



KR9800543

KAERI/RR-1797/97

원자력 기반 연구

방사선에 의한 유전자손상 방어기술연구

Protection of DNA Strand Breakage by Radiation Exposure

1997. 12.

ㄷ

한국원자력연구소

29 - 41

제 출 문

소 장 귀하

본 보고서를 기간고유사업 “원자력기반연구” 과제의(단위과제: “방사선에 의한 유전자손상 방어기술연구”) 연차보고서로 제출합니다.

1997 년 12월 31일

과제책임자 : 이 정 호

연 구 원 : 김 인 규

연 구 원 : 이 강 석

연 구 원 : 김 국 찬

연 구 원 : 심 해 원

요 약 문

I. 제목 : 방사선에 의한 유전자 손상방어기술연구

II. 연구의 목적 및 중요성

점진적 증가추세에 있는 방사선 및 RI의 산업적, 의학적 이용에 따라 방사선 장애가 불가피하게 되었다. 이러한 방사선에 의해 나타나는 손상 또는 장애를 줄일 수 있는 기반기술을 확립하여 인적손실을 보전함에 연구의 목적을 두고 있다.

III. 연구의 내용 및 범위

방사선과 환경오염 독성물질에 대한 생화학적 특성중의 하나가 DNA의 단일 및 이중가닥의 손상이다. Hydroxyl radical의 발생원으로 dithiothreitol /FeCl₃(DF) system을 사용하였으며 agarose gel 전기영동방법과 image analyzer로 DNA 손상을 검출했다. 제 2차년도 방사선에 의한 DNA 손상 최소화 기술연구는 다음과 같이 수행되었다.

- 1) 정상인 혈청으로부터 ceruloplasmin의 분리 및 정제
- 2) 정제된 사람 ceruloplasmin(hydroxyl radical 제거물질)에 의한 DNA 단일 가닥 손상 방어
- 3) 폴리아민에 의한 DNA 단일 가닥 손상 방어

- 4) 폴리아민 결손 돌연변이 대장균과 대조균에 방사선 조사 후의 세포 생존율 조사

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

구리이온을 함유하고 있는 혈청 단백질인 ceruloplasmin은 철 대사에 필수 불가결한 역할을 한다고 사료되는데, 그 외에 항산화 특성을 갖고 있다. Ceruloplasmin은 hydroxyl radical의 생성 및 지질의 과산화를 방지할 뿐만 아니라, dithiothreitol/FeCl₃ system에서 발생한 hydroxyl radical을 즉시 제거하였다.

폴리아민의 종류인 spermidine, spermine은 dithiothreitol/FeCl₃ system에서 발생된 hydroxyl radical에 의한 DNA 손상을 방어하였으며, 이 연구에서 사용된 4종류의 폴리아민 모두는 UV에 의한 DNA 손상을 방어하였다. 폴리아민 결손 돌연변이주인 KL527에서 UV조사 후의 세포 생존율이 외인성 폴리아민 putrescine과 spermidine 공급에 의해 약간 증가되었다. 그러나, 대조균주인 MG1655의 세포 생존율은 폴리아민 공급에 의해 커다란 영향을 받지 않았다. 방사선 조사된 세포에서, 폴리아민 결손 돌연변이주인 KL527의 세포 생존율은 첨가한 폴리아민, putrescine과 spermidine 공급에 의해 현저히 증가하였고, MG1655 균주는 폴리아민 공급과 상관없이 대조균과 비슷했다. 이 결과는 폴리아민이 세포수준과 DNA수준에서 상당한 방사선 방호 가능성이 있음을 시사한다.

SUMMARY

1. Project Title

Protection of DNA strand breakage by radiation exposure

2. Objective and Importance of the Project

Radiation effect is inevitable in that radiation and radioactive isotopes has been increasingly used in industrial and medical fields. Thus the objective of this study lies in minimizing the human risks through the development of technology for lessening radiation damage or risk.

3. Scope and Content of the Project

One of the characteristic biochemical response to radiation and environmental noxious pollutants is DNA single and double strand breakage. Dithiothretiol/ FeCl_3 system was used for the generation of hydroxyl radical. Agarose gel electrophoresis and image analyzer were used for the detection of DNA strand breakage. For the second year study for developing technology for minimizing DNA strabd breakage by radiation exposure, the following expermental works have been done.

- 1) Purification of ceruloplasmin from normal human serum
- 2) Inhibition of DNA single strand breakage by purified human ceruloplasmin(scavenger of hydroxyl radical)
- 3) Inhibition of DNA single strand breakage by polyamines
- 4) Cell survivability of radiation in wild type and polyamine-deficient mutant type *Escherichia coli*

4. Result and Proposal for Application

Human ceruloplasmin, the plasma copper containing protein, is thought to play an essential role in iron metabolism, but it also has antioxidant properties. Ceruloplasmin directly scavenged hydroxyl radicals($\cdot\text{OH}$) generated in dithiothreitol/ FeCl_3 system in addition to inhibitory function of hydroxyl radical formation and lipid peroxidation.

Polyamines, spermidine and spermine, significantly protected the supercoiled DNA strand breakage by hydroxyl radicals and DNA strand breakage by UV was highly protected by all four polyamines used in this study. In polyamine deficient mutant KL527, It was shown that cell survivability following UV irradiation was slightly increased by exogenous polyamines putrescine and spermidine supplement. however, the cell survivability of wild type(MG1655) was not influenced by polyamine supplement. In γ -irradiated cells, cell survivability of polyamine-deficient mutant strain KL527 was significantly increased by exogenous putrescine and spermidine supplement and that of wild

type strain MG1655 was similar irrespective of polyamine supplement. These results implicate the possibility that polyamines play a potent role in radioprotection of cell and DNA level.

목 차

제 1장 서 론.....	1
1. 방사선의 생체영향	1
2. 항산와 물질.....	3
제 2장 본 론.....	6
제 1절 연구내용 및 방법	6
1. 사용균주, 배지 및 배양조건	6
2. Plasmid DNA의 분리 및 정제	6
3. Agarose gel 전기영동.....	8
4. UV 및 Dithiotheritol/FeCl ₂ (DF) system에 의한 DNA breaks의 분석	9
5. 방사선 조사 및 생존곡선 측정.....	9
6. 사람 혈액에서의 ceruloplasmin의 분리 및 정제.....	10
제 2절 연구결과 및 고찰	
1. Ceruloplasmin의 항산화 기능.....	11
2. Polyamine의 항산화기능	13
제 3장 결론 및 건의사항	15
참고문헌	18

표목차

Table 1. LB medium	7
Table 2. M56 medium	7

그림목차

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA. The protective effect of DNA against hydroxyl radical by ceruloplasmin (Cp) in DTT/FeCl ₃ system.....	21
Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA. Effect of freezing and thawing of ceruloplasmin dissolved in 20mM phosphate buffer (pH 7.0) on the protection of DNA challenge with hydroxyl radicals.	22
Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pUC18 challenge with hydroxyl radical. Freezing and thawing effect on the ability of ceruloplasmin(20ug) protecting DNA	23
Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA. The protective effect against DNA damage by natural polycarylamines in DTT/FeCl ₃ system	24

Fig. 5. Effect of polyamine on the protection of strand breaks induced by UV-irradiation. 300 ng of pUC18 DNA was irradiated with UV at a dose of 5000 J/m².....25

Fig. 6. Effect of polyamine on the survival of polyamine deficient mutant (KL527) and wild type (MG 1665) irradiated with UV. Cells were aerobically grown in glucose minimal media with and without polyamine (1mM) until reached to 0.2 of OD₆₀₀ at 37°C. These exponentially growing cells were subsequently irradiated with UV, then survived colonies were counted.26

Fig. 7. Effect of polyamine on the survival of polyamine deficient mutant (KL527) and wild type (MG 1665) strains. Cells were aerobically grown in glucose minimal media with and without polyamine (1mM) until reached to 0.2 of OD₆₀₀ at 37°C. Cells were subsequently irradiated with γ -rays at the graded doses, then survived colonies were counted.27

Fig. 8. Effect of polyamine on the survival of polyamine deficient mutant (KL527) and wild type (MG 1665) strains. Cells were aerobically grown in glucose minimal media with and without polyamine (1mM spermidine) until reached to 0.2 of

OD₆₀₀ at 37°C. Cells were subsequently exposed to H₂O₂
(10mM).28

1장 서론

1. 방사선의 생체영향

방사선(radiation)은 우리 지구상에서 볼 수 있는 여러 가지 에너지의 한가지 형태이다. 자연방사선은 환경 내에서 언제나 접할 수 있고 생물의 생활활동에 막대한 영향을 주고 있으며 생물의 진화(evolution)에도 지대한 영향을 미쳤다. 이러한 생명체들이 이온화 방사선에 의하여 피폭 되면 생명체의 구성물질중 70 ~ 80%를 차지하고 있는 물분자와의 상호작용에 의하여 다양하고 많은 양의 비정상적 유해산소 라디칼(예: $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2)을 형성한다. 이러한 유해산소 라디칼(radical)은 매우 반응성이 강하여 생명체에 대한 방사선의 간접영향(indirect effect)을 나타내는데 기여하고 있다. 최근에는 이러한 방사선에 의한 간접영향이 직접영향(direct effect)보다 더 중요하다고 판단되고 있다. 이온화 방사선에 반응은 그 반응수준에 따라 생태학적 수준(ecological), 개체수준(individual), 세포적 수준(cellular), 분자적 수준(molecular), 원자적 수준(atomic level)으로 구분할 수 있다. 상기의 반응수준은 각기 독립적인 것이 아니라 서로 유기적인 관계를 포함하고 있다. 그러나 방사선의 최종적 영향은 분자 및 원자적 수준에서 일어나며 이것이 궁극적으로 세포 및 개체수준에서 표현형으로 나타나게 되는 것이다. 이러한 원자 및 분자수준에서의 영향이란 방사선피폭에 의하여 생성된 유해산소 라디칼과 생체고분자(biomacromolecule or biopolymer)와의 반응이다. 생체를 구성하고 있는 고분자물질로서는 핵산(DNA:deoxyribonucleic acid), 단백질(protein), 탄수화물(carbohydrate), 지질(lipid)등을 들 수 있다. 이러한 분

자들은 대부분 고유의 3차원적인 복잡한 구조(three dimensional structure)를 형성하고 있기 때문에 유해산소 라디칼에 의한 미세한 원자 및 화학적 변화를 측정하기가 어려울 때가 많다. 그러나 이러한 고분자 물질들은 각기 정량화 측정이 가능한 물리, 화학적 성질을 가지고 있으므로 생화학적으로 구조상의 변화를 간접적으로 모니터링 할 수 있다. 이러한 물질의 대표적인 것이 단백질과 핵산이다.

단백질은 생체의 구조 및 생체 내에서 일어나고 있는 제반의 화학반응을 조절하는 촉매역할과 호르몬조절(hormone regulation)작용등 생리적으로 생명현상에 중요하다. 이러한 단백질은 아미노산이 펩타이드(peptide)결합에 의하여 생체구조에 적합한 conformation을 가지고 있으며 대부분의 활성장소(active site)에는 전자(electron)의 주고받음으로서 반응을 촉매하기 때문에 방사선에 의하여 발생된 유해산소 라디칼은 이러한 부위와 쉽게 반응할 수 있어 그 기능을 상실할 수 있으며 혹은 단백질 구성원인 아미노산의 측쇄(side chain)인 R group이 이온결합(ionic bond), 수소결합(hydrogen bond), 이황화 결합(disulfide linkage)등에 의하여 단백질의 3차구조를 안정화시키게 되는데 유해산소 라디칼이 반응하여 생체 내 최적의 반응성을 나타내게 하는 3차구조를 파괴하므로써 단백질이 가지고 있는 생체기능을 상실하게 할 수 있다.

세포 내에서 모든 생체대사반응등의 생명현상이 일어나고 각 개체의 유전정보를 다음세대에 정확하게 전달하기 위하여는 핵산에 손상이 가지 않도록 구조를 유지하는 것이 중요하며 핵산의 일부분이 손상되었다 할지라도 효과적으로 손상부분을 수리할 수 있어야 한다. 일반적으로 핵산은 염색체의 주요구성물질이며 염색체 이상(chromosomal abberation)은 방사선에 의한 생물학적 영향을 예측할 수 있는 좋은 지표(indicator)이다. 방사선 피폭에 의하여 생성된 유해산소 라디칼은 최종적 DNA의 염

기(base)와 반응하게 되는데 일반적으로 피리미딘(pyrimidine: thymine, cytosine)계열이 퓨린(purine:adenine, guanine)계열보다 감수성이 강하다. 방사선 피폭에 의한 대표적인 DNA손상은 single strand breakage와 double strand breakage이다. 그 이외에 염기손상 및 DNA-DNA linkage등이 있으나 빈도와 생물학적인 중요성이 덜하다. 한편 이러한 breakage현상은 전기영동을 실시하여 정량화 할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 방사선을 비롯한 다른 환경요인의 영향 등을 정량적으로 점검할 수 있다.

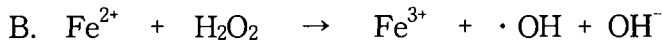
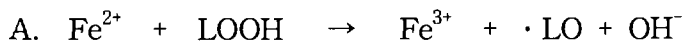
2. Antioxidant(항산화물질)

산소는 생명현상의 유지에 필수불가결 하지만 산소호흡시 반드시 부수적으로 활성산소가 생성되며 이러한 활성산소는 반응성이 강하여 유해한 작용을 나타내고 있다. 반면 방사선등 환경내 여러 인자에 의하여 새로운 유해산소가 발생할 수 있으므로 생명체는 이를 효율적으로 제거할 수 있는 system이 가동되어야 한다. 이러한 기능을 가지고 있는 물질들을 생의학적(biomedical) 용어로는 항산화물질(antioxidant substance)이라 명명한다. 대체적으로 방사선 등에 의하여 생성되는 유해산소 라디칼을 항산화하는 기능의 기전으로는 다음 2가지를 생각할 수 있다.

SYSTEM 1. 첫째는 유해산소 라디칼의 생성을 원천적으로 봉쇄하는 작용이고,

SYSTEM 2. 둘째는 생성된 유해산소 라디칼을 효과적으로 포착 제거하는 작용이다

예를 들어 glutathione(GSH), peroxidase, catalase 등의 작용은 lipid hydroperoxide나 과산화수소(H₂O₂)를 분해하여 이들로부터 lipid alkoxyl radical(\cdot LO)이나 hydroxyl radical과 같은 지질 과산화(lipid peroxidation)를 유도함으로써 유해산소 라디칼이 파생되는 과정을 억제하는 예방적 항산화 system 1에 해당된다. 또한 ceruloplasmin과 같이 ferroxidase I의 기능을 가지고 있어서 Fe²⁺를 Fe³⁺로 전환시켜(A, B, C) 유해산소 라디칼의 생성



과정을 불활성화하는 단백질이(Gutteridge, J. M. C. and Stocks, J., 1981)나 혈액내 albumin, transferrin, lactoferrin과 같이 구리, 철 등의 금속이온과 complex를 형성해서 반응계에서 유해산소 라디칼을 발생시키는 금속이온을 제거시켜 지질과산화의 유도를 저해하는 단백질도 항산화작용 SYSTEM 1에 해당한다(Hochstein, P. and Sree Kumar, K., 1980; Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 1985; Gutteridge, J. M. C., 1981).

한편 $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{LO}$, $\cdot\text{O}_2^-$ 등을 포착하여 지질과산화 유도반응을 저해하거나, 지질 peroxy radical($\cdot\text{LOO}$)을 포착하여 지질과산화반응을 정지시키는 Superoxide dimutase, uric acid, vitamine C, vitamine E 등의 scavenger는 항산화 SYSTEM 2에 속한다. 이러한 항산화 기능물질은 생체 내에 존재하며 크게 세포내 존재(intracellular)하는 물질과 세포외 존재(intercellular)물질 등으로 나눌 수 있으며 외부환경요인들에 의하여

생체 내 농도가 증가 혹은 감소하게 된다.

본 연구는 사람혈액에서 분리한 혈액 내에서 대부분(90 ~ 95% 이상)의 구리를 흡착하고 있는 ceruloplasmin이 철대사에 관여하여 hydroxyl radical이 생성되는 것을 원초적으로 저해하는데(SYSTEM 1) 이러한 ceruloplasmin이 직접적으로 hydroxyl radical을 처리할 수 있는지(SYSTEM 2)의 능력과 식물, 동물 및 미생물 등의 모든 생명체에 존재하는 polyamines(Tabor, H. and Tabor, C. W., 1984, 1985; Tabor *et al.*, 1981)을 대상으로 직접적으로 hydroxyl radical을 처리할 수 있는지에 대하여 DNA strand breakage 현상을 대상으로 실험하였으며 이러한 polyamine이 방사선 피폭후 세포의 생존율에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 야생형(wild type)과 돌연변이(mutant type)형의 대장균(*Escherichia coli*)을 대상으로 조사하였다.

제 2장 본 론

제 1절 연구내용 및 방법

1. 사용균주 , 배지 및 배양조건

본 실험에 사용된 대장균 K-12 균주는 야생형 균주로는 MG1655(F^{λ})(1) 균주를 사용하였고, polyamine 생합성 결핍 돌연변이 균주로는 KL527 [$\Delta(speA\ speB)\ \Delta speC$](2) 균주를 사용하였다.

균주의 배양은 37°C, 호기적(aerobic) 조건에서 배양하였으며, 배지는 영양배지인 LB 배지와 최소배지인 M56 배지를 사용하였다(3). 포도당은 (glucose) 최소배지에 최종농도가 1% 되게 첨가하였으며, polyamine인 putrescine과 spermidine, spermine, cadaverine 등은 최종농도가 1 mM 되게 배지에 첨가하였다. 고형배지인 경우에는 1.5% agar 배지를 사용하였다.

2. Plasmid DNA의 분리 및 정제

Plasmid DNA는 alkaline lysis 방법으로 분리하였다. pUC18 plasmid DNA를 포함하고 있는 대장균 균주 배양액 1.5 ml을 37°C에서 8시간 동안 진탕 배양하여 microcentrifuge(Eppendorf 5414S)로 원심 분리하여 세포만 모았다. 여기에 solution I(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl(pH 8.0), 10 mM EDTA(pH 8.0), 100 μ l를 첨가하여 충분히 혼합하였다. 여기에 solution II(0.2 N NaOH, 1% sodium dodecyl sulfate)를 200 μ l를 첨가하여 조심스럽게 혼합하여 세포를 완전히 lysis 시킨다. 여기에

Table 1. LB medium

1. yeast extract 5 g,
2. tryptone 10 g,
3. NaCl 10 g,
4. 증류수 1 liter, 최종 pH 6.8

Table 2. M56 medium

1. KH_2PO_4 10.6 g,
2. Na_2HPO_4 17.4 g,
3. 10% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 ml,
4. 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 ml,
5. 0.05% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 ml,
6. 증류수 1 liter, 최종 pH 7.0

solution III(5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, H_2O 28.5 ml), 150 μl 를 첨가하여 잘 섞는다. 이 혼합액을 microcentrifuge로 15,000 r. p. m으로 실온에서 10분간 원심 분리하여 cell debris를 침전시킨다. 상등액을 새로운 tube에 옮기고 여기에 2배 부피의 차가운 ethanol을 첨가하여 잘 섞어서 plasmid DNA만을 침전시킨다. 이 용액을 microcentrifuge로 15,000 r. p. m으로 실온에서 10분간 원심 분리하여 DNA만을 모은다. 이 DNA를 70% ethanol, 1 ml로 세척한 다음 건조하여 적당한 부피의 증류수에 녹인다. 분리된 DNA로부터 supercoiled DNA만을 정제하기 위하여, 위에서 분리된 DNA 용액을 0.8% 저용점 agarose gel상에서 전개시켜 supercoiled DNA band만을 예

리한 cutter를 이용하여 절단하였다. 약 0.2 g의 gel 절편을 0.2 ml의 TAE(0.04 M Tris-acetate, 10 mM EDTA)(4) buffer에 넣고, 65°C에서 10분간 heating하여 gel 절편을 완전히 녹여서 DNA를 용출시켰다. 이 DNA 용액에 동량의 phenol을 첨가하여 잘 섞은 후 microcentrifuge로 15,000 r. p. m으로 원심 분리하였다. 상등액을 새로운 tube에 옮기고, 여기에 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol(25 : 24 : 1) 용액을 첨가하여 잘 섞은 다음 다시 원심 분리하였다. 상등액을 다시 새로운 tube에 옮기고 여기에 동량의 chloroform을 첨가하여 충분히 혼합하고 다시 원심 분리하였다. 이때 상등액을 새로운 tube에 옮긴 다음, 1/10 부피의 3 M sodium acetate(pH 7.0)를 첨가하여 잘 혼합한 다음, 2배 부피의 차가운 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 이 혼합액을 상기와 동일한 방법으로 원심 분리하여 DNA pellet을 1 ml의 70% ethanol로 세척하고 건조한 다음 적당한 부피의 증류수에 녹여서 냉장고에 보관하였다.

3. Agarose gel 전기영동

Agarose gel을 이용한 전기영동은 mini-gel system(Mupid-II, Japan)을 사용하였다. 전기영동에 사용한 전개용액은 1 × TAE buffer를 사용하였다. Gel의 준비는 agarose gel 분말을 적절한 농도로 조절하여, 전개용액 40 ml에서 끓여서 완전히 녹였다. 이 gel 용액을 gel case에 부어서 굳혔다. 전기영동 장치에 gel을 옮기고 전개용액을 gel 표면이 2 mm 정도 덮힐 때까지 부어준 후 각각의 DNA 시료를 well에 첨적하여 전개시켰다. 전기영동에 사용한 전압은 gel 단위길이(cm)당 5 volt 정도로 공급하였다.

4. UV 및 Dithiothreitol/FeCl₃(DF) system에 의한 DNA breaks의 분석

UV에 의한 DNA breaks를 분석하기 위하여 증류수에 녹인 0.3 μg 의 pUC18 plasmid DNA 용액에 polyamine을 최종농도가 1 mM되게 첨가하여 최종부피가 20 μl 되게 하였다. 이 DNA 용액을 parafilm 위에 drop을 만들고 실온에서 5000 J/m²의 선량으로 조사하였다.

DF system에 의한 DNA breaks의 분석을 위하여 다음과 같은 반응용액을 준비하였다. 총 20 μl 의 40 mM HEPES buffer(pH 7.0)에 0.3 μg 의 pUC18 plasmid DNA, 3 μM FeCl₃, 10 mM dithiothreitol 그리고 1 mM의 polyamine을 첨가하여 잘 섞어주었다. 이 혼합액을 37°C에서 45분간 incubation시켰다.

이들 DNA 시료들을 0.8% agarose gel상에서 전기영동시킨 다음 Ethidium bromide(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색한 다음 image analyzer로 scanning하여 DNA breaks 정도를 분석하였다.

5. 방사선 조사 및 생존곡선 측정

시험할 균주를 1 ml의 glucose 최소배지에서 12-16시간 동안 배양하여 세포내의 polyamine을 고갈시켰다. 이들 균주를 polyamine이 첨가되고 첨가되지 않은 동이한 배지 2 ml에 계대배양하여, 600 nm에서 optical density가 약 0.2가 될 때까지 진탕 배양하였다. 이들 세포현탁액을 선량 별로 각각 UV와 γ -선을 조사하였다. 조사한 이들 세포현탁액을 적당히 희석하여, 1.5% LB agar 배지에 도말하여, 37°C에서 12-16시간 동안 배양한 다음 생존한 colony 숫자를 파악하였다. 생존율은 조사

한 표본에서 자란 colony 숫자를 조사하지 않은 표본에서 성장한 colony 숫자로 나누어서 나온 값을 생존율로 결정하였다.

6. 사람혈액에서의 ceruloplasmin의 분리 및 정제

Ceruloplasmin은 단백질 분해효소(plasmin)에 의하여 매우 빠르게 분해되므로 이들에 의한 영향을 최소한 줄이기 위하여 혈청에 최종농도가 2 mM이 되게 ϵ -aminocaporic acid를 처리하였다. 순수분리를 위하여 chloroethyamine을 Sepharose에 화학적으로 결합시킨 affinity gel을 사용하였다. 분리된 순도를 관찰하여 다른 단백질이 오염되어 있으면 DEAE-Sepharose 이온교환수지를 다시 사용하였다. Chloroethylamine-Sepharose gel은 Calabrese와 Morri의 방법에 의해 합성하였다 (Calabrese L. *et al.*, 1988)

제 2절 연구결과 및 고찰

1. Ceruloplasmin의 항산화기능

생체 내의 대부분의 copper ion은 특정물질과 결합되어 혈액 내에서 운반되는데 혈액내 단백질인 albumin과 ceruloplasmin이 이러한 copper ion을 흡착하고 있다. 이중 ceruloplasmin은 copper ion의 95%이상을 포함하고 있는 혈액내 단백질로서 iron metabolism에 관여와 amine계열의 호르몬조절등 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있으며 항산화기능(antioxidant properties)도 가지고 있는(Stock, J. and Gutteridge, J. M. C., 1974) 기능성 단백질로 알려지고 있다. 특히 근래에는 간조직에서 합성되어 혈액 내로 방출되는 것 이외에 각기 다른 조직 내에서도 자체적으로 합성이 일어나고 상당히 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 보고되어 실제로 생체 내에서(*in vivo*)의 중요한 생리적(physiological function) 기능에 대하여 상당한 관심을 가지고 있다.

우선 ceruloplasmin은 ferroxidase I 기능을 가지고 있으므로 서 항산화기능을 역할을 하고 있다. 즉 reducing oxygen이 water로 전화되면서 Fe^{2+} 가 Fe^{3+} 로 전환된다(A). 이러한 ceruloplasmin-catalyzed 산화반응은 산소에 의한 Fe^{2+} 의 비효소적 산화과정과(Halliwell, B., 1978; Wong, S. F. and Halliwell, B., 1981)는 다르게 어떠한 유해 산소 라디칼도 방출하지 않는다.



따라서 이러한 ceruloplasmin의 ferroxidase기능은 iron dependent lipid

peroxidation의 inhibition(Gutteridge, J. M. C. and Hill, C., 1984; Lovstad, R. A., 1987) 기능과 모든 조건하에서 H_2O_2 로 부터 $\cdot OH$ 의 생성을 저해하는 기능을 발휘하므로써 단백질의 중요한 항산화기능을 가지고 있다(Gutteridge, J. M. C., 1985).

이러한 기능이외에 ceruloplasmin은 H_2O_2 와 $\cdot O_2^-$ 와 반응하는 것으로 보고되고 있으나 이러한 반응들은 stoichiometric한 반응이기 때문에 실제로 ceruloplasmin은 SOD(superoxide dismutase) 활성도나 catalase 활성도를 가지고 있지 않아 H_2O_2 를 분해한다거나 $\cdot O_2^-$ 를 dismutation하는 기능을 가지고 있지 않다. 세포외 체액내(extracellular fluid)에서 H_2O_2 와 $\cdot O_2^-$ 의 제거기능이 없다는 사실은 혈액내 ceruloplasmin의 존재가 이러한 종류의 유해 산소라디칼을 제거하는데 중요하지 않다라는 것을 알려주고 있다(Calabrese, R. and Carbonaro, M., 1986; Marklund, S. L., 1986) 또한 ceruloplasmin과 transferrin은 human knee-joint synovial fluid(Gutteridge, J. M. C., 1986) 와 lung alveolar lining fluid(Pacht, E. R. and Davis, W. B., 1988)에서 $\cdot OH$ 의 생성을 저해하므로써 항산화 효과를 나타내고 있다(Blake, D. R. and Hall, N. D., 1981). 실제로 상용화되어 판매중인 사람 ceruloplasmin은 간단한 copper complexes와 EC-SOD가 미량 오염되어 있어 ceruloplasmin과 $\cdot O_2^-$ 의 반응연구에 상당한 혼선을 불러일으킨 것이 사실이다(Marklund, S. L., 1986).

현재 본 실험은 이러한 여러 가지 유해산소 라디칼 중 방사선에 의하여 가장 많이 생성되고 있으며 반감기는 짧지만 세포 내에서는 유전자의 직접적인 손상을 가지고 올 수 있는 hydroxyl radical의 ceruloplasmin에 의한 직접적인 제거기능을 DF system을 사용하여 관찰하였다. 실제로 세포 내에서 DNA 손상은 $\cdot O_2^-$ 에 의하여는 직접적으로 일어나지 않는다고 보고되고 있다. 현재의 결과로 본다면 ceruloplasmin의 기능은 1979

년도에 보고되었던 것처럼 $\cdot O_2^-$ 의 제거기능이 아니라 강력한 $\cdot OH$ 의 제거기능을 가지고 있는 것으로 보인다(그림 1). 이러한 기능은 다른 생화학적 기능과 마찬가지로 혈액 내에서 분리 정제되고, phosphate buffer 하에서 냉동상태($-20^\circ C$)로 보관하면 상당히 불안정하여 그 활성도가 떨어지고 있다(그림 2). 반면 증류수(distilled water)나 barbital buffer하에서는 활성도가 상당히 안정한 상태로 보존되고 있다(그림 3).

2. Polyamine의 항산화기능

그림 4는 hydroxyl radical을 생성하는 DTT/ $FeCl_3$ system에서 DNA strand breakage억제현상의 polyamines 영향을 본 것이다. Strand breakage 정도의 측정은 agarose 전기영동 후 supercoiled DNA(I) band의 밀도 변화로 측정하였다. Supercoiled DNA의 strand breakage 억제현상은 polyamine의 종류에 따라 다르다. Supercoiled DNA가 relaxed(II) 형태로 전환된다 할지라도 spermine과 spermidine등은 supercoiled DNA의 strand breakage를 억제하는데 매우 효과적으로 작용하지만 putrescine과 cadaverine 등은 매우 비효과적으로 나타나고 있다.

그림 5는 $5,000 J/m^2$ 정도의 UV를 조사하였을 경우 supercoiled DNA strand breakage 억제현상의 polyamines 영향을 나타낸 것이다. strand breakage의 억제효과는 hydroxyl radical의 경우와 비슷한 양상을 보이고 있다. 즉 spermine과 spermidine 등은 매우 효과적으로 작용하지만 putrescine과 cadaverine 등은 매우 비효과적으로 나타나고 있다.

대장균의 방사선민감도에 대한 polyamines의 영향을 보기 위하여 UV와 γ -ray를 사용한 후 대조인 wild type과 polyamine-deficient 형태의

돌연변이균주의 생존율을 조사하였다.

그림 6에서 보는 바와 같이 UV에 대한 돌연변이 대장균의 세포생존률 (cell survivability)은 배양액에 1 mM의 putrescine과 spermidine의 polyamines를 첨가하게 되면 증가하게 된다. 반면 정상적인 대조군에서는 polyamines의 첨가에 의하여 영향을 받지 않는다. 배양액에 putrescine과 spermidine을 첨가한 경우 60과 40 J/m²에서 각 2.1 ~ 2.36 배의 세포생존률의 증가를 보이고 있다.

그림 7은 방사선 피폭 후 세포생존률의 변화를 나타낸 것이다. polyamine 결핍 대장균에서는 방사선 조사에 매우 민감한 반응을 보이고 있으며 polyamines를 첨가한 경우는 공급하지 않은 것 보다 방사선 피폭에 덜 민감하다. 80 Gy의 방사선 조사 후에는 putrescine과 spermidine첨가에 의하여 7.67배와 23.78배의 세포생존률이 증가하였다.

그림 8은 방사선은 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 처리하였을 경우 시간경과시 대장균의 생존율을 조사한 것이다. polyamines를 합성하는 정상적인 대조군주에서는 외부에서 polyamines의 공급에 관계없이 생존율이 높다. 반면 돌연변이 균주에서는 외부 polyamines의 공급이 없는 조건에서는 생존율이 급격히 떨어지며 반면 polyamines 공급 하에서는 생존율이 급격히 상승된다.

제3장 결론 및 건의사항

실험실내(*in vitro*)에서 ceruloplasmin은 상당히 다양한 polyamine과 polyphenol외에 기능은 모르지만 bioamine 등 다양한 종류의 amine을 산화시키는 작용을 가지고 있다. 또한 ceruloplasmin은 ferroxidase의 기능을 가지고 있어 산화된 Fe^{3+} 가 transferrin에 결합되는 것을 용이하게 하여 비효소적 반응과는 다르게 hydroxyl radical과 superoxide radical을 생성하지 않으며 따라서 지질 과산화 작용을 막는다. 또한 유전병의 일종인 Wilson disease등에는 이러한 ceruloplasmin이 부족하여 이러한 철 대사에 상당한 영향을 미쳐 치사에 이르게 한다. 따라서 ceruloplasmin은 Fe^{2+} -dependent radical reaction을 저해하므로 서 세포외(extracellular) 항산화기능에 상당히 중요할 뿐아니라(Gutteridge, J. M. C., 1977; Lovstad, R. A., 1983). 방사선 피폭시등 생성되며 유해산소 라디칼중 생체 내에서 가장 많이 영향을 미치는 hydroxyl radical을 직접적으로 제거하는 기능을 가지고 있다.

일반적으로 polyamine은 분화(differentiation)이나 세포성장(cell growth) 및 세포의 구조 보호에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각되고 있다(Balasundaram *et al.*, 1991) 또한 세포내 기관(organelle)이 방사선 조사에 의해 손상을 받을 수 있다고 보고되고 있다(Wilson and Bloomfield, 1979). 일반적으로 polyamine의 합성 저해제인 α -difluoromethylornithine을 human colon carcinoma cell에 처리하였을 경우 방사선에 의한 세포독성(cytotoxicity)을 보이고 있다(Arundel *et al.*, 1988; Snyder and Sunkara, 1990). 한편 polyamine depleted 세포(HeLa cells)에서는 세포복구과정에서의 DNA strand breakage 복구의 지연현

상이 일어나며 UV에 의한 민감도가 증가하게 된다. 본 실험은 polyamine이 UV와 hydroxyl radicals에 의한 DNA strand breakage 방호작용과 대장균에서 radioprotection 작용을 조사하였다. Polyamine인 putrescine과 spermidine은 hydroxyl radical에 의한 pUC18 DNA의 strand breakage protection에 상당한 영향을 미치는데 이것은 polyamine이 가지고 있는 전하(charge)에 의한 것으로 보고 있다. UV는 pyrimidine dimer와 다른 photo-adducts를 생산하므로서 DNA strand breakage를 일으킨다(Hall, 1988). 그러나 이러한 polyamine이 실험실내에서 직접적으로 UV조사로부터 직접적으로 DNA를 방어하는지는 연구되지 않았다. 현재 실험결과는 그 정도는 아주 달라도 polyamine (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine)은 UV에 의한 DNA strand breakage를 강력하게 억제하는 것으로 나타나고 있다. 이러한 이유는 이러한 polyamine들이 negative charge를 가지고 있는 DNA에 결합하므로서 DNA구조를 응집(condensation)시키기 때문이라 생각하고 있다. 이러한 결과는 DNA의 방사선방호(radioprotection)에서 가장 중요한 기작이라고 할 수 있는 polyamine-induced compaction and aggregation (PICA)으로 설명될 수 있으리라 생각된다(Newton *et al.*, 1996). 그러한 PICA현상은 phosphate charge 의 90%가 polyamine에 의하여 중성화된다면 비약적으로 발생하느 것으로 보고되고 있다(Wilson and bloomfield, 1979). PICA effect는 hydroxyl radical 과 UV에 노출되는 molecule당 surface area를 축소시키므로서 간접적으로 single strand breakage형성을 감소시킨다(Newton *et al.*, 1996).

본 연구에 사용된 ceruloplasmin과 polyamine은 생체 내에서 직접 합성되어 항산화기능 및 다양한 생리적 기능을 가지고 있어서 생체내 조절 메커니즘에 대한 연구가 심도 있게 이루어지고 이를 조절할 수 있는 천

연물질의 개발이 이루어지면 방사선 방호기능에 중요한 역할을 할 수 있으리라 기대된다.

REFERENCES

1. Arundel, C. M., and Sunkara, P. S., 1990, Effect of polyamine depletion on DNA damage and repair following UV irradiation of HeLa cells. *Photochemistry and Photobiology*, 52 (3), 525-532.
2. Balasundaram, D., Tabor, C. W. and Tabor, H., 1991. Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*. 88, 5857-5876.
3. Blake, D. R., Hall, N. D., Treby, D. A., Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., 1981, *Clin. Sci.* 61, 483-486.
4. Calabrese, L., Carbonaro, M. and Musci, G., 1988, Chicken ceruloplasmin, *J. Biol. Chem.* 263(14), 6480-6483
5. Calabrese, R. and Carbonaro, M., 1986, *Biochem. J.* 238, 291-295.
6. Gutteridge, J. M. C., 1977, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77, 379
7. Gutteridge, J. M. C., and Stocks, J., 1981, *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 14, 257-329.
8. Gutteridge, J. M. C., Paterson, S. K., Segal, A. W., and Halliwell, B., 1981, *Biochemical J.* 199, 259-261
9. Gutteridge, J. M. C., Hill, C., and Blake, D. R., 1984, *Clin, Chim. Acta* 139, 85-90.
10. Gutteridge, J. M. C., 1985, *Chem-Bio. Interact.* 56, 113-120.
11. Gutteridge, J. M. C., 1986, *Biochim. Biophys. Acta* 869, 119 -127.
12. Halliwell, B., 1978 *FEBS Lett.* 96, 238-242.

13. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 1985, *Trends Neurosci.* 8, 22-26
14. Hochstein, P., Sree Kumar, K., and Forman, S. J., 1980, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 355, 240-248
15. Hall, E. J., 1988, *Radiobiology for the radiologist.* pp. 2-16. J. B. Lippincott, Philadelphia.
16. Lovstad, R. A., 1983, *Int. J. Biochem.* 15, 1067
17. Lovstad, R. A., 1987, *Int. J. Biochem.* 19, 309-313.
18. Marklund, S. L., 1986, *J. Free Rad. Biol. Med.* 2, 255-260.
19. Newton, G. L., Aguilera, J. A., Ward, J. F. and Fahey, R. C., 1996, Polyamine-induced compaction and aggregation of DNA—a major factor in radioprotection of chromatin under physiological condition. *Radiation Research*, 145, 776-780.
20. Pacht, E. R., and Davis, W. B., 1988, *J. Appl. Physiol.* 64, 2092-2099.
21. Snyder, R. D. and Sunkara, P. S., 1990, Effect of polyamine depletion on DNA damage and repair following UV irradiation of HeLa cells. *Photochemistry and Photobiology*, 52 (3), 525-532.
22. Spothem-Maurizot, M., Ruiz, S., Sabattier, R. and Charlier, M., 1995, Radioprotection of DNA by polyamines. *International Journal of Radiation Biology*, 68 (5), 571-577.
23. Stocks, J., Gutteridge, J. M. C., Sharp, R. J., and Dormandy, T. L., 1974, *Clin. Sci. Mol. Med.* 47, 215-222.
24. Stocks, J., Gutteridge, J. M. C., Sharp, R. J., and Dormandy, T. L., 1974, *Clin. Sci. Mol. Med.* 47, 223-233.

25. Tabor, H. and Tabor, C. W., 1984, Polyamines. *Annula Review of Biochemistry*, 53, 749-790.
26. Tabor, H. and Tabor, C. W., 1985, Polyamines in microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49, 81-89.
27. Tabor, H., Tabor, C. W., Cohn, M. S. and Hafner, E. W., 1981, Streptomycin resistance (*rpsL*) produces an absolute requirement for polyamines for growth of *Escherichia coli* strain unable to synthesis putrescine and spermidine [D(*speA speB*) D*speC*]. *Journal of Bacteriology*, 147, 702-704.
30. Williams, J. R., Casero, R. A. and Dillehay, L. E., 1994, The effect of polyamine depletion on the cytotoxic response to PUVA, gamma rays and UVC in V79 cells *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201 (1), 1-7.
31. Wilson, R. W. and Bloomfield, V. A., 1979, Count erioninduced condensation of deoxyribonucleic acid: A light- scattering Study. *Biochemistry*, 18, 2192-2196.
32. Wong, S. F., Halliwell, B., Richmond, R., and Skowroneck, W. R., 1981, *J. Inrg. Biochem* 14, 127-134.

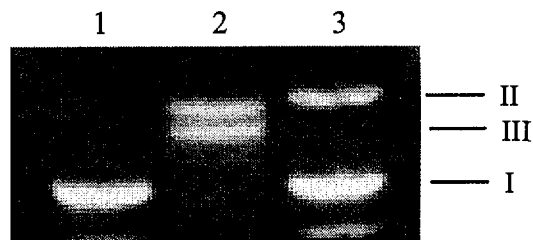


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA.

The protective effect of DNA against hydroxyl radical by ceruloplasmin (Cp) in DTT/FeCl₃ system.

Lanes: 1, control; 2, DNA only; 3, 30 ug of Cp. Three forms of plasmid DNA are indicated on the right: I, closed; II, open circular; III, linear.

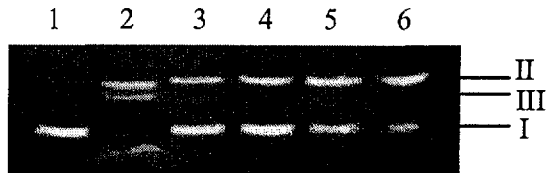


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA. Effect of freezing and thawing of ceruloplasmin dissolved in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) on the protection of DNA challenge with hydroxyl radicals. Ceruloplasmin was added at 20 ug.

Lanes: 1, control; 2, DNA only; 3, no freezing and thawing; 4, twice; 5, four times; 6, six times. Three forms of plasmid are indicated on the right. I, closed; II, open circular; III, linear.

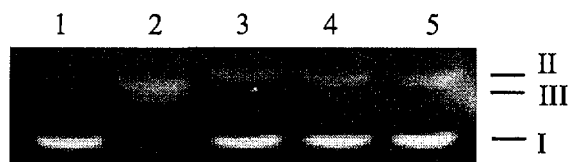


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pUC18 challenge with hydroxyl radical. Freezing and thawing effect on the ability of ceruloplasmin (20 ug) protecting DNA.

Lanes: 1, control; 2, DNA only; 3, once; 4, three times; 5, five times

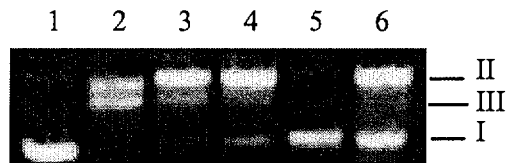


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pUC18 plasmid DNA.

The protective effect against DNA damage by natural polyamines in DTT/FeCl₃ system. Lanes: 1, control; 2, DNA only; 3, Putrescine; 4, Cadaverine; 5, Spermidine; 6, Spermine. The polyamines were added at the final concentration of 2 mM. I, II and III indicate closed circular, open circular and linear DNA, respectively.

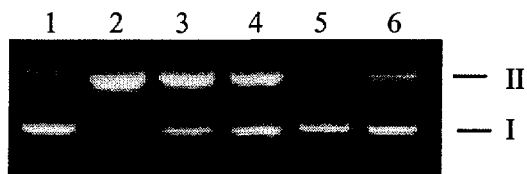


Fig. 5. Effect of polyamine on the protection of strand breaks induced by UV-irradiation.

300 ng of pUC18 DNA was irradiated with UV at a dose of 5000 J/m². Polyamines were added at the final concentration of 2 mM. II and I indicate open circular and closed circular DNA, respectively.

Lanes: 1, control; 2, DNA only; 3, putrescine; 4, cadaverine; 5, spermidine; 6, spermine.

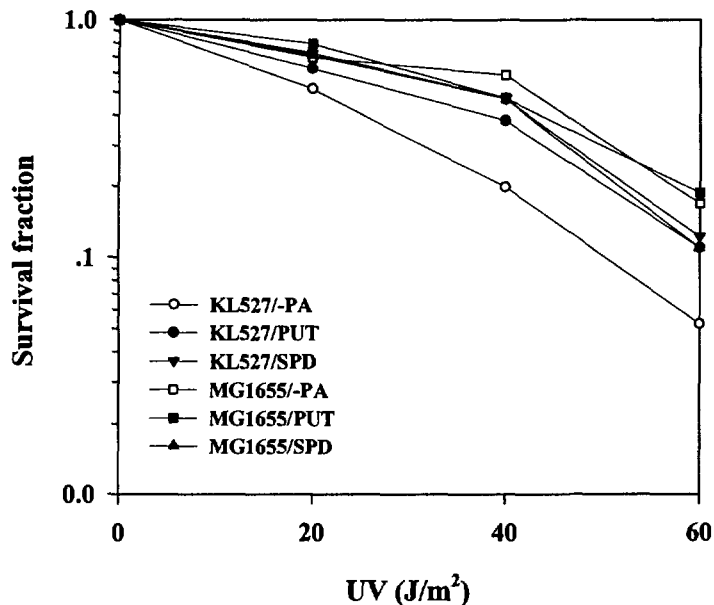


Fig. 6. Effect of polyamine on the survival of polyamine deficient mutant (KL527) and wild type (MG1655) strains irradiated with UV. Cells were aerobically grown in glucose minimal media with and without polyamine (1 mM) until reached to 0.2 of OD₆₀₀ at 37°C. These exponentially growing cells were subsequently irradiated with UV, then survived colonies were counted.

Abbreviations: -PA, polyamine lacking condition; PUT, 1 mM putrescine; SPD, 1 mM spermidine.

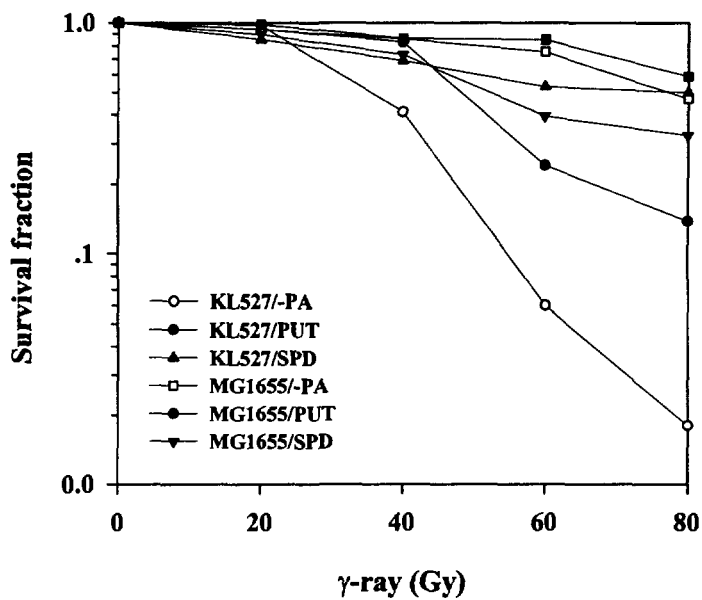


Fig. 7. Effect of polyamine on the survival of polyamine deficient mutant (KL527) and wild type (MG1655) strains. Cells were aerobically grown in glucose minimal media with and without polyamine (1 mM) until reached to 0.2 of OD_{600} at 37°C. Cells were subsequently irradiated with γ -rays at the graded doses, then survived colonies were counted. Abbreviations: -PA, polyamine lacking condition; PUT, 1 mM putrescine; SPD, 1 mM spermidine.

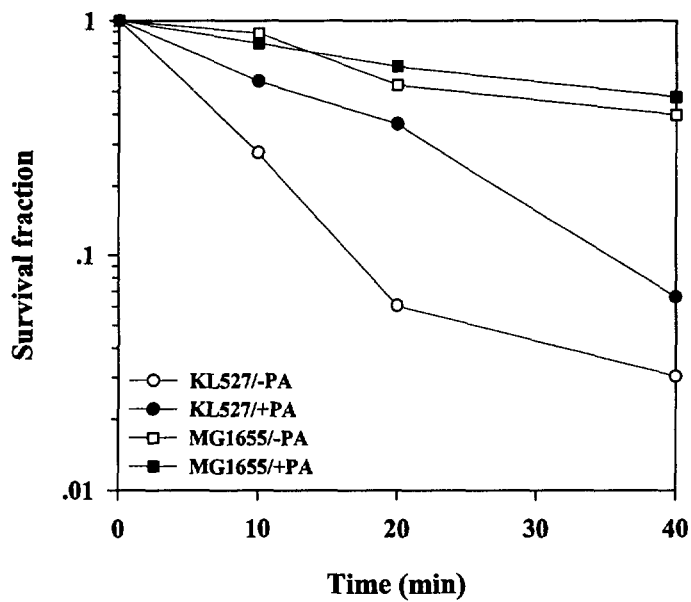


Fig. 8. Effect of polyamine on the survival of polyamine deficient mutant (KL527) and wild type (MG1655) strains. Cells were aerobically grown in glucose minimal media with and without polyamine (1 mM spermidine) until reached to 0.2 of OD₆₀₀ at 37°C. Cells were subsequently exposed to H₂O₂ (10 mM).

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서번호	INIS 주제코드
KAERI/RR-1797/97			
제 목 / 부 제	방사선에 의한 유전자손상 방어기술연구		
연구책임자 및 부서명	이 정 호 (원자력환경안전연구팀)		
연구자 및 부서명	김 인 규 (방사선생체영향해석분야), 이 강 석 ("), 김 국 찬 ("), 심 혜 원 (")		
발 행 지	대 전	발행기관	한국원자력연구소
발행일	1998. 1. .		
페 이 지	p.28	도 표	유(√), 무()
크 기	cm		
참고사항	'97 기관고유사업, 원자력기반연구		
비밀여부	공개(√), 대외비(), 급비밀	보고서종류	연구보고서
연구위탁기관		계약 번호	
초록 (300 단어 내외)	<p>구리이온을 함유하고 있는 혈청 단백질인 ceruloplasmin은 철 대사에 필수 불가결한 역할을 한다고 사료되는데, 그 외에 항산화 특성을 갖고 있다. Ceruloplasmin은 hydroxyl radical의 생성 및 지질의 과산화를 방지할 뿐만 아니라, dithiothreitol/FeCl₃ system에서 발생한 hydroxyl radical을 즉시 제거할 수 있다.</p> <p>폴리아민의 종류인 spermidine, spermine은 hydroxyl radical에 의한 DNA 손상을 방어하였으며, 이 연구에서 사용된 4개의 폴리아민 모두 UV에 의한 DNA 손상을 방어하였다. 폴리아민 결손 돌연변이주인 KL527에서 UV조사 후의 세포 생존율이 외인성 폴리아민 putrescine과 spermidine 공급에 의해 약간 증가되었다. 그러나, 대조군주인 MG1655의 세포 생존율은 폴리아민 공급에 의해 별 영향을 받지 않았다. 방사선 조사된 세포에서, 폴리아민 결손 돌연변이주인 KL527의 세포 생존율은 첨가한 폴리아민, putrescine과 spermidine 공급에 의해 현저히 증가하여, MG1655 균주는 폴리아민 공급과 상관없이 대조군과 비슷했다. 이 결과는 폴리아민이 세포수준과 DNA수준에서 상당한 방사선 방호 가능성이 있음을 시사한다.</p>		
주제명 키워드 (10단어 내외)			
주제어: 셀룰로플라즈민, 항산화물질, ·OH, 폴리아민, 방사선방호, 세포생존률			

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-1797/97			
Title/Subtitle	Protection of DNA strand breakage by radiation exposure		
Project Manager and Dept.	Jeong Ho Lee(Environment Radiation Research Dept.)		
Researcher and Dept.	In Gyu Kim (Radiation Biology Dept.), Kang Suk Lee("), Kug-Chan Km("), Hae Won Shim(")		
Pub. Place	Daejeon	Pub. Org	KAERI
Page	p.28	Fig. and Tab.	Yes(✓), No()
Pub. Date	1998. 1. .		
Size	cm		
Note	'97 Annual report		
Classified	Open(✓), Outside(),	Class	Report type
			Research Report
Sponsoring Org.		Contract No.	
Abstract (About 300 Words)	<p>Human ceruloplasmin, the plasma copper containing protein, is thought to play an essential role in iron metabolism, but it also has antioxidant properties. Ceruloplasmin directly scavenged hydroxyl radicals(·OH) generated in dithiothreitol/FeCl₃ system besides inhibitory function of hydroxyl radical formation and lipid peroxidation.</p> <p>Polyamines, spermidine and spermine, significantly protected the supercoiled DNA strand breakage by hydroxyl radicals and DNA strand breakage by UV was highly protected by all four polyamines used in this study. In polyamine deficient mutant KL527. It was shown that cell survivability following UV irradiation was slightly increased by exogenous polyamines putrescine and spermidine supplement. however the cell survivability of wild type(MG1655) was not influenced by polyamine supplement. In γ-irradiated cells, cell survivability of polyamine-deficient mutant strain KL527 was significantly increased by exogenous putrescine and spermidine supplement and that of wild type strain MG1655 was similar irrespective of polyamine supplement. These results implicate the possibility that polyamines play a potent role in radioprotection of cell and DNA level.</p>		
Subject Keywords (About 10 Words)			
<p>keywords : ceruloplasmin, antioxidant, hydroxyl radical, polyamine, supercoiled DNA, radioprotection, cell survivability</p>			