



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](#)

석사학위논문

방사선에 의해 유도된 피부 손상에 대한
Phloroglucinol의 방사선 방어 효과

제주대학교

차세대융복합과학기술협동과정

김 아 름

2016년 2월



방사선에 의해 유도된 피부 손상에 대한
Phloroglucinol의 방사선 방어 효과

지도교수 박 재 우, 지 영 혼

김 아 름

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2015. 12.

김아름의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	정 동 기	(인)
위원	박 재 우	(인)
위원	지 영 혼	(인)

차세대융복합과학기술협동과정

일반대학원

제주대학교

TABLE OF CONTENTS

Table of contents	1
List of tables	2
List of figures	3
List of abbreviations	4
Abstract	5
Introduction	7
Materials and methods	10
Results	14
Discussion	19
References	23
Tables	29
Figures	30

LIST OF TABLES

Table 1. Dermal papilla shape of the dorsal skin in mice.

LIST OF FIGURES

- Figure 1.** Hair follicles structure in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 2.** Hair bulb diameter in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 3.** Dermal papilla shape in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 4.** Melanocytes density in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 5.** Apoptotic fragments in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 6.** Typical apoptotic fragments in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 7.** p53 immunoreactivity in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 8.** Cleaved caspase-3 immunoreactivity in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 9.** p53 expression in 8.5Gy irradiated mice skin.
- Figure 10.** Ki-67 immunoreactivity in 8.5Gy irradiated mice skin.

LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	Analysis of variance
DAB	3,3'-diaminbenzidine tetrachloride
DNA	Deoxyribonucleic acid
EC	EpiCeram
ECL	Enhanced chemiluminescence
H&E	Hematoxylin-eosin
HRP	Horseradish peroxidase
IR	Irradiation
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline-triton X100
PG	Phloroglucinol
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
TUNEL	Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated d-Uridine 5' triphosphate nick end labelling

Abstract

Radioprotective potentials and its mechanism of Phloroglucinol on the skin in gamma-ray irradiated mice

Areum Kim

(Supervised by Professor Jae-Woo Park and Youngheun Jee)

Departments of Advanced Convergence Technology & Science

When exposed to gamma-rays, hair follicle stem cells, immediately go through apoptosis, which injures their rapid differentiation essential for the regeneration of hair. Phloroglucinol (PG) is a phenolic compound of *Ecklonia cava*, brown algae abundant in Jeju island, Korea. Containing plentiful polyphenol, PG is known for its instructive effects by inhibiting apoptosis, scavenging oxygen radicals, and protecting cells against oxidative stress. In this study, we demonstrate that PG rescues radiosensitive hair follicle stem cells from gamma radiation-induced apoptosis and DNA damage. To identify the hair follicle protection capability of PG, we irradiated gamma-rays to the whole body of C57BL/6 mice at day 6 after depilation with or without PG. PG or EpiCeram (EC) was applied once at 17.8 hours before irradiation and, after irradiation, it was applied at 17.8 hours intervals until autopsy. At 8 hours after gamma-rays irradiation, PG not only decreased apoptosis which was suppressed by radiation as shown in control but also decreased morphological changes of hair follicles. Our results suggest that PG presents radioprotective effects by inhibiting apoptosis of radiosensitive hair follicle

stem cells and can PG protects hair follicle stem cells from gamma-ray induced damage.

Key words: Phloroglucinol, hair follicle stem cells, gamma-ray, radioprotection

1. 서론

Phloroglucinol (PG)은 다시마목 다시마과에 속하는 갈조류인 감태 (*Ecklonia cava*)의 주요 성분이며, 면역조절 (immunomodulation) 및 면역활성 (immune activation) (Ahn 등, 2008), 항산화 효과 (antioxidant activity) (Ahn 등, 2007), 항염 효과 (anti-inflammatory effect) (Wijesinghe 등, 2012) 등 다양한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 방사선으로 인하여 손상된 골수 내 조혈모세포와 비장세포 등 면역세포의 세포자멸사 (apoptosis)가 억제됨을 보고하였으며 (Park 등, 2011), 방사선으로 인하여 손상된 소장 내 성체줄기세포의 세포자멸사 (apoptosis) 억제 및 재생에 효과가 있음이 보고되면서 (Ha 등, 2013), PG가 방사선 방어 효과를 가지는 물질로서 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 이러한 선행 보고 등을 토대로 성체줄기세포 중 하나인 마우스의 모낭 성체줄기세포에 대한 방사선 방어 가능성을 확인하였다.

현대에 이르러 방사선 및 방사성 동위원소는 의학, 농업 및 공업 등 다양한 분야에서 널리 사용하고 있다. 그에 따라 관련 기관 및 인력이 증가하고 있다. 그 중 의학 분야에서의 방사선 및 방사성 동위원소는 질병의 진단뿐만 아니라 치료에도 이용하고 있다. 또한 양전자 단층촬영 (positron emission tomography, PET)과 같은 진단용 장비가 연구·개발됨에 따라 방사선 피폭의 기회가 증가하였다. 또한 암환자의 발생이 점차 증가하여 암 조직의 사멸을 위하여 외과적 수술과 화학적 항암치료 등과 더불어 방사선을 이용한 항암치료도 증가하는 추세에 있다 (Karakatsanis 등, 2015). 방사선을 이용한 항암치료 시에는 종양세포뿐만 아니라 그 주변부의 정상 조직에도 영향을 끼쳐 문제가 되고 있다. 방사선으로부터 인체가 노출되면 방사선으로 인한 직접적인 DNA (deoxyribonucleic acid) 손상이 일어나거나, 세포내 물 분자의 이온화를 유도하여 hydrogen ($\cdot\text{H}$), hydrated electron (e^-), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide radical, hydrogen peroxide, alkoxy radical, peroxy radical (하 등, 2011)과 같은 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)에 의한 간접적 세포 손상이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Halliwell 등, 1999; Park 등, 2008). 이와 같이 방사선으

로 인하여 생체 내에서 일어난 물의 대사 결과 생성된 활성산소에 의하여 단백질의 SH기나 DNA와 반응하여 화학결합의 절단이나 가교결합을 형성하여 생체 구성 분자의 구조적인 변화를 유도한다 (Pollycove, 2006). 이러한 방사선의 직접적·간접적 영향은 인체 조직 중에서도 특히 분열 및 증식 속도가 빠른 골수의 조혈모세포, 소장 및 모낭 성체줄기세포 (hair follicle stem cells)가 방사선에 민감하며 (Plikus 등, 2015), DNA, RNA (ribonucleic acid) 및 단백질의 손상 정도에 따라 세포의 기능을 잃거나 세포자멸사 (apoptosis)를 유도한다 (Clarke 등, 1997).

방사선 치료 시 그 부작용으로 나타나는 피부 손상과 탈모 현상은 가시적인 형태학적 변화가 뚜렷하여 오래 전부터 알려져 왔으며, Daniels가 1896년 방사선 조사에 의한 탈모 현상을 보고하였다. 방사선에 의하여 손상된 피부는 조사된 선량에 따라 다양한 반응이 나타나는데 탈모, 홍반, 수포, 궤양 등의 급성반응은 일반적인 화상의 증상과 비슷하다고 알려져 있다. 그러나 방사선으로 인하여 손상된 피부에서 나타나는 궤양은 심한 통증을 동반하고 그 부위에 암이 호발하는 증상은 방사선 특이적이라고 할 수 있다 (고 등, 2003). 또한 탈모는 모낭 성체 줄기세포의 손상으로 인하여 나타나는 것으로 알려져 있는데 방사선 조사 후에 헤어 주기 (hair cycle)가 변화하고 모낭의 지름이 감소함에 따라 탈모가 일어나며, 모낭이 굵고 뒤틀리는 방사선에 특이적인 형태학적 변화가 동반된다 (Sugaya 등, 2015). 따라서 이러한 피부 손상과 탈모 현상은 방사선 치료를 받는 환자로 하여금 극심한 통증과 심리적인 고통을 주기 때문에 방사선에 의한 피부 손상을 줄여줄 수 있는 방사선 방어제를 국내·외에서 개발 중에 있다.

기존의 방사선 방어제로는 -SH (thiols)계 화합물인 시스테인 (cysteine), 시스타민 (cystamine), 2-머캅토에틸아민 (2-mercaptoethylamine; cysteamine) 등이 개발되어 사용하였으나 (고 등, 2003) 오심, 구토, 저혈압 등의 부작용으로 인하여 새로운 방사선 방어제의 개발이 중요한 문제로 대두되었다 (Miura, 2004). 또한 대표적인 방사선 방어제로 알려진 thiol 복합체인 WR-2721 [Amifostin; S-2-(3-aminopropoylamino) ethylphospherothiotic acid] 역시, 중간 대사산물의 독성으로 인한 두통, 구토, 식욕부진, 발열 등의 부작용이 보고되었고 일부 장기에서 방사선 방어 효과가 저해됨이 밝혀져 (Antonadou 등,

2001) 화합물로 이루어지지 않았으며, 천연물 (natural product)에서 방사선 방어 효능을 가지는 물질을 찾는 연구가 활발히 진행 중에 있다. 특히 *Aloe arborescens* (Chitra 등, 1998), *aloe vera* (Williams 등, 1996), chamomile (Maiche 등, 1991), amond (Maiche 등, 1991)와 *centella asiatica* (Chen 등, 1999) 등은 방사선에 의해 손상된 피부에서 효과가 있다고 보고되었으나, 이는 방사선에 의해 손상된 피부 염증 반응에서 일부 항염 효과 (anti-inflammatory effect)가 보고된 것이다. 따라서 본 연구를 통하여 방사선으로 인하여 손상된 마우스 피부의 모낭 성체줄기세포 (hair follicle stem cells)에 대한 PG의 피부에서의 방사선 방어 효과를 구명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

실험동물

실험동물은 6~7주령 C57BL/6 마우스 (OrientBio, South Korea)를 사용하였다. 실험동물은 표준 사육조건 온도 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$ 로 유지되는 환경에서 사료 (LabDiet 5L79; OrientBio, South Korea)와 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 정상 대조군 (Non IR), 방사선 조사 대조군 (IR), 시중 시판되고 있는 피부 손상 연고제인 EpiCeram[®] (Swiss American Products Inc., USA)을 처리한 양성 대조군 (IR+EpiCeram (IR+EC), 이하 IR+EC) 및 시료 병행 처리군 (IR+Phloroglucinol (PG), 이하 IR+PG)으로 나누어 실험하였다. 본 연구는 제주대학교 실험동물윤리위원회에 동물실험 계획서를 제출하여 승인 받았으며 (동물실험 승인번호 2015-0028), 동물실험 및 관리는 제주대학교 실험동물윤리위원회의 윤리적 기준에 의거하여 시행하였다.

시료와 처치

8.5Gy의 방사선을 조사하기 6일 전 털의 동기화를 위하여 마우스 등쪽의 털을 제모하였고, 6일간의 휴지기를 가지며 안정화시켰다. 방사선 조사 17.8 시간 전 제모한 마우스 등쪽 피부에 시료를 도포하였다. IR+EC군에는 EC (Swiss American Products Inc., USA)를 제모한 등쪽 피부에 얇게 도포하였으며, IR+PG군에는 PG (Sigma, USA)를 아세톤에 희석하여 10mg/kg의 용량으로 도포하였다. 시료의 도포는 방사선 조사 후에도 17.8 시간 간격으로 실시하였다.

방사선 조사

등쪽 털을 제모한 마우스에 대한 방사선 조사는 close-fitting perspex box ($3\times 3\times 11\text{cm}$)를 이용하여 제주대학교 원자력과학기술연구소의 ^{60}Co 감마선 조사기 (Theratron-780 teletherapy; C-188 9.9 TBq; Nordion, Canada)를 이용하여 100cm의 거리에서 8.5Gy를 일회 전신 조사하였다.

Hematoxylin-Eosin (H&E) 염색

8.5Gy의 방사선 조사 후 8시간 쯤 부검하여 마우스의 등쪽 피부를 채취한 후 10% 중성 포르말린에 고정하고, 통상적인 방법에 따라 파라핀 블록을 제작하였다. 파라핀 블록을 3 μ m로 박절하여 이를 슬라이드에 부착한 뒤, 탈파라핀화를 위하여 xylene에 3분씩 3단계를 거치고 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol에 단계적으로 3분씩 담가 함수시킨 후 흐르는 물에서 5분간 수세하여 알코올을 제거하였다. Mayer's hematoxylin 용액을 이용하여 핵을 염색하였고 eosin 용액을 이용하여 세포질과 결합조직 등을 염색한 후 흐르는 물에서 3분간 수세하였다. 그 후 70%, 80%, 95%, 100% ethanol에 단계적으로 3분씩 담근 후 xylene에 3분씩 3단계를 거쳐 탈수 및 투명화 과정을 거친 뒤 봉입하였다. 봉입 후 광학현미경에서 관찰하였고 모낭의 형태학적 변화는 200배율에서, apoptotic fragments는 400배율에서 관찰하여 image J 프로그램 (National Institute of Health (NIH), Maryland, USA)을 이용해 분석하였다.

면역조직화학(Immunohistochemistry) 염색

파라핀 블록을 3 μ m로 박절하여 이를 슬라이드에 부착한 뒤, 탈파라핀화를 위하여 xylene에 3분씩 3단계를 거치고 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol에 3분씩 담가 함수시켰다. 그 후 항원성 부활화를 위하여 citrate 완충액 (10mM, pH 6.0)을 마이크로웨이브 오븐을 이용하여 예열하였다. 예열된 citrate 완충액에 슬라이드를 담근 후 10분간 열처리를 한 후 흐르는 물에서 5분간 수세하였다. 조직 내 내인성 peroxidase를 억제하기 위하여 30분간 0.3% 과산화수소 용액에 담가 두었다. 또한, 비특이적 면역반응을 방지하기 위하여 blocking goat serum을 30분간 반응시킨 후 조직 내 p53, cleaved caspase-3와 Ki-67의 발현을 확인하기 위하여, p53 항체 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), cleaved caspase-3 항체 (1:100; Cell signaling Technology, Beverly, MA, USA)와 Ki-67 항체 (1:100; Abcam, Cambridge, UK)를 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 45분 동안 반응시킨 다음 DAB (3,3'-diaminobenzidine)을 이용하여 발색하였고 양성 반응이 나타난 조직

은 hematoxylin 용액으로 대조염색을 하였다. 각각의 단계 사이에는 PBS (Phosphate buffered saline)와 0.3% PBS-T (phosphate buffered saline-triton X100)로 충분히 세척하였다. 탈수 및 투명화 과정을 위하여 70%, 80%, 95%, 100% ethanol에 단계적으로 3분씩 담근 후 xylene에 3분씩 3단계를 거친 후 봉입하였다. 봉입 후 광학현미경에서 200배율 및 400배율을 이용하여 관찰하였고, image J 프로그램 (National Institute of Health (NIH), Maryland, USA)을 이용해 분석하였다.

TUNEL assay

과라핀 블록을 3 μ m로 박절하여 이를 슬라이드에 부착한 뒤, 탈과라핀화를 위하여 xylene에 3분씩 3단계를 거치고 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol에 3분씩 담가 흡수시키고 조직 내 내인성 peroxidase를 억제하기 위하여 5분간 3% 과산화수소 용액에 담가 두었다. 그 후 equilibration buffer와 10분간 상온에서 반응시킨 뒤 working strength TdT enzyme과 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 working strength stop/wash buffer에 담가 15초 간 살짝 흔들어준 후 10분 동안 상온에 방치하였다. Anti-digoxigenin conjugate과 30분간 상온에서 반응시킨 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine)를 이용하여 발색하였고 양성 반응이 나타난 조직은 methyl green 용액으로 대조염색 하였다. 각각의 단계 사이에는 PBS와 DW를 이용하여 충분히 세척하였다. 100% n-butanol과 xylene을 이용하여 탈수와 투명화 과정을 거친 후 봉입하였다. 봉입 후 광학현미경에서 200배율 및 400배율을 이용하여 관찰하였고 image J 프로그램 (National Institute of Health (NIH), Maryland, USA)을 이용해 분석하였으며, 본 실험에 사용한 TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated d-Uridine 5' triphosphate Nick End Labelling) assay는 Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore corporation, USA)를 구입하여 사용하였다.

Western blot analysis

방사선 조사 8시간 후 부검한 마우스의 피부를 채취한 후, lysis buffer

(40mM Tris pH 8.0, 120mM NaCl, 0.1mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 0.5 µg/µl leupeptin, 10mM sodium orthovanadate; Sigma-Aldrich, USA, 2µg/mL aprotinin; Millipore, USA)에 넣고 균질화기 (homogenizer)를 이용하여 마쇄한 후, 14,240×g로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 분리하여 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질의 정량하여 10% SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동을 통하여 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막 (nitrocellulose membrane, Bio-Rad Laboratories, CA, USA)에 120분 동안 100V로 전이시켰다. 그 후 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 2% 탈지분유 (skim milk; maeil, South Korea)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 1차 항체로 p53 (1:250, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)을 사용하여 1시간 동안 반응시킨 뒤 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, USA)를 사용하여 45분간 반응시키고, HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-rabbit IgG를 사용하여 45분간 반응시켰다. 단백질 밴드는 ECL detection kit (Cyanagen, Italy)를 사용하여 발현시켜 Fusion Solo[®] (Vilber Lourmat, Germany)를 이용하여 각각의 밴드 이미지를 얻은 후 image J 프로그램 (National Institute of Health (NIH), Maryland, USA)으로 밴드 밀도를 구한 후 분석하였다.

통계처리

각각의 실험결과는 평균값±표준편차로 나타내었으며, dBSTAT 프로그램을 이용하여 ANOVA (analysis of variance) test를 실시하였다. $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

3. 결과

PG 도포에 따른 모낭의 형태 변화 양상

방사선을 조사한 마우스에서 PG의 도포가 모낭의 형태학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H&E 염색을 수행하여 모낭의 형태학적 변화를 확인하였다 (Fig. 1A-D).

Non IR군에서 길고 곧은 모양의 모낭 개수가 13.3 ± 0.67 개인 것을 확인하였고 8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군에서 길고 곧은 모양의 모낭 개수가 3.3 ± 0.67 개로 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.005$). 반면에 IR+PG군에서는 길고 곧은 모양의 모낭 개수가 8.7 ± 0.88 개로 IR군에 비하여 유의성 있게 증가함을 보였고 ($p < 0.01$), IR+EC군에서도 10.7 ± 0.33 개의 길고 곧은 모양의 모낭 개수를 확인하였다 (Fig. 1E, $p < 0.005$). 이와 상응하는 결과로서 Non IR군에서는 굵고 뒤틀린 모양의 모낭 개수가 1.7 ± 0.66 개로 현저히 낮은 반면에 8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군에서는 11.7 ± 0.672 개로 확연한 증가를 보였다 ($p < 0.005$). 또한, IR+PG군과 IR+EC군에서 굵고 뒤틀린 모양의 모낭 개수는 각각 6.3 ± 0.88 , 4.3 ± 0.33 개로 방사선 조사 대조군보다 굵고 뒤틀린 모양의 모낭 개수가 감소함을 확인하였다 (Fig. 1F, $p < 0.01$, $p < 0.005$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부의 모낭의 형태학적 변화를 억제시킴을 확인할 수 있었다.

PG 도포에 따른 털망울 (hair bulb)의 지름 변화 양상

방사선을 조사한 마우스에서 PG의 도포가 털망울 (hair bulb)의 지름에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H&E 염색을 수행하여 털망울 (hair bulb)의 지름을 확인하였다 (Fig. 2).

Non IR군의 털망울 (hair bulb) 지름은 $765.9 \pm 14.98 \mu\text{m}$ 인데 반하여 8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군에서는 $482.2 \pm 21.31 \mu\text{m}$ 로 유의성 있게 감소함을 확인하였다 ($p < 0.005$). 반면, IR+PG군과 IR+EC군의 털망울 (hair bulb) 지름은 각각 $613.3 \pm 4.92 \mu\text{m}$, $754.7 \pm 24.65 \mu\text{m}$ 로 IR군에 비하여 털망울 (hair bulb)의 지름이

긴 것을 확인하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.005$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부의 털망울(hair bulb) 지름 감소를 억제시킴을 확인 할 수 있었다.

PG 도포에 따른 진피유두 (dermal papilla)의 모양 변화 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부의 진피유두 (dermal papilla)의 모양 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H&E를 수행하여 진피유두 (dermal papilla)의 형태학적 변화를 확인하였다 (Fig. 3).

진피유두 (dermal papilla)의 모양은 헤어 주기 (hair cycle)를 진행함에 따라 점차 얇아지다가 둥글게 변하고, 동시에 모양의 길이도 점점 짧아지는 것으로 알려져 있는데, Non IR군에서는 진피유두 (dermal papilla)의 모양이 좁아짐을 확인하였으나, 8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군의 진피유두 (dermal papilla) 모양이 둥글게 변한 것을 확인 할 수 있었다. 반면에, IR+PG군의 진피유두 (dermal papilla) 모양은 얇게 변한 것을 확인 할 수 있었다 (Table 1). 이는 IR군과는 달리 헤어 주기 (hair cycle)를 진행하고 있음을 시사한다.

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부의 진피유두 (dermal papilla) 모양의 변화를 확인함으로써, 방사선 조사 대조군과는 달리 헤어 주기 (hair cycle)를 진행하고 있음을 확인할 수 있었다.

PG 도포에 따른 모양의 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도 변화 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부의 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도에 미치는 영향을 확인하기 위하여 H&E를 수행하여 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도를 확인하였다 (Fig. 4).

8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군의 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도는 Non IR군에 비하여 모양의 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도가 현저히 감소함을 확인할 수 있었다. 반면, IR+PG군과 IR+EC군에서는 IR군의 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도보다 다소 증가함을 육안으로 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 모양의 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도 감소를 억제시킴을 확인할 수 있었다.

PG의 도포에 따른 모낭의 세포자멸사 (apoptosis)에 미치는 영향 평가

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부 모낭의 세포자멸사 (apoptosis)에 미치는 영향을 H&E 염색을 수행하여 모낭줄기세포의 핵의 위축 및 염색질 응축과 세포질 분절과 같은 형태학적 변화를 확인하였다 (Fig. 5).

하나의 모낭 당 apoptotic fragments를 확인한 결과, Non IR군과 IR+ EC군의 apoptotic fragments는 각각 0.6 ± 0.24 , 5.3 ± 0.08 개였으나 ($p < 0.005$), 8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군에서는 apoptotic fragments가 14.4 ± 4.47 개로 확인한 증가를 보였다 ($p < 0.005$). 반면에 IR+ PG군의 apoptotic fragments는 6.7 ± 1.56 개로 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다 ($p < 0.005$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부 모낭의 세포자멸사 (apoptosis)를 억제시킴을 확인할 수 있었다.

PG의 도포에 따른 모낭의 TUNEL assay의 양성 세포 발현 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스의 피부 모낭의 세포자멸사 (apoptosis)에 미치는 영향을 TUNEL assay를 수행하여 모낭줄기세포의 핵의 위축 및 염색질 응축과 세포질 분절과 같은 형태학적 변화를 확인하였다 (Fig.6).

H&E 염색과 함께 *In situ* DNA-end labeling을 이용한 TUNEL assay를 통하여 apoptotic fragments를 확정하였다. 그 결과 H&E 염색과 마찬가지로 Non IR군에서는 apoptotic fragments가 0.7 ± 0.00 개로 그 수가 미미하였으나 (Fig. 6A, E, I), 8.5Gy의 방사선을 조사한 IR군에서는 16.9 ± 1.05 개로 apoptotic fragments가 크게 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 6B, F, I, $p < 0.005$). 반면에 IR+ PG군에서는 8.7 ± 0.80 개로 IR군에 비하여 약 50% 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었고 (Fig. 6C, G, I, $p < 0.005$), IR+ EC군에서도 6.5 ± 0.60 개로 IR+ PG군과 비슷한 수치를 보였다 (Fig. 6D, H, I, $p < 0.005$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부 모낭의 세포자멸사 (apoptosis)를 억제시킴을 확인할 수 있었다.

PG의 도포에 따른 모낭의 p53 양성 세포 발현 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부의 모낭에서 p53 양성 세포 발현 양상에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 수행하여 p53 양성 세포 발현을 확인하였다 (Fig. 7).

방사선 조사 후 세포자멸사 (apoptosis) 유도에 영향을 미치는 인자인 p53의 양성 세포 발현 양상을 평가한 결과, Non IR군에서는 1.7 ± 0.54 개로 거의 발현하지 않았으며 (Fig. 7A, E, I), IR+EC 역시 9.9 ± 0.53 개로 p53이 미미하게 발현하였다 (Fig. 7D, H, I, $p < 0.005$). 반면에 8.5Gy를 조사한 IR군에서는 23.1 ± 1.40 개로 p53의 발현양이 확연하게 증가하였으나 (Fig. 7B, F, I, $p < 0.005$), IR+PG군에서는 9.8 ± 1.07 개로 p53의 발현양이 IR군보다 유의적으로 감소하였고 또한, IR+EC군과 비슷한 수치임 확인하였다 (Fig. 7C, G, I, $p < 0.005$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부 모낭의 세포자멸사 (apoptosis) 유도에 영향을 미치는 인자로 알려진 p53의 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

PG의 도포에 따른 모낭의 cleaved caspase-3 양성 세포 발현 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부의 모낭에서 cleaved caspase-3 양성 세포 발현 양상에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 수행하여 cleaved caspase-3 양성 세포 발현을 확인하였다 (Fig. 8).

Non IR군에서는 cleaved caspase-3의 발현양이 0.8 ± 0.20 개로 미미한 수준으로 발현하였고 (Fig. 8A, E, I), IR+EC군 역시 10.0 ± 0.55 개로 cleaved caspase-3가 미미하게 발현하였다 (Fig. 8D, H, I, $p < 0.005$). 반면에 8.5Gy를 조사한 IR군에서는 cleaved caspase-3의 발현양이 22.6 ± 1.70 개로 크게 증가하였고 (Fig. 8B, F, I, $p < 0.005$), IR+PG군에서는 15.3 ± 1.75 개로 IR군에 비하여 cleaved caspase-3의 발현이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 8C, G, I, $p < 0.005$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부 모낭의 세포자멸사

(apoptosis) 유도에 영향을 미치는 인자로 알려진 cleaved caspase-3의 발현을 감소시킴을 확인할 수 있었다.

PG의 도포에 따른 모낭의 p53의 발현 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부의 모낭에서 p53 발현 양상을 western blot analysis를 수행하여 p53 발현 양상을 확인하였다 (Fig. 9).

세포자멸사 (apoptosis)를 유도하는 분자인 p53의 발현은 8.5Gy를 조사한 IR군에서 178.0 ± 37.42 로 Non IR군의 92.1 ± 3.6 보다 다소 증가하는 경향을 보였으며, IR+PG군에서는 43.6 ± 1.89 로 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한, IR+EC군 역시 61.5 ± 4.57 로 IR군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 인한 마우스 피부 모낭의 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하는 분자인 p53의 발현을 억제시킴을 확인할 수 있었다.

PG의 도포에 따른 모낭의 Ki-67 양성 세포 발현 양상

PG의 도포가 방사선을 조사한 마우스 피부의 모낭에서 Ki-67 양성 세포 발현 양상에 미치는 영향을 면역조직화학염색을 수행하여 Ki-67 양성 세포 발현을 확인하였다 (Fig. 10).

세포 주기 중 DNA가 합성되는 S기의 후반부부터 G2기를 거쳐 세포질 분열이 일어나 세포가 둘로 나뉘는 M기 중반부까지 발현되는 것으로 알려진 Ki-67의 양성 세포 발현을 통하여 세포 재생을 평가하였다. 그 결과, Non IR군과 IR+EC군에서 Ki-67의 양성 세포의 수는 각각 25.6 ± 1.50 , 23.5 ± 0.45 개였고 (Fig. 10A, D, E), 8.5Gy를 조사한 IR군은 14.4 ± 0.07 개로 Non IR군에 비하여 크게 감소하였다 (Fig. 10B, E, $p < 0.005$). 반면에 IR+PG군에서는 Ki-67 양성 세포의 수가 22.9 ± 3.35 개로 IR군에 비하여 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다 (Fig. 10D, E, $p < 0.01$).

이상의 결과는 PG의 도포가 방사선으로 손상된 마우스 피부 모낭의 줄기세포 복구를 증진시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

4. 고찰

인체에서의 방사선 감수성은 각각 다르게 나타나는데 그 차이는 세포의 종류, 분화 정도 및 증식률에 따라 다르며 세포분열 및 증식이 빠른 세포가 방사선 감수성이 크다고 알려져 있다 (Pawlik 등, 2004). 피부는 표피와 진피로 구성되는데 표피는 세포의 기저층에서 유래된 것으로 방사선에 의한 손상을 받는 부분은 기저층에서 분열하고 있는 줄기세포이며, 진피는 조밀한 결합조직으로 섬유아세포 (fibroblast)와 혈관내피세포 (vascular endothelial cell)가 산재해 있다 (최 등, 2011). 방사선에 의해 피부가 손상되면 수 시간 이내에 홍반 (erythema)이 나타나는데 혈관확장, 부종, 모세혈관으로부터 형질구성요소의 소실에 기인하는 것이며, 기저세포군의 세포자멸사 (apoptosis)로 인하여 건성 또는 습성 박리 (dry or moist desquamation)가 일어난다 (최 등, 2011). 또한 만발반응으로 건성 박리화와 색소 침착의 증가, 방사선섬유증 (radiation fibrosis) 및 모세혈관 확장증 (telangiectasia)이 나타난다 (최 등, 2011). 피부의 부속기관 (skin appendages)인 털은 방사선에 의하여 일시적 탈모와 영구적 탈모를 일으키는데, 방사선으로 유발된 형성 장애에 영향을 받은 털은 짧고 가늘며 탈색되고, 재생된 피부는 건조하고 털이 없다 (고 등, 2003; 최 등, 2011). 특히, 분화능이 큰 피부의 모낭줄기세포는 방사선 감수성이 크기 때문에 방사선 치료 시 급성반응에서 나타나는 탈모와 관련이 있다 (Baxley 등, 1984). 현재까지 방사선 치료법의 발달과 함께 방사선 방어제의 개발도 이루어져 왔으나, 강한 독성과 함께 복수의 약제와 병용함에 따라 복합 부작용이 나타나는 문제가 있다 (Iida 등, 1995).

본 실험에서 양성 대조군에 사용한 EpiCeram[®]은 피부 장벽을 회복 또는 보호시켜 피부 건조증, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 방사선 치료 시 피부질환 등 여러 피부질환과 관련된 건조증, 가려움증의 경감 및 치료 목적으로 개발되었다 (Simpson 등, 2010). Chen 등의 보고에 따르면, *centella asiatica*의 항염 효과 (anti-inflammatory effect)가 방사선으로 인하여 손상된 피부 개선에 간접적으로 영향을 미쳤음을 밝혔다 (Chen 등, 1999). 또한 Amber 등의 보고에 따르면, *aloe vera*의 보습 효과가 방사선으로 인하여 손상된 피부 장벽의 기능 개선으로

이어져 피부 독성을 감소시켰고, 그 효과는 *aloe vera*에 포함되어 있는 폴리페놀 (polyphenol) 성분에서 기인한 것이라고 보고하였다 (Amber 등, 2014). 현재로서는, 방사선 특이적인 피부 보호제에 대한 연구는 미비한 실정으로 (Simpson 등, 2010), 천연물에서 방사선 방어 효능을 가진 물질과 방사선에 의하여 손상된 피부에 대하여 효과가 있는 물질을 찾기 위한 노력이 계속되고 있다 (Hosseinimehr 등, 2007).

폴리페놀 (polyphenol)성 물질로 알려진 PG는 감태에 포함되어 있는 dieckol과 함께 phlorotannin 성분을 함유하여 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) 생성 (Stone 등, 2004) 및 소장염 세포손상 (Ha 등, 2013), 말초 혈액 세포의 세포자멸사 (apoptosis) 억제 (Park 등, 2011) 등에 대하여 방사선 방어 효과가 있음이 보고되기도 하였다. 본 연구에서도 PG는 방사선 조사로 인하여 손상된 피부의 모낭줄기세포의 세포자멸사 (apoptosis)를 유의적으로 감소시키는 것을 확인 할 수 있었는데, 이는 PG에 포함된 유효 활성 성분인 폴리페놀 (polyphenol) 및 플로로탄닌 (phlorotannin) 성분에 기인한 것으로 사료된다.

방사선에 의한 피부 손상에 있어서 모낭의 방사선 방어 효과를 확인하기 위한 지표로서 모낭의 형태학적 변화는 중요한 의미를 갖는다 (Sugaya 등, 2014). 본 연구에서 H&E 염색을 통하여 PG가 방사선 조사에 의한 피부 손상에 대하여 모낭의 형태학적 변화에 미치는 영향을 평가한 결과, 방사선 조사 대조군보다 PG를 도포한 군에서 반듯한 모낭의 수가 유의성 있게 증가하였고, 굵고 뒤틀린 모낭의 수가 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 방사선 조사 시 모낭에서 형태학적인 기형이 나타난다는 Sugaya 등의 보고 (Sugaya 등, 2014)와 일치함을 확인하였다.

헤어 주기 (hair cycle)가 진행됨에 따라 털망울 (hair bulb)의 지름이 감소한다고 알려져 있으며, 방사선 조사 시에도 털망울 (hair bulb)의 지름이 감소한다는 보고가 있다 (Fumiaki 등, 2009). 본 연구에서도 방사선 조사 대조군에서 털망울 (hair bulb)의 지름이 감소하였고 그에 비하여 PG를 도포한 군에서 털망울 (hair bulb)의 지름이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이는 PG의 도포로 인하여 털망울 (hair bulb)에 집적한 모낭줄기세포의 세포자멸사 (apoptosis) 억제 효과와 연관이 있는 것으로 보인다. 또한 방사선 조사 대조군의 진피유두

(dermal papilla) 모양이 둥근 형태를 보인 것에 반해 PG를 도포한 군에서는 얇은 형태를 나타내었는데, 이 역시 PG의 도포로 인하여 모낭줄기세포의 세포자멸사 (apoptosis) 억제 효과와 연관이 있는 것으로 보인다.

모낭에 위치한 멜라닌 세포 (melanocytes)는 털의 색을 결정하는데 작용하며, 방사선 조사 시 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도가 줄어들고 털의 백화 현상을 유도한다 (Hirobe 등, 1994; Russell 등, 1957). 본 연구에서 PG가 방사선으로 인한 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도에 미치는 영향을 확인한 결과, 방사선 조사 대조군보다 PG를 도포한 군에서 멜라닌 세포 (melanocytes) 밀도가 육안적으로 증가함을 확인하였다. 이는 PG의 도포가 모낭줄기세포의 세포자멸사 (apoptosis) 억제뿐만 아니라 멜라닌 세포 (melanocytes)의 세포자멸사 (apoptosis) 억제에도 관여하는 것으로 보인다.

모낭줄기세포와 같은 성체줄기세포와 같이 방사선 감수성이 높은 세포는 방사선 조사 후 몇 시간 이내에 세포자멸사 (apoptosis)를 쉽게 관찰할 수 있다 (Lee 등, 2007). 모낭줄기세포의 세포자멸사 (apoptosis)를 핵과 염색질의 응축과 같은 형태학적 변화 (Selvakumaran 등, 1994)로써 이를 확인하기 위하여 H&E 염색을 한 결과 방사선 조사 대조군에 비하여 PG를 도포한 군에서 세포자멸사 (apoptosis)가 유의적으로 감소함을 확인하였다. 또한, 세포자멸사 (apoptosis)를 확정하기 위하여 *In situ* DNA-end labeling을 이용한 TUNEL assay를 실시하여 모낭줄기세포에서 양성 반응을 확인한 결과 방사선 조사 대조군에 비하여 PG를 도포한 군에서 세포자멸사 (apoptosis)가 유의적으로 감소하는 결과를 얻어 H&E 염색의 결과와 일치함을 확인하였다.

세포자멸사 (apoptosis)에는 많은 인자가 관여하고 있으며, 특히 방사선에 의한 세포자멸사 (apoptosis)는 p53 의존적인 경로를 거쳐 일어난다고 알려져 있다 (Eriksson 등, 2010). 방사선 조사 후 세포자멸사 (apoptosis)에 관여하는 여러 단백질들이 생성되는데, 대표적으로 p53과 bax 단백질이 알려져 있다 (Matsuu 등, 2006). 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하는 단백질은 p53은 bax를 활성화시켜 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하며, bcl-2는 항상성 유지를 위하여 p53과 bax와 같은 세포자멸사 (apoptosis) 유도 단백질이 증가할 경우 감소하게 된다 (Enokido 등, 1996). 또한 방사선 조사로 인하여 활성화된 p53으로 인하여

세포주기가 지연되는데, 이 때 손상에 대한 복구를 하지 못하면 그 세포는 세포자멸사 (apoptosis)를 진행한다 (Verheij, 2000). 방사선 조사에 의한 세포 손상 시에 증가하는 단백질로 알려진 p53의 발현 양상의 변화를 면역조직화학염색으로 확인한 결과 방사선 조사 대조군보다 PG를 도포한 군에서 p53의 양성 세포가 유의적으로 감소함을 확인하였는데, 이는 이전의 결과인 H&E 염색과 TUNEL assay의 결과와 일치함을 확인하였다. 또한 western blot analysis를 이용하여 p53의 발현 양상을 확인하였을 때에도 방사선 조사 대조군보다 PG를 도포한 군에서 p53의 발현이 감소함을 확인하여, 이전의 조직 염색 결과와 같음을 확인하였다. 세포자멸사 (apoptosis)를 일으키는 p53 경로 중 caspase와 같은 단백 분해 효소가 관여하며, inhibitor caspase인 caspase-9의 활성화를 통하여 effector caspase인 caspase-3를 활성화시켜 최종적으로 세포자멸사 (apoptosis)를 유도한다 (Lee 등, 2013). Caspase-3의 발현 정도를 면역조직화학염색으로 확인한 결과 방사선 조사 대조군보다 PG를 도포한 군에서 caspase-3의 양성 세포가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 이로써, 방사선으로 인하여 손상된 모낭줄기세포는 p53 의존적인 경로를 거쳐 세포자멸사 (apoptosis)를 유도하는 것으로 생각되나, 이를 뒷받침하기 위하여 caspase와 같은 단백 분해 효소와 관련 있는 anti-apoptotic 분자인 bcl-2와 bcl-xL와 pro-apoptotic 분자인 bax와 bak에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다.

Ki-67 단백질은 세포 재생의 마커로써 세포 주기 중 DNA가 합성되는 S기부터 세포질 분열이 일어나는 M기 중반부까지 발현한다고 알려져 있다 (Shunji 등, 1990). 방사선 조사 대조군보다 PG를 도포한 군에서 Ki-67의 양성 세포가 유의적으로 증가한 결과는 방사선으로 인하여 손상된 모낭줄기세포에 대하여 PG의 도포가 세포자멸사 (apoptosis)의 억제뿐만 아니라, 방사선에 의해 감소한 모낭줄기세포의 재생능을 상승시키는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, PG가 방사선에 민감한 피부의 모낭줄기세포의 손상을 억제하고, 방사선 조사에 의하여 억제된 모낭줄기세포의 재생능을 향상시키는 것으로 보인다. 본 연구 결과를 토대로 PG를 방사선에 의해 손상된 피부와 모낭줄기세포에 대한 방사선 방어제 및 방사선 치료 시 보조제로써 사용될 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

5. 참고문헌

- 고인호, 박영순, 박인국, 유병규, 이덕규, 지연상. 2003. 방사선 생물학 2nd edition. 청구문화사.
- 최종학, 임한영, 이준일, 강정호, 홍시영, 김정삼, 이인자, 최성관, 지태정. 2011. 의료방사선생물학. 신광출판사.
- 하단비, 김민주, 주해진, 조진희, 빙소진, 임윤규, 현진원, 지영훈. 2011. 저선량 감마선 조사 마우스의 말초면역 세포에 대한 바나듐 함유 제주 워터의 면역 활성화 효과. 한국수의공중보건학회. 35(1):49-59.
- Ahn G, Kim K, Cha S, Song C, Lee J, Heo M, Yeo I, Lee N, Jee Y, Heu M, Jeon Y. 2006. Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. Eur Food Res Technol. 226(1):71-79.
- Ahn G, Hwang I, Park E, Kim J, Jeon YJ, Lee J, Park JW, Jee Y. 2008. Immunomodulatory effects of an enzymatic extract from *Ecklonia cava* on murine splenocytes. Mar Biotechnol(NY). 10(3):278-289.
- Amber KT, Shiman MI, Badiavas EV. 2014. The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity. Integr Cancer Ther. 13(1):38-45.
- Antonadou D, Coliarakis N, Synodinou M, Athanassiou H, Kouveli A, Verigos C, Georgakopoulos G, Panoussaki K, Karageorgis P, Throvalas N. 2001. Randomized phase III trial of radiation-treatment+/-amifostine in patients with advanced-stage lung cancer. Int J Radiat

Oncol Biol Phys. 51(4):915-922.

Baxley Ko, Erdman LK, Henry EB, Roof BJ. 1984. Alopecia: effect on cancer patient's body image. *Cancer Nur.* 7:499-503.

Chen YJ, Dai YS, Chen BF, Chang A, Chem HC, Lin YC, Chang KH, Lai YL, Chung CH, Lai YJ. 1999. The effect of tetrandrine and extracts of *Centella asiatica* on acute radiation dermatitis in rats. *Biol pharm Bull.* 22(7):703-706.

Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. 1998. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Mol Cell Biochem.* 181(1-2):71-76.

Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC, Wyllie AH. 1994. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene.* 9(6):1767-1773.

Enokido Y, Araki T, Tanaka K, Aizawa S, Hatanaka H. 1996. Involvement of p53 in DNA strand break-induced apoptosis in postmitotic CNS neurons. *Eur J Neurosci.* 8(9):1812-1821.

Eriksson D, Stigbrand T. 2010. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol.* 31(4):363-372.

Ha D, Bing SJ, Cho J, Ahn G, Kim DS, Al-Amin M, Park SJ, Jee Y. 2013. Phloroglucinol protects small intestines of mice from ionizing radiation by regulating apoptosis-related molecules: a comparative

immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem.* 61(1):63-74).

Halliwell B, Gutteridge JM. 1999. *Free radicals in biology and medicine.* 3rd edition. Oxford.

Hirobe T. 1994. Effects of gamma-irradiation on the yield of mid-ventral white spots in mice in different genetic backgrounds and at different times during development. *Mutat Res.* 322(3):213-220.

Hossenimehr SJ. 2007. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today.* 12(19-20):794-805.

Iida S, Matsuoka S, Kudo C, Moriya Y, Yoshida T, Saito M. 1995. Combination chemo-immunotherapy of murine solid tumor with OK-432, G-CSF, IL-2, and chemotherapeutics. *Int J Immunopharmacol.* 17(12):973-980.

Karakatsanis NA, Fokou E, Tsoumpas C. 2015. Dosage optimization in positron emission tomography: state-of-the-art methods and future prospects. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 5(5):527-547.

Lee CH, Wu SB, Hong CH, Yu HS, Wei YH. 2013. Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy. *Int J Mol Sci.* 14(3):6414-6435.

Lee H, Kim SH. 2007. Relative biological effectiveness of fast neutrons for apoptosis in mouse hair follicles. *J vet Sci.* 8(4):335-340.

Nakayama F, Hagiwara A, Kimura M, Akashi M, Imamura T. 2009.

Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1. *Exp Dermatol.* 18(10):889-892.

Maiche AG, Grohn P, Maki-Hokkonen H. 1991. Effect of chamomile cream and almond ointment on acute radiation skin reaction. *Acta Oncol.* 30(3):395-396.

Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Okaichi K, Ishii K, Wen CY, Fukuda E, Nakayama T, Nakashima M, Okumura Y, Sekine I. 2006. Sucralfate protects intestinal epithelial cells from radiation-induced apoptosis in rats. *J Radiat Res.* 47(1):1-8.

Miura Y. 2004. Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res.* 45(3):357-372.

Miyauchi S, Hashimoto K, Miki Y. 1990. The innermost cell later of the outer root sheath is positive with Ki-67. *J Invest Dermatol.* 95(4):393-396.

Park E, Jeon SM, Joo HG, Hwang KK, Jee Y. 2008. Radioprotective effect of fucoidan against hematopoietic and small intestinal stem cells of γ -ray irradiated mice. *Korean J vet Res.* 48:393-399.

Park SJ, Ahn G, Lee NH, Park JW, Jeon YJ, Jee Y. 2011. Phloroglucinol(PG) purified from *Ecklonia cava* attenuates radiation-induced apoptosis in blood lymphocytes and splenocytes. *Food Chem Toxicol.* 49(9):2236-2242.

- Pawlik TM, Keyomarsi K. 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59(4):928-942.
- Plikus MV, Van Spyk EN, Pham K, Geyfman M, Kumar V, Takahashi JS, Andersen B. 2015. The circadian clock in skin: implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity. *J Biol Rhythms.* 30(3):163-182.
- Pollycove M. 2006. Radiobiological basis of low-dose irradiation in prevention and therapy of cancer. *Dose Response.* 5(1):26-38.
- Russell LB, Major MH. 1957. Radiation-induced presumed somatic mutations in the house mouse. *Genetics.* 42(2):161-175.
- Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, Hoffman B, Liebermann D. 1994. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TG beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene.* 9(6):1791-1798.
- Simpson EL. 2010. Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Curr Med Res Opin.* 26(3):633-640.
- Sugaya K, Hirobe T. 2014. Exposure to gamma-rays at the telogen phase of the hair cycle inhibits hair follicle regeneration at the anagen phase in mice. *Int J Radiat Biol.* 90(2):127-132.
- Sugaya K, Ishihara Y, Inoue S, Hirobe T. 2015. The effects of gamma rays on the regeneration of hair follicles are carried over to later hair cycles. *Int J Radiat Biol.* 2:1-7.

Verhij M, Bartelink H. 2000. Radiation-induced apoptosis. Cell Tissue Res. 301(1):133-142.

Wijesinghe WA, Jeon YJ. 2012. Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: a review. Int J Food Sci Nutr. 63(2):225-235.

Williams MS, Burk M, Loprinzi CL, Hill M, Schomberg PJ, Nearhood K, O'Fallon JR, Laurie JA, Shanahan TG, Moore RL, Urias RE, Kuske RR, Engl RE, Eggleston WD. 1996. Phase III double-blind evaluation of an aloe vera gel as a prophylactic agent for radiation-induced skin toxicity. Int J radiat Oncol Biol Phys. 36(2):345-349.

Table 1. Dermal papilla shape of the dorsal skin in mice

Non IR	IR	IR+ PG	IR+ EC
narrow	round	thin	narrow

Non-irradiated mice (Non IR), irradiated mice (8.5Gy; IR), irradiated (8.5Gy) plus PG (10mg/kg) treated mice (IR+ PG), irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC).

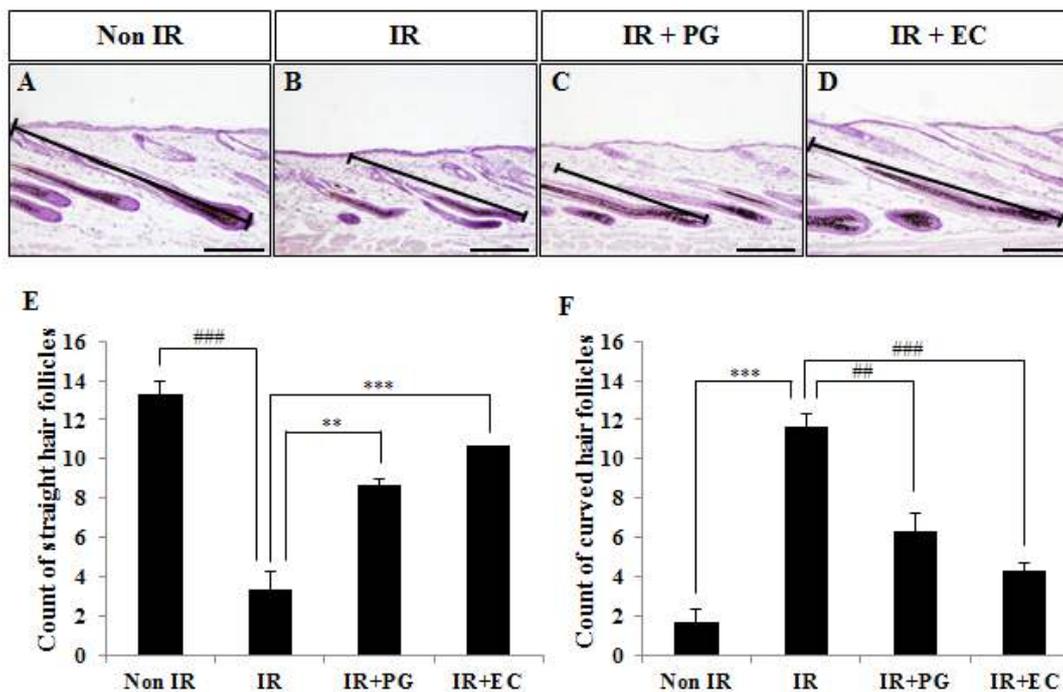


Figure 1. Histological sections of a dorsal skin from (A) Non-irradiated mice (Non IR), (B) irradiated mice (8.5Gy), (C) irradiated (8.5Gy) plus PG (10mg/kg) treated mice (IR+ PG), (D) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC) and the number of (E) straight and (F) curved hair follicles of skin sections from each group are presented. No abnormality is observed in hair follicles of the Non IR group but 8.5Gy irradiation resulted in curved hair follicles. Values are indicated as mean±S.E. (**; $p < 0.01$, ***; $p < 0.005$, ##; $p < 0.01$, ###; $p < 0.005$). (A-D) Bars=90 μ m.

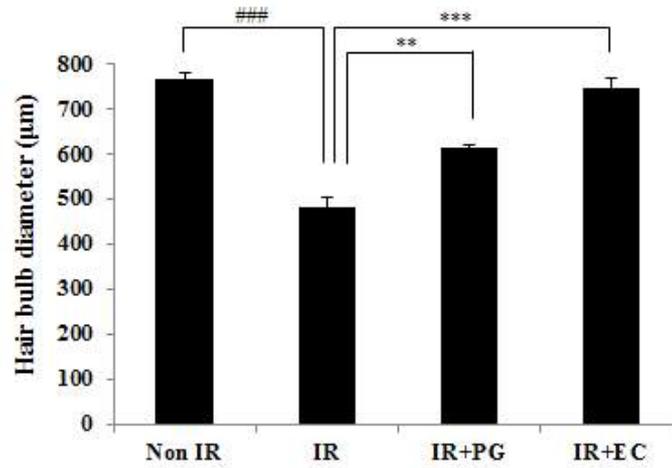


Figure 2. The hair bulb diameter, the hair follicle length and the ratio of the dermal papilla diameter (μm). Each group was presented in the column. Values are indicated as mean \pm S.E. (**; $p < 0.01$, ***; $p < 0.005$, ###; $p < 0.005$).

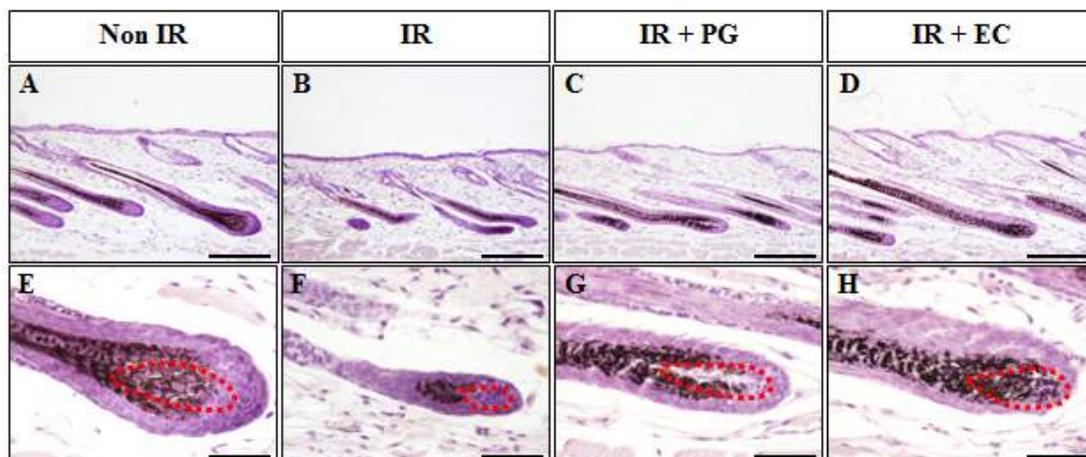


Figure 3. The dermal papilla shape. (A, E) Non-irradiated mice (Non IR), (B, F) irradiated mice (8.5Gy; IR), (C, G) irradiated (8.5Gy) plus PG treated mice (IR+ PG), (D, H) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC), (A-D) Bars=90 μ m, (E-H) Bars=30 μ m.

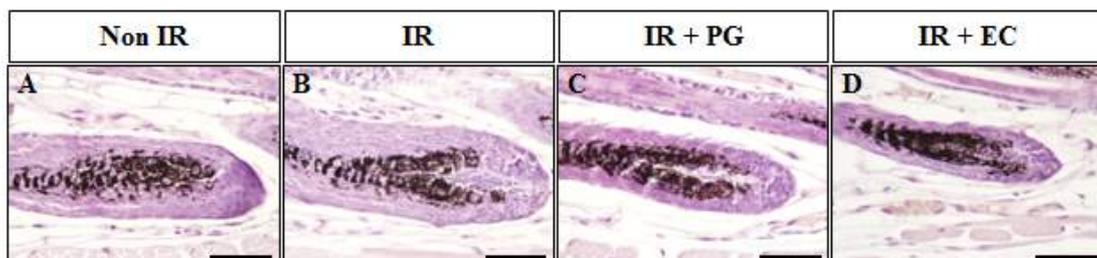


Figure 4. Effect of gamma-rays on the development of melanocytes. (A) Non-irradiated mice (Non IR), (B) irradiated (8.5Gy) mice, (C) irradiated (8.5Gy) plus PG (10mg/kg) treated mice (IR+ PG), (D) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC). (A-D) Bars=30 μ m.

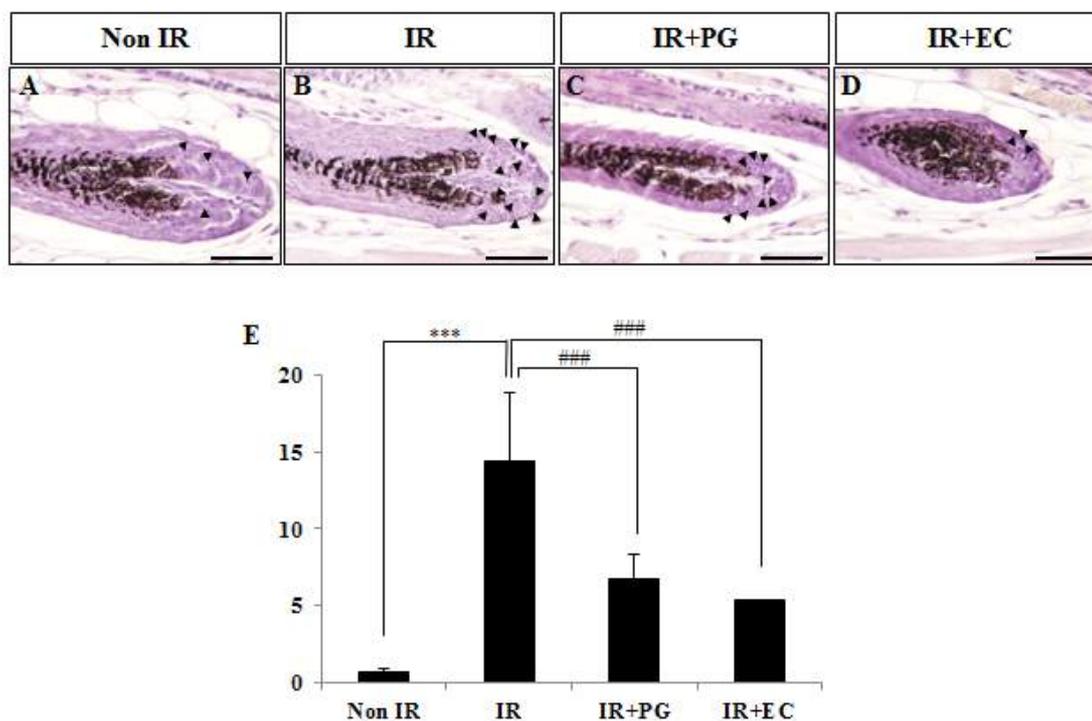


Figure 5. Phloroglucinol(PG) protects hair follicle stem cells from gamma-rays irradiation-induced damages in mice. Mice skins were obtained at 8 hours after 8.5Gy irradiation. (A) Non-irradiated mice (Non IR), (B) irradiated (8.5Gy) mice, (C) irradiated (8.5Gy) plus PG (10mg/kg) treated mice (IR+PG), (D) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+EC). (E) The number of apoptotic fragments per hair follicle of skin sections from each group is presented in the column. Values are indicated as mean±S.E. (***; $p < 0.005$, ###; $p < 0.005$). (A-D) Bars=30µm.

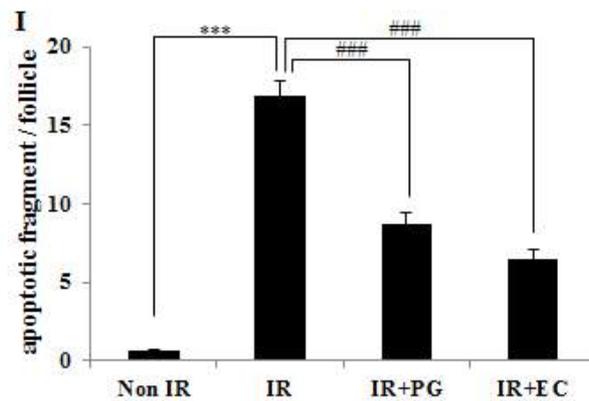
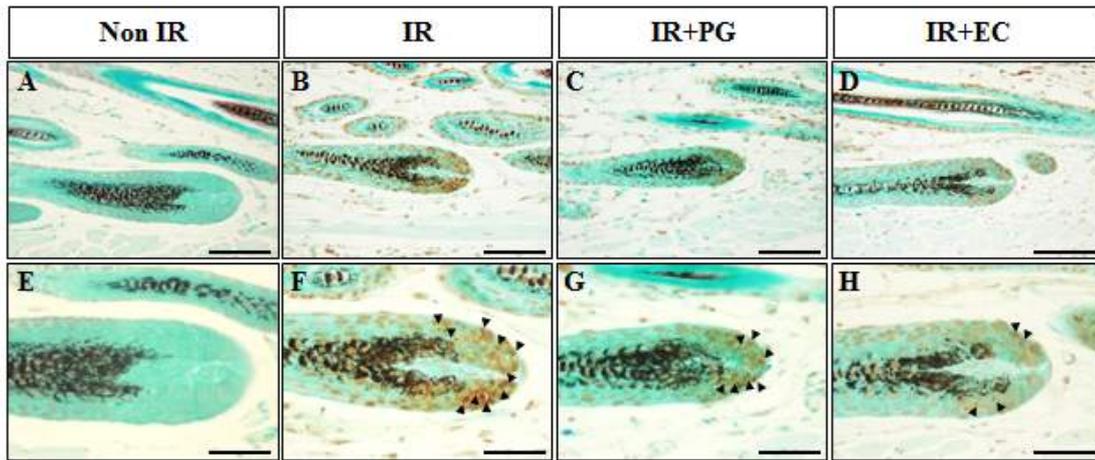


Figure 6. Typical apoptotic fragments in hair follicles under TUNEL assay. (A, E) Non-irradiated mice (Non IR), (B, F) irradiated mice (8.5Gy; IR), (C, G) irradiated (8.5Gy) plus PG treated mice (IR+PG), (D, H) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+EC), (A-D) Bars=60 μ m, (E-H) Bars=30 μ m. (I) Quantitative analysis result of apoptotic fragments in hair follicles. Values are indicated as mean \pm S.E. (***; $p < 0.005$, ###; $p < 0.005$). (A-D) Bars=90 μ m, (E-H) Bars=30 μ m.

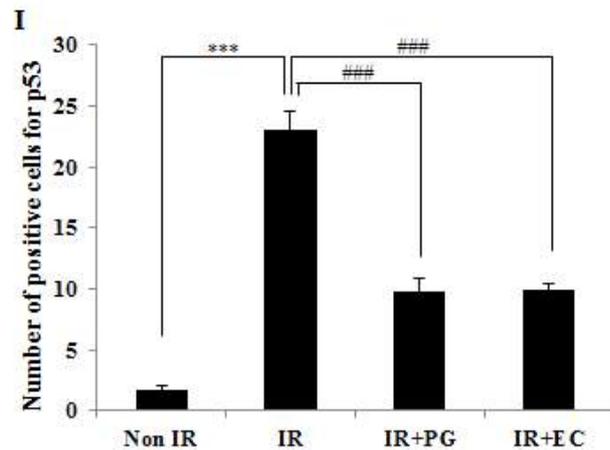
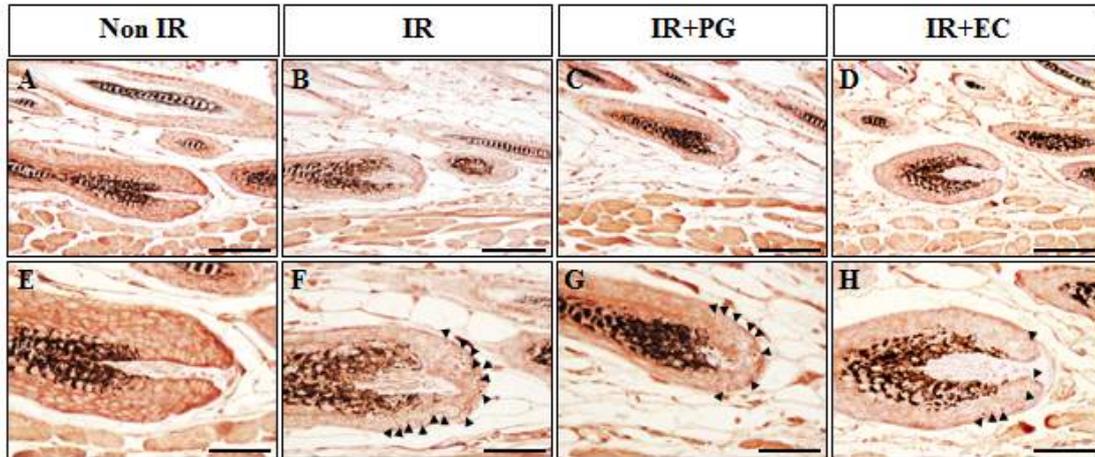


Figure 7. p53 immunoreactivity in hair follicles of mice 8 hours after gamma-rays irradiation. (A, E) Non-irradiated mice (Non IR), (B, F) irradiated mice(8.5Gy; IR), (C, G) irradiated (8.5Gy) plus PG treated mice (IR+ PG), (D, H) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC), (A-D) Bars=60 μ m, (E-H) Bars=30 μ m. (I) Quantitative analysis result of immunohistochemistry for p53 positive cells in hair follicles. Values are indicated as mean \pm S.E. (***, $p < 0.005$, ###, $p < 0.005$). (A-D) Bars=90 μ m, (E-H) Bars=30 μ m.

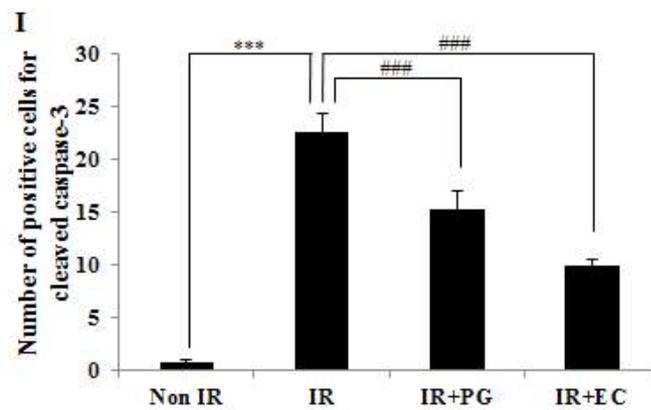
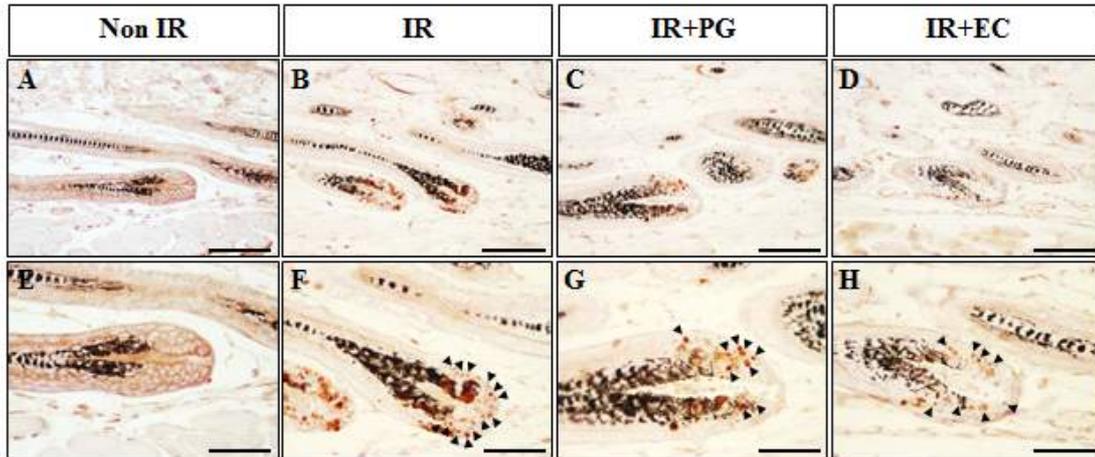


Figure 8. Cleaved caspase-3 immunoreactivity in hair follicles of mice 8 hours after gamma-rays irradiation. (A, E) Non-irradiated mice (Non IR), (B, F) irradiated mice (8.5Gy; IR), (C, G) irradiated (8.5Gy) plus PG treated mice (IR+ PG), (D, H) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC), (A-D) Bars=60 μ m, (E-H) Bars=30 μ m. (I) Quantitative analysis result of immunohistochemistry for cleaved caspase-3 positive cells in hair follicles. Values are indicated as mean \pm S.E. (***; $p < 0.005$, ###; $p < 0.005$). (A-D) Bars=90 μ m, (E-H) Bars=30 μ m.

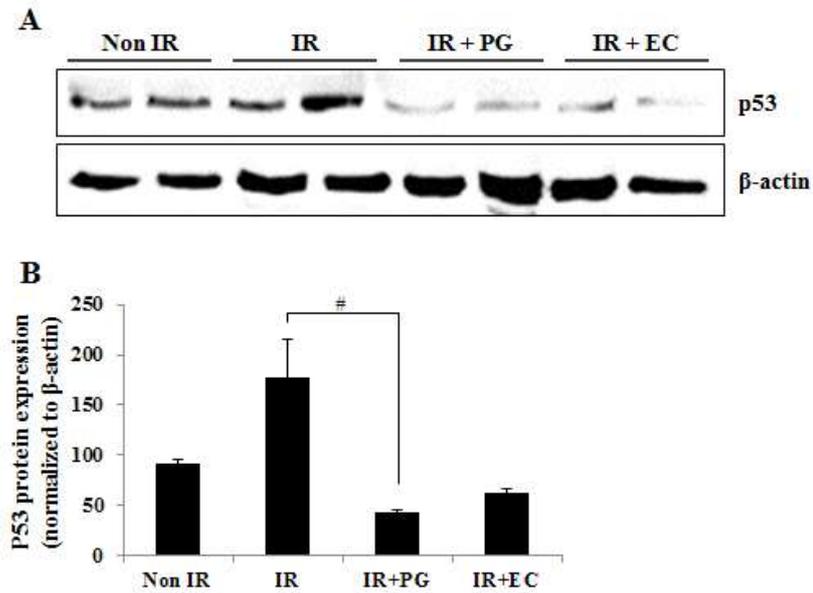


Figure 9. Western blot analysis of p53 expression modulated by PG in hair follicle stem cells of mice 8 hours after gamma-rays irradiation. (A) Expression levels of p53 protein in skin of non-irradiated mice (Non IR) (lanes 1 and 2), irradiated mice(8.5Gy; IR) (lanes 3 and 4), irradiated (8.5Gy) plus PG treated mice (IR+PG) (lanes 5 and 6) and irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+EC) (lanes 7 and 8) were analyzed by western blot analysis. (B) Densitometric analysis of p53 molecule was evaluated (#; $p < 0.05$).

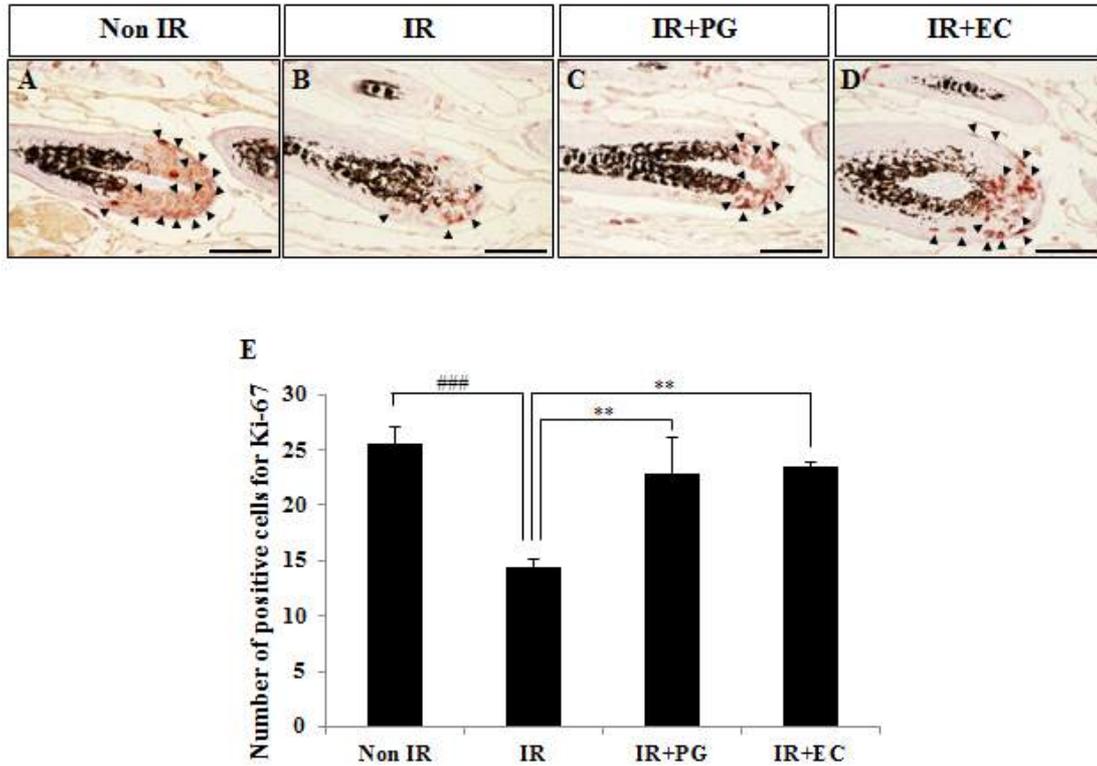


Figure 10. Ki-67 immunoreactivity in hair follicles of mice 8 hours after gamma-rays irradiation. (A) Non-irradiated mice (Non IR), (B) irradiated mice(8.5Gy; IR), (C) irradiated (8.5Gy) plus PG treated mice (IR+ PG), (D) irradiated (8.5Gy) plus EC treated mice (IR+ EC), (A-D) Bars=30 μ m. (E) Quantitative analysis result of immunohistochemistry for Ki-67 positive cells in hair follicles. Values are indicated as mean \pm S.E. (**; $p < 0.01$, ###; $p < 0.005$). (A-D) Bars=30 μ m.