— J. Korean Soc Ther Radiol Oncol : Vol. 16, No. 4, December, 1998 —

HL60 세포주에서 방사선 조사에 의한 Apoptosis와 세포 주기 관련 유전자의 발현 변화

계명대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 경북대학교 의과대학 치료방사선과학교실†

김 진 희* · 박 인 규†

Expression of Cell Cycle Related Genes in HL60 Cells Undergoing Apoptosis by X-irradiation

Jin Hee Kim, M.D.* and In Kyu Park, M.D. †

*Department of Radiation Oncology, Keimyung University School of Medicine, Dongsan Medical Center,
† Department of Radiation Oncology, Kyungpook National University, School of Medicine, Taegu, Korea

Purpose : To evaluate changes in expression of cell cycle related genes during apoptosis induced in HL60 cells by X-irradiation to understand molecular biologic aspects in mechanism of radiation therapy.

Material and Methods : HL-60 cell line (promyelocytic leukemia cell line) was grown in culture media and irradiated with 8 Gy by linear accelerator (6 MV Xray). At various times after irradiation, ranging from 3 to 48 hours were analyzed apoptotic DNA fragmentation assay for apoptosis and by western blot analysis and semi-quantitative RT-PCR for expression of cell cycle related genes (cyclin A, cyclin B, cyclin C, cyclin D1, cyclin E, cdc2, CDK2, CDK4, $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, E2F, PCNA and Rb).

Results : X-irradiation (8 Gy) induced apoptosis in HL-60 cell line. Cycline A protein increased after reaching its peak 48 h after radiation delivery and cyclin E, E2F, CDK2 and RB protein increased then decreased after radiation. Radiation induced up-regulation of the expression of E2F is due to mostly increase of phosphorylated retinoblastoma proteins (ppRb). Cyclin D1, PCNA, CDC2, CDK4 and $p16^{INK4a}$ protein underwent no significant change at any times after irradiation. There was not detected $p21^{WAF1}$ and $p27^{KIP1}$ protein. Cyclin A, B, C mRNA decreased immediately after radiation and then increased at 12 h after radiation. Cyclin D1 mRNA increased immediately and then decreased at 48 h after radiation. After radiation, cyclin E mRNA decreased with the lapse of time. CDK2 mRNA decreased at 3 h and increased at 6h after radiation. CDK4 mRNA rapidly increased at 6 to 12 h after radiation. There was no change of expression of $p16^{INK4a}$ and not detected in expressin of $p21^{WAF1}$ and $p27^{KIP1}$ mRNA.

Conclusion : We suggest that entry into S phase may contribute to apoptosis of HL60 cells induced by irradiation. Increase of ppRb and decrease of pRb protein are related with radiation induced apoptosis of HL60 cells and tosis of HL60 cells induced by irradiation. Increase of ppRb and decrease of pRb protein are related with radiation induced apoptosis of HL60 cells and this may be associated with induction of E2F and cyclinE/CDK2. These results support that $p21^{WAF1}$ and $p27^{KIP1}$ are not related with radiation induced- apoptosis.

Key Words : Radiation, Apoptosis, Cell cycle related gene, HL60

이 논문은 1998년 7월 28일 접수하여 1998년 9월 30일 채택되었음.
책임저자 : 김진희, 대구시 중구 동산동 194번지 계명대학교 동산의료원 치료방사선과학교실

서 론

세포에 대한 방사선 조사의 효과는 일반적으로 일시적인 세포주기의 정지와 DNA 손상복구의 증가 그리고 복구할 수 없는 상해에 의한 세포사를 일으킨다고 알려져 있다.[1] 세포사는 necrosis와 programmed cell death(apoptosis)로 분류 할 수 있으며 이 중 apoptosis는 각종 유전자의 발현과 발현산물인 단백의 활성화로 이루어지며, calcium dependent nuclease에 의하여 180-200bp의 DNA fragment로 DNA가 절단되어 나타나는 DNA ladder를 특징적으로 나타낸다.[2-6]

세포는 성장, 분열을 거듭하거나 분열하지 않고 G_0기에 있는 세포 등이 있다. 세포의 분열은 매우 규칙적인 세포주기를 지키면서 이루어지는데, 이러한 세포주기는 G_1, S, G_2 및 M기로 나눌 수 있으며 각 세포주기와 세포주기간의 이동은 세포주기를 조절하는 각종 유전자 산물에 의하여 조절을 받고 있다. 이러한 세포주기조절 인자들은 각 주기에서 필요한 여러 가지 화학반응과 합성, 대사를 유발하고 또한 각 주기에서의 세포상태를 인지하여 세포주기 진행을 결정하는 역할을 담당하고 있다. 세포주기 조절에 관련하는 단백들은 각 세포주기에 특이적으로 발현이 증가하였다가 감소하는 현상을 보이는 각종 cyclin들(cyclin A, cyclin B, cyclin C, cyclin D, cyclin E 등), cyclin들과 결합하여 각 세포주기에서 특이적으로 단백의 인산화에 관여하는 cyclin dependent kinases(CDKs), cyclin dependent kinase와 결합하여 CDKs의 기능을 억제하는 cyclin dependent kinase inhibitors (CKIs), 항암retinoblastoma 단백질(Rb)과 결합능이 있는 전사조절인자인 E2F, DNA합성에 관여하는 PCNA(proliferating cell nuclear antigen), E2F 등과 결합능을 가지는 Rb 단백, G1/S 이행과 유전자 수리 등에 관여하는 p53항암단백질 등이 대표적인 것들이다.[7] 세포주기의 조절은 분열하는 세포의 조절에도 중요하지만 각종인자에 의한 세포상해시에 DNA손상복구와 apoptosis의 발생에 있어서도 매우 중요한 역할을 수행한다.[8, 9]

세포의 apoptosis는 여러 가지 세포내외의 자극에 의해 유도되며, 이러한 자극으로는 방사선조사, 화학요법제 처리, hyperthermia, glucocorticoid 투여, 성장인자 제거, serum withdrawal 등이 포함된다.[10, 11] 이들 apoptosis를 유도하는 각종 자극이 apoptosis를 유도하는 기전은 아직도 규명되어야 할 점이 많은데, 방사선 조사에 의한 apoptosis 유도는 유전자 손상 즉 DNA double strand break와 TNF-alpha에 의해 유도되는 apoptosis에 관여한다고 알려진 sphingomyelin 신호전달경로 등이 알려지고 있다. Sphingomyelin은 방사선 조사에 의하여 ceramide로 분해된 후 stress-activated PK/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) cascade를 활성화하여 apoptosis를 유도한다.[12, 13]

저자들은 방사선 조사에 의한 HL60 세포주의 세포상해시에 나타나는 각종 세포주기관련 유전자들(cyclin A, cyclin B, cyclin C, cyclin D1, cyclin E, cdc2, CDK2, CDK4, $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, E2F, PCNA와 Rb)의 발현 양상을 RNA와 단백 수준에서 분석하여 방사선조사에 의한 apoptosis에서 나타나는 세포주기 조절의 변화를 규명함으로서 방사선치료의 기전에 대한 분자생물학적 이해를 도모하고자 이 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 방사선조사

promyelocytic leukemia 세포주인 HL60 세포주를 미국 ATCC(American Type Culture Collection)으로부터 분양받아 2×10^5cell/ml에서 10×10^5cell/ml 농도로 10% FBS를 함유하는 RPMI1640 세포배양액으로 36℃, 5% CO_2에서 배양 유지하였다. 방사선 조사시에는 3.5×10^5cell/ml 농도로 직경 100mm 세포배양접시에 세포를 분주하고 선형가속기(Mitsubishi사, ML-15-MDX, 6MV X-선)를 이용하여 배양용기의 상하양면에 acryl을 두어 X-선의 build-up과 후방산란을 보정하고 세포에 8Gy의 방사선을 조사하였다.

2. Trypan Blue Exclusion Assay

방사선 조사 직전과 방사선 조사 후 6, 12, 24, 48 시간 후에 각각 0.4% trypan blue 50μl에 세포배양액 50μl를 넣고 섞은 후 hemocytometer에 넣고 1분 후 세포수를 세어 생존세포수를 계수하였다.

3. Apoptotic DNA Fragmentation Assay

0.5×10^6개의 세포를 eppendorf-tube로 옮긴 후 2000rpm에서 2분간 원심하여 세포를 얻은 후 20μl의 lysis buffer(20mM EDTA, 100mM Tris, pH 8.0, 0.8%(W/V) sodium lauryl sarcosine)와 2μl의 RNase A(5mg/ml)를 섞고 37℃에서 1시간 incubation한 후 20μl의 proteinase K를 넣고 50℃에서 12시간 반응시켰다. 여기에 6×Gel Loading Buffer (GLB) 5μl를 넣고 섞은 후 1.2% agarose gel로 dry gel electrophoresis(전기영동)를 실시하였다.

4. SDS-PAGE 및 Western Blot Analysis

방사선 조사 직전과 방사선 조사 후 6, 12, 24, 48 시간 후에 세포들에 Lysis Buffer(10mM Tris-Cl (pH7.4), 5mM EDTA(pH 8.0), 130mM NaCl, 1% TritonX-100), 0.2M phenyl-methyl-sulfonyl fluoride, proteinase inhibitor cocktail을 넣고 얼음에서 30분간 둔 후 원심하여 상층액을 취한 후 BioRad protein assay kit로 정량하였다. 얻어진 단백질 분획을 SDS-PAGE로 전기영동하고 nitrocellulose paper(Millipore 제, Immobilon)로 electrotransfer를 시행하였다. transfer된 membrane을 Blotto용액(5% skim dry milk in TBS-T buffer)에 넣어 cold chamber내에서 12시간 진탕(shaking)하였다. Blotto용액을 제거하고 일차항체 용액(실온)에 2시간 두고 TBS-T buffer로 세척한 다음 이차항체 용액(실온)에서 1시간 두었다. 이를 다시 TBS-T buffer로 세척한 후 Enhanced Chemiluminescence(ECL, Amersham사)로 관찰하였다. cyclin A, B, D1, E와 E2F, PCNA, cdc2, cdk4, p16, P27 단백들에 대한 일차항체는 Santacruz사의 제품을, Rb와 p21에 대한 일차항체는 pharmingen사의 제품을 사용하였다.

5. RT-PCR (Reverse Transcripion-Polymerase Chain Reaction)

1) RNA 분리

방사선 조사 직전과 방사선 조사 후 3, 6, 12, 24, 48시간 후에 각각 배양된 세포를 원심하여 모은 후 RNAzol B(Biotecx laboratories, Inc.)를 1ml 넣고 잘 섞고 0.1ml의 chloroform을 넣고 15초간 잘 혼합한 후 4℃에 5분간 두었다. 이것을 12,000rpm, 4℃로 15분 원심하여 상층액을 새 tube로 옮긴 후 동량의 2-propanol을 넣고 -70℃에 2시간 방치하였다. 이를 12,000rpm에서 4℃로 15분 원심하여 RNA침사를 얻은 후 75% cold 에탄올로 세척하고 Speedvac concentrator(Savant Co, U.S.A.)에서 5분간 건조시킨 다음 여기에 diethyl pyrocarbonate(DEPC)처리된 증류수 100μl를 넣어 녹인 후 UV 분광광도계로 농도 및 순도를 측정하고 -70℃에 보관하였다.[14)]

2) cDNA 합성

분리된 RNA 4μg을 oligo dT(16mer)를 사용하여 40 μl 용량으로 역전사(reverse transcription)를 시행하였다. 반응혼합액의 조성은 RNA 4 μg, 5mM $MgCl_2$, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH8.3), 1mM dATP, 1 mM dTTP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1U/μl RNase inhibitor(Perkin-Elmer Co.), 2.5U/μl MuLV reverse transcriptase(Perkin-Elmer Co.), 2.5μM oligo d(T)16이며, 반응 조건은 42℃ 1시간, 99℃ 5분, 5℃ 5분으로 하였다.

3) mRNA의 반정량적 분석을 위한 PCR

PCR은 10×reaction buffer(15mM $MgCl_2$, 100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl) 5μl와 10mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1μl씩 그리고 30μM sense 및 antisense primer(Table 1)를 각각 1μl를 넣은 mixture에 1μl의 반응시킨 cDNA 반응혼합물과 2.5unit의 Taq polymerase(Perkin Elmer Co.)를 넣은 후 증류수로 50μl로 용량을 맞추고 30μl의 광유(mineral oil)를 중층한 후 DNA thermal cycler (Perkin Elmer Co.)를 사용하여 PCR을 시행하였다. DNA denaturation은 95℃ 1분, annealing은 60℃ 1분, extension은 72℃ 2분으로 하여 GAPDH 유전자 증폭을 위해서는 25 cycle, 나머지 유전자들의 증폭을 위해서는 30 cycle을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물 10μl를 1% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하고 UV transilluminator에서 사진을 촬영하였다.

결 과

방사선 조사에 의한 세포의 생존율을 조사하기 위하여 3.5×10^5cell/ml 의 세포에 8Gy의 X-선을 조사하고 세포를 배양하면서 방사선 조사 직전과 조사 후 6, 12, 24, 48 시간에 trypan blue dye exclusion 실험으

Table 1. PCR Primers Used in This Study

Genes		Sequences	Product size(bp)
cyclin A	Sense	5' CAGAA TGAGA CCCTG CATTT GGCTG 3'	615
	Antisense	5' CAGAT TTAGT GTCTC TGGTG GGTTG 3'	
cyclin B	Sense	5' CCATT ATTGA TCGGT TCATG CAGA 3'	585
	Antisense	5' CTAGT GGAGA ATTCA GCTGT GGTA 3'	
cyclin C	Sense	5' CCTGT ATTAA TGGCT CCTAC ATGTG TG 3'	510
	Antisense	5' GGTTG CCATC TCTTT TCTCT CATCG A 3'	
cyclin D1	Sense	5' ACCTG GATGC TGGAG GTCTG 3'	402
	Antisense	5' GAACT TCACA TCTGT GGCAC A 3'	
cyclin E	Sense	5' GGAAG GCAAA CGTGA CCGTT 3'	638
	Antisense	5' GGGAC TTAAA CGCCA CTTAA 3'	
CDK2	Sense	5' CATGGAGAACTTCCAAAAG 3'	901
	Antisense	5' CTATCAGAGTCGAAGATGGG 3'	
CDK4	Sense	5' ATGGCTGCCACTCGATATGA 3'	912
	Antisense	5' CTCTGGGTTGCCTTCGTCCTT 3'	
p16	Sense	5' ATGGAGCCTTCGGCTGACT 3'	464
	Antisense	5' GAGCCTCTCTGGTTCTTTCA 3'	
p21	Sense	5' CGGGATCCGGCGCCATGTCAGAACCGGC 3'	509
	Antisense	5' CGGGAATTCGTGGGCGGATTAGGG 3'	
p27	Sense	5' GCGGGATCCATGTCAAACGTGCGAGTGTC 3'	615
	Antisense	5' GTGAAGCTTTTACGTTTGACGTCTTCTGA 3'	
GAPDH	Sense	5' CGTCT TCACC ACCAT GGAGA 3'	300
	Antisense	5' CGGCC ATCAC GCCAC AGTTT 3'.	

로

생존세포계수(viable cell counting)를 시행하였다(Fig. 1). 생존세포계수 결과 방사선을 조사하지 않은 세포는 지속적인 성장분열로 생존세포수가 증가하여 confluent상태로 되어 성장이 억제될 때까지 증가하였으나, 방사선 조사군에서는 약 6시간 후까지 세포수의 변화가 없다가 시간이 진행할수록 생존세포수가 감소하였다. 이러한 생존 세포수 감소가 방사선 조사에 의한 apoptosis의 결과인지를 알아보기 위하여 DNA fragmentation assay를 시행하였다(Fig. 2). 방사선 조사(8Gy) 후에 HL60 세포주가 apoptosis가 유도되는 지를 시간별로 DNA를 분리하여 DNA fragmentation assay로 조사한 결과 방사선 조사 후 12시간부터 apoptotic DNA ladder가 관찰되기 시작하여 24시간, 48시간이 되면서 분명하게 나타나 8 Gy의 방사선 조사로 apoptosis가 발생함을 알 수 있었다.

방사선 조사에 의한 HL60세포주의 apoptosis에 있어서 세포주기 관련 유전자 발현의 변화를 조사하기 위하여

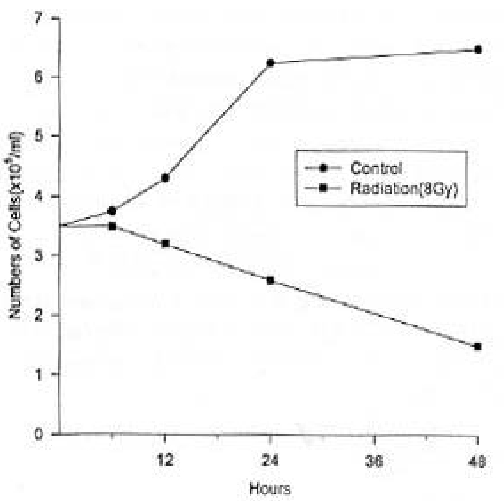

Fig. 1. Viable cell counting of HL60 cells. Cells were seeded at concentration of 3.5x10^5 cells/ml on time 0. Viability was determined by trypan blue dye exclusion test.

각종 세포주기 관련 단백의 발현을 western blot방법으로 조사하였다(Fig. 3-10). Cyclin A는 방사선 조사군에서 조사 후 48 시간까지 시간이 갈수록 증가하였으며, cyclin E는 조사 후 6시간 및 12시간에는 증가되어 있었으나, 24시간이나 48시간에는 급격한 감소를 보였다. E2F는 조사후 6시간부터 바로 급격한 증가를 보이다가 48시간에 감소하였으며 CDK2도 조사 후 증가하다가 48시간에 감소하였다. cyclin D1, PCNA, CDC2, CDK4, $p16^{INK4a}$는 급격한 발현의 차이를 보이지 않았으며 $p21^{WAF1}$과 $p27^{KIP1}$ 단백은 검출할 수 없었다. Rb단백은 방사선 조사 후 6시간부터 전체적인 Rb단백이 증가하여 12-24시간에 가장 많은 발현이 보이다가 48시간에 감소하였다. 이러한 양적변화의 대부분은 비활성형인 ppRb(phosphorylated Rb protein)의 양적변화에 의한 것이었다.

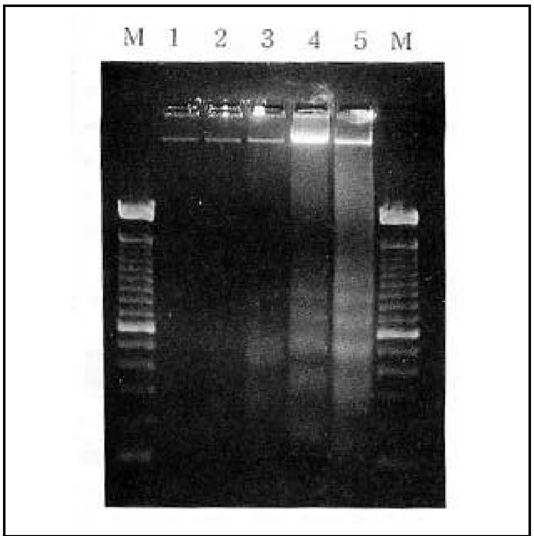

Fig. 2. Photograph of electrophoresed gel showing apoptosis-like DNA "ladders" in HL60 cells after X irradiation(8Gy). Lanes 1-5: 0, 6, 12, 24, 48 hours after irradiation, M: 100bp DNA ladder size marker.

RNA수준에서의 세포주기관련 유전자의 발현변화를 조사하기 위하여 반정량적 RT-PCR을 시행하였다(Fig. 11, 12). cyclin A, B, C의 mRNA는 방사선 조사 직후 감소하였다가 12시간부터 발현이 증가되었으며 cyclin D1 mRNA는 조사후 바로 증가하여 48시간에 다시 감소하였다. cyclin E mRNA는 조사후 시간이 경과함에 따라 감소하였다. CDK2 mRNA는 3시간째는 감소하다가 6시간부터 많은 증가를 보였으며 CDK4 mRNA는 조사후 6-12시간에 급격한 발현증가를 보였다. $p16^{INK4a}$ mRNA는 발현의 변화가 없었으며, $p21^{WAF1}$ 및 $p27^{KIP1}$ mRNA의 발현은 관찰되지 않았

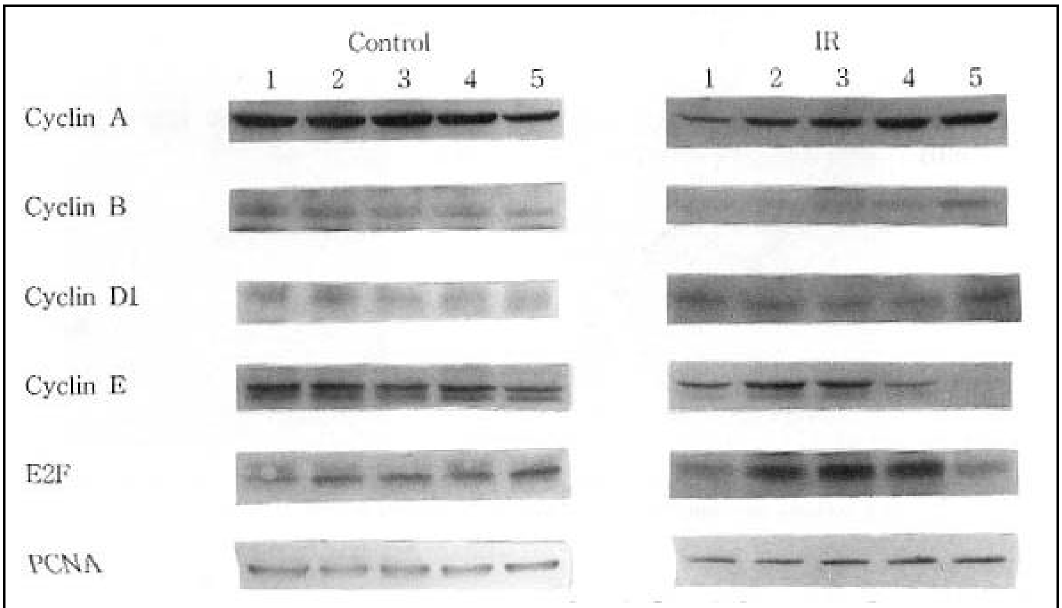

Fig. 3. Western blot analysis of relative changes in cyclin A, cyclin B, cyclin D1, cyclin E, E2F and PCNA expression levels after irradiation. Lysates from control and irradiated cells were subjected to immunoblotting with anti-cyclin A, anti-cyclin B, anti-cyclin D1, anti-cyclin E, anti-E2F, or anti-PCNA antibodies. Lanes 1-5: 0, 6, 12, 24 and 48 hours after irradiation.

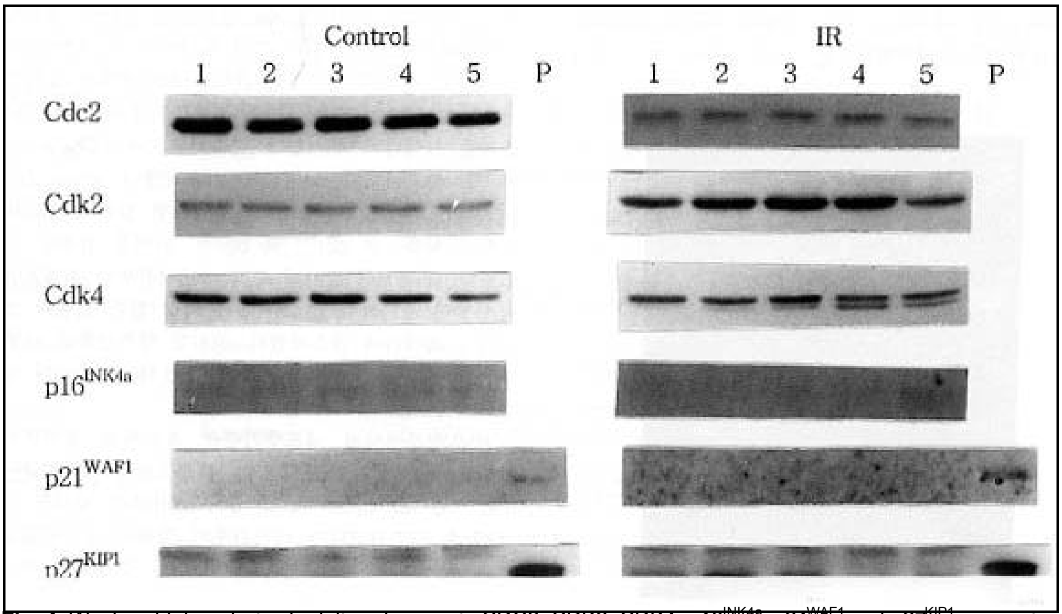

Fig. 4. Western blot analysis of relative changes in CDC2, CDK2, CDK4, p16^{INK4a}, p21^{WAF1} and p27^{KIP1} expression levels after irradiation. Lysates from control and irradiated cells were subjected to immunoblotting with anti-CDC2, anti-CDK2, anti-CDK4, anti-p16^{INK4a}, anti-p21^{WAF1}, or anti-p27KIP1 antibodies. Lanes 1-5: 0, 6, 12, 24 and 48 hours after irradiation, P: positive control.

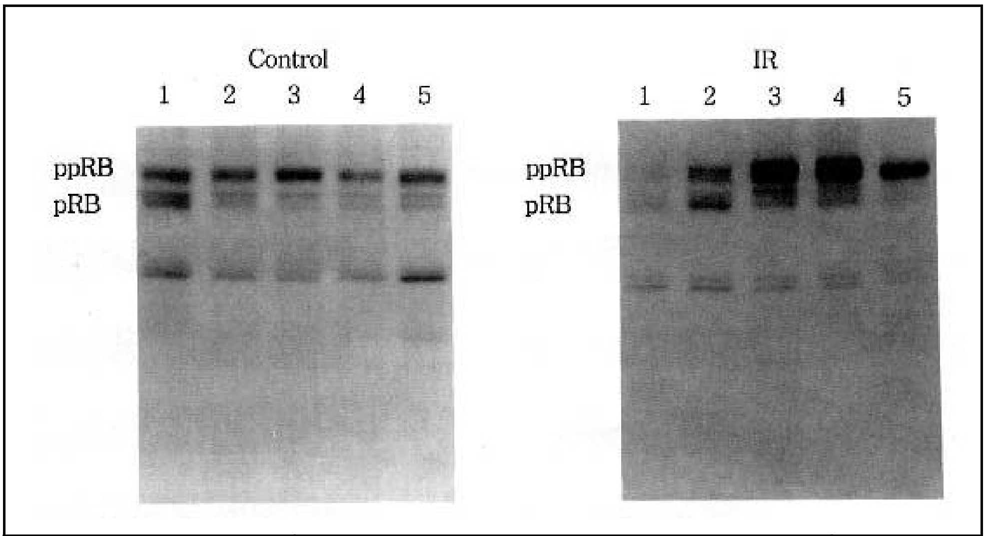

Fig. 5. Western blot analysis of RB protein in control and irradiated HL60 cells. Lysates from control and irradiated cells were subjected to immunoblotting with anti-RB antibody. Lanes 1-5: 0, 6, 12, 24 and 48 hours after irradiation.

다.

고 찰

방사선조사는 세포의 일시적인 세포주기의 정지와 DNA손상복구의 증가 그리고 복구할 수 없는 세포사

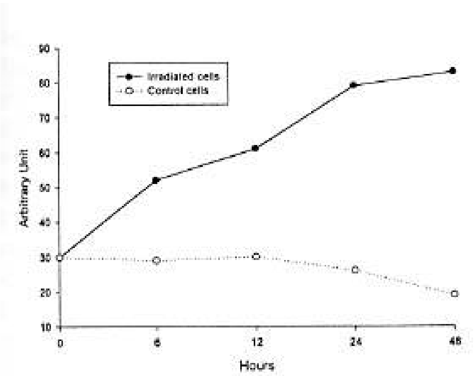

Fig. 6. Expression levels of cyclin A protein in control and irradiated HL60 cells.

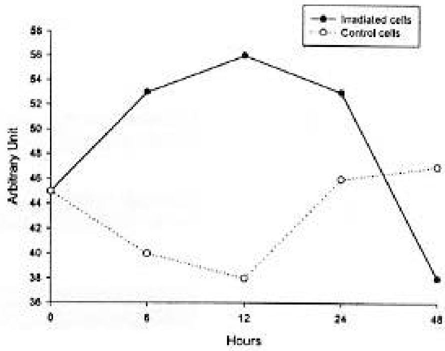

Fig. 9. Expression levels of CDK2 protein in control and irradiated HL60 cells.

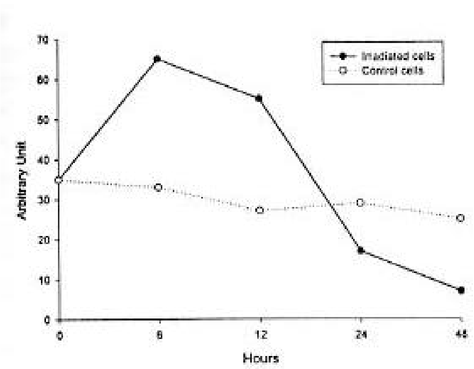

Fig. 7. Expression levels of cyclin E protein in control and irradiated HL60 cells.

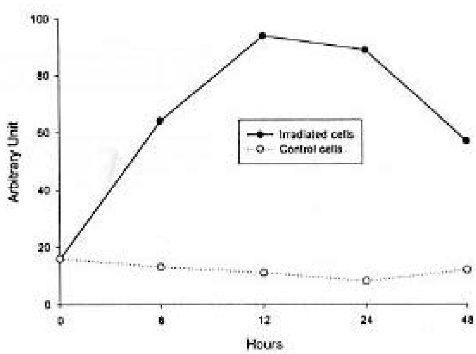

Fig. 10. Expression levels of Rb protein in control and irradiated HL60 cells.

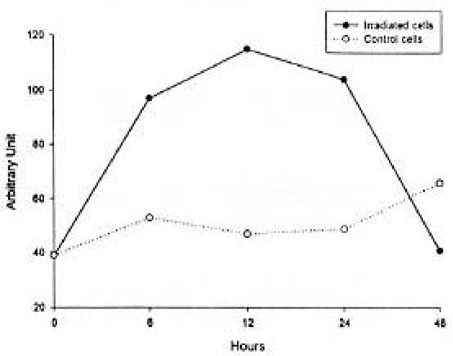

Fig. 8. Expression levels of E2F protein in control and irradiated HL60 cells.

등을 일으킨다. 각종 자극에 의한 apoptosis가 유도되는 세포는 apoptosis과정을 수행하면서 세포주기 조절인자의 변화가 동반된다고 알려져 있다. 이 실험에서는 방사선조사에 의해 유도되는 apoptosis에서 세포주기 조절인자들의 발현 변화를 HL60 세포주에 8Gy의 방사선을 조사한 후 세포의 생존율을 계산하고 같은 시간대에서 DNA fragmentation assay를 시행한 결과 생존세포수 감소 및 DNA ladder 현상이 관찰되었다. DNA ladder현상은 apoptosis때 세포내의 calcium dependent nuclease가 활성화되어 genomic DNA가 절단되어 나타난다고[6] 알려져 있어 8Gy의 방사선조사가 HL60 세포주에서는 충분히 apoptosis를 유도할 수 있음을 시사한다.

최근까지 여러 연구에 의해 apoptosis때에 세포주기조절의 혼란이 발생한다는 것이 보고되고 있어 방사선조사에 의한 HL60 세포주의 세포상해시에 나타나는 각종 세포주기관련 유전자들

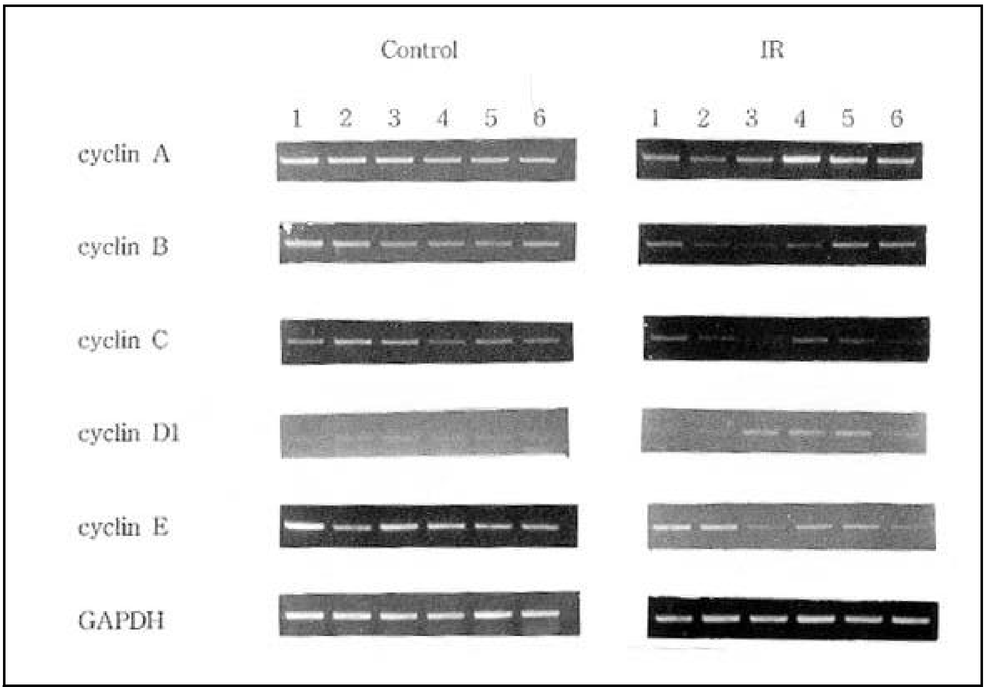

Fig. 11. RT-PCR analysis of relative changes in cyclin A, B, C, D1, E, and GAPDH mRNA expression levels after irradiation. Total RNAs from control and irradiated cells were subjected to reverse transcription. Lanes 1-6: 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after irradiation.

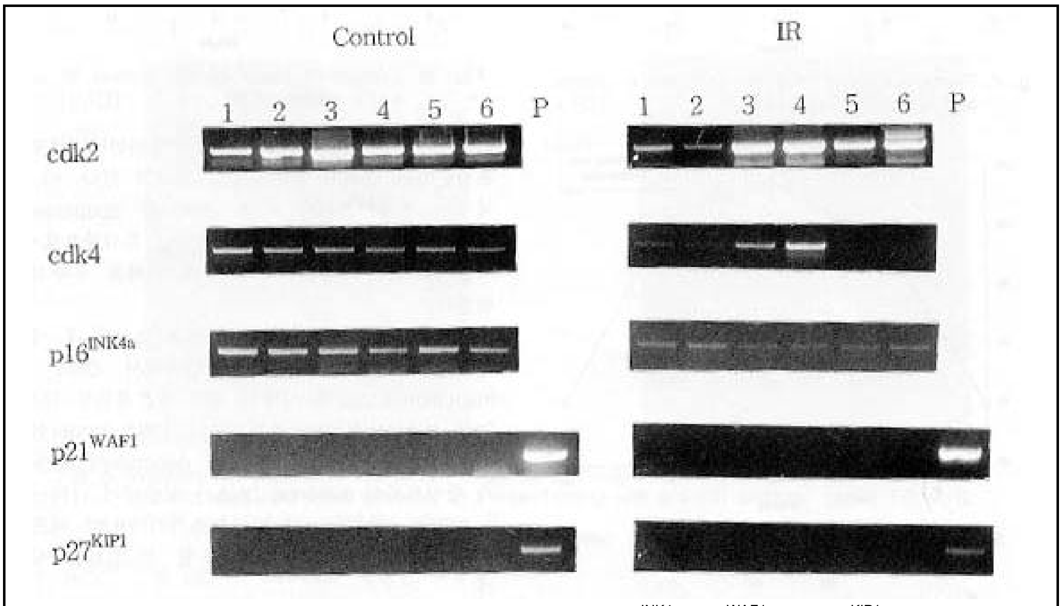

Fig. 12. RT-PCR analysis of relative changes in CDK2, CDK4, $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1}$ and $p27^{KIP1}$ mRNA expression levels after irradiation. Total RNAs from control and irradiated cells were subjected to reverse transcription. Lanes 1-6: 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after irradiation, P: positive control.

(cyclin A, cyclin B, cyclin D1, cyclin E, cdc2, CDK4, p16^{INK4a}, p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, E2F, PCNA와 RB)의 발현 양상을 단백 수준에서 조사하기 위하여 western blot analysis를 시행하였다. 실험 결과 가장 주목할 만한 것은 E2F의 발현 변화와 이와 함께 나타나는 cyclin A, E 및 pRb와 CDK2의 변화였다. E2F는 전사조절인자로서 세포가 G1기에서 S기로 세포주기의 이동이 이루어 질 때 주로 발현이 증가되며 cyclin A, cyclin E, cdc2, c-myc, DNA polymerase-alpha, thymidine kinase 등의 발현을 증가시킨다고 한다[15]. 어떤 세포에서는 S기로의 진행이 apoptosis의 발생과 연관되어 있다고 알려져 있으며[16], 또한 E2F의 과발현은 세포의 S기로의 진행과 DNA합성을 유도하고 과도한 E2F의 발현유도는 apoptosis를 유발하기도 한다.[17-20] E2F-1$^{-/-}$ mice의 세포는 apoptosis에 결함이 있었으며 비정상적 세포분열이 있었다는 보고도 있다.[21] 이와 같은 다른 연구자들의 연구와 연관하여 볼 때 이 실험에서 방사선 조사 후 6시간에서 24시간까지의 E2F단백발현 증가는 방사선 조사에 의한 apoptosis의 유도에 관련이 있다고 생각된다. cyclin E와 CDK2 그리고 cyclin A단백은 G1/S transition에 관여하는 cyclin과 CDK들로서 방사선 조사 후 12시간까지의 cyclin E 단백의 증가, 24시간까지의 CDK2 단백의 증가 그리고 48시간까지의 cyclin A 단백의 증가도 같은 현상으로서 생각된다. 즉 방사선 조사 후 유도되는 HL60세포의 apoptosis는 세포의 G1/S transition과 연관되어 있을 것으로 사료된다.

Rb 단백은 retinoblastoma에서 처음 발견된 항암 유전자로서 그 후 여러 연구에 의하여 pRB가 E2F와 결합하여 G1기에 세포주기의 정지를 유도한다는 것과[22-24] CDKs(cyclin dependent kinases) 특히 cyclin D/CDK4, cyclin E/CDK2에 의해 주기적으로 인산화되면서 E2F와의 결합력이 약화된다는 것이 알려지게 되었다[8, 25-28]. 이 실험에서 방사선 조사 후 Rb단백을 western blot으로 검사한 결과를 보면 조사 후 즉각적인 Rb단백의 증가가 보이고 시간이 갈수록 E2F와 결합할 수 있는 활성형인 비인산화형 Rb 단백이 감소하는 것이 보이고 있다. 이러한 Rb단백의 증가와 활성형 Rb단백의 감소는 방사선 조사에 의해 유도되는 apoptosis와 연관되는 것으로 추측되며 그 기전은 E2F의 비정상적인 과발현과 cyclin E/CDK2의 발현 증가와도 관련이 있는 것으로 사료된다. 최근에는 apoptosis때 활성화되는 효소계인 caspase의 기질로서 Rb단백이 포함된다는 연구 결과들이[29-31] 나오고 있어 caspase와 연관하여 연구해 보아야 할 것으로 생각된다.

p21^{WAF1}과 p27^{KIP1}단백은 HL60세포주를 분화유도하였을 때 발현이 증가하는 것으로 알려져 있어[32-34] 이를 양성대조군으로 사용하여 실험한 결과 분화유도제(TPA) 처리시에는 발현이 유도되었으나 방사선 조사시에는 발현되지 않아 방사선조사에 의한 HL60세포주의 apoptosis에서는 이들의 역할이 없는 것으로 생각되며 발현의 변화가 보이지 않은 CDK4, p16^{INK4a}, cyclin B, D1, 그리고 PCNA 단백들은 방사선 조사에 의한 apoptosis 유도에서는 별 변화가 없는 것으로 사료된다.

RNA수준에서의 세포주기관련 유전자의 발현변화를 반정량적 RT-PCR로 실험한 결과를 보면 cyclin A mRNA가 방사선 조사 후 계속적으로 증가하고 있고 cyclin E는 방사선 조사후 시간이 경과함에 따라 감소하며, CDK2 mRNA는 3시간째는 감소하다가 6시간부터 많은 증가를 보이고 있어 western blotting실험에서 나타난 cyclin A 단백이나 CDK2 단백의 증가와 cyclin E 단백의 감소는 mRNA의 전사증가나 감소에 의한 것으로 생각된다. 그러나 다른 유전자들을 보면 cyclin B mRNA는 방사선 조사 직후 감소하였다가 12시간부터 발현이 증가되고, cyclin D1 mRNA는 조사 후 바로 증가하여 48시간에 다시 감소하고, CDK4 mRNA는 조사 후 6-12시간에 급격한 발현 증가를 보여 단백발현의 변화와는 다르게 나타났다. 이러한 차이는 post-transcriptional regulation에 의한 것이라고 생각되지만 앞으로 actinomycin D나 cycloheximide 등을 사용하여 발현조절에 대한 좀더 구체적인 연구가 필요하리라고 생각된다. p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1} mRNA의 발현은 관찰되지 않아 p21^{WAF1} 및 p27^{KIP1}유전자의 발현이 transcription에서 발현 유도되지 않는 것을 알 수 있었다.

이상과 같이 저자는 HL60 세포주를 대상으로 방사선조사에 의해 유도되는 apoptosis에서 세포주기관련 유전자의 발현변화를 조사하였다. 실험 결과들을 종합하여 볼 때 apoptosis때에는 세포주기조절의 혼란이 발생함을 알 수 있었다. 특히 HL60세포의 방사선조사에 의한 apoptosis는 E2F발현 증가와 cyclin E와 CDK2 그리고 cyclin A 유전자의 발현증가 양상을 보여서 세포의 G1/S 이행과 apoptosis가 연관되어 있는 것으로 사료된다. 그리고 Rb단백의 증가와 활성형 Rb단백의 감소 현상도 apoptosis와 연관되는 것으로 생각되며 그 기전은 E2F의 비정상적인 과발현과 cyclin E/CDK2의 발현 증가와도 관련이 있는 것으로

추측된다. HL60세포주를 TPA로 분화유도하였을 때 발현이 유도되는 것으로 알려진 $p21^{WAF1}$과 $p27^{KIP1}$은 본 실험에서는 방사선조사에 의해 발현이 유도되지 않아서 방사선조사에 의한 apoptosis에는 이들이 관여되지 않는 것으로 생각된다.

결 론

방사선조사에 의한 세포상해시에 나타나는 각종 세포주기관련 유전자들의 발현 양상을 RNA와 단백 수준에서 조사하여 방사선 조사에 의한 apoptosis에서 나타나는 세포주기조절의 변화를 규명함으로써 방사선 치료의 기전에 대한 분자생물학적 이해를 도모하고자 HL60 세포주를 대상으로 방사선 조사 후 cyclin A, cyclin B, cyclin C, cyclin D1, cyclin E, cdc2, CDK2, CDK4, $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, E2F, PCNA와 Rb에 대하여 반정량적 RT-PCR과 western blot analysis를 시행하였다.

방사선 조사에 의한 HL60세포의 apoptosis에서 E2F단백 발현 증가, cyclin E와 CDK2, 및 cyclin A 단백의 증가양상을 보였다. 세포의 G1/S transition과 apoptosis는 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다. 그리고 Rb단백의 증가와 활성형 Rb단백의 감소도 apoptosis와 연관되어 있는 것으로 사료되며 그 기전은 E2F의 비정상적인 과발현 및 cyclin E/CDK2의 발현 증가와 관련이 있는 것으로 추측된다. HL60세포주에서 TPA로 분화유도를 시켰을때 발현이 유도되는 것으로 알려진 $p21^{WAF1}$과 $p27^{KIP1}$은 방사선 조사로 발현유도가 되지 않아 방사선 조사에 의한 apoptosis에는 관여하지 않는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. **Yarnold J.** Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. Radiother Oncol 1997; 44:1-7
2. **Carr AM, Hoekstra MF.** The cellular responses to DNA damage. Trends Cell Biol 1995; 5:32-40
3. **Martin SJ, Green DR.** Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. Crit Rev Oncol 1995; 18:137-153
4. **Steller H.** Mechanism and genes of cellular suicide. Science 1995; 267:1445-1449
5. **White E.** Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. Genes Dev 1993; 7:2277-2284
6. **Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 1980; 284:555-556
7. **Sherr CJ.** Cancer cell cycles. Science 1996; 274: 1672-1677
8. **Sherr CJ and Roberts J.** Inhibitors of mammalian G1 cyclin dependent kinases. Genes Dev 1995; 9: 1149-1163
9. **Wang JY.** Retinoblastoma protein in growth suppression and death protection. Curr Opin Genet Dev 1997; 7:39-45
10. **Hickman J.** Apoptosis induced by anticancer drugs. Cancer metastasis Rev 1992; 11:121-139
11. **Sellins KS.** Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. Radiat Res 1991; 126:88-95
12. **Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, et al.** Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med 1994; 180:525-535
13. **Ward JF.** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and reparability. Prog Nucleic Acid Mol Biol 1988; 35:95-125
14. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162:158-159
15. **DeGregori J, Kowalik T, Nevins J.** Cellular targets for activation by the E2F-1 transcription factor include DNA synthesis and G1-S-regulatory genes. Mol Cell Biol 1995; 15:4215-4224
16. **Manome Y, Datta R, Taneja N, et al.** Coinduction of c-jun gene expression and internucleosomal DNA fragmentation by ionizing radiation. Biochemistry 1993; 32:10607-10613
17. **Kowalik TF, Degregori J, Schwartz JK, et al.** E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. J Virol 1995; 69:2491-2500
18. **Qin X-Q, Livingston DM, Kaelin WG Jr, et al.** Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:10918- 10922
19. **Shan B, Lee W-H.** Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. Mol Cell Biol 1994; 14:8166-8173
20. **Wu X, Levine A.** p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:3602-3606
21. **Field SJ, Tsai F-Y, Kuo F, et al.** E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress

proliferation. Cell 1996; 85:549-561
22. **Hamel PA, Phillips RA, Muncaster M, et al.** Speculations on the roles of RB1 in tissue specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. FASEB J 1993; 7:846-854
23. **Nevins JR.** E2F: A link between the tumor suppressor protein and viral oncoproteins. Science 1992; 258:424-429
24. **Wang JY, Knudsen ES, Weich PJ.** The retinoblastoma tumor suppressor protein. Adv Cancer Res 1994; 64:25-84
25. **Lees JA, Buchkovich KJ, Marshak DR, et al.** The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. EMBO J 1991; 10: 4279-4290
26. **Peter M, Herskowitz L.** Joining the complex cyclin dependent-kinase inhibitory proteins and the cell cycle. Cell 1994; 79:181-184
27. **Peters G.** Stifled by inhibitions. Nature 1994; 371: 204-205
28. **Sherr CJ.** Mammalian G1 cyclins. Cell 1993; 73: 1059-1065
29. **An B, Dou QP.** Cleavage of retinoblastoma protein during apoptosis: An interleukin 1 beta-converting enzyme like protease as candidate. Cancer Res 1996; 56:438-442
30. **Chen W-D, Otterson GA, Lipkowitz S, et al.** Apoptosis is associated with cleavage of 5kDa fragment from RB which mimics dephosphorylation and modulates E2F binding. Oncogene 1997; 14: 1243-1248
31. **Janicke RU, Walker PA, Lin XY, et al.** Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like proteinase in apoptosis. EMBO 1996; 15: 6969-6978
32. **Jiang H, Lin J, Su Z, et al.** Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. Oncogene 1994; 9:3397-3406
33. **Steinman RA, Hoffman B, Iro A, et al.** Induction of p21(WAF-1/CIP1) during differentiation. Oncogene 1994; 9:3389-3396
34. **Wang QM, Jones JB, Studzinski GP.** Cyclin-dependent kinases inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. Cancer Res 1996; 56: 264-267

= 국문 초록 =

HL60 세포주에서 방사선조사에 의한 Apoptosis와 세포 주기 관련 유전자의 발현 변화

계명대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 경북대학교 의과대학 치료방사선과학교실†

김 진 희* · 박 인 규†

목 적 : 방사선조사에 의한 apoptosis에서 나타나는 각종 세포주기관련 유전자들의 발현 양상을 RNA와 단백 수준에서 분석하여 방사선조사에 의한 apoptosis에서의 세포주기 조절의 변화를 규명함으로서 방사선치료의 기전에 대한 분자생물학적 이해를 도모하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법 : promyelocytic leukemia 세포주인 HL60 세포주를 배양하여 선형가속기(6MV X-선)로 세포에 8Gy의 방사선을 조사하였다. 조사후 다양한 시간 간격으로 Apoptotic DNA Fragmentation Assay법을 이용하여 apoptosis를 확인하고 동시에 세포주기관련 유전자들(cyclin A, cyclin B, cyclin C, cyclin D1, cyclin E, cdc2, CDK2, CDK4, $p16^{INK4a}$, $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$, E2F, PCNA와 Rb)을 단백질과 RNA 수준에서 분석하기위해 western blot analysis와 반정량적 RT-PCR을 시행하였다.

결 과 : 8 Gy의 방사선 조사에 의해 HL60세포에서 apoptosis가 관찰 되었다. 방사선 조사군에서 cyclin A단백은 조사후 48시간까지 시간이 갈수록 증가하였으며, cyclin E, E2F, CDK2 및 Rb 단백은 증가되었다가 다시 감소를 보였다. Rb단백의 증가는 대부분 비활성형인 ppRb (phosphorylated Rb protein)의 양적변화에 의한 것이었다. cyclin D1, PCNA, CDC2, CDK4, $p16^{INK4a}$단백은 발현의 차이를 보이지 않았으며 $p21^{WAF1}$과 $p27^{KIP1}$ 단백은 검출되지 않았다. cyclin A, B, C mRNA는 방사선 조사 직후 감소하였다가 12시간부터 발현이 증가되었으며 cyclin D1 mRNA는 조사후 바로 증가하여 48시간에 다시 감소하였다. cyclin E mRNA는 조사후 시간이 경과함에 따라 감소하였다. CDK2 mRNA는 3시간째는 감소하다가 6시간부터 많은 증가를 보였으며 CDK4 mRNA는 조사후 6-12시간에 급격한 발현증가를 보였다. $p16^{INK4a}$ RNA는 발현의 변화가 없었으며, $p21^{WAF1}$ 및 $p27^{KIP1}$ RNA의 발현은 관찰되지 않았다.

결 론 : 이상의 결과로 미루어볼 때, 방사선 조사에 의한 HL60세포의 apoptosis와 세포의 G1/S transition는 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되며 Rb단백의 증가와 활성형 Rb단백의 감소 현상도 관련이 있는 것으로 사료된다. 이는 E2F의 비정상적인 과발현 및 cyclin E/CDK2의 발현 증가와 관련이 있는 것으로 추측된다. 또한 $p21^{WAF1}$ 및 $p27^{KIP1}$는 방사선에 의한 apoptosis에는 관여되지 않는 것으로 사료된다.