

방사선을 조사한 마우스의 소장 음와세포에서 DNA 수복을 위한 PCNA와 p21의 발현 양상

홍수지 · 황인선 · 안미정 · 신태균 · 주홍구 · 박현정 · 지영훈

제주대학교 농업생명과학대학 수의학과

방사선응용과학연구소

(게재승인: 2005년 11월 22)

Coexpression of PCNA and p21 for DNA repair in small intestinal crypt cells of mouse with ^{60}Co γ -rays irradiation

Suji Hong, Insun Hwang, Meejung Ahn, Taekyun Shin, Hong-gu Joo, HyunJeong Park, and Youngheun Jee

Department of Veterinary Medicine, College of Applied Life Sciences and Applied Radiological Science

Research Institute, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

(Accepted: November 22, 2005)

Abstract : The irradiation of radioactive γ -ray induces apoptosis of radiosensitive organs for homeostasis. In this study, we investigated the repair mechanisms for homeostasis in the small intestine after cell damage by ^{60}Co γ -ray irradiation. The apoptosis was most frequently observed in the crypt cells of the small intestine after four and six hours by radioactive γ -ray irradiation, and the frequency of apoptosis was proportional to the amount of irradiation. Also, the number of apoptotic cells was coincident with expression pattern of p53. Interestingly, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) which is engaged in DNA replication and repair was expressed in apoptotic cells of small intestinal crypts. Also, it was observed that cell-cycle regulator p21 which is known to induce cell-cycle arrest is co-expressed in the same apoptotic cells of irradiated small intestinal crypt cells. These findings suggest that the co-expression of PCNA and p21 proteins, which may lead to resistance to DNA damage through cell-cycle arrest is closely associated with repair of damaged gastrointestinal cells after γ -ray irradiation.

Key words : apoptosis, ^{60}Co γ -ray, small intestine, crypt cells, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), p21

서 론

방사선 조사는 세포에 DNA 손상을 유발하여 결국 세포사에 이르게 한다. 세포사에는 서로 다른 기전을 가지는 apoptosis와 necrosis가 있다 [8]. Apoptosis와 necrosis는 유전학적, 생화학적, 형태학적으로 다른 형태의 세포사로서 necrosis는 조직에서의 염증과 관련이 있는 반면에 apoptosis는 활성화된 세포사의 과정에서 일어나는 생리학적인 현상이며 정상 조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다 [16]. 이처럼 방사선에 의한 DNA 손상 후에

세포는 apoptosis를 유도하고, apoptosis를 통해 손상된 세포를 제거함으로써 방사선 민감 표적 장기의 항상성을 유지하려고 한다.

방사선 민감 장기에서 항상성을 유지하기 위하여 진행되는 apoptosis에는 많은 인자들이 관여하고 있으며 특히 p53의 관련성에 대해서는 많은 보고가 있다. 특히 소장 음와세포 등의 *in vivo*계와 조혈세포, human lymphoblastoid cell line 등 다양한 세포주의 *in vivo*계에서 apoptosis 유도에 p53이 요구된다는 사실이 보고되었다 [4, 5, 22]. 그리고 p53이 결여된 마우스에서 방사선 조

This study was supported by a grant from Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF), and Ministry of Science and Technology (MOST), Korean government.

*Corresponding author: Youngheun Jee

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Life Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea
[Tel: +82-64-754-3374, Fax: +82-64-756-3354, E-mail: yhj@cheju.ac.kr]

사시 소장 음와세포와 type A spermatogonia에서 apoptosis가 발생하지 않음이 보고되었다 [3, 12]. 이와 같이 DNA 손상을 받은 세포는 p53의 조절에 의해 유도된 apoptosis를 통해 유전적 안정성을 유지한다는 제안이 널리 받아들여지고 있다 [4].

일반적으로 DNA 손상 후 유전적 안정성을 유지하기 위하여 여러 과정으로 DNA 수복이 일어난다. DNA 수복 과정은 여러 인자와 관련되는데, 그 중 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)는 DNA polymerase δ 보조 효소로서 DNA 복제와 핵산절제(nucleotide excision)에 관여한다고 알려져 있다 [30]. 그리고 DNA polymerase δ 가 세포주기 조절 단백질에 의해 조절된다는 사실로 인해 세포주기 조절에 있어서 PCNA의 역할이 제안되었으며 [10], PCNA가 cyclin-dependent kinase(CDK)-cyclin 복합체와 상호 작용함이 알려져 있다 [1, 20, 27]. 따라서 PCNA는 복제, 수복, 재조합 및 세포주기 조절에 관계된 여러 단백질들과 상호 작용하는 역할을 담당하는 것으로 보고되었다 [12]. 세포주기 조절에 있어서 PCNA와 복합체를 형성하여 세포주기를 조절할 수 있는 단백질로는 cyclin D, CDK와 cyclin dependent kinase inhibitor(CDK inhibitors: CKI)의 일종인 p21이 알려져 있다 [23].

세포주기의 조절에 관련된 단백질들이 안정적으로 세포주기를 조절하기 위해서는 검사점(checkpoint)이 중요한 역할을 한다. 세포주기의 일련의 과정은 한 과정이 완전히 종료될 때까지 다음 과정으로의 진행이 통제되는 엄격한 순서로 이루어져 있는 조절 기전에 의해 일어나며, 한 세포주기에서의 통제는 다른 과정의 종료에 의존하여 나타나는데 이것을 검사점이라 한다 [7, 11]. 즉 다음 과정으로의 진행을 위해 세포주기의 검사점에서는 세포주기 조절인자들의 발현이 필수적이며, 세포주기 조절인자들에는 여러 cyclins과 CDK가 관여하게 된다. 세포주기 내에는 G1-S기와 G2-M기의 검사점이 존재하는데, 이로써 세포의 외부자극에 대한 세포주기의 진행을 통제하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 [11]. 즉, 수복되지 못한 DNA 손상시에 세포주기의 정지를 유도함으로써 세포 복제 과정에서 잘못된 유전정보의 전달을 통제할 것으로 생각된다. 이처럼 세포주기 진행이 멈추어진 상태를 세포주기 정지(cell cycle arrest)라고 한다. CDK inhibitor로서 알려진 p21 [2, 25]은 CDK 뿐만 아니라 PCNA와 결합함으로써 세포주기의 진행을 통제하는 것으로 알려져 있다 [30]. 따라서, PCNA는 여러 세포주기 인자들과 상호작용하여 과발현된 p21과 더불어 G1과 G2기에서 세포주기 정지를 유도한다 [1].

따라서 본 연구에서는 마우스 소장 음와세포에서 방사선에 의해 유도된 p53 단백질 증가에 의존적인 apoptosis

의 과정에서 생체내 항상성 유지를 위한 재생기전을 알아보기 위해 DNA 수복과정에 관련하는 PCNA와 세포주기의 정지와 관련해서 PCNA와 복합체를 형성하는 p21의 발현양상에 관하여 알아보았다.

재료 및 방법

실험동물과 ^{60}Co 감마선의 조사

본 실험에 사용된 7-8주령의 BALB/c mice는 KCCH (division of experimental animal care and management)에서 구입하였다. BALB/c mice의 방사선 조사는 이전에 보고 되었던 Katan 등 [14]의 방법에 따라 close-fitting perspex box(22×11×4 cm)를 사용하여 ^{60}Co 감마선(제주대학교 방사선 응용과학연구소)을 조사하였다. 조사선의 조사량은 30cGy/min로서 각 군에 따라 0.25 Gy, 0.5 Gy, 0.75 Gy, 1 Gy 2 Gy, 4 Gy 그리고 8 Gy의 ^{60}Co 감마선을 조사하였다.

마우스 소장의 음와에서 apoptotic cell의 확인

방사선 조사 후 시간 경과에 따른 세포 손상의 정도를 알아보기 위해 2 Gy의 방사선을 조사한 후 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 그리고 72시간에 각각 부검하였다. 체내 실질장기의 피폭 정도를 예측할 수 있는 척도로 이용하고 있는 소장의 음와 세포에서의 apoptosis를 관찰하기 위해 소장 조직을 채취한 후 10% 중성 포르말린에 고정하고, 각 마우스 당 8개의 소장 절편을 만들었다. 그리고 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하고, 절편을 만들어 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 하였다. 또한 방사선의 증가에 따른 세포 손상의 정도를 알아보기 위해 0.25 Gy, 0.5 Gy, 0.75 Gy, 1 Gy 2 Gy, 4 Gy 그리고 8 Gy의 방사선을 조사 후 6시간에 부검하였고, 상기와 동일한 방법으로 절편을 만들어 염색을 실시하였다. 방사선 조사 마우스의 소장 음와 세포에서 유도된 apoptosis는 핵의 위축, 염색질의 응축과 변연화 그리고 세포성 분절 같은 형태학적 특징을 증거로 판별하였다 [15]. 또한 이를 확인하기 위하여 ApopTag *in situ* apoptosis detection Kit(Oncor, USA)을 사용하여 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-Uridine 5' triphosphate Nick End Labelling(TUNEL) assay를 통해 양성반응을 보인 세포의 수를 관찰하였다. 세포의 oligonucleosome 크기로 분절된 DNA fragment의 3'-OH 끝에 terminal transferase를 사용하여 digoxigenin-dUTP를 붙였다. Anti-digoxigenin-peroxidase conjugate를 처리한 뒤 0.05% diaminobenzidine(DAB)로 발색하여 양성반응을 확인하였고, 0.5% methyl green으로 대조 염색하였다. 이와 같은 근거로 H&E 염색상에서 나타난 apoptotic cell과

TUNNEL assay 결과 양성 반응을 보인 세포의 수를 세었다.

면역조직화학 염색

방사선을 조사한 마우스의 소장 조직에서 PCNA와 p21의 분포 및 발현 양상을 관찰하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다. 면역조직화학 염색은 avidin-biotin complex Elite kit(Vector, USA)를 이용하였다. 조직절편은 파라핀을 제거한 후 0.3% 과산화수소에서 침적하여 내인성 peroxidase를 제거하였다. 그 후 비특이적 면역 반응을 방지하기 위해 blocking horse serum을 반응시켰다. 조직 내 PCNA와 p21 발현을 확인하기 위해 PCNA 항체(1 : 100; Santa Cruz, USA)와 p21 항체(1 : 50; Santa Cruz, USA)를 실온에서 1시간 반응시킨 후 biotinylated anti-mouse IgG를 실온에서 45분간 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase conjugate로 실온에서 45분간 반응시켰으며, 면역반응이 끝난 조직은 3, 3'-diaminobenzidine(DAB)용액에서 발색시켰다. 각 단계 사이에는 PBS로 충분히 세척하였다. 양성반응을 나타낸 조직을 hematoxylin 용액으로 대조염색하고, ethanol과 xylene의 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

결 과

방사선 조사량에 따른 소장 음와세포에서의 apoptosis의 경향성

방사선에 의한 손상의 정도는 세포와 장기의 종류에 따라 다르며, 특히 소장은 방사선 감수성이 매우 높은 장기이다. 실험적으로 ^{60}Co 감마선을 조사하여 apoptosis를 유도한 마우스 소장조직에 대해 H&E 염색을 실시하였다. 방사선 조사 후 소장 음와세포에서의 핵의 위축, 염색질의 응축과 세포성 분절 같은 형태학적 변화 [22]로 apoptosis가 일어났음을 판정할 수 있었다(Fig. 1A). 또한 apoptotic fragment를 확정하기 위하여 *In situ* DNA-end labeling을 이용한 TUNNEL assay를 실시하여 소장의 음와세포에서 양성반응을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이상의 H&E 염색과 TUNNEL assay의 결과에서 방사선 조사 후 유도된 apoptosis는 소장 음와세포에서 가장 민감하게 나타났다.

^{60}Co 감마선 2 Gy를 조사한 후 시간에 따른 apoptosis 유도 경향을 관찰하기 위해 소장 음와에서 apoptotic cell의 수를 관찰한 결과 방사선 조사 후 4시간과 6시간에서 가장 많은 apoptotic cell을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 방사선량 증가에 따른 세포손상의 정도를 알아보기 위하여 각각 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4 그리고 8 Gy의

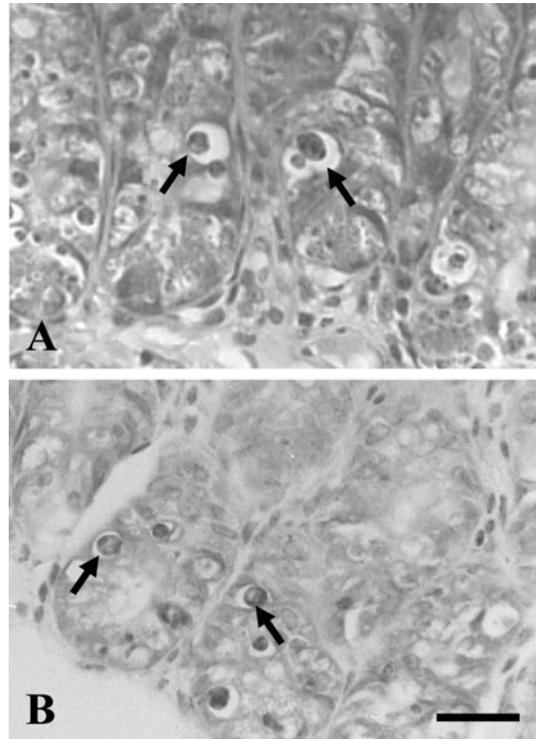


Fig. 1. Morphological classification of typical apoptotic fragments(arrows) in the crypt cells. Fig. 1A presents typical apoptotic fragments stained with H&E. Fig. 1B presents apoptotic fragments with TUNEL-positive nuclei by TUNEL assay. Scale bar = 30 μm .

방사선을 조사한 후 apoptosis가 가장 빈번하게 관찰되었던 6시간 후에 부검하여 소장 음와에서 apoptotic cell의 수를 확인한 결과 방사선 조사량이 증가함에 따라 apoptosis가 증가되는 것을 관찰하였다(Fig. 2B).

이상의 결과로부터 방사선 조사선량의 증가와 apoptotic cell의 수적 증가는 밀접한 상관관계가 있는 것으로 생각된다.

방사선 조사량에 따른 소장에서의 p53 발현양상

방사선 조사 후 경과된 시간과 방사선의 선량의 증가에 따른 소장에서 apoptosis 유도에 영향을 미치는 인자로서 p53의 발현양상을 western blot analysis를 이용해 관찰하였다. 방사선 조사 후 시간경과에 따른 p53의 발현양상은 방사선을 조사하지 않은 소장조직에서는 p53의 발현이 미약하였고(Fig. 3A, Lane 1), 방사선 조사 후에는 급격히 증가하여 4시간(Fig. 3A, Lane 2)과 6시간(Fig. 3A, Lane 3)에 최고치를 보였으며, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여(Fig. 3A, lanes 4-6) 72시간에는

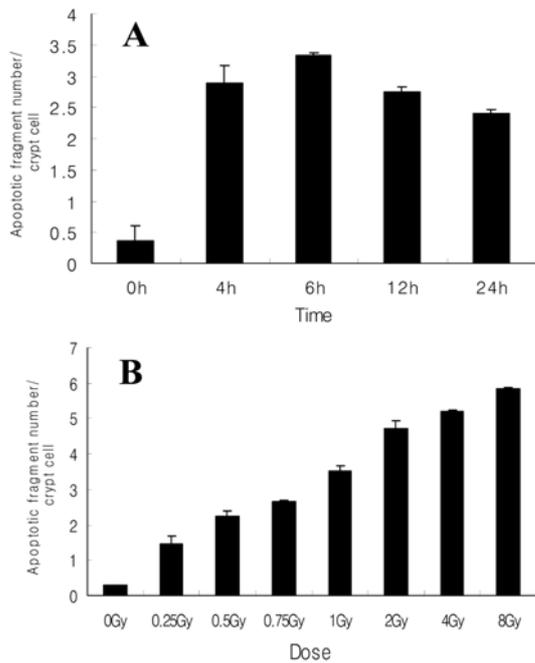


Fig. 2. Time (A)- and dose (B)-dependent apoptosis induction in mice crypt cells after ^{60}Co γ -ray irradiation. (A) Animals were exposed the 0.75 Gy of ^{60}Co γ -ray maintained up to 72 hours post-irradiation. (B) Animals were sacrificed 6 hours after irradiation, having reached a maximum yield of apoptotic fragments. The error bars represent the standard deviations.

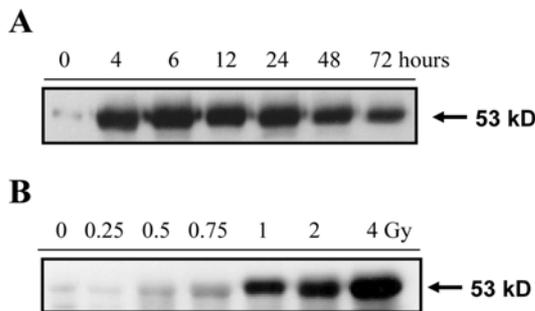


Fig. 3. Time (A)- and dose (B)-dependent p53 expression after ^{60}Co γ -ray irradiation. At each time and dose point, small intestine tissues of two mice were processed for the analysis. (A) Western blot analysis of p53 after 2 Gy ^{60}Co γ -ray irradiation. (B) Western blot analysis of p53 6 hours post irradiation. Zero hour and 0 Gy means non-irradiated control animals.

현저히 감소하였다(Fig. 3A, lane 7). 그리고 선량의 증가에 따른 p53의 발현양상은 선량이 증가함에 따라 점

차 증가하는 경향을 보였으며, 0.25, 0.5 그리고 0.75 Gy를 조사한 소장조직에서는 미약한 증가가 관찰되었다(Fig. 3B, lanes 2-4). 그리고 1 Gy(Fig. 3B, lane 5)와 2 Gy(Fig. 3B, lane 6)에서 점차 증가하여 4 Gy(Fig. 3B, lane 7)를 조사한 소장조직에서는 현저한 p53의 발현양의 증가를 관찰할 수 있었다.

따라서 방사선에 의한 세포 손상 시에 증가되는 단백질로 알려진 p53의 발현양상을 관찰한 바 시간경과와 선량증가에 따른 apoptotic cell의 수적 변화와 p53의 발현양상의 변화가 일치하는 결과를 관찰할 수 있었다.

방사선에 의해 유도된 소장 음와의 apoptotic cell에서의 PCNA의 발현

PCNA는 DNA 복제와 수복에 관여하는 인자로서, 여러 세포주기 인자들과 상호작용을 하는 것으로 알려져 있다 [30]. 방사선에 의한 손상에 대한 DNA 수복에 관여하는 PCNA의 발현양상을 관찰하기 위하여 0, 0.25, 1, 2, 4 및 8 Gy의 방사선을 조사한 마우스 소장 조직에서 PCNA에 대하여 면역조직화학 염색을 실시하였다. 방사선을 조사하지 않은 마우스의 소장조직에서는 다수의 용모 상피세포와 음와세포에서 양성반응이 관찰되었다. 그리고 0.25, 1, 2 및 4 Gy의 저선량이나 중등도의 선량의 방사선을 조사한 소장조직에서는 방사선을 조사하지 않은 소장조직과 동일하게 용모 상피세포, 음와세포와 소수의 점막 고유판의 결합조직 세포에서 양성반응을 나타내었지만, 흥미롭게도 apoptosis가 유도된 음와의 apoptotic cell에서 PCNA에 대한 양성반응을 나타냈다(Figs. 4A, B). 한편, 8 Gy의 고선량을 조사한 소장 음와에서 나타난 apoptotic cell에서 PCNA에 대한 양성반응은 저선량이나 중등도의 선량에서 보다 현저히 미약한 양성반응을 보였다.

이상의 결과로부터 세포에 치명적인 손상을 주지 않는 저선량이나 중등도의 선량의 방사선을 조사한 마우스 소장 조직에서는 소장 음와의 apoptotic cell에서 PCNA 양성반응이 증가했음을 알 수 있었다.

방사선에 의해 유도된 소장 음와의 apoptotic cell에서의 p21의 발현

손상된 세포의 수복을 위해 세포주기의 진행을 통제하기 위해 CDK 뿐만 아니라 PCNA와 결합함으로써 세포주기 정지를 유도하는 단백질인 p21 [30]의 발현양상을 면역조직화학 염색을 실시하여 관찰하였다. 그 결과 PCNA에 대한 면역염색의 결과와 유사하게 0.25, 1, 2와 4 Gy의 저선량과 중등도의 선량의 방사선을 조사한 소장 음와의 apoptotic cell에서 p21에 대한 양성반응을 관

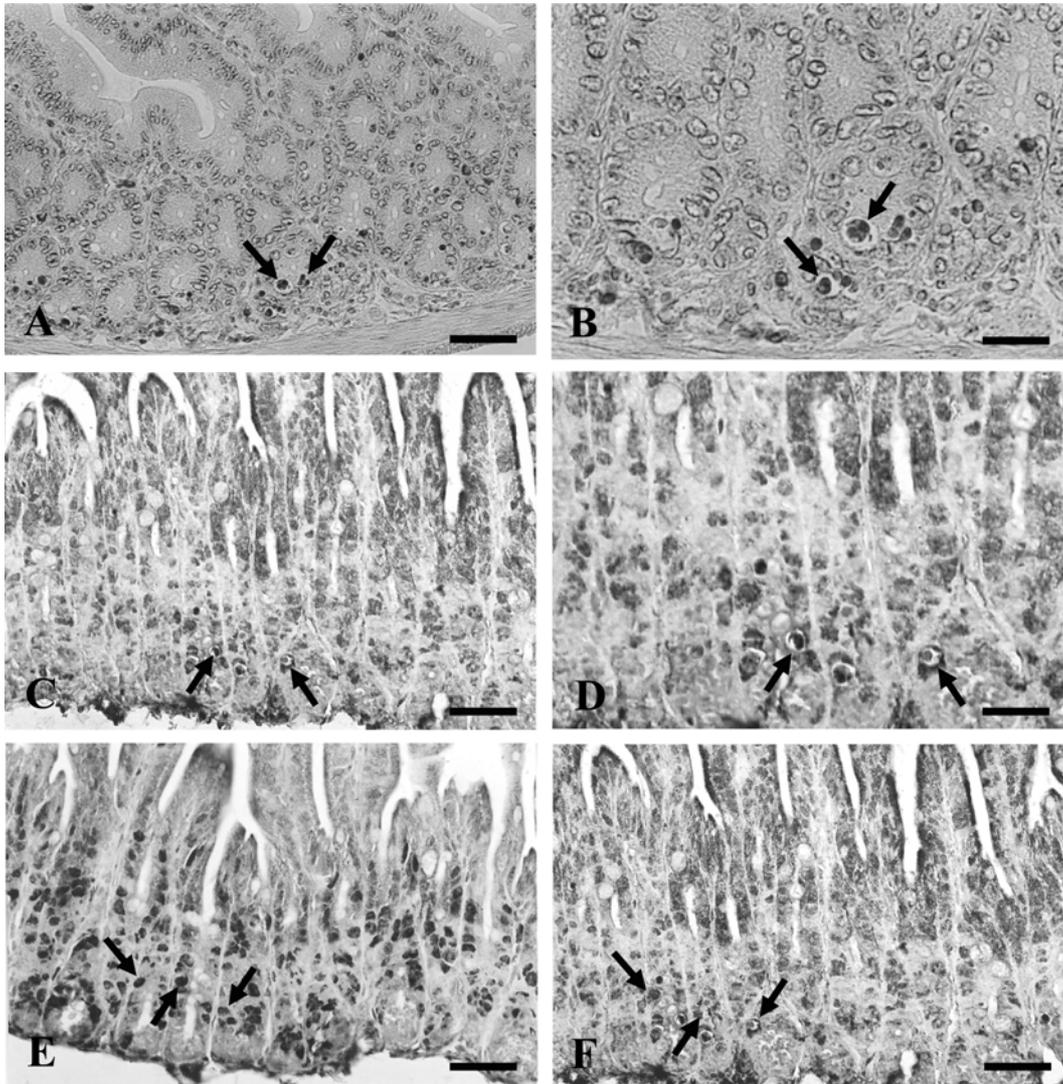


Fig. 4. Immunostaining for PCNA and p21 in the irradiated mouse intestinal tissues. (A) Arrows indicated the PCNA-positive cells in irradiated intestinal crypt cells. (B) Higher magnification of Fig. 4A. (C) Arrows indicated the p21-positive cells in irradiated intestinal crypt cells. (D) Higher magnification of Fig. 4C. Immunostaining for PCNA (E) and p21 (F) in serial sections of irradiated intestinal tissues. PCNA and p21 were localized in same apoptotic cells. Counterstained with hematoxylin. Scale bar = 60 μ m (A, C, E, F) ; 30 μ m (B, D).

찰할 수 있었다(Figs. 4C, D). 그리고 방사선을 조사하지 않거나 8 Gy의 고선량의 방사선을 조사한 소장 음와의 apoptotic cell에서 p21에 대한 양성반응은 현저히 감소하였다. 따라서 p21에 대한 양성반응은 DNA 수복이 가능한 저선량이나 중등도의 선량의 방사선을 조사한 소장 음와의 apoptotic cell에서 현저히 증가했음을 알 수 있었다.

그리고 apoptotic cell에서 세포주기 정지에 관여하는

PCNA와 p21의 관계를 알아보기 위해 2 Gy와 4 Gy의 방사선을 조사한 소장 조직의 연속절편에서 PCNA와 p21에 대하여 각각 면역조직화학 염색을 실시하였다. 그 결과 PCNA와 p21의 발현은 동일한 apoptotic cell에서 관찰되었다(Figs. 4E, F). 이상의 결과에서 방사선 조사 후 소장 음와의 동일한 apoptotic cell에서 관찰된 PCNA와 p21의 과발현은 세포주기 정지를 유도하여 DNA 손상에 따른 잘못된 유전정보의 전달을 방

지하고, DNA 수복 시간을 획득하는 역할을 할 것으로 사료된다.

고 찰

*in vivo*에서 방사선에 의한 손상의 수복 기전에 관한 연구는 많이 이루어져 왔다 [4, 7, 13]. 저선량의 방사선에 의해 유도된 apoptosis는 세포내 항상성을 유지하기 위한 기전으로 알려져 있으며, 이는 p53 인자와 밀접하게 관련이 있다 [3-5, 26]. 최근 연구에 따르면 방사선에 의해 유도된 apoptosis는 p53에 의존적인 경로뿐만 아니라 비의존적 경로가 보고되었다 [6]. 본 연구에서는 ⁶⁰Co 감마선을 조사한 마우스 소장에서 p53과 apoptosis의 유도가 밀접한 관련성이 있음을 확인하였다. 그리고, 방사선 조사에 의한 소장 음와세포에서 유도되는 apoptosis의 빈도는 방사선 선량의 증가에 비례함을 관찰할 수 있었다. 또한 p53의 발현은 선량의 증가에 의존적으로 증가되었다. 이상의 결과로써 방사선에 의해 유도된 소장 음와세포에서 apoptosis의 빈도는 p53의 조절을 받는 것을 알 수 있었다.

p53은 DNA 손상 후에 항상성을 유지하기 위한 apoptosis의 유도 그리고 수복시간을 획득하기 위한 세포주기 정지의 두 가지 기전을 조절하는 중요한 인자이다. p53은 세포주기 정지를 통해 수복되지 않는 DNA의 손상에 대하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다. p53에 의존적인 p21의 과발현은 세포주기 정지를 유도하여 DNA 손상을 수복할 시간을 획득하기도 하는 반면 Bax의 발현에 의해서는 apoptosis가 유도되기도 한다 [29]. 이 과정의 선택은 여러 세포주기 관련 인자들과 연관성이 있다. 그 중 세포주기 정지에 관여하는 인자로서 널리 알려져 있는 p21은 PCNA, CDK-cyclin 등과 결합할 수 있는 기능적 잔기를 가지고 있고 [19-21], 이들 분자들과 결합하여 세포주기 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다 [9, 26]. DNA 수복에 중요한 인자인 PCNA는 p21과 결합함으로써 세포주기 조절에도 관여한다.

본 연구에서는 저선량 또는 중등도의 선량을 조사한 소장 음와의 상피세포와 더불어 음와의 apoptotic cell에서 PCNA의 발현을 관찰할 수 있었으나, 고선량에서는 PCNA의 발현을 관찰할 수 없었다. 몇몇 보고에 의하면 p53이 결여된 세포에서 PCNA의 발현이 증가하면 DNA 복제가 일어나는 반면에 p53의 존재하에 PCNA가 높은 수준으로 유지된다면 DNA 수복이 일어나지만 PCNA가 없거나 낮은 수준으로 존재시 apoptosis가 유도된다고 한다 [17, 18]. 이들 결과로부터 p53의 발현이 증가된 소장에서 저선량 또는 중등도의 선량을 조사하였을 때에는 PCNA의 발현에 의해 세포 손상의 수복이 일어날 것

으로 생각되지만, 고선량을 조사하였을 때에는 PCNA의 발현의 감소와 함께 세포 손상의 수복도 어려울 것으로 사료된다. 따라서 방사선 조사에 의한 마우스 소장에서 apoptosis의 유도는 세포내 PCNA의 발현 양상과 상관관계가 있을 것으로 생각된다. 그리고 본 연구에서는 세포주기 정지를 유도하는 인자로 알려진 p21이 PCNA에 양성반응을 보인 apoptotic cell에서 동시에 발현함을 관찰하였다. 따라서 방사선에 의하여 손상 받은 apoptotic cell에서의 DNA의 수복과 관련이 있는 PCNA의 발현 양의 증가와 함께 유전적 안전성을 위해 세포주기 정지를 유도하는 p21의 발현은 매우 중요할 것으로 생각되며, PCNA와 p21의 상호작용에 대해 고려하여야 할 것이다. 또한 본 연구에서 동일한 apoptotic cell에서 PCNA와 p21의 양성반응이 나타남으로써, 세포주기 정지를 유도할 것으로 생각되는 p21이 PCNA와 CDK-cyclin 분자들과 직접적으로 관련성이 있는지에 대해서는 추가적인 연구가 더 필요하다.

이러한 결과로부터 방사선의 조사에 의해 증가된 p53의 발현에 의존한 소장 음와의 apoptotic cell에서의 PCNA와 p21의 발현은 손상 받은 DNA의 수복과 세포주기의 정지를 통한 유전적 안정성을 확보하여 세포 손상의 수복에 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

결 론

방사선 조사에 의해 유도된 방사선 민감 장기에서의 apoptosis는 방사선에 의한 세포 손상 후에 항상성 유지를 위해 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 방사선 민감 장기인 소장조직에서 ⁶⁰Co 감마선 조사에 의해 유도된 세포 손상에 대한 수복기전을 알아보고자 하였다. 방사선을 조사한 마우스 소장에서 4시간과 6시간 후에 음와세포에서 apoptosis가 가장 빈번하게 관찰되었으며, apoptosis의 빈도는 방사선 조사선량의 증가에 비례하였다. 또한 이들 apoptotic cell의 수는 p53의 발현 양상의 변화와 일치하였다. 흥미롭게도 DNA 복제와 수복에 관여하는 인자인 PCNA에 대한 면역조직화학 염색을 실시한 결과 저선량과 중등도의 방사선을 조사한 소장 음와의 apoptotic cell에서 발현되었다. 또한 여러 세포주기 조절인자들과 상호 작용하는 것으로 알려져 있는 PCNA와 더불어 세포주기 조절인자인 p21이 소장 음와의 동일한 apoptotic cell에서 발현함을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과로부터 DNA 수복에 관여하는 PCNA와 세포주기 정지 유도를 위해 PCNA와 복합체를 형성하는 것으로 알려진 p21이 방사선에 의해 apoptosis가 유도된 음와세포에서 동시에 발현됨은 방사선에 의한 세

포 손상 시에 항상성 유지를 위한 apoptosis의 유도과 더불어 손상된 DNA 수복을 위해 세포주기의 진행을 통제하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ando T, Kawabe T, Ohara H, Docummun B, Itoh M, Okamoto T. Involvement of the interaction between p21 and proliferating cell nuclear antigen for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J Biol Chem* 2001, **276**, 42971-42977.
2. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995, **377**, 552-557.
3. Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC, Wyllie AH. p53 dependence of early apoptotic and proliferation responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 1994, **9**, 1767-1773.
4. Clarke AR, Howard LA, Harrison DJ, Winton DJ. p53 mutation frequency and apoptosis in the murine small intestine. *Oncogene* 1997, **14**, 2015-2018.
5. Dulic V, Kaufmann WK, Wilson SJ, Tlsty TD, Lees E, Harper JW, Elledge SJ, Reed SI. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 1994, **76**, 1013-1023.
6. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993, **75**, 817-825.
7. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996, **274**, 1664-1672.
8. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *In situ* via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **1992**, **119**, 493-501.
9. Goodhead DT. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiation. *J Radiat Res (Tokyo)* 1999, **40**, 1-13.
10. Goubin F, Ducommun B. Identification of binding domains on the p21Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Oncogene* 1995, **10**, 2281-2287.
11. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989, **246**, 629-634.
12. Hindges R, Hubscher U. DNA polymerase delta, an essential enzyme for DNA transactions. *Biol Chem* 1997, **378**, 345-362.
13. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991, **51**, 6304-6311.
14. Kastan MB, Radin AI, Kuerbitz SJ, Onyekwere O, Wolkow CA, Civin CI, Stone KD, Woo T, Ravindranath Y, Craig RW. Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res* 1991, **51**, 4279-4286.
15. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in the tissue kinetics. *Br J cancer* 1972, **26**, 239-257.
16. Lee JM, Bernstein A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, **90**, 5742-5746.
17. Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 1997, **14**, 2759-2766.
18. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, Hall PA. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 1994, **54**, 614-617.
19. Paunesku T, Mittal S, Profic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001, **77**, 1007-1021.
20. Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 1987, **326**, 517-520.
21. Prospero E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1997, **3**, 193-210.
22. Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* 1994, **9**, 1791-1798.
23. Szepesi A, Gelfand EW, Lucas JJ. Association of proliferating cell nuclear antigen with cyclin-dependent kinases and cyclins in normal and transformed human

- T lymphocytes. *Blood* 1994, **84**, 3413-3421.
24. **Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM.** An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem* 1986, **261**, 12310-12316.
25. **Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B.** The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 1994, **369**, 574-578.
26. **Wenz F, Azzam EI, Little JB.** The response of proliferating cell nuclear antigen to ionizing radiation in human lymphoblastoid cell lines is dependent on p53. *Radiat Res* 1998, **149**, 32-40.
27. **Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D.** p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993, **366**, 701-704.
28. **Xiong Y, Zhang H, Beach D.** D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992, **71**, 505-514.
29. **Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillout C, Liebermann DA, O'Connor PM, Fornace AJ Jr.** Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994, **9**, 3743-3751.
30. **Zhang H, Xiong Y, Beach D.** Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* 1993, **4**, 897-906.