대한방사선종양학회지 2003;21(4):315 ~ 321

발육 중의 백서 태아 대뇌 피질에서 방사선에 의한 아포토시스

전남대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 병리학교실†, 의공학과‡

정웅기*·남택근*·이민철†·안성자*·송주영*·박승진‡·나병식*

목 적: 발육 중인 백서 태아 대뇌 피질에서 방사선조사에 의한 아포토시스 반응에 대하여 알아보고자 하였다.
대상및방법: 임신백서의태령 17 내지 19일(E17 ~ E19)에 선형가속기의 X-ray를 이용하여 어미쥐의 복부에 방사선을 조사하였다. 방사선량에 따른아포토시스를 보기위하여 1, 2, 3, 4 Gy를 전후 조사면으로방사선조사를 시행하고 5시간 후 백서 태아의 뇌를 획득하였다. 시간 경과에 따른 아포토시스를 보기 위하여 E17 ~ E19에 2 Gy의 방사선을 조사한 후 1, 3, 6, 12, 24시간에 각각 백서 태아의 뇌를 획득하였다. 대조군은 방사선을 조사하지 않은 임신 쥐를 같은 조건하에서 사육하여 각 군당 3마리씩 할당하였다. 아포토시스 세포는 면역조직화학적 방법(TUNEL; *In situ* TdT-mediated dUTP nick end labeling)으로 염색하여 관찰하였다.
결 과: 백서 태아 대뇌 피질에서 TUNEL 양성인 세포는 광학현미경하에서 전형적인 아포토시스의 형태학적 특징을 나타내었다. 대조군에서는 대뇌 피질의 전 층에서 TUNEL 양성세포를 거의 발견할 수 없었다. 1 Gy의 방사선 조사 후 5시간에 대뇌피질 전 층에서 미약하게 관찰되었으나 2 Gy에는 전 층에서 1 Gy 경우보다 더 증가하였고 그중 뇌실대와 중간대에서 피질대보다 더 많이 나타났다. 조사된 1 ~ 4 Gy 범위에서 방사선량이 증가할수록 TUNEL 양성세포가더욱 증가하는 것을볼수있었다. 2 Gy의 방사선조사후 3시간부터 TUNEL 양성세포가 관찰되기 시작하여 방사선 조사 후 6시간에 최고점을 이루었으며 이는 24시간까지 지속되었다.
결 론: 발육 중인백서태아대뇌피질에서방사선에의한아포토시스의전형적인형태학적특징을관찰할수있었다. 아포토시스는 뇌실대와 중간대에서피질대보다 더 많이 나타났으며 이는줄기세포와 초기의 분화세포에서 방사선조사에 대한 감수성이 더욱 민감함을 시사하였다.

핵심용어: 방사선조사, 아포토시스, 백서, 뇌

서 론

척추 동물에서 세포사는 괴사와 아포토시스의 두 가지 형태가 있다.[1] 괴사는 허혈, 지속적인 온열, 그리고 물리적 및 화학적 외상과 같은 갑작스런 심한 손상에 의하여 유발될 수 있다.[2] 아포토시스는 세포 내의 신호 전달에 의하여 야기되는 세포사의 한 형태로 정상적인 세포의 수급, 호르몬에 의한 조직의 위축, 배형성 등의 생리적 조건하에서 일어난다. 또한 글루코코르티코이드, 사이토카인, 성장인자 등의 제거, 항암제나 방사선치료에 의하여도 유발될 수 있다.[3,4] 아포토시스는 세포 내 칼슘의 상승, 엔도뉴클레에이스의 활성화, 염색질의 농축, 분절, 세포의 수포화, 그리고 아포토시스 세포로 되는 생화학적, 형태학적으로 분명한 형태를 가지고 있다.[3,5]

한편 방사선에 의한 아포토시스는 반사선민감도와 관계가 있다. 정상조직과 종양에서 아포토시스에 관한 연구는 많이 이루어져 왔으나 아포토시스에 의한 세포사의 기전은 아직도 확실하게 밝혀지지 않고 있다. 발육중인 백서 뇌에서 자연발생적 아포토시스는 보고된 바 있으나[6] 방사선에 의해 유도된 아포토시스에 관한 연구는 드물고,[7~10] 이들 대부분은 생후 쥐의 발육 중인 뇌에서 이루어졌으며 방사선에 민감한 태중의 발육기 뇌에서 방사선조사 후 아포토시스 연구는 매우 드물다. 이에 저자들은 태아기의 발육 중인 백서 뇌에서 방사선조사에 의한 아포토시스의 형태학적 특징을 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

이 연구는 전남대학교병원 임상연구소 연구비(CUHRI-1999)에 의해 이루어졌음.
이 논문은 2003년 8월 18일 접수하여 2003년 10월 27일 채택되었음.
책임저자: 정웅기, 전남대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 062)220-6858, Fax: 062)226-4443
E-mail: wkchung@chonnam.ac.kr

대상 및 방법

1. 실험동물

Sprague Dawley 백서 암컷 두 마리당 수컷 한 마리를 하오 6시부터 상오 6시까지 같은 우리에 넣어 교미를 유도하였다. 다음 날 질도말을 하여 정자를 관찰함으로써 수정을 확인하였다. 수정이 확인된 날을 E0 (embryonic day 0)로 하고 임신한 백서들은 12시간 간격의 명암 주기로 상품화된 먹이로 사육하였다.

2. 방사선조사

방사선조사는 선형가속기(Mevatron 6700, Siemens Co., Germany)의 6 MV X-ray를 이용하여 태령 17 내지 19일(E17 ~ E19)에 조사하였다. 방사선조사를 위하여 자체 제작한 백서 고정용 틀을 만들어 사용하였다. 방사선량에 따른 아포토시스를 보기 위하여 각 군당 3 마리씩 임신 쥐의 복부에 전후 조사면으로 1, 2, 3, 4 Gy의 방사선조사를 시행하고 5시간 후 백서 태아의 뇌를 획득하였다. 시간 경과 및 뇌의 발육 시기에 따른 아포토시스를 보기 위하여 E17 ~ E19에 2 Gy의 방사선을 조사한 후 1, 3, 6, 12, 24시간에 각각 백서 태아의 뇌를 획득하였다. 대조군은 방사선을 조사하지 않은 임신쥐를 같은 조건하에서 사육하여 각 군당 3마리씩 할당하였다.

3. 면역조직화학적 염색(TUNEL; *In situ* TdT-mediated dUTP nick end labeling)

백서 뇌 조직의 파라핀 포매괴를 3 μm 두께의 절편으로 만들어 탈파라핀과 rehydration시켰다. 아포토시스 세포는 ApopTag Plus Kit (Oncor, U.S.A.)를 사용하여 염색하였다. 즉, 3 μm 두께의 절편을 15분간 proteinase K 용액에 부치한 다음 증류수로 세척 후 3% hydrogen peroxide와 반응시켰다. 슬라이드를 2시간 동안 37°C에서 biotin-dUTP와 transferase 혼합액에 작용시켰다. Digoxigenin conjugated with peroxidase로 염색하고 헤마톡실린으로 대조 염색하였다.

4. 조직관찰방법

대뇌의 시상정중선 중앙지점에서 관상면으로 절제된 대뇌 조직의 배측 피질(dorsal cortex)을 관찰 대상으로 하였다. 백서 태아 대뇌 피질은 연막(piamater)으로부터 변연대(marginal zone), 피질판(cortical plate), 피질하판(subplate), 중간대(intermediate zone), 뇌실하대(subventricular zone), 뇌실대(ventricular zone) 등의 6개의 세부층으로 구별할 수 있으나[6], 측정의 일관성을 위해 대체로 같은 조직특성이라고 볼 수 있는 영역끼리 함께 취급하여 피질대(cortical zone, CZ; 변연대+피질판+피질하판), 중간대(intermediate zone, IZ; 중간대+뇌실하대), 뇌실대(ventricular zone, VZ)의 3개의 층으로 분류하였다. 아포토시스 세포의 관찰은 광학현미경을 이용하여 임의의 아포토시스 지수(apoptotic index)를 산정하였다. 즉, 대뇌피질의 각 층에서 100개의 세포 중 TUNEL 양성반응을 보인 세포수를 백분율로 표시하고 3개 표본의 평균을 내었다. 결과를 10% 미만은 ±, 10 ~ 20%는 +, 20 ~ 30%는 ++, 30% 이상은 +++로 각각 표기하였다.

결 과

1. 아포토시스 세포의 TUNEL 염색 특징

광학현미경하에서 백서 태아 대뇌 피질의 TUNEL 양성인 세포는 파라핀 절편에서 짙은 갈색으로 염색되어 정상 세포와 구분이 잘 되었다. 또한 특징적인 둥그런 모습으로 군집을 이루지 않고 산재하여 출현하였다(Fig. 1).

2. 방사선량에 따른 아포토시스 세포의 출현

대조군에서는 백서 태아(E17 ~ 19) 대뇌피질의 전 층에서 TUNEL 양성세포를 거의 발견할 수 없었다(Table 1, Fig. 1A). 1 Gy의 방사선조사 후 5시간에 관찰한 TUNEL 양성세포는 대뇌피질 전 층에서 미약하게 관찰되었으나(Fig. 1B) 2 Gy 방사선 조사후에는 전층에서 현저하게 증가하였고 뇌실대와 중간대에서 피질대보다 많이 발생하였으며(Fig. 1C), 방사선량이 증가할수록 TUNEL 양성세포가 더욱 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히 4 Gy 방사선조사 후에는 뇌실대와 중간대와 함께 피질대에서는 변연대에 근접한 피질판 표층

Table 1. Patterns of TUNEL Positivity* 5 hours after 1 ~ 4 Gy Irradiation on Fetal Rat Cerebral Cortex

Dose	Ventricular zone	Intermediate zone	Cortical zone
1 Gy	+	±	±
2 Gy	+++	+++	++
3 Gy	+++	+++	+++
4 Gy	+++	+++	+++

*Positivity was defined as ±, when mean of stained cells are less than 10%; +, 10 ~ 20%; ++, 20 ~ 30%; +++, more than 30%, respectively.

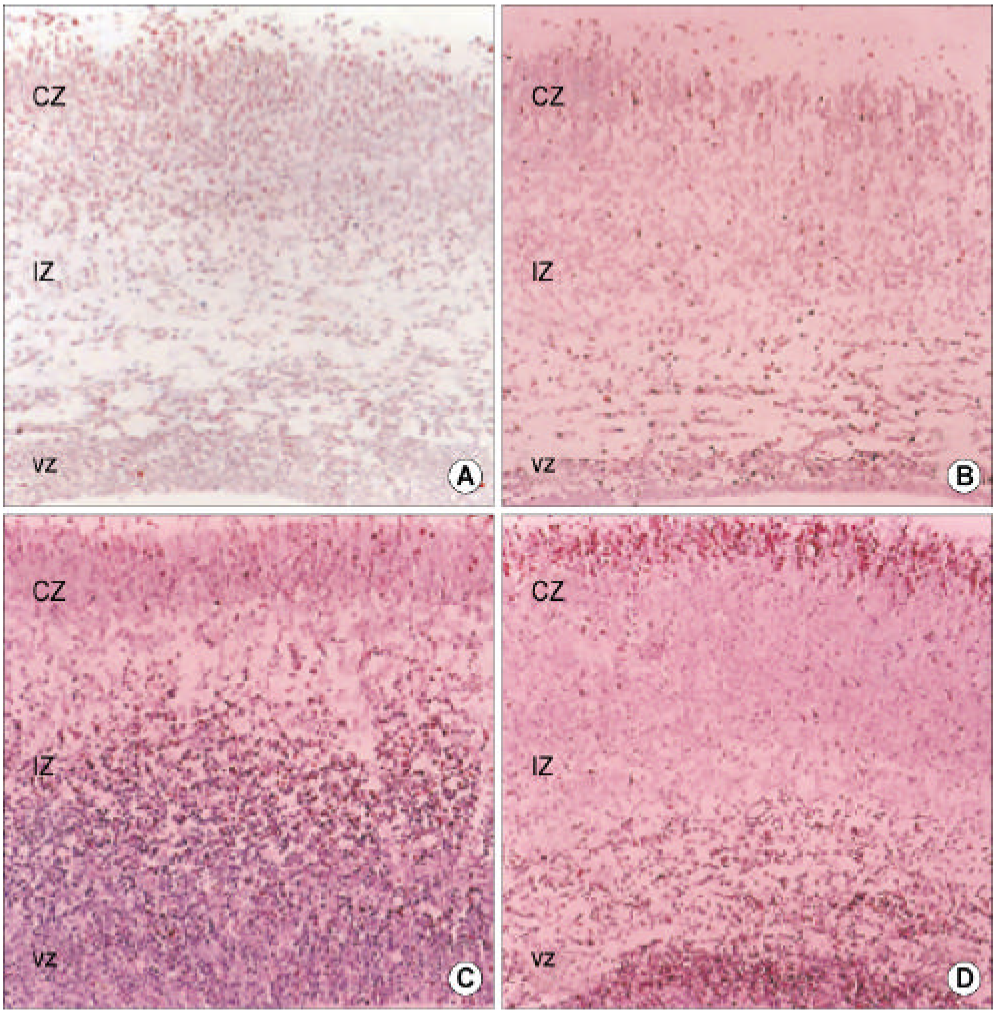

Fig. 1. TUNEL-positiveness accordingto the radiationdose.Thespontaneousapoptosis is rarelyseeninnon-irradiated fetal cerebral cortex (A, ×50),whilesomeTUNEL-positivecellsareobserevedShouraftertheonsetof1Gyirradiation (B, ×60),andincreasing cells with 2 Gy (C,×50)and4Gy(D,×50).Itseemsmoreprominentatthe ventricular zone (VZ)andintermediatezone(IZ)than atthecortical zone (CZ)after 2 Gy, while show marked apoptosis in cortical plate of cortical zone after 4 Gy.

에서 아포토시스가 많이 일어났다(Fig. 1D).

3. 시간에 따른 아포토시스의 출현

대조군에서는 TUNEL 양성세포가 거의 관찰되지 않았으나(Table 2, Fig. 2A), 2 Gy의 방사선조사 후 3시간부터 뇌실대와 중간대에서 TUNEL 양성세포가 관찰되기 시작하였고(Fig. 2B), 6시간에는 양성세포가 뇌실대와 중간대에서 더욱 많이 나타났으며 피질대에서도 TUNEL 양성세포가 상당수 관찰되기 시작하였다. 전체적으로 방사선조사 후 6시간에 TUNEL 양성세포의 분포가 최고를 이루었다(Fig. 2C). 이들의 분포는 24시간까지 지속되었다(Fig. 2D).

Table 2. TUNEL Positivity according to the Time Course after 2 Gy Irradiation on Fetal Rat Cerebral Cortex

Hours	Ventricular zone	Intermediate zone	Cortical zone
1	±	±	-
3	++	++	+
6	+++	+++	++
12	+++	+++	+++
24	+++	+++	+++

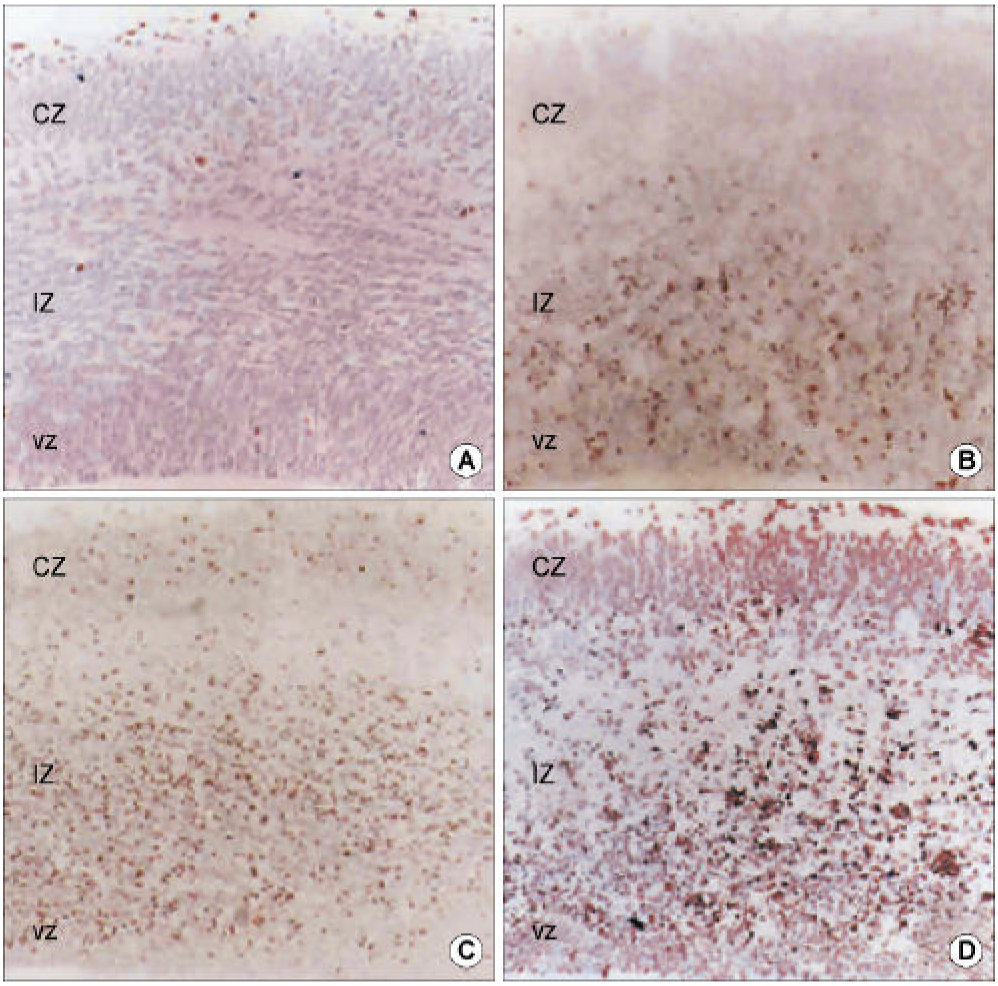

Fig. 2. TUNEL-positiveness according to the time course.Theapoptotic cells are seldom observed innon-irradiated fetal cerebral cortex (A, ×60). At 3 hour (B, ×80) IZ and VZ show many TUNEL-positive cells but fewer in CZ. At 6 hour (C, ×50) the extent of TUNEL-positiveness of all three zonesreach the peak and persisted until 24 hour (D, ×80).

고안 및 결론

뇌의 발육은 이주(migration), 복제(replication), 그리고 세포들의 제거(elimination)들로 특징지워진다.[11] 이러한 발육의 진행 순서는 뇌세포의 형태와 부위에 따라 다르다.[6] 아포토시스는 정상적인 뇌의 발육에 필요하며[12] 과잉의 신경세포(neuron)와 신경교(glia)를 제거하는 데 기본적인 기전이다.[11,13] 전리방사선은 분화 중이거나 또는 분열하고 있는 세포에 많은 영향을 줄 수가 있으며 성쥐 정상 뇌의 상의하(subependyma), 해마(hippocampus)에서 아포토시스를 유발함이 보고되었다.[14] 저자들은 발육 과정에 있는 정상 뇌의 방사선에 의한 아포토시스를 연구함으로써 세포의 분화 및 발육과 관련한 형태학적 특징들을 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

방사선에 의한 아포토시스에 관하여 많은 연구가 보고되었는데[7~10] 이들 대부분은 생후 쥐의 발육 중인 뇌에서 이루어졌으며 방사선에 민감한 태아기의 발육 중인 뇌에서 방사선 유발 아포토시스 연구는 매우 드물다. 임신쥐나 마우스에서 임신 16~18일째에 방사선조사를 하였을 때 5시간 이내에 전뇌(forebrain)의 증식 또는 분화 중인 줄기세포(stem cell)에서 급격한 세포사가 일어나고 이미 분화된 신경세포에서는 세포사가 잘 일어나지 않는 것으로 알려져 있다.[15~18] 생존한 태아쥐는 성장하면 전뇌의 크기가 현저히 작고 심한 신경학적 결손을 갖게 된다.[15,16] 본 연구는 백서에서 태령 17~19일(E17~E19) 되는 시기에어미쥐의 복부에 방사선을 조사하고 1, 3, 6, 12, 24시간 후에 각

각 발육 중인 태아의 뇌조직을 획득하여 대뇌피질에서 아포토시스를 형태학적으로 관찰하였다.

발육 중인 백서 뇌에서 자연발생적 세포사 및 전리방사선에 의하여 유도된 세포사는 모두 아포토시스의 형태학적 특성을 가지고 있다. 즉, 세포질 변연부에 염색질의 응축, 핵의 농축, 아포토시스 세포 형성을 나타내며 생화학적으로 엔도뉴클레에이스 활성에 의하여 초래되는 뉴클레오솜간 DNA 분절의 특징을 가지고 있다.[10] 아포토시스 세포는 terminal deoxynucleotidyl exotransferase의 작용을 통하여 DNA 단절 부위에서 biotinylated dUTP의 incorporation에 근거한 TUNEL 방법으로 염색될 수 있다.[19] 면역조직화학적 방법인 TUNEL 염색은 감수성이나 특이성에서 아포토시스의 평가에 좋은 방법으로 알려져 있다.[14]

Spreafico 등[6]의 연구에 의하면 발육 중인 정상 백서 뇌조직에서 광학현미경하에서 TUNEL 염색에 양성인 세포핵은 파라핀 절편에서 강하고 선택적인 갈색으로 쉽게 구분되었으며 이들은 대뇌의 피질과 시상(thalamus)에서 항상 분산되어 나타났고 여러 개의 세포가 군집을 이루는 모습은 보이지 않았다. 저자들의 연구에서도 대뇌 피질에서 이와 같은 아포토시스의 일반적인 형태학적 특징들을 잘 관찰할 수 있었다. 한편 대뇌 피질에서 아포토시스 세포가 신경원세포 기원임이 밝혀져 있다.[6]

정상적인 발육과정에 있는 백서뇌에서 사멸세포는 아포토시스의 형태학적 특징을 나타내며 방사선조사 후에 이러한 사멸세포의 현저한 증가를 관찰할 수 있다. 사멸세포는 주로 대뇌피질, 피질하백질, 해마, 뇌실 주위 배세포지역(germinal zone), 그리고 소뇌의 외과립세포층(external granule cell layer)에서 관찰된다.[10] 대뇌 피질에서 아포토시스 세포는 뇌실대의 증식세포뿐만 아니라 중간대의 이주세포와 피질판의 유사분열 후의 세포에서도 관찰되었으며 이러한 양상은 이미 보고된 결과와 비슷하였다.[8,20] 또한 발육 중인 신경상피 내에서의 방사선 유발 아포토시스 세포의 분포는 정상적으로 일어나는 세포고사에서의 분포와 비슷하다.[21] 중추신경계에서 희돌기교세포(oligodendrocyte)와 상의하세포(subependymal cell)가 방사선 유도 아포토시스를 일으키는 것으로 알려져 있다.[14,22] 이 세포들의 기능은 잘 알려져 있지 않으나 손상에 대한 반응으로 증식을 하는 것으로 관찰되었고 신경원성(neuronal) 및 비신경원성(non-neuronal) 세포 군집을 생산할 수 있다.[23]

출생 직후 백서에서 방사선조사 후에 세포의 핵농축에 대한 연구에서 소뇌피질에서 아포토시스의 형태학적 모습을 증명하였으며 0.04~4 Gy 범위에서 선량반응관계가 있었다.[24] Bolaris 등[20]의 연구에서는 백서 임신 15~17일째 된 태아 뇌에서 10~40 cGy의 저선량에서 방사선량이 증가할수록 아포토시스 세포도 증가하였으며 10 cGy의 저선량에서도 아포토시스가 유발되었다. 본 연구에서도 1~4 Gy 범위에서 방사선량이 증가할수록 백서 태아 대뇌피질의 전층에서 아포토시스의 발생이 증가하였다.

아포토시스의 발생 분포에 있어서 피질대보다 뇌실대와 중간대에서 상대적으로 많이 일어났는데, 이는 뇌실대와 중간대에서는 비교적 미분화된 세포들로 이루어져 방사선에 더 민감한 것으로 보이며, 피질대에서는 비교적 분화가 어느 정도 진행된 상태로 이의 일부 세포들은 방사선으로 인한 손상을 복구하고 분화를 계속 진행하는 것으로 보인다.[17,25,26] 그러나 4 Gy 방사선조사 후에는 피질대의 세부영역에서도 아포토시스의 분포가 차이가 있었다. 즉 피질대 중 변연대에 근접한 피질판 표층에서 아포토시스가 더 많이 일어났는데, 이들은 가장 최근에 이주한 신경세포들로서 피질대의 심층부위 세포들보다 방사선에 비교적 더 민감한 것으로 생각되었다.[17,25]

마우스 공장의 크립트 세포에 관한 연구에서 방사선 유도 아포토시스는 방사선조사 후 3 내지 6시간사이에서 증가하는 경향이었다.[27~31] Shinohara 등[14]의 연구에서 정상 성쥐의 뇌 상의하에서 방사선조사 후에 아포토시스는 6시간만에 정점에 도달하였으며 Ferrer 등[32]의 보고에서는 생후 3일 된 쥐의 소뇌에 방사선조사 하여 6시간 후 DNA분절이 최고를 이루었다. 본 연구에서도 2 Gy의 방사선 조사 후 6시간에 백서 대뇌 피질 전 층에서 아포토시스가 정점을 이루었다. 이러한 사실들은 정상조직에서 방사선 유도 아포토시스는 거의 동일한 양상의 시간 의존성이 있음을 시사하였다.

문헌 고찰 결과 발육 중인 중추신경계에서 방사선조사에 의한 아포토시스는 p53 의존성임을 보여주었다.[18,20,33] E17~18의 백서 태아 뇌에서 4 Gy 방사선조사 후 1~3시간에 p53 단백질의 상승이 있었고,[18] 마우스 뇌의 상의하세포와 척수의 교원세포에서 아포토시스 전 p53 유전자 발현의 선행됨이 보고되었다.[33] 방사선조사 후 아포토시스가 일어나기 전 p53 유전자 발현의 상승은 마우스 소장의 크립트 세포[34]와 흉선세포[35,36]에서도 관찰되었다. 한편, 방사선에 의해 유도된 아포토시스와 조기반응 유전자의 발현에 관한 연구는 많지 않으며, 특히 c-jun과 c-fos mRNA 또는 이들의 단백 발현에 대해서는 세포의 종류 및 환경,

방사선량 등에 따라 다양하게 보고되고 있다.[18,37 ~ 39)] 앞으로 백서 태아 뇌에서 아포토시스와 c-Jun 및 c-Fos와의 연관성에 대해서는 더욱 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

결론적으로 발육 중인 백서 태아(E17 ~ E19) 대뇌피질에서 방사선에 의한 아포토시스의 전형적인 형태학적 특징을 관찰할 수 있었으며 뇌실대와 중간대에서 피질대보다 더 많이 나타났으며 1 ~ 4 Gy 범위에서 선량 증가에 따라 아포토시스가 증가함을 보여주었고 시간 경과에 따른 변화는 방사선조사 3시간 후부터 나타나기 시작하여 6시간에 정점을 이루고 24시간까지 지속되었다.

참 고 문 헌

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. Apoptosis; a basic biological phenomenonwithwiderangingimplicationsintissuekinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257
2. CohenJJ. Overview;Mechanisms ofapoptosis. ImmunolToday 1993;14:126-130
3. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death *via* apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation ofbothtumorandnormalcells.Anticancer Res 1990;10:1153-1159
4. Meyn RE, MilasL,StoryMD,AnfKK,TomasovicSP,StephensLC. Programmed cell death in response of normal and tumor tissue to radiation. Cancer Bull 1992;44:80-85
5. Wyllie AH, Kerr JFR,CurrieAR.Cell death;thesignificance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980;68:251-306
6. SpreaficoR,Frassoni C,ArcelliP,SelvaggioM,DeBiasiSInsitu labelling of apoptoticcelldeath in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. J Comp Neurol 1995;363:281-295
7. Ferrer I, Serrano T, Rivera R, Oliver M, Zajar MJ, Graus F. Radiosensitive populations and recovery in X-ray induced apotosis in the developing cerebellum. Acta Neuropathol 1993b;86:491-500
8. Ferrer I, Serrano T, Alcantara S, Tortosa A, Graus F. X-ray induced cell death in the developing hippocampal complex involves neurons and requires protein systnesis. J Neuropathol Exp Neurol 1993c;52:370-378
9. Ferrer I, Macaya A, Blanco R, et al. Evidence of internucleosomal DNA fragmentation and identification of dying cells inX-ray-induced celldeath inthedevelopingbrain.Int J Dev Neurosci 1995;13:21-28
10. Ferrer I. Cell death in the normal developing brain, and following ionizing radiation, methyl-azoxymethanol acetate, and hypoxia-ischaemia intherat.NeuropatholApplNeurobiol 1996; 22:489-494
11. Soriano E,Del Rio J, Auladell C. Chracterization of phenotype and birthdates of pyknotic dead cells in the nervous system by a combinationofDNAstainingandimmunohistochemistry for 5 ’ -bromodeoxyuridine and neural antigens.J Histochem Cytochem 1993;41:819-827
12. Thomson CB. Apoptosis in the pathogenesisandtreatment of disease. Science 1995;267:1456-1462
13. Wolff RA, Dobrowsky RT, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA. Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. J Biol Chem 1994; 269:19605-19609
14. Shinohara C, GobbelGT,Lamborn KR,TadaE,FikeJR.Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated dose of X-rays. Cancer Research 1997;57:2694-2702
15. HicksSP, D'Amato CJ. Effects of ionizing radiations on mammalian development. Adv Teratol 1975;1:196-250
16. Antal S, Fonagy A, Fulop Z, Hidvegi EJ, Vogel HH. Decreased weight, DNA, RNA and protein content of the brain after neutron irradiation ofthe18-daymouseembryo.IntJRadiat Biol 1984;46:425-433
17. Bayer SA, Altman J. Experimental studies of neocortical development using x-irradiation. In: Bayer SA, Altman J, eds. Neocortical Development.New York: RavenPress1991;128-152
18. Borovitskaya AE, Evtushenko VI, Sabol SL. Gamma-radiation-induced cell death in fetal rat brain possesses molecular characteristics of apoptosis and is associated with specific messenger RNA elevations. Mol Brain Res 1996;35:19-30
19. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of DNA nuclearfragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501
20. BolarisS,Bozas E, Benekou A, PhillippidsH,Stylianopoulou F. In utero radiatin-inducedapoptosisandp53geneexpression in the developingratbrain. Int J Radiat Biol 2001; 77:71-81
21. Poulaki V, Benekou E, Bozas E, Bolaris S, Stylianopoulou F. p53 expression and regulation by NMDA receptors in the developing rat brain. J Neurosci Res 1999;56:427-440
22. Bellinzona M, Gobbel GT, Shinohara C, Fike JR. Apoptosis is induced in the subepenyma of youngadult rats by ionizing radiation. Neurosci Lett 1996;208:163-166
23. Goldman SA, Zukhar A, Barami K, Mikawa T, Niedzwiecki D. Ependymal/subependymal zone cells of postnatal and adult songbird brain generate both neurons and nonneuronal siblings in vitro and in vivo. J Neurobiol 1996;30:505-520
24. Harmon BV,AllanDJ. X-rayinduced celldeath by apoptosis in the immature rat cerebellum. Scanning Micros1988;2:561-568
25. Bayer SA,Altman J. Development of layer I and thesubplate in the rat neocortex. Exp Neurol 1990;107:48-62
26. Barendsen GW. Dose fractionation, dose rate and iso-effect relationshipsfornormal tissue response. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1982;8:1981-1997
27. PottenCS.Extremesensitivityofsomeintestinalcryptcellsto X and γ irradiation. Nature 1977;269:520-518

28. Hendry JH, Potten CS. Intestinal cell radiosensitivity;a comparison for celldeathassayedby apoptosis or byalossofclonogenicity. Int J Radiat Biol 1982;42:621-628
29. Ijiri K, Potten CS. Response of intestinal cells of differing topographical and hierarchical status to ten cytotoxic drugs andfive sources of radiation. Br J Cancer1983;47:175-185
30. IjiriK,PotenCS. Further studies ontheresponse of intestinal crypt cells of different hierarchicalstatustocytotoxicdrugs. Br J Cancer 1987;55:113-123
31. Chung WK, Ahn SJ, Nam TK, Lee MC, Chan C, Nah BS. Radiation-induced apoptosis in the crypt cells of mouse jejunum. Chonnam J Med Sci 1997;10:119-125
32. Ferrer I. Role of caspases in ionizing radiation-induced apoptosis in the developing cerebellum. J Neurobiol 1999;41:549-558
33. ChowBM,LiYQ,WongCS. Radiation-inducedapoptosis inthe adult central nervous system is p53-dependent. Cell Death Diff 2000;7:712-720
34. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, et al. The role of *p53* in spontaneousandradiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53deficientmice.Cancer Res 1994;54:614-617
35. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 1993;362:847-849
36. ClarkeAR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Thymocyteapoptosis induced byp53-dependentandindependentpathways.Nature 1993;362:849-852
37. ManomeY,DattaR,Taneja N, et al. Coinductionofc-jungene expression and internucleosomal DNA fragmentation by ionizing radiation. Biochemistry 1993;32:10607-10613
38. Ferrer I, Olive M, Ribera J, Planas AM. Naturally occurring (programmed) and radition-induced apoptosis are associated with selectivec-Jun expression in thedeveloping rat brain. Eur J Neurosci 1996;8:1286-1289
39. Syljuasen RG, Hong JH, McBride WH. Apoptosis and delayed expression of c-jun and c-fos after gamma irradiation of Jurkat T cells. Radiat Res 1996;146:276-282

Abstract

Radiation-induced Apoptosis in Developing Fetal Rat Cerebral Cortex

Woong-Ki Chung, M.D., Ph.D.*, Taek-Keun Nam, M.D., Ph.D.*, Min-Cheol Lee, M.D., Ph.D.[†], Sung-Ja Ahn, M.D., Ph.D.*, Ju-Young Song, Ph.D.*, Seung-Jin Park, Ph.D.[‡] and Byung-Sik Nah, M.D.*

Departments of *Radiation Oncology, [†]Pathology and [‡]Medical Engineering
Chonnam National University Medical School, University Hospital, Gwangju, Korea

Purpose: This study was performed to investigate apoptosis by radiation in the developing fetal rat brain.
Materials and Methods: Fetal brains were irradiated in utero between the 17th and 19th days of fetal life (E17-19) by linear accelerator. A dose of irradiation ranging from 1 Gy to 4 Gy was used to evaluate dose dependency. To test time dependency the ratswereirradiated with 2 Gy and then the fetalbrainspecimens were removed at variable time course; 1, 3, 6, 12 and 24 hours after the onset of irradiation. Immunohistochemical staining using *in situ* TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) technique was used for apoptotic cells. The cerebral cortex, including three zones of cortical zone (CZ), intermediate zone (IZ), and ventricular zone (VZ), was examined.
Results: TUNEL positive cells revealed typical features ofapoptoticcellsunderlight microscope in the fetalrat cerebral cortex. Apoptotic cells were not found in the cerebral cortex of non-irradiated fetal rats, but did appear in the entire cerebralcortex after 1 Gy irradiation, and were more extensive at the ventricular and intermediate zones than at the corticalzone.Theextentofapoptosiswasincreasedwith increasing doses of radiation. Apoptosis reached the peak at 6 hours after the onset of 2 Gy irradiation and persisted until 24 hours.
Conclusion: Typicalmorphologic features of apoptosis by irradiation were observed in the developing fetalrat cerebral cortex. Itwasmoreextensive at the ventricular and intermediate zones than at the cortical zone, which suggested that stem cells or early differentiating cells are more radiosensitive than differentiated cells of the cortical zone.

Key Words: Radiation, Apoptosis, Rat, Brain