

세포고사

이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실

정성민

Apoptosis

Sung Min Chung, M.D.

Department of Otolaryngology, College of Medicine, Ewha Womans University

I. 서 언

세포고사 (Apoptosis)는 세포가 죽을때 이미 준비된 상태에서 사망 프로그램을 가동시킴으로써 능동적으로 죽음을 맞이한다는 개념이다. 세포의 괴사를 수동적인 사고사 (accidental death) 라고 본다면 세포고사는 자연사 (natural death)로써 능동적이면서 자발적인 사망기전이다³⁵⁾.

세포의 이러한 죽음에 대한 형태학적 유형은 1900년대 초 Rabi와 Jokl 이 광학 현미경으로 율쟁이와 병아리 태아 발생을 관찰하면서, 염색이 진하게 되는 파립성 형질 (dark-staining granule)을 보고하고 이것이 세포가 정상적으로 죽는 것과는 무관하다고 보고한 바 있다³⁾.

1951년 Gl cksmann¹⁸⁾ 이 태아에서 세포사망을 자세히 관찰하고 이 사망기전이 괴사와는 다르며 정상적인 발생과정에서도 자연적인 세포사망이 일어난다고 주장하였다.

1965년 Kerr²⁶⁾는 성숙한 쥐의 간 문맥을 묶은 후 간세포가 죽는 양상을 관찰하면서, 수축형괴사가 나타나 핵과 세포질이 수축되면서

마지막에는 작은 세포체로 나뉘어져 대식세포에게 먹히게 된다는 것을 보고하였다.

그후, 1972년 Kerr, Wyllie, 그리고 Currie 등이 쥐 유방암세포가 죽을때, 간문맥을 묶은 후 간세포가 죽는 유형으로 죽는 것을 발견하고, 이를 처음에는 수축괴사 (shrinkage necrosis) 라고 표현하였다가 곧이어 그리스어의 falling off (낙엽이 떨어짐) 뜻을 가진 apo (off) 와 ptosis (falling)의 합성어인 apoptosis (세포고사)라고 처음 명명하게 되었다³⁰⁾.

그 이후부터 세포고사는 세포 손상의 분명한 중요한 한 형태로 인식되고, 태생기나 성숙기 모두에서 불필요한 세포들을 제거하기 위한 중요한 생리적 기능이라는 것을 인정하게 되었다.

이러한 세포고사는 배태발육 (embryogenesis), 면역 및 신경계 발달 (development of immune and nervous system), 그리고 종양 퇴행 (tumor regression)과 같은 생체내 여러가지 생리 및 병리학적 상태에서 흔히 관찰되기 때문에, 본 글에서는 생체내에서 세포고사가 관계되는 사건들을 살펴보고, 세포고사의 형

KEY WORDS : Apoptosis · General characteristics

태학적 특징과 생화학적 특징들을 소개한 다음, 최근시행되고 있는 세포고사의 관찰방법과, 지금까지 보고된 각종 질환에서의 세포고사에 대한 연구를 간단하게 소개하기로 한다.

II. 세포고사가 관계된 생리학 및 병리학적 사건들

세포고사는 형태학적 사건을 표현하는 명칭이고, 기능적으로 볼 때는 세포의 예정된 죽음(programmed cell death)으로 표현되고 있으며 명칭에 대해서는 다소 논란이 있으나³³⁾, 최근까지 세포고사와 예정된 세포사(programmed cell death)는 동의어로 사용되고 있다.

이러한 세포고사는 변태(metamorphosis), 배태발육(embryogenesis) 동안 세포들의 예정된 파괴때 볼 수 있으며, 다음과 같은 다양한 생리학, 병리학적 사건들에 관계되고 있다.

1. 성인에서 호르몬 의존성 퇴축(involution)과 관계되며, 이러한 현상은 월경주기 동안 자궁내막의 분해(breakdown)³⁹⁾, 폐경때의 난소 포상의 폐쇄⁴¹⁾, 수유유방의 이유후의 퇴행(regression)³⁹⁾에서 볼 수 있다.

2. 장음와상피(intestinal crypt epithelia) 같은 증식되는 세포집단에서의 세포결손(cell deletion)에 관여한다³⁹⁾.

3. 종양이 퇴행하거나 또는, 활동적으로 세포가 증식하는 종양에서의 세포죽음에서 볼 수 있다^{27,38)}.

4. 성장하는 흉선에서 자기 항원에 반응하는 T세포의 결손과 cytokine 결핍시 B와 T 림프구의 죽음에서 나타난다¹²⁾.

5. 호르몬 의존세포의 병리학적 위축, 즉 거세후 전립선위축²⁸⁾, glucocorticoid 투여후 흉선 림프구의 상실때 볼 수 있다⁵⁷⁾.

6. 관폐쇄후 실질기관의 병리적 위축에서 나타나며 주로 해장, 이하선, 신장등에서 관찰할 수 있다³⁵⁾.

7. 특정 바이러스 질환에서의 세포 손상에서 볼 수 있는데, 예를들면 바이러스성 간염의

간에서 발견되는 Councilman bodies는 세포고사에 의한 세포조각(fragment)이다³⁵⁾.

8. 다양한 종류의 손상을 일으키는 자극들—경미한 열손상, 방사선조사, 세포독성 항암제, 저산소증—에 의해 나타나는 세포죽음으로 이러한 자극들은 강하게 주면 괴사를 일으키지만 약하게 주는 경우 세포고사를 일으킨다³⁵⁾.

이상과 같이 세포고사는 다양한 조건에서 관찰되며, 호르몬이나 다른 영양요소들의 부가(addition) 또는 중단(withdrawal)에 의해 유발될 수 있다는 것을 알 수 있으며²⁴⁾, 이와같은 작용에 의해 세포성장과 세포고사는 서로 조화되거나 또는 서로 역행관계가 될 수도 있다. 그러므로 세포고사는 정상세포밀도를 조절하는데 매우 중요하고, 또한 세포고사에 의한 세포사의 역제는 암성장의 결정적인 요인이 되기도 한다. 이외에도 세포고사는 비정상세포나, 손상된 세포들을 제거하는 한 기전이기도 하다는 것을 알 수 있다.

III. 세포고사의 형태학적 특징

1. 세포고사와 괴사의 차이점

세포사에는 세포고사와 괴사의 두 종류가 있는데 세포고사는 앞에서 설명한 바와 같이 세포가 스스로 자멸하여 가는 능동적, 생리적 과정이며 이것에 의해 생체의 항상성기능(homeostatic function)이 유지되게 된다. 반면 괴사는 우발적으로 발생할 수 있고, 심한 손상으로 인하여 세포가 파괴됨으로써 염증반응과 함께 발생하게 된다⁷⁾.

세포고사와 괴사의 조직학적 차이점을 보면, 세포고사는 조직 속에서 개별세포를 산발적으로 탈락시키는 반면, 괴사는 인접세포들을 집단으로 손상시키게 된다. 그리고, 세포고사에서는 세포막의 손상이 없고, 세포막이 방울처럼 팽윤되는 현상을 보이나, 괴사에서는 세포막의 손상을 볼 수 있다. 또한 세포고사에서는 세포수축, 주위세포에 의한 탐식작용이 있고, 염증반응이 없으나, 괴사에서는 세포부종, 대

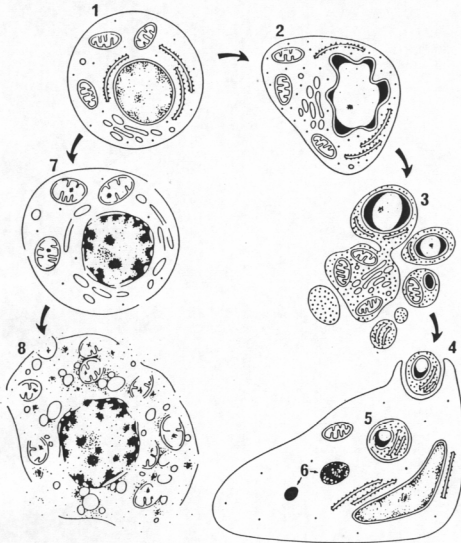


Fig. 1. Sequence of ultrastructural changes in apoptosis(2~6) and necrosis(7 and 8)
 1, Normal cell 2, Compaction and segregation of chromatin 3, Nucleus fragments and further condensation of cytoplasm 4, Phagocytosis by nearby cells and degradation by lysosomal enzymes 5, Rapidly reduction 6, In irreversibly injured cell, the onset of necrosis 7, Irregular clumping of chromatin 8, All cellular components disintegration

식세포에 의한 탐식작용, 급성염증 반응을 볼 수 있다²⁰⁾.

일반적으로 세포고사의 경우 외부자극은 생리적인 것인데 반하여 괴사는 병리적이며, 세포고사는 라이소솜 효소유리 (lysosomal enzyme release)가 결여되어 있는데 반해, 괴사는 효소유리가 있으며, 세포고사는 DNA 파손이 뉴클레오솜 사이 (internucleosome)에 일정하게 일어나는데 괴사는 불규칙하다¹⁷⁾ (Table

1, Figure 1).

2. 세포고사의 조직학적 소견

(1) 전자현미경 소견

세포고사가 일어나고 있는 세포를 전자현미경으로 관찰하면 다음과 같은 형태학적 특징을 가진다. 세포고사 발생시 가장 최초의 형태학적 특징은 핵에서 발견되는데, 즉 핵 안의 염색질의 농축 (condensation)이 발생되면서 염

Table 1. General differences between apoptosis and necrosis

Characteristics	Apoptosis	Necrosis
Stimuli	Physiological	Pathological (injury)
Occurrence	Single cells	Groups of cells
Reversibility	No (after morphological changes)	Yes) up to the point of no return)
Adhesions between cells and to BM	Lost (early)	Lost (late)
Cytoplasmic organelles	Late stage swelling	Very early swelling
Lysosomal enzyme release	Absent	Present
Nucleus	Convolution of nuclear outline and breakdown (karyorrhexis)	Disappearance (Karyolysis)
Nuclear chromatin	Compaction in uniformly dense masses	Clumping not sharply defined
DNA breakdown	Internucleosomal	Randomized
Cell	Formation of apoptotic bodies	Swelling and later disintegration
Phagocytosis by other cells	Present	Absent
Exudative inflammation	Absent	Present
Scar formation	Absent	Present

색질이 핵막 바로 아래 가장자리로 응집되어 다양한 모양과 크기의 짙은 응어리로 보인다 (Fig 2).



Fig. 2. Early stage of apoptosis: Convolution of the nuclear outline and segregation of condensed chromatin in sharply circumscribed uniformly fine granular masses that lie against the inner surface of the nuclear envelope.

세포고사는 처음에는 광범위하게 표면이 팽윤되어 방울처럼 보이지만 (Fig 3), 곧이어 조각들로 나뉘어져서 세포질과 촘촘하게 채워진 소기관들로 구성된 막으로 둘러싸인 세포고사체 (apoptotic body)로 보인다. 이때 핵소체

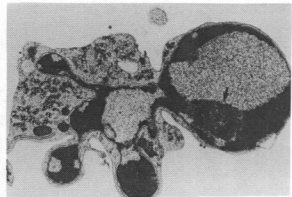


Fig. 3. Convolution of cell and nuclear outline and compact nucleolar remnant (arrow).

(nucleolus)의 잔유물은 핵안에 있는 핵조각안에 남아있으며 과립질의 형태로 농축된 염색질 내면 가까이에 있게 된다 (Fig 4).

핵에서 변화가 일어나면서 동시에 세포질에도 비슷한 변화가 일어나, 세포질 농축이 발생되며, 세포표면의 광범위한 팽윤에 의한 방울형성은 주사형현미경 (scanning EM)에서 잘 관찰된다 (Fig 5). 농축된 세포질 안에는 투명한 공포가 많으며 때때로 그안의 내용물을 세포의 유출 (exocytosis)에 의해 배설하기도 한다 (Fig 6).

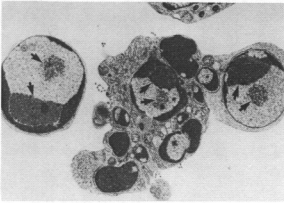


Fig. 4. Multiple nuclear fragments, which are enclosed by double membraned and which have varying chromatin content. Nucleolar remnants are indicated by arrows.

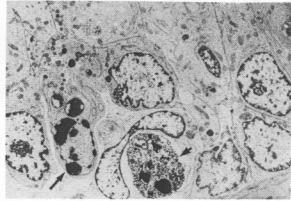


Fig. 7. Degraded apoptotic body within intraepithelial macrophage (short arrow) and early apoptosis of epithelial cell (long arrow).

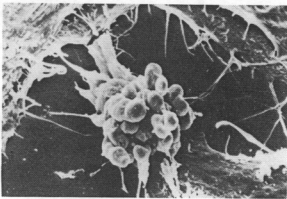


Fig. 5. The surface protuberances are graphically obvious using scanning electron microscopy.

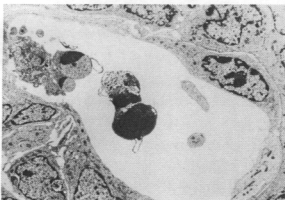


Fig. 6. Apoptotic bodies shed into tubule lumen in nephrogenic zone of kidney.

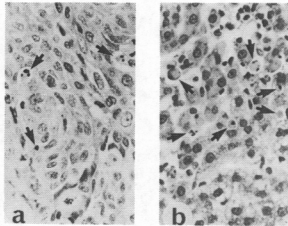


Fig. 8. Light microscopic appearance of apoptotic bodies (arrow).
 a, Untreated poorly differentiated human carcinoma.
 b, Rat liver 3 days after ligation of associated portal vein branch.

그후 고사된 세포나 세포고사체들은 인접의 건강한 세포, 즉, 실질세포나 대식세포에 의해 탐식되고, 라이소솜내에서 분해된다 (Fig 7). 그리고 없어진 세포고사세포에 의해 차지되었던 공간은 인접세포들이 이동하거나, 증식하여 메꾸어 지게 된다.⁵⁰⁾

(2) 광학현미경 소견

세포고사가 되고 있는 세포의 형태학적 특징을 Hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학

현미경으로 관찰하였을때, 세포고사는 조직속에서 한개의 세포 또는 세포들의 작은 집단에서 발생되며, 고사된 세포는 짙은 핵염색체 조각(dense nuclear chromatin fragments)을 가진 강한 호산성 세포질(intensely eosinophilic cytoplasm)을 가진 원형의 또는 난원형의 응어리(mass)로 보인다(Fig 8). 그러나, 세포수축과 세포고사의 형성이 빠르게 일어나고, 이러한 조각들은 빠르게 탐식되고, 분해되고, 관장으로 밀어내어지기 때문에 상당한 세포고사자 조직 절편(histologic section)에서 보이기전에 이미 조직속에서 발생되고 있다는 것을 알아야 하며, 그 외에도 세포고사는 피사와는 달리 염증은 일으키지 않아야 하며, 이러한 이유때문에 조직학적으로 발견하기가 더욱 힘들다⁴³.

IV. 세포고사의 생화학적 특징

1. 세포고사의 생화학적 기전

세포고사가 유도되는 경로는 자극이나 세포 형태에 따라 매우 다양하여 그 과정에 대해 아직은 명확하게 밝혀져있지 않다.

세포고사의 특징적인 소견인 염색질 농축의 기전은 광범위하게 연구되어 있는데, 이러한 변화는 뉴클레오솜(nucleosome) 사이의 연결부위(linker region)에서 핵의 이중쇄 DNA가 절단되어 180 내지 200 염기쌍(base pair) 길이의 배수로 절단된 조각들이 생기는 것이다. 이러한 조각들에 의해 고사된 세포가 한천겔 전기영동(agarose gel electrophoresis)에서 특징적인 사다리 모양(ladder pattern)의 띠(band)로 나타나게 된다. 이 양상은 피사에서 보이는 무작위 DNA 분해에 의한 미만적 도말 형태(diffuse smear pattern)와 비교된다⁴⁰(Fig 9).

이러한 핵간 DNA 분할(internucleosomal DNA cleavage)은 내핵산분해효소(endonuclease)에 의해 조정된다고 추측되고 있으며 이 효소는 칼슘과 마그네슘에 의해 작동되며 아연에 의해 억제된다고 보고된 바 있다⁴⁰. 내핵

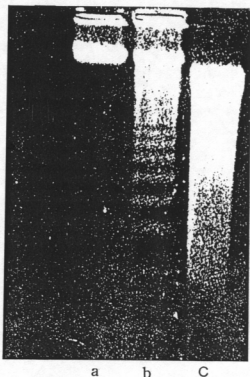


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis. a, control b, apoptosis; characteristic ladder pattern of DNA fragment c, necrosis; diffuse smearing of DNA

산분해효소는 몇몇 세포에서 구성성분으로 존재하며 1982년 Nikonova⁴⁰가 처음으로 칼슘/마그네슘 의존성 내핵산 분해효소(Ca^{2+}/Mg^{2+} dependent endonuclease)를 보고한 이래로 지금까지 6개의 서로 다른 칼슘/마그네슘 의존성 내핵산분해효소가 보고되고 있다^{43,44}.

지금까지 보고된 바로는 흉선세포의 고사에는 칼슘치의 상승이 필요하고 칼슘치가 상승되면 내핵산분해효소가 활성화되는 것으로 추측되고 있다³⁷. 그러나, 흉선세포의 고사를 일으키는 세 세포 내 칼슘치 상승외에 다른 인자(예를들면 Protein kinase C의 활성화)도 관여하는 것으로 보고되고 있고 또한 다른 종류의 세포에서도 세포내 칼슘치가 세포고사를 유도하는데 중요한 역할을 하는지에 대해서는 아직 밝혀진 것이 없다^{3,4,58}.

그외에도 아연이 세포배양에서 세포고사를 억제한다는 연구결과가 있으며 아연결핍 쥐 장관 내 표피에서 자연발생세포고사가 크게

증가된다는 연구결과로 세포고사에 관여하는 내핵산분해효소가 아연에 의해 억제된다는 것을 보여주고 있다^{10,11}.

최근에는 산성 pH에서만 활성화되고 금속성의 이온 (metal ion)은 필요하지 않은 Deoxyribonuclease II라는 내핵산분해효소가 세포고사에 관계된다는 보고가 있으며^{5,6} 인터루킨 2 의존성 세포독성 T 림프구 (interleukin 2 dependent cytotoxic T lymphocytes, CTL-2) 같은 세포에서는 마그네슘 의존성 내핵산분해효소 (Mg⁺ dependent endonuclease)의 농도가 높은 것으로 보고되고 있다²⁰.

이와같이 내핵산분해효소에 대한 많은 보고가 있으나 아직 어떤 내핵산분해효소가 세포고사에 관계되는지는 유전학적으로 특정한 내핵산분해효소만을 표현하는 세포가 만들어지기 전에는 알 수가 없으며, 또한 이러한 내핵산분해효소에 의한 핵간 DNA 분할이 앞서서 언급한 염색질 농축의 직접적인 원인인지는 아직 확실한 근거는 없다⁹.

고사된 세포의 세포용적과 모양의 변화는 부분적으로 transglutaminase 활성화에 의하는 것으로 생각되어지고 있다. transglutaminase는 세포고사가 진행되는 동안에 합성되고 활성화된다고 유일하게 알려진 단백질이며, 이 효소는 세포내 단백질들의 광범위한 교차결합 (cross-linking) 을 일으켜서 각화편평상피 (keratinized squamous cells)의 겹질과 유사하게 세포막 앞에 딱딱한 겹질을 형성하므로써 세포고사체가 주위세포에 의해 탐식되기전에 내용물이 밖으로 빠져나오지 못하게 하는 역할을 한다^{14,15}.

또한, 세포고사에서 특징적으로 보여지는 세포농축 (cellular condensation)은 세포내 밀도를 증가시키는데 그 기전은 아직 밝혀지고 있지 않다. 그러나, 최근 칼슘의존성 단백질효소 (Calcium dependant protease, Calpain)가 세포골격 (cytoskeleton)을 분해하여 세포가 주글 주글해지고 발아형태를 이루는데 관여한다는 보고가 있다⁹.

세포고사체가 주위세포에 의해 빨리 탐식되

는 것은 형질막이 변질되어 있다는 것을 의미하며 대식세포나 다른세포에 의한 세포고사체의 식작용은 이들 세포에 있는 고사된 세포와 결합하는 수용체 (receptors)들에 의해 조정된다. 대식세포에 있는 이러한 수용체 중의 하나가 vitronectin 수용체 (beta3-integrin)로서 고사된 호중구와 림프구의 탐식작용을 조정하는 것으로 알려져 있다⁹.

2. 세포고사 유도인자

세포고사 유도인자들은 세포 표면의 수용체와 결합한 후 신호가 전령자 (messenger)나 이차 전령자 (second messenger)들에 의하여 세포내로 전달되면 세포고사 유도관련 특정 유전자 발현이 증가되고 특히 단백질 합성이 증가되어 이 단백질들이 직접, 간접으로 자신의 DNA를 파괴하여 세포고사가 일어난다고 한다. 예로서 세포고사 유도 인자중의 하나인 glucocorticoid 를 흉선세포에 투여하면 내핵산분해효소 합성과 활성이 증가되어 DNA를 파괴하여 세포고사의 생화학적 특징적인 소견이 나타난다¹¹. 이러한 세포고사의 유도는 ATP 형태의 에너지를 필요로 하며 세포고사에 RNA와 단백질의 적극적인 합성이 필요한지 아닌지는 세포형태와 세포고사의 자극원에 의한다고 한다. 예를 들면 오랫동안 생존하는 림프구에서는 RNA 또는 단백질합성을 억제하는 물질들이 세포고사를 억제하지만 같은 물질들이 짧게 생존하는 호중구나 몇몇 백혈병 세포주에서는 세포고사를 증가시킨다는 것이다⁹.

이런 분명한 모순에 대한 설명으로는 대부분의 세포가 생리적인 세포죽음을 억제하거나 증진시킬수 있는 조절 단백질을 가지고 있으며 특정 세포에서 억제제나 증진제의 대사의 상대적인 비율에 의해 RNA와 단백질 합성을 정지하는 것이 세포고사를 방해하는지 또는 유도하는지에 달려있다고 하겠다⁹.

1980년도 후반부터 여러실험에서 세포독성 T 림프구와 자연살세포 (natural killer cell) 등에 의한 표적세포의 사망, 종양세포 성장억제효과가 있는 lymphotoxin, interferon, inter-

Table 2. Stimuli for apoptosis in different systems

Stimuli	Cell type	Inter-nucleosomal DNA fragments	Apoptotic nuclear and cytoplasmic morphology
ATP	Thymocytes, lymphoma cell line	Yes	Yes
Actinomycin D	Leukemia cell line, primary cultures of rabbit endometrium	Yes	Yes
A23187 Ca ²⁺ -Mg ²⁺ ionophore	Thymocytes, prostate organ culture	Yes	Yes
Cytochlasin B	T cell lymphoma line	Yes	Yes
Calcium	Immature thymocytes	Yes	Yes
Cycloheximide	HL-60, 1° cultures of rabbit endometrium	Yes	Yes
Anti-CD3/T-cell receptor antibody	Immature mouse thymocytes	Yes	Yes
Epipodophyllotoxins	Thymocytes	Yes	Yes
Glutotoxin	Macrophages, T blasts	Yes	Yes
Glucocorticoids	Thymocytes, lymphoma cell lines	Yes	Yes
Hyperthermia	Lymphoma, mastocytoma cell lines	Yes	Yes
Irradiation(soft beta or gamma)	Thymocytes, mouse fibroblasts	Yes	Yes
Lymphotoxin	Target cells	Yes	Yes
RU 486	Rabbit uterine epithelium	Yes	Yes
TCDD	Rat immature thymocytes	Yes	Yes
Tumor necrosis	Target cells factor	Yes	Yes
TGF-β1	Cultured rabbit endometrial cells	Yes	Yes

leukin, tumornecrosis factor (TNF), transforming growth factor (TGF-β) 등과 같은 cytokine, glucocorticoids 또는 여러종류의 항암제 (topoisomerase inhibitors, alkylating agents, antimetabolitics, hormone antagonist) 등에 의하여 세포고사가 유도됨을 발견하였으며 현재 까지 알려진 세포고사 유도인자들은 다음과 같다.^{17,20)} (Table 2).

3. 세포고사와 관련된 유전자 및 단백질을 앞서 설명한 바와 같이 여러 가지 외부 자극이나 세포고사 유도인자들에 의하여 세포내에서 새로운 유전자 발현이 증가되고 이 유전자에 의하여 신합성된 단백질이 세포고사를 유도하는 것으로 생각되고 있는데, 성장이나 압 유발에 관계된 몇몇 유전자들이 세포고사의 조절역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 이러한 세포고사유도에 있어서 항상 새로운

유전자 발현이 필요한 것이 아니라, 유전자 발현 억제에 의하여 세포고사가 유도된다는 것이다. 즉 예를 들면 세포고사가 세포고사를 유도하는 단백질의 반감기보다 훨씬 짧은 반감기를 가진 억제제에 의해 일시적으로 중지되었다가, 억제역할을 가진 단백질 합성이 방해되어 그러한 억제제가 감소하게 되면 다시 세포고사가 유도된다는 것이다.¹⁹⁾

지금까지 보고된 세포고사와 관련된 유전자 및 단백질은 다음과 같다.

(1) bcl-2 암유전자

bcl-2 유전자는 B세포 림프종 형성에서 발견되는 암유전자로서 단백질 산물은 미토콘드리아 막과 내형질세망, 그리고 핵막에서 발현된다. 일반적으로 bcl-2 암유전자는 세포고사를 직접적으로 조절하는 세포사 억제인자 (cell death suppressor, antidote to apoptosis)로 알려져 있다.²⁰⁾ bcl-2의 농도가 높으면 c-myc에

의해 유도된 세포고사로부터 세포를 방어하게 된다²⁾.

아직까지 bcl-2가 어떻게 세포사망기전을 억제하는지는 알수 없으나 단지 반응성 산소경로 (reactive oxygen pathway)에 관여하지 않는가 추측되고 있다³⁾.

1992년 Korsmeyer²⁰⁾ 등은 배양쥐 림프구세포에서 bcl-2와 heterodimer를 이루는 단백질인 Bax homodimer가 세포고사를 유도한다는 것을 발견하였는데, bcl-2와 Bax는 서로 heterodimer를 이룰수 있는데 만일 Bax가 주종단백질로 heterodimer를 만들면 세포고사를 촉진시키고, bcl-2가 주종이면 세포고사가 억제된다. 세포고사의 억제는 bcl-2에 의해 일어나고 Bax는 이를 촉진시키는데 서로서로 heterodimer를 이루므로써 미세한 양의 차이로써 이런 상을 조절하는 듯이 보인다고 하였다. 연구자들은 bcl 유사 단백질이 어떻게 세포고사를 억제하는지는 아직 이해하지 못하고 있다.

(2) p53 단백질

p53 종양억제유전자의 단백질산물은 복제형 DNA 합성 시작 전에 세포주기 진행을 정지시킬 수 있으며, 사람에게서 발생하는 많은 종양이 p53 유전자의 변이 또는 결손을 가지고 있다²⁰⁾.

p53의 기능부전은 DNA가 그 자체의 손상을 완전히 회복하기전에 DNA를 복사하므로써 이차적으로 변이된 세포가 만들어지게 하므로써 암을 유발시킬 수 있다²⁰⁾.

p53은 이와같이 세포분열의 억제인자일 뿐 아니라 상황에 따라 직접적인 세포고사유전자 (apoptogene) 즉, 세포고사를 유도하는 유전자로도 작용한다. 예를들면 골수양백혈병 세포주에서 정상 p53 단백질의 과생산은 세포고사에 의해 빠른 세포사를 유도한다²⁰⁾.

(3) myc 암유전자

myc 암유전자가 과발현되는 쥐의 섬유아세포에서 증식이 정지되는 조건이 되면 돌연 세포고사가 유도된다는 것을 발견하면서 myc 암유전자가 세포증식을 일으키지만 세포고사에 의한 세포사망도 일으킨다는 사실이 Evan 등¹³⁾

에 의해서 알려졌다.

myc 암유전자 중 c-myc와 s-myc 유전자들과 그 산물들이 여러종류 세포의 세포고사에서 발현이 증가되었다고 하나, 이들 유전자 산물들이 max라 부르는 단백질들과 heterodimer를 형성한 후 세포고사를 유도하는 기전에 관여하는 아직까지 불분명하다¹³⁾.

(4) Anti-Fas antibody

1989년 독일의 Krammer 박사팀들이 발표한 Apo-1 항원과 비슷한 시기에 일본의 Yonehara 교수팀들이 보고한 Fas 항원은 동일 단백질인데, 이 Apo-1/Fas 항원에 대응하는 anti-Fas 항체는 사람의 종양괴사인자 수용체, 신경성장인자 수용체와 결합하여 Apo-1/FAS 항원에 양성 반응을 보이는 세포들에서 세포생존에 관여하는 인자들의 작용을 차단하든지 또는 세포사망신호를 유도하여 세포들의 세포고사를 일으킨다고 한다¹³⁾.

(5) cell death (Ced) gene

선충 (nematode)의 변이체 (mutant)들에서 세포사망에 관련된 Ced 유전자들이 발견됐고 특히 Ced-1, Ced-2, 그리고 nuc-1 유전자들이 세포고사와 관련이 있다고 하며, Ced-3와 Ced-4 유전자들도 선충 발달시 세포들의 세포고사에 깊은 연관이 있을 것이라고 한다²⁰⁾.

V. 세포고사의 관찰 방법

1. 형태학적 방법에 의한 세포고사의 관찰

(1) 전자현미경에 의한 관찰

세포고사의 진단은 세포고사의 조직학적 조건에서 설명한 바와 같이 전자현미경을 이용한 초미세구조 (ultrastructure)의 관찰에 의해 할 수 있다.

하나의 세포가 세포고사체의 덩어리로 전환 되는데는 수 분밖에 안 걸리고, 조직내에서 형성된 이러한 세포고사체는 대부분 상주하는 대식세포 또는 근처에 있는 세포 즉 상피세포 등에 의해 빠르게 탐식된다. 이런 관찰은 방울처럼 표면이 팽윤된 세포를 전자현미경에서

비교적 드물게 볼 수 있다는 사실에 의해서도 알 수 있다. 즉 조직속에서 세포고사체의 탐식과 분해과정은 수 시간(약 3시간) 안에 끝나게 된다. 그러므로 전자현미경표본이 세포고사과정의 초기에 만들어져 있으면 주로 나중의 분해과정이 표본에서 주로 발견되게 된다⁵⁰.

중앙에서는 많은 세포고사체가 중앙세포에 의해 흡수되며, 탐식된 후에 세포고사체는 라이소솜 효소에 의해 분해된다. 분해되는 동안 어떤 세포가 세포고사됐는지는 핵조각 잔유물들을 포함하고 있다면 알 수 있다⁵⁰.

(2) 광학현미경에 의한 관찰

통상의 Hematoxylin-eosin 염색으로 관찰할 수 있다. 앞에서 언급한 바와 같이 세포고사의 광학현미경에 의한 진단은 주로 잘 보존된 세포고사체의 발견에 의한다.

때때로 도말표본(smear) 상에 세포표면이 방울모양으로 뿜어진 세포가 보이기는 하지만 액침에 고정된 조직의 파라핀 절편에서는 드물게 보여진다. 농축된 세포로부터 세포고사체의 분리과정은 고정된 조직을 일차마자 곧바로 시작해도 조직학에서 통상 사용되는 비교적 큰 블록(blocks)을 고정액이 침투하는데 필요한 시간동안 끝나게 된다. 또한 세포고사체는 탐식된 후 심하게 분해되면 발견하기 어려워진다. 세포배양에서도 세포고사체는 저절로 분해되어 결국 피사세포의 조직파편으로부터 구별이 어렵게 된다.

세포고사체가 세포밖에 있는지 탐식된 것인지는 광학현미경을 사용하여 관찰할 때는 어려운 경우가 종종 있다. 파라핀 블록의 조직표본과정동안 피할 수 없이 발생하는 세포의 수축은 세포밖에 있는 세포고사체주위에 공간을 만들 수 있다. 이런 인공염색(artifact)은 이들 세포고사체가 파라핀절편에서 눈에 잘 띄게 만드는 경향이 있다⁴⁰ (Fig. 2).

(3) In situ staining에 의한 세포고사의 관찰

세포고사를 관찰하는 방법에는 각각의 세포에서 분석하는 방법과 조직의 형태를 보존하면서 시행하는 in situ 적용이 있다. 이중 조직

의 생리학적 배경에서 세포고사를 조사하는 방법으로 통상의 조직병리학적 과정을 거쳐 만들어진 조직절편에서 각각의 핵에서 DNA가 분해된 것을 in situ Nick end labelling을 하는 것이 있다⁵⁰.

즉 파라핀 포매조직으로부터 절편을 만든 후 xylene과 alcohol을 이용하여 탈파리핀과 함유 화를 시킨 후 digoxigenin이 labelled된 UTP (Uridine triphosphate)와 TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) 효소를 완충액(buffer)과 함께 반응시킨다. 이때 세포고사가 일어나는 세포에서는 DNA조각이 있기 때문에 효소에 의해 UTP가 붙게 된다. 그런 후 stop buffer로 작용을 중지시키고 anti digoxigenin-peroxidase를 다시 붙이고 PBS (phosphate buffered saline)로 씻고 DAB (3'-diaminobenzidine)로 발색시킨다음을 관찰한다.

최근에 Oncor사 제품의 동소고사감지시약(in situ apoptosis detection kit, ApopTag TM-kit)을 이용한 면역조직화학 염색방법과 조직의 methyl green의 대조염색에 의해 쉽게 관찰할 수 있다. 이 방법은 다음에 설명할 생화학적 방법에 의한관찰에 비해 세포고사의 질적인 측정이 가능하다는 장점이 있다.

(4) 세포고사지수 (Apoptotic Indices, AI)

통상의 Hematoxylin-Eosin 염색으로 또는 면역조직화학적 방법으로 DNA조각을 염색하여 관찰한다. 매 슬라이드마다 400배율 하에서 세포 100개당 세포고사체의 수를 각기 다른 10군데에서 세어 평균한 수, 또는 각 슬라이드 표본당 무작위로 10개의 고배율시야(400배)에서 관찰된 세포고사체 수의 평균값을 구하여 세포고사지수로 할 수 있다. 즉, 손상되지 않은 100개의 세포당 세포고사체의 수를 백분율로 표현한 것이다⁴⁷. 그러나 아직은 사람의 중앙에서 세포성장지수(proliferative indices)만큼 세포고사지수가 많이 보고되고 있지는 않다³⁰.

2. 생화학적 방법에 의한 세포고사의 관찰

(1) 찬천 겔 전기영동

덜러든 조직을 이용하여 찬천 겔 전기영동

을 시행하면, 세포고사는 DNA가 뉴클레오솜 사이의 연결부위에서 절단되어 약 180~200 염기쌍크기로 보전되므로 사다리모양의 띠로 나타나고 반대로 피사에서는 형태적으로 염색질이 점진적으로 소실을 보이므로 전기영동을 하면 미판성 도말형태로 나타나게 된다 (Fig 9).

이 방법은 전자현미경이나 광학 현미경을 이용하여 형태학적 관찰을 하는 방법에 비해 노력이 적게 들고 비용이 절감되기는 하나, 준비과정이 3~4일 걸리고 양적인 측정이 가능하지는 않지만 세포집단에서 세포고사가 된 세포의 비율을 정확하게 알 수는 없다. 따라서 최근에는 이런 문제점의 해결 방법으로 유세포 측정법 (Flow cytometry)에 의한 분석방법이 시도되고 있다.

(2) 유세포 분석기 (Flow cytometry)에 의한 분석

유세포 측정법은 세포의 다양한 생화학적 지표를 정확하게 신속하게 분석할 수 있는데, 세포주기의 여러 단계의 핵산의 분포와 DNA의 상대적 정량이 가능하며, 최근에는 이질적인 세포집단에서 각각의 세포의 DNA, 항원등을 정량적으로 분석할 수 있게 되었다.

측정방법은 파라핀 포매된 조직을 세척한 후 TdT와 biotin-dUTP 등이 포함된 완충액에 부유시킨다음 FITC (Fluorescein isothiocyanate)-avidin을 포함한 염색액과 실온에서 차광상태로 반응시키고 세척하여 propidium iodide와 RNAase가 함유된 인산완충식염수에 부유시켜 빙수조에 꽂아 차광상태로 30분간 반응시키고 세척하여 유세포 측정기로 분석한다.

이러한 방법으로 FITC-dUTP가 부착된 조각난 DNA를 가지는 고사된 세포수를 측정하고 이를 정상세포수와 비교해 봄으로써 서로 다른 세포들의 집단에서, 또는 세포의 특정구역안에서 세포고사의 비율을 연구할 수 있게 되었다²⁰.

VI. 각종 질환에서의 세포고사에 대한 연구

1. 암과 세포고사

암은 DNA의 변화가 세포들의 기형적인 축적을 초래할 때 발생하게 된다. 세포 분열과 세포죽음 사이의 상대적인 비율은 얼마나 빨리 암이 성장하는가를 결정한다. 어떤 암은 정상 세포보다 천천히 분열하지만 세포의 생존기간이 연장되므로써 암이 커지게 될 수도 있다. 많은 발암인자가 DNA를 손상시키거나 정확한 DNA 복제에 필요한 효소작용을 방해하며, 세포는 여러방법으로 이런종류의 손상에 반응하게 되는데, 어떤 경우는 손상이 회복될때까지 세포분열을 연기시킬수 도 있고 또다른 경우는 스스로 세포고사를 일으키거나, 또는 세포성장 주기를 통해 중단없이 진행될 수도 있다. 그러므로, 세포고사는 유전학적인 병변이 있는 세포를 제거하므로써 악성화를 막을 수 있는 효과적인 방법이며, 비정상적인 세포고사는 분열하는 세포의 축적을 허락하고 악성화의 가능성을 가진 유전적 변이체 (varinats)를 제거 못하게 하므로써 암을 유발시킬 수 있다. 그러나, 아직까지도 세포가 손상된 후에 세포고사로 갈지 손상된 부위를 회복시킬지, 또는 세포 주기를 통해 계속 분열할지를 미리 알 수는 없다²¹.

이와같이 세포고사경로가 암치유전과 관련된 세포사망기전이 아닌가하여 많은 연구가 진행되고 있다. 즉 종양세포들의 새로운 세포고사 유도인자들이 계속 발견되고 이들의 기전이 밝혀지면 어떤 세포고사 유도인자가 어떤 신호전달 시스템 (signal transduction system)에 의해 항암인자들의 신호가 세포핵내로 전달되고, 어떤 특정 유전자와 단백질들의 발현이 증감되는지를 확인하고 이들 유전자와 단백질들의 특성을 규명하면 암 치료에 새로운 장이 열릴 것이라고 기대하고 있다²².

1995년 Liu³⁴⁾ 등은 두경부의 편평상피세포암에서 adenovirus-mediated gene transfer를 시행하여 야생형 p53을 과발현시키면 성장이 억제되는 것을 발견하고, 이러한 외인성 p53 유전자에 의한 종양성장억제의 기전은 세포고사에 의한 것으로 본다는 보고를 하면서, 야생형 p53이 사람의 두경부암세포주에서 세포고사에 중요한 역할을 하는 것으로 보고, 이들 암세포에서 세포고사의 선택적인 유도가 암유전자치료의 한 방법으로 연구되어야 한다고 보고하고 있다.

2. 세포고사와 자가면역질환

원래 정상조건에서는 자가 항원에 결합된 미성숙 림프구는 세포고사에 의해 죽게 된다³⁵⁾. 그러나, 이들 림프구가 세포고사에 의해 제거되는 것에 결합이 생기면 자가면역 질환이 생기기 쉽게 되는데, 최근 bcl-2 유전자가 과발현되는 쥐에서 면역복합성 신장염(Immune complex nephritis)이 발생하는 것을 보고한 문헌도 있다³⁶⁾.

3. 노화와 퇴행성 질환에서의 세포고사

노화에 따라 체세포질량이 감소 되는 것이 유전적으로 조절되는 것은 분명하다. 그러나, 노화되는 동안 조기에 또는 과도하게 세포가 손실되는 것은 기관의 기능부전이나 질환을 일으키게 된다. 중추신경계의 퇴행성 질환에 대해서는 잘 연구되어 있는데, 죽어가는 신경세포는 세포고사의 구조적, 생화학적 변화를 나타내지는 않는다. 그러나, 보통 RNA나 단백질 합성을 필요로 하는 예정된 세포사의 경로를 가지고 있다^{36,40)}.

성장인자의 제거나, 흥분성 아미노산 신경전달물질들에 과다한 노출은 신경세포에게 독성이 있는데, 교감신경세포에서 bcl-2의 높은 발현은 신경성장인자의 제거에 의한 세포사를 방지할 수 있다는 보고도 있다⁴⁰⁾.

4. 후천성 면역결핍 증후군(AIDS)과 세포고사

HIV-1 (human immunodeficiency virus 1)으로 감염된 사람은 CD4 림프구의 결손으로 림프구감소증과 면역결핍을 초래한다. 그러므로, 후천성 면역결핍증후군은 CD4 세포죽음과 세포보충사이의 병적인 불균형으로 볼 수 있다⁴¹⁾.

HIV-1 감염에서 림프구 결손의 기전은 복잡한데 증상이 없는 HIV-1으로 감염된 사람의 CD4 림프구를 유사분열물질(mitogen)로 자극하면 세포고사에 의해 죽게 된다⁴²⁾.

이와같이 만약 세포고사가 후천성 면역결핍증후군에서 림프구 결손의 기전의 하나라면 세포고사의 필수적인 대사과정을 차단시키므로써 면역결핍의 시작을 지연시킬 수 있으리라 본다⁴³⁾.

5. 세포고사와 향후 치료전망

특정세포의 세포고사에 대한 감수성을 증가시키거나 감소시키므로써 치료제를 개발할 수 있으리라 본다. 세포고사를 증가시키는 약제는 항암제에 내성이 있는 세포들에 대해 항암효과를 증폭시킬 수 있으리라 보며, 이런 약제의 예로는 bcl-2 발현의 억제제, 세포고사의 구조적 변화를 초래하는 칼슘의존성 효소의 세포특이성 활성제 등이 있을 수 있겠다. 세포고사의 억제제는 후천성면역결핍증 환자에게 도움이 될 것이고, 유전자 치료에 의한 항 신경성 호르몬의 보충은 중추신경계의 퇴행성 질환에 효과가 있을 수 있다^{36,40)}.

또한 세포고사에 대한 연구는 정상적인 노화에서 세포죽음의 조절에 대해 더욱 알게 할 것이며 생리적 세포죽음의 약리학적 처치는 노화과정을 조절할 수 있으리라 본다⁴⁴⁾.

References

- 1) 김인경: 아포토시스와 종양성장억제. 대한의학회지 37(10): 1222~1229, 1995
- 2) 서정선: 20세기 말의 의생물학의 새로운 비전 아포토시스. 대한생화학 분자생물학회 소식2 (3): 12~16, 1995

- 3) Alnemri ES, Litwack G : Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoid and novobiocin. Evidence for a non-Ca²⁺ requiring mechanisms. *J Biol Chem* 265 : 17323~17329, 1990
- 4) Bansal N, Houle AG, Melnykovich G : Dexamethasone-induced killing of neoplastic cells of lymphoid derivation : Lack of early calcium involvement. *J cell physiol* 143 : 105~110, 1990
- 5) Barry MA, Eastman A : Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 300 : 400~450, 1993
- 6) Barry MA, Reynolds JE, Eastman A : Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* 53 : 2349~2357, 1993
- 7) Bissonette RP, Echeverri F, Mriboubi A : Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359 : 552~554, 1992
- 8) Brach MA, de Vos S, Gruss HJ et al : Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80 : 2920~2924, 1992
- 9) Carson DA, Ribeiro JM : Apoptosis and disease. *Lancet* 341 : 1251~1254, 1993
- 10) Cohen J J, Duke RC : Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132 : 28~35, 1984
- 11) Cohen J J, Duke RC, Chervenak R et al : DNA fragmentation in targets of CTL : An example of programmed cell death in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 184 : 493~497, 1985
- 12) Cohen JJ, Duke RC : Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10 : 267~293, 1992
- 13) Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS et al : Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69 : 119~128, 1992
- 14) Fesus L, Thomazy V, Antnori F et al : Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action. *FEBS Lett* 245 : 150~159, 1989
- 15) Fesus L, Thomazy V, Falus A : Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett* 224 : 104~110, 1987
- 16) Garcia I, Martinon I, Tsujimoto Y et al : Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto oncogene. *Science* 258 : 302~304, 1992
- 17) Gerschenson LE, Rotello RJ : Apoptosis : a different type of cell death. *FASEB J* 6 : 2450~2455, 1992
- 18) Glicksmann A : Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev* 26 : 59~86, 1951
- 19) Goldstein P, Ojcius DM, Young JD : Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121 : 29~65, 1991
- 20) Gorczyca W, Gong J, Parzynkiewicz : Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res* 53 : 1945~1951, 1993
- 21) Groux H, Torprier G, Monte D et al : Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp. Med* 175 : 331~340, 1992

- 22) Hedgecock E, Sulston JE, Thomson N : Mutations affecting programmed cell deaths in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* 220 : 1277~1280, 1983
- 23) Hickman JA : Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 11 : 121~139, 1992
- 24) Hinchliffe JR : Cell death in embryogenesis. In *Cell Death in biology and pathology* (Ed Bowen LD, Locksley RA), Chapman and Hall, London, pp 35~75, 1981
- 25) Kawabata H, Anzai H, Masutani H et al : Detection of Mg^{2+} dependent endonuclease activity in myeloid leukemia cell nuclei capable of producing internucleosomal DNA cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 191 : 247~254, 1993
- 26) Kerr JFR : A histochemical study of hypertrophy and ischemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 90 : 419~435, 1965
- 27) Kerr JFR, Searle J : A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 107 : 41~44, 1972
- 28) Kerr JFR, Searle J : Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. *Virchows Arch B* 13 : 87~102, 1973
- 29) Kerr JFR, Searle J, Harmon BV et al : Apoptosis. In *Perspectives on mammalian cell death* (ed Potten CS), Oxford University Press, Oxford, England, pp 93~128, 1987
- 30) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR : Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 : 239~257, 1972
- 31) Korsmeyer SJ : Bcl-2 : an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* 15 : 105~118, 1992
- 32) Leoncini L, Del Vecchio MT, Megha T et al : Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol* 142(3) : 755~763, 1993
- 33) Levine AJ, Marmè D, Finlay CA : The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 351 : 453~456, 1991
- 34) Liu TJ, El-Naggar AK, McDonnell TJ et al : Apoptosis induction mediated by wild-type p53 Adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 55 : 3117~3122, 1995
- 35) Locksley RA, Zakeri Z : Programmed cell death and apoptosis. In *Apoptosis : The molecular basis of cell death* (ed Tomei LD and Cope FO), Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 47~60, 1991
- 36) Martin DP, Ito A, Horigome K et al : Biochemical characterization of programmed cell death in NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurobiol* 23 : 1205~1220, 1992
- 37) McConkey DJ, Orrenius S, Jondal M : Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol Today* 11 : 120~132, 1990
- 38) Moore JV : Death of cells and necrosis of tumors. In *Perspectives on mammalian cell death* (ed Potten CS), Oxford University Press, Oxford, England, pp 295~325, 1987
- 39) Nawaz S, Lynch MP, Galand P et al : Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol* 127

- : 51~59, 1987
- 40) Niconova LV, Neligovich PA, Umansky SR : The involvement of nuclear nucleases in rat thymocytes DNA degradation after γ -irradiation. *Biochem Biophys Acta* 699 : 281~289, 1982
 - 41) O'shea JD, Hay MF, Cran DG : Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J Reprod Fertil* 54 : 183~187, 1978
 - 42) Pantales G, Graziosi C, Fauci AS : The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 328 : 327~335, 1993
 - 43) Peitsch MC, Polzar BG, Stephan H et al : Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death) *EMBO J* 12 : 371~377, 1993
 - 44) Ribeiro JM, Carson DA : Ca^{2+}/Mg^{2+} dependent endonuclease from human spleen : Purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry* 32 : 9129~9136, 1993
 - 45) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V : Pathologic basis of disease. 5th Ed. Philadelphia, W.B. Saunders company, pp 17~21, 1994
 - 46) Rosenberg MB, Friedmann T, Robertson RC et al : Grafting genetically modified cells to the damaged brain : Retorative effects of NGF expression, *Science* 242 : 1575~1578, 1988
 - 47) Sarraf CE, Bowen ID : Kinetic studies on a murine sarcoma and an analysis of apoptosis. *Brit J Cancer* 54 : 989~998, 1986
 - 48) Sarraf CE, Bowen ID : Proportions of mitotic and apoptotic cells in a range of untreated experimental tumors. *Cell tiss kinet* 21 : 45~49, 1988
 - 49) Savill J S, Wyllie AH, Henson JE et al : Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *CJ Clin Incest* 83 : 865~877, 1989
 - 50) Schwartz LM, Osborne BA : Cell death. In *Methods in cell biopsy*. London, Academic press, pp 1~18, 1995
 - 51) Sun DY, Jiang S, Iheng LM et al : Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation. *J Exp Med* 179 : 559~568, 1994
 - 52) Terai C, Kornbluth RS, Panza CD et al : Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest* 87 : 1710~1714, 1991
 - 53) Vaux DL : Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci* 90 : 786~789, 1993
 - 54) Walker NI, Harmon BV, Gob Ge et al : Patterns of cell death. *Meth Achiev exp path* 13 : 18~54, 1988
 - 55) Walder NI, Bennett RE, Kerr JFR : Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am J Anat* 185 : 19~32, 1989
 - 56) Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R et al : A new method to detect apoptosis in paraffinsection : in situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem* 41 : 7~12, 1993
 - 57) Williams GT, Smith CA : Molecular regulation of apoptosis : Genetic control on cell death. *Cell* 74 : 777~779, 1993
 - 58) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with en-

- dogenous endonuclease activation. Nature 284 : 555~559, 1980
- 59) Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death : The significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68 : 251~259, 1992
- 60) Yonish-Rouach E, Resnitsky D, Loten J : Wild type p53 induces apoptosis of myeloid leukemia cells that is inhibited by interleudin 6. Nature 353 : 345~347, 1991