

흰쥐에서 발가락 발생중 방사선조사에 의한 세포자멸사의 변화

김원식, 김수일, 조문준¹, 조근자², 한승로,
차달선, 송승택, 경현우, 노정호
충남대학교 의과대학 해부학교실, ¹치료방사선과학교실
²공주대학교 보건학부

간추림 : 이온화방사선은 사지발생에 유해로운 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나, 그 기전이 무엇인가는 아직까지 확실하게 알려져 있지 않다.

본 실험에서는 뒷다리 발생이 개시되는 시기인 임신 10.7일에 2Gy의 방사선을 조사하고, 임신 14.7일, 15.7일 및 16.7일에 희생시켜 대조군과 실험군간의 차이를 비교하여 세포자멸사의 변화를 경시적으로 비교 관찰하여 방사선에 의한 발가락 기형형성 기전의 일부를 알아보았다.

그 결과 방사선을 조사한 실험군이 대조군에 비해 평균 태아체중은 현저하게 감소하였으며, 기형의 발생빈도는 현저히 증가하였다. 출현한 발가락 기형은 발가락 수의 감소와 비대칭 등 형태이상으로, 임신 15.7일군에서는 오른쪽 뒷다리 발가락과 왼쪽 뒷다리 발가락에서 동일한 수의 기형이 발생하였으나, 기형의 정도가 오른쪽이 더 심하게 나타났고, 임신 16.7일군에서는 오른쪽 뒷다리 발가락 기형이 좀 더 많이 나타났으나 기형의 정도에는 차이가 없었다.

또한, TUNEL 면역조직화학 및 공초점 레이저 주사현미경 (confocal laser scanning microscope) 관찰을 실시한 바 세포자멸사가 정상적인 발가락 형태형성에 중요하며 이것의 이상이 발가락 기형형성과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

찾아보기 낱말 : 사지발생, 형태형성, 세포자멸사, 공초점 레이저 주사현미경

서 론

포유동물이 발생될 때는 수많은 세포분열을 통해 부피가 증가될 뿐만 아니라 각기 특수한 기능을 하는 여러 세포로 분화하여 각 장기를 형성한다. 그러나 세포의 증식 못지않게 개체의 형성에서 중요한 것은 세포사망이다. 개체의 생명 유지에 직접적인 영향을 미치는 세포사망은 크게 세포괴사와 세포자멸사로 나눌 수 있으며, 외상성 사망이라고 불리는 세포괴사는 대개 급격한 병리적 자극에 의하여 일어나며 효소 유리가 관찰되고 세포질의 변화가 선

행되는 반면, 계획된 세포사망이라고도 불리는 세포자멸사는 세포의 분화과정에서 일어나는 것으로, 세포괴사와는 달리 생리적 자극에 의하여 일어나며 핵의 변화가 선행되는 것이 특징이다 (Ueda와 Shah 1994). 이러한 세포자멸사는 배아발달, 조직재형성, 면역조절 그리고 암 억제에서 일어나는 가장 흔한 생리적 형태이며, 이러한 정상적 분화과정 외에도 외부 자극에 의한 임파구의 활성화, 세포매개물질, DNA 손상 및 산화적 스트레스에 의해서도 유발된다 (Schulte-Hermann 등 1992, Singh와 Anand 1995, Saunders 1966, Kwon과 Kim 1997, Seo 1998).

이러한 세포자멸사는 정상적으로 발생하는 사지의 형태형성에서 볼 수 있다. 흰쥐 뒷다리는 임신 10.5일에 체간 중배엽 가쪽판의 몸벽층으로부터 중

교신저자: 김원식 (충남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편: wonsikk@cnu.ac.kr

간엽세포들이 가쪽으로 이동하여 뒷다리씩을 형성함으로써 시작되며, 이 후 뒷다리씩은 길어지면서 라켓모양의 발판을 형성하고, 이어 각 발목뼈, 발허리뼈 및 발가락뼈들을 형성할 중간엽세포들의 농축이 일어나고 발가락열의 형성이 뒤따른다. 발가락열 사이에 있는 중간엽세포들은 대량으로 세포자멸사를 일으켜 패임이 형성되고 이것이 깊어지면서 정상적인 발가락이 형성되는 것으로 알려져 있다 (Wolpert 1991, Mglinets 1993, Kim 등 1996). 이같은 발생과정중에 일어나는 세포자멸사는 형태형성 과정에서 비교적 단순한 시간적 단계와 공간적 형식을 따라 순차적으로 일어나는 것으로 보이며, 불필요한 세포들을 제거함으로써 복잡한 조직발생과 기관발생을 달성하는데 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Garcia 등 1993, Kochhar 등 1993, Tone 등 1994, Hopkinson-Woolley 등 1994, Zaken 등 1994, Mori 1995, Nishikawa와 Sasaki 1996, van der Hoeven 등 1997, Kwon과 Kim 1997).

세포자멸사는 형태형성 과정 중 불필요한 세포들을 제거할 뿐만 아니라 기형형성에 있어서도 매우 중요한 기전으로 작용할 것으로 보인다. 즉, 정상 발생과정중 외부요인에 의해 세포자멸사가 억제 또는 촉진되면 다양한 형태이상과 숫적 이상이 초래될 수 있다. 여기에 속하는 것들로 방사선 (Haimovitz-Friedman 등 1994), 항암제 (Lee 등 1998) 등이 알려져 있다. 생체에 방사선을 조사하면 세포자멸사의 신호전달기전에 상당히 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀진 단백분해효소인 caspase (CPP32-like caspase)가 활성화되어 핵안에 존재하면서 손상된 DNA 복구에 관련된 단백질인 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase)를 절단하여 세포내 신호전달 불균형을 유발시켜 세포자멸사를 초래한다고 알려져 있다 (Nicholson 등 1995, Allen 등 1998, Sakahira와 Enari 1998, Widmann과 Gibson 1998). 그러나 이는 방사선에 의해 비가역적인 세포손상을 일으키는 세포피사에서 나타나는 현상으로, 시공간적으로 일부 가역성을 갖는 세포자멸사와의 관련성에 대한 연구는 희소한 실정이다. 이에 착안하여 저자들은 흰쥐의 뒷다리 발생 시작시기에 방사선을 조사한 후 발생 단계별로 희생시켜 대조군과 실험군을 관찰 비교하

여 방사선으로 인한 뒷다리 기형형성과 세포자멸사와의 사이에 의미있는 관련성이 있음을 확인하고 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 흰쥐 (Sprague-Dawley계통)로서, 생후 8주령의 암컷 60마리와 수컷 10마리를 구입하여, 본 대학 동물사육장에서 온도 $18\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $60\pm 10\%$ 의 환경하에서 일반식이와 충분한 양의 물을 공급하면서 2주간 사육한 후 실험에 사용하였다. 이들중 암컷 45마리는 방사선을 조사하는 실험군으로 정하고, 15마리는 방사선을 조사하지 않은 정상대조군으로 하였다. 우선 이들을 임신시키기 위하여 저녁 7시부터 11시경까지 암수한 마리씩 합사하고 교미를 확인한 후 다음날 아침 8시에 분리시켜 암컷의 질전이 확인되면 이날을 임신 0일로 정하였다.

2. 방사선 조사

실험군은 흰쥐 태아에서 뒷다리발생이 시작되는 시기인 임신 10.7일에 임신한 어미를 polyurethane box내에 가두고 방사선을 2 Gy 선량으로 조사하였다. 이 때 사용된 방사선속의 종류는 6MV-X선 (Mevatron 67, Siemens, Germany)을 사용하였으며, 조사면적은 $7\times 7\text{ cm}$, 조사거리 100 cm에서 배골반부를 향해 단일 전신조사하였다. 6MV-X선은 피하 1.5 cm 깊이에서 최대선량이 형성되므로 태아에서 최대선량이 균일하게 조사되도록 하였다. 방사선량의 결정은 다른 문헌 (Lee 등 1998)을 참고로 수차례에 걸친 예비실험 결과 태아의 자궁내 사망이 최소이면서 뒷다리기형이 가장 많이 나타나는 2 Gy로 정하였다.

3. 외부기형 관찰

대조군과 실험군은 외부기형 관찰을 위해 임신 14.7일, 15.7일, 16.7일에 각각 대조군 5마리와 실험

군 10마리씩을 에테르(ether) 마취하여 개복하고 자궁 전체를 절제해 생리식염수를 담은 페트리 디쉬(Petri dish)에 놓고 임신주머니의 수, 생존 태아의 수 및 흡수되었거나 흡수중인 태아의 수를 계수한 다음 각 태아의 체중을 측정하고 10% 중성포르말린 완충용액에 고정하였다. 고정된 태아는 입체현미경 하에서 뒷다리의 선천성 기형을 관찰하였다.

4. TUNEL 면역염색

발생중인 뒷다리에서 세포자멸사의 변화를 관찰하기 위해 발가락 가쪽면 조직을 취하여 TUNEL (TdT-mediated dUTP biotin nick end-labeling) 면역염색을 시행하였다. TUNEL 면역염색은 ApopTag kit (Oncor co. USA)를 사용하였다. 우선 통상적인 방법으로 파라핀 포매한 조직을 5 µm 두께로 절단한 후 슬라이드를 만들어, 탈파라핀과정을 거친 다음 0.05 M 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS) 용액(pH 7.4)으로 5분간 수세한 후 proteinase K (20 µg/mL in PBS)로 실온에서 25분간 반응시킨 후 증류수로 2분간 4회 수세하여 핵산에 둘러싸인 단백질을 제거하였다. 또한 내재성 peroxidase 활성을 제거하기 위하여 2% H₂O₂액에 30분간 반응시킨 다음 0.05 M PBS 용액으로 5분간 2회 세척하고, equilibration buffer에 10분간 반응시켜 주변부의 비특이적 반응을 억제하였다. 이 후 TdT 32 µL와 reaction buffer 76 µL를 혼합한 working strength TdT (108 µL/slide)에 37°C humidified chamber에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 조직은 37°C로 데운 working strength stop/wash buffer에 실온에서 10분간 담근 후, 0.05 M PBS 용액으로 5분간 3회 세척하고 anti-digoxigenin-peroxidase에 실온에서 humidified chamber에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 0.05 M PBS 용액으로 5분간 6회 세척 후 0.05% diaminobenzidine (DAB)에 0.02% H₂O₂를 첨가하여 20분간 발색시켰으며, 0.5% methyl green (in 0.1 M sodium acetate, pH 4.0)에 10분간 실온에서 대조염색하고 수세 후 100% butanol과 xylene과정을 거쳐 mounting medium으로 봉입하였다. 이를 공초점레이저 형광현미경(confocal laser scanning micro-

scope, Carl Zeiss LSM 510, Yena, Germany)을 이용하여 녹색형광과 투과 이미지를 합쳐 사진 촬영하였다.

5. 통계학적 처리

본 실험에서 측정된 계측치들은 SPSS를 이용하였다. 대조군과 실험군간의 임신주머니의 수, 태아 생존율은 빈도분석 및 태아체중의 평균비교는 독립표본 T 검정을 통해 분석하였다.

결 과

1. 임신주머니수, 태아 생존율 및 태아체중의 비교

본 실험에서 임신 14.7일에 대조군 흰쥐의 평균 임신주머니의 수는 16개였고 평균 태아의 수는 15.4마리로 태아 생존율은 약 96.3%였으며, 방사선 조사군의 평균 임신주머니 수는 16.5개였고 평균 태아의 수는 15.7마리로 태아 생존율은 약 95.2%였다. 평균 임신주머니의 수와 태아 생존율은 비슷하였으나 태아의 평균 체중은 대조군이 137.50 ± 10.55 mg, 실험군이 127.70 ± 8.32 mg으로 실험군이 현저히 ($p < 0.01$) 낮았다(Table 1).

임신 15.7일에 대조군 흰쥐의 평균 임신주머니의 수는 15개였고, 평균 태아의 수는 14마리로 태아 생존율은 약 93.3%였으며, 방사선 조사군의 평균 임신주머니 수는 16.5개였고, 평균 태아의 수는 15.5마리로 태아 생존율은 약 93.9%였다. 평균 임신주머니의

Table 1. The pregnancy outcome on GD 14.7 after X-ray irradiation

Measurement\Groups	Control	X-ray
Number of dams	5	10
Number of pregnant sacs (average)	80 (16)	165 (16.5)
Number of live fetuses (average)	77 (15.4)	157 (15.7)
Survival rate (%)	96.3	95.2
Body weight of fetuses (M ± SD, mg)	137.50 ± 10.55	127.70 ± 8.32*

*: $p < 0.01$, GD: gestation day

수와 태아 생존율은 비슷하였으나 태아의 평균 체중은 대조군이 316.40 ± 26.49 mg, 실험군이 227.8 ± 24.86 mg으로 실험군이 현저히 ($p < 0.01$) 낮았다 (Table 2).

임신 16.7일에 대조군 흰쥐의 평균 임신주머니의 수는 14개였고, 평균 태아의 수는 14마리로 태아 생존율은 약 100%였으며, 방사선 조사군의 평균 임신주머니 수는 13.8개였고, 평균 태아의 수는 12.8마리로 태아 생존율은 약 92.8%였다. 평균 임신주머니의 수와 태아 생존율은 비슷하였으나, 태아의 평균 체중은 대조군이 480.00 ± 29.81 mg, 실험군이 423.80 ± 44.44 mg으로 실험군이 현저히 ($p < 0.01$) 낮았다 (Table 3).

2. 발가락 형태형성 관찰조건

발생 14.7일의 대조군에서는 발생중인 발이 라켓

Table 2. The pregnancy outcome on GD 15.7 after X-ray irradiation

Measurement\Groups	Control	X-ray
Number of dams	5	10
Number of pregnant sacs (average)	75 (15)	165 (16.5)
Number of live fetuses (average)	70 (14)	155 (15.5)
Survival rate (%)	93.3	93.9
Body weight of fetuses (M±SD, mg)	316.40 ± 26.49	$227.8 \pm 24.86^*$

*: $p < 0.01$, GD : gestation day

Table 3. The pregnancy outcome on GD 16.7 after X-ray irradiation

Measurement\Groups	Control	X-ray
Number of dams	5	10
Number of pregnant sacs (average)	70 (14)	138 (13.8)
Number of live fetuses (average)	70 (14)	128 (12.8)
Survival rate (%)	100	92.8
Body weight of fetuses (M±SD, mg)	480.00 ± 29.81	$423.80 \pm 44.44^*$

*: $p < 0.01$, GD : gestation day

모양으로 납작하게 퍼져 발판을 형성하였고, 발가락 열이 분화되어 있었으며, 그들 사이의 발가락패임은 현저하지 않았다. 이 시기의 세포자멸사 소체는 주로 발판의 안쪽모서리와 가쪽모서리 몸쪽부위에서 광범위하게 산재되어 있었으며 밀도도 높았다. 그러나 임신 10.7일에 2Gy의 방사선을 조사한 실험군에서는 발은 라켓모양을 갖추고 발가락열들도 발달되었으나 발가락패임은 나타나지 않아 대조군보다 형태형성이 지연되고 있음을 알 수 있었으며, 세포자멸사 소체들도 대조군과 같이 발판의 안쪽·가쪽모서리 몸쪽부위에서 관찰되었으나 그 출현 정도가 현저히 적었다 (Fig. 1a, b).

발생 15.7일의 대조군 발가락을 보면 발생 14.7일에 비해 발판은 커지고 발가락열은 길어졌으며, 발가락패임도 비교적 현저해졌다. 세포자멸사 소체들도 발판의 안쪽·가쪽모서리 몸쪽부위에 높은 밀도로 산재되어 있었다. 그러나 실험군에서는 대조군보다 발의 발생이 지연되는 소견을 보였으며, 세포자멸사 소체의 출현도 대조군에 비해 그 밀도가 현저히 낮았다 (Fig. 2a, b).

한편, 발생 16.7일의 대조군 발가락을 보면 발가락 사이의 패임은 매우 현저해졌으며, 세포자멸사 소체들은 발가락패임쪽 발가락 상피와 발가락열 사이막 조직에 분포되어 있었다. 그러나 실험군에서는 대조군에서와 마찬가지로의 형태형성은 진행되고 있었으나 그 정도는 지연되고 있었다. 한편, 이 시기에 실험군에서도 대조군과 같이 발가락패임쪽 발가락 상피와 발가락열 사이막 조직에서 활발한 세포자멸사 소체를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3a, b).

3. 방사선으로 유발된 흰쥐 뒷다리의 선천성 기형

본 실험에서 관찰된 흰쥐 뒷다리의 선천성 기형을 보면 대조군에서는 모두 정상으로 나타났으나 실험군에서 발가락 결핍증과 발판형성의 비대칭성이 관찰되었다. 발가락의 수적 이상은 모두 발가락 결손증이었으며, 14.7일에는 대조군과 실험군 모두에서 발가락패임이 현저하지 않아 정확한 발가락 개수 확인이 불가능하였으나, 다른 일령에서는 실험군에서 발가락이 4개인 기형은 오른쪽이 15.7일에

고찰

Table 4. Numerical anomalies of the digits of hindlimbs in the rat fetuses after irradiation on GD 13.7

Side	digital count\GD	14.7	15.7	16.7	
Right limb		4	0	13	25
		3	0	18	15
		2	0	28	3
	Total	0	59	43	
Left Limb		4	0	25	18
		3	0	15	10
		2	0	18	3
	Total	0	58	31	

GD: gestation day

Table 5. Asymmetry of the hindlimbs in the rat fetuses after irradiation on GD 13.7 (%)

Side\GD	14.7	15.7	16.7	Total
Right limb	120 (76.4)	65 (41.9)	30 (23.4)	215 (48.9)
Left limb	95 (60.5)	30 (19.4)	10 (7.8)	130 (29.5)*

*: $p < 0.01$, GD: gestation day

13마리, 16.7일에 25마리 나타났으며, 왼쪽은 15.7일에 25마리, 16.7일에 18마리 나타났고, 발가락이 3개인 기형은 오른쪽이 15.7일에 18마리, 16.7일에 15마리였고 왼쪽은 15.7일에 15마리, 16.7일에 10마리였으며, 발가락이 2개인 기형 즉 발과열은 15.7일에는 오른쪽 28마리, 왼쪽 18마리였고, 16.7일에는 오른쪽과 왼쪽 모두에서 3마리씩 관찰 되었다. 일령별로 보면, 15.7일에는 오른쪽 59마리, 왼쪽 58마리의 숫적 이상이 관찰되었고, 16.7일에서는 오른쪽 43마리, 왼쪽 31마리의 숫적 이상이 관찰되었다. 전체적으로 오른발이 102마리였고, 왼발이 89마리로 양쪽의 숫적 차이는 현저하지 않았으나, 특별히 오른발에서는 발과열이 28마리로 왼발의 18마리보다 더 많이 나타나 오른발의 기형이 좀 더 심한 것으로 생각되었다(Table 4).

발가락 형태의 대칭성에 있어서는, 오른쪽에 비대칭이 있는 예는 14.7일에 120마리, 15.7일에 65마리 및 16.7일에 30마리였고, 왼쪽에 비대칭이 있는 예는 14.7일에 95마리, 15.7일에 30마리 및 16.7일에 10마리로 나타나 오른쪽이 왼쪽에 비해 유의하게 ($p < 0.01$) 많이 나타났다(Table 5).

세포자멸사는 1972년 병리학자 Kerr가 간세포 괴사를 관찰하던 중 기준에 알려져 있던 세포괴사와는 다른 형태학적 세포 소실 소견을 발견하고 명명한 것으로 (Kerr 등 1972), 1990년대 들어 이러한 세포자멸사가 광범위한 생체 조절기능에 관여한다는 것이 밝혀졌다. 지금까지 세포자멸사가 관여하는 것으로 밝혀진 현상으로는 개체의 발생에서 발가락형성, 망막 발생 및 구개융합, 곤충의 변태, 성체에서 가역적으로 팽창을 거듭하는 조직의 퇴행 즉 부신 결절, 전립샘 및 젖샘 등의 퇴행과 자궁속벽과 난포의 퇴축과 같은 생리적 현상과 이외에도 종양의 발생과 신경질환과 같은 병적 현상은 물론 방사선이나 독성물질에 의한 조직손상과 같은 외부적 자극에 의해서도 세포자멸사가 유발되고 있음이 밝혀졌다 (Haimovitz-Friedman 등 1994, Lee 등 1998). 즉, 세포자멸사는 특정한 생리적 신호 또는 세포사멸인자로 인해 유발될 뿐 아니라, 다양한 외부적 자극에 의해서도 초래됨을 의미한다.

본 실험에서 실험군이 대조군에 비해 발가락열 형성 정도와 발가락패임의 깊이가 14.7일과 15.7일에는 현저히 저하되어 있었고, 세포자멸사 소체의 상대적 밀도는 14.7일에 현저하게 낮았는데, 이는 발가락 형태 형성에 결정적으로 작용하는 세포자멸사가 방사선에 의해 억제되었음을 의미하는 것으로 본다. 정상적으로는 발가락열 사이막을 형성하고 있는 세포들이 세포자멸사를 일으켜 떨어져 나가야만 온전한 발가락이 형성된다. 그러나 본 실험에서 방사선에 의해 세포자멸사가 억제된 것은 뒷다리 발생과정중 뒷다리뼈 형성 시점인 발생 13.7일에 노출된 방사선에 의해 뒷다리분화를 주도하고 있는 선단외배엽능선 세포들중 일부가 사망 또는 억제되어 그곳으로부터 분비되는 성장인자 등의 부족으로 발가락분화가 지연되기 때문으로 생각된다. 한편, 16.7일에 이르기까지 성장지연은 계속되고 있으나 세포자멸사 소체가 대조군과 비슷하게 출현한 것은 이 세포들이 방사선의 영향으로부터 회복되었기 때문으로 생각된다. 즉, 방사선에 의한 세포자멸사의

억제기전 (caspase, NF- κ B, Bcl-2, sphingomyelinase 등)이 일시적으로 억제되었다가 재개되었음을 의미하는 것으로 보인다 (Nicholson 등 1995, Allen 등 1998, Sakahira와 Enari 1998, Widmann과 Gibson 1998). 그러나 본 실험에서 합지증 등의 다양한 형태 이상이 초래된 것은 방사선의 영향으로부터 회복은 되었으나 분화가 지연되어 나타난 결과로 발생의 시기특이성 때문에 (Lee 등 1998) 더 이상 분화가 일어나지 못하여 초래된 결과로 생각된다.

또한 본 실험에서는 정상보다 적은 수의 발가락을 가진 4발가락기형, 3발가락기형 및 발과열등이 실험군에서 관찰되었는데 이 또한 세포자멸사와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각된다. 즉 방사선에 의해 뒷다리의 분화를 주도하는 선단외배엽능선 세포수의 감소나 기능저하가 일어나 그 아래에 있는 중간엽으로 보내는 신호의 부족이 초래되고 그로 인해 5개의 발가락을 결정할 연골모델이 제대로 형성되지 않아 발가락 감소증이 나타난 것으로 보인다. 즉 이 기형형성 과정은 방사선에 의해 유발된 선단외배엽능선 세포들의 세포자멸사 때문에 일어난 결과로 생각할 수 있겠다. 그러나 한편으로는 외형상 발가락 감소증이 발가락 발생지연으로 인해 발가락 사이막 중간엽조직을 구성하고 있는 세포들이 세포자멸사를 일으킬 시기를 놓쳐 초래된 발가락 융합증으로 생각할 수도 있겠다. 즉 발가락을 포함한 모든 기관의 발생은 시기 특이적이기 때문에 방사선의 영향으로 발가락사이막 중간엽세포들이 정상적으로 능동사망을 일으키는 시기를 지나 발가락 사이막이 형성되었기 때문에 더 이상 세포자멸사가 일어나지 않아 발가락 융합증이 생긴 경우로 생각된다. 이를 확인하기 위해서는 모든 기형태아의 조직표본을 만들어 발가락뼈들을 관찰해야 할 것으로 생각된다. 그러나 어떤 경우이든 뒷다리쪽 발생시기에 조사한 방사선에 의해 선단외배엽능선 세포들에 세포자멸사가 일어났기 때문에 초래된 것임은 확실하다고 보며, 따라서 방사선에 의한 발가락의 숫적 및 형태이상은 뒷다리쪽 발생시기에 이미 결정된 것이라고 할 수 있다.

이와같이 발가락의 기형형성에 있어 뒷다리쪽의 선단외배엽능선이 결정적 구조로 알려져 있으나 본

실험을 실시하면서 저자들은 선단외배엽능선 바로 아래에 위치한 중간엽세포들의 상호작용을 고려해야 할 것임을 발견하였다. 즉 선단외배엽능선 세포들에서 분비되는 인자들에 의해 중간엽세포들의 분화가 결정되지만 방사선 조사가 이 중간엽세포들에도 직접적인 영향을 미쳐 세포사망, 대사억제, 운동성의 억제 등을 일으켜 연골로의 분화를 저해했기 때문에 기형이 발생되었을 가능성 (Lee 등 1998)도 함께 고려해야 될 것으로 생각되었다. 동시에 중간엽세포의 부족은 선단외배엽능선 상피세포와의 상호작용 즉 대화에 필요한 인자의 부족을 초래한 것도 기형형성과 관련한 것으로 생각할 수 있었다. 그러나 발가락기형이 오른쪽에서 현저하게 많이 나타나는 현상에 대해 어느 한 쪽이 기관분화에 있어 우세함을 의미하는 것이라는 점 외에는 명확한 기전이 밝혀지지 않은 실정 (Lee 등 1998)이지만, 양측의 발생시기의 미세한 차이 또는 양쪽 발가락 선단외배엽능선세포들이 갖는 기형유발물질에 대한 미세한 감수성의 차이등도 함께 고려되어야 할 것으로 생각된다.

세포자멸사는 매우 정교하게 프로그램된 과정을 거치면서 새로운 유전자가 발현되고 특이한 형태학적 변화를 보이면서 세포가 사멸하는 것으로 이 과정에는 caspase, NF- κ B, Bcl-2 단백질, sphingomyelinase, DNA와 미토콘드리아를 절단하는 효소 등 다양한 신호전달물질이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 한편, 세포는 이에 대응하는 여러 기전을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 다양한 스트레스에 의해 유도되는 HSPs (heat-shock proteins)의 과발현이 세포자멸사를 유발하는 인자에 노출된 세포의 생존을 증가시키고, HSPs의 과발현은 TNF에 의해 유도되는 세포자멸사를 억제하고 (Schendel 등 1997) 산화적 스트레스, TNF, CD95, staurosporine, 항암제에 대한 저항성을 증가시킨다 (Mehlen 등 1996)고 한다. 염증유전자 발현의 매개체로서 알려져 있는 NF- κ B도 세포자멸사를 억제하는 주요 전사요소로, NF- κ B RelA-knockout mice에서 출생전 간세포가 과도한 세포자멸사를 일으키는 것이 바로 이를 입증해 준다 (van Antwerp와 Verma 1996, Beg와 Baltimore 1996, Wang 등 1996). 세포자멸사는 Bcl-2에 의해서도 억

제된다(Allen 등 1998). 그 예로 ICE (interleukin-1 β convertase enzyme) 유전자를 배양 중인 흰쥐 세포에 주입하여 ICE단백이 세포를 죽이는 것을 확인한 실험에서 ICE에 의한 세포자멸사가 Bcl-2에 의해서 억제된다는 것이 밝혀졌다(Schendel 등 1997). 반면에 p53은 세포자멸사의 촉진인자(prmotor)로 작용하는 것으로 잘 알려져 있다(Yonish-Rouach 등 1991). 본 실험에서 방사선 조사로 인해 발생한 뒷다리 기형이, 발생이 진행됨에 따라 감소되고 또한 세포자멸분해 밀도의 변화양상을 살펴봤을 때 방사선이라는 외부 스트레스가 정상적으로 발가락열 형태 형성에 관여하는 세포자멸사 억제단백들을 발현시켰을 것으로 추정된다. 또한 시간이 지나면 방사선 조사 후 억제되었던 세포자멸사가 재개되어 정상적인 발달양상을 나타내는 것으로 추정된다.

본 실험에서는 방사선이 뒷다리 선단외배엽능선 세포에 세포자멸사를 유발하므로써 다양한 형태 이상을 일으킨 것으로 밝혀졌으나, 또다른 실험에서는 30 Gy의 방사선을 HL-60세포에 조사 바 5시간까지는 생존율이 감소하다가 그 이후에는 다시 생존율이 증가함을 보여 주었는데, 이것은 세포에 방사선이 조사되었을 때 일부 세포는 자극을 이기지 못하고 사멸되는 반면, 나머지 살아남은 세포는 자신을 살리기 위한 기전에 의해 회복된다는 보고(Haimovitz-Friedman 등 1994)도 있다. 이는 최근 방사선저항성 또는 방사선적응성(hormesis)과 관련하여(Wang과 Cai 2000) 발생과정에서 좀 더 연구해야할 과제로 보인다.

본 실험을 통해 방사선이 정상적인 발가락 형성 과정중 선단외배엽능선 세포들에 세포자멸사를 일으켜 다양한 숫적 및 형태적 발가락이상을 초래하는 기형형성기전의 일부를 확인할 수 있었으나, 좀 더 확실한 기전을 밝히기 위해서는 향후 단백질 분석, 면역조직화학 및 전자현미경 관찰 등 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK : Mechanism controlling

cellular suicide : role of Bcl-2 and caspases. *CMLS* 54: 427-445. 1998.

Beg AA, Baltimore D : An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274: 782-783, 1996.

Garcia-Martinez V, Marcias D, Ganan Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA, Hurler JM : Internucleosomal DNA fragmentation and PCD (apoptosis) in the interdigital tissue of the embryonic chick limb bud. *J Cell Sci* 106: 201-208, 1993.

Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RA, McLoughlin M, Fuks J, Kolesnick RN : Ionizing radiation acts on cellular membranes generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180: 525-535, 1994.

Hopkinson-Woolley J, Hughes D, Gordon S, Martin P : Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and fetal mouse. *J Cell Sci* 107: 1159-1167, 1994.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972.

Kim CH, Park SG, Kim S, Park KR, Kim WS : Congenital anomalies of the rat hindlimb induced by 5-fluorouracil. *Chungnam Med J* 23: 13-37, 1996. (in Korean)

Kochhar DM, Jiang H, Harnish DC, Soprano DR : Evidence that retinoic acid-induced apoptosis in the mouse limb bud core mesenchymal cells is gene-mediated. *Prog Clin Biol Res* 383B: 815-825, 1993.

Kwon OY, Kim WS : Recent Issue of apoptosis researches in animals. *Korean J Life Science* 7: 66-72, 1997. (in Korean)

Lee SB, Chui SB, Cho GJ, Yang EJ, Park KR, Lee YH, Kim WS : Morphogenesis of the hindlimb digits and 5-FU induced apoptotic changes. *Korean J Phys Anthropol* 11: 117-129, 1998. (in Korean)

Mehlen P, Kretz Remy C, Preville X, Arrigo : Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human aB expression-mediated increase in glutathione is essential protective activity of these proteins against TNF α induced cell death. *EMBO J* 15: 2695-26706, 1996.

Mglinets VA : Genetic regulation of limb development in vertebrates. *Genetika* 29: 1765-1783, 1993.

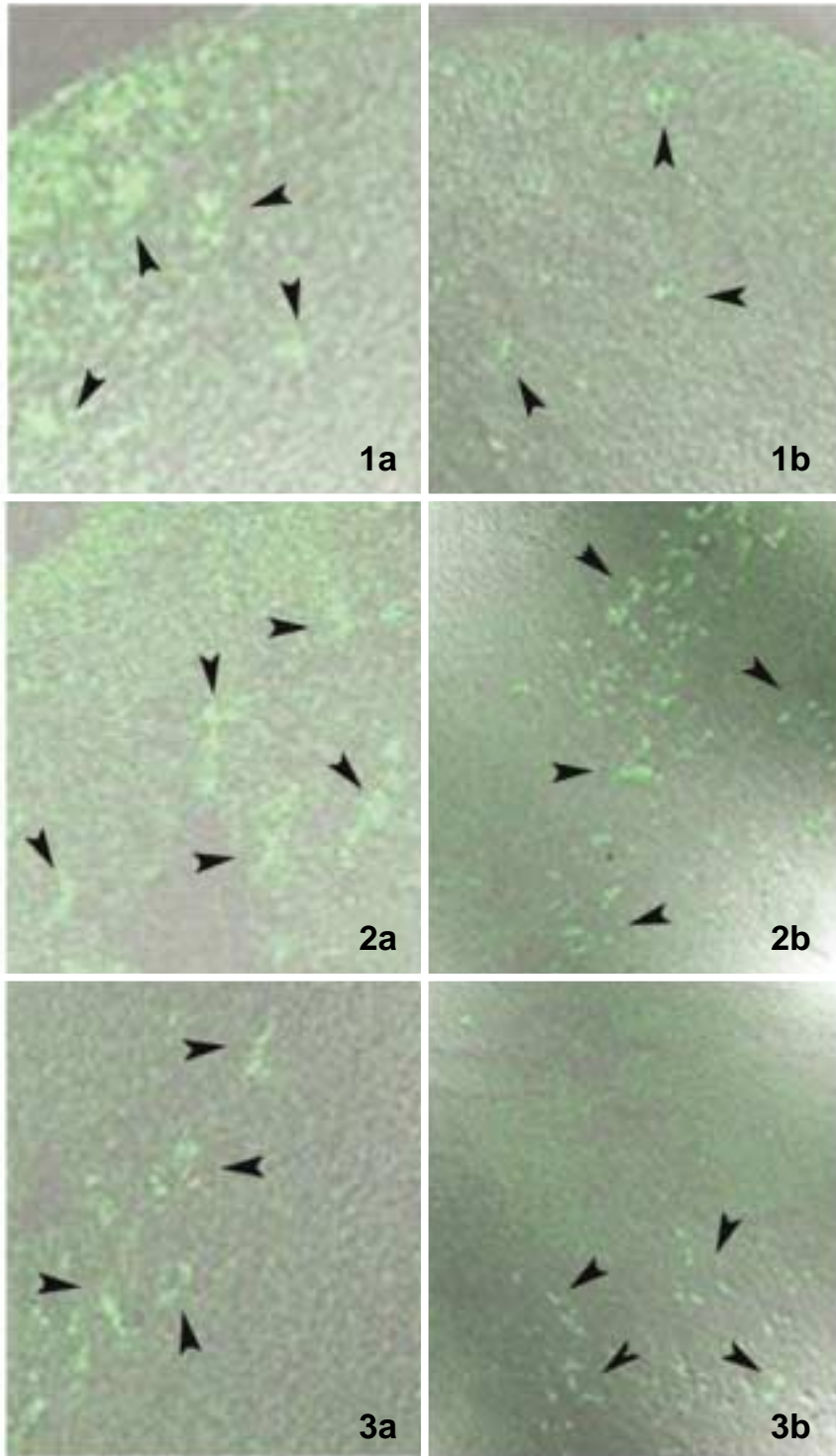
Mori C : Significance of programmed cell death in mammalian limb and palate development. *Acta Anat Nippon* 70: 503-508, 1995.

- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin TT, Yu VL, Miller DK : Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376: 37-43, 1995.
- Nishikawa S, Sasaki F : Apoptosis of transitional ameloblasts and MHC class II expression in the rat incisors. *Acta Anat Nippon* 71: 597-603, 1996.
- Sakahira H, Enari M : Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99, 1998.
- Saunders JM : Death in embryonic system. *Science* 154: 604-612, 1966.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC : Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5113-5118, 1997.
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Kraupp-Grasl B, Oberhammer F, Wagner A : Programmed cell death and its protective role with particular reference to apoptosis. *Toxicol Lett* 64: 569-574, 1992.
- Seo JS : New vision of medical biology at the end of 20th century, apoptosis-mechanism of programmed cell death. *JBMB* 31: 30-33, 1998. (in Korean)
- Singh N, Anand S : Apoptosis in health and disease. *Indian J Physiol Pharmacol* 39: 91-94, 1995.
- Tone S, Tanaka S, Minatogawa Y, Kido R : DNA fragmentation during the PCD in the chick limb buds. *Exp Cell Res* 215: 234-236, 1994.
- Ueda N, Shah SV : Apoptosis. *J Lab Clin Med* 124: 169-177, 1994.
- van Antwerp DJ, Verma IM : Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274: 787-789, 1996.
- van der Hoeven F, Schimmang T, Volkmann A, Mattei MG, Kyewski B, Ruther U : Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant fused toes. *Development* 120: 2601-2607, 1997.
- Wang GJ, Cai L : Induction of cell-proliferation hormesis and cell-survival adaptive response in mouse hematopoietic cells by whole-body low-dose radiation. *Toxicol Sci* 53: 369-376, 2000.
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. : TNF and cancer therapy-induced apoptosis ; Potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 274: 783-787, 1996.
- Widmann C, Gibson S : Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem* 273: 7141-7147, 1998.
- Wolpert L : The triumph of the embryo. Oxford University Press, Oxford, New York, pp 59-76, 1991.
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem T, Sachs L, Kimchi A, Oren M : Wild-type p 53 induces apoptosis of myeloid leukemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-349, 1991.
- Zaken Z, Qualino D, Ahuja HS : Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the hammertoe mutant. *Develop Biol* 165: 294-297, 1994.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Confocal laser scanning micrographs of apoptotic figures at the lateral border of developing digit of the rat fetus at GD 14.7. 1a : control group, 1b : experimental group. ×400. Apoptotic bodies (arrowheads) were decreased markedly in experimental group.
- Fig. 2.** Confocal laser scanning micrographs of apoptotic figures at the lateral border of developing digit of the rat fetus at GD 15.7. 2a : control group, 2b : experimental group. ×400. Density of apoptotic bodies (arrowheads) was similar in both control and experimental groups.
- Fig. 3.** Confocal laser scanning micrographs of apoptotic figures at the lateral border of developing digit of the rat fetus at GD 16.7. 3a : control group, 3b : experimental group. ×400. Density of apoptotic bodies (arrowheads) was similar in both control and experimental groups.

K C I



Abstract

Changes of Apoptosis After X-irradiation During the Hindlimb Development in the Rat Fetus

Won-Sik Kim, Soo-Il Kim, Moon-June Cho¹, Geun-Ja Cho², Seung-Ro Han,
Dal-Sun Cha, Seung-Taek Song, Hyun-Woo Kyeong, Jeong-Ho No

Department of Anatomy and ¹Therapeutic Radiology, College of Medicine, Chungnam National University

²College of Visual Images and Health, Kongju National University

Ionizing radiation exerts harmful effect during the limb development, but the exact mechanism is still largely unknown.

In this study, 2 Gy of X-ray irradiated to the rat fetuses on gestation day of 13.7 when the hindlimb buds appear, and sacrificed at GD 14.7, GD 15.7 and GD 16.7, respectively. To reveal the changes of apoptotic figures between control and experimental groups, TUNEL immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy were carried.

Mean body weight of fetuses of irradiated groups were decreased significantly compared to the control group. Numerical digit anomalies and asymmetries between right and left sides were increased significantly in the irradiated group compared to control group. Some digit anomalies were increased significantly in the right side.

Radiation-induced decrement of the density of apoptotic figures on GD 14.7 was presumed to be related with foot and digit anomalies.

Key words : Limb development, Morphogenesis, Apoptosis, Confocal laser scanning microscope