

감마선 조사에 따른 흰쥐의 혈장 및 좌골신경의 혈소판-유래성 성장인자(PDGF)와 PDGF α - 및 β - 수용체의 시간 의존성 변화

안산전문대학 방사선과 · 경희대학교 생물학과*
林韓榮 · 南相烈*

- Abstract -

Time Dependent Changes in Platelet-Derived Growth Factor(PDGF) and PDGF α - and β - Receptors Following Gamma-Irradiation of Rat Plasma and Sciatic Nerve

Han Young Lim · Sang Yul Nam*
Dept. of Radiotechnology, Ansan Junior College
Dept. of Biology, Kyung Hee University*

The total-bodies of 10 week-old Sprague-Dawley rats were irradiated with single doses 4.5 and 7.5 Gy, respectively. The effects on plasma and sciatic nerve platelet-derived growth factor(PDGF) concentrations and sciatic nerve PDGF α -and β -receptors densities were examined up to 10 days post-treatment. There was no consistent significant variation in the plasma and sciatic nerve PDGF concentrations in time over the period of study between 4.5 and 7.5 Gy groups. Plasma PDGF concentrations were significantly reduced to 58% of control values between 5 and 10 days with 4.5 Gy and to 51% of control values as percentage of control values between 5 and 10 days with 7.5 Gy after irradiation, respectively($p < 0.05$). Sciatic nerve PDGF concentrations were increased to 118% of control values at 1 day with 4.5 Gy and to 130% of control values at 1 day with 7.5 Gy after irradiation, respectively($p > 0.05$). After irradiation, the levels of PDGF α -receptor protein density were reduced to 33% of control values at 2 days with 4.5 Gy and to 50% at 2 days with 7.5 Gy, while the levels of PDGF β -receptor protein density were reduced to maximally 26% of control values at 2 days with 4.5 Gy and to 27% at 2 days with 7.5 Gy, respectively, but both initial decreased levels of those were increased subsequently after 2 days following irradiation. These results suggest that the radiation-induced alteration of plasma and sciatic nerve PDGF concentrations, and sciatic nerve PDGF α -and β -receptors densities may be involved in the pathogenesis of bone marrow stem cell and peripheral neuron damages.

I. 서 론

이온화 방사선은 그 선원에 상관없이 피폭된 생체조직에 즉각적인 화학적 변화, 즉 이온쌍과 자유 라디칼(free radical)이 생성되며, 또한 초기의 화학적 변화는 대사적 교란을 초래하고, 그리고 DNA, 리보솜 및 미토콘드리아처럼 세포 내 중요한 세포 소기관에서 광자에너지의 축적은 세포에서 수복할 수 없는 장애를 초래하고, 이로 인하여 수일 혹은 수주간에 걸쳐 뚜렷한 세포적인 장애를 유발하여 마침내 세포 및 생체에 치사적 효과를 가져오게 한다. 또한 방사선의 급성 장애에 대한 세포적인 변화는 생물학 활성물질의 국부적 합성과 분비 그리고 수용

체에 대한 광범위한 측정으로 추정할 수 있다.

방사선의 전신조사에 따른 조혈계에 대한 장애의 범위는 종에 따라 다르며, 특히 이러한 장애는 간세포(stem cell)의 파손에 기인되어 여러 생리학적 반응을 나타내고 있다¹⁻⁷⁾. 혈소판은 비교적 낮은 방사선 감수성으로 골수 내에 거대핵세포(megakaryocyte)가 존재하는 한 순환계에 공급된다.

방사선의 전신조사 후 신경계를 형태학적으로 관찰하여 보면, 보통 방사선 감수성이 낮은 장기로 생각되나, 기능적 지표로 관찰하면 비교적 낮은 선량에서도 일시적으로 여러 가지 생리학적 반응이 나타난다⁸⁻¹⁶⁾

방사선 조사 후 배양된 소, 돼지 및 사람의 내피세포-

유래성 성장인자(endothelial cell-derived growth factor, EDGF)¹⁷⁾와 사람에서의 대식세포-유래성 성장인자(macrophage-derived growth factor, MDGF)¹⁸⁾, 그리고 흰쥐의 노르에피네프린(norepinephrine)¹⁹⁾ 등에 변화양상이 나타나며, 한편 방사선조사 후 α -아드레날린 작동성 및 β -아드레날린 작동성 수용체에도 변화양상이 나타난다.²⁰⁾

혈소판-유래성 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)는 평활근세포²¹⁾, 섬유아세포²²⁾ 그리고 신경교세포²³⁾에서 강력한 마이토젠(mitogen)이라는 것이 처음으로 사람의 혈소판에서 동정되었다. 한편 최근에 PDGF는 여러 세포형에서 생성되어 폭넓은 표적세포를 지니고 있음이 밝혀진 바 있다.^{24,25,26)} Heldin 등²⁵⁾에 의하면 PDGF는 성장, 주화성 그리고 결합조직세포의 기질(matrix)의 생성 등을 촉진하고 있으며, 또한 Harrison 등²⁷⁾에 의하면 혈액에서 PDGF가 상처부위의 혈소판에서 방출되는 경우, 상처치유에 중요한 역할을 수행하고 있다.

PDGF A-사슬 유전자는 태아 및 성체 생쥐의 뉴런집단에 많은 함량으로 발현되고 있으며,²⁸⁾ 이는 뉴런에서는 PDGF A-사슬이 주된 원천이라는 것을 암시하고 있다. 신경교세포(glia cell)는 PDGF A-사슬과 밀접한 관련이 있으며, 또한 여러 뉴런에서 PDGF의 방분비(paracrine) 조절은 신경교세포 생성에 영향을 미치고 있다.²⁸⁾ Smits 등²⁹⁾은 뉴런의 PDGF는 간충직-유래성 세포(mesenchyme-derived cell)와 신경교-유래성 세포(glia-derived cell)에 대하여 마이토젠의 역할을 수행하고 있다고 보고한 바 있다.

뉴런의 PDGF는 염증 및 종양생성 등에서 생리학적 기능을 수행하고 있다.^{30,31,32)} Richardson 등³²⁾에 의하면 뉴런의 PDGF는 신경계에서 신경교세포 생성에 중요한 역할을 수행하고 있다. 뉴런의 PDGF가 조직 배양실험의 슈반세포(Schwann cell)에서 마이토젠으로서 작용하며^{33,34,35,36)} 뉴런의 PDGF의 활성화에는 세포 내 cAMP의 상승이 필요하며³³⁾, 또한 슈반세포 생성에 자가분비(autocrine) 역할을 하고 있다.³⁴⁾ 발생 중의 말초신경계(peripheral nervous system:PNS)에서 PDGF가 슈반세포에서 중요한 기능을 수행하고 있다.³⁷⁾

배위자(ligand)의 결합으로 뉴런의 PDGF 수용체(receptor)가 자가인산화작용을 거쳐 수용체의 이량체형성이 유도되며, 또한 이들 수용체는 수용체 특이적 펩티드에 대하여 생산되는 항체에 의해서 구별된다.^{31,38,39)} PNS에서 PDGF α - 및 β -수용체가 배근 신경교신경과 좌골신경(sciatic nerve)에 존재하고 있으나, 특히 PDGF β -수용체는 수초 뉴런에는 적은 함량으로 존재하고 있다.^{28,29,37,40)}

이 연구의 목적은 4.5 및 7.5 Gy의 단일 선량으로, 감마선의 전신조사에 따른 혈장 및 좌골신경 PDGF 농도와 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체 밀도의 시간 의존성 변화를 조사 추구하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 동물과 방사선 조사

웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐(주식회사 대한실험동물센터, 서울에서 구입, 10 주령 및 체중 270±15.4 g)를 일회 선량인 4.5 Gy 및 7.5 Gy를 각각 전신에 조사하였다.

조사는 ⁶⁰Co γ -선 치료장치(Toshiba Co., 일본)로 시행하였으며, 방사선 조사시 방사선 선원과 동물의 표피 간의 거리는 60 cm이고 조사면적은 19 × 19 cm이며, 선량율은 1.065 Gy/min이다. 동물은 우리속에 2 내지 3마리씩 수용하였으며, 또한 각종 자료를 측정할 때까지 불과 먹이(주식회사 대한 실험동물센터, 서울)를 자유롭게 취식하도록 하였으며, 환경온도는 22~26°C를 유지하고 주간의 시간은 07:00에서 19:00까지이며, 상대습도는 60~80%를 유지하였다. 시료는 방사선 조사 후 1, 2, 3, 5 및 10 일구에서 채취하였다.

2. 시료처리 과정

흰쥐를 탄산가스로 질식사시켜 복벽을 절개하여 복부 대동맥에서 혈액을 8~10 ml 채취, 채혈량 1/10의 양을 항응고제인 3.8% 구연산(Sigma Co., USA)을 첨가한 후, 곧 3,000 rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 혈장을 얻었으며, 시료측정 전까지 -70°C에 보관하였다.

좌골신경을 좌골절흔(sciatic notch)에서 노출시키고 그 좌골신경을 혈관을 피하면서 절제 제거하여, 액화질소로 급속 냉동시킨 후, -70°C에 저장시켰다. 시료를 드라이아이스 위에서 면도날로 작게 절단한 후, 용해 완충액(20mM Tris pH 7.4, 1% nonidet P-40, 150mM NaCl 10% glycerol)과 단백질 분해억제제(1mM phenylmethylsulfonylfluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ M leupeptin)를 혼합한 후 시료를 Dounce homogenator(Wheaton Co., USA)로 균질화 하여, 얼음 속에서 안구형 진탕기 위에 놓고, 4°C에서 30분간 진탕한 후 다시 13,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상층액만 채취하여 정량하였으며, 그밖의 시료는 -70°C에 보관하였다.

3. 혈소판-유래성 성장인자(PDGF)의 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA)

PDGF는 분리된 염색체에서 2개의 근접하게 연관되고 있는 유전자(PDGF-A 혹은 PDGF-B)에 의해서 합성되고 있다. 생물학적인 활성생성물은 동종이량체(AA 혹은 BB) 혹은 이종이량체(AB)이다. 여기에서 기술하는 효소결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)은 PDGF-B 사슬(chain)에 대하여 매우 특이적이다.

PDGF에 대한 측정은 Dunbar 등⁴¹⁾의 방법에 따라 효

소결합 면역흡착 분석법에 의해서 측정하였다. 플라스틱 평판(plate, NUNC, Denmark)에 PDGF-B 사슬에 대하여 특이성인 단일클론성 항체(anti-human PDGF-BB, UBI, USA)를 중탄산염 완충액(40 mM Na₂CO₃, 60 mM NaHCO₃, pH 9.6)으로 4 µg/ml로 희석하여 웰(well)당 50 µl 씩 도말하여 4 °C에서 16시간을 항온시킨 후, 차단 용액(phosphate buffered saline Tween-20, PBST: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄ 7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, 0.05% Tween-20 pH 7.35, PBST 용액에 1% BSA)으로 실온에서 2시간 차단시킨다. 시료는 웰당 100 µl를 주입하고 표준량을 측정하기 위하여 웰당 10 pg, 50 pg, 100 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 및 20 ng 을 주입시킨 후 실온에서 6시간 항온시킨다. 각 단계별 진행시에는 세척용액(PBST 용액, pH 7.35)으로 5회씩 세척하고, 희석용액(PBST 용액에 0.1% BSA)에 일차항체(polyclonal rabbit anti-human PDGF-BB, genzyme, MA, USA)를 1:50과 1:100으로 희석하여 평판의 반응 상하로 반씩 나누어 이중으로 웰당 50 µl씩 주입시켜 4 °C에서 12시간을 항온시킨다. 또한 희석용액(PBST 용액에 0.01% BSA)에 biotin이 결합된 이차항체(goat anti-rabbit IgG, Vector Lab, USA)를 웰당 50 µl씩 주입하여 30분 간 항온시킨다. Biotin이 결합된 peroxidase와 avidin의 결합체(ABC kit, Vector Lab, USA)를 웰당 50 µl씩 주입하여 30분간 항온시킨다. PDGF를 검출하기 위하여 기질로 사용한 OPD(O-phenylenediamine, Sigma Co., USA)를 용해완충액(phosphate citric buffer, 100 mM citric acid, 200 mM Na₂HPO₄, pH 5.0)에 용해시켜 과산화수소(3.5 mM)를 첨가한 후 웰당 100 µl씩 주입한다. 10~15분 정도 반응시킨 후 정지용액(3 mM H₂SO₄)을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 기질이 불안정하므로 40분 이내에 490 nm에서 ELISA 판독기(Molecular Devices, Emax precision microplate reader, USA)로 판독한다.

4. 혈소판-유래성 성장인자(PDGF)의 웨스턴 블롯팅(Western blotting)

Bradford 방법⁴²⁾에 의해 단백질을 정량한 후, 각 50µg의 시료를 동일한 양의 시료 완충액(250 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 8% β-mercaptoethanol, 16% bromo phenol blue)과 혼합하여 95 °C에서 5분간 끓인다. 이어서 시료액은 전기영동 장치인 SE250 Mighty Small II(Hoefler Scientific Instruments, USA)를 사용하여 7% gel인 폴리아 크릴아마이드 겔 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE; Laemmli)⁴³⁾을 시행한다. 도데실 황산나트륨-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel eletrophoresis, SDS-PAGE)으로 얻은 겔은 전기이동장치(Hoefler Scientific Instrument, USA)를 사용하여 불화폴리비닐렌(polyvinylidene fluoride, PVDF) 흡착지(Immobilon-P, Millipore, USA)로 20 volt 와 110 mA의 조건하에서 14~15시간 흡취시켰으며 PVDF 흡착지

는 차단용액(20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20, 2% 소의 혈장 albumin)으로 실온에서 약 4시간 동안 원형 진탕기 위에 놓고 교반시킨다. 블롯트(blot)를 차단용액에서 1차 항체로 실온에서 2시간 동안 처리한다. 이때 PDGF α -수용체 항체(anti-mouse PDGF α -receptor rabbit antiserum, UBI, USA)는 1:2000으로, 또 PDGF β -수용체 항체(anti-human PDGF β -receptor rabbit antiserum, UBI, USA)는 1:5000으로 희석한다. 항체로 처리한 후 블롯트를 TBST 완충액(20 mM Tris pH 8.0, 137 mM NaCl, 0.05% Tween-20)으로 5분간에 걸쳐 두 번 세척한다. 세척시킨 후 블롯트를 AP(alkaline phosphatase, Promega, USA)가 결합된 이차항체(anti-rabbit IgG, AP conjugate, Promega, USA, 희석 1:7000)로 실온에서 1시간 항온시키고, 15분에 걸쳐 2회 세척시킨다.

마지막으로 AP 완충액(100 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 9.5)에 BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Promega, USA)와 NBT(nitro blue tetrazolium, Promega, USA)를 각각 1:400, 1:200으로 희석 혼합하여 발색반응이 일어나게 한다. 대조군과 실험군에서 PDGF 수용체 단백질의 상대적 함량을 측정하기 위하여, 블롯트상의 흡광도 값을 CLINISCAN-2(Helena Lab., USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 통계학적 분석

통계분석은 Duncan의 다중 레인지 분포폭 검정(multiple range test)을 사용하여 실험조건에서 혈장 및 좌골신경 PDGF의 농도에 대하여 통계학적 유의성 차($P < 0.05$)를 측정하였다.

III. 결 과

1. 감마선 조사가 혈장 PDGF의 농도에 미치는 영향

4.5 및 7.5 Gy 선량으로 조사한 후 1, 2, 3, 5 및 10일구에서 측정된 피폭군 및 대조군 흰쥐의 혈장 PDGF의 농도는 Fig. 1에 표시하였다. 4.5 및 7.5 Gy 선량군에서는 혈장 PDGF의 농도가 전 일구에 걸쳐 대조군(2.26±0.31 ng/ml)에 비해서 감소되었으며, 한편 4.5 및 7.5 Gy 선량군 사이에서는 전 일구에 걸쳐 혈장 PDGF의 농도의 차에 대하여 무의성이었다($P > 0.05$). 피폭된 흰쥐의 혈장 PDGF의 농도는 4.5 및 7.5 Gy 선량군에서 모두 대조군 흰쥐에 비하여 5일 구(4.5 Gy: 1.35±0.23 ng/ml; 대조군의 백분율로서 59.7% 그리고 7.5 Gy: 1.24±0.13 ng/ml; 54.9%) 및 10일구(4.5 Gy: 1.27±0.28 ng/ml; 56.2% 그리고 7.5 Gy: 1.07±0.19 ng/ml; 47.3%)에서 각각 유의성이 있는 낮은 값을 나타내었다($P < 0.05$).

2. 감마선 조사가 좌골신경 PDGF의 농도에 미치는 영향

4.5 및 7.5 Gy의 선량으로 조사시킨 후 1, 2, 3, 5 및 10일 구에서 측정된 피폭군 및 대조군 흰쥐의 좌골신경 PDGF의 농도는 Fig. 2에 표시하였다. 4.5 및 7.5 Gy 선량군에서는 좌골신경 PDGF의 농도가 대조군(3.68 ± 0.12 ng/ml)에 비하여 전 일구간에 걸쳐 대체로 약간씩 증가하였으며, 한편 4.5 및 7.5 Gy 선량군 사이에서는 전 일구에 걸쳐 좌골신경 PDGF의 농도차는 무의성이었다($P > 0.05$).

피폭된 흰쥐 좌골신경 PDGF의 농도는 4.5 및 7.5 Gy 선량군에서 모두 대조군의 흰쥐에 비하여 1일구(4.5 Gy: 4.33 ± 0.03 ng/ml: 118% 그리고 7.5 Gy: 4.81 ± 0.36 ng/ml: 130%)에서 각각 증가하였으나 무의성이었다($P > 0.05$).

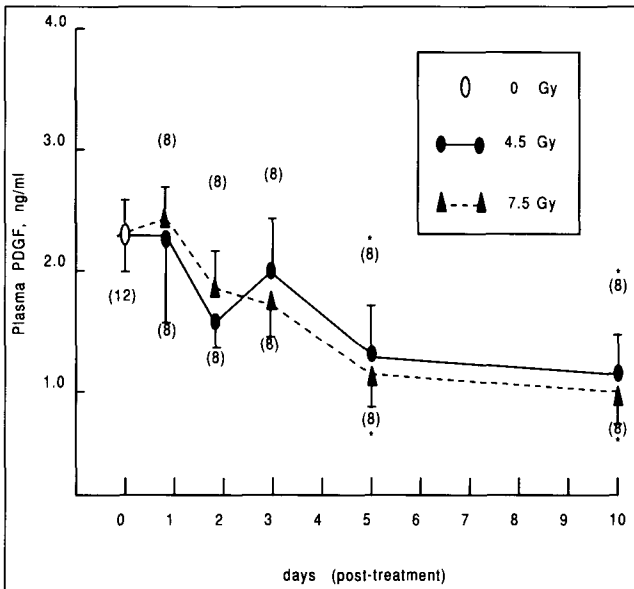


Fig. 1. Concentration of platelet-derived growth factor(PDGF, ng/ml) in control(open circle) and irradiated plasma (closed circles and triangles) at 1, 2, 3, 5 and 10 days after total-body irradiation with 4.5 and 7.5 Gy. The parentheses represent the number of animals and the vertical bars indicate the standard error of the mean. *Significantly different per time point: ($p < 0.05$).

3. 감마선 조사가 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체의 밀도에 미치는 영향

4.5 및 7.5 Gy의 선량으로 조사한 후 1, 2, 3, 5 및 10일 구에서 측정된 피폭군 및 대조군의 흰쥐의 좌골신경

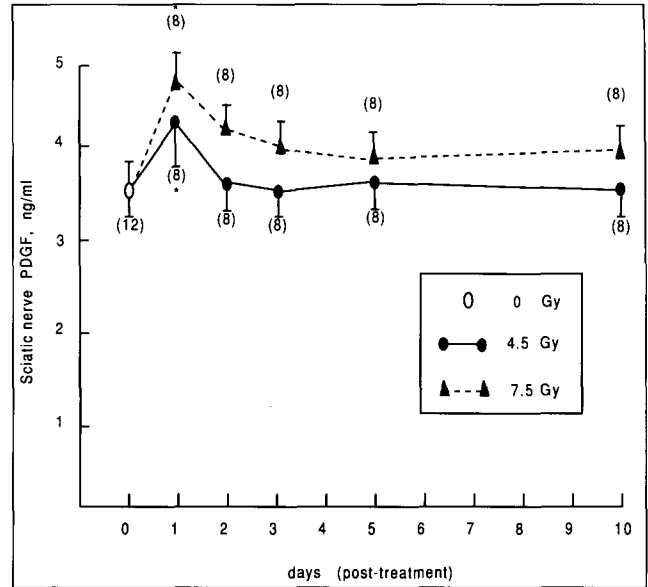


Fig. 2. Concentration of platelet-derived growth factor(PDGF, ng/ml) in control(open circle) and irradiated sciatic nerves(closed circles and triangles) at 1, 2, 3, 5 and 10 days after total-body irradiation with 4.5 and 7.5 Gy. The parentheses represent the number of animals and the vertical bars indicate the standard error of the mean. *No significant different per time point: ($p > 0.05$).

PDGF α -수용체의 밀도는 Fig. 3에, 그리고 좌골신경 PDGF β -수용체는 Fig. 4에 각각 표시하였다. 방사선의 조사는 혈장 및 좌골신경 PDGF의 농도의 변화를 초래할 뿐만 아니라 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체 밀도의 변화도 초래하였다. 좌골신경 PDGF 수용체의 밀도의 단위는 단백질의 상대적 함량(relative level of protein)으로 표시하였고 또한 일구-필적되는 대조군의 값을 백분율로 표시하였다. Fig. 3에서 좌골신경 PDGF α -수용체의 밀도는 4.5 및 7.5 Gy 선량군 모두에서 대조군에 비하여 초기에 감소경향으로 나타나, 1일구에서는 40%(4.5 Gy)와 50%(7.5 Gy)를, 그리고 2일구에서는 33%(4.5 Gy)와 50%(7.5 Gy)의 가장 낮은 값을 각각 나타낸 후, 점차 대조군에 근접하는 값으로 증가하는 경향이있으며, Fig. 4에서 좌골신경 PDGF β -수용체의 밀도는 4.5 및 7.5 Gy 선량군 모두에서 대조군에 비하여 초기에 감소경향으로, 특히 2일구에서는 26%(4.5 Gy)와 27%(7.5 Gy)의 최저의 값을 각각 나타낸 후 점차 대조군에 근접하는 값으로 증가하는 경향으로 나타났다.

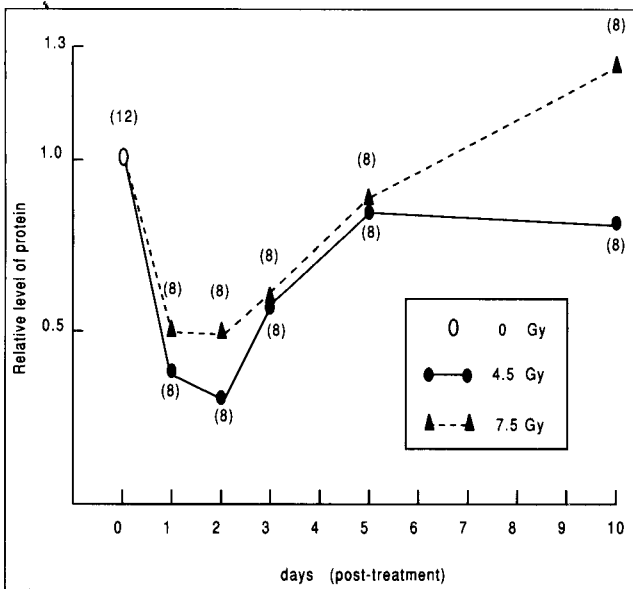


Fig. 3. Quantitation of platelet-derived growth factor (PDGF) α -receptor in control(open circle) and irradiated sciatic nerves(closed circles and triangles) at 1, 2, 3, 5 and 10 days after total-body irradiation with 4.5 and 7.5 Gy. The parentheses represent the number of animals and each points represent the average value.

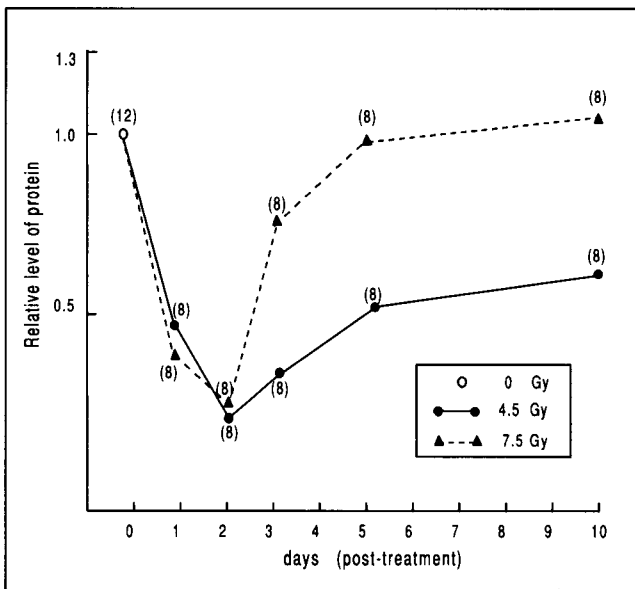


Fig. 4. Quantitation of platelet-derived growth factor (PDGF) β -receptor in control(open circle) and irradiated sciatic nerves(closed circles and triangles) at 1, 2, 3, 5 and 10 days after total-body irradiation with 4.5 and 7.5 Gy. The parentheses represent the number of animals and each points represent the average value.

IV. 고찰 및 결론

이 실험에서 4.5 및 7.5 Gy 선량으로 전신조사에 의하여 혈장 및 좌골신경 PDGF의 농도는 조사 후 전 일구간에 걸쳐서 대조군에 비하여 감소되는 경향이었으나, 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체의 밀도는 4.5 및 7.5 Gy 선량군 모두에서 초기에 감소 현상이 나타난 후 점차 대조군에 근접하는 값으로 증가하는 추세를 알 수 있다.

방사선의 급성 효과에 있어 특히 조절기관 장애는 결국 방사선에 의해 일부의 혈구세포도 장애를 받으나, 증식부위에 있는 간세포가 파괴되기 때문에 새로운 기능세포의 보급이 원활치 않으며, 또한 세포재생계의 변화를 초래하게 된다.

생쥐의 조절계에서의 증식활성은 생물학적 주기의 의존성 변이성을 나타내며,^{1,2,6)} 한편 X-선에 조사된 생쥐의 방사선 감수성에 있어서 조절 간세포의 영향은 생물학적 주기 및 세포주기 변화와 깊은 연관을 나타내고 있다.^{3,4,5,7)} Hendry 등⁴⁾에 의하면, 방사선이 조절계 세포에 미치는 영향은 방사선의 피폭시간에 비의존성이라고 한다.

방사선 조사 후, 배양된 소, 돼지 및 사람의 내피세포의 EDGF¹⁷⁾와 사람에서의 MDGF¹⁸⁾의 농도가 일반적으로 전 실험기간에 걸쳐 약간 감소하였으며, 또한 흰쥐의 노르에피네프린¹⁹⁾의 농도도 감소하였다.

이 실험연구에서 혈장 및 좌골신경 PDGF의 농도가 4.5 Gy군과 7.5 Gy군 모두 전 실험일구에 걸쳐 감소경향이 나타나서 Witte 등,¹⁷⁾ Franken 등¹⁹⁾ 및 Thornton 등¹⁸⁾의 실험결과와 비슷한 경향이 나타났다. 혈액의 PDGF는 방사선 감수성이 큰 조혈조직의 간세포와 깊은 관련이 있는 것으로 생각되며, 좌골신경 PDGF는 방사선 감수성이 낮은 신경조직임에도 불구하고 방사선-유발성 변화가 초기에 일어나는 것으로 생각된다.

PDGF는 처음 양이온성 30 KDa이고 이량체성 단백질로서 사람의 혈소판에서 정제된 바 있다.^{44,45,46,47)} 한편 Johnson 등⁴⁷⁾에 의해서 PDGF를 A-사슬과 B-사슬로 명명한 바 있으며, 사람의 혈소판의 PDGF의 주된 형은 A-사슬과 B-사슬의 이중이량체이다.^{48,49,50)}

일반적으로 PDGF는 악성종양증, 동맥경화증, 사구체신염, 그리고 섬유증에서처럼 과잉세포 증식에 관련된 여러 질병에 길항작용으로서 관련되고 있는 것으로 추정되고 있다.^{24,26)}

혈액 속의 PDGF는 여러 간충세포(mesenchymal cell)에 대하여,⁵¹⁾ 또한 혈장에서 배양된 여러 결합조직의 세포에서⁴⁴⁾ 강력한 마이토텐으로서 역할을 수행하고 있다.

방사선 조사 후, 신경계의 방사선 급성장애가 수주 내 또는 수개월에 출현된다.¹⁵⁾ 또한 사람의 신경계 부검시료에서 방사선의 지체성 효과가 괴사(necrosis)를 동반한 광범위한 수초탈락(demyelination)과 회돌기교세포(oligodendroglial cell)의 감소가 나타난다.¹²⁾ 그밖에 흰쥐에서 방사선 조사로 인하여 말초신경계 및 중추신경계(central nervous system, CNS)에서 모세혈관 투과성의 증가가 수초탈락과 관련되

고, 또한 이러한 투과성의 증가가 초기의 지체성반응에 기여하고 있다.⁸⁾ 한편 방사선 조사 후 신경계의 만성장해는 수개월 내지 수년에 걸쳐 생성된다.^{9,13,14)}

뉴런처럼 분화된 비증식성 세포는 일반적으로 방사선에 대하여 매우 낮은 방사선 감수성을 나타내고 있다. 또한 발생의 초기단계에서 신경교세포의 증식율은 성체보다 매우 빠르다.¹⁶⁾ 한편 van der Kogel에 의하면 수초탈락은 신경교요인의 점차적인 감소 그리고 이어서 괴사를 초래한다고 한다. Jaberaboansari 등^{10,11)}은 방사선 조사 후 흰쥐의 뉴런에서 염색질부피의 변화를 보고한 바 있으며, 이는 뉴런의 DNA 2중 나선구조의 변화를 의미하고 있다.

Delattre 등⁸⁾에 의하면 X-선 조사 후 수초탈락은 방사선 장해에 따른 신경계에 대한 초기 지체반응이 생성되는 가장 중요한 반응이며, 한편 수초탈락은 회돌기교세포의 장해로 생성되며, 이로 인하여 마이엘린(myelin) 합성이 이루어지지 않아서 회돌기교세포의 치사를 초래한다고 하나, 아직도 마이엘린 합성의 저하성-조절에서 어떠한 기작이 일어나고 있는지는 밝혀져 있지 않다. 한편 현재 방사선 처리 후 신경계 조직의 장해 및 괴사에 관한 문제가 많이 제기되어 왔으나, 아직도 괴사개시에 관한 실질적인 기작이 밝혀져 있지 않으며, 또한 분자적 수준에서 세포성 변화에 관해서도 완전히 밝혀져 있지 않다.

PDGF B-사슬은 PDGF α - 및 β -수용체 모두에 결합하며, 한편 PDGF A-사슬은 단지 α -수용체에만 결합한다.⁵²⁾ Smits 등²⁹⁾에 의하면 갓 태어난 흰쥐의 CNS의 뉴런의 PDGF는 기능적으로 PDGF β -수용체와 밀접한 관련이 있으며 또한 이들 PDGF는 신경 영양성 기능(neurotrophic function)을 수행하고 있다.

Eccleston 등³⁷⁾에 의하면 슈반세포가 증식 및 분화 중에 있을 때, PDGF가 PNS에 존재하고 있다. 또한 뉴런의 성숙에는 PDGF의 함량이 높게 유지되어 있고, PDGF가 PNS의 발생과 유지에 중요한 역할을 하고 있으며, 한편 슈반세포가 PDGF를 합성하고 있으므로, 세포 내 혹은 세포 외 구획분에서 자가분비가 가능하다. PDGF가 PNS 및 CNS에서 뉴런에 의해서 합성된다는 것은 뉴런활성의 조절에 자가분비기능을 암시하고 있다.

PDGF α -수용체 유전자의 전사는 배자 및 갓 태어난 생쥐의 CNS의 모든 부위에서 출현되고 있으며, 또한 PDGF α -수용체를 출현하는 세포는 주로 신경교세포 혹은 그 전구세포이다.⁵³⁾ 한편 PDGF α -수용체의 발현은 신경교세포가 생성되는 시기와 일치되며, 또한 PDGF α -수용체는 신경교세포에 의해 발현되고 그리고 신경교세포는 in vivo에서 뉴런에 의해서 분비된 PDGF-A 사슬과 알맞게 반응을 이루고 있다. 따라서 뉴런이 CNS에서 PDGF의 주된 원천이라는 것이 명백하므로, 다른 성장인자도 뉴런과 신경교세포에서 매우 중요성을 띠고 있는 것으로 생각된다.

방사선을 국부적으로 흰쥐의 심장에 조사시키면 심근의 α -아드레날린 작동성 및 β -아드레날린 작동성 수용

체 밀도가 증가하였다.^{19,20)}

이 실험에서 4.5 및 7.5 Gy 조사 후 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체의 밀도는 2일까지 초기에 감소하다가 시간이 지남에 따라 점차 증가하였으며 이는 방사선 조사로 인한 뉴런의 장해와 깊은 연관으로 생각된다. 이 실험의 결과는 Franken 등¹⁹⁾에 의한 흰쥐의 심장에 대한 국부적 방사선 조사 후 심근의 α -아드레날린 작동성 및 β -아드레날린 작동성 수용체 밀도의 증가와는 상반된 경향이 나타났다. 또한 Franken 등에 의하면 방사선 조사 후 노르에피네프린 농도는 β -아드레날린 작동성 수용체의 밀도와 상관관계가 성립되지 않는다고 한다.

흰쥐의 뉴런은 성숙시, PDGF-수용체의 발현을 지속시키고 있으며,³⁷⁾ 또한 조직배양에서 PDGF β -수용체는 슈반세포의 중요한 PDGF 수용체이다.³⁶⁾ 한편 조직배양에서 슈반세포는 단지 적은 양의 PDGF α -수용체를 발현시키고 있다.^{35,36)} Hardy 등³⁵⁾에 의하면 뉴런의 PDGF α - 및 β -수용체 유전자는 서로 다른 염색체에 위치하고, 또한 이들은 성장인자에 의해 독립적으로 조절되고 있으며, 그리고 갓 태어난 흰쥐의 좌골신경에서는 적은 양의 PDGF α -수용체만이 검출된다고 한다. 한편 슈반세포의 PDGF β -수용체는 강력한 마이토젠의 신호를 전달하고 있으나, 이에 반해 PDGF α -수용체의 생리학적 기능은 아직 완전히 밝혀져 있지 않다.

Eccleston 등³⁷⁾에 의하면 슈반세포가 PDGF 및 PDGF-수용체를 합성하고 있으므로, 세포 내의 구획분에서 자가분비 축진이 가능하고, 또한 PDGF α - 및 β -수용체가 갓 태어난 흰쥐의 좌골신경과 배근 신경교에 많은 양으로 발현되고 있다. 따라서 PDGF 수용체가 PNS 및 CNS의 뉴런에서 합성된다는 것은 뉴런의 자가분비의 기능을 지니고 있음을 의미한다.

이러한 실험결과를 미루어 본다면 혈장 및 좌골신경의 PDGF 농도 그리고 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체 밀도에 대한 방사선-유발성 변경이 골수 간세포 및 말초 뉴런 장해의 병인론에 관련될 것이라고 생각된다.

V. 요 약

이 실험의 목적은 4.5 및 7.5 Gy의 단일 선량으로 감마선의 전신조사에 따른 혈장 및 좌골신경 혈소판-유래성 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)의 농도와 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체 밀도에 대한 시간의 존성 변화를 조사 추구하는데 있다.

응성 흰쥐(Sprague-Dawley계, 체중 270±15.4g)를 사용하여 ⁶⁰Co 감마선을 전신 조사(선량률 1.065 Gy/min)하고, 조사 후 1, 2, 3, 5 및 10일구에서 피복에 따른 급성 반응을 조사 추구하였다. 실험의 결과는 다음과 같다.

- 1) 4.5 및 7.5 Gy 선량군에서는 혈장 PDGF의 농도가 전 일구에 걸쳐 대조군(2.26±0.31 ng/ml)에 비해서 감소경향이 나타났으며, 한편 4.5 및 7.5 Gy 선량군 사이에서는 전 일구에 걸쳐 혈장 PDGF의 농도차에 유

의적인 차이가 없었다($P > 0.05$). 피폭된 흰쥐의 혈장 PDGF의 농도는 4.5 및 7.5Gy 선량군에서 모두 대조군의 흰쥐에 비하여 5일구(4.5Gy:1.35 \pm 0.23 ng/ml; 대조군의 백분율로서 59.7%, 그리고 7.5 Gy:1.24 \pm 0.13 ng/ml;54.9%) 및 10일구(4.5Gy:1.27 \pm 0.28ng/ml;56.2% 그리고 7.5Gy:1.07 \pm 0.19 ng/ml;47.3%)에서 각각 유의성으로 낮았다($P < 0.05$).

- 2) 4.5 및 7.5Gy 선량군에서는 좌골신경 PDGF의 농도가 전 일구간에 걸쳐 대조군(3.68 \pm 0.12 ng/ml)에 대하여 대체로 약간의 증가가 나타났으나, 한편 4.5 및 7.5Gy 선량군 사이에서 전 일구에 걸쳐 좌골신경 PDGF의 농도차는 무의성이었다($P > 0.05$). 피폭된 흰쥐의 좌골신경 PDGF의 농도는 4.5 및 7.5Gy 선량군에서 모두 대조군에 비하여 1일구(4.5Gy:4.33 \pm 0.03ng/ml;대조군의 백분율로서 118% 그리고 7.5Gy:4.81 \pm 0.36 ng/ml; 130%)에서 각각 증가하였으나 무의성이었다($P > 0.05$).
- 3) 방사선의 조사는 혈장 및 좌골신경 PDGF의 농도의 변화를 초래할 뿐만아니라 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체 밀도의 변화도 초래하였다. 수용체의 밀도 단위를 단백질의 상대적 함량(relative level of protein)으로 표시하고 일구-필적의 대조군을 백분율로 표시하였다. 4.5 및 7.5Gy 선량군에서의 좌골신경 PDGF α -수용체의 밀도는 대조군에 비하여 초기에 감소현상으로 나타나, 1일구에서는 40%(4.5Gy)와 50%(7.5Gy)를, 그리고 2일구에서는 33%(4.5Gy)와 50%(7.5Gy)로 가장 낮은 값을 나타낸 후 점차 대조군에 근접하는 값으로 증가하는 경향이였으며, 한편 4.5 및 7.5Gy 선량군에서 좌골신경 PDGF β -수용체의 밀도는 역시 대조군에 비하여 각각 26%(4.5 Gy)와 27%(7.5Gy)의 최소 값을 나타낸 후 점차 대조군에 근접하는 값으로 증가하는 경향으로 나타났다.

이러한 실험의 결과를 미루어 보아서, 혈장 및 좌골신경의 PDGF의 농도와 좌골신경 PDGF α - 및 β -수용체의 밀도에 대한 방사선-유발성 변경이 골수 간세포 및 말초뉴런의 장애의 병인론에 관련되어 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Aardal, N., (1984) Circannual variation of circadian periodicity in murine colony-forming cells. *Exp. Hematol.* 12: 61-67.
2. Aardal, N. and Laerum, O. D., (1983) Circadian variations in bone marrow. *Exp. Hematol.* 11: 791-801.
3. Antoniades, H. N. and Williams, L. T., (1983) Human platelet structure and function. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Eng. Biol.* 42: 2630-2634.
4. Bernabei, P. A., Balzi, M., Saccardi, R., Becciolini, A. and Ferrini, P. R.,(1992) Time dependent sensitivity of rat CFU-GM to total body irradiation. *Haematologica.* 77: 21-24.
5. Bowen-Pope, D. F., Hart, C. E. and Seifert, R. A., (1989) Sera and conditioned media contain different isoforms of platelet-derived growth factor(PDGF) which bind to different classes of PDGF receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 2502-2508.
6. Bowen-Pope, D. F., van Koppen, A. and Schatteman, G., (1991) Is PDGF really important? Testing the hypotheses. *Trends Genetics* 7: 413-418.
7. Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
8. Claesson-Welsh, L., Hammacher, A., Westermark, B., Heldin, C.-H. and Nister, M.,(1989) Identification and structural analysis of the A type receptor for platelet-derived growth factor: Similarities with the B type receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 1742-1747.
9. Davis, J. B. and Stroobant, P.,(1990) Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* 110: 1353-1360.
10. Delattre, J. Y., Rosenblum, M. K. and Thaler, H. T., (1988) A model of radiation myelopathy in the rat. Pathology, regional capillary permeability changes, and treatment with dexamethasone. *Brain* 111: 1319-1336.
11. Deuel, T. F., Huang, J. S., Proffitt, R. T., Baenziger, J. U., Chang, D. and Kennedy, B. B., (1981) Human platelet-derived growth factor: Purification and resolution into two active protein fractions. *J. Biol. Chem.* 256: 8896-8899.
12. Dunbar, P. R., Harrison, A., Corkill, M. M. and Neale, T. J., (1993) Immunoassay of platelet-derived growth factor in the plasma of patients with scleroderma. *Br. J. Rheumatol.* 32: 966-971.
13. Eccleston, P. A., Collarini, E. J., Jessen, K. R., Mirsky, R. and Richardson, W. D., (1990) Schwann cells secrete a PDGF-like factor: Evidence for an autocrine growth mechanism involving PDGF. *Eur. J. Neurosci.* 2: 985-992.
14. Eccleston, P. A., Funari, K. and Heldin, C.-H., (1993) Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF α - and β -receptors in the peripheral nervous system : An analysis of sciatic nerves and dorsal root ganglia. *Devel. Biol.* 155: 459-470.
15. Eriksson, A., Rorsman, C., Ernlund, A., Claesson-

- Welsh, L. and Heldin, C.-H., (1992) Ligand-induced homo and heterodimerization of platelet-derived growth factor α - and β -receptors in intact cells. *Growth Factors* 6: 1-14.
16. Fike, J. R., Sheline, G. E. and Cann, C. E., (1984) Radiation necrosis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 28: 136-151.
 17. Franken, N. A. P., van der Laarse, A., Bosker, F. J., Reynart, I. W. C., van Ravels, F. J. M., Strootmn, E. and Wondergem, J., (1992) Time dependent changes in myocardial norepinephrine concentration and adrenergic receptor density following x-irradiation of the rat heart. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24: 721-727.
 18. Hammacher, A., Nister, M., Westermark, B. and Heldin, C.-H., (1989a) A human glioma cell line secretes three structurally and functionally different dimeric forms of platelet-derived growth factor. *Eur. J. Biochem.* 176: 179-186.
 19. Hardy, M., Reddy, U. R. and Pleasure, D., (1992) Platelet-derived growth factor and regulation of Schwann cell proliferation *in vivo*. *J. Neurosci. Res.* 31: 254-262.
 20. Harrison, A. A., Dunbar, P. R. and Neale, T. J., (1994) Immunoassay of platelet-derived growth factor in the blood of patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 37: 1142-1146.
 21. Hart, C. E., Bailey, M., Curtis, D. A., Osborn, S., Raines, E., Ross, R. and Forstrom, J. W., (1990) Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochem.* 29: 166-172.
 22. Heldin, C.-H. and Westermark, B., (1990) Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible *in vivo* function. *Cell Regulation* 1: 555-566.
 23. Heldin, C.-H. and Westermark, B., (1991) Platelet-derived growth factor and autocrine mechanisms of oncogenic processes. *CRC Crit. Rev. Oncogen.* 109-124.
 24. Heldin, C.-H., Östman, A. and Westermark, B., (1993) Structure of platelet-derived growth factor: Implications for functional properties. *Growth Factor* 8: 245-252.
 25. Hendry, J. H., Xu, C. X. and Testa, N. G., (1983) A cellular analysis of residual hemopoietic deficiencies in mice after 4 repeated doses of 4.5 Gray X rays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 9: 1641-8.
 26. Jaberaboansari, A., Landis, M. R. and Wallen, C. A., (1989) Alterations of neuronal nuclear matrix and chromatin structure after irradiation under aerobic and anoxic conditions. *Radiat. Res.* 119: 57-72.
 27. Jaberaboansari, A., Nelson, G. B. and Roti Roti, J. L., (1988) Postirradiation alterations of neuronal chromatin structure. *Radiat. Res.* 114: 94-104.
 28. Johnsson, A., Heldin, C.-H., Westermark, B. and Wasteson, A., (1982) Platelet-derived growth factor: Identification of constituent polypeptide chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 66-74.
 29. Kohler, N. and Lipton, A., (1974) Platelet as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp. Cell Res.* 87: 297-301.
 30. Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
 31. Lauk, S., Bohm, M., Feiler, G., Geist, B. J. and Erdmann, E., (1989) Increased number of cardiac adrenergic receptors following local heart irradiation. *Radiat. Res.* 119: 157-165.
 32. Lampert, P. W. and Davis, R. L., (1964) Delayed effects of radiation on the human central nervous system. *Neurology* 14: 912-917.
 33. Leibel, S. A. and Sheline, G. E., (1987) Radiation therapy for neoplasms of the brain. *J. Neurosurg.* 66: 1-22.
 34. Marks, J. E., Baglon, R. J. and Prasad, S. C., (1981) Cerebral radionecrosis: Incidence and risk in relation to dose, time, fractionation, and volume. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7: 243 - 252.
 35. Östman, A., Andersson, M., Hellman, U. and Heldin, C.-H., (1991) Identification of three amino acids in the platelet-derived growth factor (PDGF) B-chain that are important for binding to the PDGF β -receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 10073-10077.
 36. Pizzarello, D. J. and Witcofski, R. L., (1970) A possible link between diurnal variations irradiation sensitivity and cell division in bone marrow of male mice. *Radiol.* 97: 165-7.
 37. Raines, E. W. and Ross, R., (1982) Platelet-derived growth factor. I. High yield purification and evidence for multiple forms. *J. Biol. Chem.* 257: 5154-5160.
 38. Raines, E. W., Bowen-Pope, D. F. and Ross, R., (1990) Platelet-derived growth factor. In Sporn, M. B. and Roberts, A. B. (ed.), *Handbook of Experimental Pharmacology. Peptide growth and their*

- receptors*. Springer-Verlag, Heidelberg, 9: 173-262.
39. Richardson, W. D., Raff, M. C. and Noble, M., (1990) The oligodendrocyte-type 2 astrocyte lineage. *Semin. Neurosci.* 2: 445-454.
 40. Rider, W. D., (1963) Radiation damage to the brain—a new syndrome. *J. Ca. Assoc. Radiol.* 14: 67-69.
 41. Ross, R., (1989) Platelet-derived growth factor. *Lancet* 1: 1179-1182.
 42. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L., (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 71: 1207-1210.
 43. Sasahara, M., Fries, J. W. U., Raines, E. W., Gown, A. M., Westrum, L. E., Frosch, M. P., Bonthron, D. T., Ross, R. and Collins, T., (1991) PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. *Cell* 64: 217-227.
 44. Smits, A., Kato, M., Westermark, B., Nister, M. and Heldin, C-H., (1991) Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF) : Rat neuronal cells possess functional PDGF β -type receptors and response to PDGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8159-8163.
 45. Stoney, P. J., Halberg, F. and Simpson, H. W., (1975) Circadian variation in colony-forming ability of presumably intact murine bone marrow cells. *Chronobiologia.* 2: 319-324.
 46. Thornton, S. C., Walsh, B. J., Bennett, S., Robbins, J. M., Foulcher, E., Morgan, G. W., Penny, R. and Breit S. N., (1996) Both *in vitro* and *in vivo* irradiation are associated with induction of macrophage-derived fibroblast growth factors. *Clin. Exp. Immunol.* 103: 67-73.
 47. Vacek, A. and Rotkovic, D., (1970) Circadian variations in the effect of X-irradiation on the hematopoietic stem cells of mice. *Strahlentherapie.* 140: 302-326.
 48. van der Kogel, A. J., (1986) Radiation-included damage in the central nervous system: An interpretation of target cell responses. *Br. J. Cancer* 53 (Suppl. 7): 207-217.
 49. Weinmaster, G. and Lemake, G., (1990) Cell-specific cyclin AMP mediated induction of the PDGF receptor. *EMBO J.* 9:915-920.
 50. Westermark, B. and Wasteson, A., (1976) A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp. Cell Res.* 98: 170-174.
 51. Witte, L., Fuks, Z., Haimovitz-Friedman, A., Vlodavsky, I., Goodman, D. S. and Eldor, A., (1989) Effects of irradiation on the release of growth factors from cultured bovine, porcine, and human endothelial cells. *Cancer Research.* 49: 5066-5072.
 52. Yeh, H-J., Ruit, K. G., Wang, Y-X., Parks, W. C., Snider, W. D. and Deuel, T. F., (1991) PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. *Cell* 64: 209-216.
 53. Yeh, H-J., Silos-Santiago, I., Wang, Y-X, George, R. J., Snider, W. D. and Deuel, T. F., (1993) Developmental expression of the platelet-derived growth factor α -receptor gene in mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1952-1956.