

## Proteomics를 이용한 마우스 조직에서의 방사선 감수성 조절 단백질의 탐색

연세대학교 의과대학 방사선종양학교실, 두뇌한국21 의과학사업단

안 정 희 · 김 지 영 · 성 진 실

**목적:** 방사선 감수성이 다른 마우스 조직에서 apoptosis 유도 수준을 확인하고 방사선 감수성에 관여된 인자를 proteomics를 통해서 확인한다.

**대상 및 방법:** C3H/HeJ 마우스에 10 Gy 방사선을 조사하고 8시간 후 비장과 간을 채취하여 apoptosis 유도 수준을 비교 분석하였다. 조직에서 단백질을 추출하여 2-dimension electrophoresis (2-DE)를 실시하였다. 2-DE에서 방사선에 의해 발현의 변화를 보이는 gel의 spot를 trypsin 처리하여 MALDI-TOF 측정 후 Swiss-prot database를 통하여 단백질을 동정하였다.

**결과:** Apoptosis index는 방사선 조사 후 비장 조직에서  $35.3 \pm 1.7\%$ , 간조직은  $0.6 \pm 0.2\%$ 로 비장에 비해 간 조직이 낮게 나타났다. Proteomics 결과에서 방사선 내성 조직인 간은 ROS대사에 관여되는 단백질인 glutathione S transferase Pi, carbonic anhydrase, NADH dehydrogenase, peroxiredoxin VI, riken cDNA 등이 방사선 조사 후 증가되었고 apoptosis 관련된 단백질인 cytochrome c는 간과 비장 조직에서 확인되었다. 그러나 방사선 민감 조직인 비장에서는 방사선 조사 후 산화적 stress에 관련된 단백질, apoptosis 관련 단백질, 신호 전달에 관련된 단백질, 면역반응, cell cycle, Ca 신호 전달, 대사 cycle에 관련된 단백질 등이 방사선에 관련하여 발현의 변화를 보여 주었다.

**결론:** Apoptosis 유도 수준이 다른 조직에서 apoptosis에 관련된 단백질과 redox에 관련된 단백질은 방사선 감수성 조절에 관련된 것으로 보인다.

**핵심용어:** Proteomics, 방사선 감수성, Apoptosis

### 서 론

방사선 감수성 차이는 세포의 종류, 분화 정도, 증식율과 조절기전에 따라 다르게 나타난다.<sup>1,2)</sup> 일반적으로 정상세포에 비해 종양세포가, 분화가 잘 된 세포보다 미분화세포가, 간엽세포보다 상피세포가 방사선 감수성이 높다고 알려져 있다.<sup>3)</sup> 그러나, 같은 세포라도 방사선 조사에 대한 세포반응은 방사선 흡수선량 이외에도 세포의 생리적 조건, 산소 분압, 조사 환경 등에 따라서 달라진다고 보고되었다.<sup>4)</sup> 또한 ataxia-telangiectasia (AT), 기저 세포암 증후군, Fanconi

씨 증후군 같은 유전 질환은 방사선 감수성이 높은 집단으로 보고되고 있으며, 이것은 방사선 감수성이 유전적으로 조절된다는 간접적인 증거이기도 하다.<sup>5,6)</sup>

간은 정상 상태에서는 분열하지 않으나 손상 등의 자극을 받으면 분열하는 조직으로,<sup>7)</sup> 방사선 감수성이 낮은 조직이나, 비장은 다능성 간 세포가 간세포(stem cell)를 더 생산하거나 혹은 다양한 committed progenitor cell를 생산하기 위해 분열하는 조직이므로,<sup>8)</sup> 간에 비해서 상대적으로 방사선 감수성이 높은 조직이다.<sup>9)</sup>

이에 본 연구자는 방사선의 감수성이 높은 조직인 비장과 방사선 내성 조직인 간에서 방사선 조사 시 감수성의 차이를 apoptosis로 측정하였다. 또한 방사선 유도 수준에 따라서 발현이 변화되는 단백질을 proteomics를 통해서 분석하여 방사선 감수성 단백질을 확인하였고 이에 따른 단백질의 표현 양상을 확인하였다.

이 논문은 2004년 11월 3일 접수하여 2004년 12월 6일 채택되었음.

본 연구는 과학기술부 및 한국과학기술기획평가원의 지원을 받아 2004년도 원자력연구개발사업을 통해 수행되었음.

책임저자: 성진실, 연세대학교 의과대학 방사선종양학교실

Tel: 02)361-8348, Fax: 02)312-9033

E-mail: jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물 및 방사선 조사

8주령의 웅성 마우스를 연세대학교 실험 동물부에서 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급 받았으며 사육 상자 당 5마리씩 사육하였다. 이들은 연세대학교 실험동물부의 지침에 따라 온도(22°C), 습도(55%)가 일정하게 유지된 환경에서 무균음수와 멸균사료로 사육되었다. 방사선 조사는 치료용 선형가속기(Varian Co. Milpitas, CA, USA)를 이용하여 10 Gy의 전신 방사선 조사를 시행하였다. 방사선이 조사되지 않은 대조군과 조사 후 8시간 경과된 마우스 군을 각각 경추 탈구사시킨 후 비장과 간을 채취하였다.

### 2. Apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4  $\mu$ m 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다.<sup>10)</sup> 또한 Apop-Tag kit (Oncor Inc, Gaithersburg, MD)를 이용하여 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay를 하였다.<sup>11)</sup> 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라, 마우스의 조직표본에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. Apoptosis의 평가는 400X 광학 현미경 하에서 시행하며, 1000개의 세포핵 당 나타난 apoptosis의 수를 apoptotic index (A.I.)로 나타내었다. 각각의 A.I.는 실험자 2명이 3번씩 계수하여 평균값을 구하였다.

### 3. Proteomics 분석

#### 1) 2-dimension electrophoresis (2-DE) 하기 위한 sample 준비

조직을 homogenizer로 분쇄 후 sample buffer인 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (Bio-Rad, Hercules, CA), 1% DTT (Sigma, St. Louis, MO), 2% bio-lyte ampholytes (pH 3-10, Bio rad), 0.01% bromphenol blue에 반응시켜 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 10,000 g에서 1시간 원심 분리한 후 상층액을 실험에 사용하였다. 회수된 상층액은 Bradford 법으로 단백질 정량을 하였다.

#### 2) 2-DE

2-DE은 이미 발표된 연구 방법에 따라서 시행하였다.<sup>12)</sup> 단백질 1 mg를 nonlinear immobilized dry strip (pH 3-10, Bio Rad)에 넣고 rehydration시킨 후 20°C에서 10,000 VH로 first dimension electrophoresis을 하였다. 2-DE은 9~18% gradient polyacrylamide gel 사용하여 20°C에서 전기영동을 하였다.

전기영동 후 gel을 40% 메탄올과 5% phosphoric acid를 함유한 고정액에 넣어 단백질을 고정시키고 37% 메탄올, 17% ammonium sulfate, 5% phosphoric acid, 0.1% Com-massie brillant blue G-250 (Bio rad)을 함유한 stain 용액에 넣어 단백질을 염색하였다. 염색된 gel을 scan하여 PD Quest 2-D software (Bio rad)를 이용하여 image를 분석하였다.

3) In gel digestion 및 MALDI - TOF에 의한 분석  
방사선에 의해 발현 차이를 보이는 gel의 spot를 trypsin digestion 처리 후 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Micromass, UK)에서 측정하였다. MALDI-TOF에서 측정된 peptide의 monoisotopic peak data는 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.4/msfit.htm>)의 Swiss-prot database 또는 NCBI database를 이용하여 단백질을 확인하였다. Mass tolerance 값은 50 ppm에서 시행하였다.

### 4. Western blotting을 이용한 유전물질의 검사

채취한 조직의 약 1 mm<sup>3</sup>을 잘게 부수어 인산 완충액 (pH 7.4)으로 3회 세척한 후 100 mM HEPES, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 2% NP40, 2 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glyceraldehyde-phosphate, 2 mM sodium fluoride, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin 등을 포함한 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4°C에서 20분간 원심분리하여 단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 상층액 단백질 용액은 polyacrylamide gel에서 전기 영동시킨 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% Tween-20를 포함하는 Tris-buffered saline (TBST)에 2시간 동안 처리하고, 분석하고자 하는 각 유전자에 대한 1차 항체로 2시간 처리하였다. 다시 TBST로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 2차 항체로 1시간 처리한 후 ECL Western blotting detection system (Amersham, UK)을 사용하여 luminescent image analyzer (Fuji film, Japan)로 band의 농도를 조사하였다. 발현 수준의 평가는 densitometry (Amersham, UK)를 이용하여 분석하였다. 사용된 항체는 Bcl-X<sub>L</sub>S (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), Bcl-2, Bax, cytochrome c (N-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), peroxiredoxin (gift from Dr. Cha),  $\alpha$ -Tubulin (Oncogene Science, Manhasset, NY) 등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다.

결 과

1. 방사선에 의한 Apoptosis 의 유도

전신 방사선 조사를 시행한 마우스에서 채취한 비장과 간 조직은 hematoxylin-eosin과 TUNEL으로 각각 염색한 후

apoptosis의 형태학적 특징에 따라 400 X 광학 현미경 하에서 apoptosis의 수준을 평가하였다(Fig. 1). TUNEL 반응에 양성인 핵은 짙은 갈색으로 염색되어 정상 세포와 구분이 잘 되었으며 방사선 처리 후 apoptosis가 증가되었다(Fig. 1B). 10 Gy 방사선 조사 후 간은 비장에 비해 상대적으로 apoptosis의 감소가 관찰되었다. 비장 조직에서는  $35.3 \pm$

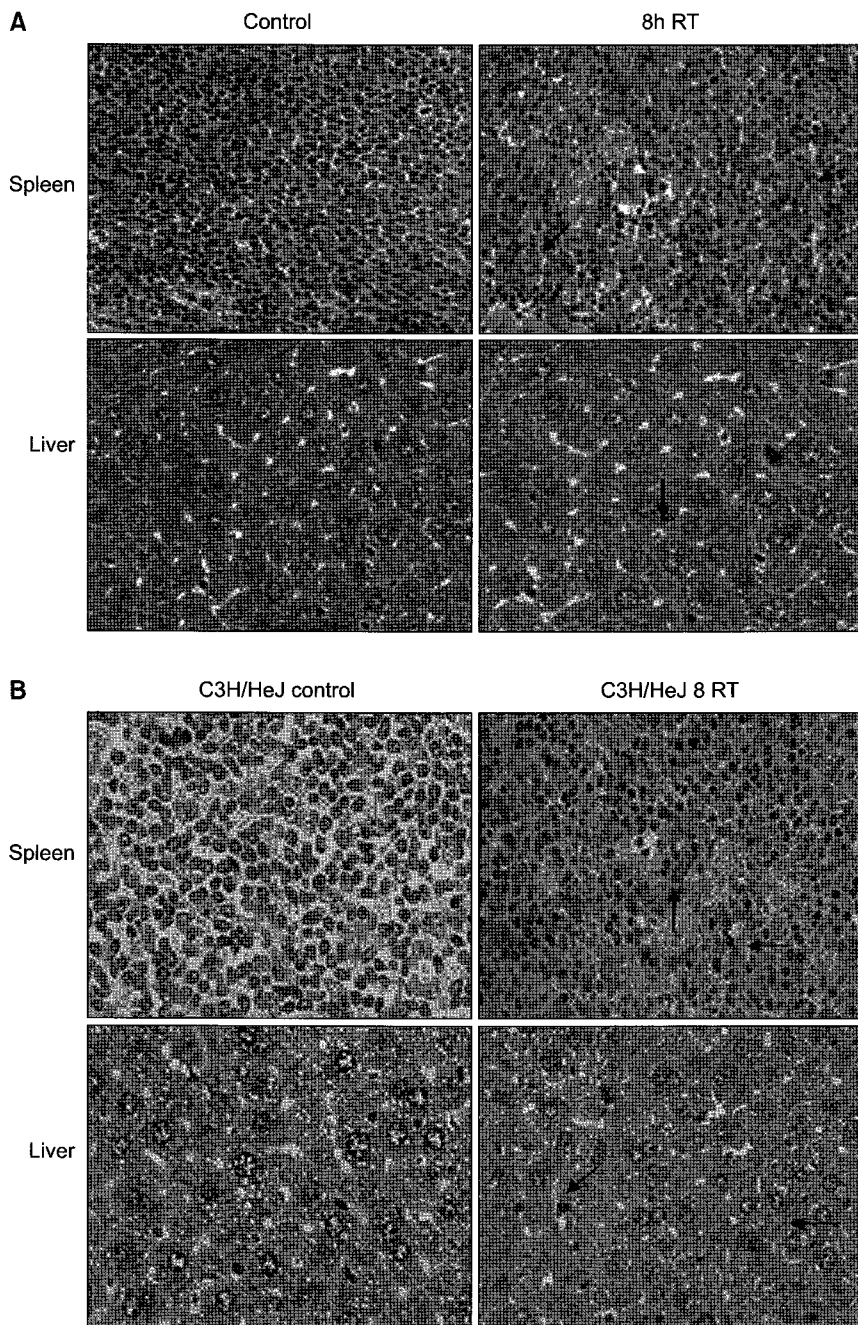


Fig. 1. Histology and immunohistology of untreated tissues and irradiated spleen and liver of C3H/HeJ mice. (A) hematoxylin- eosin staining (a-d), (B) TUNEL for detection of apoptosis (e-h). Magnification,  $\times 400$ . Arrow indicated apoptosis cells.

1.7%이고 간조직  $0.6 \pm 0.2\%$ 로 apoptosis가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1,  $p < 0.05$ ).

2. 간에서 방사선 조사 후 발현의 변화를 보이는 단백질

본 연구는 방사선 감수성의 차이를 보이는 두 조직에서 proteomics방법을 통해서 감수성 단백질의 역할을 확인하

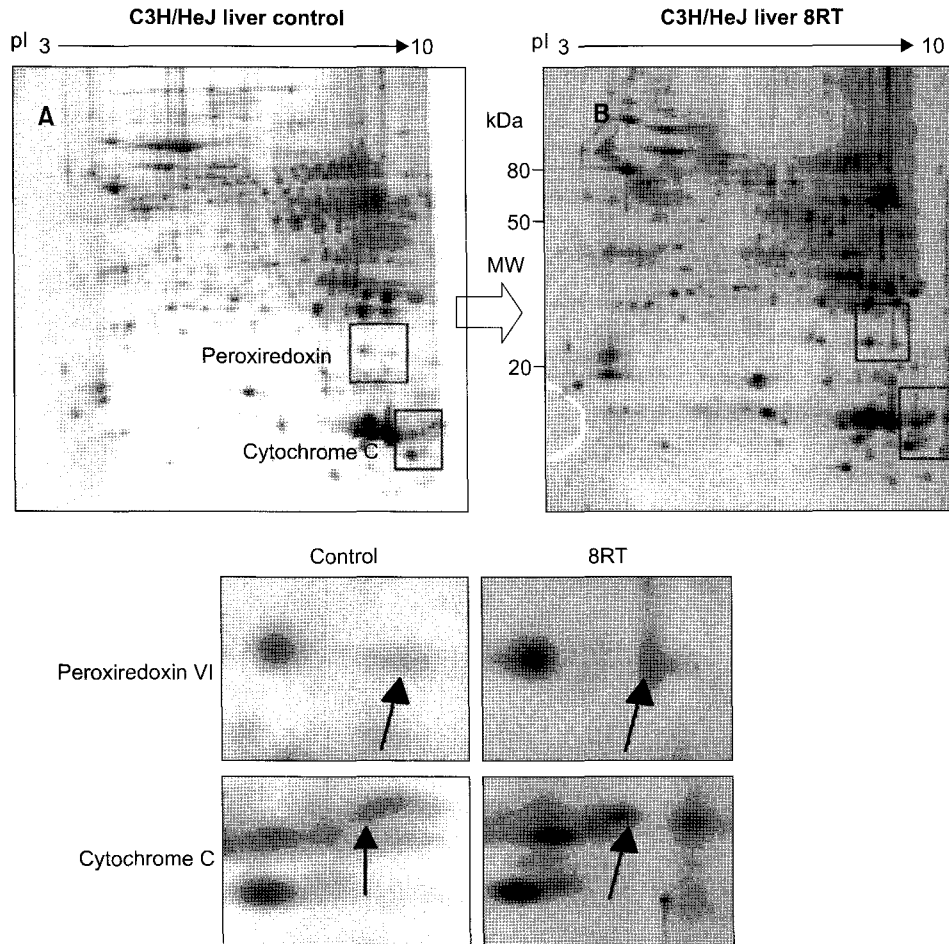


Fig. 2. 2-DE images of master gel visualized by Coomassie blue staining in control and irradiated spleen tissues.

Table 1. Oxidative Stress-Related Proteins that Exhibited Expression between Liver and Spleen after Radiation Treatment

Protein name	Spleen Con→RT	Liver Con→RT	Coverage (%)	MW/pI	Accession code
Gluthathione S transferase P1	—	Up	38	23,537/7.7	P46425
Gluthathione S transferase P2	—	Up	35	23,609/7.7	P19157
Peroxiredoxin VI	—	Up	30	21898/9.1	6755114
NADH dehydrogenase	—	Up	20	51,551/7.4	1334705
Carbonic anhydrase	—	Up	30	29,239/6.5	12834481
RIKEN cDNA	Up	Up	25	17181/4.6	13385208
Stress-induced phosphoprotein 1	Up	—	20	62640/6.4	P31948
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	Up	—	16	61752/8.2	P30038
Heat shock protein 1A	Up	—	21	70550/5.9	P55063

Up represent: Up-regulated: 3 fold increased after radiation treatment

였다. 염색된 gel에서 각각 800~100개의 spot가 검출되었고 PDQUEST program을 통해 정상 그룹과 방사선 조직간 단백질 발현 차이는 3배로 분석되었다. 발현의 차이를 보이는 28개 spot를 trypsin을 이용하여 digestion 처리하고, 이를 MALDI-TOF 질량 분석기로 측정된 peptide의 mass data를 MS-Fit의 NCBI database에서 단백질을 확인하였다(Fig. 2).

Apoptosis index결과에서 보듯 비장에 비해서 방사선 내성 조직인 간에서는 방사선 처리 후 28개의 단백질의 발현의 변화를 보였으며, 그 중에서 24개의 단백질은 증가하였으나 4개의 단백질은 방사선 조사 후 감소하였다. 이들 단백질은 G-type 관련단백질, ROS 대사에 관련된 단백질, 대사 cycle에 관련된 단백질로 구분된다. 특히 ROS대사에 관

여되는 단백질로 glutathione S transferase Pi (GSTP)와 carbonic anhydrase와 NADH dehydrogenase와 peroxiredoxin VI (Prx VI)와 Riken cDNA는 방사선 조사 후 증가 되었다 (Table 1). Fig. 2에서는 redox 관련 단백질인 Prx VI의 발현이 방사선 처리 후 증가된 양상을 보여 주었다. 또한 Western blotting 결과에서도 Prx VI의 발현이 proteomic결과와 일치됨을 확인하였다(Fig. 4A).

### 3. 비장에서 방사선 조사 후 발현의 변화를 보이는 단백질

Apoptosis index에서 비장은 간에 비해 방사선에 민감한 조직으로 방사선 민감성에 관련된 단백질을 2 D 전기영동을 통해 분석한 결과 간 조직에 비해서 3배 이상의 발현

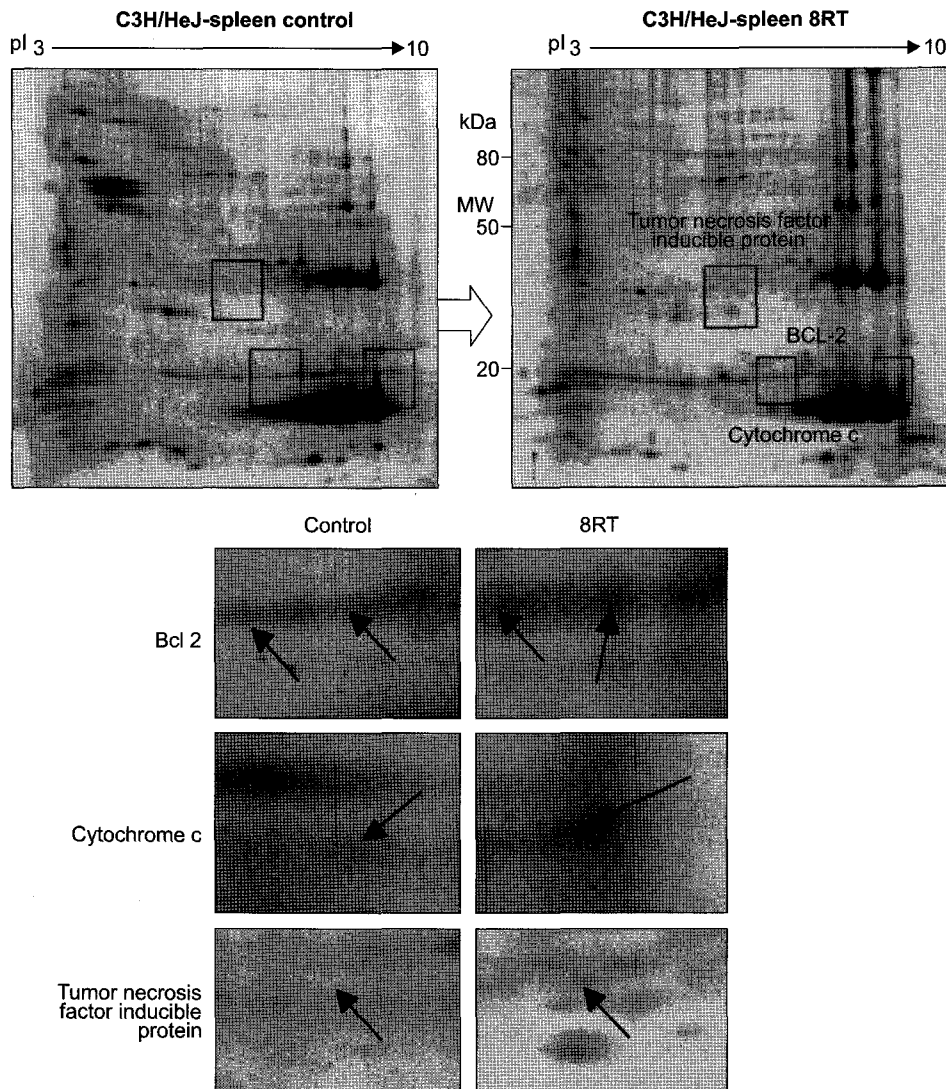


Fig. 3. 2-DE images of master gel visualized by Coomassie blue staining in control and irradiated liver tissues.

**Table 2. Apoptosis Related Proteins that Exhibited Expression between Liver and Spleen after Radiation Treatment**

Protein name	Spleen Con→RT	Liver Con→RT	Coverage (%)	MW/pI	Accession code
Cytochrome c oxidase	Up	Up	45	13,695/9.3	2144362
M-calpain	Down	—	20	37,809/4.7	P43367
Bcl-2- related protein A1	Up	—	31	19,914/5.2	Q07440
CD59A glycoprotein precursor	Up	—	17	13648/7.5	O55186
Bcl 2l2 protein	Up	—	34	19,119/6.9	25955645
Iodothyronine deiodinase	Up	—	13	31,070/7.6	4009517
Fas antigen	Up	—	23	36,103/6.6	4996371
Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6 precursor	Up	—	31	31,232/6.5	1351315

Up represent: Up-regulated 3 fold increased after radiation treatment, Down represent: Down-regulated 3 fold decreased after radiation treatment

**Table 3. List of Proteins Showing Similar Pattern of Change in Spleen and Liver Tissues after Radiation Treatment**

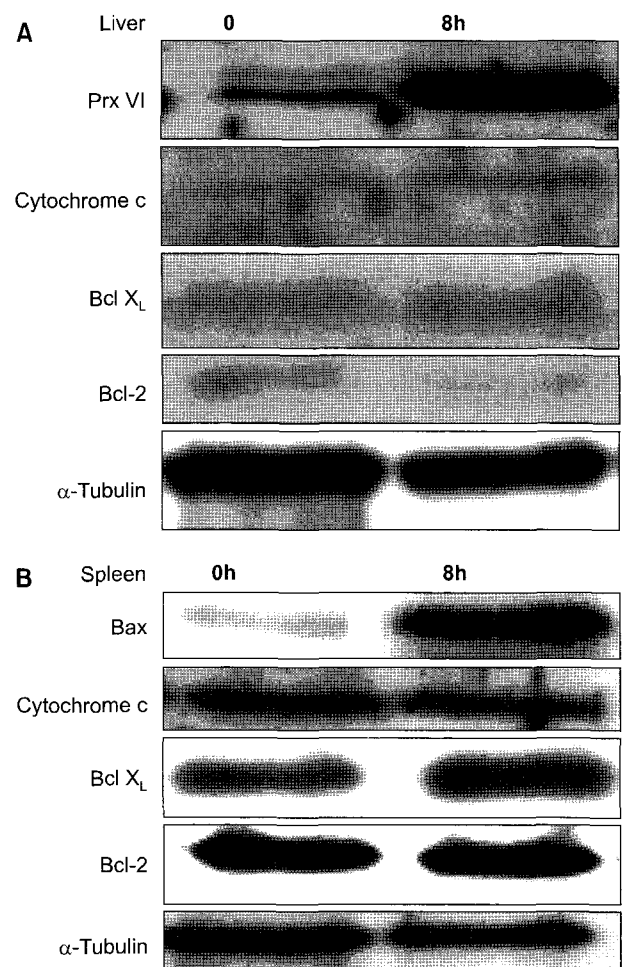
Protein name	Changed in pattern	Coverage (%)	MW/pI	Accession code
Cytochrome c oxidase	Up	45	13,695/9.3	2144362
RiKen cDNA	Up	25	17,181/4.6	13385208
Imunoglobuline kappa light chain variable region	Up	44	9538/8.0	11137493
Imunoglobuline heavy chain variable region	Up	50	9552/8.9	11137493
Imunoglobuline heavy chain variable region	Up	53	13,606/6.9	4530543

증감을 보인 spot는 60개의 단백질로 확인하였다. MALDI-TOF로 측정 결과 산화적 stress에 관련된 단백질, apoptosis에 관련 단백질, 신호 전달에 관련된 단백질, 면역반응, cell cycle, Ca signal, 대사 cycle에 관련된 단백질이 방사선 조사 후 발현의 변화를 보인 단백질로 확인되었다(Fig. 3). 그 중에서 산화적 stress에 관련된 단백질인 stress-induced phosphoprotein 1과 riken cDNA와 그리고 heat shock protein 1A 등이 상대적으로 방사선 조사 후 많이 증가되었다(Table 1). 간과 비장 조직 모두에서 cytochrome c와 면역반응에 관련된 단백질인 immunoglobuline 등이 방사선 조사 후 동일하게 발현된 것을 확인하였다(Table 3).

#### 4. 방사선 조사 후 두 장기에서 다르게 발현된 단백질

방사선 감수성의 증가는 apoptosis 유도 증가에 의하여 이루어지기 때문에 apoptosis에 관련된 단백질의 변화는 방사선 감수성과 관련되어 있다. 이에 방사선 감수성이 다른 두 조직에서 apoptosis 관련 단백질을 조사하였다.

Apoptosis 유도 수준이 낮은 간 조직에서는 방사선 조사



**Fig. 4.** Protein expression of irradiated liver and spleen tissue and normal tissue by Western blot analysis.

후 cytochrome c의 발현만을 확인하였다(Table 2, Fig. 2). 그러나 방사선에 의해 유도되는 apoptosis 수준이 높은 비장 조직에서는 apoptosis의 관련된 단백질 중에서 cytochrome c,

iodothyronine deiodinase, CD59A glycoprotein precursor 단백질, fas antigen, tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6 precursor 단백질이 방사선 조사 후 발현이 증가 되었다. 그리고 p53 inhibitor인 M-calpain은 방사선 조사 후 발현 양상이 감소 되는 것을 확인 하였다. 또한 비장 조직에서는 Bcl-2의 이성체 단백질의 발현들이 방사선 조사 후 증가됨을 확인하였다(Table 2).

Proteomics에서 확인된 apoptosis 관련 단백질의 발현을 Western blotting으로 확인한 결과 cytochrome c는 간 조직에서 방사선 조사 후 발현이 증가하였으나 비장에서는 방사선에 의한 변화는 경미하였다. 또한 Bcl-2의 발현은 비장에서 방사선 조사 후 Bax의 발현이 증가하였으나 Bcl-X<sub>L</sub>과 Bcl-2의 발현의 변화는 미비하였다(Fig. 4).

### 고안 및 결론

방사선에 의한 정상 조직의 손상에 대한 기존 연구 방법은 유전자 수준 변화를 유전체의 구조적 측면과, 유전자의 RNA 표현수준에서 전체적으로 파악할 수 있는 기회를 제공하였으나 최종적으로 생성된 단백질의 표현수준과 단백질들 간의 상호관계를 전체적으로 파악할 수 없는 단점이 있다. 본 연구에서는 proteomics를 적용하여 방사선의 감수성을 조절하는 단백질을 탐색, 확인하여 단백질의 표현 수준과 이들 간의 상호 관계를 파악하였다.

본 연구에서 C3H/HeJ 마우스 동일 개체에서 조직간 방사선 유도수준을 확인한 결과 비장 조직에서 방사선 조사 후 간 조직에 비해서 apoptosis 유도 수준이 높았다. 방사선 감수성은 개체간, 조직 종류에 따라서 다르게 나타나게 된다. 본 연구 결과에서도 apoptosis 유도 수준에 따라서 방사선 감수성이 다르게 나타나는 것으로 보이며 동일 개체에서 조직간 방사선 감수성이 다름을 확인할 수 있다. 이것은 앞선 연구 결과에서 방사선에 민감한 표현형인 C57BL/6J 마우스와 방사선에 내성이 높은 C3H/HeJ 마우스에서 방사선 감수성의 차이를 확인하였고 방사선 감수성의 이형성이 동일 개체에서 조직마다 공유되는 것을 흉선과 간 조직에서 확인한 결과와<sup>2)</sup> 일치하였다.

방사선에 의한 apoptosis 신호 기전은 Fas/Fas-ligand,<sup>13)</sup> sphingomyelin/ceramide 경로,<sup>14)</sup> 조기 발현유전자 발현,<sup>15)</sup> caspase계 cysteine protease<sup>16)</sup>나 TNF- $\alpha$ 에<sup>17)</sup> 의해 유도되고 있다고 보고되고 있다. 앞선 연구에서는 apoptosis 관련된 유전자 산물을 확인한 결과 흉선 조직에서는 p53, Bcl-X, Bax의 발현이 증가되었으나 간 조직에서는 유전 산물이 그다지 증가된 양상의 결과를 보여 주었다. 이 같은 연구

결과에서 보듯 방사선 감수성 차이는 apoptosis 유전 물질의 발현 차이에 의해서 결정되는 것으로 보인다.

특히 cytochrome c는 정상적으로 미토콘드리아의 내외막 사이에 존재하여 respiratory chain에서의 전자 전달자 역할을 수행하지만<sup>18)</sup> apoptosis signal pathway에서는 세포질로 방출된 cytochrome c는 caspase cascade를 자극시켜 apoptosis를 일으킨다고 보고되었다.<sup>19)</sup> 본 연구에서도 cytochrome c의 발현이 방사선 조사 후 비장과 간 조직에서 증가 되었고 Western blotting결과에서도 같은 결과를 보였는데 이것은 방사선에 의한 apoptosis에서 주요한 인자로 작용하는 것으로 보인다.

Bcl-2 단백질계는 anti-apoptosis 인자인 bcl-2와 bcl-X<sub>L</sub>와 pro-apoptosis 인자인 Bcl-Xs, Bad 와 Bax 등을 가지고 있다<sup>20)</sup>. 오 등의 연구 결과에서 뇌 조직의 Bcl-2은 방사선 조사 후 1시간에서는 거의 변화가 없었고 2시간에서는 증가하였고 8시간에서 최고 1.5배의 bcl-2의 증가를 보여 준 것과 같이<sup>21)</sup> 본 연구에서도 Bcl-2는 뒤늦게 활성화되었는데 이것은 apoptosis 억제제로 이용된 것으로 볼 수 있다. 또한 비장 조직에서 방사선 처리 군의 proteomics 결과에서는 Bcl-2의 이성체들이 방사선에 의해 발현이 증가된 것으로 보아 Bcl-2 계통인 Bcl-Xs, Bax 등이 cytochrome c의 방출에 관여 하는 것으로 보여진다. 즉 apoptosis 신호 전달이 일어나는 것으로 볼 수 있다.

본 연구 결과에서 tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6 precursor 단백질이 방사선에 의해 발현이 증가되었다. 이것은 방사선에 의해 TNF- $\alpha$ 가 free radical를 형성하여 세포 독성을 나타내 radiosensitive효과를 가져온다는 보고에서 보는 바와 같이<sup>17)</sup> 조직간의 방사선 민감성과 관련 될 수 있다. 또한 CD 95라고 알려져 있는 fas 및 fas ligand는 apoptosis 신호를 전달하는 activated-induced cell death의 전달자로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 본 연구 결과에서도 방사선 민감 조직에서 fas antigen의 발현이 방사선 처리 후 증가 된 양상을 보여 주었다.

그러나 M-calpain은 방사선 조사 후 감소된 결과를 보여 주었다. 이것은 Ca<sup>2+</sup>-dependent cysteine proteases계의 일종으로 apoptosis 신호전달에서 p53의 활성을 억제한다고 보고 하였다.<sup>22)</sup> M-calpain 감소는 p53 활성의 증가를 유도 세포 내 apoptosis 유도를 촉진 방사선 감수성을 증가시키는 것으로 보인다.

본 실험에서는 방사선 민감 조직인 비장에서는 방사선 조사 후 apoptosis 관련된 단백질의 변화가 두드러지게 나타난 반면, 방사선 내성 조직인 간에서는 방사선 조사 후 산화 환원 반응에 관여하는 단백질 변화가 두드러진다. 특

히 apoptosis 유도 수준이 비장에 비해서 낮은 간 조직에서 항산화 효소인 GSTP, Prx VI와 NADH dehydrogenase 등이 방사선 조사 후 증가하였다.

Prx 단백질은 6개의 이성체를 가지고 thiol기를 함유하고 있다.<sup>23)</sup> 이 등은 마우스의 흉선 조직에 방사선 조사 후 6시간에서 Prx I과 II 발현이 증가된 연구 결과를 보여 주었으며<sup>24)</sup> 박 등은 두경부암 종양 세포 주에서 Prx II 발현의 증가가 방사선에 내성인자로 작용한다고 보고하였다.<sup>25)</sup> 본 연구에서도 방사선 조사 후 간에서 Prx VI의 발현이 증가되었으나 apoptosis 유도 수준은 매우 낮았다. 이것은 방사선에 의해 생성되는 free radical에 대해서 세포 방어 기작을 작동하여 이로 인한 방사선 내성이 유도되는 것으로 보인다.

본 연구에서는 apoptosis 유도 수준이 뚜렷이 차이를 보이는 비장과 간 조직에서 proteomics를 이용한 다양한 단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 apoptosis 유도 수준이 다른 조직에서 apoptosis에 관련된 단백질과 redox에 관련된 단백질은 방사성 감수성 조절에 관련된 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌

1. Pawlik T, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59:928-942
2. Seong J, Kim SH, Lee WJ, et al. Strain-specific differences in radiation-induced apoptosis in murine tissues. *J Korean Cancer Assoc* 1997;30:1259-1268
3. Bristow RG, Hill RP. Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse in murine tumor cell lines II: in vivo in radioresponse following fractionated treatment and in vitro/in vivo correlations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18:331-345
4. Hall EJ. *Radiobiology for the radiologist*, 5th ed. Philadelphia, PA J.B. Lippincott Co. 2000:314-338
5. Taylor AM. Chromosome instability syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001; 14:631-644
6. West CM, Elyan SA, Berry P, et al. A comparison of the radiosensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes. *Int J Radiat Biol* 1995; 68:197-203
7. Ingold JA, Reed GB, Gallager S. Radiation hepatitis. *Am J Roentgenol* 1965; 93: 200-208
8. Ploemacher RE, Van Os R, Van Beurden CA, et al. Murine haemopoietic stem cells with long-term engraftment and marrow repopulating ability are more resistant to gamma-radiation than are spleen colony forming cells. *Int J Radiat Biol* 1992; 61:489-499
9. Kerr NC, Wright EG, Plumb MA. p53-dependent X-ray-induced modulation of cytokine mRNA levels in vivo. *Pathol* 1998; 186:24-30
10. Seong J, Kim SH, Suh CO. Enhancement of tumor radioresponse by combined chemotherapy in murine hepatocarcinoma *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:883-889
11. Bang B, Gniadecki R, Larsen JK, et al. In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. *Exp Dermatol* 2003;12:791-798
12. An JH, Kim J, Seong J. Redox signal by ionizing radiation in mouse liver. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1030:86-94
13. Kim SH, Seong J. The role of Fas/FasL in radiation induced apoptosis in vivo. *J Korea Soc Ther Radiol Oncol* 2002;21: 222-226
14. Kolesnick R, Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis *Oncogene* 2003;22:5897-5906
15. Maity A, Kao G, Mushel R, et al. J. Potential molecular target for manipulating the radiation response *Int J. Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:639-653
16. Chen Q, Chai YC, Mazumder S, et al. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 2003;10:323-34
17. Hallahan DE, Beckett MA, Kufe D, et al. Interaction between recombinant human tumor necrosis factor and radiation in 13 human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19:69-74
18. Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades *FEBS Lett* 1998;423:275-80
19. Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol* 2003;160:65-75
20. Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:169-177
21. Oh WY, Song MH, Chung EJ, et al. Regulation of apoptosis and cell cycle in irradiated mouse brain. *J Korea Soc Ther Radiol Oncol* 2001;19:146-152
22. Bemetti R, Sal GD, Monte M, et al. The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *The EMBO J* 2001;20:2702-2714
23. Lee K, Park JS, Kim YJ, et al. Differential expression of Prx I and II in mouse testis and their up-regulation by radiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:337-342
24. Rhee SG, Kim KH, Chae HZ, et al. Antioxidant defense mechanisms: a new thiol-specific antioxidant enzyme. *Ann N Y Acad Sci* 1994;738:86-92
25. Park SH, Chung YM, Lee YS, et al. Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res* 2000;6:4915-4920.



---

*Abstract*

---

## **Proteomics of Protein Expression Profiling in Tissues with Different Radiosensitivity**

Jeung Hee An, Ph.D., Jiyoung Kim, M.S. and Jinsil Seong, M.D., Ph.D.

Department of Radiation Oncology, Yonsei University College of Medicine  
Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine Seoul, Korea

**Purpose:** The purpose of this study was to identify Radiosensitivity of proteins in tissues with different radiosensitivity.

**Materials and Methods:** C3H/HeJ mice were exposed to 10 Gy. The mice were sacrificed 8 hrs after radiation. Their spleen and liver tissues were collected and analyzed histologically for apoptosis. The expressions of radiosusceptibility protein were analyzed by 2-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.

**Results:** The peak of apoptosis levels were  $35.3 \pm 1.7\%$  in spleen and  $0.6 \pm 0.2\%$  in liver at 8 hrs after radiation. Liver, radioresistant tissues, showed that the levels of ROS metabolism related to proteins such as cytochrome c, glutathione S transferase, NADH dehydrogenase, riken cDNA and peroxiredoxin VI increased after radiation. The expression of cytochrome c increased significantly in spleen and liver tissues after radiation. In spleen, radiosensitivity tissue, the identified proteins showed a significantly quantitative alteration following radiation. It was categorized as signal transduction, apoptosis, cytokine, Ca signal related protein, stress-related protein, cytoskeletal regulation, ROS metabolism, and others.

**Conclusion:** Differences of radiation-induced apoptosis by tissues specified were coupled with the induction of related radiosensitivity and radioresistant proteins. The result suggests that apoptosis related protein and redox proteins play important roles in this radiosusceptibility.

---

**Key Words:** Radiation, Proteomics, Apoptosis, Radiosusceptibility