

배자배양법을 이용한 방사선 유도 선천성 기형 검사의 모델 시스템 개발

박형우, 성진실¹, 김명희, 정은지¹, 설은영, 유병기

연세대학교 의과대학 해부학교실, ¹방사선종양학교실

간추림 : 배자배양법을 이용하여 방사선에 의해 나타나는 세포탈락 (apoptosis)을 형태적 및 유전자 발현의 측면에서 체계화함으로써 방사선에 의한 기형 유발 기전을 구명하기 위해, 임신 9일된 흰쥐의 배자를 분리하여 배양하고, 10일째에 각각 대조군, 0.1, 0.5, 2 그리고 5 Gy의 방사선을 조사한 실험군의 외형과 조직의 형태적인 변화를 관찰하고 단백질을 추출하여 유전자 산물의 발현을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 외형 관찰 결과, 머리엉덩길이와 몸분절의 수는 2 Gy와 5 Gy 실험군에서 유의하게 감소하였으며, 인두굽이의 수, 배자의 회전상태, 귀오목, 수정체오목 그리고 팔썩의 발달 정도는 방사선 조사량이 증가함에 따라 유의하게 지연되었다.
2. 조직의 형태적 변화를 분석하기 위해 세포탈락 염색을 시행한 결과, 0.1 Gy와 0.5 Gy에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 2 Gy와 5 Gy에서는 삼차신경절과 인두굽이에서 많은 수의 세포탈락소체가 관찰되었고, 심장, 작은창자 등에서도 뚜렷한 증가를 확인할 수 있었다.
3. 유전물질의 발현을 분석하기 위해 p53, WAF1, Bcl-2, Bcl-X, Bax 등이 발현 양상을 분석한 결과 Bcl-X, Bax는 어느 실험군에서도 전혀 발현되지 않았으며, Bcl-2는 방사선 조사량의 증가에 상관없이 일정한 수준의 발현을 보였다. p53과 WAF1은 방사선 조사량이 증가함에 따라 발현 수준이 증가하였다.

이상과 같이 발생 9일 흰쥐 배자를 배양하여 방사선 조사 및 이로 인한 기형을 관찰하였던 바, 방사선 노출에 의한 효과로 배자 발육의 지연, 단백질 합성을 감소, 세포탈락의 발현 증가 및 관련 유전 물질의 발현 등을 관찰할 수 있었고, 이러한 결과는 최종적으로 방사선에 의한 선천성 기형유발의 평가에 실험동물 모델로 이용될 수 있을 것이며, 향후 방사선에 의한 장애 감소 및 예방 등에 쓰일 신물질의 검증 등에 중요하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

찾아보기 낱말 : 방사선, 배자배양, 선천성 기형, 쥐

서 론

배자 혹은 태아에서 방사선이나 약물 등을 이용한 기형유발 연구는 대부분 임신 동물에 직접 노출시켜 실험을 진행하였으나 이러한 방법은 같은 배 (breed)의 새끼들 사이에서도 발생의 정도가 다르기 때문에 기형유발물질에 미치는 정확한 영향

을 객관적으로 분석하기 힘든 단점이 있었다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 방법이 배자배양법 (whole embryo culture)이다 (New 1978). 배자배양에는 설치류 (rodents)가 가장 흔히 사용되며 많은 구조들의 원기가 출현해 기관발생이 활발한 발생 2주 동안에 2~3일간 배양할 수 있다 (New 1971). 이 방법은 배양중인 배자를 수시로 관찰할 수 있고, 배양액에 검사하고 싶은 약물을 첨가하면 다양한 기형유발물질을 검색할 수 있다 (Warner 등 1983, Sadler와 Warner 1984, 1985). 또한 기형 유발성이

*이 연구는 “과학기술부 지원 원자력연구개발사업비, 1998년도”에 의하여 이루어졌음.

correspondence to : 박형우 (연세대학교 의과대학 해부학교실)

나 효과를 보다 순수하게 알 수 있어 특히 기형학 분야의 연구에 중요한 방법의 하나로 이용되고 있다(Copp와 Cockroft 1990).

모든 종류의 방사선은 기형을 유발시킬 수 있으며, 실험동물 뿐 아니라 인간에서도 이미 입증된 기형유발물질 중의 하나이다(Hall 1993). 방사선은 성인에서 빠르게 분열하는 세포에 특히 영향을 미치며, 활발히 발생 중인 배자(embryo)나 태아(fetus)는 심한 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Szekely 등 1982). 방사선이 생물체에 미치는 영향은 용량에 따라 크게 두 가지로 나타나는데, 고용량(high dose)은 노출 직후 세포의 죽음(cell death) 혹은 심한 손상을 일으키며, 저용량(low dose)은 노출 후 수 개월 혹은 수 년 후에 돌연변이(mutation)나 암(cancer)을 유발시킬 수 있다(Sheline 1980). 발생 중인 태아가 고용량의 방사선에 노출될 위험은 과거에 비해 뚜렷하게 감소하였지만 진단 기술 등의 발전으로 저용량의 방사선이 태아에 노출될 가능성은 점차 증가하고 있다. 그 효과는 즉시 나타나지 않을 수도 있고, 임신부가 아니라도 성세포(sex cell)가 영향을 받으면 2세에 큰 영향을 미칠 수 있기 때문에 방사선은 앞으로 중요한 기형유발물질(teratogen)의 하나로서 계속 연구할 필요가 있다.

전리방사선(ionizing radiation)은 그 에너지가 물질의 원자나 분자에 흡수되는 것으로 물질과 상호작용하는데 최종 산물로서 고에너지를 가진 전자가 방출된다. 이 고에너지 전자가 직접 세포의 DNA에 손상을 주기도 하며, 물분자를 가수분해하여 화학적으로 매우 불안정한 유리기(free radical)가 만들어지고 이 유리기가 다른 유기물을 산화시키게 되는데, 이들 작용의 공통된 결과는 분자생물학적으로는 DNA 등 세포의 유전물질에 손상을 일으키고, 이는 세포수준에서 DNA, RNA, 단백질, 세포 호흡 등 각종 세포대사에 장애를 일으키게 된다(Yau 1981).

방사선은 인간 및 실험동물의 태아에서 성장장애(growth retardation) 같은 일반 효과 뿐 아니라, 신경계통에서는 정신발육지연(mental retardation), 작은머리증(microcephaly) 및 낭상척추뼈갈림증(spina bifida cystica) 등을 일으키고, 이외에 백내장

(cataract), 입천장갈림증(cleft palate) 등의 이상을 일으킨다고 보고되어 있다(Brent 1980).

이 연구에서는 실험 환경을 정밀하게 제어할 수 있는 배자배양법을 이용하여 임신 중 배자의 정상 발달 및 분화 과정에서 방사선에 의해 나타나는 세포탈락을 형태적 및 유전자 발현의 측면에서 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley계의 임신 흰쥐를 이용하였다. 저녁에 1~2마리의 수컷 흰쥐와 3~5마리의 암컷 흰쥐를 한 우리에 넣고 다음날 아침 8시에 질도말검사를 통해 정액이 검출되면 발생 0일로 정의하였다.

2. 배자배양

이 실험에서 발생 10일 배자의 배양에 사용한 방법은 발생 9일 배자를 48시간 동안 배양하는 박형우 등(1996)의 방법과 같았다. 임신 쥐는 발생 9일 오전 9시에 이터(ether)로 마취해 복부를 열고 자궁 전체를 분리하였다. HBSS용액(Hanks' Balanced Salt Solution) 속에서 안과용 가위로 자궁벽을 긴 축을 따라 절개한 후 착상 부위를 적출하였으며, 끝이 날카로운 휘셋(EM forceps)으로 탈락막 및 라이케르트막을 제거하였다. 배자는 Fujinaga 등(1992)이 제시한 발생기에 따라 분류하여 사용하였다. 대부분의 경우 손상없이 배자를 적출할 수 있었으며, 착상부의 자궁조직이나 라이케르트막을 제거할 때 손상된 것은 배양에서 제외하였다. 임신 쥐에서 배를 연 후 배양을 시작할 때까지 소요된 시간은 2시간을 넘지 않았다.

3. 배양액

흰쥐의 혈액을 뽑은 즉시 원심분리하고 56°C에서 30분간 열처리한 100% 혈청에 항생제(100 µg/ml 스트렙토마이신, 100 IU/ml 페니실린)를 넣은 것

을 배양액으로 사용하였다. 한 마리의 쥐에서 7~8 ml 정도의 혈액을 얻었고, 원심분리 후 3 ml 정도의 혈청을 얻을 수 있었다. 배양용기는 50 ml 용량의 conical tube를 사용하고, 6 ml의 배양액을 넣어 3~4마리의 배자를 배양하여, 배자 1마리당 1 ml 이상의 배양액을 사용하였다. 배양 30분 전에 2분 동안 배양기체를 흘려 배양용액의 기체가 배양기체와 평형이 되도록 하였다.

4. 배양법

배양기체는 배양을 시작할 때 5% 이산화탄소, 5% 산소 및 90% 질소의 혼합기체를 사용하였으며, 배양 12시간 후 같은 기체로 다시 채웠다. 발생 10일 오전 9시(배양 24시간 후)에 5% 이산화탄소, 20% 산소 및 75% 질소의 혼합기체로 바꾸었으며, 36시간 후 다시 발생 24시간 후에 사용되었던 기체로 채웠다. 배양용기는 얇은 나사실링테이프용기마개 흡을 감은 후 마개를 단아 기체의 누출을 막았다. 배양기(incubator)에 롤러회전기(roller rotator)를 넣고 온도가 37°C를 유지하도록 하였다. 회전기 위에 배양용기를 놓고 분당 30번 회전시키며, 발생 11일 오전 8시에 48시간의 배양을 끝냈다.

5. 방사선 조사

배자는 배양액 속에 있는 상태로 발생 10일 오전 10시에 방사선을 조사하였다. 방사선 조사는 Co 60 동위원소를 이용한 외부방사선 조사기(ALCYON)를 사용하여 흡수선량이 0.1 Gy, 0.5 Gy, 2 Gy 그리고 5 Gy가 되게 선원으로부터 60 cm 거리에서 γ -ray를 단일조사하였다.

6. 외형관찰

배양이 끝난 배자는 5~60배로 확대가 가능한 수술현미경(M10, Leica, Switzerland)을 이용하여 난황주머니의 길이, 배자의 머리엉덩길이, 몸분절의 수, 인두굽이의 수, 배자의 회전, 귀오목과 수정체오목의 형성, 팔쌍의 출현, 앞신경구멍 폐쇄 상태의 8개 항목으로 세분하여 시행하였다.

7. 조직 표본 제작

배자는 4% paraformaldehyde-0.1 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 4°C에서 4시간 동안 고정하였다. 고정이 끝난 배자는 0.87% sodium chloride로 희석한 50% 에틸알코올에 20분간 처리한 후 70%, 95%, 100% 알코올의 순서로 15분씩 3차례 탈수하고, histoclear로 투명화시켰다. 파라핀에 30분씩 3차례 침투시킨 후 포매하였다. 파라핀 블록을 5 μ m 두께로 박절하여 poly L-lysine으로 피복된 슬라이드글라스(DAKO, Japan)에 붙인 후 56°C로 유지되는 dry oven에서 1시간 동안 건조시켰다.

8. 세포탈락 염색

세포탈락소체는 TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 방법을 이용하여 염색하였다. 조직이 붙어 있는 슬라이드는 37°C로 맞춘 항온기에서 밤새 파라핀을 제거하고, 흡수과정을 거친 후, 10 μ g/ μ l proteinase K를 실온에서 30분간 처리하고 증류수로 수세하였다. 이어 2% 과산화수소를 처리하고 증류수로 씻어내며, TdT buffer로 전처리한 후 TdT와 Biotin-16-dUTP를 5 μ M의 최종 농도로 처리하여 습윤챔버에 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 즉시 TB buffer로 수세하여 반응을 정지시키고, 증류수로 씻은 후 2% BSA에 처리하였다. 이어 증류수로 수세하고, phosphate buffer solution (PBS)에 희석한 Vectastain Peroxidase Standard ABC Kit로 37°C에서 30분간 반응시켰다. PBS로 수세하고 증류수에 녹인 Diaminobenzidine (DAB)로 발색시켰다. 이어 증류수로 수세하고 methyl green 또는 Mayer hematoxylin으로 대조염색을 한 후, 수세, 탈수과정을 거쳐 봉입하고 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 유전자 산물의 분석(Western blotting)

조직을 잘게 부수고 세척한 뒤 SDS-PAGE로 분할하여 nitrocellulose 막에 blotting하였다. Blotting한 nitrocellulose 막은 5% 탈지우유가 포함된 인산완충액으로 상온에서 4시간 처리하고, 검사하고

Table 1. Effects of the radiation on the morphology of rat embryos (mean \pm S.D.)

	Control	0.1 Gy	0.5 Gy	2 Gy	5 Gy
Diameter of yolk sac	3.59 \pm 0.55	3.53 \pm 0.58	3.38 \pm 0.26	3.35 \pm 0.43	3.16 \pm 0.59
Crown-rump length	2.77 \pm 0.27	2.81 \pm 0.22	2.77 \pm 0.25	2.45 \pm 0.25	2.11 \pm 0.27
Number of somites	21.82 \pm 1.51	21.18 \pm 1.38	20.65 \pm 2.29	19.00 \pm 3.82	11.23 \pm 6.68
Number of branchial arch					
1	0%	0%	6%	12%	24%
2	88%	100%	94%	88%	76%
3	12%	0%	0%	0%	0%
Rotation					
No rotation	0%	0%	0%	6%	21%
Start	0%	12%	6%	12%	47%
Completion	100%	88%	94%	82%	24%
Otic system					
No development	0%	0%	0%	6%	12%
Otic pit	0%	6%	12%	18%	53%
Otocyst	47%	35%	35%	47%	35%
Endolymphatic duct	53%	59%	53%	29%	0%
Optic system					
No development	0%	0%	0%	6%	41%
Optic sulcus	24%	24%	24%	47%	47%
Optic vesicle	76%	76%	76%	47%	12%
Upper limb bud					
No development	0%	0%	0%	6%	41%
Low	0%	12%	24%	29%	47%
Crest	94%	65%	64%	65%	12%
Semilunar	6%	23%	12%	0%	0%
Closure of rostral neuropore	100%	100%	94%	94%	94%

자 하는 유전자 산물 (p53, WAF1, BCl-2, Tubulin)에 대한 일차 항체로 1시간 처리하였다. 이를 세척하고 이차 항체로 1시간 처리한 후 chemiluminescence 법으로 항체 반응을 발현시켰다. 이 결과의 양적인 증감을 분석하기 위하여 밀도측정기 (densitometry)로 nitrocellulose 막에 발현된 band의 농도를 수량적으로 나타내어 유전자 산물 발현을 분석하였다.

결 과

1. 수술현미경을 이용한 형태 관찰

실험군과 대조군에서 난황주머니의 길이, 배자의 머리엉덩길, 몸분절의 수, 인두굽이의 수, 배자의 회전, 귀오목과 수정체오목의 형성, 팔쌍의 출현, 앞신경구멍의 폐쇄 상태 등을 관찰한 결과는 Table 1

에서와 같았다.

난황주머니의 길이는 실험군과 대조군에서 유의한 차이가 없었으나, 난황막혈관의 발달 상태나 혈액 순환은 5 Gy 실험군에서 감소되어있었다 (Fig. 1). 배자의 머리엉덩길이는 2 Gy와 5 Gy 실험군에서 유의하게 감소되었으며, 특히 머리목의 크기가 감소하였고, 몸분절의 수 또한 5 Gy 실험군에서 유의하게 감소되었다. 인두굽이의 수, 배자의 회전상태, 귀오목, 수정체오목 그리고 팔쌍의 발달 정도는 방사선 조사량이 증가함에 따라 유의하게 지연됨을 보였다. 앞신경구멍의 폐쇄는 유의한 차이를 보이지는 않았으나 0.5 Gy, 2 Gy 그리고 5 Gy에서 각각 한 예씩이 폐쇄가 이루어지지 않았다 (Fig. 2).

2. 조직의 형태적 변화 분석

대조군의 경우 세포탈락은 신경관이 닫히는 부분, 눈소포의 바닥부분, 삼차신경절, 머리의 중간엽,

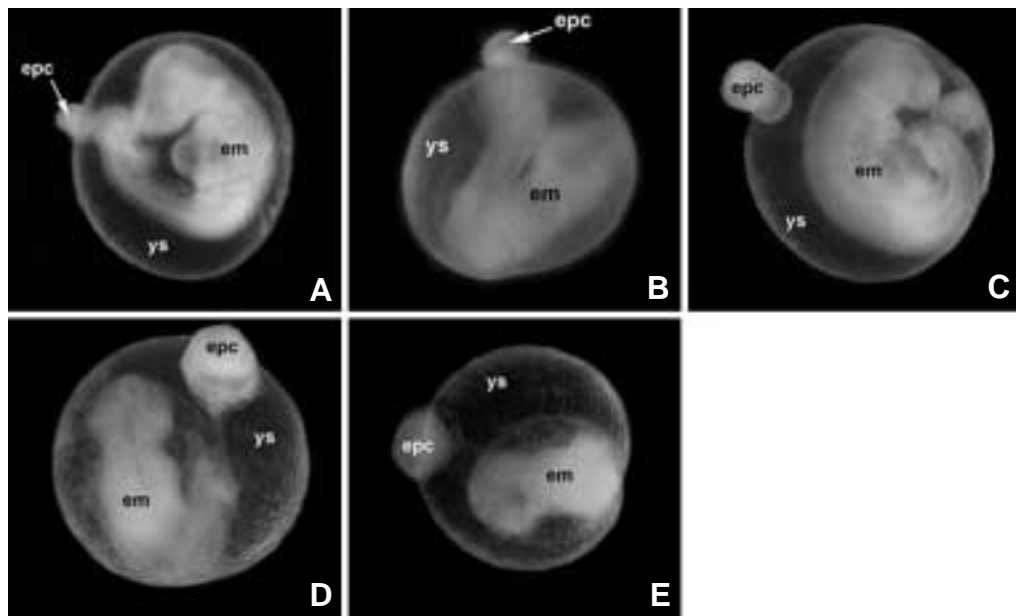


Fig. 1. Day 11 rat embryos within yolk sac cultured for 48 hours ($\times 12.6$). A. control, B. 0.1 Gy, C. 0.5 Gy, D. 2 Gy, E. 5 Gy, em; embryo, ep; ectoplacental cone, ys; yolk sac.

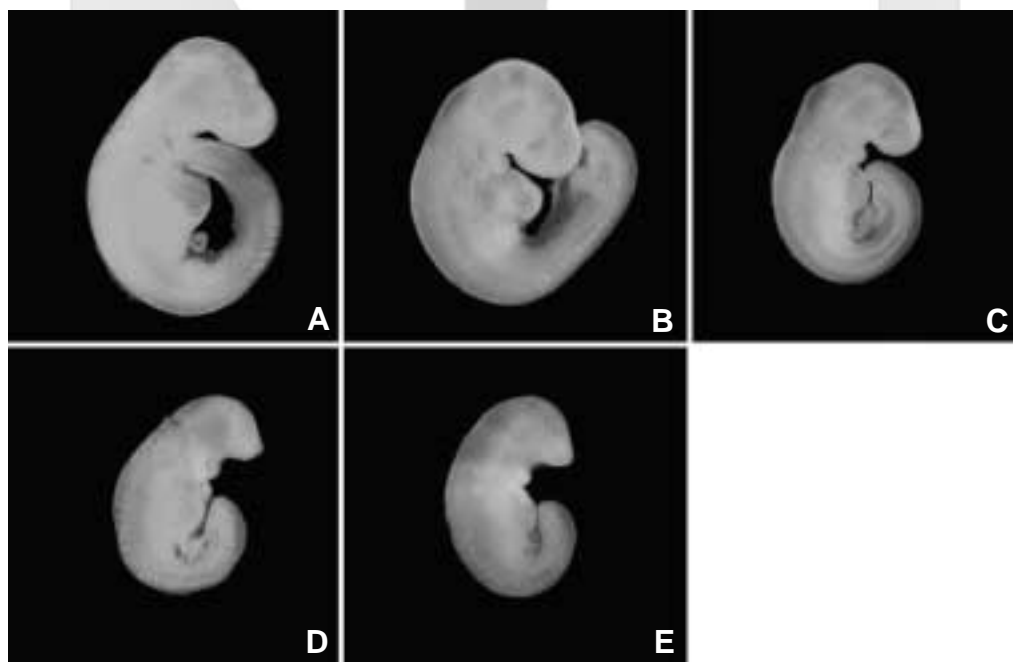


Fig. 2. Day 11 rat embryos cultured for 48 hours ($\times 25.2$). A. control, B. 0.1 Gy, C. 0.5 Gy, D. 2 Gy, E. 5 Gy.

인두굽이, 귀구멍의 주변부에서 뚜렷하게 관찰되었으며, 한 단면에서 5~10개의 세포탈락소체가 관찰되었다 (Fig. 3).

실험군의 경우 0.1 Gy와 0.5 Gy에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만 2 Gy에서 약간 증가하였으며, 5 Gy에서는 뚜렷하게 증가하였다. 특히 삼차신경절과 인두굽이에서 많은 수의 세포탈락소체를 관찰할 수 있었으며, 심장, 작은창자 등에서도 0.1, 0.5 Gy군과 비교하였을 때 세포탈락소체의 수

가 뚜렷하게 증가되었음을 확인할 수 있었다.

3. 방사선 조사에 따른 유전자 산물의 발현 분석

Bcl-X와 Bax는 모든 실험군에서 전혀 발현이 되지 않았다 (Fig. 4). Bcl-2는 방사선 조사량의 증가에 상관없이 일정한 수준의 발현을 보였다. 의의 있게 증가한 것은 p53과 WAF1이었는데 이들은 방사선 조사선량이 증가되면서 발현수준이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 WAF1은 0.1 Gy, 0.5 Gy,

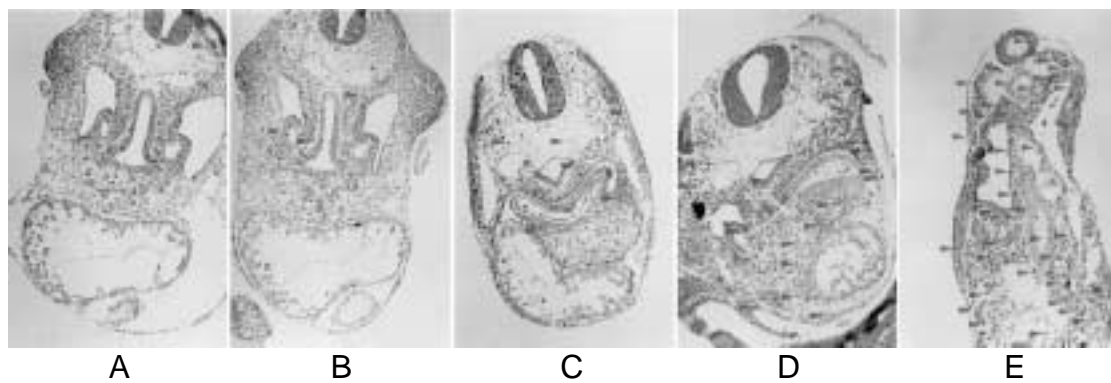


Fig. 3. Day 11 rat embryos, TUNEL stain ($\times 100$). A. control, B. 0.1 Gy, C. 0.5 Gy, D. 2 Gy, E. 5 Gy. Arrow heads indicate apoptotic bodies.

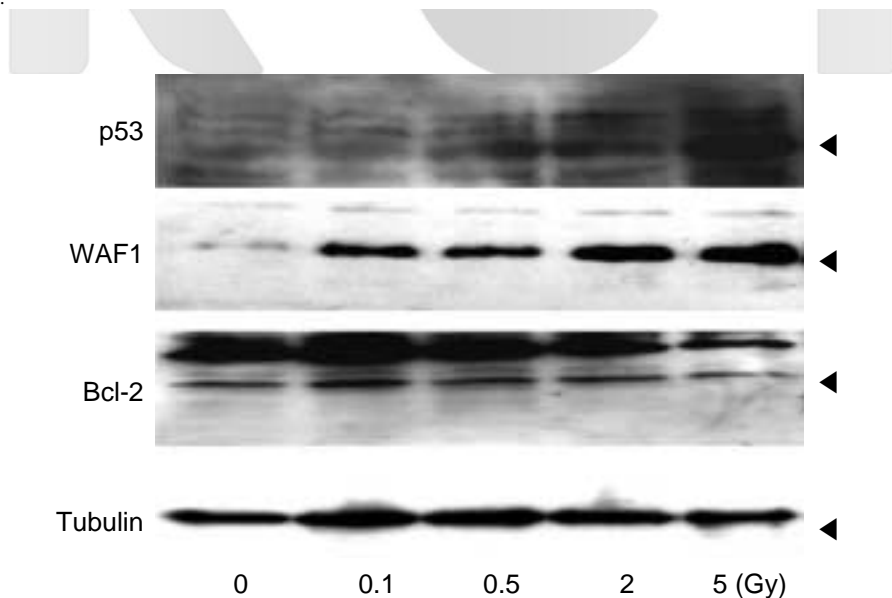


Fig. 4. Radiation-induced gene expression in rat embryo-Western blotting.

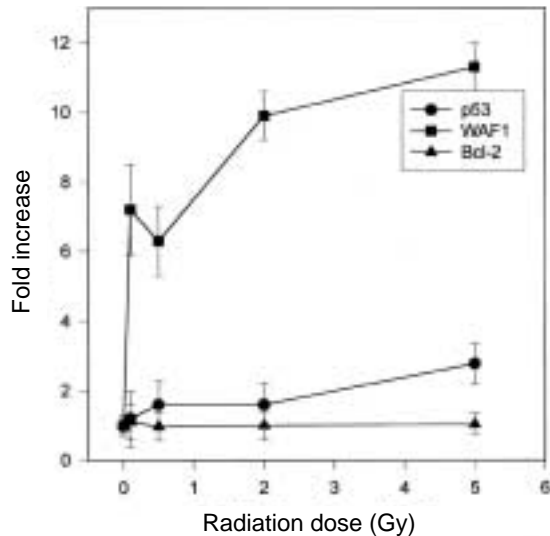


Fig. 5. Radiation-induced gene expression in rat embryo.

2 Gy, 5 Gy 조사시 각각 대조군의 7.2배, 6.3배, 9.9 배, 11.3배로 증가하였다(Fig. 5).

고 찰

이 실험에서는 발생 9일 오전에 적절한 배자를 발생 11일 오전까지 48시간 배양하고, 배양 중 발생 10일 오전에 각각 0.1 Gy, 0.5 Gy, 2 Gy 및 5 Gy의 $^{60}\text{Co-}\gamma$ 방사선에 노출시킨 후, 배자 발생에 어떤 변화가 일어나며, 조직단면에서 세포탈락의 발현에 어떤 영향을 미치는가를 알아보고, 또한 이때 발현되는 유전자 산물을 분석하였다.

1930년대 프랑스의 Jolly와 Lieure (1938), 미국의 Nicholas와 Rudnick (1934, 1938) 등에 의해 처음으로 착상 이후의 배자배양에 성공한 이래, 현재 배자배양에서는 병을 회전시켜 배양하는 병회전배양법 (rotation bottle culture)이 주로 사용되고 있으며, 실험방법이 비교적 단순하고 결과가 확실하기 때문에 특히 많은 배자를 배양할 경우 가장 널리 사용되고 있다 (Shepard 등 1987).

이 실험에 사용된 배자배양법은 병회전배양법을 일부 변형한 것으로, 많은 구조들의 원기가 출현하

고 기관형성이 활발한 시기에 배자를 손상없이 온전하게 꺼낸 후 2~3일 동안 배양하는 방법이다. 이 방법은 배양 중에 배자를 수시로 관찰할 수 있고 원하는 발생 단계의 배자를 선택하거나 다양한 조작을 통해 발생의 기전을 연구하는데 큰 도움이 되며, 배자를 원하는 환경에 노출시키면 기형유발성이나 효과를 보다 순수하게 알 수 있다 (박형우 등 1996). 이 실험에서는 순수한 쥐 혈청을 동량의 HBSS 용액과 섞어 배양액으로 사용하였으며, 배양 결과는 순수한 쥐 혈청을 사용했을 때와 차이가 없었다. 그리고, 배양용기로 125 ml 용량의 병 대신 50 ml 용량의 conical tube를 사용하여 한 번에 배양할 수 있는 배자의 수는 줄었지만 동시에 여러 실험군을 배양하는 잇점이 있었다.

배양이 끝나면 그 결과를 객관적으로 분석해야 하는데 이 실험에서는 발생 9일 배자를 48시간 동안 배양했을 때 배양 성공 여부의 판단에 가장 적절하게 사용되는 지표인 머리엉덩길, 몸분절의 수, 배자의 회전 완료, 인두굽이의 수, 귀오목의 폐쇄, 팔뚝의 발달 상태, 수정체오목의 형성 등을 관찰 및 계측하였다 (Brown과 Fabro 1981).

현재 배자배양은 주로 기형학 분야에서 기형 유발의 기전 연구에 많이 사용되고 있다. 배자배양법은 2, 3일 후면 신속히 결과를 얻을 수 있고, 모체의 제거로 기형유발 물질에 대한 배자의 노출을 정확히 제어할 수 있고, 배양기간이 짧아 손상을 복구할 시간을 없앨 수 있다는 장점을 갖고 있다. 반면, 물질의 투여 경로가 생체와 다른 점, 노출 기간이 짧기 때문에 제한된 계통만을 검사할 수 있으며, 실험의 결과가 태어나 신생아에서의 결과와 관계가 때로 불분명한 단점이 있다.

발생 중 주위 환경의 변화가 배자의 기형을 유발할 수 있다는 사실은 1941년 풍진바이러스가 선천성 기형을 일으킴이 처음 밝혀짐으로써 인식되기 시작하였고 (Gregg 1941), 비타민 A 결핍이 선천성 기형을 일으킴도 입증되었다 (Warkany와 Schraffenberger 1946). 인간에서 선천성 기형을 일으키는 것들로는 방사선, 감염 (거대세포바이러스, 풍진 등), 산모의 대사 불균형 (술, 당뇨병 등), 약물 및 여러 환경 화학물질 (aminopterin, busulfan, thalidomide)

등이 알려져 있다 (Shepard 1995).

전리방사선은 에너지가 물질의 원자나 분자에 흡수되어 물질과 상호작용하는데, 입사에너지의 준위에 따라 광전효과(photoelectric effect), 콤프톤효과(compton effect) 및 쌍생성(pair production) 등의 효과를 나타내지만, 결국 고에너지를 가진 전자를 방출한다. 방사선은 흡수된 요량, 노출 빈도 및 노출된 배자나 태아의 발생기(developmental stage) 등에 따라 다양한 결과를 초래한다(Brent 1980, Yau 1981, Michel 1989). 방사선은 여러 종의 동물에서 돌연변이원과 발암원으로 작용하며, 기형을 유발한다(Sheline 1980, Shepard 등 1987, Bruni 1994). 방사선에 의한 기형 발생의 작용 기전 구명에는 정립된 배양법 모델에서 다양한 변수의 조절로 얻은 결과의 분석이 중요하다.

이 실험에서는 방사선 용량 증가에 따라 8가지 기준 지표에서 유의하게 발달의 지연이 나타났다. 이 결과는 Devi 등(1994)이 발생 11.5일 마우스에서 0.05 Gy에서 0.5 Gy까지 방사선을 조사하였더니, 0.25 Gy 이하에서는 뚜렷한 사망률 증가나 발달 지연이 없었으나, 0.5 Gy에서 뚜렷한 발달지연이 나타났다는 보고와 일치하고 있다. 특히 2 Gy와 5 Gy 실험군에서 귀오목과 수정체오목의 발달이 지연되어 있는 것은 Anniko 등(1989)이 마우스의 귀소포기에 1~2 Gy의 방사선을 조사하였을 때 속귀의 조직학적 변화가 발생하였다는 보고와 유사하였다.

조직에 대한 형태적 변화 분석에서 실험군의 경우 0.1 Gy와 0.5 Gy에서는 대조군과 큰 차이를 보이지 않았지만, 2 Gy에서 세포탈락 소체의 수가 약간 증가하였으며, 5 Gy에서는 뚜렷하게 증가하였다. 특히 삼차신경절과 인두굽이에서 많은 수의 소체가 관찰되었고, 심장, 작은창자 등에서도 뚜렷하게 증가한 것은 초기 기관형성기의 마우스에 방사선을 조사한 후 눈의 원기를 미세현미경으로 분석한 결과 눈의 기형이 나타났고, 방사선 용량의 증가에 따라 회복의 정도가 느리고 괴사 형태의 변화가 나타난 Balla 등(1893)의 보고와 유사하였다. 그리고 발생 11일된 마우스에 방사선을 조사했더니 4 시간 후에 세포탈락이 뚜렷하게 증가하고 출생 후 선천성 기형이 유발되며, 이러한 영향이 방사선 용

량과 관계 있다는 Wang 등(1999)의 결과와도 일치하는 것이었다.

세포탈락의 전형적인 형태적 변화는 염색질의 농축, 세포 위축, 세포막의 농포, DNA의 분절화 및 세포탈락 소체의 출현 등이다(Wylie 등 1981, 1987). 이러한 특징 중 DNA의 분절화는 세포탈락이 일어나고 있는 세포의 대표적인 특징으로 185염기쌍의 다양한 다량체로 분절화되며 전기영동으로 쉽게 확인할 수 있다(Sellins와 Cohen 1987, Enari 등 1998). 따라서 현재 많은 경우 DNase에 의한 DNA 절편화를 세포탈락의 정의로 사용하고 있다. 하지만 DNA 절편화 현상을 확인하는 TUNEL 염색법에서 많은 괴사세포들 역시 염색된다는 최근 여러 실험 증거들(Grazi-Kraupp 등 1995, de Torres 등 1997, Kim 등 1999)을 고려하면 DNA 절편화는 세포탈락에서만 고유하게 일어나는 현상은 아닌 것으로 믿어진다.

이 실험에서는 세포탈락을 조절하는 유전물질의 발현 분석을 위해 P53, WAF1, Bcl-2, Bcl-X, Bax 등의 변화를 살펴보았다. Bcl-X, Bax는 모든 실험군에서 전혀 발현되지 않았고 Bcl-2는 방사선 조사량의 증가와 상관없이 일정하게 발현되었으나, p53과 ASG1은 방사선 조사선량의 증가에 따라 발현이 유의하게 증가하였다. 특히 WAF1은 0.1 Gy, 0.5 Gy, 2 Gy, 5 Gy 조사시 각각 대조군의 7.2배, 6.3배, 9.9배, 11.3배로 증가하였다.

방사선에 노출된 세포에서 가장 먼저 관찰된 것은 세포의 복제기능 부전과 세포주기의 지연이다(Little 1994). 방사선에 의해 나타나는 세포반응으로 DNA의 손상 뿐 아니라 G1 checkpoint와 세포탈락의 조절에 관여하는 p53 발현의 증가가 있으며, p53은 MDM2와 WAF1을 포함하는 다양한 유전물질의 전사를 활성화시킨다(Brugarolas 등 1995, Xu와 Morris 1999). WAF1은 cyclin-cdk 복합체에 결합하여 비활성화시킴으로써 pRb, E2F 등과 같은 성장 조절 단백질의 부인산화 반응을 억제함으로써 세포가 DNA 합성을 하지 못하도록 하며, 결국 세포는 G1기에 머물게 된다(Nevins 1992, de Toledo 등 1998). 이 실험에서 방사선에 의해 유도된 p53과 WAF1의 증가는 방사선에 노출된 세포에서

WAF1에 의해 p53 의존 세포주기의 정체가 일어났다는 Di Leonardo 등(1994)의 보고, 그리고 역시 방사선에 노출된 세포의 핵에 G1기와 S기에서 p53이 축적되고 WAF1의 발현이 증가했다는 Komarova 등(1997)의 보고와 일치한다.

de Toledo 등(1998)은 저용량(1.2 Gy)으로도 유전자의 발현 양상에 심각한 변화를 초래하며, 이때의 양상이 고용량(7.2 Gy)과 비슷하게 나타났다고 하였는데, 이 실험에서는 방사선의 조사용량이 증가함에 따라 관련 유전자의 발현도 증가하였다. 이러한 차이는 세포배양과 배자배양이라는 배양 방법의 차이와 방사선 조사 후 이를 분석한 시점의 차이 등이 관련될 것으로 생각된다.

이상과 같이 발생 9일 흰쥐 배자를 배양하여 방사선 조사 및 이로 인한 기형을 관찰하였던 바, 방사선 노출에 의한 효과로 배자 발육의 지연, 단백질 합성율 감소, 세포탈락의 발현 증가 및 관련 유전 물질의 발현 등을 관찰할 수 있었고, 이러한 결과는 최종적으로 방사선에 의한 선천성 기형유발의 평가에 실험동물 모델로 이용될 수 있을 것이며, 향후 방사선에 의한 장애 감소 및 예방 등에 쓰일 신물질의 검증 등에 중요하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 박형우, 이혜정, 설은영, 유병기 : 흰쥐의 배자배양에서 배양온도의 변화에 의해 유도된 apoptosis. 대한해부학회지 29 : 409-418, 1996.
- Anniko M, Thornell LE, Hultcrantz M, Virtanen I, Ramaekers FC, Stigbrand T : Prenatal low-dose gamma irradiation of the inner ear induces changes in the expression of intermediate filaments. Acta Otolaryngol 108 : 206-216, 1989.
- Balla I, Michel C, Fritz-Niggli H : Cellular damage and recovery of the early developing mouse eye following low dose irradiation. II. X-rays on day 9 of gestation. Experientia 39 : 95-96, 1983.
- Brent RL : Radiation teratogenesis. Teratology 21 : 281-298, 1980.
- Brown NA, Fabro S : Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. Teratology 24 : 65-78, 1981.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ : Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. Nature (Lond) 377 : 552-557, 1995.
- Bruni JE : Effects of in exposure to low dose ionizing radiation on development in the rat. Histology and Histopathology 9 : 27-33, 1994.
- Copp AJ, Cockcroft DL : Postimplantation mammalian embryos. A practical approach. IRL press, New York, pp. 1-14, 1990.
- de Toledo SM, Azzam EI, Keng P, Laffrenier S, Little JB : Regulation by ionizing radiation of CDC2, cyclin A, cyclin B, thymidine kinase, topoisomerase IIalpha, and RAD51 expression in normal human diploid fibroblasts is dependent on p53/p21Waf1. Cell Growth Differ 9 : 887-896, 1998.
- de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventos J, Macaya A : Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. Neurosci Lett 230 : 1-4, 1997.
- Devi PU, Baskar R : Influence of gestational age at exposure on the prenatal effects of gamma-radiation. Int J Radiat Biol 70 : 45-52, 1996.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM : DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. Genes & Development. 8 : 2540-51, 1994.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S : A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 393 : 396, 1998.
- Fujinaga M, Brown NA, Baden JM : Comparison of staging systems for the gastrulation and early neurulation period in rodents : a proposed new system. Teratology 46 : 183-190, 1992.
- Grazl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R : In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. Hepatology 21 : 1465-1468, 1995.
- Gregg NM : Congenital cataract following German measles in the mother. Rev Med Virol 11 : 277-283; discussion 284-285, 2001.

- Hall EJ : Radiobiology for the radiologist. 5th ed, Lippincott -Raven Publisher, pp. 178-192, 1993.
- Jolly J, Lieure C : Recherches sur la Culture des Oeufs des mammiferes. Arch Anat Microsk 34 : 307-374, 1938.
- Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn S, Koh JY : Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. Neuroscience 89 : 175-182, 1999.
- Komarova EA, Zelnick CR, Chin D, Zeremski M, Gleiberman AS, Bacus SS, Gudkov AV : Intracellular localization of p53 tumor suppressor protein in gamma-irradiated cells is cell cycle regulated and determined by the nucleus. Cancer Res 57 : 5217-5220, 1997.
- Little JB : Failla Memorial Lecture. Changing views of cellular radiosensitivity. Radiat Res 140 : 299-311, 1994.
- Michel C : Radiation embryology. Experientia 45 : 69-77, 1989.
- Nevins JR : E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. Science 258 : 424-429, 1992.
- New DAT : Methods for the culture of post-implantation rodents: In Daniel J. C., ed. Methods in mammalian embryology. W. H. Freeman and Co, San Francisco, pp. 305-319, 1971.
- New DAT, Cockroft DL : A rotating bottle culture method with continuous replacement of the gas phase. Experientia 35 : 138-140, 1978.
- Nicholas JS, Rudnick D : The development of rat embryos in tissue culture. Proc Nat Acad Sci 20 : 656-658, 1934.
- Nicholas JS, Rudnick D : Development of rat embryos of egg cylinder to head-fold stages in plasma cultures. J Exp Zool 78 : 205-232, 1938.
- Sadler TW, Warner CW : Use of whole embryo culture for evaluating toxicity and teratogenicity. Pharmacol Rev 36 : 1455-1505, 1984.
- Sadler TW, Warner CW, Tulis AA, Smith MK and Doerger J : Factors determining the in vitro response of rodent embryos to teratogens. Concepts Toxicol 3 : 36-45, 1985.
- Sellins KS and Cohen JJ : Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. J Immunol 139 : 3199-3206, 1987.
- Sheline GE : Irradiation injury of the human brain : A review of clinical experience. In radiation damage to the nervous system, ed. by Gilbert HA and Kagan AR, Raven press, New York, pp. 39-58, 1980.
- Shepard TH, Fantal AG and Mirkes PE : In developmental Toxicology: Mechanisms and Risk. (Eds. by Markert C and McLachlan J) Somite-stage mammalian embryo culture-use in study of normal physiology and mechanisms of teratogenesis. Banbury Report 26, pp. 29-44, 1987.
- Shepard TH : Agents that cause birth defects. Yonsei Med J 36 : 393-396, 1995.
- Szekely JG, Raaphorst GP, Lobrean AU, Copps TP : Effect of X-irradiation and radiation modifiers on cellular ultrastructure. Scan Electr Microsc Pt 1 : 335-347, 1982.
- Wang B, Fujita K, Ohhira C, Watanabe K, Odaka T, Mitani H, Hayata I, Ohyama H, Yamada T, Shima A : Radiation-induced apoptosis and limb teratogenesis in embryonic mice. Radiat Res 151 : 63-68, 1999.
- Warkany J, Schraffenberger E : Congenital malformation induced in rats by maternal vitamin A deficiency. I. Defects of the eye. Arch Ophthalmol 35 : 150-169, 1946.
- Warner CW, Sadler TW, Shockey J and Smith MK : A comparison of the in vivo and vitro response of mammalian embryos to a teratogenic insult. Toxicology 28 : 271-282, 1983.
- Wyllie AH : Cell death: A new classification separating apoptosis from necrosis, in Bowed, I.D., Lockshin RA (eds): Cell death in biology and pathology, New York, NY, Chapman and Hall, pp. 9-34, 1981.
- Wyllie AH : Apoptosis: Cell death in tissue regulation. J Pathol 153 : 313-316, 1987.
- Xu J, Morris GF : p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. Mol Cell Biol 19 : 12-20, 1999.
- Yau TM : Alterations in the structural and function of the mammalian cell membrane after exposure to ionizing radiation. Scan Electr Microsc 4 : 47-54, 1981.

Abstract

Development of Model System for Radiation Induced Congenital Malformations by Whole Embryo Culture

**Hyoungh Woo Park, Jin Sil Seung¹, Myung Hee Kim, Eun Ji Chung¹,
Eun Young Seol, Byoung Ki Yoo**

Departments of Anatomy and ¹Therapeutic Radiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

It is known that radiation can induce various kind of mutations, cancers and congenital malformations. Day 9 rats embryos were cultured by whole embryo culture method and irradiated 0.1, 0.5, 2 and 5 Gy at day 10 to study the effect of radiation on the development of rat embryos. Harvesting after 48 hours culture, the morphological changes and apoptosis were investigated. In addition, we assessed the expression patterns of p53, WAF1, Bcl-2, Bcl-x and Bax.

Compared to the control group, no remarkable morphological changes were observed in the low dosage group (0.1 and 0.5 Gy). But at high dosage group (2 and 5 Gy), growth was retarded and the heart beats were weak. The crown rump length, the number of somites, and branchial arch were decreased and the rotation of embryo and development of otic pit and lens pit, and upper limb bud was delayed significantly. Especially in the 5 Gy group the most of external morphology were difficult to discriminate.

In histological observations, high dosage group showed marked increase in the number of apoptotic bodies in the optic cup, trigeminal ganglion, pharyngeal arches, heart and small intestine.

In western blot analysis, Bcl-x and Bax were not expressed in all groups. Expression level of Bcl-2 was constant regardless of the amount of radiation. Expression level of p53 and WAF1 increased significantly in accordance with the increasing amount of radiation. Especially, WAF1 was expressed 7.2, 6.3, 9.9 and 11.3 folds more than the control groups when embryos were exposed to 0.1, 0.5, 2 and 5 Gy, respectively. Considering WAF1 arrests cell cycle, we concluded that cell cycle was affected most sensitively to radiation injury.

From these results, radiation showed growth retardation, decrease in protein synthesis, increase in apoptosis and expression of related genetic materials. These results may be used as a standard to test the effect of drugs for reducing and protecting agents against deteriorious effect of radiation in developing embryo and fetus.

Key words : Radiation, Whole embryo culture, Congenital malformation, Rat