Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 28(6): 415-422 (2013)
http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2013.28.6.415

연구논문

저선량 감마선 노출에 의한 비장세포의 염증 유발 작용에 대한 연구

손은화*

Effects of Low Dose Gamma Irradiation on the Inflammatory Response in Spleen Cells

Eun-Hwa Sohn*

접수: 2013년 11월 27일 / 게재승인: 2013년 12월 23일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Gamma irradiation (γIR) is widely used for radiotherapy as a treatment of cancer cells although it has a risk to damage normal cells. Inflammation is regarded as one of side effects of γIR while the effect of low dose of γIR on inflammation has not been researched well. Here, we investigated the inflammatory responses of low dose of γIR on murine spleen cells. It was evaluated if γIR affected the mitogen-induced lymphocyte proliferation, the regulation of various inflammatory cytokines (IFN-γ, IL-2, IL-17, IL-4, IL-10), and the involvement of Ikaros and MAPK/NF-κB medicated mechanism. Exposure of ^{137}Cs-γIR below 2 Gy decreased the lymphocytes proliferative response to mitogens (LPS, ConA) except at the lowest dose, 0.05 Gy. IL-17, IL-2 and IL-4 mRNA increased at 0.5 and 2 Gy, but not altered at 0.05 Gy. IL-10, anti-inflammatory cytokine, increased only at 0.05 Gy. In regard to intracellular signaling, p-JNK, p-p38 and p-IκBα were not changed, whereas the activation of ERK and Ikaros increased at the lowest dose. These results suggest that exposure of γIR less than 0.5 Gy (or below 0.05 Gy) has beneficial effects as a radiation hormesis on immune function.

Keywords: Gamma irradiation, Low dose rate, Splenocyte, Inflammation

강원대학교 생약자원개발학과
Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea
Tel: +82-33-540-3322, Fax: +82-33-540-3329
e-mail: ehson@kangwon.ac.kr

1. 서론

방사선 (radiation) 노출에 대한 인체 유해성 평가에 관한 연구는 끊임없이 이루어져 왔다. 최근 들어 방사선 및 방사성 동위원소의 의학적 이용 증가, 원자력 시설 이용 증대, 주변 지역의 방사성물질에 의한 오염도 증가, 우주방사선을 비롯한 자연 방사선의 노출 증가 등 방사선에 대한 인체의 피복빈도가 더욱 증가하였으며, 2011년 일본의 대지진으로 인한 후쿠시마 원자력 발전소의 폭발이 방사능 누출로 이어지면서 전세계적으로 핵시설사고의 발생 가능성이 또 다른 위험요소로 가해져 방사선 피폭에 관한 연구는 더욱 중요시 되었다 [1,2].

방사선에 의한 생체손상은 활성산소 발생에 의한 DNA 손상이 주원인으로 알려져 있다 [3]. 생체 조직이 방사선에 노출되면 일련의 과정을 통해 •H, •OH 와 같은 산화적 손상물질을 발생시키고 [4], superoxide radical, H_2O_2, alkoxy radical, peroxyradical 등을 생성함으로써 생체 구성분자의 구조적 변화를 일으킨다 [5]. 이로 인해 효소 활성의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등을 손상시킬 뿐 아니라 세포막의 불포화지방산과의 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화가 유발 된다 [6,7]. 이와 같은 과산화지질의 증가는 세포에 산화적 손상을 주어 기관의 생리적 기능을 저하시킴으로써 동맥경화, 간질환, 당뇨병, 심장병 및 암 등의 여러 가지 질병을 초래하며 결국에는 유전적 장해의 원인이 되는 것으로 알려져 있다 [8].

전리 방사선 또는 이온화 방사선 (ionizing radiation)은 인체에 해를 줄 수 있는 방사선으로 X-선과 감마선이 알려져 있다. 이들은 주로 의료용으로 촬영에 사용하거나 (X-선), 방사선 항암요법에서 암세포를 죽이는 근접 치료용 방사선으로 사용하고 있다 (감마선). 치료용 감마선은 방사선 에너지

가 높고 투과력이 커서 암세포를 사멸시키는 효과가 크므로 임상적으로 크게 이용되고 있지만, 정상세포에 조사될 경우에는 세포 손상을 일으켜서 치료 환자들에게 심각한 부작용을 일으키고, 감마선을 다루는 의료진들에게는 피폭에 대한 위험성이 항상 존재하기 때문에 큰 단점으로 지적되고 있다. 지금까지 연구되어진 감마선 노출에 대한 인체의 임상적인 부작용은 노출된 조사선량에 따라서 100~300 Gy에서의 중추신경 장해, 10~30 Gy의 위장관 장해, 4~8 Gy의 골수 장해, 저선량 장해 (1~2 Gy 이하) 등으로 보고되고 있으며, 각각의 급성, 만성 또는 유전 효과에 대하여 연구가 진행되고 있다 [9]. 그러나 감마선에 대한 유해성 평가에 관한 연구는 대부분 고선량 방사선을 이용한 방사선 치료 및 부작용에 관한 연구가 주로 이루어졌으며, 저선량 방사선 (1~2 Gy 이하) 또는 1 Gy 이하의 노출로 인한 인체 영향에 대해서는 연구가 매우 미흡한 실정이다.

1981년 Luckey는 매우 낮은 선량의 방사선이 암 발생억제, 동물의 병원성 감염에 대한 저항력 획득 등과 같이 생체의 면역기능을 항진시키면서 수명을 연장시킨다고 보고하였다 [10]. Nambi (1987) 등도 저선량 방사선량이 비교적 높은 지역에서 암 발생율이 다른 지역에 비해 낮다고 보고함으로써 저선량 방사선의 면역력 증가 효과를 제시하였고 [11], 인체를 대상으로 한 임상연구 보고에서도 0.5 Gy 이하에서는 세포성 면역이 항진된다고 보고하였다 [12]. 1998년 Hildebrandt 등은 고선량 방사선 (10 Gy)의 효과와 달리 저선량의 방사선 (0.3 Gy)에서 조혈, 면역증강작용과 항염증 효과를 보고함으로써 저선량에 의한 항염증성 방사요법 (anti-inflammatory radiotherapy)의 가능성을 제시하기도 하였다 [13].

일부 연구결과에 의하면 저선량 방사선 조사에 의한 작은 양의 활성산소종 (ROS; reactive oxygen species)의 발생이 세포내의 유전자 발현을 조절하여 신호전달과정에 영향을 미친다고 보고하였으며, 특히 이러한 작용은 작은 양의 ROS를 해독 (detoxification)하는 과정에서 나타난다고 설명하였다. 이와 같이 세포가 ROS를 해독 하는 과정은 ROS 농도를 정상화하려는 정상 세포의 호메시스 (hormesis) 과정이며 이는 저선량 방사선 노출에 대한 인체 방어 기전의 하나라고 보고하였다 [14-16].

이와 같이 저선량 감마선의 노출이 고선량의 노출과 다르게 효과를 나타낼 가능성이 높다는 실험적 증거들이 있음에도 불구하고, 아직까지 저선량 감마선 노출에 대한 염증 반응과 그 작용 기전에 대한 연구가 제대로 이루어지지 않아서 실제로 저선량의 노출이 염증을 유발시키는지, 또는 앞서 언급된 바와 같이 염증에 대하여 억제적 효과를 나타내는지에 대한 구체적인 과학적 증거가 부족하다. 따라서 본 연구에서는 대식세포, B림프구, T림프구 등의 염증 반응에 관여하는 면역세포들이 가장 많이 밀집되어 있는 비장세포를 이용하여 저선량 감마선 조사에 의한 T, B 림프구의 mitogen에 대한 세포증식 기능변화, 염증질환 관련 단백질의 발현변화, 저선량 감마선 노출에 의한 세포내 MAPK/NF-κB 및 PI3K/Akt 등 세포내 신호전달경로 등을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물과 생쥐 비장세포의 분리

C57/BL6 종의 수컷 생쥐를 중앙실험동물 (서울, 대한민국)에서, 무작위로 5마리로 분주하고 실험을 시작하기 7일 전의 적응기를 두었다. 실험동물은 강원대학교 동물사육시스템에서 ILAR (Institute for Laboratory Animal Research) 가이드라인에 근거하여 사육되었으며, 6~8주의 생쥐가 실험에 사용되었다. 비장세포의 분리는 생쥐를 ether로 치사시킨 후 비장을 분리하여 ice-cold PBS에 넣고 100 μm nylon mesh (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 single-cell suspension으로 만들었다. Suspension은 1000 rpm, 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 PBS로 다시 resuspension하였다. 다음 0.83% ammonium chloride 용액 10 mL을 가하여 적혈구를 용혈한 후 1000 rpm, 10분간 원심 분리한 다음 상층액을 제거하였다. 다시 비장세포를 RPMI 1640 media에 10 mL 정도 넣어 세척하고 이 과정을 3회 반복하였다. 최종적으로 RPMI 완전배지 (10% FBS, penicillin 100 units/mL, 100 μg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine)에 비장세포를 현탁시킨 후 5% CO_2와 37°C의 배양조건에서 배양하였다.

2.2. 감마선 조사

감마선 발생장치는 CS-137 blood irradiator (IBL 437C, CIS Bio International S.A., Gif-sur-Yvette, France)를 이용하였다. 감마선은 0.8 Gy/min의 선량율로 각 선량 0.05 Gy (4초), 0.5 Gy (37초), 2 Gy (150초)로 3개의 선량그룹으로 나누어 조사하였다.

2.3. Splenocyte blastogenesis 측정

생쥐에서 분리된 비장세포 (splenocyte)에 감마선을 선량별로 조사하고, 96-well plate에 well당 5×10^5의 세포로 분주한 다음 3시간 뒤에 mitogen인 LPS (10 μg/mL)와 ConA (2.5 μg/mL)를 첨가하여 각각 B 림프구와 T 림프구의 세포증식력을 측정하였다. 전체 배양 부피는 100 μL로 하여, 37°C, 5% CO_2 배양기에서 24, 48, 72시간 배양 후 50 μL의 XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-(phenylaminocarbonyl)-2H-tetra zolium hydroxide)를 가하고, 4시간 더 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 450, 690 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. RT-PCR을 이용한 mRNA 발현 측정

60 mm culture dish에 비장세포를 분주하고 3시간 동안 안정화시킨 다음 감마선을 선량별로 조사하고 3시간 배양 후에 trizol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY)를 이용하여 kit에서 제공하는 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 이때 추출된 total RNA는 UV spectrophotometer를 이용하여 1 μg/μL의 농도로 정량하고 추출된 total RNA는 superscript one-step RT-PCR with platinum Taq kit (Invitrogen, Grand Island, NY)을 이용하여 mRNA 발현량을 측정하였다. 1× reaction buffer, 2 mM $MgSO_4$, 0.04 μg/μL template RNA, 0.2 μM primer, 0.5

μL/25 μL RT/platinum Taq mix의 조성으로 25 μL의 volume으로 최적조건을 나타내는 cycle로 반응하였다. PCR 반응이 종결된 후 product 중 5 μL를 2% agarose gel에 전기영동하고 band를 확인하였다. 이때 이용된 primer의 염기 배열은 다음과 같다. IFN-γ-F : 5'-TGA ACG CTA CAC ACT GCA TCT TGG-3', IFN-γ-R : 5'-CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTG AG-3', IL-2-F : 5'-TGC TCC TTG TCA ACA GCG-3', IL-2-R: 5'-TCA TCA TCG AAT TGG CAC TC-3', IL-4-F : 5'-ATG GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT-3', IL-4-R: 5'-GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA GTC-3', IL-10-F : 5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3', IL-10-R: 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3', IL-17-F : 5'-GCT CCA GAA GGC CCT CAG A-3', IL-17-R: 5'-AGC TTT CCC TCC GCA TTG A-3', GAPDH-F: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3', GAPDH-R: 5'-CCA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'.

2.5. Western blot을 이용한 단백질 발현량의 측정

비장세포에 감마선을 선량별로 조사하고 1시간 동안 배양한 다음 원심분리하여 세포 pellet에 homogenization buffer (50 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5 ng/mL leupepsin, 0.25 mM PMSF in ethanol, 0.1 TIU/mL aprotinin, 1 mM DTT)를 넣고 4°C에서 30분간 반응시켰다. 원심분리 (4°C, 13,000 rpm, 30분)하여 상등액을 취해서 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 정량하고, 총 25 μg의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에 전기 영동한 후 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후, membrane을 1시간 동안 상온에서 5% skim milk로 block 처리한 후 primary antibody를 4°C에서 12시간 동안 처리하였다. 세척 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 처리하고 ECL 용액을 가한 후 필름에 노출시켜 확인하였다. 이때 이용된 antibody는 phospho-JNK, JNK, phospho-p38, p38, phospho-ERK, ERK, phospho-IκBα, IκBα, β-actin이며, 모두 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

2.6. Immunopresipitation을 이용한 Ikaros의 인산화 측정

60 mm culture dish에 비장세포를 분주하고 3시간 동안 안정화시킨 다음 감마선을 선량별로 조사하고 3시간 배양 후 homogenization buffer를 넣고 4°C에서 30분간 반응시켜 원심분리 후 상층액을 취하여 단백질을 정량한 후, protein A/G plus agarose bead (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 Ikaros antibody를 넣고 4시간동안 4°C에서 침강시켰다. 침강된 bead를 세척하고 10% SDS-PAGE gel에 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 옮긴 다음, membrane을 1시간 동안 상온에서 5% skim milk로 block 처리하였다. Primary antibody를 4°C에서 12시간 동안 처리하고 세척 후 HRP-conjugated secondary antibody를 1시간 동안 상온에서 처리하고 ECL 용액을 가한 후 필름에 노출시켜 확인하였다. 이때 이용된 antibody는 phosphoserine/threonine, Ikaros이며, phosphoserine/threonine은 BD Transduction Laboratories (Palo Alto, CA), Ikaros는 Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)에서 구입하였다.

2.7. 통계처리

모든 자료는 mean±S.E.M으로 표시하였고, 각 실험군 간 유의성은 Student's *t*-test로 검증하였고, 유의수준은 $^{*,\#}p<0.05$와 $^{**,\#\#}p<0.01$ 를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Mitogen에 의한 림프구 (lymphocyte)의 세포증식효과

Resting lymphocyte는 외부 자극에 의하여 활성화되는 단계에서 proliferation이 일어난다. 이러한 활성화 정도는 mitogen-stimulated response에 의하여 쉽게 확인할 수 있으며, 이는 mitogen이 특이적으로 감작된 어떤 lymphocyte subpopulation에 결합하여 cell cycle을 G0 phase에서 G2 phase로 자극함으로써 mitosis를 일으켜 lymphocyte population을 유용하여 측정할 수 있게 하는 방법이다 [17]. 저선량 감마선의 노출이 직접적으로 lymphocyte의 세포증식효과에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 생쥐의 비장 (spleen)으로부터 비장세포 (splenocyte)를 분리하고 2 Gy 이하의 저선량을 노출시킨 후 B림프구의 mitogen으로 LPS (lipopolysaccharide)와 T림프구의 mitogen ConA (concanavalin A)를 사용하여 세포증식능을 측정하였다. 저선량을 선량별로 조사한 직후 세포생존률을 측정하였을 때 차이가 없었음을 확인하였고 (data not shown), mitogen을 각각 처리하고 24, 48, 72시간별로 측정한 결과 LPS 처리군에서 179.19%, 244.29%, 246.75%로 세포증식을 나타내었고, ConA 처리군에서 시간별로 120.03%, 141.75%, 164.46%로 세포증식이 일어남을 확인함으로써 LPS와 ConA가 본 실험에서 mitogen으로써 적절히 활용되었음을 우선 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

실험 결과에 의하여, mitogen을 처리하지 않고 감마선을 조사한 군에서 72시간 동안의 세포생존률에 있어서 85% 이상의 생존률을 보였으며, 0.05 Gy 조사군은 대조군 즉, 감마선을 조사하지 않은 군과 차이를 나타내지 않았다. Mitogen을 처리한 실험군을 살펴보면, LPS를 처리한 B 림프구 증식에 있어서 감마선 0.5 Gy 및 2 Gy 노출된 군은 세포증식이 억제되었으며, ConA를 처리한 T 림프구 증식에서도 B 림프구 증식에서의 결과와 마찬가지로 0.5 Gy 및 2 Gy 노출된 군에서 세포증식이 억제되었다. 그러나 특이적으로 0.05 Gy 노출군에서는 mitogen LPS와 ConA에 대한 세포증식이 오히려 증가하였다. 이러한 효과는 특히, LPS에 의한 B림프구의 세포증식 반응에서 더 민감하게 나타났다.

3.2. 다양한 염증질환 관련 사이토카인 조절에 대한 효과

사이토카인은 면역세포가 분비하는 단백질로써 면역세포들 간의 활성을 조절하고 면역체계를 조절하는 중요한 매개체이다. 특정 질환에 대한 원인과 치료를 규명하거나 면역증강

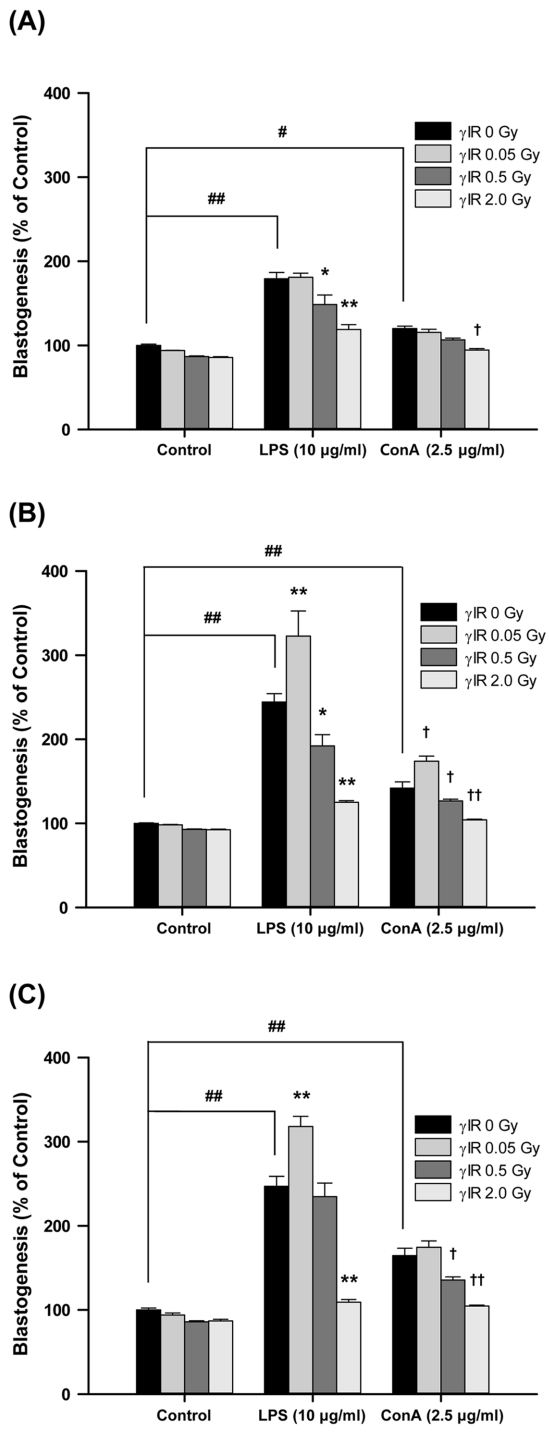

Fig. 1. Effect of low dose of γ-irradiation on proliferation of ConA- and LPS-treated splenocytes. After irradiation, murine splenocytes were treated with ConA and LPS respectively for 24, 48, and 72 hrs. The proliferation of ConA- and LPS-treated splenocytes were assessed by XTT assay. Cell density was measured at a test wavelength of 450 nm and a reference wavelength of 690 nm. Cell proliferations were represented by the percentage of control. The results are mean±SE. of quintuplicates from a representative experiment. ($^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$; significantly different from control group; $^{*,\dagger}p<0.05$, $^{**,\dagger\dagger}p<0.01$; significantly different from the LPS- or ConA-alone group)

요인 및 면역억제요인을 규명하는데 있어서 사이토카인의 역할은 매우 중요하며, 이미 그 기능이 밝혀진 IL-2, IFN-γ, TNF-α 등은 이를 타겟으로 분비 조절하는 의약품이 개발되었으며 임상적으로 사용되고 있다 [18,19]. 따라서 본 실험에서는 저선량 감마선 노출에 대하여 염증반응에서 주요 역할을 나타내는 Th1세포가 분비하는 IFN-γ, IL-2와 알러지 관련성 염증반응에 관여하는 Th2세포가 분비하는 IL-4, 자가면역질환과 관련되어 있다고 알려진 IL-17 [20]의 발현 변화를 측정하였으며, 억제성 사이토카인으로써 항염증성 특징 (anti-inflammatory properties)이 있다고 알려진 IL-10의 발현 정도를 측정하였다 [21-23].

Fig. 2에서 보는 바와 같이 2 Gy 이하의 감마선의 노출은 모두 IFN-γ 생성에 영향을 미치지 않았으며, 0.5 Gy 이상의 감마선의 노출은 IL-2, IL-4, IL-17 mRNA의 생성을 증가시켰다. 저선량 감마선의 노출은 Th1세포에서 분비하는 염증성 사이토카인 IFN-γ에는 변화가 없었으나, 0.5 Gy 이상에서 IL-2의 증가가 나타나 T세포를 활성화시켜 염증을 유발할 수 있을 가능성을 나타내었고, Th2 세포가 분비하여 알러지 반응에 관여하는 IL-4와 자가면역질환을 일으키는데 중요한 IL-17 생성 역시 0.5 Gy 이상의 감마선 노출에서 증가하였다. 이는 많은 연구들이 2 Gy 이상에서 염증반응을 보고했던 결과와 유사한 양상이며 [24,25], 우리의 결과는 0.5 Gy 이상에서부터 이러한 염증 유발 현상이 trigger 된다는 것을 유추할 수 있었다. 그러나 매우 낮은 0.05 Gy의 감마선 노출에서는 IL-2, IL-4, IL-17의 염증질환관련 마커 발현 모두에서 감마선에 노출되지 않은 군과 차이가 없었으며, 오히려 항염증 사이토카인 또는 억제성 사이토카인으로 알려진 IL-10은 0.05 Gy 노출에서 다른 0.5 및 2 Gy군과 달리 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었다. 이는 0.05 Gy에서 mitogen에 의한 림프구의 세포증식효과가 오히려 증가되었던 긍정적 결과와 동일한 결과이다.

3.3. MAPK 및 NF-κB에 미치는 영향

MAPK (mitogen-activated protein kinase) 경로는 염증반응을 일으키는 세포내 주요 신호전달경로로 알려져 있다. MAPK의 subfamily에는 c-Jun N-terminal kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 등이 있으며, 일부 염증 유발자극에 대하여 JNK, ERK, p38의 인산화 과정을 거쳐 NF-κB 등의 전사인자의 활성화를 일으키고 염증 반응에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 증가시킴으로써 염증을 유발시킨다고 알려져 있다 [26]. 따라서 우리는 저선량 감마선 노출에 대하여 세포내 MAPK 경로와 NF-κB의 활성 변화를 측정함으로써 염증 반응에 관여하는지 확인하고자 하였다. 그러나 2 Gy 이하의 저선량 감마선 노출에서는 p-IκBα의 증가가 나타나지 않았다 (Fig. 4A, 4B). p-IκBα의 활성화는 NF-κB가 핵 내로 translocation되는 과정에서 나타나는 것으로 p-IκB의 증가량에 변화가 없는 것은 NF-κB의 활성화에 영향을 미치지 않았다는 것을 의미한다. 2 Gy 이하의 감마선 노출은 p-JNK와 p-38의 활성화에도 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3A,

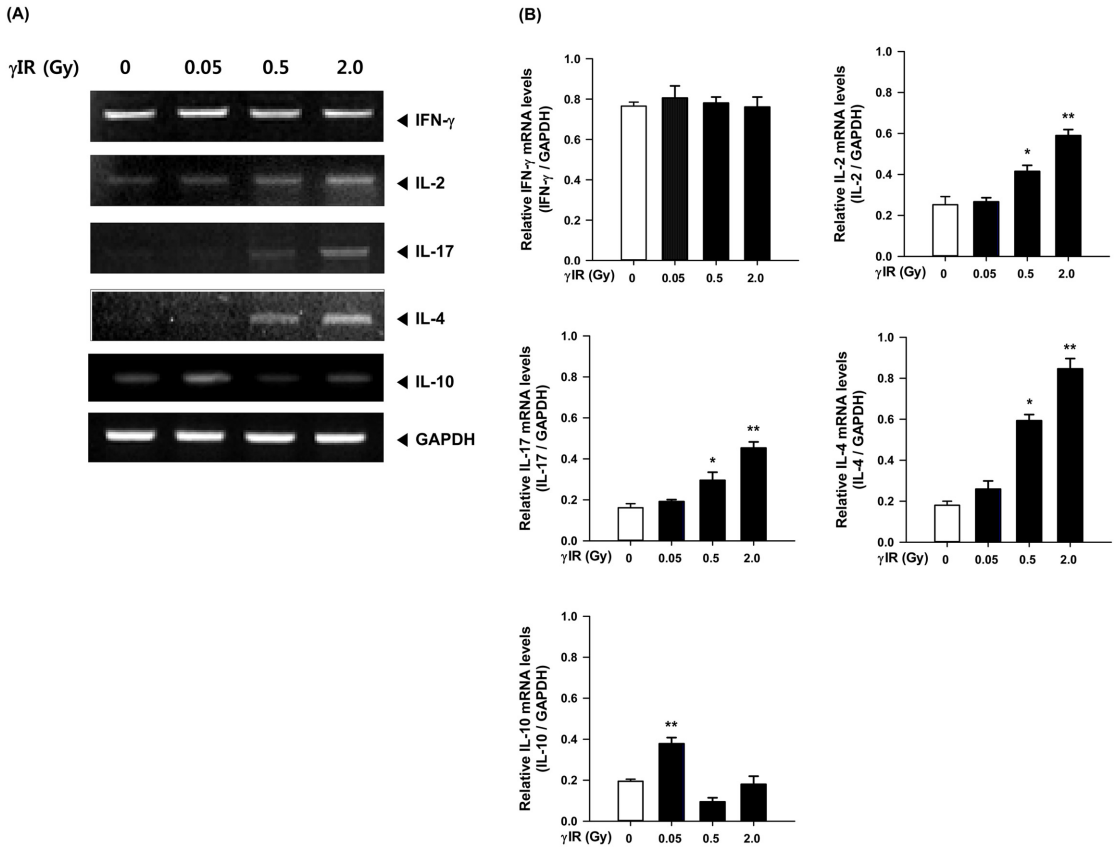

Fig. 2. Effect of low dose of γ-irradiation on the production of IFN-γ, IL-2, IL-17, IL-4 and IL-10. At 3 hr post-irradiation, total RNA was extracted from splenocytes. RT-PCR analysis was performed to measure mRNA levels of IFN-γ, IL-2, IL-17, IL-4, IL-10 respectively. The results illustrated come from a single experiment, and are representative of three separate experiments. ($^{\#}p<0.05$, $^{\#\#}p<0.01$; significantly different from control group; $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$; significantly different from the LPS- or ConA-alone group)

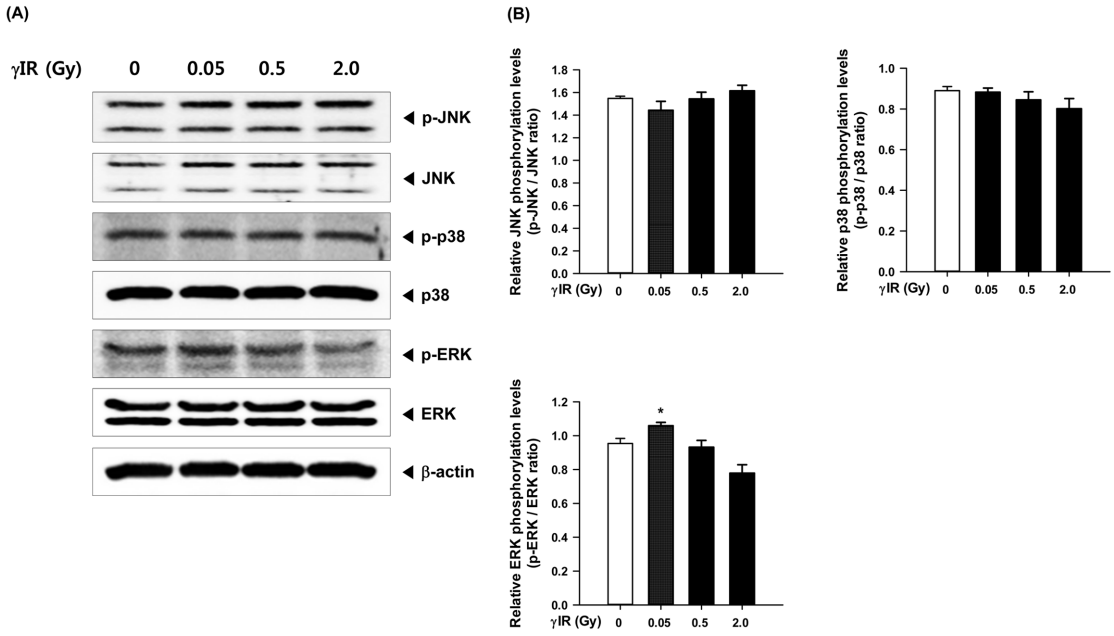

Fig. 3. Effect of low dose of γ-irradiation on phosphorylation of MAPKs in the splenocytes from mice. (A) At 1 hr post-irradiation, the expression of phosphorylated MAPKs and normal MAPKs were determined by Western blot analysis. (B) Densitometric analysis of Western blots is represented as the mean band density normalized to β-actin. Results are expressed as mean±SEM (n=3).

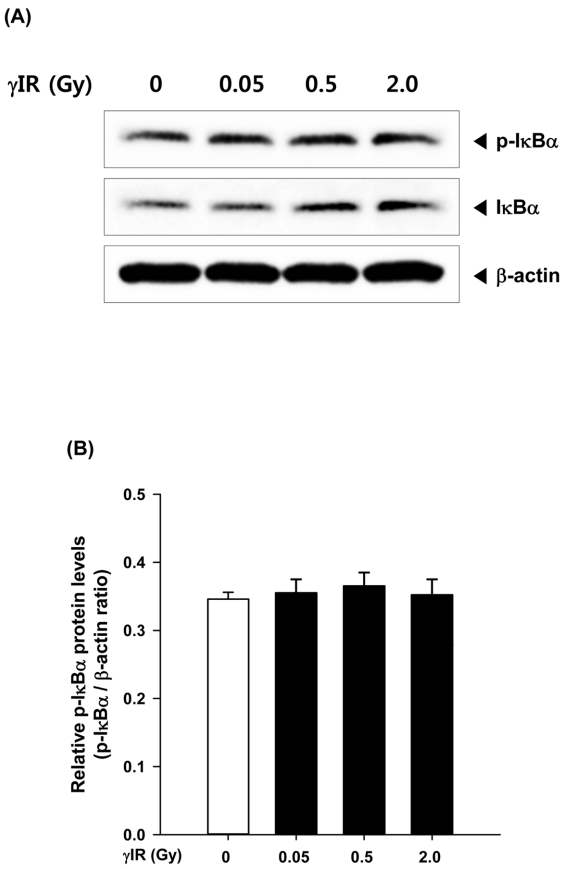

Fig. 4. Effect of low dose of γ-irradiation on NF-κB activation in the splenocytes from mice. (A) At 1 hr post-irradiation, the expression of phospho-IκBγ was determined by Western blot analysis. (B) Densitometric analysis of Western blots is represented as the mean band density normalized to β-actin. Results are expressed as mean±SEM (n=3).

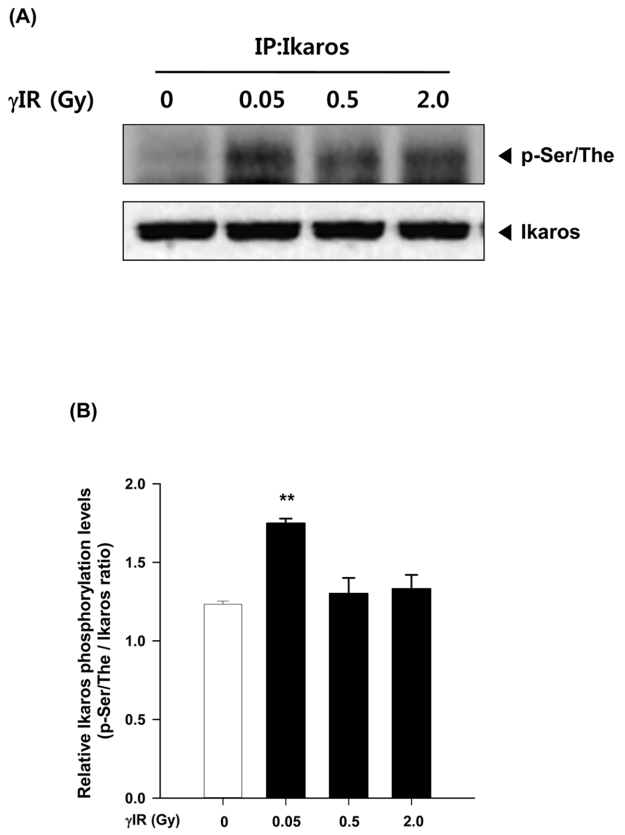

Fig. 5. Effect of low dose of γ-irradiation on the activation of Ikaros. Proteins were immunoprecipitated using anti-mouse Ikaros antibody, then subjected to western blotting, and were then immunoreacted with anti-phosphoserine/threonine antibody for detection of phosphorylation of Ikaros. Graphs demonstrate p-Ikaros expression level by densitometry. $^{*}p<0.05$, compared to each group.

3B). 그러나 특이적으로 감마선 조사량 0.05 Gy에서 p-ERK의 유의적 증가가 나타났으며, 0.5 및 2 Gy에서는 다시 감소하는 효과가 나타났다 (Fig. 3A).

ERK의 신호전달경로는 세포의 증식과 분화에 관여하는 인자로 알려져 있다 [27]. 급성백혈병환자에서 나타나는 세포과증식 작용에서도 ERK의 비정상적인 활성이 나타나는데, 이는 ERK의 활성화 경로가 면역세포의 증식과 분화에 관여하는 c-myc 단백질을 조절함으로써 나타낸다고 보고하였다 [28]. 이러한 보고는 본 연구결과에서 나타난 0.05 Gy 조사선량에서 특이적으로 나타난 p-ERK의 활성 증가와 림프구의 mitogen에 대한 세포증식 증가 결과와 일치하며, 0.05 Gy에서 p-ERK의 증가가 림프구의 세포증식에 관여한다는 것을 예측할 수 있게 한다.

3.4. 면역세포의 증식과 분화에 관여하는 Ikaros 전사인자에 미치는 영향

저선량 감마선의 노출이 NF-κB의 활성에는 영향이 없었으며, ERK 활성에 유의성을 나타냄으로써 저선량의 노출이 면역세포의 증식과 분화에 영향을 미칠 수 있을 가능성을 가지게 되었다. 따라서 저선량의 노출이 면역세포의 증식과 분화의 조절 전사인자로 알려진 Ikaros의 활성에 미치는 영향을 확인하였다. Ikaros는 면역세포를 생성하는 모든 hematopoetic progenitor에서 발현되며 특히 mature thymocyte, T세포, B세포, 그리고 NK세포에서 높게 발현되는데, Ikaros의 기능이 손상될 경우 T, B세포, NK세포 등의 증식과 분화가 전혀 일어나지 않는다고 보고되어 있다 [29,30]. Fig. 5에서 나타내는 바와 같이 저선량 감마선의 노출은 2 Gy 이하에서 모두 Ikaros의 활성에 변화를 일으켰으나, 0.05 Gy 낮은 조사선량에서 오히려 더 높은 Ikaros의 활성 증가를 보였다.

앞서 나타내었던 실험 결과들과 함께 이번 결과는 0.05 Gy 이하 (또는 0.5 Gy 미만)의 저선량 감마선의 노출이 고선량 감마선이 세포에 미치는 손상과는 확실히 다른 양상을 나타낸다는 것을 입증하고 있으며, 더 나아가 이러한 효과가 실제 임상적으로 항염증 또는 면역증강이라는 호메시스 효과를 나타낼지, 적어도 인체에 무해할지에 관한 연구는 좀 더 체계적이고 구체적으로 연구되어져야 할 것으로 보인다.

4. 결론

감마선 노출에 관한 인체에 미치는 영향에 대한 연구가 매우 중요시되고 있음에도 불구하고 지금까지의 연구는 주로 고선량 방사선 노출에 관한 연구에 초점이 맞추어져 있었다. 본 연구는 2 Gy 이하의 저선량 감마선 노출에 대하여 T세포 B세포 림프구들의 mitogen에 관한 세포증식능의 변화, 염증사이토카인의 발현변화, 염증관련 전사인자 및 관련 세포내 kinase들의 변화를 측정함으로써 저선량 노출이 염증반응 유발에 관한 영향에 대하여 구체적인 과학적 근거를 제시하고자 하였다. 연구결과 0.5 Gy 이상의 저선량에서는 mitogen LPS와 ConA에 대한 림프구 세포증식이 모두 억제되었으나, 0.05 Gy에서는 오히려 증가하는 긍정적인 효과가 나타났다. Th1 세포에서 분비하는 염증반응을 일으키는 주요사이토카인 IFN-γ는 변화가 없었으나, 0.5 Gy 이상에서 IL-2의 증가가 나타났고, Th2세포가 분비하는 알러지 반응에 관여하는 IL-4와 자가면역질환에 관여하는 IL-17 역시 0.5 Gy 이상에서 증가하였다. 그러나 0.05 Gy의 매우 낮은 저선량에서는 IL-2, IL-4, IL-17 모두에서 대조군과 차이가 없었으며, 항염증 사이토카인으로 알려진 IL-10이 다른 0.5 및 2 Gy군과 다르게 오히려 증가하는 효과를 나타냄으로써 0.05 Gy 이하 (또는 0.5 Gy 미만) 노출에서의 감마선은 인체 긍정적인 반응인 호메시스 효과에 대한 가능성을 제시해 주었다. 세포내 신호전달경로 연구에서도 염증반응을 일으키는 JNK, p38, NF-κB의 활성화에는 영향을 미치지 않았으나, 0.05 Gy에서 특이적으로 세포증식 및 분화에 관련 있는 ERK와 Ikaros의 활성을 증가시킬 수 있다는 가능성을 보여주었다.

종합적으로 볼 때, 저선량 감마선 노출에 대한 IL-2 등에 관한 염증유발인자의 증가는 0.5 Gy 이상에서 발견되는 것으로 보이며, 0.5 Gy 미만 (또는 0.05 Gy 이하)에서 염증유발인자들은 증가하지 않았으며, 오히려 mitogen에 대한 림프구 세포증식증가, 항염증 사이토카인 IL-10의 증가, 세포 증식 및 분화인자 ERK 및 Ikaros의 활성 증가로 비장세포에 긍정적인 효과를 나타내었다. 본 연구는 의료용 방사선 작업 종사자, 원자력 발전소 또는 작업장 인근 주민들이 일상생활에서 노출될 수 있는 안전한 범위의 감마선에 대한 선량 연구에 있어서 크게 기여할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Kerr, G. D., S. D. Egbert, I. Al-Nabulsi, H. L. Beck, H. M. Cullings, S. Endo, M. Hoshi, T. Imanaka, D. C. Kaul, S. Maruyama, G. I. Reeves, W. Ruehm, A. Sakaguchi, S. L. Simon, G. D. Spriggs, D. O. Stram, T. Tonda, J. F. Weiss, R. L. Weitz, and R. W. Young (2013) Workshop report on atomic bomb dosimetry-residual radiation exposure: recent research and suggestions for future studies. *Health Phys.* 105: 140-149.
2. Shahbazi-Gahrouei, D., M. Gholami, and S. Setayandeh (2013) A review on natural background radiation. *Adv. Biomed. Res.* 2: 65.
3. Zhao, W. and M. E. Robbins (2009) Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: Therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* 16: 130-143.
4. Singh, A. and H. Singh (1982) Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and postirradiation therapy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 39: 69-107.
5. Fridovich, I. (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.
6. Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
7. Mirzayans, R., B. Andrais, A. Scott, Y. W. Wang, D. Murray (2013) Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 22409-22435.
8. Panganiban, R. A., A. L. Snow, and R. M. Day (2013) Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 15931-15958.
9. Wojcik, A., E. Gregoire, I. Hayata, L. Roy, S. Sommer, G. Stephan, and P. Voisin (2004) Cytogenetic damage in lymphocytes for the purpose of dose reconstruction: a review of three recent radiation accidents. *Cytogenet. Genome. Res.* 104: 200-205.
10. Luckey, T. D. (1982) Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. *Health Phys.* 43: 771-789.
11. Nambi, K. S. and S. D. Soman (1987) Environmental radiation and cancer in India. *Health Phys.* 52: 653-657.
12. Bloom, E. T., M. Akiyama, Y. Kusunoki, and T. Makinodan (1987) Delayed effects of low-dose radiation on cellular immunity in atomic bombsurvivors residing in the United States. *Health Phys.* 52: 585-591.
13. Hildebrandt, G., M. P. Seed, C. N. Freemantle, C. A. Alam, P. R. Colville-Nash, and K. R. Trott (1998) Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 74: 367-378.
14. Finkel, T. (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 248-253.
15. Rhee, S. G. (1999) Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* 31: 53-59.
16. Macklis, R. M. and B. Beresford (1991) Radiation hormesis. *J. Nucl. Med.* 32: 350-359.
17. Modiano, J. F., J. Mayor, C. Ball, C. G. Chitko-McKown, N. Sakata, J. Domenico-Hahn, J. J. Lucas, E. W. Gelfand (1999) Quantitative and qualitative signals determine T-cell cycle entry and progression. *Cell Immunol.* 197: 19-29.
18. Craddock, D. and A. Thomas (2006) Cytokines and late-life depression. *Essent. Psychopharmacol.* 7: 42-52.
19. Misson, D. R., D. R. Abdalla, A. M. Borges, D. S. Shimba, S. J. Adad, M. A. Michelin, and E. F. Murta (2011) Cytokine serum levels in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade II-III treated with intralesional interferon-α 2b. *Tumori.* 97: 578-584.
20. Zou, W. and N. P. Restifo (2010) T(H)17 cells in tumor immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 248-256.
21. Andersen, M. H., J. Gehl, S. Reker, L. Ø. Pedersen, J. C. Becker, P. Geertsen, and P. Straten (2003) Dynamic changes of specific T cell responses to melanoma correlate with IL-2 administration. *Semin. Cancer Biol.* 13: 449-459.
22. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Ho-

ward, K. W. Moore, and A. O'Garra (1991) IL-10 acts on the antigenpresenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146: 3444-3451.

23. Homey, B., M. Steinhoff, T. Ruzicka, and D. Y. Leung (2006) Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 118: 178-189.
24. Koo, H. J., S. A. Jang, K. H. Yang, S. C. Kang, S. Namkoong, T. H. Kim, D. T. Hang, and E. H. Sohn (2013) Effects of red ginseng on the regulation of cyclooxygenase-2 of spleen cells in whole-body gamma irradiated mice. *Food Chem. Toxicol.* 62: 839-846.
25. Rithidech, K. N., M. Tungjai, P. Reungpatthanaphong, L. Honikel, and S. R. Simon (2012) Attenuation of oxidative damage and inflammatory responses by apigenin given to mice after irradiation. *Mutat. Res.* 749: 29-38.
26. Lin, C. C., H. L. Hsieh, R. H. Shih, P. L. Chi, S. E. Cheng, and C. M. Yang (2013) Up-regulation of COX-2/PGE2 by endothelin-1 via MAPK-dependent NF-κB pathway in mouse brain microvascular endothelial cells. *Cell Commun. Signal.* 11: 1-14.
27. Shen, L. and G. Du (2012) Lycium barbarum polysaccharide stimulates proliferation of MCF-7 cells by the ERK pathway. *Life Sci.* 91: 353-357.
28. Li, Q., L. Huai, C. Zhang, C. Wang, Y. Jia, Y. Chen, P. Yu, H. Wang, Q. Rao, M. Wang, and J. Wang (2013) Icaritin induces AML cell apoptosis via the MAPK/ERK and PI3K/AKT signal pathways. *Int. J. Hematol.* 97: 617-623.
29. Nichogiannopoulou, A., M. Trevisan, S. Neben, C. Friedrich, K. Georgopoulos (1999) Defects in hemopoietic stem cell activity in Ikaros mutant mice. *J. Exp. Med.* 190: 1201-1214.
30. Wu, L., A. Nichogiannopoulou, K. Shortman, and K. Georgopoulos (1997) Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity.* 7: 483-492.