

방사선 조사후 백서 공장 접막의 재생과정에서 5-fluorouracil 투여가 phospholipase C 와 ras 암유전자단백의 발현에 미치는 영향

연세대학교 원주외과대학 치료방사선과학교실, 이화여자대학교 의과대학 방사선과학교실¹
병리학교실², 포항공대 생명과학과³

박경란 · 이정식¹ · 김성숙² · 이영한³ · 류성호³ · 서판길³

= Abstract =

The Influence of 5-Fluorouracil Administration Mode on the Expression of Phospholipase C and Ras Oncoprotein Associated with Regeneration of Rat Intestinal Mucosa Following Radiation

Kyung Ran Park, M.D., Chung Sik Rhee, M.D.¹, Sung Sook Kim, M.D.²
Young Han Lee, MS.³, Sung Ho Ryu, Ph.D.³, Pann-Ghill Suh, Ph.D.³

Department of Radiation Oncology, Yonsei University Wonju College of Medicine
Department of Radiology¹ and Pathology², Ewha Womans University College of Medicine
Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology³

Purpose : Phospholipase C(PLC) isozymes play significant roles in transmembrane signal transduction. PLC- γ 1 acts as the intracellular effector in signal transduction for cellular proliferation and differentiation. Ras oncoprotein is also involved in cell growth. We determined the biological significance of PLC and ras oncoprotein in regeneration following radiation and the effect of different modes of administration of 5-FU.

Materials and Methods : To determine the effect of the administration mode of 5-FU on the regeneration of intestinal mucosa of rats following radiation, we compared the expression of PLC and ras oncoprotein in six groups. Group I had no treatment. Group II received radiation(8 Gy) only. Group III received radiation(8 Gy) and 5-FU(150mg/kg) continuous intravenous (iv) infusion for 12 hours. Group IV received radiation(8 Gy) and 5-FU(150mg/kg) iv bolus injection. Group V received only 5-FU(150mg/kg) continuous iv infusion for 12 hours. Group VI received only 5-FU (150mg/kg) iv bolus injection. Through immunoblotting and immunohistochemistry, we examined the expression of PLC and ras oncoprotein in rat jejunum at 96 hours after radiation or 5-FU administration and at 120 hours after radiation and 5-FU administration. We also investigated the histological findings using hematoxylin and eosin stain.

Results : In the immunohistochemistry study, PLC- γ 1 expression was the highest in group III followed by groups II and VI in that order and was weakly positive in groups V and VI. PLC- γ 1 was hardly detected in the control group. The expression

of ras oncoprotein was the same as the PLC- γ 1 expression for all groups. These results were confirmed by the histological findings regarding the mucosal regeneration. In the immunoblotting analysis, PLC- γ 1 expression was the highest in group III followed by group IV and II in that order. This difference between the immunoblotting and immunohistochemistry study was due to the high expression of PLC- γ 1 on the damaged surface epithelium rather than to its expression in the regeneration region as observed in the immunohistochemistry study for group IV. The expression of PLC- δ 1 was positive only in group V and VI, which received both radiation and 5-FU, and the expression of PLC- β 1 was negligible for all groups.

Conclusion : These results suggest that PLC- γ 1 mediated signal transduction and ras oncoprotein may have a significant role in mucosal regeneration after radiation, and that continuous iv infusion of 5-FU may induce active regeneration in intestinal mucosa following radiation. In addition, the expression of PLC- δ 1 in combined group of radiation and 5-FU implies that PLC- δ 1 may be involved in signal transduction mediated by concerted action between radiation and 5-FU.

Key Words : Radiotherapy-5-fluorouracil interaction, Jejunal crypt cell, Phospholipase C, Ras oncoprotein.

서 론

모든 세포들은 세포 외부의 자극을 감지하고 적절히 반응하는 기전을 갖고 있으며 세포에서 일어나는 여러 생리 현상들은 세포 외부로부터 전달되어 오는 여러가지 신호전달물질 즉 호르몬, 성장인자, 신경전달물질 및 mitogen 등에 의해 조절을 받게 되는데 이러한 세포 외부의 신호가 어떠한 기전을 통해 세포막을 통과하여 핵내로 전달되는가에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

세포외부에서 전달되는 여러 신호물질은 세포막에 존재하는 각각의 특이 수용체에 결합하여 각각 effector인 adenylate cyclase, guanylate cyclase, phosphoinositide-specific phospholipase C(PLC)를 활성화하여 cyclic adenosine monophosphate(cAMP), cyclic guanosine monophosphate(cGMP), inositol 1, 4, 5-trisphosphate 및 diacylglycerol 등의 2차 신호전달물질을 생성하여 세포 내의 각종 생리 활성을 일으킨다^{1,2)}.

이들 effector중 PLC는 세포막에 존재하는 phosphatidyl inositol 4, 5-biphosphate(PIP₂)를 가수분해하여 inositol 1, 4, 5-triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DG)의 두가지 2차 전달물질을 만들

고 IP₃는 Ca²⁺을 저장기관으로부터 세포질로 유리시키고 DG은 protein kinase C를 활성화하여 세포의 분비, 대사, 수축, 신경흥분, 분화 및 성장등의 생리적 현상을 조절하게 된다³⁾. 동물 실험을 통해 여러 신경전달물질, 홀몬, 성장인자 및 면역세포에 대한 자극신호들이 PLC를 통해 세포내로 전달되고 있음이 밝혀져 PLC 매개 신호전달체계는 신경전달, 홀몬의 작용, 암세포의 성장조절등의 생리 및 병리 현상 연구에 중요한 출발점이 되고 있다.

PLC는 지금까지 β , δ , 및 γ 세종류의 동위효소(isozyme)들이 알려져 있으며 각 동위효소들은 서로 다른 기전을 통해 활성화된다는 사실도 밝혀졌다. 이중 PLC- γ 1은 성장인자의 수용체와 직접 결합하여, 이들 수용체의 tyrosine kinase 활성화에 의해 PLC- γ 1의 활성이 증가함이 밝혀졌으며⁴⁻⁶⁾ 최근에 유방암, 직장암 조직에서 PLC- γ 1이 과발현되었음이 보고됨으로써^{7,8)} PLC- γ 1이 세포의 성장, 분화 및 증식에 중추적 요소임이 시사되고 있다. PLC- β 는 GTP 결합 단백질(G-protein)이 매개하는 신호전달에 관여되어 있다는 사실이 밝혀졌으며^{9,10)} PLC- δ 는 최근에 thrombin이 PLC- δ 1에 의해 신호가 전달된다는 보고가 있었으나¹¹⁾ 아직 작용 기전에 관하여 알려진 바가 없다.

ras 단백질은 신호전달과정을 조절하는 분자 개체

기(molecular switches)의 역할을 하는 guanine nucleotide 결합단백질(G 단백질)의 일종으로서 ras가 암유전자로 돌연변이가 일어나면 ras 암유전자 단백질은 계속 활성화된 상태로 있으면서 세포내로 신호를 보내어 세포의 성장을 유도하게 되는 것으로 알려져 있다¹²⁾.

방사선감작약물로 널리 사용되고 있는 5-fluorouracil(5-FU)은 임상 연구에서 방사선치료와 동시에 투여함으로써 여러 소화기암에서 생존율이 향상됨이 밝혀져 주로 복부 및 골반 부위의 방사선 치료시 5-FU를 병행하게 된다. 5-FU의 합병증으로는 투여 방법에 따라서 일시 정주시(intravenous bolus injection)에는 골수세포에 대한 독성, 구내염과 장염이 발생하는데 이중 골수세포에 대한 독성이 가장 문제가 되고 있으며 지속성 정주(intravenous continuous infusion)시는 일시 정주에 비해 골수세포에 대한 독성은 감소하나 구내염과 장염은 주된 합병증으로 남는다¹³⁻¹⁵⁾. 또한 소장 점막은 방사선에 민감한 반응을 보여 복부와 골반 부위 방사선 치료시 드물지만 급만성 장염이 발생하기 때문에 방사선과 5-FU 병행시 소장 손상이 더욱 가중되는 문제가 있다. 따라서 정상 소장 점막에 대한 방사선효과와 5-FU의 방사선감작효과에 대해 관심을 갖고 많은 연구가 이루어졌으나 대부분 방사선조사와 5-FU의 투여 순서 및 투여 간격에 따른 차이를 조직병리학적 소견상의 세포의 재생 정도를 비교한 연구들이었으며¹⁶⁻²³⁾, 분자 수준에서의 특성 규명 및 단백질의 발현에 대하여 연구된 바가 없었으며 또한 5-FU의 투여 방법에 따라 지속성 정주와 일시 정주간에 방사선감작효과를 비교한 연구 또한 이루어져 있지 않은 실정이다.

저자들은 방사선 조사후 활발한 세포의 증식을 보이

는 소장점막의 재생과정에서 세포 성장에 중요한 PLC와 ras 암유전자단백이 관여하는지를 규명하고, 5-FU 투여 방법이 PLC와 ras 암유전자단백의 발현에 미치는 영향을 보고자 본 연구를 계획하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험동물은 무게 200g 전후의 흰쥐(Sprague Dawley계)를 암수 구별없이 사용하였다. 각 군은 정상 대조군(I), 방사선조사 단독군(II), 방사선과 5-FU 12시간 지속성 정주 병행군(III), 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군(IV), 5-FU 12시간 지속성 정주 단독군(V), 5-FU 일시 정주 단독군(VI)으로 나누어 관찰하였다(Table 1).

2. 방 법

1) 방사선 조사와 5-fluorouracil 투여 방법

6 Megavoltage X-선(CLINAC 1800)을 이용하여 80 cGy/min의 선량률(dose rate)로 흰쥐의 전신에 8 Gy를 단일 조사하였다.

5-FU 용량 150mg/kg을 일시 정주군에서는 ether 마취하에서 쥐의 꼬리 정맥을 통해 5분간 주사하였고 지속성 정주군에서는 pentothal sodium의 복강내 마취하에서 쥐의 꼬리 정맥을 통해 12시간에 걸쳐 서서히 주사하였다.

2) 실험 동물의 희생시기

방사선조사나 약물 투여후 공장 소낭선의 재생 시간에 맞추어²⁴⁾ 방사선 단독군과 5-FU 단독군에서는 방사선조사나 약물 투여후 90시간후에, 방사선과 약물 병행군에서는 120시간 후에 흰쥐를 희생시켰다.

Table 1. Experimental Design

Group	Radiation Dose (Gy)	5-FU Dose (mg/kg)	No. of Rat
I. Control	—	—	6
II. Radiation alone	8	—	6
III. Radiation & 5-FU continuous iv infusion	8	150	6
IV. Radiation & 5-FU iv bolus injection	8	150	6
V. 5-FU continuous iv infusion	—	150	6
VI. 5-FU iv bolus injection	—	150	6

iv : intravenous

3) 시료 채취 및 제조

조직병리학적 소견의 관찰과 면역조직화학염색을 위하여 Treitz 인대 직하부의 공장(jejunum)을 2cm 길이로 절단하여 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하여 두께 5 μ m 두께로 절편하여 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다. immunoblotting을 위해서는 희생시킨 쥐의 공장 조직을 채취한 후 즉시 -70 $^{\circ}$ C로 실험에 사용할 때까지 냉동 보관하였다.

4) 면역조직화학염색법

PLC동위효소와 ras 암유전자단백(C-H-ras(Ab-1), Oncogene Science Inc.)의 발현 분포를 관찰하기 위하여 시행한 면역조직화학 염색은 Hsu등이²⁵⁾ 기술한 방법에 약간의 수정을 하여 시행하였다. 즉 파라핀에 포매된 조직을 5 μ m두께로 절편하여 xylene과 alcohol을 이용하여 탈파라핀과 hydration을 시켰다. xylene에는 5분간 3번씩 담겼으며 alcohol은 100%, 90%, 80%, 70%의 순으로 각 2번씩, 2분간 처치하였다. 비특이적인 단백질의 결합을 막기 위해 10% goat serum으로 20분간 반응시키고 조직내 peroxidase 활성을 차단하기 위하여 3% hydrogen oxide에 15분간 반응시켰다. 그 후 증류수로 수세하고 phosphate buffer saline(PBS)에 5분간 담근후 1:200으로 희석시킨 PLC 동위효소를 실온에서 2시간 반응시켰다. ras 암유전자단백은 1:100으로 희석시켰고 역시 2시간 실온에서 반응시킨후 PBS로 5분간 3번씩 수세한후 DAKO사의 LSAB kit를 사용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 즉 link antibody를 20분간 반응시키고 그후 streptavidin으로 20분간 반응후 PBS로 수세후 AEC(3-aminoethyl 9-carbasol)로 발색하고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색한후 mount하고 현미경으로 검색하였다. negative control은 2가지 방법으로 사용하였는데, 하나는 PLC 동위효소에 대한 항체대신 PBS를 반응시킨 후 같은 순서로 염색한 것과 다른 하나는

PLC 항체를 정제된 PLC 동위효소와 반응시킨 후 즉, preabsorption시킨 항체를 일차항체로 하고 같은 순서로 염색하여 양성반응이 소실되는 것을 확인하여 이들의 양성반응이 특이적임을 확인하였다. Positive control로는 가장 양성반응이 잘 나오는 슬라이드를 골라 매번 염색시 1장씩 같이 염색하여 염색상을 비교 관찰하였다.

5) Immunoblotting

얼린 정상 소장조직과 방사선 및 화학요법 처치된 백서 소장 조직을 10% glycerol, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 μ g/ml leupeptin 및 1mM PMSF 20mM이 함유된 10mM HEPES(pH 7.2)의 균질액을 만들고 이것을 20,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원침하여 그 상등액을 수확하였다. 100 μ g의 단백질에 Laemmli cooking 완충액을 첨가하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가온하여 얻은 시료를 8% SDS-PAGE로 분리시켰다. 분리된 단백질을 전기적 이동법(electrotransfer)으로 nitrocellulose paper에 이동시키고 5%(W/V) 탈지분유(non fat dry milk)로 blocking하였다. 이것을 각각의 PLC 동위효소에 특이적인 단세포균항체로 4시간동안 반응시킨후 0.05% tween 20이 함유된 PBS로 5번 세척하였다. Immunoreactive band는 horse-radish peroxidase가 결합된 goat anti-mouse IgG antibody (Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc., Gaitersburg)로 반응시켜 ECL system(Amersham)으로 발색하였다.

6) 결과 판정

흰쥐 한마리당 공장에서 4개의 횡단면을 얻어 hematoxylin 과 eosin 염색을 하여 각 군의 특징적인 조직병리학적 소견을 관찰하고 세포의 재생정도를 객관적으로 평가하기 위하여 5개의 소낭선당 유사분열의 수를 세어 각 군의 평균을 구하고 t-test를 시행하여 통계적 유의성 여부를 보았다.

Immunohistochemistry의 등급은 통상 면역조직

Table 2. The expression of PLC isozymes shown by immunohistochemistry

Group	I	II	III	IV	V	VI
γ 1	0	+++	++++	+	+/0	+/0
δ 1	0	0	+++	+++	0	0
β 1	0	0	0	0	0	0

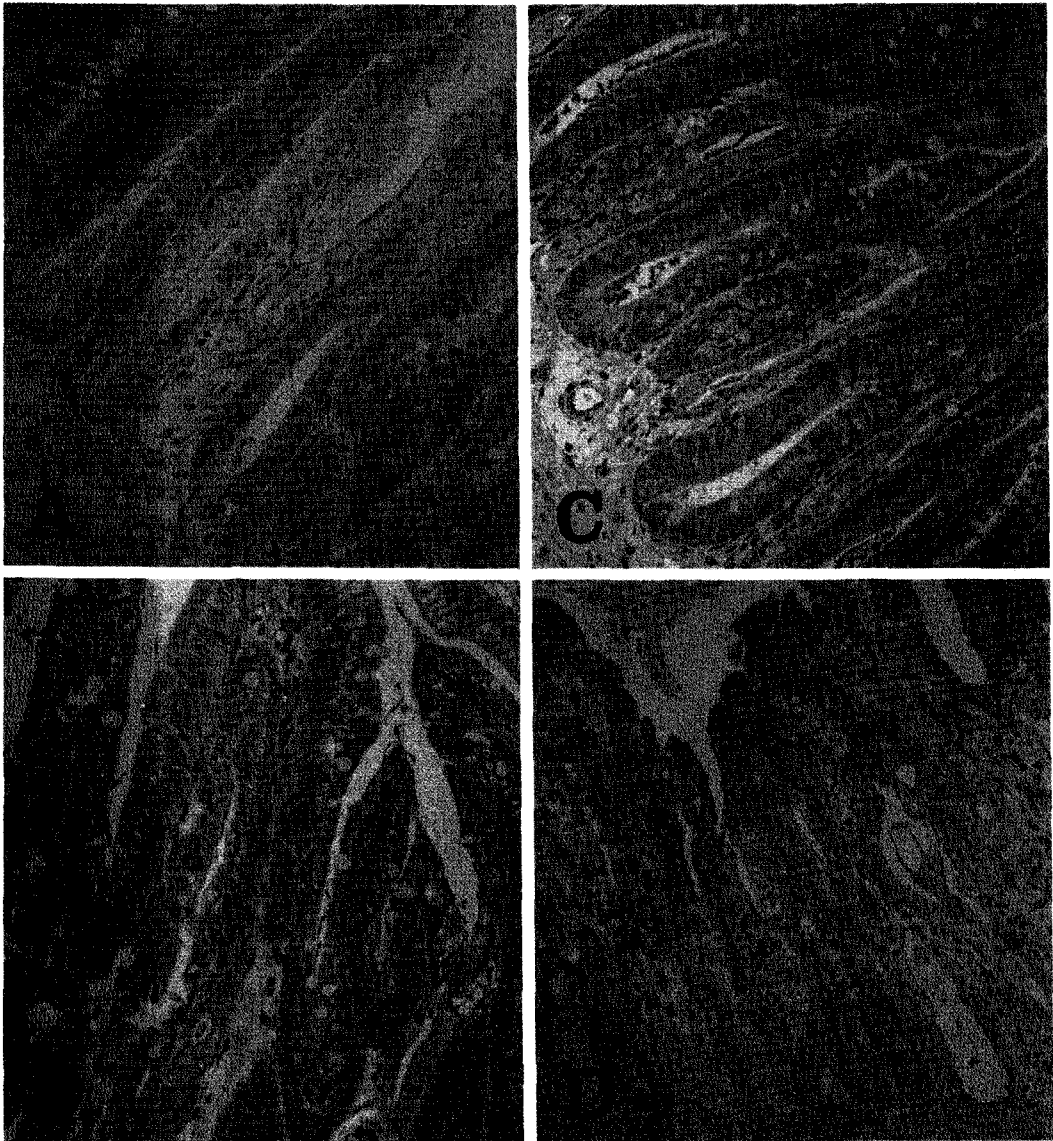


Fig. 1. The expression of PLC- γ 1 shown by immunostain(brown color) in the jejunal section of rats($\times 200$). (A) Normal jejunal mucosa : hardly detected expression of PLC- γ 1. (B) Radiation alone group : moderately increased expression of PLC- γ 1 in glandular epithelium. (C) Combined radiation and 5-FU continuous infusion group : markedly increased expression of PLC- γ 1 in regenerating glands. (D) Combined radiation and 5-FU bolus injection group : moderately increased expression PLC- γ 1, but it is localized to damaged surface epithelium rather than to its expression in the regeneration region.

화학염색에서 시행되는 염색상의 강도(intensity)와 분포(distribution)를 사용하였다. 즉 정상 대조군의 경우를(0), 약간 표현이 있는 듯 하나 확실하지 않은 경우를(+/0)로 하고 표현이 확실히 나타나지만 약한 정도를(+)로, 제일 강하고 대부분의 세포에서 양성

을 보인 경우를(++++)라고 한후 그 사이의 양성 반응된 세포들은 정도에 따라(++), (+++)로 등급을 정하였다. Immunoblot에서도 band가 나오지 않는 경우를(0), 보일듯 하지만 확실하지 않은 경우를(+/0)로 하고 약하지만 확실한 band를 보이는 경우

를(+), 제일 강하고 확실한 band를(++++) 라고 한후 그 사이의 양성반응을 정도에 따라(++), (+++)로 분류하였다.

결 과

1. PLC 동위 효소의 발현

면역조직화학염색법의 결과 PLC- γ 1의 발현은 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군에서 정상 대조군에 비해 가장 강한(++++) 염색상을 보였고 그 음으로 방사선조사 단독군(+++), 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군(+)의 순이었고 5-FU 투여 단독군에서는 미약한 염색상을 보였다(Table 2, Fig. 1). PLC- δ 1의 발현은 방사선 및 5-FU 지속성 정주 병행군과 방사선 및 5-FU 일시 정주 병행군에서만 강한 양성(++)의 염색상을 보였고 그외 모든 군에서 정상

대조군에 비해 차이가 없었다(Table 2). PLC- β 1의 발현은 모든 실험군에서 정상 대조군과 차이를 보이지 않았다(Table 2).

PLC- γ 1의 발현을 공장 점막의 부위별로 나누어 보았을때, 재생이 활발한 기저부위에서는 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군에서 가장 강한 양성의 염색상을 보였고, 다음으로 방사선조사 단독군, 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군의 순이었으나, 점막의 손상으로 상피세포의 탈락을 보이는 상층부위에서는 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군에서 가장 강한 양성의 염색상(++/++++)을보였다(Table 3, Fig 1).

한편 Immunoblotting에서 PLC- γ 1의 발현은 방사선 및 5-FU 지속성 정주 병행군에서 가장 강한 양성의 band를 보였고 그 다음으로 방사선 및 5-FU 일시 정주 병행군, 방사선 단독군의 순서로 양성 band를 보였으며 그외 군에서는 immunoblotting으

Table 3. The differences of PLC- γ 1 expression according to location shown by immunohistochemistry

Group	I	II	III	IV	V	VI
Surface	0	+ / +++	++	+++	+	+
Base	0	++	+++	+	+	0
Repair	0	+++	++++	+	+ / 0	+ / 0

Table 4. The expression of PLC isozymes shown by immnoblotting

Group	I	II	III	IV	V	VI
γ 1 Grade	0	+	+++	++	0	+ / 0
No.	0 / 6	5 / 6	6 / 6	5 / 6	0 / 6	3 / 6
δ 1 Grade	0	+ / 0	+	++	0	0
No.	0 / 6	1 / 6	2 / 6	5 / 6	0 / 6	0 / 6
β 1 Grade	0	0	0	0	0	0
No.	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6

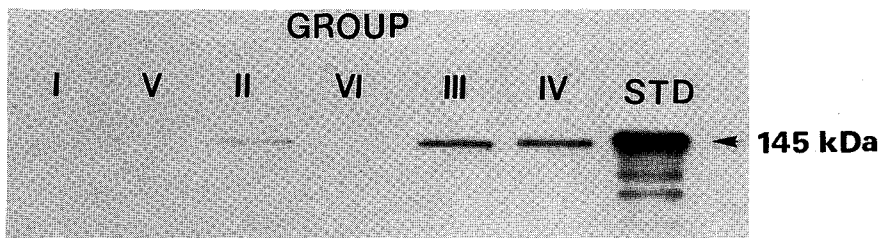


Fig. 2. The immunoblot analysis of phospholipase C- γ 1. PLC- γ 1 expression was highest in group III followed by groups II and IV in that order and was weakly positive in groups V and VI. PLC- γ 1 was hardly detected in the control group. STD indicate purified PLC- γ 1(50ng).

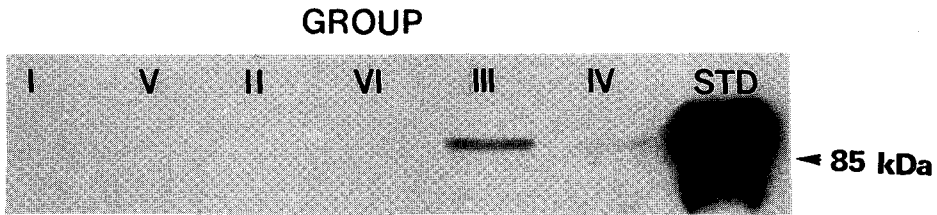


Fig. 3. The immunoblot analysis of phospholipase C- δ 1. The expression of PLC- δ 1 was positive only in group III and IV, which received both radiation and 5-FU, strongly positive in group IV and weakly positive in group III. STD indicate the purified PLC- δ 1(100ng).

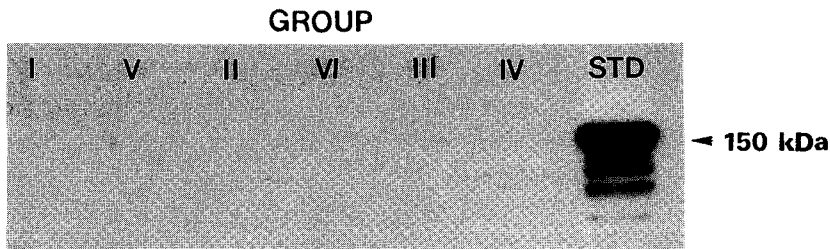


Fig. 4. The immunoblot analysis of phospholipase C- β 1. The expression of PLC- β 1 was negligible for all groups. STD indicate the purified PLC- β 1(100ng).

Table 5. The expression of PLC- γ 1 and ras oncoprotein shown by immunohistochemistry

Group	I	II	III	IV	V	VI
PLC- γ 1	0	+++	++++	++	+/0	+/0
ras	0	++	+++	+	+/0	+/0

로 발현 정도가 감지 되지 않았다(Table 4, Fig. 2).

PLC- δ 1의 발현은 방사선 및 5-FU 지속성 정주 병행군(+)과 방사선 및 5-FU 일시 정주 병행군(++)에서만 양성의 염색상을 보였고 그외 모든 군에서 정상 대조군에 비해 차이가 없었다(Table 4, Fig. 3). 한편 PLC- β 1의 발현은 모든 실험군에서 정상 대조군에 비해 차이가 없었다(Table 4, Fig. 4).

2. ras 암유전자 단백질의 발현

면역조직화학염색 결과 ras 암유전자단백의 발현은 방사선 및 5-FU 지속성 정주 병행군에서 가장 강한 양성의 염색상을 보였고, 그 다음으로 방사선조사 단독군, 방사선및 5-FU 일시 정주 병행군의 순으로 PLC- γ 1 발현의 정도와 일치하는 소견을 보였다(Table 5).

3. 병리학적 소견

정상 백서의 공장 점막은 기저부에 증식대가 잘 발

달되어 있고 배상세포(goblet cell)가 규칙적으로 분포되어 있는데(Fig. 5A) 비하여 방사선조사 단독군에서는 점막의 용모 길이가 전체적으로 짧아져서 점막의 위축을 초래하였고, 부분적인 점막 상피세포의 탈락도 있었다. 소낭선의 재생은 활발하였으며, 재생 소낭선에서는 배상세포가 거의 관찰되지 않았다(Fig. 5B).

방사선과 5-FU 병행군 중 5-FU 12시간 지속성 정주 병행군에서는 점막의 정상 구조가 유지되면서 배상세포도 관찰되었고, 기저부에서는 재생 소낭선도 존재하였으나(Fig. 5C), 5-FU 일시 정주 병행군은 12시간 지속성 정주 병행군에서 보다 점막의 위축이 심하면서 용모의 길이가 더욱 짧아지고, 소낭선의 변형과 더불어 재생이 자주 관찰되었으며, 상피세포의 핵이 균질의 과염색성으로 변하여 있었다(Fig. 5D). 5-FU 주사 단독군 중 12시간 지속성 정주군에서는 정상 공장 점막의 구조가 유지되었고, 배상세포가 많이 관찰되었으며 소낭선의 재생도 활발하였고(Fig. 5E),

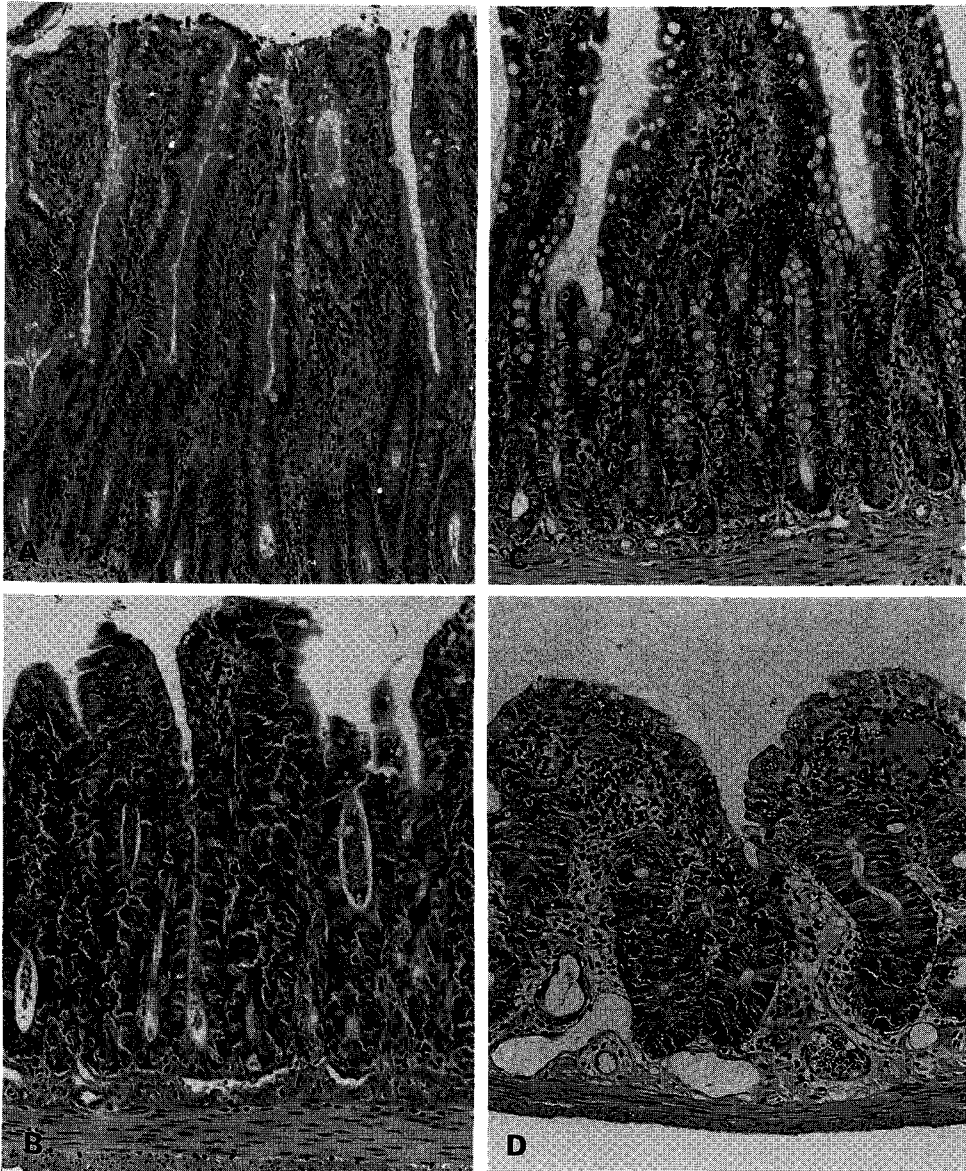


Fig. 5. Histopathological findings of the jejunal mucosa of rats(H & E, $\times 100$). (A) Normal jejunal mucosa showing even villous surface, crypts with goblet cells and basal proliferative zone. (B) Radiation alone group: the villi are evenly atrophic and the regenerative glands are frequently seen. (C) Combined radiation and 5-FU continuous infusion group: the mucosal architecture is well preserved compared with the radiation alone group(Fig. 5B). (D) Combined radiation and 5-FU bolus injection group: the mucosal villi are more atrophic and damaged in radiation plus 5-FU bolus injection group compared with the radiation alone group(Fig. 5B).

일시 정주군에서는 점막의 정상 구조가 소실되고 위축되어 있으면서 점막내 림프선의 확장이 있었고 소낭선의 재생이 활발한 소견을 보여(Fig. 5F) 같은 약물

의 농도에서 12시간 지속성 정주군이 일시 정주에 비해 손상이 적었다.

소낭선에서의 유사분열의 수는 방사선과 5-FU 지

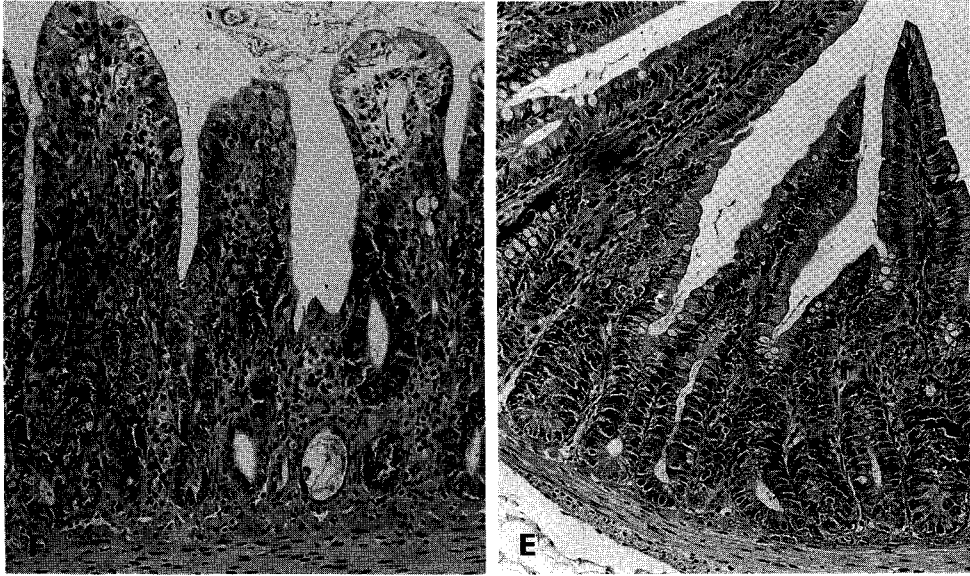


Fig. 5. (E) 5-FU continuous infusion group: the villi are slightly shortened and the goblet cells of crypts are focally decreased. (F) 5-FU bolus injection group: the mucosa is atrophic, the villi are much shortened, and the epithelial cells are actively regenerated.

Table 6. The number of mitoses per five glands

Group	Mean \pm S.E.
I	8.33 \pm 1.202
II	30.83 \pm 3.936
III	31.33 \pm 3.887
IV	21.50 \pm 1.839
V	12.33 \pm 2.011
VI	13.50 \pm 2.693

S.E. : Standard error

p-value : Group II vs. III(p=0.930)

Group II vs. IV(p=0.057)

Group III vs. IV(p=0.045)

속성 정주 병행군에서 가장 많았고 다음으로 방사선 단독, 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군의 순으로 조직 병리학적 소견상 재생이 활발한 정도와 일치하는 결과를 보였다. 이 세 군 중 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군과 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 6).

고 찰

방사선과 5-FU를 동시에 투여하므로써 5-FU나 방사

선 각각의 단순한 첨가(additive) 작용보다 더 큰 상승(synergistic) 작용을 보여준 기초실험 결과^{26,27)}가 토대가 되어 5-FU는 지난 30년간 방사선감작(radio-sensitizing) 약물로써 널리 사용되어 왔으며, 상호작용 기전에 대해서는 5-FU의 농도가 세포독성(cytotoxicity)을 일으킬 정도로 충분하면 방사선 생존곡선의 기울기에 유의한 변화를 가져오는 세포독성 효과의 증강을 보이며²⁸⁾, 또한 5-FU는 anaerobic 세포와 aerobic 세포에 똑같은 세포독성효과를 보여 방사선에 저항을 보이는 hypoxic cell에 대해서도 유용하기 때문에 설명되고²⁹⁾ 있으나 아직 그 기전은 완전히 밝혀지지 않았다.

5-FU는 생물학적 반감기가 10분으로 짧기 때문에 방사선과 5-FU의 상승작용은 종양 세포가 방사선조사 후 8시간 이상 5-FU에 지속적으로 노출되어야만 발생되며, 일시 정주시는 이러한 상승작용이 발생되지 않는다고 보고 되었다^{17,30)}. Lelieveld등³⁰⁾은 상승효과를 기대하기 위해서 48시간 이상 노출이 필요하다고 하였고, Vietti등¹⁷⁾과 Byfield등³⁰⁾은 방사선 조사후 세포가 5-FU에 8시간 이상 지속적으로 노출되었을 경우에만 상승작용이 일어나고 일시 정주시에는 상승작용이 일어나지 않음을 보고하였다. 따라서 임상에서

역시 일시 주사에 의한 최고농도(peak concentration)를 피함으로써 전신적 부작용을 줄이고 적절한 방사선감작효과(radiosensitization)를 얻어 치료성파(therapeutic gain)를 높이기 위하여 대부분 지속성 정주를 이용하고 있다.

임상에서 5-FU는 주로 유방암, 소화기암, 자궁암, 및 두경부암등에서 이용되고 있고 여러 전향성 임상연구(prospective randomized trial)에서 방사선치료와 5-FU를 동시에 투여함으로써 여러 소화기암에서 생존율이 향상됨이 밝혀져 복부 및 골반 부위의 방사선 치료시 5-FU를 병행하게 된다. 그러나 정상 조직에 대한 5-FU의 합병증으로 골수세포에 대한 독성, 구내염과 장염이 발생하는데 지속성 정주시는 일시 정주시에 가장 문제가 되는 골수세포에 대한 독성은 감소하나 구내염과 장염이 주된 합병증으로 남게 된다¹³⁻¹⁵. 또한 소장 점막은 방사선에 매우 민감한 반응을 보이기 때문에 방사선과 5-FU를 병행시 소장 손상이 더욱 가중되는 문제가 있다. 이러한 이유로 정상 소장 점막에 대한 5-FU의 방사선감작효과에 관심을 갖고 많은 연구가 시행되어 왔으나 대부분 방사선과 5-FU의 투여 순서 및 투여 간격과 5-FU의 노출시간에 따른 상승작용에 대한 연구가 주류를 이루었고¹⁶⁻²³ 현재까지 방사선과 5-FU 병행시 소장점막의 손상 정도를 관찰하는데 있어 5-FU의 지속성 정주와 일시정주간에 소장에 대한 방사선감작효과를 비교한 연구는 없었다.

최근 분자 생물학의 급속한 발전으로 특정질환의 원인을 규명하고 병리 및 생리 현상을 밝히는데 있어 분자수준에서의 특성규명 및 단백질의 발현에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있고, 방사선생물학 분야에 있어서도 방사선에 대한 세포의 반응 과정에서의 신호전달기전을 밝히고자하는 연구들이 시도되기 시작하여 방사선 조사후 protein kinase C^{31,32}, tyrosine kinase³³와 mitogen-activated protein kinase³⁴가 활성화되고 raf-1 유전자가 방사선에 대한 반응과 관련되어 생성됨이³⁵ 밝혀졌으나 아직 신호전달기전의 체계적 과정은 밝혀지지 않았으며 근래에 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 현재까지 방사선 조사후 소장점막의 손상정도를 관찰하는데 있어서 대부분 광학현미경상의 병리학적소견을 관찰한 microcolony survival assay³⁶를 이용한 연구들이었고

신호전달기전에 관하여 연구된 바가 없었다.

최근 외부 자극에 대한 생체 신호전달체계에서 중요한 효소로 알려진 phospholipase C(PLC) 동위효소들의 발현은 조직의 종류와 발달과정에 따라 특이한 양상을 보이고 특히 PLC 동위효소중 PLC- γ 1은 세포의 성장, 분화 및 증식에 중추적 요소로 알려져 있으며, ras 암유전자단백도 세포의 성장을 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서 소장 점막에 대한 방사선과 5-FU의 상승작용을 관찰하기 위하여 소장점막의 재생 정도를 비교하는데 있어 방사선과 5-FU 투여 후 활발한 세포의 증식과 분화를 보이는 소장 점막의 재생과정에서 PLC 동위효소와 ras 암유전자단백의 관여 여부와 발현 정도를 밝히는 연구는 매우 의의있을 것으로 생각된다.

신호전달체계에서 중요한 PLC 동위효소 β , δ 및 γ 각각의 DNA 염기서열 및 아미노산 서열을 비교해보면, 세개의 동위효소들은 분자량의 차이는 물론, 아미노산 배열의 유사성(homology)이 매우 낮았지만 특정한 두 부위(X부위 및 Y부위)에서는 유의할 만한 유사성을 보였다. 이들은 아미노산이 각각 약 260개(X부위)와 약 170개(Y부위)로 이루어져 있으며, 이 부위를 구성하고 있는 아미노산은 X부위에서 54%, Y부위에서 42%가 서로 동일하였다³⁷. 이들 부위는 각각 혹은 함께 PLC의 기질인 phosphoinositide을 인지할 수 있게 공간적 구조를 형성하여 기질의 phosphodiester 결합을 분해할 수 있는 촉매 성질을 가지거나, 또는 PLC를 조절하는 인자와 상호작용할 수 있는 부위로 추정되고 있다.

특히 이들 PLC 동위 효소중 PLC- γ 의 경우 다른 동위효소와는 달리 src 계통의 암유전자중 하나인 비수용체성 tyrosine kinase의 noncatalytic domain과 유사성이 있는 부분인 SH2 및 SH3를 가지고 있으며^{38,39}, PLC- γ 의 활성화조절은 암유전자생산물인 src와 비슷한 기전에 의해 이루어질 것으로 예상되는 결과를 보여³⁹ PLC- γ 가 세포의 성장에 중요한 역할을 한다는 것을 시사하였다. 최근들어 PLC- γ 1이 epidermal growth factor(EGF)와 platelet-derived growth factor(PDGF), nerve growth factor(NGF) 및 fibroblast growth factor(FGF) 등의 성장인자의 수용체와 직접 결합함이 밝혀졌고, 이들 수용체의 tyrosine kinase 활성화에 의해 PLC 활성이

증가됨이 밝혀졌다^{4,6)}. 또한 사람의 유방암⁷⁾, 대장암조직⁸⁾, familial adenomatous polyposis⁴⁰⁾ 및 hyperproliferative epidermal disease인 건선(psoriasis)⁴¹⁾에서 정상조직보다 PLC- γ 1이 과발현됨이 확인되었으며 이외에 PLC- γ 1은 형질전환과 면역세포인 T세포나 B세포의 활성화에도 관여하며^{42,43)}, DNA 합성과 세포증식에 관여하는 것으로 밝혀져⁴⁴⁾, PLC- γ 1이 세포의 성장과 분화에 중추적 역할을 한다는 사실이 확인되었다.

본 연구에서도 PLC- γ 1이 정상 대조군에 비해 방사선조사후 세포증식이 활발한 소장 점막세포의 재생시 과다 발현됨으로써 PLC- γ 1이 세포의 성장 및 분화에 관여함을 시사해주고 있다. 면역조직화학염색 결과 PLC- γ 1의 발현은 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군에서 가장 강한 염색상을 보였고 그 다음으로 방사선조사 단독군, 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군의 순이었고 5-FU 투여 단독군에서는 미약한 염색상을 보였다. 이러한 PLC- γ 1의 발현 정도는 조직병리학적 소견에서 재생이 활발하게 일어난 순서와 동일한 결과를 보여 주었다. 즉 방사선과 5-FU 병행군 중 5-FU 12시간 지속성 정주 병행군에서는 점막의 정상구조가 유지되면서 배상세포도 관찰되었고 기저부에서는 재생 소낭선도 존재하였으나 5-FU 일시 정주 병행군은 12시간 지속성 정주 병행군에서 보다 점막의 위축이 심하면서 융모의 길이가 더욱 짧아지고, 소낭선의 변성과 더불어 재생이 자주 관찰되었으며, 상피세포의 핵이 균질의 과염색성으로 변하여 있었다. 또한 소낭선에서의 유사분열의 수도 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군에서 가장 많았고 다음으로 방사선단독, 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군의 순으로 조직병리학적 소견상 재생이 활발한 정도와 일치하는 결과를 보였다. 따라서 방사선과 5-FU 병행 치료시 일시 주사보다는 지속적 정주법이 공장점막세포에 대한 손상후 재생면에서 더욱 우수한 것으로 사료되는 결과를 보였다. 면역조직화학염색상 PLC- γ 1의 발현을 부위별로 보았을때 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군과 방사선조사 단독군에서는 재생이 가장 활발한 공장점막의 기저부에서 가장 강한 발현을 나타내어 PLC- γ 1이 공장점막세포의 재생에 관여함을 입증하였으나 특이하게도 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군에서는 PLC- γ 1의 발현이 재생이 일어나는 기저부위에서는

나타나지 않았고 점막의 손상이 심하였던 상층부위에서만 비교적 강한 양성을 보였는데 이러한 이유에 대해서는 앞으로 좀더 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 Immunoblotting 결과에서 PLC- γ 1은 면역조직화학염색 결과에서와 달리 방사선 및 5-FU 지속성 정주 병행군 다음으로 방사선 및 5-FU 일시 정주 병행군, 방사선 단독군의 순서로 발현의 증가를 보였는데 이러한 차이는 방사선 및 5-FU 일시 정주 병행군에서 면역조직화학염색상 점막의 손상으로 상피세포의 탈락을 보이는 상층부위에서 양성의 염색상을 보였기 때문으로 생각된다.

PLC- δ 는 쥐에서 자연적으로 발생한 고혈압이 PLC- δ 에서 촉매성을 지니는 것으로 추정되는 부위인 X 부위내 몇군데의 point mutation에 의해 PLC활성에 변화가 일어나기 때문인 것으로 보고되었고^{45,46)} 최근에 thrombin이 PLC- δ 1에 의해 신호가 전달된다는 보고가 있었으나¹¹⁾ 그 작용기전에 관해 알려진 바가 없다. 본 연구에서 PLC- δ 1의 발현은 방사선 및 5-FU 지속성 정주 병행군과 방사선 및 5-FU 일시 정주 병행군에서만 강한 양성을 보였고 그외 모든 군에서 음성인 소견을 보였다. 즉 방사선과 5-FU를 병행한 군에서만 PLC- δ 1이 높게 발현된 결과를 보였다. 따라서 아직까지 PLC- δ 1의 작용기전이나 방사선과 5-FU의 상호작용기전이 밝혀지지 않은 상태에서 앞으로 방사선과 5-FU 병행요법을 이용한 연구는 PLC- δ 1의 작용기전과 방사선과 5-FU의 상호작용기전을 밝히는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

또한 PLC- β 에 대해서는, 신호전달기전에 관여하는 여러 종류의 GTP 결합단백질(G-protein) 중 Gq 및 G₁₁형의 G-단백질이 PLC- β 를 활성화한다는 것이 알려져, G-단백질이 매개하는 신호전달은 PLC- β 와 관련되어 있다는 사실이 밝혀졌는데^{9,10)} 본 연구에서 PLC- β 1의 발현은 정상 대조군에 비해 모든 실험군에서 차이가 없음을 보여 방사선조사후 소장 점막의 세포재생과정에서 PLC- β 와 관련된 G-protein이 매개하는 신호전달이 관여하지 않음을 알 수 있었다.

ras는 신호전달과정을 조절하는 분자 개폐기의 역할을 하는 guanine nucleotide 결합단백질의 한 종류로서 ras 단백질에 GDP 분자가 결합되어 있으면 비활성상태로 있다가 외부자극이 가해지면 ras는 GDP를 분리하고 GTP와 결합, 활성상태로 변하여 세

포성장을 유도하게 된다. 정상적으로 ras 단백질은 활성 상태로 잠시 머물러 있다가 GTP를 GDP로 가수분해하여 재빨리 비활성상태로 돌아가게 되나 ras가 암유전자로 돌연변이가 일어나면 ras 암유전자단백은 GTP를 가수분해하는 능력을 소실하고 계속 활성 상태로 남아 세포성장이 계속되는 것으로 알려져있다¹²⁾. 본 연구에서 ras 암유전자단백의 발현은 방사선과 5-FU 지속성 정주 병행군에서 가장 강한 염색상을 보였고, 그 다음으로 방사선조사단독군, 방사선과 5-FU 일시 정주 병행군의 순이었고 5-FU 투여 단독군에서는 미약한 염색상을 보였고 정상대조군에서는 음성인 소견을 보여 PLC- γ 1의 발현 정도와 일치하는 소견을 보였다. 이러한 결과는 ras 암유전자단백 역시 방사선조사후 세포재생과정에 관여함을 시사해주고 있다.

결론적으로 방사선 조사후 공장점막 세포의 재생기전에서 PLC- γ 1과 ras 암유전자단백의 발현정도는 방사선과 5-FU를 병행하였을때 5-FU 투여 방법에 따라 차이를 보였다. 즉, 방사선과 5-FU 12시간 지속성 정주 병행시 5-FU를 일시 주사한 경우에 비해 재생이 더욱 활발하여 가장 강양성을 나타내었고 부위별로는 세포의 재생이 활발하게 일어나는 점막의 기저부에서 가장 강한 발현을 보여 방사선 조사후 공장 점막세포의 재생기전에서 PLC- γ 1과 ras 암유전자단백이 관여하는 신호전달기전이 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 아직까지 작용기전이 밝혀지지 않은 PLC- δ 1의 발현이 방사선과 5-FU를 병행한 군에서만 발현된 결과를 보여 앞으로 PLC- δ 1은 방사선과 5-FU의 상호작용기전을 연구하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 또한 PLC- β 1의 발현은 정상 대조군에 비해 모든 실험군에서 차이가 없음을 보여 방사선조사후 소장 점막의 세포재생과정에서 PLC- β 와 관련된 G-단백질이 매개하는 신호전달체계가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

본 연구에서는 방사선과 5-FU 투여후 소장 점막의 재생시 PLC 동위효소와 ras 암유전자단백이 관여함을 규명한 바, 앞으로 소장 점막에 대한 방사선과 5-FU의 상호작용시 PLC 동위효소와 ras 유전자단백의 역할을 좀더 명확하게 밝히기 위해서는 방사선과 5-FU 투여후 급성 손상에서 재생까지 시간 간격에 따른 일련의 과정에서의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

방사선 조사 후 소장 점막세포 재생과정에서 아직까지 밝혀지지 않은 신호전달기전에 PLC 매개 신호전달체계와 ras 암유전자가 관여하는가와 5-FU의 투여 방법에 따른 방사선 감작효과를 비교하기 위하여 흰쥐의 공장 점막세포에서 면역조직화학염색과 immunoblotting을 이용하여 PLC 동위효소와 ras 암유전자단백의 발현상을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

첫째, 방사선 조사후 발생하는 재생기전에 PLC- γ 1 및 ras 암유전자단백이 관여하는 신호전달체계가 중요한 역할을 할 것으로 사료되며 방사선과 5-FU를 병행하였을때 5-FU 투여 방법에 따라 차이가 있는 것으로 밝혀졌다. 즉, 방사선과 5-FU 12시간 지속성 정주 병행시 가장 강한 발현을 보였고 5-FU를 일시 주사하여 병행하는 경우는 방사선 단독 조사시 보다도 발현 정도가 약하였다. 이러한 결과는 조직학적 소견 소장 점막의 재생정도과 일치하였다.

둘째, PLC- δ 1은 방사선과 5-FU를 병행한 군에서만 발현된 결과를 보여 앞으로 방사선과 5-FU의 상호작용기전을 연구하는데 PLC- δ 1이 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

셋째, PLC- β 1의 발현은 정상 대조군에 비해 모든 실험군에서 차이가 없음을 보여 방사선 조사후 소장 점막의 세포재생과정에서 PLC- β 와 관련된 G-단백질이 매개하는 신호전달체계가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Berridge MJ, Irvine RF: Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-321
2. Rana RS, Hokin LE: Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol Rev* 1990;70: 115-164
3. Nishizuka Y: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986;233:305-312
4. Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG, et al: Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and

- EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 1989;57:1109-1122
5. **Nishibe S, Wahl MI, Rhee SG, et al:** Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II in vitro by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1989;264:10335-10338
 6. **Wahl MI, Nishibe S, Suh PG, et al:** Epidermal growth factor stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II independently of receptor internalization and extracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1568-1572
 7. **Arteaga CL, Johnson MD, Todderud G, et al:** Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88:10435-10439
 8. **Noh DY, Lee YH, Kim SS, et al:** Elevated content of PLC- γ 1 in colorectal cancer tissues. *Cancer* 1994;73:36-41
 9. **Wange RL, Smrcka AV, Sternweis PC, et al:** Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [32P]- γ -Azidoanilido GTP in response to vasopression. *J Biol Chem* 1991;266:11409-11412
 10. **Wu D, Lee CH, Rhee SG, et al:** Activation of phospholipase C by the subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells. *J Biol Chem* 1992;267:1811-1817
 11. **Banno Y, Okana Y, Nozawa Y:** Thrombin-mediated phosphoinositide hydrolysis in Chinese Hamster Ovary cells overexpressing phospholipase C- δ 1. *J Biol Chem* 1994;269:15846-15852
 12. **Watson JD, Gilman M, Witkowski J, et al:** Oncogenes and anti-oncogenes. In Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M, eds, *Recombinant DNA*, 2nd ed, New York: Scientific American Books, 1992:349-351
 13. **Lokich JJ, Bothe A, Fine N, et al:** Phase I study of protracted venous infusion of 5-fluorouracil. *Cancer* 1981;48:2565-2568
 14. **Schilsky RL:** Antimetabolites. In Perry MC, eds, *The chemotherapy source book*: Baltimore, Williams and Wilkins, 1992:307
 15. **Chabner BA. Anticancer drugs:** In DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 2nd ed, Philadelphia: JB Lippincott Co, 1993:364-365
 16. **Leshner J, Leshner S:** Effects of single-dose, whole-body,⁶⁰Co gamma irradiation on number of cells in DNA synthesis and mitosis in the mouse duodenal epithelium. *Radiat Res* 1970;43:429-438
 17. **Vietti T, Eggerding F, Valeriote F:** Combined effect X-radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cells. *JNCI* 1971;47:865-870
 18. **Leshner J, Leshner S:** Effects of single-dose partial-body X-irradiation on cell proliferation in the mouse small intestinal epithelium. *Radiat Res* 1974;57:148-157
 19. **Maruyama Y:** Evidence of reinitiation of proliferative activity following alkylation or radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1976;1:903-909
 20. **Ho E, Coffey C, Maruyama Y:** Enhancement of radiation effect on mouse intestinal crypt survival by timing of 5-fluorouracil administration. *Radiology* 1977;125:531-532
 21. **Phillips TL, Fu KK:** The interaction of drug and radiation effects on normal tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1978;4: 59-64
 22. **Phillips TL:** Clinical and experimental alterations in the radiation therapeutic ratio caused by cytotoxic chemotherapy. In Meyn RE, Withers HR, eds, *Radiation biology in cancer research*, New York: Raven Press, 1980:567-588
 23. **von der Maase H, Overgaard J:** Microcolony survival assay for jejunal crypt cells exposed to radiation alone and combined with cancer chemotherapeutic agents-methodological problems. *Int J Radiat Biol* 1980;43:45-56
 24. **von der Maase H:** Interactions of radiation and 5-fluorouracil, cyclophosphamide or methotrexate in intestinal crypts cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984;10:77-86
 25. **Hsu SM, Raine I:** The value of the avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in diagnostic and research pathology. In Delellis RA, ed, *Advances in immunohistochemistry*, New York: Masson, 1984:31
 26. **Heidelberger C, Greisbach L, Montag BJ:** Studies in fluorinated pyrimidines: II. Effects of transplanted tumors in mice. *Cancer Res* 1958;18:305-317
 27. **Verumund H, Hodgett J, Ansfield FJ:** Effects of combined radiation and chemotherapy on transplanted tumors in mice. *Am J Roentgenol* 1961;

- 85:559-567
28. **Lelieveld P, Smink T, van Putten L:** Experimental studies on the combination of radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1978; 4:37-41
 29. **Tannock IF:** Toxicity of 5-fluorouracil for aerobic and hypoxic cells in two murine tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987;19: 53-56
 30. **Byfield JE, Frankel SS, Hornback CL, et al:** Phase I and pharmacological study of 72 hour infused and hyperfractionated cyclic radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985;11:791-800
 31. **Hallahan DE, Virudachalam S, Sherman ML, et al:** Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res* 1991;51:4565-4569
 32. **Hallahan DE, Virudachalam S, Schwartz JL, et al:** Inhibition of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation. *Radiat Res* 1992; 129:345-350
 33. **Chae HP, Jarvis LJ, Uckun FM:** Role of tyrosine phosphorylation in radiation induced activation of c-jun protooncogene in human lymphohematopoietic precursor cells. *Cancer Res* 1993;53:447-451
 34. **Boothman DA, Bouvard I, Hughes EN:** Identification and characterization of X-ray-induced proteins in human cells. *Cancer Res* 1989;49:2871-2878
 35. **Kasid U, Pfeifer A, Brennan T, et al:** Effect of antisense c-raf-1 on tumorigenicity and radiation sensitivity of a human squamous carcinoma. *Science* 1989;243:1354-1356
 36. **Withers HR, Elkind MM:** Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol* 1970;17: 261-267
 37. **Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, et al:** Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C, *Science*, 1989;244:546-550
 38. **Stahl ML, Ferenz CR, Kelleher KL, et al:** Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature* 1988;332:269-272
 39. **Suh PG, Ryu SH, Moon KH, et al:** Inositol phospholipid-specific phospholipase C: Complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase related oncogene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;55:5419-5423
 40. **Park JG, Lee YH, Kim SS, et al:** Overexpression of phospholipase C- γ 1 in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1994;54:2240-2244
 41. **Nanney LB, Gates RE, Todderud G, et al:** Altered distribution of phospholipase C- γ 1 in benign hyperproliferative epidermal disease. *Cell Growth & Diff* 1992;3:233-239
 42. **Metzer H:** Fc receptors and membrane immunoglobulin. *Curr Opin Immunol* 1991;3:40-46
 43. **Secrist JP, Karnitz L, Abraham RT:** T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *J Biol Chem* 1991;266:12135-12139
 44. **Smith MR, Ryu SH, Suh PG, et al:** S-phase induction and transformation of quiescent NIH 3T3 cells by microinjection of phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3659-3663
 45. **Yagisawa H, Emori Y, Nojima H:** Phospholipase C genes display restriction fragment length polymorphisms between the genomes of normotensive and hypertensive rats. *J Hypertension* 1991; 9:303-307
 46. **Kato H, Fukami K, Shibasaki F, et al:** Enhancement of phospholipase C- δ 1 activity in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem* 1992;267:6483-6487