

마우스 조직에서 방사선에 의한 Apoptosis의 마우스계간 이형성

¹연세대학교 의과대학 치료방사선과학교실, ²연세 암센터,
³연세 임상의학 연구소,

성진실^{1,2} · 김성희¹ · 이원재³ · 서창옥^{1,2} · 민진식²

Strain-Specific Differences in Radiation-Induced Apoptosis in Murine Tissues

Jinsil Seong, M.D.^{1,2}, Sung Hee Kim, M.D.¹, Won Jae Lee, Ph.D.³
Chang Ok Suh, M.D.^{1,2} and Jin Sik Min, M.D.²

¹Department of Radiation Oncology, Yonsei University Medical College,
²Yonsei Cancer Center, ³Yonsei Medical Research Center,
Seoul, Korea

Purpose: To characterize strain-specific differences in radiation response in murine tissues with different radiosensitivity.

Materials and Methods: Six-week old male mice of 2 strains, C57Bl/6J and C3H/HeJ, were given whole body γ -radiation with a single dose of 10 or 25 Gy. At different times after irradiation, mice were killed and tissues with different radiosensitivity, thymus and liver, were collected. Each tissue sample was stained with hematoxylin and eosin and apoptotic cells were scored. Expression of p53, Bcl-2, Bcl-x, and Bax was analysed by western blotting and densitometry.

Results: Radiation induced massive apoptosis in thymus with a peak level at 8 h after radiation. With 10 Gy irradiation, apoptotic indices in C57Bl/6J and C3H/HeJ were $81.0 \pm 2.5\%$ and $59.4 \pm 4.0\%$, respectively ($p < 0.05$). Radiation upregulated the expression of p53, Bcl-x, and Bax, but not Bcl-2; p53 with a peak level of 2.5 fold (C57Bl/6J) and 1.4 fold (C3H/HeJ) at 4 h, Bax with a peak level of 2.6 fold (C57Bl/6J) and 1.3 fold (C3H/HeJ) at 8 h, and Bcl-x with a peak level of 11.1 fold (C57Bl/6J) and 8.2 fold (C3H/HeJ) at 8 h after radiation. In liver, however, radiation-induced apoptosis was minimal (peak apoptotic index of 2.1% in C57Bl/6J and 1.7% in C3H/HeJ). None of p53, Bcl-2, Bcl-x, and Bax was significantly increased.

Conclusions: Induction of apoptosis and regulation of related genes by radiation were tissue specific. Strain difference of radiation-induced apoptosis was well coupled with the

induction of related genes in thymus, a radiosensitive tissue. This study shows that quantitative difference of radiation induced apoptosis by strain is regulated at the gene level with the involvement of multiple genes.

Key Words: Radiation, Apoptosis, p53, Bcl-2, Bcl-x, Bax

서 론

전리 방사선은 생체 조직에서 세포사를 유도하며, 정상 조직 측면에서 보면 방사선 치료에 있어서 충분한 양의 방사선을 투여하는 데에 심각한 장애가 되고 있다. 정상 조직의 손상은 정상 조직의 방사선 감수성의 표현형으로 볼 수 있으며, 방사선 감수성이 개체간에 이형성을 보인다는 것은 *in vitro* 실험 및 임상적으로 관찰되는 유전 질환자들의 방사선 반응 등을 통하여 이미 정립된 개념으로 받아들여지고 있다. 방사선 감수성이 극단적으로 높은 집단으로는 ataxia-telangiectasia(AT) (1~6), 기저 세포암 증후군(7), Fanconi씨 증후군(4)같은 유전적 질환을 들 수 있으며 이는 방사선 감수성이 유전적으로 조절된다는 증거로 생각할 수 있다. 이러한 유전 질환 등은 대부분 단일 유전자의 이상에서 비롯되는 것으로 보고되었다. 그러나 인구 집단에서 보이는 개체간 방사선 감수성의 차이는 아마 다수 유전자가 관여되었을 가능성이 높아 보인다. 인구 집단에는 유전적 다형성이 존재하므로 민감한 집단과 그렇지 않은 집단이 존재할 것이라고 추정할 수 있다. 따라서, 이러한 방사선 감수성을 관장하는 유전자의 위치나 유전방식, 표현방식 등에 대한 연구가 방사선에 민감한 집단을 정의하고 screen하는 도구로서 중요성을 갖게 될 것이다.

방사선 감수성의 이형성에 유전적 요인이 관련 된다고 가정하면 다음과 같은 의문이 제기될 수 있다. 첫째, 방사선 감수성의 차이가 구체적으로 어느 정도 차이인가, 둘째, 관여되는 유전적 조절 인자의 표현 양상은 어떠한가, 셋째, 동일 개체에서 방사선 감수성의 고저가 한 조직에서 다른 조

직으로 공유되는가. 이 경우 인간을 대상으로 하는 연구는 윤리적 문제 및 실험방법 적용의 난이성 등 수행상의 어려움이 있으므로 적절한 실험적 모델을 설정할 필요성이 대두되었다.

실험 동물에서 마우스계에 따라 방사선 감수성의 차이가 있다는 것은 오래 전부터 언급되어 왔다(8). 최근 Mori등(9)은 몇 종의 마우스에서 방사선에 의해 유도되는 흉선세포의 apoptosis의 수준이 서로 차이가 나는 것을 보고한 바 있으며, C57BL/6N과 C3H/HeMsNrs이 각각 방사선에 민감한 표현형과 방사선에 내성이 높은 표현형으로 기술되었다. 방사선 감수성이 서로 다른 마우스주가 존재한다는 것은 개체간 방사선 감수성의 차이를 연구하는데 매우 가치가 있다. 그 이유는 대부분의 실험실에서 사용하는 *in vitro* 세포주들이 전리 방사선에 의한 세포사에 민감한 변이 세포주들이라는 점에 비하여 마우스계간의 방사선 감수성의 다양성은 자연적으로 발생하는 유전적 다형성(genetic polymorphism)에 기인하므로, 인구 집단에서 보이는 현상과 일치하기 때문이다. 따라서 이들 실험 동물을 모델로 방사선 감수성의 다양성을 연구하여 궁극적으로 인체의 경우로 외삽 적용할 수 있을 것으로 본다.

본 연구에서는 앞서 제기된 의문에 대하여 방사선에 민감한 표현형인 C57Bl/6J 마우스와 방사선에 내성이 높은 표현형인 C3H/HeJ 마우스를 실험모델로 설정하고 *in vivo*에서 방사선 감수성 차이를 방사선에 의하여 유도되는 apoptosis 측면에서 연구하였다. 즉, apoptosis의 유도 수준 및 유전적 조절 요인의 발현양상 등을 분석하고 동일 개체에서 방사선 감수성의 고저가 조직마다 공유되는가를 분석하였다.

재료 및 방법

1) 실험 동물 및 방사선 조사

마우스는 연세대학교 실험동물부에서 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급받은 C57Bl/6J 마우스와 C3H/HeJ 마우스를 사용하였다. 이들은 근교계 마우스로서 주령 6~9주의 웅성 마우스를 실험대상으로 하였고 사육 상자당 5마리씩 사육하였다. 방사선 조사는 cobalt-60 방사선 조사기 (선량률 1.54 Gy/min)를 이용하여 10 Gy, 25 Gy의 전신 방사선 조사를 시행하였다. 조사 후 1~24시간 까지 일정 시간마다 마우스를 경추 탈구사시킨 후 흉선 및 간조직을 채취하였다.

2) apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부는 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 μ m 절편을 만들어 hematoxylin eosin 염색을 시행하였다. 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라(10~11), 마우스의 조직표본에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. apoptosis의 평가는 400 X 광학 현미경하에서 시행하며, 수준의 비교는 다음 공식을 이용하여 apoptotic index (A.I.)를 구하였다. Apoptotic index의 차이는 t-검정으로 그 유의성을 검정하였다.

$$\text{Apoptotic index(\%)} = \frac{\text{number of apoptotic body}}{1500 \text{ nuclei}} \times 100$$

3) western blotting을 이용한 유전물질의 검사

채취한 조직의 다른 일부는 western blotting을 이용하여 apoptosis와 관련된 유전물질의 발현을 분석하였다. 채취한 조직 약 1 mm³을 잘게 부수어 인산 완충액 (PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 0.5% NP40 (Sigma, St. Louise, MO, USA), 1 μ g/ml dithiothreitol (DTT, Sigma), 10 μ g/ml of PMSF (Sigma), 20 mM Tris-hydrochloride (pH 7.6), 150 mM sodium chloride, 5 mM EDTA 등을 포함하는

냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4°C에서 20분간 원심분리하여 단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 polyacrylamide gel에서 100 volt로 1시간동안 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% tween-20를 포함하는 PBS (blocking 액)에 2시간동안 처리하고, 분석하고자 하는 각 유전자에 대한 1차 항체로 2시간 처리하였다. 다시 PBS로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 항마우스 또는 항토끼 항 IgG 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 chemiluminescence detection module, Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 분석하였다. 사용된 항체는 p53 (Ab7, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-2 (Ab 7, Oncogene Science), Bcl-x (Ab 1, Oncogene Science), Bax (p-19, Santa Cruz) 등으로 생산 회사가 추천하는 농도를 사용하였다.

결 과

1) 방사선에 의한 apoptosis의 유도

전신 방사선 조사를 시행한 마우스에서 일정 시간마다 채취한 흉선 및 간조직을 hematoxylin eosin 염색한 후 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라(10~11), 400 X 광학 현미경하에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. 10 Gy의 감마선 조사 후, 흉선조직에서는 apoptosis의 수준이 극심하게 증가하여 조사 4시간 부터는 현미경 시야 하의 대부분의 세포들이 apoptosis를 보였다 (Fig. 1A, B). 반면에 간조직에서는 방사선 조사를 받지않은 대조군에 비하여 apoptosis의 유도가 매우 적었다(Fig. 1C, D). 이같은 양상은 방사선 조사 후 시간 경과에 따른 apoptosis 유도의 역동적 변화에서도 C57Bl/6J 및 C3H/HeJ 마우스에서 공

Fig. 1. Histology of C57Bl/6J mouse tissues, thymus, untreated (A) and 8 h after 10 Gy irradiation (B) and liver, untreated (C) and 8 h after 10 Gy irradiation (D). Arrows indicate apoptotic cells.

히 같이 나타났다. 즉, 흉선조직에서는 방사선 조사 후 8시간 쯤에 apoptosis가 최대로 많이 일어났고 24시간 쯤에 거의 정상 수준에 가깝게 회복이 되었다. 반면에 간조직에서는 apoptosis의 증가가 뚜렷하지 않았다. 즉, 조직의 종류에 따른 apoptosis의 유도 양상의 차이가 마우스계의 종류에 무관하게 일정하게 유지된다는 것을 보여주었다

(Fig. 2A, B). 그러나 유도되는 apoptosis의 양적인 수준을 분석하여 보면 흉선조직인 경우, 10 Gy 조사 후 8시간 쯤의 최대치 A.I.는 C57Bl/6J 및 C3H/HeJ 마우스에서 각각, $81.0 \pm 2.5\%$, $59.4 \pm 4.0\%$ 로서 C57Bl/6J 마우스에서 apoptosis가 유의하게 많이 유도되는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 25 Gy 조사 시에는 C57Bl/6J 및 C3H/HeJ 마우스의 A.I.

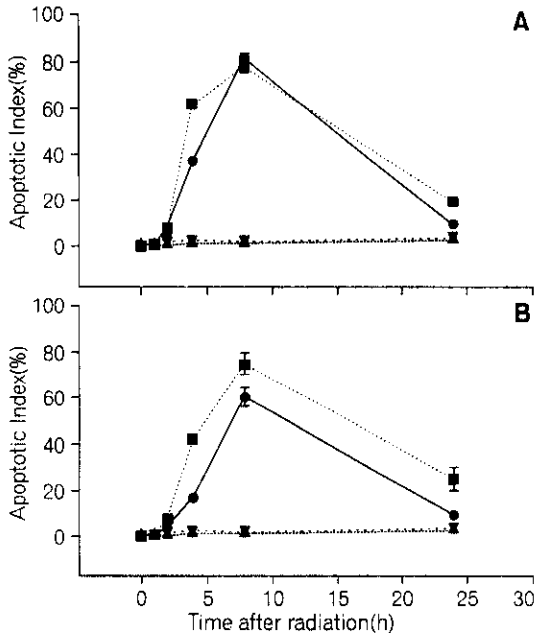


Fig. 2. Radiation induced apoptosis by time in mouse strains, C57Bl/6J (A) and C3H/HeJ (B). Data are shown for 10 Gy (●) and 25 Gy (■). Apoptotic index is percent number of apoptotic body per 1500 nuclei. Vertical bars are standard errors of mean.

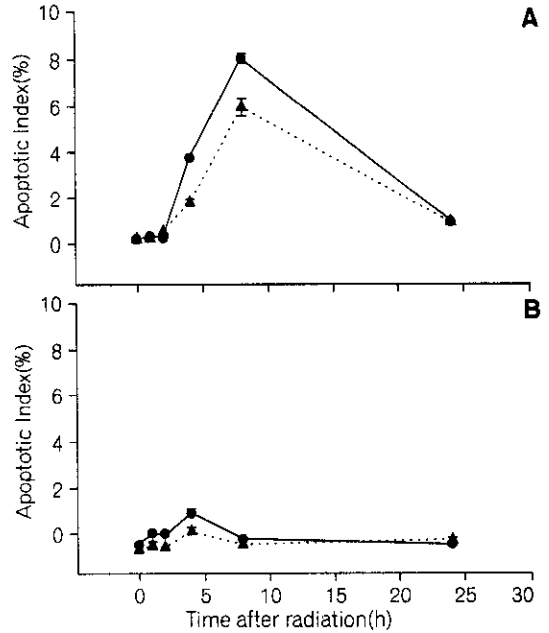


Fig. 3. Radiation induced apoptosis by time in mouse tissues, thymus (A) and liver (B) after 10 Gy irradiation. Data are shown for C57Bl/6J (●) and C3H/HeJ (▲). Apoptotic index is percent number of apoptotic body per 1500 nuclei. Vertical bars are standard errors of mean.

가 각각, $78.3 \pm 2.8\%$, $74.1 \pm 4.7\%$ 로서 C3H/HeJ 마우스는 방사선조사량이 10 Gy에서 25 Gy로 증가되면서 apoptosis도 $59.4 \pm 4.0\%$ 에서 $74.1 \pm 4.7\%$ 로 증가한 반면 C57Bl/6J 마우스에서는 $81.0 \pm 2.5\%$ 에서 $78.3 \pm 2.8\%$ 로 유의있는 변화를 보이지 않았다(Fig. 3A, B). 이는 흉선조직처럼 방사선에 민감한 조직에서는 현미경하에서 제수할 수 있는 수준의 apoptosis가 10 Gy에서 이미 충분히 일어났기 때문으로 해석되며 방사선 조사량에 따른 apoptosis의 증가가 없었다고 보기는 어렵다. 간조직에서는 10 Gy 조사 후 최대치 A.I.는 조사 후 4시간 쯤에 나타났으며, C57Bl/6J 및 C3H/HeJ 마우스의 A.I.가 각각, $1.55 \pm 0.2\%$, $0.8 \pm 0.2\%$ 였고 25 Gy 경우 최대치 A.I.는 조사 후 역시 4시간 쯤에 $2.1 \pm 0.3\%$, $1.7 \pm 0.7\%$ 로서, 흉선조직에 비하여 apoptosis의 유도가 절대적으로 저조하였다.

2) 흉선조직에서 apoptosis 조절 유전물질의 발현

p53, Bcl-2, Bcl-x, 및 Bax 등 유전자 산물들의 발현을 western blotting으로 검사하고 발현 수준의 비교 평가는 densitometry를 이용하여 분석하였다. 흉선조직에서 p53, Bcl-x, 및 Bax는 방사선에 의하여 발현이 유의있게 증가하였다. C57Bl/6J 마우스에서 방사선 조사 후 가장 먼저 변화를 보인 것은 p53로서 1시간부터 증가를 보여 4시간 쯤에 최대치인 2.5배를 보였다. 그 다음으로 Bax가 조사 후 2시간부터 증가하여 8시간 쯤에 최대치인 2.6배를 보였다. Bcl-x는 4시간부터 증가하여 8시간 쯤에 최대치인 11.1배를 보였다. 그러나 Bcl-2는 뚜렷한 증감을 보이지 않았다(Fig. 4). C3H/HeJ 마우스에서는 같은 양상을 보였으며 최대치가 p53, Bcl-x 및 Bax에서 각각, 대조군의 1.6

배, 8.2배 및 1.4배로 나타났다. Bcl-2는 역시 뚜렷한 증감을 보이지 않았다(Fig. 5).

3) 간조직에서 apoptosis 조절 유전물질의 발현

흉선조직에서 p53, Bax, 및 Bcl-x 등의 발현이

방사선에 의하여 유의있게 증가한 데 반하여 간 조직에서는 p53, Bcl-2, Bcl-x, 및 Bax 등 분석한 유전자 산물 어느 것도 뚜렷한 증감을 보이지 않았다. p53의 경우는 western blotting한 결과에서 전혀 발현되지 않았다. 다른 유전자들도 C57Bl/6J

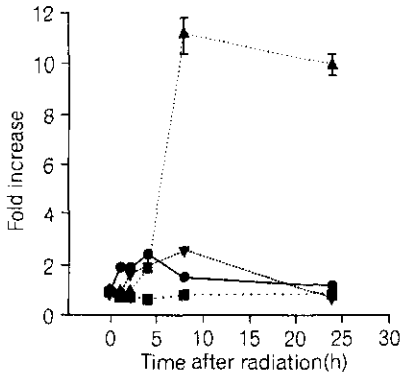


Fig. 4. Western blotting analysis for p53, Bcl-2, Bcl-x, and Bax in thymus of C57Bl/6J mice (right). Densitometric analyses are plotted (left) for p53 (●), Bcl-2 (■), Bcl-x (▲), and Bax (▼). Vertical bars are standard errors of mean.

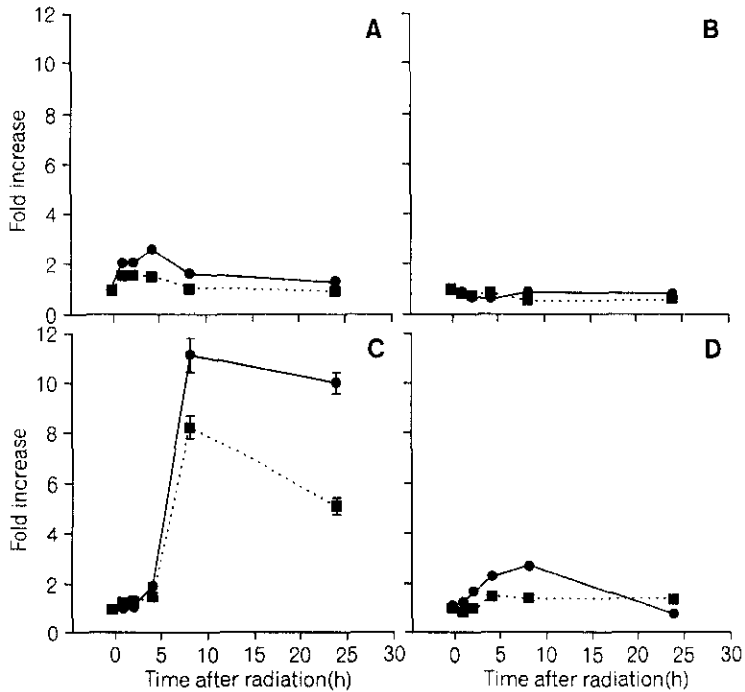


Fig. 5. Expression of p53(A), Bcl-2(B), Bcl-x(C), and Bax(D) in thymus of C57Bl/6J mice(●) and C3H/HeJ mice(■) as a function of time after 25 Gy irradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

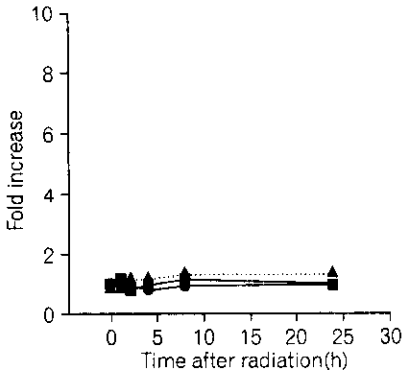


Fig. 6. Western blotting analysis for p53, Bcl-2, Bcl-x, and Bax in liver of C57Bl/6J mice (right). p53 is not detected. Densitometric analyses are plotted (left) for Bcl-2 (●), Bcl-x (■), and Bax (▼). Vertical bars are standard errors of mean.

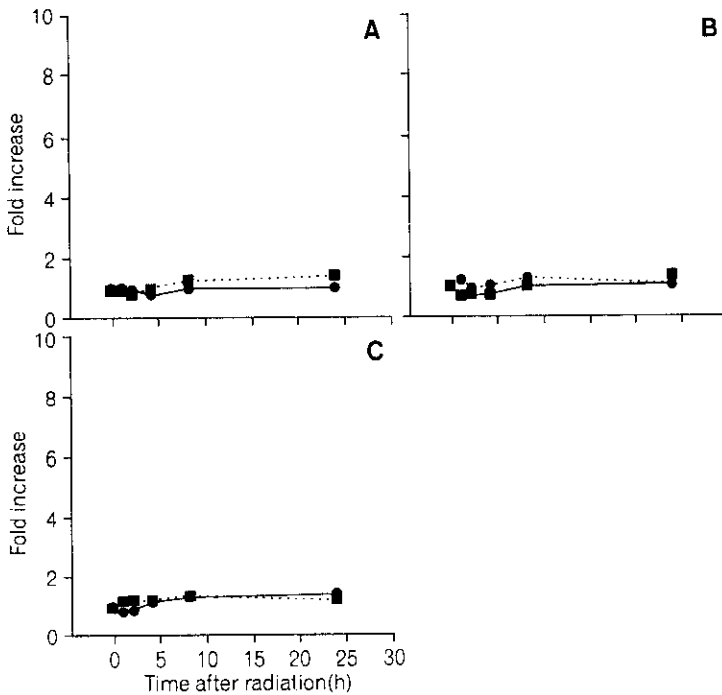


Fig. 7. Expression of Bcl-2 (A), Bcl-x (B), and Bax (C) in liver of C57Bl/6J mice (●) and C3H/HeJ mice (■) as a function of time after 25 Gy irradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

마우스의 경우, Bax, Bcl-2 및 Bcl-x 등의 최대치가 각각, 대조군의 1.2배, 0.98배, 1.2배에 불과하였고(Fig. 6), C3H/HeJ 마우스에서도 같은 양상을 보였다(Fig. 7).

고 찰

방사선 감수성이 개체간에 이형성을 보인다는

것은 *in vitro* 실험 및 임상적으로 관찰되는 유전 질환자들의 방사선 반응 등을 통하여 이미 정립된 개념으로 받아들여지고 있다. Weichselbaum 등(12)은 방사선 치료 후 비정상적으로 심한 방사선 피부염을 보였던 환자들의 피부 섬유아세포를 취하여 방사선 생존율을 실험적으로 측정한 결과를 건강한 지원자들과 비교하였을 때 세포생존 곡선의 보외수(extrapolation number)가 환자의 경우에 현저히 낮았다고 보고하였다. 유사한 결과가 Smith 등(13), Wood 등(14)에 의하여 보고되었으며 Loefler 등(15)은 극심한 피부 반응을 보였던 유방암 환자의 피부 섬유아세포를 분리하여 대조군과 비교한 결과 세포 생존곡선의 α 값이 환자군에서 유의하게 높았다고 보고하였다. 본 연구자도 AT homozygote 및 AT heterozygote 임파양 세포주들과 정상인 임파양 세포주를 대상으로 방사선 감수성의 차이에 대하여 연구한 바, 세포주들의 방사선 감수성이 서로 다른데도 불구하고 적응 반응에 있어서는 유사한 양상을 보인다는 것을 보고하였다(16,17). 이같은 연구결과는 방사선 감수성이란 개체마다 고유한 특성을 지니는 반면, 방사선 감수성의 조절 기전의 어느 부분은 공유할 것이라는 것을 시사한다.

본 연구에서도 C57Bl/6J와 C3H/HeJ 마우스의 방사선에 의한 apoptosis 유도 수준은 흉선 조직의 경우 최대치 A.I.가 각각, $81.0 \pm 2.5\%$, $59.4 \pm 4.0\%$ 로서 유의있는 차이를 보여주었으나 방사선 조사 후 시간에 따른 역동적 변화에 있어서는 조사 후 8시간 쯤에 최대치에 이르고 24시간 후에 회복이 되는, 동일한 양상을 보여주었다. 흥미로운 것은 apoptosis가 현저하게 증가되는 4시간 쯤, 8시간 쯤에 두 마우스주간의 A.I.의 차이가 매우 일정하게 유지되고 있다는 점이다. 즉, 10 Gy 조사시 C57Bl/6J와 C3H/HeJ에서 A.I.가 각각 4시간 쯤에 $36.1 \pm 2.3\%$, $16.1 \pm 1.4\%$ (20% 차이), 8시간 쯤에 $81.0 \pm 2.5\%$, $59.4 \pm 4.0\%$ (21.6% 차이)였고, 25 Gy 조사시 4시간 쯤에 $62.4 \pm 2.6\%$, $41.6 \pm 2.4\%$ (20.8% 차이)였다. 8시간 쯤에는 $78.3 \pm 2.8\%$, $74.1 \pm 4.7\%$ 로서 이러한 차이가 소실되었는데 이는 흉선 조

직처럼 방사선에 민감한 조직에서는 현미경하에서 계수할 수 있는 수준의 apoptosis가 10 Gy에서 이미 충분히 일어났기 때문으로 해석된다. 간조직에서는 방사선 조사 후 최대치 A.I.가 조사 후 4시간 쯤에 나타났으며, C57Bl/6J 및 C3H/HeJ 마우스의 A.I.가 각각, 10 Gy시 $1.55 \pm 0.2\%$, $0.8 \pm 0.2\%$ 였고 25 Gy시 $2.1 \pm 0.3\%$, $1.7 \pm 0.7\%$ 로서, 흉선조직에 비하여 apoptosis의 유도가 절대적으로 저조할 뿐 아니라 최대치가 나타나는 시점도 다르게 나타났다. 그러나 apoptosis의 유도 수준은 간조직에서도 C57Bl/6J 마우스에서 C3H/HeJ 마우스보다 유의있게 높은 것으로 나타났다. 즉, 개체간 방사선 감수성의 이형성이 동일 개체내에서 조직마다 공유되리라는 가능성을 암시한다. 그러나 본 연구에서는 분석 대상 조직이 흉선과 간에 국한되었으므로 더 다양한 조직을 대상으로 연구를 연장하여야 할 것으로 생각된다.

방사선에 의한 apoptosis는 여러 가지 유전물질에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. 이 과정에서 가장 중추적인 것은 p53이며 세포 독성 물질에 의하여 p53가 활성화되면 연속적으로 다른 유전 물질을 활성화시킨다(18~22). Bcl-2, Bcl-x 및 Bax 등은 p53에 의하여 세포내 발현 수준이 증가 또는 감소되어 궁극적으로 apoptosis로 갈 것인지 아니면 생존 쪽으로 갈 것인지 세포의 운명이 결정된다. 본 연구 결과, C57Bl/6J 마우스의 흉선 조직에서 p53는 방사선 조사 후 1시간부터 2.0배로 신속한 증가를 보였고 Bax, Bcl-x 순으로 발현 수준이 증가되는 양상을 보여, 이들의 시차적 연관성을 나타내었다. p53은 조사 후 4시간 쯤 최대치(2.5배)를 보이고 감소하였으나 Bax 및 Bcl-x는 apoptosis가 최대로 일어난 8시간 쯤에 역시 최대로 증가하여(각각 2.6배, 11.1배) 이러한 유전 물질들과 apoptosis와의 밀접한 연계성이 잘 나타났다. C3H/HeJ 마우스의 흉선 조직에서 유전물질들의 발현 양상은 C57Bl/6J 마우스 경우와 동일하게 나타났으며 단지 발현의 증가 폭이 C57Bl/6J 마우스 보다 적게 나타났다. 흥미로운 것은 방사선에 의한 apoptosis의 유도에서 Bcl-2의 증감이 뚜렷하

지 않다는 점이다. Miyashita 등(23)은 M1 백혈병 세포주를 이용한 *in vitro* 실험에서 p53이 활성화되면 bcl-2의 발현이 감소되고 bax의 발현은 증가된다고 보고한 바 있다. 그러나 이들 유전자의 산물들인 Bcl-2, Bax들은 그 증가 폭이 현저히 낮은 것으로 나타나, 그 이유로서 bcl-2가 감소되고 bax가 증가한 세포들이 이미 apoptosis함으로써 실제보다 과소 평가되었을 것으로 기술한 바 있다. 대체로 *in vivo*에서는 희석 효과가 있으므로 유전물질들의 증감이 *in vitro*에서 보다 낮게 나타나는 경향이 있다. 그러나 마우스의 동종암에서 apoptosis 관련 유전 물질들을 분석한 연구(24)에서도 Bcl-2 보다는 Bax의 변화가 나타났음이 보고된 바 있으며, 본 연구에서도 역시 같은 현상을 볼 수 있었다. 가장 두드러진 변화는 Bcl-x의 증가이다. 이는 Bcl-2 계통으로서(25), Bcl-x_S, Bcl-x_L 두 아형으로 구성되며, 이 중 Bcl-x_S는 Bcl-2의 적대자 역할을 한다. 본 연구에서 Bcl-x의 증가가 두드러지고 시차적으로도 apoptosis가 최대로 일어나는 시점과 일치하는 것은 *in vivo*에서 Bcl-x가 apoptosis와 가장 연관이 깊은 조절 인자인 것을 암시한다.

간조직에서는 p53, Bcl-2, Bcl-x, 및 Bax 등 어느 것도 뚜렷한 증감을 보이지 않았고 p53의 경우는 western blotting한 결과에서 전혀 발현되지 않았다. 이는 방사선에 의한 apoptosis의 유도 수준이 흉선과 비교하였을 때, 매우 저조하였던 것과 일치한다. 조직 마다 세포사의 기전이 다른 것으로 알려져 있는데 흉선 및 임파절같은 임파 조직의 세포들은 apoptosis가 세포사의 주 기전인 반면, 그외의 조직에서는 apoptosis가 세포사의 일부분에 국한되는 것으로 알려져 있다. 따라서 방사선 감수성의 연구에 있어서 apoptosis 이외의 세포사에 대하여 연구를 확대해야 할 것으로 보인다.

본 연구는 마우스계에 따른 apoptosis 유도 수준의 실질적인 차이를 보여주었다. 이는 apoptosis가 세포사의 주 기전인 흉선 조직에서 뚜렷하였다. 또한 동일 개체내에서도 흉선 또는 간조직에 따라 차이를 나타내었다. 이러한 차이는 관여되는 유전물질의 발현의 증감과도 잘 일치하였다. 그

러나 유전적 조절물질의 증감이 과연 어느 수준에서 결정되는지는 아직 명확하지 않다. 대개의 표현형이 그 표현형의 발현 수준을 결정짓는 locus를 가지며 이러한 quantitative trait locus (QTL)은 마우스의 당뇨병, 랫드의 고혈압 등에서 이미 밝혀진 바 있다. 향후 방사선에 대한 감수성의 발현 수준을 결정하는 QTL의 정확한 mapping을 시행하는 연구가 수행되어야 하며, 본 연구는 그 기초 자료로서 이용될 수 있을 것이다.

결 론

방사선에 민감한 표현형인 C57Bl/6J 마우스와 방사선에 내성이 높은 표현형인 C3H/HeJ 마우스를 실험모델로 설정하고 *in vivo*에서 방사선 감수성을 apoptosis 측면에서 연구하였다. 그 결과 apoptosis 유도 수준이 마우스계에 따라서 실질적으로 차이를 나타내었다. 이러한 차이는 유전적 조절물질의 증감과 잘 연관되었다. 조직에 따라 정도의 차이는 있으나 C3H/HeJ 마우스에 비하여 C57Bl/6J 마우스의 방사선 감수성이 높은 것이 조직마다 공유되는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 방사선에 의하여 유도되는 apoptosis의 마우스계간 차이는 여러 유전인자가 관련된 조절작용으로 인한다는 것을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Taylor A, Hamden D, Arlett C, Harcourt S, Lehmann A, Stevens S, Bridges B. Ataxia telangiectasia: A human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 1975; 258: 427-429.
2. Hart R, Kimler B, Evans R, Park C. Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia telangiectasia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 1237-1240.
3. Abadir R, Hakami N. Ataxia telangiectasia with cancer. An indication for reduced radiotherapy and chemotherapy doses. *Br J Radiol* 1983; 56: 343-345.
4. Deschavanne P, Debieu D, Fertil B, Malaise E. Re-evaluation of *in vitro* sensitivity of human fibroblasts of different genetic origins. *Int J Radiat Biol* 1986;

- 50: 279-293.
5. Woods W, Byrne T, Tae H. Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiosensitivity. *Cancer* 1988; 62: 2341-2345.
 6. Cole J, Arlett C, Green M, Harcourt S, Priestly A, Henderson L, Cole H, James S, Richmond F. Comparative human cellular radiosensitivity: II. The survival following gamma-irradiation of unstimulated (G0) T-lymphocytes, T-lymphocyte line, lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from normal donors, from ataxia telangiectasia patients and from ataxia telangiectasia heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1988; 54: 929-943.
 7. Stacey M, Thacker S, Taylor A. Cultured skin keratinocytes from both normal individuals and basal cell naevus syndrom patients are more resistant to gamma rays and UV light compared with cultured skin fibroblasts. *Int J Radiat Biol* 1989; 56: 45-58.
 8. Reinhard M, Mirand E, Goltz H, Hoffman J. Mouse-strain differences in response to radiation. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1954; 85: 367-370.
 9. Mori N, Okumoto M, Morimoto J, Imai S, Matsuyama T, Takamori Y, Yagasaki O. Genetic analysis of susceptibility to radiation-induced apoptosis of thymocyte in mice. *Int J Radiat Biol* 1992; 62: 153-159.
 10. Stephens L, Hunter N, Ang K, Milas L, Meyn R. Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. *Radiat Res* 1993; 135: 75-80.
 11. Milas L, Hunter N, Kurdoglu B, Mason KA, Meyn RE, Stephens LC, Peters LJ. Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995; 325: 297-303.
 12. Weichselbaum RR, Ebstein J, Little SJ. In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from patients with unusual clinical responses to radiation. *Radiology* 1976; 121: 479-482.
 13. Smith KC, Hahn GM, Hoppe RT, Earle JD. Radiosensitivity in vitro of human fibroblasts derived from severe skin reaction to radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980; 6: 1573-1575.
 14. Woods WG, Byrne TD, Kim TH. Sensitivity of cultured cells to gamma radiation in a patient exhibiting marked in vivo radiation sensitivity. *Cancer* 1988; 62: 2341-2345.
 15. Loeffler JS, Harris JR, Dahlberg WK, Little JB. In vitro radiosensitivity of human diploid fibroblasts derived from women with unusual clinical responses to definitive radiation therapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 1990; 121: 227-231.
 16. 심진실. 인체 임파양 세포에서 G2기 염색체의 방사선 감수성. 대한치료방사선과학회지 1993; 11: 193-203.
 17. Seong JS, Suh CO, Kim GE. Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 869-874.
 18. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for Cancer. *Cancer and Metastasis Rev* 1995; 14: 3-15.
 19. Korsmeyer SJ. Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. *Immunol Today* 1992; 13: 285-288.
 20. Oltavi ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-6190.
 21. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: and overview. *Cancer and Metastasis Rev* 1992; 11: 95-103.
 22. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608.
 23. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.
 24. 심진실, Hunter N, Milas L. 방사선에 대한 종양의 반응에서 apoptosis의 유도과 이에 관련되는 유전자의 발현. 대한치료방사선과학회지 1998; 15: 187-195.
 25. Todd J, Aitman T, Cornall R, Ghosh S, Hall J, Heard C, Knight A, Love J, McAleer M, Prins J-B, Rodriguez N, Lathrop M, Pressey A, DeLarato N, Peterson L, Wicker L. Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature* 1991; 351: 542-547.
 26. Jacob H, Lindpainter K, Lincoln S, Kusumi K, Bunker R, Mao Y-P, Ganten D, Szau V, Lander E. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 1991; 67: 213-224.
 27. Deng A, Dene H, Rapp J. Mapping of a quantitative trait loci for blood pressure on rat chromosome 2. *J Clin Invest* 1994; 94: 4431-436.