

**방사선의 학기 술 개 발 사업**

**SMP30 결손 마우스를 이용하여 방사선의 전사조절기전에  
근거한 조직손상 제어기술개발**

**Development of Radioprotectors Based on Transcription-regulatory  
Mechanism of Radiation Using SMP30 KO Mice**

**부 산 대 학 교**

**과 학 기 술 부**

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ SMP30 결손 마우스를 이용하여 방사선의 전사조절기전에 근거한 조직손상 제어 기술개발에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2007. 8. 28

주관연구기관명	: 부산대학교
주관연구책임자	: 정 해 영
연 구 원	: 김 대 현
”	: 김 지 영
”	: 허 형 삼
”	: 하 영 미
”	: 고 은 경
”	: 정 재 현
”	: 최 재 훈
”	: 김 지 민
”	: 임 현 애
”	: 정 경 식

## 보고서 초록

과제관리번호	2006-04978	해당단계 연구기간	2006.09.29 - 2007.06.28 (9개월)	단계 구분	1단계 / 1단계
연구사업명	중 사업명	방사선기술개발사업			
	세부사업명	방사선의학기술개발사업			
연구과제명	대 과제명	원자력연구개발사업			
	세부과제명	SMP30 결손 마우스를 이용하여 방사선의 전사조절기전에 근거한 조직 손상 제어기술 개발			
연구책임자	정해영	해당단계 참여연구원 수	총 : 11명 내부 : 1명 외부 : 10명	해당단계 연구비	정부: 120,000 천원 기업: 천원 계: 120,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	부산대학교 약학대학/ 장수생명과학기술연구소		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	36
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 방사선 조사에 의하여 SMP30 KO 마우스의 산화스트레스 손상 (ROS 생성량, PTK/PTP level, 항산화 GSH level, RNS 생성량, 지질 과산화물 생성량 검토)에 대한 결과를 확인하였음</li> <li>• 이들 마우스에서 방사선 조사의 산화 스트레스 영향에 따른 redox 감수성 전사인자 (NF-κB / FOXO1, 3a)의 인산화 신호전달 및 활성화 기전을 검토하였음</li> <li>• 방사선 조사에 의한 redox 감수성 전사인자에 의하여 생체 내 염증관련 유전자 단백질인 COX-2, iNOS, VCAM1, ICAM1, E-selectin이 발현됨으로써, 방사선 조사와 염증 관련 기전의 상관관계를 확립하였음</li> <li>• 방사선 조사에 의한 신장 조직에서의 세포사 현상이 세포사멸 지표 Bax/Bcl-2, 세포괴사 지표 HMGB1, 세포막의 손상지표 MDA/HAE의 변화에 의하여 확인되었음</li> <li>• 이들 방사선 조사에 의한 redox 감수성 전사인자 발현에 따른 조직 손상 기전이 phenolic 화합물인 Baicalein과 sulfide계 화합물인 Allylmethyl sulfide에 의하여 산화스트레스 손상 (ROS 생성량, PTK/PTP level 불균형, GSH level 감소, 지질 과산화물 생성량 증가) 현상이 회복되었음</li> <li>• Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 전사인자 NF-κB/FOXO의 활성화가 조절되었으며, 이들은 MAPKs와 PI3K/Akt signaling을 통한 경로임을 재확인하였음</li> <li>• Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 염증 관련 단백질(COX-2, iNOS, AMs)들의 발현량이 감소되었으며, 조직 손상 지표 단백질인 Bax/Bcl-2/HMGB1의 발현량이 감소되었음</li> <li>• 이러한 전자 조절 기전의 제어와 조직 손상의 제어는 곧 방사선 손상 보호 약물로서의 가능성을 가져와 앞으로 방사선 조사 관련 보호 신약 개발에의 활용이 가능할 것으로 여겨짐</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	SMP30 결손마우스, 보호, 기전, 방사선, 전사인자, 비타민C, 조직손상, 산화환원			
	영 어	SMP30 KO mice, Protection, Mechanism, Radiation, Transcription factor, Vitamin C, Tissue damage, Redox			

# 요 약 문

## I. 제 목

SMP30 결손 마우스를 이용하여 방사선의 전사조절기전에 근거한 조직손상 제어기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- ◎ 목적: 방사선 노출은 인체내 redox status(산화·환원상태)의 불균형을 초래 하여 redox 감수성 전사인자조절을 통해서 조직손상을 초래한다. 따라서 본 연구는 특이적인 유전자 변이 동물모델 SMP30 결손 마우스 (SMP30 KO, 비타민 C 합성을 할 수 없어 인체의 산화·환원 상태와 일치하는 특수모델)를 이용하여 방사선 노출에 의한 생체내 redox에 관여하는 전사인자를 탐색하여 그 기전을 규명함으로써 조직손상의 분자기전을 규명하고, 이에 근거한 조직손상을 제어할 수 있는 기술을 개발한다.
- ◎ 필요성: 방사선의 산화스트레스 손상에 따른 전사조절 기전과 이에 근거한 조직손상 제어기술에 대한 새로운 분자적인 접근으로 학문이 새롭게 발전될 계기가 되며, 이는 곧 새로운 방사선에 의한 조직손상 예방기술 및 조기 예방이 가능하게 되고, 결국에는 이를 근거로 하는 새로운 형태의 방사선 노출에 의한 예방물질 발굴이 가능

## III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2006년도 (1차년도)	방사선 노출에 의한 생체내 redox status, 조직손상지표 및 redox 감수성 전사인자 검토와 방사선 방어 물질 발굴	1)방사선 노출에 의한 생체내 redox변화 및 조직손상지표 확인 · 방사선 조사에 의한 ROS, 지질과산화, 조직손상지표 Bax/Bcl2, HMGB1를 검토하였음 2)방사선 노출에 의한 redox 감수성인자 NF-κB / FOXO 검토 · NF-κB / FOXO 조절기전 및 인산화 검토 · PTK/PTP, PI3K/Akt 및 MAPKs 정보전달계 및 분자기전 규명 3)방사선 노출 저해에 효과가 있는 sulfide, phenol관련 화합물 탐색 · 활성물질 2종 발굴 · 신물질을 통한 방사선 노출로 유도된 조직손상 저해기전 확인

#### IV. 연구개발결과

- 방사선 조사에 의하여 SMP30 KO 마우스의 산화스트레스 손상 (PTK/PTP level 변화, 항산화 GSH level 감소, 지질 과산화물 생성량 증가)에 대해 확인한 결과, PTK/PTP level의 불균형 초래 및 GSH level의 감소와 지질 과산화물(MDA/HAE) 생성량의 증가가 관찰되었다.
- 이들 마우스에서 방사선 조사의 산화 스트레스 영향에 따른 redox 감수성 전사인자 (NF- $\kappa$ B / FOXO1, 3a)의 인산화 신호전달 기전 및 발현 기전을 검토한 결과, MAPKs의 인산화에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화 및 PI3K/Akt signaling에 의한 FOXO1, 3a의 인산화가 관찰되었다.
- 방사선 조사에 의한 redox 감수성 전사인자에 의하여 생체 내 염증관련 물질인 COX-2, iNOS, VCAM1, ICAM1, E-selectin등이 발현함으로써, 방사선 조사와 염증 관련 기전의 상관관계를 확립하였다.
- 방사선 조사에 의한 신장 조직의 세포사 현상이 세포사멸 지표 Bax/Bcl-2, 세포괴사 지표 HMGB1의 발현량 변화에 의하여 확인되었다.
- 이들 방사선 조사에 의한 redox 감수성 전사인자 발현에 따른 조직 손상 기전이 phenol계 화합물인 Baicalein과 sulfide계 화합물인 Allylmethyl sulfide에 의하여 산화스트레스 손상 (ROS 생성량, PTK/PTP level 불균형, GSH level 감소, 지질 과산화물 생성량 증가) 현상이 회복되었다.
- Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 전사인자 NF- $\kappa$ B/FOXO의 활성화가 조절되었으며, 이들은 MAPKs와 PI3K/Akt signaling을 통한 경로임을 재확인하였다.
- Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 염증 관련 단백질(COX-2, iNOS, AMs)들의 발현량이 감소되었으며, 조직 손상 지표 단백질인 Bax/Bcl-2/HMGB1의 발현량이 감소되었다.
- 이러한 전자 조절 기전의 제어와 조직 손상의 제어는 곧 방사선 손상 보호 약물로서의 가능성을 가져와 앞으로 방사선 조사 관련 보호 신약 개발에의 활용이 가능할 것으로 여겨진다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 방사선의 전자조절 기전에 근거한 조직손상 제어기술에 대한 새로운 분자적인 접근으로 학문이 새롭게 발전될 계기가 됨
- 새로운 방사선에 의한 조직손상 예방기술 및 조기 예방이 가능하게 되고, 이를 근거로 하여 새로운 형태의 방사선 노출에 의한 예방물질 발굴이 가능
- 방사선 노출에 의한 예방의학의 발굴로 방사선 노출기전 조절 및 예방이 가능하게 됨으로써 방사선 노출에 따른 조직손상 제어기술이 도출됨
- 다양한 후보물질에 대한 방사선 작용의 메카니즘 해석기술과 함께 접목되어 생체기능 조절을 통한 방어 효능 증대, 방어 가능성 유도, 물질 합성 등 효율적인 방사선 도출에 직접적으로 기여함으로써 방사선의 긍정적 이용효율을 높이는 동시에 방사선 장해로부터 인적자원을 보전하는데 크게 기여함
- 방사선에 의한 조직손상의 분자기전 규명을 위한 연구결과 및 확립된 실험기법은 방사선 방어제 후보물질 개발시 작용기작 연구 및 고효능 방사선 방어제 개발시 핵심 기술로 활용될 수 있다.

## S U M M A R Y

Since radiation injury is known to be implicated in redox imbalance caused by oxidative stress, we studied the modulation of redox-sensitive transcription factors NF- $\kappa$ B and FOXO 1/3a by irradiation in SMP30 KO mice.

We found that irradiation induced the phosphorylation of redox sensitive transcription factors, NF- $\kappa$ B and FOXO 1/3a *via* PTK/PTP imbalance and lipid peroxidation in SMP30 KO mice. These phosphorylation was modulated by MAPKs and PI3K/Akt signaling. Also, irradiation activated NF- $\kappa$ B-response genes, such as COX-2, iNOS, and adhesion molecules. Furthermore, irradiation increased pro-apoptotic protein Bax and necrosis marker HMGB1 in contrast to decrease of anti-apoptotic protein Bcl-2. These results indicated that irradiation modulated tissue damage through the imbalance of redox status and phosphorylation of redox sensitive transcription factors in SMP30 KO mice.

We discovered that 6 kinds of phenolic and sulfide compounds have anti-oxidative activity. Among them, baicalein and allylmethyl sulfide showed the potent activity. They protected effect of irradiation in SMP30 KO mice. They modulated irradiation-induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B and FOXOs through MAPKs and Akt pathways. Moreover, baicalein and allylmethyl sulfide diminished irradiation-induced Bax and HMGB1 proteins.

Therefore, irradiation modulated redox status and redox sensitive transcription factors in SMP30 KO mice and these activations are significantly suppressed by treatment with baicalein and allylmethyl sulfide.

# C O N T E N T S

1. Synopsis of Research and Development Project
2. Necessity of Research
3. The present condition of the internal and external technical development
4. Aim attainment and coherence of related field
5. Application plan of results of Research and Development
6. Results
7. The external scientific and technical information of collected from research and development process

# 목 차

1. 과제개요
2. 연구개발의 필요성
  - 가. 기술적 측면
  - 나. 경제·산업적 측면
  - 다. 사회·문화적 측면
3. 국내외 기술개발 현황
4. 연구개발 목표 및 달성도
5. 연구개발 결과 활용방안
6. 연구 성과
7. 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보



## 제 1장 연구개발과제의 개요

### 제 1절 연구개발의 목적

방사선 노출은 생체내의 redox status(산화·환원상태)의 불균형을 초래 하여 redox 감수성 전사인자조절을 통해서 조직손상을 초래한다. 따라서 본 연구의 목적은 일반적인 C57BL/6 마우스와 달리 특이적인 유전자 변이 동물모델 SMP30 결손 마우스 (SMP30 KO, 비타민 C 합성을 할 수 없어 인체의 산화·환원 상태와 일치하는 특수모델)의 모델을 이용하여 방사선 노출에 의한 생체내 redox에 관여하는 전사인자를 탐색하여 그 기전을 분자적으로 규명함으로써 조직손상의 분자기전을 규명하고, 이에 근거한 조직손상을 제어할 수 있는 기술 및 물질을 개발하는 것에 있다.

### 제 2절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

1895년에 X-선이 발견되고 1896년에 방사능이 발견된 이후 오래지 않아 방사선이 인체에 유해한 영향을 끼친다는 임상적 증거가 나타나기 시작하였다. 그 후 산업사회가 도래하면서 방사선의 이용분야가 급증함에 따라 인류는 스스로를 방사선으로부터 보호하기 위해 전리방사선의 생물학적 효과에 관한 연구를 수행하여 왔다.

전리방사선의 생물학적효과는 크게 두가지로 직접효과와 간접효과로 나뉜다. 직접효과는 방사선이 DNA분자의 원자 또는 세포의 생존에 중요한 역할을 하는 세포구성요소와 반응을 하여 세포가 증식 또는 생존하는데 영향을 주는 효과를 의미한다. 간접적효과는 방사선이 입사되었을때 DNA보다 오히려 물과 반응하여 물분자의 결합을 끊고 수소와 수산기 및 수화전자를 생성하여 이들 화학종이 다시 반응하여 과산화수소와 같은 독성을 지닌 화합물을 구성하여 DNA를 공격하여 절단함을 의미한다. 위와 같은 생물학적 효과를 나타내는 전리방사선이 인체에 노출이 되면 생체의 조직손상과 방어에 매우 중요한 역할을 하는 산화·환원상태 (redox status)의 균형이 깨져 redox 감수성 전사인자의 활성이 변화하여 그들에 의해 여러 유전자들의 발현 변화를 초래한다.

하지만 방사선의 전사조절기전에 근거한 조직손상 제어기술에 대한 연구는 미비한 실정이다. 방사선의 전사조절기전에 근거한 조직손상 제어기술의 개발에 따른 이점은 첫째, 관련 제약업체 및 식품 업체의 연구 투자를 유도하고 관련 분야 기초 및 응용연구의 활성화로 전반적인 국가 경쟁력이 제고되며 둘째, 새로운 방사선에 의한 조직 손상 예방 기술 및 조기 예방이 가능하게 되고 이를 근거로 하여 새로운 형태의 방사선 노출에 의한 예방 물질 발굴이 가능하며 셋째, 그에 따라 방사선노출에 의한 예방의학의 발굴로 방사선 노출에 의한 조직손상기전의 조절 및 예방이 가능하게 됨으로써 방사선 노출에 따른 조직손상 제어 기술이 도출될 것이다.

따라서 방사선의 전사조절기전에 근거한 조직손상 제어기술을 개발하는 것은 전사조절의 분자수준 해명과 제어 물질 개발 등의 연구로 기초 과학 및 응용과학 전반의 수준을 향상시킬 수 있는 파급효과를 나타낼 것이며 새로운 분자적인 접근으로 학문이 새롭게 발전될 계기가

될 것이다.

## 2. 경제·산업적 측면

방사선에 의한 전사조절기전에 근거한 조직손상 제어기술을 개발하여 탐색된 제어물질은 본 연구에서 밝혀낸 전사조절기전을 바탕으로 하여 활성물질의 효능 평가를 수행한 다음 임상검증을 거쳐 제품화가 가능한 기업체로 기술 이전할 예정이다. 또한 이러한 활성물질은 방사선 치료에 있어 암 조직 주변의 정상조직을 보호하므로 상대적으로 방사선 조사선량을 증가시킬 수 있어 치료효과를 높이는 데 직접적으로 기여할 뿐 아니라, 방사선 노출관련 질환 및 활성산소 관련 만성질환의 치료·예방 물질을 도출하기 위한 물질기반으로 활용될 수 있다.

또한 이 제어물질을 방사선 종사자뿐만 아니라 일반인들도 활성산소 관련 질환의 치료, 예방 차원에서 복용하게 되면 방사선 노출에 의해 유발되는 질환을 치료, 예방할 수 있다. 이것은 방사선 종사자들은 좀 더 안전하고 건강하게 일을 할 수 있고, 일반인들에게는 방사선에 대한 두려움을 감소시켜 경제, 산업적인 측면에서 상당한 이익을 창출할 것이다.

다양한 후보물질에 대한 방사선 작용의 메커니즘 해석 기술과 함께 접목되어 생체기능 조절을 통한 방어 효능 증대, 방어 기능성 유도, 물질 합성 등 효율적인 방사선 도출에 직접적으로 기여함으로써 방사선의 긍정적 이용효율을 높이는 동시에 방사선 장해로부터 인적자원을 보전하는데 크게 기여하고 일반인들의 방사선에 대한 두려움을 감소시켜 경제·산업적인 측면에서 상당한 이익을 창출할 것으로 예상된다.

## 3. 사회·문화적 측면

현재 원자력 발전과 방사선 및 방사선동위원소 (RI)의 이용을 축으로 원자력은 이미 어떤 과학기술분야 못지않게 생활 속에 스며들어 있다. 이에 따라 우리나라는 원자력과 방사선 연구의 특성화와 핵심·전략기술의 자립, 연구기반의 강화, 기관운영의 활성화를 통해 2010년경 원자력기술 G5에 진입하여 세계 원자력 연구개발을 주도한다는 비전을 설정하고 있다. 원자력 발전 뿐만 아니라 또 다른 방사선 및 방사선 동위원소 이용 즉 비발전 분야는 오히려 발전분야 보다 개발역사가 길며 실제로 전기 못지않게 보이지 않은 분야에서 우리들의 삶을 뒷받침해 주고 있을 뿐만 아니라 앞으로의 그 이용 가능성도 무궁무진하다.

방사선은 의료, 산업, 정밀 분석, 식품 보전 그리고 각 종 연구개발에 이르기까지 다양한 분야에서 광범위하게 이용되고 있다. 2005년 통계청 발표에 의하면 우리나라에는 산업체, 공공기관, 의료기관, 교육기관, 연구기관 등 2,336 곳의 방사선 허가 기관이 있다. 특히 의료분야 경우 매년 120만 명의 암환자가 새로이 발생하고 있는 미국에서는 지금 이 시간에도 1시간당 100명의 암환자가 방사선 및 방사선 동위원소로 건강진단 또는 질병치료를 받고 있다고 한다. 따라서 방사선 및 방사선 동위원소의 의료·농업·환경·공업적 이용을 확대하여 고부가가치 정부 주도의 연구개발지원이 필요하다.

방사선 허가 기관이 확대될수록 당 기관의 종사자들뿐만 아니라 우리는 인식하지 못 하는 사이에 자연에서 발생하는 방사선에 노출되므로 방사선 노출에 의한 조직손상의 분자기전해명과 제어기술 개발은 절실히 요구된다. 따라서 방사선 노출에 의한 조직손상의 분자기전과 제어

기술 개발은 조절기전을 밝히고 그에 근거하여 조직손상 제어기술을 개발함으로써 방사선 노출에 의한 질병을 예방할 수 있는 기반을 마련하게 된다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내·외 연구기관의 연구개발 동향 및 기술수준

세계적으로 방사선 방어제에 대한 천연물질의 효용성 및 기능성을 중요시하고 이들 천연물질로부터 효능이 뛰어난 물질을 분리, 개발해 내기 위한 연구에 많은 나라가 노력을 기울이고 있으나 아직까지 천연물질로부터 실용성 있는 방어제를 개발한 사례는 거의 없으며 기존의 합성 방어제는 방어효능 뿐 아니라 심각한 부작용도 동반하므로 실제 임상적용이 거의 어려운 실정이다.

국외의 경우 합성 aminothiols인 WR-2721 및 그 유도체인 WE-1065 (WR-2721의 dephosphorylated form) 및 selenium과 같은 WR-series로 명명되는 방사선 방어물질이 개발되고 있으며 이들 연구는 방사선에 의해 세포내에 생성된 활성산소를 제거하거나 그 작용을 억제하려는 노력에서부터 시작되었다고 할 수 있다. 여러 가지 활성물질들이 방사선 손상을 줄이는 효과가 있는 것으로 확인되었지만 대부분의 방사선 방어제 후보물질은 심각한 부작용으로 인하여 사용상의 제한을 받고 있다.

이러한 제약 때문에 방사선 연구와 함께 대두되기 시작한 것이 천연물질을 이용한 방사선 방어물질 개발 연구로, 가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*), 인삼(*Panax ginseng*)의 추출물과 단일 물질인 dithiothreitol 및 중국전래의 건강보조식품인 lifukang이 효과가 있다는 것을 입증한 연구 보고가 있다. 또한 브로콜리 또는 양배추, 토마토, 녹차 등의 방사선 방어효과가 보고되어 있다. 그러나 천연 약용식물의 종류는 매우 다양하고 그들의 방사선 방어작용이 복합적이어서 이에 대한 보다 체계적인 활성 검색이 요구되고 있다.

### 제 2절 국내 연구개발 동향 및 선진국과의 기술격차

선진국에 비해 국내의 방사선 방어물질에 관한 연구는 아직까지 체계적으로 이루어지지 못하고 있는 실정이며 각개 관심 있는 방사선 관련분야 연구자들에 의한 단편적인 연구결과가 보고되고 있다. 현재의 국내 기술수준은 방사선 방어제 효능평가 방법론을 정립하는 단계이며, 방사선의 의료적 이용에 따르는 불가피한 방사선 장해를 극복하고 인체를 보호하기 위한 노력이 국가경쟁력 강화에 차원에서 이루어져야 한다는 인식이 늘어나고 있다. 현재 국내에서 방사선이 체내에서 생성하는 ROS을 저해하는 천연물질을 찾으려는 연구는 진행 중에 있으나, 방사선이 redox (산화·환원 상태) 감수성 전사인자를 조절하여 조직손상을 일으키는 분자기전과이에 근거한 조직손상 제어기술에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 방사선의 생체내 작용에 대한 보다 근본적인 연구가 절실히 요구된다.

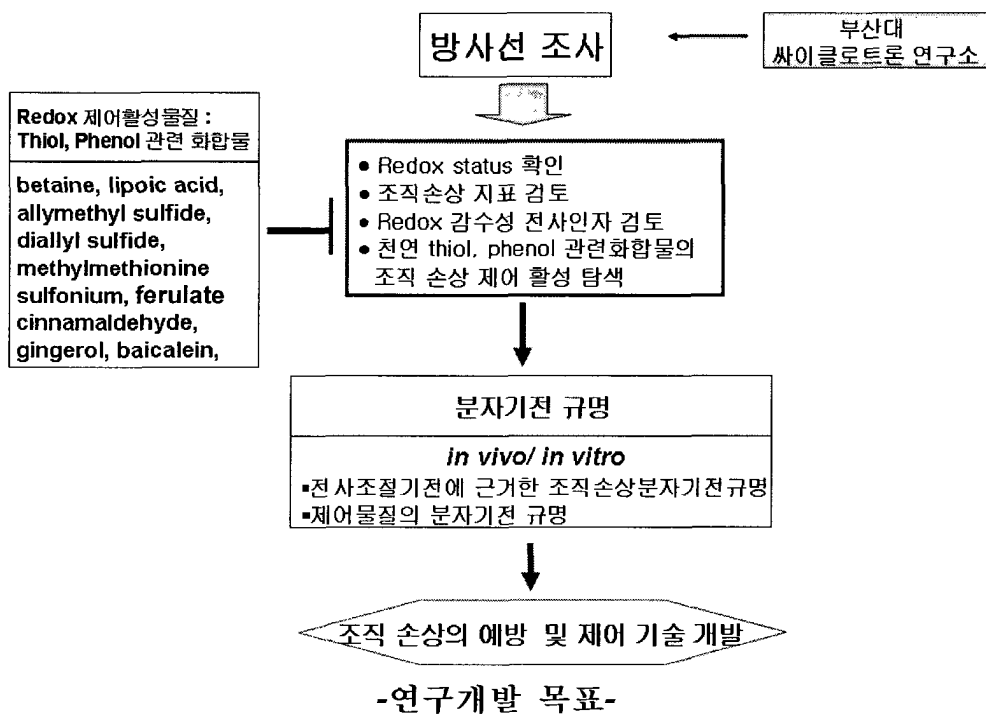
### 제 3절 현기술상태의 취약성

미국과 유럽의 선진국들은 라돈을 자연방사선 방어대상 물질로 규정하고 있다. 영국에서는 매년 폐암 사망 중 약 2000건 (전체의 약 6%)은 거주지 라돈에 의한 것으로 추정되며, 흡연으로 인한 폐암 다음이라고 한다. 미국에서는 매년 발생하는 6000-36000명의 폐암 사망 (전체의 10-12%)이 실내 라돈과 연관된 것으로 추정하고 있다.

최근의 연구에 따르면, 서울시내 대부분의 지하철 역사에서 지하로 내려갈수록 라돈 농도가 높아지는 경향을 보였고, 6개 지하역사에서는 미국 환경청의 권고 기준 (4pci/L)을 초과하는 결과가 나왔다고 한다. 그럼에도 불구하고, 우리나라는 지금껏 '실내공기질 관리법'에서도 라돈은 측정 대상에서 제외된 상태이고, 다른 나라와 같이 정밀한 라돈지도 만들기 위한 조사가 진행된적도 없다 (뉴스위크 2006년 4월 32호). 외국의 경우 WR-series를 명명되는 방사선 방어 물질이 개발되고 있다. 이 방어 물질을 투여함으로써 방사선 피폭 후 생존 기간을 연장 시킬 수 있다는 많은 연구보고가 있었지만 이들 물질이 가지고 있는 자체 독성 때문에 실용화되지는 못하고 있는 실정이다 (Grdina et al., 1985; Smoluk et al., 1988).

세계적으로 천연물질의 효용성 및 기능성을 중요시하고 이들 천연물질로부터 효능이 뛰어난 물질을 분리, 생산해 내기 위한 연구에 많은 나라가 노력을 기울이고 있으나 아직까지 천연물질로부터 실용성 있는 방어제를 개발한 사례는 없으며 기존의 합성 방어제는 방어 효능과 함께 나타내는 부작용 때문에 실제 임상적용이 거의 어려운 실정이다.

### 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과



## 제 1절 연구 방법

### 1. 방사선 조사에 의한 생체내 redox status, redox 감수성 전사인자 및 제어물질 탐색

가. 방사선 조사에 이용된 SMP30 KO 마우스

- (1) 8주령인 SMP30 유전자가 결손된 SMP30 KO 마우스를 본 실험에서 사용하였다. 방사선 조사는 기존에 보고된 방법을 따른다. 즉, 부산대 싸이클로트론 연구소의  $^{60}\text{Co}$  감마선원을 0, 1, 3, 5, 9 Gy를 조사한 group과 엑스선원을 15 Gy 조사한 group으로 실험하였다. 조사선량은 Fricher dosimeter로 측정하였다.
- (2) SMP30 KO 유전자 결손 모델 : SMP30의 결손은 비타민 C 합성에 관여하는 gluconolactonase가 생성되지 않아 생체내 vitamin C가 합성되지 않는다. 그 결과, 이 모델은 인체의 redox 상태와 일치하는 모델이다 [1].
- (3) 기존의 마우스, 랫을 이용한 방사선의 redox 관련 연구는 vitamin C를 합성하는 모델이므로 인체와 전혀 다른 상태인데 비해 본 SMP30 KO mice 모델은 비타민 C를 합성할 수 없어 인체의 redox 상태와 일치하는 특수 동물모델이다.

나. 방사선 조사에 의해 redox status 및 역할 확인

- (1) 방사선 조사에 의한 ROS 및 RNS 생성계 검토
- (2) 방사선 조사에 의한 ROS 제거계 검토

다. 예비실험에서 도출된 redox제어 활성물질

본 연구실에서 수년전부터 연구한 redox 제어활성물질인 thiol 유도물질 betaine (구기자), lipoic acid (브로콜리), allylmethyl sulfide (마늘), methylmethionine sulfonium (양배추)과 항산화성 redox제어물질 cinnamaldehyde (계피), gingerol (생강), baicalein (황금)등을 활용하여 방사선 방어물질의 활성을 스크리닝 한 후 그중 가장 활성이 좋은 후보물질을 선택하여 일정량을 마우스에 투여한 후 방사선 보호 효과에 대하여 검토하였다.

라. 방사선 조사에 의한 redox 변화 검토 (*in vivo*)

- (1) 산화스트레스 확인: ROS 생성능

조직을 균질화한 후 cytosol을 획득하여 조직내 ROS 생성능을 dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)을 이용하여 측정하였다. 25  $\mu\text{M}$  DCFH-DA 존재 하에서 생성된 형광의 변화를 excitation 485 nm 및 emission 530 nm에서 30분간 Microplate Fluorescence genious (TECAN)으로 측정하였다.

- (2) 항산화 효소 GSH level 확인 : 조직을 균질화한 후 cytosol을 획득하여 조직내 GSH level을 GSH assay kit을 이용하여 측정하였다.

- (3) 조직내 redox 감수성 전사인자 및 염증관련 단백질의 변화 확인 : NF- $\kappa$ B, FOXO1/3a, MAPKs, PI3K/Akt, Adhesion molecules

(가) Western blotting

Postmitochondria 분획을 동량의 gel loading buffer (0.125 M Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromphenol blue)와 혼합한 후 5분간 끓인다. 각각의 sample (100  $\mu$ g)을 10-15% sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide mini-gel에서 1시간 30분간 15 V에서 전기영동시킨다. Towbin buffer (25 mM Tris-Cl, 192 mM glycine, 20% MeOH)를 이용하여 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane에 transfer시키고, 비특이적 단백결합을 차단하기 위해 membrane을 5% non-fat milk를 함유하는 washing buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% tween-20)에서 1시간 동안 shaking을 시킨 후 washing buffer로 1번 세척을 하고 각각의 1차 항체와 실온에서 1 시간 동안 반응시킨다. Washing buffer로 3회 세척하고 horseradish-peroxidase가 결합된 2차 항체와 실온에서 1 시간 동안 반응시킨다. washing buffer로 4회 세척후 ECL detection reagent를 가하여 생성되는 인광을 Hyperfilm에 감광시켜 현상하여 signal을 확인한다. pre-stained blue protein markers (Bio-rad)를 이용하여 분자량을 확인한다.

#### 마. 조직손상 지표 확인

##### (1) MDA / HAE

조직에서 세포질을 분리한 다음 MDA/HAE assay kit을 이용하여 변화량을 확인하였다.

##### (2) Bax / Bcl-2

조직에서 세포질을 분리한 다음 Western blotting을 이용하여 변화량을 확인하였다.

##### (3) HMGB1

조직에서 세포질을 분리한 다음 Western blotting을 이용하여 변화량을 확인하였다.

#### 바. 산화, 환원에 의해 활성화되는 redox 감수성 전사인자 탐색 (*in vivo*) : NF $\kappa$ B, PPAR, FOXO

##### (1) Gel retardation (Band shift) analysis

###### (가) Nuclear extract 분리

조직에 homogenization buffer (0.3 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.6), 0.74 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5mM PMSF, 2  $\mu$ g/ml each of aprotinin, leupeptin, bestatin)를 가하여 혈액을 제거한 후 Potter homogenizer에 homogenization buffer 일정량을 가하여 homogenize 한다. Homogenate는 cheese cloth를 통과시켜 미마쇄 부분을 제거한다. 2배의 cushion buffer를 가한 후 1 $^{\circ}$ C, 24,000 rpm ,50min간 원심분리한다. 상등액을 제거한 후 nuclear pellet의 buffer를 제거하기 위하여 얼음위에서 10분간 건조시킨다. Nuclear storage buffer (25% glycerol, 50 mM HEPES (pH 7.6), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 0.1 mM PMSF)를 가하여 suspending하여 몇 개로 나누어 liquid nitrogen에 방치 한다. 냉동된 nuclei에 storage reconstitution buffer (2.5% glycerol, 2 mM HEPES (pH 7.6), 116 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1.0

mM NaMoO<sub>4</sub>, 2 μg/ml each of aprotinin, leupeptin, bestatin)를 가하여 suspension시킨다. Nuclear pellet은 nuclear lysis buffer (10% glycerol, 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1.0 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 2 μg/ml each of aprotinin, leupeptin, bestatin) 일정량을 가하여 suspension시킨다. 이 nuclear suspension의 반은 새로운 tubes에 이동시켜서 4M ammonium sulfate (pH 7.9)를 본래 부피 1/10을 가하여 잘 혼화한후 4°C에서 30-60min간 약간 흔들여 주면서 방치한다. 이것을 1°C, 35,000rpm, 20분간 원심분리한다. 상등액에 ammonium sulfate의 powder를 0.33 g/ml 가하여 녹인후 0°C, 15min간 shaking없이 방치한다. 다시 1°C, 35,000rpm, 20분간 원심분리하여 상등액은 버린후 10min간 얼음위에서 물기를 제거한다. 얼어진 nuclear protein pellet은 nuclear dialysis buffer (20% glycerol, 20 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 1 mM NaMoO<sub>4</sub>, 2 μg/ml each of aprotinin, leupeptin, bestatin) 적당량을 가하여 suspension한다. 이 pellet은 얼음위에서 overnight 방치한다. Nuclear protein extract는 nuclear dialysis buffer로 4시간동안 투석한다. 투석후 nuclear extract는 4°C, 10min동안 spinning한다. 상등액을 분리하여 liquid nitrogen에 보관한다.

#### (나) Oligomer labeling

DNA 주형과 상보적 DNA를 75°C에서 5분간 가온하여 서서히 식혀서 double strand로 만든다. labeling은 oligo double strand 4 pmol, T4 oligonucleotide kinase 10U, 10X T4 kinase buffer 3 μl, γ-<sup>32</sup>P ATP 3 μl를넣고 전량을 20 μl로 하여 37°C에서 1시간 반응한다. 반응 후 Yeast t-RNA 20μg, 증류수 80 μl, 8M A.A 50 μl, EtOH 300 μl를 가하여 섞은 후 -80°C에서 30분간 방치 후 12,000rpm에서 25분간 원심분리시킨다. 생성된 침전을 75% EtOH로 세척한 후 건조시켜 100-200 μl의 증류수에 녹여 band shift에 사용한다.

#### (다) Transcription factor 확인

각 tubes에 incubation buffer [H<sub>2</sub>O 2μl, TETG 8 μl, poly dIdC (2 μg/ml) 1 μl, 1:1000 β-mercaptoethanol 1 μl, 10X binding buffer (120 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 30mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris pH 8.0, 6 mM EDTA) 2 μl] 17 μl를 취한다. Probe (17-35 pg)을 가하고 nuclear extract를 가하여 23-25 μl가 되도록 한다. 4°C에서 incubation후 0.1% bromphenol blue 2 μl를 가한 후 gel을 5% acrylamide gel에 loading후 1X TBE buffer를 running buffer로 50mA에서 running한다. Gel을 건조시킨 후 autoradiography로 감광하여 band를 비교 검토한다.

사. Redox 제어에 관여하는 thiol 화합물 중 redox 감수성 전사 제어 활성이 높은 물질탐색

2. Redox 분자기전 경로규명과 이에 근거한 방사선 노출에 의한 조직 손상의 예방 및 수복 기술 개발

가. Redox 변화에 의해 조절되는 전사인자의 활성화 기전 검토

핵 내 전사인자의 활성화 기전을 검토하기 위하여 마우스 조직의 핵단백을 분리한 뒤, Western blotting을 이용하여 발현량을 검토하였다.

나. 전사인자 활성화에 관여하는 signaling pathway 검토 : MAPKs, Akt pathway

각각의 전사인자가 활성화되는 signaling pathway 검토하기 위하여 마우스 조직의 세포질을 분리한 뒤 Western blotting을 이용하여 그 변화량을 확인하였다.

다. 활성 물질 중 세포실험을 통하여 방사선 노출로 유도된 조직손상을 저해할 수 있는 물질의 조직 손상억제 및 수복능을 검토하였다.

라. 활성물질을 실험동물모델에 투여 후 redox관련 전사인자 조절기전 및 signal pathway 규명하였다.

마. 기능성 식·의약 및 예방제 개발을 위한 기초지식을 제공하였다.

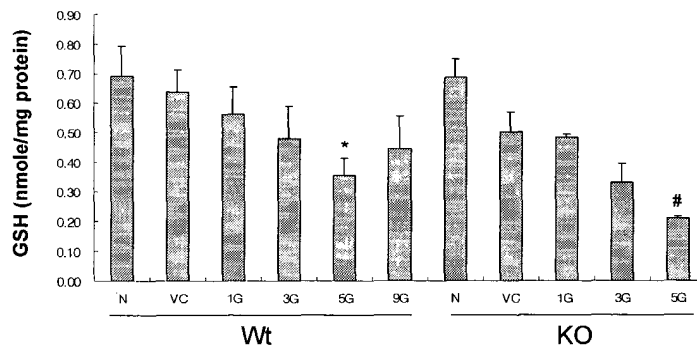
## 제 2절 연구 결과

### 1. 방사선에 조사에 의한 산화 스트레스의 증가

방사선 조사가 *in vivo*에 미치는 영향을 규명하기 위한 실험을 실시하였다. 비타민 C 결핍 마우스 SMP30 KO mice를 동경도립노화연구소의 Dr. Maruyama로부터 분양받아, 부산대 약대 동물 사육실에서 사육하여 사용하였다. Normal group에는 비타민 C를 물에 녹여 3주간 장기 투여 (wild type과 일치) 하였으며, Nor 외의 군은 비타민 C 결핍 먹이로 3주간 사육한 후, 3주째에 <sup>60</sup>Co 감마선원을 각각 0, 1, 3, 5 Gy씩 조사한 후, 24시간 후에 해부하여 장기를 적출하였다.

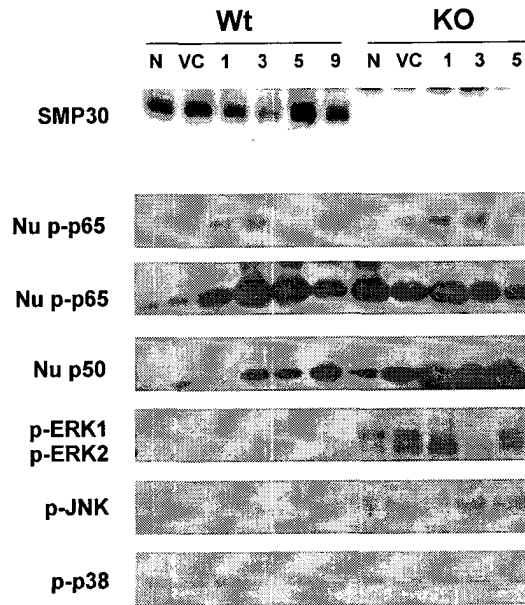
본 실험에 앞서 이번 실험에 사용된 SMP30 Knock Out (KO) mice와 Wild type C57BL/6 mice의 방사선 손상에 대한 차이를 살펴보았다. 동량의 방사선 선량 조사에 대한 두 종의 glutathione (GSH) level과 redox 감수성 전사인 NF-κB의 변화와 MAPKs 변화량을 살펴보았다 (Fig. 1).

**A**





**B**



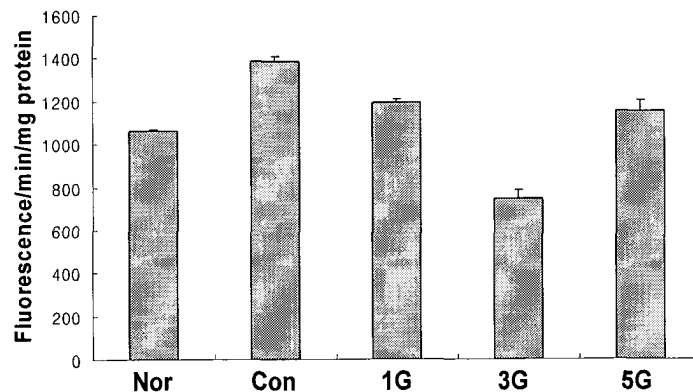
**Fig. 1. GSH depletion and NF- $\kappa$ B activation by irradiation between C57BL/6 and SMP30 KO mice**

N, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; VC, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1, 3, 5, and 9, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, 5, and 9 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively

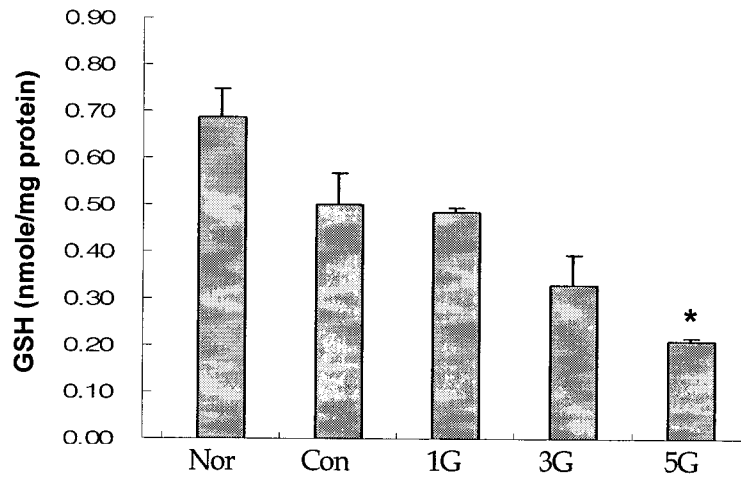
SMP30 protein이 발현되지 않은(Fig. 1B) 비타민 C 결핍 SMP30 KO mice는 체내에서 비타민 C를 합성하는 일반적인 C57BL/6 mice보다 산화스트레스에 대한 민감도가 높은 것이 관찰되었다. 즉 항산화 GSH level의 감소와 redox 감수성 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화가 wild type C57BL/6 mice에 비하여 방사선 조사에 더 민감하게 반응하는 경향을 나타내었다. 이는 SMP30 KO mice가 스스로 vitamin C를 합성할 수 없는 인체와 일치하는 모델이므로, 이를 이용하여 본 실험에서 사용하게 되었다.

본 실험에서는 먼저 활성산소 (ROS) level을 측정하기 위하여 DCFDA를 이용한 fluorometric assay를 실시하였다. SMP30 KO mice에서 방사선에 의한 ROS의 특이적인 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 2).

**A**



B

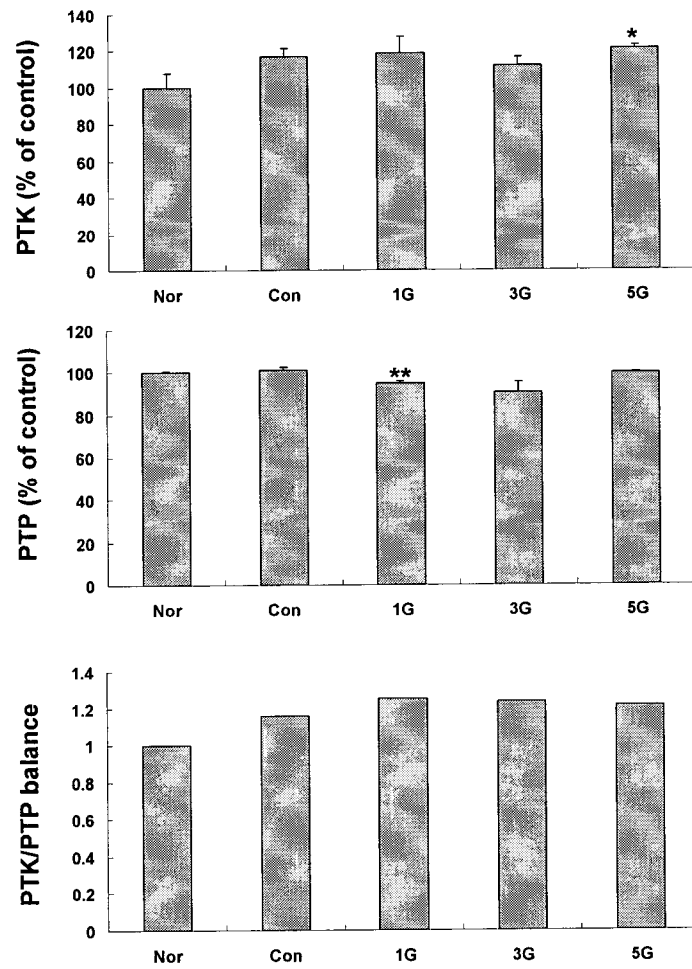


**Fig. 2. ROS generation and GSH depletion by irradiation in SMP30 KO mice**

\* $p < 0.05$  vs. Control. Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively

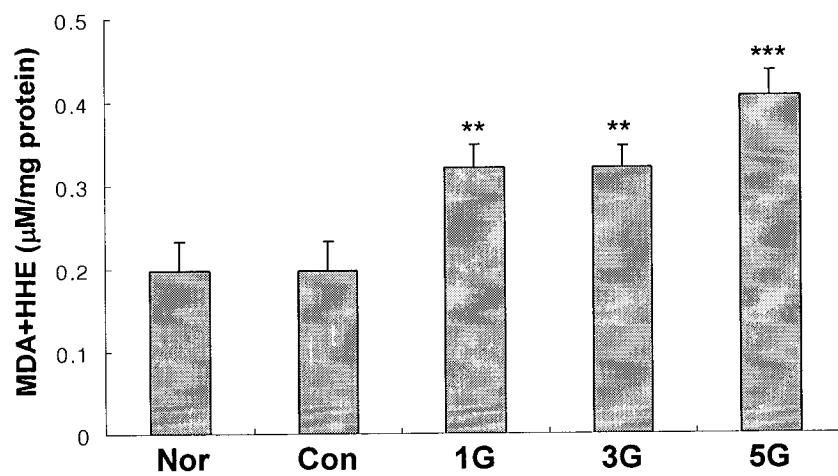
ROS 생성반응에 민감하며, 세포내 항상성을 유지시키는데 중요한 역할을 담당하는 GSH에 대해 방사선이 미치는 영향에 대해 실험하였다 [2]. 방사선 조사는 증가된 ROS level에 의해 생체 내에서의 -SH기를 감소시켜 GSH의 level을 5G 조사한 SMP30 KO mice에서 유의성 있게 감소시켰다 (Fig. 2).

세포내 증가하는 산화스트레스는 protein tyrosine kinase (PTK)는 증가시키고 protein tyrosine phosphatase (PTP)를 감소시켜 PTK/PTP 불균형을 초래한다고 알려져 있다. 또한, PTK/PTP 불균형은 세포내 redox 감수성전사인자에 영향을 끼친다고 알려져 있다. 그래서 Fig. 2는 방사선에 의해 증가되는 산화스트레스가 PTK와 PTP의 변화를 초래하는지 확인하였다. 그 결과 방사선에 의하여 PTK는 증가하고, 반대로 PTP는 감소되었다. 따라서 방사선 조사에 의해 SMP30 KO mice의 PTK/PTP의 불균형이 초래됨을 알 수 있었다 (Fig. 3)



**Fig. 3. PTK/PTP level by irradiation in SMP30 KO mice**

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Control. Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.



**Fig. 4. Lipid peroxidation by irradiation in SMP30 KO mice**

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. Control. Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.

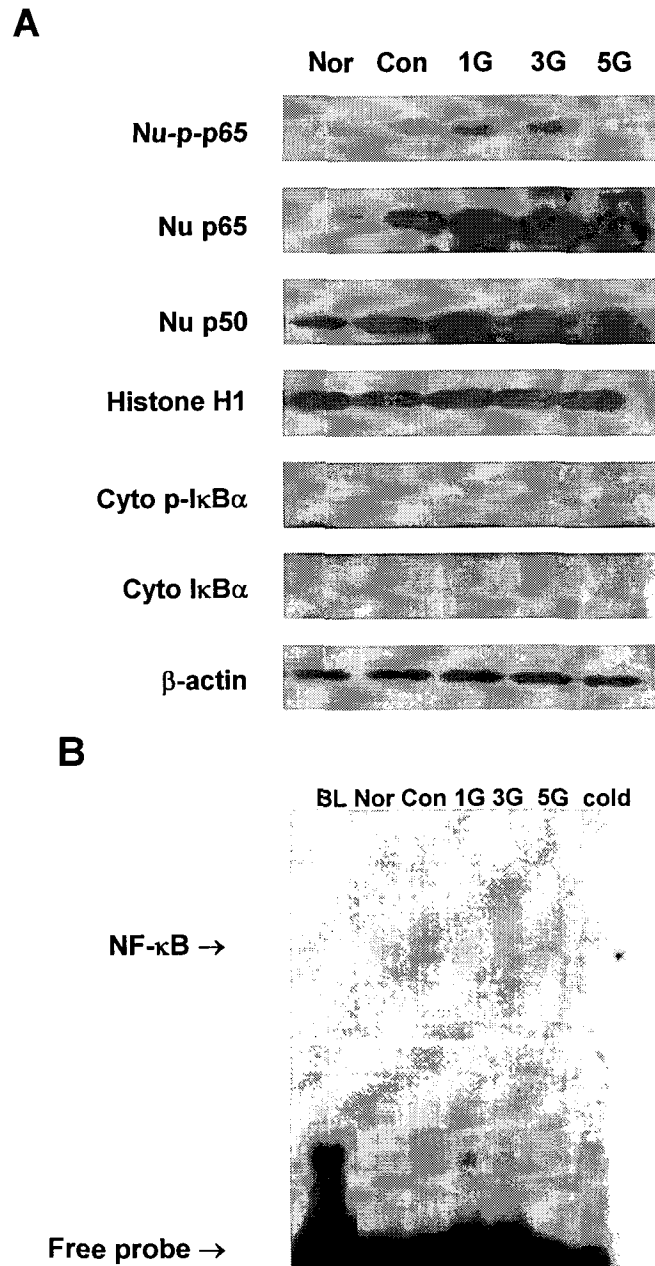
또 다른 산화스트레스의 지표인 지질과산화물의 형성 정도를 알아보기 위하여 lipid peroxidation level을 malondialdehyde (MDA) / 4-hydroxyalkenals (HAE) assay kit을 사용하여 측정해보았다. ROS와 RNS level과는 달리 주로 세포막 손상에 의해 생성되는 지질과산화물의 형성은 방사선 조사에 의하여 유의성 있게 증가하였다 (Fig. 4). 본 연구에서 방사선이 ROS/RNS level에는 영향을 미치지 않았으나, ROS/RNS에 의해 변하는 GSH level과 지질과산화가 현저히 변화하였다. 이는 ROS/RNS가 매우 불안정한 상태로 존재하여 쉽게 변하므로 방사선에 의해 생성된 ROS/RNS 으로 인해 2차적으로 GSH와 지질과산화에 영향을 미친 것으로 사료되어, 산화스트레스에 큰 영향을 미친 것으로 생각된다.

## 2. 방사선 조사에 의한 전사인자 활성화

앞의 결과에 따라 방사선 조사가 산화스트레스를 유발한다는 것을 확인하였다. 유발된 산화스트레스에 의해 redox 불균형한 상태를 유발시켜, redox 감수성 전사인자들을 활성화시켜 단백질 전사과정을 조절한다는 것은 이미 보고가 되어있다. 방사선 조사에 의해 이들 전사인자들이 활성화 또는 불활성화 되는지를 규명하기 위한 실험을 실시하였다. 방사선 조사를 한 마우스의 신장을 적출하여 homogenate를 한 후 전사인자들의 protein level을 Western blotting으로 확인하였다.

### 가. NF- $\kappa$ B 활성화

먼저 염증반응에 관여하는 redox 감수성 전사인자인 NF- $\kappa$ B 활성을 확인하였다 [3-5]. 방사선에 의하여 핵 내의 NF- $\kappa$ B의 dimer protein인 p65와 p50의 활성화가 모두 현저히 증가하였다. 특히 p65의 인산화가 관찰이 되었다. 이는 NF- $\kappa$ B의 인산화를 통한 활성화를 유도한다는 현상을 나타낸다. 또한 이 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제하는 I $\kappa$ Ba의 protein level이 방사선 조사에 의해서 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 5A). Fig. 5B는 EMSA를 이용하여 5A에서의 결과를 NF- $\kappa$ B DNA binding activity로 다시 한 번 확인하였다. SMP30 KO mice에서 모두 방사선 조사량이 높아질수록 NF- $\kappa$ B DNA binding activity가 증가하는 경향을 나타내었다.

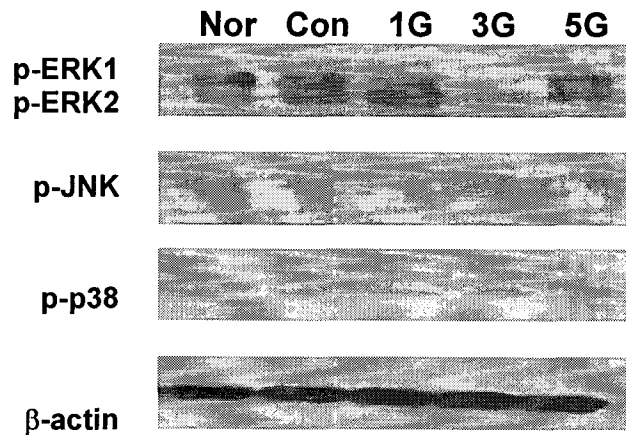


**Fig. 5. Activation of NF-κB by irradiation in SMP30 KO mice**

Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.

이상의 결과는 방사선 조사에 의하여 생체내의 NF-κB가 활성화되어, 핵 내로 이동하여 전사 조절 현상을 한다는 결과를 뒷받침하여 준다 [6, 7].

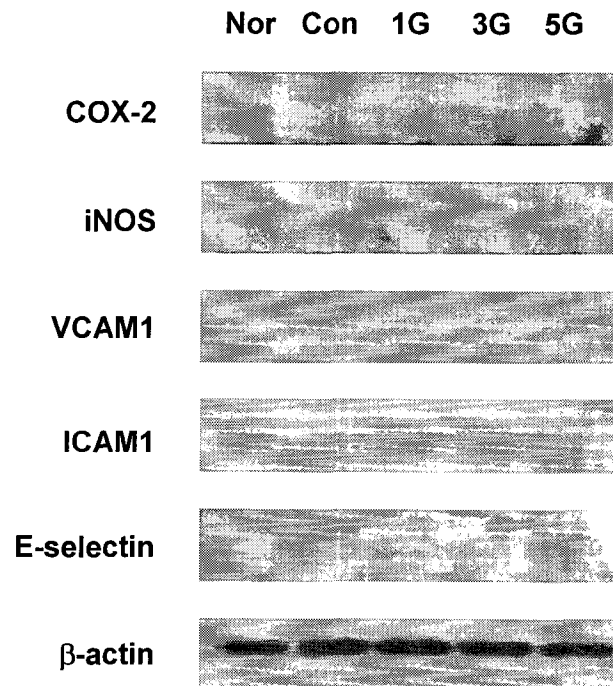
방사선 조사에 의한 전사인자 NF-κB의 변화를 확인해본 결과, 어떠한 factor들에 의하여 조절되는지를 확인하기 위하여 NF-κB의 upstream-signaling인 MAPKs pathway를 조사해보았다. 그림에서 보는바와 같이 MAPKs pathway인 ERK, JNK, p38이 모두 방사선에 의하여 인산화되어 활성을 가짐을 알 수 있었다 (Fig. 6).



**Fig. 6. Phosphorylation of MAPKs by irradiation in SMP30 KO mice**

Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.

다음으로 염증반응과 관련된 NF- $\kappa$ B-response gene들의 발현량을 Western blotting으로 실험하였다. COX-2와 iNOS 같은 염증관련 protein의 발현량이 모두 증가하는 것이 관찰되었다. 이와 마찬가지로 NF- $\kappa$ B에 의하여 활성화 되는 염증 관련 접착분자들, VCAM1, ICAM1, E-selectin의 발현량을 검토하여 본 결과 이들 모두 방사선에 의하여 활성화 되는 것을 확인하였다 (Fig. 7). 이것은 방사선 조사에 의하여 생체내에서 redox 감수성 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화와 그에 따른 염증관련 protein들의 발현이 증가한다는 것을 시사하였다 [8-10].



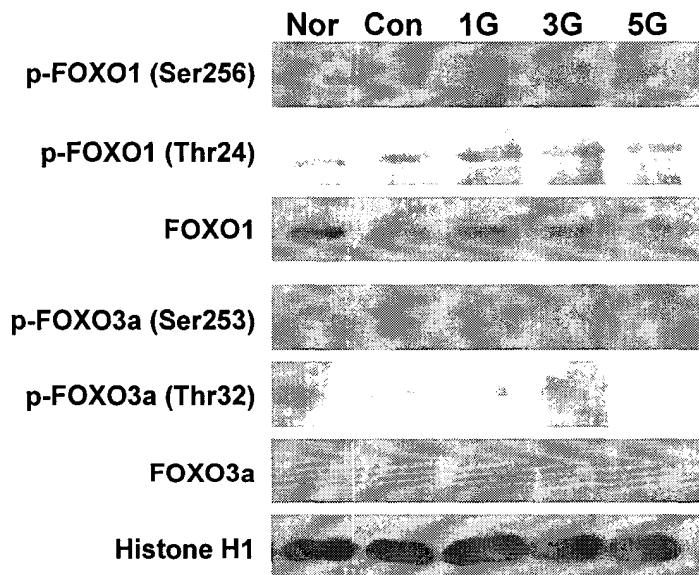
**Fig. 7. Activation of NF- $\kappa$ B-response genes by irradiation in SMP30 KO mice**

Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.

#### 나. FOXO 인산화

산화스트레스에 의한 PI3K/Akt 전달계에 의해 FOXO의 인산화를 통해 염증에 관련된 NF- $\kappa$ B의 활성화에 영향을 준다는 것이 이미 보고되어 있다. 이는 FOXO와 NF- $\kappa$ B간을 조절하는 분자적 조절작용이 조직손상의 새로운 기전으로 제시되고 있다는 것을 의미한다. 이에 방사선 조사에 의해 활성화되었던 NF- $\kappa$ B와 반대로 FOXO의 불활성화가 유도되는지 확인하기 위하여 실험하였다.

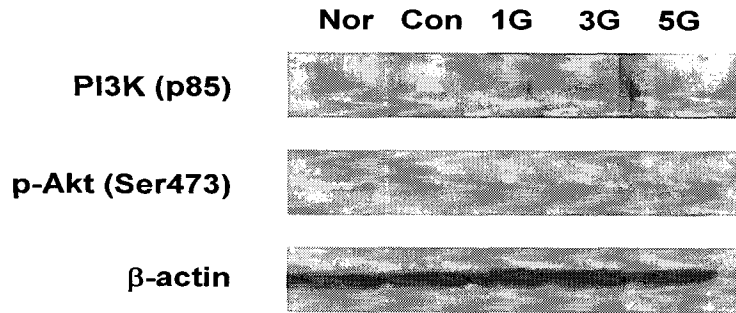
Fig. 8에서와 같이 방사선 조사에 의하여 핵 내의 FOXO의 불활성화가 유도되었음이 확인되었다. FOXO1과 FOXO3a 모두 핵 내에서 FOXO의 Ser과 Thr잔기에서 인산화가 일어남에 따라 불활성화가 진행되었음이 규명되었으며, 이는 핵 내에서 FOXO level이 감소하는 경향과 일치하였다.



**Fig. 8. Phosphorylation of FOXO1/3a by irradiation in SMP30 KO mice**

Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.

FOXO 인산화에 의한 불활성화에 관여하는 upstream signaling pathway를 확인하기 위하여 PI3K와 Akt level을 Western blotting으로 확인하였다. 방사선 조사에 의하여 PI3K 발현량과 Akt의 인산화가 증가하는 것으로 보아 방사선이 FOXO 인산화 신호전달체계를 활성화 시켜 전사인자 FOXO를 불활성화 시키는 것으로 사료된다 (Fig. 9).

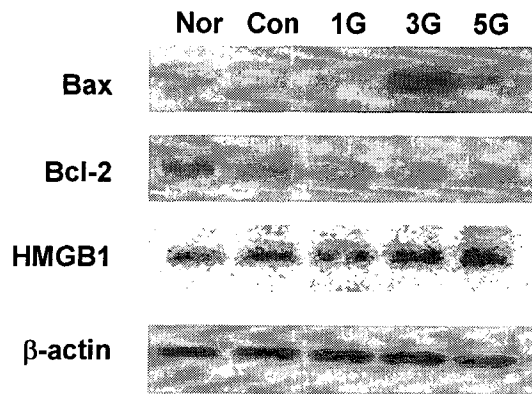


**Fig. 9. Activation of FOXO phosphorylation signaling pathway by irradiation in SMP30 KO mice**

Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.

### 3. 방사선 조사에 의한 Bax/Bcl-2 activation

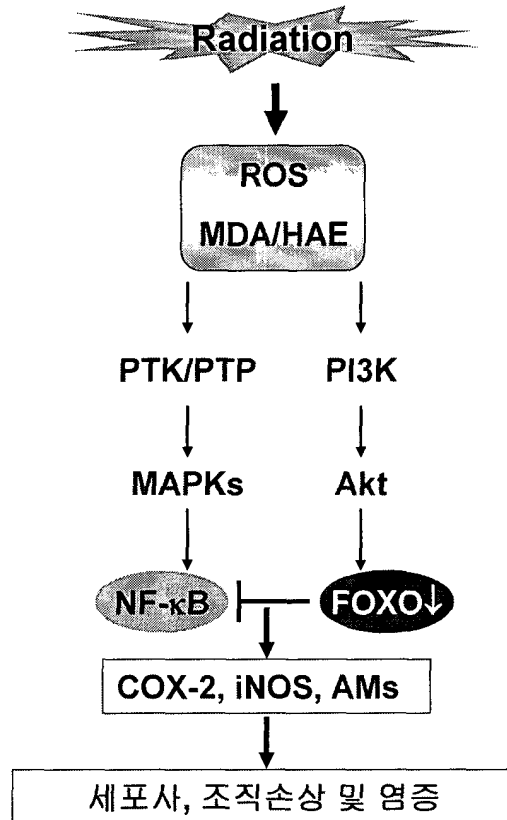
방사선 조사에 따른 redox 감수성 전사인자들의 변화에 의한 신장 조직의 영향을 살펴본 결과, pro-apoptosis 관련 protein인 Bax의 현저한 증가와 anti-apoptosis 관련 protein인 Bcl-2, 그리고 세포괴사의 Marker인 HMGB1 protein의 뚜렷한 감소가 관찰되었다 (Fig. 10). 이는 방사선 조사에 의하여 신장조직의 세포사가 일어났음을 시사한다.



**Fig. 10. Activation of apoptotic / necrotic signal by irradiation in SMP30 KO mice**

Nor, SMP30 KO mice not irradiated and not treated with Vt C; Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 1G, 3G, and 5G, not treated with Vt C and irradiated at a dose of 1, 3, and 5 Gy of  $\gamma$ -ray, respectively.





Scheme 1. SMP30 KO mice에서 방사선 조사에 의한 조직손상기전

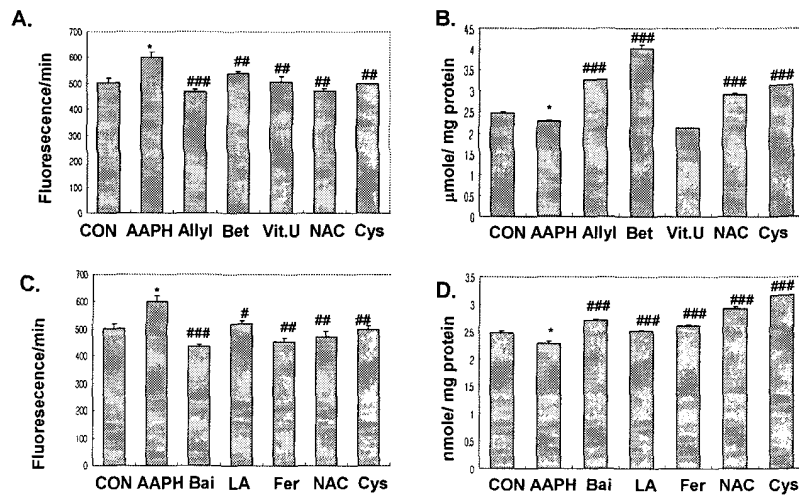
이상의 결과를 종합하여 볼 때, 방사선 조사에 의하여 생체 내 산화스트레스 발생 (ROS 생성 / GSH depletion)으로 산화·환원 상태 (redox status)의 불균형 상태를 초래하여 지질과산화물 (MDA+HAE)이 현저히 증가하게 되었다. 이로 인하여 염증 질환 관련 redox 감수성 전사인자의 upstream signaling pathway인 MAPKs의 인산화와 전사인자 NF-κB의 활성화가 유도되었다. 이 NF-κB의 활성화로 인해 염증관련 protein인 COX-2 및 iNOS의 발현량이 증가되었고, 접착분자인 VCAM1, ICAM1 및 E-selectin의 발현량이 증가되는 현상을 나타냈었다. 또한 항산화 protein을 조절하는 역할을 하는 FOXO 전사인자의 upstream signaling pathway인 PI3K발현과 Akt의 인산화에 의한 FOXO 인산화 현상이 발생하였다. 이와 같은 redox 감수성 전사인자들의 인산화로 인해 염증성 조직 손상의 유도되었고, 신장 조직 세포사가 관찰되었다.

따라서 방사선 조사는 생체 내에서 산화스트레스를 유발시켜, redox 감수성 전사인자들의 인산화를 통해 염증관련 단백질의 과발현을 유도하여 생체 내 조직 손상을 초래하는 것으로 사료된다 (Scheme 1).

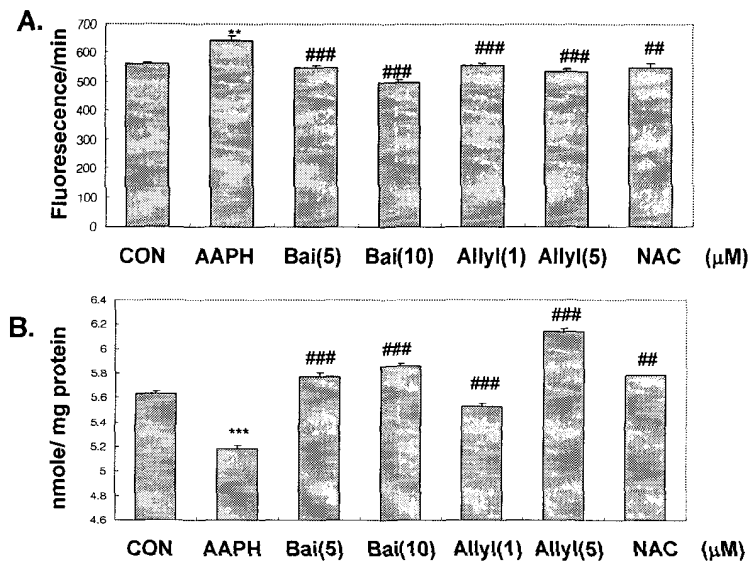
#### 4. 산화 스트레스 손상에 대한 방어 활성 물질 탐색

Redox 제어에 관여하는 천연 thiol, phenol관련 화합물 중 redox 감수성 전사 제어 활성이 높은 물질 탐색하기 위하여 수종의 thiol, phenol관련 화합물 중에서 활성이 높은 3종의 thiol화합물과 1종의 phenol관련 화합물을 선택하였다 [11, 12]. 선택된 각각의 화합물 중에서 세포내

redox status 균형에 높은 활성을 나타내는 물질을 선택하기 위하여 AAPH로 세포내 산화스트레스를 유발시킨 뒤, ROS와 GSH를 측정하였다. Fig. 11A, B는 thiol 관련 화합물의 ROS와 GSH를 나타낸 것으로 Allylmethyl sulfide가 2종의 thiol화합물에 비해 ROS 소거능과 GSH 생성능이 큰 것을 알 수 있을 뿐더러, positive control인 NAC와 Cysteine만큼 큰 활성을 보였다. Fig. 11C, D는 phenol관련 화합물의 ROS 소거능과 GSH 생성능을 나타낸 것으로 Baicalein이 높은 활성을 나타냄을 알 수 있었다.



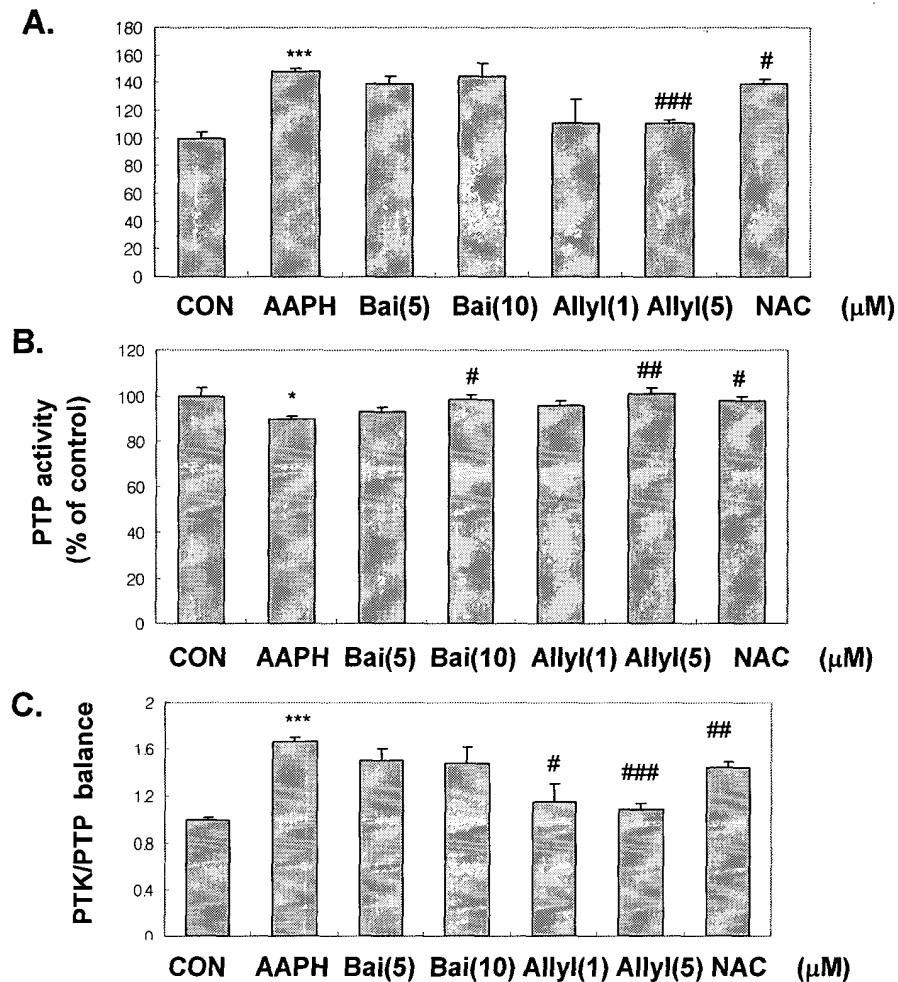
**Fig 11. ROS 소거능과 GSH 생성능이 높은 thiol, phenol관련 화합물의 screening**  
 AAPH, 2,2 azobis(2-amidino propane)dihydrochloride; Allyl, allymethyl sulfide; Bai, baicalein; Bet, betaine; Cys, cysteine; Fer, ferulate; LA, lipoic acid; NAC, N-acetyl cysteine; Vit. U, methylmethionine sulfonium



**Fig. 12. Allylmethyl sulfide와 Baicalein의 redox status의 효과**  
 AAPH, 2,2 azobis(2-amidino propane)dihydrochloride; Allyl, allymethyl sulfide; Bai, baicalein; NAC, N-acetyl cysteine

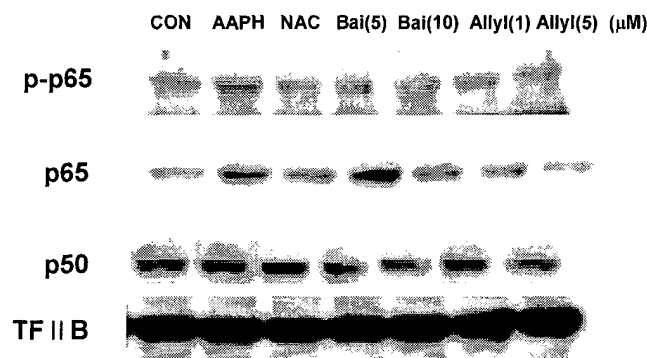
선택된 thiol, phenol 화합물인 Allylmethyl sulfide와 Baicalein을 농도별로 전처리하여 AAPH로 산화스트레스를 유발시킨 뒤, 세포내 redox status에 기여하는지 알아보기 위하여, ROS 소거능과 GSH 생성능을 측정하였다. Fig. 12A는 ROS 소거능을 확인한 것으로 AAPH에 의하여 증가한 ROS를 Baicalein과 Allylmethyl sulfide가 농도 의존적으로 감소시킴을 알 수 있었다. Fig. 12B는 GSH 생성능을 확인한 것으로 AAPH에 의하여 감소된 세포내 GSH을 두 약물에 의해서 증가됨을 알 수 있었다.

세포내 증가하는 산화스트레스는 PTK는 증가시키고 PTP를 감소시켜 PTK/PTP 불균형을 초래한다고 알려져 있다. 또한, PTK/PTP 불균형은 세포내 redox 감수성전사인자에 영향을 끼친다고 알려져 있다. 그래서 Fig. 13은 AAPH에 의하여 증가되어진 산화스트레스에 의한 PTK와 PTP의 변화를 확인하였다. 그 결과 AAPH에 의하여 증가되어진 PTK를 Allylmethyl sulfide와 Baicalein이 감소시킴을 확인하였고, 반대로 감소한 PTP는 증가되어졌다. 따라서 두 약물에 의해 PTK/PTP의 불균형이 조절 될 수 있다는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 13. Allylmethyl sulfide와 Baicalein의 PTK/PTP 조절**  
AAPH, 2,2 azobis(2-amidino propane)dihydrochloride; Allyl, allylmethyl sulfide;  
Bai, baicalein; NAC, N-acetyl cysteine

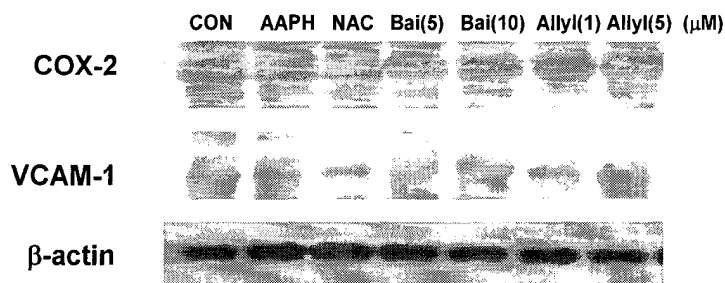
이상의 결과를 통해서 Allylmethyl sulfide와 Baicalein은 세포내 redox status를 조절한다는 것을 알 수 있었고, 이 두 약물이 세포내 redox 변화에 민감한 전사인자인 NF-κB를 조절할 수 있는지를 Western blotting으로 확인하였다. Fig. 14는 NF-κB를 나타낸 것으로 NF-κB는 p50/p65 dimer로 존재하며 산화스트레스에 의하여 p65는 phosphorylation되어 전사된다. 그 결과, AAPH에 의하여 증가한 p50/p65와 p-p65는 두 약물에 의하여 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 Allylmethyl sulfide와 Baicalein은 세포내 redox 변화에 민감한 전사인자를 조절할 수 있는 중요한 활성물질로 사료된다.



**Fig. 14. Allylmethyl sulfide와 Baicalein의 NF-κB 조절**

AAPH, 2,2 azobis(2-amidino propane)dihydrochloride; Allyl, allylmethyl sulfide;  
Bai, baicalein; NAC, N-acetyl cysteine

COX-2와 VCAM1은 대표적인 염증인자 중 하나로 redox 변화에 민감한 전사인자인 NF-κB에 의해서 증가되어진다고 알려져 있다. Fig. 15는 Allylmethyl sulfide와 Baicalein이 NF-κB에 의해 증가하는 염증성 유발인자를 조절하는지를 Western blotting으로 확인하였다. 그 결과 AAPH에 의해서 증가하는 COX-2와 VCAM1을 Allylmethyl sulfide와 Baicalein이 감소시킴을 알 수 있었다 (Fig. 15).



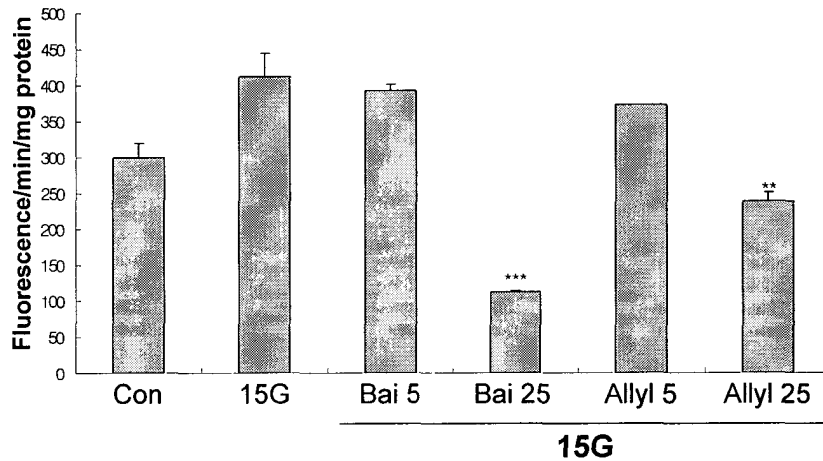
**Fig 15. Allylmethyl sulfide와 Baicalein에 의한 COX-2 / VCAM1의 조절**

AAPH, 2,2 azobis(2-amidino propane)dihydrochloride; Allyl, allylmethyl sulfide;  
Bai, baicalein; NAC, N-acetyl cysteine

### 5. 활성 성분의 방사선 조사 손상에 대한 *in vivo* 보호 효과

예비실험을 통하여 도출된 redox 제어 활성 물질 중 항산화효과가 유의성 있게 관찰된 phenol관련 화합물인 Baicalein과 sulfide계 물질인 Allylmethyl sulfide 천연화합물을 최종 후보 물질로 선정하여 *in vivo* 실험을 실시하였다. Vt C를 결핍시킨 SMP30 KO 마우스에 Baicalein과 Allyl methyl sulfide를 각각 5, 25mg/kg의 양으로 3일간 투여하였다. 약물 투여 마지막 날에 X선원 방사선을 15Gy 조사한 후 24시간 후에 해부하여 장기를 적출하였다.

방사선 조사에 의한 마우스 신장 조직에서의 산화스트레스 정도 및 보호 약물 효과를 검토하기 위하여 ROS 생성량과 GSH level을 측정하였다. 방사선 조사 group에서 증가한 ROS의 양이 Baicalein과 Allylmethyl sulfide를 처리한 group에서는 모두 유의성이 있는 감소 효과를 보였다 (Fig. 16).

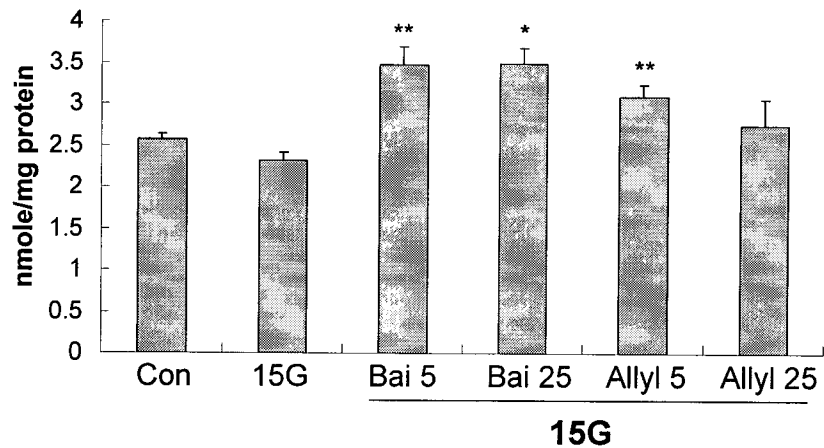


**Fig. 16. Effect of active compounds on ROS generation by irradiation**

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. 15G

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

그리고 ROS 생성량에 민감하게 반응하는 항산화물질인 GSH level의 측정을 하였다. 신장조직 homogenate에서 측정을 한 결과 GSH level이 감소된 방사선 조사 group에 비하여 Baicalein과 Allylmethyl sulfide를 투여한 group에서 감소되었던 GSH level이 유의성 있게 회복되는 경향을 보이고 있다 (Fig. 17).

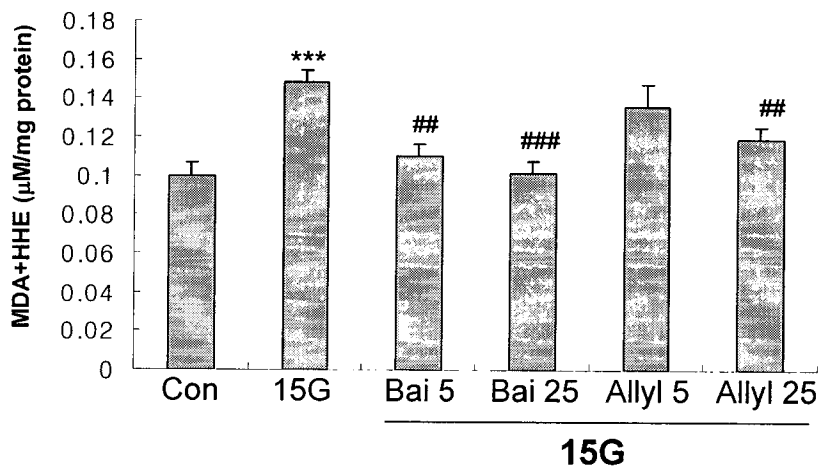


**Fig. 17. Effect of active compounds on GSH depletion by irradiation**

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. 15G

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

또한 산화스트레스의 지표인 지질과산화물 형성에 대한 보호 효과를 검토하기 위하여 lipid peroxidation level을 MDA / HAE assay kit을 사용하여 측정해 보았다. ROS level과 마찬가지로 지질과산화물의 형성 또한 방사선 조사에 의하여 증가하였고, Baicalein과 Allyl methyl sulfide를 투여한 group에서는 지질과산화물 형성이 억제되는 경향을 나타내었다 (Fig. 18).



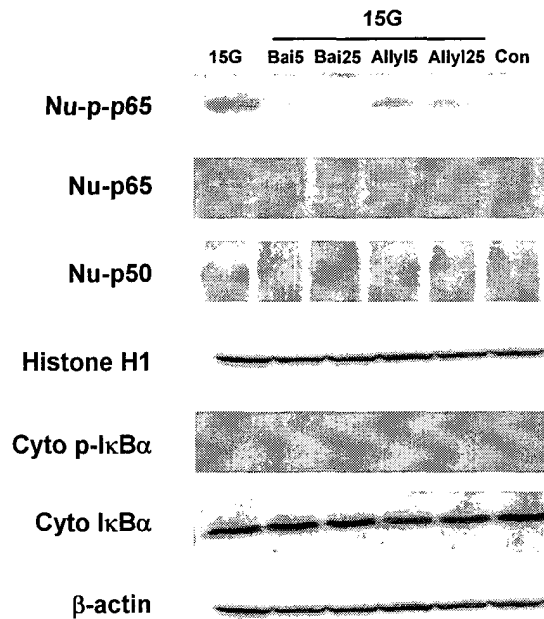
**Fig. 18. Effect of active compounds on lipid peroxidation by irradiation**

\*\*\* $p < 0.001$  vs. control, ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs. 15G

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 방사선 조사에 의하여 증가된 산화스트레스 상태는 천연 phenol계 활성물질 Baicalein과 sulfide계 활성물질 Allylmethyl sulfide에 의하여 효과적으로 보호가 된다는 것을 알 수가 있다.

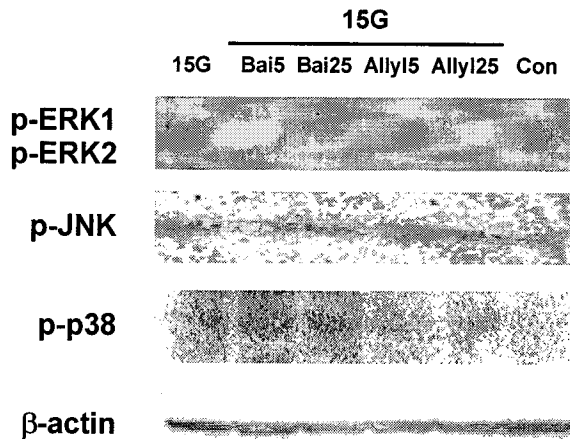
다음으로 redox 감수성 전사인자인 NF- $\kappa$ B 활성화에 대한 억제 효과에 대하여 검토해보았다. 방사선 조사에 의하여 증가하였던 NF- $\kappa$ B의 인산화에 따른 활성화가 Baicalein과 Allylmethyl sulfide의 투여에 의하여 억제되는 경향을 나타내었다 (Fig. 19). 또한 세포질에의 감소된 NF- $\kappa$ B의 발현량이 보호 약물에 의하여 다시 회복되는 경향을 나타내었다.



**Fig. 19. Effect of active compounds on NF- $\kappa$ B activation by irradiation**

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

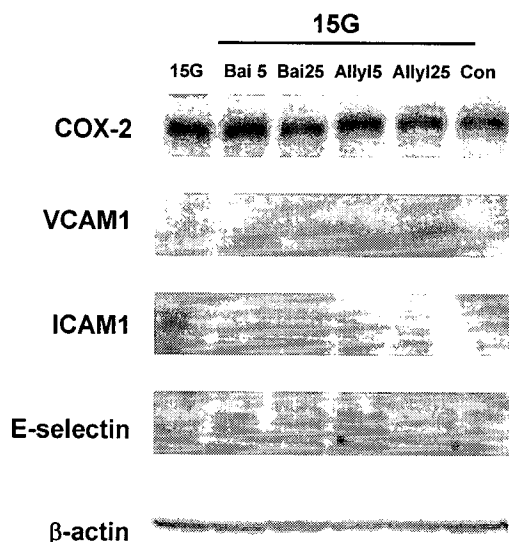
NF- $\kappa$ B 활성화의 upstream signaling pathway인 MAPKs (ERK, JNK, p38)의 인산화에 미치는 영향을 Western blotting으로 확인해보았다. 방사선 조사에 의하여 인산화되었던 MAPKs가 Baicalein과 Allylmethyl sulfide의 투여에 의하여 억제되는 경향을 나타내었다 (Fig. 20).



**Fig. 20. Effect of active compounds on phosphorylation of MAPKs by irradiation**

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

염증반응과 관련된 NF-κB-response gene들의 발현량을 Western blotting으로 확인해보았다. 방사선 조사에 의하여 증가된 COX-2와 같은 염증관련 protein의 발현량이 Baicalein과 Allylmethyl sulfide의 투여에 의하여 모두 감소하는 것이 관찰되었다. 이와 마찬가지로 NF-κB에 의하여 활성화 되는 염증 관련 접착분자들, VCAM1, ICAM1, E-selectin의 발현량을 검토하여 본 결과 방사선에 의하여 활성화된 발현량이 모두 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 21).

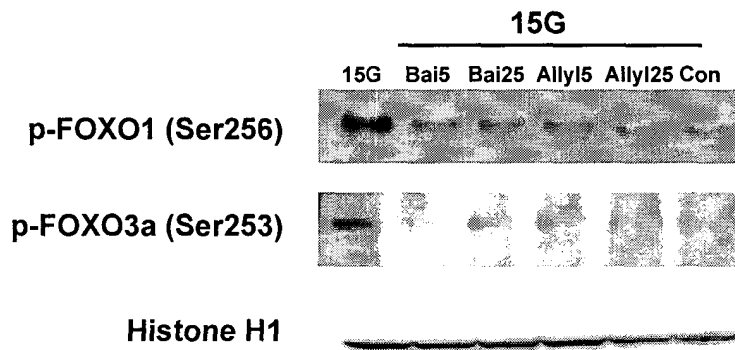


**Fig. 21. Effect of active compounds on NF-κB-response genes by irradiation**

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.



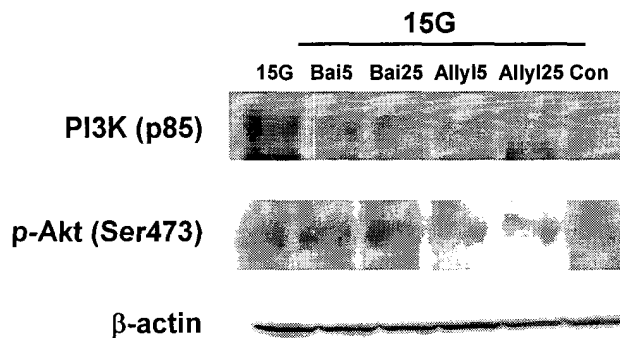
다음으로 FOXO phosphorylation에 대하여 검토하였다. Fig. 22에서와 같이 방사선 조사에 의하여 핵 내의 FOXO1과 FOXO3a의 Ser잔기의 인산화를 통한 불활성화가 유도되었음이 확인되었다. 그러나 Baicalein과 Allylmethyl sulfide의 투여한 group에서는 유도된 인산화가 현저히 억제된다는 결과가 확인되었다. 이는 방사선 조사에 유도된 전사인자 NF- $\kappa$ B와 마찬가지로 핵 내의 FOXO level 또한 Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 조절이 된다는 것을 나타내며, 이는 곧 위의 두 천연화합물이 앞에서 나타난 산화스트레스 보호 효과와 마찬가지로 방사선 손상에 대한 생체내의 분자적 기전에 대한 보호 효과를 가지고 있다는 것을 시사한다.



**Fig. 22. Effect of active compounds on phosphorylation of FOXOs by irradiation**

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

FOXOs upstream signaling pathway에 대한 보호 약물의 효과를 확인하기 위하여 PI3K(p85)와 Akt level을 Western blotting으로 확인하였다. 방사선 조사에 의하여 증가되었던 PI3K(p85) 발현량과 Akt의 인산화 현상이 Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 억제되는 효과를 나타내었다. 이는 방사선에 의하여 활성화된 FOXO 인산화 신호전달체계에 Baicalein과 Allyl methyl sulfide이 효과적으로 억제시킨다는 것을 시사한다 (Fig. 23).

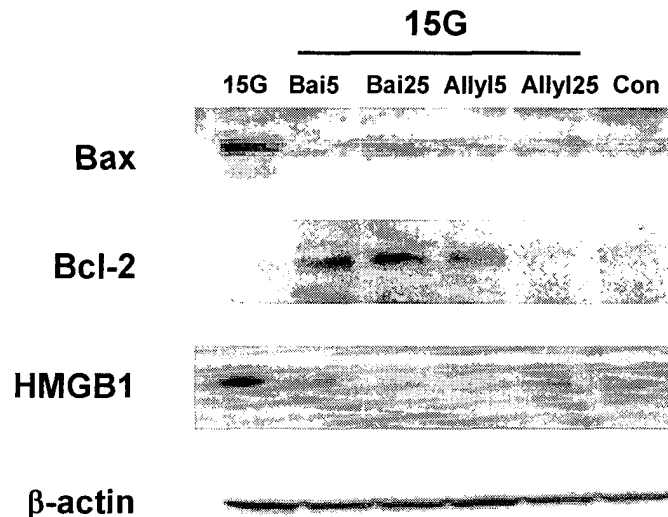


**Fig. 23. Effect of active compounds on activation of FOXOs phosphorylation signaling**

### pathway by irradiation

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

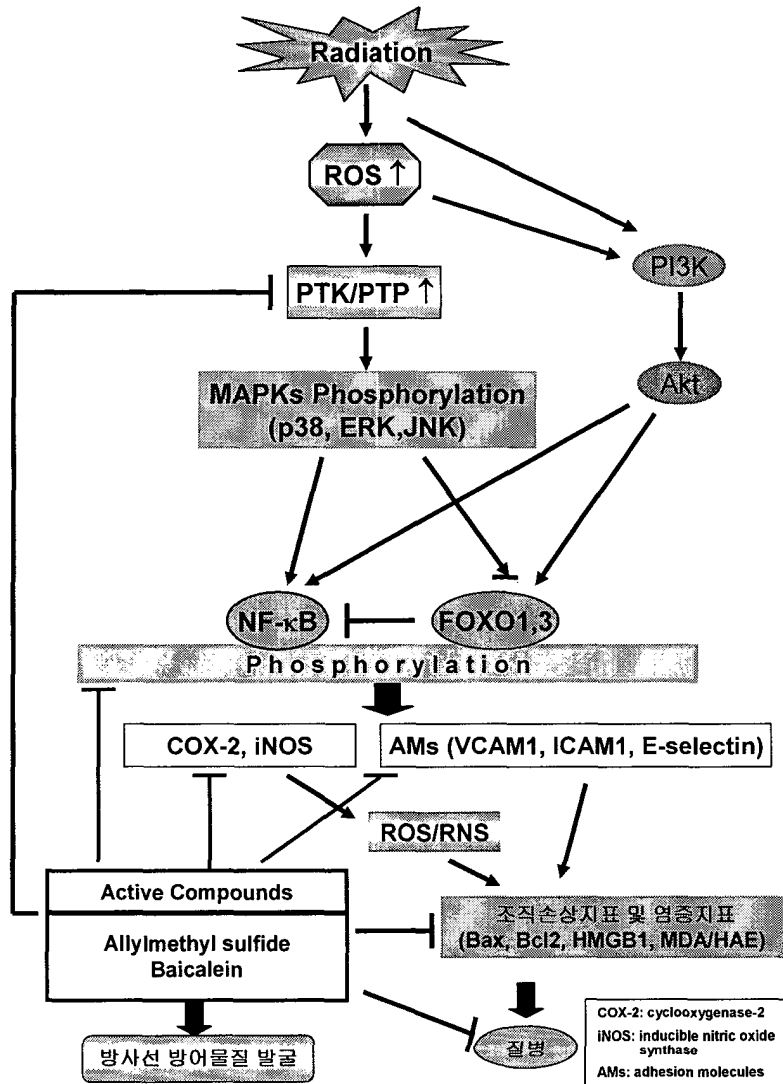
방사선 조사에 의해 활성화된 pro-apoptosis 관련 protein인 Bax와 anti-apoptosis 관련 protein인 Bcl-2에 대한 보호 효과를 검토하였다. Baicalein과 Allylmethyl sulfide를 투여한 group에서 방사선에 의하여 증가된 Bax 발현량의 감소현상과 감소된 Bcl-2의 증가현상이 관찰되었다. 또한 세포 괴사시에 발현되는 HMGB1 protein의 발현량이 방사선에 의하여 증가되었으나, Baicalein과 Allylmethyl sulfide에 의하여 발현량이 저해되었다 (Fig. 24). 이는 방사선 조사에 의한 신장 조직의 세포사에 Baicalein과 Allylmethyl sulfide가 보호 효과가 있는 것으로 사료된다.



**Fig. 24. Effect of active compounds on activation of apoptotic signal by irradiation**

Con, Vt C depleted SMP30 KO mice; 15G, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray; Bai 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg Baicalein; Bai 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg Baicalein; Allyl 5, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 5mg/kg allylmethyl sulfide; Allyl 25, irradiated by dose of 15 Gy of x-ray treated with 25mg/kg allylmethyl sulfide.

이상의 결과로서, phenol계 화합물인 Baicalein과 sulfide계 화합물인 Allylmethyl sulfide는 방사선 조사에 의해 유도된 산화스트레스 손상, redox 감수성 전사인자의 인산화와 그에 따른 염증 관련 단백질들의 발현, 신장 조직 세포사에 각각 보호효과가 있는 것으로 관찰되었다. 이는 앞으로 위 두 천연 화합물이 방사선 조사에 의한 손상에 대한 보호 약물로서 사용될 수 있음을 시사한다.



Scheme 2. 활성물질에 의한 방사선 조사의 조직손상제어 기전

지금까지의 연구 결과를 Scheme 2에 모식도로 나타내었다. 방사선 조사는 SMP30 KO 마우스의 생체 내 산화스트레스 상태를 유도하여 ROS / RNS를 증가시킨 상태를 유지한다. 이런 redox 불균형 상태는 redox 감수성 전사인자 NF-κB와 FOXO1/3a의 인산화를 통하여 염증 관련 단백질인 COX-2, iNOS와 접착분자인 VCAM1, ICAM1, E-selectin의 발현을 현저히 증가시켰다. 또한 조직 손상을 일으키는 세포사 관련 protein인 Bax / Bcl-2의 발현량을 증가시켜 신장 조직의 손상을 가져왔으며 세포괴사 지표인 HMGB1의 증가와 세포막 손상 지표인 MDA/HAE 생성의 증가를 유도하였다. 이러한 방사선의 손상에 대하여 phenol계 화합물인 Baicalein과 sulfide계 화합물인 Allylmethyl sulfide는 산화스트레스 단계부터 염증 관련 반응 단계까지 유의성 있게 보호하는 효과를 나타내었다. 이는 방사선 손상에 의한 질병 관련 기전에 대한 보호 약물로서의 가능성을 발굴하였다. 이로서 본 연구에서는 SMP30 KO 마우스에서 산화스트레스를 통한 redox 감수성 전사인자 활성화에 따른 방사선 손상 관련 기전을 밝힘과 동시에 보호 약물로서의 Baicalein과 Allylmethyl sulfide의 효과에 대하여 입증하였다.

## 제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

RFP상의 연구목표	연구수행내용 및 실적	달성도
<ul style="list-style-type: none"> <li>방사선 노출에 의한 SMP30-KO 마우스의 생체내 redox status 및 조직손상지표 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>방사선 조사에 의한 ROS, 지질과산화, 조직손상지표 Bax/Bcl2, HMGB1를 검토</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>방사선 노출에 의한 SMP30-KO 마우스의 redox 감수성 전사인자 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>NF-<math>\kappa</math>B / FOXO 조절기전 및 인산화 검토</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>활성화된 redox 감수성 전사인자의 분자기전 탐색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>PTK/PTP, PI3K/Akt 및 MAPK 정보전달계 및 분자기전 규명</li> </ul>	100%
<ul style="list-style-type: none"> <li>Redox 조절 천연 thiol 화합물의 조직 손상 제어 활성 탐색</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>활성물질 2종 발굴 및 신물질을 통한 방사선 노출로 유도된 조직손상 저해기전 확인</li> </ul>	100%

### 가. 경제·산업적 측면

- 방사선에 노출이 큰 종사자뿐만 아니라 일반인들도 활성산소 관련 질환의 치료·예방 차원에서 복용할 수 있을 것임
- 다양한 후보물질에 대한 방사선 작용의 메카니즘 해석기술과 함께 접목되어 생체기능 조절을 통한 방어 효능 증대, 방어 기능성 유도, 물질 합성 등 효율적인 방사선 도출에 직접적으로 기여함으로써 방사선의 긍정적 이용효율을 높이는 동시에 방사선 장애로부터 인적자원을 보전하는데 크게 기여할 것임
- 일반인들에게 방사선에 대한 두려움을 감소시켜 경제·산업적인 측면에서 상당한 이익을 창출할 것임

### 나. 기술적 측면

- 관련 제약업체 및 식품 업체의 연구 투자를 유도하고 관련 분야 기초 및 응용 연구의 활성화로 전반적인 국가 경쟁력 제고
- 방사선의 전사조절 기전에 근거한 조직손상 제어기술에 대한 새로운 분자적인 접근으로 학문이 새롭게 발전될 계기가 될 것임
- 새로운 방사선에 의한 조직손상 예방기술 및 조기 예방이 가능하게 되고, 이를 근거로 하여 새로운 형태의 방사선 노출에 의한 예방물질 발굴이 가능
- 방사선노출에 의한 예방의학의 발굴로 방사선 노출기전 조절 및 예방이 가능하게 됨으로써 방사선 노출에 따른 조직손상 제어기술이 도출됨

### 다. 활용방안

- 방사선에 의한 조직손상의 분자기전 규명을 위한 연구결과 및 확립된 실험기법은 방사선

방어제 후보물질 개발시 작용기작 연구 및 고효능 방사선 방어제 개발시 핵심 기술로 활용될 수 있다.

- 방사선 치료에 사용될 수 있는 후보물질은 병소에 대한 방사선의 치료 효율을 증대시키기 위한 물질을 도출하기 위한 물질기반으로 사용될 것이다.
- 후보 물질에 대한 구조 분석 및 생물학적 의학적 작용기전을 추가적으로 연구하여 효과적인 인물질에 대한 유도체 합성에 기여할 것이며, 차후 임상 검증을 거쳐 산업화될 가능성이 시사되었음

## 제 5장 연구개발결과의 활용계획

- 방사선의 전사조절 기전에 근거한 조직손상 제어기술에 대한 새로운 분자적인 접근으로 학문이 새롭게 발전될 계기가 됨
- 새로운 방사선에 의한 조직손상 예방기술 및 조기 예방이 가능하게 되고, 이를 근거로 하여 새로운 형태의 방사선 노출에 의한 예방물질 발굴이 가능
- 방사선 노출에 의한 예방의학의 발굴로 방사선 노출기전 조절 및 예방이 가능하게 됨으로써 방사선 노출에 따른 조직손상 제어기술이 도출됨
- 다양한 후보물질에 대한 방사선 작용의 메카니즘 해석기술과 함께 접목되어 생체기능 조절을 통한 방어 효능 증대, 방어 기능성 유도, 물질 합성 등 효율적인 방사선 도출에 직접적으로 기여함으로써 방사선의 긍정적 이용효율을 높이는 동시에 방사선 장해로부터 인적자원을 보전하는데 크게 기여함
- 방사선 치료에 사용될 수 있는 후보물질은 병소에 대한 방사선의 치료 효율을 증대시키기 위한 물질을 도출하기 위한 물질기반으로 사용될 것이다.
- 방사선에 의한 조직손상의 분자기전 규명을 위한 연구결과 및 확립된 실험기법은 방사선 방어제 후보물질 개발시 작용기작 연구 및 고효능 방사선 방어제 개발시 핵심 기술로 활용될 수 있다.
- 후보 물질에 대한 구조 분석 및 생물학적 의학적 작용기전을 추가적으로 연구하여 효과적인 인물질에 대한 유도체 합성에 기여할 것이며, 임상 검증을 거쳐 기업체에 기술 이전을 할 생각이다.

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

- 방사선 조사에 의한 ROS 생성, MAPK/NF- $\kappa$ B 활성화 (Oncogene. 2003, 22, 5885)
- 방사선 조사에 의한 mouse epithelial cell에서의 NF- $\kappa$ B 활성화 (Cancer Res. 2007, 67, 3220)
- 방사선 조사에 의한 마우스 DNA 산화 손상 기전 (Radiat. Res. 2007, 167, 207)

- 방사선 조사에 의한 B lymphoma cell에서의 Ras에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화 (J Toxicol Environ Health A 2005, 68, 2019)
- 방사선 조사에 의한 마우스 대동맥에서의 내피세포의 dysfunction (Radiat Environ Biophys 2007, 46, 179)
- 방사선 조사에 의한 쥐에서의 염증성 cytokine 발현 (Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004, 58, 427)
- 방사선 조사에 의한 쥐 회장에서의 NF- $\kappa$ B 활성화와 염증성 cytokine 발현 (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2003, 285, G556)

## 제 7장 참고문헌

1. The redox-sensitive DNA binding sites responsible for age-related downregulation of SMP30 by ERK pathway and reversal by calorie restriction. Jung KJ, Maruyama N, Ishigami A, Yu BP, Chung HY. Antioxid Redox Signal. 2006 8(3-4):671-80.
2. The molecular inflammatory process in aging. Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. Antioxid Redox Signal. 2006 8:572-81.
3. Effect of short-term, low dose aspirin supplementation on the activation of pro-inflammatory NF-kappaB in aged rats Jung KJ, Kim JY, Zou Y, Kim YJ, Yu BP, Chung HY. Mech Ageing Dev. 2006 127(3):223-30.
4. Betaine suppresses proinflammatory signaling during aging: the involvement of nuclear factor-kappaB via nuclear factor-inducing kinase/IkappaB kinase and mitogen-activated protein kinases. Go EK, Jung KJ, Kim JY, Yu BP, Chung HY. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2005 60(10):1252-64.
4. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, Yu BP. Ann N Y Acad Sci. 2001 928:327-35.
5. Nuclear factor-kappaB and manganese superoxide dismutase mediate adaptive radioresistance in low-dose irradiated mouse skin epithelial cells. Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. Cancer Res. 2007 67(7):3220-8.
6. Mechanism of NF-kappaB activation induced by gamma-irradiation in B lymphoma cells : role of Ras. Rho HS, Kim SH, Lee CE. J Toxicol Environ Health A. 2005 68(23-24):2019-31.
7. The suppression of radiation-induced NF-kappaB activity by dexamethasone correlates with increased cell death in vivo. Nam SY, Chung HY. Biochem Biophys Res Commun. 2005 336(2):603-8.
8. Activation of NF-kappaB in bone marrow cells of BALB/cJ mice following exposure in vivo to low doses of (137)Cs gamma-rays. Rithidech KN, Tungjai M, Arbab E, Simon SR. Radiat Environ Biophys. 2005 44(2):139-43.

9. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. Magne N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Houtte PV, Gerard JP, Peyron JF. *Cancer Lett.* 2006 231(2):158-68.
10. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA. *Oncogene.* 2003 22(37):5813-27.
11. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. Chen CC, Chow MP, Huang WC, Lin YC, Chang YJ. *Mol Pharmacol.* 2004 66(3):683-93.
12. Diallylsulfide and allylmethylsulfide are uniquely effective among organosulfur compounds in inhibiting CYP2E1 protein in animal models. Wargovich MJ. *J Nutr.* 2006 136(3 Suppl):832S-834S.