CHOSUN UNIVERSITY 1946

creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

CHOSUN UNIVERSITY 1946

[UCI]I804:24011-200000237684

2009년 2월

박사학위논문

염증성 창자질환에서의 유전자 손상복구 반응

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

하 현 철

CHOSUN UNIVERSITY 1946
조선대학교
CHOSUN U

염증성 창자질환에서의 유전자 손상복구 반응

DNA Repair Response in the Inflammatory Bowel disease

2009년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

하 현 철

CHOSUN UNIVERSITY 1946

염증성 창자질환에서의 유전자 손상복구 반응

지 도 교 수 장 인 엽

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2008년 10 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원
의 학 과

하 현 철

CHOSUN UNIVERSITY 1946

하현철의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 유 호진 인

위원 조선대학교 교수 임 경준 인

위원 조선대학교 교수 전 제열 인

위원 서남대학교 교수 윤 상필 인

위원 조선대학교 교수 장 인엽 인

2008년 12월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

CHOSUN UNIVERSITY 1946
조선대학교
CHOSUN U

목 차

영 문 초 록 ----------1
서 론 ----------3
재료 및 방법----------8
결 과 ----------11
고 찰 ----------14
결 론 ----------24
참 고 문 헌 ----------25
사진부도설명---------- 31
사 진 부 도----------32

CHOSUN UNIVERSITY 1946

영문초록

DNA Repair Response in the Inflammatory Bowel disease

Hyeon-Cheol Ha

Advisor : In-Youb Chang, MD.PhD.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

Oxidative stress is an imbalance condition between production of reactive oxygen species (ROS) and diminished antioxidant defense systems. Oxidative stress develops chiefly in the processing ofinflammations since the inflammatory cells create enormous volume of ROS for the purpose of protection from many noxious assaults. It has been extensively identified extensively that oxidative stress in inflammatory tissue can head for malignant growth. Moreover oxidative stress acts as a chief pathogenetic factor for cancer development from inflammatory diseases, such as chronic inflammatory bowel disease (IBD)-related colorectal cancer. The levels of oxidized bases in the DNA molecule are a result of the balance between the amount of oxidative DNA damage and repair. Thereforewe analyzed the changes of colonic mucosal DNA repair proteins of the dextran sulfate sodium(DSS)-induced IBD. In this experiment, we studied the DSS-induced colonic mucosal changesof morphological localization and protein expression for DNA base mismatch repair(MMR) proteins, MSH2, MSH6; DNA base damage marker and base excision repair(BER) protein, 8-oxo-7,8-dihydro-2,-deoxyguanosine (8OHdG), Ref1, OGG1; DNA double strands breaks(DSB) marker and its repair(BER) protein, -H2AX, DNAPKCs, Ku70, Ku80. **The patterns of DNA repair proteins expression were protein-specific with time-course. While the DNA repair proteins that show increased expression were Ref-1, OGG1, DNAPKCs and MSH2, but Ku80 was decreased. The proteins changed level of expression may be the**

CHOSUN UNIVERSITY 1946

target molecule in the pathogenesis and protection of IBD, but additional study are needed to be confirmed.

Keywords : Inflammatory bowel disease, DNA repair protein, Dextran sulfate

조선대학교 CHOSUN U

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Ⅰ. 서 론

궤양성 잘룩창자염(궤양성 대장염, ulcerative colitis: UC)와 크론씨병(Crohn's disease: CD)은 주요한 두 형태의 염증성 창자질환(inflammatory bowel disease IBD)인데. 창자 벽의 재발성 만성 염증이 특징으로 알려져 있다. UC와 CD 모두 잘룩창자곧창자암(colorectal cancer)을 유발할 수 있다. 미국에서는 수 만명의 새로운 IBD 환자가 매년 새로이 보고되며, UC에서 발전되는 잘룩창자곧창자암의 위험률은 질병 유병기간이 길어질수록 증가한다(Hanauer, 2006 Ruttler et al 2006). UC와CD의 병인은 유전적이고 면역학적인 요인, 큰창자장벽 기능의 변화, 박테리아와 바이러스 감염, 변화된 큰창자의 미생물, 영양 상태, 정신적인 요인 등과도 관련되어 있기 때문에 다인자적인 성격을 지녔다고 말 할 수 있지만, 산화적 스트레스가 창자염증 질환의 주요 요인이라는 것은 잘 알려져 있다(Head and Jurenka, 2003). IBD의 조직학적 특징이라면, UC에서는 염증세포에 의해 점막에 심각한 침윤이 있고, CD에서는 장벽의 더 깊은 층에 침윤이 일어난다는 것이다. 림프구와 형질세포 외에도 호중구 과립세포, 대식세포들의 침윤이 발생하며, 호중구와 대식세포는 고농도의 ROS를 생성한다(Grisham, 1994). 그 결과 IBD에 걸린 인간과 실험적 동물의 염증성 큰창자점막과 실험적 큰창자염에 걸린 동물의 염증성 큰창자점막에서 정상적인 큰창자점막에서 보다 훨씬 더 많은 ROS가 생성된다는 것이 밝혀졌다(Keshavarzian et al, 1992; Simmonds et al, 1992; Campregher et al, 2008). 뿐만 아니라, UC를 앓고 있는 환자의 장점막에 있는 호중구, 대식구, 혈관내피세포의 조직화학적 국한에 의해서 많은 양의 superoxide가 나타났다(Oshitani et al, 1993).

한편, 항산화제 방어 체계는 IBD에서 감소한다. IBD환자의 점막에서 중요한 항산화제 효소인 SOD가 감소한다는 사실을 발견하였다(Lih-Brody et al, 1996). UC나CD에 걸린 환자의 염증성 점막에서 염증이 일어나지

CHOSUN UNIVERSITY 1946

않은 점막과 비교해 볼 때 총 글루타치온이 감소해 있음을 관찰했다(Buffinton and. Doe, 1995). 글루타치온의 산화환원 상태를 분석해 본 결과 활동성 UC환자의 염증성 점막에서 환원된 글루타치온의 소비로 인해서 산화된 글루타치온이 증가되어 있다는 것을 발견하였다(Holmes et al, 1998). 총 혈청 혈장 항산화제 능력(TAC)을 측정하였고, 대조군과 비교해 볼 때 IBD환자의 점막에서 질환의 활동성과 관계없이 현저하게 감소되어 있다는 것을 알아냈다(Koutroubakis et al, 2004). 이 모든 자료를 통해서 총 항산화제 능력의 감소와 함께 ROS 생성의 증가는 IBD의 만성적 염증성 큰창자점막에 상당한 산화적 스트레스를 유발한다는 것으로 추정된다.

생명체가 창조되었을 때 지구의 대기에는 산소가 없었기 때문에 원시유기체는 혐기성이었다. 진화의 과정에서 광합성을 할수 있는 남조류가 증식하였고, 광합성에 의해 얻어낸 에너지로 물분자를 쪼개고 이산화탄소를 탄수화물로 환원시키는 반응의 부산물로 산소가 생성되고, 현재 대기의 21%를 차지할 만큼 산소가 축적되어 온 것이다. 이 과정의 주요 문제점은 산소가 그 대사과정에서 유리 라디칼(free radicals)을 생성하여 생물에게 유해하다는 것이다. 생물들이 이런 장애를 극복하기 위해서 진화를 통하여 주로 두 가지 발전 과정을 거쳤는데, 어떤 생명체들은 산소없이 생존해 오늘날의 혐기성 세균의 조상으로, 나머지 생명체들은 항산화 방어체계를 발전시켜 산소를 견뎌내게 했던 것이다. 이 항산화제 방어 메커니즘은 산소-유리 라디칼에 의한 산화적 손상으로부터 자신들을 보호하려는 호기성 생물의 진화와 함께 발전해 왔다.

활성산소(reactive oxygen species: ROS)는 미토콘드리아 전자전달사슬(electron transport chains)을 통해 일어나는 산화에 의한 에너지의 생성과정 도중에 생성되는데, 이 전자전달사슬이 전자를 산소로 공급하여 ROS를 형성하기 때문이다. 호기성 대사에서 소비된 산소의 1-2%가 ROS를 생성한다고 추측되고 있으며, 호기성 생물에서 OH, O_2^-,

CHOSUN UNIVERSITY 1946

H_2O_2를 포함하는 특정 양의 ROS를 끊임없이 생성하게 된다. 매일 하나의 세포에 유입되는 산소분자는 10^{12} 개 정도인데, 100개 중 한 개는 DNA에 손상을 일으키고, 또한 100개중 한 개는 단백질에 손상을 일으킨다고 추정되고 있다(Acworth and Bailey, 1996; Papa and Skulachev, 1997). 사립체 호흡사슬의 말단 산화효소가 포화상태로 된 시점부터는 산소의 분압의 증가에 비례하여 ROS의 생성이 빠르게 증가한다(Boveris A and Chance, 1973). 세포의 항산화 기능이 ROS를 제거하는데, 해독할 수 있는 것 보다 더 많은 양의 ROS가 생성되면 산화성 스트레스(oxidative stress)가 생기는 것이다. 이와 같이 ROS생성의 출처는 사립체와 세포질그물(endoplasmic reticulum)에 있는 세포내 전자운반 사슬이다. 특정 병적인 조건(저산소증, 고압산소치료 등)에서 ROS 형성이 현저하게 증가하고. 또한 이온화나 자외선 방사능 등 유해자극, 산소로부터 과산화물을 만드는 전자들의 생성을 유발하는 생체내 특정 화학물질 등에 의해서도 만들어진다. 중요한 점은 염증반응으로 인한 백혈구, 활성화된 대식세포들로 부터 유리 라디칼이 방출된다는 것이다(Babior, 1978; Hussain et al, 2003). 특히, 자극된 대식세포나 호중구는 생체 내에서 강력한 ROS인peroynitrite(ONOO)를 생성하는 것으로 알려져 왔다(Marnett, 2000). 이러한 과정들이 DNA분자, 단백질, 정상 세포 기능수행에 필수적인 물질에 변화를 일으켜 발암(carcinogenesis)를 초래할 수 있다.

ROS에 의한 DNA의 산화는 모든 4개의 염기와 데옥시리보오스 분자에 손상을 일으킬 수 있다. ROS와의 상호작용에 의해 생성되는 DNA염기산물(DNA base products)과 변형된DNA분자는 매우 다양하고 방대한 양이다(Aust and Eveleigh, 1999; Cooke, Evans, 2003). 이 산화산물 중 가장 많은 것 중 하나는 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-OH-dG)인데, 쉽게 측정되기 때문에 실제적으로 산화적 스트레스의 생물학적 표지자로 이용되고 있다(Kasai et al, 1997; Fortin et al, 2003). 8-OH-dG는 포유류 세포에 돌연변이 유발 효과를 가지고 있어 발암성으로

간주되는데, 폐, 간암 등 다양한 암에서 p53유전자를 비롯한 다양한 암억제인자들에서 8-oH-dG에 의한 G-C가 T-A로 변환된 현상이 관찰되기 때문이다(Hollstein et al, 1996). 이러한 DNA 손상과 축적을 초래한는 ROS는 모든 생명체에서 지속적으로 생성된다. 정상적으로는 ROS에 유도된 것들을 포함한 모든 손상들은 수복되거나 세포죽음으로 유도되어 인체에 치명성을 가하지 못하게 예방이 이루어진다. 이러한 작용을 하는 생물체 내 계통을 DNA 수복 계통(DNA repair system)이라고 한다.

여러 가지 DNA 수복 경로가 존재하지만, 알기 쉽게 나누어 보면 다음과 같다,첫째, 잘못짝짓기 수복(mismatch repair; MMR)은 어떤 원인에 의해 잘못 짝지어진 DNA염기쌍을 수복시키는 역할을 수행하고 둘째, DNA염기절제 수복(DNA base excision repair BER)은 산화성 염기손상에 의한 단일DNA가닥 손상이나, 퓨린이 결손된 부위(apurinergic site: AP) 등의 복구를 담당하고(Mitra et al, 1997 2002) 셋째, 뉴크레오티드 절제수복(nucleotide excision repair NER)은 염기 사이의 교차 결합(cross-link) 같은 어떤 방대한 DNA 손상을 복구하며, 넷째, 재조합 수복(recombination repair)은 DNA 이중가닥 손상(double strands break: DSB)을 복구시킨다(Sunesen et al, 2002 Intanno et al, 2003; Skinner and Turker, 2005).

DNA 복구 유전자 중 하나인 MMR의 변화와 UC-관련 암의 연관성을 살펴보면, UC-관련 암과 이형성의 26%에서 *MSH2* 엑손13이 선천적으로 돌연변이 형질을 가지게(germline splice site substitution)된다(Brentnall, 1995). 이러한 다형태성(polymorphism)은 UC 음성 환자에서는 11%, 정상 환자에서는 9% 각각 나타나지만, 태어날 때 *MSH2* 변형이 있다 하더라도 UC-관련 암과 이형성의 발생과는 관계가 없다는 주장도 있다(Noffsinger et al, 1999). 또 다른 MMR인 *MLH1* 의 변형(haplotypes)과 UC는 관련이 있다고 알려졌는데(Pokornyet al, 1997). *MLH1* 프로모터 과메틸화(*MLH1*

promoter hypermethylation)와 MSH2발현 소실을 포함한 잘못짝짓기 복구 단백질의 유전적 변형은 UC-관련 병변에서는 심각한 수준의 미세부수체 불안정성(microsatellite instability: MSI)을 초래하여 심하면 종양 유발까지 해를 끼칠 수 있지만, 미미한 수준의 MSI는 잘못짝짓기 복구유전자 변형과 관계는 현재까지 정립되지 않고 있다(Cawkwell et al,2000; Fleisher et al, 2000).

하지만 염증성 창자질환의 발병 및 치유과정에 있어서 ROS에 의한 유전자 손상 중 DNA손상 복구에 대한 정확한 관련성은 여전히 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 실험적으로 창자염증을 초래한 흰쥐 큰창자에서 DNA 복구인자의 변화를 면역조직화학염색과 단백질 정량 방법으로 알아 보았다

CHOSUN UNIVERSITY 1946

II. 실험재료 및 방법

동물조직

본 실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley 계통의 흰쥐(6-8주)를 사용하였다. 실험적으로 창자 염증을 초래시키기 위하여 Dextran sulfate sodium (DSS, Sigma)를 음료수에서 타서(2% 또는 5%) 7일 간 투여하고 하였으며 이에 따라 날짜 별로 실험군을 선정하여 구분하였다(Cooper et al, 2000). DSS모델은 최근 화학적으로 잘룩창자염을 유발시키는 방법 중 가장 널리 쓰이는 방법으로, 더구나 잘룩창자염-관련 잘룩창자-곧창자 암 발생에도 많이 이용되는 방법이다. DSS는 합성된 황산염다당류 (sulfated polysaccharide)로 설치류에 잘룩창자염을 유발시키는데 임상적, 조직학적으로 사람 UC와 유사한 상황을 만들 수 있는 장점도 또한 갖추고 있다.

면역조직화학염색

(1) 동물조직의 절편제작 및 염색

실험동물을 ether로 깊게 마취시켜희생시킨 다음, 창자를 적출하여 paraformaldehyde으로 4℃에서 24시간 고정하였다. 냉동절편을 얻기 위해 조직을 30% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에서 탈수시켜 냉동에 따른 조직손상을 최소화하여 10-15 ㎛ 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 파라핀 조직 절편은 고정 후 통상의 ethanol 탈수, xylene투명 등을 거쳐 파라핀으로 포매 한 후 잘라서 슬라이드에 부착시켰다. PBS로 수 차례 세척하여 고정액을 제거하고, 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS를 실온에서 1시간, 1% bovine serum albumin(BSA)가 함유된 PBS를 실온에서 1시간 각각 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 실험에 사용된 1차 항체는 다음과 같다. 염증 초래 표지자인 Heat shock protein-70(HSP70), tumor necrotizing factor-α(TNF-α); 잘못 짝짓기 수복(mismatch repair; MMR) 인자로는 MSH2 항체 (1: 100, BD Bioscience, USA), MSH6 항체 (1:100, BD

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Bioscience, USA); DNA염기절제수복(DNA base excision repair BER) 인자로는 MTH1, AP endonuclease(APE), 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) (이상 모두 1:1,00, Santa Cruz biotechnology, USA) DNA이중가닥 손상수복(double strands break repair; DSBR) 인자로는 Ku70, Ku80, DNA-PKCs(이상 모두 1:1,00, Santa Cruz biotechnology, USA).

1차 항체를 4℃에서 24시간 반응시킨 후. PBS로 세척시킨 다음, 형광이 부착된 2차 항체(Alexa fluor, Molecular probes, USA)를 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 confocal microscopy로 조사하고 자료를 저장하였다. 대조군은 1차 항체들을 생략하고 2차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다.

(2)Western blotting

흰쥐 큰창자를 드라이아이스와isopentane이 혼합된 용액에서 급속히 냉각시킨 냉동상태로 보관시켜 다음 실험에 사용하였다. 조직 0.5mg을 300㎕ 용해 완충액 (lysis buffer; 20mM Hepes, pH 7.4, 2mM EGTA, 50mM-glycerol phosphate, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol(DTT), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10㎍/ml leupeptin, 10㎍/ml aprotinin, 1mM Na3VO4, and 5mM NaF)으로 30분 동안 용해시킨 후 균질화(Homogenization) 시켰다. Ultra-sonicator를이용해서 세포를 파괴시켜 원심분리시키고(18.000rpm, 4℃ 15min), 상층액을 재차 원심분리하였다(18,000rpm, 4℃ 10min). 5분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를Bio-Rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하였는데, 20㎍의 단백질을10% SDS polyacrylamide gels로 전기영동시킨 후 단백질들을Hybon ECL membranes(Amersham-Phamacia, Biotech)로 옮겨서염색을 하였다. 1차 항체는 면역조직화학염색에서 사용한 항체와 동일하게 사용하였다. 항체의 농도는 모두 1: 1000으로 사용하였다. 염색된

단백질을 enhanced chemiluminescence detect system(iNtRON, Biotech, Seoul, Korea)을 이용하여 특정 단백질의 발현 여부를 확인하였다

CHOSUN UNIVERSITY 1946

III. 결 과

본 실험에서 젊은 흰쥐의 큰창자를 대상으로 창자 염증 유발에 따른 DNA 수복인자들의 변화를 관찰하였다. 웨스턴블롯으로 단백질을 정량하고, 면역조직화학염색방법으로 현미경적 조직변화를 조사하였는데, 먼저 염증 표지자인 TNFα와 HSP 70(heat shock protein) 의 protein 양이 증가하여 본 실험에 사용된 조직이 염증상테가 초래 되었음을 알 수 있었다. DNA 손상을 나타내는 표지자로는 DNA 염기 G(구아닌)손상을 나타내는8-OHdG과 DNA 이중나선구조의 손상(double strands break)을 나타내는 γ-H2AX발현이 증가함을 확인하여 본 실험 방법이 최소한 DNA 손상을 초래함을 알 수 있었다.

Western blot과 면역조직염색의 결과가 공통으로 일치하는 소견은 8-OxoG을 복구시키는 Ref-1 과 OGG1, 잘못 짝짓기 복구 인자인 MSH2등은 증가하였고, DSB 복구인자인 Ku80은 감소하였던 결과이다.

(1) 큰창자 염증에 따른 흰쥐 큰창자 조직학적 변화

DSS 의 투여에 다른 흰쥐 큰창자에 염증이 유도되었는 지를 H/E 염색으로 확인한 결과, 점막 상피의 손상 및 소실, 보상성 세포의 수적 증가, 염증세포의 침윤, 등 염증 소견들을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

(2) 큰창자 염증에 따른 흰쥐 큰창자 염증표지자 TNFα와 HSP 70의 변화

DSS 의 투여에 다른 흰쥐 큰창자에 염증이 유도 되었는가를 재차 확인하기 위하여 염증 표지자인 TNFα와 HSP 70(heat shock protein)을 단백 정량을 실시한 결과 1일부터 증가하기 시작하여3일에 걸쳐 최고치를 보인 후 감소하였다(Fig.2).

CHOSUN UNIVERSITY 1946

(3) 큰창자 염증에 따른 흰쥐 큰창자 DNA 수복 인자들의 변화

A. 잘못 짝짓기 수복 (mismatch repair; MMR) 인자들의 변화

염증에 따른 큰창자의MMR 인자 MSH2의 염색 수준은 증가하였다(Fig. 2-3). MMR 인자들 중 MSH2단백질의 염색이 증가하였으며, MSH6의 변화는 거의 없었다. 창자 염증에 따른 MSH2 의 결과는 3일에서 7일까지 지속적으로 증가하는 뚜렷이 경향을 보였다(Fig. 2-3, Arrows). 이러한 MSH2 감소현상은 정량분석과 면역조직화학 염색에서 공통적으로 관찰되었다. MSH6결과는 MSH2단백질에 비해 정상대조군에서의 발현 수준도 낮았고, 실험군에서 차이도 크지 않았다. MSH2 면역조직화학적 소견상 면역반응이 핵과 세포질에서 잘 관찰되었지만 핵에서의 반응이 한층 뚜렷하였다.

B. DNA 염기절제수복(DNA base excision repair BER) 인자들의 변화

창자 염증에 의해 DNA 염기인 G(구아닌)손상을 나타내는 8-OxoG이 증가하였는데, 면역조직화학적으로 3일에 최고 수준으로 된 후 7일까지 감소하는 패턴을 보였다(Fig. 4A, Arrows). 따라서 이렇게 유도된 염기손상을 복구하는 단백질을 조사한 결과, Ref-1(APE)과 OGG1의 염색성이 증가함을 보였다(Fig 2, 4B). 특히 Ref-1의 소견은 염증 유도 1일 후부터 증가하기 시작하여 7일까지 지속적으로 증가하였다. 한편 OGG1은 염증 유도 3일 후부터 증가하기 시작하였다(Fig. 2). 이러한Ref-1(APE) 과 OGG1의 증가 현상은 단백질 정량 및 면역조직화학염색에서 공통적으로 관찰할 수 있었다. 염색성은 핵과 세포질에서 모두 증가함을 관찰할 수 있었다.

C. DNA이중가닥 손상수복(DSBR) 인자들의 변화

면역조직화학 염색 결과, DNA 이중나선구조의 손상(double strands break)을 나타내는 rH2AX발현이 1일부터 증가함을 확인한 다음(Fig. 5A),

DNA이중가닥 손상수복에 관여하는 DNA 재조합수복(Recombination repair: RR) 인자들의 변화를 조사하였다. Ku70은 거의 변화가 없었고, Ku80은 3일군과 7일군에서 모두 감소하였지만(Fig. 5C-D, Arrows), 이와는 다르게 DNAPKCs는 3일군에서 최고로 증가하였다가, 7일째 약간 감소 하는 경향을 보였다(Fig. 5B). 이들 3개의 복구 인자들의 단백질 정량은 매우 불안정하여 결과를 산출할 수 없었다. 이러한 창자 염증반응에 따른 RR의 인자들의 각각 다른 변화 양상은 DNA이중가닥 손상에 대한 복구과정이 아직 설명 되지는 않지만 여러 복잡한 과정을 거치는 것으로 추측된다.

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Ⅳ. 고 찰

궤양성 잘룩창자염의 발병 및 병리학적 원인

궤양성 잘룩창자염(Ulcerative colitis: UC)은 정확한 원인없이 발병하여, 잘룩창자 점막의 염증을 초래하는 질환이다. 미국을 포함한 서구에서 발병률이 높은 경향이 있으며, 호발 연령층은 청소년 후반에서 성인 초기, 특정 인종에서 발병률이 높은 것으로 보아 유전적 요인이 관여하는 것으로 알려져 있다(Odes et al, 1987).

UC 의 원인은 잘 알려져 있지 않지만, 여러 요인들이 염증의 시작, 염증의 파급 등에 연관되어 있는 것으로 추측되고 있다. 여기에 대한 2가지 주요 관점은 첫째, UC가 주변 환경으로부터 오는 자극들에 대한 비정상적인 반응이라는 것이고, 둘째, UC는 지속적인 감염 또는 큰 창자 정상세균(colonic microflora) 분포의 변화에 대한 정상적인 면역반응이라는 주장이다. UC는 2가지 가설이 단독적으로 병을 일으키기보다는 상호 작용하면서 발병할 것으로 추정된다. 잘룩창자 장벽(colonic barrier) 기능의 변화가 발병에 관련되어 있다는 주장은 정상 창자세균 분포 균형의 파괴, 또는 창자 감염성의 증가 환경에 따라 UC의 발병이 증가한다는 것이다 (Pullan et al, 1994). 따라서 점액분비의 감소, 점액구조의 변화, 렉틴결합능력의 변화들은 창자장벽 기능을 위협하게된다(Rhodes et al, 1989). 짧은고리 지방산 대사의 결함도 역시 창자장벽 기능과 상피세포 상태를 악화시킨다(Finnie et al, 1995). T_H2 사이토카인(T_H2 cytokines)의 증가, 상피세포의 자극에 의한 T_H 세포 활성화가 나타나며, T 세포수용체(T-cell receptor) *Tcr*유전자가 결핍된 동물과 염증유발 싸이토카인 *Il-2* 유전자를 제거한 동물에서 큰창자 염증을 초래하는 것으로 알려지고 있다(Sadlack et al, 1993; Mombaerts et al, 1993).

Tropomyosin 항체, 창자술잔세포에 대한 항체(anti-goblet cell serum antibodies), 혈관내피세포에 대한 항체, 핵주변 호중구 세포질에 대한 항체(perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody:pANCA)들의 잘룩창자 상피세포에 대한 작용 등이 UC 환자들에서 나타나는 것으로 밝혀졌지만, 여전히 면역체계이상에 의한 UC의 발병기전은 잘 알려져 있지 않다(Hibi et al, 1994). 연쇄상구균을 포함한 세균감염 또는 바이러스 감염(Ekbom et al, 1990; Tedder and Pounder, 1992), 또 창자 정상세균들의 숫자, 활성도, 분포도 등이 UC 발병에 관련되어있다(Fiocchi et al, 1998).

만성 UC는 잘룩-곧창자 암 발생위험도(risk of developing colorectal cancer) 증가, 약10배 정도와 관련이 있다(.Prior et al, 1982). 암발생 및 이형성(dysplasia) 위험도는 UC 발병 지속기간이 길어짐에 따라 더욱 기하급수적으로 증가하게 되므로, 10년 이상 장기 UC 환자는 암발생, 이형성에 대한 각별한 주의가 필요하다(Collins et al, 1987).

실험적 궤양성 잘룩창자염 모델

흰쥐에 덱스트란 황산염(DSS)를 투여하여 실험적으로 잘룩창자염(UC) 모델을 유도시켜 본 실험에서 관찰된 임상 양상은 기존의 방법에 의해 제시된 모델들과 유사한 소견이 관찰되었고, H/E염색을 통해 조직 변화 결과 역시 잘룩창자염 유도되었음을 검증 할 수 있었다. 즉 임상적으로는 혈변, 체중감소, 전신적인 건강상태 등의 저하 등이 관찰되었으며 점막 상피의 손상, 염증세포의 침윤 등 조직학적으로 염증이 유발된 소견들을 관찰할 수 있었다. 이렇게 창자장벽의 결함으로 인해 창자속 내용물과 창자상피세포와의 접촉 가능성 커지고, 표면점액 두께가 감소하는 것은 UC 병인과 관련이 깊은 것으로 보고 되고 있다(Pullan et al, 1994).

본 실험에서 사용한 방법 이외에도UC가 자연스럽게 발생하는 모델(Cotton-top tamarin)은 조직학적, 임상적으로 사람의 UC와 유사한

CHOSUN UNIVERSITY 1946

잘룩창자염을 갖는 동물모델이다(Warren and Watkins, 1994). 그러나 실제적으로 동물 이용도의 효율, 장기간 진행과정의 추적 등에는 적합치 못한 단점이 있다 UC 유전적 모델은 N-cadherin을 억제시킨 형질변형 생쥐(transgenic mice dominant negative for a mutant N-cadherin)는 크론씨 병을(Hermiston. and Gordon, 1995), 세포신호전달물질인 Ga_{i2} 이 결핍된 생쥐($Ga_{i2}^{-/-}$ mice)는 잘룩창자 염증과,잘룩창자-곧창자 선암을(Rudolph et al, 1995), HLA-B27형질변환 흰쥐는 UC 유사 질환과 잘룩창자-곧창자 선암을 각각 유발시킨다(Hammer et al, 1995). 그러나 잘룩창자염-관련 암발생을 연구하는데 있어서 이러한 모델들의 유효성에 대해서는 잘 알려져 있지 않아 앞으로 검증이 필요한 실정이다. 따라서 지금까지 DSS 모델은 최근에 화학적으로 잘룩창자염을 유발시키는 방법 중 가장 널리 쓰이는 방법으로, 잘룩창자염-관련 잘룩창자-곧창자 암 발생에도 많이 이용되는 방법이다. DSS는 함성된 황산염다당류 (sulfated polysaccharide)로 설치류에 잘룩창자염을 유발시키는데 임상적, 조직학적으로 사람 UC와 유사한 상황을 만들 수 있다. DSS모델은 창자내 정상세균 및 큰포식세포 활성도를 변화시킴을 통하여 급성과 만성 UC를 가능하게 한다(Ohkusa et al, 1995). DSS는 틈새세포(crypt cells)에 독성을 발휘하여, 만성적으로 그 세포들의 소실을 일으켜, 면역반응 시작을 유발하는 것으로 추측 되고 있다(Cooper et al, 1993). 흰쥐 등 설치류를 대상으로 장기간 DSS를 사료에 첨가하여 사육하면, 곧창자 점막에 편평상피성 이형성증(metaplasia), 편평상피 유두종양(papilloma), 선종(adenoma), 선암(adenocarcinoma) 등 다양한 병변이 초래된다(Tamaru et al, 1993; Cooper et al, 2000). 염증지수가 높을수록 이형성증 또는 암 발생빈도가 증가하였으며, 중등도 염증으로 유발시킨 이형성증 관련 병변 또는 종양(dysplasia-associated lesion or mass DALMs)은 잘룩창자염의 중함(severity)과 관련이 있었다. 주기적으로 DSS처치를 받은 상태에서는 azoxymethane (AOM)이라 불리우는 발암유발제의 효과를 높여 암시작을 촉진시킨다(Okayasu et al, 1996).

CHOSUN UNIVERSITY 1946

유전자손상 복구 유전자*Msh2*-결핍 생쥐(MIN+ phenotype)에 3-5차례 주기적DSS처치하면 선암과 이형성증이 더욱 용이하게 발병된다(Kohonen-Corish et al, 2002). 따라서 특수한 조직 상황에서 이러한 외적 스트레스가 가해지면, MIS가 더욱 쉽게 초래되고, 이에 따라 UC-관련암도 초래되므로 염증 관련 창자 암의 연구에 본 실험에서 이용한 DSS 동물 모델은 매우 유용할 것으로 사료된다

본 연구에서 시행된 급성기 염증 모델에서는 DSS 투여 1일째 손상 직후, 잘못 짝짓기 된 염기를 수복하는 MSH2의 변화는 정상 수준이거나 약간 증가된 것이 관찰되었으나 3일 5일 7일 시간이 진행 됨에 따라 증가하는 양상을 보였다, 본 실험에서 관찰한 다른 염기절단 수복 인자들(OGG1, Ref-1)의 증가가 같이 발생하였던 점을 감안하더라도 MSH2의 급성 증가는 염증성 창자 질환의 초기 병인에 밀접한 관련이 있을 수 있다는 것을 추측케 한다. 특히 이중나선구조 손상을 수복 하는 Ku80의 감소는 이들 염증 반응과 이에 따른 질환 발병에 밀접한 관계가 있는 것으로 추정된다. 이러한 변화가 장기간 지속되는 상태에서 잘룩창자암의 발현이 나타난다면 염증성 질환에서의 암발생에 관계한다는 것을 증명할 수 있을 것으로 예견된다. 특히 MMR 기능을 수행하는MSH2 경우 본 실험에서는 어린 쥐를 이용하여 실험한 결과 증가되었지만, 성인 쥐나 늙은 쥐에서는 반대의 결과를 초래한 것(미공개 자료)으로 보아, 발병시기에 따른 DNA 복구능력의 변화도 질환 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

본 실험에서 또한 tumor necrotic factor (TNF)-α와 열손상단백질(HSP 70)의 증가를 관찰하였는데, 이는 UC에서 염증이 초래되었다는 발병과정의 확인 뿐만 아니라, 장기적으로 보아 이로 인해 발생하는 대장암에서 항산화 방어계통의 손상이 관련되어 있다는 보고(Korenaga et al, 2002)와 유사하였다. 본 실험의 결과는, 간접적으로 알 수 있었던 산화 손상에 대한 이들의 주장에 조직학적 근거가 될 수 있을 것으로 생각된다.

점막 세포의 산화적 손상 및 DNA의 손상은 DSS투여로 인해 증가된 잘룩창자 점막세포들의 죽음(apoptosis of colonic epithelial cell) 와도 관련이 있을 것으로 생각된다(Vetuschi et al, 2002). 점막세포죽음은 잘룩창자점막의 탈락을 유발하고, 혈변이 임상양상으로 나타나며, 체중감소 또한 유발된다고 "M수 있다. 수분 흡수 기능을 수행하는 큰창자 점막이 절대적으로 감소하기 때문에 설사가 발생하고 한편, 손상 받은 점막을 통해 인한 수분 소실 또한 증가하여 이들은 결국 탈수인한 초기 체중감소를 나타나는 것으로 생각된다.

본 실험에서 관찰된 임상 양상을 살펴보면 투여 5일째 대부분의 경우에서 처음으로 혈변과 체중감소가 관찰되었고, 투여 7일이후에는 대부분 사망하여 더 이상의 추적 조사는 불가능하였다. 하지만 이를 면역조직화학염색과 Western Blotting을 통해 알아본 결과 혈변이나 체중감소가 나타나기 이전인 투여 후 3일째부터 이미 조직학적인 산화적 손상은 8-OHdG의 관찰됨으로 증명되었다.

산화성 스트레스와 창자점막 세포의 손상

산화성 스트레스와 산화성 세포손상은 UC발병원인 및 UC관련 진행과정에 중요한 역할을 하는 것으로 믿고있다. UC환자의 잘룩창자에서 포식작용을 하는 백혈구의 활성도가 매우 증가하고, 산화물질 전구형태의 발생이 증가한다(Schreiber et al, 1991; Grisham, 1994). UC에서는 과도한 염증 때문에 항산화 방어작용이 결핍되게 된다(Holmes et al, 1998). 사람UC조직생검과 큰장자 절제술 표본들에 의하면 UC의 발병에 반응성 산소와 반응성 질소(reactive oxygen and nitrogen species RONS) 가 관련되어 있다고 밝혀지고 있다(Lih-Brody et al, 1996; McKenzie et al, 1996). 본 실험에서는 조사하지 못하였지만 질소(NO)의 역할에 대한 대단한 관심이 집중되고 있다. NOS 활성도를 반영하는 혈청 nitrite 활성도가 UC 환자에서 증가되고, UC 생검조직에서도 nitrite 수준과 NOS 활성도가 증가하였다(Rachmilewitz et al, 1995). 산화성스트레스에 의한

세포손상은 사람뿐만 아니라 동물모델에서도 UC-관련암발생에 관여되는 것으로 여겨지는 많은 요인들(유전자 변형, 유전자 불안정성, 비정상적인 메틸화)의 발병기전 밑바탕을 제공하고 있다. RONS는 DNA 염기를 변형시키고, 이들 병변을 제거하지 못하게 하여 염기가 다른 것으로 대치되거나, 염기결손, 염기삽입 등을 초래하게된다(Wang et al, 1998; Marnett, 2000). RONS는 세포실험에서 반복적 DNA에 변화를 유도하여 염증성 잘룩창자 점막에 MIN 이 발생하게 한다. 인간조직에서 가장 흔하게 발생되는 산화성 부산물(oxidized adduct)은 8-OHdG으로 주로 G가 T 로 바뀌지는 변이 형태이다(Wang et al, 1998). 이러한 염기 변화는 흔하게 돌연변이가 초래된 종양발생과정과 종양억제유전자에서 각각 발견되는 것은 흥미로운 사실이다(Hussain and Harris, 1998). 따라서 본 실험에서 급성 염증 초기에 증가된 8-OHdG 은 이런 주장들과 일치하는 것으로 사료된다. NO 또한 DNA 복구 단백질(DNA repair proteins)의 기능을 억제하고, DNA병변 제거능력을 약화시킨다(Wink et al, 1998). UC환자의 염증성 점막과 암 표본에서 *p53* 돌연변이는 주로 산화성 염기 변형에 의한 염기전위 때문에 생겨난다(Hussain and Harris, 1998). 다른 암관련 유전자도 만성UC상태에서 RONS 작용에 의해 영향을 받는 것으로 추정된다.

RONS-매개성 DNA 손상과 telomere 손상은 UC-관련암의 진행 과정 중 유전자 불안정성이 초기에 나타난 다는 것을 의미한다. hydroxyl radical은 DNA 염기로부터 수소를 빼앗고, 염기를 첨가하고, 퓨린결손 부위와 피리미딘결손 부위(apurinic and apyrimidic sites)로 유도하여, 당의 분절화에 의하여 이중사슬이 깨지게 된다(Wang et al, 1998). 산화성 손상은 또한 DNA이중사슬을 손상시킬 수 있다(Kehrer, 1993). 이러한 DNA 손상들이 부적절한 재조합으로 복구되면 돌연변이와 DNA재배열을 초래하고, 복구할 수 없는 손상은 염색체 파괴, 분절화, 전좌(translocation)가 발생하고. telomere 짧아짐은 이형성에서 암으로

CHOSUN UNIVERSITY 1946

진행될수록 점차 심해지고, DNA전좌, 결손, 증폭 등을 초래하게 된다(Kinouchi et al, 1998; Artandi et al, 2000). 산화성 손상은 *p16*를 포함한 종양억제유전자의 메틸화과다현상(hypermethylation) 을 초래하지만(Issa et al, 2001), 근본적 기전은 잘 알려져 있지 않다 따라서 본 실험에서 감소하거나 증가한 MMR 과 BER 관련 수복 단백질들의 변화는 이들 산화성 손상을 발병 원인과 관련이 있을 것으로 보이며, 이들의 복구 능력의 회복이 또한 질병의 발생 시기를 늦추거나 방지 할 수 있을 것으로 사료된다

창자점막의 손상과 암발생과의 관계

세포의 유전자의 변화, 염색체 불안전성, 미세부수체불안정성

암발병 과정은 분자 수준의 변화에 따른 조직 수준의 변화가 초래되는 다단계 과정이라는 이론이 많은 연구들에 의해 다양한 암에서 제시되었다(Sato et al, 1990; Presti et al, 1991). 유사하게 UC-관련 암은 종양억제 유전자(tumor suppressor genes), 종양발생 유전자(oncogenes), DNA 수복 단백질을 부호화하는 유전자(genes encoding DNA repair proteins)들의 변화뿐만 아니라, 전반적인 유전자 안정성의 소실 등이 축적된 결과로 여겨진다,

UC 생검조직을 포함 검체를 조사한 결과 조직학적으로 정상에서 염증, 퇴행성 상피, 이형성, 암 등으로 진행됨에 따라 염색체 비정상 정도도 증가함을 밝혀내었다. UC 환자 잘룩창자에서 이수성을 나타내는 부위들은 빈번하게 이형성과 관련되거나, 명백한 조직학적 변화가 진행된 상태였고 이수성 조직검체들은 UC 10년 이상 앓고 있는 고위험 환자에서, 저위험 환자에 비해, 더욱 빈번하게 관찰되었다(Rubin et al, 1992). 따라서 본 실험과 다른 보고들에서 보여준 산화성 손상에 따른 급성 및 만성 염증은 DNA손상을 초래하여 비정상적이 창자점막 유전자를 생기게 할 가능성이 높은 것으로 추정된다

CHOSUN UNIVERSITY 1946

염색체 불안정성은(chromosomal instability)은 염색체 이수성과 다양한 염색체 수준의 변화, 즉 유전자의 결여(deletions), 증폭(amplifications), 전위(translocations)를 일으킨다. 염색체 불안정성은 UC-관련 암에서 가장 빈번하게 발생하는 게놈 불안정성 형태이다(Willenbucher et al, 1999). 이들 암과 이형성 조직뿐만 아니라 비이형성 상피(non-dysplastic)에서도 모두 염색체 변이인 단수체(monosomies), 복수체(polysomies), 염색체 소실, 과다 등이 나타났다, 이러한 결과들을 통하여 염색체 불안정성은 UC-관련 암의 진행에 있어서 비교적 초기에 발생하고, 전반적인 염색체 이수성을 유도하여 결국에는 이형성을 초래하는 것으로 생각된다.

미세부수체 불안정성(microsatellite instability: MSI)은 2-4쌍의 염기(2-4bp)로 구성된 미세부수체의 크기가 통상적으로는 사람마다 다르지만 모든 조직에서 동일하게 일생 동안 변하지 않고 반복적인 DNA 고리를 충실하게 복제를 수행하지만, 미세부수체 불안정성에서는 미세부수체의 크기가 일생 동안 계속 변하게 된다. 즉 게놈의 DNA 복제 충실도의 전반적인 결핍이 특징적으로 나타나게 된다. MSI의 빈도는 UC-관련 암 8-21%, 이형성의 13-19%로 보고되었지만, MIS는 또한 재생 상피와 염증 상피에서도 나타난다 (Noffsinger et al, 1999; Cawkwell et al, 2000),

이형성 조직에 비교하여 볼 때 염증조직들의 MIS 빈도가 이형성이 없는 조직에서 비교적 높게 나타나는데, 따라서 MIS가 산화성 스트레스인 만성 염증과 관련이 있는 것으로 추정되지만, UC-관련 병변의 대부분은 염색체 불안정성과 염색체 이수성과 관련된 경로를 통하여 나타나게 된다. UC-관련암과 이형성에서 종양억제유전자의 변화는 *p53* 유전자(Chaubert et al, 1994). 망막아세포 유전자(retinoblastoma gene: *Rb*)(Greenwald et al, 1992), 잘룩창자 선양폴립증 유전자(adenomatous polyposis coli gene : *APC*) (Kern et al, 1994; Redston et al, 1995), *K-ras*

CHOSUN UNIVERSITY 1946

종양유전자(Chaubert et al, 1994; Kern et al, 1994; Redston et al, 1995) 등에서 관찰된다. ,

ROS에 의한 DNA의 산화는 모든 4개의 염기와 데옥시리보오스 분자에 DNA염기산물(DNA base products)과 변형된DNA분자 등을 일으킬 수 있다. 8-OH-dG는 포유류 세포에 돌연변이 유발 효과를 가지고 있어 발암성으로 간주되는데, 폐, 간암 등 다양한 암에서 p53유전자를 비롯한 다양한 암억제인자들에서 8-oH-dG에 의한 GC가 TA로 변환된 현상이 관찰되기 때문이다(Hollstein et al, 1996). 암에서 8-OH-dG의 발생빈도의 증가가 주요한 원인임이 증명되지 못했음에도 불구하고, 산화적 DNA 손상의 돌연변이 유발효과가 암의 발생과 관련된 가장 가능성이 있는 요소로 여겨지게 하고 있다. 8-OH-dG의 복구 기능을 가진 효소 중 가장 중요한 것은hOgg1인데 (Sunaga et al, 2001). DNA 당화효소/AP 분해효소(DNA glycosylase/AP-lyase)로 작용하여 사이토신의 반대편 8-OH-dG을 선택적으로 제거하는 역할을 한다(Russo et al, 2004; Mambo et al, 2005). Ogg1이 결핍된 생쥐(Ogg1-deficient mice)의 DNA에서 8-OH-dG가 축적되고, 나아가 폐암을 유발시키며, 다른 DNA 글리코실라아제로 DNA염기절단복구 기능이 있는 MutY(excision repair gene MutY: MYH)의 이상은 선암 발병이 쉬운 표현형을 유발시킨다는 사실이 관찰되었다(Croitoru et al 2005). MYH 는 8-OH-dG와 잘못 짝지어진DNA로부터 아데닌을 제거한다. 실제로 Ogg1/ MYH 이중결핍 MEFs는 산화제에 더욱 민감하다(Xie et al, 2008). 두 효소는 8-OH-dG에 의해 G:C가 T:A로 전환하는 것을 억제하는 역할을 한다(Yamane et al, 2003). 따라서 본 실험에서 나타난 창자 염증 모델에서의 8-OH-dG의 면역조직화학적 증가 소견, 그리고 이를 제거하기 위한 Ogg1과 Ref-1단백질의 증가 소견은 급성 즉 염증 초기에는 DNA 염기 손상을 수복시키는 생체내 방어 작용이 알어난다는 것을 의미한다. 하지만 이런 상황이 만성적으로 변하였을 때에는 여러 공격 요소들이 함께 손상을

CHOSUN UNIVERSITY 1946

초래하게 되어 수복 작용이 감소되거나 소멸되게 되는 것으로 추측된다. 따라서 향후 장기간 실험을 진행하여 이러한 UC 병인과 관련성이 높은 DNA 수복 단백질들의 변화를 추적해야 할 과제라고 사료된다.

CHOSUN UNIVERSITY 1946

V. 결 론

우리나라에서는 드물고 서양에 흔한 질환으로 알려졌던 궤양성 잘룩창자염은 최근 꾸준히 증가하고 있으나, 아직까지 그에 대한 연구가 미미한 실정이었다. 따라서 실험적으로 창자 염증을 유발시킨 동물모델을 통한 궤양성 잘룩창자염을 연구하고자 본 연구에서는 생후 28일된 어린 흰쥐에 2% DSS를 7일간 투여하여 큰창자 염증 모델을 정립한 후, 조직학적 변화, 큰장자 점막 염증 유발 효과, DNA 수복 인자들의 변화를 관찰하였다. 조직학적으로 흰쥐 큰창자 점막층의 소실과 그 대신 정상 세포 형태와는 다른 세포가 증가하였고, 면역조직화학염색으로 확인한 결과 염증반응을 의미하는 HSP 70, TNF-α 등이 증가한 소견을 바탕으로 염증 유도가 이루어졌음을 재차 확인하였다. DNA 손상을 의미하는 8-OHdG, γ-H2AX가 증가함을 나타냈으며, 이들은 투여 1일째부터 양성 반응이 증가함을 나타내 임상 증상의 발현에 앞서 이미 손상받고 있음이 관찰되었다. Western blotting과 면역조직화학염색을 사용하여 단백질 정량과 분포 상황을 알아본 결과 DSS의 투여에 따라 과 Ku80 은 감소되었고, 반면 MSH2, Ref-1, OGG1, DNAPKCs 등은 증가되는 소견을 보였다. 이러한 결과는 DSS에 의해 흰쥐의 큰창자 점막층에 산화적 손상을 주게 되면, DNA의 손상이 발생하고, 생체 내에서 이를 복구하려는 반응이 일어나는데, 단백질 발현이 증가되는 경우도 있지만, 변화가 없거나, 감소하는 반응이 나타나는 등 다양한 생체 반응이 나타나는 것으로 확인되었다. 앞으로 이러한 손상 복구의 기전이 반복적으로 일러나는 만성적인 모델을 통하여 궤양성 큰창자염의 발병 및 암으로의 진행에 대한 조사가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

CHOSUN UNIVERSITY 1946

References

Acworth IN and Bailey B, The Handbook of Oxidative Metabolism, ESA Inc, Chelmsford, MA, 1996.

Artandi SE and Depinho RA, A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 39–46, 2000

Aust AE and Eveleigh JF, Mechanisms of DNA oxidation, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:246–252, 1999

Babior BM, Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts), *N. Engl. J. Med.* 298: pp. 659–668, 1978

Boveris A and Chance B, The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen, *Biochem. J.* 134:707–716, 1973

BrentnallTA, Rubin CE, Crispin DA *et al*, A germline substitution in the human MSH2 gene is associated with high-grade dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 109: 151–155, 1995

Buffinton GD and. Doe WF, Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease, *Free Radical Biol. Med.* 19: 911–918, 1995

Campregher C, Luciani MG.and Gasche C, Activated neutrophils induce an hMSH2-dependent G2/M checkpoint arrest and replication errors at a (CA)13-repeat in colon epithelial cells, *GUT* 57:780–787, 2008

Cawkwell L, Sutherland F, Murgatroyd H, Jarvis P, Gray S, Cross D, Shepherd N, Day D and Quirke P, Defective hMSH2/hMLH1 protein expression is seen infrequently in ulcerative colitis associated colorectal cancers, *Gut.* 46: 367–369, 2000

Chaubert P, Benhattar J, Saraga E and Costa J,K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am. J. Pathol.* 144: 767–775, 1994

Collins RHJr, Feldman M and Fordtran JS, Colon cancer, dysplasia and surveillance in patientswith ulcerative colitis. A critical review. *N. Engl. J. Med.* 316: 1654–1658, 1987

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M and. Lunec J, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB J.* 17:1195–1214, 2003

Cooper HS, Murthy SN, Shah,RS and Sedergran DJ, Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69: 238–249, 1993

Cooper HS, Murthy S, Kido K, Yoshitake H and Flanigan A,Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation. *Carcinogenesis* 21: 757–768, 2000

Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola M, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, CotterchioM, Knight J,. Gryfe R and Gallinger S, Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.* 96: 1631–1634, 2005

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Ekbom A, Adami H-O, Helmick CG, Jonzon A and Zack MM,Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 132 1111–1119, 1990

Finnie IA, Dwarakanath AD, Taylor BA and RhodesJM, Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* 36: 93–99, 1995

Fiocchi C, Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology 115: 182–205, 1998

Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N et al, Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. Cancer Res. 60: 4864–4868, 2000

Fortini P, Pascucci B, Parlanti E, D'Errico M, Simonelli V and Dogliotti E, 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways, Mutat. Res. 531: 127–139, 2003

GreenwaldBD, Harpaz N, Yin J, Huang Y, Tong Y, Brown VL, McDaniel T, Newkirk C, Resau JH and Meltzer SJ, Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer Res.* 52: 741–745, 1992

Grisham MB, Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease, *The Lancet* 344: 859–861, 1994

Hanauer SB, Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities, *Inflamm. Bowel Dis.* 12 (Suppl. 19): S3–S9, 2006

Hammer RE, Richardson JA, Simmons WA, White AL, Breban M and Taurog JD, High prevalence of colorectal cancer in HLA-B27 transgenic F344 rats with chronic inflammatory bowel disease. *J. Invest. Med.* 43: 262–268, 1995

Head KA and Jurenka JS, Inflammatory bowel disease part I: ulcerative colitis – pathophysiology and conventional and alternative treatment options, *Altern. Med. Rev.* 8:247–283, 2003

HermistonML and Gordon JI, Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 270: 1203–1237, 1995

Hibi T, Chara M, Kobayashi K *et al,* Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation studies on anti-goblet cell antibody using a mucin producing cell line in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 35: 224–230, 1994

Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E,. Montesano R and Harris CC, Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation, *Nucleic Acids Res.* 24:141–146, 1996

Holmes EW, Yong SL, Eiznhamer D and Keshavarzian A, Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* 43: 1088–1095, 1998

Hussain SP and Harris CC, Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 58: 4023–4037, 1998

Hussain SP, Hofseth LJ and Harris CC, Radical causes of cancer, *Nat. Rev. Cancer* 3:276–285, 2003

Intano GW, Cho EJ, McMahan CA, Walter CA, Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 58(3):205-11, 2003

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Issa J-P, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP and Brentnall TA, Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 61: 3573–3577, 2001

Kasai H, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutat. Res.* 387: 147–163, 1997

Kehrer JP, Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 21–48, 1993

Kern SE, RedstonM, Seymour AB, Caldas C, Powell SM, Kornacki S and Kinzler KW, Molecular genetic profiles of colitis-associated neoplasms. *Gastroenterology,* 107, 420–428, 1994

Keshavarzian A., Sedghi S .and Kanofsky J . *et al.*, Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe, *Gastroenterology* 103:177–185,1992

Kinouchi Y, Hiwatashi N, Chida M, Nagashima F, Takagi S, Maekawa H and Toyota T, Telomere shortening in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *J. Gastroenterol.* 33: 343–348, 1998

Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, te Riele H, Buffinton GD and Dahlstrom JE, Susceptibility of Msh2-deficient mice to inflammation-associated colorectal tumors. *Cancer Res.* 62: 2092–2097, 2002

Korenaga D, Takesue F, Kido K, Yasuda M, Inutsuka S, Honda M, Nagahama S,Impaired antioxidant defense system of colonic tissue and cancer development in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. The journal of surgical research 102: 144-149, 2002

Koutroubakis IE, Malliaraki N, Dimoulios PD, Karmiris K, Castanas E and Kouroumalis EA, Decreased total and corrected antioxidant capacity in patients with inflammatory bowel disease, *Dig. Dis. Sci.* 49:1433–1437, 2004

Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E,. Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE and. Mullin GE, Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease, *Dig. Dis. Sci.* 41:2078–2086, 1996

Mambo E, Chatterjee A,. de Souza-Pinto NC, Mayard S, Hogue BA, Hogue MO, Dizdaroglu M,. Bohr VA and Sidransky D, Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer, *Oncogene* 24:4496–4508, 2005

Marnett LJ, Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 21: 361–370, 2000

Mitra S, Hazra TK, Roy R, Ikeda S, Biswas T, Lock J, Boldogh I, Izumi T, Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. Mol Cells. 7: 305–312, 1997.

McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD and Doe WF, Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* 98: 136–141, 1996

Mitra S, Izumi T, Boldogh I, Bhakat KK, Hill JW, Hazra TK,Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes. Free Radic Biol Med. 33: 15–28, 2002

MombaertsP, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK and Tonegawa S, Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 75: 274–282, 1993

Noffsinger AE, Belli JM, Fogt F, Fischer J, Goldman H and Fenoglio-Preiser CM, A germline hMSH2 alteration is unrelated to colonic microsatellite instability in patients with ulcerative colitis.

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Hum. Pathol. 30: 8–12, 1999
Odes HS, Fraser D and Krawiec J, Ulcerative colitis in the Jewish population of southern Israel 1961–1985: epidemiological and clinical study. Gut. 28: 1630–1636, 1987
Ohkusa T, Okayasu I, Tokoi S, Araki A and Ozaki Y, Changes in bacterial phagocytosis of macrophages in experimental ulcerative colitis. Digestion. 56: 159–164, 1995
Okayasu I, Ohkusa T, Kajiura K, Kanno J and Sakamoto S, Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut.* 39: 87–92, 1996
Oshitani N. Kitano A, Okabe H. Nakamura S, Matsumoto T and Kobayashi K, Location of superoxide anion generation in human colonic mucosa obtained by biopsy, *Gut.* 34:936–938, 1993
Papa S and Skulachev, VP, Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging, *Mol. Cell. Biochem.* 174:305–319, 1997
Podolsky DK, Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut.* 36: 718–723, 1995
Pokorny RM, Hofmeister A, Galandiuk S, Dietz AB, Cohen ND and NeibergsHL, Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with the DNA repair gene MLH1. *Ann. Surg.* 225: 718–725, 1997
Presti JJC, Reuter VE, Galan T, Fair WR and Cordon-Cardo C, Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res.* 51: 5405–5409, 1991
Prior P, Gyde SN, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA and Allan RN, Cancer morbidity in ulcerative colitis. *Gut.* 23: 490–497, 1982
Pullan RD., Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A and Rhodes J, Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35: 353–359, 1994
Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z and Podolsky DK, Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 36: 718–723, 1995
Redston MS, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler KW and Kern SE, Common occurrence of APC and K-ras gene mutations in the spectrum of colitis-associated neoplasias. *Gastroenterology* 108: 383–392, 1995
Rhodes J, Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 35: 353–359, 1994
Rhodes JM, Colonic mucus and mucosal glycoproteins: the key to colitis and cancer?, *Gut* 30:1660–1666, 1989
Rubin,C.E., Haggitt,R.C., Burmer,G.C., Brentnall,T.A., Stevens,A.C., Levine,D.S., Dean,P.J., Kimmey,M., Perera,D.R. and Rabinovitch PS, DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 103, 1611–1620, 1992
Rudolph U, Finegold M, Rich SS, Harriman GR, Russo MT, De Luca G, Degan P, Parlanti E, Dogliotti E, Barnes DE, Lindahl T, Yang H,Miller JH and Bignami M., Accumulation of the oxidative

CHOSUN UNIVERSITY 1946

base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases, *Cancer Res.* 64:4411–4414, 2004

Ruttler MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Klamm MA, Williams, OB Price AB, Talbot IC and. Forbes A, Thirty-year analysis of colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis, *Gastroenterology.* 130: 1030–1038,2006

Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC and Horak I, Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene, *Cell.* 75: 253–261, 1993

Sato T, TanigamiA, Yamakawa K, Akiyama F, Kasumi F, Sakamoto G and Nakamura Y, Allelotype of breast cancer: cumulative allele losses promote tumor progression in primary breast cancer, *Cancer Res.* 50: 7184–7189, 1990

SchreiberS, Macdermott RP, Raedler A, Pinnau R, BertovichMJ and Nash GS, Increased activation of isolated intestinal lamina propria mononuclear cells in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 101: 1020–1030, 1991

Simmonds NJ, Allen RE and Stevens TRJ *et al*, Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease, *Gastroneterology* 103:186–196, 1992

Skinner AM, TurkerMS: Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging. Sci Aging Knowledge Environ. (9): re3, 2005

Srinivasan,Y, Brabet P, Boulay G, Bradley A and Bimbaumer L, Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nature Genet.* 10: 143–150, 1995

Sunaga N, Khono T., Shinmura K, Saitoh T, Matsuda T, Saito R and Yokota J, OGG1 protein suppresses G:C? T:A mutation in a shuttle vector containing 8-hydroxyguanine in human cells, *Carcinogenesis* 22:1355–1362, 2001

Sunesen M, Stevnsner T, Brosh Jr RM, Dianov GL, Bohr VA.: Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. Oncogene 21: 3571–3578, 2002

Tamaru T, Kobayashi H, Kishimoto S, KajiyamaG, ShimamotoF, and Brown WR,Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis of rats, *Dig. Dis. Sci.* 38: 529–537, 1993

Tedder RS. and Pounder RE, Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction, *J. Med. Virol.* 38: 183–190, 1992

Vetuschi A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E. (2002). Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium -induced colitis in rats. Dig Dis Sci. 47, 1447-1457.

Warren BF and Watkins PE,Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 172: 313–316, 1994

Willenbucher RF, Aust DE, Chang CG, Zelman SJ, Ferrell LD, Moore DH and Waldman FM, Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative colitis-related neoplasia, *Am. J. Pathol.* 154: 1825–1830, 1999

Wink DA, Vodovotz Y, Lava IJ, Laval F, Dewhirst MW and Mitchell JB, The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. *Carcinogenesis*, 19: 711–721, 1998

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Xie Y, Yang H, Miller JH, Shih DM, Hicks GG, Xie J and Shiu RP, Cells deficient in oxidative DNA damage repair genes Myh and Ogg1 are sensitive to oxidants with increased G2/M arrest and multinucleation, *Carcinogenesis*, 722–728, 2008

Yamane A, Shinmura K, Sunaga N, Saitoh T, Yamaguchi S, Shinmura Y, Yoshimura K, Murakami H, Nojima Y, Kohno T and Yokota J, Suppressive activities of OGG1 and MYH proteins against G:C to T:A mutations caused by 8-hydroxyguanine but not by benzo(*a*)pyrene diol epoxide in human cells in vivo, *Carcinogenesis* 24:1031–1037, 2003

CHOSUN UNIVERSITY 1946

Legends for Figures

Fig. 1. Hematoxylin and Eosin stain of DSS-treated colonic mucosa of the control, 1day(1D), and 7days(7D).

Fig. 2Western blot analysis for the HSP 70, TNF-α, MSH2, Ref-1 and OGG1. Induction of inflammation was confirmed by protein expression for the HSP 70 and TNF-α. The level DNA repair proteins MSH2 was decreased, but Ref-1 and OGG1 were increased.

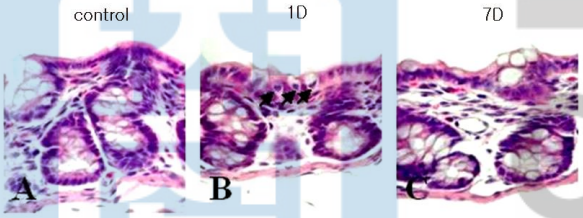
Fig. 3.Immunolabelling of MSH2

Fig. 4.Immunolabelling of 8-oxoG(A) and Ref-1(B).

Fig. 5.Immunolabelling of γ-H2AX(A), DNAKPCs(B), Ku70(C) and Ku80(D).

CHOSUN UNIVERSITY 1946
조선대학교 CHOSUN U

Fig. 1



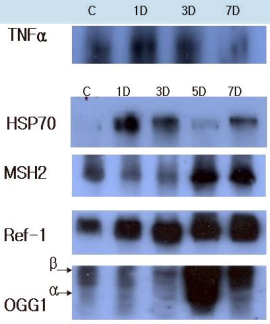


Fig. 2

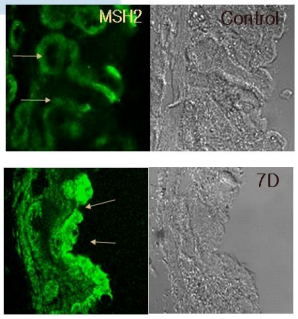


Fig. 3

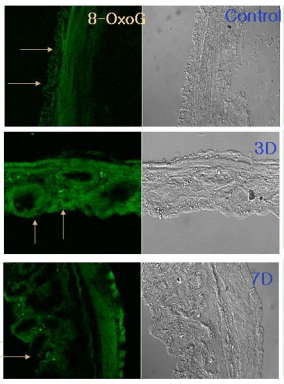


Fig. 4A

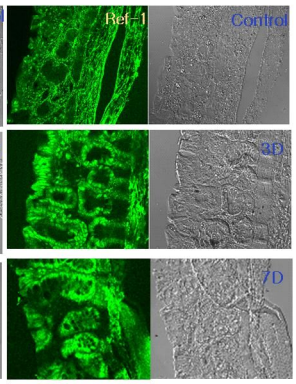


Fig. 4B

CHOSUN
UNIVERSITY
1946

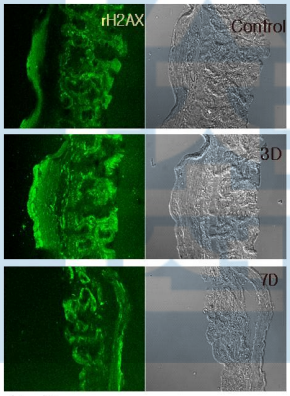


Fig. 5A

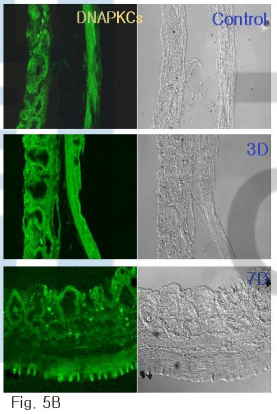


Fig. 5B

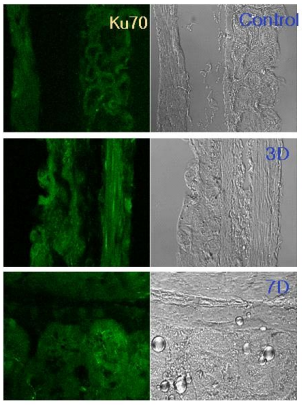


Fig. 5C

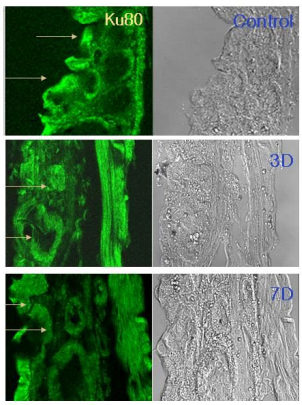


Fig. 5D

CHOSUN UNIVERSITY 1946
조선대학교 CHOSUN U

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20057462	과 정	박사
성 명	한글:하현철 한문 :河 賢哲 영문 :Hyeon-Cheol Ha				
주 소	서울 서초구 우면동 동양고속 아파트 104-403				
연락처	010-7277-2020		E-MAIL	joymann@nate.com	
논문제목	한글 : **염증성 창자질환에서의 유전자 손상복구 반응**				
	영어 : **DNA Repair Response in the Inflammatory Bowel disease**				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제,기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함.
다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O)반대()

2008년 12월 29 일

저작자: 하 현철 (인)

조선대학교 총장 귀하