

방사선 조사후 백서 공장 점막의 손상 및 재생 과정에서의 Phospholipase C 동종효소의 발현에 관한 연구

울산대학교 의과대학 병리학교실, ¹이화여자대학교 의과대학 방사선과학교실
²포항공대 생명과학과

김성숙 · 우영주 · 허주령 · 유정현¹ · 이경자¹ · 이정식¹ · 서판길²

Expression of Phospholipase C Isozymes in Radiation-Induced Tissue Damage and Subsequent Regeneration of Murine Small Intestine

Sung Sook Kim, Yeong Ju Woo, Juryung Huh, Jung Hyun Ryu¹
Kyung Ja Lee¹, Jung Sik Lee¹, and Pann-Ghill Suh²

Department of Pathology, Ulsan University Hospital, Ulsan 680-060, Korea
¹Department of Radiology, Medical College, Ewha Womans University
²Department of Life Science, Pohang Institute of Science and Technology

Phospholipase C (PLC) isozymes play significant roles in transmembrane signal transduction. PLC- γ 1 is one of the key regulatory enzymes in signal transduction for cellular proliferation and differentiation. The exact mechanisms of this signal transduction of tissue damage and subsequent regeneration, however, were not clearly documented. This study was planned to determine the biological significance of PLC isozymes following irradiation in rat small intestine. Sprague-Dawley rats were irradiated to the entire body by a single dose of 8 Gy. The rats were divided into 5 groups according to the sacrifice days after irradiation. The expression of PLCs in each group was examined by the immunohistochemistry and immunoblotting. The histologic findings were observed using hematoxylin and eosin staining. The regenerative activity, which was estimated by mitotic count and proliferatin cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining, was highest in Group III (5th day after irradiation). By the immunohistochemistry, the expression of PLC- γ 1 was higher in Group III and Group II (3rd day after irradiation), and was found in the regenerative zone of the mucosa. The expression of PLC- δ 1 was highest in Group I (1st day after irradiation) and was dominantly in the damaged surface epithelium. The immunostaining of PLC- β 1 was negative in all groups. The results of the immunoblotting study was compatible to that of the immunohistochemical study. Group II and III showed positive bands for PLC- γ 1, and group I and II for PLC- δ 1. These results suggest that PLC- γ 1 plays a significant role in mucosal regeneration following irradiation. PLC- δ 1 may play a role in radiation - induced mucosal damage. (Korean J Pathol 1998; 32: 155~161)

Key Words: Phospholipase C, Isozymes, Radiation, Murine small intestine

접 수: 1997년 2월 5일, 게재승인: 1997년 12월 11일
주 소: 경남 울산시 동구 전하동, 우편번호 680-060
울산대학교병원 병리학교실, 김성숙

ISSN : 0379-1149

*본 논문은 이화의대 동창회 연구비의 보조를 받아 이루어졌음.

서 론

모든 세포들은 세포 외부의 자극을 감지하고 적절히 반응하는 기전을 갖고 있으며 세포에서 일어나는 여러 생리 현상들은 세포 외부로부터 전달되어 오는 여러 가

지 신호전달물질 즉 호르몬, 성장 인자, 신경전달물질 등에 의해 조절을 받게 되는데 이러한 세포 외부의 신호가 어떠한 기전을 통해 세포막을 통과하여 핵내로 전달되는가에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.¹⁻³

외부 자극에 대한 여러 신호전달기전에는 세포막에 존재하는 각각의 특이수용체와 결합하여 신호를 전달하는 방법이 특히 중요하다고 알려져 있다. 즉, 세포 외부에서 전달되는 신호물질들은 특이수용체와 결합하여 효과기인 adenylyate cyclase, guanylate cyclase, phospholipase C (PLC)를 활성화하여 cAMP, cGMP, inositol trisphosphate (IP3) 등의 2차 신호전달물질을 생성함으로써 세포내 각종 생리 작용을 활성화시킨다.^{4,5} 이들 효과기중 PLC가 세포막에 존재하는 phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP2)를 가수분해하여 세포내 Ca^{++} 의 이동을 시키는 IP3와 여러가지 생리 현상을 조절하는 PKC를 활성화시키는 diacylglycerol (DG)을 만든다.⁶

한편 방사선 조사에 의한 세포 손상은 소장 점막 세포와 같이 주로 빠르게 증식하는 세포들에서 일어난다. 따라서 복부와 골반 주위의 방사선 치료시 급만성 장염과 같은 합병증이 빈번히 유발되게 된다.⁷ 또한 이와 같은 손상이 있게 되면 반드시 재생 과정이 필수적으로 일어나게 되며 특히 소장 점막에서의 재생 과정은 많은 연구에 이용되고 있다.⁸

방사선 조사 후 방사선에 의한 세포의 손상이나 재생에서의 신호전달기전에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 방사선 조사후 소장 점막의 재생에 PLC- γ 1 및 ras 암유전자단백이 관여하며 조직 손상에 PKC등이 관여한다는 발표들이 있었으나 이들의 연구는 단편적이고 체계적으로 이루어지지 않았으며 아직 확실한 기전이 밝혀진 바가 없다.⁹⁻¹³ 또한 방사선 손상이나 재생과정에서 PLC- δ 1 이나 PLC- β 1에 대한 논문은 아직 발표된 바 없다. 따라서 저자들은 실험적으로 백서의 전신에 방사선조사후 방사선 손상을 받고 활발한 세포 증식을 보이는 소장 점막의 재생 과정을 시간적으로 관찰하고 이들 조직에서 신호전달체계에서 중요한 역할을 하는 PLC 동종효소의 발현을 면역조직화학적 염색 및 면역 블롯으로 관찰하여 조직 손상 및 재생의 기전을 체계적으로 밝히고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 실험 재료

실험 동물은 암수 구별 없이 생후 4~5개월된 백서로 평균 무게 약 250~300 gm이었고 총 60마리를 사용하였다. 방사선 조사는 백서를 가볍게 에테르로 흡입 마취한 후 고정틀에 사지를 고정하고 6 MV선형 가속기 (NEC 1006X, Japan)로 균등한 조사를 위해 블루스와 판톰을 사용하여 분당 2 Gy선량률로 총 8 Gy의 방사선을 전신 조사하였다. 실험군은 방사선 조사 후 기간에 따라 1일 (I군), 3일 (II군), 5일 (III군), 7일 (IV군), 14일

(V군)로 구분하여 각 군에 10마리씩 사용하였다. 방사선 조사를 조사하지 않은 10마리를 정상 대조군으로 하여 실험군 시기에 따라 각각 2마리씩 사용하였다. 조직병리학 소견의 관찰과 면역조직화학 염색을 위하여 treitz인대 직하부의 공장을 2 cm길이를 절단하여 포르말린에 고정, 파라핀에 포매한 후 통상의 방법으로 표본 제작하였다. 면역블로팅을 위해서는 조직 채취후 즉시 섭씨 영하 70도에 저장하였다.

2. 연구 방법

1) 조직내 유사분열 수 측정: 백서 공장 조직에서 4개의 횡단면을 얻어 통상의 hematoxylin과 eosin염색을 하여 각 군의 특징적인 조직병리학 소견을 관찰하고 방사선 조사 후 백서 소장에서 재생 정도를 객관적으로 평가하기 위하여 광학대 (400배) 시야에서 관찰되는 유사분열 수를 세포 100개당 나타나는 수를 10회 반복 측정하여 평균하였다. 또한 이들 세포증식을 확인하기 위해 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)를 이용하여 면역조직화학염색을 하여 증식지수를 측정하였다. 즉 세포 100개당 PCNA에 염색된 핵의 수를 5번 세어 평균하였다.

2) 면역조직화학 염색: 면역조직화학 염색은 Hsu와 Raine이 기술한 방법을 응용하여¹⁴ 시행하였다. 파라핀에 포매된 조직을 5 μ m두께로 자른 후 xylene으로 파라핀을 제거한 후 알코올을 이용하여 수화시켰다. PLC동종효소의 PLC- β 1, PLC- δ 1, PLC- γ 1에 대한 단클론성 항체¹⁵를 2시간 실온에서 반응시키고 DAKO사의 염색 kit를 이용하여 면역조직화학염색을 하고 AEC (3-amino-9-ethyl carbazole)로 발색하였다. Hematoxylin으로 대조염색한 후 현미경으로 검색하였다. 양성 대조 염색은 이미 알고 있는 양성 조직 (PLC- γ 1: 평활근, PLC- β 1: 부신피질, PLC- δ 1: 위장점막)을 이용하였고 음성대조 염색은 일차항체대신 PBS로 대체시킨 후 염색을 시행하여 비교하였다. 결과의 판정은 염색정도에 따라 음성대조염색 정도인 경우를 음성 (-)으로 판정하였고 조직내에 포함되어 있는 평활근이 PLC- γ 1에 염색된 정도를 약양성 (+), PLC- δ 1에 염색된 화생화된 위장점막조직 정도를 강양성 (+++), 그 사이의 염색상을 보이는 경우를 중등도 (++)로 표현하였다. 양성인 경우 대부분의 세포들이 염색이 되었기 때문에 염색강도 (intensity)만으로 등급을 나누었고 빈도 (distribution)는 각 경우마다 차이가 없었다. PCNA항체는 Dako사의 PC-10을 이용하였다.

3) 면역 블로팅 및 면역침강: PLC- β 1, PLC- γ 1, PLC- δ 1의 면역침강을 위하여 얼린 정상 백서 소장 조직과 방사선 조사된 소장 조직을 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM Na3Vo4, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 10 μ g/ml leupeptin, 1mM PMSF가 함유된 10 mM HEPES의 균질액에 담그고 polytron homogenizer로 균일하게 분쇄한 후 섭씨 4도에서 20,000 rpm으로 30분

간 원심 분리한 후 그 상층액을 취하였다. 상층액에서 단백질을 정량을 한 후 이 단백질을 20 µg을 취하여 K92-3 (단클론성 PLC-β1항체), F7-2 (단클론성 PLC-γ1 항체), S11-2 (단클론성 PLC-δ1)로 섞여 4도에서 2시간 동안 면역침전시킨 후 면역화합물을 얻었다. 이를 8% SDS-PAGE로 분리시킨 후 nitrocellulose paper로 이동시키고 다시 각각의 PLC동위효소들에 대한 단클론성 항체로 4시간 동안 반응시켰다. 2차 항체로 반응시킨 후 ECL system (Amersham, U.S.A)으로 발색시킨 후 band를 관찰하였다.

4) 통계 처리: 통계 처리는 SAS program을 사용하였는데 대조군과 각 실험 군간의 비교는 student T test를, 실험군에서 연속되는 두 변수에 대한 비교는 Pearson상관 계수를 이용하여 처리하였다. P 값이 0.05이하인 경우를 유의하다고 판정하였다.

연구 결과

1. 병리조직학적 소견

정상 백서의 공장 점막은 점막 표면이 고르며 소낭선 내에 배상 세포가 규칙적으로 분포되어 있고 기저부에 증식대가 잘 발달되어 있었다 (Fig. 1A). 제 I군에서는 방사선 조사 1일 후 공장 점막의 용모길이가 전체적으로 짧아져서 점막의 위축이 관찰되었고 부분적인 점막 상피세포의 탈락과 염증세포침윤이 있었다 (Fig. 1B). 또한 많은 수의 세포사 (apoptosis)의 형태를 관찰할 수 있었다. 제 II군에서는 소낭선의 재생이 관찰되기 시작하고 유사분열 소견이 관찰되었다. 제 III군에서는 기저부의 증식과 소낭선의 활발한 재생으로 배상 세포들이 보이지 않았으며 유사분열의 수가 증가하였다 (Fig. 1C). 제 IV군에서는 정상 공장 점막의 구조로 회복되었고 제 V군에서는 대조군과 같은 소견을 보였다 (Fig. 1D).

2. 소낭선 내의 유사분열 수

소낭선의 유사분열 수와 PCNA염색을 하여 구한 증식지수는 제 II군에서 증가하여 제 III군에 가장 많이 관찰되었다 (Table 1 and Fig. 2A & B). 대조군에 대한 유의성 검증에서 제 II군과 제 III군에서 유의하게 높았다 (P<0.05).

3. PLC동종효소의 면역조직화학염색

면역조직화학염색 결과 대조군에서의 PLC동종효소들은 전혀 발현이 되지 않았다 (Fig. 3A). PLC-δ1은 제 I군에서 가장 강하게 발현되었고 제 II군에서는 감소하다가 제 III군에서는 발현이 관찰되지 않았다. 또한 발현은 주로 손상 정도가 심한 점막 표면의 상피세포에서 나타났다 (Fig. 3B). 염증세포나 간질 (stroma)에서는 관찰되지 않았다. PLC-γ1은 제 I군에서 약하게 발현되었고 제 II군에서는 점막 전반에 걸친 발현이 관찰되었으

Table 1. Comparison of regenerative activity after irradiation

Group	Mitotic number	Proliferative index
Control	5.6±2.3	4.5±2.8
I	5.4±1.6	7.0±2.5
II	13.8±2.8*	23.0±4.8*
III	19.4±4.3*	26.0±5.6*
IV	8.3±4.1	8.0±4.8
V	6.2±2.7	4.5±2.8

All data are expressed as mean±SD.

*Statistical significance (p<0.05) were observed in correlation between group I vs II, II vs III, III vs IV.

Table 2. The expression of PLC isozymes after irradiation

Group	Control	I	II	III	IV	V
PLC-β1	-	-	-	-	-	-
PLC-γ1	-	-	++	+++	-	-
PLC-δ1	-	++	+	-	-	-

The staining was grades as -, when staining not greater than negative control, 1+ for light or focal staining, ++ for moderate staining, +++ for diffuse or heavy staining.

나 주로 소낭선에서 관찰되었다. 제 III군에서는 PLC-γ1의 발현이 최고조에 달하였고 주로 증식을 활발하게 하고 있는 소낭선 상피 세포에서 발현이 보였다 (Fig. 3C). PLC-γ1역시 염증세포나 간질에서는 발현이 되지 않았고 단지 평활근층만이 미약하게 발현되었다. 제 IV군에서는 발현이 감소하였고 (Fig. 3D) 제 V군에서는 정상 대조군과 비슷한 정도의 발현만이 관찰되었다. 한편 PLC-β1은 모든 실험군에서 발현되지 않았다. 각 결과는 Table 2에 정리하였다.

4. 면역블로팅

면역 블로팅에서는 면역조직화학염색의 결과를 확인할 수 있었는데 즉, PLC-γ1은 대조군을 비롯하여 제 I군, 제 IV군, 제 V군에서는 어떤 band도 확인되지 않았으나 제 II군에서 가장 강한 band, 그리고 제 III군에서 양성 band를 보였다 (Fig. 4A). PLC-δ1은 대조군, 제 III군, 제 IV군, 그리고 제 V군에서는 양성 band가 나타나지 않았으나 제 I군과 제 II군에서 발현을 보였다 (Fig. 4B). PLC-β1의 발현은 모든 실험군에서 정상대조군과 같이 발현되지 않았다.

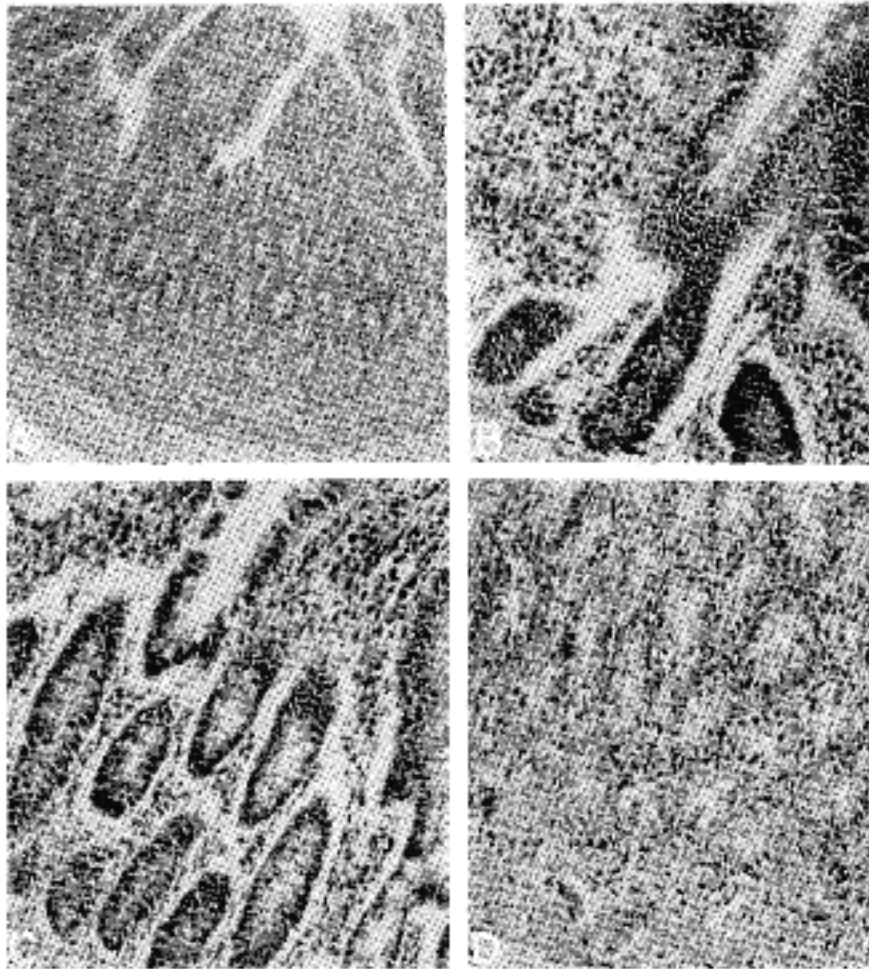


Fig. 1. Histopathological findings of murine jejunal mucosa. **A:** Normal mucosa showing even villous surface, crypts, and well preserved basal proliferative zone, **B:** Jejunal mucosa in Group I showing atrophic and shortened villi accompanied by inflammatory cells infiltration, **C:** Jejunal mucosa in Group II showing regeneration of the crypt cells, **D:** Jejunal mucosa in Group III showing active regeneration with frequent mitoses.

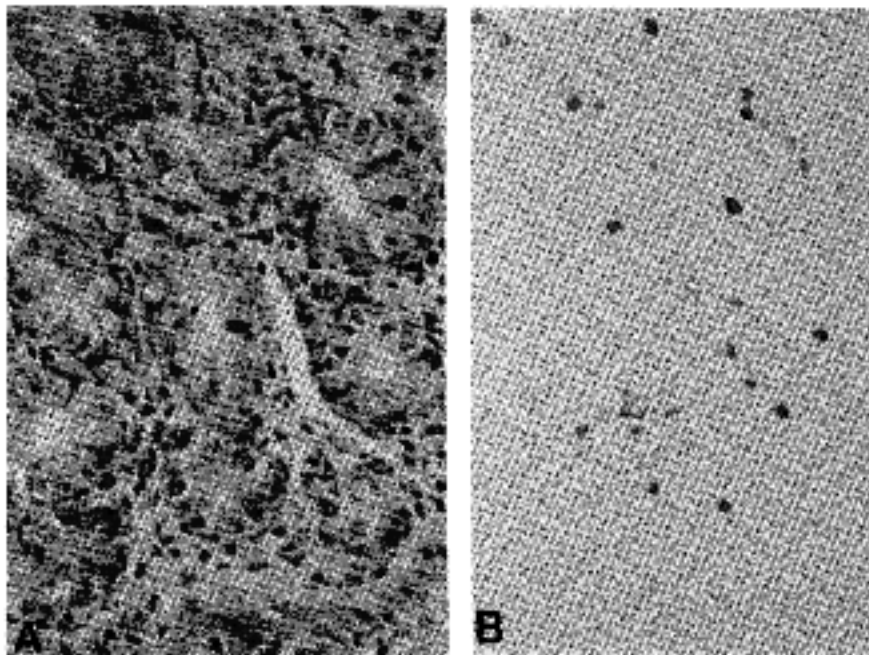


Fig. 2. Frequent mitoses are observed in Group III (A) and is confirmed by PCNA immunostaining (B).

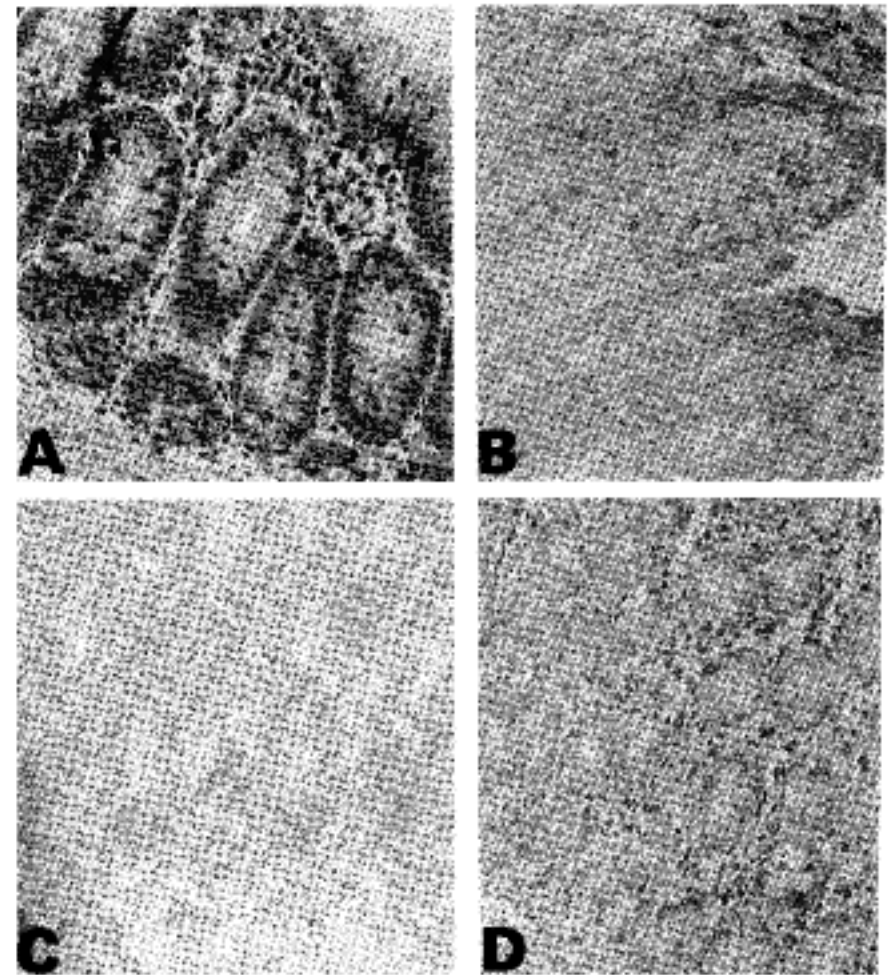


Fig. 3. The expression of PLCs by immunostaining in the murine jejunal mucosa.

A: PLCs were not expressed in control group, **B:** PLC- δ 1 in Group I showed strong expression in the damaged surface epithelium, **C:** Increased expression of PLC- γ 1 was observed in actively regenerative zone in Group III, **D:** PLC- γ 1 was disappeared in Group IV.

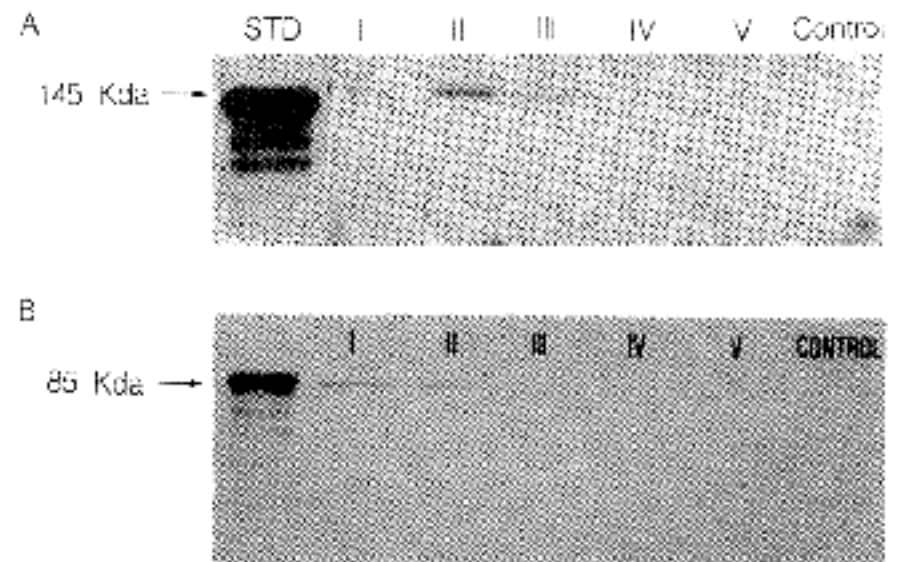


Fig. 4. Immunoblot analysis.

A: The immunoblot analysis of PLC- γ 1 showed strong bands in Group III (Lane 1; standard marker, lane 2; group I, lane 3; group II, lane 4; group III, lane 5; group IV, lane 6; group V, lane 7; control group), **B:** PLC- δ 1 immunoblot revealed a single band in Group I and II (Lane 1; standard marker, lane 2; group I, lane 3; group II, lane 4; group III, lane 5; group IV, lane 6; group V, lane 7; control group).

고 찰

방사선 조사에 의한 세포 손상은 소장 점막세포와 같이 주로 빠르게 증식하는 세포들에서 일어나는데 임상적으로 복부와 골반 주위의 방사선 치료시 급, 만성 장염과 같은 합병증이 빈번히 유발한다. 방사선 조사에 의한 급성 또는 만성, 초기와 후기로 구분되며 소장선 세포의 생존 수에 의한 소집락측정이나 섬유화에 의한 콜라겐을 측정하여 급, 만성 손상의 정도를 객관적으로 정량 측정하기도 한다.^{16,17} 한편 세포 손상에 따른 재생의 증거를 위한 실험의 모델로도 응용되고 있다.

본 연구에서는 방사선 조사에 의한 소장 점막의 세포 손상과 세포 증식을 통한 재생 과정을 관찰하기 위하여 조직병리학적 변화를 관찰하고 재생 과정의 객관적 증명을 위해 광학현미경상의 유사분열 수를 측정하였다. 방사선 손상은 결과에서도 기술한 바와 같이 방사선 조사 후 1일째 손상 정도가 심하게 보였고 3일부터 재생 소견이 관찰되었으며 7일부터는 정상으로 회복되는 소견을 보여 Jensen등¹⁸의 보고에서 보다 약간 일찍 회복되는 것으로 나타났다. 그러나 방사선 조사 후 5일에 가장 유사분열 수가 높고 재생 과정이 활발한 것은 기왕의 보고와 일치한다.¹⁹

최근 분자생물학의 급속한 발전과 더불어 방사선 생물학 분야에서도 방사선에 대한 세포반응과정의 신호 전달기전을 밝히고자 하는 연구들이 시도되고 있다. 여러 신호전달체계중 PLC매개 신호전달체계는 여러 성장 인자 및 암유전자와 관련하여 정상 및 암과 같은 비정상 세포의 성장, 증식뿐 아니라 정상 세포의 재생기전 등 생리 및 병리 현상 연구에 활발히 응용되고 있다.²⁰⁻²³

PLC동종효소 중 가장 많이 연구되고 있는 것은 PLC- γ 1으로 이는 다른 동종효소들과 달리 SH2, SH3의 src 유사성 부위를 포함하고 있어 세포의 성장 및 암발생기전에 관여한다는 것이 밝혀졌고²⁴ 또한 여러 성장 인자들과 결합하여 타이로신인산화과정을 거쳐 활성화되어 DNA합성을 유도하는 등 세포 증식에 관여하는 것으로 알려져 세포의 성장은 물론 세포 분화 및 증식에 중요한 역할을 하는 것이 증명되었다.²⁵

본 연구에서는 면역조직화학 염색상 PLC- γ 1이 정상 대조군에 비해 방사선 조사후 3일과 5일에 강한 발현을 보이고 세포 증식이 활발한 소장 점막 세포에서 발현됨을 확인하여 방사선 조사 후의 소장 점막 재생 과정에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 이를 면역블로팅으로 확인하였다. PLC- γ 1은 앞에서도 언급한 바와 같이 PI를 가수분해하여 DG와 PKC를 생성하므로 방사선 조사 후 PKC가 타이로신 인산화가 관여하는 신호전달체계에 의하여 세포 생존을 증가시킴으로 세포 증식에 관여한다는 보고^{26,27}와 관련이 있는 결과라고 생각된다.

한편 PLC- δ 1은 85 Kd으로 PLC동종효소 중 가장 작다.⁵ PLC- δ 1의 작용 기전은 백서에서 자연적으로 발생

한 고혈압이 PLC- δ 에서 촉매성을 지닌 것으로 추정되는 X 부위내 몇 군데의 점돌연변이로 PLC활성에 변화를 일으켰기 때문인 것으로 보고된 바 있으나²⁸ 아직 정확한 활성화 기전이나 역할은 밝혀지지 않고 있다. 단지 PLC- δ 1의 구조에 칼슘과 결합할 수 있는 부위가 있어 이것으로 다른 동종효소들에 비해 칼슘에 예민하여 세포내 칼슘 증가만으로 PLC- δ 1이 PI가수 분해를 자극할 수도 있다는 것을 시사하고 또한 칼슘과 결합하여 세포막으로의 전이나 기질 상태, 촉매반응, 조절단백과의 상호작용을 조절할 수 있을 것으로 추측되고 있다.²⁹

본 연구에서는 방사선 조사후 1일과 3일에 PLC- δ 1의 강한 발현이 나타났고 주로 손상 정도가 심한 점막 표면에 발현을 확인할 수 있었다. 일반적으로 조직 손상의 초기에는 세포내 칼슘이 증가하고 이의 지속적인 증가는 결과적으로 세포에 강력한 손상 효과를 나타내어 여러 효소들을 활성화시킨다. 칼슘에 의해 활성화되는 효소는 지질단백효소, 단백질효소, ATPase등이 있어 세포막 손상이 일어나는 것으로 알려져 있다.³⁰ 본 실험에서 나타난 PLC- δ 1의 발현 증가는 조직 손상에 의한 칼슘 증가와 밀접한 관계가 있다고 추측된다. 왜냐하면 조직 손상의 근거로 많은 계획된 세포 고사의 형태들이 관찰되는데 이의 기전에 역시 칼슘이 원인이 되는 것으로 알려져 있기 때문이다.³¹ 즉 방사선 조사에 의한 자극이 세포내 칼슘 증가를 유도하고 이 증가된 칼슘은 PLC- δ 1과 결합하여 세포사 등의 점막 손상기전에 관여할 것이라고 추측된다. 또한 PLC- δ 1은 활성화되면 PI가 가수분해되어 생성된 DG를 통해 더욱 세포내 칼슘을 증가시켜 조직 손상을 더욱 가속화시킬 수 있다. 이 과정에서의 칼슘과 세포사와의 상호작용 기전을 증명하기 위한 연구는 추후 이루어져야 할 것이다.

한편 PLC- β 1은 G-단백을 통해 활성화되는 효소로 세포분비 및 신경 조절 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁰ G-단백을 통해 활성화되므로 세포성장과도 관여할 것이라는 보고가 있으나³¹ 본 연구에서는 손상이나 재생시 전혀 발현이 되지 않았다. 이는 양성 대조 염색으로 사용한 부신 피질에서는 확실한 양성으로 염색되었으므로 발현이 되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 방사선 조사에 의한 세포손상이나 특히 재생시 신호전달이 PLC- β 1을 통하지 않는 것으로 생각되었다.

결 론

저자들은 실험적으로 백서의 전신에 방사선조사후 방사선 손상을 받고 활발한 세포 증식을 보이는 소장 점막의 재생 과정을 시간적으로 관찰하고 조직 손상 및 재생의 기전을 체계적으로 밝히고자 이들 조직에서 신호전달체계에서 중요한 역할을 하는 PLC동종효소의 발현을 면역조직화학적 염색으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 방사선 조사후 소장 점막에서 방사선에 의한 손상은 1일에 가장 심하였고 재생은 3일부터 활발하게 일어나 5일에 최고치에 달하였다.

2) PLC-β1은 발현이 관찰되지 않았고 PLC-δ1은 방사선 조사 후 1일에 강하게 발현되었으며 주로 소장 점막 표면에서 나타났고 반면에 PLC-γ1은 3일 부터 발현이 되어 5일에 가장 강하게 발현이 되고 주로 재생이 활발한 소낭선에서 발현이 되었다.

3) 위의 소견은 면역조직화학염색뿐 아니라 면역침강에서도 같은 소견을 확인할 수 있었다.

이상과 같은 소견으로 방사선 조사후 재생과정에 PLC-γ1이 중요한 역할을 하는 것으로 사료되었고 방사선 손상의 기전에는 PLC-δ1이 관여할 것으로 추측되었다.

참 고 문 헌

- Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984; 312: 315-21.
- Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986; 233: 305-12.
- Rana RS, Hokin LE. Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol Rev* 1990; 70: 115-64.
- Rhee SG. Inositol phospholipids-specific phospholipase C, interaction of the γ 1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 297-300.
- Rhee SG, Suh PG, Rue SH, Lee SY. Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* 1989; 244: 546-50.
- Suh PG, Ryu SH, Moon KH, Suh HW, Rhee SG. Inositol phospholipid-specific phospholipase C: Complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase related oncogene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 55: 5419-23.
- Followill DS, Kester D, Travis E. Histologic changes in mouse colon after single- and split-dose Irradiation. *Radiat Res* 1993; 136: 280-8.
- Ito H, Meistrich ML, Barkley HT, Thomas HD, Milas L. Proliferation of acute late radiation damage of the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12: 211-9.
- Hallahan DE, Virudachalam S, Sherman ML, Huberman E, Kufe DW, Weichselbaum RR. Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res* 1991; 51: 4565-9.
- Kim CY, Giaccia AJ, Strulovici B, Brown JM. Differential expression of protein kinase C epsilon protein in lung cancer cell lines by ionizing radiation. *Br J Cancer* 1992; 66: 844-9.
- Uckun FM, Schieven GI, Tuel-Ahlgren LM, et al. Tyrosine phosphorylation is a mandatory proximal step in radiation-induced activation of the protein kinase C signal pathway in human B-lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 252-6.
- 박경란, 이정식, 김성숙, 이영한, 류성호, 서관길. 방사선 조사후 백서 공장 점막의 재생 과정에서 5-fluorouracil 투여가 Phospholipase C와 ras 암유전자 단백질의 발현에 미치는 영향. *대한치료방사선학회지* 1994; 12: 271-84.
- Matsuo T, Ohtsura A, Ito M, et al. Inhibition of epidermal growth factor binding system by ionizing radiation in A431 human squamous carcinoma cells. *Cancer Lett* 1995; 89: 153-9.
- Hsu SM, Raine I. The value of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in diagnostic and research pathology. In: Delellis RA ed. *Advances in immunocytochemistry*. New York: Masson, 1984; 31.
- Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, Rhee SG. Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. *J Bio Chem* 1988; 263: 14497-504.
- Withers HR, Elkind MM. Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol* 1970; 17: 261-7.
- Taylor JMG, Withers HR, Mason KA, Davis CA. Repopulation of mouse jejunal crypt cells. *Radiation Oncol* 1991; 20: 181-90.
- Jensen MH, Sauer T, Devik F, Nygaard K. Late changes following single dose roentgen irradiation of rat small intestine. *Acta Radiol Oncol* 1983; 22: 299-303.
- Leshner J, Leshner S. Effects of single-dose partial-body X-irradiation on cell proliferation in the mouse small intestinal epithelium. *Radiat Res* 1974; 57: 148-57.
- Arteaga CL, Johnson MD, Todderud G, Coffey RJ, Carpenter G, Page DL. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-γ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10435-9.
- Margolis B, Rhee SG, Felder S, et al. EGF Induce Tyrosine Phosphorylation of Phospholipase C-II: A Potential Mechanism for EGF Receptor Signaling. *Cell* 1989; 57: 1101-7.
- Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG, Hunter T. Phospholipase C-γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 1989; 57: 1109-22.
- Nishibe S, Wahl MI, Rhee SG, Carpenter G. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II in vitro by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 10335-8.
- Stahl ML, Ferenz CR, Kelleher KL, Kriz RW, Knopf JL. Sequence similarity of phospholipase C with the noncatalytic region of src. *Nature* 1988; 332: 269-72.

25. Smith MR, Ryu SH, Suh PG, Rhee SG, Kung H-F. S-phase induction and transformation of quiescent NIH 3T3 cells by microinjection of phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3659-63.
 26. Hallahan DE, Virudachalam S, Schwartz JL, Panje N, Mustafi R, Weichselbaum RR. Inhibition of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation. *Radiat Res* 1992; 129: 345-50.
 27. Chae HP, Karvos LJ, Uckun FM. Role of tyrosine phosphorylation in radiation induced activation of c-jun protooncogene in human lymphohematopoietic precursor cells. *Cancer Res* 1993; 53: 447-51.
 28. Kato H, Fukami K, Shibasaki F, Homma Y, Takenawa T. Enhancement of phospholipase C δ 1 activity in the aortas of spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem* 1992; 267: 6483-7.
 29. Bairoch A, Cox JA. EF-hand motifs in inositol phospholipid-specific phospholipase C. *FEBS Lett* 1990; 269: 454-6.
 30. Clapham DE, Neer EJ. New roles for G-protein $\beta \gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature* 1993; 365: 403-6.
 31. Vaux D. Towards an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 786-90.
-