KR0000182

KCCH/RR-104/99
최종보고서

방사선의 의학적 이용 연구
Radiation Research for Clinical Application

방사선의 인체영향 연구
Biological Effect of Radiation on Human

주관연구기관
한국원자력연구소
부설 원자력병원

과 학 기 술 부

31/40

Please be aware that all of the Missing Pages in this document were originally blank pages

최종연구보고서

2000년도 원자력연구개발사업에 의하여 완료한 "방사선의 인체영향연구"의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종 보고서 3부.

2. 자체평가의견서 1부.

3. 최종보고 전산입력서 1부.

2000 . 4 . 20 .

주관 연구 기관 : 원자력 병원

주관연구책임자 : 이 윤 실 (인)

주관연구기관장 : 백 남 선 직인

과학기술부장관귀하

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀하

본 보고서를 "방사선의 인체영향연구" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 . 4 . 20 .

주관연구기관명 : 한국원자력연구소
부설 원자력병원

주관연구책임자 : 이 윤 실
연 구 원: 조 철 구 이 수 재
이 기 호 김 태 환
김 경 중 김 수 관
이 재 현 함 용 호
조 혜 년 배 인 화
이 민 정 최 선 아
박 문 택 전 용 진
이 정 임 최 정 아
위탁연구책임자: 장 자 준, 정 명 희, 성 진 실
공동연구책임자: 김 인 규, 박 영 미, 허 선,
범 희 승, 최 은 경

총 목 차

제 1 부 저준위 방사선에 의한 적응응답반응의 기전 규명

제 2 부 방사선의 Early Effect 기전 규명

제 3 부 방사선의 Late Effect 기전 규명

제 1 부

저준위 방사선에 의한 적응응답반응의 기전 규명

요 약 문

I. 제 목

저준위 방사선에 의한 적응응답반응 기전의 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

에너지원으로서의 원자력 이용이 많아짐에 따라 향후 일어날 가능성이 있는 방사선 피조사에 의한 장해 대책 강구의 필요성이 증가함에도 불구하고 현재 국내에는 이에 대한 의료전달체계 및 의료대책이 전무한 실정이며, 피조사된 사람에게 나타날 수 있는 질병의 양상과 방사선과의 유관성을 판별할 수 있는 기초 생물학적 지표가 확립되어 있지 않다. 또한, 방사선에 의한 생체내 변화에 대한 사전 지식과 정확한 기초 자료의 필요성에 의하여 인체정상세포와 암세포의 형태학적인 면과 분자생물학적인 면에서의 변화를 관찰하여 방사선 장해의 기초 의학적 현상을 체계적으로 파악하는 것이 시급히 요청되어진다. 따라서 방사선 저항기전의 일종인 저준위 방사선에 의한 적응응답 (adaptive response) 기전을 규명하여 피조사에 의한 장해 경감과 방사선에 대한 국민의 부정적인 견해 개선 및 대국민 홍보 및 교육의 기초 자료의 필요성이 절실함으로 저준위 방사선에 의한 적응응답반응의 기전 규명을 위하여 본 연구가 시도되었다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 정상세포와 암세포의 저준위 방사선에 의한 적응반응의 차이 규명 여부 및 기전 규명

본 연구에서는 저준위 방사선 (0.01Gy)이 고준위 방사선에 의한 세포손상을 억제시켜줄 수 있는 가를 관찰하였으며 이러한 억제효과가 apoptosis와 관련 있는 가를 규명하는 것으로 방사선에 감수성이 있다고 보고되는 정상 임파구 세포 및 정상 상

피세포, Chinese hamster ovarian cell, mouse fibroblast cell을 대상으로 정상세포에 대한 저준위 방사선의 적응응답반응을 관찰하였고 이러한 적응응답반응이 암세포에서도 일어나는가를 확인하기 위하여 EL-4, L5178Y (L5178Y-S, X-ray sensitive clone 및 L5178Y-R, X-ray resistant clone) 같은 임파구 암세포 및 *v-ras*^{Ha} transformed keratinocytes, 308 (mouse papilloma cells), RIF (radiation induced fibrosarcoma), TR (RIF의 thermoresistant clone) 를 대상으로 관찰하였다. 결과로는, 저준위 방사선에 의한 적응반응기전이 정상세포 및 adaptation된 세포에서 일어나는 현상이며 그 기전의 일부분이 apoptosis 유발 저하에 의한 것임을 확인하였다.

2. 저준위 방사선에 의한 적응응답반응에 있어서 Heat Shock Protein (HSP)의 역할 규명

저준위 방사선 (0.01 Gy)의 Preirradiation 이후의 고준위 방사선에 의한 세포손상을 억제시켜주는 적응응답반응이 정상세포에서는 나타나는데 비해 암세포에서는 나타나지 않음을 규명한바 있다. 이러한 실험 중 RIF (Radiation Induced Fibrosarcoma)라는 암세포는 적응응답반응을 나타내지 않았지만 RIF의 Thermoresistant clone인 TR 세포는 적응응답반응을 나타내었다. 이들 두 세포의 현저한 차이는 Heat Shock Protein (HSP)의 Profile이 다르다고 보고되었기 때문에 HSP의 발현 정도를 검색하였고 HSP25 및 Inducible HSP70의 발현이 차이가 있음을 확인하였다. 따라서 HSP25 및 Inducible HSP70의 expression vector를 제조하여 overexpression cell line을 확립하였고 이들 세포에서 적응응답반응이 증가함을 확인하였다.

3. HSP25와 Radioresistance

본 연구에서 HSP25가 적응응답반응 및 Radioresistance에 관여함을 확인하였고 이러한 보고는 전혀 없기 때문에 HSP25의 radioresistance 발현기전을 규명하였다. HSP25 overexpression 세포는 (L929-HSP25)는 외형상 세포의 모양 및 colony 형태를 변화시켰고 세포의 성장속도를 감소시켰다. 이러한 현상은 실제적인 세포성장곡선 및 flow cytometry법에 의해 확인하였고 세포조절주기에 관여하는 protein의 발현차이에서도 알 수 있었다. 따라서 HSP의 방사선 내성에 세포성장억제기전이 관여함을 알 수 있었고 또한 HSP25에 의해 과도 발현되는 BCl-2 단백도 이러한 방사선 내성

에 관여함을 확인할 수 있었다.

4. HSP70과 Radioresistance

Inducible HSP70의 적응응답반응에 관여함을 확인하기 위하여 적응응답반응이 나타나지 않는 RIF 세포에 Inducible HSP70을 과도 발현시키고 적응응답반응을 확인하였다. Inducible HSP70이 과도 발현된 RIF세포는 적응응답반응 및 Radioresistance를 나타내었다. Inducible HSP70 overexpression 세포는 (NIH3T3-HSP70)는 Protein Kinase C의 활성도가 높았고 특히 PKCdelta의 발현이 증가하였다. 또한 방사선에 의한 PKC activation이 inducible HSP70에 의해 block됨을 확인하였다. 또한 PKC inhibitor를 처리하였을 때 Inducible HSP70에 의한 radioresistance가 소실됨을 확인하여 Inducible HSP70에 의한 radioresistance에 PKC activation이 관여함을 알 수 있었다.

5. 방사선 조사후 HSP25의 세포주기 조절에 미치는 영향

HSP25가 방사선 내성을 유발하였고 이러한 방사선 내성이 growth delay와 상관있음을 확인하였으므로 실제적으로 방사선 조사후 세포주기에 미치는 영향을 확인한 결과 HSP25는 G2/M phase arrest를 지연시켰으며 molecular event 역시 이러한 G2/M phase arrest를 지연시켜는 효과를 나타내었다. 따라서 HSP25의 방사선 내성을 G2/M phase 내성을 증가시킴으로 유도되어 지는 것으로 추정되었다.

Ⅳ. 연구개발결과

1. 정상세포와 암세포의 저준위 방사선에 의한 적응반응의 차이 규명 여부 및 기전 규명

저준위 방사선에 의한 적응반응기전이 정상세포 및 adaptation된 세포에서 일어나는 현상이며 그 기전의 일부분이 apoptosis 유발 저하에 의한 것임을 확인하였다.

2. 저준위 방사선에 의한 적응응답반응에 있어서 Heat Shock Protein (HSP)의 역할 규명

● RIF (Radiation Induced Fibrosarcoma)라는 암세포는 적응응답반응을 나타내지 않았지만 RIF의 Thermoresistant clone인 TR 세포는 적응응답반응을 나타내었다.

● 이들 두 세포의 현저한 차이는 Heat Shock Protein (HSP) 25 및 inducible HSP70의 발현이었다.

● HSP25 및 Inducible HSP70의 expression vector를 제조하여 overexpression cell line을 확립하였다.

● 이들 세포에서 적응응답반응이 증가하였다.

3. HSP25와 Radioresistance

● HSP25가 적응응답반응 및 Radioresistance에 관여함을 확인하였다.

● HSP25 overexpression 세포는 (L929-HSP25)는 외형상 세포의 모양 및 colony 형태를 변화시켰고 세포의 성장속도를 감소시켰다.

● HSP25 overexpression 세포는 세포조절주기에 관여하는 protein의 발현차이를 유도하였고 특히 Cyclin D1, Cdc2, Cyclin A의 발현이 감소하였고 p21 protein의 발현을 증가시켰다.

● HSP25 overexpression 세포는 Antiapoptotic protein으로 알려진 Bcl-2 단백의 발현을 증가시켰다.

● 따라서 HSP25에 의한 세포성장속도 감소 및 BCl-2의 발현증가에 의해 HSP25의 radioresistance가 증가되는 것으로 추정되었다.

4. HSP70과 Radioresistance

● 적응응답반응이 나타나지 않는 RIF 세포에 Inducible HSP70을 과도 발현시킨 결과 적응응답반응을 확인하였다.

● Inducible HSP70이 과도 발현된 RIF세포는 Radioresistance를 나타내었다.

● Inducible HSP70 overexpression 세포는 (NIH3T3-HSP70)는 Protein Kinase C의 활성이 높았고 특히 PKCdelta의 발현이 증가하였다.

● 방사선에 의한 PKC activation이 inducible HSP70에 의해 block됨을 확인하였다.

● PKC inhibitor를 처리하였을 때 Inducible HSP70에 의한 radioresistance가 소실되었다.

● Inducible HSP70에 의한 radioresistance에 PKC activation이 관여함을 알 수 있었다.

4. 방사선 조사후 HSP25의 세포주기 조절에 미치는 영향

● 방사선 조사에 의한 G2/M arrest가 HSP25에 의해 증가되었다.

● HSP25는 G1-S transition에 관여하는 세포주기 단백질의 발현을 억제하였고 $p21^{Waf}$ 발현을 증가시켰다.

● HSP25는 S-G2 transition에 관여하는 세포주기 단백질의 발현을 억제하였다.

● HSP25는 G2/M phase arrest에 관여하는 단백질의 발현을 증가 시켰다.

● HSP25는 cyclin A 및 cycln B1의 발현을 억제하여 G2-M phase transition을 지연시키고 mitotic cell death를 억제하는 것으로 추정되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

저준위 방사선에 의한 적응응답반응이 정상세포에서는 나타나나 암세포에서는 나타나지 않음을 apoptosis 발현정도로 규명하였고 이러한 적응응답반응에 heat shock protein (HSP) 25 및 inducible HSP 70이 관여함을 증명하였다.

SUMARY

I. Project Title:

Evaluation of Basic Mechanisms of Adaptive Response Induced by Low-Dose Radiation

II. Objectives and Importance of the Project

Since there has been an increase in the use of atomic power as an energy source, we are under the necessity of establishing the countermeasures for biological damages induced by exposure to radiation. Nevertheless, there is no medical countermeasure or medical delivery system for it and no establishment of basically biological indices by which we can judge the positive interrelationship between the pattern of disease shown up in the exposed persons and exposure to radiation. There is also an urgent need to catch systematically hold of basic medical phenomena of radiation damages by observing a variety of changes in the aspects of morphology and molecular biology for human normal cells and tumor cells. This study was carried out in order to observe whether expression of radiation resistance induced by low-level radiation can ameliorate the magnitude of biological damage by high-level radiation or not, and to understand what the basic mechanisms of this adaptive response are

III. Scope and Contents of the Project

Radiation induced fibrosarcoma (RIF) cells did not show the adaptive response, i.e. a reduced effect from a higher challenging dose (4 Gy) of a radiation when a priming dose (1cGy) had been applied 4 or 7 hrs earlier, but its thermoresistant clone (TR) did. Since inducible HSP70 expression was different

between two cell lines, the role of inducible HSP70 in adaptive response was examined. When inducible *hsp70* was transfected to RIF cells, the adaptive response was acquired. Inducible *hsp*70 transfected NIH3T3 mouse embryo cells also conferred radioresistance when detected by clonogenic survival, physiological cell survival, [3H]-thymidine incoporation, and ELISA cell death detection kit, as well as increased tendency of induction adaptive response. Interestingly, basal levels of Ca2+-dependent and Ca2+-independent PKC activities were increased by inducible HSP70, when compared to those of control vector cells. Irradiation of g-ray induced PKC activation within minutes in control vector cells, while it did not by inducible HSP70. Cellular redistribution to particulate fraction of PKCalpha, delta and zeta by gamma-rays was not detected either. Furthermore, radioresistance by inducible HSP70 was disappeared by pre-treatment of PKC inhibitor, 1-(5-isoquinolinesulfomyl)-2-methylpepirazine (H7) in clonogenic survival assay. Taken together, these data suggest that inducible HSP70-induced radioresistance is associated with its elevated level of PKC activity.

When cells were irradiated with 4 Gy, flow cytometry analysis revealed that a pronounced arrest of G1, S and G2/M phase was observed and these arrests were augmented by *hsp25* overexpression. Inhibition of cyclin D1, and cyclin E and induction of p21 by radiation, which are responsible for radiation-induced G1-arrest, was more pronounced in *hsp25* overexpressed cells than control cells, which is associated with increased binding activity of CDK2. S-phase regulator, cyclin A and its associated CDK2 and CDC2 kinase activities were also increased by irradiation and *hsp25* overexpression attenuated these phenomena. In addition, cyclin B1 expression and its associated kinase activity that are responsible for the transition of G2 to M phase, were increased by radiation and *hsp*25 overexpression also decreased these phenomena. From these results, HSP25 augmented radiation-induced cell cycle arrest (G1, S, and G2/M phase) and this may be caused by the HSP25-mediated cell growth delay and is associated with radioresistance.

IV. Results and Proposal of Application

Adaptive Response is Differently Induced Depending on the Sensitivity to Radiation Induced-Cell Death in Mouse Epidermal Cells

We investigated the relationship between induction of radio-adaptive response and

cell death in mouse normal and neoplastic epidermal cells. Mouse normal primary keratinocytes (PK), cancer-prone [*v-ras*^{Ha}-transfected mouse keratinocytes (ras-PK) and line 308 (mouse skin papilloma cells which have activated *rasHa* gene with A to T transversion at codon 61)] cells were primed with low dose of g-rays (0.01Gy) and then challenged with a high dose (4 Gy) at 4 or 7 hrs interval. The induction of cell death was 2-10 times higher and was also rapid in PK than in ras-PK or 308 cells. Low dose pretreatment with 4 hrs interval led to decreased cell death, and this adaptive response was prominent in PK, whereas, the adaptive response was less obvious in the case of ras-PK and 308 cells. The responses of each PKC isozyme to high-dose radiation, especially PKCalpha, -delat, -epsilon, and -eta, were different between the normal and *ras* oncogene activated neoplastic keratinocytes; translocation of these isozymes to membrane occurred more rapidly in normal than in neoplastic cells. Furthermore, low dose pretreatment did not significantly induce the translocation of PKCdelta in PK than in ras-PK and 308. Thus, the difference in the induction of radio-adaptive response between mouse normal and neoplastic epidermal cells reflected difference in the rapidity

HSP70 involved in adaptive response when low dose (0.01Gy) was preirradiated.

TR cells that is the thermoresistant clone of RIF cells showed radioresistance and when 0.01 Gy was pre-irradiated before a high challenging dose of radiation, adaptive response was detected in clonogenic survival assay, while it was not in its parental RIF cells. Since there is a report that HSP expression profile is different between two cell lines, we analyzed these protein expression by western blotting. Inducible HSP70 and HSP25 expression was dramatically increased in TR cells, suggesting that adaptive response is related with these protein expressions.

Inducible HSP70 acquired radioresistance

First, to examine the role of HSP70 on the induction of adaptive response,

inducible HSP70 was transfected to RIF cells in which the adaptive response was not induced, using retroviral vector system. Inducible HSP70 overexpression could be seen and it induced radioresistance; the tendency of radioresistance was similar to that of TR cells. In addition, adaptive response was drastically induced by inducible HSP70, suggesting inducible HSP70 is responsible for the induction of adaptive response. Because adaptive response usually reported in normal cell types, we transfected this inducible HSP70 to NIH3T3 mouse embryo cells. Inducible HSP70 protein was also shown and it induced radioresistance when detected by colonogenic survival, physiological cell viability, [3H]-thymidine incoporation, and ELISA cell death detection kit. Increased induction of adaptive response was also detected; adaptive response was induced in vector control cells but the induction ratio of this effect was higher in inducible HSP70 overexpressed cells than that of vector control cells.

Inducible HSP70 increased basal level of PKC activity and altered radiation induced PKC activity.

To know the signaling of regulation of adaptive response by inducible HSP70, early response protein of PKC was examined. As shown in Fig. 3a, inducible HSP70 increased both Ca2+-dependent and Ca2+-independent PKC activity. To know if these altered PKC activity by inducible HSP70 could modify the PKC response by ionizing radiation, PKC activity was examined after irradiation. When 4 or 8 Gy was irradiated, both Ca2+-dependent and Ca2+-independent PKC activity were increased in vector control cells; induction time was more rapid in higher dose radiation. Within 90 min, PKC activity was restored. In contrast of this, inducible HSP70 overexpressed cells did not respond by radiation, even at 8 Gy irradiation. Results from cellular redistribution of each PKC isozyme also revealed that translocation to particulate fraction of PKCa, d and z was increased by radiation in vector control cells, while it was not in inducible HSP70 overexpressed cells; translocation of PKCa and d was transient, but in the case of PKCz, it lasted for over 90 min.

PKC inhibitor treatment attenuated the radioresistance by inducible HSP70.

Whether elevated PKC activity by inducible HSP70 is related to the radioresistance, PKC inhibitor (H7) was pretreated before irradiation and clonogenic survival was examined. H7, 200 mM reduced colony number even without radiation and radioresistance by inducible HSP70 was disappeared in H7 pretreated cells, suggesting elevated PKC activity is reponsible for radioresistance by inducible HSP70.

Overexpression of hsp25 induced a radioresistance.

Since the sHSP enhances resistance to drugs as well as various stresses such as heat or oxidative stress, we examined whether overexpression of *hsp25* is involved in radioresistance. We have transfected a complete murine *hsp25* gene into murine fibroblast L929 cells, which has been reported that sHSP family proteins were not detected. To investigate this, first, we performed clonogenic survival assay. As shown in Fig.1, *hsp25*-transfected cells showed increased clonogenicity, but in higher dose of 8 Gy, *hsp25* did not induced radioresistance. When cells were exposed to 4 and 8 Gy of g-rays and survival was examined by trypan blue dye exclusion method, *hsp25*-transfected cells showed a greater survival at 24 and 48 hr after irradiation. To know the correlation between induction of apoptosis and radioresistance by HSP25, apoptotic fragments were determined at 48 hr after irradiation. Fig. 1C showed that g-rays induced an intense fragmentation of DNA in vector control cells, while overexpression of *hsp25* drastically inhibited this phenomenon (37% inhibition at 8 Gy). Data from scanning electron microscopy (SEM) also suggested that *hsp25* overexpression reduced cellular damage when detected at 24 hr after irradiation of 4 Gy.

Overexpression of hsp25 did not change expressions of other endogenous HSP family.

For excluding possibility of effects generated by other HSP family, which may induce by exogenous *hsp25*, the expressions of major HSP family (HSP70, 90 and 110) were detected by immunoblotting. HSP25 was only detected in *hsp25*-transfected cells and there was no difference in expressions of other HSPs

between two cells. These data suggest that overexpression of *hsp25* did not alter the expressions of other endogenous HSPs, as reported by Mehlen *et al.*.

Overexpression of hsp25 caused a morphological change and an increased concentration of filamentous actin (F-actin).

hsp25-transfected cells showed less fibroblastic, polygonal shaped morphology with cobblestone monolayer, while, its vector control showed a typical fibroblastic and spindly-shaped morphology. Data from SEM also suggested the difference of morphology between two cells. Since the morphological changes in *hsp25*-transfected cells increased cell adhesion, the amount of F-actin was compared in two cells. When fluorescein-conjugated phalloidin, a probe specific for F-actin, was used, a prominent F-actin accumulation was observed in *hsp25*-transfected cells, when compared to that in control cells.

Overexpression of hsp25 reduced cell growth.

When growth curves of vector control and *hsp25*-transfected cells were examined with trypan blue dye exclusion method, growth rate of *hsp25*-tranfected cells were 3 or 4 hr slower than those of vector control cells. Data from clonogenicity also revealed that growth rate was different in two cells; vector control cells formed typical fibroblast-like colony, while, *hsp25*-transfected cells showed smaller size colony with clear form. In addition, colony number smaller than 0.5 mm was significantly higher in *hsp25*-transfected cells, while, in colonies larger than 1.0 mm, the result was *vice versa*, which suggested the increased adherent efficiency and delayed cell growth of *hsp25*-transfected cells.

Overexpression of hsp25 proceeded slower cell cycle.

To confirm the reduction of cell growth by *hsp25* overexpression, cell cycle analysis was done by flow cytometry. Twenty hr of mimosine treatment nicely induced late G1 arrest in both control and *hsp25*-transfected cells. Cells, approximately 39.3 % of vector control were in G2 phase after 6 hr following release from G1 arrest, while, only 4.8 % of *hsp25*-transfected cells were. At 10

hr after release, the most cells of control vector already passed G2/M phase, but those of *hsp25*-transfectant did not yet. These data also indicated that *hsp25* overexpression proceeded cell cycle more slowly than vector control.

Overexpression of hsp25 changed expressions of cell cycle related proteins.

To know if delayed cell growth by *hsp25* due to altered expressions of cell cycle related proteins, Western blot analysis was done. Overexpression of *hsp25* reduced basal levels of Cdc2, Cyclin D1 and Cyclin A proteins, but it increased that of p21 protein. Since it was reported that Cyclin D1-Cdk4 and Cyclin A-Cdc2 complexes involve in the progression from G1 to S, and S to G2/M phase and p21 causes cell arrest by binding to Cyclin-Cdk complex, it would suggested that reduced expressions of Cdc2, Cyclin D1, and Cyclin A and increased expression of p21 in *hsp25*-transfected cells induced cell growth delay.

Synchronization by mimosine treatment attenuated radioresistance by HSP25.

Because our data showed that the radioresistance in *hsp25*-transfected cells is related to its cell growth delay, it was examined if synchronization of cell cycle could abolish *hsp25*-induced radioresistance. While twenty hr treatment of mimosine reduced incidence of apoptotic fragments in vector control cells, when compared to that in cells with 4 or 8 Gy of g-ray alone (phenomenon with 8 Gy irradiation was more prominent than that with 4 Gy), the effect of mimosine treatment could not be seen in *hsp25*-transfected cells. Transfection of *hsp25* induced radioresistance by 35.4% and 53.8% at 4 Gy and 8 Gy, respectively, when compared to that of vector control, but synchronization by mimosine treatment reduced these gaps by 27.8% and 17.5% at 4 and 8 Gy of g-rays, respectively. Synchronization by serum depletion also reduced the radioresistance by *hsp25* overexpression. However, radioresistance by *hsp25* overexpression was not changed by synchronization with mimosine treatment when clonogenic survival was examined, suggesting clonogenic survival after irradiation might not be affected by growth arrest.

HSP25 prolonged Radiation-Induced G2/M Phase Arrest

We further extended our studies on the possible role of HSP25 on ionizing radiation-induced cell cycle regulation. When cells were irradiated with 4 Gy, flow cytometry analysis revealed that a pronounced arrest of G1, S and G2/M phase was observed and these arrests were augmented by *hsp25* overexpression. Inhibition of cyclin D1, and cyclin E and induction of p21 by radiation, which are responsible for radiation-induced G1-arrest, was more pronounced in *hsp25* overexpressed cells than control cells, which is associated with increased binding activity of CDK2. S-phase regulator, cyclin A and its associated CDK2 and CDC2 kinase activities were also increased by irradiation and *hsp25* overexpression attenuated these phenomena. In addition, cyclin B1 expression and its associated kinase activity that are responsible for the transition of G2 to M phase, were increased by radiation and *hsp*25 overexpression also decreased these phenomena. From these results, HSP25 augmented radiation-induced cell cycle arrest (G1, S, and G2/M phase) and this may be caused by the HSP25-mediated cell growth delay and is associated with radioresistance.

Cell cycle progression after radiation

To determine to what extent the cell cycle was affected by radiation and the role of HSP25 in cell cycle regulation, flow cytometry was performed. Without radiation, more G1 peak was found in *hsp25*-overexpressing cells, which is due to decreased expression of cyclin D1 and A, and increased expression of p21 protein, when compared to the control vector cells. After 4 Gy irradiation, increased population of S phase cells were detected in *hsp25*-overexpressing cells during the experiment, when compared to the control cells; 6 hrs after irradiation, 13 % of the cells overexpressing *hsp25* was observed in S phase, while in control cells, only 5 % cells was remained in S phase. Moreover, delayed G2 arrest also found in *hsp25*-overexpressing cells; 12 hrs later, peak G2 arrest was shown in control cells and became to release into the next cell cycle, but in *hsp25*-overexpressing cells, it was lasted until 16 hrs. From these

data, HSP25 induced delayed cell cycle progression after irradiation.

Effect of hsp25 on cell cycle regulators of the G1-S transition after irradiation

To determine the molecular mechanisms of *hsp25* in radiation-induced cell cycle arrest, cells were stimulated with radiation and the components of the cell cycle regulatory proteins involved in the G1-S transition were examined. Expression of cyclin D1 was decreased from 6 hrs after radiation in both cell lines and it recovered from 36 hr, but the decreased tendency was greater in *hsp25*-overexpessing cells than the control cells. Expression level of cyclin E was also inhibited 16 hrs after irradiation in both cell lines, which sequentially followed after cyclin D1 inhibition, and the decrease tendency was also greater in *hsp25*-overexpressing cells. Total level of p21Waf protein was clearly increased upon radiation and it lasted for 36 hr, with a markedly more pronounced effect in *hsp25*-overexpressing cells than in control cells. To determine if p21Waf induction was associated with its inhibitory effect of cyclin/CDK complex, the association p21Waf with CDK2 or CDK4 was examined. Although expression levels of CDK2 and CDK4 were not changed, as a result, p21Waf became increasingly associated with CDK2 at 16 and 36 hr after radiation and this association was also increased in *hsp25*-overexpressing cell. The association however, with CDK4 was not different between cell lines. From the results, *hsp25*-overexpressing cells showed decreased G1-S transition of the cells.

Effect of hsp25 on cell cycle regulators of the S-G2 transition after irradiation

To examine the role of *hsp25* on cell cycle regulators of S-G2 transition after irradiation, western blotting of cyclin A and kinase assay for CDK2 were performed. Cyclin A expression was increased from 6 hr after irradiation, with less effect in *hsp25*-overexpressing cells. Activities of CDK2 when histone H1 was used as a substrate, as well as total cyclin A associated kinase activity were increased after irradiation, which showed consistent phenomena of cyclin A

western blotting data; less effect in *hsp25*-overexpressin cells than in control cells. Co-immunoprecipitation data of cyclin A with CDK2 or CDC2 also showed the similar patterns; less radiation effect in *hsp25*-overxpressin cells, suggesting that *hsp25* augmented the radiation-induced S phase arrest.

Effect of hsp25 on cell cycle regulators of the G2-M transition after irradiation

To examine whether *hsp25* also affect radiation-induced G2/M arrest by altering cyclin/CDK activity, western blotting for cyclin B1 was performed. Cyclin B1 expression was increased from 6 hr of irradiation in control cells, but more delayed and weaker expression were shown in *hsp25*-overexpressing cells. When kinase activity was examined, total cyclin B1 associated kinase activity, as well as CDC2 activity were increased more significantly in control cells than in *hsp25*-overexpressing cells. Co-immunoprecipitation data of cyclin B1 with CDC2 also showed the similar patterns; less radiation effect in *hsp25*-overxpressin cells. The association p21Waf with cyclin B1 or CDC2 was clearly increased by radiation, with more pronounced effect in *hsp25*-overexpressing cells than in control cells. These data suggest that *hsp25* showed delayed and weaker effect in radiation-induced G2-M transition.

Effect of hsp25 on p53 protein induction after irradiation

Since p53 protein is known to be an inducer of G1 or G2 phase arrest, p53 protein expression after radiation was examined. Induction of p53 protein was increased from 6 hr of irradiation in both cell lines and it lasted for 36 hrs, with less effect in *hsp25*-overexpressing cells. These results suggested that p53 protein expression is independent process of cell cycle regulation by radiation. Because radiation-induced apoptosis was higher in the control cells, p53 protein expression was more correlated with apoptotic pathway than cell cycle progression in L929 cells, when 4 Gy was irradiated.

목 차

제 1 장 서 론---------- 29

제 2 장 국내외 기술개발 현황---------- 31

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과---------- 33

제 1 절 연구개발의 내용 및 방법---------- 33

제 2 절 연구결과---------- 38

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도---------- 47

제 5 장 연구개발결과의 활용계획---------- 49

제 6 장 참고문헌---------- 51

그 림 목 차

Figure 1. Cell survival curves ---------- 58
Figure 2. Determination of adaptive response ---------- 59
Figure 3. Determination of apoptosis using sandwich enzyme immunoassay
---------- 61
Figure 4. Determination of apoptosis using TUNEL assay ---------- 63
Figure 5. Adaptive response was differently induced depending on the
carcinogenesis stage of epidermal keratinocytes ---------- 65
Figure 6. HSP25 and inducible HSP70 involve in adaptive response by
preirradiation to low dose (1 cGy) radiation ---------- 69
Figure 7. Overexpression of HSP25 or HSP70 in RIF cells recovered adaptive
response.---------- 71
Figure 8. Constitutive levels of HSPs ---------- 72
Figure 9. Determination of radioresistance ---------- 73
Figure 10. Comparison of morphology in vector control and
hsp25-transfected cells ---------- 76
Figure 11. Growth curve of vector control and hsp25-transfected cells γ-ray
irradiation ---------- 77
Figure 12. Cell cycle distribution after G1 phase arrest by mimosine treatment
---------- ---------- 78
Figure 13. Effect of HSP25 on the expression of cell cycle related proteins
---------- 81
Figure 14. Effect of HSP25 on the level of Bcl-2 ---------- 82
Figure 15. Inhibition of apoptosis by HSP25 attenuates after cell cycle arrest by
mimosine treatment ---------- 83
Figure 16. Overexpression of Bcl-2 is responsible for radioresistance ------ 84
Figure 17. Radioresistance and induction of adaptive response in inducible

HSP70 transfected RIF cells ---------- 85
Figure 18. Inducible HSP70 acquires radioresistance ---------- 87
Figure 19. Inducible HSP70 increases basal level of PKC activity and alters radiation induced PKC activity ---------- 90
Figure 20. PKC inhibitor (H7) treatment attenuates the radioresistance by inducible HSP70 ---------- 94
Figure 21. HSP25 proloned radiation-induced G2/M arrest ---------- 95
Figure 22. HSP25 delayed G1-S transition after irradiation ---------- 96
Figure 23. HSP25 delayed G2-S transition after irradiation ---------- 97
Figure 24. HSP25 delayed G2-M transition after irradiation ---------- 98
Figure 25. Induction of p53 by irradiation was attenuated by HSP25 ---------- 99
Figure 26. HSP70 induced growth delay ---------- 100
Figure 27. HSP70 induced radioresistance and inhibited radiation induced apoptosis ---------- 103
Figure 28. HSP70 shortened radiation induced G2/M phase arrest---------- 104
Figure 29. HSP70 facilitated G1/S transition after irradiation ---------- 105
Figure 30. HSP70 inhibited aberrant S-G2 cell cycle progression after irradiation ---------- 106
Figure 31. HSP70 inhibited aberrant G2-M cell cycle progression after irradiation ---------- 107
Figure 32. HSP70 showed reduced induction of p53 protein ---------- 108

제 1 장 서 론

에너지원으로써의 원자력의 이용이 많아짐에 따라 향후 일어날 가능성이 있는 방사선 피조사에 의한 장해 대책 강구의 필요성이 증가하고 있으며, 암치료에 사용되는 방사선이 주위의 정상조직에 손상을 주면서 방사선 부작용을 유발하고 있다. 이에 적절한 대책을 세우기 위해서는 기초 생물학적 연구를 통해 방사선에 의한 암세포와 정상세포의 형태 및 분자생물학적 변화를 체계적으로 파악하여 피폭과 장해 발현의 생물학적 연관성을 파악하여야 할 필요가 있다. 전리방사선이 직접 또는 간접적인 기전에 의해 DNA와 같은 생물학적으로 중요한 거대분자에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있고 이는 돌연변이, 염색체 이상, 발암 및 세포사등으로 표현될 수 있다. 그러나 방사선에 의한 인체 영향은 크게 긍정적인 부분과 부정적인 부분으로 구분되어 질 수 있고 부정적인 면은 방사선 사고 또는 고선량 방사선 노출시 정상세포에 미치는 악영향이고 긍정적인 면은 저준위 방사선 조사에 의한 고준위 방사선 치료시의 정상세포의 내성 획득이라든지, hormesis등의 효과이다. 대장균이 독성을 나타내지 않는 극소량의 alkylating agent에 만성적으로 노출되면 DNA 회복 반응이 유도되어 추후 급성 alkylating agent에 의한 손상 및 살해효과, 돌연변이에 대해 세균이 저항하게 된다. 최근 포유동물 체세포에서도 alkylating agent와 전리 방사선에 대해 대장균에서와 유사한 적응응답반응, 즉 어떤 손상 인자의 저농도 전처리가 뒤따른 고농도 처리에 의한 손상의 정도를 경감시켜 준다는 결과가 보고되었다. 인체 림파구를 사용한 저준위 방사선에 대한 적응응답반응에 대한 연구는 Olivieri 등에 의해 처음으로 제안되었는데 저농도의 tritiated thymidine [^{3}H-TdR]를 먼저 처리한 경우 1.5 Gy의 X-ray 조사에 의해 세포가 내성을 획득하는 적응응답반응을 유도함을 제시한 이래 많은 연구가 진행되고 있다. 이들 연구는 sister-chromatoid exchange 와 chromatid breaks등의 염색체 이상, 돌연변이의 빈도 및 세포의 생존율 등을 적응응답반응의 생물학적 지표로 사용하였다. 그러나 현재 치료의 목적으로 사용하거나 방사능 사고에 의해 방사선 노출 직후의 인체에 해를 미치는 고준위 방사선에 대한 여러 가지 세포손상에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만 저준위 방사선에 대한 여러 가지 세포손상에 대한 연구는 거의 전무한

실정이다. 방사선에 대한 최대의 적응 응답 반응을 보이는 가장 적합한 저준위 방사선 범위는 0.05-0.1 Gy 로 보고되어 있다. 현재 진행되고 있는 저준위 방사선에 의한 적응응답반응의 연구는 호주 및 미국에서는 인체 정상 림파구에서 저준위 방사성 동위원소에 의한 적응반응 현상을 규명하였으나, 암세포 및 이의 관련 유전자의 특성을 아직 파악하지 못하였고 체세포 및 종양세포에 있어서의 방사선민감도의 측정, 방사선 조사 전 민감도 예측 방법에 대한 많은 실험적 연구가 진행중에 있다.

본 연구는 저준위 방사선에 의한 적응응답반응이 정상세포에서는 발현되지만 암세포에서는 발현되지 않음을 세포 증식능 및 apoptosis 유발의 차이로 규명한 다음 연구로 그 기전을 검색하여 Heat Shock Protein이 방사선의 적응응답반응 및 내성기전에 관여함을 규명하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

원자력의 평화적 이용 증대와 이의 안전성에 관한 연구는 각 전문 분야 별로 순조롭게 진행되어 왔으나 원전사고 및 방사선 관련 종사자의 취급 부주의 등의 사고시에 발생할지 모르는 각종 재해로부터 방사선 종사자는 물론 인근 주민의 생명을 보호하고 방사선 사고로 긴급처치를 요하는 방사선 장해자가 발생할 경우 이에 대한 의료대책은 매우 중요한 과제로써 대두되게 되었다. 따라서 이러한 의료대책을 수립하기 위하여 우선 방사선이 인체에 어떠한 변화를 일으키는지에 대한 기초적인 실험을 통한 자료가 확보되어 있어야만 한다. 현재 국내에서는 나이, 연령, 성별에 따른 정상 한국인의 각 장기 및 기관별, 세포별 방사선에 대한 민감도의 측정이 아직 이루어져 있지 않다. 이것이 이루어지기 위해서는 방사선의 인체 내 역할이 정확하게 규명되어야 하며 특히 최근에 와서 눈부시게 발전하고 있는 분자생물학적 도구를 이용하여 방사선의 인체 영향을 규명하여 향후 발생할 가능성이 있는 원전사고에 대비한 기초자료로 이용하고자 한다.

모든 생물은 외부의 자극에 대한 나름대로의 적응 반응을 나타내는데, bacteria 뿐 아니라 mammalian 세포도 소량의 alkylating agent에 노출시 곧 이은 다량의 alkylating agent의 노출에 대해 저항력을 나타낸다. 이러한 적응 반응은 DNA methyl-transferase와 glycosylase 같은 적응관련 단백질의 합성에 의한 것으로 알려져 있다. 저준위 방사선을 쪼였을 경우 고준위 방사선에 의해 유발된 chromatid aberration의 회복율의 증가도 저준위 방사선에 의해 유도된 단백질이 관여할 것으로 추측되고 있다. 하지만 chemical mutagen과는 달리 아직 ionizing radiation 에 대한 세포의 적응 반응에 어떤 단백질이 관여하는지는 밝혀져 있지 않은 실정이다. Ionizing radiation 조사시에도 세포내 손상을 회복하기 위한 단백질의 생성이 있음은 물론이며, 세포에 치명적이지 않은 저준위 방사선만으로도 이러한 단백질의 유도가 가능할 것으로 추측되지만 현재까지 나온 결과는 거의 없는 실정이다.

지난해 연구 결과에서 방사선에 대한 세포의 적응 반응을 관찰하였고 이러한 적응응답반응이 정상세포에서는 나타났지만 암세포에서는 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 이러한 적응응답반응의 기전연구의 일환으로 적응응답반응을 유도하는 분자를 규명하였다. 현재까지 저준위 방사선 조사시 나타나는 기전 규명에 대한 연구는

전혀 실시되고 있지 않은 실정이므로 이러한 저준위 방사선에 의한 적용 반응의 기전이 규명 되어진다면 방사선 종사자 및 핵폐기물 등에 의해 야기되는 문제를 해결할 수 있는 대책 마련이 가능해 지리라 사료된다.

Heat shock protein (HSP)은 세포내 여러 stress에 반응하여 나타나는 protein으로 이의 발현이 hyperthermia, TNF-α, oxidative stress, cytokines, hypoxia 등의 여러 유해한 조건에서 세포에 저항성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서 HSP이 저준위 방사선에 의한 적응응답 반응에 중요한 역할을 수행할 것으로 생각되어지는 바, 세포에 *hsp25* 및 *hsp70*을 transfection시켜 방사선 적응응답 반응에 어떻게 관여하는지 알아보고자 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용 및 방법

1. 실험 세포주

정상 마우스 임파구 세포, 정상 마우스 상피세포, 마우스 임파구 암세포인 EL-4, L5178Y-S (X-ray에 감수성 있는 세포, Y-S) 및 L5178Y-R (X-ray에 저항성 있는 세포, Y-R), Chinese hamster ovarian cell, mouse fibroblast cell. *v-ras*^{Ha} transformed keratinocytes, 308 (mouse papilloma cells), RIF (radiation induced fibrosarcoma), TR (RIF의 thermoresistant clone), L929 mouse fibroblast 및 NIH3T3 mouse fibroblast cell를 대상으로 실험하였다.

2. 세포의 계수

부유하여 증식하는 세포는 방사선 조사 0시간부터 48시간까지 각 세포를 분취하여 trypan blue dye exclusion method에 의하여 살아있는 세포를 hematocytometer를 이용하여 계수 하였고 붙어서 자라는 세포의 경우 일상적인 colony forming assay를 실시하였다.

3. DNA의 분리 및 전기영동

세포를 배양하여 early log phase에 이르렀을 때 방사선을 조사하였다. 각 시간에 아래와 같은 방법으로 DNA를 분리하였다. 4℃에서 800 xg로 5 분간 원심분리하여 상층액을 버린 뒤 ice-cold PBS로 수세하여 다시 원심분리하였다. 세포를 $5x10^7$ cell/ml의 농도가 되도록 1xTE에 부유시켜 비이커에 옮긴 후 10배 부피의 lysis buffer (0.5% SDS, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.5)를 넣어 가볍게 저었다. Proteinase K를 최종농도 1 μg/ml가 되게 넣고 유리막대로 가볍게 섞은 뒤 conical tube (15 ml)로 옮겨서 50℃에서 overnight 배양하였다. 실온으로 식혀

microcentrifuge tube로 옮겨 phenol:chloroform 추출을 경계면이 없을 때까지 2-3번 반복하였다. 동 부피의 chloroform을 넣어 1 회 추출하였다. 3M sodium acetate를 1/10 부피를 넣은 후 ethanol (-20℃)을 2와1/2 부피만큼 넣어 -20℃에서 overnignt하였다. 침전된 DNA를 회수하기 위해 4℃에서 30분간 12,000xg에서 원심분리 한 뒤 70% ethanol로 수세하여 10분간 다시 원심분리 하였다. 회수된 DNA를 공기 중 말리고 100㎕의 1x TE에 부유시킨 뒤 RNase A를 최종농도 200 ㎕/ml가 되게 넣고 37℃에서 30분간, 65℃에서 5 분간 두었다. Spectrophotometer 260 nm에서 각 시료의 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 계산하여 10 ㎍을 1.5% agarose gel에서 lower dye가 중간 정도 내려올때까지 전개하였다. Ethidium bromide 염색으로 가시화 하여 nucleosomal DNA가 fragmentation되는 정도를 비교하였다.

4. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Boehringer Mannheim에서 구입한 Cell Death Detection Kit를 사용하였다. 방사선 조사 후 일정 시간 배양한 후 죽은 세포와 살아있는 세포의 수가 $1x10^5$ 개가 되게 만들었다. 500 ㎕의 incubation buffer를 넣어 세포를 lysis한 후 4℃에서 30분간 배양하고 원심분리 하였다. 상층액을 incubation buffer로 1:10 희석하였다. 각 well에 coating solution (anti-histon)으로 coating 한 후 실온에서 1시간 방치하고 coating solution을 제거하였다. 2-3회 washing solution으로 세척한 후 lysis한 DNA를 100 ㎕ 넣고 90분간 실온에서 방치하였고 용액을 제거한 후 100 ㎕의 anti-DNA peroxidase를 넣고 실온에서 90분간 방치하였다. 다시 용액을 제거한 후 100 ㎕의 substrate solution을 넣고 10-20분 후에 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. TUNEL assay

방사선 조사 후 일정시간 배양한 세포를 Phosphate buffered saline (PBS)로 수세한 후 95% ethanol로 고정하였다. Oncor사에서 구입한 Apop Tag kit를 사용하여 apoptotic fragment를 관찰하였다. 세포의 apoptotic cell 내 oligonucleosome 크기로 분절된 DNA fragment의 3'-OH 끝에 terminal transferase를 사용하여

digoxigenin-dUTP를 붙였다. anti-digoxigenin- perosidase conjugate를 처리한 뒤 0.05% diaminobenzidine (DAB)로 발색 반응시키고 0.5% methyl green으로 counter staining하였다.

6. Small-Heat Shock (HSP25) 또는 Inducible HSP70 Protein을 분비하는 세포주의 확립

마우스 섬유 아섬포 (L929)에 Heat Shcok Protein 25 (hsp25) 유전자를 Lipofection법으로 transfection하여 *hsp25*가 과도하게 분비하는 세포주를 확립한다. Inducible HSP70의 경우 *hsp70*을 포함하는 plasmid를 lipofection 방법으로 세포에 transfection 시킨다. puromycin이 포함된 배지에서 살아남은 세포만을 선택하여 이들 세포가 HSP70을 제대로 발현시키는지 확인한 다음 대량 배양하여 실험에 사용한다.

7. 방사선 조사

저준위 방사선 (1 cGy) 조사에는 자체 제작한 저준위 방사선 조사기로 ^{137}Cs 감마선을 분당 0.143 cGy로 조사하였다. 고준위의 경우 ^{60}Co 원격 치료 장치 (Teratron-780, AECC)를 사용하여 선량률 119.7 cGy/min로 조사하였다.

8. Western blotting

조직 또는 세포에서 단백질을 lysis buffer로 추출하여 SDS PAGE에서 단백질을 분리한 후 nitrocellulose에 transfer 시킨다. Specific antibody를 membrane에 부착시키고 horse radish peroxide가 연결된 secondary antibody를 붙인 후 ECL 시약을 사용하여 발현된 단백질을 확인하다.

9. HSP 발현 측정

Vector control만 transfection 시킨 세포와 *hsp70* 유전자를 transfection 시킨 세포를 lysis 용액 (120 mM NaCl, 40 mM Tris (pH 8.0), 0.1% NP40)으로 1 시간

동안 처리하여 단백질만 추출한 다음 전기 영동상에서 분리한 후 western blot analysis를 실시하였다. HSP 발현을 알아보기 위하여 mouse monoclonal anti-HSP90, -HSP110 antibody (Transduction Laboratories, Inc., Lexington, KY)와 goat polyclonal anti-Hsp70 antibody (Santa Cruze Biotechnology, Inc., Santa Cruze, CA)를 1:1000으로 희석하여 사용하였다.

10. 세포주기 조절에 관여하는 단백질의 발현 측정

Vector control만 transfection 시킨 세포와 *hsp70* 유전자를 transfection 시킨 세포를 lysis 용액 (120 mM NaCl, 40 mM Tris (pH 8.0), 0.1% NP40)으로 1 시간 동안 처리하여 단백질만 추출한 다음 전기 영동상에서 분리한 후 western blot analysis를 실시하였다. 세포주기에 관여하는 단백질의 발현을 알아보기 위하여 mouse monoclonal anti-Cdc2, -p53, -cyclin B1 antibody (Santa Cruze Biotechnology, Inc., Santa Cuze, CA)와 rabbit polyclonal anti-CDK2, -CDK4, -cyclin D1, D2, A, (Santa Cruze Biotechnology) E (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), -PCNA, -Bcl2, -p27 antibody (Santa Cruze Biotechnology)를 1:1000으로 희석하여 사용하였다. 또한 Rb family의 변화를 보기 위하여 mouse monoclonal anti-Rb (Pharmingen, San Diego, CA), -p107, -p130 (Santa Cruze Biotechnology)를 1:1000으로 희석하여 사용하였다.

11. 세포의 분획

세포를 Triton X100이 섞이지 않은 buffer로 추출한 후 100,000 xg 에서 1시간 원심 분리하여 세포질 분획을 분리하고 Triton X100이 들어있는 buffer로 추출하여 다시 100,000 xg에서 원심 분리하여 membrane 분획을 얻는다. 나머지 분획을 cytoskeleton 분획으로 한다.

12. PKC enzyme assay

세포를 lysis한 후 PKC substrate, TPA (tetradecanoly phorbol ester), Ca^{++} 및 gamma-P^{32} ATP를 섞어 일정시간 incubation 한 후 scintillation count를 시행한다.

13. 방사선에 대한 감수성 및 적응응답반응의 관찰

평상적인 clonogenic assay법에 의해 *hsp25*가 과도하게 발현된 세포의 방사선에 대한 감수성을 관찰하고 저준위 방사선 전처치에 의한 적응반응의 유도를 관찰한다.

14. Apoptosis 측정

방사선 조사 후 세포를 3.7%의 formaldehyde 용액에 20 분 동안 고정시킨 다음 PBS 용액으로 세척하였다. 암 조건하에서 4 ug/ml 농도의 Hoechst 용액에 10 분간 염색한 후 형광현미경으로 관찰하여 DNA fragmentation 이 일어난 세포를 계수하여 비교하였다.

제 2 절 연구 결과

본 연구에서는 저준위 방사선 (0.01Gy)이 고준위 방사선에 의한 세포손상을 억제시켜줄 수 있는 가를 관찰하였으며 이러한 억제효과가 apoptosis와 관련 있음을 규명하였다. 방사선에 감수성이 있다고 보고되는 정상 임파구세포, 정상 상피세포를 대상으로 정상세포에 대한 저준위 방사선의 적응응답반응을 관찰하였고 이러한 적응응답반응이 암세포에서도 일어나는가를 확인하기 위하여 EL-4, L5178Y 같은 임파구 암세포 및 마우스 papilloma 세포, ras oncogene으로 initiation된 세포를 대상으로 관찰하였다.

● *방사선 용량별 세포주별 방사선에 의한 감수성 검색*

정상 마우스 임파구 세포, 정상 마우스 상피세포 및 EL-4, L5178Y-R (X-ray에 의해 저항성을 보이는 세포주), L5178Y-S (X-ray에 의해 감수성을 보이는 세포주) 임파구 암세포 및 마우스 papilloma 세포, ras oncogene으로 initiation된 세포를 대상으로 감마선에 의한 용량별 세포사망곡선을 작성하였다. 모든 세포에서 시간에 따라 방사선 조사 세포의 세포 사망율은 증가하였고 용량 의존적이었다. 또한 X-ray도는 온도에 저항성을 보이는 세포는 감마선에 대해서도 저항성을 나타내었다. 방사선 용량 곡선으로부터 50% 세포 사망을 보이는 방사선 용량을 각 세포의 고준위 방사선의 용량으로 결정하였다 (Fig. 1).

● *저준위 방사선에 의한 적응응답반응의 관찰*

저준위와 고준위 방사선의 조사 간격을 4 시간과 7 시간으로 하여 저준위 방사선에 의한 적응응답반응을 확인하였다. 정상 임파구 세포, 정상 상피세포, L5178Y-R 및 TR 세포의 경우 적응응답반응을 유도하였으나 EL-4, L5178Y-S, RIF 및 308 세포의 경우 적응응답반응을 유도하지 못하였다 (Fig. 2).

● *저준위 방사선에 의한 적응응답반응 기전 규명*

Apoptosis와의 관련성 규명: 저준위 방사선에 의한 정상세포 및 방사선 또는 온도에 의해 적응 된 세포 (L5178Y-R 및 TR)의 적응응답반응이 apoptosis 유발 저하에 의한 것인가를 확인하기 위하여 저준위 방사선을 조사하고 고준위 방사선을 조사한 세포에서 apoptosis 유발 정도를 DNA ladder 형성, ELISA법에 의한 Cell death

detection 및 Immunohistochemistry에 의한 TUNEL assay에 의해 측정하였다. 그 결과 저준위 방사선에 의해 적응응답반응을 유도하는 정상 임파구 세포, 정상 상피세포, L5178Y-R 및 TR의 경우 apoptosis가 저준위 방사선의 전 조사에 의해 현저히 저하되었지만 EL-4, L5178Y-S, RIF 및 308의 경우 저준위 방사선 전 조사에 의해 apoptosis가 저하되지 않았다 (Fig. 3 및 4).

● ***저준위 방사선에 의한 적응응답반응에 PKC activation이 관련되었다 (Fig. 5)***

발암 단계별 (정상상피세포-PK, ras 유전자가 활성화된 상피세포-ras-PK 및 papilloma cell line-308) 세포에서 방사선 감수성 및 PKC 활성화정도를 관찰 한 결과 감수성은 정상세포에서 강하게 나타났고 발암단계가 진행될수록 방사선에 의한 세포사가 감소하였다 (Fig 5A). 적응응답반응은 PK에서는 유도되었고 ras-PK는 중간정도의 적응응답반응이, 308 암세포는 전혀 적응응답반응이 유도되지 않았다. 이러한 적응응답반응의 유도가 PKC 활성화정도와 관련 있는가를 관찰하였는데 PKCdelta의 반응성이 적응응답반응의 유도와 상관이 있는 것으로 추정되어졌다 (Fig. 5C).

● ***저준위 방사선 조사에 의한 적응응답반응이 RIF (Radiation Induced Fibrosarcoma)세포에서는 나타나지 않았지만 RIF의 Thermoresistant 세포인 (TR)세포에서는 나타났다 (Fig. 6).***

암세포인 RIF세포와 이의 Thermoresistant clone인 TR세포의 방사선에 반응도를 측정한 결과 열에 의해 내성을 유도하는 TR세포의 경우 방사선에 의해서도 약간의 내성을 유도함을 clonogenic survival assay에서 확인하였다. 또한 지난해의 연구결과와 마찬가지로 0.01 Gy 방사선 전 조사에 의한 적응응답반응이 암세포인 RIF세포에서는 나타나지 않았지만 TR세포에서는 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 6A 및 B).

● ***Heat Shock Protein (HSP)의 발현정도가 RIF 세포 및 TR 세포에서 차이가 있었으며 특히 HSP25 및 inducible HSP70의 발현이 TR세포에서 현저하였다.***

RIF 및 TR세포의 가장 큰 차이점은 HSP protein이라는 보고가 있기 때문에 이 두 세포의 HSP profile을 관찰하였다. 그 결과 HSP25 및 inducible 70의 발현이 TR 세포에서 현저히 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6C).

● ***적응응답반응이 나타나지 않는 RIF세포에 HSP25 또는 inducible HSP70을 과***

발현 시킨 결과 적응응답반응이 다시 나타남을 확인할 수 있었다.

적응응답반응에 HSP25 및 inducible HSP70이 직접적으로 관여하는가를 관찰하기 위해 적응응답반응이 일어나지 않았던 RIF 세포에 hsp25 또는 inducible hsp70 유전자를 과발현시킨 후 적응응답반응을 관찰하였다. 그 결과 적응응답반응이 이 두 유전자 과발현 세포주에서 모두 발현되었고 방사선 저항성 및 적응응답반응의 발현도는 inducible HSP70 과발현 세포에서 더 크게 나타났다 (Fig. 7).

● ***HSP25의 적응응답반응 및 방사선 내성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 HSP25 발현의 거의 없는 L929 세포를 이용하여 HSP25 발현을 증가시킨 결과 morphological change가 뚜렷하였다 (Fig. 8-10).***

HSP25의 endogenous expression이 거의 없는 mouse fibroblast 세포인 L929 세포에 murine *hsp25*의 complete genomic sequence가 들어있는 pBC voctor를 이용하여 transfectant를 만들었다 (Fig. 8). HSP25 transfectant 세포의 경우 conogenic survival, Trypan blue assay, apoptosis assay 모두에서 방사선에 의한 내성을 보여주었고 (Fig. 9) HSP25 transfectant의 경우 control vector transfectant에 비해 morphological change가 있었는데 spindle like shape이 round shape으로 변하였고 이는 전자현미경 사진도 마찬가지였다. HSP25에 의한 morphological change중에 F-actin의 concentration증가가 보고되었기 때문에 phalloidin 염색에 의한 F-actin 양을 immunohistochemistry에 의해 관찰하였다. 마찬가지로 F-actin의 양이 HSP25에 의해 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 10).

● ***HSP25의 transfectant는 세포증식능이 저하되었다 (Fig. 11 및 12).***

HSP25의 방사선 내성 및 적응응답반응의 기전 규명을 위해 먼저 세포 증식능을 관찰한 결과 HSP25 transfectant가 control vector transfectant에 비해 3-4시간 세포 증식능이 저하되었고 (Fig. 11) 이는 mimosine을 처리하여 G1 arrest를 시키고 mimosine을 제거하여 세포 증식을 동시에 시킨 결과에서도 같은 현상이었다 (Fig. 12).

● ***Cell cycle related protein expression의 관찰 결과 HSP25 transfectant의 경우 cyclin D1, cdc2의 level 이 저하되었고 p21 expression level 이 증가되었다 (Fig. 13).***

HSP25 transfectant의 세포 증식능 저하가 cell cycle related protein expression level 차이에 의한 것인가를 확인하기 위해 G1, S 및 G2/M phase에 관여하는 cell cycle related protein expression을 관찰하였다. 그 결과 HSP25 overexpression은 cyclin D1 및 cdc2 level을 감소시켰으며 p21 level을 증가시켰다 (Fig. 13). 따라서 이러한 HSP25의 cell cycle related protein 조절이 세포 증식능에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

● ***HSP25 overexpression은 antiapoptotic protein인 bcl-2 expression level을 증가시켰다 (Fig. 14)***

또 하나의 사실은 HSP25의 overexpression이 antiapoptotic protein으로 알려진 bcl-2의 발현을 증가시킴을 western blotting으로 확인하였다 (Fig. 14).

● ***Mimosine 처리에 의한 cell cycle progression 의 억제는 완전하지는 않지만 HSP25에 의한 apoptosis inhibition 효과를 억제하였다 (Fig. 15).***

HSP25에 의한 cell growth 저해가 방사선 내성의 주 factor인가를 확인하기 위해 mimosine 처리에 의해 cell growth를 정지시킨 후 방사선을 조사하였다. 그 결과 완전하지만 않지만 HSP25에 의한 방사선 내성이 일부 없어지는 것을 apoptosis assay 결과 확인할 수 있었다 (Fig. 15).

● ***Bcl-2 overexpression은 방사선 내성을 증가 시켰고 따라서 HSP25에 의한 방사선 내성은 Bcl-2 overexpression에 의한 것임을 확인할 수 있었다 (Fig. 16).***

Cell cycle arrest에 의한 방사선 효과가 완전하지 않았기 때문에 HSP25의 또다른 factor인 BCl-2의 영향을 관찰하였다. L929세포에 bcl-2 gene이 들어 있는 pcDNA vector를 이용하여 Bcl-2를 overexpression 하였고 이 세포의 방사선 내성을 관찰하였다. 그 결과 clonogenic survival, apoptosis 및 trypan blue dye에 의한 세포증식능 assay 모두에서 Bcl-2 overexpression이 방사선 내성을 나타내었다.

따라서 HSP25에 의한 방사선 내성 및 적응응답반응은 HSP25에 의한 cell cycle delay 및 bcl-2 overexpression에 의한 것임을 추정할 수 있었다.

● ***Inducible HSP70의 RIF cell의 overexpression은 적응응답반응을 회복시켰다 (Fig. 17).***

hsp70 gene을 포함하는 MFGpuro vector를 RIF 세포에 transfection 시켜 HSP70이 overexpression되는 세포주를 만들었다 (Fig. 17). *hsp70*-transfectant cell에서의 방사선에 대한 민감도를 관찰하기 위하여 1, 2, 4, 8 Gy의 방사선 조사후 colony forming assay를 실시하여 survival fraction을 측정한 결과 *hsp70*-transfectant cell에서 방사선에 대하여 더 높은 저항성을 나타내었으며 저준위 방사선에 의한 적응 응답 반응에 inducible HSP70이 관여하는지 알아보기 위하여 0.01 Gy의 저준위 방사선을 조사한 후 4 시간과 7 시간 후에 고준위 방사선 4 Gy를 조사하여 고준위 방사선만을 받은 실험군의 survival fraction과 비교하였다. Vector만 transfection된 세포에서는 적응 응답 반응이 관찰되지 않았지만 *hsp70*을 transfection 시킨 세포의 경우 적응응답반응이 나타남을 관찰할 수 있었다. 또한 inducible HSP70의 과발현은 다른 HSP의 발현에는 변화를 주지 않았다.

● ***Inducible HSP70은 정상세포 type인 NIH3T3세포에서도 방사선 내성 및 적응응답반응을 나타내었다 (Fig. 18).***

적응응답반응이 주로 정상세포에서 나타나는 것으로 알려져 있으므로 inducible HSP70 vector를 normal fibroblast cell인 NIH3T3세포에 overexpression하고 방사선에 대한 내성 및 적응응답반응을 관찰하였다. 그 결과 역시 *hsp70*-transfectant cell에서 방사선에 대하여 더 높은 저항성을 나타내었으며 저준위 방사선에 의한 적응 응답 반응에 inducible HSP70이 관여하는지 알아보기 위하여 0.01 Gy의 저준위 방사선을 조사한 후 4 시간과 7 시간 후에 고준위 방사선 4 Gy를 조사하여 고준위 방사선만을 받은 실험군의 survival fraction과 비교하였다. Fig. 18에서 보는바와 같이 vector만 transfection된 세포에서도 약간의 적응 응답 반응이 관찰되지 않았지만 *hsp70*을 transfection 시킨 세포의 경우 적응응답반응이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 NIH3T3 세포에서도 inducible HSP70의 과발현은 다른 HSP의 발현에는 변화를 주지 않았다.

● ***Inducible HSP70의 과발현은 PKC activity를 증가시켰다 (Fig. 19).***

Inducible HSP70에 의한 적응 응답 반응에 있어서 signaling regulation이 어떻게 작용하는지 알아보기 위하여 signaling regulation의 upstream에 위치하는 PKC의 activity를 조사하였다. Fig. 19은 PKC activity가 *hsp70*-transfected cell에서 더 높은 것을 보여주며 방사선 조사시 control vector의 경우 PKCalpha, delta 및 zeta의 membrane으로의 translocation이 일어났으나 *hsp70*-transfected 과발현은 방사선에 대

한 이러한 변화를 억제함이 관찰되었다.

● ***PKC inhibitor (H7)의 전처리는 inducible HSP70에 의한 방사선 내성을 제거하였다 (Fig. 20).***

Inducible HSP70 과 발현에 의한 방사선 내성이 PKC activity에 의한 것인가를 관찰하기 위해 PKC inhibitor인 H7을 전처리 한 후 방사선 조사하여 clonogenic survival을 측정하였다. 그 결과 inducible HSP70에 의한 방사선 내성이 소실됨을 확인할 수 있어 위의 결과들을 종합하여 볼 때, inducible HSP70이 세포내의 신호전달 체계를 변화시킴으로써 방사선에 대한 저항성을 획득한 것으로 생각할 수 있으며 특히, PKC activation이 이에 관련되어 있을 것으로 생각된다 (Fig. 20).

● ***HSP25 과발현은 방사선 조사에 의한 G2/M arrest를 지연시켰다 (Fig. 21).***

방사선 조사후의 세포주기조절에 HSP25가 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위해 4 Gy의 방사선 조사후 flow cytometry에 의해 세포주기를 관찰하였다. 방사선 조사 6시간과 12시간에 G2/M phase arrest가 HSP25에 의해 현저히 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 21).

● ***방사선조사에 의한 G1-S cell cycle transition을 HSP25가 지연시켰다. (Fig. 22)***

HSP25에 의한 G2/M phase 지연이 실제적인 molecular event를 확인하기 위하여 먼저 G1-S transition에 관여하는 protein의 발현을 관찰하였다. Cyclin D1 및 E의 발현이 방사선에 의해 감소되었고 이러한 감소폭이 HSP25에 의해 완화되었다. 또한 P21 발현이 방사선에 의해 증가되었는데 이러한 증가폭이 HSP25에 의해 증가되는 것을 관찰하였다. P21의 CDK2 및 CDK4와의 binding activity도 HSP25 과발현 세포에서 증가되었으므로 HSP25 과발현은 G1-S cell cycle transition을 지연시킴을 알 수 있었다.

● ***방사선 조사에 의한 S-G2 cell cycle transition을 HSP25가 지연시켰다. (Fig. 23)***

또한 방사선의 S-G2 phase cell cycle transition에 미치는 HSP25의 영향을 관찰한 결과 방사선에 의한 cylcin A의 발현폭 및 그의 kinase activity를 감소시켜 방사선

조사에 의한 S-G2 cell cycle transition을 HSP25가 지연시킴을 알 수 있었다.

● ***방사선 조사에 의한 G2-M cell cycle transition을 HSP25가 지연시켰다 (Fig. 24).***

G2-M phase cell cycle에 미치는 방사선 영향에 대한 HSP25의 역할을 살펴본 결과, cyclin B1 및 그의 kinase activity의 발현폭의 감소, P21의 cdc2와의 binding activity 증가등의 결과로 방사선 조사에 의한 G2-M cell cycle transition을 HSP25가 지연시킴을 확인하였다.

● ***HSP25 과발현 세포는 방사선에 의한 p53 induction을 억제하였다 (Fig. 25).***

방사선 조사에 의한 p53 발현에 HSP25의 영향을 관찰한 결과 control vector에 비해 p53 발현이 억제됨을 확인하였다. 따라서 HSP25의 방사선 내성이 p53 induction 저해와 상관 있음을 알 수 있었다.

● ***HSP70 과발현은 세포의 성장을 지연시켰다. (Fig. 26).***

HSP70을 NIH3T3에 transfection, 시킨후 세포성장에 미치는 영향을 실험한 결과 trypan blue법에 의한 cell count 및 ^{3}H-thymidine incorporation에서 모두 HSP70 transfectant가 성장이 지연됨을 확인하였고 flow cytometry를 측정할 결과에서도 증가된 G1 phase를 관찰하였다. 실제로 mimosine 및 serum starvation에 의해 세포의 성장을 중단시키고 동시에 세포증식을 유도하였을 때에도 HSP70 transfectant에서 세포 성장이 지연됨을 관찰하였다. 세포주기 관련 단백질의 분포를 확인한 결과에서도 HSP70 transfectant에서 감소된 cyclin D1 및 cdc2가 관찰되었고 pRb의 dephosphorylated form이 증가되어 HSP70에 의한 증가된 G1-peak 결과와 일치하였다.

● ***HSP70은 방사선에 의한 apoptosis을 억제하여 radioresistance를 유도하였다 (Fig. 27).***

HSP70이 방사선에 의한 세포사에 어떠한 영향 미치는가를 관찰한 결과 방사선에 의한 세포사가 HSP70 transfectant에서 감소됨을 관찰하였고 이러한 세포사의 감소가 HSP70의 radioresistance와 상관이 있을 것으로 추정되었다.

● ***HSP70 과발현은 방사선 조사에 의한 G2/M arrest를 감소시켰다. (Fig. 28).***

방사선 조사후의 세포주기조절에 HSP70이 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위해 4 Gy의 방사선 조사후 flow cytometry에 의해 세포주기를 관찰하였다. 방사선 조사 6시간과 12시간에 G2/M phase arrest가 control transfectant에서는 관찰되었으나 HSP70 transfectant의 경우 이러한 G2/M phase arrest가 감소되어 짐을 확인하였다. (Fig. 28).

● ***방사선조사에 의한 G1-S cell cycle transition의 지연을 HSP70이 회복하였다. (Fig. 29)***

HSP70에 의한 G2/M phase arrest의 회복에 대한 실제적인 molecular event를 확인하기 위하여 먼저 G1-S transition에 관여하는 protein의 발현을 관찰하였다. Cyclin D1 및 E의 발현이 방사선에 의해 감소되어 G1-S transition이 지연되는 현상이 나타났지만 이러한 현상이 HSP705에 의해 완화되었다. 또한 P21 발현이 방사선에 의해 증가되었는데 이러한 증가폭도 HSP70에 의해 완화되는 것을 관찰하였다. P21의 CDK2 및 CDK4와의 binding activity도 HSP70 과발현 세포에서 감소되었으므로 HSP70 과발현은 방사선에 의한 G1-S cell cycle transition의 지연을 완화시킴을 알 수 있었다 (Fig. 29).

● ***방사선 조사에 의한 aberrant한 S-G2 cell cycle transition을 HSP70이 완화하였다 (Fig. 30).***

또한 방사선의 S-G2 phase cell cycle transition에 미치는 HSP70의 영향을 관찰한 결과 HSP70 transfectant에서 방사선에 의한 cylcin A의 발현폭 및 그의 kinase activity를 감소시켜 방사선 조사에 의한 aberrant한 S-G2 cell cycle transition을 HSP70이 억제함을 알 수 있었다. 또한 방사선에 의한 P21과 cyclin A와의 binding activity도 HSP70에 의해 감소되어지므로 실제적인 방사선 damage가 HSP70 transfectant에는 감소되어 이러한 현상이 나타난다고 추정할 수 있다 (Fig. 30)

● ***방사선 조사에 의한 aberrant한 G2-M cell cycle transition을 HSP70이 완화하였다 (Fig. 31).***

G2-M phase cell cycle에 미치는 방사선 영향에 대한 HSP70의 역할을 살펴본 결과, cyclin B1 및 그의 kinase activity의 발현폭의 감소, P21의 cdc2와의 binding activity 감소등의 결과로 S-G2 phase 결과와 마찬가지로 실제적인 방사선 damage가 HSP70 transfectant에는 감소되어 이러한 현상이 나타난다고 추정할 수 있다 (Fig.

31).

● ***HSP25 과발현 세포는 방사선에 의한 p53 induction을 억제하였다 (Fig. 32).***

방사선 조사에 의한 p53 발현에 HSP70의 영향을 관찰한 결과 control vector에 비해 p53 발현이 억제됨을 확인하였다. 따라서 HSP70의 방사선 내성이 p53 induction 저해와 상관 있음을 알 수 있었다 (Fig. 32).

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

국내에서는 아직 미개척 분야로써 방사선의 생물학적 또는 기초 의학적 연구가 거의 실시되고 있지 않기 때문에 실질적으로 방사선의 생물학적 연구 결과를 임상적으로 응용함으로서 연속적이고 통일된 연구 결과를 기대할 수 있으며 연구의 궁극적 목표인 방사선에 의한 인체 영향의 정도를 판별할 수 있는 기술을 축적, 확립할 수 있을 것으로 생각된다. 방사선 관련 종사자 수의 증가, 원자력 발전소 수의 증가, 핵폐기물의 증가 및 방사선의 치료 및 진단 등, 방사선 사용이 증가됨에 따라 방사선의 생물학적 영향을 올바르게 규명함으로써 현재 방사선의 부정적 이미지를 해소할 수 있는 자료의 제공할 수 있을 것으로 생각되며 또한 기초 자료의 부족으로 인한 여러 가지 원자력 관련 업무의 효율을 증대할 수 있다. 특히 저준위 방사선에 대한 영향 연구는 피조사 가능성이 있는 방사선 종사자 및 원자력 발전소 주위 주민의 세포 손상 정도를 경감 내지 억제 할 수 있으며 방사선에 대한 부정적 견해를 갖고 있는 일반 국민의 불안감을 해소 시킬 수 있을 것으로 사료된다. 방사선에 의한 생물학적 기전 (세포사 및 신호전달체계)를 이해함으로서 방사선에 대한 손상 대책 마련하는 기초 자료를 제공할 수 있다.

본 연구에서는 저준위 방사선 (0.01Gy)이 고준위 방사선에 의한 세포손상을 억제시켜줄 수 있는 가를 관찰하였으며 이러한 억제효과가 Heat shock protein (HSP), 특히 HSP25 및 inducible HSP70과 관련 있음을 규명하였다. 현재까지 저준위 방사선에 의한 적응응답반응에 대한 기전 규명을 거의 이루어지고 있지 않고 있으므로 본 연구로 인해 저준위 방사선에 의한 적응응답반응의 기전연구의 실마리를 제공하게 되었으며 향후 이 반응에 관여하는 인자의 조절에 의한 정상세포의 내성획득 및 방사선 손상의 감소등에 응용할 수 있으리라 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 저준위 방사선의 영향을 평가하기 위하여 시도되었으며 본 연구의 결과 저준위 방사선이 고준위 방사선 조사에 세포 사망률을 억제하는 적응응답반응을 나타내는데 apoptosis가 관여하고 특히 HSP25 및 inducible HSP70이 연관되었음 규명하였다. 또한 이러한 연구를 바탕으로 방사선의 생물학적 연구를 광범위하게 수행하고 방사선 영향에 대한 구체적인 자료를 제공하여 방사선 종사자 및 대국민 홍보에 사용토록 하며, 특히 저준위 방사선에 대한 영향 연구는 피조사 가능성이 있는 방사선 종사자 및 원자력 발전소 주위 주민의 세포 손상 정도를 경감 내지 억제할 수 있으며 방사선에 대한 부정적 견해를 갖고 있는 일반 국민의 불안감을 해소시킬 수 있을 것으로 사료된다.

제 6 장 참고문헌

1. Abend M, Rhein A, Gilbertz KP, Blakely WF, van Beuingen D. Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. Int J Radiat Biol. 1995;3:315-326.
2. Afanasev VN, Korl BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechatnikov VA, Umaksky SR. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. FEBS Letters. 1986;194:347-350.
3. Azzam EI, Raaphors GP, Mitchel REJ. Radiation induced adaptive response for protection against micronucleus formation and neoplastic transformation in C3H 10T/1/2 mouse embryo cells. Radiation Res. 1994;138:S28-S31.
4. Bosi A, Olivieri G. Variability of the adaptive response to ionizing radiation in humans. Mutation Res.1989;211:13-17.
5. Boothman DA, Meyers M, Odegaard E, Wang M. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. Mutation Res. 1996;358:143-153.
6. Cai L, Liu SZ. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation. Int J Radiat Biol. 1985;58:187-194.
7. Fan S, Vijayalaxmi G, Mindek G, Burkart W. Adaptive response to 2 low doses of X-rays in human blood lymphocytes. Mutat Res. 1990;243:53-56.
8. Farooqi Z, Kesavan PC. Low dose radiation-induced adaptive response in bone marrow cells of mice. Mutat Res. 1993;302:83-89.
9. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. Cell. 1980;19:245-254.
10. Hyun SJ, Yoon MY, Kim TH, Kim JH. Enhancement of mitogen-stimulated proliferation of low dose radiation-adapted mouse splenocytes. Anticancer Res. 1987;17:225-230.

11. Ishii K, Watanabe M. Participation of gap-junctional cell communication on the adaptive response in human cells induced by low-dose of X-rays. Int J Radiat Biol. 1996;69:291-299.
12. Ljungman M. The influence of chromatin structure on the frequency of radiation-induced DNA breaks: a study using nuclear and nucleoid monolayers. Radiat Res. 1991;128:58-64.
13. Noma A, Tsuboi N. Dependence of junctional conductance on proton, calcium and magnesium ions in cardiac paired cells of guinea-pig. J Physiol. 1997;382:193-211.
14. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. Science. 1984;223:594-597.
15. Radford IR. Mouse lymphoma cells that undergo interphase death show markedly increased sensitivity to radiation-induced DNA double strand breakage as compared with cells that undergo mitotic death. Int J Radiat Biol. 1991;59:1353-1369.
16. Samson L, Schwartz JL. Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. Nature. 1980;287:861-863.
17. Seong JS, Suh CO, Kim GE. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. Int J Radiat Oncology Biol Phys. 1995;33:869-874.
18. Shadley JD, Wolff S. Very low doses of X-ray can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. Radiat Res. 1987;111:511-517.
19. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, Milas L, Meyn RE. Apoptosis in irradiated murine tumors. Radiat Res. 1989;120:140-153.
20. Szekely JG, Lobreau AU. High radiosensitivity of MOLT-4 leukeamic cell line. Int J Radiat Biol. 1985;48:277-284.
21. Trosko JE. Possible role of intercellular communication in the modulation of the biological response to radiation. Yokojama Medical Bull. 1991;42:151-165.
22. Vijayalaxmi G, Burkart W. Resistance and cross-resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycine. Mutat Res.

1989;211:1-5.

23. Wolff S, Afzal V, Wiencke JK, Olivieri G, Michaeli A. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiation become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double strand breaks in DNA. Int J Radiat Biol. 1988;53:39-49.
24. Wolff S, Wiencke JK, Afzal V, Youngblom J, Cortes F. The adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation: a case of induced chromosomal repair with the induction of specific proteins. In: Baverstok KM, Stather JW, eds. Low Dose Radiation: Biological Bases of Risk Assessment. London: Taylor & Francis press; 1989: pp446-454.
25. Wolff S. Low dose exposure and the induction of adaptation. In: Sugahara T, Sagan LA, Aoyama T, eds. Low dose irradiation and biological defense mechanisms. Amsterdam: Elsvier Science Publishers; 1992; pp21-28.
26. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1980;68:251-306.
27. Zou PK, Liu SY, Sun WZ, Zhang YP, Wei K. Cultured mouse SR-1 cells exposed to low dose of gamma-rays become less susceptible to the induction of mutagenesis by radiation as well as bleomycin. Mutagenesis. 199;8:109-111.
28. Parsell DA and Lindquist S: Heat shock proteins and stress tolerance. In The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. (Morimoto RL, Tissieres A and Georgopoulos C, eds), pp457-494, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
29. Craig EA, Weissman JS and Horwich AL: Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. Cell, 78: 365-372, 1994.
30. Jaattela MD, Wissing D: Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. EMBO J, 11: 3507-3512, 1992.
31. Jaattela M and Wissing D: Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanisms of self-protection. J Exp Med, 177: 231-236, 1993.

32. Gething MJ and Sambrook J: Protein folding in the cell. Nature, 355: 33-45, 1992.
33. Hill CS and Treisman R, Cell, 80: 199-211, 1995
34. Hunter T and Karin M, Cell, 70: 375-387, 1992.
35. Erdos G and Lee YS: Biochem Biophys Res Commun, 202: 476-483, 1994.
36. Kim SH, Kim JH, Erdos G and Lee YS: Effect of staurosporine on suppression of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. Biochem Biophs Res Commun 193: 759-763, 1993
37. Ding XZ, Smallridge RC, Galloway RJ and Kiang JG: Increase in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A431 cells; role of protein kinase C and [Ca2+]i. J Invest Med, 44: 144-153, 1996
38. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Bebicki JM and Dean RT: Long lived reactive species on free radical damaged proteins. Biochem J, 282: 621-624, 1992.
39. Keyse SM and Tyrrell RM: Both near ultraviolet radiation and the oxidizing agent hydrogen peroxide induce a 32-kDa stress protein in normal human skin fibroblasts. J Biol Chem 262: 14821-14825, 1987.
40. Sierra-Rivera E, Voorhees GJ and Freeman ML: Ganna irradiation increases hsp-70 in Chinese hamster ovary cells.
41. Woloschak G, Chang-Liu C, and Shearin-Jones P: Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. Cancer Res, 50: 3963-3967, 1990.
42. Krauss S, Mochly-Rosen D, Koshland D and Linn S: Exposure of HeLa DNA polymerase alpha to protein kinase C affects its catalytic properties. J Biol Chem 262: 3432-3435, 1987.
43. Samuels D, Shimizu Y and Shimizu N: Protein kinase C phosphorylates DNA topoisomerase I. FEBS Lett 259: 61-63, 1989.
44. Davis PD, Hill CH, Keech G, Lawton G, Nixon JS, Sedgwick AD, Wadsworth J, Westmacott D and Wilkinson SE: Potent selective inhibitors of protein kinase C. FEBS Lett, 259: 61-63, 1989.
45. Morrison DK, Kaplan DR, Rapp U and Roberts TM: Signal transduction from membrane to cytoplasm: Growth factors and membrane-bound oncogene

products increase Raf-1 phosphrylation and associated protein kinase activity. PNAS, 85: 8855-8859, 1988.

46. Al-Bagdadi F, Singh N and Arlinghaus RB: Evidence for involvement of the protein kinase C pathway in the activation of v-mos protein kinase. Oncogene 5: 1251-1257, 1990.
47. Kasid U, Pfeifer A,Brennan T, Beckett RR, Weichselbaum A, Dritschillo A and Mark GE: Effect of antisense c-raf on tumorigenicity and radiation sensitivity of a human squamouse cell carcinoma. Science 243: 1354-1356, 1989.
48. Pirollo KF, Garner R, Yuan YS, Blattner WA and Chang EH: Raf-involvement in the simultaneous genetic transfer of the radioresistant and transforming phnotypes. Int J Radiat Biol, 55: 783-786, 1989.
49. Sklar M: The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. Science 239: 645-647, 1988.
50. Borner C, Weinstein IB: Transformation by ras oncogene causes increased expression of protein kianse C. Cell Growth Differ 1: 653-660, 1990.
51. Dlugosz AA, Cheng C, Williams EK, Dharia AG, Denning MF and Yuspa SH: Alterations in murine keratinocyte differentiation induced by activated rasHa genes are mediated by protein kinase C-a. Cancer Res., 54: 6413-1420, 1994.
52. Lee YS, Dlugosz AA, McKay R, Dean NM and Yuspa SH: Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase Ca in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. Mol Carcinogenesis, 18: 44-53, 1997.
53. Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A: Charaterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent PKC isozymes. Mol Pharmacol, 44: 298-307, 1993.
54. Mehlen P, Krets-Remy C, Briolay J, Fostan P, Mirault ME and Arrigo AP: Biochem J 312: 367-374, 1995.
55. Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP, J Immunol 154: 363-374, 1995.
56. Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki S, Bebicki JM and Dean RT,

Biochem J 282: 621-624, 1992.

57. Sierra-Rivera E, Voorhees G and Freeman ML: Gamma irradiation increases hsp-70 in Chinese Hamster Ovary cells. Radiation Res, 135: 40-45, 1993.
58. Ibuki Y, Hayashi A, Suzuki A and Goto R: Low dose irradiation induces expression of heat shock protein 70 mRNA and thermo- and radio-resistance in myeloid leukemia cell line. Biol Pharm Bull, 21: 434-439, 1998.
59. Kwak HJ, Jun CK, Pae HO, Yoo JC, Park YC, Choi BM, Na YG, Park RK, Chung TH, Chung HY, Park WY and Seo JS: The role of inducible 70-kDa heat shock protein in cell cycle control, differentiation, and apoptotic cell death of the human myeloid leukemic HL-60 cells. Cell Immunol, 187: 1-12, 1998.
60. Park SH, Lee YH, Yoo SY, Cho CK and Lee YS: Variability of the adaptive response to ionizing radiation depending on normal and neoplastic properties of the cells. J Korean Associ Cancer Prev, 2: 122-130, 1997.
61. Park YM, Mivechi NF, Auger EA and Hahn GM: Altered regulation of heat shock gene expression in heat resistant mouse cells. Int J Radiation Oncology Biol Phys, 28: 179-187, 1993.
62. Sadekova S, Lehnert L and Chow TYK: Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possibile role in induced radioresistance. Int J Radiat Biol, 72: 653-660, 1997.
63. Gething MJ and Sambrook J: Protein folding in the cells. Nature, 355: 33-45, 1992.
64. Spitz DR, Dewey WC and Li GC: Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. J Cell Physiol, 131: 364-373, 1987.
65. Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreutzer DL and Das KK: Modlcular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. American J Physiol, 264: C715-722, 1993.
66. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C and Massie B: Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol Cell Biol, 17: 5317-1327, 1997.

67. Holmberg CI, Leppa S, Eriksson JE and Sistonen L: The phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate enhances the heat-induced stress response. J Biol Chem, 272: 6792-6798, 1997.

68. Ding XZ, Tsokos GC and Kiang JG: Overexpression of HSP70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kianse C activity. FASEB J, 12: 451-459, 1998.

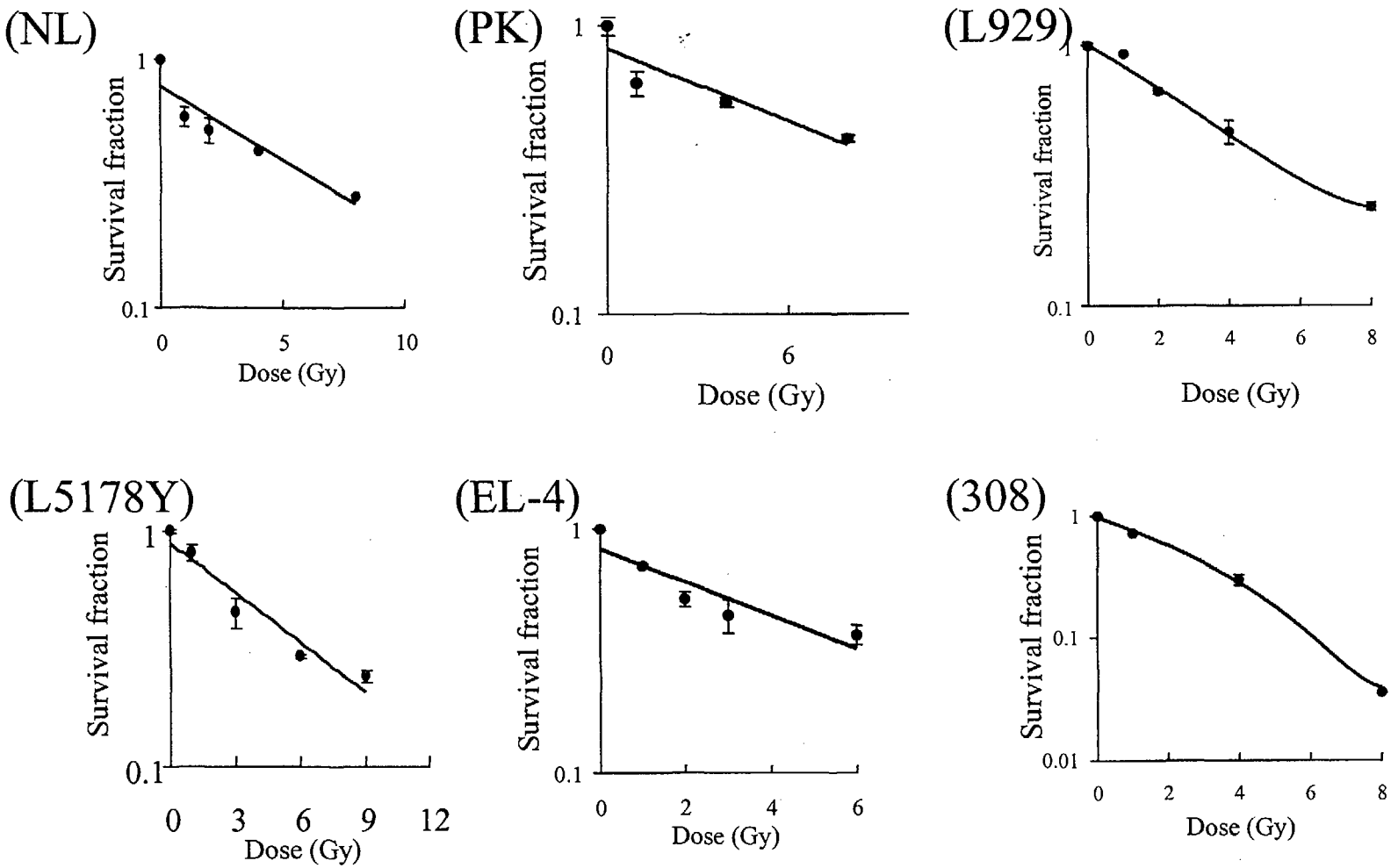


Fig. 1. Cell survival curves

Viable cells of NL, PK, L5178Y and EL-4 cells were counted by the trypan blue dye exclusion method at 24 hr after irradiation and those of L929 and 308 cells were counted by colony forming assay.

Fig. 2.

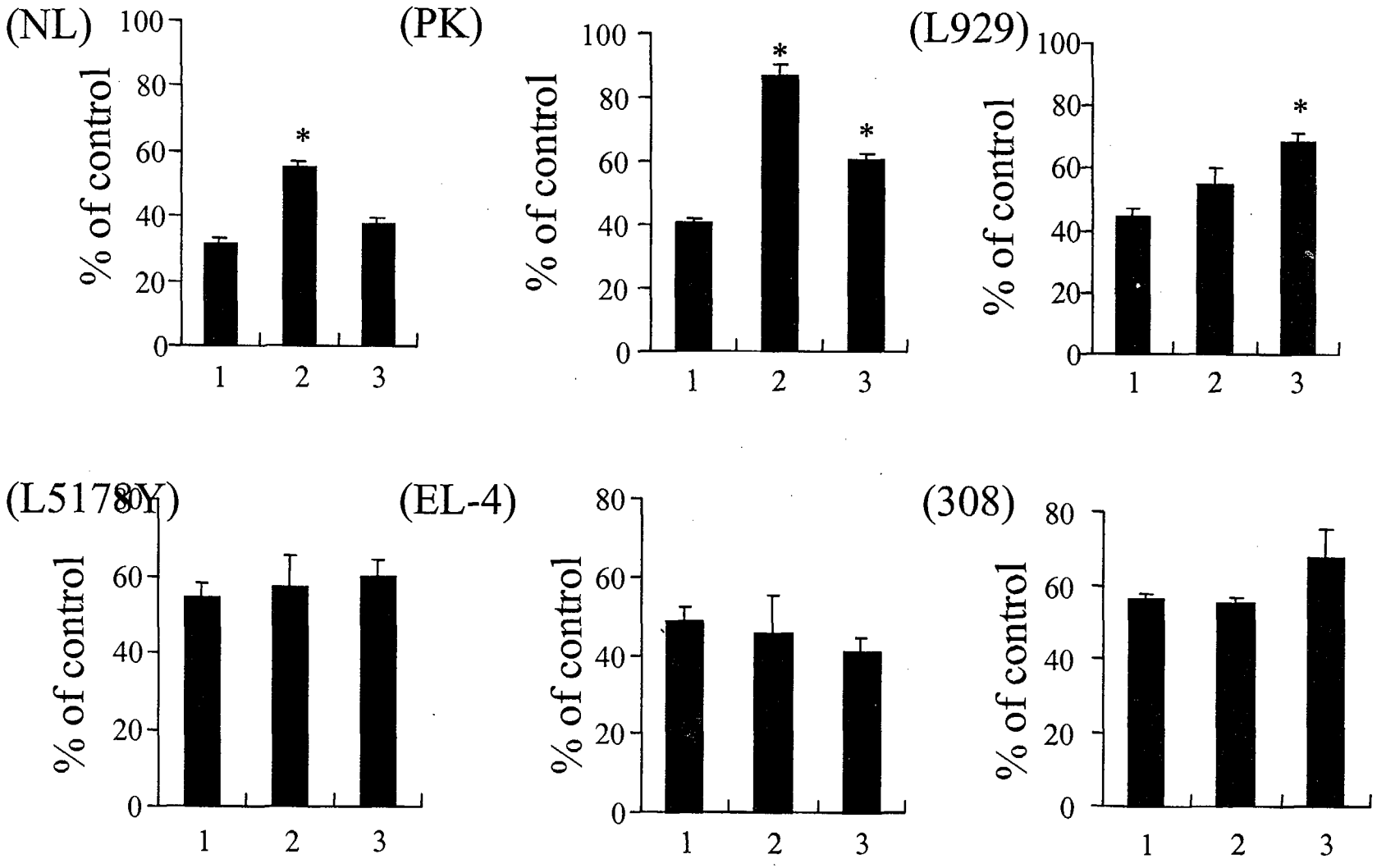


Fig. 2. Determination of adaptive response

Cells were irradiated to 0.01 Gy and after 4 or 7 hr, cells irradiated to high challenging doses of 2 Gy for NL, 8Gy for PK, 4 Gy for L929 and 3 Gy for L5278Y, EL-4 and 308. Viable NL, PK, L5178Y, and EL-4 cells were counted by the trypan blue dye exclusion method, while those of L929 and 308 were counted by colony forming assay. Cell viability was tested 24 hr after high-challenging dose irradiation. A significant difference was calculated from high-challenging dose only irradiated cells (*$p<0.05$). 1,high dose alone; 2, 4 hr interval between 0.01 Gy and high dose; 3, 7 hr interval between 0.01 Gy and high dose

Fig. 3.

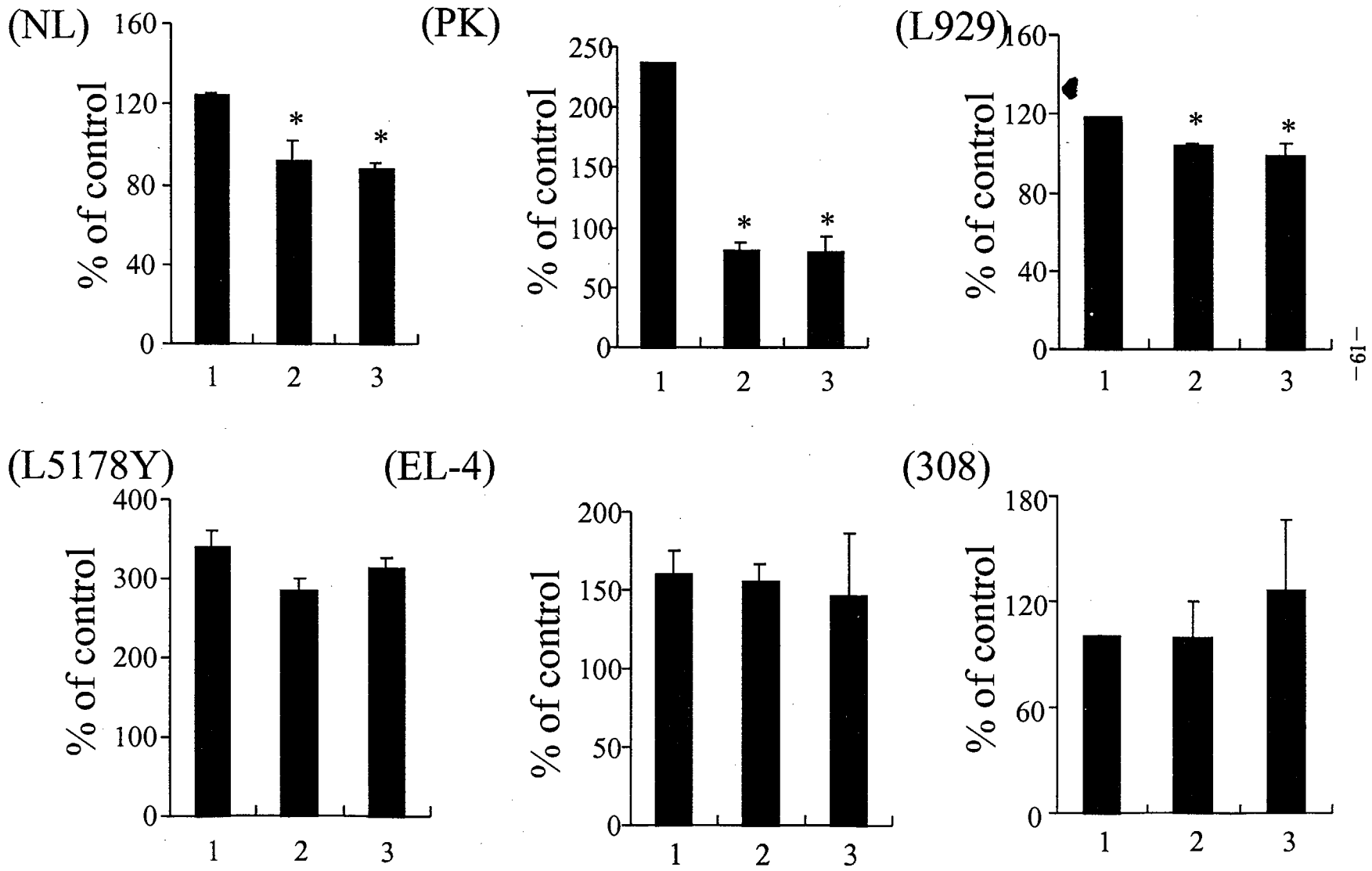

(NL)
(PK)
(L929)
(L5178Y)
(EL-4)
(308)
% of control
160
120
80
40
0
250
200
150
100
50
400
300
180
60
1
2
3
*

Fig. 3. Determination of apoptosis using sandwich enzyme immunoassay. Cells were irradiated to 0.01 Gy and after 4 or 7 hr, cells irradiated to high challenging doses of 2 Gy for NL, 8Gy for PK, 4 Gy for L929 and 3 Gy for L5278Y, EL-4 and 308. Apoptosis induction was detected using sandwich enzyme immunoassay at 24 hr after high challenging dose irradiation. A significant difference was calculated from high-challenging dose only irradiated cells (*$p<0.05$). 1,high dose alone; 2, 4 hr interval between 0.01 Gy and high dose; 3, 7 hr interval between 0.01 Gy and high dose

Fig. 4.

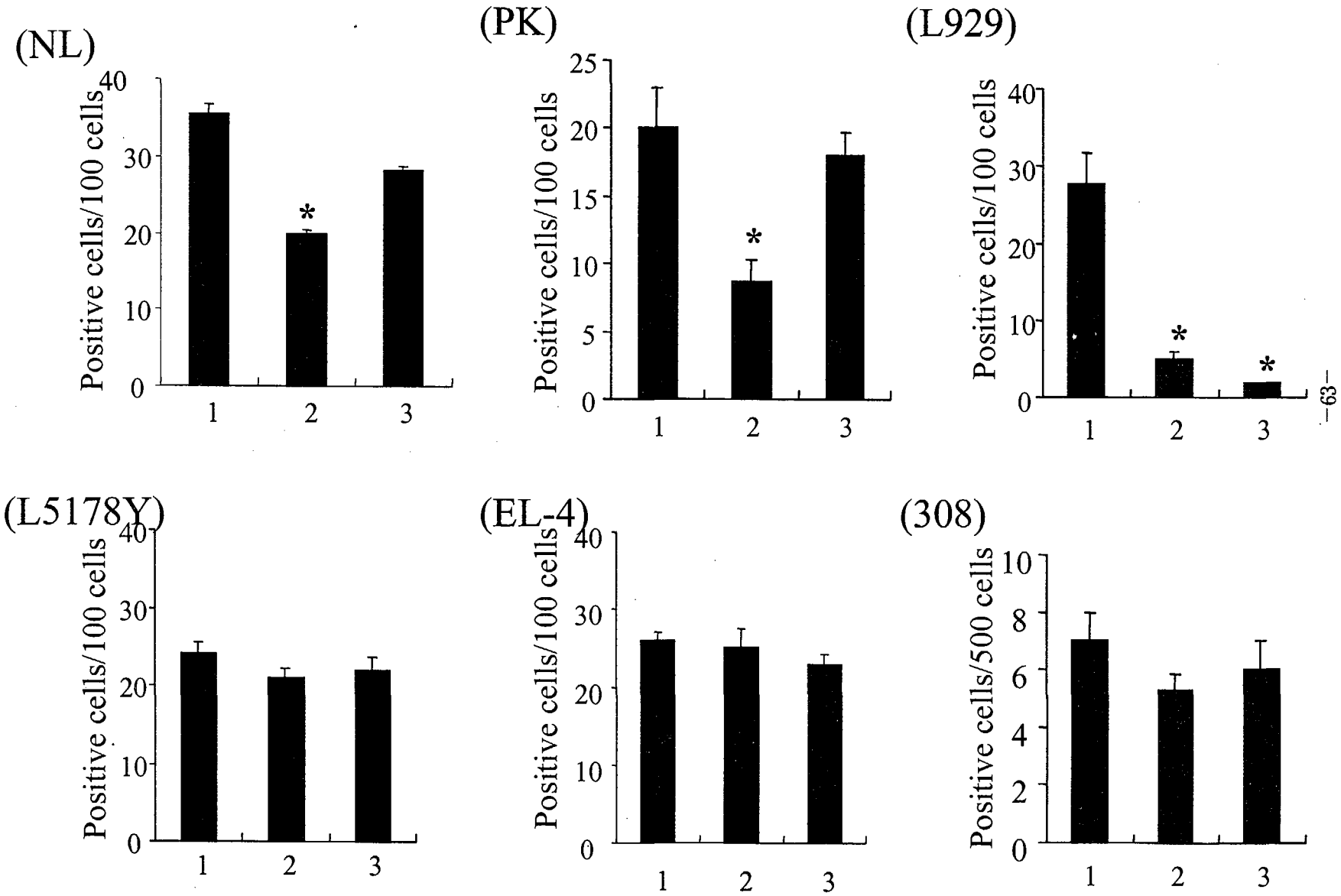
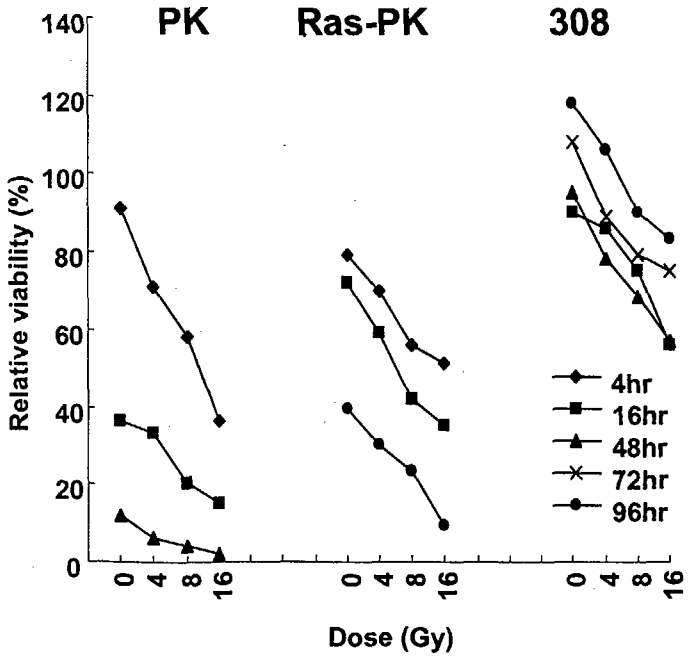

(NL)
Positive cells/100 cells
40
30
20
10
0
*
1
2
3
(PK)
Positive cells/100 cells
25
20
15
10
5
0
*
1
2
3
(L929)
Positive cells/100 cells
40
30
20
10
0
*
*
1
2
3
(L5178Y)
Positive cells/100 cells
40
30
20
10
0
1
2
3
(EL-4)
Positive cells/100 cells
40
30
20
10
0
1
2
3
(308)
Positive cells/500 cells
10
8
6
4
2
0
1
2
3

Fig. 4. Determination of apoptosis using TUNRL assay.

Cells were irradiated to 0.01 Gy and after 4 or 7 hr, cells irradiated to high challenging doses of 2 Gy for NL, 8Gy for PK, 4 Gy for L929 and 3 Gy for L5278Y, EL-4 and 308. Apoptosis induction was detected using TUNEL assay at 24 hr after high challenging dose irradiation. A significant difference was calculated from high-challenging dose only irradiated cells (*$p<0.05$). 1,high dose alone; 2, 4 hr interval between 0.01 Gy and high dose; 3, 7 hr interval between 0.01 Gy and high dose

Fig. 5A.

a.


PK
Ras-PK
308
Relative viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
4
8
16
Dose (Gy)
4hr
16hr
48hr
72hr
96hr

b.

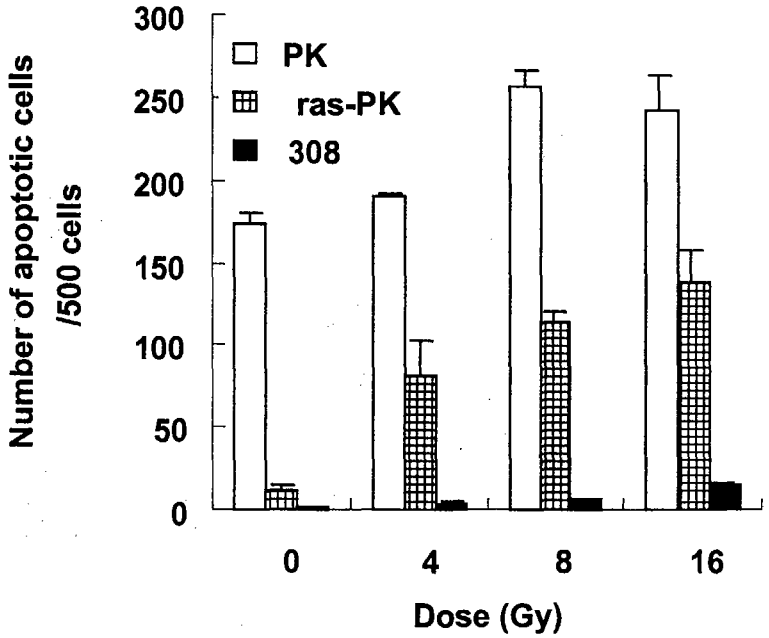

Number of apoptotic cells
/500 cells
300
250
200
150
100
50
0
PK
ras-PK
308
0
4
8
16
Dose (Gy)

Fig. 5B

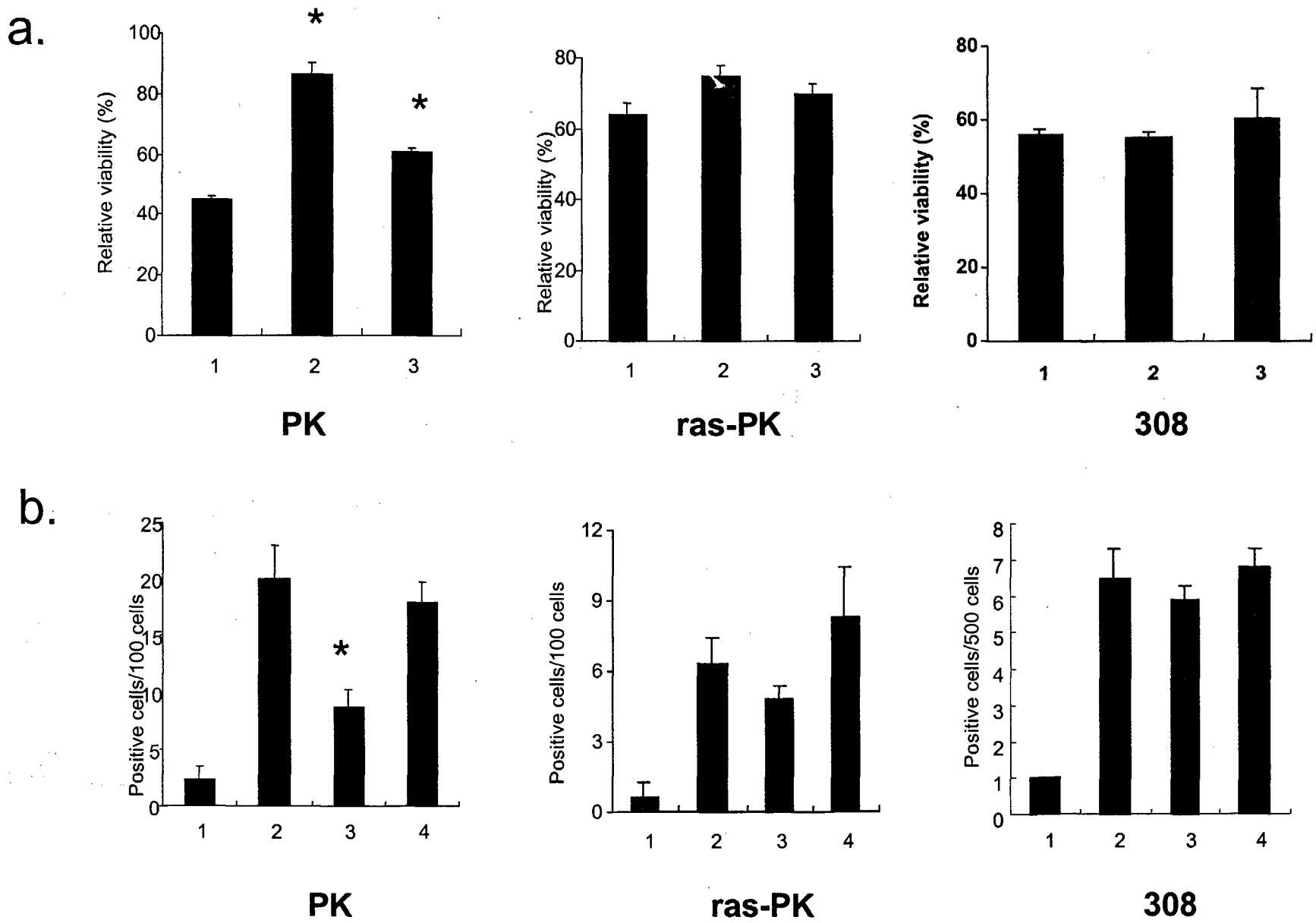

a.
Relative viability (%)
100
80
60
40
20
0
*
*
1
2
3
PK
Relative viability (%)
80
60
40
20
0
1
2
3
ras-PK
Relative viability (%)
80
60
40
20
0
1
2
3
308
b.
Positive cells/100 cells
25
20
15
10
5
0
*
1
2
3
4
PK
Positive cells/100 cells
12
9
6
3
0
1
2
3
4
ras-PK
Positive cells/500 cells
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1
2
3
4
308

Fig. 5C

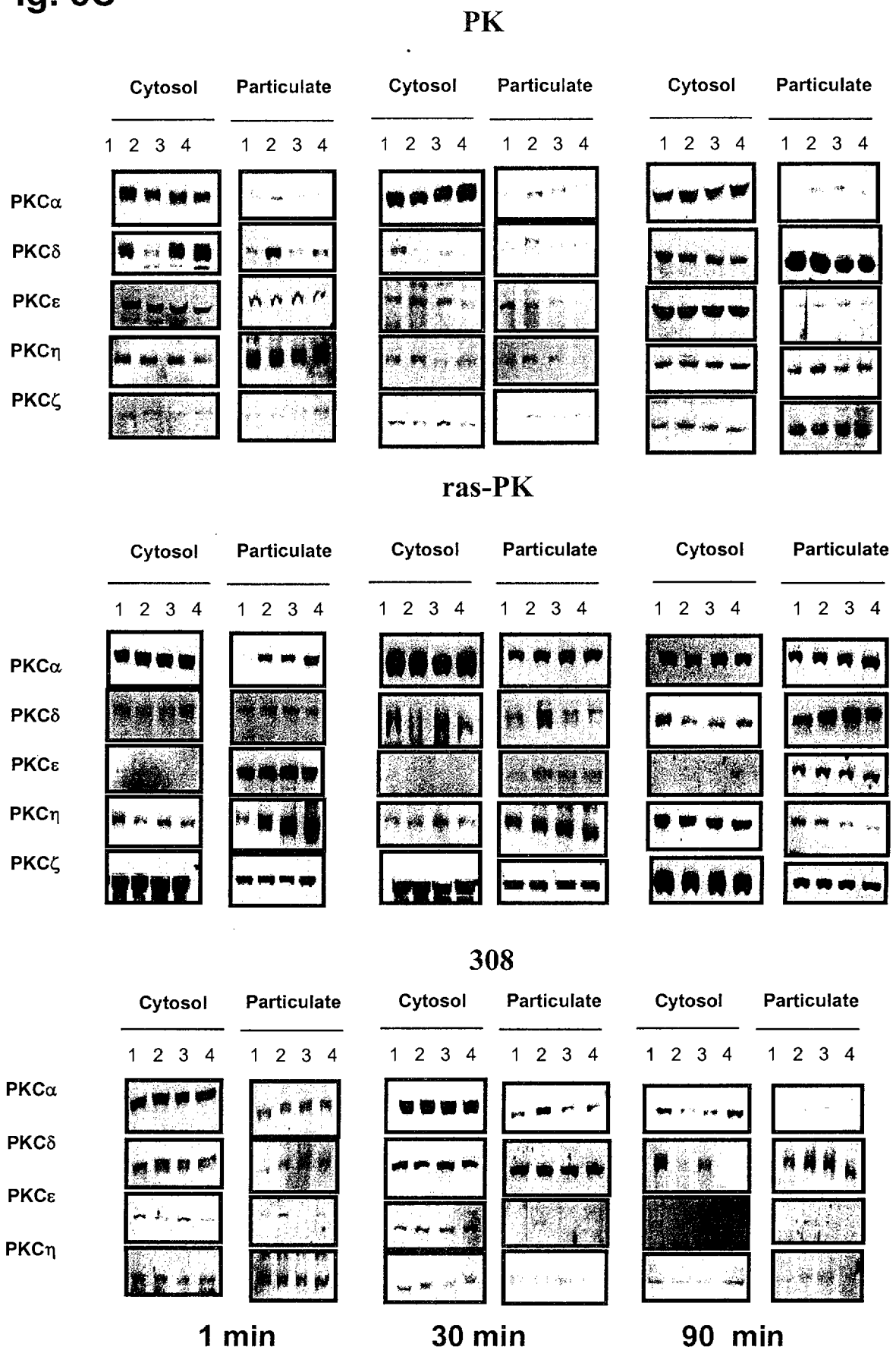

PK
Cytosol
Particulate
1 2 3 4
PKCα
PKCδ
PKCε
PKCη
PKCζ
ras-PK
308
1 min
30 min
90 min

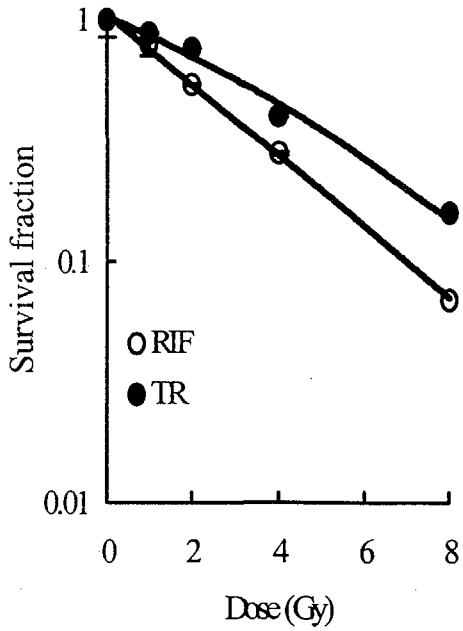
Fig. 5. Adaptive Response was Differently Induced Depending on the Carcinogenesis Stage of Epidermal Keratinocytes.

Aa, Survival curves, *Ab*. Determination of apoptosis by TUNELassay,

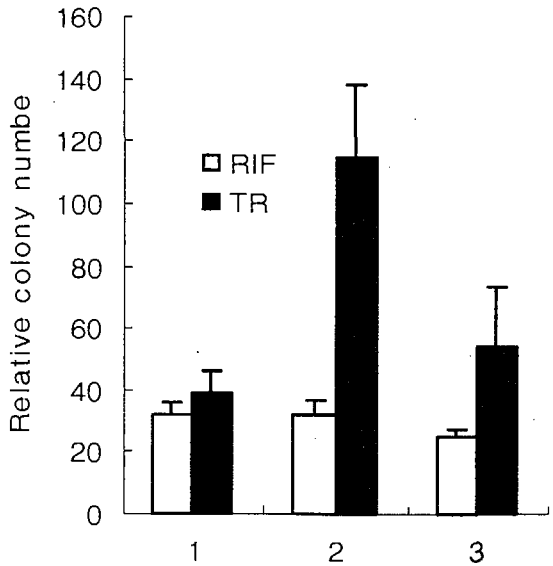
B, Detection of adaptive response by viability (a) and TUNEL assay (b)

C, Subcellular distribution of PKC after gamma-ray.

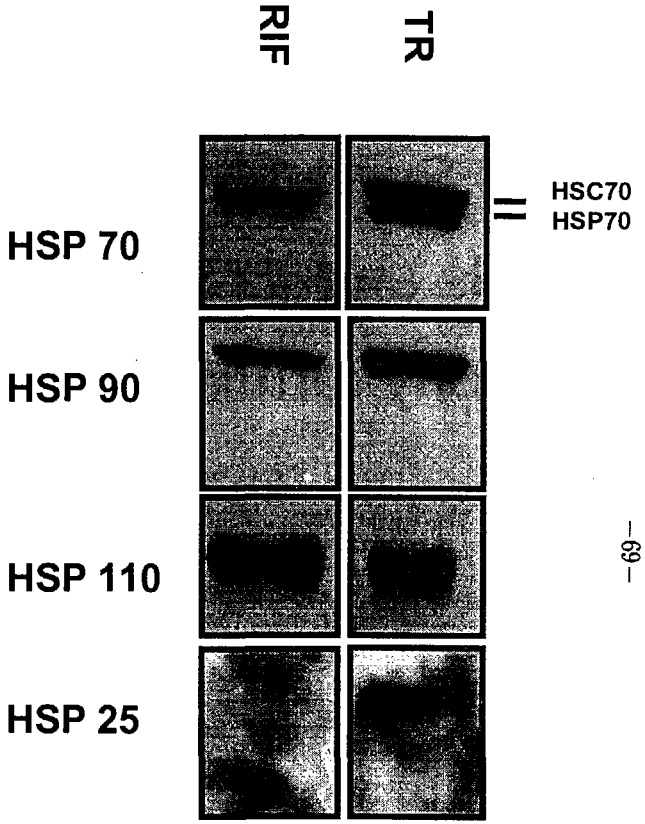
Fig. 6


Survival fraction
1
0.1
0.01
0
2
4
6
8
Dose (Gy)
RIF
TR

(A)


Relative colony numbe
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1
2
3
RIF
TR

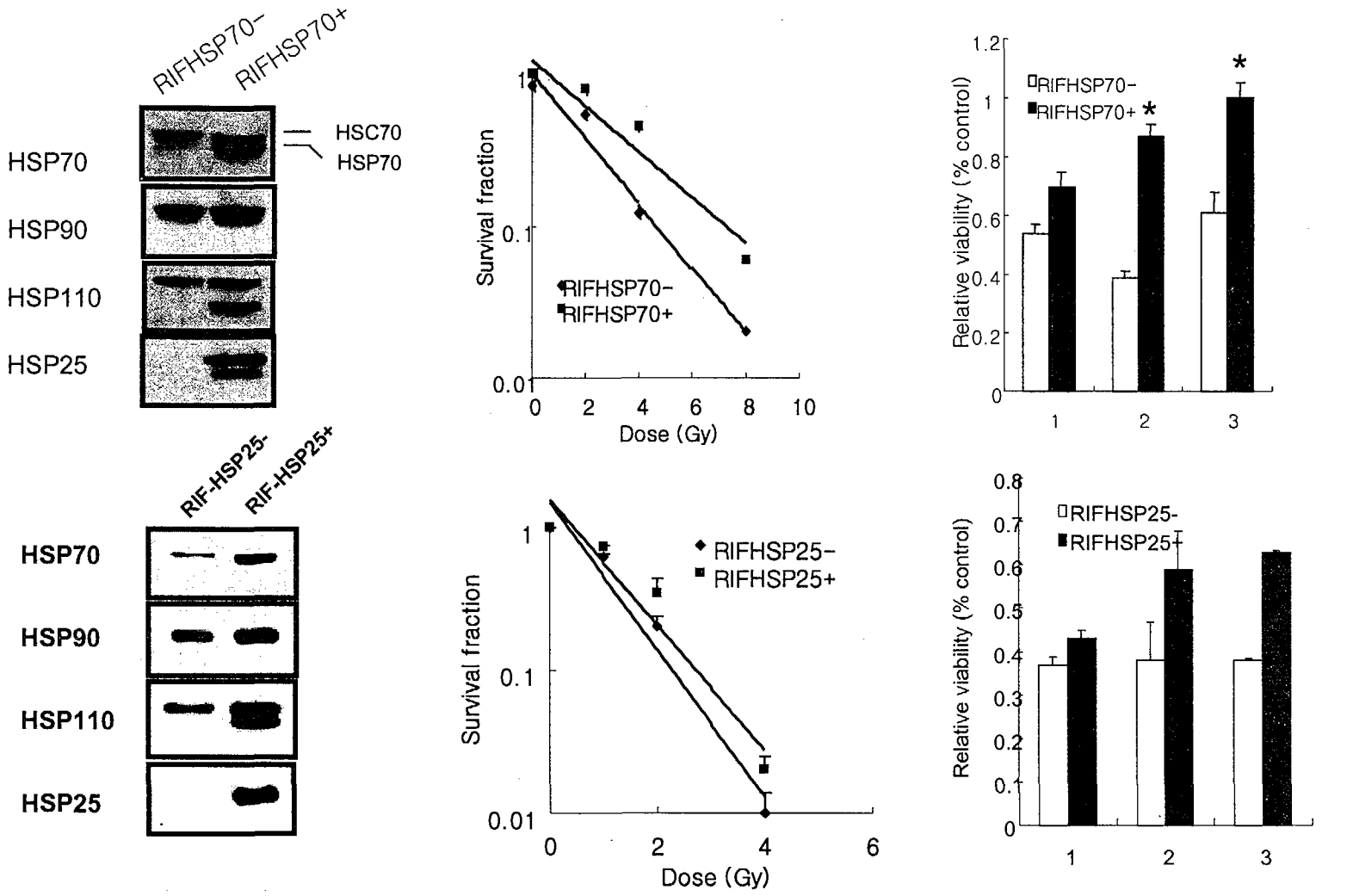
(B)


RIF
TR
HSP 70
HSP 90
HSP 110
HSP 25
HSC70
HSP70

(C)

Fig. 6. HSP25 and inducible HSP70 involve in adaptive response by preirradiation to low dose (1 cGy) radiation

(A) Survival fraction of radiation induced fibrosarcoma (RIF) cells and its thermoresistant clone (TR) was obtained by colony forming assay after irradiation. **(B)** Induction of adaptive response was observed using clonogenic survival assay. Cells were irradiated to 0.01 Gy an after 4 or 7 hr, high challenging dose of 4 Gy was administered. 1,4 Gy alone; 2, 4 hr interval between 0.01 Gy and 4 Gy; 3, 7 hr interval between 0.01 Gy and 4 Gy **(C)** Protein extracts of RIF and TR cells were prepared and assessed by western blot analysis for HSP25, 70, 90 and110.



1, high dose; 2, adaptive (4hr); 3, adaptive (7hr)

Fig. 7. Overexpression of HSP25 or HSP70 in RIF cells recovered adaptive response.

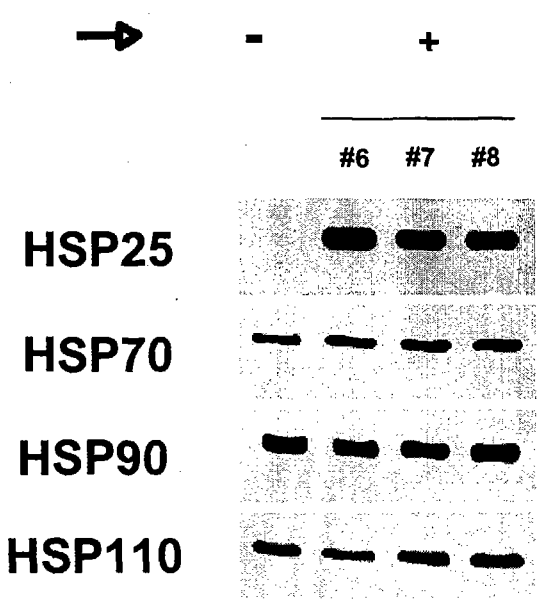
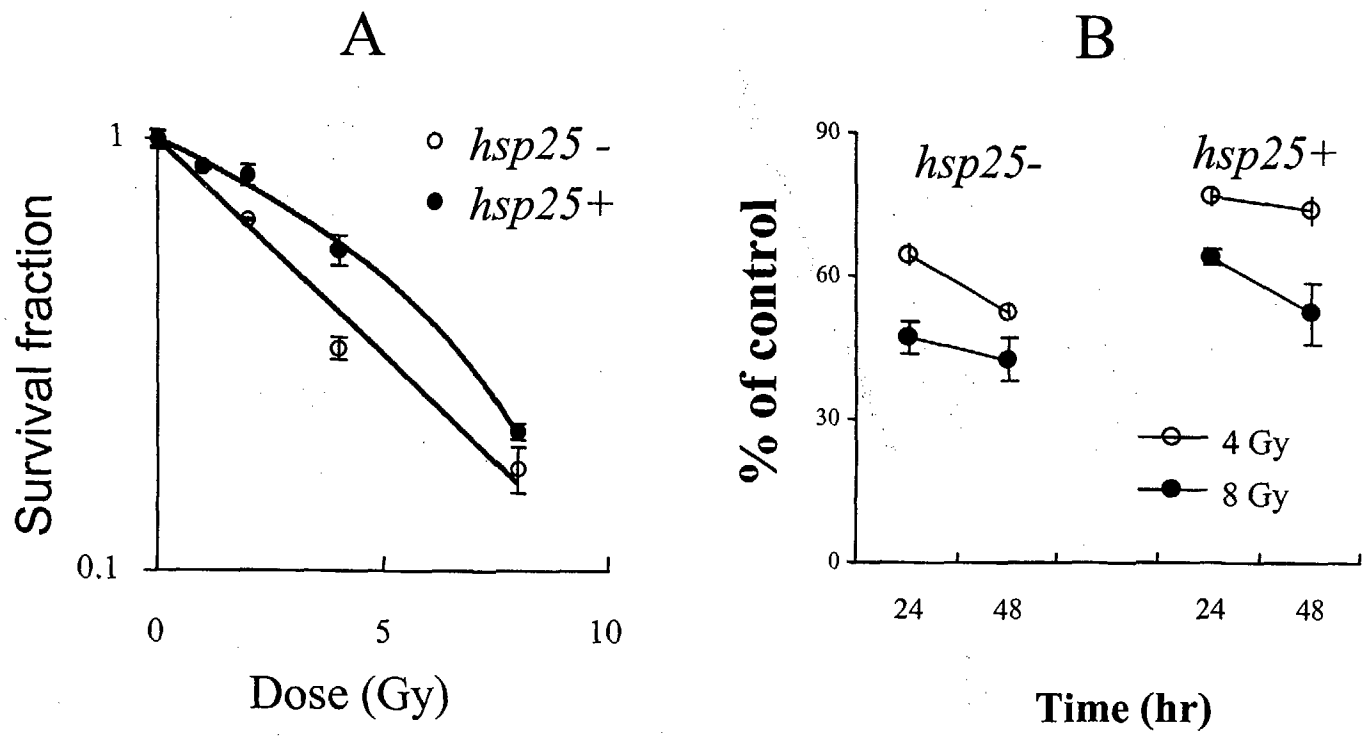
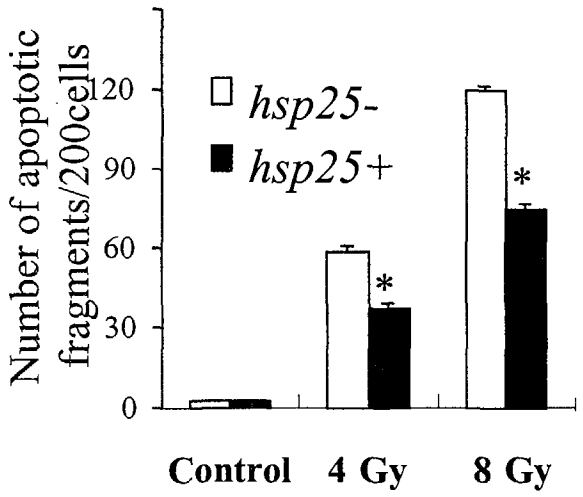


Fig. 8. Constitutive levels of HSPs

Fig. 9


A
B
Survival fraction
1
0.1
0
5
10
Dose (Gy)
hsp25 -
hsp25+
% of control
90
60
30
0
hsp25-
hsp25+
4 Gy
8 Gy
24
48
24
48
Time (hr)

C


Number of apoptotic fragments/200cells
120
90
60
30
0
hsp25-
hsp25+
*
*
Control
4 Gy
8 Gy

D

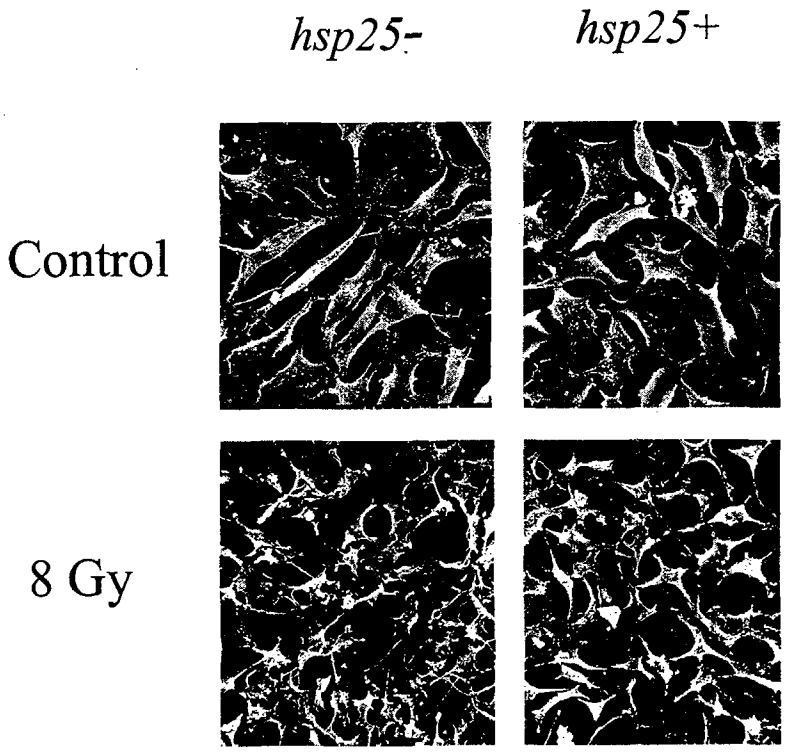

hsp25-
hsp25+
Control
8 Gy

Fig. 9. Determination of radioresistance

Surviving fraction of vector control and hsp25-transfected cells was obtained by colony forming assay **(A)** and counting using trypan blue dye exclusion method **(B)** after irradaiation *$p<0.05$ versus vector control cells **(C)** comparison of DNA fragmentation measured by Hoechst 33258 staining 48 hr after irradiation **(D)** comparison of morphological changes by irradiation with scanning electron microscopy (SEM), x350

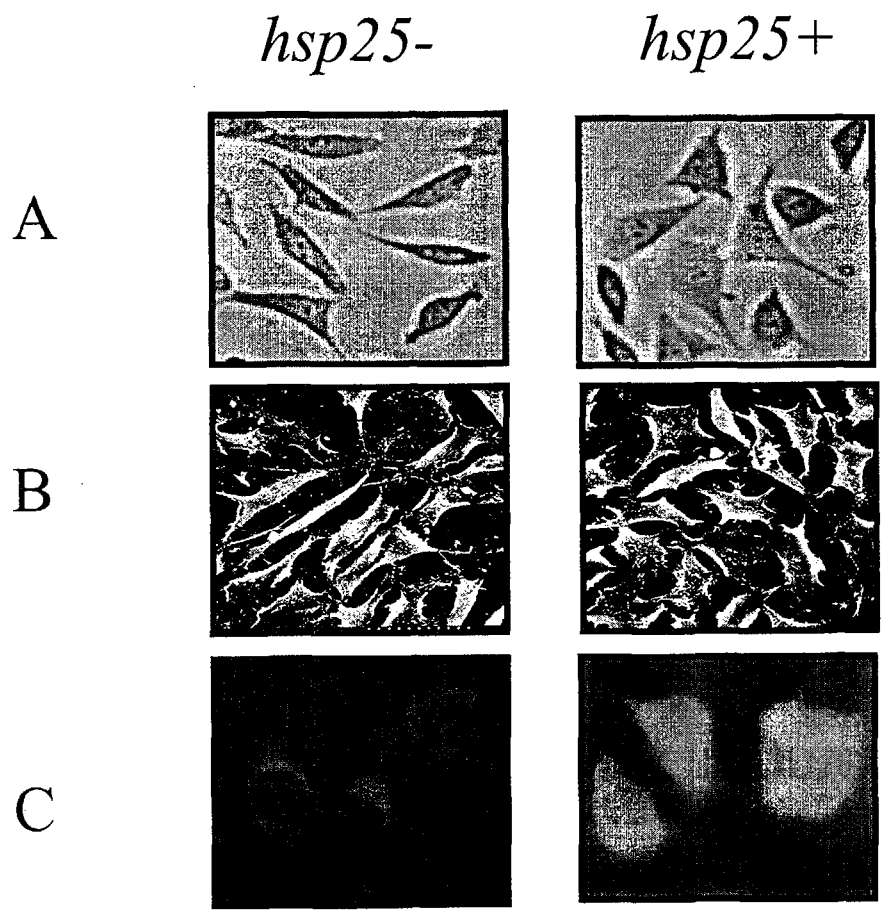


Fig. 10. Comparison of morphology in vector control and hsp25-transfected cells

A, light microscopy; **B**, scanning electron microscopy (SEM), x 800; **C**, immunofluorescence staining of F-actin

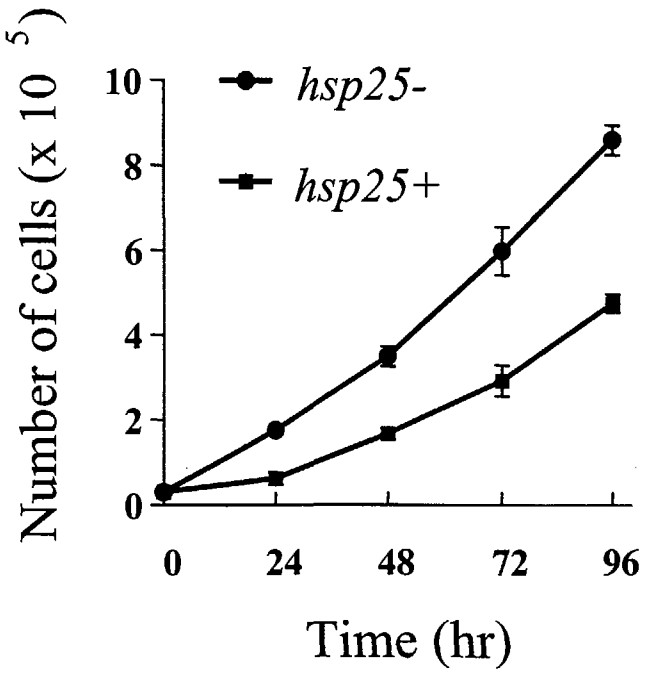


Fig.11. Growth curve of vector control and hsp25-transfected cells

Fig. 12A.

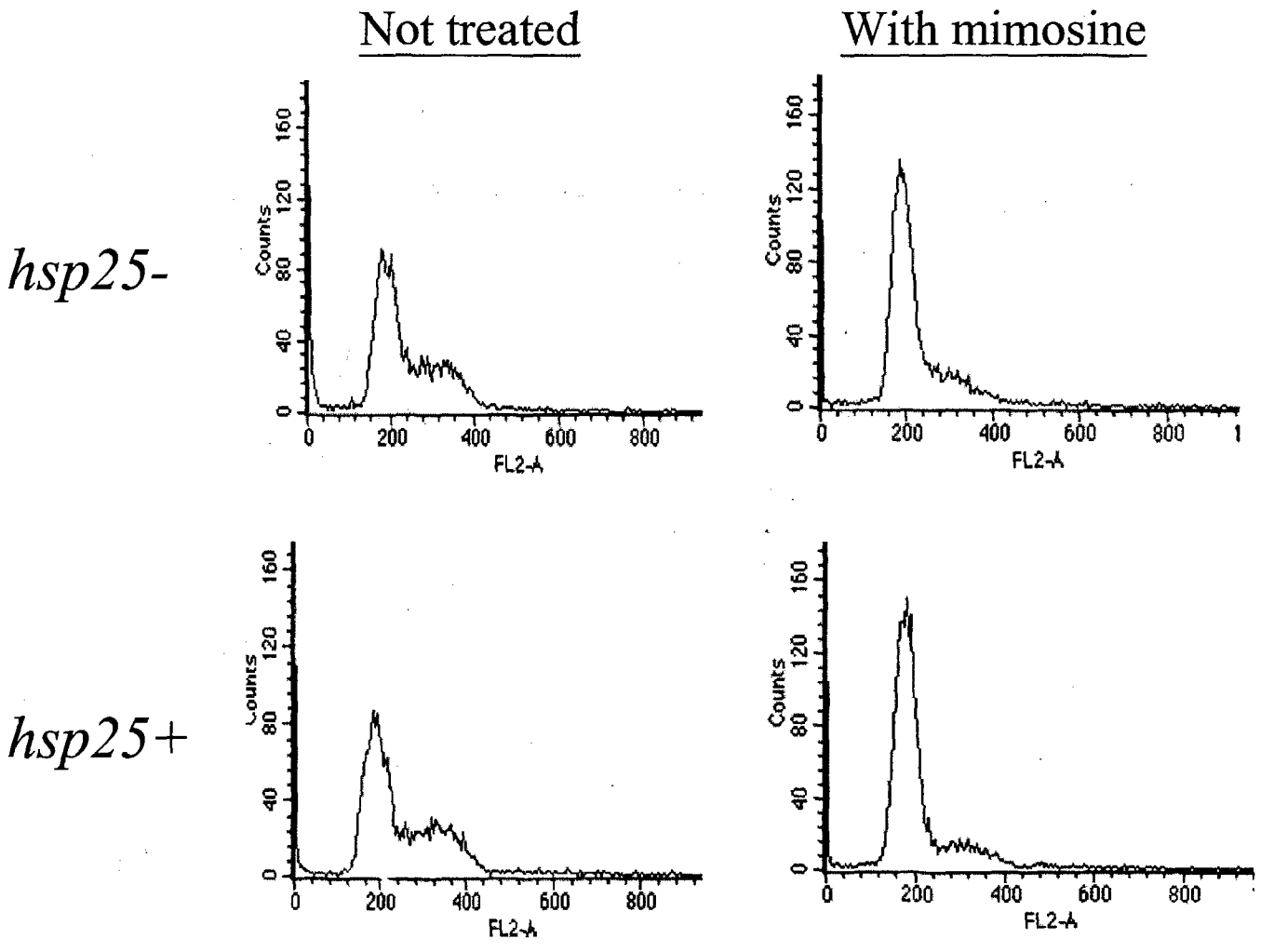

Not treated
With mimosine
hsp25-
hsp25+
Counts
FL2-A
0
40
80
120
160
200
400
600
800

Fig. 12B.

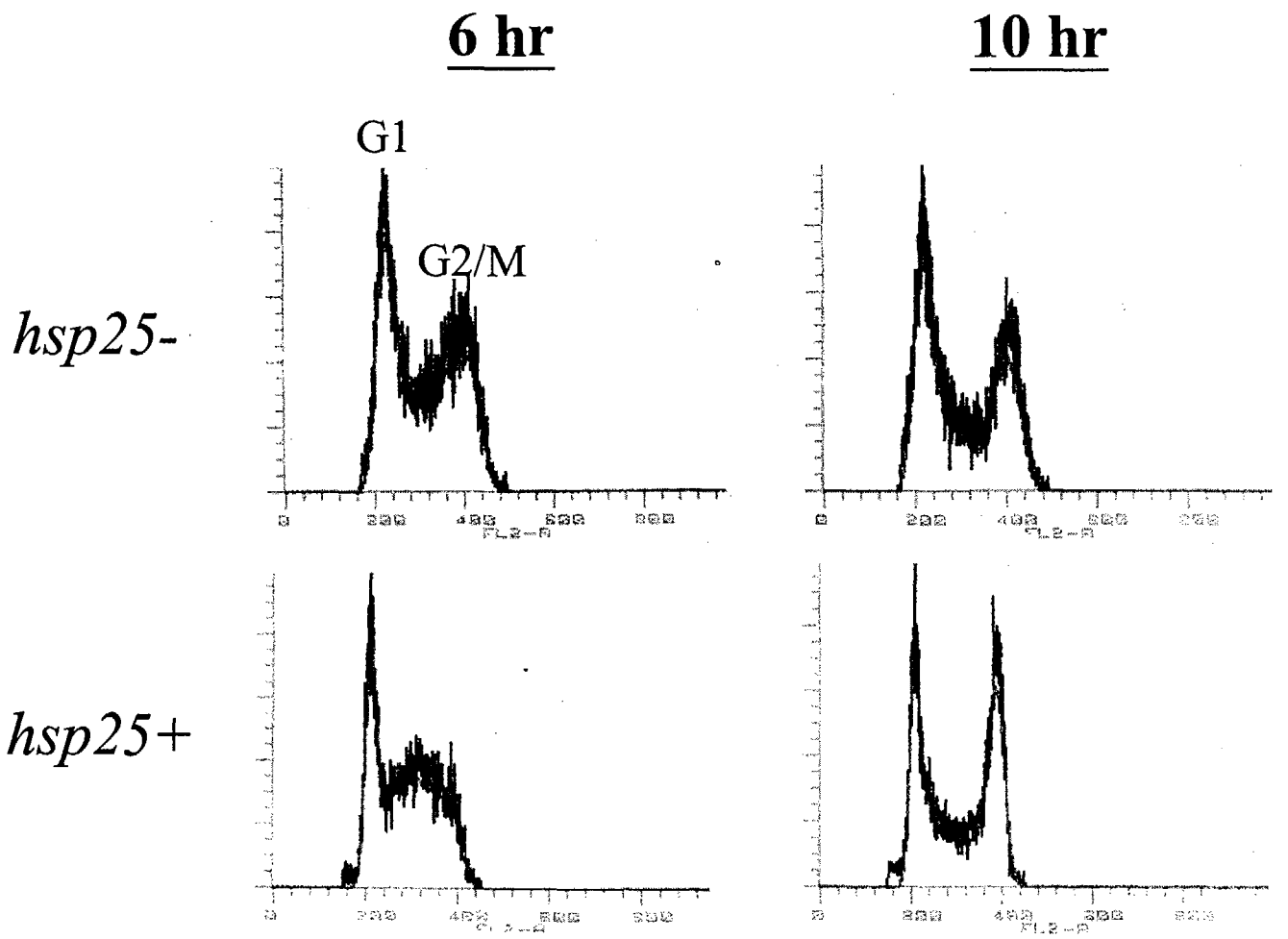


Fig. 12. Cell cycle distribution after G1 phase arrest by mimosine treatment

Cells were preincubated 20 hr with 400 uM mimosine and havested following incubation. **A,** synchronization with mimosine in vector control and hsp25 transfected cells; **B,** cell cycle distribution at 6 and 10 hr following release from mimosine treatment

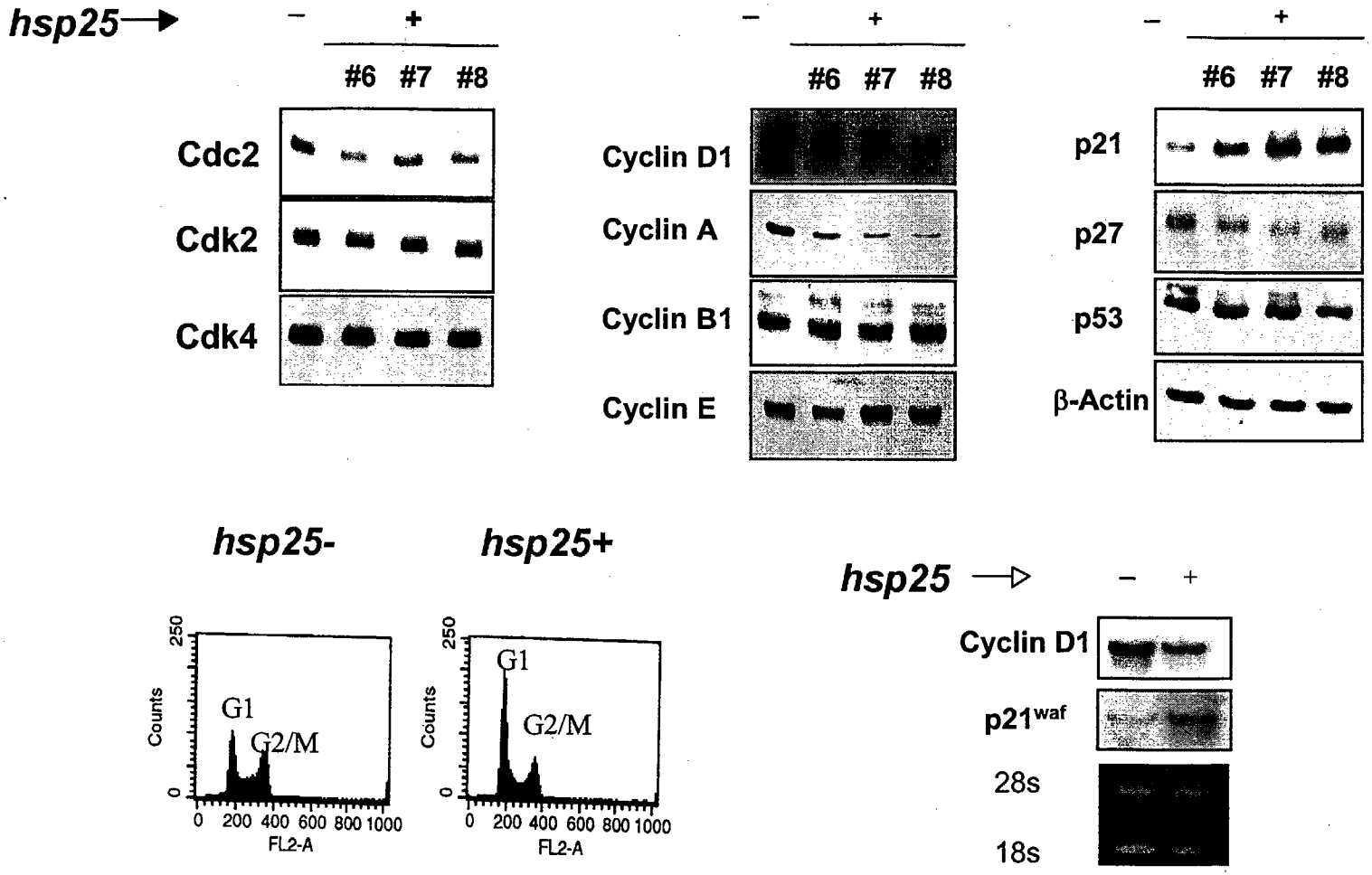


Fig. 13. Effect of HSP25 on the expression of cell-cycle related proteins

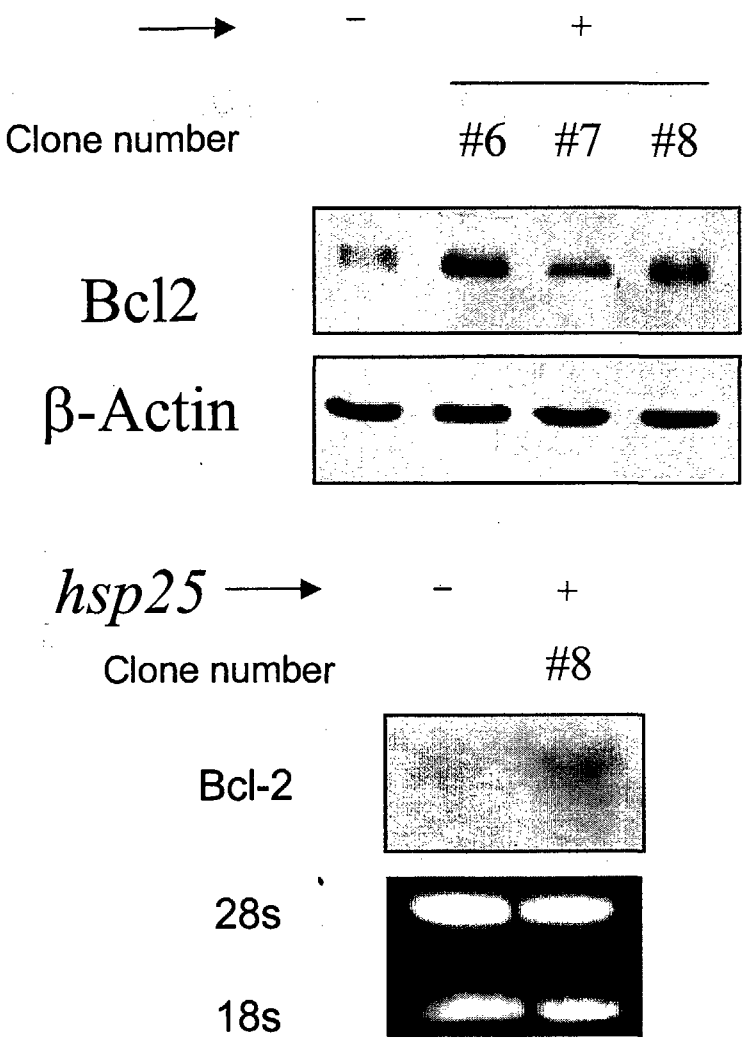


Fig. 14. Effect of HSP25 on the level of Bcl-2

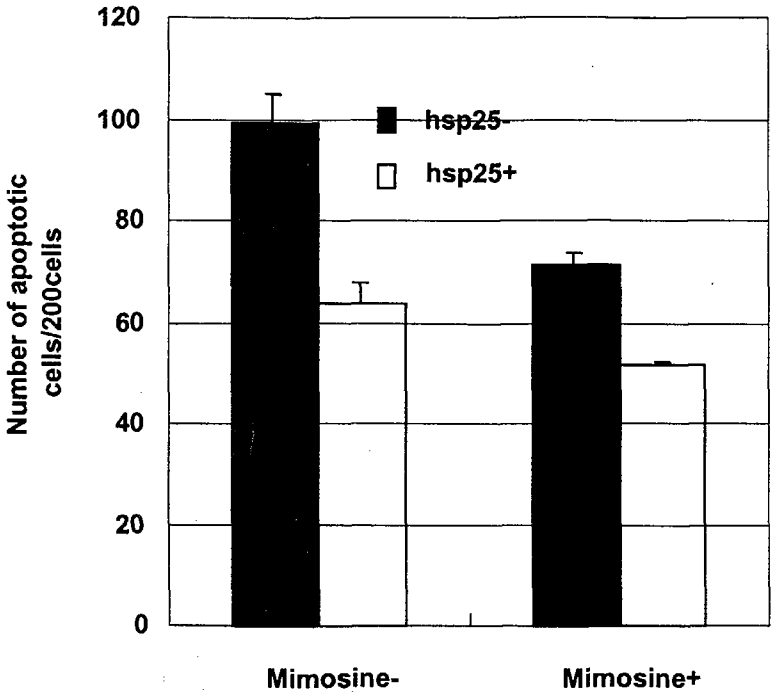


Fig. 15. Inhibition of apoptosis by HSP25 attenuates after cell cycle arrest by mimosine treatment

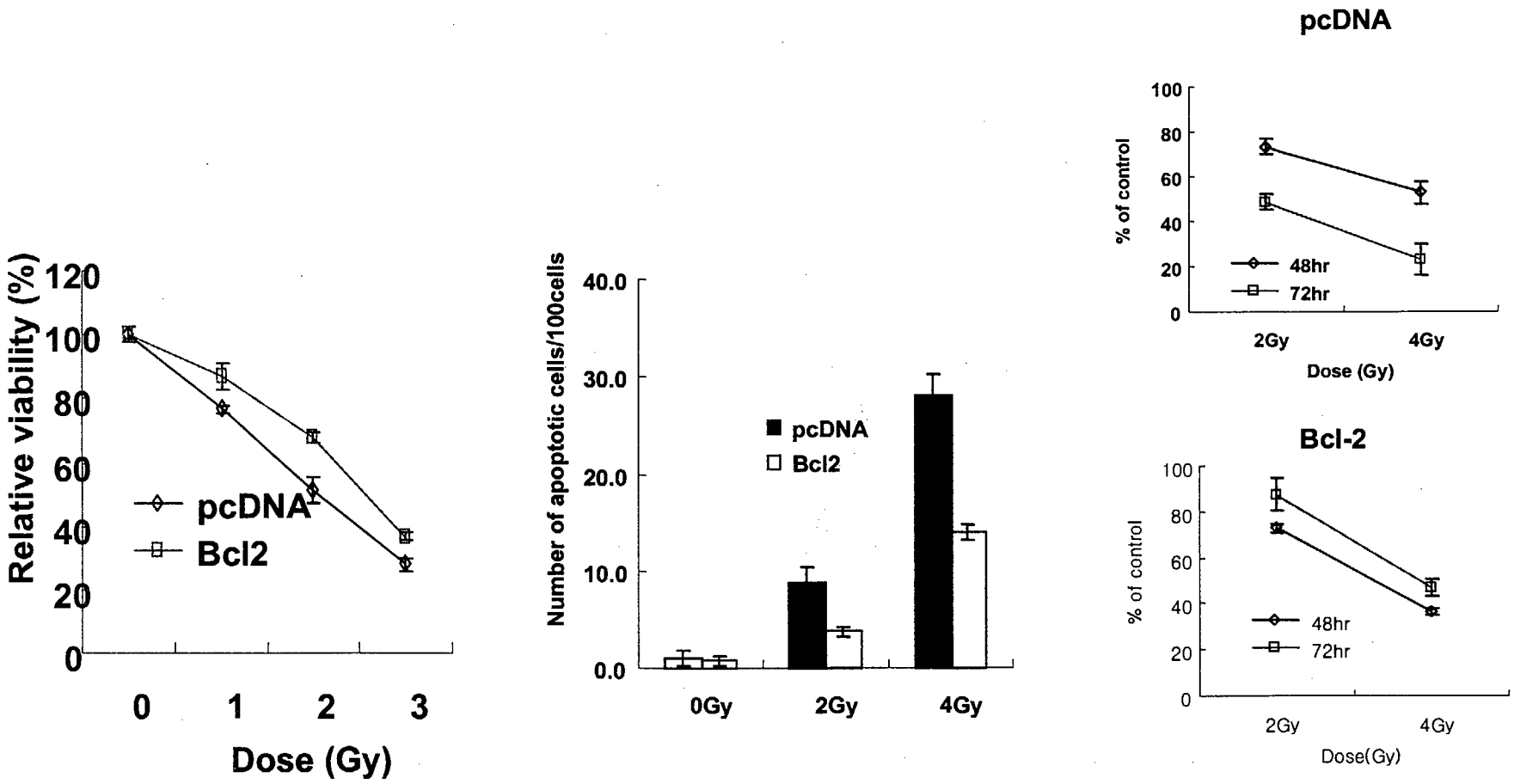
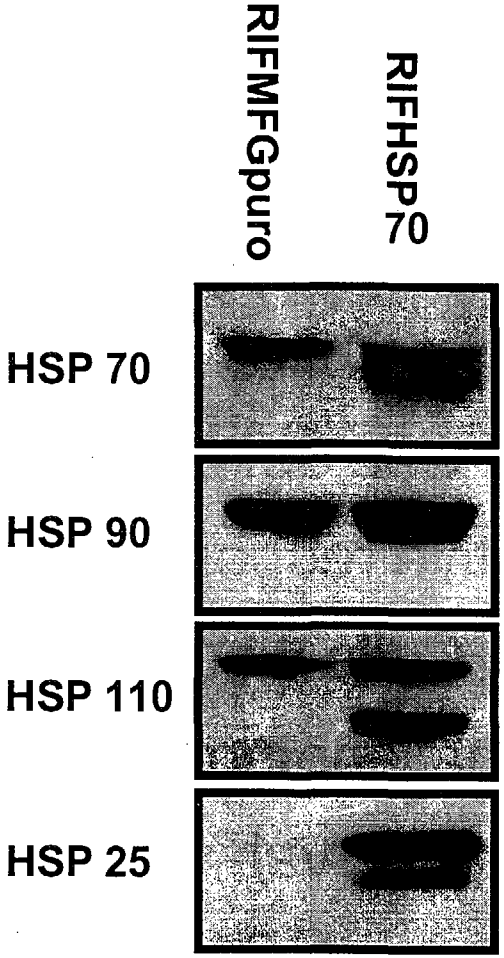
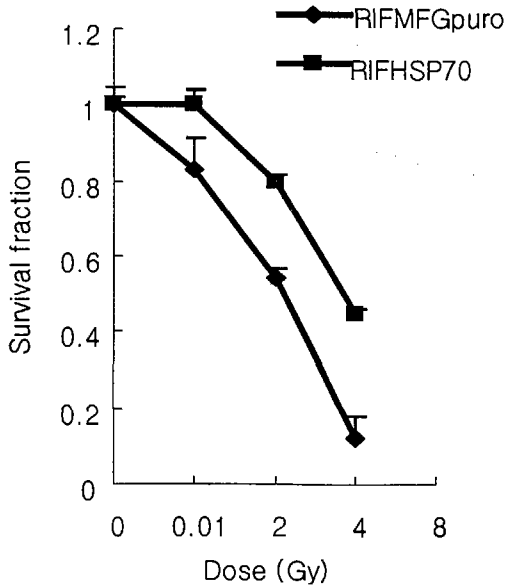


Fig. 16. Overexpression of Bcl-2 is responsible for radioresistance

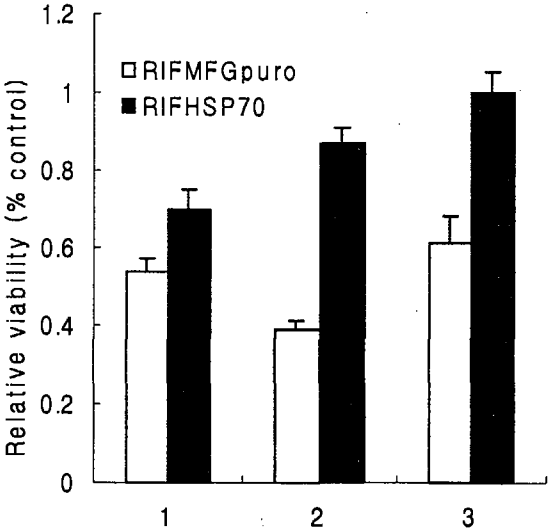
Fig. 17


RIFMFGpuro
RIFHSP70
HSP 70
HSP 90
HSP 110
HSP 25

(A)


RIFMFGpuro
RIFHSP70
Survival fraction
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
0.01
2
4
8
Dose (Gy)

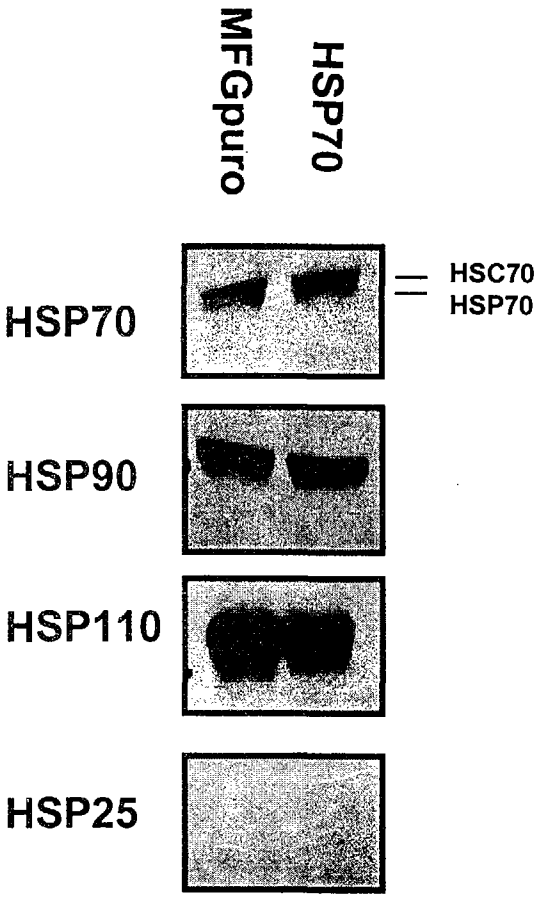
(B)


RIFMFGpuro
RIFHSP70
Relative viability (% control)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
3

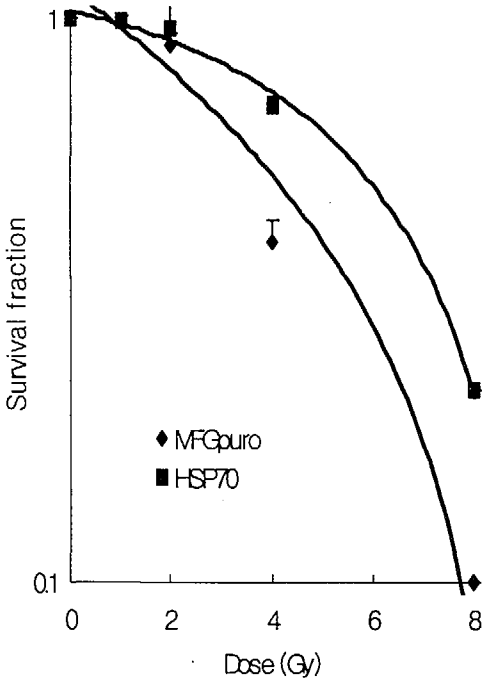
(C)

Fig. 17. Radioresistance and induction of adaptive response in inducible HSP70 transfected RIF cells (A) Protein extracts of vector control (RIFMFGpuro) and inducible HSP70 transfected cells (RIFHSP70) were prepared and assessed by western blot analysis for HSP25, 70, 90, and 110. **(B)** Survival fraction of RIFpuro and RIFHSP70 was obtained by colony forming assay. **(C)** Induction of adaptive response was observed using clonogenic survival assay. Cells were irradiated to 0.01 Gy and after 4 or 7 hr, high challenging dose of 4 Gy was administered. 1,4 Gy alone; 2, 4 hr interval between 0.01 Gy and 4 Gy; 3, 7 hr interval between 0.01 Gy and 4 Gy

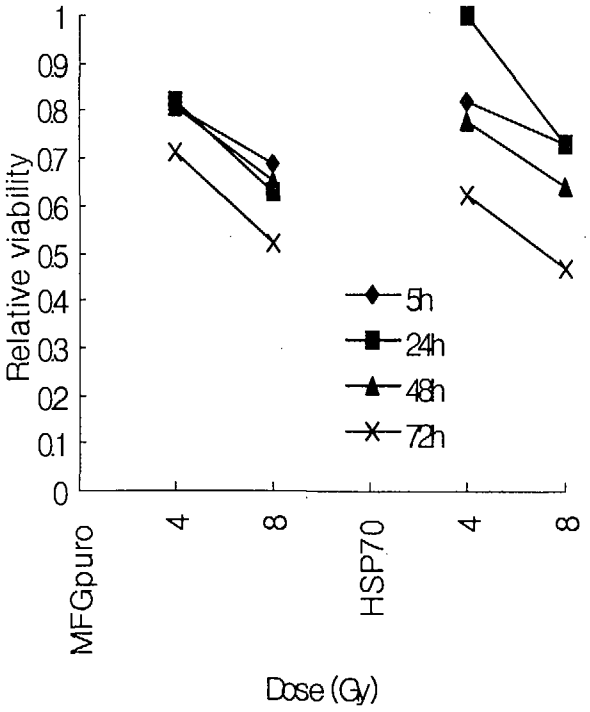
Fig. 18


MFGpuro
HSP70
HSP70
HSP90
HSP110
HSP25
HSC70
HSP70

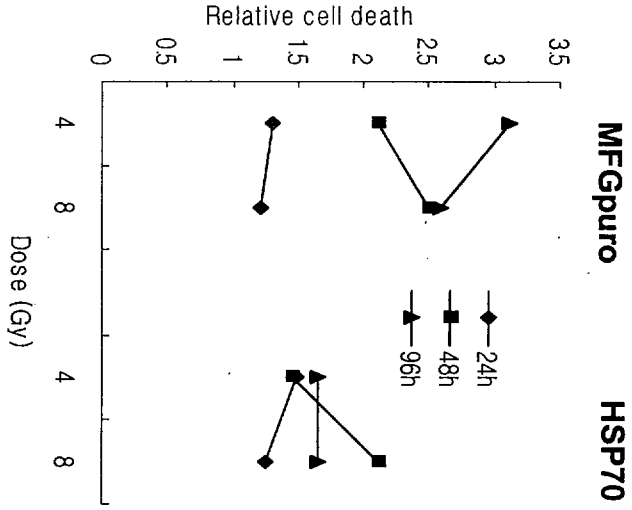
(A)


Survival fraction
1
0.1
0
2
4
6
8
Dose (Gy)
MFGpuro
HSP70

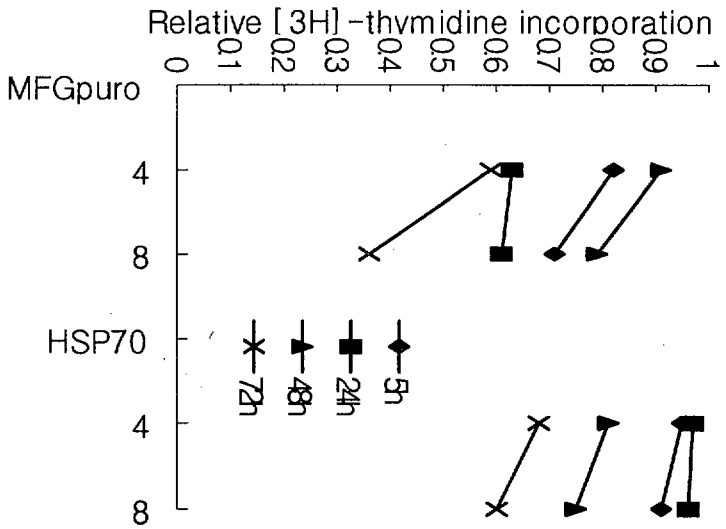
(B)


Relative viability
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
MFGpuro
4
8
HSP70
4
8
Dose (Gy)
5h
24h
48h
72h

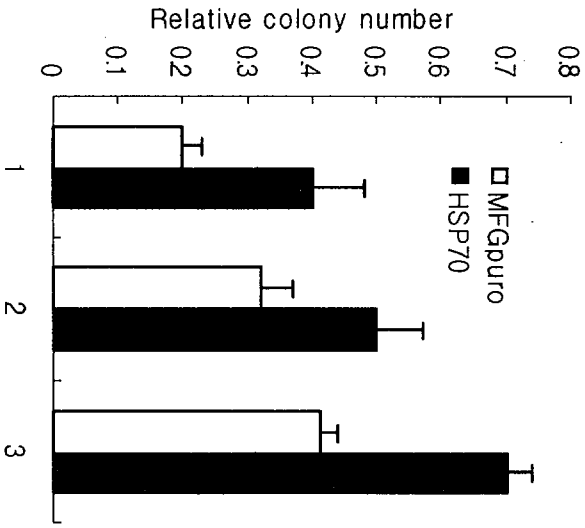
(C)


MFGpuro
HSP70
Relative cell death
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24h
48h
96h
4
8
Dose (Gy)
4
8

(D)


Relative [3H]-thymidine incorporation
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
MFGpuro
4
8
HSP70
4
8
5h
24h
48h
72h
Dose(Gy)

(E)


Relative colony number
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
MFGpuro
HSP70
1
2
3

(F)

Fig. 18. Inducible HSP70 acquired radioresistance

(A) Protein extracts of vector control (MFGpuro) and inducible HSP70 transfected NIH3T3 (HSP70) were prepared and assessed by western blot analysis for HSp25, 70, 90 and 110. **(B)** Viability was obtained by colony forming assay. **(C)** Counting using trypan blue dye exclusion method. **(D)** ELISA cell detection kit **(E)** [3H]-thymidine incoporation after irradiation. **(F)** Induction of adaptive response was observed using clonogenic survival assay. Cells were irradiated to 0.01 Gy an after 4 or 7 hr, high challenging dose of 4 Gy was administered. 1,4 Gy alone; 2, 4 hr interval between 0.01 Gy and 4 Gy; 3, 7 hr interval between 0.01 Gy and 4 Gy

Fig. 19a

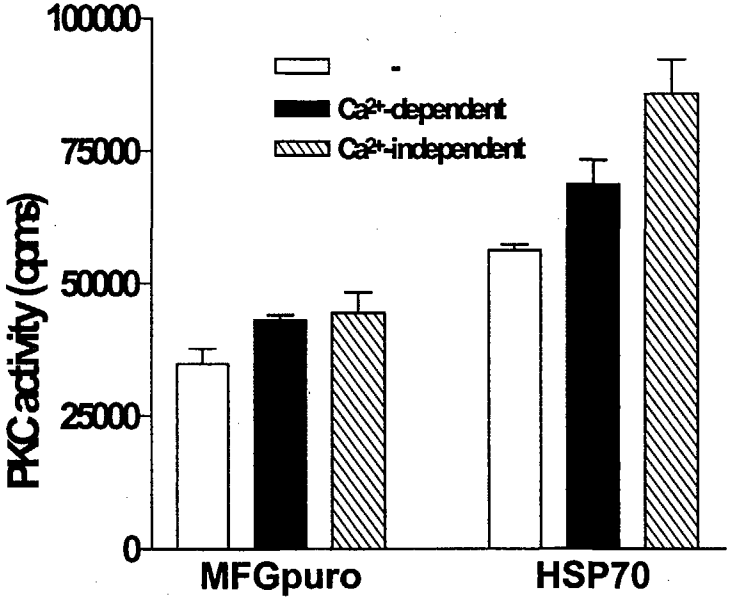
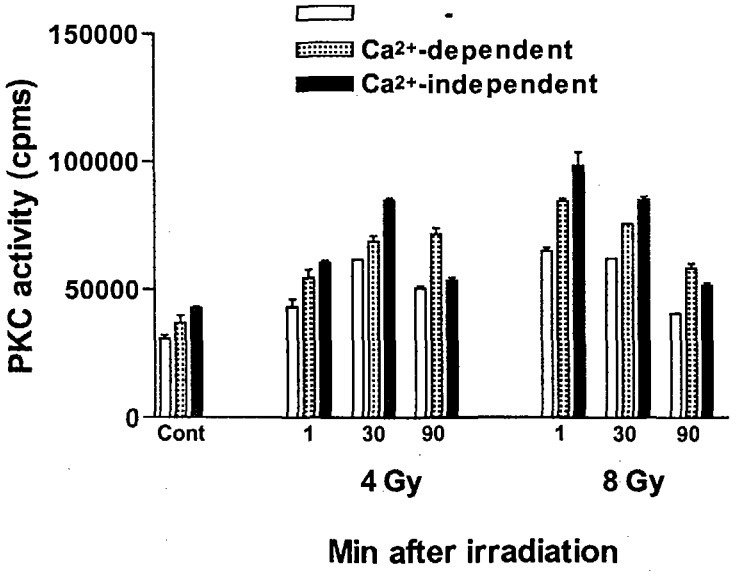
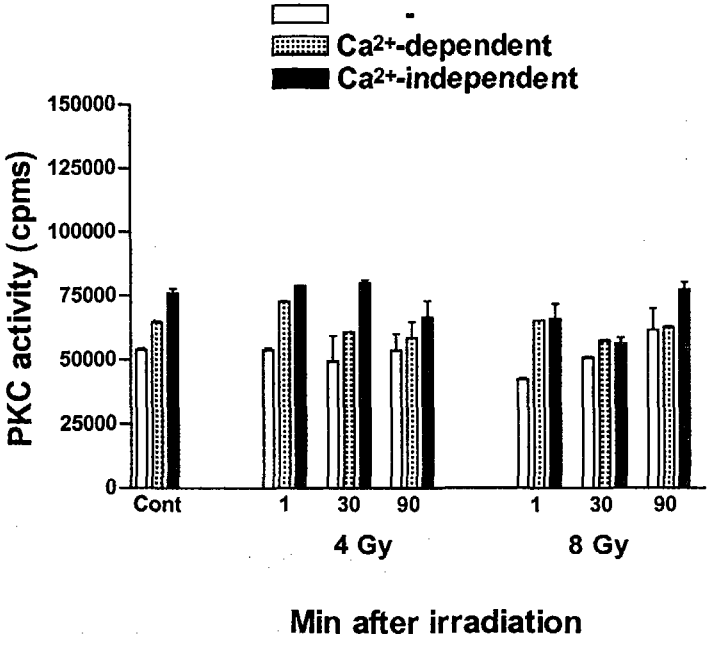

100000
75000
50000
25000
0
PKC activity (cpms)
-
Ca2+-dependent
Ca2+-independent
MFGpuro
HSP70

Fig. 19b



MFGpuro



HSP70

Fig. 19c

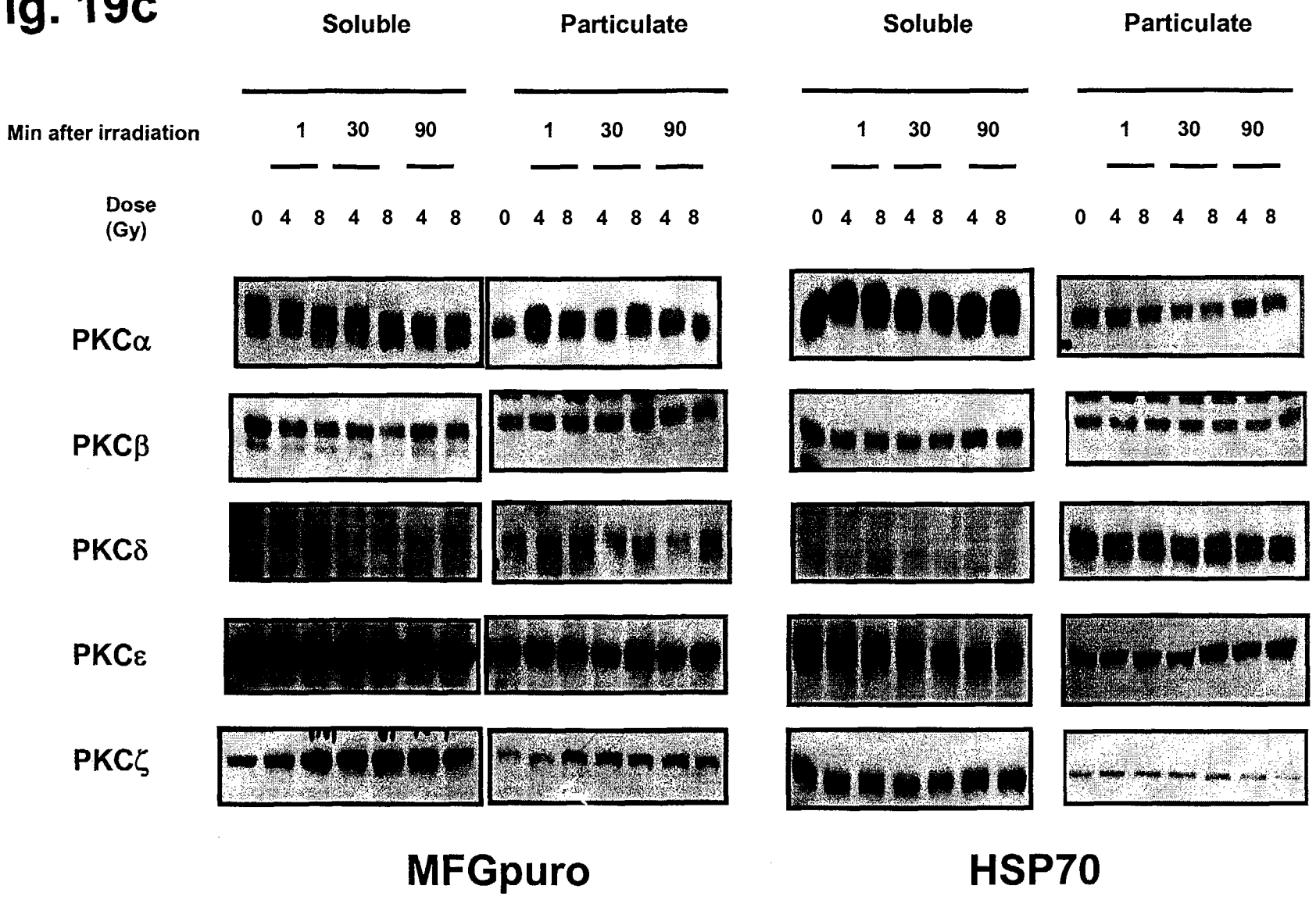

Soluble
Particulate
Soluble
Particulate
Min after irradiation
1 30 90
1 30 90
1 30 90
1 30 90
Dose (Gy)
0 4 8 4 8 4 8
0 4 8 4 8 4 8
0 4 8 4 8 4 8
0 4 8 4 8 4 8
PKCα
PKCβ
PKCδ
PKCε
PKCζ
MFGpuro
HSP70

Fig. 19. Inducible HSP70 increases basal level of PKC activity and alters radiation induced PKC activity

a, Ca2+-dependent and Ca2+-independent PKC activity was determined in Triton X-100 lysates from control vector (MFGpuro) and inducible HSP70 transfected NIH3T3 cells (HSP70) ***b***, Ca2+-dependent and Ca2+-independent PKC activity was determined in Triton-X 100 lysates from control vector (MFGpuro) and inducible HSP70 transfected NIH3T3 cells (HSP70) after 4 and 8 Gy irradiation ***c***, Control vector (MFGpuro) and inducible HSP70 transfected NIH3T3 cells (HSP70) were exposed to gamma rays at the doses of 4 and 8 Gy. After the indicated times, cells were lysed and separated into soluble and Triton X-100 soluble particulate fractions.

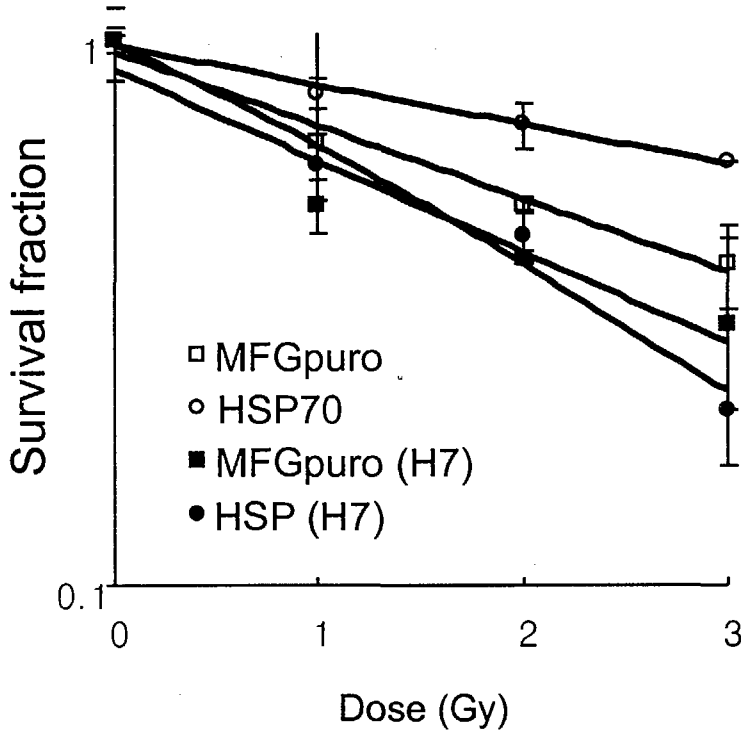


Fig. 20. PKC inhibitor (H7) treatment attenuates the radioresistance by inducible HSP70.

Survival fraction was obtained from control vector (MFGpuro) and inducible HSP70 transfected NIH3T3 (HSP70) with or without 2 hr pretreatment of 200 ug/ml of H7.

Fig. 21. *HSP25* Prolonged Radiation-Induced G2/M Arrest

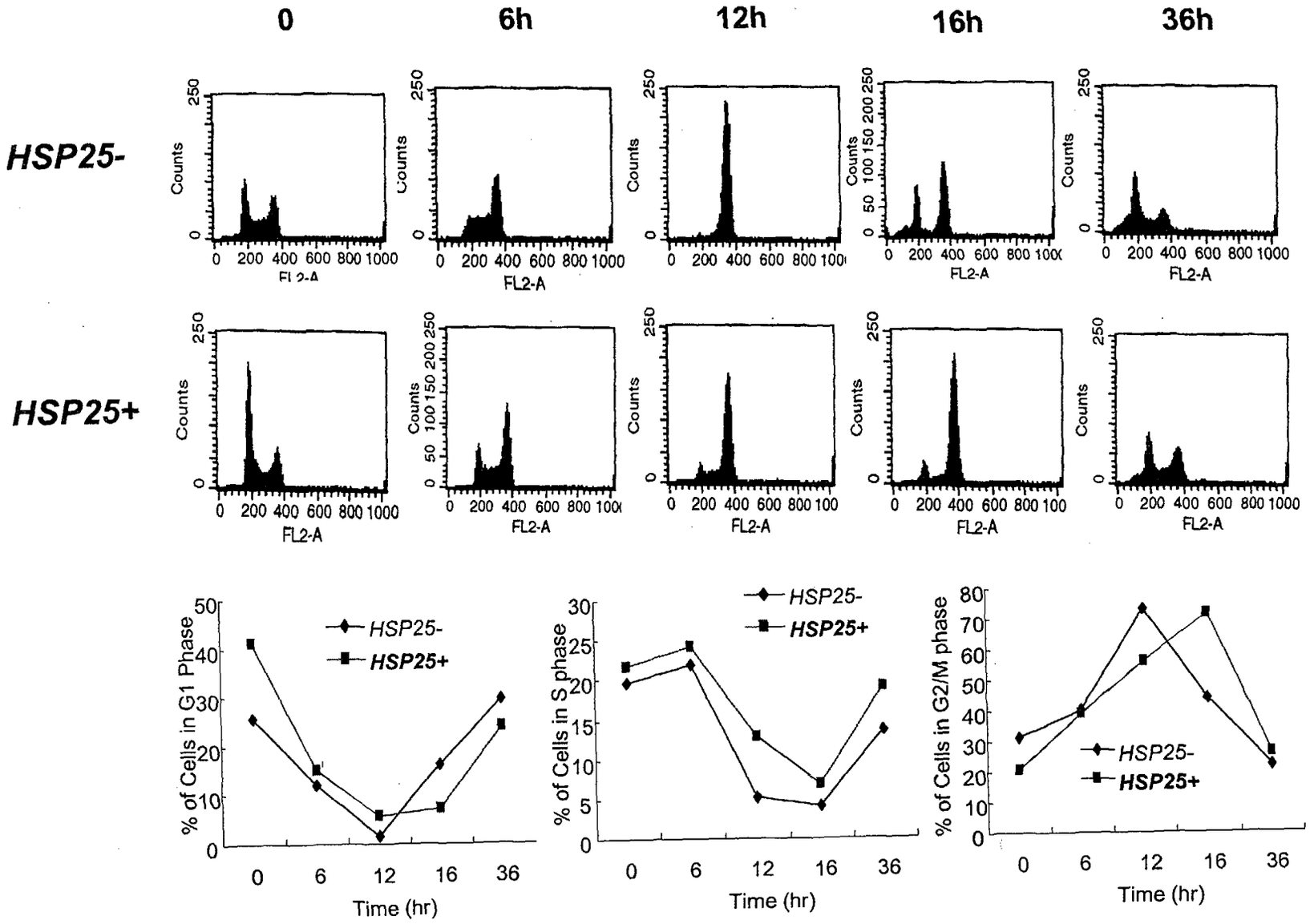


Fig. 22. *HSP25* Delayed G1-S Transition After Irradiation

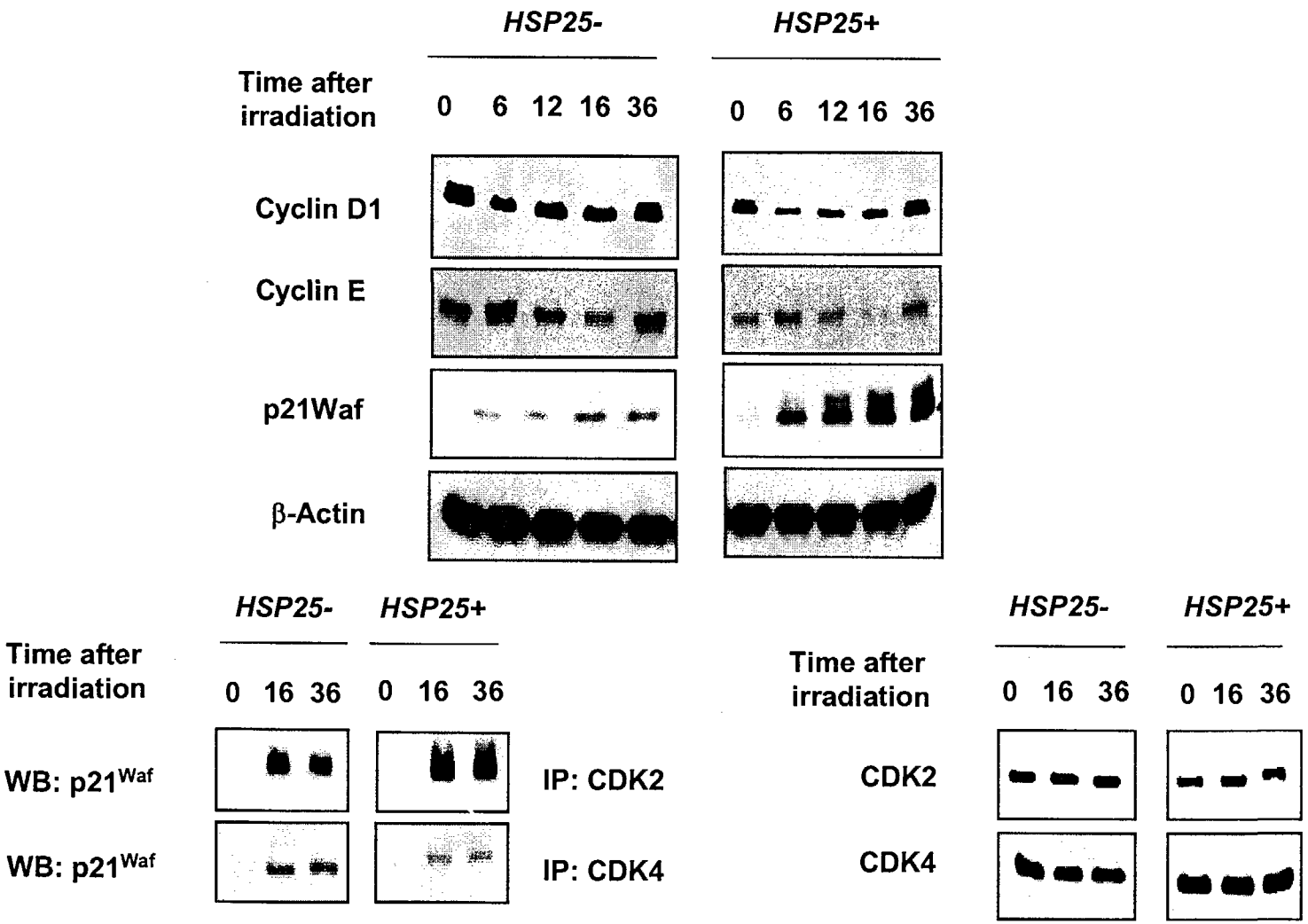


Fig. 23. *HSP25* Delayed S-G2 Transition After Irradiation

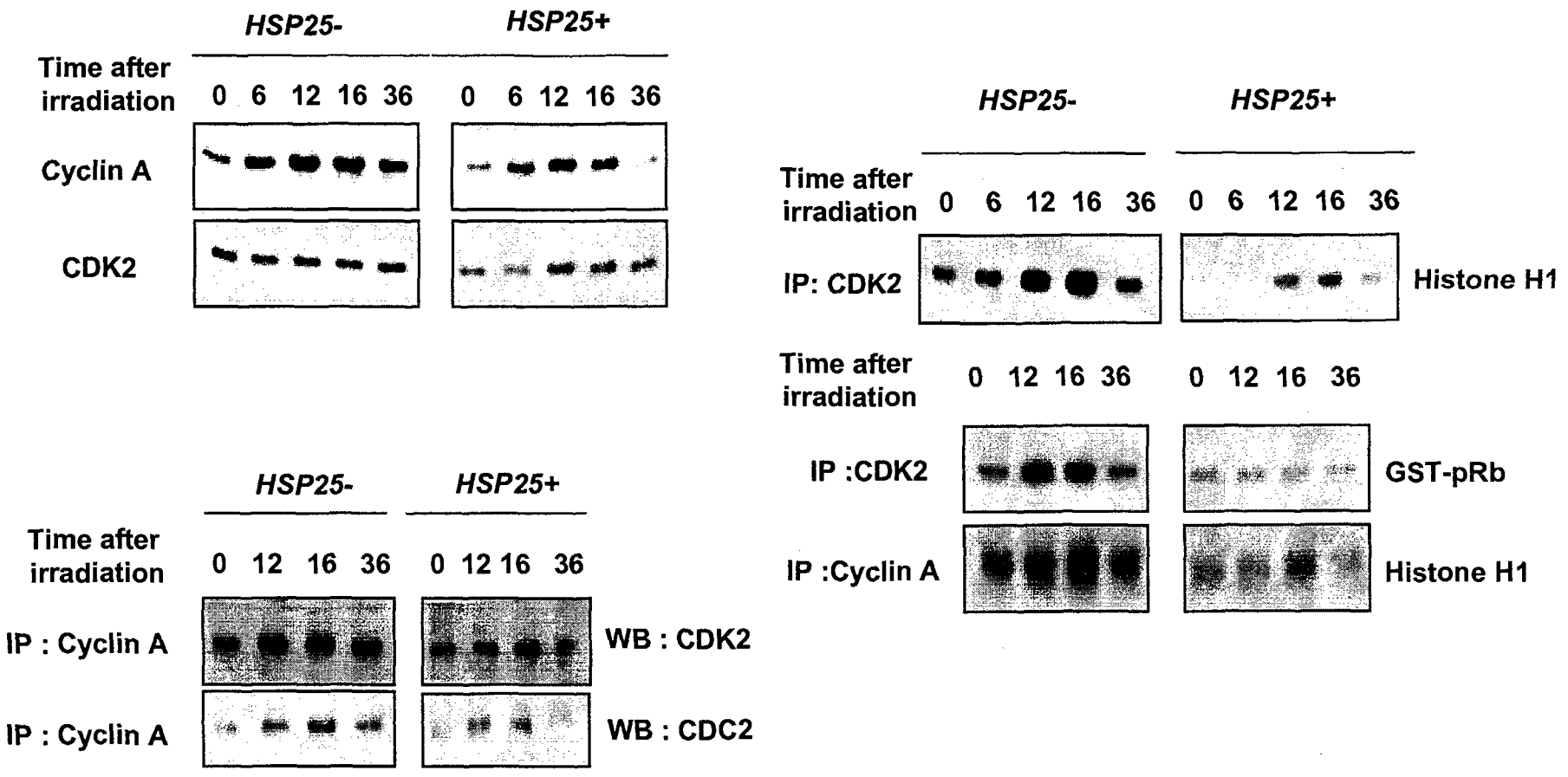


Fig. 24. *HSP25* Delayed G2-M Transition After Irradiation

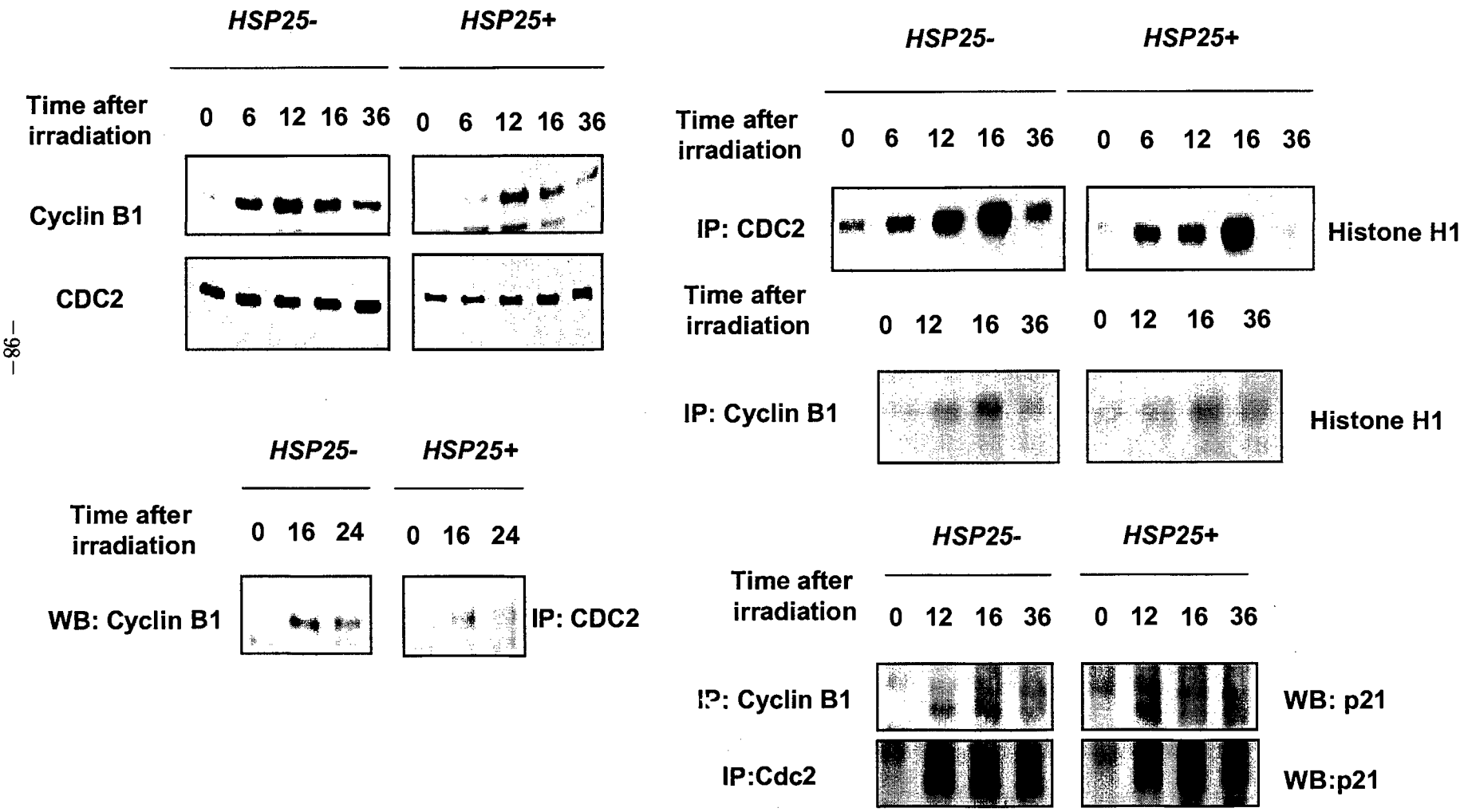


Fig. 25. Induction of p53 by Irradiation was Attenuated by *HSP25*

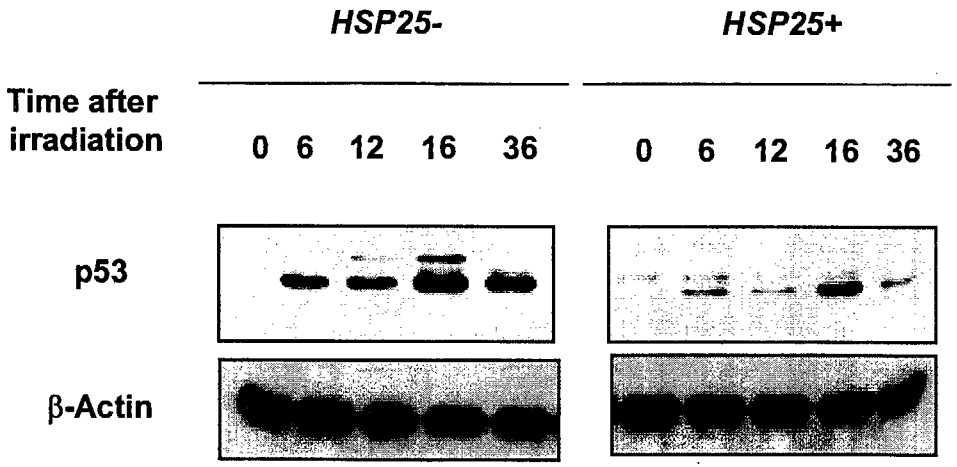
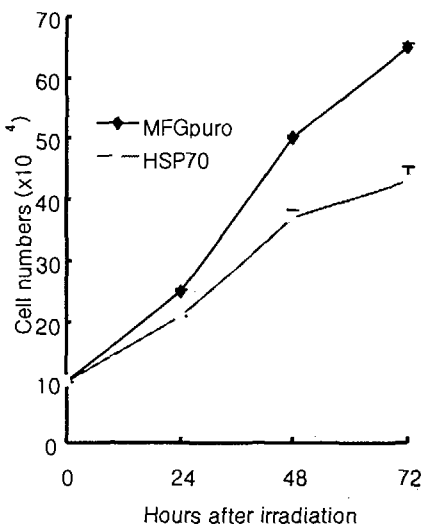
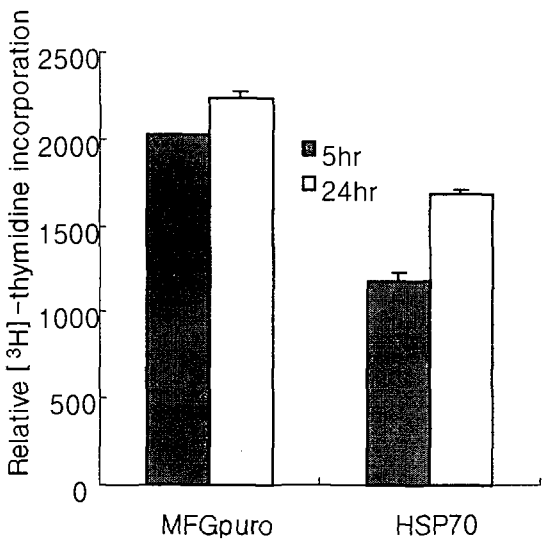


Fig. 26. HSP70 Induced Growth Delay

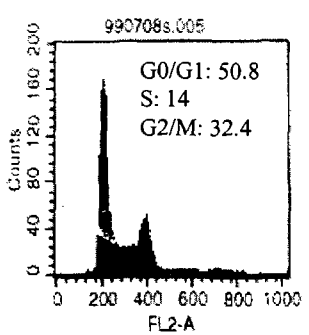
Cell count



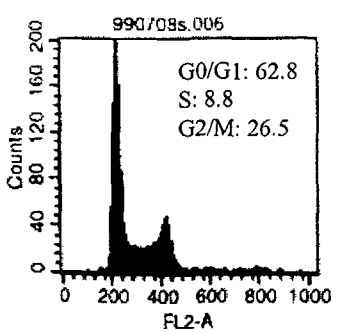
[^{3}H]-thymidine incorporation



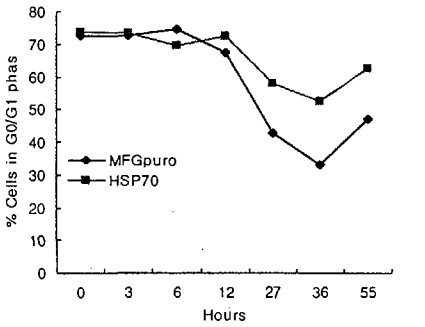
Flow cytometry

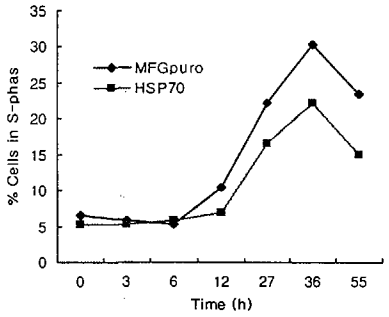


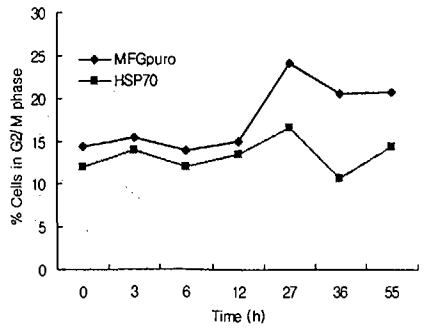
MFGpuro

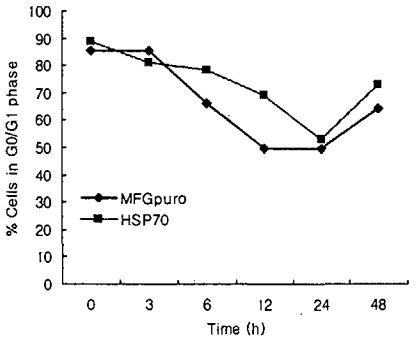


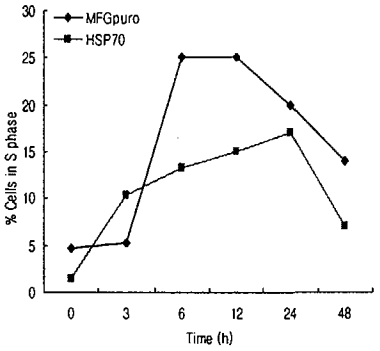
HSP70

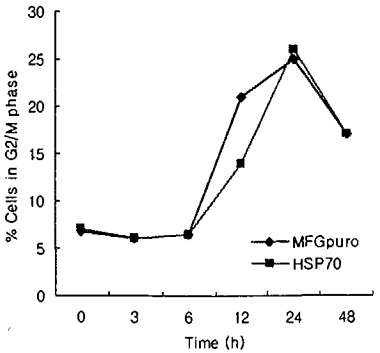








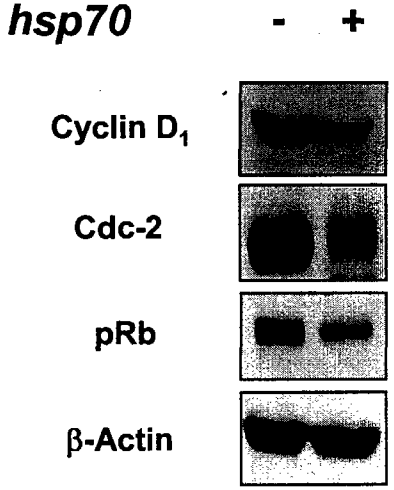


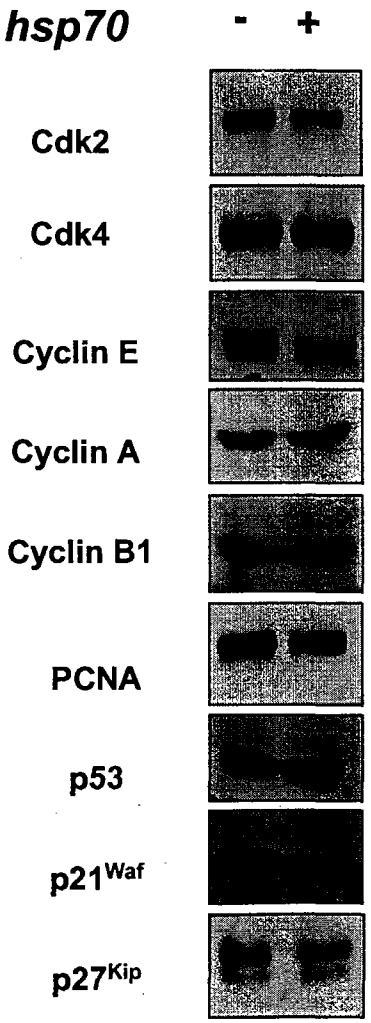


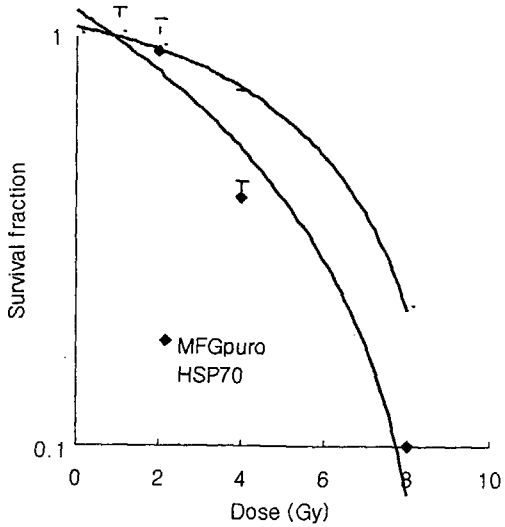
Serum starvation

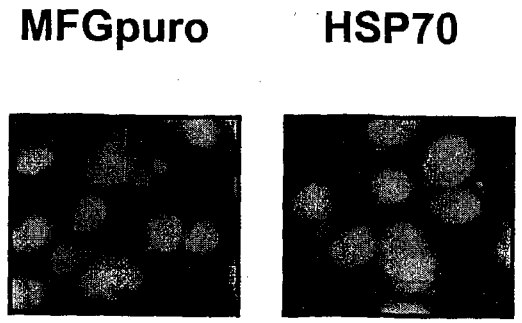
Mimosine treatment

Protein expression









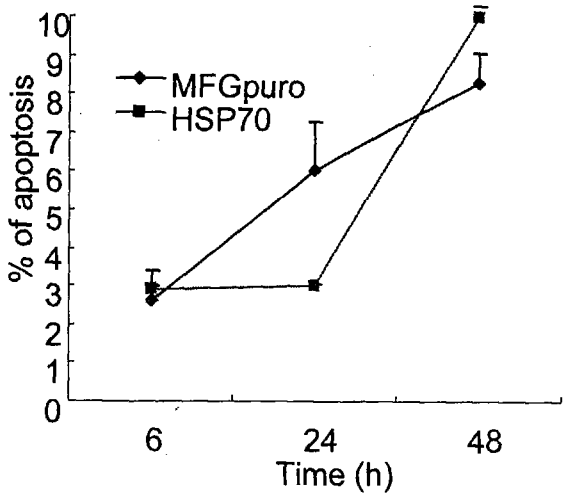


Fig. 27. HSP70 Induced Radioresistance and Inhibited Radiation Induced Apoptosis

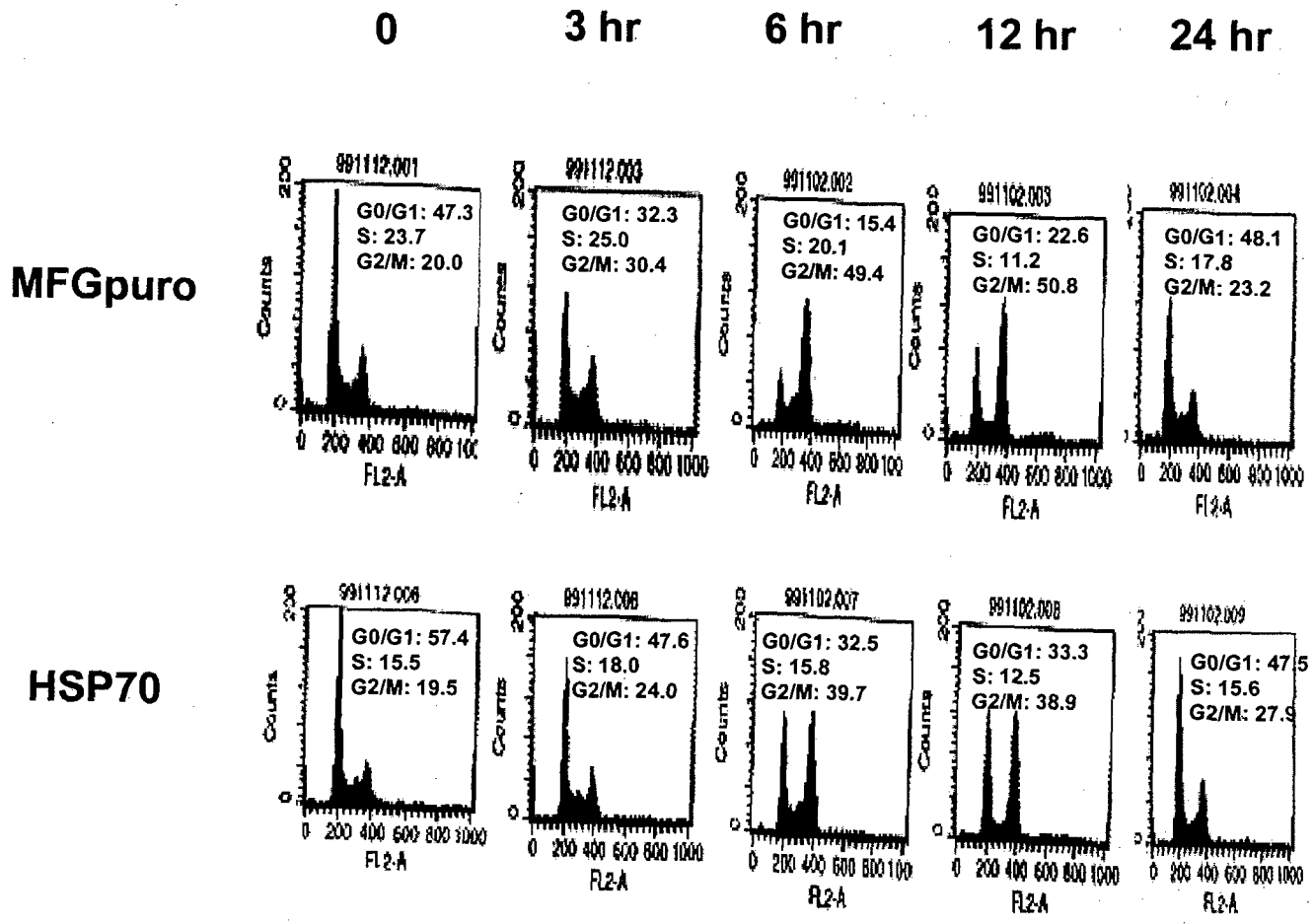
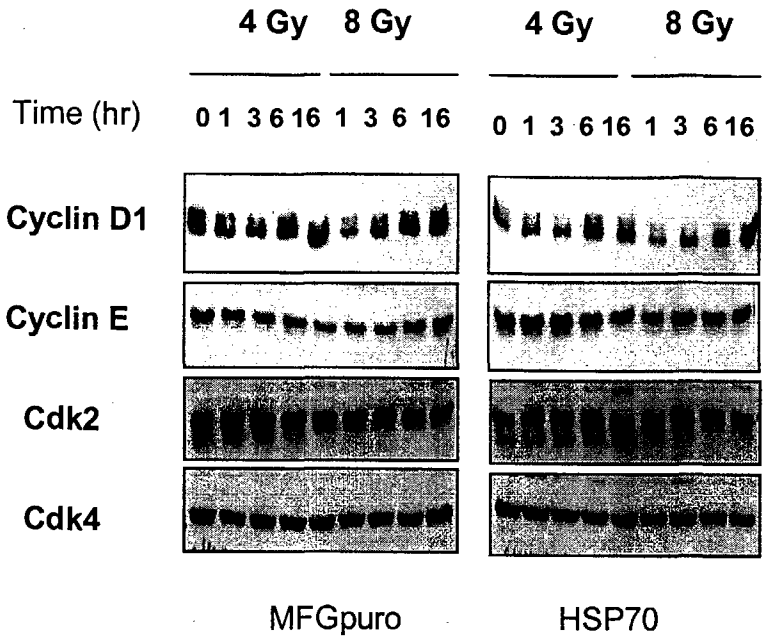
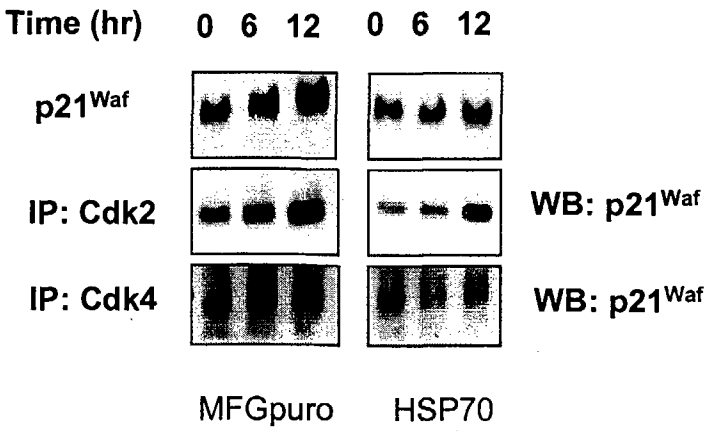


Fig. 28. HSP70 Shortened Radiation Induced G2/M Phase Arrest





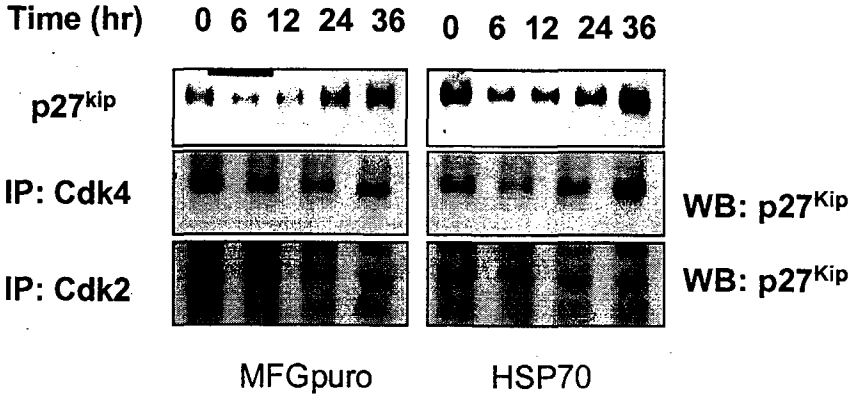


Fig. 29. *HSP70* Facilitated G1-S Transition After Irradiation

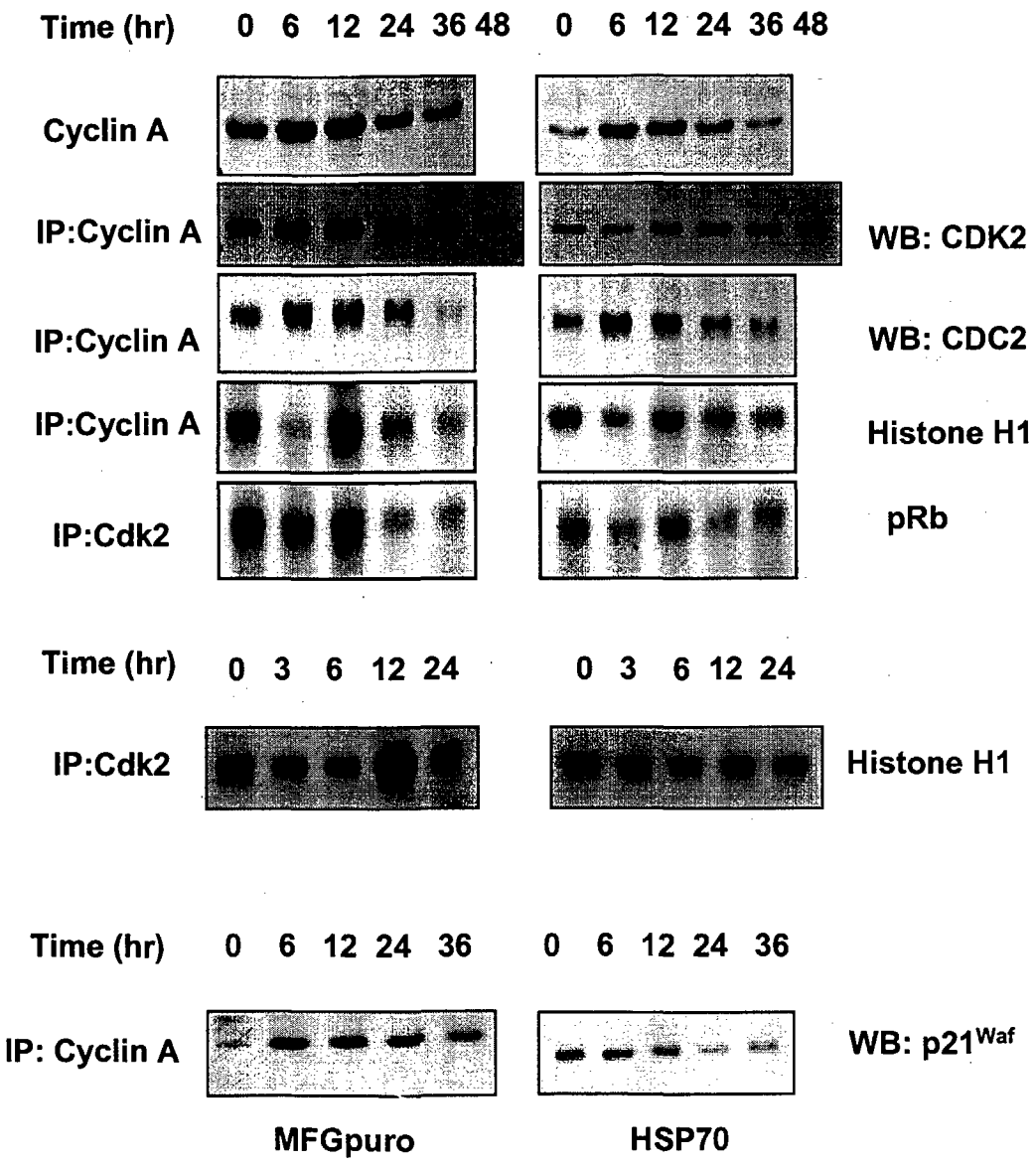


Fig. 30. *HSP70* Inhibited Aberrant S-G2 Cell Cycle Progression After Irradiation

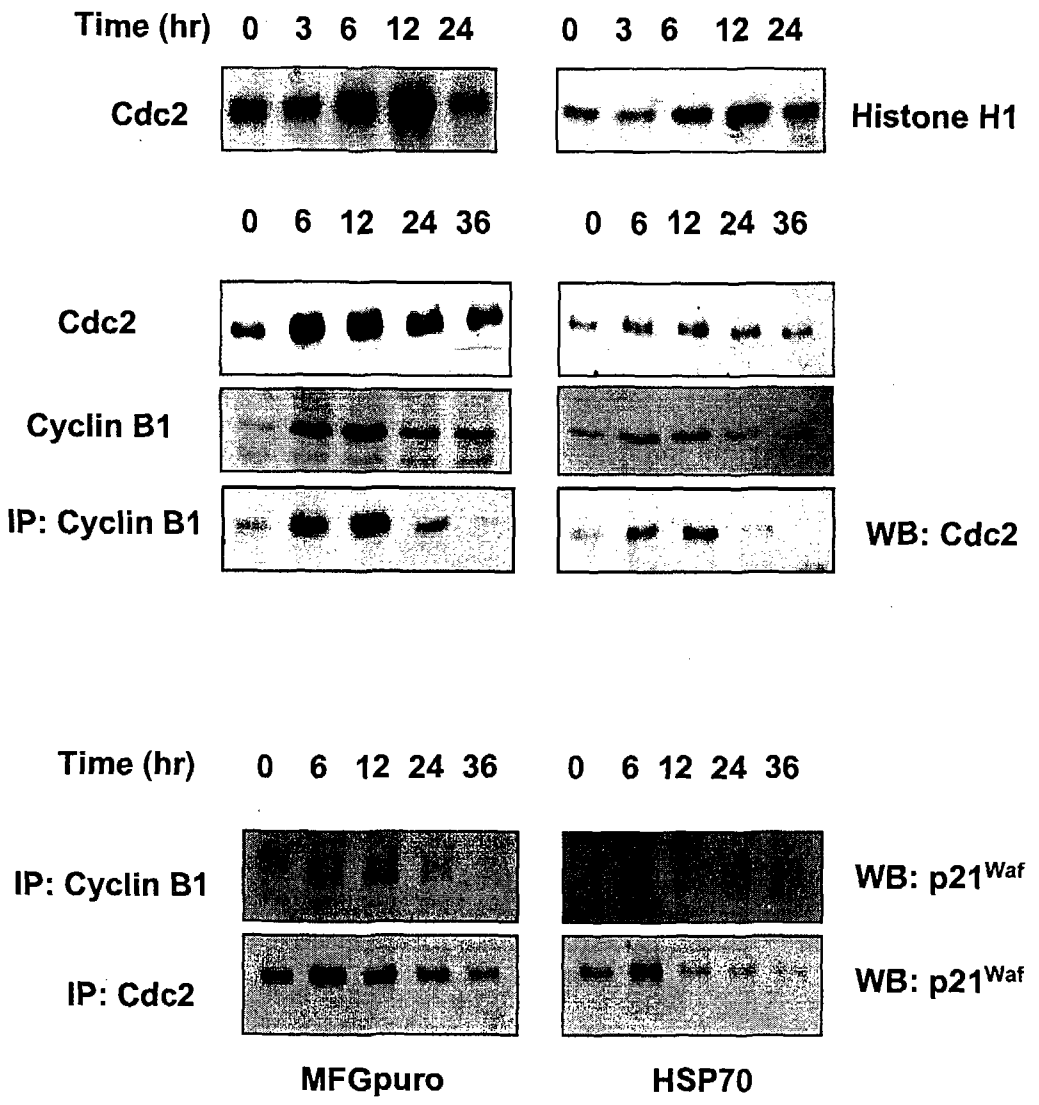


Fig. 31. *HSP70* Inhibited Aberrant G2-M Cell Cycle Progression After Irradiation

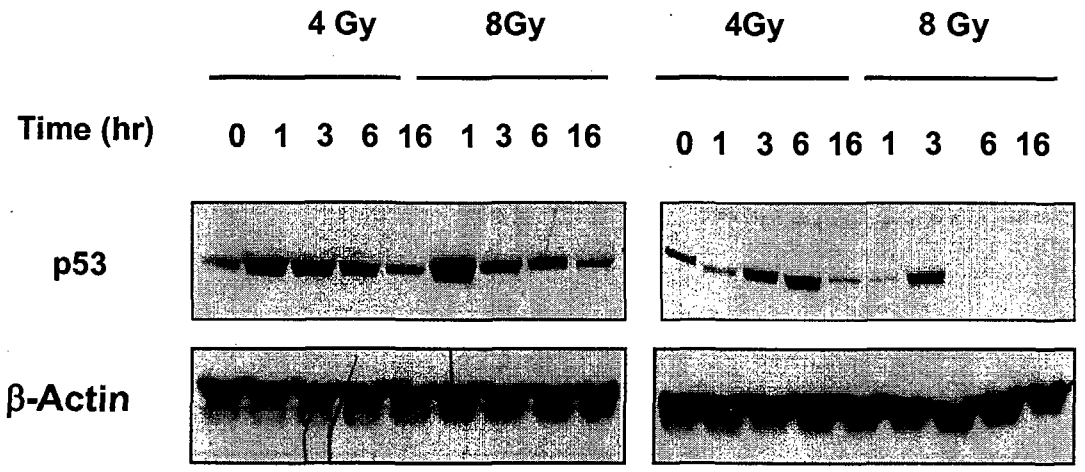


Fig. 32. *HSP70* Showed Reduced Induction of p53 Protein

공동과제

인체세포주에서 방사성핵종에 의해 발현되는 방사선유도 적응응답 반응 관련 유전자에 관한 연구

제 1 장 서 론

방사능에 대한 막연한 공포심과 저항감으로 인해 저선량의 방사능 마저도 위험한 것으로 인식되고 있으나, 저선량 방사선에 의해 그 이후의 고선량 방사선에 저항이 생기는 유익한 반응을 보인다는 방사선 적응반응이라는 현상이 알려지면서 저선량 방사선을 인체에 유익하게 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 그러나, 저선량 방사선이 어떤 기작에 의해 이런 반응을 일으키는지에 대해서는 아직 알려지지 않고 있다. 그동안 방사선이 세포에 미치는 영향에 대해서는 외부피폭을 이용한 실험이 주종을 이루어왔다. 하지만 핵의학적 이용은 내부피폭을 이용하는 것이며, 그 외에도 환경방사능이 내부피폭을 항상 주고 있는 것이므로, 내부피폭에 의한 반응을 연구하는 것이 외부피폭 못지않게 중요하다고 생각된다.

1986년 소련 체르노빌 원전 폭발사고, 1987년 브라질 코이아니아사고 등이 발생한 후 세계적으로 불의의 방사선 사고 유발 가능성을 재인식하고 있고, 우리나라의 경우에도 원자력발전소 주변이나 방사성 핵종을 사용하는 작업장 등에서 방사선 장해에 관한 시비가 끊이지 않고 있는 등 방사선에 대한 일반 국민의 부정적 시각과 심리적 불안감이 사회적 문제가 되고있다. 방사선은 우리 사회의 필수불가결한 생활의 도구로 자리잡고 있으며, 특히 의료용 방사성 핵종은 저선량의 방사능을 갖고 있으므로 매우 안전하게 사용할 수 있지만 현실적으로는 핵의학 검사에 대한 불필요한 거부감이 심하고 사회적 제약도 지나치게 심한 편이다. 이러한 저선량의 방사선이 인체에 미치는 영향을 정확히 규명하여 그 긍정적인 면에 대한 새로운 시각을 유도하고 장해를 방어할 수 있는 기반을 마련해야 한다.

1984년 Olivieri 등은 인체 림프구를 방사성 thymidine에 노출시키고 이어 고선량의 X 선을 조사하였을 때 직접 고선량의 X 선만을 조사받은 림프구보다 염색분체의 손상이 적게 일어나는 현상을 관찰하여 인체의 세포에서 방사선 적응반응이 일어남을 밝힌 이후 많은 연구자들에 의해 방사선 적응반응의 특성 및 그 기작에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근 본 연구자들은 인체 혈액 림프구와 마우스의 골수세포에서 중기염색체 분석법과 미소핵 검사법을 이용하여 적응반응의 현상을 입증한 바 있고, 핵의학 영상검사 중 가장 빈번히 시행하는 골 신티그라피를 시행할 때 사용하는 방사성 의약품인 Tc-99m-methylene diphosphate (MDP)에 의한 내부 피폭에 의해서도 방사선 적응반응이 유도된다는 사실을 밝힌바 있다.

적응반응의 기전에 관해서는 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만 손상 받은 DNA로

부터 유전자가 발현되어 새로운 단백질이 합성될 것으로 추측되고 있다. 새로운 단백의 합성에 관해서는 Cai 등이나 Youngblom 등의 연구에서 단백합성 억제제인 cycloheximide에 의해 적응반응이 소실되는 현상을 봄으로써 가능성을 확인한 바 있고 본 연구자들도 몇 차례의 실험을 통해 이 현상을 확인한 바 있다.

Shadley와 Wolff는 poly (ADP-ribose) polymerase의 길항제인 3-aminobenzamide (3-AB) 처리를 하였을 때 방사선 적응반응이 소실되는 현상을 보고하였는바 이러한 poly (ADP-ribose) polymerase가 방사선 조사된 세포의 수선 기작으로 작용하는 효소일 것으로 추측할 수 있다. Kelsey 등은 돌연변이의 광범위한 스펙트럼을 보여주는 HPRT 유전자를 southern blot hybridization 한 결과 저선량에 미리 노출된 경우 돌연변이 발생 빈도가 현저히 감소함을 밝혔는데 이 연구를 통하여 염색체 이상을 수선하는 특정 효소가 유도되어 이미 발생한 염색체 결실로부터 회복시킬 것으로 추정할 수 있었다. 1996년 Rigaud와 Moustacchi은 방사선 적응반응의 기작에 관한 연구에서 protein kinase C에 의해 매개되는 signalling pathway가 저선량에 의해 유도되는 signal transduction에 중요한 단계일 것으로 보고하였고, 1997년 Sadekova 등은 mRNA를 이용한 differential dysplay를 통해 저선량 조사한 세포에서 heat shock protein 70 family의 PBP74/mortalin/Grp75 유전자의 발현이 강화되는 것을 규명하였는데, 이 현상은 세포에 따라 나타나지 않는 경우도 있었다. 최근에는 저선량의 방사선이 여러 유전자의 발현에 변화를 주어 DNA 수선과 세포주기의 진행을 조절하는 것으로 생각되고 있으나 대부분의 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

최근 들어 분자생물학적인 실험방법의 비약적인 발전으로 인하여 특정 자극에 의해 유도되거나 억제되는 유전자를 찾아내는 것이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 differential screening 법을 이용하여 방사선 조사를 하지 않은 정상세포에 비해 저선량의 방사성 동위원소에 의해 피폭 받은 세포에서 새로 유도 발현되거나 발현이 강화되는 clone을 찾아낸 후 이들의 염기서열을 분석하여 방사선 적응반응 관련 유전자를 찾아보고자 하였다.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

선진국에서는 방사선 적응반응의 기전에 관한 연구는 여러 형태로 이루어지고 있지만, 관련 유전자의 검색을 통한 연구는 매우 드문 편이며 특히 방사성 핵종을 통해 유도된 방사선 적응반응의 기전에 관한 연구는 거의 이루어지고 있지 않다. 또한 국내에서도 마찬가지로 방사선 적응반응의 현상을 규명한 연구는 일부 있었으나 방사성 핵종의 내부 피폭에 의해 유도되는 방사선 적응반응 관련 유전자를 검색하는 연구는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 독창성 있는 분야로 국제경쟁력이 있다고 사료된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1 절 방사선 적응반응

1. 연구재료

인체 림프구 세포주인 NC-37 세포주를 한국 세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 실험군은 총 9개 군으로 방사선 조사를 전혀 하지 않은 군(Cell Line group 1, 이하 CL1), 2 Gy의 고선량만 조사한 군(CL2), 148 MBq의 Tc-99m을 10배씩 차례대로 희석하여 148×10^{-6} MBq까지 희석한 다음 2 Gy의 고선량을 조사한 군(CL3~CL9)으로 나누었다.

2. 세포배양과 방사성 핵종 첨가 및 방사선 조사

NC-37 세포주는 배양 후 분주시에 RPMI 1640 배지 4.5 ml에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, 이하 FBS) 0.5 ml을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 방사성 핵종에 의한 저선량 방사선 조사를 위해 배양과 동시에 Tc-99m을 148 MBq에서 148×10^{-6} MBq까지 10배씩 차례대로 희석하여 첨가한 후 배양하였다. 고선량의 방사선 조사는 배양 44시간째에 Cs-137 조사기(central dose rate = 654 Gy/h, Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 사용하여 2 Gy를 조사하였다.

3. 수 확

배양 46시간 후에 염색체의 중기분열을 억제하는 colcemid 0.2 ml을 첨가하여 분열을 억제시킨 후, 2시간 더 배양하였다. 배양이 끝난 플라스크의 세포는 15 ml 튜브에 옮긴 후, 5분간 1500 rpm으로 원심분리한 다음 상층액은 버리고 저장액(0.075 M KCl)을 10 ml씩 각각 분주하고 잘 섞은 후 37℃ 수조에서 20분간 방치하였다. 그 후 5분간 1500rpm으로 원심분리를 시행하여 상층액은 버리고 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)을 10 ml씩 각각 분주하여 고정을 하였다. 이 과정을 두 차례 더 반복하여 여분의 상층액은 버리고 침전된 세포를 잘 섞은 다음, 50℃로 데워진 슬라이드 글라스 위에서 한 방울 떨어뜨려 퍼지게 하고 공기 중에서 잘 건조시킨 뒤 Giemsa 용액으로 염색하였다.

4. 현미경 검경 및 계수

염색된 표본은 현미경 하에서 100배의 배율로 관찰하여 핵분열 중기 세포를 찾아 1,000배의 배율로 확대관찰 하였다. 이때 세포의 염색체 수가 46개인지 확인하고, 그 숫자가 부족하거나 염색체 이상을 판정하기에 부적합한 것은 관찰에서 제외하였다. 불안정 염색체인 반지형과 이중 중심체형 염색체의 숫자를 계수하였고, 하나의 염색체 중에서 3개이상의 중심체가 보일 때는 그 중심체의 수효에서 1을 뺀 횟수만큼을 이중 중심체형 염색체로 간주하였다. 계수한 전체 중기염색체에서 관찰된 불안정 염색체 수의 비율인 불안정 염색체의 출현빈도(Ydr=(D+R)/total scored cells)를 구하여 서로 비교하였다.

5. 통계분석

저선량의 전처치 없이 단일 고선량만을 조사한 군과 전처치를 한 군간에 불안정 염색체의 계수의 차이는 ANOVA test를 이용한 분산 분석으로 하였고, p값은 0.05 미만을 유의한 수준으로 인정하였다.

2절 방사선 적응반응 관련 유전자

1. 세포배양과 방사성 핵종 첨가

인체 림프구 세포주인 NC-37 세포주를 한국 세포주은행에서 분양받아 사용하였다. NC-37 세포주는 배양 후 분주시에 RPMI 1640 배지 4.5 ml에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, 이하 FBS) 0.5 ml을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양과 동시에 방사성 핵종에 의해 방사선 적응반응을 유도한 선량인 148×10^{-3} MBq Tc-99m을 첨가한 후 배양하였다. 실험군은 방사선 조사를 전혀 하지 않은 군(Control group, 이하 Con)과 Tc-99m을 148×10^{-3} MBq로 희석한 군(Tc-99m 148×10^{-3} MBq 군, 이하 T103)으로 나누었다.

2. Total RNA 분리

방사성 핵종의 저선량 방사선에 일정시간 피폭된 T103과 정상세포인 Con을 수확한 후 -20℃의 냉동기에 얼려 놓은후 total RNA를 제작했다. 6 ml의 guanidine

isothyocyanate 용액과 30 μl의 2-mercaptoethanol을 첨가하여 5cc 주사기로 분쇄한 후 상층액에 5~6 ml의 cesium chloride solution (5.7 M CsCl)위에 overlay하고 25,000 rpm으로 10℃에서 24시간이상 초원심 분리하였다. 원침 후 tube 밑바닥 부분을 절단하고 바닥에 붙어있는 RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 물로 용해한 다음 ethanol로 precipitation 하여 260 nm에서 spectrophotometer로 정량한 후 -70℃의 초저온 냉동고에 보관하였다.

3. mRNA 합성

mRNA는 Oligotex kit(QIAGEN Inc, USA)을 사용하여서 합성하였다. 합성에 들어가기에 앞서 Oligotex를 37℃에서, OEB를 70℃에서 prewarming 시킨 후 total RNA에 동량의 OBB를 첨가하고 Oligotex를 혼합하였다. spin column의 중앙에 Oligotex 혼합물을 주입한 후 14,000 rpm에서 2분간 원심분리한 후 상층액은 제거하고 OW2로 2번 세척하였다. 세척 후 새로운 튜브를 넣고 OBB를 첨가하여 14,000 rpm에서 1분간 원심분리한 다음 ethanol로 precipitation 하여 260 nm에서 spectrophotometer로 정량한 후 -70℃의 초저온 냉동고에 보관하였다.

4. ds cDNA 합성

-70 ℃의 초저온 냉동고에서 precipitated sample을 꺼내어 얼음위에서 자연스럽게 녹도록 놓아둔 후, 정량을 하였다. 정량 후 mRNA가 10 μl의 농도가 되도록 희석을 하였고, 5x 1st buffer 6 μl, dNTP(10 mM) 3 μl, RNase inhibitor 3 μl, Oligo $d(T)_{18}$ 3 μl, RAV-2 RTase 3.3 μl, DEPC water 1.7 μl와 잘 혼합하여 실온에서 10분간 방치 후 42℃에서 1시간동안 반응시키고 나서 얼음위에 두었다. 얼음위에 있던 1st 혼합물을 5x 2nd buffer 30 μl, E.coli DNA polymerase 19.5 μl, E. coli RNase H/DNA ligase 3 μl, DEPC-water 61.5 μl와 잘 섞어준 후, 12℃에서 1시간, 22℃에서 1시간 70℃에서 10분간 차례대로 반응시켜 주었다. 반응 후 T_4 DNA polymerase를 첨가하여 37℃에서 10분간 더 반응시켰으며 stop solution인 0.25M EDTA와 10% SDS를 첨가하여 반응을 중시시킨 후 ethanol로 precipitation 하여 260 nm 에서 spectrophotometer로 정량한 후 -70℃의 초저온 냉동고에 보관하였다.

5. RDA (Representative Differential Analysis)

ds cDNA를 PCR purification kit(QIAGEN, USA)을 이용하여purification한 후 Sau3A1

제한효소(10 unit/㎕)와 10x buffer를 첨가하여 37℃에서 overnight 반응시켜 digestion을 한 후 R Bgl II adaptor를 이용하여 ligation을 하였다. ligation 후 cDNA/R Bgl II adaptor과 PCR 용액인 10x PCR buffer, 15 mM MgCl2(2.4 mM/㎕), 2.5 mM dNTP 혼합물, Taq polymerase를 이용하여 72℃에서 5분간 반응시키고 95℃에서 1분 72℃에서 3분간을 35번 반응시킨 후 다시 72℃에서 10분간 반응시켜서 25℃에서 무한대로 반응시켜서 증폭을 시켰다. 증폭 후 다시 Sau3A1으로 digestion을 하였고 tester용과 driver용으로 나누어 J adaptor를 이용하여 ligation 하였다. ligation 시킨 혼합물은 PCI/CI extraction 하여 10분간 -80℃에서 precipitation 하였고 70% ethanol로 세척 후 67℃에서 약 45시간 정도 반응시켜 selective PCR을 실시하고 agarose gel 전기영동을 통해 band를 확인하였다. 확인 후 각각의 DNA 100 ng에 10x ligase buffer, pair N을 첨가한 후 hybrids 시켰고 selective PCR을 하였다. 마지막으로 J adaptor를 첨가하여 반응시키고 PCR 증폭을 통해 difference product를 얻었다.

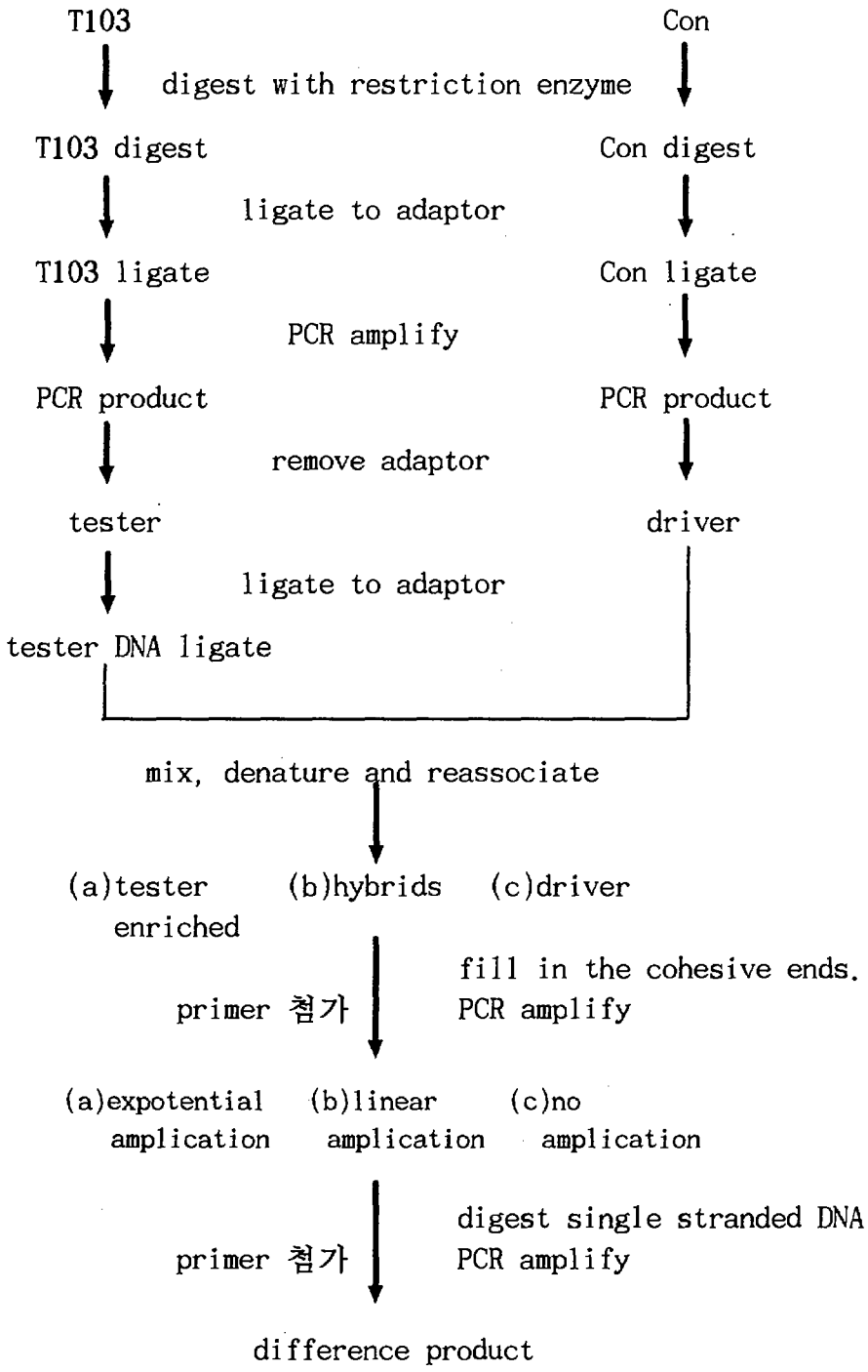


Figure 1. Schematic protocol for RDA

6. Cloning

RDA를 통해 선별된 difference 산물들을 plasmid vector에 주입하여 PCR을 이용하여 원하는 insert들을 증폭하였다. PCR로 증폭 시켰던 산물들은 3% agarose gel 전기영동을 하여 각각의 band들에 대해 size를 확인하였다.

7. Differential screening (Dot blot)

cloning한 subtracted T103과 Con의 산물들을 Nylon membrane에 각각 dot을 찍은 후 공기중에서 말려 -20℃의 냉동고에 보관하였다. 보관되어 있는 membrane에 prehybridization 용액인 20x SSC, 50x Denhardt's 10% SDS, SS DNA를 첨가하여 65℃ 수조에서 shaking 하였다. subtracted된 cDNA probe를 spin column(BM, USA)을 이용하여 만들어 hybridization중인 membrane에 넣어주었고, 2x ssc와 0.1% SDS로 이루어진 washing 용액으로 세척하여 공기중에서 말린 후 하루 동안 X-ray film에 반응시켰다.

연 구 결 과

1 절 방사선 적응반응

NC-37 세포주에서는 Tc-99m으로 전처치를 하지 않고, 2 Gy의 단일 선량만을 조사한 군(CL2)에서는 불안정 염색체의 비율인 Ydr 값이 0.26±0.02 인데 비해, 148 $\times 10^{-3}$ MBq로 희석한 군(CL6)과 148$\times 10^{-4}$ MBq로 희석한 군(CL7)에서는 각각 0.15 ±0.02와 0.16±0.03으로 현저하게 감소된 값을 보여 CL6과 CL7에서 방사선 적응반응이 유도되었음을 알 수 있었다 ($p<0.01$).

Table 1. Chromosomal Aberrations in Human Lymphoblast Cell Lines (NC-37) under Different Schemes of irradiation

Groups	Conditioning dose	Challenge dose	Total number of lymphocytes scored	Total number of chromosomal aberration	Ydr
CL 1	None	None	191	16	0.08±0.08
CL 2	None	2 Gy	217	56	0.26±0.02
CL 3	148 MBq	2 Gy	218	45	0.21±0.04
CL 4	148×10^{-1} MBq	2 Gy	233	47	0.20±0.04
CL 5	148×10^{-2} MBq	2 Gy	224	63	0.28±0.04
CL 6	148×10^{-3} MBq	2 Gy	214	32	0.15±0.02*
CL 7	148×10^{-4} MBq	2 Gy	238	38	0.16±0.03*
CL 8	148×10^{-5} MBq	2 Gy	221	51	0.23±0.03
CL 9	148×10^{-6} MBq	2 Gy	191	44	0.23±0.02

* $p<0.01$ comparing to CL2

CL 1 : 방사선 조사를 전혀 하지 않은 군
CL 2 : 전처치 없이 2 Gy만을 조사한 군
CL 3 : 148 MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군
CL 4 : 148×10^{-1} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군
CL 5 : 148×10^{-2} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군
CL 6 : 148×10^{-3} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군
CL 7 : 148×10^{-4} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군
CL 8 : 148×10^{-5} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군
CL 9 : 148×10^{-6} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

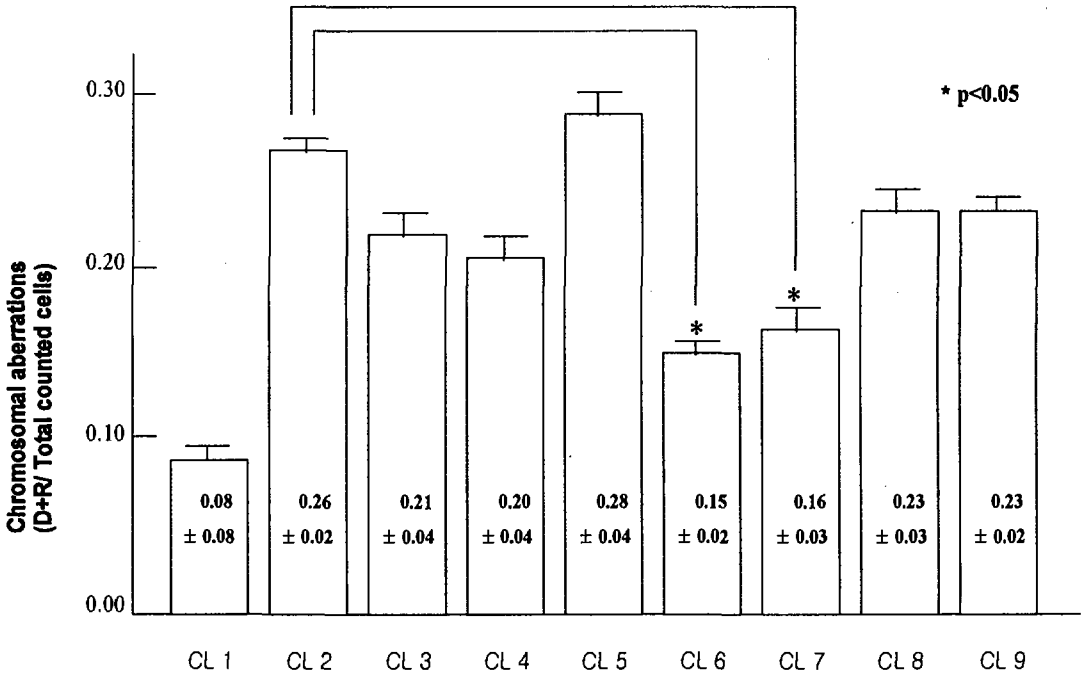


Fig. 2. The number of chromosomal aberrations in serial dilution groups after high dose radiation in human lymphoblast cell-line(NC-37 cell line)

CL 1 : 방사선 조사를 전혀 하지 않은 군

CL 2 : 전처치 없이 2 Gy만을 조사한 군

CL 3 : 148 MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

CL 4 : 148×10^{-1} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

CL 5 : 148×10^{-2} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

CL 6 : 148×10^{-3} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

CL 7 : 148×10^{-4} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

CL 8 : 148×10^{-5} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

CL 9 : 148×10^{-6} MBq의 선량을 전처치한 후 2 Gy를 조사한 군

2 절 방사선 적응반응 관련 유전자

RDA 방법을 사용하여 얻은 127개의 T103-Con subtracted clones 중에서 전기영동 결과 band가 확연하게 나타난 46개의 clones을 선택하였고, Con-T103 subtracted clones은 총 130개의 clones에서 전기영동 결과 band가 확연한 45개의 clones을 선택하여 dot-blotting을 시행하고 각각의 3차subtracted된 T103-Con cDNA probe과 Con-T103 cDNA probe으로 혼합하여 비교한 결과 방사선 적응반응을 유도하였던 T103에서 확연하게 차이가 나는 20개의 clones을 찾아내었고, 이들 clones에 대해 전기영동을 실시하여 각각의 size를 비교하였다.

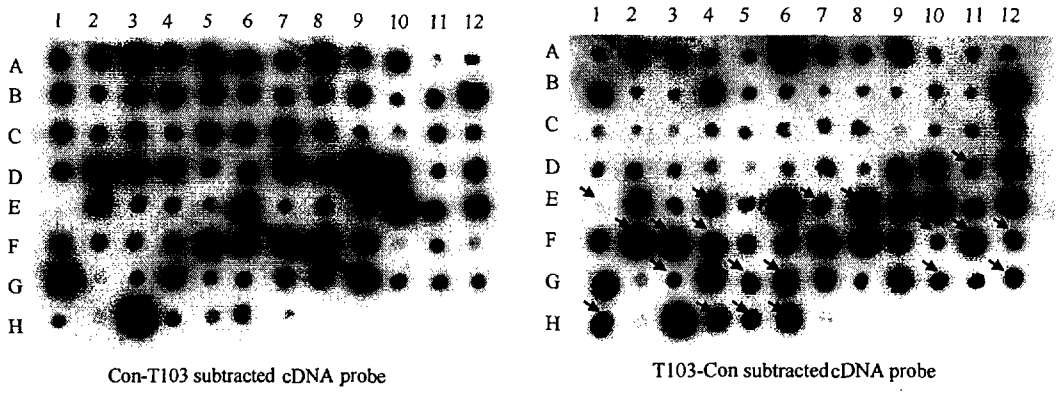


Fig. 3. Differential screening approach. Dot blots hybridized with cDNA probes made from Con-T103 subtracted cDNA and T103-Con subtracted cDNA

A1~D9 : Con-T103 subtracted clones

D10~H7 : T103-Con subtracted clones

Arrow : The concentration of the clones cDNA fragment in T103-Con subtracted cDNA were much higher than Con-T1o3 subtracted cDNA

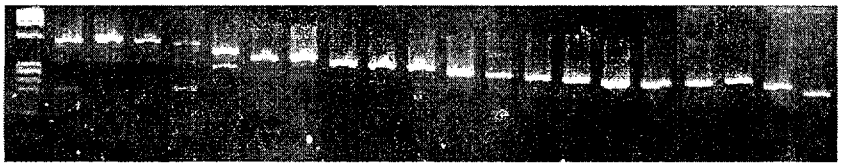


Fig. 4. Comparison of size to each clones by electrophoresis

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

저선량 방사선에 의해 유도 발현되는 유전자를 검색함으로써 국외에서도 아직 규명되지 않은 방사선 적응반응의 기전을 밝히는데 국제적으로 경쟁력을 향상시킬 것으로 생각되어지고, 방사선 적응반응의 기전이 규명되면 방사선 사업장이나 방사선 치료분야에서 방사선에 의한 장해를 방어하는데 응용할 수 있으리라 본다.

특히 본 연구가 성공적으로 수행되면 저선량 방사선, 특히 방사성 핵종에 대한 불필요한 우려를 씻어 방사선의 안전한 이용을 증가시킬 수 있고, 저선량 방사선에 의해 유도되는 유전자들을 밝혀냄으로써 방사선 방어에도 도움이 되리라 사료되어지고, 의료용 방사성 핵종의 안전한 이용을 활성화시킴으로써 핵의학 분야나 새로운 방사성 핵종의 생산 및 연구에 기여하여 학문적, 경제적 발전에 도움을 줄 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

국제경쟁력의 향상: 저선량 방사선에 의해 유도 발현되는 유전자를 검색함으로써 국외에서도 아직 규명되지 않은 방사선 적응반응의 기전을 밝히는데 국제적으로 경쟁력을 향상시킬 것으로 생각됨.

타 분야 연구에 응용: 방사선 적응반응의 기전이 규명되면 방사선 사업장이나 방사선 치료분야에서 방사선에 의한 장해를 방어하는데 응용할 수 있음.

추가연구의 필요성: 검출된 clones에 대한 cDNA 염기서열 분석 및 Northern blot을 이용하여 연구결과의 검증이 차후에 필요하다고 생각됨

제 6 장 참고문헌

1. Strauss BA. Molecular biology of the response of cells to radiation and to radiomimetic chemicals. *Cancer* 1977;40:471-80.
2. Samson L, Cairns J. A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. *Nature* 1977;267:281-3.
3. Cortes F, Dominguez I, Mateos S, Pinero J, Mateos JC. Evidence for an adaptive response to radiation damage in plant cells conditioned with X-rays or incorporatde tritium. *Int J Radiat Biol* 1990;57:537-41.
4. Samson L, Schwartz JL. Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature* 1980;287:861-3.
5. Kaina B. Enhanced survival and reduced mutation and aberration frequencies induced in V79 chinese hamster cells pre-exposed to low level of methylating agents. *Mutat Res* 1982;93:195-211.
6. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S: Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 1984;223:594-7.
7. Sankaranarayanan K, Duyn AV, Loos MJ, Natarajan AT. Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res* 1989;211:7-12.
8. Bom HS, Song HC, Lee SY, Min JJ, Jeong HJ, Kim JY. Radiation induced cytogenetic adaptive response in lymphocytes of patients undergoing bone scintigraphy. *J Nucl Med* 1998;39:184p-5p (abstract)
9. 민정준, 범희승. 골신티그라피를 시행한 환자의 림프구에서 방사선 적응반응의 유도에 관한 연구. *대한핵의학회지*. 1999;2 (In press)
10. Shadley JD, Afzal V, Wolff S. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat Res* 1987;111:511-7.
11. Cai L, Liu SZ. Study on the mechanism of cytogenetic adaptive response induced by low dose radiation. *Chin Med J* 1992;105:277-83.
12. 민정준, 범희승, 이승연, 최근희, 정환정, 송호천, 김지열. 인체말초혈액 림프구와

마우스 골수세포에서 중기염색체 분석법과 미소핵검사법을 이용한 방사선 적응 반응 평가. *대한핵의학회지* 1996;32:525-33.

13. 김정희, 이경종, 조철구, 류성렬, 김태환, 김성호. 인체 말초혈액 림프구에서 저선량 방사선조사에 의해 유도되는 적응반응. *대한방사선방어학회지* 1995;20:97-102.
14. Ernst M, Freed ME, Zametkin AJ. Health hazard of radiation exposure in the sontext of brain imaging research: special consideration for children. *J Nucl Med* 1998;39:689-98.
15. Youngblom JH, Wiencke JK, Wolff S. Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutat Res* 1989;227:257-61.
16. Shadley JD, Wolff S: Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 1987;2:95-6.
17. Kelsey K, Memisoglu A, Frenkel D, Liber H. Human lymphocytes exposed to low doses of x-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis. *Mutat Res* 1991;263:197-201.
18. Rigaud O, Moustacchi E. Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms fo the adaptive response. *Mutat Res* 1996;358:127-34.
19. Sadekova S, Lehnert S, Chow TY. Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol* 1997;72:653-60.

제 2 부

방사선에 의한 Early Effect 규명

요 약 문

I. 제 목

방사선에 의한 Early Effect 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

방사선이 DNA 및 세포에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 많으나 이에 대한 체계적인 연구가 국내에는 거의 시도되고 있지 않다. 또한 방사선의 이러한 early effect에 의해 late effect (암 또는 기형)가 발전됨은 이미 잘 알려진 사실이다. 또한 향후 일어날 가능성이 있는 방사선 피조사에 의한 장해 대책 강구의 필요성이 증가함에도 불구하고 현재 국내에는 이에 대한 의료전달체계 및 의료대책이 전무한 실정이며, 피조사된 사람에게 나타날 수 있는 질병의 양상과 방사선과의 유관성을 판별할 수 있는 기초 생물학적 지표가 확립되어 있지 않다. 따라서 방사선에 의한 early effect를 규명하고 이를 유도하는 유전자를 규명함으로써 향후 방사선 피폭 진단을 위한 새로운 진단법의 개발 및 손상의 극복, late effect로의 진행을 예측, 이를 예방할 수 있는 근거를 제시할 수 있으리라 사료된다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. PKC Isozyme별 Dominant/Negative Vector의 제작

2. Stable overexpressing cell line 제조

NIH3T3 cell에 제작한 PKC isozyme mutant vector를 이입시켜 transfectant를 확립하였다.

2. PKC Isozyme별 Adenoviral Vector의 제작

GAG promoter가 함유된 Cosmid Cassette를 이용하여 PKCalpha, delta 및 eta의 유전자를 이입시켜 adenoviral vector를 제작하였다.

3. 피부 조직 및 상피세포의 분리

신생 Balb/c newborn 마우스에서 피부를 분리한 후 trimming 하여 파라핀 포매하였고 조직학적 및 면역조직학적 염색을 시행하였다. 또한 상피세포를 분리하기 위해 하룻밤동안 trypsin 처리를 하여 epidermis와 dermis를 분리한다. 분리된 epidermis를 0.12 mM Ca^{++}농도의 배지에서 plate하여 하룻밤동안 dish에 부착시킨다. 배지를 0.05 mM Ca^{++}농도의 배지를 교환한 후 1-2일 후에 감마선을 조사한다.

4. Co-Immunoprecipitataion

단백질을 추출한 후 Lysis buffer속에서 primary antibody와 반응하고 이어서 첨가된 protein A-sepharose에 primary antibody를 매개체로 결합하게 하게 만든다. 이어 lysis buffer로 washing을 5회 정도 반복하였고 순수 분리된 단백질을 SDS-sample buffer로 denaturation한 후 SDS-PAGE로 해리하였다. Nitrocellulose membrane에 trnasfer한 후 원하는 protein에 대한 항체로 western blotting하여 그 protein과 interaction하는 protein을 검출하였다.

5. Immune Complex Kinase Assay

단백질을 추출한 후 Immunoprecipitation을 실시하였다. Precipitation된 protein A-Sepharose beads를 lysis buffer로 3회 washing 한후 다시 kinase buffer (20mM Tris, pH7.5, 4mM MgCl2)로 2회 washing하였다. Beads를 2X kinase butter로 resuspension한고 3 uCi의 ^{32}P-ATP와 substrate (2 ug)를 첨가하여 37C 30분간 반응하였다. 순수 분리된 단백질을 SDS-sample buffer로 denaturation한 후 SDS-PAGE로 해리 하였다. Gel dryer를 이용하여 건조한 후 autoradiography하였다.

6. 세포의 Senescence 측정을 위한 SA-β-gal 염색법

Dulbecco's modified eagle medium에서 활발하게 자라는 mouse embryo fibroblast (MEF) 세포에 방사선을 조사한 다음 5-7 일 뒤에 senescent β-gal staining을 실시한다. 세포를 PBS로 씻어준 뒤 2% formaldehyde/ 0.2% glutaraldehyde로 5분간 실온에서 고정시킨다. 세포를 PBS로 2번 세척한 뒤 X-gal staining 용액(X-gal 1㎎/㎖, ferricyanide 5mM, ferrocyanide 5mM, $MgCl_2$ 2mM in PBS)을 넣고 37℃에서 overnight 반응을 시킨 후 세포를 PBS로 씻고 2% formaldehyde 용액에 보관한다. 이때 파랗게 염색된 세포와 염색되지 않은 세포를 정량화 하여 senescence에 들어간 세포의 비율을 계산한다.

7. In situ FISH에 의한 telomere 측정

Slide 위에 적하한 metaphase chromosome을 슬라이드에 준비한 후 Zilmernan의 발

굴 et al., 준비한 슬라이드는 -20° C에 보관하며, 최소 3시간 이상의 건조 후 실험에 들어간다. 우선 슬라이드를 PBS로 씻어낸 후, 4% formaldehyde/PBS 로 2분간 고정화한다. PBS로 5분동안 3회로 씻어낸 후, 10mM HCl에 1 mg/ml 농도로 녹인 펩신을 37° C에서 10분간 처리한다. 펩신처리 후 PBS로 간단히 씻어내고 다시 4% formaldehyde로 고정화한다. 이후 PBS를 이용하여 5분간 3회 씻어낸 후, EtOH 70%, 85%, 100%를 이용하여 슬라이드를 건조한다. 건조된 슬라이드에 hybridization mixture 〔10mM Tris-HCL pH 7.2 70% formamide, 1% blocking reagent, telomere probe (Oncor, USA)〕 30λ 씩 떨어뜨린후, 80° C에서 3분간 열처리하여 single strand 화하여 실온에서 2시간 반응시킨다. 슬라이드를 70% formamide/10mM Tris (pH 7.2)로 15분간 2회 씻어내고, 다시 0.05% triton X-100이 담긴 PBS로 5분간 3회 씻어낸다. Propidium iodide로 3분간 counter staining하고, PBS로 씻은후 EtOH 70%,85%,100%로 슬라이드를 건조한 후 fluorescent microscope을 이용하여 chromosome끝의 telomere signal을 관찰한다.

8. 세포주기 변화 관찰

세포 현탁액 $5X10^5$/ml을 조사한 후, 다양한 시간간격으로 배양 후 각 세포 그룹을 PBS로 잘 세척하고 Propidium iodide 형광시약으로 DNA를 염색 후 flowcytometry를 실시하여 G1, S, G2/M phase 변화를 관찰한다.

9. 8-hydroxyguanine 수복효소 mutant 세포주 확보

본 연구팀에서는 8-hydroxyguanine 수복효소의 유전자 OGG1에 돌연변이가 일어난 mutant 세포주를 탐색하였다.

10. 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정

발견한 hOGG1 mutant 세포주와 wild type 세포주로부터 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정하여 두 세포주간에 활성 정도를 비교하였다. 두가지 작용, 즉 8-hydroxyguanine이 존재하는 부위에서 DNA를 절단하는 작용 즉, endonuclease 활성과 8-hydroxyguanine을 DNA strand로부터 free base로 제거하는 작용 즉 glycosylase 활성을 동시에 가지고 있으므로 두가지 활성을 측정하였다.

11. 세포내 8-hydroxyguanine 정량

8-hydroxyguanine의 양을 다음과 같은 방법으로 측정하여 방사선 조사에 의 한 hOGG1 mutant 세포주와 wild type 세포주간에 세포 DNA에 생성된 8-hydroxyguanine의 양을 비교하였다.

12. 방사선 조사에 의한 세포손상

방사선조사에 의한 세포손상의 차이를 세포주기 변화 및 세포사 (특히 apoptosis) 측면에서 관찰하여 hOGG1의 wild type과 mutant type 세포주간에 그 세포 손상 정도차이를 비교하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

● PKC isozyme별 (alpha, delta, epsilon, zeta) dominant/negative mutant를 제작하여 NIH3T3 mouse embryo-fibroblast cell에 transfection하여 established cell line을 확립하였다.

● 마우스 정상상피세포에 PKCalpha adenovirus를 infection 하였을 때 morphology에서 분화가 유도되었고 분화관련 단백질 발현이 증가되었다.

● 방사선에 의한 세포주기조절 기전 연구

본 연구에서는 방사선에 의한 세포주기 조절에 관여하는 단백질들의 발현 및 활성을 중심으로 정상세포에서의 방사선조사에 다른 세포주기의 조절 기전을 연구하였다. 방사선 조사 후 생쥐 정상세포는 G2/M 기로의 축적이 일어나는 것을 보였고 G2기로부터 M 기로의 전이에 필요한 많은 단백질들의 발현 및 활성이 변화하는 것으로 나타났다.

● 방사선에 의한 세포의 senescence과정은 telomere의 소실을 수반하였다.

● 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정

발견한 hOGG1 mutant KG1 세포주와 wild type U937 세포주로부터 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정한 결과 wild type U 937 세포주에 비하여 mutant KG 1 세포주의 경우 8-hydroxyguanine이 존재하는 부위에서 DNA를 절단하는 작용 즉, endonuclease 활성과 8-hydroxyguanine을 DNA strand로부터 free base로 제거하는 작용 즉 glycosylase 활성이 현저히 저하되었다.

● 세포내 8-hydroxyguanine 정량

방사선 조사에 의한 hOGG1 mutant 세포주와 wild type 세포주간에 세포 DNA에 생성된 8-hydroxyguanine의 양을 비교한 결과 KG1 세포의 경우 U937보다 세포 DNA에 생성된 8-hydroxyguanine의 양이 현저히 높았다.

● 방사선 조사에 의한 세포손상

① 세포사 관찰 측정

세포사의 정도를 MTT방법, trypan blue 및 [^{3}H]-thymidine 방법을 이용하여 측정한 결과 KG1 세포의 경우 U937보다 dose별로 방사선 조사에 의한 세포 민감성이 현저히 높았다.

② 세포주기 변화 관찰

세포 현탁액 5X10^5/ml을 조사한 후, 12-24-48 시간 배양 후 각 세포 그룹을 PBS로 잘 세척하고 Propidium iodide 형광시약으로 DNA를 염색 후 flowcytometry를 실시하여 G1, S, G2/M phase 변화를 관찰한 결과 KG1 세포의 경우 U937보다 G2/M phase의 arrest가 높게 나타났다.

③ apoptosis 관찰 측정

Flowcytometry를 실시하여 hypodiploid DNA영역을 측정하므로서 apoptosis 생성을 정량한 결과 KG1세포의 경우 U937보다 hypodiploid DNA 생성양이 높게 나타났다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 방사선의 감수성 유전자의 확보
- 방사선의 초기 영향을 규명함으로서 기형 및 발암과의 관련성 규명
- 방사선 인체영향의 기초자료

S U M A R Y

I. Project Title

Elucidation of Early Radiation Effect and its Mechanism

II. Objective and Importance of the Project

There are many radiation-induced early responses was proposed, however, it is still unclear in relation with teratogenesis or carcinogenesis. Radiation effect is divided into two mechanism; one is direct DNA damage and the other is indirect effect by oxygen radicals. Radiation induces single and double strand breaks in DNA and induction of DNA break is generally considered to be a lethal event. Radiation also damages the cell membrane, inducing pathways that may lead or contribute to cell death. Radiation-induced damage leads to cell death by two mechanisms: apoptosis, an active process of cellular suicide, and necrosis, a process generally regarded as passive, which, in the case of radiation injury results from passage through mitosis of cells containing unrepaired DNA breaks. Several genes or proteins such protein kinase C, immediate early genes (c-fos c-jun, and NFkB, etc), cell cycle regulation and chromosome instability are known to involve in these process. Cellular damage by irradiation is mediated by oxygen radicals, especially causing serious damage in DNA. DNA damages by oxygen radical are various, however, among them, 8-hydroxyguanine forming by hydroxylation at 8-position of guanine may be the marker of DNA damage and mediator of mutagenesis. 8-hydroxyguanine is easily forming as well as detecting in tissue by irradiation and is possible to use the indicator of DNA damage. Also, 8-hydroxyguanine mismatch with A instead to C, inducing GC→TA

transversion and activate the oncogene by GC→TA transversion, finally transforming benign tumor to malignant cancer. But, until now, it is not yet elucidated how formation of 8-hydroxyguanine contribute to the harmful effect by irradiation. The answer to this question is very important. In this study, we examined the number of target genes which are involved in radiation induced early effect and elucidated their mechanism.

III. Scope and Contents of the Project

Cell Culture and Materials: Primary mouse epidermal keratinocytes and skin tissue were isolated from BALB/c mice and keratinocytes were grown in Eagles minimal essential medium with 8% Chelex-treated fetal calf serum, 0.2% penicillin/sreptomycin solution, and 0.05 mM Ca^{2+} to maintain a basal cell-like population of undifferentiated cells.

Irradiation: Cells were plated in sterile 10 cm dishes and incubated at 37℃ under humidified, 5% CO_2-95% air in culture medium. Gamma ray from ^{60}Co theraton-780 teletherapy unit at a dose rate of 119.7 cGy/min was irradiated to the cells and prewarmed media were changed after irradiation.

Cell cycle analysis : For cell cycle analysis, cells were fixed in 80% ethanol at 4℃ for at least 18 hr. The fixed cells were then washed once with PBS-EDTA and resuspended in 1 ml of PBS. After the addition of 10 ml propidium iodide solution (5 mg/ml) and 10 ml RNase (10 mg/ml), the samples were incubated for 30 min at 37℃ and analyzed with a FACScan flow cytometer.

Immunoblotting: The cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped into SDS sample buffer, boiled, and run immediately on 8.5% polyacrylamide gels. Proteins were transferred electorphoritically to nitrocellulose, and the membranes were blocked in 5% milk. Pirmary antibodies for specific antigens

were used and proteins were detected using the ECL system with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody.

Immunoprecipitation and immune complex kinase assay. Immune complex kinase assay was performed as previously described. Briefly, cell lysates were incubated with a primary antibody, and immunocomplexes were collected on protein A-Sepharose beads and resuspended in kinase assay mixture containing [^{32}P] ATP and histone H1 as substrates. The proteins were separated on the SDS-polyacrylamide gels, and bands were detected by autoradiography.

Detection of apoptosis: For the detection of apoptotic cells, the cells were plated on glass slides and irradiated with 4 Gy. After 12 or 24 hr, cells were fixed for 20 min in 3.7% formaldehyde, and washed with phosphate-buffered saline (PBS). The cells were incubated with Hoechst 33258 solution in PBS (4 mg/ml) for 30 min at room temperature in the dark. Specimens were analyzed with a Bio-Rad MRC-600 confocal imaging system mounted on a Nikon Diaphot-TDM. The percent of apoptotic cells were determined.

Chromosomal instability is a central of the changes of cellular contents by irradiation. Recent advances in telomere biology have been exiting and have pointed to telomeres as important elements for cell survival, senescence, ageing, etc. through the controlling chromosomal stability. The direct connection between chromosomal stability and radiation-induced phenotype such as senescence was suggested in the present study through investigating telomere breakage by irradiation.

Establishment of mutant of 8-hydroxyguanine repair enzyme

Our team screened the mutant type of cell lines in 8-hydroxyguanine repair enzyme of OGG1 gene and tried to use in this studies.

Detection of activity of 8-hydroxyguanine repair enzyme

We tried to compare to repair activity between wikd type and mutant type of cell line in OGG1 gene by detecting the activity of hOGG1 mutant type and wild type. The enzyme was assayed both for glycosylase actvity to remove 8-hygroxyguanine from DNA strand and for endonuclease activity to cleave the DNA strand at the site of 8-hydroxyguanine.

① Endonuclease activity :

Two 21mer oligonucleatide one is containing 8ohG was and the other is containing G at the site of 8ohG were labeled with 32P at the 3 terminus and annealed with unlabeled complementary oligonucleotide. Each of the duplex DNAs (0.2 pmol) was incubated with the cell extract (50 g protein) in 20 ul of 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA (pH 7.5) at 37 ℃ for 15 min. Cleaved fragments of substrate DNA at the position of 8ohG were detected by autoradiography. G*/C : duplex DNA containing 8ohG and G/C: duplex DNA containing G at the position of 8ohG. The arrow indicates the fragment cleaved at the position of 8ohG.

② Glycosylase activity :

A 21-mer stranded oligonucleotide containing 8ohG (5'-CAGCCAATCAGTG*CACCATTC-3': G* 8ohG) was chemically synthesized (The Midland Certified Reagent Co., Medland, TX). The oligonucleotide was annealed with its complementary oligonucleotide and the resulting duplex DNA was used as the substrate for this assay. The duplex substrate DNA (4 pmol) was incubated with the cell extracts (2 mg protein) at 30 ℃ for 2 h in 1 ml reaction mixture (50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 1 mM EDTA, pH 7.5). The reaction was terminated by heating at 90 ℃ for 3 min. The amount of 8ohG released into reaction media were assayed.

Quantification of 8ohdG level

DNA was extracted using the DNA Extracter WB Kit and digested with nuclease P1 and alkaline phosphatase in a 10 mM sodium acetate solution at 37

℃ for 60 minutes. After incubation, the mixture was centrifugated at 13000 rpm for 5 mins. The supernatant was filtrated by a filter tube and injected onto an high performance liquid chromatography column equipped with an electrochemical detector. As standard samples, deoxyguanosine and 8-hydroxydeoxyguanosine solution were injected. The value of 8ohdG was calculated as the number per 10^5 dG.

Cellular damage by irradiation

① Detection of cellular cytotoxicity

After irradiation of cell suspension ($5X10^5$/ml) at various dose, irradiated cell suspension was incubated for 96 h and the cellular cytotoxicity was detected using MTT method, trypan blue and [^{3}H]-thymidine uptake method.

② Cell cycle analysis

Flow cytometric analysis of DNA content was performed to assess the cell cycle phase distribution. 1 x 10^6 cells per sample were harvested at various times and fix for 1 hour at 4 ℃ with 1 ml of 70 % ethanol. Cells were washed twice with PBS buffer and incubated in the dark with 100 ug/ml propidium iodide and 100 ug/ml RNAse A at 37 ℃ for 30 minutes. Analysis was performed with a FACSCalibur flow cytometer. The computer program Cell Quest and Mod-Fit was used to generate histograms, which were used to determine the cell cycle phase distribution.

③ Apoptosis assay

Flow cytometric quantification of apoptotic cells within the propidium iodide stained population was measured as sub-G1 hypodiploid cells. 1 x 10^6 cells per sample were harvested at various times and fix for 1 hour at 4 ℃ with 1 ml of 70 % ethanol. Cells were washed twice with PBS buffer and incubated in the dark with 100 ug/ml propidium iodide and 100 ug/ml RNAse A at 37 ℃ for 30 minutes. Analysis was performed with a FACSCalibur flow cytometer. The computer program Cell Quest and Mod-Fit was used to generate histograms, which were used to determine the cell cycle phase distribution.

IV. Results

1. Transfectant of PKC (alpha, delta, epsilon, and zeta) dominent/negative mutant was prepared using NIH3T3 mouse.

2. Adenoviral system of PKC (alpha, delat, and eta) was established.

3. When PKCa adenovirus was infected to primary keratinocytes, differentiation was induced morphologically and differentiation marker expression was increased.

4. Radiation increased G2/M phase arrest which is related to the expressional and localizaional changes of G2-phase cell cycle regulators.

5. Cellular senescence by irradiation was accompanied by telomere fragmentation

Gradual loss of telomere ends limits the growth capacity of primary cells, and ultimately leads to the cellular senescence. Since it has been reported that telomere-associated cellular senescence may contribute to certain age-related disorders, we investigated whether irradiation-mediated cellular senescence might be related with telomere dysfunction. MEFs exposed to r-irradiation exhibited the severe morphological changes associated with cellular senescence, which was confirmed by SA-β-gal staining. In situ FISH revealed that massive fragments of telomere were produced at the same dose of irradiation, indicating that cellular senescence by irradiation might be related with telomere fragmentation.

6. Establishment of mutant of 8-hydroxyguanine repair enzyme

We found a point mutation in hOGG1 gene of KG-1 cells, which was CGA→ CAA (Arginine→glutamine) at codon 229.

7. Detection of activity of 8-hydroxyguanine repair enzyme

We compared the activity of hOGG1 enzyme of KG-1 with that of U 937, having wild type of hOGG1 gene. hOGG1 enzyme was assayed in terms of glycosylase activity and endonuclease activity). KG-1 as compared to U 937 was almost negligible in both glycosylase activity and endonuclease activity.

8. Quantification of 8ohdG level

We examined the level of 8-hydroxyguanine using UV/ECD-HPLC in cellular genomic DNA at day 3 after irradiation. KG-1 cells contained more amount of 8-hydroxyguanine (0.22 8-hydroxyguanine/10^5 deoxyguanine) than that of U 937 (0.05 8-hydroxyguanine/10^5 deoxyguanine). It suggest that formation of 8-hydroxyguanine by irradiation showed significant different between wild type and mutant type of hOGG1 gene.

9. Cellular damage by irradiation

① Detection of cellular cytotoxicity

The effect of r-ray irradiation on the growth of U 937 and KG 1 cell lines were assessed using MTT test at day 3 after irradiation at various doses. At this date, indeed, we observed a pronounced effect between the two cell types. The cell growth of U 937 was not affected, but KG 1 cell was inhibited at the dose dependent manner of irradiation. we also determined the effect of oh8dG on the cell growth by trypan blue exclusion and [^{3}H]thymidine incorporation to confirm completely the effect of cell growth by irradiation. These result are significantly consist with MTT test. Therefore, from these results, we found that KG 1 cell showed more sensitive than U 937 cell by irradiatiojn.

② Distribution of phases of cell cycle after r-ray irradiation

Having demonstrated that irradiated KG 1 cells resulted in significant levels of oh8G in cellular DNA comparing with U 937, we observed the effects of 8ohdG in cellular DNA on cell cycle. Cells were harvested at day 3 after irradiation and analyzed by flowcytometry. Percentage of G2/M phase of irradiated KG 1 cell increased significantly and also distribution of S phase is not found. However, In case of irradiated U 937, Percentage of G2/M phase increased a little and distribution of S phase is not changed compared with non-irradiated control. It suggests that KG 1 cell seriously need to have the repair time because of increased 8ohdG in cellular DNA by irradiation. Because KG 1 cell have the loss of repair activity against 8-ohdG in cellular DNA in spite of the arrest of the G2/M phase, prolonged G2/M phase arrest contributes

to the accumulation of radiation-induced DNA damage and activation of the pathways to cell death by apoptosis finally.

③ Cell death by irradiation induce apoptosis

The decrease in KG 1 cell counts, and change in cell appearance following exposure to irradiation suggested that resulted in programmed cell death, i.e. apoptosis. To further investigate this possibility, flow cytometric analysis were performed on two cell lines at day 3 and day 6 after irradiation. We found that oh8dG induced sub-G1 hypodiploid cells (apoptotic cells) in two cell lines, however, the population of sub-G1 hypodiploid cells is higher in KG 1 cells than in U 937, 17 % and 5 % at day 3 respectively and this tendancy at day 3 after irradiation is consistent with at day 6.

V. Application plan of project result

We suggest the useful possibility of 8-hydroxyguanine, PKC, cell cycle regulators, and telomerase as indicator of cellular damage by showing the different sensitivity to the irradiation.

목 차

제 1 장 서 론---------- 153

제 2 장 국내외 연구 동향---------- 159

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과---------- 169

제 1 절 연구내용 및 방법---------- 169

제 2 절 연구결과 및 고찰---------- 174

제 4 장 연구개발 목표 및 달성도---------- 179

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획---------- 181

제 6 장 참고 문헌---------- 183

그 림 목 차

Figure 1. Construction of dominant negative mutants of PKC ---------- 193
Figure 2. Establishment of PKC mutant construction transfected cells ---------- 194
Figure 3. Structure of PKC-adenovirus vector ---------- 195
Figure 4. Overexpression of adenoviral PKCalpha induces morphological changes ---------- 196
Figure 5. Overexpression of adenoviral PKCalpha increases differentiation marker, filaggrin expression ---------- 197
Figure 6. Cell cycle distribution following ionizing irradiation in L929 cells --------- 198
Figure 7. Expression of localizational changes in G2-associated molecules by ionizing irradiation ---------- 199
Figure 8. Expression of localizational changes in p21 by ionizing irradiation ---------- 200
Figure 9. Induction of cellular senescence by gamma-radiation ---------- 201
Figure 10. Telomere fragmentation by gamma-irradiation ---------- 202
Figure 11. Activity of hOGG1 enzyme in KG-1 and U937 ---------- 203
Figure 12. The level of 8ohdG amount into cellular DNA ---------- 204
Figure 13. Cytotoxic effect of gamma irradiation on KG-1 and U937 ---------- 205
Figure 14. Cell cycle distribution by irradiation on KG1 and U937 ---------- 206
Figure 15. Formation of hypodiploid DNA by gamma-irradiation ---------- 207

제 1 장 서 론

방사선의 감수성은 세포의 종류뿐 아니라 개개인에 따라 매우 다양하게 나타나는 것으로 보고되고 있다. 현재까지 방사선의 감수성을 결정하는 요인으로 Apoptosis라는 세포사가 주 인자로 인식되고 있으며 Apoptosis를 조절하는 인자로는 현재까지 수없이 많은 유전자가 알려져 있다. 그러나 방사선에 specific한 세포사 조절 유전자 및 기전에 대한 연구는 아직 미흡한 편이며 암세포의 감수성을 증가시키기 위한 노력을 많이 시도되고 있으나 정상세포의 방사선 감수성 조절에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않은 실정이다. 또한 방사선의 발암 및 기형의 유발은 방사선의 초기 영향이 조절되지 않아 진행되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 방사선의 초기영향을 알아보고 이러한 초기영향을 조절함으로서 방사선의 감수성을 조절하고자 한다. 이를 위해 cell membrane signal인 Protein kinase C (PKC) isozyme, 세포주기조절, repair enzyme 및 chromosome instability에 관여하는 telomerase를 대상으로 방사선 감수성을 평가한 후 이들의 조절을 유도하고자 한다.

PKC는 세포의 성장, 분화 및 정상세포의 암세포 전환에 관여하는 여러 유전자의 복합체로서 현재까지 12개의 isozyme이 있는 것으로 알려져 있다. PKC isozyme은 크게 3개의 군으로 나눌수 있는데 Ca^{2+}에 의존적인 classical PKC군 (cPKC α, βI, βII, γ), Ca^{2+}에 비의존적인 novel PKC군 (nPKC δ, ε, η, θ) 및 diacylglycerol (DAG) 또는 phorbol ester에 비의존적인 atypical PKC군 (aPKC ς, λ)들이다. classical PKC군은 3개의 domain으로 구성되어 있는데 2개의 cystein-rich zinc finger like motif를 가진 C1 domain과 Ca^{2+}에 반응하는 C2 domain 및 catalytic domain인 C3 domain이며 이러한 효소가 활성화되기 위해서는 Ca^{2+}, phospholipid 및 diacylglycerol (DAG) 등을 필요로 한다. novel PKC군은 C2 domain이 결여되어 Ca^{2+}에 반응하지 않으며 atypical PKC군은 cystein rich domain인 C1 domain이 1개밖에 존재하지 않고 C2 domain도 결여되어 있어 Ca^{2+} 및 DAG에 반응하지 않는다. PKC isozyme의 존재 및 조직마다 PKC isozyme의 분포가 다른 것은 이러한 isozyme의 역할이 세포내에서 다르게 작용한다는 것을 시사한다. 방사선에 의한 apoptosis와 PKC 발현과의 상관관계는 여러 가지 일치된 결과를 보여주지 않고 있다. 방사선에 의해 α 및 ε 등의 변화가 보고되고 있으나 아직까지 방사선 감수성과 각각의 PKC isozyme과의 관계에 대해서는 잘 알

려져 있지 않다.

정상 상피세포는 4개의 phenotypic stage를 가지는데 분화가 진행되면 세포가 basement membrane에서 피부의 표면으로 이동됨을 관찰할 수 있다. 피부 상피세포에서는 분화됨에 따라 발현되는 특정 단백질이 있는데 keratine (K1, K10)과 granular cell 단백질인 filaggrin, loricrine, SPR-1 및 transglutaminase등이다. PKC는 상피세포의 분화에 관련된 유전자의 발현을 조절하며 마우스의 상피세포를 Ca^{2+}농도가 0.05 mM에서 0.12 mM로 상승된 배지에서 배양하면 분화가 유도된다. 배지의 Ca^{2+}농도를 올리면 phosphatidylinositol에서 DAG에로의 전환이 촉진되며 이는 PKC activator로 알려진 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)를 처리하였을 때와 같은 현상이다. TPA에 의한 PKC의 활성화는 cornified envelope formation을 촉진하며 spinous cell marker (K1, K10)의 발현은 억제되지만 granular cell marker (loricrin, filaggrin)의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있다. 한 보고에 의하면 상피세포의 분화 과정중에 PKC α, ε, δ의 분포가 변화하였으며 Ca^{2+}에 의한 분화 유도에 PKCα가 필요하다고 하였다.

Cell cycle 은 네 가지 phase로 나누어져 있는데, chromosome duplication이 일어나는 S phase, chromosome segregation이 일어나는 M phase, M phase와 S phase사이에 존재하는 G1 phase 그리고 S와 G2 사이에 놓여있는 G2 phase로 구분된다. Cell cycle event는 한 과정이 완전히 성공적으로 완료되어질 때까지 다른 과정의 수행이 방지되어지는 정밀한 순서로 이루어져 있는 조절 기전에 의해 일어나는데, 예를 들어, chromosome replication은 cell에서 mitosis가 완전히 종료될 때까지 일어날 수 없고, mitosis는 chromosome replication이 종료될 때까지 일어날 수 없다. 이처럼 하나의 cell cycle event는 다른 event 의 종료에 의존하여 나타나는데 이것을 소위 checkpoints라고 부른다. Checkpoints는 cell cycle의 진행을 위하여 반드시 만족되어져야하는 intracellular condition들의 set으로 여겨진다. Cell cycle 동안 많은 checkpoints가 존재하는데, 이것이 독특한 cell cycle event의 수행을 monitoring 한다 (DNA synthesis, spindle assembly, DNA repair 등). 즉, checkpoints는 고쳐지지 않은 error가 존재할 때 cell cycle을 멈추게 하므로써 cell duplication 과정 중의 에러에 대항하는 safeguard로써 작용한다. Hormone이나 growth factor 같은 외부 신호들은 주로 cell cycle의 G1 phase를 통하여 cell proliferation을 조절한다. 예를 들어, mammalian cell은 S phase로 들어가기 2시간 전까지 growth factor들이 요구되는데

cell이 일단 이 point (restriction point)를 지나게되면 그 cell들은 growth factor의 존재 여부와는 관계없이 cell cycle의 진행을 종료할 수 있다. Single organism에서는 nutrient 환경이 이와 유사하게 G1 phase를 통하여 cell proliferation을 조절하는데 예를 들어 yeast에서의 commitment point (Start)는 mammalian cell에서의 restriction point와 아주 유사하게 작용한다. 더구나 restriction point를 조절하는 molecule들 또한 Start를 control 하는 molecule들과 아주 유사하다. 이처럼, cell cycle을 control하는 요소들은 진화과정 통하여 극도로 conservation 되어있다.

방사선조사는 mammalian cell 뿐만 아니라 아메바나 성게 egg 그리고 yeast등의 다양한 cell 들에서 division delay를 야기한다. Mammalian cell에 있어 이러한 delay는 G1 arrest, S phase delay, G2 arrest등 cell cycle의 여러 단계를 통하여 일어난다. 위의 여러 과정들이 방사선에 의한 delay와 관련되어져 있다는 것은 이미 오래 전부터 주지되어온 사실이지만 이들이 복잡한 생화학적 과정이 수반되는 checkpoint를 통한 cell cycle regulation의 기전에 의해 조절되어진다는 사실은 최근 들어서야 밝혀졌다. Mammalian cell에서의 radiation effect에 대한 초기의 일들은 Hela cell 들에서 많이 수행되어졌다. Hela S3 cell을 5 Gy로 irradiation 하면 division delay가 관찰되면서 S phase로 cell들의 accumulation이 일어나는데 이러한 accumulation은 G1에서 S phase로의 cell cycle의 transition rate의 변화에 의한 것이 아니라 DNA synthesis rate의 직접적인 depression의 결과로 일어나는 것이다. 그러나 이 cell을 0.34-1.35 정도의 저준위 방사선으로 조사하면 S phase에서의 duration 나 G1에서 S phase로의 transition의 저해는 나타나지 않지만 조사 1 시간 이내에 metaphase의 빈도가 줄어드는 것을 알 수 있다. Metaphase의 빈도가 방사선 조사 후 1 시간 이내에 감소하기 시작하였으므로 실제 radiation에 의한 억제는 metaphase 1시간 전인 late G2에서 일어날것으로 추정할 수 있다. 또한 dose의 증가에 따라 G2 delay의 duration 또한 함께 증가하는 것으로 나타났다. 한편 synchronization된 Hela S3 cell에 대한 방사선 조사로 관찰된 division delay는 G1에서 조사된 cell에서 가장 낮게 나타났고, G2에 있는 cell에서 가장 높았으며 S phase의 cell에서는 그 중간 정도로 나타났다. G1에서 조사된 cell들은 S phase가 약간 연장되어 나타났으며, G2 phase에 있어서의 delay는 아주 미약한 정도였다. 그러나 S phase나 G2 phase에서 조사된 cell들은 G1에서와는 달리 심각한 G2 delay를 보였다. 또한 S phase에 있는 cell들은 조사 후 S phase의 연장과 함께 DNA 합성정도가 감소되었는데 어느 phase에 있는 cell들도 심

각한 G1 delay를 보이지는 않았다. Chinese hamster V79 cell들은 radiation에 의해 dose-dependent한 mitotic delay를 보이는데 late S에서 조사된 cell들이 가장 민감하였고 G1 phase의 cell 들이 가장 둔감하였으며 G2에 있는 cell들은 그 중간 정도의 mitotic delay를 나타내었다. 이와 아울러 mitotic shake-off로 synchronize된 CHO cell도 방사선 조사에 따라 심각한 division delay를 보이는데 이 delay 또한 dose와 cell cycle 의 진행 정도에 dependent 하였다. 이처럼 방사선은 더 늦은 단계의 cell cycle에 있는 cell 들에서 더 큰 delay 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다 (G1에서 최소, S와 G2에서 최대). 이상의 연구 결과로 볼 때 대부분의 delay는 G2에서의 block에 기인하는 것이고 약간의 delay가 G1이나 S를 통한 progression에서 일어난다. 방사선 조사에 따른 유사한 효과가 mouse L3 cell에서도 관찰되었는데, 이 cell에 20-50 Gy의 방사선을 조사하면 G2에서의 reversible한 block에 기인하는 심각한 division delay가 나타나고, dose를 2.2-5.8 Gy 정도로 감소시켜 조사하면 G1에서 S로의 transition의 delay와 함께 DNA 합성율이 저하되어 나타난다. Human tissue로부터 직접 분리된 cell에서도 이러한 delay에 관한 연구들이 수행되어 졌는데 human bone marrow cell을 5-50 Gy의 dose로 조사하면 G1에서 S phase로의 movement 뿐 만 아니라 DNA 합성율 까지 감소되어 나타나는 반면에 2-3Gy의 낮은 dose는 단지 DNA 합성율에 만 영향을 미친다. Placenta로부터 분리된 turnover가 극도로 느린 diploid human amnion cell은 0.1 Gy 정도의 낮은 dose에서조차도 G1에서 S로의 cell cycle의 흐름이 감소하는데, 이러한 G1에서 S로의 감소는 0.1 Gy부터 3 Gy 까지는 dose dependent하게 나타나고 3-10 Gy 에서는 거의 완전한 G1 arrest를 야기한다.

Chromosome의 말단에 존재하는 telomere는 chromosome간의 fusion을 억제하고 chromosome의 integrity를 유지하는데 중요한 역할을 한다 (Greider 1996). Telomere는 telomerase에 합성이 되며 정상적인 세포는 telomerase의 활성이 없으므로 분열할 때마다 약 50-200 bp의 telomere가 소실되어 분열이 지속되면 telomere의 길이가 일정수준이상으로 짧아지게 되어 세포는 더 이상 성장을 멈추고 senescence 에 들어가게 된다. Telomere와 관련된 세포의 senescence과정은 발암, atherosclerosis, osteoporosis, 체중감소 등과 같은 세포의 노화 (aging) 와 연관성이 있는 질병을 유발할 것으로 추론되고 있다. 한편 방사선이나 항암 요법을 받은 환자에게서 공통적으로 발생하는 발모현상, 머리색의 회색화, 피부 수축 등과 같은 노화현상이 발생하며, 배양 중인 세포에서도 방사선 등에 의하여 세포의 senescence를 수반한 노화 현

상이 진행된다. 따라서 본 연구에서는 방사선에 의하여 발생하는 세포의 senescence 현상이 telomere의 기능 상실과 관련이 있는지 알기 위하여 mouse embryo fibroblast (MEF) 세포를 이용하여 이의 연관성을 조사하였다.

방사선 조사에 의한 세포손상은 산소 라디칼에 의하여 매개되며 이로 인한 세포 손상 가운데 세포기능에 가장 심각한 영향을 주는 것은 DNA손상이라고 할 수 있다. 왜냐하면 DNA손상은 수복(repair)되지 않고 축적될 경우 발암의 요인이 되기 때문이다. 산소라디칼에 의한 DNA 손상에는 여러가지가 있으나 이중 guanine 염기의 8번 위치에 수산화반응 (hydroxylation)으로 생성된 8-hydroxyguanine는 방사선에 의한 DNA 손상 지표는 물론 발암매개인자로서의 의미를 가지고 있다. 8-hydroxyguanine는 기타의 DNA손상과는 달리 방사선 조사에 의하여 생체조직에서 쉽게 형성될 뿐만 아니라 또한 그 검출이 용이하여 손상 지표로 가능하다. 또한 8-hydroxyguanine은 C대신 A으로 mismatch하여 GC→TA transversion을 유발하고 또한 GC→TA transversion에 의하여 oncogene을 활성화시켜 양성세포를 악성세포로 변화시켜 발암매개 역할을 한다. 그러나 현재까지 방사선 조사에 의한 유해작용에 DNA의 8-hydroxyguanine 생성이 얼마나 기여하고 있는 지는 아직 확실히 밝혀져 있지 않고 있다. 이 의문에 대한 해답은 매우 중요한 의미를 가지는데 그 이유는 방사선 조사의 유해작용이 산소라디칼에 의한 DNA손상이라는 사실은 잘알려져 있지만 구체적으로 어떠한 DNA손상에 기인하는 지가 알려져 있지 않기 때문이다.

이 연구를 위해서는 8-hydroxyguanine 수복효소의 결핍 세포가 필수적으로 요구되는데 최근 본 연구진은 8-hydroxyguanine 수복효소의 기능이 상실된 세포주를 발견하였다. 이에 본 연구에서는 wild type과 mutant type 세포주 사이에 방사선 조사에 의한 산화적 DNA 손상, 세포사 및 각종 세포 기능 장애에 대한 차이를 관찰하여 산화적 DNA 수복효소가 방사선 조사에 의한 세포손상에서의 방어 기능을 알아보고자 한다.

본 연구는 방사선의 early effect를 규명하고 이를 극복하고자 하는 노력의 일환으로 시도되었다. 따라서 early effect중 PKC, 세포주기, 노화와 telomere, Repair enzyme 및 기타 다른 signal transduction pathway를 중심으로 이러한 과정에서의 방사선 감수성 조절 및 그의 기전연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

방사선에 의한 세포사 과정에는 necrosis 와 apoptosis가 있는데 최근에 와서 방사선에 의한 apoptosis 세포사에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.. 세포가 apoptosis 과정으로 사망하게 되면 형태학적으로 염색체의 밀집, 핵의 분절 및 apoptotic 소체를 특정적으로 형성한다. 이는 세포내 소기관의 팽창, 세포막의 파괴를 수반한 세포의 붕괴인 necrosis와 뚜렷이 구분된다. 생화학적 측면에서 나타나는 독특한 현상은 핵 DNA의 변화인데 nucleosome을 연결하는 DNA들이 기본단위가 약 185 bp인 nucleosomal DNA fragmentation을 일으켜 agarose 전기영동상에서 독특한 DNA ladder를 형성한다. 이러한 DNA fragmentation은 Ca^{2+}, Mg^{2+}-dependent endonuclease에 의한 것임이 잘 알려져 있다. 저준위 방사선 조사에 의한 세포 생존의 연장, 세포 증식의 증대, DNA fragmentation의 감소 등이 보고되고 있다.

● 외국에서는 방사선 조사후 induction 되는 유전자들에 대한 연구가 시도되어 p21, Gadd45가 cell cycle regulation 에 관여하며 transcriptional regulation 에는 jun, fos, p53 등이 관여한다고 보고하고 있다. 그외 AT 세포를 이용하여 NFkB가 signal transduction pathway 에 관여함도 밝혀내는 등 최근 분자 생물학 기법의 발견으로 방사선 신호전달 체계에 대한 연구가 더욱더 활발히 진행되는 추세이다. 국내에서는 최근까지도 방사선 생물학에 대한 연구가 미흡한 실정이었으나 최근 방사선 생물학 연구회를 중심으로 광범위한 정보 교환 등으로 연구를 펼치고 있는 상태이다. 국내에서는 아직까지 방사선 신호전달 체계에 대한 연구가 전혀 시도되고 있지 않은 상태로 이러한 연구에 투자하는 것은 매우 의미 있는 일로 생각되며 실험 자체도 과다한 비용을 요하지 않은 실험임. 향후 Rheb, PKCl 의존 유전자를 규명하여 novel gene이 발견될 경우 gene therapy에 응용이 가능하며 그 경우 cloning 된 gene 들을 대량 생산하고 수출하게 되면 매우 유용한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

● **Ionizing Radiation에 의한 Cell Cycle의 조절**

G1 arrest

방사선 조사에 따른 G1 arrest는 모든 cell line에서 나타나는 것이 아니다. 그러나

방사선 조사에 따른 G1 arrest는 p53의 상태에 의존적이다. Kaston등에 따르면 ML-1 myoblastic leukimia cell에 0.5-4 Gy의 radiation을 주면 G0/G1 과 G2/M 에서 cell들의 accumulation이 일어난다. G1 arrest는 낮은 dose에서 우세하게 나타나고 높은 dose에서는 G2 arrest가 우세하게 나타난다. 또한 S phase에서 조사된 cell들은 G2/M으로 진행이 저해되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 방사선 조사에 따른 G1 arrest에서 주된 역할을 하는 것은 p53 protein으로 알려졌다. 실제로 p53 protein level은 방사선 조사 후 1-2시간에 올라갔다가 48-72시간정도에 정상으로 돌아온다. Northern blot으로 볼 때 p53 mRNA의 변화는 없기 때문에 이러한 증가는 posttranslational modification에 따른 단백질 자체의 stability에 의한 것으로 사료된다. 방사선조사에 따른 다른 hematopoietic cell과 non-hematopoietic cell lines (human fibroblast, colorectal carcinoma cells, osteosarcoma cells)의 반응은 주목할 만 하다. 일반적으로, ML-1 같이 wild type p53을 발현하는 cell line들은 radiation-induced G1 arrest를 나타내지만 mutant p53이나 p53이 없는 cell line들은 G1 arrest가 나타나지 않는다. 반대로 radiation에 의한 G2 arrest는 p53 상태와 상관없이 나타난다. 게다가 wild type p53을 발현하는 RKO cell 내로 mutant p53을 transfection하면 radiation에 의한 G1 arrest가 줄어든다. 반대로 p53이 없고 radiation-induced G1 arrest를 보이지 않는 HL-60 cell로 wild type p53을 transfection하면 그 arrest가 부분적으로 restore된다. Kastan등은 p53과 radiation-induced arrest 사이의 연관성을 wild type p53 gene이 deletion된 p53 knock-out transfenic mice를 이용하여 조사하였다. 이 mice는 특정한 tumor (특히 lymphoma 와 sarcoma)에 대한 빈도가 높다는 것만 제외하면 정상과 마찬가지로 발생한다. Intact한 p53 gene을 가지는 정상 mice로부터 분리한 fibroblast는 2-4 Gy 조사 후 뚜렷한 G1 arrest를 나타낸 반면, p53 유전자가 deletion된 mice로부터 분리된 fibroblast는 G1 arrest가 나타나지 않았고, 단지 하나의 정상 p53 유전자를 가진 mice로부터의 fibroblast는 그 중간정도의 반응을 나타내었다. p53의 effector molecule은 p21과 gadd45로 알려져 있는데, 위에서도 언급한 바와 같이 방사선 조사 후 p53에 의해 발현이 증가된 p21은 CDK들의 활성을 억제하므로 써 cell cycle arrest에 그 기능을 하는 것으로 여겨진다. G1 arrest에서의 Gadd45의 역할에 대한 연구 또한 다양하게 이루어졌는데, Gadd (**g**rowth **a**rrest and **D**NA **d**amage-inducible) 유전자들은 alkylating agent와 같은 DNA 손상 agent인 MMS (Methylmethansulfonate)나 serum starvation과 같은 성장을 저해하는 신호에 의해 CHO cell에서의 발현이

현저히 증가한다. 이들 중 하나의 유전자인 Gadd45는 human cell에서 발견되어 졌는데 다른 Gadd 유전자와는 다르게 X-irradiation에 의해 강하게 유도되어지는데 2Gy 정도의 낮은 dose 에서도 irradiation 후 gadd45 mRNA가 3-4배 정도 증가함을 볼 수 있다. Kaston등은 p53의 상태와 gadd45 mRNA induction 사이의 상호 연관성을 발견했는데, 정상 p53를 가진 cell line은 20Gy로 irradiation해서 4 시간 후 2-10배의 gadd45의 증가를 보인 반면, 비정상인 p53을 가진 세포들은 gadd45의 induction이 나타나지 않았다. p53 response가 없는 ataxia telangietasia를 가진 환자로부터 분리된 cell들 또한 gadd45 mRNA의 induction은 관찰되지 않았다. DNA sequence analysis결과 gadd45의 세 번째 intron이 p53 binding sequence와 높은 상동성을 가진 sequence를 가진다는 것을 알게되었다. 실제 이 sequence를 가진 oligomer에 wild type p53는 결합할 수 있으나 mutation된 sequence에는 결합하지 못하는 것으로 나타났다. 또 이 sequence를 이용한 CAT assay 결과 wild type p53 만이 CAT의 transcription을 조절 할 수 있다고 보여졌다. 그러므로 gadd45 또한 G1 arrest에 필수적인 신호전달 과정에서 p53의 downstream factor로 작용하는 것으로 생각 할 수 있다. p53 과 G1 arrest간의 연관성은 Burkitt's lymphoma와 lymphoblastoid line을 이용한 O'Connor 등의 실험에서 또한 잘 나타난다. 그들은 6.3Gy의 방사선을 조사한 후 완전한 G1 arrest가 나타나는지를 두 cell line에서 관찰하였는데, 두 cell line 모두 intact한 p53을 가졌음에도 불구하고 G1 arrest되는 능력은 높지 않았다. Western blot결과 이 두 cell line들은 radiation 후 p53의 induction 정도가 아주 낮은 것으로 나타났다. 따라서, irradiation 후 나타나는 G1 arrest는 p53의 상태나 그 induction 정도에 의존적임을 알 수 있다. 비록 G1 arrest가 DNA repair를 증가시키는데 중요한 것으로 사료되기는 하지만, arrest의 loss로 radiodensitivity를 설명할 수는 없다. Kaston의 연구에서 p53 Knock out mice로부터 분리된 fibroblast는 한쪽이나 양쪽 p53 유전자가 deletion되어 있지만 대조군과 비교할 때 radiosensitivity에서는 어떠한 차이도 보이지 않았다. 또한 RKO cell 내로의 mutant p53의 transfection 역시 radiosensitivity에 어떤 영향도 미치지 못했다. 그리고 Little 등은 HPV16 E6 gene의 transfection에 의한 p53 기능의 억제가 human tumor cell 에 있어 radioresistance를 enhance하지 못한다고 보고하였다. 사실, 어떤 경우에는 mutant p53과 G1 arrest의 loss가 radioresistance의 증가와 연관되어 나타나기도 한다. Lee 와 Benstein 등에 따르면 mutant p53을 가진 transgenic mice로부터 나온 bone marrow cell들이 wild type으로

부터 나온 세포들 보다 r-irradiation에 대하여 현저하게 민감함을 보인다 (D0 2.48-2.80 vs.1.75 Gy). 또한, O'Connor등은 lymphoma cell line에서 wild type p53의 loss와 G1 arrest의 loss가 radioresistance와 관련이 있다고 (비록 완벽한 correlation은 아니지만) 주장하였다. 이처럼 서로 상반되는 결과들은 일치시키기는 어렵지만 thymocytes의 연구에서 나온 결과들이 이 문제에 대한 실마리를 제공한다. Wild type p53를 가진 thymocyte는 1 Gy 정도의 dose에 대해서도 극히 민감해서 irradiation 후 1시간 이내에 p53의 급격한 증가를 보이고 apoptotic cell death가 나타난다. 반대로 양쪽의 유전자가 결여된 homozygous null p53 mice로부터의 thymocytes는 glucocorticoid에 노출되었을 때는 정상적인 apoptotic response를 보였음에도 불구하고 20Gy 정도의 높은 dose에도 radiation-induced apoptosis에 극도로 resistance하다 [55, 57]. 한쪽 copy만 intact한 p53를 가진 heterozygous mice로부터의 thymocytes는 중간정도의 민감성을 보인다. 이처럼 lymphocytes나 bone marrow cell 같은 종류의 cell type에서 p53는 radiation에 반응하여 나타나는 apoptosis와 G1 arrest 두 pathway 모두를 trigger하기 위해 중요한 요소이지만, fibroblast 와 같은 다른 cell type에서 p53는 단지 G1 arrest를 개시하는데 있어 중요한 요소로 작용한다. 전자의 경우에서 wild type p53의 손실은 radioresistance를 증가하므로 써 apoptosis의 감소를 유발한다. 그러나 후자의 경우 p53 signal은 apoptosis pathway에 중요한 요소로 작용하지 않으므로 wild type p53 기능의 loss가 radiosensitivity에 영향을 끼치지 못하는 것이다.

S phase delay

Irradiation은 G1 arrest 뿐만 아니라 S phase 진행에서의 지연도 야기하는데 이러한 delay는 DNA 합성율의 감소에 기인하는 것으로 여겨진다. DNA 합성율의 감소는 lower dose에 대한 radiosensitive component와 high dose에 의한 radioresistant component를 가진 biphasic dose response를 보인다. Watanabe group에서 3H-thymidine의 존재 하에서 autoradiography를 이용하여 mouse leukemia L5178 Y cell에서 신장하는 DNA fiber의 길이를 측정하였는데, Do 130 Gy 의 radiation dose로 plot 하였을 때 DNA chain growth의 rate가 감소함을 관찰했다. 그러므로 high dose에 의한 S phase의 delay는 radioresistant component를 통한 DNA chain elongation의 저해에 기인한다는 것을 알 수 있다. 한편 low dose에 의한 S phase delay는

radiosensitive component 의 활성을 통한 replicon initiation의 저해에 기인하는데 Makin과 Okada 는 3H-thymidine으로 L5178Y를 pulse-label하고 그 DNA를 alkaline sucrose gradient sedimentation하여 5Gy의 radiation이 DNA 합성률의 감소를 야기한다는 것을 보였다[61]. 방사선이 조사되지 않은 대조군과 비교하여 조사 후 2시간이 지나도 smaller sized DNA가 나타나지 않는데 이것으로 볼 때 이 cell에서 DNA 합성율의 감소는 chain elongaton 보다는 오히려 replicon initiation의 저해와 일치한다는 것을 알 수 있다. 또한 같은 방법을 사용하여 5-8Gy의 dose가 CHO, Hela, mouse L cell에서 replicon initiation을 저해한다는 것도 발견하였다. 이와 아울러, Painton과 Young은 target size의 측정에 기초해서, single radiation hit이 단지 하나의 replicon이 아니라 전체 replicon cluster의 irradiation을 방해한다는 것도 관찰하였다. Wang등이 사용한 alkaline sucrose gradient sedimentation 실험에서도 radioresistant한 3.7 cell에서 radiation 후 1시간에 강한 replicon initiation의 suppression이 일어나 6시간 이상까지 유지되어진다는 것을 알 수 있었다. 이와 비교하여 radiosensitive한 MR4 cell에서는 훨씬 약한 replicon inhitiation의 suppression을 보였고, 3 내지 6 후에 점진적으로 회복되어졌다. 그러나 두 cell line에서 chain elongation의 inhibition 에 있어서의 심각한 차이는 관찰되지 않았다. 한편, synchronized된 3.7 cell은 early S phase에서 10-50Gy의 dose로 조사하였을 때 MR cell에 비해 2 배 내지 3 배정도의 S phase delay가 나타난다. 3.7 cell을 3시간동안 10mM Staurosporine (tyrosine protein kinase inhibitor인) 처리하고 irradiation하면, MR cell에서 보인 level에 비하여 DNA 합성 저해가 아주 약화되어지는데, 이것은 방사선 조사에 따른 S phase delay에 protein tyrosine kinase 의 활성이 요구되어진다는 것을 간접적으로 시사하는 것이다. 또한 alkaline sucrose sedimentation실험의 결과에 따르면 staurosporine이 radiation에 의해 induced된 replicon initiation의 inhibition을 reduce하는 것으로도 나타났다. 이상과 같이 방사선 조사에 따른 S phase delay와 관련된 연구들을 나열하였다. 하지만 현재까지도 S phase delay에 주된 역할을 하는 factor들은 발견되지 않고 있다. 이처럼 방사선 조사에 따른 S phase delay와 관련된 기전은 G1 이나 G2 arrest의 기전에 비해 자세히 알려져 있지 않으므로 앞으로 radiation과 관련된 많은 연구가 요망되는 부분이라고 할 수 있다.

G2 arrest

방사선조사에 따라 rat fibroblast MR4 cell이나 3.7 cell에서 나타나는 radiosensitivity의 차이는 double strand break나 rejoining 정도의 차이에 의한 것이 아니다. 그러나 radioresistant한 cell들이 sensitive한 cell들보다 방사선 조사에 반응하여 더 극심한 G2 delay를 보인다. SV40 large T antigen이 transfection된 human diploid cell에서도 이와 유사한 correlation이 나타났는데, SV40 immortalize된 cell들은 parental cell들보다 더욱 radioresistant 하였고 또한 더욱 강한 G2 delay를 보였다. 이와 같은 radiosensitivity와 G2 delay간의 correlation을 정확하게 밝히기 위해서는 먼저 방사선에 의해 induce되는 G2 arrest의 기전을 알아볼 필요가 있다. 위의 정상적인 cell cycle 의 진행 과정에서 언급한 것처럼 cell cycle 의 G2/M transition에는 cyclin B1이 주된 역할을 하고 있다. 방사선 조사에 따른 cyclin B1의 변화를 조사한 Muschel 등의 연구에서 Hela cell을 thymidine과 aphidicolin 으로 G1/S boundary에 synchronize하고 방사선을 조사하면 앞서 언급한 S phase delay와 함께 G2 delay가 나타난다. 그러나 G2에서 조사된 cell들은 훨씬 더 긴 G2 delay를 보이는데, 흥미로운 사실은 이때 cyclin B1의 level이 아주 낮게 유지된다는 것이다. 반대로 조사되지 않은 대조군에서는 G1 phase에 있는 cell들과 비교하면 10배 이상 cyclin B1 level이 증가되어 나타난다. 이것으로 볼 때 S phase에 있는 cell 들에 대한 방사선 조사로 인해 야기되는 G2 arrest는 cyclin B1의 발현 억제와 밀접한 관련성이 있는 것을 알 수 있고 또한 이 cell들은 그들이 조사되는 cell cycle phase에 dependent하게 cyclin B1의 mRNA와 단백질 level을 조절하므로 써 G2 delay의 정도를 조절하는 것으로 여겨진다. 또한 S phase에 있는 Hela S3 cell에 방사선을 조사하면, dose에 dependent하게 cyclin B1 mRNA의 발현은 억제되는 반면 cyclin A의 mRNA와 단백질 level은 증가하기 시작한다. 방사선 조사 후 G2/M에 accumulation된 cell에서도 cyclin A 의 mRNA level은 계속 증가되어 존재하는데 이러한 cyclin A의 증가가 cyclin B1의 발현 억제나 G2 delay에 연관되어 있는지는 알려져 있지 않다. Human leukemia myeloid cell인 U937 cell에서의 cyclin B1발현에 대한 radiation 효과는 다음과 같이 나타난다. G1 phase에 있는 cell 들은 방사선 조사에 따라 cyclin B1 mRNA발현을 억제하지만, cyclin A와 cdc2, cdc25A의 발현은 증가시킨다. S phase에 있는 cell 에서도 유사한 현상이 관찰되었다. 한편, CHO cell에 대한 radiation 효과는 G2 phase accumulation으로 나타나는데 이때 cdc2 kinase의 활성이 급격히 감소함을 알 수 있다. 이와 아울러 Ramos burkitt's lymphoma cell과 K562 erythroleukemia cell을 1-8Gy 정도로 조

사하면 cdc2 의 tyrosine phosphorylation이 증가하고 kinase activity는 감소한다[71]. 이 현상은 이와 함께 일어나는 G2 delay와 연관성이 있는 것으로 보여진다. 게다가 protein tyrosine kinase 억제제인 herbimycin도 G2 delay뿐만 아니라 cdc2 kinase 활성까지 억제한다. 또 Caffeine은 방사선 조사에 의해 야기되는 S phase delay와 G2 arrest 모두를 저해하는데 이때도 cdc2 kinase activity는 증가되어 나타난다. 많은 chemotherapeutic agent들 또한 G2 delay를 induce한다. Radiation에 대한 노출이나 DNA damaging agent들에 반응하여 일어나는 G2 arrest는 다양한 cell type에서 나타나지만 실제로 G2 arrest를 위해 작용하는 기전은 다르게 일어난다. HeLa cell에서의 irradiation에 의해 나타나는 G2 arrest는 cyclin B의 mRNA나 protein level에서의 downregulation과 연관되어 있는 반면, 다른 agent의 처리로 인해 나타나는 G2 arrest는 cdc2의 phosphoryaltion의 변화에 따라 야기되는 것으로 보인다. 그러나 이들 모든 변화들은 동일한 end point를 가지는데 그것은 mitosis로의 entry를 방지하는 MPF의 inactivation이다. 이상과 같이 G2 arrest에 대한 많은 연구들이 수행되었지만 아직도 많은 의문점들이 남아있다. DNA damage가 G2 arrest 동안 실제로 repair되어지는지 또는 이 arrest의 시간을 변화시키므로 써 cell viability를 변화시킬 수 있는지, 그리고 궁극적으로는 이들 MPF를 불 활성화하는데 관여하는 signal은 무엇인지, 또 왜 cell들은 MPF의 불활성이라는 동일한 목표를 위하여 다른 pathway를 사용하는지 등의 의문점들은 앞으로 심도 있게 연구되어져야 할 과제이다.

● DNA의 8-hydroxyguanine의 수복효소 즉 8-hydroxyguanine endonuclease 및 8-hydroxyguanine glycosylase의 두가지 작용으로 8-hydroxyguanine을 수복하는 효소를 *E. coli* 및 사람을 포함한 포유동물에서 발견하였으며 이에 의한 연구 논문은 다음과 같다.

(A) Chung MH, Kasai H, Jones DS, Inous H, Ishikawa H, Ohtsuka E and Nishimura S, An endonuclease that specifkcally recognizes 8-hydroxyguanine residues of DNA, *Mutation Res.*, 254, 1-12(1991)

(B) Chung MH, Tchou J, Lasao H, Shibutani S, Laval J, Grollman AP and Nishimura S, 8-Oxyguanine(8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc, Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4690-4694(1991)

(C) Chung MH, Kim HS, Ohtsuka E, Kasai H, Yammamoto F and Nishimura S, An endonuclease acitivity in human 8-hydroxyguanine residues from DNA., *Biochem.*

Biophys. Res. Comms, 178, 1472-1476(1991)

(D) Chung MH, Yamamoto F, Kasai H, Ohtsuka E, Hori T and Nishimura S, Ubiquitous presence in mammalian cells of enzyme(s) specifically cleaving 8-hydroxyguanine-containing DNA, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 351-357(1992)

(E) Lee YS, Lee HS, Park MK, Kasai H and Chung MH, Identification of 8-OH-Gua glycosylase in mammalian tissues, *Biochem. Biophys. Res. Comms.*, 196, 1545-1551(1993)

● 노화촉진 마우스 (Senescence-Accelerated Mouse :SAM)의 간조직이 산소라디칼에 심한 손상을 받고 있으며 그 원인은 간세포 mitochondria에서 superoxide dismutase 활성이 저하되어 있다는 사실을 발견하였으며 이에 대한 연구논문은 다음과 같다.

(A) Park JW, Kim MS, Choi CH and Chung MH, Oxidative status in senescence-accelarated mice, *J. Gerontol.*, 51A(5), B337-B345 (1996)

③ 8-hydroxyguanine의 수복효소는 산소라디칼이 유해작용이 증가된 상태 (방사선 조사, 고농도 산소에 폭로 및 산소 라디칼을 생성하는 화합물 투여 등)에서 그 활성이 증가됨으로써 oxidative stress 방어에 중요한 작용을 한다는 사실을 발견하였으며 이에 대한 연구 논문은 다음과 같다.

(A) Kim HS. Park YW, Kasai H and Chung MH, Induction of *E. coli* oh8-Gua endonuclease by oxidative stress: its significance in aerobic life, *Mutation Res.*, 363, 115-124 (1996)

(B) Lee YS, Choi JY, Park MK, Choi EM, Kasai H and Chung MH, Induction of oh8Gua glycosylase in rat kidneys by Potassium Bromate(KBrO3), A Renal Oxidative Carcinogen, *Mutation Res.*, 364, 227-233 (1996)

(C) Yamaguchi RH, Arami S, Chung MH and Kasai H, Increased 8-hydroxyguanine levels in DNA and its repair activity in rat kidney after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, *Carcinogenesis,* 17, 1419-1422 (1996)

● 8-hydroxyguanine수복효소의 oxidative stress에 의한 활성유도에는 fnr, fur및 arc A라는 gene들이 관여함을 발견하여 활성유도기전을 규명하였으며 이에 대한 연구 논문은 다음과 같다.

(A) Lee HS, Lee YS, Kim KS, Choi JY, Hassan HM and Chung MH, Mechanism of

Regulation of 8-hydroxyguanine endonuclease by oxidative stress: roles of fnr, arca and fur, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1193-1201 (1998)

● 조직액(혈액 또는 뇨)으로 부터 8-hydroxyguanine 정량 검출법 개발 : 지금까지 8-hydroxyguanine의 정량은 조직 DNA를 분리 한 후 이 분리된 DNA를 endonuclease P2 및 alkaline phosphatase로 처리하여 nucleoside, 8-hydroxydeoxyguanosine의 형태로 정량하는 방법을 사용하였으나 본 연구진은 수복효소에 의하여 DNA strand로부터 분리되어 조직액에 free base 형태로 존재하는 8-hydroxyguanine을 monoclonal antibody로 검출하여 정량하는 방법을 개발하였음. 이 방법을 이용하여 방사선을 조사하였을 때 8-hydroxyguanine이 생성됨을 인체에서 증명하였다.

● 8-hydroxyguanine의 생성을 immunohistochemistry방법에 의하여 in situ에서 검출하는 방법을 개발하였음.

(A) Won MH, Kang TC, Jeon GS, LEE JC, Kim DY, Choi EM, LEE KH, Choi CD, Chung MH and Cho SS, Immunohistochemical detection of oxidative DNA damage induced by ischemia-reperfusion insults in gerbil hippocampus in vivo. *Brain Res.*, 836, 70-78 (1999)

● SAM 마우스 (노화 촉진 마우스)의 경우 8-hydroxyguanine 수선 효소인 OGG1 유전자에 돌연변이가 나타나고 이로 인해 그 효소의 활성이 현저히 저하됨을 밝혔다.

Choi JY, Kim HS, Kang HK, Lee DW, Choi EM and Chung MH, Thermolabile 8-hydroxyguanine DNA glycosylase with low activity in senescence-accelerated mice due to a single mutation, *Free Radical Biology & Medicine*, 27(7/8), 848-854 (1999)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용 및 방법

1. PKC Isozyme별 Dominant/Negative Vector의 제작

pHAN1은 mammalian expression vector로서 CMV promoter와 Kozak translational initiation sequence, ATG start codon, N-terminal HA epitope tag, EcoR I 과 BamH I cloning site, stop codon을 갖는다. EcoR I 과 BamH I 으로 digestion한 후 annealed synthetic oligonucleotide (upper strand : 5′-GATCGCCACCATGGCTTATCCTTACGACGTGCCTGACTACGCCGAATTCGGATCCTAAT-3′, lower strand: 5′-AATTATTAGGATCCGAAT TCGGCGTAGTCAGGCACGTCGTAAGGATAAGCCATGGTGGC-3′)를 pcDNA3 (Invitrogen)로 ligation하여 제조하였다. pHANE를 이용하여 N-terminal HA tag을 갖는 PKC mutant를 만들었다. pHAN1-PKC-α -REG와 pHAN1-PKC-ζ -REG expression plasmid는 각각의 PKC-α (aa 4-332)와 PKC-ζ (aa 4-245)의 N-terminal regulatory doamin만을 encoding하는 cDNA fragment를 EcoR I 으로 digestion하여 pHAN1으로 ligation하여 제조하였다. pHAN1-PKC-ε -REG expression plasmid의 경우는 PKC-ε (aa 4-401)의 N-terminal regulatory domain만을 encoding하는 cDNA fragment를 BamH I 으로 digestion하여 pHAN1으로 ligation하여 제조하였다.

2. Stable overexpressing cell line 제조

NIH3T3 cell은 10% fetal bovine serum을 넣은 minimal essential medium (MEM)에서 키웠다. lipofectin법 (Gibco BRL)으로 control vector pcDNA3와 PKC expression vector인 pHAN1-PKC-α -REG, pHAN1-PKC-ε -REG, pHAN1-PKC-ζ - REG로 NIH3T3 cell을 transfection시켰다. Transfected plasmid를 stable하게 express하는 derivatives를 selection하기 위해서 transfection한 cell을 10% fetal bovine serum과 neomycin (600 ㎍/㎖)(Gibco BRL)을 넣은 MEM에 24시간 동안 transfer하였다. 10% fetal bovine serum과 neomycin (200 ㎍/㎖)이 든 MEM에서 neomycin resistant clone을 얻었다.

2. PKC Isozyme별 Adenoviral Vector의 제작

Fig. 2에서 보는 바와 같이 GAG promoter가 함유된 Cosmid Cassette를 이용하여 PKCalpha, delta 및 eta의 유전자를 이입시켜 adenoviral vector를 제작하였다.

3. 피부 조직 및 상피세포의 분리

신생 Balb/c newborn 마우스에서 피부를 분리한 후 trimming 하여 파라핀 포매하였고 조직학적 및 면역조직학적 염색을 시행하였다. 또한 상피세포를 분리하기 위해 하룻밤동안 trypsin 처리를 하여 epidermis와 dermis를 분리한다. 분리된 epidermis를 0.12 mM Ca^{++}농도의 배지에서 plate하여 하룻밤동안 dish에 부착시킨다. 배지를 0.05 mM Ca^{++}농도의 배지를 교환한 후 1-2일 후에 감마선을 조사한다.

4. Co-Immunoprecipitataion

단백질을 추출한 후 Lysis buffer속에서 primary antibody와 반응하고 이어서 첨가된 protein A-sepharose에 primary antibody를 매개체로 결합하게 하게 만든다. 이어 lysis buffer로 washing을 5회 정도 반복하였고 순수 분리된 단백질을 SDS-sample buffer로 denaturation한 후 SDS-PAGE로 해리하였다. Nitrocellulose membrane에 trnasfer한 후 원하는 protein에 대한 항체로 western blotting하여 그 protein과 interaction하는 protein을 검출하였다.

5. Immune Complex Kinase Assay

단백질을 추출한 후 Immunoprecipitation을 실시하였다. Precipitation된 protein A-Sepharose beads를 lysis buffer로 3회 washing 한후 다시 kinase buffer (20mM Tris, pH7.5, 4mM MgCl2)로 2회 washing하였다. Beads를 2X kinase butter로 resuspension한고 3 uCi의 ^{32}P-ATP와 substrate (2 ug)를 첨가하여 37C 30분간 반응하였다. 순수 분리된 단백질을 SDS-sample buffer로 denaturation한 후 SDS-PAGE로 해리 하였다. Gel dryer를 이용하여 건조한 후 autoradiography하였다.

6. 세포의 Senescence 측정을 위한 SA-β-gal 염색법

Dulbecco's modified eagle medium에서 활발하게 자라는 mouse embryo fibroblast (MEF) 세포에 방사선을 조사한 다음 5-7 일 뒤에 senescent β-gal staining을 실시

한다. 세포를 PBS로 씻어준 뒤 2% formaldehyde/ 0.2% glutaraldehyde로 5분간 실온에서 고정시킨다. 세포를 PBS로 2번 세척한 뒤 X-gal staining 용액(X-gal 1㎎/㎖, ferricyanide 5mM, ferrocyanide 5mM, $MgCl_2$ 2mM in PBS)을 넣고 37℃에서 overnight 반응을 시킨 후 세포를 PBS로 씻고 2% formaldehyde 용액에 보관한다. 이때 파랗게 염색된 세포와 염색되지 않은 세포를 정량화 하여 senescence에 들어간 세포의 비율을 계산한다.

7. In situ FISH에 의한 telomere 측정

Slide 위에 적하한 metaphase chromosome을 슬라이드에 준비한 후 Zilmernan의 발굴 et al., 준비한 슬라이드는 -20° C에 보관하며, 최소 3시간 이상의 건조 후 실험에 들어간다. 우선 슬라이드를 PBS로 씻어낸 후, 4% formaldehyde/PBS 로 2분간 고정화한다. PBS로 5분동안 3회로 씻어낸 후, 10mM HCl에 1 mg/ml 농도로 녹인 펩신을 37° C에서 10분간 처리한다. 펩신처리 후 PBS로 간단히 씻어내고 다시 4% formaldehyde로 고정화한다. 이후 PBS를 이용하여 5분간 3회 씻어낸 후, EtOH 70%, 85%, 100%를 이용하여 슬라이드를 건조한다. 건조된 슬라이드에 hybridization mixture 〔10mM Tris-HCL pH 7.2 70% formamide, 1% blocking reagent, telomere probe (Oncor, USA)〕 30λ 씩 떨어뜨린후, 80° C에서 3분간 열처리하여 single strand 화하여 실온에서 2시간 반응시킨다. 슬라이드를 70% formamide/10mM Tris (pH 7.2)로 15분간 2회 씻어내고, 다시 0.05% triton X-100이 담긴 PBS로 5분간 3회 씻어낸다. Propidium iodide로 3분간 counter staining하고, PBS로 씻은후 EtOH 70%,85%,100%로 슬라이드를 건조한 후 fluorescent microscope을 이용하여 chromosome끝의 telomere signal을 관찰한다.

8. 세포주기 변화 관찰

세포 현탁액 $5X10^5$/ml을 조사한 후, 다양한 시간간격으로 배양 후 각 세포 그룹을 PBS로 잘 세척하고 Propidium iodide 형광시약으로 DNA를 염색 후 flowcytometry를 실시하여 G1, S, G2/M phase 변화를 관찰한다.

9. 8-hydroxyguanine 수복효소 mutant 세포주 확보

본 연구팀에서는 8-hydroxyguanine 수복효소의 유전자 OGG1에 돌연변이가

일어난 mutant 세포주를 탐색하여 이를 실험에 사용하고저 한다.

10. 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정

발견한 hOGG1 mutant 세포주와 wild type 세포주로부터 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정하여 두 세포주간에 활성 정도를 비교하고자 한다. 두가지 작용, 즉 8-hydroxyguanine이 존재하는 부위에서 DNA를 절단하는 작용 즉, endonuclease 활성과 8-hydroxyguanine을 DNA strand로부터 free base로 제거하는 작용 즉 glycosylase 활성을 동시에 가지고 있으므로 두가지 활성을 측정 하고자 한다.

① Endonuclease 활성:

8-hydroxyguanine을 함유한 strand의 3 end를 32P로 labeling하여 duplex DNA를 만들고 이를 조직액과 반응시킨 후 (8-hydroxyguanine위치에서) 절단된 DNA fragment를 20% denaturing polyacrylamide gel을 이용한 전기영동으로 분리한 후 autoradiography방법으로 검출하고 이 때 나타난 band의 density를 가지고 효소활성을 정량한다.

② Glycosylase 활성:

8-hydroxyguanine을 함유한 duplex DNA를 조직액과 반응시킨 후 반응액에 유리된 free-8-hydroxyguanine을 monoclonal antibody로 만든 immunoaffinigy column을 통과시켜 8-hydroxyguanine을 수집한 후 HPLC에 주입하여 ECD로 검출하여 정량한다.

11. 세포내 8-hydroxyguanine 정량

8-hydroxyguanine의 양을 다음과 같은 방법으로 측정하여 방사선 조사에 의 한 hOGG1 mutant 세포주와 wild type 세포주간에 세포 DNA에 생성된 8-hydroxyguanine의 양을 비교하고자 한다. 각 세포로부터 DNA를 분리한 후 이를 neuclease P1 및 alkaline phosphatase로 처리하여 neucleoside level로 소화시킨 후 HPLC에 주입하여 각 nucleoside를 분리하고 8-hydroxyguanine은 ECD(electrochemical detector)로 정상 deoxyguanosine은 UV detector로 검출한후 10만개의 정상 deoxyguanosine당 존재하는 8-hydroxydeoxyguanosine 수를 가지고 정량한다.

12. 방사선 조사에 의한 세포손상

방사선조사에 의한 세포손상의 차이를 세포주기 변화 및 세포사 (특히 apoptosis) 측면에서 관찰하여 hOGG1의 wild type과 mutant type 세포주간에 그 세포 손상 정도차이를 비교한다. 방사선조사는 실험동물 방사선 조사기 (MarkII Cs-137 irradiator, Sheperd, USA)를 사용한다.

① 세포사 관찰 측정

세포 현탁액 $5X10^5$/ml을 조사한 후, 96 시간 배양한 후 세포사의 정도를 MTT 방법, trypan blue 및 [^{3}H]-thymidine 방법을 이용하여 측정한다.

② 세포주기 변화 관찰

세포 현탁액 $5X10^5$/ml을 조사한 후, 12-24-48 시간 배양 후 각 세포 그룹을 PBS로 잘 세척하고 Propidium iodide 형광시약으로 DNA를 염색 후 flowcytometry를 실시하여 G1, S, G2/M phase 변화를 관찰한다.

③ apoptosis 관찰 측정

조사된 세포들로부터 DNA를 분리한 후 1.8% agarose gel상에서 전기 영동하여 DNA fragmentation 생성 유무를 관찰하며 또한 flowcytometry를 실시하여 hypodiploid DNA영역을 측정하므로서 apoptosis 생성을 정량한다.

제 2 절 연구 결과

● ***PKC isozyme별 (alpha, delta, epsilon, zeta) dominant/negative mutant를 제작하여 NIH3T3 mouse embryo-fibroblast cell에 transfection하여 established cell line을 확립하였다 (Fig. 1 및 2).***

NIH3T3 mouse fibroblast cells의 growth control에 PKC의 specific isoform의 역할을 연구하기 위하여 specific PKC isoform의 dominant-negative mutant를 만들고 이 mutant protein이 stable하게 overexpress되는 NIH3T3 cell line을 제작하였다. NIH3T3 cell에서 발현되는 PKC isoform인 PKC-α , δ , ε , ζ 의 reguratory domain이 overexpress되도록 만든 mammalian expression vector는 PKC isoform의 N-terminal regulatory domain을 encoding하는 cDNA를 expression vector pHAN1으로 subcloning하여 제조하였다. PKC regulatory domain mutant는 pseudosubstrate sequence를 통해서 해당 isoform의 catalytic domain과 특이하게 상호 작용하므로 dominant-negative mutant로서 작용하게 된다. 이 연구에서 이용한 PKC mutant의 구조는 Fig. 1과 같다. Control vector pcDNA3, PKC-α -REG, PKC-ε -REG, PKC-ζ -REG construct를 NIH3T3 cell에 transfection하였다. 이vector에는 encoded protein의 N-terminus에 HA tag을 붙인 후 확인하였다. Neomycin에 저항성이 있는 것을 선택하여 원하는 plasmid를 integrate시켜 안정하게 발현시킨 NIH3T3 cell을 얻었다.

● ***마우스 정상상피세포에 PKCalpha adenovirus를 infection 하였을 때 morphology에서 분화가 유도되었고 분화관련 단백질 발현이 증가되었다 (Fig. 4 및 5).***

지난번 보고에서 방사선이 Ca^{2+}에 의한 분화를 촉진하고 이러한 현상이 PKCalpha에 의한 것임을 확인한바 있다. 따라서 본 연구에서는 PKCalpha를 과발현 시켰을 때 피부상피세포에서 분화가 유도되는 지를 관찰하였다. adenoviral system을 이용하여 PKCalpha를 과발현 시켰을 때 현미경 상의 세포형태가 변화됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 이러한 형태학적 변화가 실제적으로 분화와 관련됨을 분화 marker인 filaggrin의 단백질 발현으로 관찰하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 Ca^{2+}에 의한 분화 정도보다는 덜하지만 PKCalpha 과발현에 의해 분화가 촉진됨을 확인할 수 있었다.

향후 이러한 PKCalpha에 의한 분화 유도가 방사선에 의해 촉진될 수 있을 것인가에 대한 연구를 수행하고자 한다.

● ***방사선에 의한 세포주기조절 기전 연구***

본 연구에서는 방사선에 의한 세포주기 조절에 관여하는 단백질들의 발현 및 활성을 중심으로 정상세포에서의 방사선조사에 다른 세포주기의 조절 기전을 연구하였다. 방사선 조사 후 생쥐 정상세포는 G2/M 기로의 축적이 일어나는 것을 보였고 G2기로부터 M 기로의 전이에 필요한 많은 단백질들의 발현 및 활성이 변화하는 것으로 나타났다.

1. 방사선에 의한 L929 세포의 G2/M arrest.

생쥐의 정상 세포인 L929에 4 Gy의 방사선을 조사한 후 세포주기의 변화를 FACS 분석을 통하여 조사하였다 (Fig. 6). 방사선 조사 6시간 후 세포주기 중 G2/M 기로 arrest 되는 세포의 수가 많아지기 시작하여 조사 후 12시간이 지나면서 거의 모든 세포들이 G2/M 기에 축적되어졌다. G2/M 기에 축적된 세포들은 방사선 조사 후 24시간이 지나면서 다시 세포주기를 진행하기 시작하여 36시간에는 거의 정상세포와 동일한 세포주기 양상을 보였다.

2. 방사선에 의한 G2/M 전이에 관여하는 단백질들의 발현 및 활성 변화.

Fig. 6 에서 나타난 방사선에 의한 G2/M 기로 축적되는 현상에 대한 분자 생물학적 기전을 밝히기 위하여 G2 기로부터 M 기로의 전이에 관여하는 세포주기 관련 단백질들의 발현 및 활성정도를 Western blot 분석 과 Kinase assay 법, 그리고 Co-immunoprecipitation 방법 등을 사용하여 관찰하였다. L929 세포에 4 Gy의 방사선을 조사한 후 세포를 전체세포 분획과 세포질 분획 그리고 핵 분획으로 나누어 분리한 후 세포주기의 G2/M 전이에 관여하는 단백질인 cyclin B1, p34Cdc2 그리고 p34Cdc2를 인산화하여 활성을 억제하는 Wee1 kinase 또 p34Cdc2를 탈 인산화하여 활성을 증가시키는 탈인산화 효소인 phophatase Cdc25C의 발현 및 활성을 측정한 결과는 다음과 같다 (Fig. 7). 전체 세포 분획과 세포질 분획에서는 거의 모든 단백질들의 발현 및 활성이 세포주기의 G2/M arrest가 가장 극심하게 나타나는 12시간을 전후하여 현저히 증가되어 나타났다. 하지만 실제 세포주기의 조절이 일어나는 핵 분획에서의 결과는 전체 세포 분획과 세포질 분획에서 나온 결과와 다르게 나타났다. 핵 내 cyclin B1의 발현은 12시간까지 거의 변화 없이 유지되다가 세포주기가

다시 원 상태로 돌어가기 시작하는 시간인 24시간을 기점으로 증가하기 시작하였다. cyclin B1과 결합하여 G2에서 M으로의 전이에 주된 역할을하는 p34Cdc2 자체의 변화는 없었지만 p34Cdc2 의 불활성화 형인phospho-p34Cdc2과 p34Cdc2를 인산화하여 활성을 억제하는 Wee1 kinase의 핵내 발현정도는 G2/M arrest 가 가장 높게 나타난 12시간에 가장 높게 나타나다가 24시간이 지나자 감소하기 시작하였다. 이와는 반대로 p34Cdc2를 탈 인산화하여 활성을 증가시키는 탈인산화 효소인 phophatase Cdc25C의 경우는 12시간에 감소되어 나타났고 cyclin B1과 Cdc2 결합체로부터 나오는 Histone H1 kinase 활성정도 또한 12시간에 가장 낮은 것으로 관찰되었다. 한편 Cdc2 활성 억제 단백질로 알려진 p21의 발현 변화도 두드러지게 나타났는데 방사선 조사 후 핵 분획에서 12시간대에 가장 높게 나타났으며 그 이후 점차적으로 감소하는 것으로 관찰되어졌다 (Fig. 8). 또한 이렇게 증가된 p21은 실제로 방사선 조사 후 12시간에 p34Cdc2와 가장 많이 결합하여 그 활성을 억제하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때 방사선 조사 후 L929 세포는 cyclin B1의 핵 내로의 진입을 억제하고 p34Cdc2의 활성에 관여하는 효소를 불 활성화할 뿐 만 아니라 p34Cdc2에 직접 결합하여 그 활성을 억제하는 p21의 핵 내 발현을 증가시켜 궁극적으로는 Cdc2 kinase 의 핵 내 활성도를 조절함으로써 세포주기를 G2기에 축적시킨 다음 방사선에 의한 장해를 복구하는 시간을 획득하는 것으로 사료된다.

● ***방사선에 의한 세포의 senescence과정은 telomere의 소실을 수반하였다.***

방사선등에 의하여 세포가 노화되는 현상이 발생한다. 이의 원인이 telomere의 소실과 관련성이 있는지 알기 위하여 방사선을 조사한 후 세포가 senescence되는 정도를 SA-β -gal 발현을 통하여 측정하였다. Telomerase가 결핍된 세포나 telomerase가 wild type인 세포 모두 방사선조사에 비례하여 SA-β -gal을 발현하는 세포가 증가하였다. 1 Gy 조사시에는 SA-β -gal을 발현하는 세포가 거의 없었으나 8 Gy조사시에는 SA-β -gal을 발현하는 세포의 수가 각 각 66.5%와 68.7%로 증가하였다. 따라서 방사선량에 따라 senescence로 진행된 세포의 수는 증가하였으나 telomerase의 활성은 세포의 senescence에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 9).

이와 같이 방사선에 의하여 senescence상태에 들어가는 세포의 수가 증가하는 것

이 방사선에 의한 telomere의 소실과 관련이 있는지 알기 위하여, chromosome fragment에서 telomere의 signal을 측정하였다. In situ FISH 방법에 의거 측정한 telomere를 갖는 fragment의 수는 1 Gy와 8 Gy에서 각각 0.47과 6.3 개가 생성되어 telomere의 fragment 수는 방사선량에 비례하여 증가되었음을 알 수 있었다 (Fig 10A). 이와같은 연구 결과로부터 방사선에 의한 세포의 senescence현상이 telomere의 fragmentation과 관련성이 있음을 알 수 있었다. 또한 방사선량 8 Gy에서 잘려진 fragment중 23.7%가 telomere의 signal을 갖고 있었으므로 telomere가 inter-chromosomal region보다 방사선에 민감하게 반응함을 확인하였다 (Fig 10B and C). 또한 방사선 8 Gy 조사시 세포의 senescence과정에 관여하는 것으로 알려지고 있는 p21WAF1의 발현이 크게 증가하였으므로 (Fig. 10D), 방사선에 의한 세포의 senescence 과정은 telomere의 소실에 의한 p21WAF1의 발현증가를 통하여 세포분열 억제를 유도하여 나타나는 현상일 것으로 사료된다.

● ***8-hydroxyguanine 수복효소 mutant 세포주 확보***

아미노산 부위 229 codon부위가 Arginine에서 glutamine으로 변화된 KG1 백혈병 세포주를 확보하였다 (Table 1).

● 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정

발견한 hOGG1 mutant KG1 세포주와 wild type U937 세포주로부터 8-hydroxyguanine 수복효소 활성 측정한 결과 wild type U937 세포주에 비하여 mutant KG 1 세포주의 경우 8-hydroxyguanine이 존재하는 부위에서 DNA를 절단하는 작용 즉, endonuclease 활성과 8-hydroxyguanine을 DNA strand로부터 free base로 제거하는 작용 즉 glycosylase 활성이 현저히 저하되었다 (Fig. 11).

● 세포내 8-hydroxyguanine 정량

방사선 조사에 의한 hOGG1 mutant 세포주와 wild type 세포주간에 세포 DNA에 생성된 8-hydroxyguanine의 양을 비교한 결과 KG1 세포의 경우 U937보 다 세포 DNA에 생성된 8-hydroxyguanine의 양이 현저히 높았다 (Fig. 12).

● 방사선 조사에 의한 세포손상

① 세포사 관찰 측정

세포 현탁액 $5X10^5$/ml을 조사한 후, 96 시간 배양한 후 세포사의 정도를 MTT 방법, trypan blue 및 [^{3}H]-thymidine 방법을 이용하여 측정한 결과 KG1 세포의 경우 U937보다 dose별로 방사선 조사에 의한 세포 민감성이 현저히 높았다 (Fig. 13).

② 세포주기 변화 관찰

세포 현탁액 $5X10^5$/ml을 조사한 후, 12-24-48 시간 배양 후 각 세포 그룹을 PBS로 잘 세척하고 Propidium iodide 형광시약으로 DNA를 염색 후 flowcytometry를 실시하여 G1, S, G2/M phase 변화를 관찰한 결과 KG1 세포의 경우 U937보다 G2/M phase의 arrest가 높게 나타났다 (Fig. 14).

③ apoptosis 관찰 측정

Flowcytometry를 실시하여 hypodiploid DNA영역을 측정하므로서 apoptosis 생성을 정량한 결과 KG1세포의 경우 U937보다 hypodiploid DNA 생성양이 높게 나타났다 (Fig. 15).

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구에서는 방사선이 Early effect에 미치는 영향을 규명하기 위해 세포사에 영향을 주는 PKC, 세포주기, immerdiate early gene등에 대해 규명하였다.

● 방사선의 초기영향을 결정하는 PKC의 변화를 관찰하기 위해 PKC isozyme specific mutant를 제작하여 향후 방사선 감수성과의 관련성을 규명하고자 한다.

● 방사선과 분화와의 관련성을 규명하기 위해 PKC sizoyem별 adenoviral system을 완성하였고 PKCalpha가 방사선에 의한 분화와 관련있음을 확인하였다.

● 방사선에 대한 세포주기의 세포주기는 본 연구에서는 방사선에 의한 세포주기 조절에 관여하는 단백질들의 발현 및 활성을 중심으로 정상세포에서의 방사선조사에 다른 세포주기의 조절 기전을 연구하였다. 방사선 조사 후 생쥐 정상세포는 G2/M 기로의 축적이 일어나는 것을 보였고 G2기로부터 M 기로의 전이에 필요한 많은 단백질들의 발현 및 활성이 변화하는 것으로 나타났다.

● 방사선에 의한 senescence 과정이 telomere의 절단에 의한 것임을 밝힘으로서, 방사선의 작용이 interstitial telomere region의 절단뿐 아니라 chromosome 말단의 telomere에도 영향을 미칠 수 있음이 관 찰 됨으로서, 지금까지 알려지고 있던 방사선에 의한 chromosome의 single 또는 double strand의 random breakage기전에 대한 고찰이 필요할 것으로 생각되어 진다.

● 8-hydroxyguanine 수복효소 mutant 세포주와 wild type 세포주 사이에 방사선 조사에 의한 산화적 DNA 손상, 세포사 및 각종 세포기능장애에 대한 차이를 관찰하여 산화적 DNA 수복효소가 방사선 조사에 의한 세포손상에서의 방어 기능을 알아보고자 한다. 이로서 방사선 조사에 의한 세포 독성에 있어서의 산소 라디칼의 관여도를 증명하고, 또한 산소 라디칼에 의한 DNA 손상의 중요성을 확인한다. 이중에서도 특히 방사선 조사에 의한 DNA 손상에 8-hydroxyguanine의 기여도 평가 및 중요성을 확인하고, 생체방어에 8-hydroxyguanine 수복 효소의 중요성을 확인한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서는 방사선의 early effect를 규명함으로써 방사선에 대한 정상세포의 감수성을 조절할 수 있는 유전자 및 방법을 모색하고 이러한 early effect 변화가 late effect와 어떠한 관련이 있는지를 확인하기 위해 시도되었다. 본 연구의 결과 방사선의 감수성 조절에 PKC, 세포주기, telomer 절단화 및 8-hydroxyguanine 생성량이 중요함을 확인하였고 향후 이러한 감수성을 조절하는 유전자 및 단백질을 중심으로 방사선 피폭 진단 및 정상조직 손상 정도를 확인하는 marker로 이용하고 이를 조절하므로서 방사선 감수성을 조절하는 방법의 개발, 민감제 및 방어제 개발을 위한 새로운 모델의 제공등에 이용 가능하리라 사료된다.

제 6 장 참 고 문 헌

1. J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.T. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics, Br. J. Cancer 26 (1972) 239-257.
2. R.L. Warters, Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma, Cancer Res. 52 (1992) 883-890.
3. Y. Nishizuka, Studies and perspectives of protein kinase C, Science 233 (1986) 693-698.
4. D.E. Hallahan, S. Virudachalam, J.L. Schwartz, N. Panje, R. Mustafi, R.R. Weichselbaum, Inhibition of protein kinase sensitizes human cells to ionizing radiation. Radiation Res. 129 (1992) 345-350.
5. D.J. McConkey, P. Hartzell, M. Jondal, S. Orrenius, Inhibition of DNA fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents that stimulate protein kinase C. J. Biol. Chem. 264 (1989) 13399-13402.
6. F. Ojeda, M.I. Guarda, C. Maldonado, H. Folch, H. Diehl, Role of protein kinase C in thymocyte apoptosis induced by irradiation, Int. J. Radiat. Biol. 61 (1992) 663-667.
7. H. Hennings, D. Michael, C. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, S.H. Yuspa, Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture, Cell 19 (1980) 245-254.
8. M.F. Denning, A.A. Dlugosz, E.K. Williams, Z. Szallasi, P.M. Blumberg, S.H. Yuspa, Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium, Cell. Growth Differ. 6 (1995)149-157.
9. D.J. McConkey, S. Orrenius, Signal transduction pathways to apoptosis. Trends in Cell Biol. 4 (1994) 370-374.
10. G. Woloschak, C.H. Chang-Liu, P. Shearin-Hones, Regulation of protein

kinase C by ionizing radiation. Cancer Res. 50 (1990) 3963-3967.

11. N.H. Hasan, P.J. Parker, G.E. Adams, Induction and phosphorylation of protein kinase C-alpha and mitogen activated protein kinase by hypoxia and by radiation in Chinese hamster V79 cells, Radiat. Res. 145 (1996) 128-133.
12. C.Y. Kim, A.J. Giaccia, B. Strulovici, J.M. Brown, Differential expression of protein kinase C epsilon in lung cancer cell lines by ionizing radiation, Br. J. Cancer 66 (1992) 844-849.
13. T.K. Hei, R.S. Krauss, S.X. Liu, E.J. Hall, I.B. Weinstein, Effects of increased expression of protein kinase C on radiation-induced cell transformation, Carcinogenesis 15 (1994) 365-370.
14. S.H. Yuspa, H. Hennings, R.W. Tucker, The regulation of differentiation in normal and neoplastic keratinocytes, in: P. Nowley, T. Broker (Eds.), Papillomaviruses, UCLA Symposia and Molecular and Cellular Biology, New Series, Alan R. Liss, Inc., New York, 1990, pp. 211-222.

15. Hartwell, L., and Weinert, T. Chcekpoints:controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246:629-634, 1989.
16. Rossow, P., Riddle, V. and Pardee, A. Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 76:4446-4450, 1979.
17. Burns, V.W. X-ray induced division delay of individual yeast cells. Radiat.Res. 4:394-412. 1959.
18. Hartwell, L.H. and Weinert, T.A. Checkpoints:controls that ensure the order of cell cycle events. Science 246:629-634. 1989.
19. Murray, A.W. and Kirshner, M.W. Dominoes and clocks:the union of the views of the cell cycle. Science 246:614-621. 1989.
20. Yamada. M. and Puck, T.T. Action of radiation on mammalian cells.IV. Reversible mitotic lay in the S3 HeLa cell produced by low doses of X-rays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47:1181-1191. 1961.
21. Yu, C.K. and Sinclair, W.K. Mitotic delay and chromosomal aberrations

induced by X-rays in synchronized Chinese hamster cells in vitro. J. Nat. Cancer Inst. 39:619-632. 1967.

22. Sherr, C. mammalian G1 cyclins. Cell 73:1059-1065, 1993.
23. Nurse, P. genetic control of cell cycle atcell division in yeast. Nature, 256, 457-61.
24. Coleman, T.R., Tang, Z. and Dunphy, W.G. Negative regulation of the Wee1 protein kinase by direct action of the Nim1/Cdr1 mitotic inducer. Cell 72:919-929, 1993.
25. Quelle, D., Ashmun, R., Shurtleff, S. *et al.*, Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase of rodent fibroblasts. Genes Dev. 7:1559-1571, 1993.
26. Ohtsubo, M., Theodores, A., Schumacher, J., *et al.* Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1 to S phase transition. Mol. Cell. Biol. 15;2612-2624, 1995.
27. Cardosa, M., Leonhardt, H., and Nadel-Ginard, B. Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication:cyclin A and cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. Cell 74;979-992, 1993.
28. Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular tansformation. Genes Dev. 7:1572-1583, 1993.
29. Li, R., Waga, S., Hannon, G. *et al.* Differential effects by the p21 cdk inhibitor on PCNA dependent DNA replication and DNA repair. Nature 371:534-537, 1994.
30. Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., *et al.* Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7491-7495, 1992.
31. Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., *et al.* A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and gadd45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell 71:587-597, 1992.
32. O'Connor, P.M., Jackman, J., Jondle, D., *et al.* Role of the p53 tumor

suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. Cancer Res. 53:4776-4780, 1993.

33. Huang, H., Li, C. Y., Little, J. B. Abrogation of p53 function by transfection of HPV16 E6 gene does not enhance resistance of human tumor cells to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol. 70: 151-160, 1996.

34. Lee, J. M., and Bernstein, A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5742-5746, 1993.

35. Lane, D.P. p53. guardian of the genome. Nature 358:15-16, 1992.

36. Lane, D.P. A death in the life of p53. Nature 362:786, 1993.

37. Allalunis-Turner MJ, Zia PKY, Barron GM, Mirzayans R and Day RS, Radiation-induced DNA damage and repair in cells of a radiosensitive human malignant glioma cell line. *Radiation Research,* 144, 288-293(1995)

38. Ames BN, Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science,* 221, 1256-1264(1983).

39. Badie C, Iliakis G, Foray N, Alsbeith G, Cedervall B, Chavaudra N, Pantelias G, Arlett C and Malaise EP, Induction and rejoining of DNA double strand breaks and interphase chromosome breaks after exposure to X-rays in one normal and two hypersensitive human fibroblast cell lines. *Radiation research*, 144, 26-35(1995)

40. Bodepudi V, Shibutani S, and Johnson F, Synthesis of 2'-deoxy-7,8-dihydro-8-oxoguanosine and 2'-deoxy- 7,8-dihydro-8-oxoadenosine and their incorporation into oligomeric DNA. Chem. Res. Toxicol. 5, 608-617(1992)

41. Busse BM, Bose KS, Jones RW, et al. The action of caffeine on X-raybirradiated HeLa cells: Enhancement of X-ray induced killing during G2 arrest. *Radiat. Res.,* 76: 292-307(1978)

42. Carmichael J, DeGraff WG and Gazdar AF, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Research* 47, 936-941(1987)

43. Chau YP, Shiah SG, Don MJ and Kuo ML, Involvement of hydrogen

peroxide in topoisomerase inhibitor β-lapachone induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells, *Free radical biology & Medicine*, 24(4), 660-670(1998)

44. Choi JY, Kim HS, Kang HK, Lee DW, Choi EM, and Chung MH, Thermolabile 8-hydroxyguanine DNA glycosylase with low activity in senescence-accelerated mice due to a single mutation, *Free Radical Biology & Medicine*, 27(7/8), 848-854 (1999)
45. Chung MH, Kasai H, Jones DS, Inous H, Ishikawa H, Ohtsuka E and Nishimura S, An endonuclease that specifkcally recognizes 8-hydroxyguanine residues of DNA, *Mutation Res*, 254, 1-12 (1991)
46. Chung MH, Tchou J, Lasao H, Shibutani S, Laval J, Grollman AP and Nishimura S, 8-Oxyguanine(8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, *Proc, Natl. Acad. Sci. USA,* 88, 4690-4694 (1991)
47. Chung MH, Kim HS, Ohtsuka E, Kasai H, Yammamoto F and Nishimura S, An endonuclease acitivity in human 8-hydroxyguanine residues from DNA., *Biochem. Biophys. Res. Comms,* 178, 1472-1476(1991)
48. Chung MH, Yamamoto F, Kasai H, Ohtsuka E, Hori T and Nishimura S, Ubiquitous presence in mammalian cells of enzyme(s) specifically cleaving 8-hydroxyguanine-containing DNA, *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 351-357(1992)
49. Chung MH, Kiyosawa H, Ohtsuka E, Nishimura S and Kasai H, DNA strand cleavage at 8-hydroxyguanine residues by hot piperidine treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun,* 188, 1-7(1991)
50. Cornforth, MN and Bedford, JS, Ionizing radiation damage and its early development in chromosomes. *In Advances in Radiation Bilolgy*, Volume 17, edited by J. T. Lett, and W. K. Sinclair (new York: Academic Press), pp423-496(1993)
51. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-825 (1993)
52. Floyd RA, The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 11, 1447-1450(1990)

53. Hawn M, Umar A, Carethers J, et al. Evidence for a connection between the mismatch repair system and G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res.,* 55, 3721-3725(1995)

54. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D. et al. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.,* 51, 6304-6311(1991)

55. Kim HS. Park YW, Kasai H and Chung MH, Function of *E. coli* oh8Gua endonuclease by oxidative stress: its significance in aerobic life, *Mutation Res.*, 363, 115-124(1996)

56. Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H and Yokota J, Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, *Oncogene*, 16, 3219-3225 (1998)

57. Lee HS, Lee YS, Kim KS, Choi JY, Hassan HM and Chung MH, Mechanism of Regulation of 8-hydroxyguanine endonuclease by oxidative stress : roles of fnr, arca and fur, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1193-1201(1998)

58. Lee YS, Choi JY, Park M K, Choi EM, Kasai H and Chung MH, Induction of oh8Gua glycosylase in rat kidneys by Potassium Bromate(KBrO3), A Renal Oxidative Carcinogen, *Mutation Res.*, 364, 227-233 (1996)

59. Lee YS, Lee HS, Park MK, Hwang ES, Park EM, Kasai H and Chung MH, Identification of 8-hydroxyguanine glycosylase activity in mammalian tissue using 8-hydroxyguanine specific monoclonal antibody, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 1545-1551 (1993)

60. Maki H and Sekiguchi M, MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, 355, 273-275 (1992)

61. Michaels ML, Cruz C, Grollmann AP, Miller JH, Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by oxidatively damaged from of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA,* 89, 7022-7025(1992)

62. Moriya M, Ou C, Bodepudi V, Johnson F, Takeshita M and Grollman AP Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion

synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in E.Coli, *Mutat Res*, 254, 281-288 (1991)

63. Muschel R, Zhang H, Iliakis G, et al. Cyclin B expression in Hela cell during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Research,* 51, 5113-5117 (1991)

64. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F and Riccardi C, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods*, 139, 271-279 (1991).

65. Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P and Ames BN, Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column, *Proc. Natl. Acad .Sci. USA,* 89, 3375-3379 (1992)

66. Park JW, Kim MS, Choi CH and Chung MH, Oxidative status in senescence-accelarated mice., *J. Gerontol.,* 51A(5), B337-B345 (1996)

67. Strasser A, Harris AW, Jacks T and Cory S, DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53 independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell*, 79, 329-339 (1994)

68. Tapas K. Hazra, Tadahide Izumi, Lindsay Maidt, Robert A. Floyd and Sankar Mitra, The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutation, *Nucleic Acids Research*, 26(22), 5116-5122 (1998)

69. Totter JR, Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acda Sci USA,* 77, 1763-1767 (1980)

70. Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E and Essigmann JM Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome, *Biochemistry,* 29, 7024-7032 (1990)

71. Yamamoto F, Kasai H, Bessho T, Chung MH, Inoue H, Ohtsuka E, Hori T and Nishimura S, Ubiquitous presence in mammalian cells of enzymatic activity specifically cleaving 8-hydroxyguanine-containing DNA. *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 351-357 (1992)

72. Yamaguchi R, Arami, S, Chung MH, and Kasai H, Increase 8-hydroxyguanine levels in DNA and its repair activity in rat kidney after administration of a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate, *Carcinogenesis,* 17, 1419-1422 (1996)

73. Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C. Goldsyein, S., Youngiai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibrobl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10114-10118.

74. Ashcroft,, G.S., Horan, M.A., and Ferguson, M.W.(1997). Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. J. Invest. Dermatol. 108, 430-437

75. Campisi, J (1997). The biology of replicative senescence. Eur. J. Cancer 33, 703-709

76. Campisi, J (1998). The role of cellular senescence in skin aging. J. Investg. Dermatlo. Symp. Proc. 3, 1-5.

77. Chang, E., and Harley, C.B. (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11190-11194.

78. Counter, C.M. (1996). The roles of telomeres and telomerase in cell life span. Mutat. Res. 366, 45-63.

79. Courtois, M., Loussouam, G., Hourseau, C., and Grollier, J.F. (1994). Hair cycle and alopecia. Skin Pharmacol. 7, 84-89.

80. Courtois, M., Loussouam, G., Hourseau, C., and Grollier, J.F. (1995). Ageing and hair cycles. Br. J. Dermatol. 132, 86-89.

81. de Lange, T. (1998). Telomeres and senescence : ending the debate. Science 279. 334-335.

82. Frenck, R.W., Blackbum, E.h., and Shannon, K.M (1998). The rate of telomere sepuence loss in human leukocytes varies with age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5607-5610.

83. Greider, C.W. (1996). Telomere length regulation. Annu. Rev. Biochem. 65, 337-365.

84. Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990). Telomteres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345, 458-460.

85. Wright, W.E., and Shay, J.W. (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. Exp. Gerontol. 27, 383-389.

86. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B and Lansdorp, P.M. (1994), Evdence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells : loss of telomeric DNA with age. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9857-9860.

87. Zijlmans, J.M., Martens, U.M. Poon, S.S., Raap, A.K., Tanke, H.J., Ward, R.K., and

88. Lansdorp, P.M (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94,7423-7428.

Table 1 Mutation of hOGG1 gene in KG-1

Exon	Codon	Nucleotide position	Sequence change	Amino acid change
4	229	954	CGA→CAA	Arg→Gln

Fig. 1. Construction of Dominant Negative Mutants of PKC

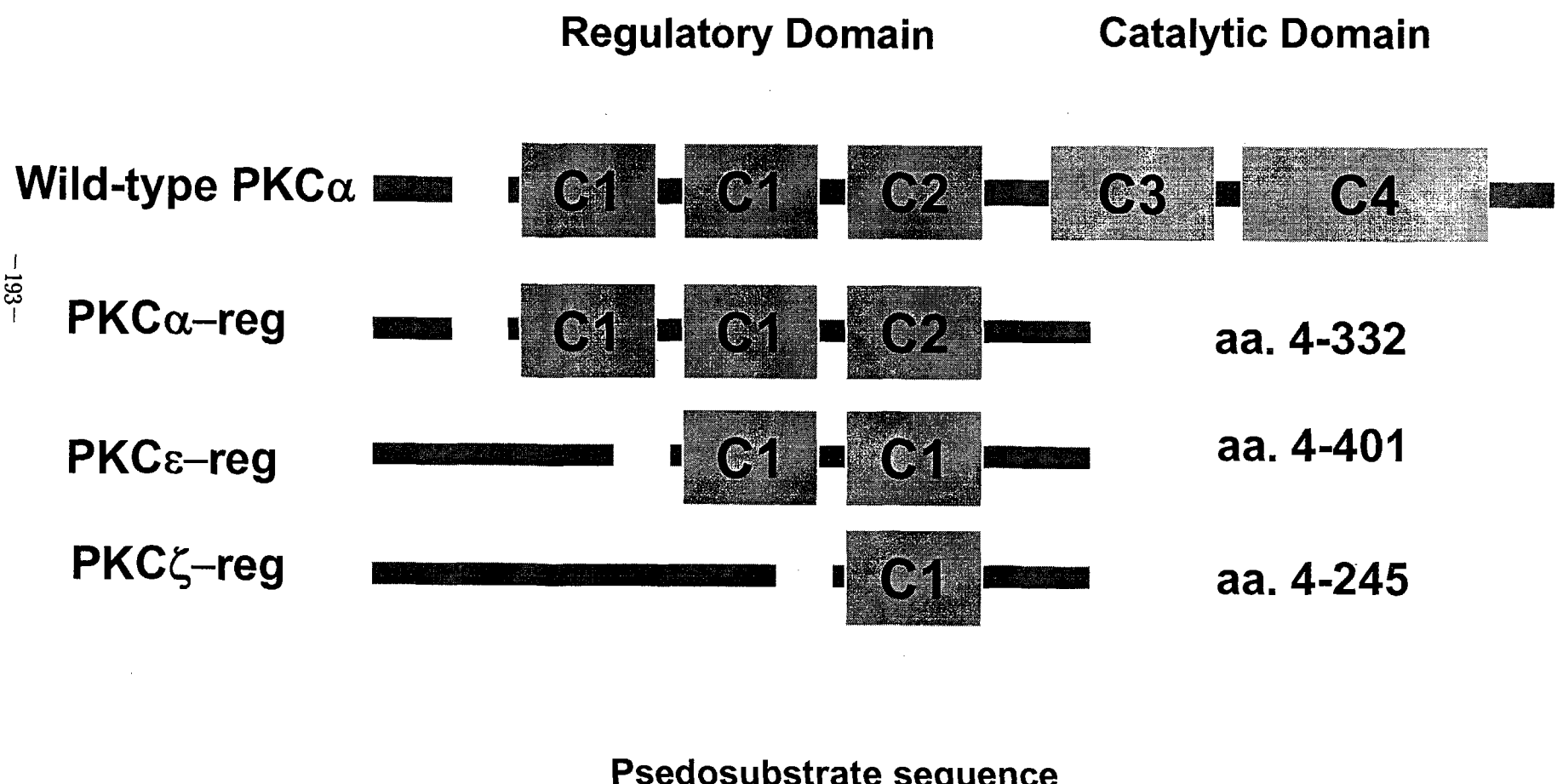
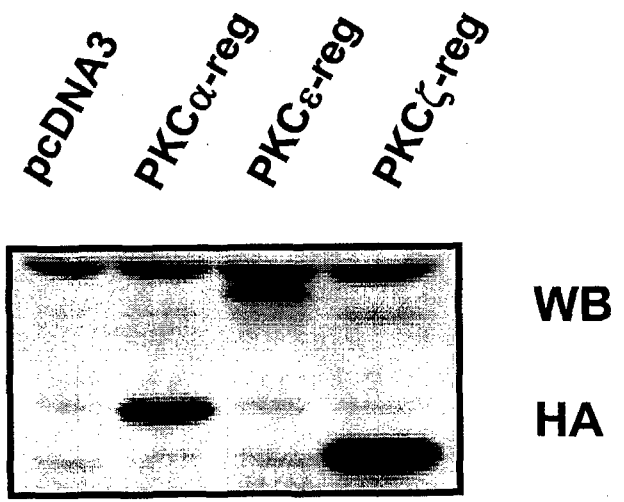


Fig. 2. Establishment of PKC mutant construction transfected cells



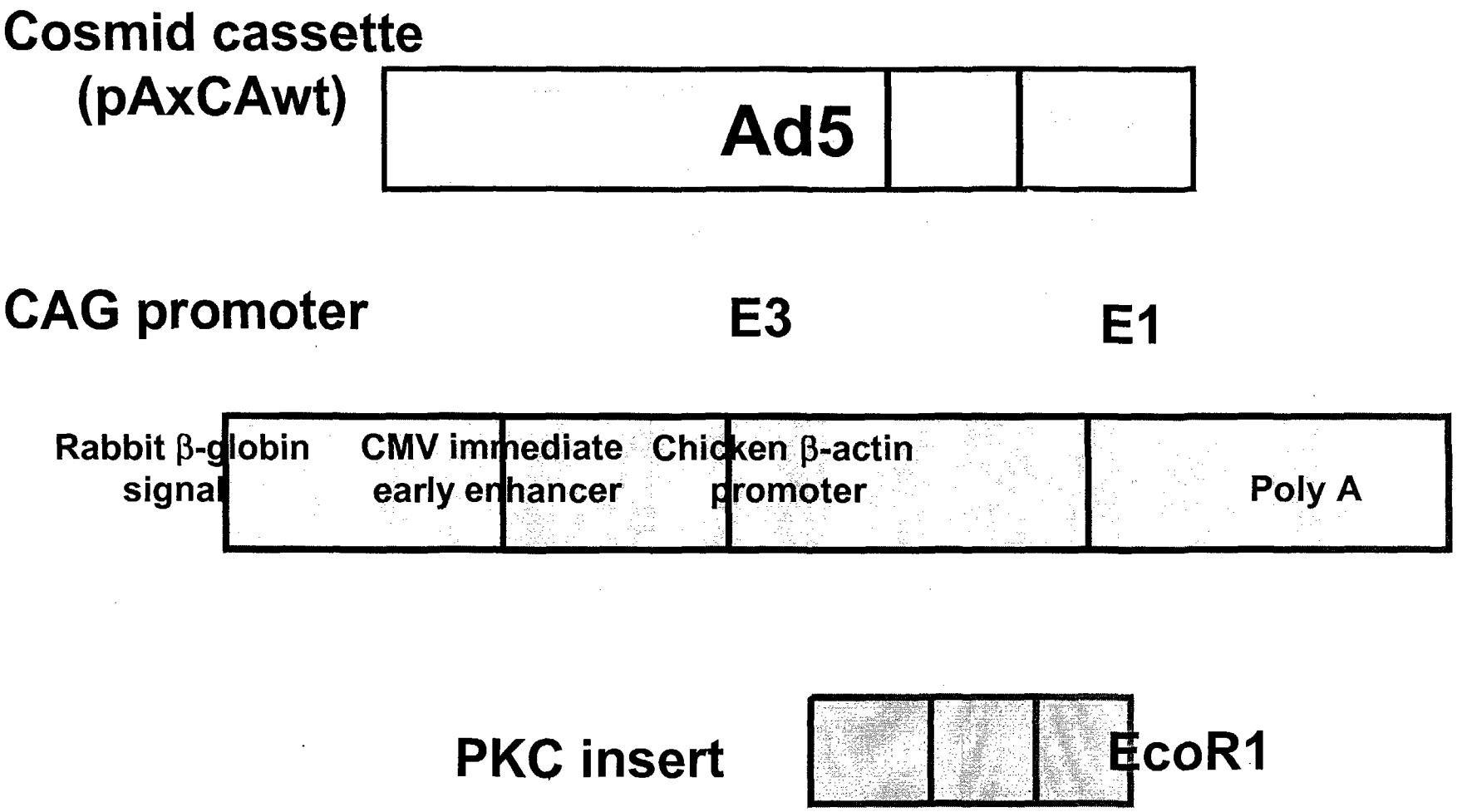
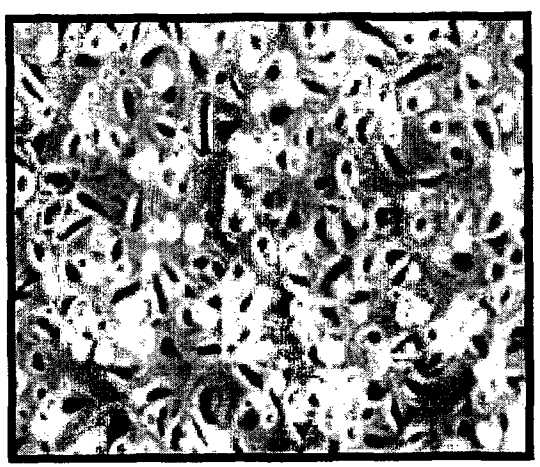
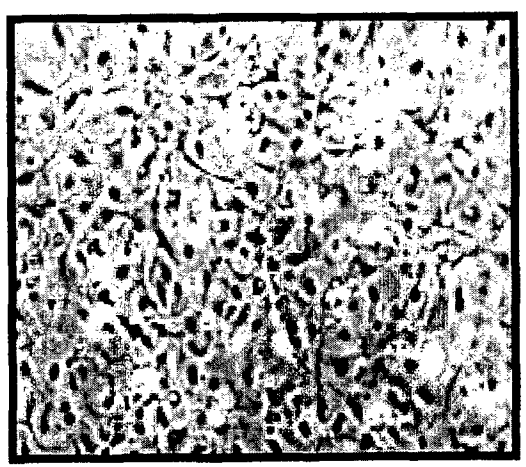


Fig. 3. Structure of PKC-Adenovirus Vector

Fig. 4. Overexpression of Adenoviral PKCα Induces Morphological Changes



Control



PKCα

Fig. 5. Overexpression of Adenoviral PKCα Increases Differentiation Marker, Filaggrin Expression

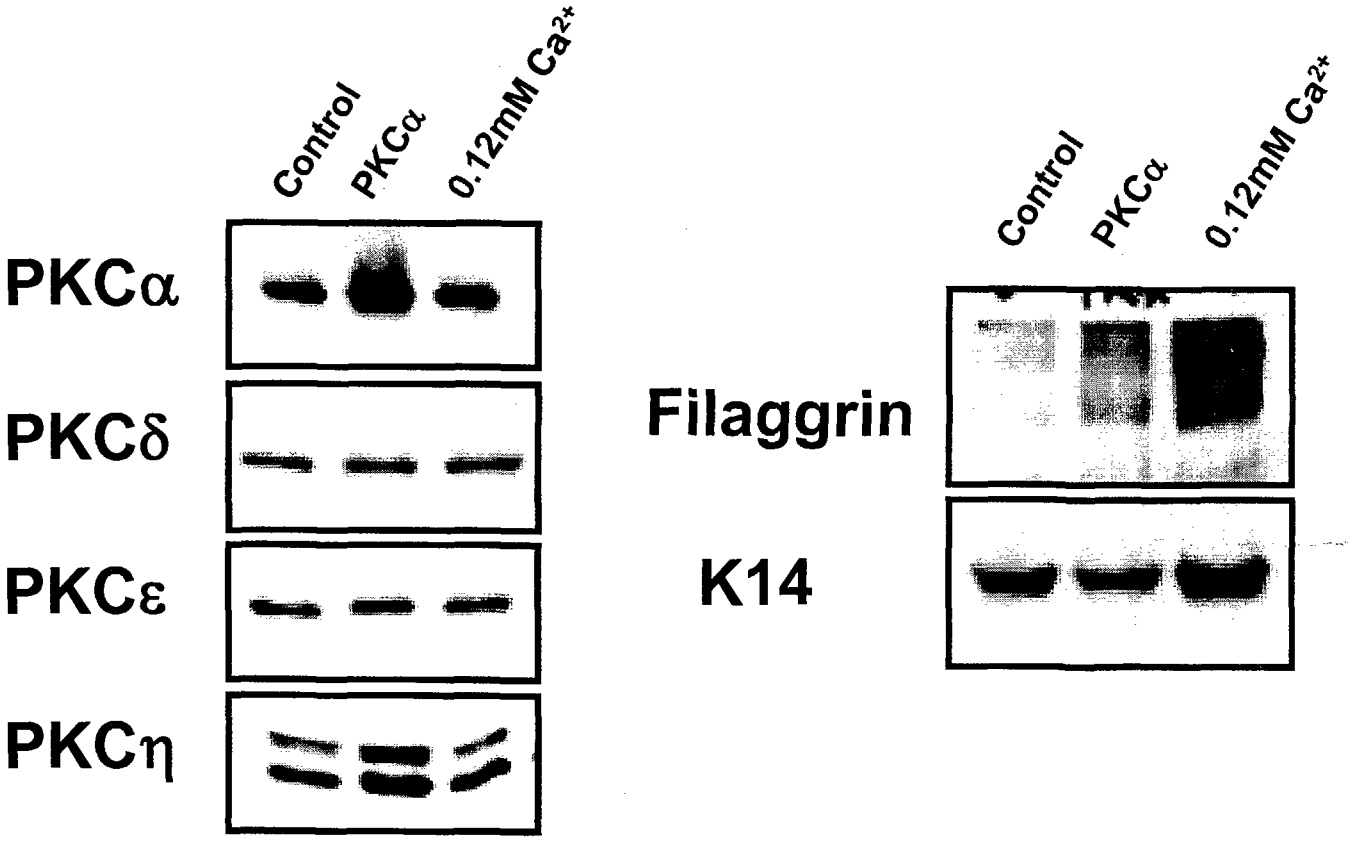
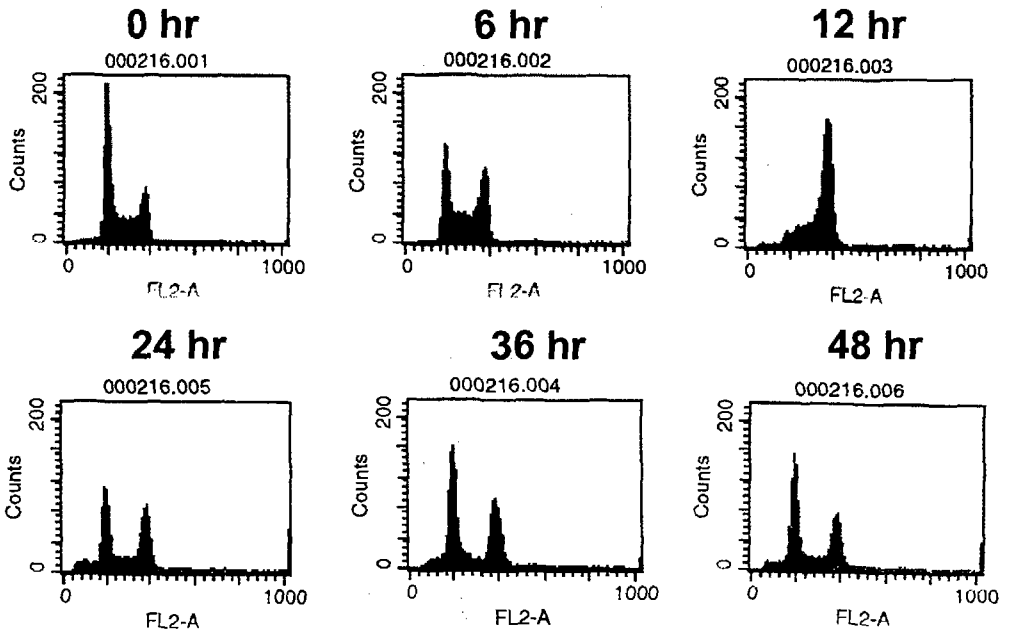


Fig. 6. Cell cycle distribution following ionizing irradiation in L929 cells



IR: 4Gy

Cell cycle	Time (hr) after IR					
	0	6	12	24	36	48
G0/G1	55.2	38.9	12.0	46.5	52.0	53.7
S	15.7	14.4	6.9	8.6	8.7	9.2
G2/M	29.1	46.7	81.1	44.9	39.3	37.1

Fig. 7. Expressional and localizational changes in G2-associated molecules by ionizing irradiation

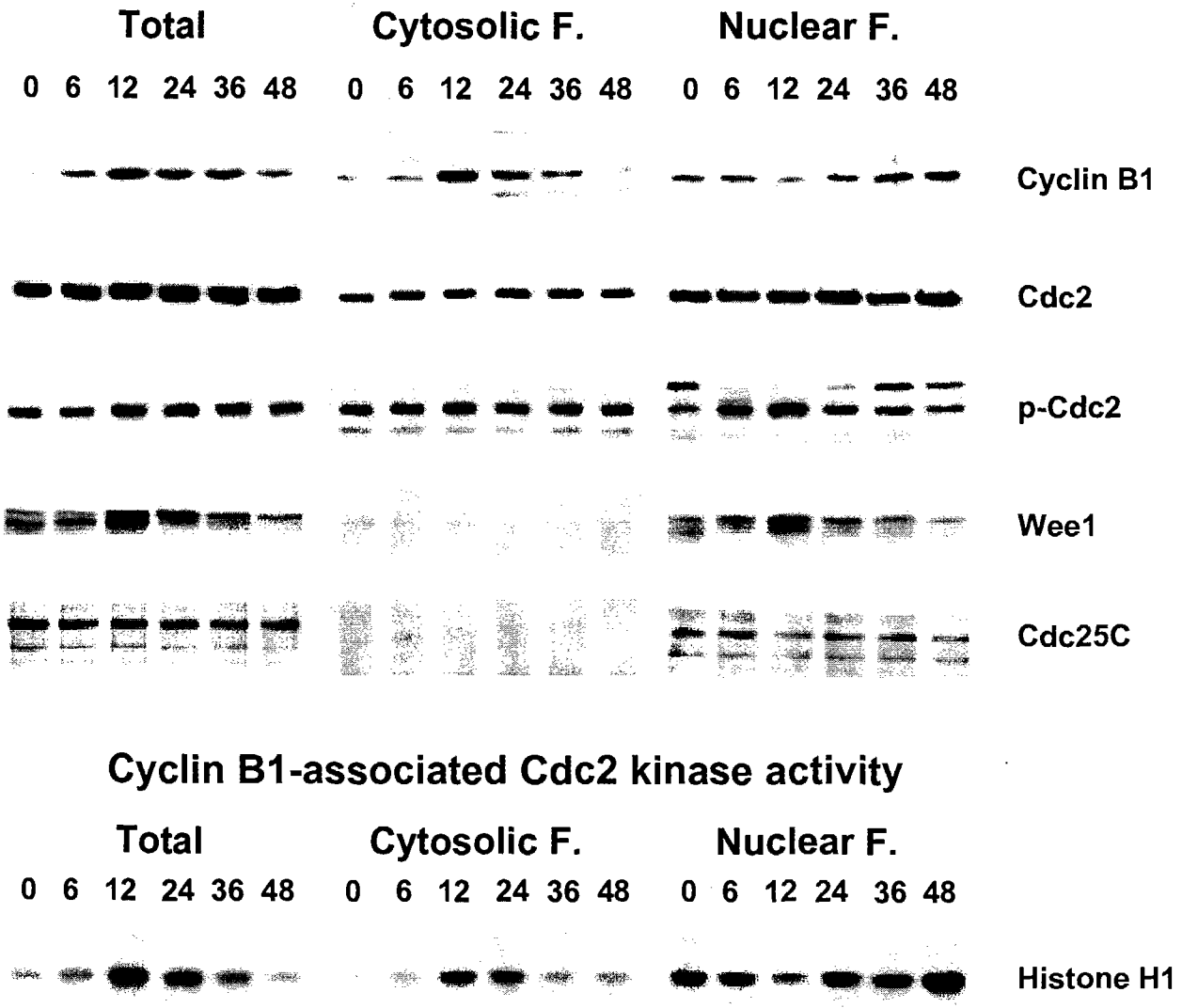
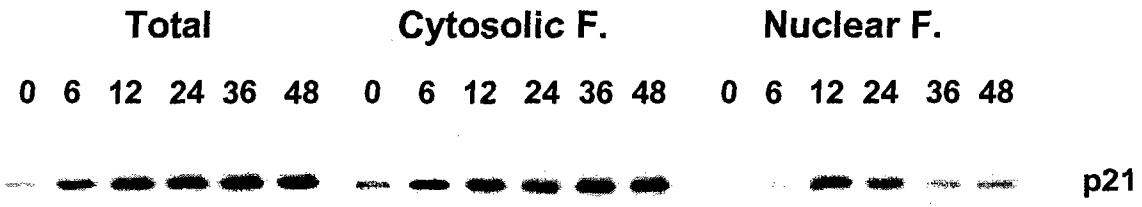
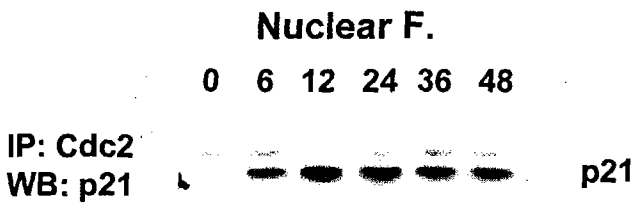


Fig. 8. Expressional and localizational changes in p21 by ionizing irradiation

IR-induced expression of p21 and its localization



Interaction between IR-induced p21 and Cdc2



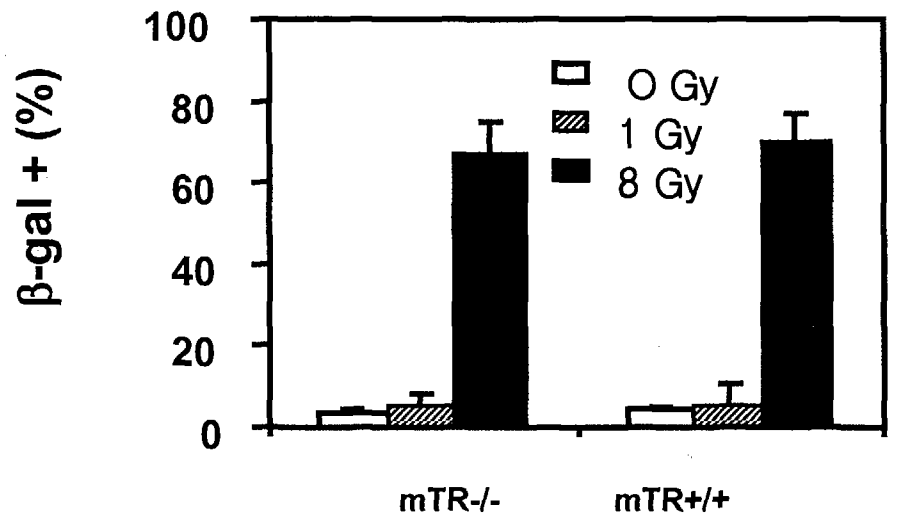


Fig. 9. Induction of cellular senescence by γ-irradiation

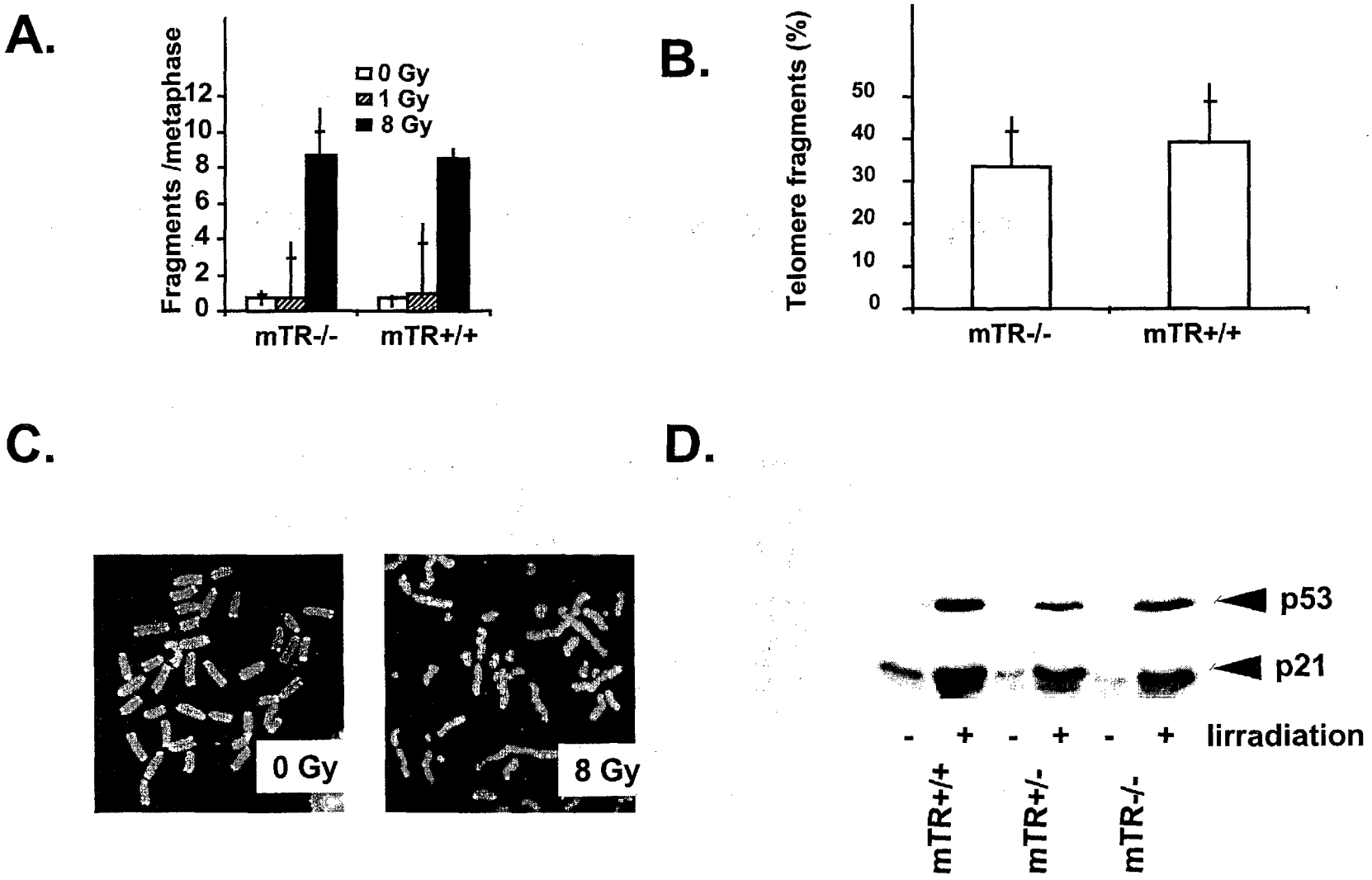
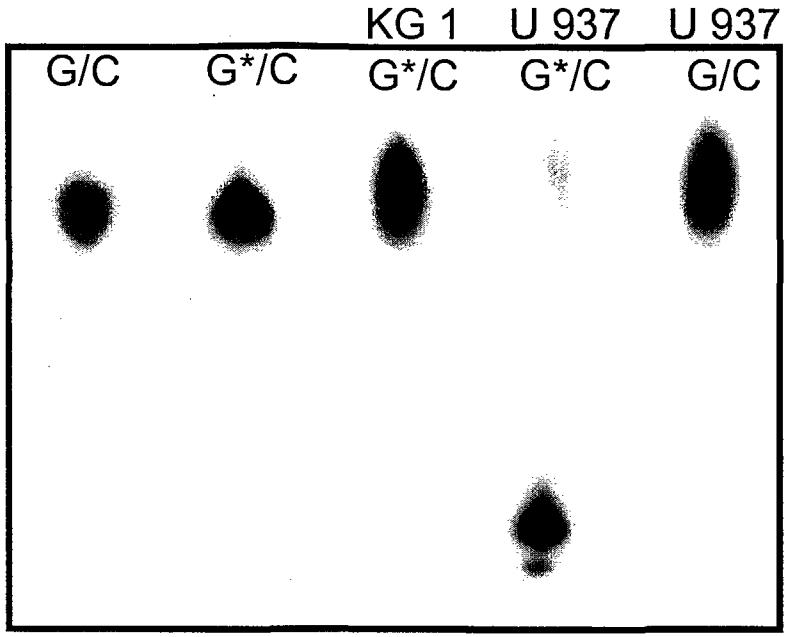
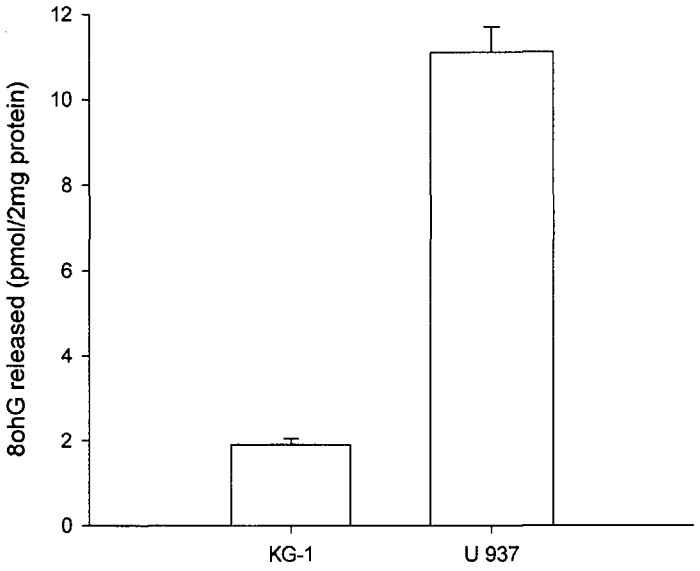


Fig. 10. Telomere fragmentation by γ-irradiation



A. Endonuclease activity



B. Glycosylase activity

Fig. 11. Activity of hOGG1 enzyme in KG-1 and U 937

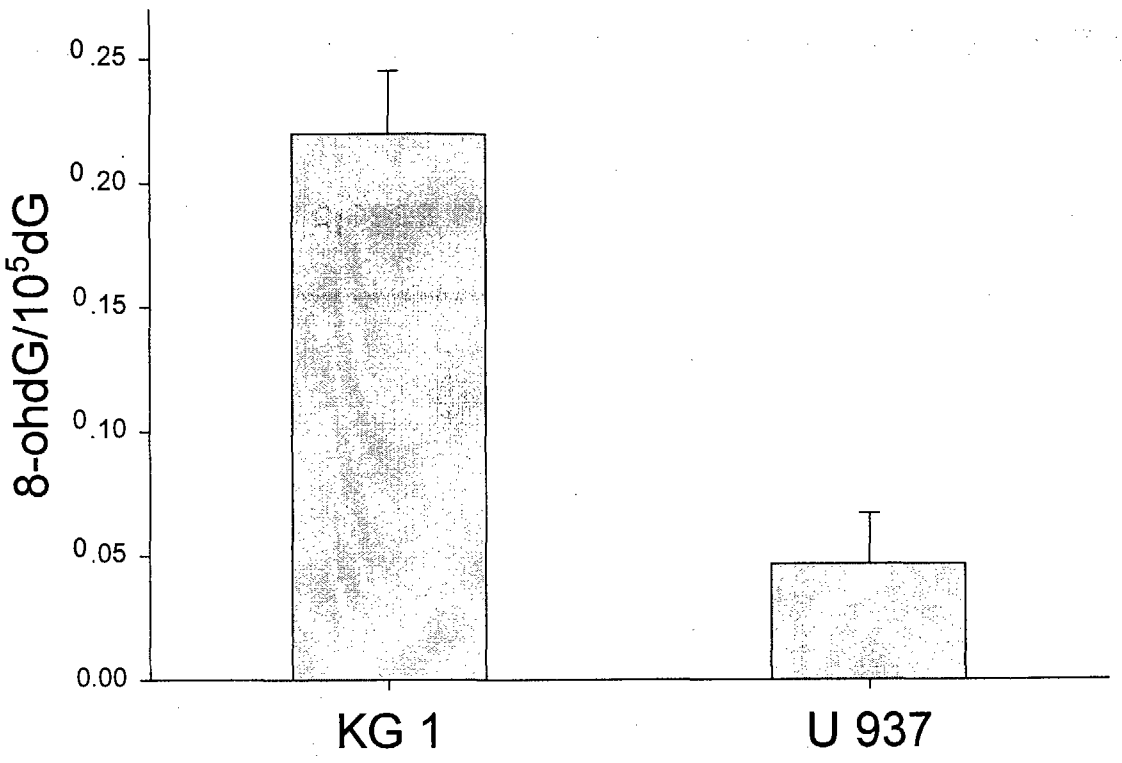
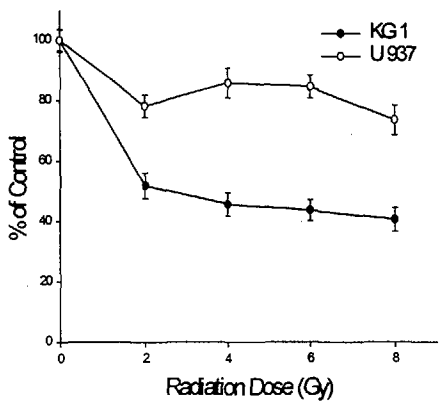


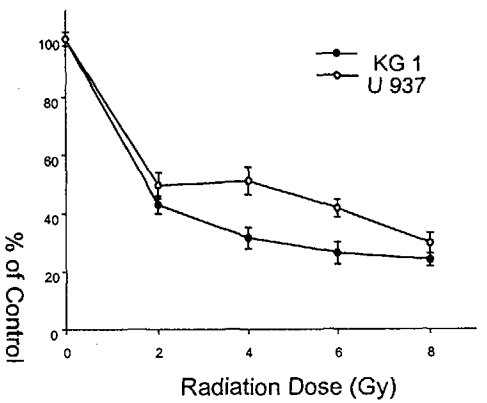
Fig. 12. The level of 8ohdG amount into cellular DNA

Fig. 13. Cytotoxic effect of *r*-irradiation on KG-1 and U 937 cells

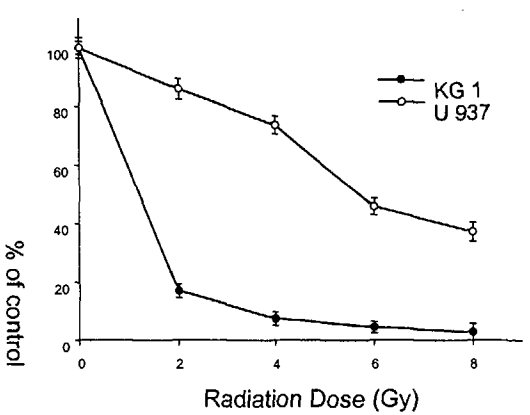
(A) MTT result



(B)Trypan blue result



(C) ^{3}[H]Thymidine incorporation result



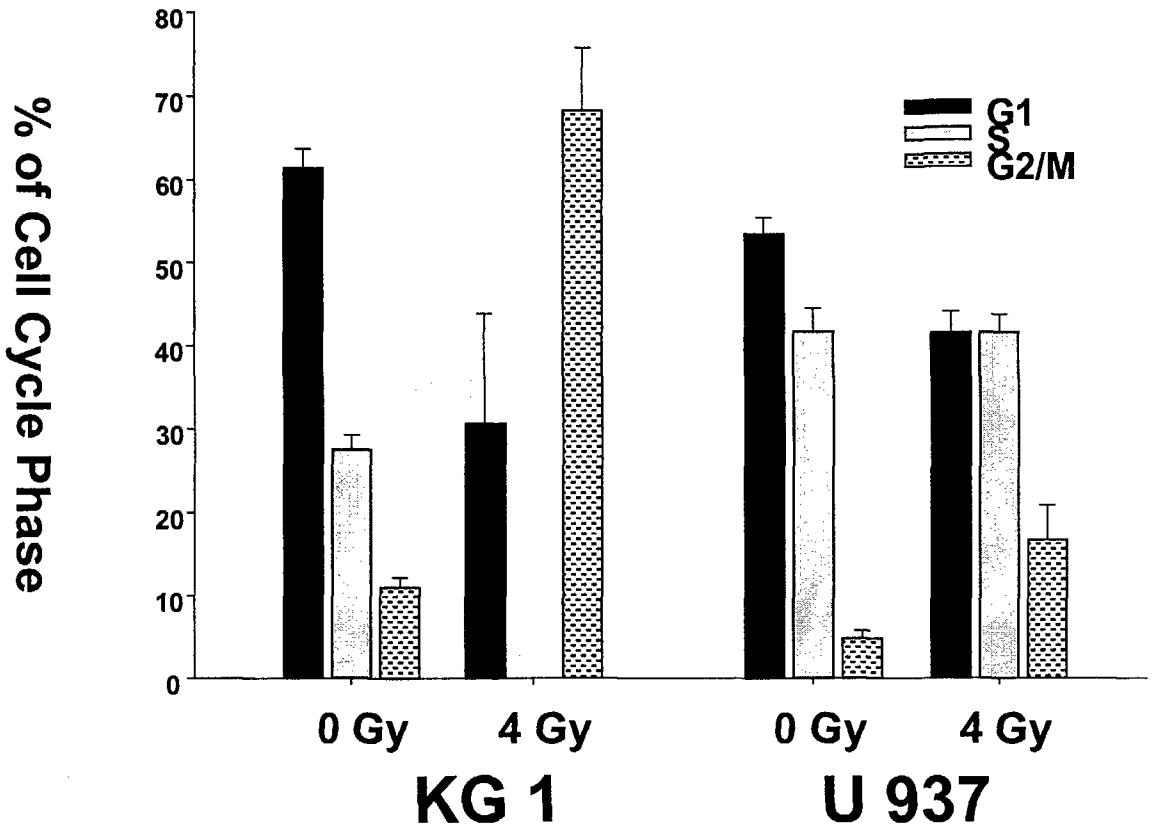


Fig.14. Cell cycle distribution by irradiation on KG 1 and U 937

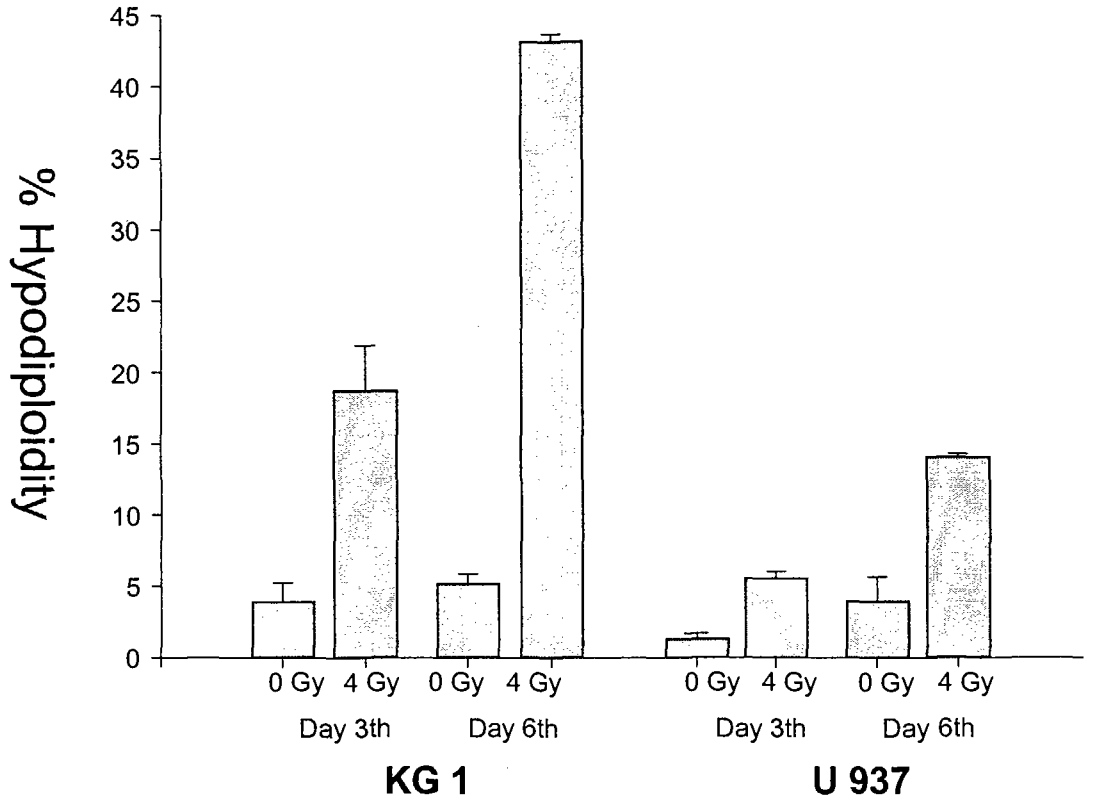


Fig. 15. Formation of hypodiploid DNA by *r*-irradiation

공동과제

정상체조직의 방사선감수성 및 내성조절 분자기전연구

요 약 문

I. 제 목

정상체조직의 방사선감수성 및 내성조절 분자기전연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

방사선 및 방사성 동위원소의 이용이 증가함에 따라 직·간접적인 경로를 통한 방사선 피조사의 가능성을 안고 있다. 따라서 방사선 인체장해의 근원적인 예방 및 대책 마련이 절실하다. 방사선이 인체에 미칠 수 있는 급만성 장해의 근원적인 예방책 및 대책을 마련하려면 먼저 방사선이 인체에 미치는 영향에 대한 체계적이고 종합적인 연구가 이루어져야 한다. 이를 바탕으로 방사선 인체장해와 방사선조사의 유관성을 판별 할 수 있는 평가기술이 개발되어야 할 것이다. 그러나 국내에서 방사선이 인체에 미치는 영향에 대한 연구는 이제 시작 단계이며 정상체조직의 본태성감수성에 대한 기초연구도 전혀 이루어져 있지 않다. 현재 방사선에 의해 발생가능한 인체장해의 경감 및 예방을 위해 활용가능한 기술은 거의 전무한 실정이다.

방사선 피조사에 의한 인체영향의 기전 및 제어기술 개발에 대한 필요성에 따라 본 연구 "정상체조직의 방사선감수성 및 내성조절 분자기전연구"가 시도되었다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

정상체조직의 방사선감수성 및 내성에 관한 자료는 주로 장기의 기능장애를 기준으로 한 것이다. 본 연구는 방사선감수성 및 내성관련 분자지표를 탐색하고 이를 중심으로 정상체조직의 방사선의 감수성 및 내성조절을 위한 기반구축을 목표로 하고 있다. 방사선감수성에 차이를 보이는 세포주를 대상으로 방사선 감수성계측용 지표를 선정하고, 실험동물에 방사선 조사 후 선정된 분자지표를 이용하여 각종 장기의 방사선감수성 및 내성을 비교하여 정상체조직의 방사선 감수성 및 내성의

분자기전 연구의 기반을 구축하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

세포주를 이용한 실험결과 방사선 감수성 및 내성과 관련되는 것으로 나타난 free radical 생성량, 지질과산화정도, glutathione 함량 및 산화정도, HSP의 발현정도를 방사선감수성 및 내성 관련 분자지표군으로 선택하고, 분자지표 분석의 효율적 수행을 위하여 microplate를 이용한 분석 방법을 확립한 후 동물 실험을 통한 적용 타당성을 검토하였다. 조직 별로 basal level의 free radical 생성량과 지질과산화정도가 크게 차이를 보였으며, 방사선 조사 후 free radical의 생성 속도와 지질과산화정도의 변화는 장기에 따라 그 양상이 다르게 나타났다. 여러 장기의 basal level glutathione 량을 비교한 결과, 방사선감수성이 높은 것으로 알려진 testis는 매우 낮은 glutathione 함량을 보였고, 방사선감수성이 낮은 것으로 알려진 brain은 높은 glutathione 함량을 보였다. 이 두 장기의 방사선 조사에 이은 시간별 glutathione의 상태 변화를 비교한 결과 brain은 방사선 조사 후 glutathione 고갈 및 산화 현상이 미미한 반면, testis에서는 glutathione의 고갈 및 산화정도가 현저히 증가하였다가 시간이 지남에 따라 회복하는 현상이 보여졌다. 이 glutathione의 대사 변화를 설명하고자 각 장기의 glutathione의 대사에 관련된 효소들인 γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase의 활성도와 superoxide dismutase 및 catalase의 활성도를 비교하였다. 조직별로 효소들의 활성도가 매우 큰 차이를 보였으며, 이 차이는 방사선 감수성 관련 요소 뿐 아니라 조직의 고유한 대사의 차이에 크게 영향을 받을 것으로 생각된다.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

현재 본 과제에서 확립한 몇 가지의 assay 방법을 kit화 시킨다면 redox관련 병리생태의 모니터링에 광범위하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 소량의 시료를 이용하여 방사선감수성 및 내성을 매우 정밀하고 재연성 있게 측정할 수 있

는 kit를 개발할 경우 특허취득은 물론이고 정상체조직의 방사선 감수성 및 내성 예측과 redox관련 약제 및 항암제 테스트에 광범위하게 활용될 수 있을 것이다.

S U M M A R Y

I. Title

Molecular mechanisms of intrinsic radiosensitivity of normal tissue

II. Objective and importance of the study

There are increasing probabilities of human body exposure to radiation because of a wide use of radioactive substances and radiation. As a result, a demand for the protective measures against ill-effect of human exposure to radiation has been built up. It is believed that the fundamental and comprehensive study on the effect of human body exposure to radiation, and the establishment of evaluation methods for the effect are among the most urgent tasks. Nevertheless, the basic research on the biological effect of radiation is still at the beginnings. The current study aims at the development of evaluation and protection methods for the effect of radiation on human bodies.

III. Scope and contents of the study

The existing data for the molecular mechanisms of intrinsic radiosensitivity of normal tissues were based on the organ impediment. The goals of the current study are the investigation of the biological indices for the radiosensitivity and radioresistance, and the establishment of fundamentals for the regulation of the sensitivity and resistance based on the use of the indices. We selected valuable indices based on the results from experiments with cells with different radiosensitivities. And we quantitated and compared the selected indices in the tissues of irradiated animals to investigate the radiosensitivity and resistance. By evaluating the resulted data on the irradiation-related changes of the indices, we established fundamentals for the study on the molecular mechanism of intrinsic radiosensitivity of normal tissue.

IV. Results

We selected the degrees of free radical formation, lipid peroxidation, glutathione contents and the oxidation ratio, and expression of heat shock proteins as the indices for evaluation of sensitivity and resistance to radiation based on the results from experiments with cells with different radiosensitivities. First, we developed methods for the efficient and convenient assays of the indices by using microplate reader. Then, the validity of the use of the indices were investigated by evaluation of the indices in the tissue of irradiated mice. Basal levels of free radical formation and lipid peroxidation showed large differences among various tissues, and the irradiation-induced changes of the levels also showed different patterns among tissues. We compared basal content and oxidation state of glutathione among tissues. The testis that is known as a radiosensitive tissue showed relatively low content of glutathione, whereas the brain that is known as a radioresistant tissue showed high content of glutathione. The irradiation-induced time-dependent depletion and oxidation of the glutathione pool in the brain was relatively low. On the other hand, the depletion and oxidation of glutathione in the testis was significant, although, it was found that the glutathione pool in the irradiated testis gradually recovered. To investigate the underlying mechanism for the glutathione-related response to radiation, we compared activities of enzymes involved in glutathione metabolism, i.e., γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase, and the free radical scavenging enzymes, i.e., superoxide dismutase (SOD) and catalase in various tissues under investigation. The tissues showed wide range of the activities of the enzymes. It is believed that the activities of the enzymes are under influence of not only the factors related to radiosensitivity but also the factors related to the intrinsic functions of the tissues.

V. Proposed application of the results

The development of the assay kits with the methods established in the current study should prove to be very useful for monitoring redox-related pathologic conditions. The developed methods can be especially useful for the

analysis of small amount of specimens and with large number of samples. The kit that is able to produce accurate and reproducible measurements can be widely used in the redox and cancer-related pharmaceutic areas.

제 1 장 서 론

방사선 및 방사성 동위원소는 각종 산업적 이용뿐 아니라 진단 및 치료, 과학연구에의 활용 등으로 삶의 질적 향상을 위하여 다각도로 이용되고 있다. 더구나 우리 나라는 전력 생산의 상당 부분을 원자력 발전에 의존하고 있어 방사선 관련 종사자들은 만성적인 방사선 피조사의 가능성을 안고 있다. 뿐만 아니라 건축물의 구조진단용 등으로 소형의 방사선조사 기기들이 전국에 산재해있는 산업현장에서 쓰이고 있으므로 향후 발생 가능성이 있는 방사선 인체장해에 대한 대책 마련 필요성이 대두되고 있다. 한편 방사능 누출 사고로 인하여 1985년 소련 체르노빌 사태와 같은 대량의 급작스러운 방사선 피폭가능성에대한 가능성도 배제할 수 없는 상황을 감안할 때 방사선 인체장해의 근원적인 예방 및 대책 마련은 더욱 절실하다.

방사선이 인체에 미칠 수 있는 급만성 장해의 근원적인 예방책 및 대책을 마련하려면 먼저 방사선이 인체에 미치는 영향에 대한 체계적이고 종합적인 연구가 이루어져야 한다. 이를 바탕으로 방사선 인체장해와 방사선조사의 유관성을 판별 할 수 있는 평가기술이 개발되어야 할 것이다. 그러나 국내에서 방사선이 인체에 미치는 영향에 대한 연구는 이제 시작 단계이며 정상 체조직의 본태성 감수성에 대한 기초연구도 전혀 이루어져 있지 않다. 따라서 현재 방사선에 의해 발생 가능한 인체장해의 경감 및 예방을 위해 활용 가능한 기술은 거의 전무한 실정이다. 그러므로 방사선 피조사에 의한 인체영향의 기전을 파악하고 이를 제어할 수 있는 기술개발에 대한 필요성은 매우 절실하다. 정상과 비정상은 동전의 앞뒷면이므로 정상세포의 방사선감수성 및 내성 조절기전 규명과 이의 제어기술개발은 궁극적으로 암세포 치료 방법이나 치료효과 증진제 개발을 위한 핵심요소 기술로써 활용되어 무한한 부가 가치를 창출할 수 있을 것이다. 아직까지 대부분 국외에서의 개발에 의존하고 있는 암세포의 살상 극대화를 위한 방사선 민감제나 방사선 감수성증진 세포조절물질의 국내 개발을 통한 물질특허와 이의 활용에 수반되는 경제·산업적 가치는 실로 막대하다 할 수 있다.

본 연구의 연구개발목표는 정상체조직의 방사선감수성 및 내성조절 분자기전 기반연구이며, 방사선감수성에 차이를 보이는 세포주를 대상으로 방사선 감수성 계측용 지표를 선정하고, 실험동물에 방사선 조사 후 선정된 분자지표를 이용하여 각종 장기의 방사선감수성 및 내성을 비교하여 정상체조직의 방사선 감수성 및 내

성의 분자기전 연구의 기반을 구축하였다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1. 지금까지의 연구개발 현황

정상 체조직의 방사선감수성에 대한 보고는 지금까지 국내외를 막론하고 많지 않은 실정이다. 특히 인체를 대상으로 실험을 할 수가 없기 때문에 대부분의 자료는 원폭피해자를 대상으로 하거나 원전 사고자를 대상으로 시행된 역학조사의 자료뿐이라고 하여도 과언이 아니다. 인체에서는 암환자에 있어서 방사선 치료가 많이 시행되고 있기는 하나 여기에서도 실험보다는 비의도적인 방사선 조사가 시행된 장기의 영향을 알아보는 정도의 연구가 진행되었고(이를 모아서 Emami, Berman등이 발표한바 있음) 이를 기준으로 현재의 방사선 치료가 시행되고 있다. 그러나 이 자료 역시 end point를 거시적인 기능 장애를 기준으로 하여 작성된 자료이므로 엄밀한 의미로 체조직의 방사선감수성을 평가하였다고 보기에는 무리가 따른다.

정상 체조직의 방사선 감수성에 대한 국내연구는 이제 방사선에 의한 인체정상조직변화 등 조직학적 관찰기초자료를 확보하고 있는 실정에 머무르고 있다. 다양한 경로를 통하여 인체가 방사선에 노출되고 있고 이에 대한 대비책이 시급히 강구되어야 함에도 정상 체조직의 방사선 감수성에 관한 기초연구조차 이루어지고 있지 않다.

정상 체조직의 방사선 감수성을 억제하고 내성을 증진시킬 수 있는 기술 개발을 위하여 일차적으로 방사선 감수성 조절의 분자기전에 대한 연구가 이루어져야 한다. 최근 들어 국내외적으로 세포수준에서 방사선 감수성조절기전을 이해하려는 노력이 시작되고 있으나 생체 수준에서의 연구는 이제 시작단계라 할 수 있다.

2. 현 기술상태의 취약성

원자력 산업신장과 많은 사람이 방사선 작업종사자로 등록되어 있을 뿐 아니라 방사선에 노출될 기회가 증가될 전망이지만 원자력계가 국가 산업에서 차지하는 인적 비중이 크지 않기 때문에 방사선 생물학에 대한 전반적인 인식 수준은 매우 낮다고 볼 수 있다. 필연적으로 방사선이 인체에 미치는 영향연구에 대한 지원이 한정적이었으며 국내에서 방사선 생물학 관련 연구자의 수도 극히 제한된 상태였다.

국내에서 방사선이 인체에 미치는 영향에 관한 체계적인 연구는 1992~1999년까지 1단계 5년간의 중장기 연구를 기점으로 시작되었으며 그간의 노력으로 비로소 자체기술의 확보잠재력이 마련되었다고 볼 수 있다. 또한 원자력 신중장기연구가 1997년부터 시행되면서 관련연구인력의 노력집중과 병행하여 국외에서 방사선생물학을 전공한 신진 연구인력들의 적극적인 참여로 바야흐로 도약기를 맞고 있다고 할 수 있다. 방사선의 인체영향을 규명하여 이의 제어기술을 개발하고 방사선의 의학적 이용을 극대화하는 세계수준의 기술 구축을 위해서는 다양한 연구주체가 육성되어야 할 것이다. 방사선의 인체영향을 분자수준에서 규명하기 위해서는 세포학, 분자생물학, 유전학, 생화학, 종양생물학, 병리학, 발생학 등의 생명과학관련 분야 전 분야에 의한 전문성이 요구된다는 사실을 감안 할 때 다양한 연구주체육성의 중요성은 더욱 강조된다. 더불어 이들 연구 주체사이의 생산적인 선의의 경쟁이 이루어질 때 현기술 상태의 취약성도 극복될 수 있을 것이라 생각된다. 방사선에 대한 인체영향 평가를 위해서는 기본 설비로 고도화된 방사선조사 장치가 있어야 하기 때문에 한정된 연구분야일 수밖에 없었음도 사실이나 이 부분은 학·연·산의 공조체제에서 충분히 해결 가능하다고 본다.

3. 앞으로의 전망

방사선 및 방사성 동위원소의 활용범위는 증가일로 추세에 있다. 또한 자연환경 중 화학물질의 분포 또는 사용빈도 역시 증가할 것임을 감안할 때 이들의 복합적 영향평가에 대한 중요성도 인식되고 있다. 또한 방사선 피조사에 의해 발생 가능한 장애의 심각성과 방사선과 관련된 정확한 생체현상을 알고자하는 시대적 요구가 있음을 고려할 때 국가차원에서 충분한 기초 자료와 기반 기술을 확보하여야 할 것이므로 이 분야의 전망은 밝다.

이밖에도 방사선 인체영향평가 부분에서 지금까지의 연구에서는 대부분 photon에 의한 영향을 보고 있지만 향후 low LET photon은 물론 neutron이나 proton같은 high LET의 방사선의 영향과 방사선의 dose rate 에 따른 연구도 필요할 것으로 생각된다. 또한 자연방사선노출과 노후발암과의 관계도 제시되고 있으므로 자연 방사선에 의한 인체영향에 대한 연구도 이루어져야 할 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발수행 내용 및 범위

정상 체조직의 방사선감수성 및 내성에 관한 자료는 주로 장기의 기능장애를 기준으로 한 것이다. 본 연구에서는 방사선감수성 및 내성관련 분자지표를 탐색함으로써 정상 체조직의 방사선감수성 및 내성조절을 위한 연구기반을 구축하고자 하였다.

제 2 절 연구결과

1. 방사선감수성 및 내성관련 분자지표군의 탐색

본 실험실에서 보유하고 있는 각종세포주중 방사선감수성에 차이를 보이는 세포주를 대상으로(RIF, TR, L929, L25#1, L25#8, H_2O_2/R등) 방사선생체작용의 첫 단계에서 생성되는 활성산소의 양 (DCF), 단백질산화 및 손상 (protein-s-thiolation, protein aggregation), 지질과산화 (TBA-lipid peroxids) 및 핵산변성 (8ohdG)을 탐색하였다. 세포주를 대상으로 한 실험결과 방사선에 의한 활성산소생성과 지질과산화정도가 가장 민감하게 방사선용량 의존적인 증가를 나타내고 이때 세포의 생존률도 감소하였으므로 활성산소생성과 지질과산화정도를 방사선감수성계측용 지표로 일차 선정하였다.

방사선내성을 계측할 수 있는 지표로써 glutathione대사, 각종 스트레스단백질의 함량 (HSP110, HSP90α , HSP90β , HSP70, HSC70, mtHSP75, HSP60, HSP25, α B, GRP78, HO-1)을 측정하였다. 스트레스단백질군중 HSP70 과 HSP25의 발현이 높을수록 세포의 방사선생존율이 높이 나타났으므로 이들을 방사선 내성지표군으로 일차 선정하였다. 본 결과는 국제 학술지에 발표하였다 (Role of small heat shock protein HSP25 in radioresistance and glutathione-redox cycle. J. Cell. Physiol., 183:100-107, 2000). Table 1은 방사선 조사후의 스트레스 유전자 발현양상을 나타낸다. 이 밖에도 방사선내성과 관련되어 보고되는 몇 가지 kinase와 항산화효소계의 조직별 활성 및 발현정도를 탐색하였다.

세포내 glutathione함량을 측정해본 결과 HSP들이 과발현된 세포주들에서 glutathione의 함량 및 환원도가 높은 것으로 나타났으며, 방사선 조사에 의한 glutathione의 변화 양상을 볼 때, HSPs의 발현이 높은 세포주들이 높은 세포내 glutathione 농도와 환원정도를 유지하고 있음이 보여졌다. Glutathione의 대사에 관련된 효소들인 γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd)들의 활성도를 비교한 결과 HSP 과발현주들에서 glutathine peroxidase와 glutathione reductase의 의미 있게 높은 활성도가 보여졌다.

위와 같이 얻어진 결과를 종합하여 정상체조직에서 각종 분자지표의 타당성 검토를 위하여 mouse에 방사선조사 후 각 조직들의 시간 별 활성산소생성과 지질과산화정도 변화, glutathione과 glutathione 관련 효소활성 변화, 조직들의 HSP 발현 정도 변화를 측정하였다.

2. 방사선감수성 및 내성조절 관련 분자지표 탐색 방법 확립

다수의 실험동물의 조직들을 분석하기 위하여 먼저 효율적이고 정확한 분석 방법의 확립이 필요하였다. 본 연구를 위하여 microplate reader를 이용한 분석 방법들을 다음과 같이 확립하였다.

가. Microplate reader를 이용한 2',7'-dichlorofluorescein 생성에 의한 조직 활성산소 생성량 분석

방사선감수성 및 내성조절 관련 분자지표 탐색 방법의 하나로 조직의 free radical 생성량을 측정하였다. 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)는 oxygen free radical의 존재 하에서 deesterified되고 이어서 산화되어 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)이 된다. DCF는 fluorescence를 내므로 excitation wave length 485 nm, emission wavelength 530 nm에서 측정할 수 있다. 본 실험에서는 각종 조직에 DCFH-DA를 처리하여 시료를 둘로 나누고 한 fraction에는 buffer만을 다른 fraction에는 ascorbate와 $FeSO_4$를 가하여, 각각 basal oxygen free radical 생성속도와 stimulated oxygen free radical 생성속도를 측정하였다. 본 실험의 결과를 kit화 하기 위하여 96well format으로 microplate fluorescence reader를 사용하는 방법을 개발하였다. Figure 6은 basal oxygen free radical 생성속도와 stimulated oxygen free radical 생성속도 측정시

의 reaction time course를 보여준다. 20분의 측정기간동안 fluorescence가 일직선으로 증가함을 알 수 있었다. 개발한 방법은 국내 특허 출원하였다 (2,7-dichlorofluorescin (DCFH)를 이용한 세포의 유리라디칼 생성량 고속측정방법. 〔출원번호〕 제 2000-3520호, 2000. 2. 15. 등록).

나. Microplate reader를 이용한 Thiobarbituric acid 반응에 의한 조직 지질과산화물 분석

방사선감수성 및 내성조절 관련 분자지표 탐색 방법의 하나로 조직의 lipid peroxidation을 측정하였다. 조직의 lipid peroxide는 lipid peroxidation의 이차적 산물인 malondialdehyde (MDA)와 thiobarbituric acid (TBA)와의 반응에 의해 정량하였다. 시료의 TBA-reactive 물질은 spectrophotometer보다 더욱 민감한 방법인 fluorescence를 측정하여 정량하였다. 많은 종류의 시료를 동시에 분석할 수 있는 kit를 개발 하고자 microplate fluorescence reader를 사용하고자 하였다. Microplate fluorometer (Cambridge Tech.)에 제공된 여러 가지의 excitation filter와 emission filter를 시험해 본 결과 530 nm excitation filter와 590 nm emission filter가 가장 적합한 것으로 나타났다. 개발한 분석 방법은 특허 출원하였다. Microplate fluorometer에서의 standard curve도 사용한 전 구간에서 일차함수로 증가함을 볼 수 있다. 실험조직의 정량 결과는 TEP의 standard curve와 비교하여 nmol/mg protein으로 나타내었다. Figure 9은 TEP standard curve이다. Figure 10은 조직의 양을 증가시키면서 lipid peroxide를 정량한 것이다. 조직량에 비례하여 fluorescence가 정량적으로 증가함이 보여진다.

다. Microplate reader를 이용한 Enzymatic 정량방법에 의한 조직 glutathione 분석

Glutatione (γ -glutamylcysteinylglycine)은 세포내에 수 내지 수십 mM 수준의 농도로 존재하는 tripeptide sulfhydryl 화합물로서, 세포내의 산화/환원상태에 따라 환원형 (reduced glutathione, GSH)과 산화형 (oxidized glutathione or glutathione disulfide, GSSG)으로 존재한다. 여러 가지의 요인에 의해 세포가 산화상태가 되면 glutathione은 disulfide로 산화되고 대부분의 세포들은 산화된 glutathione을 세포 밖으로 배출한다. 따라서 세포내의 glutathione은 세포의 산화/환원 정도의 척도로 이용될 수 있다. 이때 세포내의 glutathione의 전체량 뿐 아니라, glutathione의 산화정

도, 즉 환원형 glutathione과 산화형 glutathione의 비율을 정확히 측정하는 것이 중요하다. 그러나 특히 제한된 조직시료를 이용하여 방대한 분석을 수행하여야 하는 임상시험의 경우 기존의 HPLC 방법이나 spectrophotometer를 사용한 기존의 enzymatic assay방법으로는 효율적인 정량이 불가능하다. o-Phthalaldehyde reaction에 의한 fluorometric glutathione 정량방법을 응용하여 multi-well plate를 사용한 assay가 개발되어 쓰이고 있으나 본 연구결과 이는 GSSG의 양을 정량하는 데는 매우 부적절한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 enzymatic glutathione assay 방법에 NEM 처리 과정을 도입하여 GSH와 GSSG를 동시에 정확히 측정하는 방법을 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 microplate를 사용하여 많은 종류의 시료를 한꺼번에 측정할 수 있는 assay system을 확립하였다. 시료처리시 정확한 GSH와 GSSG의 측정은 NEM 반응의 완결 여부가 관건인데, HPLC 방법에 의해 확인 해본 결과 NEM 처리 fraction에는 GSH가 전혀 보이지 않아 반응이 완결되었음을 확인 할 수 있었다. 반응은 glutathione reductase와 DTNB의 mixture 가하는 것으로 개시하였으며 microplate reader (CERES 900C, Bio-Tek Instruments)에서 kinetic assay software를 사용하여 340 nm에서의 흡광도를 5 분간 monitor하여 기울기로부터 반응 속도 (Δ A/min)를 구하였다. Figure 12는 본 과제에서 개발한 방법에 의한 kinetic assay 결과를 나타낸다. 흡광도가 5분 이상 일직선으로 증가하여 반응 조건이 최적상태에 있으며, 이로부터 반응속도를 정확히 구할 수 있음을 보여준다. 본 정량에서 사용하는 정량 범위는 0 - 10 nmol/assay로 HPLC 방법에 못지 않게 매우 sensitive한 assay 방법임을 알 수 있다. Figure 14는 이 방법에 의한 조직 시료 glutathione 측정의 타당성을 검토하기 위하여 시료의 양을 증가시켜가면서 total glutathione과 GSSG을 정량한 결과이다. 조직의 total glutathione의 정량은 standard curve 의 측정범위 전체에 걸쳐 시료양 증가에 따라 GSH 양이 거의 정량적으로 증가하였다. 반면에 GSSG의 정량 결과는 어느 정도까지는 일직선의 증가를 보이다가 시료의 양이 더 증가하면 증가 정도가 떨어지기 시작하는 현상을 보였다. 이것은 NEM 처리 후 ether 추출을 거치더라도 시료에 미량의 NEM이 남아있어, 시료의 부피를 증가해서 가해주면 assay mixture의 glutathione reductase가 저해되는 것에 기인한 것으로 분석되었다. 따라서 assay에 가해주는 시료의 부피는 20 μl로 결정하였다. 본 개발 방법은 국내 및 미국 특허를 출원하였다 (효소 kinetics를 이용한 산화형 및 환원형 글루타치온의 고속측정방법. 〔출원번호〕 제 2000-2970호, 2000. 1. 21. 등록).

3. 동물실험

약 4주령의 수컷 C3H 생쥐를 사용하여 실험을 수행하였다. 실험동물에 방사선을 조사한 후 시간대별로 각종 장기를 적출하여 dry ice 하에서 freeze-clamp하고 분석시까지 -70℃에서 보존하였다. 각 방사선용량 당 매 time point마다 5마리를 사용하였고 5번 반복실험 하였다 (50 마리 × 5 = 250 마리). 적출장기 선택시 기능장애를 end-point로 한 Enami등의 연구결과에 근거하여 가장 방사선감수성이 낮다고 제시된 muscle, brain, 중간정도의 heart, liver, kidney, lung, spleen, 가장 높다고 제시되는 testis등 8종의 장기를 적출하고 1 항에서 일차 선정된 후보 분자지표군을 중심으로 실험을 진행하였다.

가. 방사선조사에 의한 조직별 활성산소 생성량 변화

Freeze claming에 의해 얼려 보관한 각종 장기의 oxygen free radical 생성량은 2 항에서 설명한 바와 같이 microplate reader 이용한 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) 방법을 사용하여 측정하였다. 방사선 조사 후 free radical의 생성 속도의 변화는 장기에 따라 그 양상이 다르게 나타났다.

나. 방사선조사에 의한 조직별 지질과산화 변화

방사선 조사 후 얼려 보관한 각종장기의 지질과산화정도를 2 항에서 설명한 microplate를 이용한 TBA 분석법으로 측정하였다. 조직 별로 basal level의 지질과산화정도가 크게 차이가 보였으며, 방사선 조사 후 지질과산화정도의 변화는 장기에 따라 그 양상이 다르게 나타났다.

다. 방사선조사에 의한 조직별 glutathione 변화

방사선 조사 후 얼려 보관한 각종장기의 glutathione의 함량 및 산화정도를 2 항에서 설명한 microplate를 이용한 enzymatic 분석법으로 측정하였다. 방사선감수성이 높은 것으로 알려진 testis는 매우 낮은 glutathione 함량을 보였고, 방사선감수성이 낮은 것으로 알려진 brain은 높은 glutathione 함량을 보였다. 이 두 장기의 방사선 조사 (10 Gy)에 이은 시간별 glutathione의 상태 변화를 비교한 결과 brain은 방사선 조사 후 glutathione 고갈 및 산화 현상이 미미한 반면, testis에서는 glutathione의 고

갈 및 산화정도가 현저히 증가하였다가 시간이 지남에 따라 회복하는 현상이 보여졌다. 이 glutathione의 대사 변화를 설명하고자 각 장기의 glutathione의 대사에 관련된 효소들인 γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase의 활성도와 (Fig. 20) superoxide dismutase 및 catalase의 활성도를 비교하였다. 조직별로 효소의 활성도가 매우 큰 차이를 보였으며, 이 차이는 방사선 감수성 관련 요소 뿐 아니라 조직의 고유한 대사의 차이에 크게 영향을 받을 것으로 생각된다.

라. 방사선내성관련 스트레스단백질 발현양상

세포주를 이용한 실험결과 방사선 감수성 및 내성과 관련되는 것으로 나타난 HSP70과 HSP25의 장기별 발현양상을 조사하였다. 장기별 분석결과 세포주에서의 실험과는 달리 HSP 및 PKC의 발현 양상은 방사선 감수성 및 내성과 전혀 관계가 없는 것으로 나타났다. 장기형성기에 HSP70 및 HSP25의 발현조절에 관여하는 HSF2나 promoter를 cloning 하였고 (EMBL accession number #AF172640)이들의 활성도를 조사하여 국제 학술지에 발표하였다 (Regulation of rat heat shock factor 2 (HSF2) expression during early organogenic phase of embryogenesis. Biochem. Biophys. Acta, 93389: 1-8, 2000).

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

본 연구에서는 방사선감수성 및 내성관련 분자지표를 탐색함으로써 정상체조직의 방사선의 감수성 및 내성조절을 위한 연구기반을 구축하고자 하였다. 이를 위하여 세포 실험을 통하여 방사선감수성 및 내성 관련 분자지표를 탐색하고, 실험동물을 사용한 방사선 조사 실험을 통하여 적용 타당성을 검토하였다. 본 연구 결과 방사선 감수성 및 내성 관련 분자지표로서 탐색한 요소들 중에 모든 장기에 적용될 수 있는 어는 한 요소만을 선정 사용하는 것은 적절하지 않으며, 각 장기의 대사적 특성을 고려하고, 급성의 방사선 손상을 대상으로 하는가 또는 만성의 장애를 대상으로 하는가에 따른 지표의 차별적 선택도 염두에 두어야 할 것으로 결론 지을 수 있다.

본과제의 연구결과는 정상 체조직의 장기별 방사선감수성 및 내성조절 분자기전 규명과 이를 이용한 장기별 감수성 및 내성 예측지표 선택 뿐 아니라, 인체 적용 타당성 검토를 거쳐 방사선 관련 종사자 및 환자들의 장애 예방 및 치료 효과 증진에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

현재 본 과제에서 확립한 몇가지의 assay 방법을 kit화 시킨다면 redox관련 병리 생태의 모니터링에 광범위하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 특히 소량의 시료를 이용하여 방사선감수성 및 내성을 매우 정밀하고 재연성 있게 측정할 수 있는 kit를 개발할 경우 특허취득은 물론이고 정상체조직의 방사선감수성 감수성 및 내성 예측과 redox관련 약제 및 항암제 테스트에 광범위하게 활용될 수 있을 것이다.

본 과제에서 얻어진 결과를 바탕으로 2단계 1차년도에는 확립된 측정 방법들을 바탕으로 1) 방사선 유래 활성산소 조절인자를 탐색 규명하고 2) 항산화효소계에 관한 연구를 수행하고자한다. 또한 3) 장기별 감수성에 관여하리라고 생각되는 후보 인자들을 중심으로 장기별 특이적 방사선감수성 조절 연구를 수행하고자한다.

제 6 장 참고문헌

1. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P: Uric acid provides an antioxidant defense in human against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA 78:6858-6862, 1981.
2. Baek SH, Min JN, Park EM, Han MY, Lee YS, Lee YJ and Park YM: Role of small heat shock protein HSP25 in radioresistance and glutathione-redox cycle. J Cell Physiol 183:100-107, 2000.
3. Barber DJW, Thomas JK: Reactions of radicals with lecithin bilayers. Radiat Res 74:51-59, 1978.
4. Biaglow JE, Clark EP, Epp ER, Morse-Guadio M, Varnes ME and Mitchell JB: Nonprotein thiols and the radiation response of A549 human lung carcinoma cells. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 44:489-495.1983.
5. Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 52: 302-310, 1978.
6. Bump EA, Yu NY and Brown JM: Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione. Science 217:544-545.1982.
7. Cassatella MA: Cytokines produced by polymorphonuclear neutrophils: Molecular and biological aspects. Springer, Heidelberg, 1996.
8. Cheeseman KH: Lipid peroxidation and cancer. in: Halliwell B, Aruoma OI eds. DNA and Free Radicals. Ellis Horwood, New York, 1993 pp. 109-144.
9. Choi JH, Kim WC, Loh JK, Han MY, Choi EM and Park YM: Microplate-reader based measurement of tissue glutathione by modified enzymatic assay. Kor J Hypertherm Oncol 4(4):1-16, 1999.
10. Cutler RG: Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. Ann NY Acad Sci 621:1-28, 1991.
11. Esterbauer H Schaur RJ, Zollner H: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, MDA and related aldehydes. Free Radic Biol Med

11:81-128, 1991.

12. Gey KF, Moser UK, Jordan P, Stähelin HB, Eichholzer M, Lüdin E: Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. Am J Clin Nutr Suppl 57:787S-797S, 1993.
13. Guichard M, Lespinasse F and Malaise EP: Influence of buthionine sulfoximine and misonidazole on glutathione level and radiosensitivity of human tumor xenografts. Radiat Res 105:115-125.1986.
14. Gutteridge, JMC, Quinlan GJ: MDA formation from lipid peroxides in the TBA test: the role of lipid radicals. iron salts, and metal chelators. J Appl Biochem 5:293-299, 1983.
15. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z and Kolesnick, R.N. (1994) Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med 180:525-535.
16. Halliwell B, Chirico S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 57:715S-725S, 1993.
17. Halliwell B, Gutteridge JMC: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Emzymol 186:1-85, 1990.
18. Jandero DJ: Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. Free Radc Biol Med 9:515-540, 1990.
19. Kappus H: Lipid peroxidation: mechanism, analysis, enzymology and biological relevance. in: Sies H ed. Oxidative stress. Academic Press, London, pp. 273-310.1985
20. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H: Oxidation of 2'7'-dichlorofluorescin by peroxynitrite. Free Radic Res 27:245-254, 1997.
21. LeBel CP Ischiropoulos H, Bondy SC: Evaluation of the probe 2'7'-dichlorofluorescein as an indicator of ROS formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 5:227-231, 1992.
22. LeBel CP, Odunze IN, Adams JD Jr, Bondy SC: Perturbations in cerebral

oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. Biochem Biophys Res Commun 163:860-866, 1989.

23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275.1951.
24. Martin BD, Schoenhard JA, Sugden KD: Hypervalent chromium mimics reactive oxygen species as measured by the oxidant-sensitive dyes 2'7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine. Chem Res Toxicol 11:1402-1410, 1998.
25. McCay PB: Application of ESR spectroscopy in toxicology. Arch Toxicol 60:133-137, 1987.
26. Min JN, Han MY, Lee SS, Park YM: Regulation of rat heat shock factor 2 (HSF2) expression during early organogenic phase of embryogenesis. Biochem Biophys Acta 93389: 1-8, 2000.
27. Min JN, Park JS, Choi EM, Han MY, and Park YM: Heat shock protein synthesis and thermotolerance induction in neural fold stage rat embryos in culture. Kor J Hypertherm Oncol 4(3):25-42, 1999.
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95:351-358, 1979.
29. Park JS, Kim YJ, Chung HY, Kim WC, Loh JK, Han MY, Choi EM and Park YM: Evaluation of oxidative stress by measurement of lipid peroxidation and antioxidant capacity of a tissue using microplate fluorometer. Kor J Hypertherm Oncol 4(4):17-32, 1999.
30. Park EM, Park YM, and Gwak YS: Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. Free Radic Biol Med 25:79-86,1998.
31. Park YM, Kim JY, Gu BY, Baek SH, Park EM, Han MY, Ahn YS: Protection against glutathione oxidation and 8 ohdG accumulation by mild ischemic pretreatment. Brain Res 856: 28-36, 2000.
32. Rice-Evans CA: Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states: Free radical damage and its control. Rice-Evans CA, Burdon RH eds., Elsevier Science,

Amsterdam, pp.131-154,1994.

33. Rosen GM, Barber MJ, Rauckman EJ: Disruption of erythrocyte membraneal organization by superoxide. J Biol Chem 258:2225-2228, 1983.
34. Rota C, Chignell CF, Mason RP: Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'7'-dichlorofluorescin to fluorescent dye 2'7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implication for oxidative stress measurements. Free Radc Biol Med 27:873-881, 1999.
34. Roy S, Noda Y, Eckert V, Traber MG, Mori A, Liburdy R, Packer L: The phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced oxidative burst in rat peritoneal neutrophils is increased by a 0.1 mT (60 Hz) magnetic field. FEBS Lett 376:164-166, 1995.
35. Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi H: Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 41:1355-1360, 1998.
36. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z and Kolesnick R: Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. Cell 86:189-199.1996.
37. Slater TF: Lipid peroxidation. Biochem Soc Trans 10:70-71, 1982
38. Slater TF: overview of methods used for detecting lipid peroxidation. Methods Enzymol 105:283-293, 1984.
39. Stähelin HB, Gey KF, Eichholzer M, Lüdin E, Bernasconi F, Thurneysen J, Brubacher G: Plasma oxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-year follow-up of the prospective basal study. Am J Epidemiol 133:766-775,1991.
40. Tappel AL: Free radicals in biology. Pryor WA ed., vol 4, Academic Press, New York, pp. 1-45,1980.
41. Trichopoupou A, Katsouyanni K, Stuver S, Tzala L, Gnardellis C, Rimm E, Trichopoulos D: Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. J Natl Cancer Inst 87:110-116, 1995.

42. Utsumi H, Ichikawa K, Takeshita K: In vivo ESR measurements of free radical reactions in living mice. Toxicol Lett 83:561-565, 1995.
43. Valkonen M, Kuusi T: Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum. L Lipid Res 38:823-833, 1997.
44. Wang X, Liu J, Yokoi I, Kohno M, Mori A: Direct detection of circulating free radicals in the rat using electron spin resonance spectrometry. Free Radic Biol Med 12:121-126, 1992.
45. Zweier JL, Kuppusamy P: Electron paramagnetic resonance measurements of free radicals in the intact beating heart: a technique for detection and characterization of free radicals in whole biological tissues. Proc Natl Acad Sci USA 85:5703-5707, 1988.

Table 1. Analysis of glutathione status in L25#1 and HSP25 overexpressors. The amounts of the total, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione levels were determined by HPLC and normalized as per mg protein. The data are expressed as means ± standard deviations. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ *vs.* L25#1, n=7.

Cell line	Glutathione (nmol/mg protein)			GSH/GSSG
	Total	GSH	GSSG	
L25#1	34.1±1.72	33.2±1.83	0.45±0.07	73.8
L25#6	37.0±1.38*	36.5±1.30*	0.28±0.04*	130.6**
L25#7	36.7±4.80	36.2±4.77	0.27±0.03*	134.1**
L25#8	38.4±2.42*	38.0±2.45*	0.22±0.04**	172.7**

Table 2. Induction patterns of the *hsp, grp* and *orp* stress gene families.

Stress gene	HSP					GRP		ORP	
	HSP110	HSP90	HSP70	HSP60	HSP25	GRP94	GRP78	HO-1	HO-2
Induced level	+	+	++++	++	++++	+/-	+/-	++	+

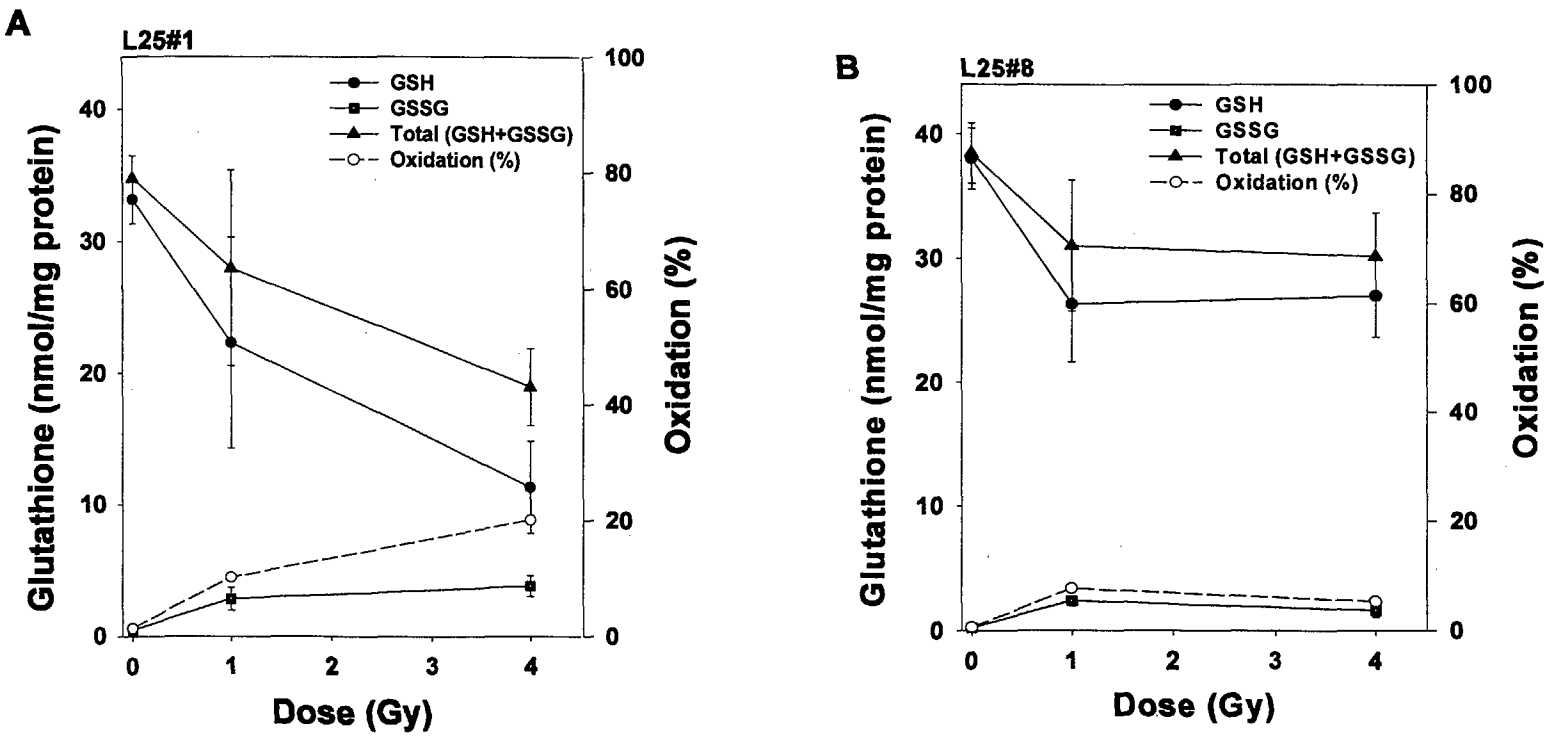


Fig. 1. Ionizing radiation dose-dependent changes of the glutathione status. (A) Vector transfected-control L25#1 (B) L25#8 cells.

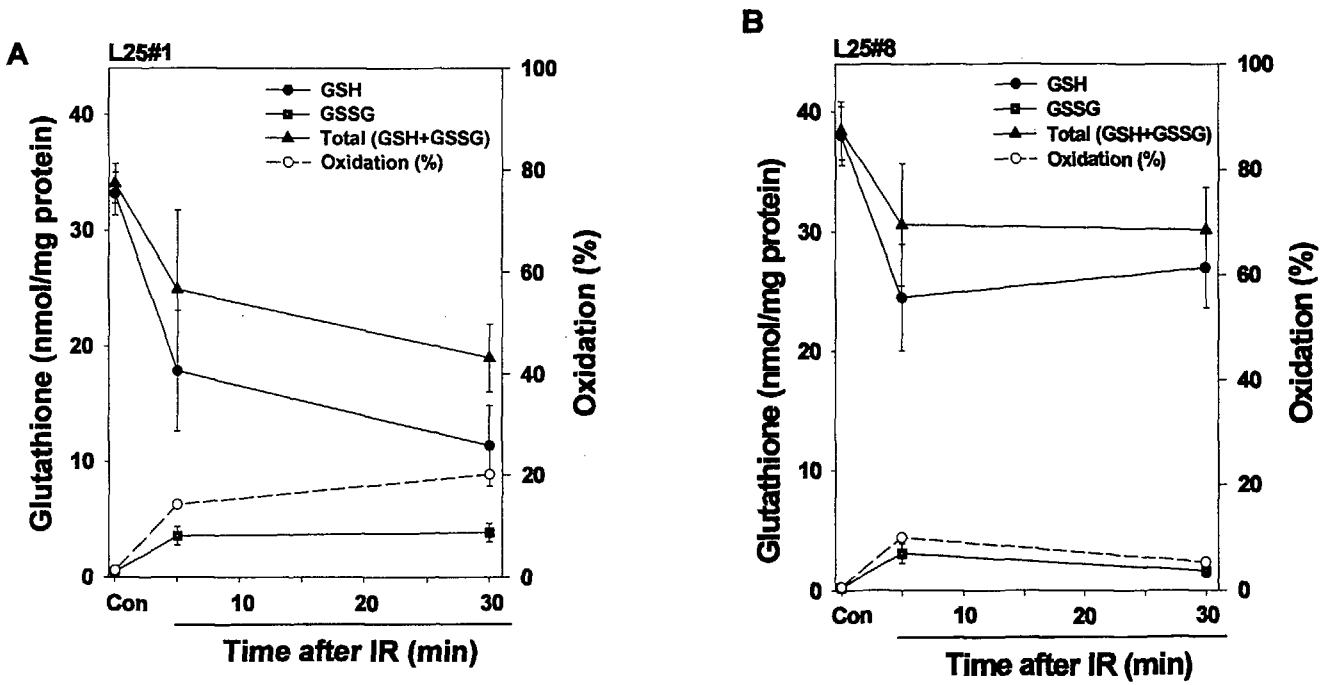


Fig. 2. Changes of the glutathione status after exposure to ionizing radiation. (A) Vector transfected-control L25#1 and (B) L25#8 cells.

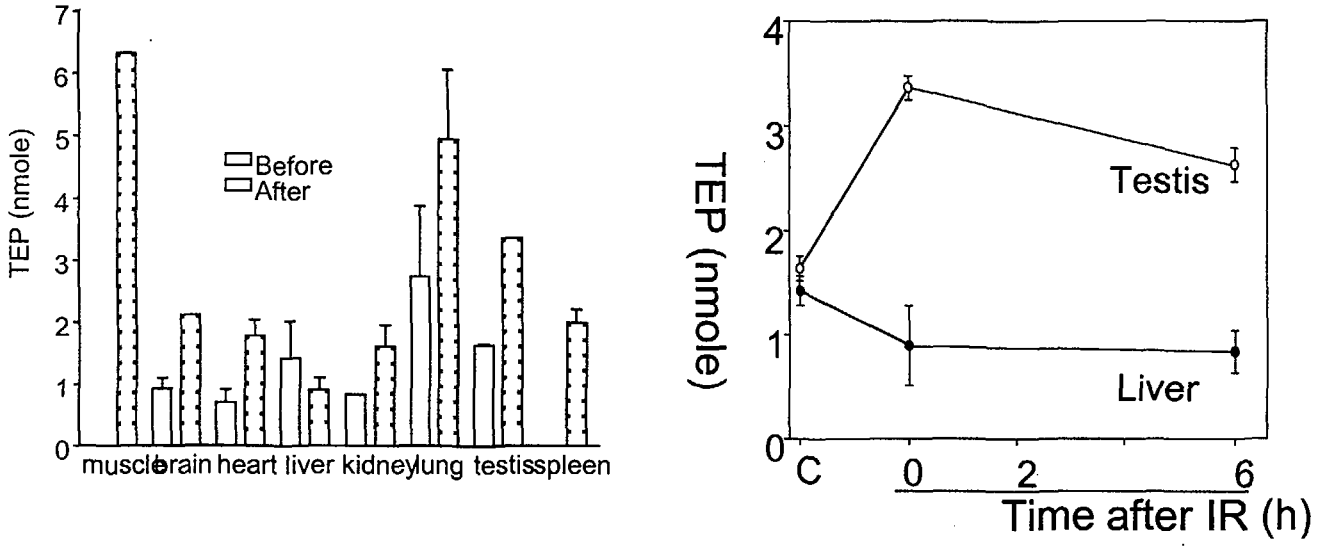


Fig. 3. Organ Difference of Lipid Peroxidation in C3H Mouse

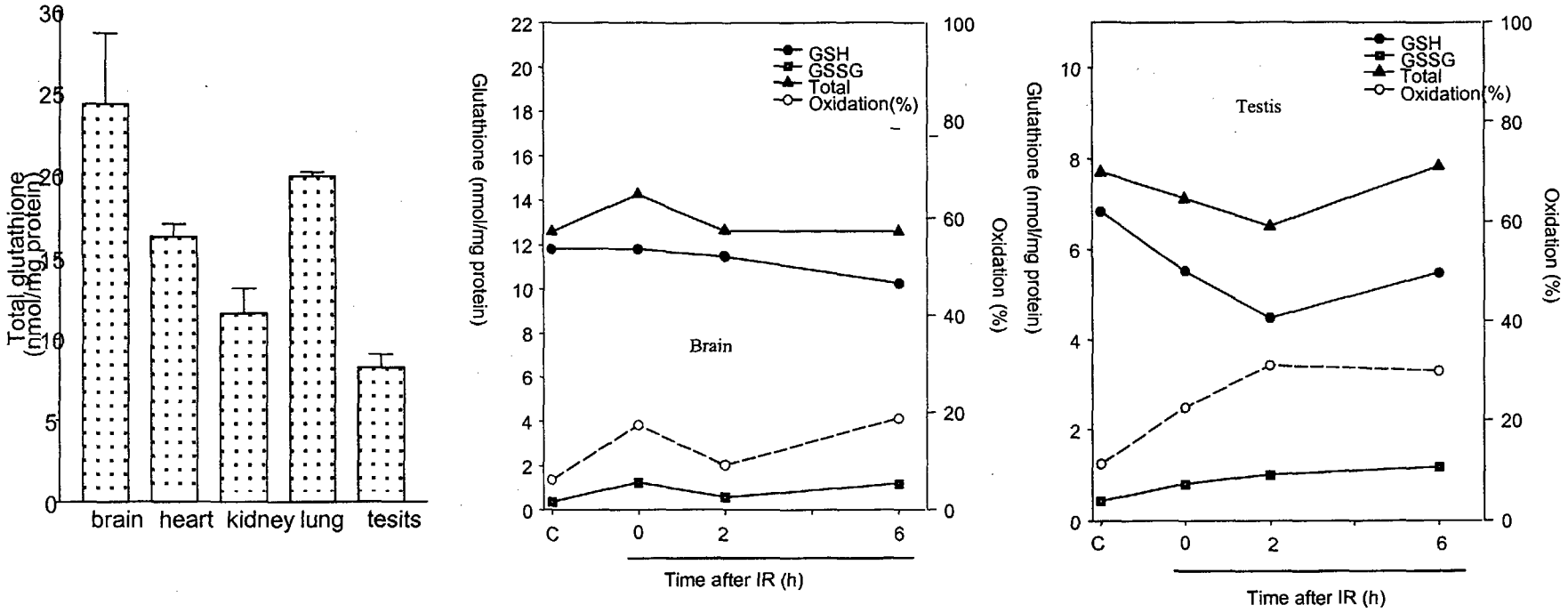


Fig. 4. Organ Difference of Glutathione level in C3H Mouse

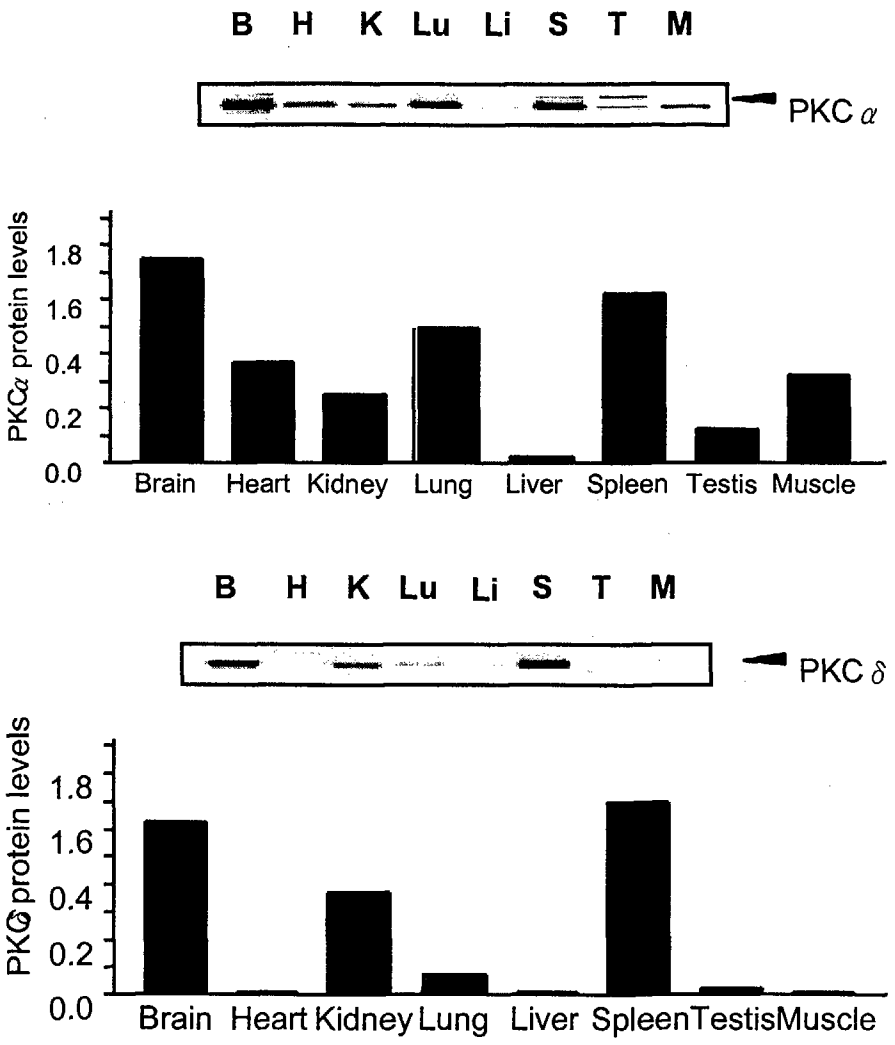


Fig. 5. Comparison of PKC levels in C3H Mouse Tissue

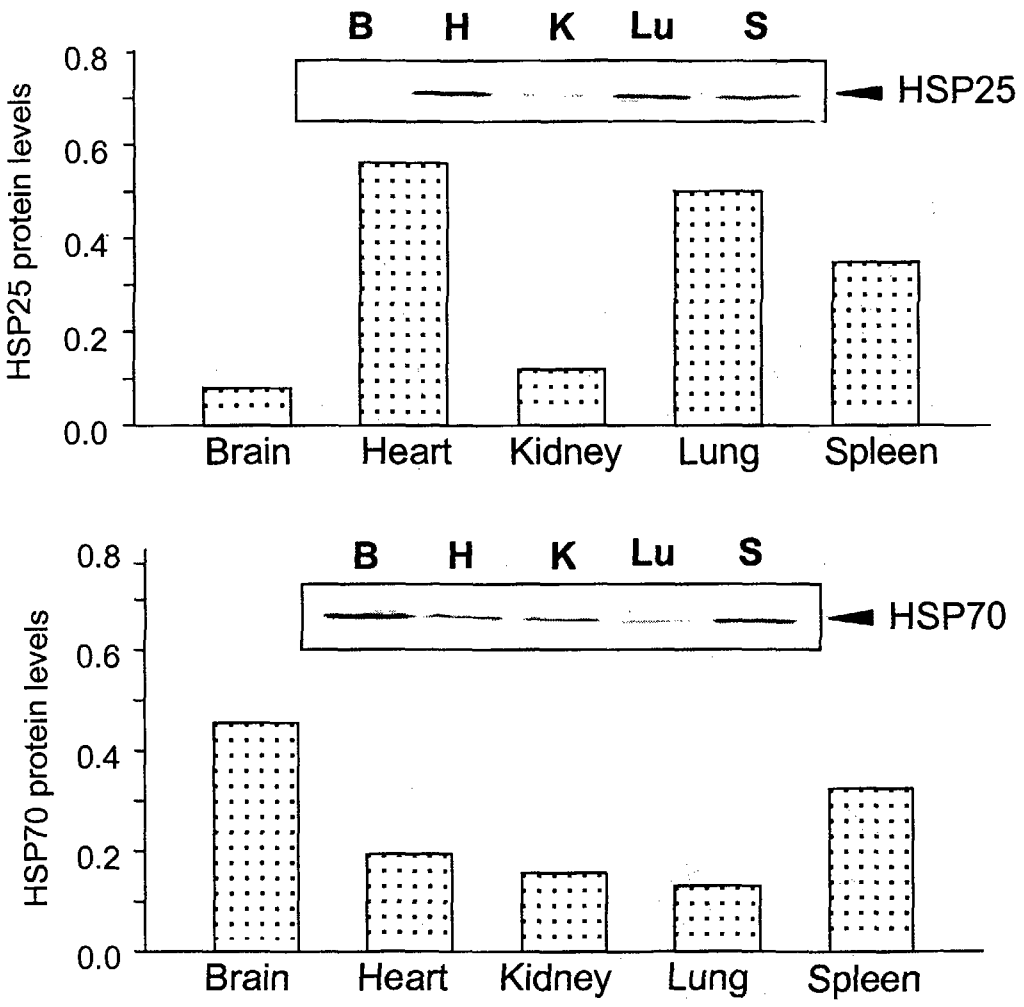


Fig. 6. Comparison of HSP levels in C3H mouse tissues.

제 3 부

방사선의 Late Effect 규명
(방사선에 의한 발암 및 기형 모델 확립)

요 약 문

I. 제 목

방사선의 late effect 규명

II. 연구개발의 목적 및 필요성

에너지원으로서, 또한 의료용으로 원자력의 이용이 많아짐에 따라 향후 일어날 가능성이 있는 방사선 피폭에 의한 장해 대책 강구의 필요성이 증가함에도 불구하고 피폭된 생체에서 나타날 수 있는 질병의 양상과 방사선과의 유관성을 판별할 수 있는 기초 생물학적 자료가 다양하게 확립되어 있지 못하다. 방사선과 관련된 발암 및 기형에 대해서는 많은 연구가 수행되었으나 국내에서는 아직 이에 대한 연구가 제대로 수행되고 있지 않은 실정이다. 특히 기형의 경우 기관형성기에서의 보고가 대부분을 차지하여 임신기간에 따른 다양한 장해에 대한 정보는 한정되어 있다. 따라서 방사선에 의한 생체내 변화의 관점에서, 보다 광범위하고 체계적인 태자의 장해에 관한 연구가 필요하다. 일반인들 사이에서 장기적인 저선량 방사선 피폭에 의한 생체내 장해, 특히 방사선에 의한 발암 가능성에 대한 우려가 높아지고 있다. 이러한 일반인들의 의구심과 우려를 과학적으로 검증하여 방사선 장해에 대한 객관적인 자료를 제공해 주는 것이 중요하다. 이러한 이유로 과학적인 검증을 통한 방사선 장애에 대한 객관적 자료들을 제공해 주는 것은 방사선에 의한 인체의 손상을 명확히 이해하기 위해 중요하다. 방사선의 발암성에 대해서는 이미 역학 조사등에 의해 발암성이 인정되었으나 이에 대한 기전 연구는 불가능한 실정이다. 따라서 본 연구는 방사선의 late effect 인 발암 기형에 대한 영향을 규명하기 위한 모델 확립을 위해 시도되었다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

(방사선의 기형에 미치는 영향)

● 본 연구에서는 마우스의 임신기간별, 방사선 용량별에 따른 방사선피폭의 영향을 착상전기, 착상기, 초기기관형성기, 후기기관형성기 및 태자기로 나누어 파악하고자 하며 이를 위하여 설치류에서 발생가능한 자연발생기형의 모든 유형, 즉 외부기형 63지표, 내부기형 29지표, 골격기형 26지표 및 골격변이 16지표를 적용하여 장해의 정도를 관찰하고자 한다. 임신단계에 따른 방사선 피폭의 장애효과를 파악하기 위하여 착상전기(0-4.5일), 착상기 (4.5-6.5일), 초기기관형성기 (6.5-8.5일), 후기기관형성기 (8.5-12일) 및 태자기(12-18일)에 방사선을 조사하고 장애발생의 종류 및 발생율등을 Morita등의 보고를 참고로 본 연구실에서 확립한 설치류 자연발생가능기형의 모든 유형을 포함하는 지표를 적용, 조사 관찰하여 보다 종합적인 장애양상을 파악하고자한다.

(방사선에 의한 내성세포의 확립 및 발암성 확인)

● 방사선의 발암개시, 발암촉진 및 암 progression에 미치는 영향을 관찰하기 위해 우선 NIH3T3 세포를 대상으로 방사선의 연속으로 조사한 후 내성정도를 확인하여였고 이 세포를 nude mouse에 grafting하여 종양생성능을 비교하였다.

(방사선이 차세대 감수성에 미치는 영향 연구)

● 실험동물 : 임신 14 일령의 모체에 방사선을 노출한 후 노출된 랫드에서 태어난 2세대 3주령의 암수 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다.

● 실험계획

임신 14일째인 모체에 각 실험군별로 10, 30, 60, 90 rad의 방사선을 조사하여 출산시킨 뒤, 각 실험군에서 얻은 F1을 암수로 나누어 diethylnitrosamine(DEN)을 생후 4주령에 50 mg/kg의 농도로 2회 복강 내에 주사하였다. F1이 13주째에 모든 동물을 도살하여 간을 적출 하였다.

● 병리조직학 및 면역조직학적 관찰

각 군에서 간의 엽을 2-3 mm두께로 채취하여 10% 중성포르말린에 고정시킨 후 통상적인 방법에 따라서 파라핀으로 포매하여 슬라이드를 만들었다. 만든 슬라이드는 Hematoxylin-eosin염색을 실시하여 현미경적인 이상 유무를 먼저 관찰 한 후

GST-P 항체를 이용하여 면역조직화학적인 염색을 실시하였다. GST-P염색이 된 슬라이드는 분석을 위하여 Video 영상분석 장치(Videoplan, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 직경 0.2mm 이상인 foci만을 측정하였다. GST-P^+ foci의 생성정도는 간 단위 면적 당 foci의 수와 면적으로 표시하였다.

(방사선에 의한 유방암 모델 확립)

● 실험동물 : 3주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다.

● 실험계획 :

방사선 조사는 Cesium irradiator를 이용하여 1주 간격으로 150 rads 용량으로 5회 조사를 실시하였다. 방사선 조사 후 계속적으로 사육하면서 육안적으로 종양의 발생이 확인되면 부검하였다.

● 병리조직학 및 면역조직학적 관찰

떼어낸 종양조직의 크기를 특정하고, 조직의 일부는 10% 중성포르말린에 고정하여 파라핀 블록으로 만들고, 일부는 신선조직을 급속냉동시켜 deep freezer에 보관하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

(방사선의 기형에 미치는 영향)

임신마우스에 방사선조사시 임신초기에는 유산을 초래하며, 임신 7.5일에서 11.5일의 기관형성기에 사지말단, 뇌 및 흉부를 중심으로 기형발생이 높게 나타나고, 임신 15.5일의 태아기에는 약간의 성장지연을 동반하나 기형발생은 극히 미미하였다.

(방사선에 의한 내성세포의 확립 및 발암성 확인)

● 방사선의 발암개시, 발암촉진 및 암 progression에 미치는 영향을 관찰하기 위해 우선 NIH3T3 세포를 대상으로 내성 세포를 확립하였고 이 세포를 nude mouse에 grafting하였을 경우 종양이 생성됨을 확인하였다.

(방사선이 차세대 감수성에 미치는 영향 연구)

방사선 선량에 따른 차세대 발암감수성에 관한 상관관계를 알아보고자 랫드 간의 GST-P^+ foci 모델을 이용하여 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 임신 중인 모체에 다양한 용량의 방사선을 피폭한 후 태어난 차세대의 체중 및 간 중량의 변화는 방사선 선량과 비례적 상관관계는 보이지 않았다.
나. GST-P^+ foci의 수와 크기를 통해 관찰한 차세대의 화학 발암물질에 대한 발암감수성 또한 용량-반응이 비례적 관계를 보이지 않았고 단지 30 rad의 방사선 조사에 대해 암수 모두 가장 큰 반응을 보였다.

(방사선에 의한 유방암 모델 확립)

방사선에 의한 발암모델개발 및 발암기전을 알아보고자 3주령 랫드에 방사선의 조사하여 유방종양의 발생을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 방사선 노출군의 체중 증가량은 대조군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다.
나. 방사선 조사가 끝난 시점에서 약 5주후부터 일부 쥐들이 사망하여 24주까지 약 46%가 사망하였고, 24주 이후 종양발생이 관찰되어 부검을 실시 하였다.
다. 종양이 생성된 랫드는 총 26마리로 평균 1.35개의 유방종양이 평균 30.89주에 나타났다.
라. 종양의 평균 크기는 12.31±23.93㎟였고, 발생 장소에는 큰 차이가 없었으나 종양의 크기는 각각 우측, 하단에 발생한 종양이 큰 것으로 나타났다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1) 임신단계에 따른 방사선 피폭의 장해효과를 파악
2) 자연발생예의 모든 장해 지표를 적용한 다양하고 광범위한 기형유형의 파악
3) 방사선에 의한 발암 및 기형발생의 유형 확립 및 특이적 발생 유형 조사

4) 방사선에 의한 발암 및 기형 발생의 예방제 개발을 위한 자료 제공

5) 방사능 오염 가능지역의 환경 감시 지표로서의 활용을 위한 기초자료 제공

S U M A R Y

I. Project Title

Mechanism Elucidation of Radiation Induced Late effect

II. Objective and Importance of the Project

Since there has been an increase in the use of atomic power, we are under the necessity of investigation on the biological damages induced by exposure to radiation. Despite numerous published studies on radiation teratology, most radiation embryologic studies carried out during the organogenesis stage and there is relatively limited information on the influence of gestational age at exposure on the prenatal effects of radiation. Therefore, there is also an need to catch systematic hold of various embryonic responses of radiation damage with a widescopic criteria. In addition, different factors of physical, chemical or biological nature in man's environment may act in separation or combination with ionizing radiation giving rise to synergistic effect and this may pose difficult problems in protection to radiation. During the past decades, new and important information has become available concerning the carcinogenic effect of radiation. In spite of a considerable amount of research, only recently have efforts been made to apply the extensive laboratory data in animals to define the relationship between low dose radiation and carcinogenesis. In this study we have tried to establish radiation induced tumor and elucidate its mechanism.

III. Scope and Contents of the Project

(Radiation Teratogenesis)

This study will be carried out on the influence of gestational age (preimplantation, implantation, early organogenesis, late organogenesis, and fetal stage) with various radiation doses at exposure on the prenatal effects of gamma-radiation using the observation point on malformations over 100 criteria (external malformation: 63, internal malformation: 29, skeletal malformation: 26, skeletal variation: 16) in mice. In this investigation, we expect to get the systematic data on the radiation-induced embryotoxicity, and the stereo microscope is indispensable research equipment for the detailed observation on the malformation and other lesion of the fetus and uterus.

(Radiation Carcinogenesis)

1. NIH3T3 cells were irradiated with 4Gy, twice per week total 16 times, and resistant cells were collected and grafted to nude mouse.
2. The animals were irradiated with gamma-rays at a dose rate of 150 rads whole body radiation once a week for five weeks. Commercial laboratory rodent chow and tap water were available *ad libitum* throughout the experimental period.
3. Each four female and male experimental group were divided according to the level of exposure to radiation at 14 days of pregnancy and treatment of DEN to 4-week-old offsprings. The offsprings, which were bored of exposed rat, were treated with DEN. Group 5 of female and male was untreated control offspring. The radiation-treated pregnant rats were received each 10, 30, 60, 90 rad whole body irradiation at 14 days of pregnancy according to each experimental group. DEN-treated rats was intraperitoneally injected 50 mg/kg of DEN at 4-week-old. When the rats were 13 weeks of age, they were sacrificed. The body weight, liver weight were measured and then the liver was removed for pathological study. The liver weighted and then fixed 10% buffered formalin, and embedded in paraffin and 4 ㎛-thick sections were stained with hematoxylin and eosin. For

immunohistochemical examination of GST-P^+ foci, we used abidin-biotin complex (ABC) method. The numbers and areas of GST-P^+ foci of more than 0.2 mm diameter were measured with a video image processor. They were expressed as foci number/cm^2, foci area (mm^2)/cm^2 and maximum diameter (Dmax, mm).

IV. Results

(Radiation Teratogenesis)

1. The rate of resorption was increased when radiation was given at 2.5 days after gestation. Early death including foetal death were highly expressed when radiation was given at 7.5 days after gestation. There are no difference in incidence of late death including embryonic death.
2. Growth retardation and small head was present when radiation was given at 5.5, 7.5, 11.5, and 15.5 days after gestation and small head showed high incidence at 11.5 days after gestation.
3. External malformation was induced when radiation was given at 7.5 days after gestation.
4. Internal malformation was induced when radiation was given at 7.5 days after gestation.
5. Skeletal malformation was induced when radiation was given at 7.5 days after gestation.

(Radiation Carcinogenesis)

1. Radiation resistant NIH3T3 cells were established and when they were grafted to nude mouse, they became to tumor.
2. There are no mortality attributable to the irradiation and DEN. The body weight gain showed no linear correlation with radiation dose. The average liver weight, in general, changed in accordance with the change in body weight, but showed no difference among the with or without irradiation group, so did relative liver weight. In immunohistochemical study of the liver, the GST-P^+ foci number

and area in 30 rad group (both female and male) were maximum, but which were no linear correlation with radiation dose. These results suggest that the tumorigenicity susceptibility of the offsprings after maternal conceptional exposure of ionizing radiation was no linear correlation with radiation dose.

3. Body weight gain was decreased by γ-ray irradiation, and so mean body weight of treated group was significantly lower than that of control group. About 46% rats of radiation treated group were died before mammary tumor development, and 24 weeks after last irradiation mammary tumors were developed. 26 of 39 rats (67%) developed mammary tumors at an average age of 30.89 weeks. The average tumor size was $12.31 \pm 23.93 mm^3$. In this study we developed rat mammary tumor by γ-irradiation. These results can provide the basic understanding of radiation carcinogenesis and more studies need to elucidate the underlying mechanisms.

목 차

제 1 장 서 론---------- 263

제 2 장 국내외 연구 동향---------- 267

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과---------- 271

제 1 절 연구내용 및 방법---------- 271

제 2 절 연구결과 및 고찰---------- 274

제 4 장 연구개발 목표 및 달성도---------- 279

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획---------- 281

제 6 장 참고 문헌---------- 283

표 목 차

Table 1. Observation of the 18th day mouse foetuses exposed 2 Gy gamma radiation on different gestation days ---------- 290
Table 2. Analysis on 18th day mouse foetuses exposed 2 Gy gamma-radiation on different gestation days. ---------- 291
Table 3. Malformation on the 18th day mouse foetuses exposed to 2 Gy gamma radiation on different gestation days ---------- 292
Table 4. External malformation on 18th day mouse foetuses exposed to 2 Gy gamma radiation on different gestation days ---------- 293
Table 5. Internal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to 2 Gy gamma radiation on different gestation days ---------- 294
Table 6. Skeletal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to 2 Gy gamma radiation on different gestation days ---------- 295
Table 7. Skeletal variation on the 18th day mouse foetuses exposed to 2 Gy gamma radiation on different gestation days ---------- 296
Table 8. Observation of the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 297
Table 9. Analysis on 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 298
Table 10. Malformation on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 299
Table 11. External malformation on 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 301
Table 12. Internal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 302

Table 13. Skeletal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 303
Table 14. Skeletal variation on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of gamma ray on 11.5 day of gestation ---------- 304

그 림 목 차

Figure 1. Observation of abnormality on the 18th day mouse foetuses exposed 2 Gy ---------- 305

Figure 2. Establishment of radioresistant cells and carcinogenic effect ---------- 306

Figure 3. Radiation effect on liver carcinogenesis in rats ---------- 307

Figure 4. Paternal or Maternal radiation effect on liver carcinogenesis of offspring ---------- 308

Figure 5. Mammary tumor model by radiation in mouse ---------- 309

제 1 장 서 론

에너지원으로서, 또한 의료용으로 원자력의 이용이 많아짐에 따라 향후 일어날 가능성이 있는 방사선 피폭에 의한 장해 대책 강구의 필요성이 증가함에도 불구하고 피폭된 생체에서 나타날 수 있는 질병의 양상과 방사선과의 유관성을 판별할 수 있는 기초 생물학적 자료가 다양하게 확립되어 있지 못하다. 따라서 방사선에 의한 생체내 변화에 대한 사전 지식과 정확한 기초자료의 필요성에 의하여 생체 조직의 방사선 장해의 기초의학적 현상을 체계적으로 파악하는 일이 시급히 요청되어진다. 원자력 시설의 이용증대와 방사선의 의학적 이용증가, 핵시설 주위의 방사성 물질 오염 뿐만 아니라 우주 방사선에 의한 노출 증가 등으로 인하여 인체의 방사선 피폭량과 피폭빈도가 계속적으로 증가되고 있으므로 이에 대한 의료적 안전대책 수립이 시급하며, 특히 방사선 피폭에 가장 민감한 시기이며 치명적인 장해요인으로 작용할 수 있는 임신상태에서의 방사선 피폭에 의한 병적 상황의 파악도 필요하다.

포유류를 이용한 연구에서 임신기간중 방사선에 의한 장애는 다음의 3기간으로 크게 나누어 설명되고 있다.

1. 착상전기(preimplantation stage) : 수정에서부터 배가 자궁벽에 부착될 때까지의 시기로서 마우스의 경우 수정후 0 - 5일이며 이 시기의 장애 결과는 "전부" 아니면 "전무" 즉, 배자의 사망에 따른 흡수 또는 생존의 경우 정상적으로 성장한다고 알려져 있으나 최근 Muller 등의 연구에서 기형발생이 보고되었다. 따라서 이 시기의 연구도 재검토 되어야 할 것이다.

2. 기관형성기(organogenesis stage) : 주요 기관이 형성 되는 시기로써 마우스의 경우 임신 5 - 13일에 해당되며 발달기관의 일부 또는 전부의 기형이 나타난다. 그러나 인체의 연구에서 이 시기의 결과는 대부분 소두증 (microcephaly)을 비롯한 중추신경계 기형에 한정되어 있으며 이는 인체에서 기관형성기가 임신기간의 1/15에 불과하고 사람에서는 중추신경계가 형성되는 시간이 길기 때문으로 알려져 있다. 동물을 이용한 실험에서도 이러한 관점에서 중추신경계와 눈의 기형에 국한된 보고가 거의 대부분으로 다양한 기형의 검사 항목을 적용한 광범위한 연구가 필요하다

고 생각된다. 사람의 태자에서 방사선에 대한 민감도가 마우스를 비롯한 동물에 비하여 낮게 나타나며 이는 대부분의 동물실험이 근교계 동물을 사용한 결과이며 상대적으로 근교계 유래의 homozygote에 비해 방사선에 저항성이 있는 비근교계 동물을 사용하여 인체와 비슷한 heterozygote 상태에서의 연구가 요구된다.

3. 태아기 (fetal stage) : 기관이 형성된 이 후의 시기로서 마우스의 임신 13일에서 출생시까지에 해당되며 이 시기의 장애는 방사선에 의한 성장장애이고 고선량 피폭시에는 조혈 및 생식기 장애도 일어난다.

이상과 같이 배자 및 태자의 방사선장애는 외국의 경우 많은 연구가 진행되어 중성자 및 초음파등의 방사선의 종류, 선량율, 방사선에 의한 기형발생의 예방 및 증강 약제등의 연구가 활발히 수행되고 있으며, 한편 착상전기에서의 기형발생에 대한 결과의 불일치 및 자연적으로 발생되는 기형의 모든 판별기준을 적용한 보다 다양하고 종합적인 연구가 필요한 실정에 있다. 국내의 경우 원전주위의 기형아 발생 및 기형동물의 발생 등이 커다란 사회문제로 부각되기도 하였으나 방사선에 의한 기형발생 및 임신 기간중 장해에 대한 실질적이고 직접적인 연구는 전무한 실정이다.

국내의 방사선생물학 분야의 연구는 소수의 대학 및 연구소에서 수행되고 있으나 연구의 다양성 면에서 매우 취약한 상태이며 특히 방사선에 의한 기형발생에 대한 직접적인 연구는 전무한 실정으로 이 분야의 연구수행이 절실히 요구된다. 본 연구자의 경우 방사선의 생물학적 선량측정 분야 및 방사선 방호제의 연구를 다수 수행하였으며 방사선과 관련된 기형 발생등의 연구를 위하여 예비실험을 수행하였고 현재 기형을 비롯한 태자의 장해지표 및 모체자궁의 변화에 관한 방법론적 체계를 확립하였으며 자연발생의 외부기형, 내부장기기형 및 골격기형 유형을 포함하는 기형의 종합적인 검사지표를 확립하였다.

임신 단계에 따른 방사선의 장해유형은 방사능 오염지역의 기형발생 상황의 판단 기준을 비롯한 태자의 장해에 대한 기초 자료로서의 활용이라는 관점에서 매우 시급하고 필수적인 연구의 대상으로 사료되며, 특히 국내의 취약한 분야로서 많은 연구의 수행이 이루어져야 할 것이다.

방사선에 의한 암 발생에 관한 연구는 과거 수십 년간의 보고에 의해 새롭고 중요한 정보가 많이 축적되고 있다. 그러나 암 발생과 방사선 영향에 대한 명확한 평가를 위한 실험, 특히 생체를 이용한 실험은 아직도 많은 문제점을 안고 있다. 이런 문제점으로는 방사선의 발암효과가 저선량의 방사선 선량에서는 확인이 불가능하고

일반적으로 고선량의 효과에 대한 이론적 개념을 근거로 하여 추정하고 있다는 것과 방사선의 영향을 평가하기 위한 생체내 실험모델이 거의 없다. 이러한 이유로 과학적인 검증을 통한 방사선 장애에 대한 객관적 자료들을 제공해 주는 것은 방사선에 의한 인체의 손상을 명확히 이해하기 위해 중요하다.

방사선의 영향을 평가하기 위해 세포주를 이용한 생체외 모델이나 염색체 이상 유무를 지표로 한 방법들이 이용되고 있으나, 생체내 효과를 단기간에 종합적으로 평가할 수 있는 적절한 *in vivo* 검색 시스템은 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 마우스를 사용한 생체내 방사선 발암모델을 개발하여 방사선에 의한 발암과정 수식인자 검색 및 발암기전을 연구함으로써 방사선의 인체 장해에 관한 기초적 자료를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

배자 및 태자의 방사선장애는 외국의 경우 많은 연구가 진행되어 중성자 및 초음파등의 방사선의 종류, 선량율, 방사선에 의한 기형발생의 예방 및 증강 약제등의 연구가 활발히 수행되고 있으며, 한편 착상전기에서의 기형발생에 대한 결과의 불일치 및 자연적으로 발생되는 기형의 모든 판별기준을 적용한 보다 다양하고 종합적인 연구가 필요한 실정에 있다. 국내의 경우 원전주위의 기형아 발생 및 기형동물의 발생 등이 커다란 사회문제로 부각되기도 하였으나 방사선에 의한 기형발생 및 임신 기간중 장해에 대한 실질적이고 직접적인 연구는 전무한 실정이다.

국내의 방사선생물학 분야의 연구는 소수의 대학 및 연구소에서 수행되고 있으나 연구의 다양성 면에서 매우 취약한 상태이며 특히 방사선에 의한 기형발생에 대한 직접적인 연구는 전무한 실정으로 이 분야의 연구수행이 절실히 요구된다. 본 연구자의 경우 방사선의 생물학적 선량측정 분야 및 방사선 방호제의 연구를 다수 수행하였으며 방사선과 관련된 기형 발생등의 연구를 위하여 예비실험을 수행하였고 현재 기형을 비롯한 태자의 장해지표 및 모체자궁의 변화에 관한 방법론적 체계를 확립하였으며 자연발생의 외부기형, 내부장기기형 및 골격기형 유형을 포함하는 기형의 종합적인 검사지표를 확립하였다.

임신 단계에 따른 방사선의 장해유형은 방사능 오염지역의 기형발생 상황의 판단 기준을 비롯한 태자의 장해에 대한 기초 자료로서의 활용이라는 관점에서 매우 시급하고 필수적인 연구의 대상으로 사료되며, 특히 국내의 취약한 분야로서 많은 연구의 수행이 이루어져야 할 것이다.

지금까지 알려진 발암원들은 크게 바이러스와 화학적 요인, 물리적 요인으로 분류되어 진다. 이중 바이러스나 화학물질은 특정 암유전자를 활성화시켜 암을 유발하는 경우가 많다고 알려져 있으나 물리적 요인 특히 방사선에 의한 암 발생은 다른 발암원들과는 그 발암기전이 다른 것으로 알려져 있다. 방사선 조사에 의한 암 발생에 관해서는 Roentgen이 방사선을 발견하고 7년이 지난 다음 Frieben이 보고한 것이 처음으로써, 방사선 작업 종사자들에서 발생한 피부암에 대한 내용이었다. 이후로 백혈병을 비롯한 많은 암발생 보고들이 속출하였고, 역학적으로도 원폭피해자

나 직업상 우발적 피폭에 대한 추적 연구가 많이 진행되었다. 하지만 이러한 임상적, 역학적 연구들은 방사선 조사와 암 발생에 대한 막연한 관련성만을 제시할 수 있을 뿐이었다.

방사선은 일반적으로 생체내 유전자의 상태를 불안정하게 할 수 있는 물질로 알려져 있다. 즉, 부분적으로는 방사선 조사가 특정한 세포의 손상이나 다양한 포유류의 세포에 스트레스를 주어 세포의 표현형에 영향을 줄 수 있다는 것이다. 또한 이 때문에 암을 유발하고 유전자의 부분적인 손상이 세대간에 전달됨으로써 암의 발생 빈도를 높이는 것으로 알려져 있다. 아직까지 이러한 유전자의 손상에 대해서 그 기전이 명확히 알려져 있는 것은 없으나 그 과정이 매우 복잡하며 분자상 유전자 변화가 주요한 원인으로 생각되고 있다. 즉 유전자 조절기능의 손상이 유전자를 불안정화 시키고 이것이 내인적인 세포내의 물질을 활성화시키거나 자극하는 작용을 함으로써 염색체를 비정상적 상태로 만들 수 있다는 것이다. 궁극적으로는 유전자의 불안정화가 직접적으로 DNA 의 손상을 유도한다고는 설명할 수는 없으나, 비핵표적의 정보전달 체계를 손상시키는 것으로 설명할 수 있다.

선진국을 중심으로 저준위 방사선에 의한 생물학적 영향을 평가하려는 노력의 일환으로, 일부 인체 세포에서의 방사선에 대한 적응반응 현상의 기전을 규명하려는 연구가 현재 진행 중이다. 특히 p53이 방사선에 의한 세포 주기 변화에 미치는 영향에 대한 연구가 활발히 진행중이며, 일부 세포에서 p53 유전자가 방사선에 의한 세포 주기 진행 지연에 관계하고 있고, 아포프토시스 등 세포사에도 일부 관여하고 있으며, 특히 신호 전달 체계와도 상호 연관이 있을 것으로 예상하고 있다.

방사선의 발암성 연구는 역학적 조사에 의해 추론된 사실은 많으나 실제적으로 방사선이 암의 진행과정중 어느 단계에 관여하는지에 대한 실험적 증거는 불충분한 상태이고, 단시간에 방사선의 발암성을 검색할 수 있는 동물 모델도 정립되어 있지 않다.

방사선 발암 기전연구는 원자력병원 방사선 영향 연구실과 서울의대 병리학교실에서 수행하고 있으며, 일부 동물에서 방사선 민감 발암 모델 수립에 성공하였다. 그러나 외국에서 발표되었거나 현재 진행중인 방사선에 대한 생물학적 영향 연구는 시험관 내 실험을 통하여 얻은 세포주에 대한 결과이므로 인체에 그대로 적용하기에는 무리가 있으며, 방사선이 DNA 및 염색체 변이를 일으킨다는 결과는 많으나 분자생물학적 면에서의 현상만이 파악되었을 뿐 *in vivo*에서의 효과는 알 수 없는 실

정이다. 따라서 실험동물을 이용한 *in vivo*에서의 방사선의 생물학적 영향 연구를 통해 인체에 대한 영향을 파악하기 위한 모델 개발이 절실하다. 또한 방사선에 의한 발암성 및 발암기전을 규명함으로서 방사선에 의한 암 발생의 예방이 가능하며 방사선에 의한 발암모델 확립으로 방사선 방어제등의 개발에 이용 가능할 것으로 기대된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

(방사선 기형모델의 확립)

제 1 절 연구내용 및 방법

1) 실험동물

10-12주령의 출산 경험이 없는 ICR비근교계마우스를 사용하며 전실험 기간중 자유롭게 급수 급식하였다. 교배 다음날 아침 숫컷을 분리하고 질전이 확인된 경우 임신 0일로 하며 각 실험군당 최소 6마리이상의 임신어미를 공시하며 임신 18일째 공히 부검을 실시하였다.

2) 방사선조사

방사선 조사는 실험용 방사선 조사기 (Gammacell 3000 Elan, Nordion International Co. Canada)를 이용하여 착상전기 (0-4.5일), 착상기 (4.5-6.5일), 초기기관형성기 (6.5-8.5일), 후기기관형성기 (8.5-12일) 및 태자기 (12-18일)에 Caesium-137γ선을 1회 전신 조사하였다.

3) 제왕절개 및 일반 검사

각실험군 마우스를 임신 18일에 제왕절개하여 착상수, 생존 및 사망 태자수, 태자의 성별, 체중, 체장, 두부의 길이, 넓이 및 태반의 무게등을 측정하고 Uma Devi의 방법에 따라 흡수 (resorption), 배자사망 (embryonic death) 및 태자사망 (fetal death)을 분류 조사하였다. 총사망율은 착상총수로서 사망태자를 나눈 백분율로 하며 성장지연 (growth retardation)의 기준은 정상대조군 체중편차의 2배 이상의 차이를 보이는 체중미달의 경우로 하였다.

4) 외부기형의 관찰

실험군의 전체 생존태자의 외부 장애유형을 실체현미경으로 관찰하며 관찰의 지표는 두부 (두개열 외 32지표), 흉부 (심장일소 외 3지표), 미부 (무미 외 3지표), 사

지 (무지 외 12지표) 및 기타 (척수열 외 8지표)등으로 구분하여 관찰하였다.

5) 내부기형 및 골격기형의 관찰

외부기형 검사 후 좌측 자궁뿔 상부에서 홀수번째의 태자는 내부장기기형 관찰을 위하여 Bouin용액에 고정하며 나머지 1/2의 태자는 골격기형 관찰을 위하여 Inouye의 방법과 kimmel 및 Trammell의 방법의 변형한 방법을 적용하여 alcian blue 및 alizaline red S 이중염색을 실시한 후 관찰하였다. 내부기형의 지표는 두부 (뇌실확장 외 4지표), 흉부 (횡격막탈장 외 11지표), 복부 (신우확장 외 11지표) 및 기타로 하며 골격기형의 지표는 두 개골 (두개골결손 외 2지표), 척추 (추체결여외 5지표), 늑골 (결여 외 5지표), 흉골 (결여 외 3지표), 사지골격 (결여 외 2지표) 및 기타로 분류 관찰하였다. 골격의 기형과 함께 골격의 변형 (척추골 골화중심 분리 외) 빈도도 관찰 조사하였다.

(방사선 내성세포의 확립 및 발암성 확인)

1) 내성세포의 확립

마우스 embryo-fibroblast 인 NIH3T3 세포에 방사선을 4 Gy씩 1주에 2회씩 조사하여 2달간 살아남은 clone을 선별하였다. 선별된 세포에 대해 clonogenic assay를 실시하여 내성정도를 확인하였다.

2) 방사선조사

방사선 조사는 실험용 방사선 조사기 (Gammacell 3000 Elan, Nordion International Co. Canada)를 이용하여 조사하였다.

3) 실험동물 및 세포의 이식

8-10 주령의 Balb/c nude mouse (Charles River Japan)를 이용하였다. 세포는 마리당 $3x10^6$ 개를 주입하였고 4주동안 clean bench에서 사육하였다.

(방사선이 차세대 발암 감수성에 미치는 영향에 관한 연구)

1) 실험동물

임신 14 일령의 모체에 방사선을 노출한 후 노출된 랫드에서 태어난 2세대 3주령의 암수 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다.

2) 실험계획

임신 14일째인 모체에 각 실험군별로 10, 30, 60, 90 rad의 방사선을 조사하여 출산시킨 뒤, 각 실험군에서 얻은 F1을 암수로 나누어 diethylnitrosamine (DEN)을 생후 4주령에 50 mg/kg의 농도로 2회 복강 내에 주사하였다. F1이 13주째에 모든 동물을 도살하여 간을 적출 하였다.

3) 병리조직학 및 면역조직학적 관찰

각 군에서 간의 엽을 2-3 mm두께로 채취하여 10% 중성포르말린에 고정시킨 후 통상적인 방법에 따라서 파라핀으로 포매하여 슬라이드를 만들었다. 만든 슬라이드는 Hematoxylin-eosin염색을 실시하여 현미경적인 이상 유무를 먼저 관찰 한 후 GST-P 항체를 이용하여 면역조직화학적인 염색을 실시하였다. GST-P염색이 된 슬라이드는 분석을 위하여 Video 영상분석 장치(Videoplan, Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 직경 0.2mm 이상인 foci만을 측정하였다. GST-P^+ foci의 생성정도는 간 단위 면적 당 foci의 수와 면적으로 표시하였다.

(방사선에 의한 유방암 모델 확립)

1. 실험동물

3주령의 이유된 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다.

2. 실험계획

방사선 조사는 Cesium irradiator를 이용하여 1주 간격으로 150 rads 용량으로 5회 조사를 실시하였다. 방사선 조사 후 고형식이와 물을 자유로이 급식하면서 사육하여 육안적으로 종양의 발생이 확인되면 부검하였다.

3. 병리조직학적 및 면역조직학적 관찰

떼어낸 종양은 가로, 세로, 높이를 측정하여 크기를 계산하였으며, 종양조직의 일부는 10% 중성포르말린에 고정하여 파라핀 블록으로 만들고, 일부는 신선조직을 급속냉동시켜 deep freezer에 보관하였다.

제 2 절 연구 결과

(방사선 기형모델의 확립)

1. 출생전 사망 (prenatal death)

흡수 (resorption), 조기사망 〔early death, 배자사망 (embryonic death)〕 및 후기사망 〔late death, 태자사망 (foetal death)〕으로 구분하였다. 흡수의 판별 기준은 완전히 발달되지 않은 태반의 흔적 또는 완전한 태반에 태자 가 없는 경우로써 임신 2.5일, 5일 및 7.5일군에서 증가되었고 특히 2.5일 (64.9%)에 높게 나타났다. 조기사망의 기준은 태반에 부분적으로 형성된 배자가 부착된 것으로 임신 7.5일에 18.3%로 가장 높았다. 후기사망은 완전히 형성된 사망태자의 경우로써 전 실험군에서 유의성 있는 증가는 없었다 (Table 1).

2. 성장지연 (growth retardation)과 소두 (small head)

성장지연은 임신 18일째 부검시 정상대조군의 평균에 표준편차의 2배를 감한 수치보다 감소된 체중을 나타내는 개체의 수로 산정되며 임신 5.5일, 7.5일, 11.5일 및 15.5일에 높게 나타났으며 임신 11.5일군은 전개체에서 관찰되었다 (Table 2).

소두는 두부의 길이 및 폭을 측정하여 정상대조군에 성장지연 판별시와 같은 방법으로 산출하며 임신 11.5일에 가장 높게 나타났다 (Table 1).

3. 외부기형 (external malformation)

대부분 임신 7.5일 및 11.5일에 발생되었으며 주로 결지를 비롯한 사지말단의 기형이 관찰되었고 이외 7.5일군에서는 무안검, 소악, 복벽열, 배꼽탈장, 굴곡미, 단미 등이 있었으며 11.5일에는 국곡미가 17.5% 관찰되었다 (Table 3 및 4).

4. 내부기형 (internal malformation)

5.5일군에서 발생이 시작되어 7.5일에 최고치를 나타내고 11.5일군에서도 다수 관찰되었다. 5.5일군에서는 신우확장, 7.5일군에서는 신우확장 및 뇌실확장, 11.5일군에서는 뇌실확장 및 구개열이 주발생 기형이였다. 15.5일군에서는 전혀 발생되지 않았다 (Table 3 및 5).

5. 골격기형 (skeletal malformation)

7.5일 및 11.5일군에서 주로 발생되었고 7.5일에는 경추골 분리, 늑골융합 및 흉골 형성부전이, 11.5일에는 중수골 결여, 중족골 결여 및 흉골 형성부전이 다수 관찰되었다 (Table 3 및 6).

6. 골격변이 (skeletal variation)

7.5일군에서 주로 관찰되었고 흉골 골화중심 비대칭이 높은 발생율을 보였다 (Table 3 및 7).

결론적으로 임신마우스에 방사선조사시 임신초기에는 유산을 초래하며, 임신 7.5일에서 11.5일의 기관형성기에 사지말단, 뇌 및 흉부를 중심으로 기형발생이 높게 나타나고, 임신 15.5일의 태아기에는 약간의 성장지연을 동반하나 기형발생은 극히 미미하였다.

임신 11.5일에 방사선 선량별 기형결과

1. 출생전 사망(prenatal death)

흡수(resorption), 조기사망 〔early death, 배자사망(embryonic death)〕 및 후기사망 〔late death, 태자사망 (foetal death)〕으로 구분하였다. 흡수의 판별 기준은 완전히 발달되지 않은 태반의 흔적 또는 완전한 태반에 태자 가 없는 경우로써 4Gy 조사군에서 25.81%로 높게 나타났다. 조기사망의 기준은 태반에 부분적으로 형성된 배자가 부착된 것으로 방사선량에 따른 차이는 없었다. 후기사망은 완전히 형성된 사망태자의 경우로써 4Gy 조사군에서 6.45%로 대조군에 비하여 약간 증가 하였다 (Table 8).

2. 성장지연 (growth retardation)과 소두 (small head)

성장지연은 임신 18일째 부검시 정상대조군의 평균에 표준편차의 2배를 감한 수치보다 감소된 체중을 나타내는 개체의 수로 산정되며 방사선량의 증가에 EK라 비례하여 증가하였으며 2Gy 이상의 군에서는 전개체에서 관찰되었다.

소두는 두부의 길이 및 폭을 측정하여 정상 대조군에 성장지연 판별시와 같은 방법으로 산출하였으며 방사선량에 비례하여 증가하였다 (Table 9).

3. 외부기형 (external malformation)

주로 꼬리, 사지말단의 기형과 혈종이 나타났으며 방사선량에 비례하여 증가하였고 이외 항문폐쇄 배꼽탈장이 관찰되기도 하였다 (Table 10 및 11).

4. 내부기형 (internal malformation)

뇌실확장, 구개열 및 신우확장이 방사선조사량에 따라 증가하였으며 이외 소안구, 심장좌선, 비정상폐엽, 비강협착이 관찰되기도 하였다 (Table 10 및 12).

5. 골격기형 (skeletal malformation)

후두골, 늑골, 중수골 및 중족골의 기형이 주로 관찰되었으며 방사선량에 따라 증가하였으며 이외 경추, 미추, 흉골의 기형이 산발적으로 관찰되었다 (Table 10 및 13).

6. 골격변이 (skeletal variation)

척추에서 다양하게 관찰되었으며, 흉골 골화중심 형성부전 및 13늑골 결여가 고선량조사군에서 다발하였다 (Table 10 및 14).

결론적으로 1차년도 연구의 결과 가장 기형다발 임신기간인 임신 11.5일 즉, 주기관형성기에 모체에 대한 방사선조사시 방사선조사량의 증가에 따라서는 흡수, 성장지연, 소두의 예가 증가하며 사지말단 및 꼬리의 외부기형, 뇌실확장, 구개열등의 내부기형, 후두골, 늑골, 중수골 및 중족골의 골격기형이 주로 나타난다.

(방사선 내성세포의 확립 및 발암성 확인)

1. 내성세포의 분리

NIH3T3에 4Gy의 방사선을 1주에 2번씩 총 16번을 조사하여 살아남은 clone 7개를 분리하였다. 이중에서 clonogenic effect가 가장 큰 2개의 세포 (#1 및 #4)를 선

택하였는데 내성정도는 #4가 더 우수하였다 (Fig. 2).

2. Nude mouse에 의한 발암성 확인

모세포와 함께 이 두 개의 내성세포를 nude mouse 이식하고 이식 4주후에 생성된 tumor를 비교하였다. 모세포의 경우 발암성이 없었지만 내성세포의 경우 암이 생성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

(방사선이 차세대 발암 감수성에 미치는 영향에 관한 연구)

1. 체중 및 간 중량의 변화

임신 중 방사선을 조사 받은 모체에서 태어난 차세대 체중은 10 rad에선 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았고 체중과 방사선량과의 어떤 비례적 관계도 관찰할 수 없었다. 단지 차세대 암컷 제 3 군(60 rad)의 체중이 증가하는 양상을 보였고 차세대 수컷은 대조군에 비해 유의한 체중증가 없이 30 rad를 조사받은 제 2 군에서 감소하는 양상을 보였다. 간 중량은 체중변화에 따라 약간씩 변화하였을 뿐 상대적 간 중량과 함께 대조군과 유의한 차이는 없었다.

2. GST-P$^+$ 면역 조직 화학 염색의 결과

GST-P$^+$ 염색의 결과에서는 수컷이 foci 수, 크기에 있어 암컷에 비해 전반적으로 컸으며 암수 모두 제 2 군(30 rad)에서 GST-P$^+$ foci의 수와 면적이 가장 컸고 수컷은 그 후 방사선량 증가에 따라 감소하는 경향을 보였을 뿐 차세대 발암감수성과 방사선 선량에서 비례적 상관관계를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3,4).

(방사선에 의한 유방암 모델 확립)

방사선에 의한 발암모델개발 및 발암기전을 알아보고자 3주령 랫드에 방사선을 조사하여 유방종양의 발생을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다 (Fig. 5).

1. 방사선 노출군의 체중 증가량은 무처치 대조군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 방사선 노출이 성장기 랫드의 정상성장을 방해한

결과로 생각된다.

2. 방사선 조사가 끝난 시점에서 약 5주후부터 일부 쥐들이 사망하여 24주까지 약 46%가 사망하였고, 24주 이후 종양발생이 관찰되어 부검을 실시 하였다(Figure 2). 이로써 본 실험에서 사용된 방사선 조사량 150 rads는 랫드의 유방종양을 발생시키기에 충분한 량으로 판단된다.

3. 종양이 생성된 랫드는 총 26마리로 평균 1.35개의 종량이 관찰되었다. 개체별 종양의 갯수는 19마리가 1개, 5마리가 2개 그리고 2마리는 3개의 종양이 발생하였으며, 종양발생에 걸린 기간은 평균 30.89주로 나타났다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

임신중 방사선에 피폭될 경우 태아에 중대한 영향을 미칠 수 있음은 잘 알려진 사실이다. 암발생을 제외한 전형적인 방사선에 의한 장해는 태아 또는 신생아의 사망, 선천성 기형, 성장장애 및 신체구조와 기능에 대한 영향이 있다. 이러한 장해에 중요한 요인으로는 방사선량, 임신시기 및 방사 선량율이 있다. 모든 동물은 수정 후 출산까지 착상, 기관형성기, 태아기의 과정을 동일하게 거치게 되며 따라서 기간의 차이는 있으나 분류시기별로 방사선 피폭에 의한 영향은 동일한 것으로 간주된다.

사람에 있어서 방사선 사고의 경우는 물론, 진단 및 치료방사선 영역에서도 임신 여성에 대한 방사선의 위험정도가 관심의 대상이며, 연구의 관점이 되고 있다. 인체에서의 연구는 불확실한 피폭 선량에 대한 수치의 한계가 있으며 때로 방사선 피폭시 정확한 임신 일령의 추정이 불가능한 경우도 있다. 따라서 동물실험에 의한 결과의 종합적인 산출 및 다양한 장해유형을 적용한 결과를 도출하고 이를 인체에 대한 외삽의 관점에서의 접근이 필수적이다.

본 연구에서는 임신 마우스에 방사선 조사했을 경우 임신초기에는 유산을 초래하며, 임신 7.5일에서 11.5일의 기관형성기에 사지말단, 뇌 및 흉부를 중심으로 기형 발생이 높게 나타남을 확인하였고, 임신 후반부에 갈수록 방사선 영향이 미미하였다. 향후 방사선 용량별 기형유발 관계를 규명하고 이러한 기형을 유발하는 인자를 밝힘으로서 이를 예방할 수 있는 방법의 모색이 가능하리라 사료된다.

방사선 선량에 따른 차세대 발암감수성에 관한 상관관계를 알아보고자 랫드 간의 GST-P^+ foci 모델을 이용하여 검색하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. 임신 중인 모체에 다양한 용량의 방사선을 피폭한 후 태어난 차세대의 체중 및 간 중량의 변화는 방사선 선량과 비례적 상관관계는 보이지 않았다.
나. GST-P^+ foci의 수와 크기를 통해 관찰한 차세대의 화학 발암물질에 대한 발암감수성 또한 용량-반응이 비례적 관계를 보이지 않았고 단지 30 rad의 방사선 조사에 대해 암수 모두 가장 큰 반응을 보였다.

본 실험에서 보여진 GST-P$^+$ foci의 수와 면적의 변화는 표적장기를 간으로 하여 저선량 방사선이 전암병변 단계에 미치는 영향을 직접적으로 관찰할 수 있는 좋은 실험모델이라고 생각된다. 실험결과에서는 차세대 암수 모두에서 대조군에 비해 GST-P$^+$ foci의 수와 면적의 증가를 보였으나, 방사선 선량과는 비례적 관계를 관찰할 수 없었다. 그러나 중성자나 감마선 노출 모두가 간 종양의 발생빈도와 분명한 용량-반응성 관계가 있다는 보고가 있다. 또한 GST-P$^+$ foci가 방사선의 직접적인 유전자 수준에서의 변화나 그 기전에 대해서는 명확히 설명해 줄 수 없다는 단점이 있고 방사선의 선량에 따른 감수성의 차나 동물종이나, 임신중의 방사선의 조사시기, 임신중 방사선 조사량에 따른 차세대의 기준에 따른 용량-반응관계 등 검토할 문제가 산재해 있어 이러한 기본적인 연구가 지속적으로 진행되어야 방사선의 차세대 용량-발암감수성에 관해 명확한 이해를 얻을 수 있으리라 판단된다.

방사선에 의한 유방종양 발생모델 확립을 위하여 3주령 랫드에 150 rads의 방사선을 5회 조사한 결과 약 31주에 평균 1.35개의 유방종양이 발생함을 관찰할 수 있었다.

이러한 연구 결과로부터 방사선 조사에 의한 랫드의 유방종양 발생모델이 성공적으로 이루어진 것으로 평가되며, 앞으로 방사선 조사에 의한 유방종양 발생기전 및 선량의존성에 대한 연구의 기초자료가 될 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과는 임신단계별에 따른 방사선 피폭의 장해효과를 파악하고 자연발생예의 모든 장해 지표를 적용한 다양하고 광범위한 기형유형의 파악할 뿐 아니라 방사선에 의한 기형발생의 유형 확립 및 특이적 발생 유형 조사 및 방사선에 의한 기형발생의 예방제 개발을 위한 자료 제공, 방사능 오염 가능지역의 환경 감시 지표로서의 활용을 위한 기초자료 제공이 가능하리라 사료된다.

제 6 장 참 고 문 헌

1. Raju MR: Proton radiobiology, radiosurgery and radiotherapy. Int J Radiat Biol, 67 : 237-259, 1995.
2. Brent RL : The effects of ionizing radiation, microwaves and ultrasound on the developing embryo: clinical interpretations and applications of the data. Current Problems in Pediatrics, 14 : 1-86, 1984.
3. Hall EJ: Radiobiology for the radiologist. pp 363-378, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.
4. Tubiana M, Dutreix, J and Wambersie A: Introduction to radiobiology. pp 323-327, Taylor & Francis, 1990.
5. Kameyama E: In gene interaction in common diseases(Inouye E and Nishimura S, Eds.), pp.167-178. University of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
6. Hande MP, UmaDevi P: Effect of prenatal exposure to diagnostic ultrasound on the development of mice. Radiation Research, 130:125-128, 1992.
7. Uma Devi P and Hande MP: Effect of low dose of 70 kVp X-rays on the intrauterine development of mice. Experimentia, 46 : 511-513, 1990.
8. Tubiana M: The problems raised by the irradiation of pregnent women. Effects of ionizing radiations on the embryon and foetus. Bull Cancer (Paris), 66: 155-164, 1979.
9. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Ionizing radiation sources and biological effects. United Nations, New York, 1982.
10. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Sources, effects and risks of ionozing radiation. Report to the General Assembly, with annexes. United Nations, New York, 1988.
11. Muller WU and Streffer C: Lethal and teratogenic effects after exposure to X-rays at various times of early murine gestation. Teratology, 42 : 643-650,

1990.

12. Muller WU, Streffer C and Pamper S: The question of threshold doses for radiation damage : malformations induced by radiation exposure of unicellular or multicellular preimplantation stages of the mouse. Radiat Environ Biophys, 33: 63-68, 1994.
13. Streffer C and Muller WU: Malformations after radiation exposure of preimplantation stages. International Journal of Developmental Biology, 40: 355-360, 1996.
14. Otake M and Schull WJ: In utero exposure to A-bomb radiation and mental retardation: a reassessment. Br J Radiol, 57 : 409-414, 1984.
15. Otake M, Schull WJ and Yoshimura H: A review of radiation-related brain damage in the prenatally exposed atomic bomb survivors. CR 4-89, Radiation Effects Research Foundation. Hiroshima, 1990.
16. Streffer C: Radiation effects of exposure during prenatal development. Radiologe, 35: 141-147, 1995.
17. Sun XZ, Inouye M, Takagishi Y, Hayasaka S and Yamamura H: Follow-up-study on histogenesis of microcephaly associated with ectopic gray-matter induced by prenatal gamma-irradiation in the mouse. J Neuropathology and Experimental Neurology, 55 : 357-365, 1996.
18. Friedberg W, Faulkner DN, Neas BR, Hanneman GD, Darden EB, Deal RB and Parker DE: Dose-incidence relationships for exencephalia, anophthalmia and prenatal mortality in mouse embryos irradiated with fission neutrons or 250kV X-rays. Int J Radiat Biol, 52 : 223-236, 1987.
19. Uma Devi P and Baskar R: Influence of gestational age at exposure on the prenatal effects of γ-radiation. Int J Radiat Biol, 70 : 45-52, 1996.
20. Uma Devi P, Baskar R and Hande MP: Effect of exposure to low-dose gamma radiation during late organogenesis on the mouse fetus. Radiation Res, 138: 133-138, 1994.
21. Vidal-Pergola GM, Kimler BF and Norton S: Effect of in utero irradiation on the postnatal development, behavior, and brain structure of rats: dose fraction

with a 6 hr interval. Radiation Res 134 : 369-374, 1993.

22. Beckman DA, Solomon HM, Buck SJ, Gorson RO, Mill RE and Brent RL: Effects of dose and dose protraction on embryotoxicity of 14.1 MeV neutron irradiation in rats. Radiation Res 138 : 337-342, 1994.
23. Solomon HM, Beckman DA, Buck SJ, Gorson RO, Mills RE and Brent RL: Comparative effects of neutron irradiation and X irradiation on the embryonic development of rat. Radiation Res, 137 : 226-230, 1994.
24. Fisher JE, Acuff SKD, Schilling MA, Vorhees CV, Meyer RA, Smith NB, and O'Brien WD Jr: Teratologic evaluation of rats prenatally exposed to pulsed-wave ultrasound. Teratology, 49 : 150-155, 1994.
25. Hande MP and UmaDevi P: Effect of prenatal exposure to diagnostic ultrasound on the development of mice. Radiation Res, 130:125-128, 1992.
26. Salvesen KA, Eik NSH: Is ultrasound unsound? A review of epidemiological studies of human exposure to ultrasound. Ultrasound In Obstetrics and Gynecology, 6:293-298, 1995.
27. Kusama T, Sugiura N, Kai M and Yoshizawa Y: Combined effects of radiation and caffeine on embryonic development in mice. Radiation Res, 117: 273-281, 1989.
28. Balla I, Michel C and Fritz-Niggli H: Synergistic interaction between vindesine and X-rays in the prenatal development of mice. Int J Radiat Biol, 52 : 371-383, 1987.
29. Cekan E, Tribukait B and Vokal-Borek, H: Protective effect of selenium against ionizing radiation-induced malformations in mice. Acta Radiol Oncol, 24 : 267-271, 1985.
30. Cekan E, Slanina P, Bergman K and Tribukait B: Effects of dietary supplementation with selenomethionine on the teratogenic effect of ionizing radiation in mice. Acta Radiol Oncol, 24 : 459-463, 1985.
31. 김성호, 김태환, 정인용, 조철구, 고경환, 류성렬 : KCCH cyclotron neutron 및 ^{60}Co gamma-ray에 의한 인체 말초혈액림프구의 염색체 이상 측정. 대한방사선방어학회지, 17 : 21-30, 1992.

32. Sung-ho Kim, Chul-koo Cho, Tae-hwan Kim, Seong-yul Yoo, Kyung-hwan Koh, Hyong-geun Yun: In vivo radioprotective activity of panax ginseng and diethyldithiocarbamate. In Vivo, 7 : 467-470, 1993.

33. Sung-ho Kim, Chul-koo Cho, Tae-hwan Kim, Seong-yul Yoo, Kyung-hwan Koh, Hyong-geun Yun: Frequency of micronuclei in lymphocyte following gamma and fast-neutron irradiation. Anticancer Res, 13 : 1587-1592, 1993.

34. 김정희, 이경종, 조철구, 류성렬, 김태환, 김성호: 인체 말초혈액림프구에서 저선량방사선 조사에 의해 유도되는 적응반응. 대한방사선방어학회지, 20 : 97-102, 1995.

35. 김성호, 한동운, 강문일, 임정택: Argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) 염색을 이용한 림프구의 미세핵분석법의 개선. 대한수의학회지, 36: 277-281, 1996.

36. 김성호, 오헌, 이송은, 이윤실, 김태환, 정규식, 류시윤: 마우스와 사람 림프구에서 방사선에 의한 미소핵의 형성 및 고려인삼의 효과. 방사선방어학회지, 22: 153-160, 1997.

37. Sung-ho Kim, Dong-un Han, Jeong-taek Lim, Sung-kee Jo and Tae-hwan Kim: Induction of micronuclei in human, goat, rabbit peripheral blood lymphocytes and mouse splenic lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. Mutation Research 393 : 207-214, 1997.

38. Tae-hwan Kim, Sung-ho Kim, Jeong-hee Kim, Yun-sil Lee, Chul-koo Jo, Soo-yong Choi, Sang-hee Park, Seong-yul Yoo: Measurement of apoptotic fragments in growing hair follicles following gamma-ray irradiation in mice. Anticancer Res, 16 : 189-192, 1996.

39. 김성호, 한동운, 정용운, 정도영, 강문일, 임정택, 김태환, 이윤실: 방사선 피폭 마우스의 털수질세포에 대한 인삼의 방사선방호효과. 고려인삼학회지, 20:149-153, 1996.

40. Sung-ho Kim, Kyu-shik Jeong, Si-yun Ryu and Tae-hwan Kim: Panax ginseng prevents apoptosis in hair follicle and accelerates recovery of hair medullary cell in irradiated mice. IN VIVO 12 : in press, 1998.

41. Sung Ho Kim, Chi Young Chung and Chang Ho Son: Cell death by

apoptosis in the neonatal mouse cerebellum following gamma-irradiation. Anticancer Research in press, 1998

42. Morita H, Ariyuki F, Inomata N, Nishimura K, Hasegawa Y, Miyamoto M and Watanabe T: Spontaneous malformation in laboratory animals: Frequency of external, internal and skeletal malformations in rats, rabbit and mice. Cong Anom, 27: 147-206, 1987.
43. Inouye M: Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red S. Cong Anom, 16: 171-173, 1976.
44. Kimmel CA and Trammell C: A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. Stain Technology, 56: 271-273, 1981.
45. Howard M.S., David A.B., Susan J.B., Robert O.G., Robert E.M. and Robert L.B.: Comparative effect of neutron irradiation and x-irradiation on the embryonic development of the rat. Radiat. Res. 137, 236-230 (1994).
46. Cabriela M.V., Bruce F.K., and Stata N. : Effect of in utero irradiation on the postnatal development, behavoir, and brain structure of rats: dose fractionation with a 6-h interval. Radiat. Res. 134, 369-374 (1993).
47. Covelli V., Di Majo V., Coppla M., and Rebessi S.: Neutron carcinogenesis in mice : A study of the dose-response curve. Radiat. Res. 128, S114-S116 (1991).
48. Mutsubara S., Sasaki M.S., Adach T.: Dose-response relationships of lymphocyte chromosome aberrations in locally irradiated persons. J. Radiat. Res. 15, 189-196 (1974).
49. Savage J.R.K., and Breckon G.: Chromosome aberration frequencies after partial body irradiation of Syrian hamsters. Br. J. Radiol. 58, 1105-1110 (1985).
50. Beckmen D.A., Solomon H.M., Buck S.J., Gorson K.O., Mills R.E., and Brent R.L. : Effect of dose and dose protraction on embryotoxicity of 14.1 MeV neutron irradiation in rats. Radiat. Res. 138, 337-342 (1994).
51. Takahashi T., Wadanabe H., Dohi K., and Ito A. : ^{252}Cf relative biological effectiveness and inheritable effect of fission neutrons in mouse liver tumorigenesis. Cancer Res. 52, 1948-1953 (1992).

52. Pitot H.C., Dragan Y.P. Teeguarden J., Hsia S., Campbell H. : Quantitative of multistage carcinogenesis in rat liver. Toxicol. Pathol. 24, 119-128 (96).
53. Bannasch P.: The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis. Recent Result Cancer Res. 19, 1-100 (1968).
54. Scherer E., Hoffman M., Emmelot P., and Freidrich-Freksa H. : Study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. JNCI 49, 93-106 (1972).
55. Bannasch P., Mayer D., and Hacker H.J. : Hepatocellular glycogenesis and hepatocarcinogenesis. Biochem Biophy Acta 49, 93-106 (1972).
56. Peraino C., Staffeldt E.F., Carnes B.A., Ludeman V.A., Blomquist J.A., and Vesselinovitch S.D. : Characterization of histochemically detectable altered hepatocyte foci and their relationship to hepatic tumorigenesis in rats treated once with diethylnitrosamine or bezo(a)pyrene within one day after birth. Cancer Res. 44, 3340-3347 (1984).
57. Jang J.J., Lee Y.S. and Kim T.H. : Development of GST-P^+ foci in 3 week old rats induced by diethylintrosamine : Preliminary data for liver foci model. J Korean Cancer Assoc. 26, 231-235 (1994).
58. Grdina D.J., Peraino C., Carnes B.A., and Hill C.K. : Protective effect of S-2-(3-aminopropylamino)-ethylphophorothioic acid against induction of latered hepatocyte foci in rats treated once with gamma radiation within one day after birth. Cancer Res. 45, 5379-5381 (1985).
59. Perino C., Gradina D.J., Staffeldt E.F., Russel J.J., Prapuolenis A., and Carnes B.A.: Effects of separate and combined treatments with gamma radiation and diethylnitrosamine in neonatal rats on the induction of altered hepatocyte foci and hepatic tumors. Carcinogenesis 8, 599-600 (1987)
60. Peraino C., Gadina D.J., and Carnes B.A. : Synergistic induction of altered hepatocyte foci by combined gamma radiation and diethylnitrosamine administered to neonatal rats. Carcinogenesis 7, 445-448 (1986).
61. Goud S.N., Feola J.M. and Maruyama : Sperm shape abnormalities in mice exposed to californium 252 radiation. Int. J. Radiat. Biol. 52, 755-760 (1987).
62. Wadanabe H., Takahashi T., and Ito A. : Influence of paternal ^{252}Cf neutron exposure on abnormal sperm, embryonal lethality and tumorigenesis in the F1 offspring of mice. Jpn. J. Res. 87, 51-57 (1996).

63. B.M. Cattanach, G. Patrichk, D. Papworth, D.T. Goodhead, T. Hacker, L. Cobb and E. Whitehill : Investigation of lung tumor induction in BALB/cJ mice following paternal X-irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 67, 607-615 (1995).

64. Willian F. Morgan, Joseph P. Day, Mark I. Kaplan, Eva M. Mcghee and Charles L. Limoli : Genomic instability induced by ionizing radiation. Radiat. Res. 146, 247-258 (1996).

65. Tlsty T.D.. Jonczyk P., White A., Sage M., Hall I., Schaefer D., Briot A., Livanos E., Roelofs H, Plulose B. and Sanchez J.: Loss of chromosomal integrity in neoplasia. Cold spring Harbor Symp. Quant. Bilo. 58, 645-654 (1993).

66. E. Solomon, J. Borrow and A.D. Goddard: Chromosome aberrations and cancer. Science 254, 1153-1160 (1991).

67. Jensh R.P., Brent R.L. : Effect of prenatal X-irradiation on the 14th-18th days of gestation on postnatal growth and development in the rat. Teratology 38, 431-441 (1998)

Table 1. Observation on the 18th day mouse foetuses exposed 2Gy γ-radiation on different gestation days.

Exposure day p.c.	No. of mothers	No. of implants	No. of early death	No. of late death	No. of resorption	Prenatal mortality No. (%)	Live foetuses	GRF (%)	Body weight (g)	Body length (cm)	Head length (cm)	Head width (cm)	Incidence of decreased head width	Incidence of decreased head length
Control	6	74	3	2	0	5(6.76)	69	7.25	1.557±0.09	3.252±0.634	1.154±0.047	0.825±0.015	20.29	2.90
2.5	6	74	1	0	48	49(66.22)	25	8	1.606±0.118	3.595±0.933	1.160±0.020	0.840±0.023	8	4.0
5.5	6	76	6	1	10	17(22.37)	59	69.49	1.332±0.057	3.231±0.423	1.119±0.013	0.791±0.012	49.15	3.39
7.5	6	82	15	2	20	37(45.12)	45	66.67	1.257±0.226	3.102±0.402	1.070±0.042	0.789±0.073	53.33	44.44
11.5	6	86	5	1	0	6(6.98)	80	100	0.923±0.076	2.710±0.216	1.02±0.042	0.721±0.022	98.75	72.5
15.5	6	74	3	0	0	3(4.05)	71	30.99	1.444±0.010	3.205±0.645	1.169±0.019	0.807±0.012	28.17	1.41

GRF : Growth retarded foetuses, calculated as the number of growth retarded foetuses/ total number of live foetuses.
Foetuses weighing less than two standard deviations of mean body weight of the control group were considered as growth retarded.
A head width or length of less than two standard deviations of mean the control value was defined decreased head width or length.

Table 2. Analysis on 18th day mouse foetuses exposed 2 Gy γ -radiation on different gestation days.

	Exposure day p.c.					
	Control	2.5	5.5	7.5	11.5	15.5
Litters	6	6	6	6	6	6
Conceptuses analyzed	74	74	76	82	86	74
Normal offspring	64	21	24	1	0	47
Intrauterine deaths	5	49	17	37	6	3
Malformed offspring	0	2	14	35	78	2
Offspring with very low body weight*	5	2	21	9	2	22

*Very low body weight was defined as a body weight two or more standard deviations less than the mean for the control group with no other abnormalities.

Table 3. Malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to 2Gy γ-radiation on different gestation days.

	Exposure day p.c.					
	Control	2.5	5.5	7.5	11.5	15.5
External malformation						
Foetus examined	69	25	59	45	80	71
Ablepharon (무안검)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Micrognathia (소악)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Gastroschisis (복벽열)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Omphalocele (배꼽탈장)	0	0	0	2(4.44)	0	0
Kinky tail (굴곡미)	0	0	1(1.69)	2(4.44)	14(17.5)	0
Branchyury (단미)	0	0	0	1(2.22)	3(3.75)	1(1.41)
Rudimentry tail (흔적미)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Digits (Oligodactyly, Syndactyly, Polydactyly, Absent nail) (결지, 합지, 다지, 무조)	0	0	0	12(26.67)	72(90)	1(1.41)
Anal atresia (항문폐쇄)	0	0	0	0	1(1.25)	0
Internal malformation						
Foetuses examined	35	13	31	22	41	37
Dilatation of cerebral ventricle(뇌실확장)	0	0	2(6.45)	9(40.91)	26(63.41)	0
Microphthalmia (소안구)	0	0	1(3.23)	0	0	0
Stenosis of nasal cavity (비강협착)	0	0	0	1(4.55)	1(2.44)	0
Cleft palate (구개열)	0	0	0	0	15(36.59)	0
Dextrocardia (우심)	0	0	0	3(13.64)	0	0
Levorotation of heart (심장좌선)	0	0	1(3.23)	4(18.18)	2(4.83)	0
Abnormal lobation of lung (비정상폐엽)	0	0	0	3(13.64)	1(2.44)	0
Detect of diaphragm (횡격막 결여)	0	0	0	1(4.55)	0	0
Diaphragmatic hernia (횡격막 탈장)	0	0	0	3(13.64)	0	0
Dilatation of renal pelvis (신우확장)	0	2(15.38)	10(32.26)	7(31.82)	3(7.32)	0
Skeletal malformation						
Foetuses examined	34	12	28	23	39	34
Deformity of occipital bone (후두골기형)	0	0	1(3.57)	2(8.70)	1(2.56)	0
Splitting of cervical vertebrae (경추골 분리)	0	0	0	4(17.39)	0	0
Abnormal arrangement of cervical vertebrae (경추이상배열)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Abnormal ossification of coccygeal vertebrae (미추골화이상)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Fusion of lumbar vertebrae (요추골 융합)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Abnormal arrangement of lumbar vertebrae (요추이상배열)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Fusion of thoracic vertebrae (흉추융합)	0	0	0	0	2(5.13)	0
Absence of ribs (늑골결여)	0	0	0	2(8.70)	0	0
Fusion of ribs (늑골융합)	0	0	0	4(17.39)	0	0
Bifurcation of ribs (늑골분지)	0	0	0	2(8.70)	0	0
Shortening of ribs (늑골단소)	0	0	0	2(8.70)	0	0
Fusion of sternebrae (흉골융합)	0	0	0	0	0	0
Displasia of sternebrae (흉골이형성)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Missing of sternebrae (흉골결여)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Hypoplasia of sternebrae (흉골형성부전)	0	0	0	3(13.04)	3(7.69)	0
Curvature of tibia (경골만곡)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Absence of metatarsal bone (중족골결여)	0	0	0	0	5(12.82)	0
Absence of metacarpal bone (중수골결여)	0	0	0	0	15(38.46)	0
Absence of clavicle (쇄골결여)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Skeletal variation						
Foetuses examined	34	12	28	23	39	34
Dumbbell shape of ossification of lumbar vertebrae (요추골 아령형골화중심)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Spliting of ossification of lumbar vertebrae (요추 골화중심 분리)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Spliting of ossification of thoracic vertebrae (흉추 골화중심 분리)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Dumbbell shape of ossification of thoracic vertebrae (요추골 아령형골화중심)	0	0	0	2(8.6)	0	0
Asymmetric of 13th rib (13 늑골 비대칭)	0	0	0	2(8.6)	0	0
Absence of 13th rib (13 늑골 결여)	0	0	0	1(4.35)	2(5.13)	0
Shortening of 13th rib (13 늑골 단화)	0	0	0	3(13.04)	2(5.13)	0
Split center of sternebrae (흉골골화중심 분리)	0	0	0	2(8.6)	1(2.56)	0
Asymmetry center of sternebrae (흉골골화중심 비대칭)	2(5.88)	3(25)	3(10.71)	10(43.48)	3(7.69)	0
Dumbbell shape of ossification center of sternebrae (흉골 아령형골화중심)	0	0	0	1(4.35)	0	0

Table 4. External malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to 2Gy γ -radiation on different gestation days.

	Exposure day p.c.					
	Control	2.5	5.5	7.5	11.5	15.5
Foetus examined	69	25	59	45	80	71
Ablepharon (무안검)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Micrognathia (소악)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Gastroschisis (복벽열)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Omphalocele (배꼽탈장)	0	0	0	2(4.44)	0	0
Kinky tail (굴곡미)	0	0	1(1.69)	2(4.44)	14(17.5)	0
Branchyury (단미)	0	0	0	1(2.22)	3(3.75)	1(1.41)
Rudimentry tail (흔적미)	0	0	0	1(2.22)	0	0
Digits (Oligodactyly, Syndactyly, Polydactyly, Absent nail) (결지, 합지, 다지, 무조)	0	0	0	12(26.67)	72(90)	1(1.41)
Anal atresia (항문폐쇄)	0	0	0	0	1(1.25)	0

Table 5. Internal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to 2Gy γ-radiation on different gestation days.

	Exposure day p.c.					
	Control	2.5	5.5	7.5	11.5	15.5
Foetuses examined	35	13	31	22	41	37
Dilatation of cerebral ventricle (뇌실확장)	0	0	2(6.45)	9(40.91)	26(63.41)	0
Microphthalmia (소안구)	0	0	1(3.23)	0	0	0
Stenosis of nasal cavity (비강협착)	0	0	0	1(4.55)	1(2.44)	0
Cleft palate (구개열)	0	0	0	0	15(36.59)	0
Dextrocardia (우심)	0	0	0	3(13.64)	0	0
Levorotation of heart (심장좌선)	0	0	1(3.23)	4(18.18)	2(4.83)	0
Abnormal lobation of lung (비정상폐엽)	0	0	0	3(13.64)	1(2.44)	0
Detect of diaphragm (횡격막 결여)	0	0	0	1(4.55)	0	0
Diaphragmatic hernia (횡격막 탈장)	0	0	0	3(13.64)	0	0
Dilatation of renal pelvis (신우확장)	0	2(15.38)	10(32.26)	7(31.82)	3(7.32)	0

Table 6. Skeletal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to 2Gy γ-radiation on different gestation days.

	Exposure day p.c.					
	Control	2.5	5.5	7.5	11.5	15.5
Foetuses examined	34	12	28	23	39	34
Deformity of occipital bone (후두골기형)	0	0	1(3.57)	2(8.70)	1(2.56)	0
Splitting of cervical vertebrae (경추골 분리)	0	0	0	4(17.39)	0	0
Abnormal arrangement of cervical vertebrae (경추이상배열)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Abnormal ossification of coccygeal vertebrae (미추골화이상)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Fusion of lumbar vertebrae (요추골 융합)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Abnormal arrangement of lumbar vertebrae (요추이상배열)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Fusion of thoracic vertebrae (흉추융합)	0	0	0	0	2(5.13)	0
Absence of ribs (늑골결여)	0	0	0	2(8.70)	0	0
Fusion of ribs (늑골융합)	0	0	0	4(17.39)	0	0
Bifurcation of ribs (늑골분지)	0	0	0	2(8.70)	0	0
Shortening of ribs (늑골단소)	0	0	0	2(8.70)	0	0
Fusion of sternebrae (흉골융합)	0	0	0	0	0	0
Displasia of sternebrae (흉골이형성)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Missing of sternebrae (흉골결여)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Hypoplasia of sternebrae (흉골형성부전)	0	0	0	3(13.04)	3(7.69)	0
Curvature of tibia (경골만곡)	0	0	0	0	1(2.56)	0
Absence of metatarsal bone (중족골결여)	0	0	0	0	5(12.82)	0
Absence of metacarpal bone (중수골결여)	0	0	0	0	15(38.46)	0
Absence of clavicle (쇄골결여)	0	0	0	1(4.35)	0	0

Table 7. Skeletal variation on the 18th day mouse foetuses exposed to 2Gy γ-radiation on different gestation days.

	Exposure day p.c.					
	Control	2.5	5.5	7.5	11.5	15.5
Foetuses examined	34	12	28	23	39	34
Dumbbell shape of ossification of lumbar vertebrae (요추골 아령형골화중심)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Spliting of ossification of lumbar vertebrae (요추 골화중심 분리)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Spliting of ossification of thoracic vertebrae (흉추 골화중심 분리)	0	0	0	1(4.35)	0	0
Dumbbell shape of ossification of thoracic vertebrae (요추골 아령형골화중심)	0	0	0	2(8.6)	0	0
Asymmetric of 13th rib (13 늑골 비대칭)	0	0	0	2(8.6)	0	0
Absence of 13th rib (13 늑골 결여)	0	0	0	1(4.35)	2(5.13)	0
Shortening of 13th rib (13 늑골 단화)	0	0	0	3(13.04)	2(5.13)	0
Split center of sternebrae (흉골골화중심 분리)	0	0	0	2(8.6)	1(2.56)	0
Asymmetry center of sternebrae (흉골골화중심 비대칭)	2(5.88)	3(25)	3(10.71)	10(43.48)	3(7.69)	0
Dumbbell shape of ossification center of sternebrae (흉골 아령형골화중심)	0	0	0	1(4.35)	0	0

Table 8. Observation on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ -ray on 11.5 day of gestation.

Dose(Gy)	No. of mothers	No. of Implants	No. of Early death	No. of late death	No. of resorption	Prenatal mortality No. (%)	Live foetuses	GRF (%)	Body weight (g)	Body length (cm)	Head length (cm)	Head width (cm)	Incidence of decreased head width	Incidence of decreased head length
Control	6	74	3	2	0	5(6.76)	69	7.25	1.557±0.09	3.252±0.634	1.154±0.047	0.825±0.015	2.03	2.90
0.5	7	109	3	1	5	9(8.26)	100	41	1.407±0.121	3.530±0.134	1.132±0.046	0.799±0.473	3	48
1	7	116	0	0	6	6(5.17)	110	60.91	1.337±0.151	3.414±0.161	1.089±0.048	0.763±0.038	26.36	79.09
2	6	86	5	1	0	6(6.98)	80	100	0.923±0.076	2.710±0.216	1.02±0.042	0.721±0.022	98.75	72.5
4	6	93	3	6	24	33(35.48)	60	100	0.622±0.105	2.497±0.239	0.891±0.063	0.612±0.032	100	100

GRF : Growth retarded foetuses, calculated as the number of growth retarded foetuses/ total number of live foetuses.
Foetuses weighing less than two standard deviations of mean body weight of the control group were considered as growth retarded.
A head width or length of less than two standard deviations of mean the control value was defined decreased head width or length.

Table 9. Analysis on 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ-ray on 11.5day of gestation.

	Dose(Gy)				
	Control	0.5	1	2	4
Litters	6	7	7	6	6
Conceptuses analyzed	74	109	116	86	93
Normal offspring	64	52	38	0	0
Intrauterine deaths	5	9	6	6	33
Malformed offspring	0	9	22	78	60
Offspring with very low body weight*	5	39	50	2	0

*Very low body weight was defined as a body weight two or more standard deviations less than the mean for the control group with no other abnormalities.

Table 10. Malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ-ray on 11.5 days of gestation.

	Dose(Gy)				
	Control	0.5	1	2	4
External malformation					
Foetus examined	69	100	110	80	60
Omphalocele (배꼽탈장)	0	1(1)	0	0	0
Kinky tail (굴곡미)	0	0	0	14(17.5)	2(3.33)
Branchyury (단미)	0	0	1(0.91)	3(3.75)	58(96.67)
Club food(만곡족)	0	0	0	0	12(20)
Digits (Oligodactyly, Syndactyly, Polydactyly, Absent nail) (결지, 합지, 다지, 무조)	0	0	12(10.91)	72(90)	60(100)
Dwarf (왜소)	0	0	0	0	60(100)
Anal atresia (항문폐쇄)	0	0	0	1(1.25)	0
Hematoma (혈종)	0	4(4)	6(5.45)	0	11(18.33)
Internal malformation					
Foetuses examined	35	52	58	41	32
Dilatation of cerebral ventricle(뇌실확장)	0	0	0	26(63.41)	32(100)
Microphthalmia (소안구)	0	0	0	0	2(6.25)
Anophthalamia(무안구)	0	0	0	0	1(3.13)
Stenosis of nasal cavity (비강협착)	0	0	0	1(2.44)	0
Cleft palate (구개열)	0	0	1(1.72)	15(36.59)	27(84.38)
Levorotation of heart (심장좌선)	0	0	0	2(4.83)	0
Abnormal lobation of lung (비정상폐엽)	0	0	0	1(2.44)	0
Dilatation of renal pelvis (신우확장)	0	2(3.85)	0	3(7.32)	4(12.5)
Skeletal malformation					
Foetuses examined	34	48	52	39	28
Fusion of cervical (경추골 융합)	0	0	0	0	1(3.53)
Deformity of occipital bone (후두골기형)	0	0		1(2.56)	4(14.29)
Splitting of cervical vertebrae (경추골 분리)	0	1(2.08)	1(1.92)	0	0
Separating of cervical vertebrae (경추골 분열)	0	2(4.17)	0	0	0
Abnormal ossification of coccygeal vertebrae (미추골화이상)	0	0	0	1(2.56)	0
Fusion of lumbar vertebrae (요추골 융합)	0	0	0	1(2.56)	0
Fusion of thoracic vertebrae (흉추융합)	0	0	0	2(5.13)	1(3.57)
Absence of ribs (늑골결여)	0	0	1(1.92)	0	7(25)
Fusion of ribs (늑골융합)	0	0	0	0	6(21.43)
Wavy ribs (파상늑골)	0	1(2.08)	4(7.69)	0	8(28.57)
Hypoplasia of ribs (늑골형성부전)	0	0	0	0	27(96.43)
Displasia of sternebrae (흉골이형성)	0	0	0	1(2.56)	0
Missing of sternebrae (흉골결여)	0	0	0	1(2.56)	0
Hypoplasia of sternebrae (흉골형성부전)	0	0	0	3(7.69)	0
Curvature of tibia (경골만곡)	0	0	0	1(2.56)	0
Absence of metatarsal bone (중족골결여)	0	0	1(1.92)	5(12.82)	28(100)
Absence of metacarpal bone (중수골결여)	0	0	0	15(38.46)	28(100)

Skeletal variation					
Foetuses examined	34	48	52	39	28
Dumbbell shape of ossification of lumbar vertebrae (요추골 아령형골화중심)	0	0	0	0	6(21.43)
Fusion of ossification of lumbar vertebrae (요추골 골화중심 융합)	0	0	0	0	10(35.71)
Spliting of ossification of lumbar vertebrae (요추골 골화중심 분리)	0	0	0	0	1(3.57)
Spliting of ossification of thoracic vertebrae (흉추골 골화중심 융합)	0	0	0	0	8(28.57)
Split center of sternebrae (흉골 골화중심 분리)	0	4(8.33)	0	1(2.56)	0
Asymmetry center of sternebrae (흉골 골화중심 비대칭)	2(5.88)	12(25)	10(19.23)	3(7.69)	0
Dumbbell shape of ossification center of sternebrae (흉골 아령형 골화중심)	0	2(4.17)	1(1.92)	0	0
Hypoplasia of ossification center of sternebrae (흉골 골화중심 형성부전)	0	1(2.08)	4(7.69)	0	22(78.57)
Extra-ossification center of strnebrae (부 골화중심(흉골))	0	2(4.17)	1(1.92)	0	0
Missing of ossification center of sternebrae (흉골 골화중심 소실)	0	0	1(1.92)	0	21(75)
Dumbbell shape of ossification of sacral vertebrae (천추골 아령형 골화중심)	0	0	0	0	3(10.71)
Fusion of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 융합)	0	0	0	0	7(25)
Spliting of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 분리)	0	0	0	0	3(10.71)
Hypoplasia of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 형성부전)	0	0	0	0	3(10.71)
Missing of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 소실)	0	0	0	0	1(3.57)
Asymmetric of 13th rib (13 늑골 비대칭)	0	0	0	0	0
Absence of 13th rib (13 늑골 결여)	0	0	1(1.92)	2(5.13)	28(100)
Shortening of 13th rib (13 늑골 단화)	0	0	0	2(5.13)	0

Table 11. External malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ -radiation on 11.5day of gestation.

	Dose(Gy)				
	Control	0.5	1	2	4
Foetus examined	69	100	110	80	60
Omphalocele (배꼽탈장)	0	1(1)	0	0	0
Kinky tail (굴곡미)	0	0	1(1.69)	14(17.5)	2(3.33)
Branchyury (단미)	0	0	0	3(3.75)	58(96.67)
Club food (만곡족)	0	0	0	0	12(20)
Digits (Oligodactyly, Syndactyly, Polydactyly, Absent nail) (결지, 합지, 다지, 무조)	0	0	0	72(90)	60(100)
Dwarf (왜소)	0	0	0	0	60(100)
Anal atresia (항문폐쇄)	0	0	0	1(1.25)	0
Hematoma (혈종)	0	4(4)	6(5.45)	0	11(18.33)

Table 12. Internal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ-radiation on 11.5day of gestation.

	Dose(Gy)				
	Control	0.5	1	2	4
Foetuses examined	35	52	58	41	32
Dilatation of cerebral ventricle (뇌실확장)	0	0	0	26(63.41)	32(100)
Microphthalmia (소안구)	0	0	0	0	2(6.25)
Anophthalamia(무안구)	0	0	0	0	1(3.13)
Stenosis of nasal cavity (비강협착)	0	0	0	1(2.44)	0
Cleft palate (구개열)	0	0	1(1.72)	15(36.59)	27(84.38)
Levorotation of heart (심장좌선)	0	0	0	2(4.83)	0
Abnormal lobation of lung (비정상폐엽)	0	0	0	1(2.44)	0
Dilatation of renal pelvis (신우확장)	0	2(3.85)	0	3(7.32)	4(12.5)

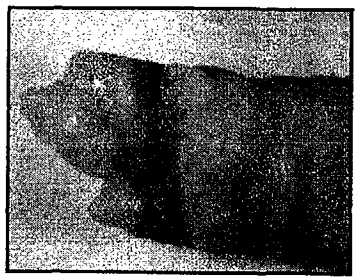
Table 13. Skeletal malformations on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ-radiation on 11.5day of gestation .

	Dose(Gy)				
	Control	0.5	1	2	4
Foetuses examined	34	48	52	39	28
Fusion of cervical (경추골 융합)	0	0	0	0	1(3.53)
Deformity of occipital bone (후두골기형)	0	0		1(2.56)	4(14.29)
Splitting of cervical vertebrae (경추골 분리)	0	1(2.08)	1(1.92)	0	0
Separating of cervical vertebrae (경추골 분열)	0	2(4.17)	0	0	0
Abnormal ossification of Coccygeal vertebrae (미추골화이상)	0	0	0	1(2.56)	0
Fusion of lumbar vertebrae (요추골 융합)	0	0	0	1(2.56)	0
Fusion of thoracic vertebrae (흉추융합)	0	0	0	2(5.13)	1(3.57)
Absence of ribs (늑골결여)	0	0	1(1.92)	0	7(25)
Fusion of ribs (늑골융합)	0	0	0	0	6(21.43)
Wavy ribs (파상늑골)	0	1(2.08)	4(7.69)	0	8(28.57)
Hypoplasia of ribs (늑골형성부전)	0	0	0	0	27(96.43)
Displasia of sternebrae (흉골이형성)	0	0	0	1(2.56)	0
Missing of sternebrae (흉골결여)	0.	0	0	1(2.56)	0
Hypoplasia of sternebrae (흉골형성부전)	0	0	0	3(7.69)	0
Curvature of tibia (경골만곡)	0	0	0	1(2.56)	0
Absence of metatarsal bone (중족골결여)	0	0	1(1.92)	5(12.82)	28(100)
Absence of metacarpal bone (중수골결여)	0	0	0	15(38.46)	28(100)

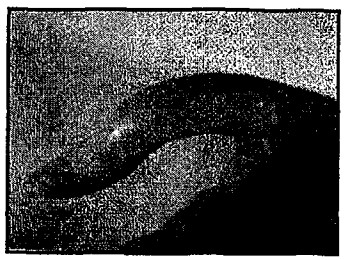
Table 14. Skeletal variation on the 18th day mouse foetuses exposed to different dose of γ-radiation on 11.5 day of gestation.

	Dose(Gy)				
	Control	0.5	1	2	4
Foetuses examined	34	48	52	39	28
Dumbbell shape of ossification of lumbar vertebrae (요추골 아령형 골화중심)	0	0	0	0	6(21.43)
Fusion of ossification of lumbar vertebrae (요추골 골화중심 융합)	0	0	0	0	10(35.71)
Spliting of ossification of lumbar vertebrae (요추골 골화중심 분리)	0	0	0	0	1(3.57)
Spliting of ossification of Thoracic vertebrae (흉추골 골화중심 융합)	0	0	0	0	8(28.57)
Split center of sternebrae (흉골 골화중심 분리)	0	4(8.33)	0	1(2.56)	0
Asymmetry center of sternebrae (흉골 골화중심 비대칭)	2(5.88)	12(25)	10(19.23)	3(7.69)	0
Dumbbell shape of ossification center of sternebrae (흉골 아령형 골화중심)	0	2(4.17)	1(1.92)	0	0
Hypoplasia of ossification center of sternebrae (흉골 골화중심 형성부전)	0	1(2.08)	4(7.69)	0	22(78.57)
Extra-ossification center of strnebrae (부 골화중심(흉골))	0	2(4.17)	1(1.92)	0	0
Missing of ossification center of sternebrae (흉골 골화중심 소실)	0	0	1(1.92)	0	21(75)
Dumbbell shape of ossification of sacral vertebrae (천추골 아령형 골화중심)	0	0	0	0	3(10.71)
Fusion of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 융합)	0	0	0	0	7(25)
Spliting of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 분리)	0	0	0	0	3(10.71)
Hypoplasia of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 형성부전)	0	0	0	0	3(10.71)
Missing of ossification of sacral vertebrae (천추골 골화중심 소실)	0	0	0	0	1(3.57)
Asymmetric of 13th rib (13 늑골 비대칭)	0	0	0	0	0
Absence of 13th rib (13 늑골 결여)	0	0	1(1.92)	2(5.13)	28(100)
Shortening of 13th rib (13 늑골 단화)	0	0	0	2(5.13)	0

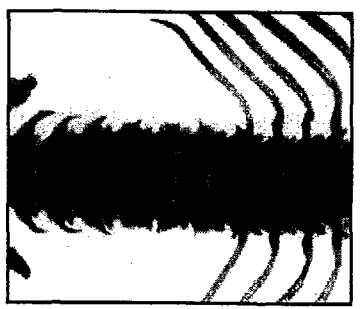
Animals: ICR Mouse
Irradiation: 2 Gy in different gestation days
Autopsy: 18th day after birth



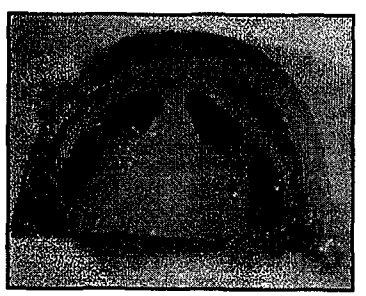
Olygodactyly



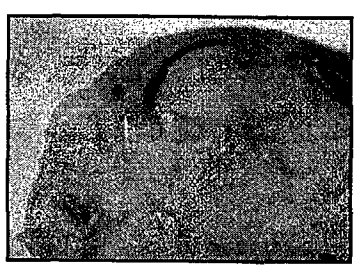
Kinky tail



Asymetry center of sternbrae



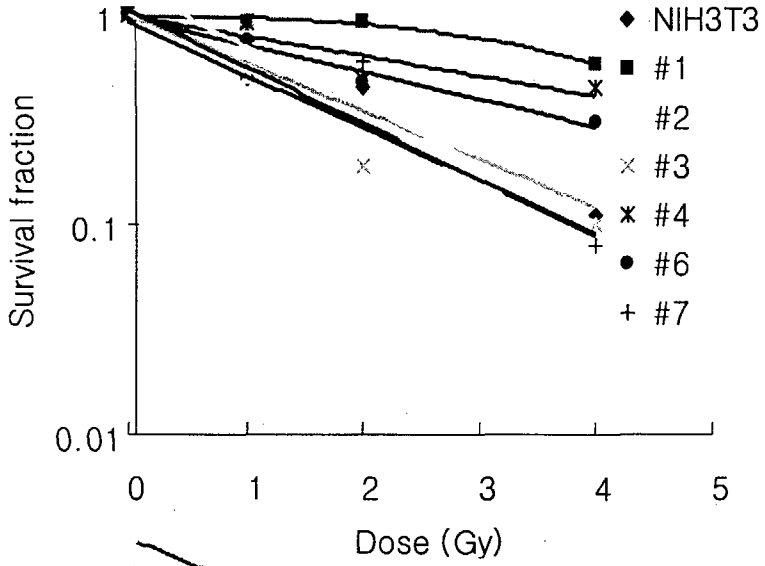
Dilatation of cerebral ventricle

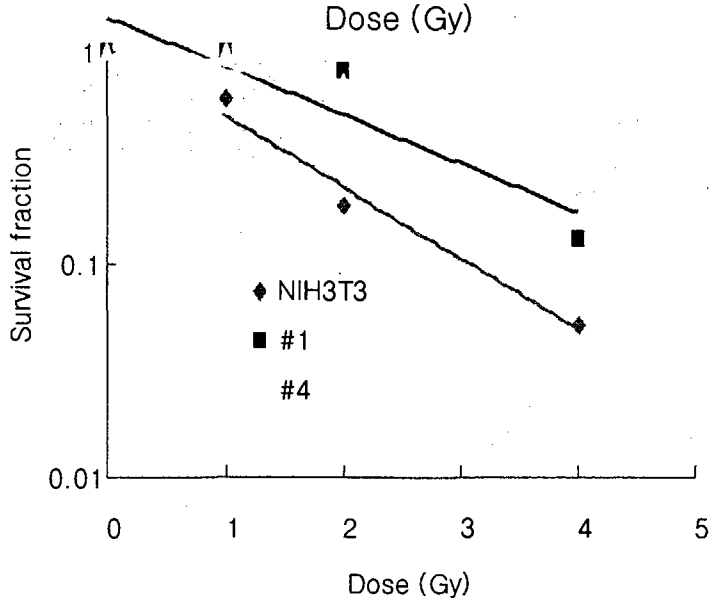


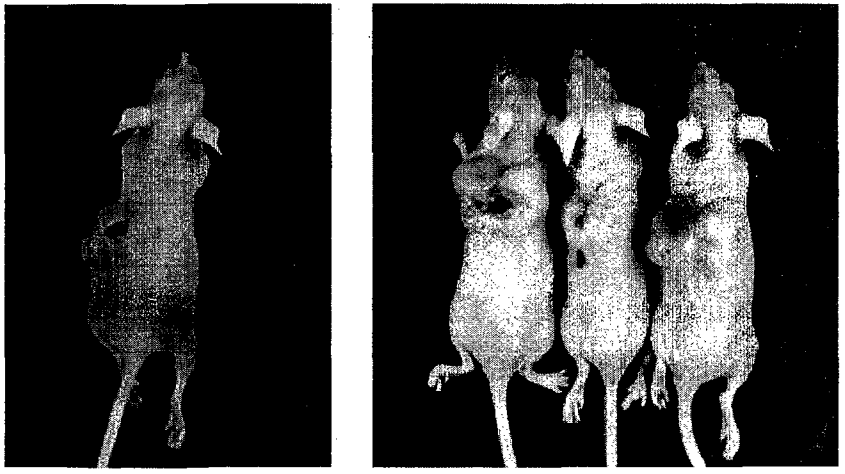
Ablepharon

Fusion of ribs

Fig. 1. Observation of abnormality on the 18th day mouse fetuses exposed to 2 Gy







#1 #4

Fig. 2. Establishment of Radioresistant Cells and Carcinogenic Effect

Fig. 3. Radiation Effect on Liver Carcinogenesis in Rats

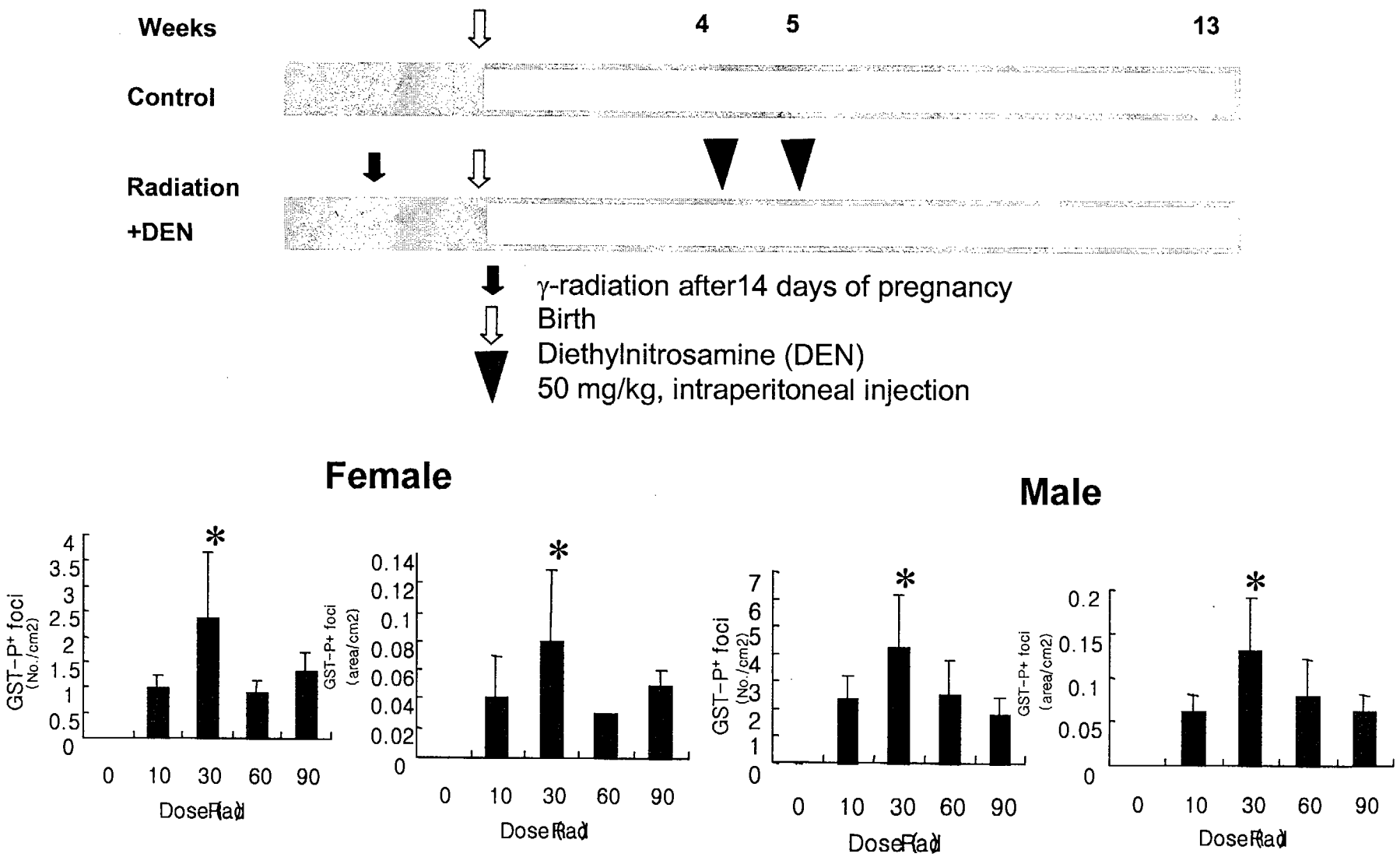
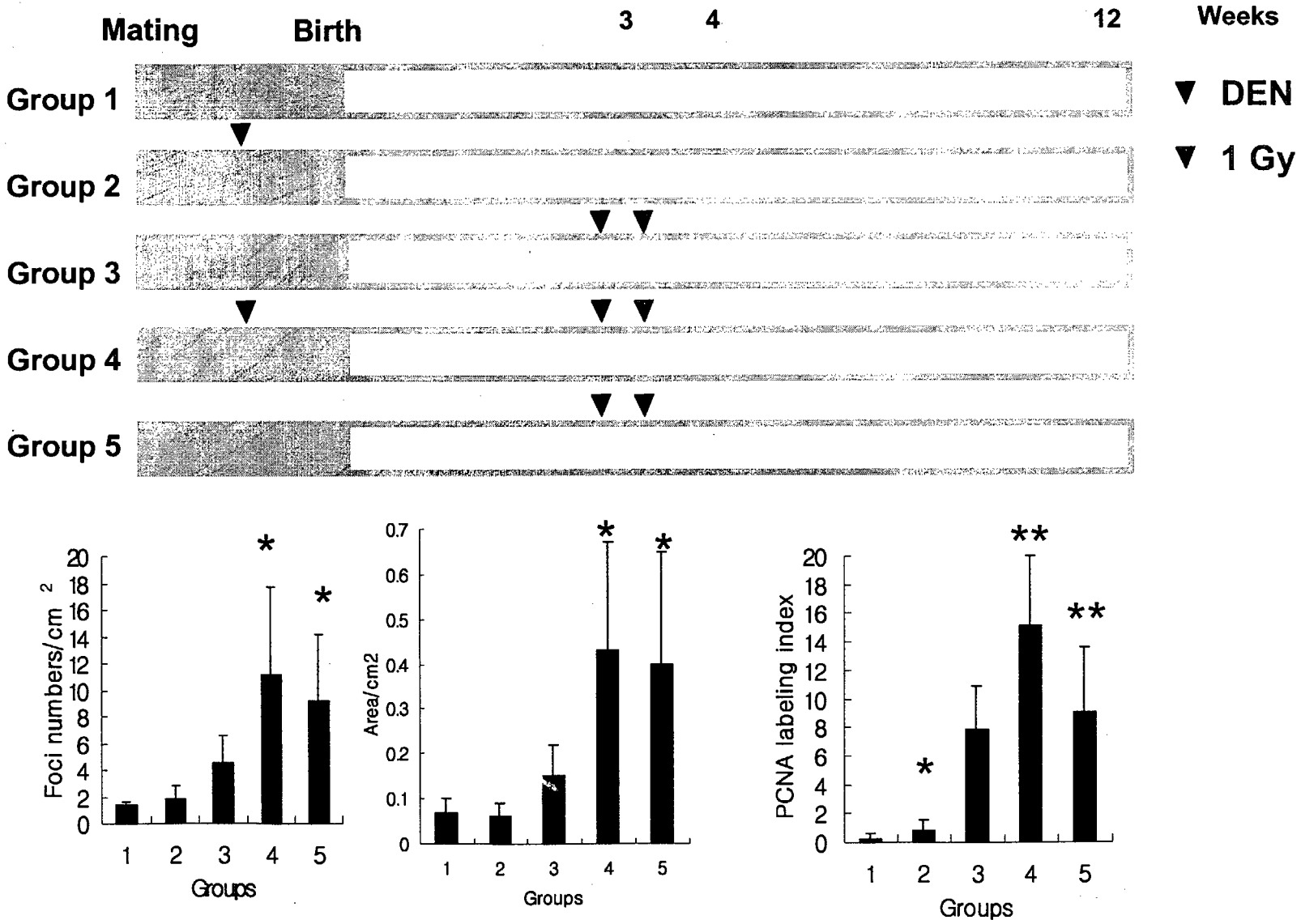
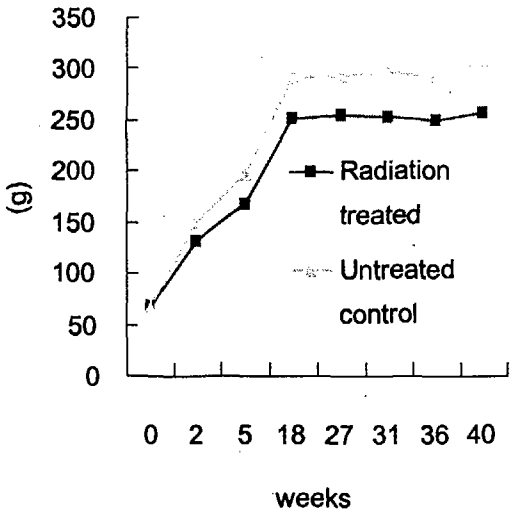
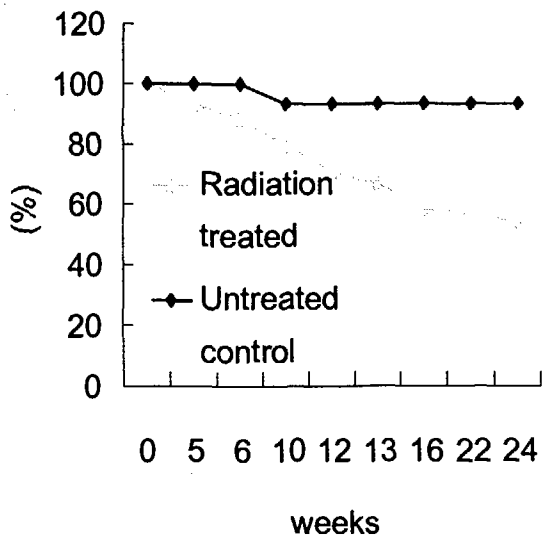


Fig. 4. Paternal or Maternal Radiation Effect on Liver Carcinogenesis of Offspring





Body weight



Survival curve

Tumor number and size per location

	Number	Size (mm3)
Left upper	8	2.34±1.79
Left lower	10	17.7±23.27
Right upper	11	8.08±11.69
Right lower	6	24.37±47.0

Fig. 5. Mammary Tumor Model by Radiation in Mouse

(위탁과제)

방사선피폭이 유전자결손에 의한 발암과정에 미치는 영향에 관한 연구

제 1 장 서 론

세포사의 기전에 관여하는 조절물질의 발현이 유전적으로 결손된 경우 암발생이 현저하게 높은 것으로 보고되고 있다. 최근들어 Fas 또는 Fas-ligand의 발현이 유전적으로 결손되어 있는 마우스들에 대하여 활발한 연구가 진행되어오고 있는데 이들 마우스는 자가면역성 질환에 쉽게 이환되며 대부분이 임파종으로 사망하는 것으로 보고되고 있다. 이들 마우스는 Fas 또는 Fas-ligand의 발현이 유전적으로 결손됨으로 인하여 자연적으로 일어나야 할 세포사가 억제되므로 발암과정이 진행되는 것으로 생각되며 따라서 발암과정에 대한 연구에 중요한 모델로 생각된다. 발암과정은 유전적 요인과 환경적요인의 복합적인 작용이라고 볼 때, 이같은 유전적 결손이 있는 경우 (유전요인), 발암요인으로서 전리방사선에 피폭되는 것 (환경요인)이 전체적인 발암과정의 양상에 어떠한 효과를 미치는지는 학문적인 관심 뿐 만 아니라, 보건적인 측면에서 볼 때도 향후 발암억제 물질을 개발하는데 중요한 기술적 단서를 제공하게 된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

carcinogenesis에 관한 연구는 지난 이십 여년간 국외에서 활발하게 진행되어왔다. 국내의 경우도 시작은 늦었으나, 종양학 관련연구자가 일차적으로 관심을 보이는 분야이기도하다. 화학물질, 바이러스, 방사선을 포함한 물리적 요인 등, 많은 외적인 요인들이 발암에 작용하는 것으로 알려졌다. 그러나, 최근 십 수년간 연구의 쾌거는 이러한 환경적인 요인 뿐 만 아니라, 숙주의 유전요인이 핵심적인 역할을 함을 밝힌 것이다. 그 중에서도, 면역계의 감시체계는 암세포를 사멸시켜서 암의 발생과정의 초기에 작용하는 것으로부터, 진행성 암의 침윤 및 전이과정이라는 후기 과정에 이르기까지, 발암 과정에 밀접하게 연관되어 있다. 이러한 면역 체계에 이상이 오면, 잘 유지되어 오던 방어 체계는 대혼란에 빠지게되고, 예기치 않은 결과를 초래할 것으로 유추된다. 면역세포인 임파구에 있는 FasL은 암세포의 Fas에 작용하여 암세포를 사멸시키는 데, 이것이 결여된 마우스는 일찍 임파종에 걸리게 되는 것이 좋은 예이다. 이러한 유전결손 마우스는 발암과정의 연구에 매우 중요한 대상으로서 발암의 초기 단계 및 후기 단계에서 어느 정도로 역할을 하는지에 대하여 규명이 필요하다. 이러한 분야의 연구는 국외에서 이제 막 시작한 상태이며, 국내에서도 관심이 일기 시작하였으나, 아직까지 보고된 결과는 없는 상태이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 개발 내용

1. 발암화학물질에 의한 발암과정

FasL이 결여되어 면역계의 Fas-FasL 상호작용이 일어나지 않는 C3H/He/gld 마우스와 이의 정상대조군인 C3H/He 마우스에 methylchloranthrene (MCA)을 다양한 용량으로 마우스의 대퇴부 피하에 주사하여 종양의 발생과정을 관찰하였다. 이과정에서 Fas-FasL의 상호작용의 역할을 유추하였다

2. 동종암세포의 일시적 부과에 따른 발암과정

FasL이 결여되어 면역계의 Fas-FasL 상호작용이 일어나지 않는 C3H/He/gld 마우스와 이의 정상대조군인 C3H/He 마우스에 동종암인 HCa-I, OCa-I 을 이식하고 대퇴부 근육내 주사하였다. 이들 암종들은 Milas 등의 방법에 따라 각각 0.025% trypsin과 DNase를 사용하여 효소 소화법으로 단일 세포 부유액을 만든 후, 10^2, 10^4, 10^6개의 세포를 마우스 대퇴부에 근육주사 하였다. 이식된 종양은 주 2-3회 caliper로 크기를 측정하여 종양의 발생시기 및 크기를 관찰하였다.

제 2 절. 연구 결과

숙주의 면역방어기전의 하나인 T-cell의 Fas-FasL 상호작용이 발암과정의 초기 시작단계 및 이식된 암세포의 생장 단계에 어떠한 역할을 하는지 알아보고 이를 발암단계의 세부과정의 모델로 응용하고자 하였다. 유전적으로 FasL이 결손된

C3H/He^{gld} 마우스와 대조군인 C3H/He 마우스를 이용하여 다음 결과를 얻었다.

1. 발암 화학물질에 의한 발암 초기 단계에서 Fas-FasL의 역할

Methylchloranthrene (MCA)을 다양한 용량으로 마우스의 대퇴부 피하에 주사하여 종양의 발생과정을 관찰한 결과 대조 군에 비하여 C3H/He^{gld} 마우스에서 종양의 발생까지의 기간이 MCA의 각 용량에서 현저하게 짧았다. 즉, 화학물질에 의한 발암의 초기단계에서 C3H/He^{gld} 마우스의 발암현상이 대조군에 비하여 유의하게 높게 나타난 것은 (암 발생의 빈도 및 발병경과기간 모두에서) 이 마우스에서 FasL가 발현되지 않으므로 Fas-FasL상호작용이 일어나지 않은 것이 관련되리라고 유추 해석할 수 있다. 그러나 이 결과가 순수하게 Fas-FasL에 특이한 상호작용에 전적으로 연관되었는지 여부는 후속실험으로서 Fas-FasL dependent cytotoxicity assay를 진행하여야 보다 분명해질 수 있다.

2. 동종암세포 투여시 종양의 생장단계에서 Fas-FasL의 역할

C3H마우스의 동종 암인 HCa-I (간암), OCa-I (난소암) 세포를 다양한 용량으로 마우스 대퇴부에 주입하여 종양발생과정을 관찰하였다. 이는 일시적으로 과량의 종양부하시 면역감시체계에서 Fas-FasL상호작용의 역할을 보기 위한 것이다. 10^2, 10^4, 10^6의 세포를 심었을 때, 세포농도에 따라 약간의 차이는 있었으나, HCa-I, OCa-I 공히 대조 군에 비하여 C3H/He^{gld} 마우스에서 종양발생이 2-3일 정도 빠른 것으로 나타났다. 흥미로운 것은 일단 종양이 발생한 후에는 성장의 속도 (growth kinetics)가 대조 군과 C3H/He^{gld} 마우스가 유사한 양상을 보인다는 점이다. 이는 종양세포가 과량 부하되었을 때, 면역감시체계에서 Fas-FasL상호작용이 종양세포의 생장의 저지에 역할을 하지만, 전반적으로는 부분적인 역할에 불과할 것으로 생각된다. 10^2의 세포를

심었을 때 이러한 적은 수의 세포수라 할지라도 10^6의 세포의 경우와 유사한 정도로 종양발생이 지연되고 있다는 것은 종양부하의 양적인 정도와 상관없이 Fas-FasL상호작용이 부분적으로 국한된다는 것을 암시하고 있다.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

연구개발 목표는 당초계획한 대로 진행되어서 연구개발목표는 100% 달성되었다고 본다. 특히, 본연구에 사용된 유전결손 마우스를 발암과정의 모델로서 국내 최초 수립하였으며, 이를 이용하여 발암과정을 다각적 접근으로 연구하는데 기여하였다고 생각된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 발암과정에서 면역계의 Fas-FasL상호작용의 중요성을 보여주었으나, 이 결과가 순수하게 Fas-FasL에 특이한 상호작용에 전적으로 연관되었는지 여부는 후속실험으로서 Fas-FasL dependent cytotoxicity assay를 진행하여야 보다 분명해질 수 있다. 또한, 다양하게 개발되어 있는 각종 유전결손 마우스의 정보를 수집하여 다단계의암화과정에 관여하는 여러 유전요인의 역할 밝힐 수 있으며, 이는 향 후 항암치료의 새로운 치료준칙 개발에 유용할 것으로 생각된다.

제 6 장 참고문헌

1. Boice JD, Fraumeni JF. Radiation carcinogenesis: Epidemiology and biological significance, New York, Raven Press, 1984.
2. Nose M, Ito MR, Ono M, et al. Vascular lesion in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis and their transfer. Int J Cardiol 54:S11-20, 1997
3. Reap EA, Roof K, Maynor K, et al. Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions. Proc natl Acad Sci USA 94:5750-5755, 1997
4. Sheard M, Vojtesek B, Janakova L, et al. Up-regulation of Fas in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. Int j Cancer 73:757-762, 1997.
5. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, et al. Melanoma cell expression of Fas ligand: Implications for tumor immune escape. Science 274:1363-1366, 1996
6. van den Broek M, Kagi D, Ossendorf F, et al. Decreased tumor immune surveillance in perforin-deficient mice. J Exp Med 184:1781-1790, 1996

Table 1. Development of chemically induced tumor by various dose of MCA

	C3H/He	C3H/He^{gld}
MCA dose (ug/mouse)	No. of mice with tumor (mean weeks to tumor growth)	No. of mice with tumor (mean weeks to tumor growth)
25	0/10	10/10 (7)
100	0/10	10/10 (6)
400	6/9 (10)	9/9 (5.5)

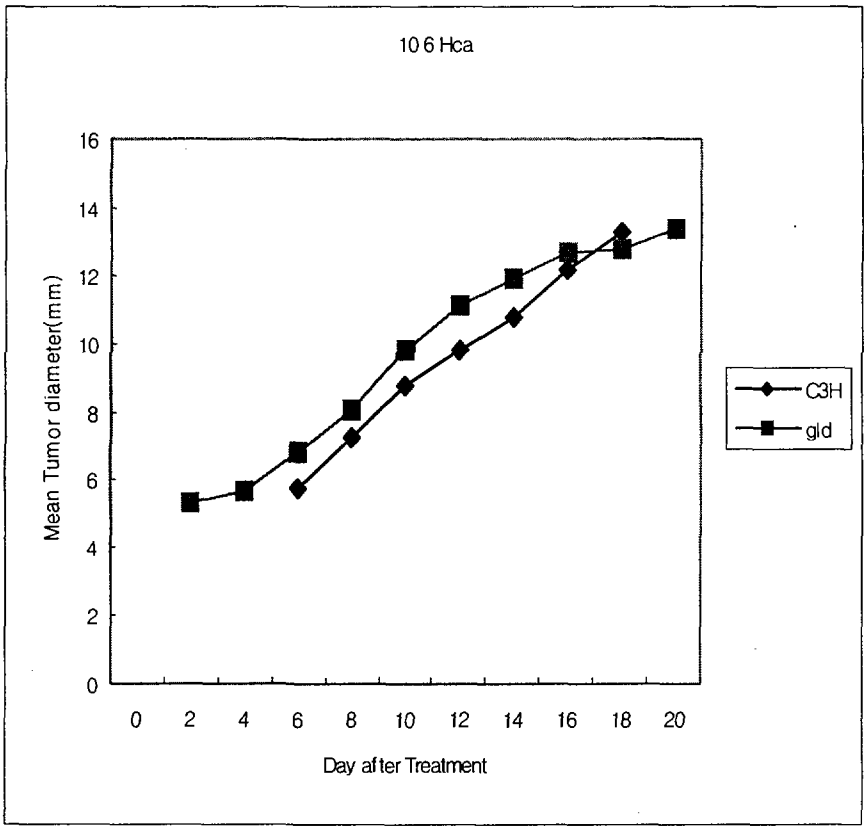


Fig. 6. Growth of HCa-I after implantation of tumor cell 10^6 cell per each mouse.

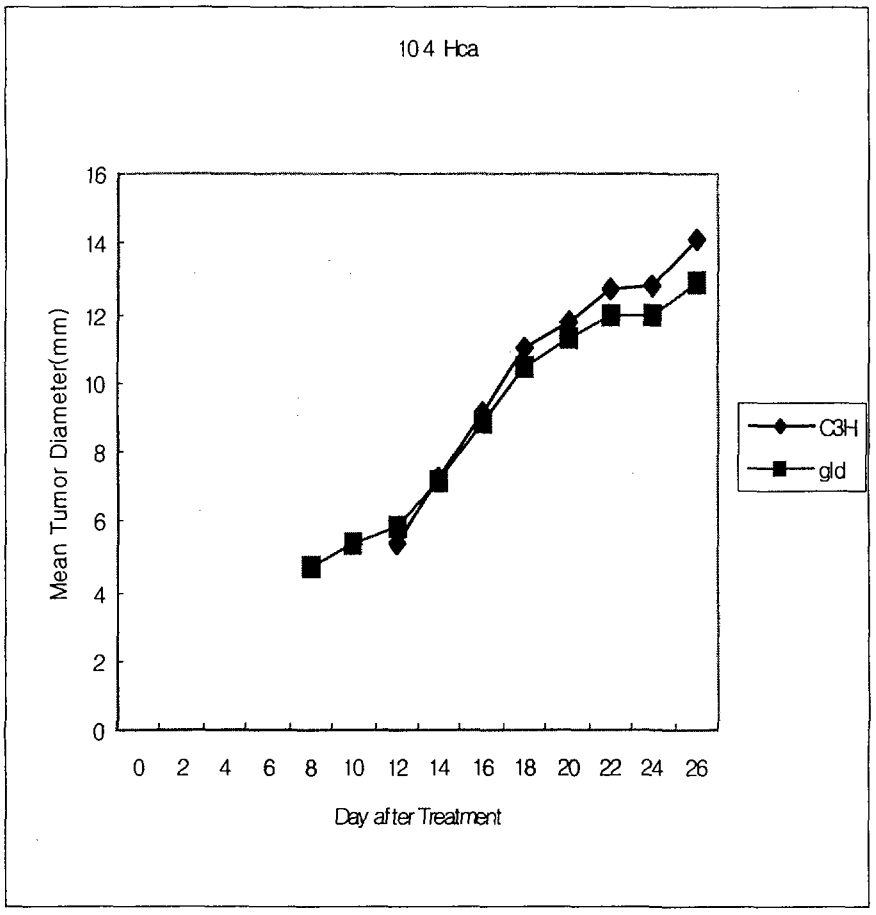


Fig. 7. Growth of HCa-I after implantation of tumor cell with 10^4 cell per each mouse.

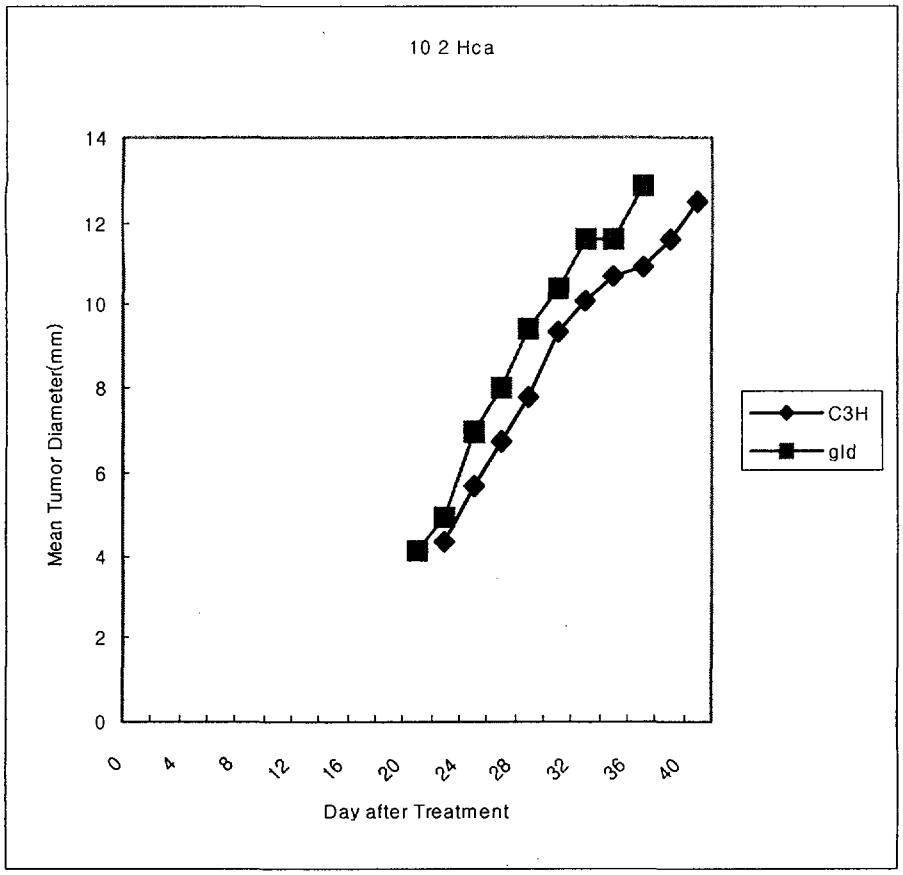


Fig. 8. Growth of HCa-I after implantation of tumor cell with 10^2 cell per each mouse.

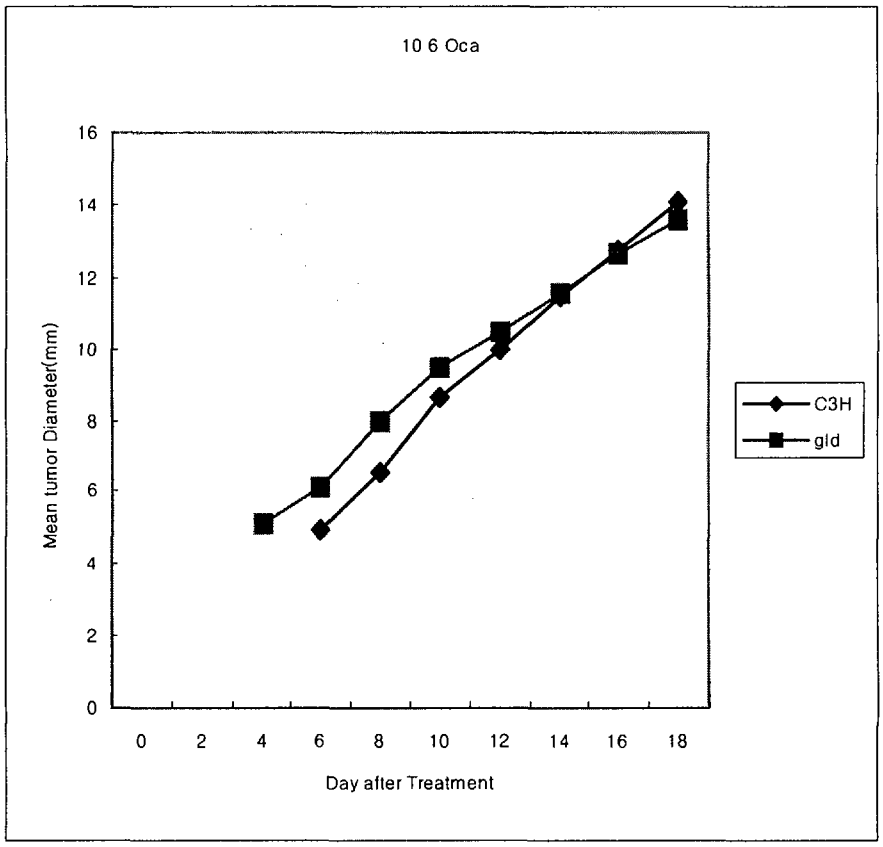


Fig. 9. Growth of OCa-I after implantation of tumor cell with 10^6 cell per each mouse.

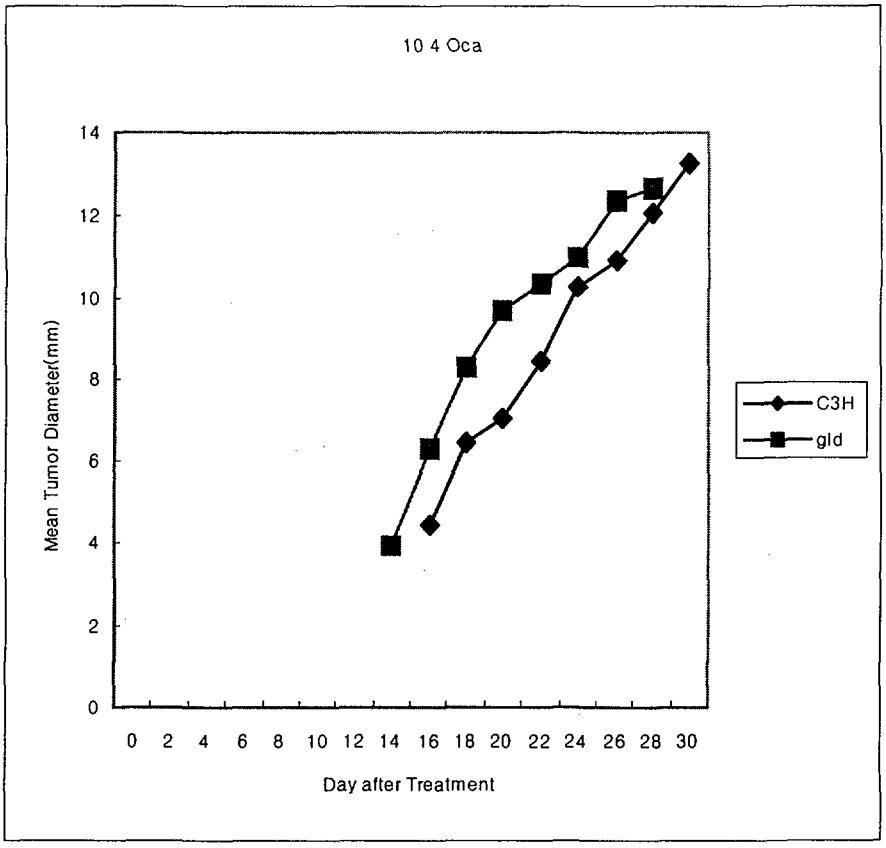


Fig. 10. Growth of OCa-I after implantation of tumor cell with 10^4 cell per each mouse.

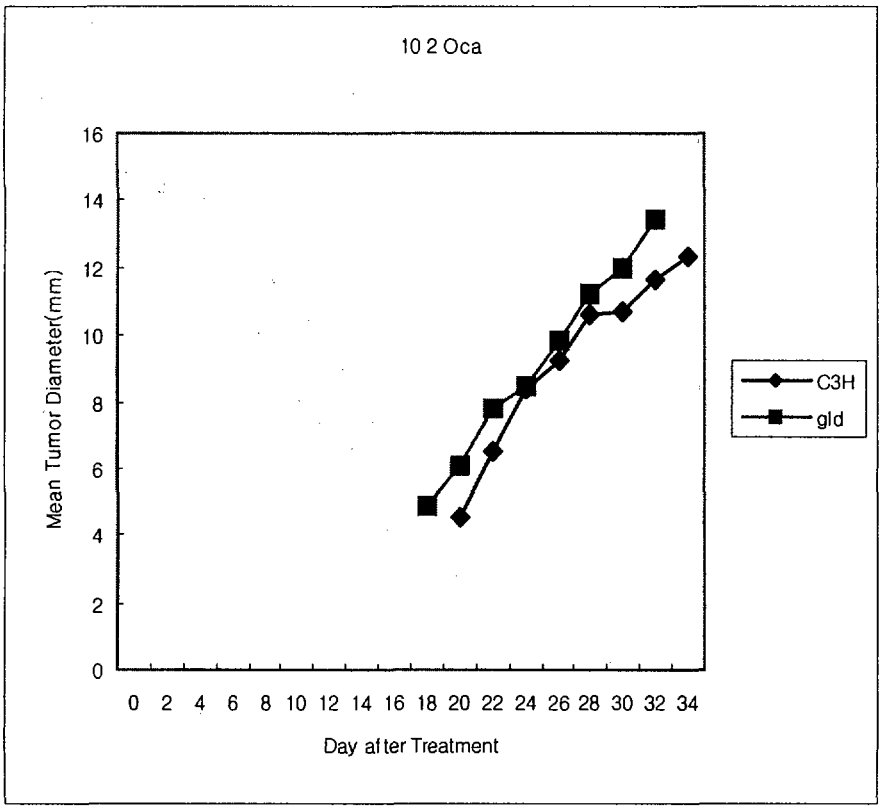


Fig. 11. Growth of OCa-I after implantation of tumor cell with 10^2 cell per each mouse.

서 지 정 보 양 식

수행기관 보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서 번호	INIS 주제코드
KCCH/ /98			

제목 / 부제	방사선의 인체영향 연구
연구책임자 및 부서명	이 윤 실 (원자력병원)
연 구 자 및 부서명	조철구, 이수재, 김태환, 이기호, 김경중, 김수관, 함용호, 조혜년, 박상희, 최선아, 배인화, 이민정 (원자력병원) 정명희, 장자준 (서울의대), 범희승 (전남대), 박영미 (인천대), 성진실 (연세대), 최은경 (울산의대)

발행지	대한민국,서울	발행기관	원자력병원	발행일	2000. 4
페이지		도 표	유(○), 무( )	크 기	A4

참 고 사 항			
비 밀 여 부	공개(0), 대외비( ), ____급 비밀	보고서 종류	연구
연구위탁기관		계약 번호	

초록(300단어 내외)

1. 저준위 방사선에 의한 적응응답반응이 정상세포에서는 나타나나 암세포에서는 나타나지 않음을 apoptosis 발현정도로 규명하였고 이러한 적응응답반응에 heat shock protein (HSP) 25 및 inducible HSP 70이 관여함을 증명하였다.
2. 정상세포 (mouse primary keratinocyte, PK), v-rasHa transformed keratinocyte (ras-PK) 및 양성종양에서 분리한 papilloma cells (308) 에 대한 방사선 감수성이 PKC isozyme의 방사선 반응성과 관련있음을 규명하였다.
3. 임신마우스에 방사선조사시 임신초기에는 유산을 초래하며, 임신 7.5일에서 11.5일의 기관형성기에 사지말단, 뇌 및 흉부를 중심으로 기형발생이 높게 나타나고, 임신 15.5일의 태아기에는 약간의 성장지연을 동반하나 기형발생은 극히 미미하였다.
4. 2 Gy 조사군에서 기형의 빈도가 가장 컸다.
5. 임신 중 모계에 대한 방사선량과 차세대 발암감수성과의 용량-반응성의 비례적 상관관계를 관찰할 수 있었으며 방사선 노출로 인한 차세대 발암감수성 기전을 규명하였다.
6. 방사선에 의한 유방암 모델을 확립하였다.
7. 정상조직의 방사선 손상에 있어서 방사선에 의한 apoptosis를 조절하는 유전자를 분석한 결과 p53, Bcl-2, Bcl-X, Bax 등 유전자 산물의 발현은 각 정상조직에 따른 고유한 역동적 양상을 나타내었으며 흉선의 경우, 먼저 p53이 증가되고 연이어서 Bax, Bcl-x 순으로 양적으로 증가되는 양상을 보였고 정상조직의 경우, Bcl-2 는 거의 변화를 보이지 않았다.
8. 방사선 노출 세포는 in vivo nude mouse system에서 발암성을 나타내었다.
9. PKC isozyme, repair enzyme, cell cycle distribution, telomerase activity등이 방사선 감수성에 영향을 미치는 인자였다.
10. 마우스를 대상으로 실험하였을 때 장기별 방사선 감수성이 차이가 있었으며 이러한 차이는 glutathione등의 함량에 의해 결정되는 것 같다.

주제명 키워드 (10단어 내외)	

저준위 방사선에 의한 적응응답반응, 방사선 발암, 방사선 기형, 방사선 세포사, 방사선 신호전달체계, 방사선 감수성

편집순서 7-1

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code

Title/Subtitle	Biological Effect on Ionizing Radiation in Human
Project Manager and Dept.	Yun-Sil Lee (Lab of Radiation Effect, Korea Caner Center Hospital)
Researcher and Dept	Chul-Koo Cho, Su-Jae Lee, Tae-Hwan Kim, Kee-Ho Lee, Kyung-Joong Kim, Soo-Kwan Kim, Young-Ho Ham, Sun-Ah Choi, Hae-Nyun Cho, Min-Jeong Yi, In-Hwa Bae (Korea Cancer Center Hospital) Ja-June Jang, Myung-Hee Chung (Seoul Natl Univ), Jin-Sil Sung (Yonsei Univ), Eun-Kyung Choi (Ulsan Univ), Hee-Sung Bum (Chunnam Natl Univ), Young-Mee Park (Inchon Univ)

Pub. Place	South Korea	Pub. Org.	Korea Cancer Center Hospital	Pub. Date	2000. 4
Page		Fig. Table	Yes(o), No( )	Size	A4
Note					

Classified	Open(o), Outside( ), Class	Report Type	Research
Sponsoring Org.		Contract No.	

Abstract (About 300 Words)

1. Adaptive response when 0.01 Gy was preirradaitated before high challenging dose is induced in normal cell types such normal lymphocytes, primary keratinocytes, and L929 fibroblast cells but not in neopalstic cells such as L5178Y lymphoma cells, EL-4 lymphoma cells and 308 papilloma cells.
2. Heat shock protein (HSP) 25 and inducible HSP70 is responsible for the induction of adaptive response and radioresistance - Cell cycl regulation, antiapoptotic molecule and PKC activation were involved.
3. Aapoptosis was induced-at most - 5 hrs after irradiation in primary keratinocytes, in v-rasHa transformed keratinocytes, the maximum interval was 16 hrs, and in 308 papilloma cells, the maximum was 48 hrs.
4. PKC response by radiation is correlated with induction of apoptosis.
5. Rapid induction PKCdelta in primary keratinocytes and no response of PKC epsilon may involved in radiation induced apoptosis.
6. The rate of resorption was increased when radiation was given at 2.5 days after gestation. Early death including foetal death were highly expressed when radiation was given at 7.5 days after gestation. There are no difference in incidence of late death including embryonic death.
7. 2 Gy is the most effective dose in radiation induced teratogenesis in mouse model.
8. Growth retardation and small head was present when radiation was given at 5.5, 7.5, 11.5, and 15.5 days after gestation and small head showed high incidence at 11.5 days after gestation.
9. External malformation, internal malformation and skeletal malformation was induced when radiation was given at 7.5 days after gestation.
10. OGG1-mutated cells induced radiosensitive by G2/M cell cycle arrest.
11. Radiation induced G2/M phase cell cycle and correlated with radiosensitivity.
12. PKCalpha induced differentiation.
13. Radiation exposed cells showed carcinogenic effect.
14. Organ specific radiosensntivity was shown and protein expression was involved.

Subject Keywords (About 10 Words)

Adaptive response by low dose radiation, Radiation induced carcinogenesis, Radiation induced teratogenesis, Radiation induced apoptosis, Radiation induced signal transduction

주 의 문 작 성 요령

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 원자력연구개발사업의 연구 보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 원자력연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가 과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.