

방사선조사에 의하여 유도된 Apoptosis 과정에 대한 형태학적 및 생화학적 연구

중앙대학교 의과대학 병리학교실[†], 서울대학교 의과대학 치료방사선과학교실[‡] 및 생화학교실[§]

송계용[†] · 강성만 · 하성환[‡] · 박상철[§]

Morphological and Biochemical Study on the Processes of Apoptosis Induced by Radiation

Kye Yong Song, M.D.[†], Seong Man Kang, M.D. Seong Hwan Ha, M.D.*
and Sang Chul Park, M.D.**

Department of Pathology, College of Medicine, Chung-Ang University[†], Department of Radiologic
Therapy* and Biochemistry**, Seoul national University College of medicine

Transglutaminase(TGase) is a calcium dependent enzyme that catalyse and acyl transfer reaction forming ϵ -(γ -glutamyl)-lysine cross linkage. the major known effect of TGase is its important role in the programmed cell death manifested in the granular layer of the skin and acidophilic bodies in the viral hepatitis and neoplastic processes. The enzyme activity, immunohistochemical reaction using polyclonal antibodies against cytosolic TGase C, light and electron microscopic studies and TdT staining of the transplanted fibrosarcoma cells in C₃H mouse with radiation therapy were done. The presence of TGase was detected immunohistochemically by avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method

Apoptosis were significantly induced after irradiation dependent with time factors and irradiation doses, resulted in marked and confluent tumor cell loss. Highest activity of the cytosolic form of TGase was noted at 24 hours and decrease after then while membrane bounded form of the TGase showed no significant changes. Immunohistochemical staining revealed strong positive reaction in the sarcoma cells in diffuse fasion and around the necrotic foci in the cytoplasm. Terminal dideoxynucleotidyl transferase(TdT) staining revealed increasing numbers of apotptic cells from two hours after irradiation.

In the mechanism of decreasing tumor size and cell death in radiation therapy, apoptosis plays an important role and during that process transglutaminse might do some irreversible cross-linking effects of cytoplasmic proteins causing cell death in part. (Korean J Pathol 1996; 30: 819~829)

Key Words: Apoptosis, Fibrosarcoma, Radiation

접 수 : 1996년 3월15일, 게재승인 : 1996년 7월 23일

주 소 : 서울시 동작구 흑석동 221, 우편번호 156-070

중앙대학교 의과대학 병리학교실, 송계용

*본연구는 1993년도 교육부지원 학술조성연구비로 이루어진 것임

서 론

조직내 세포들이 죽어가는 기전은 크게 두가지로 나뉘어지고 있는데 그것은 세포사망기전으로 알려진 괴사과정(necrosis)과 최근 새로운 기전으로 대두된 apoptosis이다¹⁻⁴.

주로 독성물질들이나, 저산소증 또는 강력한 환경적 자극에 의하여 흔히 생체내에서 초래되는 괴사과정에서는 기본적으로 세포막이 파괴되고, 핵염색질이 응축되는 핵응축(pyknosis)이 일어나고, 세포내 리소솜들이 파괴되어 리소솜내 존재하는 세포분해효소들이 방출되며 본세포 및 주변세포를 파괴하여 주변에 염증반응을 초래한다. 반면에 apoptosis는 우선 세포막이나 리소솜들이 파괴되지 않기 때문에 우선 주위에 염증반응을 초래하지 않으며, 세포 내용물과 세포자체가 응축되거나, 분절되어 주위 실질세포 및 대식구에 의하여 용이하게 내입 또는 식균되어 처리된다. 이러한 apoptosis현상은 정상적인 발육과정에서 각 조직의 발육과 퇴화의 동적인 균형을 이루어 정상적인 조직 또는 장기의 구조를 형성하고 유지하는데 크게 기여하며, 최근에는 생체의 호르몬 의존성, 각종 퇴행성 변화나 암조직의 성장 및 소멸과정에서도 중요한 역할을 하는 것으로 추정되고 있다⁵⁻¹³.

그러나 이러한 apoptosis의 분자적 기전에 대해서는 아직도 명료하지 못하다. 다만 apoptosis가 초래되기 위하여는 DNA의 분절과 단백질 생합성 유도가 필요함이 밝혀졌고, 일반적인 공통지표로서 형태학적인 세포의 변화와 DNA 분절로 대표되는 생화학적인 변화가 알려져 있다. 특히 생화학적인 측면에서 독특한 현상으로는 핵 DNA의 변화로서 apoptosis과정에서 nucleosome들을 연결하는 DNA들이 Ca^{++} 이온, Mg^{++} 이온 의존형 endonuclease에 의하여 끊어져서 기본단위가 180 bp인 DNA분절들이 생성됨이 agarose 전기영동상에서 관찰된다는 사실은 이미 잘 알려져 있다^{9,14-17}. 또한 이러한 과정에 단백질 생합성 억제제인 cycloheximide 등을 사용하면 이러한 apoptosis가 저해됨이 구명되어, 이러한 일련의 변화들은 apoptosis과정에 새로운 기능 단백질의 유도가 매우 중요한 근거로 거론되어 왔다¹⁷.

Apoptosis의 여러가지 공통적 생화학적 기전 가운데 transglutamination(이하 TGase로 약) 반응이 특별한 관심을 끌고 있다. TGase의 생리적 기능을 구명하는 연구과정에서 간조직의 암화과정 등에서 나타나는 전암성 병변 부위에 다량의 apoptotic body가

나타나고, 이러한 부위에 TGase가 현저하게 높게 출현되어, TGase발현은 암화과정 또는 암조직에서 apoptosis 유도는 암화를 억제하거나 암성장을 저지시킬 수 있는 새로운 가능성을 내포하고 있다고 추정되고 있다^{2,6}. 그러나 이러한 예비적 연구성과에도 불구하고 아직도 TGase를 유도시킬 수 있는 여건에 대한 분석도 충분하지 못하며, 그 생리적 의의에 대한 연구도 부진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 apoptosis를 유발할 수 있는 가장 명확한 요인으로 알려진 방사선 조사에 의하여 마우스에 이식한 섬유육종에서 초래되는 변화를 광학현미경적, 전자현미경적 및 면역조직화학적 변화와 생화학적 변화를 관찰하여 TGase와 apoptosis의 관련성과 섬유육종의 방사선 조사에 의한 암종괴의 축소기전을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 섬유육종

실험동물은 서울대학교 의과대학 암연구소내 방사선 생물학 연구실의 항온, 항습 및 무균설비가 갖추어진 무균동물실에서 번식되고 있는 C3H마우스를 사용하였다. 실험동물은 생후 10~14주, 체중 20~25 gm의 마우스를 사용하였으며 동물수는 30마리를 사용하였다. 모델종양으로는 C3H마우스에서 자연발생하여 동종이식을 통해 유지되고있는 섬유육종(fibrosarcoma, FSaII)을 사용하였다.

2. 섬유육종의 마우스 이식

C3H마우스로부터 무균상태에서 외과적으로 종괴를 얻은 다음 작은 가위로 잘게 썰어 미세절편을 만든 후 Hank's balanced salt solution(HBSS: Gibco, U.S.A.)과 0.5% trypsin(Gibco, U.S.A.)을 4:1로 섞은 용액을 가하고 mesh로 여과하여 단일 종양세포 혼탁액을 얻었다. trypsin의 작용을 중지시키기 위하여 calf serum(Gibco, U.S.A.)을 1:10으로 첨가하여 혼합한 후 1,000rpm으로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 이 단일 세포 혼탁액의 viability는 trypan blue exclusion법으로 측정하였으며 여러번의 회석을 통하여 필요한 세포농도를 얻은 다음, 10^3 개의 암세포와 치사선량인 120Gy의 방사선 조사를 받은 2×10^3 개의 feeder cell을 혼합하여 접종물의 양이 5 μ l가 되도록한 후 미세주사기(Hamilton, U.S.A.)로 마우스에 우측하지 근육에 이식하였다.

3. 방사선 조사방법 및 조사량

섬유육종의 크기가 직경 1 cm에 도달하였을 때 방사선을 조사하였다. 실험동물용 방사선 조사기인 Cs-137 irradiator(Mark type I, Shepherd, U.S.A.)를 사용하여 3×3 cm크기의 조사야로 1회 10 Gy 또는 20 Gy를 종양부위에 국소적으로 조사하였으며, 선량률은 분당 4.581 Gy였다. 마우스는 마취하지 않은 상태에서 고정 가능한 알루미늄판에 고정하여 무균상태를 유지하도록 특수 제작된 밀폐된 알루미늄 상자에 넣어 실온에서 방사선 조사를 하였다.

4. 생화학적 및 병리학적 분석

1) 실험군: 실험동물은 각 군당 2마리 총 18마리가 사용되었으며 방사선 조사량에 따른 차이점을 관찰하기 위하여 10 Gy 조사군과 20 Gy 조사군으로 나누고 조사후 7일에 도살하였다. 또 apoptosis의 과정을 위하여는 20Gy를 조사하였다. 모든 동물은 동일한 양의 방사선 양(20 Gy)을 조사하고 대조군, 30분, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 72시간, 5일, 7일 등 시간경과에 따라 종양조직내 형태학적 및 생화학적으로 TGase변화를 분석하였다.

2) 조직의 처리: 적출된 조직은 효소분해를 위하여서는 시료를 완충액 (50 mM HEPeS pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM leupeptin)에서 2회 세척 후, 동 완충액내에서 polytron homgenizer를 이용하여 분쇄한 다음 1,000 xg에서 10분 원침하여, 상청액을 다시 100,000 xg에서 1시간 원침한 상청액을 세포질형 TGase를 위한 cytosol 분획으로, 침사를 막결합형 TGase를 위한 particulate 분획으로 이용하였다. 또 병리조직학적 검색을 위하여는 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정후 75%에서 100%알코올에 이르는 단계별 탈수과정과 자일렌의 청명과정을 거쳐 파라핀 포매하였다. 그후 5 μm로 박절하여 H&E 염색을 실시하고 광학현미경으로 검색하였다. 세포 및 조직의 시간경과에 따른 변화와 apoptosis를 비교 관찰하였다. 전자현미경적 검색을 위하여는 조직을 1 또는 2 mm³ 되게 절편을 만든 후 2.5% glutaraldehyde용액에 고정하고 하루가 지난후 1% Osmic acid에 후고정하였다. 그후 75%에서 100%알코올에 이르는 단계별 탈수과정과 프로필렌의 청명과정을 거쳐 epon에 포매하였다. 투과전자현미경은 JEOL 200CX로 관찰하였다.

3) 면역조직화학적 분석: 면역면역화학적 분석을 위하여서는 파라핀 포매된 조직을 다시 5 μm의 박

편을 만들어 통상적인 면역조직화학적 방법인 ABC법(avidin-biotin complex method)으로 염색하였다. 본 분석에 사용하는 일차항체는 서울대학교 생화학 교실에서 조제한 가토기원의 다크론성 TGase C항체를 이용하였다. 또한 이차 및 삼차항체로서는 LSAB kit (Dako Co.) 내 포함되어있는 바이오틴이 결합된 이차항체와 삼차항체인 ABC복합체(avidin-biotin-peroxidase complex)를 결합시켰고 Tris완충액으로 수세한 후 과산화수소와 diaminobenzidine(DAB)의 혼합용액 내에서 갈색으로 발색반응을 일으켰다. 대조 염색은 Harris Hematoxylin으로 하였고 balsam으로 봉입하였다.

4) Transglutaminase(TGase)활성도 측정: 시료중의 TGase활성은 radio-labeled C¹⁴ putrescine의 incorporation정도로 분석한다. 즉 0.5 μCi의 C¹⁴ putrescine, 50 mM tris acetate buffer (pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM CaCl₂, 1 mM DTT, 0.15 M NaCl, 0.5% lubrol)에 시료를 넣어 30분 incubation 후, 10% TCA용액으로 반응을 정지시키고, GF/A filter로 여과하여 5% TCA용액으로 2회이상 세척후 β-scintillation counter로 방사능을 측정하여 비교한다.

5) Terminal dioxynucleotidyl transferase(TdT)염색: 파라핀포매된 조직을 5 μm로 박절후 탈파라핀을하고 합수시킨다. proteinase K(20 μg/ml)를(15분간) 처리하고 수세한다. 그후 3%H₂O₂를 처리하고 수세한다. TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)buffer (30 mM Trisma base, 140 mM sod. cacodylate, 1mM cobalt chloride 혼합액)에 10분간 처리한후 TdT (150 μl), BrdU (500 μl)와, RPMI (200 μl)을 혼합한 용액에서 40°C에서 2시간 incubation한다. Tris buffer로 수세하고 anti-BrdU antibody를 처리한다. 그후 수세하고 이차 및 삼차항체를 처리하고 DAB로 발색하였다. 대조염색은 Harris hematoxylin으로 하였다¹⁸.

결 과

1. 방사선조사 용량에 따른 변화

1) Transglutaminase 활성도 변화: 방사선조사 용량을 10 Gy와 20 Gy투여한 군에서 대조군에 비하여 TGase 활성도 (cpm/200 μg protein)는 상청액에서 세포질형(cytosolic form)이 트롬빈 처리전에는, 각각 1447, 2282, 1867 cpm/200 μg protein으로 증가하는 경향이 있었으나 트롬빈 처리후 활성도는 각각 7,364, 8,705, 7,122 cpm/200 μg protein으로 각군간에 유의한 증가가 관찰되지 않았다. 막결합형(membrane bound form) TGase의 활성도가 트롬빈 처리전에는

각각 1,064, 1,588, 2,013 cpm/200 μ g protein으로 증가하는 경향이 있었으나, 트롬빈 처리후에는 각각 3,518, 3,901, 3,334 cpm/200 μ g protein로 역시 각 군간에 유의한 증가는 없었다(Table 1, Fig. 1).

2) 병리학적 변화: 대조군에서는 종양괴사가 관찰되지 않았고 산별적인 apoptosis를 관찰할 수 있었으나 방사선 조사후 실질 조직내에서 심한 괴사 및 apoptosis가 발생되었고 혈관주변의 종양세포는 남아 있었다. 방사선 조사량이 10 Gy 보다는 20 Gy에서 좀더 심한 괴사가 동반되었으며 20 Gy 조사 종괴에서 다소 강한 경향은 있으나 방사선 조사량에 따른 차이가 현저하지 않았다(Fig. 2).

2. 방사선조사후 apoptosis의 변화

1) 광학현미경적 변화: 20 Gy 조사후 30분 경과후

Table 1. Changes of activity of transglutaminase in transplanted fibrosarcoma tissue with radiation (cpm/ 200 μ g protein)

| Thrombin | Cytosolic TGase in Supernatant | | Membrane bound TGase in Precipitate | |
|----------|--------------------------------|------|-------------------------------------|------|
| | - | + | - | + |
| Control | 1447 | 7364 | 1064 | 3518 |
| 10Gy | 2282 | 8705 | 1588 | 3901 |
| 20Gy | 1867 | 7122 | 2013 | 3334 |

에 섬유육종내 소수의 응축된 섬유육종 세포를 관찰할 수 있었고 소수의 apoptosis가 관찰되었다. 2시간 경과후에도 30분과 거의 유사하였다. 6시간, 12시간과 24시간 경과후에는 2시간군에 비하여 염증세포의 침윤과 apoptosis가 좀더 증가하였으나 아직은 국소적 또는 광범위한 세포의 소실은 관찰할 수 없었다. 72시간에 염증세포의 침윤과 apoptosis가 좀더 증가하여 이때부터 국소적으로 군집한 apoptosis 부위를 관찰할 수 있었다. 5~7일에는 광범위한 apop-

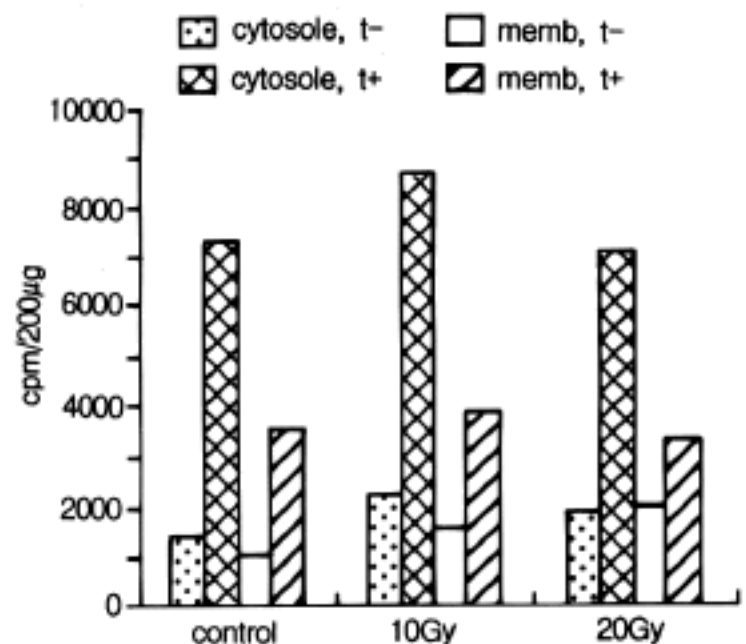


Fig. 1. Extensive apoptosis of the tumor after 10 Gy(A) and 20 Gy(B) irradiation with perivascular viable fibrosarcoma cells(A)

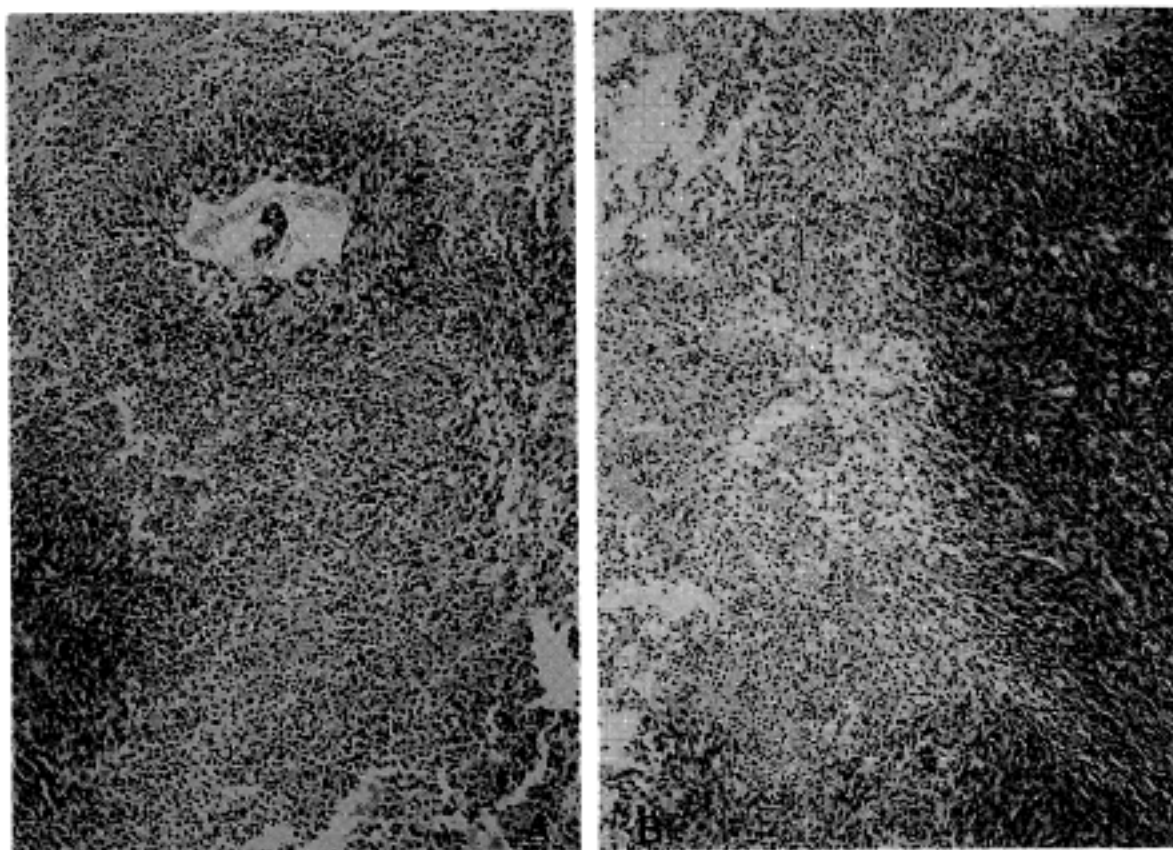


Fig. 2. A few individual apoptotic cells are noted in 2 hours(A) and extensive apoptosis of the tumor cells in 7 days(B) after 20 Gy irradiation.

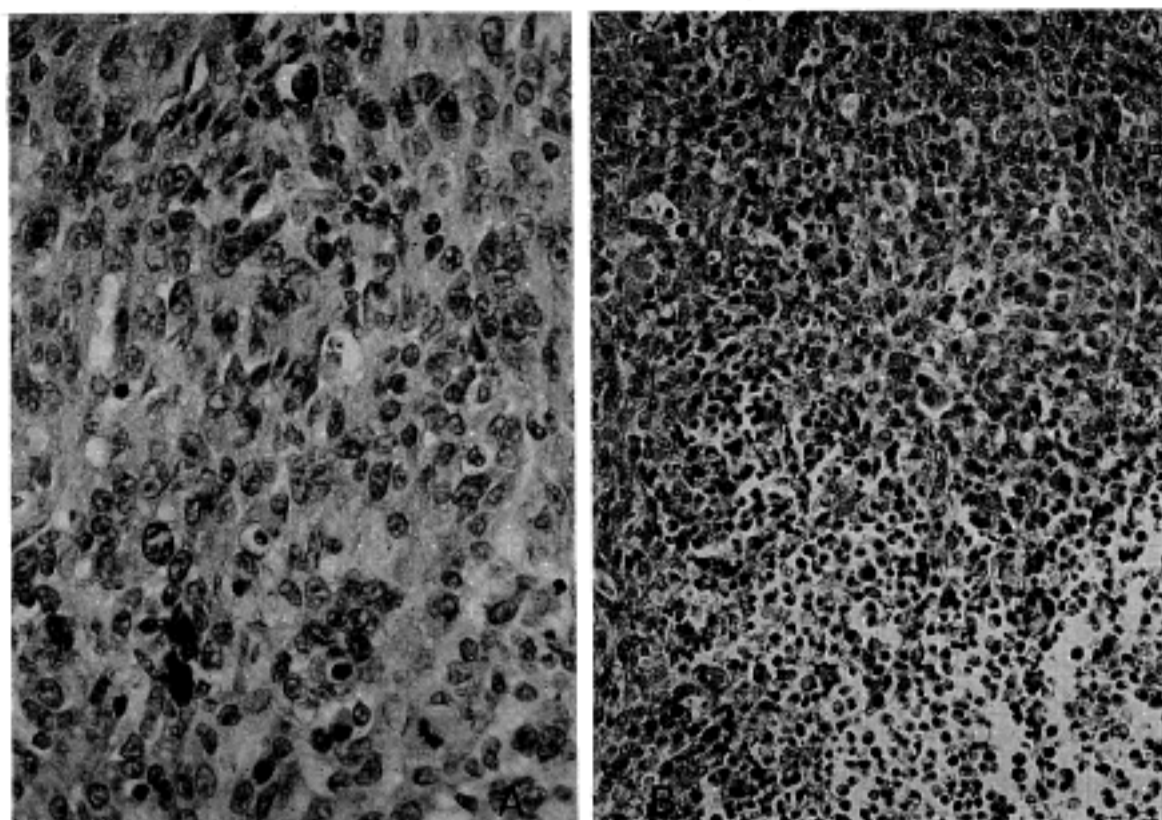


Fig. 3. A few pyknotic tumor cells (right side) are noted in 30 minutes after 20 Gy radiation on the tumor (Uranyl acetate-lead citrate, x 4000)

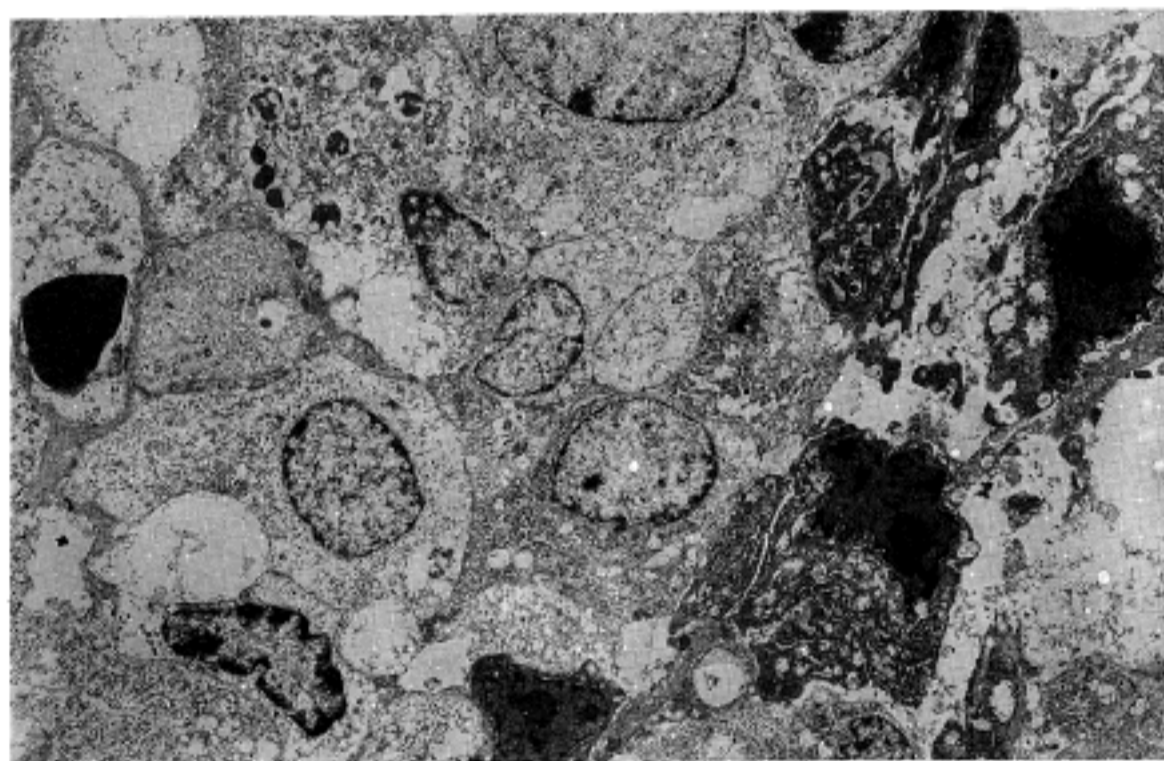


Fig. 4. Margination of chromatin and partial chromatolysis of the nuclei are noted in 24 hours after 20 Gy radiation (Uranyl acetate-lead citrate, x 5,400)

apoptosis에 의한 세포의 소실을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

2) 전자현미경적 관찰: 20Gy조사후 30분에 섬유육종에서는 극히 드물게 핵이 용해된 괴사세포, apoptosis 그리고 소수의 응축된 육종세포를 관찰할 수 있었다. 즉 세포핵은 핵염색질의 응집 및 핵막으로의 이동이 관찰되었고 세포막은 잘 유지된 상태로 관찰되었으며 일부세포는 세포질의 분절도 관찰되어 전형적인 apoptosis를 일으키고 있음을 관찰할 수 있었다. 2시간 경과후에도 30분후와 거의 유사하였

다. 6~24시간부터 apoptosis가 현저히 증가하기 시작하였으나 아직은 국소적이었고 광범위한 괴사는 관찰할 수 없었다. 5~7일에는 apoptosis가 현저히 증가하여 국소적 또는 광범위한 apoptosis를 관찰할 수 있었다(Fig. 4, 5, 6, 7).

3) 면역조직화학적 검색: 20Gy조사후 30분에서 24시간까지 apoptosis가 다수 관찰되기 전에는 TGase에 대한 면역조직화학적 염색소견상 특이성이 없이 육종세포내질에 진한 갈색으로 염색되었다. 72시간에서 7일까지 괴사 또는 apoptosis가 많이 관찰되는 시

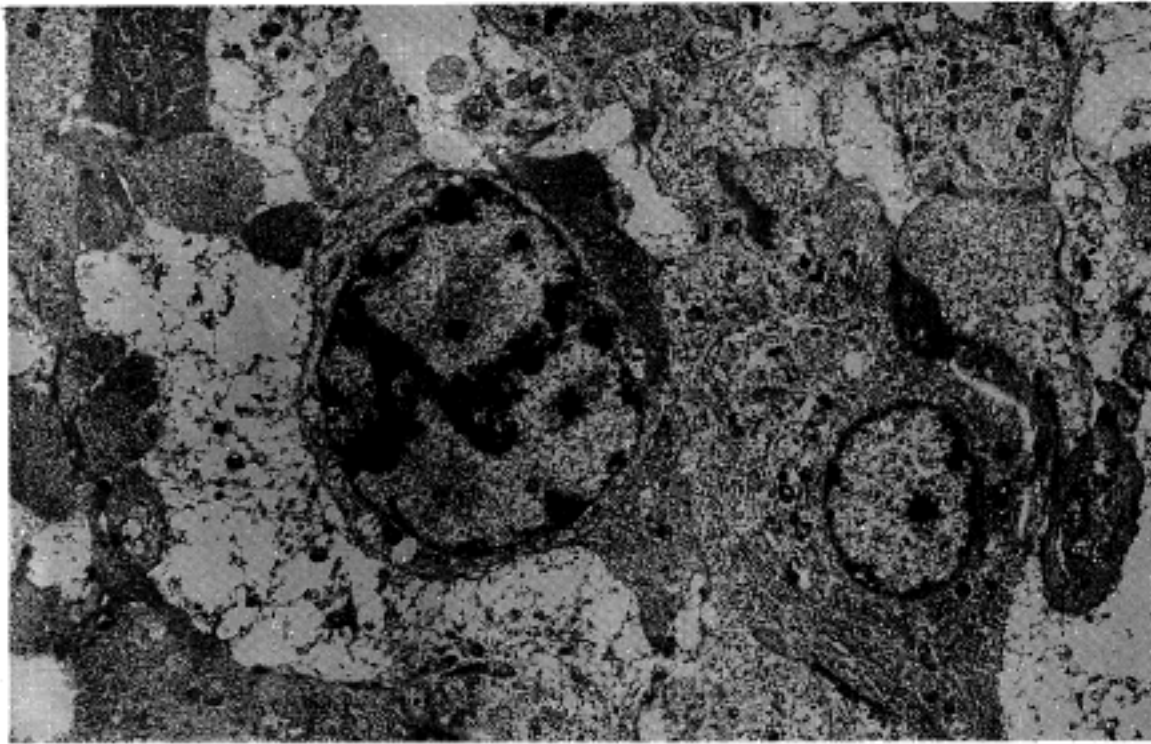


Fig. 5. Intracellular apoptotic body are noted in 24 hours after 20 Gy radiation (Uranyl acetate-lead citrate, x 20,000)

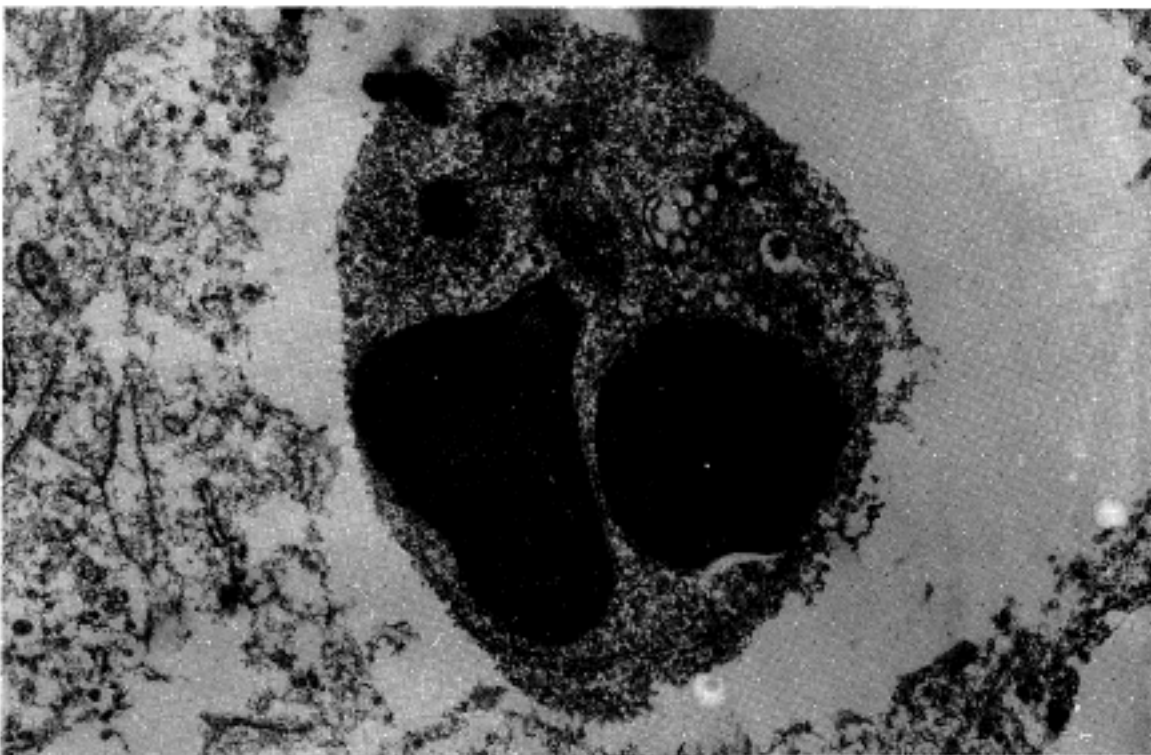


Fig. 6. Many early and later stages of apoptotic bodies are noted in 5 days after 20 Gy radiation (Uranyl acetate-lead citrate, x 5,400)

기에도 염색성의 특이성을 관찰할 수는 없었다. 초기에는 전반적인 세포에서 양성으로, 후기에는 염색되지 않는 세포도 혼재하는 양상으로 관찰되었으며, 피사주변의 세포가 좀 더 강한 양성반응을 나타내는 경향은 관찰할 수 있었다.

4) TdT염색 결과: 20 Gy 조사후 30분에 섬유육종 세포에서는 TdT에 강하게 염색된 세포수가 거의 관찰되지 않았다. 2시간에 국소적인 TdT 염색된 세포수를 관찰할 수 있었다. 그후 점차 TdT 염색된 세포수가 증가하는 경향이 있었다. 그러나 5~7일에도

TdT 염색된 세포수가 다수 증가하는 경향은 있었으나 그 증가는 현저하지는 않았다. 그러나 apoptosis가 많이 일어나 광범위한 세포의 사망이 관찰되는 부위 즉 완전히 사망한 세포에서는 염색을 관찰할 수 없었다(Fig. 9).

3. TGase 활성도 변화

20 Gy 조사후 30분에서 72시간 경과하는 동안 TGase의 활성도변화를 관찰한 결과 TGase 활성도는 세포질형(cytosolic form)이 30분에 4,576 cpm/200 μ g

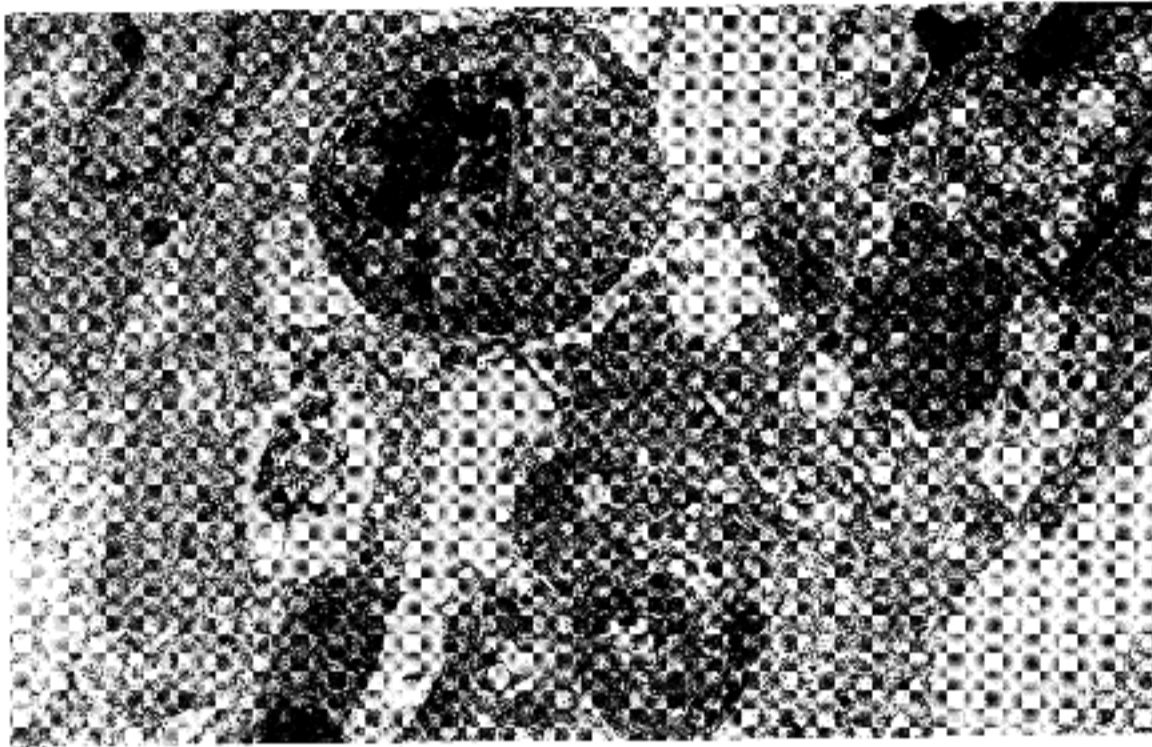


Fig. 7. Fibrosarcoma cells are stained positively with anti-TGase antibody and also in some apoptotic bodies and focal cell death are noted in 72 hours(A) and confluent area of apoptosis with basically same stainability of tumor cells in 7 days(B) after 20 Gy radiation (Immunostain method for TGase C)

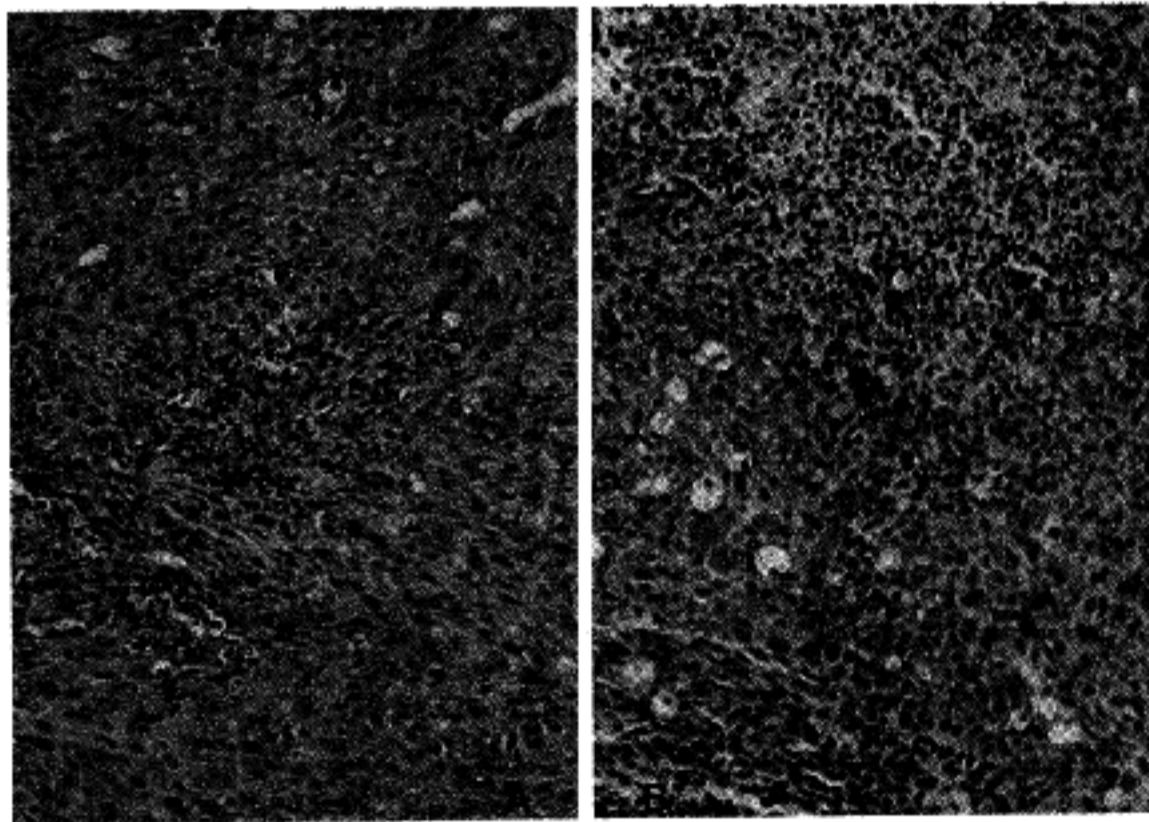


Fig. 8. A few apoptotic bodies with positively stained by anti-TdT antibody are noted in 2 hours(A) and confluent cell death and a few apoptotic bodies and negative in fragmented cells in 5 days after 20 Gy radiation (Immunostain for TdT)

protein, 2시간에 6,970 cpm/200 μ g protein으로 다소 증가하였으나 24시간에 높은 활성도를 나타내어 13,199 cpm/200 μ g이 되었고 72시간 후에 3,240 cpm/200 μ g protein, 5일후에는 4,453 cpm/200 μ g protein 그리고 7일후에는 2,283 cpm/200 μ g protein으로 감소하는 활성도를 관찰할 수 있었다.

20 Gy조사후 30분에서 72시간 경과하는 동안 TGase의 변화를 관찰한 결과 TGase 활성도는 막결합형(membrane bound form)이 30분에 6,554 cpm/200

μ g protein, 2시간에 6,607 cpm/200 μ g protein으로 다소 증가하였으나 24시간에 가장 높은 활성도를 나타내어 8,357 cpm/200 μ g protein이 되었고 72시간이 후에 5,998 cpm/200 μ g protein, 5일후에는 6,971 cpm/200 μ g protein 그리고 7일후에는 6,170 cpm/200 μ g protein으로 감소하는 경향의 활성도를 관찰할 수 있었다(Table 2, Fig. 10).

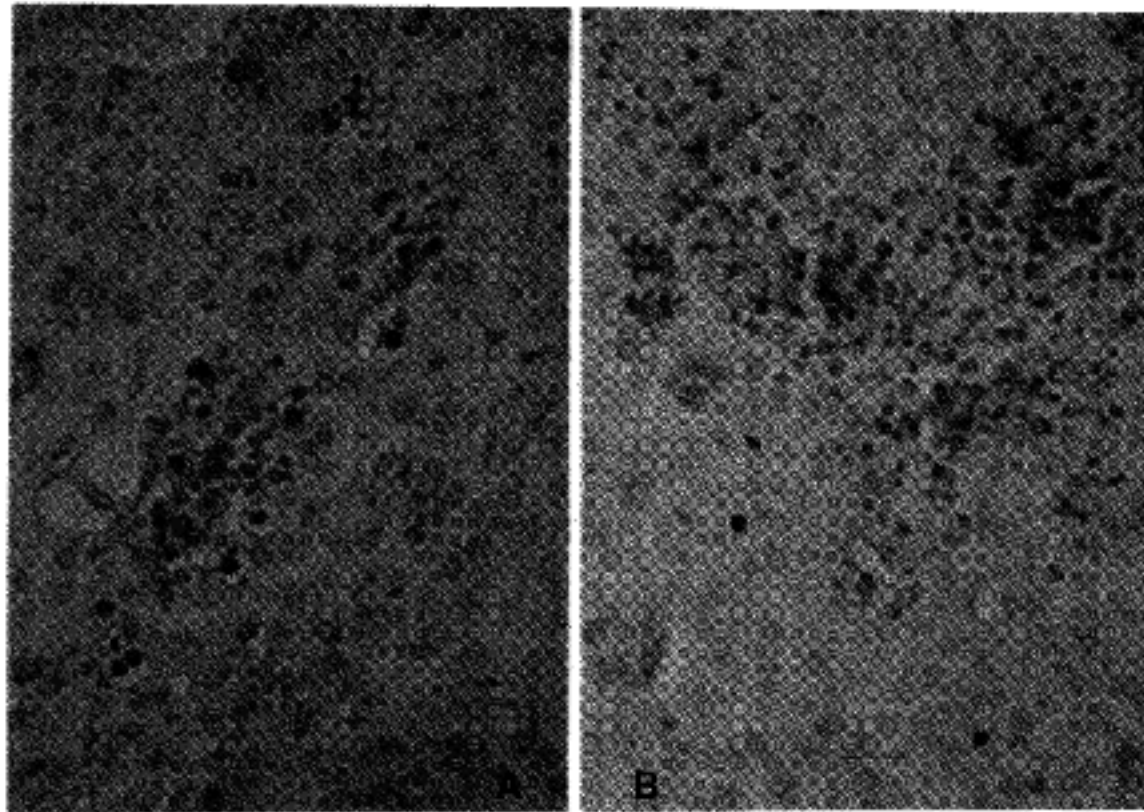


Fig. 9. A few apoptotic bodies with positively stained by anti-TdT antibody are noted in 2 hours(A) and confluent cell death and a few apoptotic bodies and negative in fragment cells in 5 days after 20 Gy radiation (Immunostain for TdT).

Table 2. Sequential changes of activity of transglutaminase after radiation(20 Gy) to transplanted fibrosarcoma (cpm/200 µg protein)

| | Cytosolic TGase in Supernatant | Membrane bound TGase in Precipitate |
|----------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Thrombin | + | + |
| Control | 3,256 | 7,433 |
| 30 min | 4,576 | 6,554 |
| 2 hrs | 6,970 | 6,607 |
| 6 hrs | 4,658 | 5,851 |
| 12 hrs | 3,405 | 3,107 |
| 24 hrs | 13,199 | 8,357 |
| 72 hrs | 3,240 | 5,998 |
| 5 day | 4,453 | 6,971 |
| 7 day | 2,283 | 6,170 |

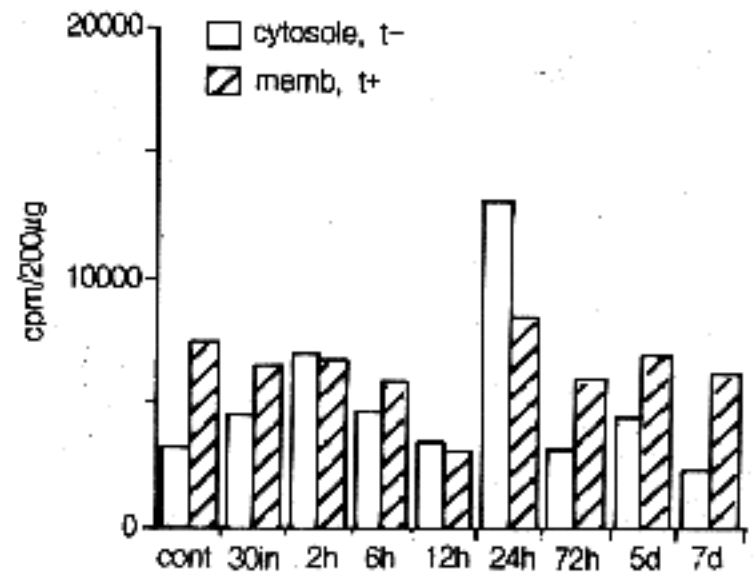


Fig. 10. Sequential changes of activity of transglutaminase in transplanted fibrosarcoma after radiation. cytosole,t-: cytosolic transglutaminase activity with thrombin memb,t+: membrane bound transglutaminase activity with thrombin.

고 찰

Apoptosis과정에 관련되어 최근 각광을 받고 있는 apoptosis단백질로는 TGase와 Fas가 있다^{19~21}. 이중 Fas는 아직도 그 기능을 명확하게 이해하지 못하고 있는 세포막성분질로 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 수용체 또는 신경성상인자 수용체(nerve

growth factor receptor, NGFR)와 구조적 상동성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 TGase는 단백질분자 상호간은 glutamine 잔기와 다른 단백질의 lysine 잔기의 isopeptide 결합을 형성하여 단백질분자들간의 공유결합성 교차 결합효소로 잘 알려져 왔다^{21,22}. 특히 TGase의 주된 기능은 단백질 분자들을 교차결합시키는 역할이므로, 이러한 효소의 활성화는 apoptosis 과정중에 나타나는 세포막의 전교상,

세포내 소기관들의 응축과 내용물의 방출이 억제되는 현상을 설명하는데 매우 합목적인 것으로 이해되어 크게 각광을 받고 있다^{20,21}. 따라서 암화과정 또는 암조직에서 apoptosis 유도는 암화를 억제하거나 암성장을 저지 시킬 수 있는 새로운 가능성을 내포하고 있다고 추정되고 있다²⁶.

세포사망에 대한 기전으로서 apoptosis는 괴사와 구별되어, 세포가 생존하는 환경에서 특정한 세포내외적 자극에 따라, 유전자 표현을 통하여 죽음에 이르는 과정으로 생체의 균형을 유지하는데 꼭 필요한 기능이며, 유핵세포사망의 가장 중요한 형식이다. 이러한 apoptosis는 형태발육과정(morphogenesis), 조직의 이차적인 위축(atrophy), 배아형성(embryogenesis) 과정에 나타나서 중요한 역할을 하며, 사이토카인(cytokine), 림프독소(lymphotoxin), glucocorticoid 및 화학요법제 치료 후 종양퇴행시에도 나타난다고 알려지고 있다^{7,8,15,23}.

Apoptosis과정은 주로 형태학적 측면에서 연구되어 왔으나, 분자적 측면에서는 apoptosis과정 중 nucleosome사이의 DNA 사슬이 끊어지는 현상에서 Ca^{++} Mg^{++} 의존성 endonuclease의 역할이 중요하다고 알려져 있다. 이러한 Ca^{++} signal의 참여는 Ca^{++} chelator의 첨가, 또는 phorbol ester를 이용한 protein kinase C의 활성화를 통하여 억제될 수 있다는 점에서 크게 각광을 받고 있다^{18,23-25}. 또한 거세(castration)후 일어나는 전립선의 퇴축(involution)현상에서는 TRPM-2 (testosterone repressed prostate message-2) 유전자와 c-fos, c-myc 등 암유전자 발현이 증가됨이 보고되어 관심을 끌고 있다²³. 이러한 apoptosis의 분자적 기전을 위한 노력으로는 림프구는 glucocorticoid에 의하여 용이하게 apoptosis가 유도되기 때문에 이를 대상으로 한 연구가 비교적 심도 깊게 진행되었다^{5,25,26}. 특히 T-림프구는 흉선의 생리적 퇴축과 더불어 apoptosis의 좋은 모델로 연구되어 왔으며, glucocorticoid, Ca^{++} ionophore 처리, T cell receptor 자극, 방사선조사, adenosine투여, 세포내 cAMP 증가, toxin 투여 등이 apoptosis를 유도하여, 이 과정은 주로 Ca^{++} 이용계, 또는 poly ADP-ribosylation 과정을 통하여 매개되는 것으로 추정되고 있다²⁵⁻²⁷.

그러나 이와 같은 다양한 연구에도 불구하고 아직도 apoptosis의 기전에 대한 연구는 매우 답보상태이다. 특히 apoptosis의 공통적 특성으로 거론되는 Ca^{++} 의존성 endonuclease 활성화에 의한 DNA ladder pattern의 연구는 동 endonuclease가 아직도 충분히 연구되어 있지 못하여 한계점에 이르고 있으나 새로운 지표로 거론되는 TGase는 효소적 특성이 비교

적 명확하게 연구되어 그 생리적 의의를 apoptosis와 연관시키기 용이하다고 사료된다. TGase가 apoptosis와 연관되기는 lead nitrate 등의 mitogen으로 간세포 증식을 유도한 다음, 이들이 퇴축되는 과정에 apoptotic body가 증가되고, TGase 활성이 증가됨에 따라 각광을 받기 시작하여 근자에 널리 연구되고 있다²⁰. 그러나 이러한 TGase는 조직에 따라 동종효소의 분포가 다르며, 대부분의 조직에 함유한 TGase C (type II TGase)와 각질형성세포에 존재하는 TGase K (type I TGase)만이 종래 주로 연구되어 왔다. 특히 apoptosis와 관련하여서는 TGase C의 발현이 강조되어 왔으나, 피부조직에 독특한 분자량 77 kDa의 TG E (type III TGase)의 존재가 구명되어 동효소가 피부조직의 발달에 따른 programmed cell death의 가장 중요한 지표임이 보고된 바 있다^{21,22}.

방사선 조사후 발생하는 세포의 손상 정도는 조직에 따라 다르며 생식계 세포 또는 증식성 세포에서 나타나며 또 휴지기 세포에서 나타난다. 비장과 림프절내에 용해성의 polydeoxyribonucleotides가 방사선 조사량 의존성으로 축적되는 현상이 휴지기의 세포의 방사선 조사에 의한 사망의 기전으로 생각되고 있는데 이물질은 염색질의 분해산물이며 히스톤과 함께 DNA에 결합되어 복합체를 이루게 되는데 이러한 현상은 방사선 조사후 뿐만 아니라 세포 독성을 야기할 수 있는 스트레스 즉 glucocorticoid 치료시에도 림프구에서 관찰된다고 보고되고 있다^{14,28}.

본연구에서 초기단계 즉 방사선 조사후 30분후에는 강하게 염색되는 세포가 없었으나 시간이 경과되며 TdT에 강하게 염색되는 세포가 출현하다가 그 후 서서히 감소되며 apoptosis body의 광범위한 출현과 함께 핵에서의 TdT염색은 감소하여 전상적인 세포에서는 감소되는 경향이 있었다. 이것은 종양내 일부의 세포는 apoptosis에 의하여 세포가 죽음이 일어나면 남아있는 세포는 증식능이 다시 증가하는 것으로 생각되는 결과라고 생각되었다²⁹. 그러한 경향은 TGase가 초기에 증가하다가 점차 감소하는 경향과 관련성이 있을 것으로도 추정되었다. 이것은 암세포의 강한 증식력과도 관련이 있으리라고 추측되었다. 이것은 발암 촉진제를 투여함으로써 방사선 조사후 발생하는 apoptosis를 감소시킬 수 있었다는 보고와 일치되는 소견으로 생각된다³⁰.

흉선세포의 염색질의 분해(degradation)는 방사선조사후 1~2시간 지난후에 나타나기 시작하며 8~10시간후에 최고치를 나타내며 24시간까지 지속되었고 버킷림프종에서는 γ -방사선조사후 72시간까지 DNA 분절이 계속 증가되었다는 보고와 일치하는

소견이라고 할 수 있겠다²⁸. 본 연구에서도 TGase와 apoptosis가 24시간에 최고치가 되었으나 그 후 효소의 활성도는 감소되는 현상이 있었으나 apoptosis는 시간 경과에 따라 계속 증가하여 점차 광범위한 세포의 죽음과 소실을 일으키는 것과 유사하리라 추측된다. 또 방사선 조사에 의해 발생한 apoptosis는 전자현미경 관찰에 의한 형태학적인 구조로 확인되고 있다³¹. 따라서 방사선 조사시 섬유육종 세포에서 발생하는 apoptosis의 기전을 유추해 볼 때 TGase 활성도와 apoptosis 발생 정도 사이에는 정확히 비례 관계에 있지는 않았으나 방사선 조사후 다소 증가하는 경향이 있어 방사선 조사에 의한 섬유육종 세포의 apoptosis 기전은 TGase 뿐만 아니라 방사선의 물리적인 작용에 의한 용해성의 polydeoxyribonucleotides 등이 핵내에 축적되는 현상이 복합적으로 작용하여 일어날 것으로 추정되었으며 앞으로 좀 더 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

방사선 조사에 의한 암의 치료과정에서 발생하는 기전과 apoptosis와의 관련성을 구명하기 위하여 C3H 마우스에 이식된 FSaII세포주가 만든 섬유육종을 이용하여 방사선 조사에 의한 육종의 감축 과정의 변화를 세포사망 기전중의 하나인 apoptosis과정과 관련된 형태학적 변화를 병리조직학적인 방법과 Transglutaminase(이하 TGase) 효소의 생화학적인 및 면역조직화학적 변동을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Apoptosis 현상이 방사선조사후 섬유육종세포에서 관찰되었고 5~7일후에 비교적 광범위한 apoptosis를 동반한 세포의 소멸을 관찰할 수 있었다. 시간이 경과됨에 따라 그현상은 증가되었다. TGase의 활성도 변화는 세포질형이 24시간에 가장 높은 활성도를 나타내었고 그 이후 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다. 그러나 막결합형 TGase의 활성도는 큰 변동이 없었다. TGase의 면역조직화학적 염색으로는 섬유육종세포에서 전반적으로 중등도 내지 고도의 양성 반응을 나타냈으나 괴사 주변부의 세포에서 좀더 강한 염색성이 있음이 관찰되었다. 그러나 음성의 반응을 나타내는 세포 수도 점차 증가하였다. TdT염색에서는 apoptosis를 일으킨 apoptotic body에서는 양성으로 관찰되었으나 세포의 사망과정이 완전히 끝난 세포에서는 음성이었다.

그러므로 섬유육종의 방사선 조사에 의한 종괴 축소의 기전으로 apoptosis기전을 통한 세포소멸이

중요한 기전인 것은 형태학적으로 증명되었으며 생화학적으로는 세포질형 TGase가 이 과정에 일부 관련이 있는 것으로 추정되었다.

참 고 문 헌

1. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984; 2: 67-77
2. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Coni PP, et al. Occurrence of cell death(apoptosis) during the involution of liver hyperplasia. *Lab Invest* 1985; 52: 670-5
3. Stacey NH, Bishop CJ, Halliday JW et al. Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity. *J Cell Sci* 1985; 74: 169-79
4. Wyllie AH. Apoptosis. *Br J Cancer* 1993; 67: 205-8
5. Harmon JM, Normal MR, Fowlkes BJ, Thompson EB. Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line. *J Cell Physiol* 1979; 98: 267-78.
6. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DSR. Occurrence of cell death(apoptosis) in preneoplastic and neoplastic liver cells. A sequential study. *Am J Pathol* 1984; 116: 441-6
7. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis : The role of the endonucleases. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608
8. Bandyk MG, Sawczuk IS, Olsson CA, Katz AE, buttyan R. Characterization of the products of a gene expressed during androgen programmed cell death and their potential use as a marker of urogenital injury. *J Urol* 1990; 143: 407-12
9. McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M.: Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J Immunol* 1990a; 145: 1227-1230
10. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 1990; 343: 170-3
11. Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, and Hsueh AJW. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinol* 1991; 129: 2799-801
12. Williams GT. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65: 1097-8
13. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues-an overview.

- Cancer Metast 1992; 11: 95-103
14. Alnemri ES, Litwack G. Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. *J Biol Chem* 1990; 265: 17323-33
 15. Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 786-9
 16. Zakeri ZF, Quaglino D, Latham T, Lockshin RA. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J* 1993; 7: 470-8
 17. Oppenheim RW, Prevette D, Tytell M, Homma S. Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in-vivo requires protein and RNA synthesis. Evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol*. 1990; 138: 104-13
 18. Wijisman JH, Jonker RR, Keijzer R et al. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41: 7-12
 19. Fesus L, Thomazy V. Searching for the function of tissue transglutaminase: Its possible involvement in the biochemical pathway of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol* 1988; 231: 119-34
 20. Fesus L, Thomazy U, Falus A. Induction and activation of tissue glutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 1987; 224: 104-8
 21. Park SC, Lee MC, Kim SH, Choi KH, Song KY, Kimm SW. (1991) Changes of transglutaminase activities in the process of regeneration and carcinogenesis of rat liver tissues. *Kor J Biochem* 1991; 23: 39-46
 22. Kim HC, Levis MS, Gorman JJ et al. Protransglutaminase E from guinea pig skin-isolation and partial characterization. *J Biol Chem* 1990; 265: 21991-78
 23. Buttyan R, Olsson CA, Pintar J et al. Induction of the TRPM 2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3473-81
 24. Duk, RC, Chervenak R, Cohen JJ. (1983) Endogenous endonuclease induced DNA fragmentation: An early event in cell mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 6361-65
 25. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of calcium dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1983; 32: 38-42
 26. Brown DG, Sun XM, Cohen GM. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* 1993; 268: 3037-9
 27. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57
 28. Umansky SR. Apoptotic process in the radiation-induced death of lymphocytes. In *Apoptosis: The molecular basis of cell death*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1991; pp193-208
 29. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501
 30. Tomei LD, Kanter P, Wenner CE. Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem. Biophys Res Commun* 1988; 155: 324-31
 31. Kohler HR, Dhein J, Alberti G, Krammer PH. Ultrastructural analysis of apoptosis by the monoclonal antibody anti-APO-1 on a lymphoblastoid B cell line(SKW 6.4). *Ultrastruct Pathol* 1990; 14: 513-8
-