

고농도 산소 처리한 골육종 세포주에서 방사선 조사 후 아포프토시스 발생 및 세포주기 분포의 변화

김재도, 정구희, 손정환, 박정호, 장재호, 권영호, 조명래, 정소학

고신대학교 의학부 정형외과학 교실

Effect of Oxygenation on Radiation-Induced Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2)

Jae Do Kim, Gu Hee Jung, Jung Hwan Son, Jung Ho Park,
Jae Ho Jang, Young Ho Kwon, Myung Rae Cho, So Hak Jung,

Department of Orthopaedic Surgery, Kosin University College of Medicine, Pusan, Korea

Abstract

Background Histological differentiation between papillary carcinoma from benign papilloma of the breast is difficult in some **Purpose** We investigated in the present study 1) the effect of 50 Gy irradiation on apoptosis of osteosarcoma cells and 2) the effect of low doses of irradiation on apoptosis in the presence of high pressure oxygen. **Methods** The osteosarcoma cell (Saos-2) was irradiated with a single dose of 10, 30, 50 Gy in the presence of high pressure oxygen. The degree of apoptosis was estimated by fluorescence analysis using Hoechst 33258 and flow cytometry 24, 48 hours after irradiation. **Results** Irradiations of osteosarcoma cells with dose of 10, 30, and 50 Gy resulted in chromatin condensation and apoptotic body formation. The degree of apoptosis in high pressure oxygen-treated cells were significantly higher than the corresponding values in the cells without high pressure oxygen ($p<0.05$). Cell-cycle analysis indicated that irradiated cells were accumulated at G2/M phase and were reduced in number at G1 phase, irrespective of high pressure oxygen exposure. **Conclusion** These results suggest that 1) a single fraction of high dose of irradiation results in accumulation of cells at G2/M phase, leading to apoptosis, and 2) in the presence of high pressure oxygen, a low dose of irradiation can induce apoptosis, as effectively as that induced by a high dose irradiation in the absence of high pressure of oxygen.

Key Words: Osteosarcoma cell, Irradiation, Oxygenation, Apoptosis, Cell-cycle distribution.

서론

골육종의 사지 보존술의 한 방법으로 광범위 절제술 후 골 결손부를 재건하는 방법 중에, 자가골을 선형가속기로 일시에 50 Gy를 수술 중 체외 방사선 조사하여 골의 해부학적 형태를 유지한 상태로 재건할 수 있는 재활용 자가골 이식술등이 최근에 보고되고 있다.^{1,2)} 하지만, 이들 보고는 임상적 시도 및 동물 실험을 통해

서 재발률 및 생존율, 합병증등에 대한 임상적 측면에 대해서만 보고하였을 뿐, 세포차원에서의 연구는 시행되지 않았다. 따라서 자가골 이식에 응용되는 50 Gy 방사선 조사 후 골육종 세포에 대한 방사선 생물학적 영향에 관한 연구가 필요하다.

종양세포의 약 10-15%는 저산소 세포로 구성되어 있으며, 이런 저산소 세포가 방사선 치료 실패의 한 원인이라고 알려져 있다.³⁾ 따라서 종양세포에 산소 처리하여 산소 분압을 높이면 방사선 조사시 자유 라디칼이 형성되어 지속적으로 종양세포에 치명적 손상을 줄 수 있다.³⁾ 아포프토시스는 성장인자, 세포내 신호전달

교신저자 : 박 정 호
TEL: 051-240-6262 · FAX: 051-243-0181
E-mail: park.jh@ns.kosinmed.or.kr

매개체, 유전자 조절단백질, 세포주기 등이 여러 경로를 통해 유도기전을 작용하여 진행되는 일종의 유전자에 의해 지배된 세포의 죽음으로 아포프토시스의 유도 및 촉진에 항암치료에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다.^{3,5-7)} 최근에 난소 종양 및 유방암 육종 세포주에 7 Gy, 10 Gy의 방사선을 조사 한 후 아포프토시스가 발생하였고, 아포프토시스의 발생은 특정 세포주기의 정체현상 즉 first gap (G1) 주기의 감소 및 second gap/mitosis (G2/M) 주기의 정체와 상관관계가 있다고 보고되었다.⁸⁻¹⁰⁾ 즉, 유방암 육종에 방사선을 조사하면 핵내 단백질계의 하나인 ubiquitin-proteasome 과정의 변화로 인해 ubiquitin 단백질은 축적되고 단백질 분해능을 갖고있는 proteasome이 억제되고 방사선 조사에 의해 과발현된 p53은 분해되지 않고 유지되어 유도성 세포주기의 정체를 유발하고, 이러한 세포주기의 정체현상은 종양유전자에 의한 종양세포가 증식하려는 특성과 서로 어긋나게되면서 아포프토시스를 유발한다고 보고하였다.^{5,8,9)}

본 연구는 재활용 자가골에 대한 체외방사선 조사를 함에 있어 자가골을 보관하는 생리식염수에 고농도 산소를 처리한 경우 방사선 조사효과를 높일수 있을 것이라는 가정에서 시작된다. 따라서 본 연구의 목적은 고농도 산소를 처리한 골육종세포주에 저용량의 조사로도 고용량 방사선 조사효과를 보이는지를 아포프토시스 발생정도로써 상호비교하고자 하며, 또한 아포프토시스 발생에 관련한 골육종 세포주의 세포주기의 변화와의 상관성을 구명하고자 한다.

대상 및 방법

1. 실험대상 세포주

한국 세포주 은행에서 분양 받은 골육종 세포주 Saos-2 (KCLB30085)를 Eagle's minimal essential medium (GIBCO BRL, Lifetechnologies사, France), 10% fetal calf serum (GIBCO BRL, Lifetechnologies사, France)과 항생 물질 penicillin 100 unit/ml, streptomycin 100 µg/ml을 첨가하여 배양하였다. 세포주는 75cm 용기에서 1주일에서 2회 배양액을 교환하여 세포주를 유지하였다.

2. 세포 배양 및 방사선 조사

아포프토시스의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 세포주는 실험 1일전, trypsin으로 처리하여 세포를 떼어낸 후 세포수 측정기(hemocytometer)로 1×10^5 개의 세포가 되도록 조절하였다. 1cm²의 세포 배양 유리가 포함된 24 well 배양용기에 분주하였으며, 시간에 따른 변화는 고용량의 방사선을 조사 후 즉시, 24시간, 48시간으로 세분하여 관찰하였다.

고농도 산소처리는 Dalton의 법칙에 따라 100% 산소를 1시간 처리하여 산소 분압을 측정하고, 산소 분압이 150 mmHg가 되도록 처리하였으며¹¹⁾, Iizuka 등⁵⁾이 골육종 세포주(MG-63)에 산소를 처리 한 후 3 Gy량의 방사선을 조사할 때 이용하였던 방법과 같이 방사선 조사 30분 전에 기존의 배지를 제거하고 고농도 산소로 처리한 배지를 교환하여 방사선을 조사하였으며, 방사선을 조사 한 후 즉시 고농도 산소 처리한 배지는 일반배지로 교환하여, 방사선을 조사 한 후 발생한 세포 대사물인 젖산에 의하여 발생하는 pH의 영향은 배제하였다. 일반배지는 산소 분압이 100 mmHg를 유지토록 하였다.

아포프토시스의 발생률 및 세포주기를 관찰하기 위하여 6개의 75cm² 용기에서 배양된 세포주는 실험 1일전에, trypsin 효소로 처리하여 세포를 떼어낸 후에, 세포수 측정기로 1×10^5 개의 세포가 되도록 조절하여 25 cm² 배양용기에 분주하였고, 시간에 따른 변화를 조사하기 위하여 각 용량의 배양용기는, 즉시, 24시간, 48시간용 3개로 세분하였다.

방사선 조사는 임상에서 이용하는 선형가속기(NEL AC1006, Japan, 200rad/min, 6MEV)로 일시에 10 Gy(1분), 30 Gy(5분), 50 Gy(10분)를 조사하였으며, 방사선을 조사하지 않았던 골육종 세포주도 비교 관찰하였다.

3. 골육종 세포주 핵의 형광 염색

시간에 따른 아포프토시스를 관찰하기 위하여 세포주를 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척한 다음 methanol로 고정하였다. DNA염색 시약인 bisbenzamide fluorochrome (Hoechst No. 33258, 이하 Hoechst) 5 mg을 Hank 용액 100 ml에 녹이고 merthiolate 10 mg을 첨가하여 보존액으로 사용하기 위하여 냉장 보관하였다. 보존액을 각 slide에 1 ml를 분주한 다음에 30분간 실온에서 염색하여, 증류수로 3회 세척한 다음 형광현미경(Nikon사, Japan)으로 관찰하였다.

세포주의 세포질 및 핵의 형태적 변화를 관찰하기 위하여 방사선을 조사 한 후 세포주를 PBS로 2회 세척하고 Wright 용액으로 염색 한 다음 광학 현미경으로 관찰하였다.

4. 유세포 분리기를 이용한 아포프토시스 발생률 및 세포주기 분포

방사선을 조사 한 후 배양된 세포주를 trypsin 효소로 처리한 후 원심분리하여 세포를 분리하였고, 분리한 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤에 냉장 보관하였던 70% ethanol로 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 2회 세척하였다. 이것을 RNase A용액에 실온에서 30분간 처리한 다음에 propidium iodide (50: $\mu\text{g}/\text{ml}$) 용액으로 염색하였다.

세포 주기의 분포 및 아포프토시스 발생률은 FACS Star Plus flow cytometer (Becton Dickinson FACS System) 및 FACS 기계에 포함된 Modifit DNA 분포 모델 프로그램을 이용하여 시간 및 조사량에 따라 분석하였다.

분석 결과는 형광강도로 측정된 DNA량과 골육종 세포수로 산출하여 점분포도 및 산포도로 표현하였다.

5. 통계학적 분석

아포프토시스 발생률은 SPSS (window 7.0, USA) 통계프로그램을 이용하여 산소로 처리하였던 군과 처리하지 않았던 군을 T-test로 검정하였다.

결과

1. 형태학적 변화 및 핵의 형광 염색

일시에 고용량의 방사선을 조사한 후 세포 배양 유리에 부착된 골육종 세포주의 형태학적 변화를 Wright 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 방사선 조사 받은 골육종 세포주는 세포질이 위축되었으며 핵은 분절되어 나타났다(Fig. 1B).

아포프토시스를 관찰하기 위한 형광염색에서 방사선을 조사 받은 골육종 세포주는 염색질이 농축되면서 핵막 주변으로 응집되어 다양한 형태를 보였고, 핵

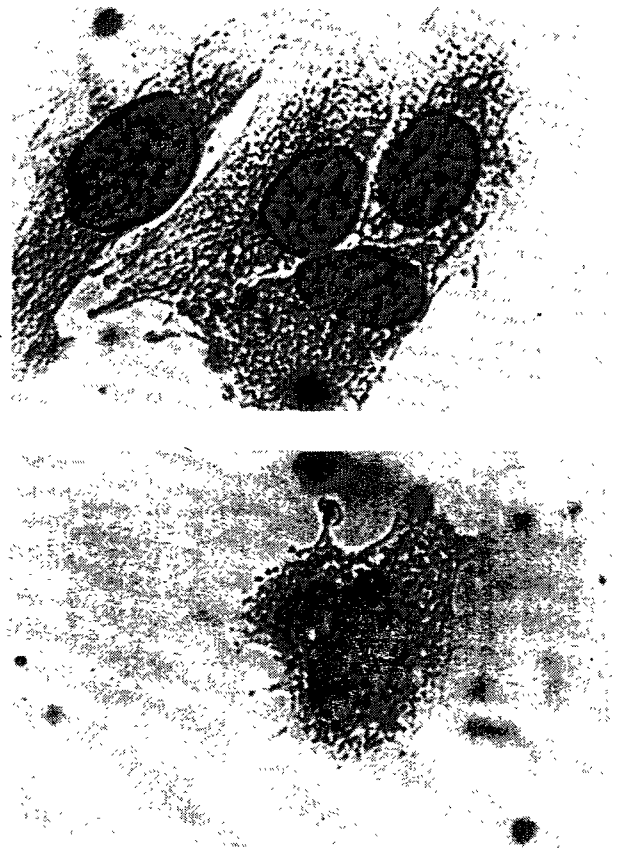


Fig. 1. Morphologic change in osteosarcoma cells
A: Non-irradiated osteosarcoma cells (Wright staining x 400)
B: Osteosarcoma cells incubated for 24 hours after 10 Gy irradiation show marked cytoplasmic shrinkage and fragmented nuclei (Wright staining x 400).

자체는 분절되어 2개 이상의 조각으로 나뉘면서 아포프토시스체를 형성하였다(Fig. 2). 고농도 산소로 처리된 골육종 세포주에 10 Gy량의 방사선을 조사 한 후 48시간에 관찰한 핵의 형태는 산소를 처리 하지 않았던 골육종 세포주에 비하여 더 많은 아포프토시스체의 형성을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

2. 유세포 분리기를 이용한 아포프토시스 발생 및 세포주기 분포

방사선을 조사 받지 않았던 골육종 세포주의 세포주기 및 DNA 정량분석을 보면, 골육종 세포주는 G1 주기에 $64.1\% \pm 3.2\%$, G2/M 주기에 $11.3\% \pm 4.1\%$ 로 분포하였다(Fig. 4). 일반배지에서 자란 골육종 세포주와 고농도 산소로 처리하였던 골육종 세포주에 방사선을

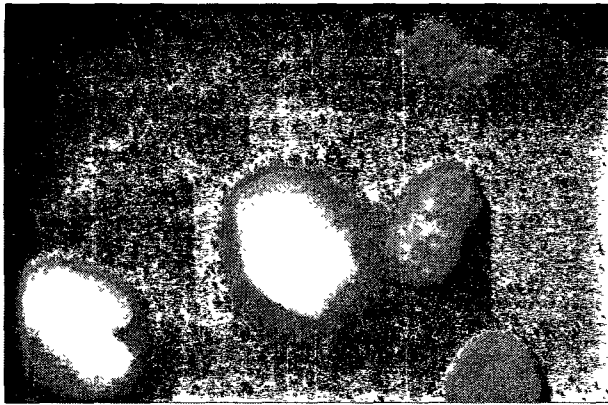


Fig. 2. Hoechst staining of nuclei in attached osteosarcoma cells
A: Non-irradiated cells (Hoechst staining x 400)
B: Cells 48 hours (after exposure to 10 Gy irradiation) show chromatin condensation.
C: Cells 48 hours (after exposure to 10 Gy irradiation) show apoptotic body.

조사 한 후 아포프토시스 발생 및 세포주기의 변화는 모두 G2/M주기에 정체된 현상을 보이고 있었으나, 산소로 처리하였던 세포주에서 보다 더 많은 아포프토시

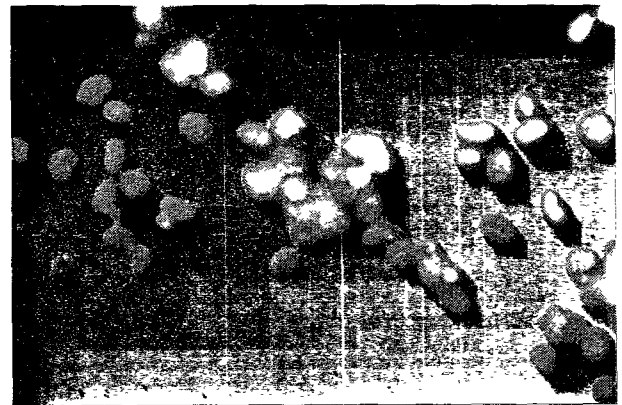
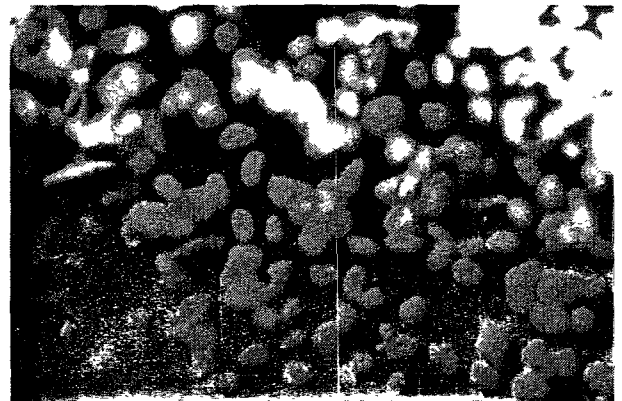


Fig 3. Comparison of morphologic change between oxygenated and non-oxygenated cells

A: Non-oxygenated cells (48 hours after exposure to 10 Gy) show chromatin condensation and apoptotic body (Hoechst staining x 100)

B: Oxygenated cells (48 hours after exposure to 10 Gy) show marked apoptotic body formation (Hoechst staining x 100).

스의 발생을 보였다(Fig. 5, 6).

아포프토시스 발생률은 산소로 처리하지 않았던 세포주에 10 Gy의 방사선을 조사하였던 예에서는 24시간, 48시간에 $29.5 \pm 3.56\%$, $39.9 \pm 4.83\%$ 로 각각 나타났고, 30 Gy를 조사한 예에서는 24시간, 48시간에 $41.1 \pm 3.93\%$, $66.9 \pm 5.21\%$ 로 나타났으며, 50 Gy를 조사한 예에서는 24시간, 48시간에 $48.0 \pm 3.69\%$, $75.6 \pm 4.65\%$ 로 나타났으며, 고농도 산소로 처리하였던 세포주에 10 Gy를 조사한 예에서는 $43.3 \pm 4.01\%$, $52.8 \pm 3.29\%$ ($p < 0.001$, $p < 0.001$), 30 Gy를 조사한 예에서는 $50.8 \pm 3.26\%$, $70.52 \pm 3.03\%$ ($p < 0.001$, $p = 0.11$)로, 50 Gy를 조사하였던 예에서는 $51.9 \pm 5.01\%$, $93.48 \pm 5.01\%$ ($p < 0.05$, $p < 0.001$)로 산소 처리하지 않았던 군보다 유의하게 높게 나타났다

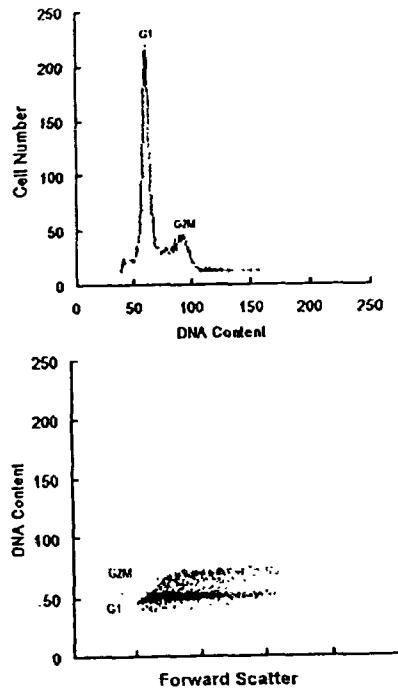


Fig. 4. Appearance of diploid cells in non-irradiated osteosarcoma cells
A: DNA content frequency histogram shows high G1 phase.
B: Dot-plots of FACS analysis show high G1 phase.

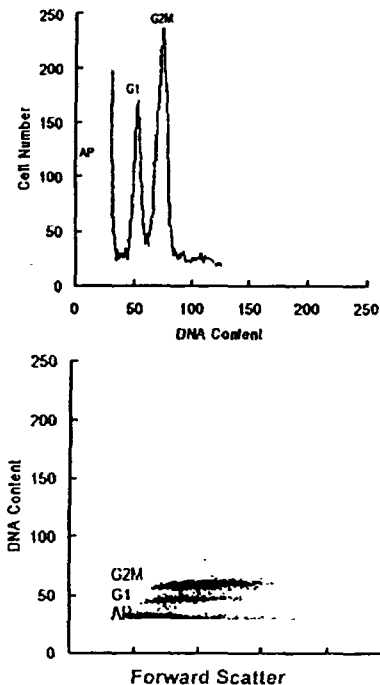


Fig. 5. Appearance of apoptotic cells in non-oxygenated osteosarcoma cells after exposure of 10 Gy
A: DNA content frequency histogram shows accumulation of G2/M phase.
B: Dot-plots of FACS analysis show marked appearance of apoptosis and arrest of G2/M phase.
AP: apoptotic cells

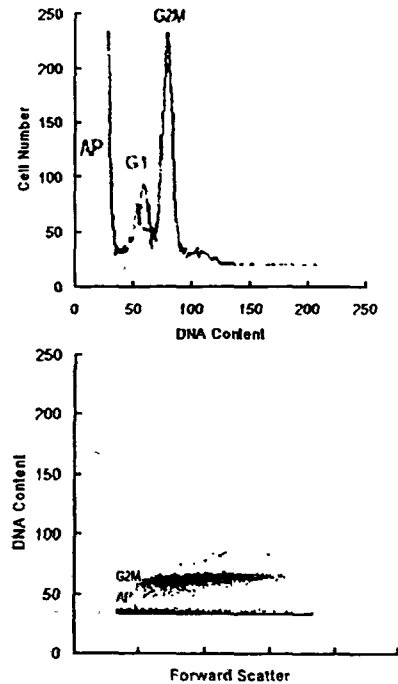


Fig. 6. Appearance of apoptotic cells in oxygenated osteosarcoma cells after exposure of 10 Gy
A: DNA content frequency histogram shows accumulation of G2/M phase.
B: Dot-plots of FACS analysis shows marked appearance of apoptosis and accumulation of G2/M phase.
AP: apoptotic cells

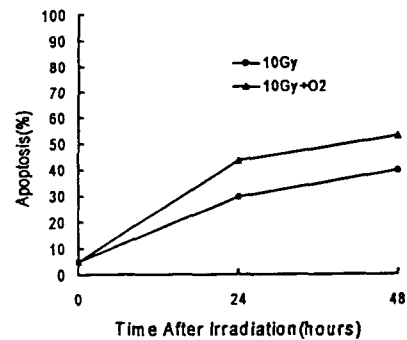


Fig. 7. Comparison of percentage of apoptosis between oxygenated osteosarcoma cells and non-oxygenated cells with 10Gy irradiation. The oxygenated osteosarcoma cells show significantly increased apoptosis than the non-oxygenated cells (24hours: $p=0.001$, 48hours: $p=0.001$).

(Fig. 7, 8, 9). 산소로 처리하였던 골육종 세포주에 30 Gy를 조사하여 발생한 아포프토시스는 산소로 처리하지 않고 50 Gy를 조사하여 발생한 아포프토시스와 유사한 결과를 보였다.

고농도 산소 처리한 골육종 세포주에서 방사선 조사 후 아포토시스 발생 및 세포주기 분포의 변화

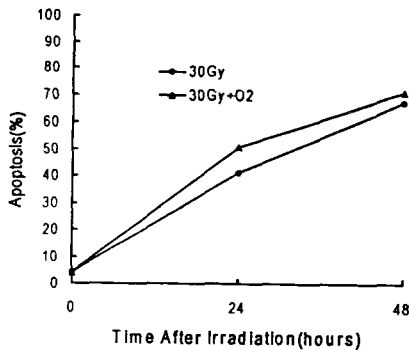


Fig. 8. Comparison of percentage of apoptosis between oxygenated osteosarcoma cells and non-oxygenated cells with 30Gy irradiation. The oxygenated osteosarcoma cells show significantly increased apoptosis than the non-oxygenated cells (24hours: $p=0.001$, 48hours: $p=0.11$).

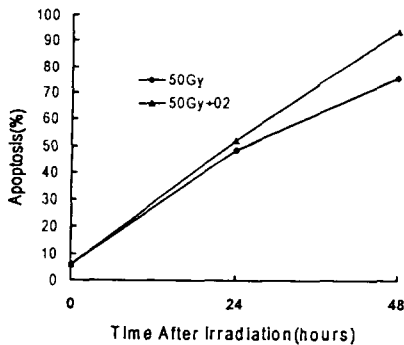


Fig. 9. Comparison of percentage of apoptosis between oxygenated osteosarcoma cells and non-oxygenated cells with 50Gy irradiation. The oxygenated osteosarcoma cells show significantly increased apoptosis than the non-oxygenated cells (24hours: $p=0.05$, 48hours: $p=0.001$).

세포주기 분포의 변화도 동시에 분석하였는데 10 Gy의 방사선을 조사 한 후 24시간에 G2/M 주기가 $39.2 \pm 4.3\%$ 로 증가하였으며, G1주기는 $22.1 \pm 3.7\%$ 감소하였다. 48시간에는 $51 \pm 4.3\%$, $20.4 \pm 4.7\%$ 이었고, 30 Gy의 방사선을 조사 후 24시간에는 $40.3 \pm 3.9\%$, $26.1 \pm 4.7\%$ 이었고, 48시간에 $59.2 \pm 3.9\%$, $5.9 \pm 5.1\%$ 로 나타났다(Fig. 10). 고농도 산소 처리한 예에서 10 Gy의 방사선 조사 후 24시간에는 $39.2 \pm 4.3\%$, $22.1 \pm 3.7\%$, 48 시간에는 $51 \pm 4.3\%$, $20.4 \pm 4.7\%$ 로, 30 Gy를 조사 후 24 시간에는 $39.2 \pm 4.3\%$, $22.1 \pm 3.7\%$, 48시간에는 $51 \pm 4.3\%$, $20.4 \pm 4.7\%$ 로 방사선 조사량에 상관없이 G2/M 주기는 증가하였고, G1 주기는 감소하였다(Fig. 11).

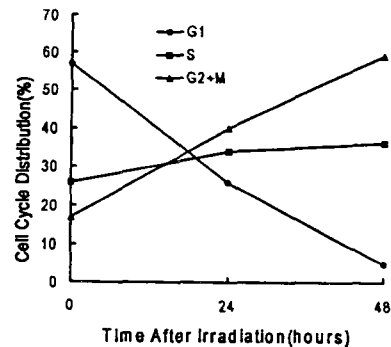
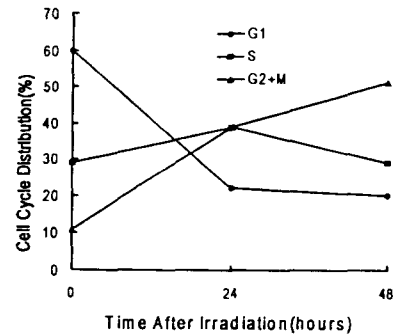


Fig. 10. Analysis of cell-cycle phase distribution
A: Irradiation with 10 Gy shows accumulation of G2/M phase at 48 hours after irradiation.
B: Irradiation with 30 Gy shows accumulation of G2/M phase at 48 hours after irradiation.

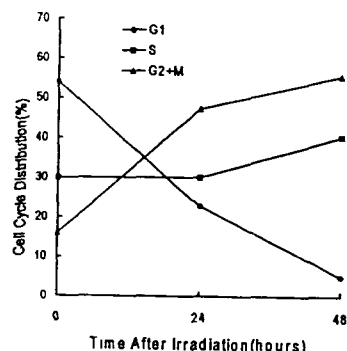
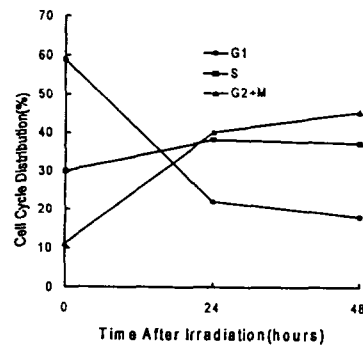


Fig. 11. Analysis of cell-cycle phase distribution : Oxygenated osteosarcoma cells
A: Irradiation with 10 Gy shows accumulation of G2/M phase at 48 hours after irradiation
B: Irradiation with 30 Gy shows accumulation of G2/M phase at 48 hours after irradiation.

고찰

골육종 치료에서 사지 보존술의 한 방법으로 광범위 절제술 후 절제한 골 조직을 선행가속기로 일시에 50 Gy를 체외 방사선 조사하여 재건하는 방법이 이용되고 있다.^{1,2)} 일시에 고용량의 방사선을 조사한 후 자가 골을 이식하는 재활용 자가골 이식술의 단점은 체중을 지탱하는 슬관절 부위에서 골조직이 붕괴하는 것이다. 저용량의 방사선 조사로 고용량의 방사선 조사의 효과를 얻기 위해, 체외 방사선 조사시 생리식염수에 고농도 산소로 처리하면 저용량의 방사선 조사를 하였음에도 불구하고 고용량의 방사선 조사를 한 것과 마찬가지로의 효과를 얻어, 골조직 붕괴의 단점을 줄일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 종양세포는 중앙 부위에 저산소 세포들로 구성되어 있어, 방사선 치료시 실패의 한 요인으로 작용하기 때문에, 저산소 세포에 고농도 산소 처리할 경우 산소분압이 30mmHg 상승시 방사선 민감도는 3배 증가한다고 보고도 있어서³⁾, 본 실험에서는 100% 산소를 처리하여 일반배지에 비하여 산소분압을 50mmHg 높게 유지하여 만든 배지를 방사선 조사 직전에 교환하여, 일반배지에서 자란 골육종 세포주와 고농도 산소 처리한 세포주에 고용량농도 방사선 조사를 한 후 방사선 생물학적 반응을 비교하였다. 항암제 및 방사선 조사는 일반세포의 괴사와는 다른 형태의 종양세포 죽음인 아포프토시스를 유발한다고 알려져 있다.^{2,6,7,8,9,12)} 아포프토시스에 대한 지금까지의 정의는 핵을 중심으로 일어나는 일련의 형태학적 변화에 따른 형태학적 정의와 유전자 DNA의 nucleosome단위로 단편화되는 생화학적 변화에 따른 생화학적 정의가 있었으나 최근에 "세포가 스스로 여러 가지 내외적인 정보를 종합적으로 판단하여 유전자에 의해 억제되어 있던 자살장치를 가동시킴으로써 세포가 죽게되는 과정"이며, 유전자에 의한 세포의 죽음이라고 정의되고 있다.^{4,7,8)} 아포프토시스의 형태학적 특징은 핵내 염색질의 농축 현상 및 아포프토시스체의 형성인데, 이러한 형태학적 변화는 nucleosome 사이의 연결 부위에서 DNA가 분할이 일어나 여러 개의 조각을 만들기 때문이다. 아포프토시스를 관찰하는 방법은 핵의 형광 염색법, 전기영동의 DNA 분석법, 유세포 분리기 등이 이용되고 있다. 본 실험에서는 세포 차원에서 방사선 생물학적 영향에 대한 척도로서 아포프토시스 발생 유무를 관찰하였

는데, 핵의 형태학적 변화를 관찰하는 Hoechst 염색을 시행하여 아포프토시스의 발생을 형태학적으로 관찰하였던 바, 방사선 조사량이 증가할수록 형광현미경 시야에서 높은 염색질의 농축 및 전형적인 아포프토시스체의 발생을 관찰할 수 있었다. 이는 Soldatenkov 등^{8,9)}이 유잉씨 육종 세포주에 7 Gy 방사선 조사 후 72시간째에 형광 염색법으로 아포프토시스를 관찰한 결과와 본 실험의 골육종 세포주에 10 Gy 방사선 조사 한 후 48시간에 아포프토시스 발생과 유사하였다.

유세포 분리기는 레이저를 광원으로 이용하여, 어떤 용액의 흐름 속에 포함된 각각의 세포에 의해 이 레이저의 빛이 변화하는 것을 감지한 후 이를 컴퓨터로 분석하여, 용액 속에 포함된 세포의 특성을 파악하는 기기이다. 최근에 악성 종양의 연구에 있어서, 종양세포를 정상세포와 구별하고, 그 특성을 규정하며, 이를 바탕으로 한 종양세포의 특성에 관한 연구를 위하여 다양한 요소 즉, 세포의 크기, 모양, 세포질내 과립의 양, 색소의 양, DNA 함량, 세포내 단백질, 세포내 암유전자 등을 정량적으로 분석하는데 유용하여 그 이용이 증가하고 있다.^{4,7,9)} 최근에 Soldatenkov^{8,9)} 및 Filippovich 등¹⁰⁾이 방사선 조사 후 유잉씨 육종과 난소 종양 세포주에서 유세포 분리기를 이용하여 아포프토시스 발생률을 보고하였는데, 유잉씨 육종 세포주에 7 Gy 방사선 조사 후 72시간에 20%의 아포프토시스 발생을 보고 하였으며, 난소 종양 세포주에 감마 방사선 10 Gy를 조사한 후 72시간에 30~40%의 발생률을 보고하였다.

본 실험에서도 유세포 분리기를 이용하여 아포프토시스의 발생을 관찰하였는데 10 Gy 방사선 조사 후 골육종 세포주에서 아포프토시스 발생률은 24시간, 48시간 후에 $29.5 \pm 3.56\%$, $39.9 \pm 4.83\%$ 로 유사한 결과가 나타났다. 한편 본 실험에서 50 Gy 방사선 조사한 후 48시간에 75%의 높은 아포프토시스 발생률을 보여 현재 임상에서 골종양의 재활용 재건술시 체외 방사선 50 Gy를 조사하였을 경우 대부분의 골육종 세포가 아포프토시스 과정으로 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 산소 처리한 골육종 세포주에 30 Gy를 조사한 후 48시간에 $70.52 \pm 3.03\%$ 로, 산소 처리하지 않았던 골육종 세포주에 50 Gy를 조사한 후 48시간에 $75.6 \pm 4.65\%$ 와 유사한 아포프토시스 발생률을 보여서, 임상에서 재활용 자가골 이식술을 시행할 때 체외 방사선 조사시 증

류수에 고농도 산소처리를 할 경우 저용량의 방사선 조사에서도 고용량을 조사한것과 같은 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에서 골육종 세포주에 방사선 조사 후 24, 48시간에 세포주기의 변화는 시간 및 방사선 조사량에 따라 G1 주기의 감소와 G2/M 주기의 정체 현상을 보였다. 이 결과는 Soldatenkov^{8,9)} 및 Filippovich 등¹⁰⁾이 유잉씨 육종 및 난소 종양에 방사선 조사를 하여 관찰한 세포주기의 변화 즉, G2/M 주기에 세포주기가 정체된 후 아포프토시스가 발생하였다는 보고와 일치하였다. 방사선 조사에 의한 아포프토시스 발생기전은, 육종 세포주에 방사선을 조사하면 핵내 단백질계의 하나인 ubiquitin-proteasome과정의 변형으로, ubiquitin단백질은 축적되며, 단백질 분해능을 갖는 proteasome이 억제되어, 방사선 조사에 의해 과발현된 p53 은 분해되지 않고 유지되어, p53 유도성 세포주기의 정체를 유발하고, 이러한 세포주기의 정체현상은 종양유전자에 의한 종양세포가 증식하려는 특성과 상호 충돌하여 아포프토시스를 유발한다고 보고하였다.^{5,8,9)} 따라서 항암치료에서 아포프토시스가 중요한 역할을 하고 있기 때문에 아포프토시스를 유도할 수 있는 proteasome 억제제에 대한 연구가 향후 필요할 것으로 생각된다.

결론

골육종 세포주에 일시에 고용량의 방사선을 조사하였을 때에, 골육종 세포주는 아포프토시스를 일으켰으며, 아포프토시스는 세포주기 중에서 G2/M 주기에서 정체되어 아포프토시스가 진행되었고, 골육종 세포주에 산소 분압을 높이면, 아포프토시스의 발생률을 더 높이고 저용량의 방사선을 조사하였음에도 고용량의 조사를 한 것과 같은 효과를 얻을 수 있었다. 따라서 임상에서 사용하는 50 Gy량의 방사선 조사는 세포차원에서 골육종 세포주에 아포프토시스를 유발하며, 체외 방사선 조사를 할 때 고농도 산소를 처리하면, 저용량에서도 높은 아포프토시스 발생을 유도할 것이라 생각된다.

참고문헌

1. Nagashima T, Yamamuro T, Kotoura Y, Takahashi M, Abe M, Nakashima Y: Histological studies on the effect of intraoperative irradiation of osteosarcoma. J J Orth Ass 57 : 1681-1697, 1983
2. Uyttendaele D, De Schryver A, Claessens H, Roels H, Berkvens P, Mondelaers W: Limb conservation in primary bone tumor by resection, extracorporeal irradiation and reimplantation J Bone Joint Surg 70 : 348-353, 1988
3. Hall EJ: Radiobiology for the radiologist. 3rd Edition, Philadelphia, J.B. Lippincott Co. 1987,137-160
4. Fisher DE: Apoptosis in cancer therapy : Crossing the threshold Cell 78 : 539-542, 1994
5. Iizuka M, Ando K, Aruga T, furusawa Y, Fukutsu K, Itsukaichi H, Nagasawa H, Moriya H: Effect of reoxygenation on repair of potentially lethal radiation damage in cultured MG-63 osteosarcoma cells. Rad Res 147 : 179-184, 1997
6. Mitsunashi N, Ishikawa H, Saito Y, Takahashi T, Sakurai H, Nozaki M, Akimoto T, Hasegawa M, Maebayashi K, Niiibe H: A quantitative study of radiation-induced apoptosis in two rat yolk sac tumour cell lines with different radiosensitivities in vitro. Anticancer Res 17 : 3605-3608, 1997
7. Mori K, Hbasami H, Satoh N, Sonoda J, yamasaki T, Tajima M, Higuchi S, Wakabayashi H, Kaneko H, Uchida A, Nakashima K: Induction of apoptotic cell death in three human osteosarcoma cell lines by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis (cyclopentylamidino)-drazone (MGBCP). Anticancer Res 17 : 2385-2390, 1997
8. Soldatenkov VA, Dritschilo A: Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins Cancer Res 57 : 3881-3885, 1997
9. Soldatenkov VA, Prasad S, Notario V, Dritschilo A: Radiation-induced apoptosis of Ewing's sarcoma cells : DNA fragmentation and proteolysis of poly (ADP-ribose) polymerase. Cancer Res 55 : 4240-4242, 1995
10. Filippovich IV, Sorokina NI, robillard N, Chatal JF: Radiation-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids Int J Cancer 72 : 851-859, 1997
11. Guyton: Textbook of medical physiology. 8th Edition, Philadelphia WB Saunder Co 1991 422-424
12. Fellenberg J, Mau H, Scheerpfug C, Ewerbeck V, Debatin KM: Modulation of resistance to anti-apo-1 induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. Int J Cancer 72 : 536-542, 1997
13. Sugimoto M, Toguchida M, Kotoura Y, Yamamuro T, and Uchimi H: Intrinsic radiosensitivity and PLD repair in osteosarcoma cell lines. Int J Radiat Biol 62 : 469-474, 1992