— J. Korean Soc Ther Radiol Oncol : Vol. 16, No. 2, June, 1998 —

SCK 선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포 주기

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 미생물학교실*

이형식 · 박홍규 · 허원주 · 서수영* · 이상화* · 정민호*

미네소타대학교 의과대학 방사선종양학교실

박 헌 주 · 송 창 원

The Cell Cycle Dependence and Radiation-induced Apoptosis in SCK Mammary Adenocarcinoma Cell Line

Hyung Sik Lee, M.D., Hong Kyu Park, M.D., Won Joo Hur, M.D.
Su Yeong Seo, M.D.*, Sang Hwa Lee, M.D.*, Min Ho Jung, M.D.*
Heon Joo Park, M.D., Ph.D. †, Chang Won Song, Ph.D. †

Department of Radiation Oncology, Microbiology, College of Medicine, Dong A University, Pusan, Korea*
Department of Therapeutic Radiology-Radiation Oncology†,
University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN, USA

Purpose : The relationship between environmental pH on the radiation induced-apoptosis in SCK mammary adenocarcinoma cells and cell cycle dependence was investigated.

Material and Methods : Mammary adenocarcinoma cells of A/J mice(SCK cells) in exponential growth phase were irradiated with a ^{137}Cs irradiator at room temperature. The cells were irradiated 1 hour after the media was replaced with fresh media at a different pHs. After incubation at 37℃ for 0-48 h, the extent of apoptosis was determined using agarose gel electrophoresis and flow cytometry. The progression of cells through the cell cycle after irradiation in different pHs was also determined with flow cytometry.

Results : The induction of apoptosis by irradiation in pH 6.6 medium was markedly less than that in pH 7.5 medium. When the cells were irradiated and maintained in pH 7.5 medium, the percentage of cells in G_2/M phase rapidly increased to about 70% at 12 h after an exposure to 12Gy and returned to control level by 36 h. The percentage of cells in G1 phase decreased as the percentage of cells in G_2/M increased. On the other hand, in pH 6.6 medium the percentage of cells in G_2/M phases gradually increased to about 45% at 24 h after 12Gy irradiation and then slowly recessed and consequently, as much as 30-35% of the cells were still in the G_2/M phase 48 h after irradiation. The percentage of cells in G1 phase then

이 논문은 1997년도 동아대학교 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.
이 논문은 1998년 4월 30일 접수하여 1998년 5월 20일 채택되었음.
책임저자 : 이형식, 부산시 서구 동대신동3가 1번지 동아대학교병원 치료방사선과

increased as the G_2/M arrest began to recede. The radiation-induced G_2/M arrest in pH 6.6 medium lasted markedly longer than that in pH 7.5 medium.

Conclusion : Radiation-induced apoptosis in SCK tumor cells are reversely suppressed in an acidic environment. Radiation-induced G_2/M arrest is prolonged in an acidic environment indicating that the suppression of radiation- induced apoptosis and prolongation of radiation-induced G_2/M arrest in an acidic environment are related.

Key Words : Radiation-induced apoptosis, Environmental pH, Cell cycle

서 론

세포의 사망 기전으로 인식되는 apoptosis는 암 치료 분야에서도 현재 암 치료의 대종을 이루는 방사선 요법, 항암 요법 및 온열 요법에 의해 일어나는 암세포의 사망이 apoptosis에 의한다는 주장이 대두되면서 이에 관한 연구가 활발하다.[1-6] 방사선에 의한 세포사망 기전은 현재도 많은 논란이 있고 apoptosis와 연관하여 많은 연구가 이루어지고 있으나 생화학적 또는 분자생물학적 과정에 대하여는 아직도 규명이 안되고 있다.[7-13]

본 연구자들은 실제 대부분의 종양 내 pH 환경이 산성이며 이러한 산성 환경은 저산소 분압 등의 요인과 더불어 암 환자의 방사선 치료에 장애 요인으로 작용함에 주목하여 SCK 암 세포주를 이용한 방사선에 의해 유도되는 암세포의 apoptosis에 관한 연구를 진행하는 가운데 흥미로운 몇가지 사실을 관찰하였다. apoptosis의 통상적인 정성 분석 방법인 agarose gel eletrophoresis 방법을 이용하여 방사선 조사량과 배지 pH 환경과의 연구에서 8Gy, 12Gy의 방사선 조사량과 pH 7.5의 배양 배지 조건하에서 DNA fragmentation의 지표인 laddering이 현저하였고 pH 6.6 조건에서는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과의 정량 분석을 위해 실시한 ^{3}H-thymidine release assay 및 TUNEL assay 등에서도 공히 산성환경에서 양적으로 감소된 apoptosis 현상을 관찰할 수 있었다.[14] 많은 연구자들이 산성환경이 apoptosis를 유발한다고 보고하였지만[2, 15-17] 방사선에 의한 apoptosis는 산성환경에서 apoptosis의 유발을 억제한다는 사실을 관찰할 수 있었다. 본 연구자들은 상기 기전의 설명으로 산성환경은 apoptosis를 유도하는 유전인자의 활성화 및 상호연관관계 또는 방사선에 의한 cell cycle의 변화 등에 영향을 미쳐 방사선에 의한 apoptosis의 유발을 억제하는 것으로 추론하였다. 예를 들면 산성환경에서 p53의 activation이 억제되든지 Bcl-2/Bax의 비가 커지든지 G_2/M arrest가 풀리지 않으면 apoptosis가 억제될 것이다. 그러나 이상과 같은 apoptosis에 관여된 여러 유전자의 상호 연관성 및 분자생물학적 과정은 모든 것이 실험적으로 증명된 것은 아니다. 실제로 서로 상반되는 실험결과가 발표되고 있으며 많은 가설이 주장되고 있다.[18-23] 본 연구자들은 방사선 조사에 의해 일어나는 apoptosis에 관여된 유전자의 확인, 이들 유전자간의 상호 연관성, DNA fragmentation에 이르는 분자생물학적 과정에 관여된 신호전달체계에 관한 연구 등을 향후 연구 과제로 인식하고 연구를 진행하고 있으며 본 연구에서는 세포주기에 관한 분석을 통하여 그 기전 중의 일부를 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상세포주

SCK(mammary adenocarcinoma cells of A/J mice) 세포주를 이용하였다. RPMI 1640 배지 (Gibco/ BRL, Grand Island, NY)는 sodium bicarbornate (0.2%), 10%(vol/vol) 우태아 혈청 (Hyclone Co., Logan, UT), penicilline(50 units/ml) 및 streptomycin (50ug/ml)을 첨가하여 세포주 배양을 위한 완전배지로 사용하였다. 실험 조건의 pH는 30mM의 Tris, MOPS, 및 MES buffers를 이용하였고 Corning pH meter (Model 24, Corning Co., Corning, NY)로 측정하였다. 세포주의 생존은 Trypan blue dye 배제방법으로 관찰하였다.

2. 방사선 조사

세포주에 대한 방사선 조사는 137Cs 방사선 조사기를 이용하여 0.9Gy/min의 선량율로 2-12Gy의 방사선량을 상온에서 균일하게 조사하였다. 세포는 방사선 조사하기 1시간 전에 실험 조건에 맞춰 pH를 조절하

였다.

3. **DNA 추출 및 전기 영동**

DAN gel 전기 영동(DNA gel electrophoresis) 실험으로 apoptosis 유발 유무를 정성적으로 확인하기 위하여 apoptosis로 인한 DNA 절편을 전기 영동 상에서 관찰하였다. 세포를 인산 완충 식염수(PBS; phosphate buffered solution)로 세척한 후 lysis buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.4; 10mM NaCl; 10mM EDTA; proteinase K at 0.1mg/ml; 1%(wt/vol) sodium dodecyl sulfate)에 재부유시켜 48℃ 수조에서 14시간 반응시켰다. 이 lysate에 cold(4℃) 5M NaCl을 첨가하여 강하게 15초간 진탕한 후 1,000g에서 5 분간 원심분리하였다. 상층액에 동량의 2-propanol을 섞고 -20℃에서 하룻밤동안 방치하여 DNA를 침전시켰다. DNA pellet을 10,000g에서 10분간 원심 분리한 후 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM EDTA)에 재부유 시킨 다음 0.2mg/ml의 DNase-free RNase를 첨가하여 37℃에서 2시간 반응시켜 RNA를 제거하였다.

최종적인 DNA 함량은 UV(ultra-violet)분량 광도기로 흡광도 A260/A280을 측정하여 계산하였다. 각 시료의 DNA 20ug과 DNA 표준 분자량 표지(123 bp ladder, GIBCO/BRL, Grand Island, NY)를 전기 영동하였다. 전기 영동은 TBE buffe (89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2mM EDTA)를 이용하여 1.5% agarose gel에서 실시하였으며 DNA 염색은 ethidium bromide로 실시하였다.

4. **Flow cytometry analysis**

실험 조작으로 apoptosis가 유발된 세포군을 정량적으로 분석하고 세포 주기를 분석하기 위하여 FACSanflow cytometer(FacsConsort 40, Becton-Dickinson, Boston, MA)를 이용하였다. 실험조작 후의 배양세포를 수거하여, 80% cold ethanol 10ml로 4℃에서 하룻밤 동안 고정한 후, 원심 분리하여 PBS로 세척하고 최종적으로 2ml PBS로 재부유하였다. 고정한 세포부유액에 30 units의 DNase-free RNase (Type 1-A, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)를 첨가한 후, 100ml의 PI(Propium Iodide, Molecular Probes, Eugene, OR) 용액으로 가볍게 섞고 상온의 어두운 장소에서 60분간 반응시켰다. 각 시료는 2×10^4개의 세포에서 PI 형광도를 분석하였다.

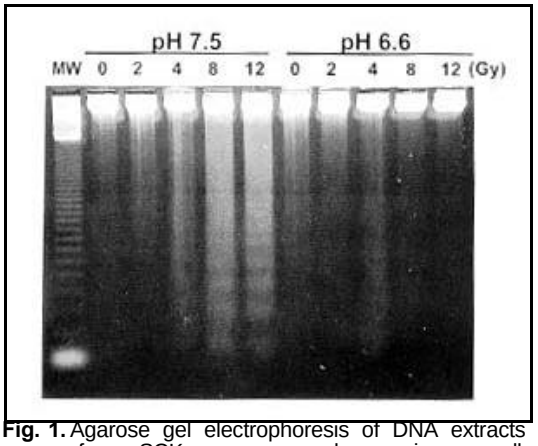

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from SCK mammary adenocarcinoma cells irradiated with 2-12Gy. The cells were irradiated and incubated for 48h in pH 7.5 or pH 6.6 media.

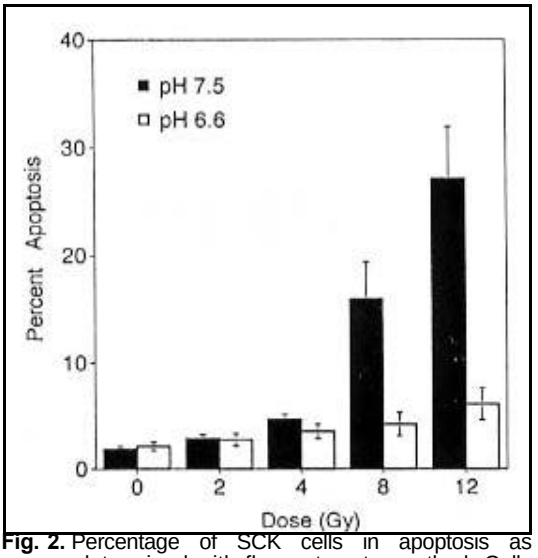

Fig. 2. Percentage of SCK cells in apoptosis as determined with flow cytometry method. Cells were irradiated with 212Gy and incubated for 48h in pH 7.5 media or pH 6.6 media. An average of three quadruplet experiment with SD are shown.

결 과

SCK 선암 세포를 2Gy에서 12Gy의 방사선량을 조사 한 뒤 pH 7.5 및 6.6의 배지에서 다양한 시간 간격으로(12, 24, 36 및 48시간) 배양한 후 DNA gel electrophoresis 실험을 시행하였다. apoptosis의 지표인 DNA fragmentation은 12, 24, 36시간째에는 관찰되지 않았지만 8Gy 및 12Gy 방사선을 조사한 후 pH 7.5 배지에서 48시간동안 배양한 세포들에서 관찰할 수 있었던 반면 pH 6.6 배양 조건에서는 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 동일한 조건에서 시행한 flow cytometry로 계측한 apoptosis의 측정에서도 pH 7.5 배지에서 48시간동안 배양한 세포들에서 방사선량에 비례하고 pH 6.6에서 배양한 세포들에 비해 뚜렷한 apoptosis 발현의 양적인 차이를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2).

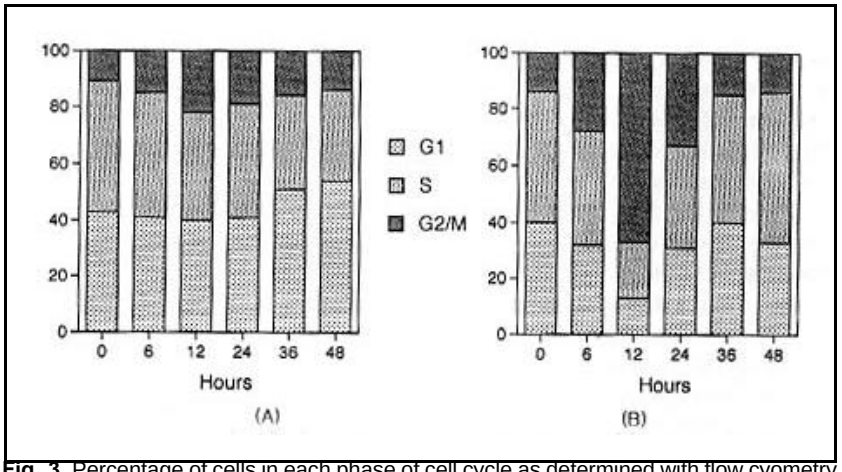

Fig. 3. Percentage of cells in each phase of cell cycle as determined with flow cyometry method. Cells were incubated in pH 7.5 for 0-48h without irradiation(A). Cells were irradiated with 12Gy and incubated for 0-48 h in pH 7.5 media(B). An average of three quadruplet experiment are shown.

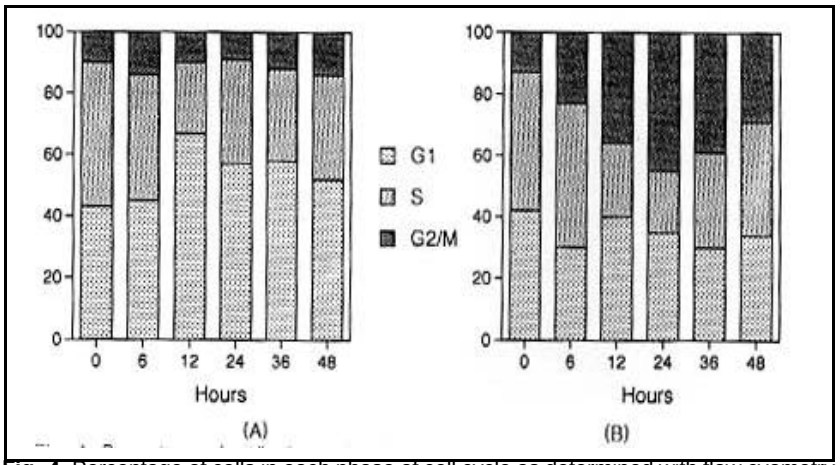

Fig. 4. Percentage of cells in each phase of cell cycle as determined with flow cyometry method. Cells were incubated in pH 6.6 for 0-48h without irradiation(A). Cells were irradiated with 12Gy and incubated for 0-48h in pH 6.6 media(B). An average of three quadruplet experiment are shown.

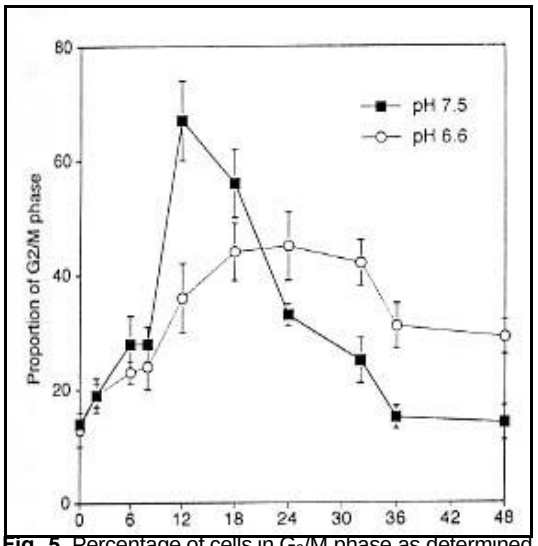

Fig. 5. Percentage of cells in G_2/M phase as determined with flow cyometry method. Cells were irradiated with 12Gy and incubated in pH 7.5 or pH 6.6 media for 0-48h. An average of five quadruplet experiment with SD are shown.

이러한 관찰 결과를 기초로 하여 12Gy 방사선량을 조사한 후 분석한 세포 주기 분석을 시행하였다. pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포에서는 각 세포 주기에 분포한 세포의 분획은 G_1 phase 42-55%, S phase 33-43% 및 G2/M phase 11-21%의 고른 분포를 관찰할 수 있었고 이는 48시간 계속 배양 시에도 각 세포 주기의 분획은 비교적 일정하였다(Fig. 3A). apoptosis가 왕성히 발현되었던 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포에서는 방사선

조사 직후부터 G_2/M phase의 세포들의 분획이 증가하기 시작하여 12시간째 70% 까지의 최고치를 보인 후 36시간째에 방사선을 조사하지 않았던 상태의 분획을 보였다(Fig. 3B). pH 6.6서 환경에서 배양하였던 세포에서는 각 세포 주기에 분포한 세포의 분획은 G_1 phase 53-78%, S phase 16-38% 및 G_2/M phase 6-12%로 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포에 비하여 G_1 phase가 조금 증가된 분포를 보였지만 48시간 계속 배양 시에도 각 세포 주기의 분획은 비교적 일정하였다(Fig. 4A). 하지만 pH 6.6 배지에서 배양하였던 세포에서의 G_2/M phase의 세포들의 분획의 증가는 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포들에 비해 비교적 천천히 일어나고 그 최고치도 24시간째에 45%로 관찰되었다. 특이한 것은 G_2/M phase의 세포들의 분획이 그 이후 감소되는 정도가 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포들에 비해 미약하여 48시간 배양 이후에도 약 30-35%의 세포는 G_2/M phase의 세포들의 분획으로 관찰되었다(Fig. 4B).

연구자들은 이러한 현상이 세포들이 G_2/M phase에서 많은 양의 세포들이 집적되어 세포 주기를 순환하지 못하는 G_2/M arrest 현상으로 이해하였다. G_1 및 S phase의 세포들의 분획은 G_2/M phase의 세포들의 분획이 증가함에 따라 감소하였으나 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포들에 비해 pH 6.6 배지에서 배양하였던 세포들에서는 그 감소 정도가 미약하였다. 각 실험 조건에서 G_2/M phase의 세포 분획만으로 비교해보면 그 확연한 G_2/M arrest의 현상이 확연하게 비교되었다 (Fig. 5).

고안 및 결론

세포의 증식은 세포가 분열을 계속함으로서 이루어지는데 이 과정에는 매우 복잡한 분자생물학적 작용이 관여되어 있다. 세포가 분열을 하고 일정 시간 후 다시 분열을 하는 과정을 세포 주기(cell cycle)라고 한다. 정상 배양 상태에서는 각 세포의 종류의 특성에 따라 차이는 있지만 일정한 분획의 세포 주기를 유지하고 세포가 방사선, UV(ultra-violet), 기타 DNA에 상해를 주는 외부요인에 노출되면 세포 주기가 길어진다. 이러한 현상을 cell cycle delay 또는 division delay라고 하고 각 주기에 세포가 집적되어 세포 주기가 지속되는 현상을 cell cycle arrest라고 한다.[24] 방사선 조사에 의해 일어나는 division delay는 G_1 phase, S phase 그리고 G_2 phase의 기간이 길어지는 까닭이다.[24, 25] 본 연구에서도 방사선 12Gy 조사후의 시간에 따른 세포 주기 분석에서 방사선을 조사 받은 세포에서 G_2/M phase delay 현상을 확연히 관찰할 수 있었다. G_1 arrest나 S phase delay는 방사선 조사량이 많아야 일어나는데 반해 G_2 arrest는 1Gy 정도의 적은 조사량으로도 일어난다. 이러한 현상은 방사선량이 많을수록 길어지게 된다. 이는 세포의 손상받은 DNA 복구에 필요한 방어기전으로 설명하고 그만큼 복구에 요구되는 시간을 많이 요구되는 것으로 설명한다.[26]

본 연구에서 주목한 G_2/M arrest와 apoptosis의 발현과의 연관성에 주목할 때 혈액암 세포주를 이용한 다른 연구자들의 실험에서도 방사선에 의한 G_2/M arrest는 apoptosis를 억제하고 herbimycin 등을 이용하여 p34cdc2의 tyrosine phosphoration을 감소시켰을 때 G_2/M arrest를 억제하여 방사선에 의한

apoptosis를 유발할 수 있다고 하였다.[27] 하지만 방사선에 의한 apoptosis는 어느 세포 주기에서 가장 민감하게 반응하는 지에 관하여서는 여러 연구자의 연구에서 혈액 종양 세포와 같은 급속히 증식하는 세포의 경우 방사선 조사 후 첫 번째 맞이하는 mitotic phase 전에도 발생하기도 하지만 본 연구에서 사용한 고형암 세포의 경우 mitotic phase를 거친 후에 apoptosis가 유발된다는 여러 보고가 있다.[28-30] 연구한 세포의 종류에 따라 상이하여 아직 뚜렷한 정설은 없으나 Dewey 등[28]이 보고한 apoptosis와 세포의 증식과의 연관성은 대체로 모든 연구자들에게 받아들여지는 이론으로 본 연구에서의 결과처럼 세포가 G_2/M phase arrest를 일단 벗어나서 세포 주기를 순환하여야 apoptosis가 유발된다고 추론할 수 있겠다.

Cell cycle delay의 분자 생물학적 기전은 최근 특히 지난 3-4년 사이에 일부가 규명이 되었다. 세포 주기는 주로 cyclins와 cdc/cdk kinase로 구성된 상호작용 단백질들과 특정한 amino acids로부터 phosphate group을 떼거나 더하는 kinases 및 phosphatases와 같은 많은 종류의 보조적인 역할을 하는 단백질들의 복잡한 상호작용에 의해 조절된다고 알려져 있다. G_1 phase, S phase, G_2 phase 그리고 M phase가 순조롭게 진행되려면 각 phase를 담당하는 cyclin과 cyclin dependent kinase(cdk)가 복합체를 형성하여 적절히 작용해야만 한다.[31-36] Cyclin은 세포 주기 동안 새로 형성되거나 활성화되는 단백질이며 cdk는 CAK(cdk activating kinase)에 의해 인산화된다. cdk는 세포주기 진행에 관계되는 여러 생화학적 물질을 인산화시키는 역할을 하는데 어떻게 cyclin-cdk 복합체가 형성되는지는 확실히 알려지지 않고 있지만 복합체를 만들고 있어야만 cdk의 탈인산화(dephosphorylation)가 방지되어 그들의 활성이 유지된다는 것이 알려져 있다.[32, 35] 현재까지 보고된 방사선에 의한 G_2 arrest에 관여하는 분자 생물학적 연구는 cyclin 및 cdc2 kinase 활성화에 주목하고 있으며 G_2 phase를 거쳐 M phase에 들어가 세포 분열을 하는 과정에 cyclin B1, p34cdc2 kinase의 적절한 인산화 및 amino acid tyrosine-15의 탈인산화가 요구된다고 보고한다.[30, 37-39] 활발히 증식하고 있는 세포의 G_2 phase의 길이는 2-4시간 정도인데 방사선 조사를 받으면 G_2 arrest가 일어나 G_2는 현저히 길어진다. 1-10 Gy 정도의 방사선을 조사받은 세포에서는 G_1 arrest 그리고 S phase delay는 미비한데 반해 현저한 G_2/M arrest가 일어남이 알려져 있다.[24, 31]

본 연구자들은 세포 내외의 산성환경은 apoptosis를 유발하지만 방사선에 의한 apoptosis의 경우 SCK 종양세포의 경우 이를 억제한다는 사실을 관찰하였다. 세포 주기와 apoptosis와의 연관성을 찾기 위한 본 실험에서는 정상적인 중성 pH 환경에서는 G_2/M phase에 세포들이 비교적 짧은 시간에 집적되었다가 세포 주기를 순환하면서 apoptosis를 유발하지만 pH 6.6-7.0의 산성 환경에서는 G_2/M phase에 세포들이 집적되어 많은 양의 세포들이 세포 주기를 순환하지 못하는 현상을 관찰할 수 있었다. 본 연구의 결과와 문헌 고찰을 통한 세포 주기와 연관된 분자생물학적인 연구 결과를 종합하여 볼 때 세포 내외의 산성환경 상태에서 방사선을 조사받은 SCK 종양세포는 cyclinB-cdc2 복합체의 활성화가 억제되어 G_2/M arrest 상태가 지속되며 이는 post-mitotic apoptosis를 억제한다고 추론해볼 수 있으나 이는 향후 연구과제로 규명되어야 할 것이다.

참 고 문 헌

1. **Barry MA, Behnke CA, Eastman A.** Activation of programmed cell death(apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. Biochem Phamacol 1990; 40:2353-2362
2. **Barry MA, Reynold JE, Eastman A.** Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. Cancer Res 1993; 53:2349-2357
3. **Chen CH, Zhang J, Ling CC.** Transfected c-myc and c-Ha-ras modulate radiation-induced apoptosis in rat embryo cells. Radiat Res 1994; 139:307-315
4. **Harmon BV, Corder AM, Collins RJ, Gobe GC, Allen J, Allan DJ, Kerr JFR.** Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47℃ heating in vitro: Evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. Int J Radiat Biol 1990; 58:845-858
5. **Kaufmann SH.** Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: A cautionary note. Cancer Res 1989; 49:5870-5878
6. **Makepeace CM, Lyons JC, Park HJ. and Song CW.** Comments on "Radiation-induced apoptosis in HL60 cells : oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity, and dependence of time to apoptosis on radiation dose" by Hopcia et al. Radiat Res 1996; 45:315-323(letter)
7) **Radford IR.** Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part I. Sensitivity to killing by ionizing radiation, rate of loss of viability, and cell type of orgin. Int J Radiat Biol 1994; 65:203-215
8. **Radford IR, Murphy TK, Radley JM, Ellis SL.**

Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part II, Apoptotic death is shown by all lines examined. Int J Radiat Biol 1994; 65:217-227

9. **Radford IR, Murphy TK.** Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines, Part III, Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage, Int J Radia Biol 1994; 65:229-239
10. **Stephens LC, Hunter NR, Ang KK, Milas L, Meyn RE.** Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. Radiat Res 1993; 135:75-80
11. **Szumiel I.** Review : Ionizing radiation-induced cell death. Int J Radiat Biol 1994; 66:329-341
12. **Langely RE, Palayoor ST, Coleman CN, Bump EA.** Radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. Int. J. Radiat. Biol. 1994; 65:605-610
13. **Meyn RE, Stephen LC, Voehringer DW, Story MD, Mirkovic N, Milas L.** Biochemical modulation of radiation-induced apoptosis in murine lymphoma cells. Radiat Res 1993; 136:327-334
14. **Lee HS, Park HJ, Lyson JC, Griffin RJ, Auger EA, Song CW.** Radiation-induced apoptosis in different pH enviromments in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 38:1079-1087
15. **Park HJ, Makepeace CM, Lyons JC, Song CW.** Effect of intracellular acidity and ionomycin on apoptosis in HL-60 cells. Eur J Cancer 1996; 32A: 540-546
16. **Li J, Eastman A.** Apoptosis in an interleukin-20-dependent cytotoxic T-lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. J Biol Chem 1995; 270:3223-3211
17. **Gottieb RA, Nordberg J, Skowronski E. and Babior BM.** Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents in preceded by intracellular acidification. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 23;93(2): 654-658
18. **Palayoor ST, Macklis RM, Bump EA, Coleman CN.** Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. Radiat Res 1995; 141:253-243
19. **Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A. and Green DR.** Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. Nature 1992; 359:552-556
20. **Williams GT. and Smith CA.** Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. Cell 1993; 74:777-779
21. **Evans GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell 1992; 69:119-128
22. **Mckenna WG, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A, Muschel RJ.** Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts: influence of H-ras on the G_2 delay. Oncogene 1996; 18;12(2):237-45
23. **Kitada S, Krajewski S, Miyashita T, Krajewska M, Reed JC.** Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. Oncogene. 1996; 4;12(1):187-92
24. **Hall EJ.** Radiosensitivity and cell age in the mitotic cycle. In Hall EJ, eds. Radibiology for the radiologist. 4th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Co. 1994; 91-106
26. **Maity A, Mckenna WG, Muschel RJ.** The molecular basis for cell cycle delay following ionizing radiation : a review. Radiother Oncol 1994; 31: 1-13
27. **Tuel-Ahlgren L, Jun X, Waddick KG, et al.** Role of tyrosine phosphorylation in radiation-induced cell cycle arrest of leukemic B-cell precursors at the G_2-M transition checkpoint. Leuk Lymphoma; 1996; 20:417-426
28. **Dewey WC, Ling CC, Meyn RE.** Radiation- induced apoptosis : Relevance to radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 33:781-796
29. **Langley RE. Quartuccio SG, Kennealey PT, Coleman CN, Bump EA.** Effect of cell cycle stage, dose rate and repair of sublethal damage on radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. Radiat Res 1995; 144:90-96
30. **Muschel RJ, Zhan HB, Iliakis G, Mckenna WG.** Cyclin B expression in HeLa cells during the G_2 block induced by ionizing radiation. Cancer Res 1991; 51:5113-5117
31. **Pines J.** Cyclins, CDKs and cancer. Semin Cancer Biol 1995; 6:63-72
32. **Ducommun B, Brambilla P, Felix M, Franza BR, Karsenti E, Draetta G.** cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. EMBO J 1991; 10:3311-3319
33. **Riabowol K, Draetta G, Brizuela L, Vandre D, Beach D.** The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. Cell 1989; 57:393-401
34. **Atherton-Fessier S, Parker LL, Geahien RL, Piwnica-Worms H.** Mechanisms of p34cdc2 regulation. Mol Cell Biol 1993; 13:1675-1685
35. **Muschel RJ, Zhan HB, Mckenna WG.** Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. Cancer Res 1991; 53:1128-1135
36. **Uckun FM.** Radiation-induced G_2 arrest in human cell cycle is triggered by tyrosin phosphorylation and inactivation of p34cdc2 kinase. In Proceedings of the 41st Annual Meeting of the Radiation Research Society, Abstract P-29-13, p.141, March 20-25, 1993. Dallas, Texas
37. **Kao GD, Mckenna WG, Maity A, Blank K, Muschel RJ.** Cyclin B1 availability is a rate- limiting component of the radiation-induced G2 delay in HeLa cells. Cancer Res 1997; 57:753-758

38. Sadhu K, Reed SI, Richardison H, Russell P. Human homology of fission yeast cdc 25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. Proc Natl Acad Sci 1990; 87:51-39

39. Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Dephosphorylation of cdc25-c by a type-21 protein phosphatase : specific regulation during the cell cycle in xenopus egg extracts. Mol Biol Cell 1993; 4:397

= 국문 초록 =

SCK 선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포 주기

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 미생물학교실*

이형식 · 박홍규 · 허원주 · 서수영* · 이상화* · 정민호*

미네소타대학교 의과대학 방사선종양학교실

박 헌 주 · 송 창 원

목 적 : SCK 선암 세포주에서 방사선 조사에 의해 일어나는 apoptosis와 세포 주기와의 연관성을 규명하고자하였다.

대상 및 방법 : SCK 선암 세포주를 apoptosis의 통상적인 정성 분석 방법인 agarose gel electrophoresis 방법을 이용하여 방사선 조사량과 배지 pH 환경과의 연구에서 2-12Gy의 방사선 조사량과 pH 7.5 및 6.6의 배양 배지 조건하에서 다양한 배양 시간의 경과에 따른 DNA fragmentation의 지표인 laddering을 관찰하였다. 실험 조작으로 apoptosis가 유발된 세포군을 정량적으로 분석하고 세포 주기 분석을 위해 FACScan을 이용하였다.

결 과 : apoptosis가 왕성히 발현되었던 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포에서는 방사선 조사직후부터 G_2/M phase의 세포들의 분획이 증가하기 시작하여 12시간째 약 70%까지의 최고치를 보인 후 36시간째에 방사선을 조사하지 않았던 상태의 분획으로 정상화되었다. 하지만 pH 6.6 배지에서 배양하였던 세포에서의 G_2/M phase의 세포들의 분획의 증가는 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포들에 비해 비교적 천천히 일어나고 그 최고치도 24시간째에 약 45%로 관찰되었다. 특이한 것은 G_2/M phase의 세포들의 분획이 그 이후 감소되는 정도가 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포들에 비해 미약하여 48시간 배양 이후에도 약 30-35%의 세포는 G_2/M phase의 세포들의 분획으로 관찰되었다.

결 론 : 연구자들은 이러한 현상이 세포들이 G_2/M phase에서 많은 양의 세포들이 집적되어 세포주기를 순환하지 못하는 G_2/M arrest 현상으로 이해하였다. 세포 내외의 산성환경 상태에서 방사선을 조사 받은 SCK 종양세포는 G_2/M arrest 상태가 지속되며 이는 post-mitotic apoptosis를 억제한다고 추론하였다.