

마우스의 대뇌조직에서 방사선에 의한 아포토시스와 세포주기의 조절

국립의료원 치료방사선과*, 연세대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 연세암센터†

오원용* · 송미희* · 정은지† · 성진실† · 서창욱†

목적 : 마우스 대뇌조직에 방사선이 조사되었을 경우 아포토시스와 세포주기의 조절작용에 어떤 영향을 미치는지를 연구하고자 하였다

대상 및 방법 : 8주간 성숙된 C57B1/6J 마우스의 전뇌에 코발트 방사선조사기로 25 Gy의 방사선을 단일 조사하였다. 방사선조사후 1, 2, 4, 8, 24시간 간격으로 마우스를 경추 탈구사시킨 후 뇌조직을 채취하였다. 채취한 뇌조직을 TUNEL 분석법에 의하여 아포토시스 유도 수준을 평가하였으며 Western blotting법을 이용하여 유전자 산물인 p53, Bcl-2, Bax 그리고 세포주기 조절인자인 cyclin B1, D1, E, cdk2, cdk4, p34^{cdc2}를 분석하였다. 세포주기의 변화는 유세포분석법에 의하여 분석되었다.

결과 : 아포토시스는 방사선조사후 8시간에서 최고치를 보였고 아포토시스 지수는 24.0 ± 0.25 ($p < 0.05$)였다. 세포주기에서 조절인자의 변화는 cyclin D1를 제외하고는 특이하지 않았다.

결론 : 마우스의 전뇌에 방사선을 조사한 결과 아포토시스는 대뇌의 상의하(subependyma)에서 주로 일어났으며 세포주기의 조절인자에는 영향을 미치지 않는 것으로 판명되었다.

핵심용어 : 마우스 대뇌 방사선조사, 아포토시스 유도, 세포주기의 조절

서 론

악성 뇌종양에서 방사선치료는 수술후 보조적인 치료법으로서 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다.¹⁾ 그러나 조사할 수 있는 방사선량이 종양 주변의 정상적인 조직의 내성의 한계 때문에 제한적일 수밖에 없고 또한 치료량의 방사선을 조사했을 경우 상당한 후유증을 일으킨다는 것이 문제이다.²⁾ 그러므로 정상적인 뇌조직의 후유증을 감소시키면서 방사선 치료의 효과를 보다 향상시키기 위해서는 방사선으로 유발되는 뇌손상에 관한 정확한 병리기전이 밝혀져야 가능하리라 본다.³⁾

최근 정상적인 뇌조직의 손상은 방사선으로 인한 아포토시스(apoptosis, programmed cell death)와 깊은 연관성을 가지고 있다고 생각하여 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.⁴⁻⁷⁾ Hopewell 등의 실험연구에 의해서 세포분열이 가능한 생후 중추신경계에 방사선을 조사한 결과 펓지교세포(oligodendroglia)와 혈관내벽세포(vascular endothelial cells)가 방사선

으로 인한 손상의 표적세포로 확인되었다.⁸⁾ 특히 뇌의 상의하세포(cells of subependymal region in the brain)가 방사선으로 인하여 상실됨으로써 뇌조직의 손상이 유발되는 것으로 알려지고 있다.^{9, 10)}

이에 본 연구자는 방사선에 민감한 표현형인 마우스 C57B1/6J를 실험모델로 하여 방사선 25 Gy를 전신에 조사한 후 일정한 시간경과(1, 2, 4, 8, 24시간) 후 뇌조직에서의 아포토시스 현상과 아포토시스 과정 속에서 어떤 유전인자들이 영향을 미치는지 그리고 세포주기에서 조절인자들과의 상관성은 어떠한지를 비교분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 방사선조사

실험동물인 마우스는 연세대학교 실험동물부에서 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급받은 C57B1/6J 마우스를 사용하였다. 이 마우스들은 근교계로서 6~9주의 웅성 마우스를 실험대상으로 하였고 사육상자당 5마리씩 사육하였다. 방사선조사는 cobalt-60 방사선조사기(선량률 0.76 Gy/min)를 이용하여 25 Gy의 방사선을 전신에 단일조사하였다. 조사후 1~24시간 까지 일정 시간 간격으로 경추 탈구사시킨 후 뇌조직을 채취하였다.

이 논문은 2001년 1월 17일 접수하여 2001년 5월 21일 채택되었음.

책임 저자 : 오원용, 국립의료원 치료방사선과
Tel : 02)2260-7331, Fax : 02)2268-6882
E-mail : nmcro@chollian.net

2. 아포토시스의 평가방법

1) DNA fragmentation assay

채취한 뇌조직 검체를 페트리 접시에 담고 차가운 PBS (phosphate buffer solution) 3 ml을 넣은 후 잘게 분쇄한 뒤 4°C, 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 버리고 TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 0.2% triton X-100] 500 μ l을 첨가하여 얼음에서 15분간 용해시킨 후 4°C, 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새 시험관에 옮기고 proteinase K (20 mg/ml) 2.5 μ l씩을 넣고 50°C 수조에서 5시간동안 배양하였다. 상층의 용해질을 2회 phenol/chloroform으로 추출한 후 ethanol로 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 TE buffer (10 mM Tris-cl, pH8.0), 1 mM EDTA, pH 8.0] 200 μ l으로 처리한 다음 0.4% SDS-TE 50 μ l을 넣고 37°C에서 RNase (1 mg/ml) 20 μ l으로 1시간 처리함으로써 DNA를 분절시켰다. 추출된 DNA에 6X loading buffer (50% Glycerol, 15 mM EDTA, 2% SDS, 0.05% Bromophenol Blue)를 첨가한 후 ethidium bromide을 넣은 2% agarose gel (1.6 g/80 ml D.W.: microwave 2 min)에 부착시키고 40 volt 전장하에 4시간 30분동안 전기영동시켰다.

2) TUNEL assay

채취한 조직의 일부는 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 μ m 절편을 만든 후 Apop-Tag kit (Oncor Inc, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 apoptotic body를 염색하였다. 조직절편을 항온기에 56~58°C로 가온시킨 후 Xylen과 알코올에 처리하여 파라핀을 제거하고 충분히 수세하였다. 3% H₂O₂에서 10분간 처리하여 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase) 활성을 억제시킨 후 proteinase K를 가하여 실온에서 15분간 두었다. TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)가 잘 labeling 되게 하기 위해 equilibration buffer를 가하여 10분 정도 둔 후에 30 U/ml의 TdT enzyme을 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 anti-digoxigenin peroxidase에 노출시킨 후 상온에 30분간 두었다. PBS로 수세한 후 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma Chemical Co.)을 처리하여 2~10분간의 발색반응을 거쳐 methyl green (0.5% in 0.1M sodium citrate, pH 4.0)으로 대조염색한 후 봉입하여 광학현미경 하에서 진한 갈색으로 염색된 apoptotic body를 관찰하여 수준을 평가하였다. 아포토시스의 평가는 $\times 400$ 배 광학현미경하에서 시행하였으며, 수준의 비교는 다음 공식을 이용하여 아포토시스 지수(AD)를 구하였다. 아포토시스 지수의 차이는 t-검정으로 그 유의성을 검정하였다.

$$\text{Apoptotic Index (\%)} = \frac{\text{number of apoptotic body}}{1000 \text{ nuclei}} \times 100$$

3) Western blotting

채취한 조직은 Western blotting을 이용하여 아포토시스와 관련된 유전물질의 발현을 분석하였다. 위에서 37°C 실온에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액인 단백질 용액을 5% 탈지유와 0.1% tween-20를 포함하는 PBS에 2시간 동안 처리하고 나서, 분석하고자 하는 각 유전자에 대한 1차 항체로 2시간 처리하였다. 다시 PBS로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 항마우스 또는 항토끼, 항IgG 항체(Santa Cruze Biotechnology Inc., Santa Cruze, CA, USA)로 1시간 처리한 후 ECL Western Blotting Detection System (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-선 필름상에 나타나는 band의 농담으로 유전물질의 발현을 조사하였다. 발현 수준의 평가는 densitometry (CSC chemi-luminescence detection module, Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 분석하였다. 사용된 항체는 p53 (Ab7, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-2 (Ab7, Oncogene Science), Bax (p-19, Santa Cruz) 등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다.

4) Flow Cytometry

신선한 조직검체에 PBS 3 ml를 넣고 가위와 면도날을 이용하여 잘게 분쇄한 후 100 μ m 크기의 구멍을 갖는 나일론 망을 사용하여 세포부유액을 여과시켜 단일 세포 상태가 되게 한다. Hemocytometry를 이용하여 여과한 부유액의 세포수를 1~2.5 $\times 10^6$ /ml로 맞춘 후, 1800 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 이어서 70% ethanol 2 ml을 넣고 30분간 얼음위에 둔 후 다시 PBS 30 ml을 넣고 세척하였다. 침전물을 1 ml PBS용액에 부유시킨 후 4°C 실온에서 1시간 동안 두었다. 이후 0.1% PI (propidium iodide) 50 μ g/ml, RNase용액 50 μ g/ml, EDTA (pH 7.4) 0.1 M, Triton x-100를 첨가하여 염색하였다. 염색한 후 FACScan (Beckton-Dickinson, USA) 유세포 분석을 이용하여 DNA를 분석하였다.

결 과

1. DNA Fragmentation (Fig. 1)

25 Gy를 전신조사한 C3H/HeJ 마우스를 일정시간(1, 2, 4, 8, 24시간)마다 경추탈구사하여 채취한 뇌조직을 DNA 분리 방법으로 분절된 DNA를 얻었다. 방사선조사 후 분절된 DNA를 agarose gel 전기영동법을 이용하여 DNA band 유무를 자동방사선촬영법(autoradiography)으로 관찰하였다. 관찰 결과 방사선조사 후 8시간이 경과한 검사물에서만 DNA 분

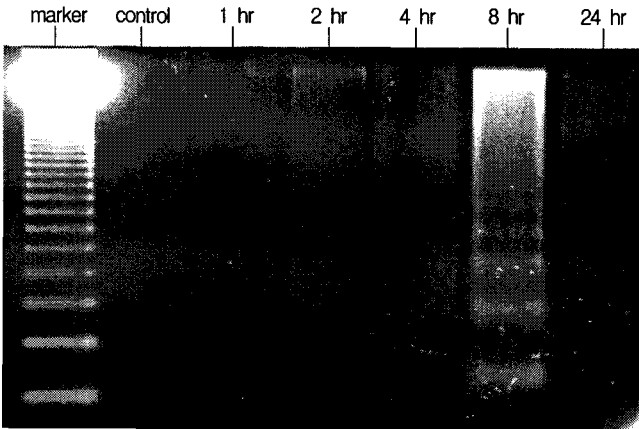


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of DNA from mouse brain tissue (cerebrum). Mouse brain of C57B1/6J were irradiated 25 Gy with ⁶⁰Co γ -rays.

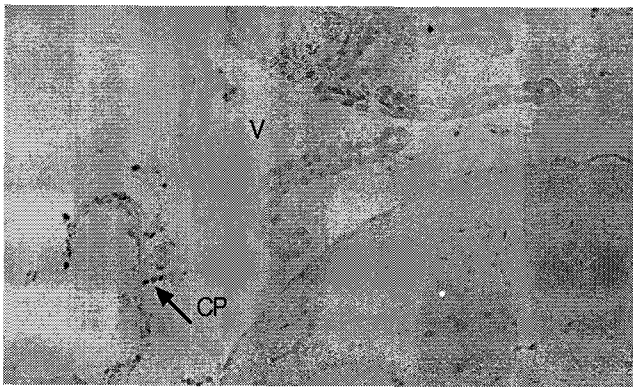


Fig. 2A. Photomicrograph of dark-staining nuclei, apoptosis (arrow) show in the subependymal region of the ventricle of normal mouse brain tissue (control, $\times 200$). V represents lateral ventricle and CP is choroid plexus.

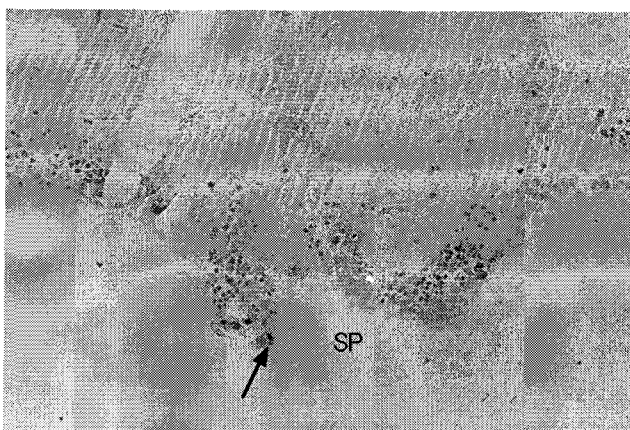


Fig. 2B. Photomicrograph of the subependyma 8 hour after irradiation with 25 Gy, showing massive apoptotic cells with TUNEL-positive nuclei ($\times 200$).

해의 특징 소견인 DNA ladder를 보였다.

2. 방사선에 의한 아포토시스의 유도(Fig. 2, Table 1)

채취한 뇌조직을 Apop-Tag kit를 이용한 면역화학적 방법으로 염색한 후 진한 갈색으로 염색되는 apoptotic body를 400배 광학 현미경하에서 3회 수준을 평가하여 평균하였다. 현미경 하에서 관찰한 결과 1, 2, 4시간에서는 아포토시스의 수준이 변화가 없다가 조사 8시간이 경과한 경우에서만 급격하게 아포토시스가 증가하는 현상을 보였다(Fig. 2A, 2B). 이 실험에서 뇌조직에서 유도되는 아포토시스의 양적인 수준 (apoptotic index)을 분석하여 본 결과, 표본에서 $2.5 \pm 0.20\%$, 1시간 $3.3 \pm 0.46\%$, 2시간 $2.8 \pm 0.27\%$, 4시간 $3.3 \pm 0.25\%$, 8시간 $24.0 \pm 2.38\%$, 24시간 $3.5 \pm 0.56\%$ ($p < 0.05$)였다(Table 1, Fig. 3).

2. 아포토시스 조절물질의 변화(Fig. 4)

p53, Bcl-2, Bax, Bcl-x 등 유전자 산물들의 발현을 western blotting으로 검사하고 발현 수준의 비교평가는 tubulin을 기준으로 densitometry를 이용하여 분석하였다(Fig. 4). 뇌조직에서 이러한 유전자 물질의 발현은 시간대에 따른 변화는 뚜렷하

Table 1. Changes in the Level of Radiation-induced Apoptosis

	Apoptotic index (%)
Control	2.5 ± 0.20
1hr	3.3 ± 0.46
2hr	2.8 ± 0.27
4hr	3.3 ± 0.25
8hr	24.0 ± 2.38
24hr	3.5 ± 0.56

Apoptotic index : apoptotic body/1,000 cells $\times 100\%$

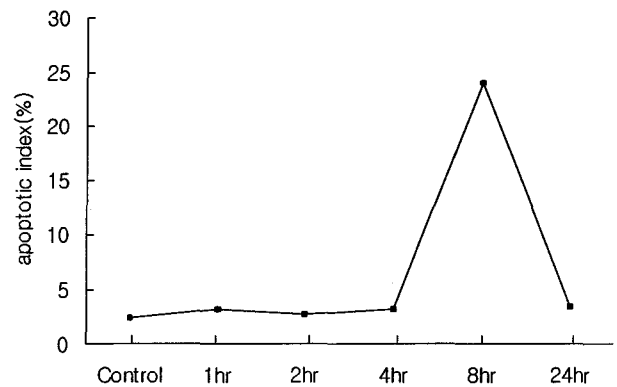


Fig. 3. Apoptotic indices for cells of the subependyma as a function of time after 25 Gy irradiation. There is apparent peak increase of apoptosis at 8 hours after irradiation.

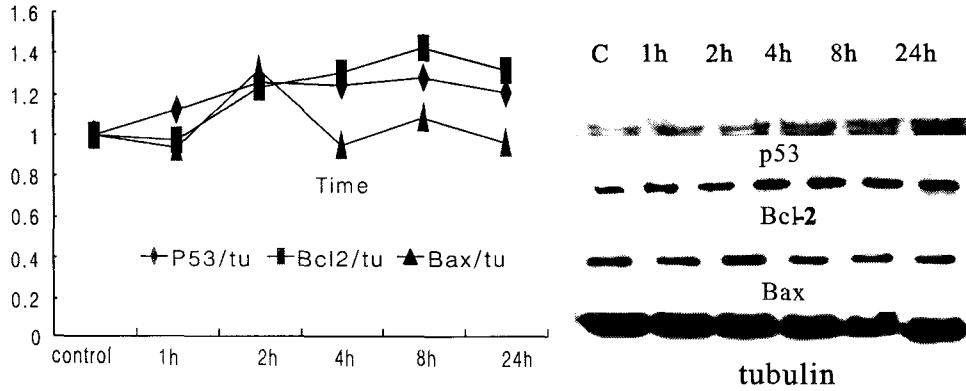


Fig. 4. Western blotting analysis for p53, Bax, and bcl-2 in mouse brain of C57B1/6j. Expression of apoptosis-regulating molecules by a function of time after irradiation are plotted.

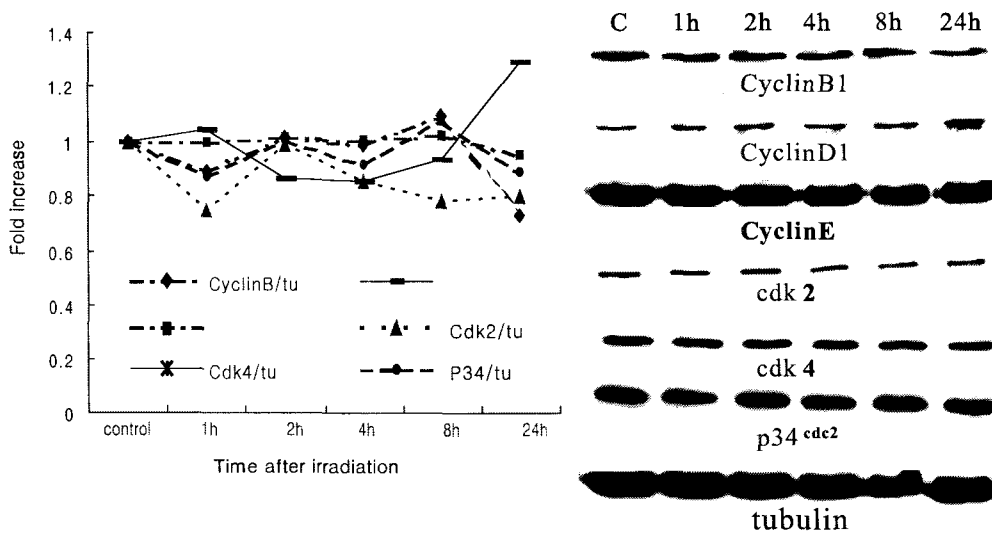


Fig. 5. Western blotting analysis for cyclin B1, D1, E, cdk2, cdk4, p34^{cdc2} in mouse brain C57B1/6j. Expression of cell cycle regulating molecules by a function of time after irradiation are plotted.

지 않았으며 더구나 시간대에 따른 변화의 굴곡도 심하였다. Bcl-2/tubulin는 1시간대에는 거의 변화가 없다가 2시간대에 증가하기 시작하다가 8시간대에 최고치(1.5배)를 보인후 감소 하였으며, 반면에 p53/tubulin는 2시간대(1.2배)까지 일정하게 증가를 보이다가 이후부터는 그 수준에서 거의 변화가 없이 유지하였다. 또한 Bax/tubulin는 2시간대(1.3배)에 최고치를 보 이다가 4시간대에 원상으로 회복되었다가 8시간대에 다시 약간의 상승을 보였으며 Bcl-x는 발현되지 않았다(Fig. 4).

3. 세포주기의 변화(Western blotting) (Fig. 5)

Western blot에 의한 방법으로 세포주기에서 조절인자로 관여하는 여러 유전인자들과의 상관관계를 분석하여 보았다. G0-G1 phase에서 조절인자인 cyclin D1은 오히려 방사선 조

사후 8~24시간대에 약간의 증가를 보였다. 반면에 G1-S phase에서 조절작용을 하는 cyclin E는 특별한 변화를 보이지 않았으며 G2-M phase에서 조절작용을 하는 cyclin B1은 약간의 감소를 보였다. 또한 cyclin D, cyclin E, cyclin A 등에 관련된 cdk4, cdc2 등도 변화를 보이지 않았다(Fig. 5).

4. 세포주기에서 조절분자의 변화(Flow cytometry)(Fig. 6)

방사선조사 후 세포주기의 분포율을 유세포분석을 통하여 분석하여 본 결과, G0-G1 phase cell의 비율은 거의 98%의 비율로서 방사선조사 후 1~8시간까지는 거의 변화를 보이지 않다가 24시간이 경과한 후에 약간 감소하였다. G2-M와 S기의 세포는 전체 세포중 2%이하로 방사선조사 후 시간이 경과해도 변화를 보이지 않고 일정했다.

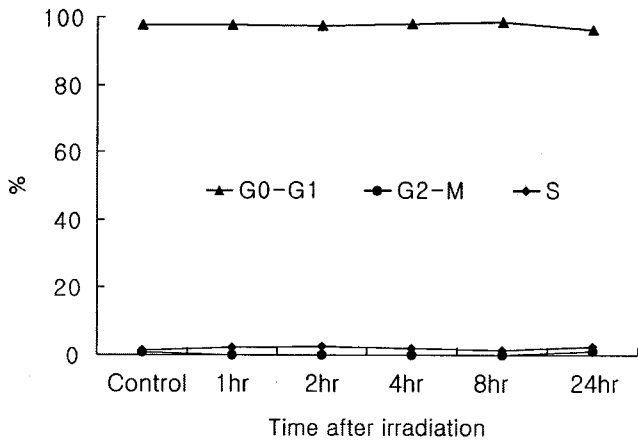


Fig. 6. Flow cytometry for the analysis of cell fraction in the cell cycle by a function of time after irradiation are plotted.

고안 및 결론

임상에서 환자의 중추신경계와 척수에 방사선을 조사하게 되면 추후 방사선으로 인한 부작용을 경험하게 되는데, 이러한 부작용은 바로 방사선에 의한 정상 조직세포의 아포토시스의 결과로 인식되고 있다.^{5,6} 이러한 사실은 실험동물에서 중추신경계와 척수에 방사선을 조사하여 아포토시스(apoptosis; programmed cell death)을 유발시킴으로서 증명되었다.⁷⁻¹⁰

방사선을 조사하여 아포토시스를 유도하고 측정하는 방법으로는 형태학적인 방법(morphological method)과 면역 조직화학적 방법(immunohistochemical method)으로 대별할 수 있다.^{11,12} 전자현미경을 통하여 핵 및 염색질의 변화를 관찰하거나 apoptotic body를 찾아내는 형태학적인 방법이 가장 기본적인 방법이지만 정량분석이 어렵고 임상적으로도 적용하기가 곤란하다는 단점을 가지고 있다. 반면 세포의 DNA를 추출하여 전기영동을 통해 분해된 DNA를 측정하는 방법 역시 정량분석이 불가능하며 이종성(heterogeneous cell population)에서는 적용하기 어렵다는 결점을 가지고 있다. 그러나 최근 개발되어 팔목할 만한 성과를 얻고 있는 면역조직화학적 방법(Immunohistochemical method, TUNEL assay)은 분해된 DNA의 3' OH-terminal에 TDT (terminal deoxynucleotidyl transferase)를 이용하여 biotinylated dUTP를 부착시키고 다시 fluoresceinated avidine을 부착시켜 측정하는 방법으로서 감수성(sensitivity)이나 특이성(specificity)에서 좋은 방법으로 평가받고 있다.¹³

이에 연구자는 방사선을 조사한 마우스의 뇌조직에서 아포토시스를 확인하고자 DNA추출분석법(DNA fragmentation assay)과 TUNEL법을 이용하였으며, 실험동물은 6주 성숙 웅

성마우스(C3H/HeJ) 5마리씩을 실험대상으로 하여 1회 25 Gy를 전신조사한 후 1, 2, 4, 8, 24시간이 경과한 다음 경추탈구 사시커 대뇌조직을 채취하였다. 먼저 DNA분석법을 이용하여 DNA를 추출하였고 이 추출물을 agarose gel electrophoresis (전기영동법)과 autoradiography (자동방사선촬영법)를 이용하여 DNA band를 관찰하였다. 관찰결과 방사선조사 후 8시간이 경과한 검사물에서 DNA분해의 특징소견인 DNA ladder를 보였다(Fig. 1). 아포토시스를 관찰하는데 있어서 이 방법은 특이성은 있으나 감수성이 없으므로 보다 특이성과 감수성이 높은 방법으로 면역조직화학분석법인 TUNEL assay를 이용하여 방사선조사 후 시간경과에 따른 아포토시스의 수준을 평가하였다. 광학현미경($\times 200$)으로 관찰한 결과 아포토시스는 대뇌조직의 상의하(subependyma)에서 주로 일어났으며 (Fig. 2A, 2B), 방사선조사한 후 시간 경과에 따른 아포토시스의 수치는 1~4시간까지는 변화가 없다가 4시간 이후부터 급격히 상승하여 8시간 후에 최고치($24.0 \pm 2.38\%$)에 이르렀으며, 이후 다시 감소하기 시작하여 24시간이 경과한 후에는 원상태로 회복되었다(Fig. 3).

Mattia Bellinzona et al¹⁴의 보고에 의하면 성숙 쥐(2~3 months, female Fischer 344 rats)에 방사선 5 Gy 또는 30 Gy를 전뇌에 조사한 결과 상의하에서 주로 아포토시스를 관찰할 수 있었으며 방사선조사 후 6시간이 경과한 검사물에서 아포토시스가 최고치($13.1 \pm 2.9\%$ and $17.1 \pm 2.2\%$ at 6 h after 5Gy and 30Gy, respectively)를 보였다. 또한 Chie Shinohara 등¹⁵의 보고에서도 상의하와 뇌량(corpus callosum)에서 주로 아포토시스를 관찰할 수 있었으며 1회 조사선량 1.4 Gy 또는 15 Gy를 조사한 결과 3시간 이후부터 증가를 보이다가 6시간이 경과하게 되면 뇌량에서 최고치(2.3%, 3.8%) 그리고 상의하에서(19%, 27%)를 보였다. 또한 이 연구에서 방사선에 민감한 반응을 보이는 상의하와 뇌량에 분할조사 선량 2~30 Gy와 아포토시스 지수와 상의하의 상관관계를 분석하여 보았다. 분석결과 분할 조사선량 2 Gy에서 아포토시스 지수가 최고치에 이른 후에는 분할선량의 증가에도 불구하고 고평부를 보였다. 분할조사의 횟수에 있어서도 3회부터는 아포토시스 지수가 고평부를 보였다. 세포수에 있어서도 분할조사 1~4 회까지는 계속적으로 감소하다가 5회부터는 고평부를 보이는 것으로 보아 아포토시스 지수와 방사선조사선량 및 분할조사 횟수와는 상관성이 적은 것으로 보인다.

아포토시스 과정에는 여러 조절인자가 작용하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 이에 연구자는 아포토시스 과정에서 어떤 인자들이 관여하고 있는지 알아보려고 Western blotting을 이용하여 아포토시스와 세포주기에서 조절인자로 작용하는

유전자 발현물질의 상관성을 분석하였다. 아포토시스로 유도되는 과정에는 유도기, 효과기, 분해기와 같은 세 단계를 거치며 이 과정에서 여러 유전물질들이 관여하며 조절작용을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 특히 대표적인 종양억제 유전자로 알려져 있는 p53은 방사선, 항암제 등의 자극을 받으면 유도기에서 발현되어 아포토시스를 유발시키며 Bcl-2는 반대로 효과기에서 억제제로 작용하는 것으로 알려져 있다.^{17, 18)}

연구자의 실험결과 뇌조직에서 p53, Bcl-2, Bax와 같은 유전자 물질의 발현은 방사선치료 후 시간에 따른 변화는 특이하지 않았으며 더구나 시간에 따른 변화의 굴곡도 심하였다. 아포토시스를 일으키는데 가장 큰 역할을 하는 p53은 2시간(1.2배)까지 일정하게 증가를 보이다가 이후부터는 그 수준에서 거의 변화가 없었으며, Bax는 2시간(1.3배)에 최고치를 보이다가 4시간 후에 원상으로 회복되었다가 8시간 후에 다시 약간의 상승을 보였다(Fig. 4). 반면에 Bcl-2는 방사선조사 후 1시간에는 거의 변화가 없다가 2시간에는 증가하기 시작하다가 8시간에 최고치(1.5배)를 보인 후 감소하였다. Seong 등¹⁹⁾의 보고에 의하면 마우스의 흉선 조직에서는 방사선 조사 후 1~2시간대에 먼저 p53이 증가하고 이어서 Bcl-2와 Bax가 영향을 받는데, 특히 Bax의 증가가 아포토시스의 최고치와 상응된다고 한다. 반면에 연구자의 뇌조직에서는 p53가 점진적으로 증가하는 동시에 Bax가 초기부터 증가하여 아포토시스를 유도하였지만 Bcl-2는 조금 뒤늦게 활성화되어 아포토시스 과정에서 억제제로 작용하였을 것으로 유추해 볼 수 있다.

세포주기에서 여러 유전물질이 조절인자로 관여하는 것으로 알려져 있는데²⁰⁾ Western blot 방법으로 이들과의 상관관계를 분석하여 보았으며(Fig. 5) 세포주기에서 각 주기세포들의 분율(Fig. 6)을 비교하여 보았다. 세포주기의 G0-G1, early G1-S check point에서 조절인자로 작용하는 cyclin D1은 방사선조사 후 8~24시간에 약간의 증가를 보였다(1.3배). Cyclin D1의 증가는 아마도 방사선조사 후 8시간이 경과한 이후에 세포가 다음 주기로 유입(transition)되어 나타나는 것으로 생각된다. 반면에 late G1-S check point에서 조절작용을 하는 cyclin E는 특이한 변화를 보이지 않았으며 G2-M check point에서 조절작용을 하는 cyclin B1은 약간의 감소를 보였다. 또한 cyclin D, cyclin E, cyclin A 등의 dependent kinase인 cdk2, cdk4, cdc2 등도 변화를 보이지 않았다(Fig. 5). 또한 방사선 조사 후 시간 경과에 따른 각 주기세포들의 분율(Fig. 6)을 분석하여 본 결과 8시간 이후에 약간의 변화를 보였지만 특이하지는 않았다. 이러한 결과로 볼 때 마우스의 뇌조직에서 방사선조사 후 시간 경과에 따른 세포주기의 조절인자

와 세포분율의 변화는 특이하지 않은 것으로 관찰된다.

결론적으로 실험동물 마우스 뇌에 방사선을 조사한 후 대뇌조직을 채취하여 관찰한 결과 아포토시스는 주로 뇌실의 상의하에서 보였으며 아포토시스 과정과 세포주기에서 조절작용을 하는 유전인자와 세포분율의 변화에는 특이한 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 앞으로 이 연구를 근간으로 하여 뇌의 각 부위 조직에서 아포토시스의 변화, 1회 조사시와 분할조사시 선량에 따른 정상조직과 종양조직 간의 아포토시스 지수의 변화 그리고 아포토시스 유도과정에서 조절작용을 하고 있는 여러 다른 유전인자들에 대해서도 더 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Sheline GE. Radiation therapy of brain tumors. *Cancer* 1979; 39:873-881
2. Walker MD, Strike TA, Sheline GE. An analysis of iso-effect relationships in the radiotherapy of malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5:1725-1731
3. Sheline GE, Wara WM, Smith V. Therapeutic irradiation and brain injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980;6:1215-1228
4. Fritsch P, Richard-Le NH, Denis S, et al. Kinetics of radiation induced apoptosis in the cerebellum of 14-day old rats after acute or during continuous exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;66:111-117
5. Hubbard BM, Hopewell JW. Quantitative changes in cellularity of the rat subependymal plate after X-irradiation. *Cell Tissue Kinet* 1980;13:403-413
6. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:781-796
7. Migheli A, Cavalla P, Marino S, et al. A study of apoptosis in normal and pathologic nerve after in situ endlabeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994;53:606-616
8. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-15
9. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:781-796
10. Hopewell JW. Late radiation damage to the central nervous system: a radiobiological interpretation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1979;5:329-343
11. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493
12. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by insitu terminal

- deoxynucleotidyl transferase and nick translation assay. *Cancer Res* 1993;53:1945
13. Chie S, Glenn TG, Kathleen R, et al. Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of x-rays. *Cancer Res* 1997;57:2694-2702
 14. Mattia B, Glenn TG, Chie S, et al. Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. *Neuroscience Letters* 1996;208:163-166
 15. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th ed. 1997;96-99
 16. Ian FT, Richard PH. *The basic science of oncology*, 3rd ed. 1998;134-166
 17. Chiou S, Rao L, White E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Bio* 1994;14:2556.
 18. Wang H, Miyashita T, Takayama S, et al. Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase. *Oncogene* 1994;9:2751
 19. Seung JS, Kim SH, Lee WJ. Strain-specific differences in radiation induced apoptosis in murine tissues. *J Kor Cancer Assoc* 1998;30:1259-1268
 20. Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th ed. 1997;121-133

Abstract

Regulation of Apoptosis and Cell Cycle in Irradiated Mouse Brain

Won Yong Oh, M.D.*, Mi Hee Song, M.D.*, Eun Ji Chung, M.D.†, Jin Sil Seong, M.D.† and Chang Ok Suh, M.D.†

*Department of Therapeutic Radiology, National Medical Center and †Department of Radiation Oncology, Yonsei University, College of Medicine, Yonsei Cancer Center, Seoul, Korea

Purpose : To investigate the regulation of apoptosis and cell cycle in mouse brain irradiation.

Materials and Methods : 8-week old male mice, C57B1/6J were given whole body γ -radiation with a single dose of 25 Gy using Cobalt 60 irradiator. At different times 1, 2, 4, 8 and 24hr after irradiation, mice were killed and brain tissues were collected. Apoptotic cells were scored by TUNEL assay. Expression of p53, Bcl-2, and Bax and cell cycle regulating molecules; cyclins B1, D1, E and cdk2, cdk4, p34^{cdk2} were analysed by Western blotting. Cell cycle was analysed by Flow cytometry.

Results : The peak of radiation induced apoptosis is shown at 8 hour after radiation. With a single 25 Gy irradiation, the peak of apoptotic index in C57B1/6J is 24.0 ± 0.25 ($p < 0.05$) at 8 hour after radiation. Radiation upregulated the expression of p53/tubulin, Bax/tubulin, and Bcl-2/tubulin with 1.3, 1.1 and 1.45 fold increase, respectively were shown at the peak level at 8 hour after radiation. The levels of cell cycle regulating molecules after radiation are not changed significantly except cyclin D1 with 1.3 fold increase. Fractions of G₀-G₁, G₂-M and S phase in the cell cycle does not specific changes by time.

Conclusions : In mouse brain tissue, radiation induced apoptosis is particularly shown in a specific area, subependyma. These results and lack of radiation induced changes in cell cycle offer better understanding of radiation response of normal brain tissue.

Key Words : Mouse brain(cerebrum) irradiation, Apoptosis, Cell cycle