대한방사선종양학회지 2001;19(3):259 264

방사선에 의해 흰쥐 소장에서 발생되는 세포고사 및 유사분열사

인제대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 서남대학교 병리학교실†

최영민* ·이지신† ·조흥래*

목 적 : 방사선에 의한 급성 손상으로 소장 음와에서 발생되는 세포고사와 유사분열사의 발생 정도를 시간 경과에 따라서 조사하고자 하였다.

대상 및 방법 : 웅성 200 250 g Sprague Dawley 쥐를 대상으로 6 MV 선형가속기로 2 Gy 전신 방사선조사를 한 후, 2, 4, 8, 24, 48시간에 희생하였다. 소장 음와당 평균 세포고사 수와 유사분열 중인 세포 수의 평균을 정상 대조군과 방사선조사 후 시간대별로 측정하였다. 세포고사가 가장 현저하였던 시간대를 대상으로 In Situ End Labeling (ISEL) 법으로 염색하여 헤마톡실린 에오진 염색법과 비교하였다.

결 과 : 음와당 세포고사의 평균 빈도는 정상 대조군에서 0.14였고 방사선조사 후 2, 4, 8, 24, 48시간에 각각 1.43, 3.19, 1.15, 0.26, 0.17로, 방사선조사 후 4시간 경에 가장 많이 증가되었다가 점차 감소되어 24시간에 정상으로 회복되었다. 정상 대조군에서 1.29였던 음와당 유사분열 세포 수의 평균은 방사선조사 후 2, 4, 8, 24, 48시간에 각각 0.56, 0.47, 0.23, 0.65, 1.19로 측정되어서, 방사선조사 후 8시간까지 감소되었다가 48시간 경에 정상으로 회복되었다. 세포고사의 발생이 유사분열 세포 수의 감소보다 변화의 정도도 크고, 조기에 발생되었다. ISEL법에 의한 세포고사의 검출은 발색 시간의 조건에 따라서 위양성이 발생되었다.

결 론 : 방사선에 의한 소장의 급성 손상으로 유발되는 세포 사망은 방사선조사 후 대개 24 48시간 내에 정상치로 회복되었고, 유사분열사보다는 세포고사가 더 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

핵심용어 : 방사선, 소장, 세포고사, 유사분열

서 론

세포괴사는 많은 방사선량에 피폭되어서 발생되는 반면, 유사분열사와 세포고사는 비교적 적은 방사선량에도 발생되므로 급성 방사선 손상의 주된 기전이다. 방사선 손상 후 몇 번의 세포분열 과정을 거치고 발생되는 유사분열사에 비해, 세포고사는 이런 과정 없이 방사선조사 후 수 시간 내에 발생된다. 따라서 소장의 음와, 흉선, 타액선, 림프구 등과 같이 비교적 방사선에 민감한 조직들을 대상으로 방사선에 의한 급성 손상으로 세포고사의 발생이 많이 보고되고 있다.[1-4]

소장은 방사선에 비교적 민감한 장기로 복부나 골반 부위에 방사선치료를 하면, 소장의 손상으로 인하여 급성적으로는 방사선 장염이 발생하여서 치료 내성이 감소될 수 있고, 만성적으로는 장 손상으로 인한 합병증이 유발될 수 있다. 급성 방사선 장염은 소장 융모의 분화된 세포들보다는 약 12시간의 세포주기로 빠르게 증식하는 음와의 미분화된 세포들이 주로 손상 받아서 발생된다.[5]

본 연구에서는 방사선에 민감한 소장 상피 세포들에서 방사선조사에 의한 세포고사와 유사분열사의 발생 정도를 알아보고자, 방사선조사 후 흰쥐 소장의 음와 세포에서 세포고사의 발생 정도를 조사하였고, 유사분열 중인 세포 수의 감소를 측정하여서 간접적으로 유사분열사의 발생 정도도 조사하였다. 그리고 세포고사의 정도를 헤마톡실린 에오진 염색 소견과 in situ end labeling (ISEL)법으로 비교하였다.

이 논문은 2001년 5월 30일 접수하여 2001년 8월 11일 채택되었음.

책임 저자 : 최영민, 인제대학교 부산백병원 방사선종양학과
Tel : 051)890-6691, Fax : 051) 891-1751
E-mail : cymin@nownuri.net

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 방사선조사

체중 200 250 g의 웅성 Sprague-Dawley 흰쥐를 대상으로 실험하였다. 실험 기간 중에는 5마리씩 사육장에 넣어서 사육하였다.

한 변의 길이가 30 cm이고 높이가 7 cm이며 호흡이 가능하도록 옆면에 구멍이 많이 있는 직육면체 용기에 마취하지 않은 흰쥐를 10마리씩 넣고, 뚜껑을 덮어서 흰쥐들을 한

층으로 분포시킨 다음, 용기의 상, 하에 조직 등가물질을 3 cm씩 대고, 6 MV 선형가속기(CL2100 C/D, Varian, USA)를 이용하여 분당 500 cGy의 선량률로 용기의 위, 아래 방향에서 총 2 Gy의 전신 방사선조사를 하였다. 소장 음와의 세포 주기의 일중 변동(circadian rhythm)을 고려하여 방사선조사를 오전 8 9시 사이에 시행하였다.

2. 조직 준비

정상 대조군과 방사선조사 후 2, 4, 8, 24, 48시간대의 실험군마다 4마리씩의 흰쥐를 에테르 마취 후 희생하였다. 희생된 흰쥐의 회맹관으로부터 약 15 cm 정도에 위치한 소장의 조직을 절단하여 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직을 5 μm의 두께로 잘라서 헤마톡실린 에오진 염색을 시행하고, 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 음와당 세포고사 및 유사분열 세포의 수

세로로 절단된 음와의 한쪽 면에 위치한 세포의 줄을 '음와'로 정의하였고,[6] 내강이 있고 기저부에 Paneth 세포가 있으며 최소한 17개의 세포가 존재하는 음와를 선택하여[7] 마리당 30개씩 관찰하였다. 세포고사의 형태학적인 특징은 Kerr 등[8]과 Wyllie 등[9]이 기술한 것을 이용하였다. 각 실험군마다 음와당 세포고사의 평균값을 구하였고, 유사분열사를 간접적으로 알아보기 위하여 음와당 유사분열 세포 수의 평균값을 구하였다(Fig. 1).

4. In Situ End Labelling (ISEL)법에 의한 세포고사 염색

헤마톡실린 에오진 염색에서 세포고사가 가장 많이 관찰되었던 시간대의 조직을 대상으로 ISEL 염색을 하였다. ISEL법은 세포고사 시에 발생되는 DNA 분절의 노출된 3' 말단에 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)를 이용하여 표지된 nucleotide를 반응시키는 것으로 조직 구조를 유지한 상태에서 세포고사 염색을 실시하였다. 염색은 ApoTag (r) Plus in Situ Apoptosis Detection Kit (Oncor, Gaithersburg, MD, U.S.A)를 이용하였다. 파라핀 포매된 조직을 5 μm 두께로 절단하여 Probe-On PLUS 슬라이드에 부착시켜 건조 시킨 후 염색에 사용하였다. 절편을 탈파라핀 시킨 후 함수 시키고, 5분 동안 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 수세하고, 20 μg/mL의 proteinase K (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A) 용액에 실온에서 15분간 처치하고 증류수로 수세하였다. 그 후 내재성 peroxidase 반응을 억제하기 위하여 3% 과산화수소(H_2O_2)에 5분간 처치하고, PBS로 수세하였다. Equilibration buffer에 10 15초간 처치한 후 남아있는 buffer를 제거하고, TdT 효소와 digoxigenin-11-dUTP 및 dATP 혼합 용액에 37℃에서 1시간 30분 처리하고, stop/wash buffer에 10분간 방치하였다. Peroxidase가 부착된 항 digoxigenin 항체를 37℃에서 1시간 작용시키고 PBS로 세척하였으며, 부착된 peroxidase는 diaminobenzidine (DAB)으로 발색하였고, 대조 염색은 헤마톡실린으로 실시하였다. 양성 대조군은 이유기의 암컷 쥐의 유선(mammary gland) 절편을 사용하였고, 음성 대조군은 TdT 대신 PBS를 작용시킨 표본을 사용하였다.

결 과

1. 음와당 세포고사의 평균값

정상 대조군의 음와당 세포고사의 평균값은 0.14였고, 2 Gy 전신 방사선조사 후 2, 4, 8, 24, 48시간에서 각각 1.43,

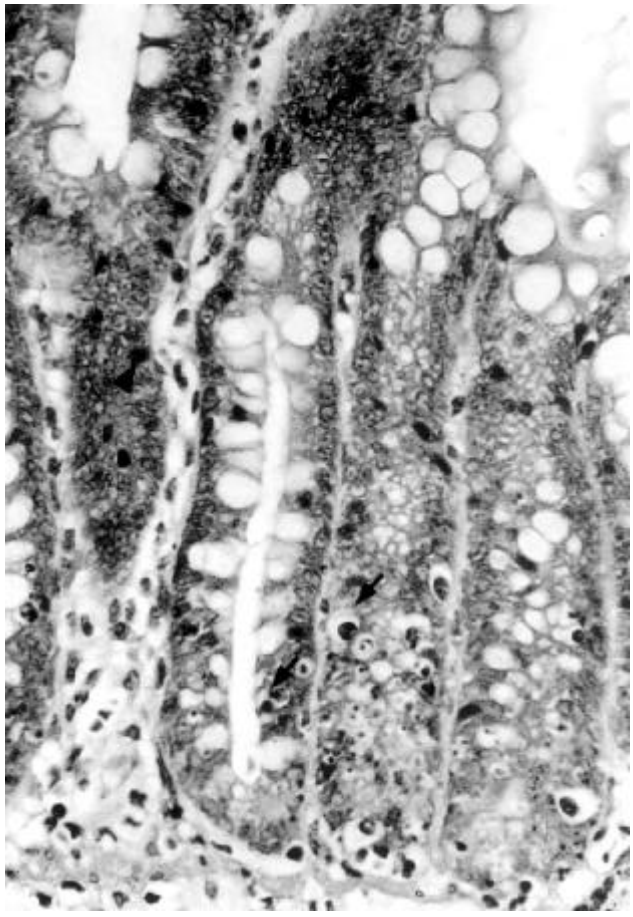

Fig. 1. Histologic section of small intestinal crypt of rat at 4 hours after 2 Gy irradiation (6 MV). Apoptotic cells (arrow) located mainly in the lower third of crypts. Mitotic cells (arrow head) were found scarcely (Hematoxylin and eosin staining, ×400).

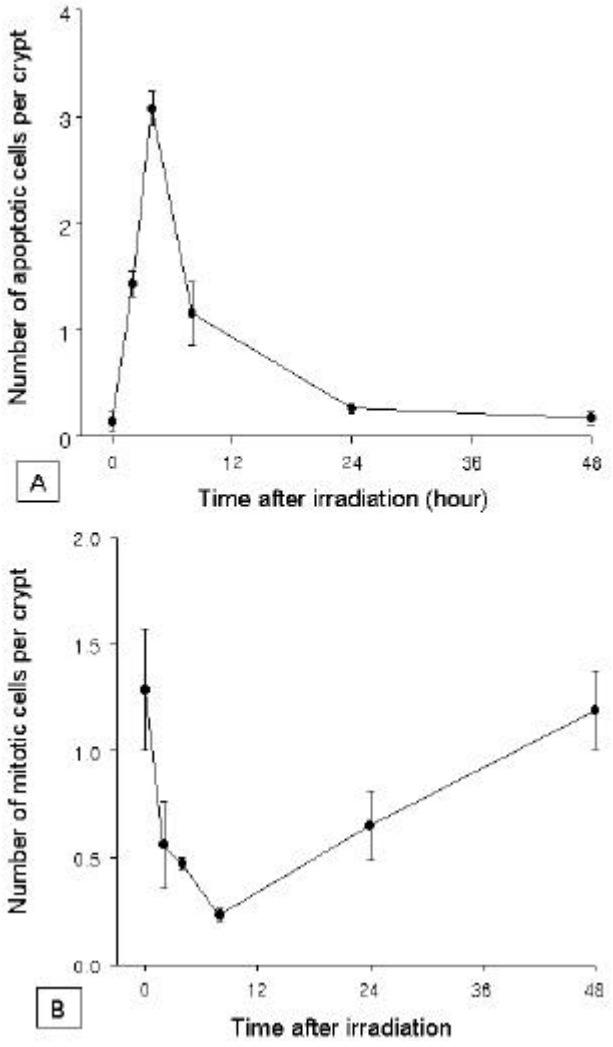

Fig. 2. Temporal alterations of the numbers of apoptotic (A) and mitotic cells(B) per crypt of rat's small intestine following 2 Gy irradiation (6 MV). The values of unirradiated control were represented at 0 hour. The occurrence of apoptosis was increased up to 4 hours and decreased to normal level about 24 hours after irradiation. The number of mitotic cells was decreased to 8 hours and normalized around 48 hours after irradiation.

3.19, 1.15, 0.26, 0.17이었다. 세포고사는 방사선조사 후 4시간 경에 가장 많이 발생되었고, 24시간 후에 정상값으로 회복되는 양상이었다(Fig. 2A).

2. 음와당 유사분열 세포의 평균값

정상 대조군에서 음와당 평균 1.29개의 유사분열 세포가 관찰되었으나, 방사선조사 후 2, 4, 8, 24, 48시간 후에는 각각 0.56, 0.47, 0.23, 0.65, 1.19로, 방사선조사 후 8시간까지 감소되었다가 48시간 경에 정상값으로 회복되는 양상이었다. 따라서 유사분열사는 방사선조사 후 8시간까지 증가되었고, 그 후로 감소되어서 48시간 경에 정상화되는 것으로 생각된다(Fig. 2B).

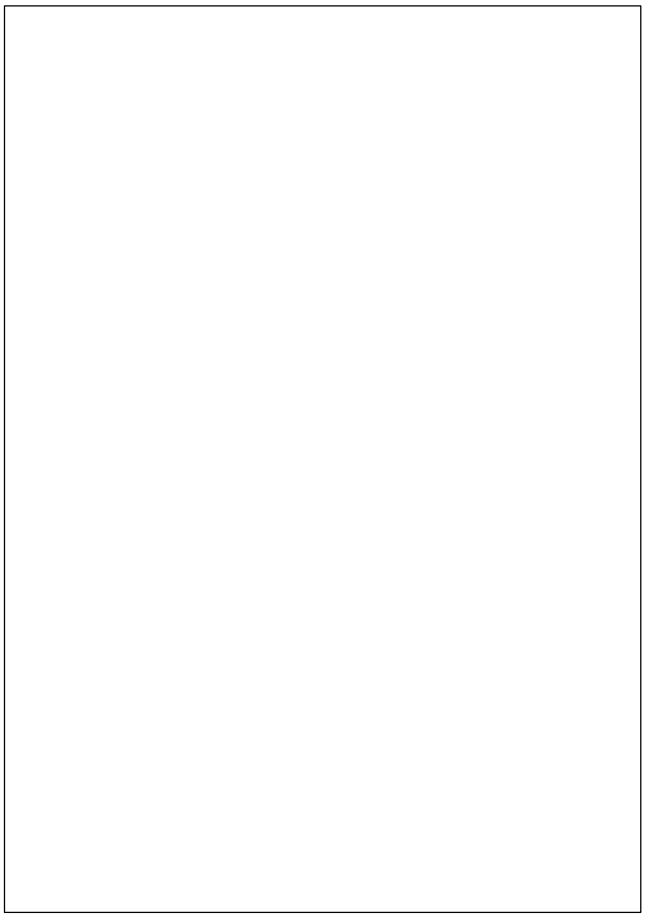

Fig. 3. In situ end labeling (ISEL) stainings of small intestine of rats at 4 hours after 2 Gy irradiation (6MV). ISEL stainings were positive in apoptotic cells arrow and some non-apoptotic cells (arrow head) as well (IESL, diaminobenzidine staining, ×250).

3. In Situ End Labelling법

ISEL법에 의한 세포고사의 관찰은 DAB 발색 과정의 시간적인 조건에 따라서 과발색되는 경향을 보여서, 헤마톡실린 에오진 염색에서 관찰되었던 세포고사 소견 이외의 정상 세포에서도 염색이 되어 위양성이 많이 발생되었다(Fig. 3).

고안 및 결론

소장 음와는 약 250개의 세포들로 구성되어 있고, 세포주기가 12시간 정도로 아주 빠르게 증식하는 조직이다. 소장 음와는 구조적으로 계층화되어 있어서, 음와 기저부에 위치하는 간세포에서 증식을 시작하여 융모로 이동하면서 분화

및 성장하고 탈락되는 과정을 지속적으로 하는데, 이 과정에 6 7일 소요되므로 소장의 상피 세포들은 대개 1주일마다 교체가 된다.[10] 소장 음와의 간세포 수는 아직 논란이 있지만, 안정 상태에서 16개 이하로 대개 4개 정도로 알려져 있다. 방사선 및 세포독성 물질들에 의해 소장에서 발생되는 세포고사에는 음와의 기저부로부터 4 5번째에 위치한 간세포 영역이 주된 표적이라는 보고가 있었다.[6, 11, 12] 본 연구에서는 세포고사의 위치를 소장 음와로부터 분석하지는 않았지만, Fig. 1에서 보는 것처럼 주로 음와 기저부로부터 4 5번째에서 많이 발생됨을 관찰할 수 있었다.

방사선에 의해 마우스 소장의 상피 세포에서 발생되는 세포고사는 세포주기 중에서 G2기에서 가장 많이 발생되고, S, G1 기 순으로 감소된다.[13] 또한 G2, M 기의 세포들이 많이 존재하는 오전 6 9시경에 방사선에 의한 세포고사의 빈도가 가장 높았다고 보고되고 있어서,[7] 본 연구에서도 이러한 일중 변동을 고려하여 오전 8 9시 사이에 방사선조사를 하였다.

Potten 등[11]의 연구 결과에 의하면 방사선조사에 의해 소장 음와에서 발생되는 세포고사의 빈도는 방사선량이 증가됨에 따라 증가되어 약 1 Gy에서 포화된다고 한다. 본 연구에서도 방사선량을 결정하기 위한 예비 실험으로 2 Gy와 4 Gy로 나누어서 세포고사의 발생 정도를 비교하였지만, 양 군간에 유의한 차이가 없어서 2 Gy로 실험을 하였다.

Arai 등[6]은 방사선조사 후 시간 경과에 따른 음와당 세포고사의 발생 변화를 관찰한 연구에서 소장과 대장은 방사선조사 후 각각 4시간, 6시간에 5.0과 4.6으로 최고값에 도달되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 소장 음와의 세포고사 발생이 방사선조사 후 4시간에 3.19로 최고치에 도달되었고, 그 후로 감소되어 24, 48시간에 0.26과 0.17로 정상 대조군의 0.14와 유사하게 되었다. 방사선조사 후 4시간 경에 세포고사가 최고치에 도달되는 것을 고려하여볼 때, 방사선에 손상받은 소장의 세포들은 세포고사를 통하여 신속하고 효과적으로 제거되는 것으로 생각된다.

방사선조사 후의 세포 증식 반응(proliferative response)에 대한 연구들에서 표지 지수(labelling index)와 유사분열지수(mitotic index)의 감소가 보고되고 있고,[14] 또한 방사선조사 후 소장 음와 세포와 골수 모세포에서 G2기 정지가 발생하여 유사분열지수가 감소되었다고 보고되고 있다.[15, 16] 본 연구에서도 유사분열 중인 세포의 수가 방사선조사 후 8시간에 0.23으로 최저로 감소되었다가, 48시간 경에 1.19로 정상값(1.29)에 근접됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 방사선조사에 의한 급성 손상으로 세포고사 뿐만 아니라 유사분열사도 발생되는 것으로 생각된다.

세포고사를 확인하는 방법들에는 광학 현미경의 특징적인 소견으로 인지하는 방법, 고사체의 특징인 DNA 단절을 확인하는 DNA ladder 방법과 ISEL 방법, 유세포분석기를 이용하는 방법 등이 있다. ISEL법은 세포괴사의 초기 변화와 유사분열 중인 세포의 핵에서 발생되는 DNA 3'-OH 말단과 반응하여 위양성이 발생될 수 있고,[17, 18] 일부 세포들에서는 형태학적으로는 세포고사의 기준에 속하지만 ISEL 염색이 되지 않아서 위음성이 발생될 수도 있다고 보고되고 있으므로,[19] 본 연구에서는 광학 현미경을 이용한 형태학적인 확인으로 세포고사를 검사하였다. 참고 자료로 확인하였던 ISEL법은 발색의 시간적인 조건에 따라 위양성이 다소 발생되었으므로, 세포고사의 검출에는 헤마톡실린 에오진 염색이 보다 간단하고 해석하기도 용이한 것으로 생각된다.

이상의 결과들에서 세포고사가 주로 음와 기저부 주위에서 발생되었으므로, 분화된 융모 세포보다는 미분화된 음와 세포가 방사선에 의한 세포고사에 민감함을 알 수 있었다. 그리고 세포고사의 발생이 방사선조사 후 4시간경에 최고값으로 증가되었다가 24시간 경에 정상값 가까이로 감소되었고, 유사분열 세포의 수가 8시간 경에 최저치로 감소되었다가 48시간에 정상치 비슷하게 회복되었으므로, 2 Gy 방사선조사에 의한 급성 손상으로 소장 음와의 상피 세포에서 발생되는 세포의 사망은 대개 24 48시간 내에 정상으로 회복되며, 발생 시기와 정도를 고려하여 볼 때, 세포고사가 유사분열사보다 신속하고 많이 발생되는 주된 기전으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. **Hendry JH, Potten CS.** Intestinal cell radiosensitivity : a comparison for cell death assayed by apoptosis or by a loss of clonogenicity. Int J Radiat Biol 1982;42:621-628
2. **Ohyama H, Yamada T, Ohkawa A, Watanabe I.** Radiation-induced formation of apoptotic bodies in rat thymus. Radiat Res 1985; 101:123-130
3. **Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH.** Acute and late radiation injury in rhesus monkey parotid glands. Am J Pathol 1986;124:469-478
4. **Sellins KS, Cohen JJ.** Gene induction by (-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. J Immunol 1987;139:3199-3206
5. **Eric J Hall.** Dose-response relationships for normal tissues. In : Eric J Hall eds. Radiobiology for the radiologist. 4th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Co. 1994;45-73
6. **Arai T, Kida Y, Harmon BV, Gobe GC.** Comparative alterations in p53 expression and apoptosis in the irradiated rat small and large intestine. Br J Cancer 1996; 74:406-412

7. **Ijiri K, Potten CS.** The circadian rhythm for the number and sensitivity of radiation-induced apoptosis in the crypts of mouse small intestine. Int J Radiat Biol 1990; 58:165-175
8. **Kerr JFR, Wylie AH, Currie AR.** Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257
9. **Wylie AH.** Cell death : a new classification separating apoptosis from necrosis. In : Bowen ID, Lockshin RA, eds. Cell Death in Biology and Pathology. London : Chapman & Hall. 1981;9-34
10. **Robbins SL, Cotran RS, Kumar V.** The Gastrointestinal Tract : Small Intestine. In : Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, eds. Pathologic Basis of Disease. Philadelphia : WB Saunders Co. 1984 :827-853
11. **Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A.** Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. Int J Radiat Biol 1994; 65:71-78
12. **Potten CS.** What is an apoptotic index measuring? A commentary. Br J Cancer 1996;74:1743-1748
13. **Tsubouchi S, Matsuzawa T.** Rapid radiation cell death and cell proliferation in intestinal epithelium after 1000-rad irradiation. Radiat Res 1974;57:451-458
14. **Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC, Wyllie AH.** P53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following γ-irradiation. Oncogene 1994;9:1767-1773
15. **Chawalinski S, Potten CS, Evans G.** Doubling time with bromodeoxyuridine and [H]-thymidine of proliferative cells in small intestinal epithelium in steady state and after irradiation. Cell Tissue Kinet 1988;21:317-329
16. **Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW.** Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991; 51:6304-6311
17. **Gobe GC, Buttyan R, Wyburn KR, Etheridge MR, Smith PJ.** Clusterin expression and apoptosis in tissue remodeling associated with renal regeneration. Kidney Int 1995;47:411-420
18. **Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R.** In situ detection of fragmented DNA(TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death : a cautionary note. Hepatology 1995;21:1465-1468
19. **Merritt AJ, Jones LS, Potten CS.** Apoptosis in murine intestinal crypts. In : Cotter TG, Martin SJ, eds. Techniques in Apoptosis. burlington, VT : Ashgate Publishing Co. 1996;269-299

Abstract

Radiation-Induced Apoptosis and Mitotic Death in the Small Intestinal Crypts of Rat

Young Min Choi, M.D.*, Ji Shin Lee, M.D.† and Heung Lae Cho, M.D.*

*Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Inje University, Pusan
†Department of Pathology, College of Medicine, Soenam University, Namwon, Korea

Purpose : We investigated the temporal alterations of apoptosis and mitotic death following irradiation in the rat's small intestinal crypts.

Materials and methods : Male Sprague-Dawley rats were irradiated 2 Gy by 6 MV linear accelerator and sacrified at 2, 4, 8, 24, 48 hours after irradiation. The mean numbers of the apoptotic cells and mitotic cells per their small intestinal crypts were measured in the unirradiated control and irradiated groups. To compare with H & E staining, ISEL (In Situ End Labelling) were performed in the group having the highest apoptotic count.

Results : The mean number of the apoptosis per crypt in the control group was 0.14 and those at 2, 4, 8, 24, 48 hours after irradiation were 1.43, 3.19, 1.15, 0.26, 0.17, respectively. So the apoptosis development was increased upto 4 hours and then normalized around 24 hours following irradiation. The mean number of the mitotic cells per crypt in the control group was 1.29 and those at 2, 4, 8, 24, 48 hours after irradiation were 0.56, 0.47, 0.23, 0.65, 1.19, respectively. The mitotic cell counts following irradiation was decreased to 8 hours and recovered to the normal level about 48 hours. So the increment of apoptotic cell count was occurred earlier and more remarkable than the decrement of mitotic cell count after irradiation. According to the staining time, false positivity was found in the ISEL staining.

Conclusions : The cell death in the small intestinal crypt developed by acute radiation damage was usually decreased to the normal level within 24 48 hours after irradiation and the apoptosis was thought to be more important process than the mitotic death.

Key Words : Radiation, Small Intestine, Apoptosis, Mitosis