

# 방사선 조사가 배양된 조골세포의 apoptosis와 세포주기의 변화 및 석회화 결절 형성에 미치는 영향에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소  
이영미 · 최항문 · 허민석 · 이삼선 · 최순철 · 박태원

## Effect of Irradiation on Apoptosis, Cell Cycle Arrest and Calcified Nodule Formation of Rat Calvarial Osteoblast

Young-Mi Lee, Hang-Moon Choi, Min-Suk Heo, Sam-Sun Lee, Soon-Chul Choi, Tae-Won Park  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

### ABSTRACT

**Purpose** : The study was aimed to detect the induction of apoptosis, cell cycle arrest and calcified nodule formation after irradiation on primarily cultured osteoblasts.

**Materials and Methods** : Using rat calvarial osteoblasts, the effects of irradiation on apoptosis, cell cycle arrest, and calcified nodule formation were studied. The single irradiation of 10 and 20 Gy was done with 5.38 Gy/min dose rate using the 137Cs cell irradiator at 4th and 14th day of culture. Apoptosis induction and cell cycle arrest were assayed by the flowcytometry at 1, 2, 3, and 4 days after irradiation. The formation of calcified nodules was observed by alizarin red staining at 1, 3, 10, 14 days after irradiation at 4th day of culture, and at 1, 4, 5 days after irradiation at 14th day of culture.

**Results** : Apoptosis was not induced by 10 or 20 Gy independent of irradiation and culture period. Irradiation did not induced G1 arrest in post-irradiated osteoblasts. After irradiation at 4th-day of culture, G2 arrest was induced but it was not statistically significant after irradiation at 14th-day of culture. In the case of irradiated cells at 4th day of culture, calcified nodules were not formed and at 14th-day of culture after irradiation, calcified nodule formation did not affected.

**Conclusion** : Taken together, these results suggest that irradiation at the dose of 10-20 Gy would not affect apoptosis induction of osteoblasts. Cell cycle and calcified nodule formation were influenced by the level of differentiation of osteoblasts. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2000 ; 30 : 189-198)

**KEY WORDS** : radiation, osteoblast, apoptosis, cell cycle, calcification

### 서 론

일반적으로 방사선 조사시 세포에 나타나는 현상으로는 일시적인 세포주기의 정지와 회복할 수 없는 DNA 손상에 의한 세포사를 일으킨다고 알려져 있다. 세포의 종류와 특성에 따라 차이가 있으나 배양된 세포는 일정한 분회의 세포주기를 유지하고 전리 방사선, 자외선, 기타 DNA에 손상을 주는 외부요인에 세포가 노출되면 세포주기가 변

화된다.<sup>1</sup>

Apoptosis는 조직과 기관의 정상 발육 과정 중에 발생된다고<sup>2</sup> 소개된 이후, 여러 유발 요인들에 대하여 연구되어 왔는데 성장호르몬이나 아연, 성호르몬 등은 apoptosis를 억제하고, 이온화 방사선, 칼슘, 열, 종양 억제제 등은 apoptosis 유발에 기여한다.<sup>3-5</sup> Apoptosis는 DNA가 심하게 손상된 세포를 제거하는 방어체제로서 일반적으로 종양세포가 정상세포에 비해 방사선감수성이 높고, 상피세포가 간엽세포에 비해 방사선감수성이 높다고 알려져 있으나, 정상 섬유모세포가 암종세포주보다 방사선에 민감하다는 보고<sup>6</sup>가 있어 방사선 조사대상 세포들의 종류와 상태에 따라 apoptosis를 일으키는 방사선 조사량은 다양하게 보고되고 있다.

접수일: 2000년 5월 9일      채택일: 2000년 6월 3일  
Correspondence to : Prof. Soon-Chul Choi  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, 28-22, Yeongun-dong, Chongno-ku, Seoul, 110-749, Korea.  
Tel) 02-760-2622, Fax) 02-744-3919  
E-mail) raychoi@snu.ac.kr

세포에 방사선을 조사하면 세포주기 지연이 일어날 수 있는데<sup>7</sup> 이 세포주기 지연은 방사선에 의한 손상을 회복하는데 필요한 시간에 해당된다. DNA는 방사선의 중요한 표적이고 DNA의 손상의 회복정도에 따라 세포의 생존이 결정되므로<sup>8</sup> DNA 손상회복능력의 차이가 방사선 감수성을 결정하는 중요한 기전임이 보고되었다.<sup>9</sup> 전리방사선에 노출된 세포는 세포주기의 진행을 지연시켜 손상된 DNA를 회복시킴으로써 세포의 성장을 조절하며<sup>10</sup> G1기 arrest나 S기 arrest는 높은 방사선량에 의해 일어나고 G2기 arrest는 1 Gy에서 10 Gy 정도의 방사선량으로도 일어나는 것으로 알려져 있다. Arrest 기간은 방사선량의 증가에 따라 길어지게 되는데, 이는 손상받은 DNA 회복에 필요한 시간이 많이 요구되기 때문인 것으로 설명된다.<sup>11</sup> 분열중인 세포에 방사선을 조사하면 대부분의 세포는 G2기에서 세포성장이 멈춘다는 보고도 있으며<sup>12,13</sup> leukemic cell에 자외선을 조사하거나 방사선을 조사하면 세포주기가 G1기에서 모인다는 결과도 있다.<sup>14</sup> 이와 같이 세포의 종류나 방사선의 성질에 따라 세포주기 지연과 정지의 차이가 있다. 김 등<sup>15</sup>은 HL-60 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포주기관련 유전자의 발현변화에 대해 보고하였고, 이 등<sup>16</sup>은 SKC 선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포주기에 미치는 영향에 관해 보고하였다. 그러나 이전의 연구에서는 방사선에 민감하다고 알려진 암종세포주와 섬유모세포 등을 대상으로 한 방사선 조사실험이 주로 행해졌으나 조골세포에 방사선 조사시 나타나는 apoptosis와 세포주기 변화에 관한 연구는 드문 상태이다.

조골세포의 세포배양이 가능해지면서 조골세포가 여러 가지 약물이나 자극에 어떻게 반응하는가에 대한 연구가 진행되어왔다.<sup>17,18</sup> 골 형성에 있어 조골세포의 증식, 분화 및 골기질 형성은 필수적인 과정으로 이 시기의 방사선 조사는 골형성을 저해하는 요소로 방사선 조사후 조골세포의 골형성능에 미치는 영향을 조사한 연구는 아직 미약한 실정이다. 백서의 발육중인 두개골 중 골막을 제거한 두개관 부위는 골형성 과정을 쉽게 관찰할 수 있는 골세포를 제공하며 여러 조건에 민감하게 반응하므로 세포의 apoptosis 등을 관찰하는데 많이 쓰인다.<sup>19</sup> 백서 태자 두개관 조골세포를 장기간 배양하면 배양 시기에 따라 1-12일째까지는 증식기이고 12-18일까지는 기질을 축적하며 그 이후부터는 석회화를 하는 단계로 알려져 있으므로 본 연구에서는 서로 다른 분화 상태인 4일과 14일째에 조골세포에 방사선을 조사하여 분화 상태에 따른 차이를 비교하여 보았다. 또한 apoptotic cell은 DNA의 염색도가 감소되므로, DNA 염색 후 유세포 분석을 시행하면 pre-G1 피크로 나타나 이에 대한 정량 분석이 가능하므로,<sup>20</sup> 본 실험에서도 DNA에 선택적으로 염색되는 propidium iodide (PI)로 염색후 유세포분석기를 이용하여 apoptosis와 세포주기 변화를 분석하였다.

따라서 본 연구에서는 분화시기를 달리하여 조골세포에 10 Gy와 20 Gy의 방사선을 조사함으로써 방사선 조사후 시간의 경과에 따라 조골세포의 분화도에 따른 apoptosis와 세포주기 변화 및 석회화 결절 형성을 비교 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 순차 효소 소화기법에 의한 골조직 세포분리와 배양

임신 19일 된 백서를 pentobarbital (0.06 ml/100 g)로 마취한 후 복부를 절개하여 태서를 꺼내고 태서의 두개관을 무균적으로 적출하였다. 두개관은 10% penicillin-streptomycin을 포함한 Hank's balanced salt solution (HBSS)에서 2회 수세하고 0.1% 교원분해효소, 0.05% trypsin, 0.5 mM EDTA를 포함한 HBSS를 사용하여 소화하였다. 10개의 두개관과 효소용액 (1.5 ml/두개관 10개)을 60 mm 배양접시에 넣은 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기, 95% 습도를 유지하는 배양기내에서 저속자성 교반기로 50 rpm의 속도를 유지하면서 20분 간격으로 5회 소화하였다. 이 중 조골세포의 성질을 가진 네번 째, 다섯번 째 군만을 수집하고 1.5 ml fetal bobine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.)을 첨가한 후 원심 분리하여 세포를 수집하였다. 세포는 10% FBS와 10<sup>4</sup> unit/ml penicillin-10<sup>4</sup> µg/ml streptomycin, 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma, Germany), 10 mM β-glycerophosphate (Sigma, Germany), 10<sup>-7</sup> M dexamethasone (Sigma, Germany)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle's Media (Gibco BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.)에서 배양하고, 2세대 세포를 사용하여 한 60 mm 배양 접시 당 10<sup>5</sup>개 세포를 분주하였다.

### 2. 방사선 조사

배양 4일과 14일에 CS-137 방사선 조사기 (IBL 437C, France)를 사용하여 실온에서 선량을 5.38 Gy/min로 10 Gy와 20 Gy를 각각 단일조사하였다.

### 3. Apoptosis와 세포주기 분석

배양 4일과 14일에 방사선 조사를 시행하고 1, 2, 3, 4일간 배양한 후 세포를 수집하고 세포주기 분석을 시행하였다. trypsin-EDTA로 회수한 세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Gibco BRL, U.S.A.)로 세척하고 차가운 70% ethanol로 고정시켰다. 세포를 0.1% bovine serum albumin이 함유된 PBS로 세척한 후 25 µl PI/25 µl RNase (Sigma, Germany)/200 µl PBS 용액으로 염색하고 유세포분석기 (FAC Star plus flowcytometry, Becton Dickinson, U.S.A.)로 DNA 용적히스토그램을 얻고 pre-G1 피크를 구하여 apoptosis를 확인하였고, 각 세포주기당 세포수의 백분율을 구

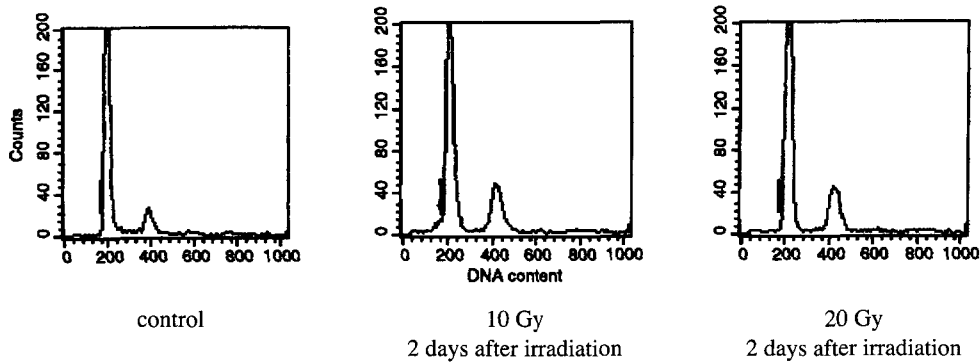


Fig. 1. DNA content histogram. Osteoblasts were irradiated on the 4th day of culture. Pre-G1 peak did not increase after irradiation.

하여 세포주기를 분석하였다.

4. 석회화 결절 형성 관찰

방사선 조사가 석회화 결절 형성에 미치는 영향을 관찰하고자 배양 4일째에 방사선 조사 후 1, 3, 10, 14일간 추가 배양하였고, 배양 14일째에 방사선을 조사한 경우에는 조사 후 1, 4, 5일간 배양하였으며 다음과 같은 방법으로 석회화 결절의 생성을 관찰하였다. 세포를 PBS로 세척후 60% isopropanol로 1분간 고정시킨 후 2-3분간 3차 증류수로 재함수시켰다. 1% alizarin red (Sigma, Germany)를 넣은 후 3분간 배양한 다음 3차 증류수로 세척하였다. 물기를 제거한 다음 alizarin red로 염색된 석회화 결절의 수를 계수하였다.

5. 통계 방법

방사선을 조사하지 않은 대조군과 방사선 조사군 간에 유의수준 0.05로 t-test 처리하였다.

연구 성적

1. Apoptosis 관찰

가로축은 DNA의 상대적 크기를 나타내고 세로축은 세포의 수를 나타내는 DNA 용적히스토그램에서 방사선 조사시기와 조사량에 무관하게 통계적으로 유의성 있는 pre-G1 피크의 증가는 나타나지 않아 방사선 조사가 조골세포의 apoptosis를 증가시키지 않았음을 알 수 있었다(Figs. 1, 2, 3).

2. 세포주기 변화 관찰

조골세포 배양 4일째 방사선 조사군에서는 10 Gy와 20 Gy 모두 방사선 조사 2일 후부터 대조군에 비하여 G1기의 세포 비율이 감소하는 경향을 보였고(Fig. 4) 14일째 방사선 조사군에서는 10 Gy 조사군은 G1기의 세포 비율이 대조군과 차이가 없었으나 20 Gy 조사군은 방사선 조사 2

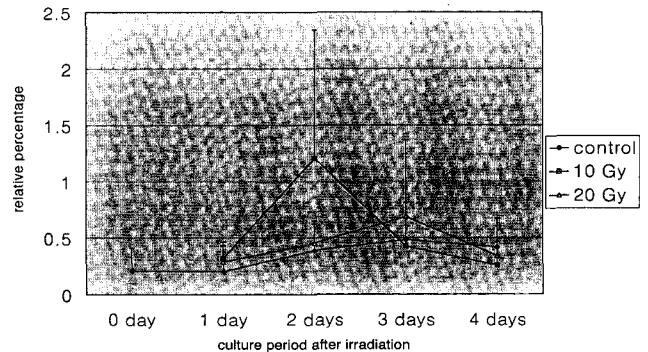


Fig. 2. Relative percentage of pre-G1 phase in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 4th day of culture, and the amount of apoptotic cells was determined by flowcytometry at 1, 2, 3, or 4 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{pre-G1 phase cell counts}}{\text{total cell counts}} \times 100$$

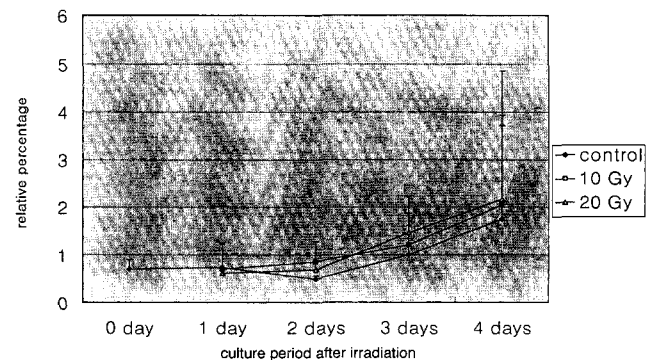
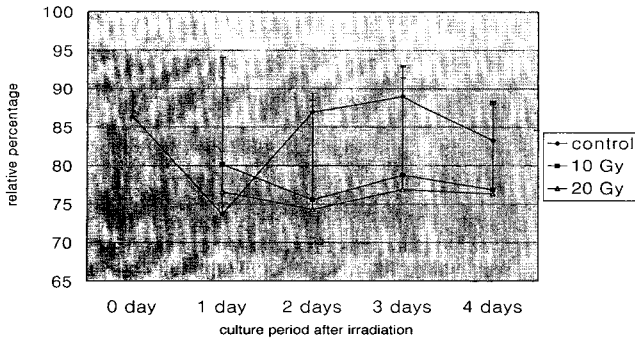


Fig. 3. Relative percentage of pre-G1 phase in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 14th day of culture, and the amount of apoptotic cells was determined by flowcytometry 1, 2, 3, or 4 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

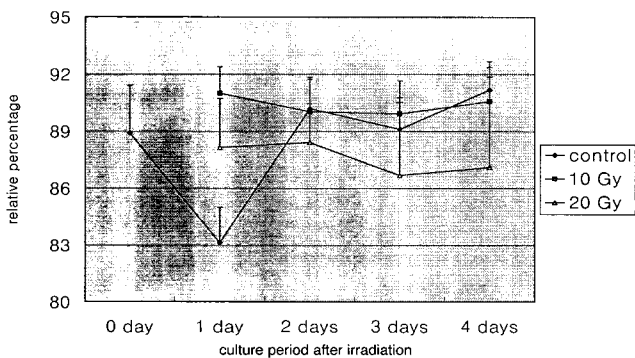
$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{pre-G1 phase cell counts}}{\text{total cell counts}} \times 100$$

방사선 조사가 배양된 조골세포의 apoptosis와 세포주기의 변화 및 석회화 결절 형성



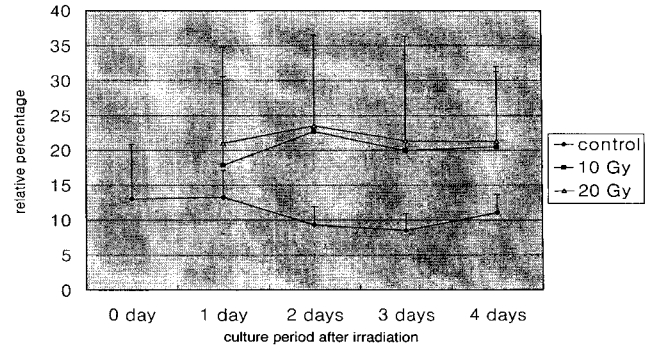
**Fig. 4.** Relative percentage of G1 phase in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 4th day of culture, and the amount of apoptotic cells was determined by flowcytometry 1, 2, 3, or 4 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{G1 phase cell counts}}{\text{total cell counts}} \times 100$$



**Fig. 5.** Relative percentage of G1 phase in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 14th day of culture, and the amount of apoptotic cells was determined by flowcytometry 1, 2, 3, or 4 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{G1 phase cell counts}}{\text{total cell counts}} \times 100$$



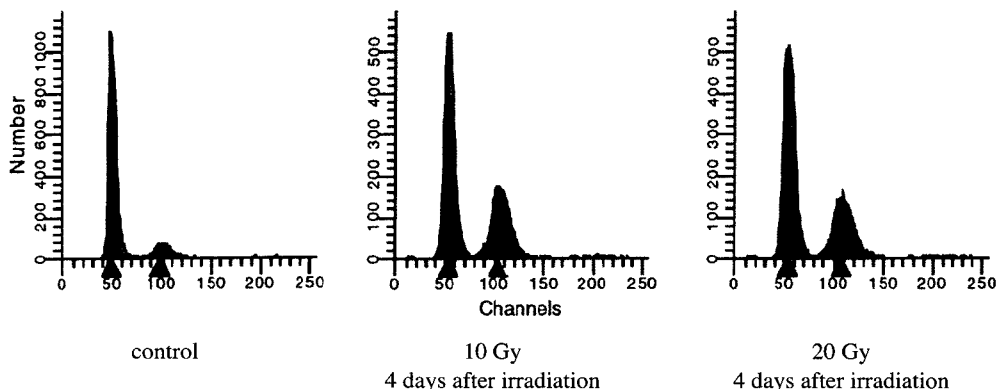
**Fig. 6.** Relative percentage of G2 phase in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 4th day of culture, and the amount of apoptotic cells was determined by flowcytometry 1, 2, 3, or 4 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{G2 phase cell counts}}{\text{total cell counts}} \times 100$$

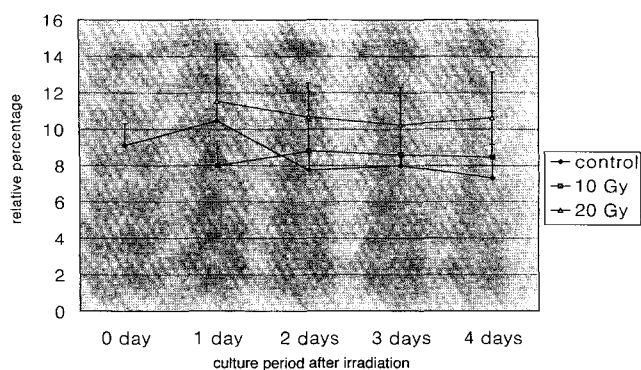
일 후부터 대조군에 비하여 다소 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 5). 세포 배양 4일째 방사선 조사군은 방사선 조사 1 일 후부터 10 Gy와 20 Gy 조사군 모두에서 대조군에 비하여 G2기의 세포 비율이 증가하는 경향을 보였고 (Figs. 6, 7) 세포 배양 14일째 방사선 조사군은 4 일째 군에 비하여 G2기의 세포 비율이 적었으며 조사군과 대조군 간에 차이도 적었다 (Fig. 8).

3. 석회화 결절 형성

세포배양 4일째 방사선을 조사하지 않고 1, 3, 10, 14일 경과 후 관찰 시 10일에 석회화 결절이 형성되었고, 14일에는 10일에 비해 330% 증가를 보였다. 반면, 배양 4일째 10 Gy, 20 Gy를 조사하고 1, 3, 10, 14일 배양한 경우에는 석회화 결절의 형성이 전혀 관찰되지 않았다 (Figs. 9, 10). 세포 배양 14일 후 방사선을 조사하지 않았을 때는 1일 (100%), 4일 (400%), 5일 (500%) 후 석회화 결절이 형성되었고, 10 Gy 조사 후 1일 (110%), 4일 (420%), 5일 (400%), 20

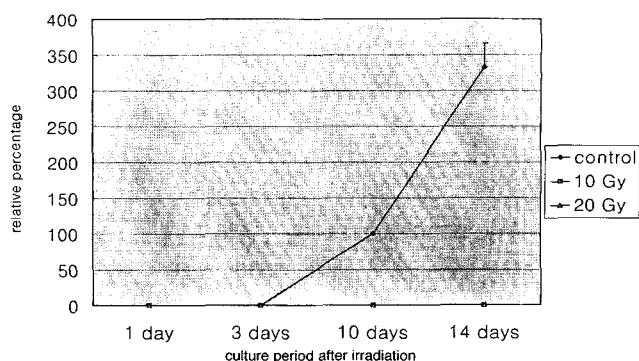


**Fig. 7.** DNA content histogram. Osteoblasts were irradiated on the 4th day of culture, G2 peak increased after irradiation.



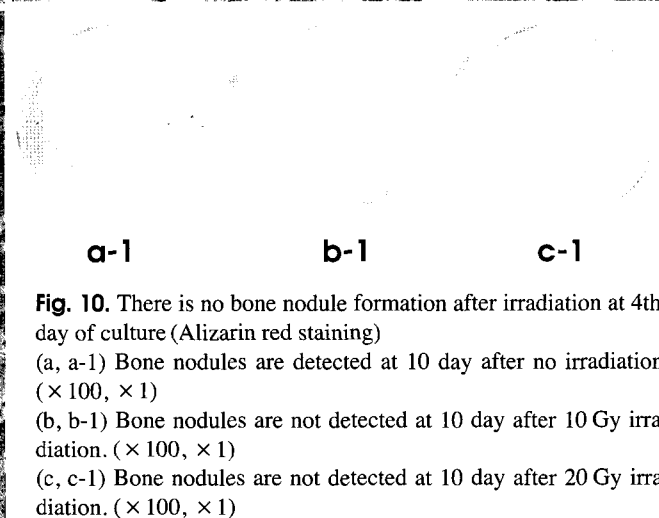
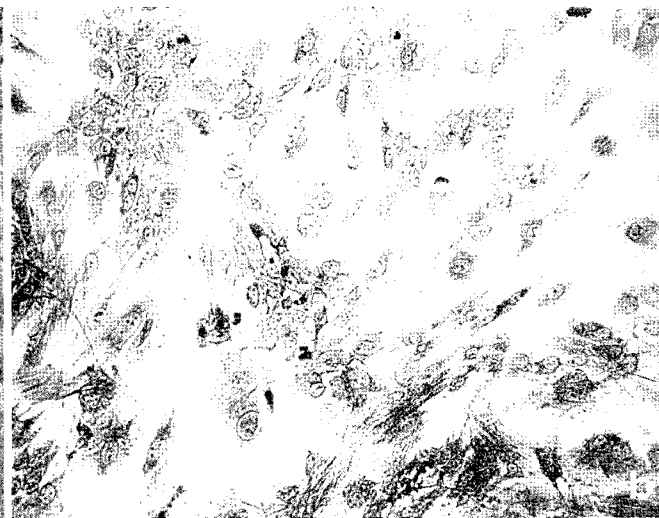
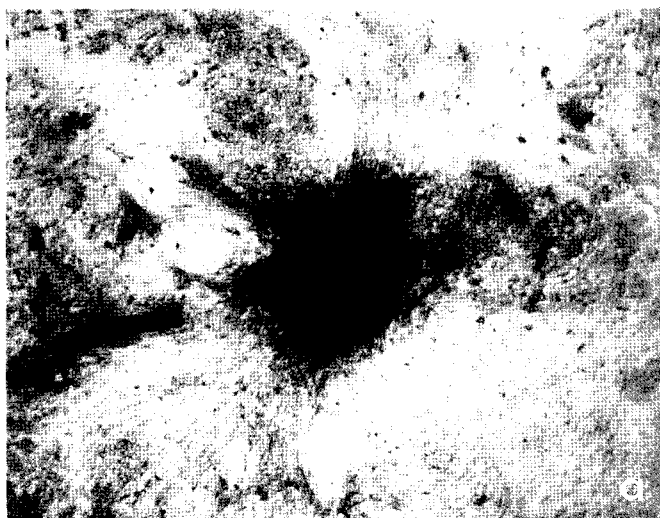
**Fig. 8.** Relative percentage of G2 phase in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 14th day of culture, and the amount of apoptotic cells was determined by flowcytometry 1, 2, 3, or 4 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{G2 phase cell counts}}{\text{total cell counts}} \times 100$$



**Fig. 9.** Relative percentage of bone nodule in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 4th day of culture, and the bone nodules were observed at 1, 3, 10, 14 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation. \* : statistically significant between control and experimental group

$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{No. of bone nodule in experiment}}{\text{No. of bone nodule in control at 10 days}} \times 100$$

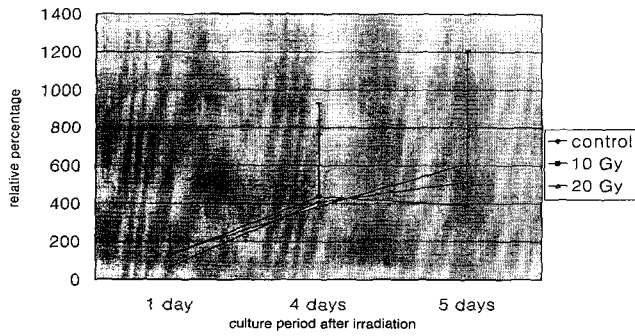


**Fig. 10.** There is no bone nodule formation after irradiation at 4th-day of culture (Alizarin red staining)

(a, a-1) Bone nodules are detected at 10 day after no irradiation. ( $\times 100, \times 1$ )

(b, b-1) Bone nodules are not detected at 10 day after 10 Gy irradiation. ( $\times 100, \times 1$ )

(c, c-1) Bone nodules are not detected at 10 day after 20 Gy irradiation. ( $\times 100, \times 1$ )



**Fig. 11.** Relative percentage of bone nodule in post-irradiated cells. Osteoblasts were irradiated on the 14th day of culture, and the bone nodules were observed at 1, 4, 5 days after irradiation. Each value represents an average of at least 3 independent experiments. The bar at each point is the standard deviation.

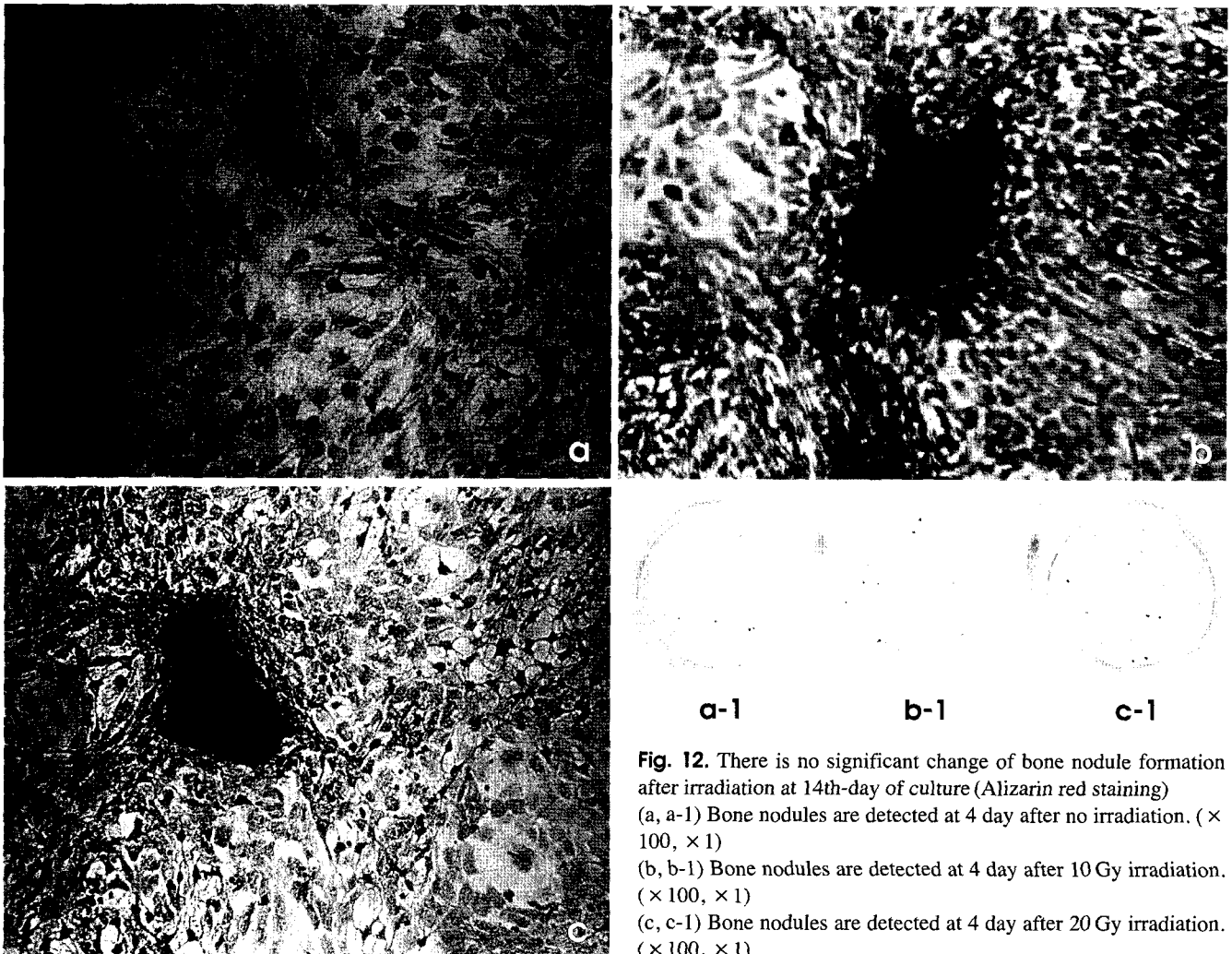
$$\text{Relative percentage} = \frac{\text{No. of bone nodule in experiment}}{\text{No. of bone nodule in control at 1 day}} \times 100$$

Gy 조사 후 1일 (110%), 4일 (400%), 5일 (600%)에 결절이 증가 생성되어 방사선 조사군과 대조군 간의 차이를 보이

지 않았다 (Figs. 11, 12).

### 총괄 및 고안

세포에 대한 방사선 조사는 일시적인 세포주기의 정지와 회복할 수 없는 손상에 의한 세포사를 일으킨다고 알려져 있는데<sup>1</sup> 세포사는 세포괴사와 예정된 세포사인 apoptosis로 분류할 수 있으며 이 두 가지 유형의 세포사는 전자현미경과 광학 현미경으로 형태학적 변화를 관찰할 수 있다. Apoptosis의 형태학적 변화로는 초기에는 핵막의 변화, 세포질의 위축 및 염색질의 농축 등이 관찰되나 세포 내 소기관들은 정상형태를 유지하며, 더욱 진행되면 핵의 분할 및 세포질의 위축으로 apoptotic body가 생기고 궁극적으로 이들은 거식세포에 흡입된다.<sup>20</sup> Apoptosis가 진행중인 세포에서는 calcium/magnesium-dependent endonuclease가 활성화되어 DNA 분절이 이루어지므로, 이들 세포에서 DNA를 수집하여 전기영동을 시행하면 DNA ladder를 특징적으로 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>21,22</sup> 또한 apoptotic cell에서는 DNA 염색도가 감소되어 그 결과 유세포분석시



**Fig. 12.** There is no significant change of bone nodule formation after irradiation at 14th-day of culture (Alizarin red staining)  
 (a, a-1) Bone nodules are detected at 4 day after no irradiation. ( $\times 100, \times 1$ )  
 (b, b-1) Bone nodules are detected at 4 day after 10 Gy irradiation. ( $\times 100, \times 1$ )  
 (c, c-1) Bone nodules are detected at 4 day after 20 Gy irradiation. ( $\times 100, \times 1$ )

pre-G1 피크가 관찰되므로 이를 이용한 apoptosis 정량분석법이 시행되었다.<sup>23</sup> 방사선 조사는 세포의 DNA와 지질막에 손상을 야기하며 이것이 신호가 되어 세포 내 칼슘이온의 증가로 bcl-2 유전자에 영향을 미쳐 apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>24</sup>

각 세포들마다 apoptosis가 유발되는 방사선조사량이 다르다는 것이 알려졌는데 Delic 등<sup>25</sup>은 2 Gy의 방사선 조사 시 백혈구에서 apoptosis가 발생됨을 보고하였고, Kubota 등<sup>26</sup>은 흉선세포에 5 Gy 방사선 조사시와 대식세포에서 50 Gy 조사시 apoptosis가 일어났음을 보고하였다. 박 등<sup>27</sup>은 유세포분석법으로 구강 내 암세포와 치은섬유모세포에 방사선조사시 apoptosis가 유발됨을 보고하였고, 문 등<sup>28</sup>은 구강 내 유포피 암종 세포에서 apoptosis가 발현됨을 연구하였다. 방사선에 민감하다고 알려진 정상 섬유모세포나 암세포주를 대상으로 한 이전의 연구에서는 방사선조사가 apoptosis를 유발한다고 보고된 반면, 일차 배양된 조골세포를 이용한 본 실험에서는 apoptosis가 유발되지 않았다. 골을 형성하는 과정에 있어 조골세포는 증식하고 분화하고 골석회화를 유도하는데, 방사선조사를 배양 후 4일, 14일로 한 것은 배양 4일째 조골세포는 배양접시에 안정적으로 존재하는 미분화단계이며, 배양 14일째 조골세포는 완전한 분화를 이룬 단계로, 미분화 시기와 분화한 시기에 각각 조사량을 달리하여 방사선을 조사하여 apoptosis가 유발되는 지를 알아보고자 유세포 분석을 시행하였다. 방사선 조사에 의해 유발되는 apoptosis는 수시간 내에 일어난다는 연구<sup>28-30</sup>가 있어 본 실험에서도 방사선 조사 1일 후부터 apoptosis를 관찰하였고 고선량을 방사선 조사시 저선량에 비해 DNA 손상이 크고 회복도 늦는다고 하여<sup>31,32</sup> 본 실험에서는 5.38 Gy/min의 고선량을 단일조사하였다. 사용한 조골세포에서 pre-G1 피크의 양은 미미하여 방사선 조사 이후에도 조사량과 배양 일수에 무관하게 통계적으로 유의성 있는 pre-G1 피크의 증가는 나타나지 않아 일반적으로 실험에 사용되는 10 Gy와 20 Gy의 방사선 조사량은 조골세포에서 apoptosis를 유도하지 않았음을 보여주었다. 이는 조골세포의 apoptosis는 세포의 2% 미만으로 나타나는 드문 현상이라고 보고한 Jilka 등<sup>33</sup>의 결과와 유사하였다. 골조직의 지속적인 재생과 항상성을 유지하기 위하여 골세포수의 조절이 필요하며 미분화 골세포가 성숙 골세포로 분화되는 속도와 골세포의 apoptosis에 의해 조절된다.<sup>34</sup>

조골세포의 apoptosis에 관여하는 인자에 대해 많은 연구가 이루어지고 있는데, Kitajima 등<sup>35</sup>은 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )가 백서 조골세포의 apoptosis를 유발함을 보고했고, Pascher 등<sup>36</sup>은 비타민D가 촉진작용을 함을 보고했으며, Tsuboi 등<sup>37</sup>은 사람의 조골세포에서 tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )와 interleukin- $\beta$  (IL- $\beta$ )가 Fas를 매개로한 apoptosis를 촉진함을 보고했다. Gohel 등<sup>38</sup>은 estrogen이

glucocorticoid로 유도된 조골세포에서 apoptosis를 억제함을 연구하였고, Jilka 등<sup>33</sup>은 부갑상선호르몬이 성숙한 조골세포의 apoptosis를 억제하여 세포 수명을 연장한다고 하였으며, Mogi 등<sup>39</sup>은 생쥐 MC3T3-E1세포에서 cytokine으로 유도된 apoptosis에 미치는 nitric oxide (NO)와 biopterin (BH4)의 상반된 효과를 보고하였다. 또한 골세포의 apoptosis는 골다공증의 진행 및 소실 과정과 관련이 있으며 정상적인 골조직의 대사 회전에 기여한다고 알려져 있다.<sup>35,40</sup>

세포가 방사선이나 기타 DNA에 손상을 주는 외부요인에 노출되면 세포주기가 길어지게 되며 각 주기에 세포가 축적되어 세포주기가 지속되는 현상을 세포주기 정지라고 한다.<sup>41</sup> Apoptosis 유발인자로 알려진 종양억제단백질인 p53은<sup>42</sup> 세포주기의 check point와 관련된 것으로 보고되었는데, 방사선이나 DNA에 손상을 주는 화학물질을 세포에 처치하면 핵내에서 p53의 빠른 축적이 유발되며, 이 인자는 DNA손상의 회복을 결정하거나, G1기의 세포분화 또는 apoptosis에 관여한다고 했다. 그러나 G2 check point에 의해 p53 인자와 무관하게 방사선 조사 후 apoptosis가 유발된다는 보고도 있다.<sup>43</sup> 방사선 조사 후 G1, S, G2기에서 세포주기 정지가 모두 일어날 수 있으나, Maity 등<sup>11</sup>은 조사한 대부분의 세포주에서 G1 block은 일어나지 않고, 5 Gy 이상의 높은 조사량에서 S기 지연이 일어남을 보고한 바 있다.

또한 G2 arrest는 높은 조사량 뿐만 아니라 세포에 따라서는 1 Gy 이하의 낮은 조사량에서도 관찰된다.<sup>40</sup> G2 arrest 정도는 방사선 조사량에 비례해서 증가하며, G2 arrest 기간은 세포의 손상이 회복되는 정도와 관계있어 G2 arrest는 방사선 감수성과 밀접한 관계가 있다.<sup>44,45</sup>

본 연구에서는 10 Gy와 20 Gy의 방사선 조사 후 시간에 따른 세포주기 분석에서 초기 분화단계인 배양 4일째와 완전히 분화된 배양 14일째에서 모두 G2 arrest가 일어났고, 방사선 조사량의 증가에 비례하여 10-20 Gy 정도의 방사선 조사를 받은 세포에서 G1 block과 S기 지연은 미비하였고 이는 G2기 arrest는 현저하다는 보고와<sup>41</sup> 유사하였다. 그러나 배양 14일째 방사선 조사군에서는 G2기 증가의 유의성있는 차이가 없었다. G1기 세포 비율은 10 Gy, 20 Gy의 방사선을 조사한 1일 후 증가하였으나 그 후 시간의 경과에 따라 감소하는 경향을 보였지만 실험한 방사선 조사량으로 G1기 세포 비율은 유의성 있는 차이가 없었다.

미분화된 조골세포는 증식하고 분화하여 골기질을 형성함으로써 골을 형성하는데 기여한다. 태서의 골조직을 분리하여 35일간의 배양기를 거친 조골세포를 이용한 실험에서, 조골세포는 성장, 분화의 전 과정을 거친 후 석회화된 골기질을 형성한다. 배양 10-12일째까지는 조골세포는 활발한 증식기로서 세포 주기의 발현, 세포 성장을 보이며

이 시기에 세포의 기질을 생성하고, 배양 12-18일 경에 세포의 기질은 여러 성분이 변화하여 기질을 축적하여 그 이후 석회화기가 된다. 따라서 조골세포의 성장 과정은 처음에 조골세포가 증식하고 이 증식이 감소하며 세포의 기질의 성숙이 시작되면서 그 다음 단계인 석회가 시작되는 분화를 하게 된다고 하였다.<sup>46-48</sup> Wada 등<sup>49</sup>의 실험에 의하면, 배양된 백서의 조골세포에서 5일째 석회화되지 않은 결절이, 10일째 석회화 결절이 형성되기 시작하여 15일째 더 커진 것으로 보고한 것과 유사하게 본 연구에서는 방사선을 조사하지 않은 대조군에서 배양 14일째 석회화 결절이 관찰되었다. 조골세포의 석회화 정도를 알아보는 데 alizarin red를 이용한 염색법이 사용되어 지는데 염색정도는 세포의 배양기간과 비례하여 나타난다고 보고되었다.<sup>50</sup> 조골세포가 골을 형성하는 과정에서 미치는 방사선의 영향을 연구한 Matsumura 등<sup>51,52</sup>은 MC3T3-E1세포주에 5, 10 Gy의 방사선을 조사시 DNA양이 감소하나 칼슘의 세포내 유입량과 염기성 인산 분해 효소의 활성화를 보이며 석회화결절 수가 증가함을 보고하여 방사선 조사가 조골세포의 분화와 골형성을 촉진함을 보고하였고, Dare 등<sup>53</sup>은 신생 백서의 골조직에서 분리한 조골세포에 40, 100, 400 mGy의 방사선 조사 후 12일째 관찰시 석회화 결절이 형성되었고, 4000 mGy의 방사선 조사시 세포의 성장을 억제하고 염기성 인산분해효소의 활성저하 및 DNA 용적감소를 초래하며 석회화 결절형성을 방해하여 많은 양의 방사선은 조골세포의 증식 및 분화에 영향을 끼치며 진단용 조사량은 덜 영향을 미친다고 보고하였다. Ozawa 등<sup>54</sup>은 저에너지의 레이저로 조골세포 배양 초기에 조사시 세포분화를 촉진하여 석회화 결절을 형성한다고 했다. 본 연구에서는 초기분화 상태라고 여겨지는 배양 4일째 10 Gy와 20 Gy의 방사선을 조사한 경우에는 석회화 결절 형성이 완전히 억제되었으나, 배양 14일째 방사선을 조사한 경우에는 방사선 조사량에 무관하게 석회화 결절이 생성되어 대조군과 차이를 보이지 않았다. Matsumura 등<sup>52</sup>의 연구에서는 일반적으로 조골세포의 성장 발육 과정을 연구하는데 많이 쓰이는 MC3T3-E1 세포주<sup>55</sup>를 이용하였으며, 세포가 가장 왕성하게 증식하는 시기인 2일째, 지속적인 성장을 보이는 4일째, 그리고 증식을 완전히 끝내고 염기성 인산 분해 효소의 활성을 보이는 시기인 8일째에 각각 방사선 선량을 25 cGy/min 하에 1-10 Gy의 방사선을 조사하여, 초기분화 단계에 있어 방사선 조사가 오히려 석회화 결절 형성을 촉진한다고 보고하였으나, 본 실험에서는 일차 배양된 세포라는 점과 5.38 Gy/min의 방사선 선량율로 조건이 달랐으며 앞서 보고된 바<sup>46-48</sup>에 따라 세포 증식이 활발하여 아직 분화단계 초기인 4일째와 조골세포 분화가 상당히 진행된 14일째 방사선을 조사하였다. 본 연구 결과로 보아 증식중인 조골세포에 10-20 Gy 정도의 방사선 조사는 G2기 지연을 유발하고 세포성장을 지연시키기는 하지만

이러한 효과가 조골세포의 분화로 유도되지는 않음을 알 수 있으며 이는 많은 세포의 이동과 분열이 일어나는 골절 치유과정에서의 방사선 조사는 골절의 치유와 골 형성을 억제한다는 실험 결과<sup>56-59</sup>와 일치하였다.

연구 결과를 요약하면, 10 Gy, 20 Gy의 방사선 조사는 조골세포의 apoptosis는 유발하지 않았으며, 증식중인 조골세포에서 G2기 지연을 약간 유도하였고, 석회화 결절 형성을 억제하였으나 분화된 조골세포에서는 별다른 영향을 미치지 않았다. 본 연구의 결과는 방사선 조사시 조골세포의 apoptosis와 세포주기를 정량적으로 분석하고 일차 배양한 조골세포의 분화 시기에 따른 세포의 변화를 관찰한 초기 연구가 될 것으로 사료된다. 향후 방사선 조사시기에 따른 조골세포의 방사선 감수성 차이에 관여하는 유전자나 단백질 인자에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Yarnold J. Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997; 44: 1-7.
2. Kerr JFR, Willie AH, Currie AR. Apoptosis : basic phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
3. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death on normal and leukemic cells : new implications for therapy. *Blood* 1993; 82: 15-21.
4. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10.
5. Reed JC. Bcl 2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124: 1-6.
6. Malaise EP, Deschavanne PJ, Fertil B. The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. *Int J Radiat* 1989; 56: 597-604.
7. Dafta R, Hass R, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Down-regulation of cell cycle control gene by ionizing radiation. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 637-44.
8. Kysela BP, Michael BD, Arrand JE. Relative contributions of levels of initial DNA damage and repair of double strand breaks to the ionizing radiation- sensitive phenotype of the Chinese hamster cell mutant, XR-V15B. Part I. X-rays *Int J Radiat Biol* 1993; 63: 609-16.
9. Weichselbaum RR, Little JB. Radioresistance in some human tumor cells conferred in vitro by repair of potentially lethal X-ray damage. *Radiology* 1982; 145: 511-13.
10. Radford IR. The level of induced DNA double strand breakage correlates with cell killing after X-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1985; 48: 45-54.
11. Maity A, Mckenna WG, Muschel RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: A review. *Radiother Oncol* 1994; 31: 1-13.
12. Su LN, Little JB. Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfected with activated ras oncogene and/or simian virus 40 T-antigen. *Radiat Res* 1993; 133: 73-9.
13. Somets MFMA, Mooren EMM, Begg AC. The effects radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother Oncol* 1994; 33: 217-27.
14. 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 : 6304-11.
15. 김진희, 박인규. HL 60 세포주에서 방사선조사에 의한 apoptosis와 세포주기관련 유전자의 발현 변화. *대한치료방사선과학회지* 1998 ; 16 : 377-87.
  16. 이형식, 박홍규, 허원주, 서수영, 이상화, 정민호. SCK 선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포주기. *대한치료방사선과학회지* 1998 ; 16 : 91-8.
  17. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vivo differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell lines derived from new bone mouse calvaria. *J Cell Biol* 1983 ; 96 : 191-8.
  18. 강선주, 김현만, 고재승, 황성명. 시험관내에서 생체활성유리가 조골세포의 활성화에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강해부학학회지* 1994 ; 18 : 177-96.
  19. Arnold M, Kummermehr J, Trott KR. Radiation-induced impairment of osseous healing: Quantitative studies using a standard drilling defect in rat femur. *Radiat Res* 1995 ; 143 : 77-84.
  20. 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.
  21. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995 ; 267 : 1445-9.
  22. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer : the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995 ; 18 : 137-53.
  23. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Motz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptosis cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992 ; 13 : 795-808.
  24. Voehringer DW, Story MD, O'Neil RG, Meyn RE. Modulating Ca<sup>2+</sup> in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 1997 ; 71 : 237-43.
  25. Delic J, Magdelenat H, Barbaroux C, Chaillet MP, Dubray B, Gluckman E, Fourquet A, Girinsky T, Gosset JM. In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation. *Br J Radiol* 1995 ; 68 : 997-1003.
  26. Kubota Y, Takahashi S, Sato H. Effect of gamma irradiation on function and viability of alveolar macrophages in mouse and rat. *Int J Radiat Biol* 1994 ; 65 : 335-44.
  27. 박무순, 이삼선, 최순철, 박태원, 유동수. 인체의 암세포주와 치은섬유모세포주에서 방사선조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 1998 ; 28 : 59-72.
  28. 문계운, 이삼선, 허민석, 최순철, 박태원, 유동수. 방사선조사후 유평피암종세포내 칼슘농도의 변화와 apoptosis 발현에 관한 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 1999 ; 29 : 105-17.
  29. Langley RE, Palayoor ST, Coleman CN, Bump EA. Radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Int J Radiat Biol* 1994 ; 65 : 605-10.
  30. Arai S, Kowada T, Takehana K, Miyoshi K, Nakanishi YH, Hayashi M. Apoptosis in the chicken bursa of fabricius induced by X-radiation. *J Vet Med Sci* 1996 ; 58 : 1001-6.
  31. Mckenna UG, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Muschel RJ. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblast : influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 1996 ; 12 : 237-45.
  32. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosa ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria populations. *Calcif Tissue Int* 1986 ; 38 : 143-54.
  33. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parafitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999 ; 104 : 439-46.
  34. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997 ; 88 : 347-54.
  35. Kitajima I, Soejima Y, Imamura T, Takasaki I, Kawahara K, Takioka T, Okano T, Soejima Y, Abeyama K, Maruyama I. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NFκB and TNF. *J Bone Miner Res* 1996 ; 11 : 200-10.
  36. Pascher E, Perniok A, Becker A, Feldkamp I. Effect of 1α, 25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> on TNFα-mediated apoptosis of human primary osteoblast-like cells in vitro. *Horm Metab Res* 1999 ; 31 : 653-6.
  37. Tsuboi M, Kawakami A, Nakashima T, Matsuoka N, Urayama S, Kawabe Y, Fujiyama K, Kiriyama T, Aoyagi T, Maeda K, Eguchi K. Tumor necrosis factor-α and interleukin-1β increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblast. *J Lab Clin Med* 1999 ; 134 : 222-31.
  38. Gohel A, McCarthy MB, Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1999 ; 140 : 5339-47.
  39. Mogi M, Kinpara K, Kondo A, Togari A. Involvement of nitric oxide biopterin in proinflammatory cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. *Biochem pharmacol* 1999 ; 58 : 649-54.
  40. Wyllie AH, Kerr JFR, Currier AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980 ; 68 : 251-306.
  41. Hall EJ. Radiosensitivity and cell age in the mitotic cycle in Hall EJ, eds. *Radiobiology for the radiologist*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Co. 1994 ; 91-106.
  42. Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for genomic instability of cancer cells. *Cell* 1993 ; 71 : 543-6.
  43. Han Z, Chatterjee D, He DM, Early J, Pantazis P, Wyche JH, Hendricksan EA. Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by x-irradiation. *Mol Cell Biol* 1995 ; 15 : 5849-57.
  44. Nagasawa H, Keng P, Harley R, Dahlberg W, Little JB. Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 1994 ; 66 : 373-9.
  45. Mckenna UG, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A, Muschel RJ. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblast : influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 1996 ; 12 : 237-45.
  46. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosa ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria populations. *Calcif Tissue Int* 1986 ; 38 : 143-54.
  47. Escarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983 ; 96 : 639-43.
  48. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 1990 ; 4 : 3111-23.
  49. Wada Y, Kataoka H, Yokose S, Ishizuya T, Miyazono K, Gao YH, Shibasaki Y, Yamaguchi A. Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvarial cells. *Bone* 1998 ; 22 : 479-85.
  50. Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tsukagoshi N. Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol Int* 1996 ; 20 : 459-64.
  51. Matsumura S, Hiramuma H, Deguchi A, Jikko A, Fuchiata M. Changes in phenotypic expression of osteoblasts after X irradiation. *Radiat Res* 1998 ; 149 : 463-71.

52. Matsumura S, Jikko A, Hiranuma H, Fuchiata H. Effect of x-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. *Calcif Tissue Int* 1996; 59: 307-8.
53. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res* 1997; 76: 658-64.
54. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 1998; 22: 347-54.
55. Quarles LD, Yohey DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 in culture : in vitro model for osteoblast development. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 683-92.
56. De Smet AA, Kuhns LR, Fayos JV, Holt JF. Effects of radiation therapy on growing long bones. *Am J Roentgenol* 1976; 127: 935-9.
57. Green N, French S, Rodriquez G, Hays M, Fingerhut A. Radiation induced delayed union of fractures. *Radiology* 1969; 93: 635-41.
58. Rubin P, Andrews R, Swarm R, Gwmp H. Radiation induced dysplasia of bone. *Radiology* 1959; 82: 206-16.
59. Schoeters GER, Vander Plaetse F, van den Heuvel RL. Effects of in vitro  $\alpha$ -particle irradiation on osteogenic bone marrow cultures. *Int J Radiat Biol* 1994; 66: 207-14.