대한방사선종양학회지 1999;17(1):70 77

SCK 선암세포주에서 방사선 조사에 의해 유도되는 Apoptosis에 미치는 암유전자의 발현

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 동아암센터*, 미생물학교실†
이형식*·박홍규*·문창우*·윤선민*·허원주*·정수진†·정민호†·이상화†
인하대학교 의과대학 미생물학교실‡
박 헌 주‡

목 적:연구자들은 배양 배지의 산성환경이 SCK 선암세포에서 apoptosis를 유도하는 것과 산성환경이 SCK 선암세포주에서 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 억제시킨다고 관찰하고 apoptosis 관련 유전자들인 p53, p21/ WAF/CIP, Bcl-2 및 Bax 들의 발현과 배양 배지 pH 환경과의 연관성을 관찰하였다.

대상 및 방법:SCK 선암 세포주를 체외 방사선 조사기를 이용하여 방사선 12Gy 조사 후 규정된 시간에 DNA fragmentation을 전기 영동으로 관찰하였다. 실험 조작으로 apoptosis가 유발된 세포군을 정량적으로 분석하고 세포주기 분석을 위하여 FACScan을 이용하였다. Apoptosis 관련 유전자들인 p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2 및 Bax 들의 발현은 western blot으로 관찰하였다.

결 과:SCK 선암 세포주에서 방사선에 의해 유도되는 apoptosis는 산성환경(pH 6.6)에서는 apoptosis의 유발이 억제된다는 사실을 관찰할 수 있었다. 세포주기 분석에서는 방사선조사 후 apoptosis가 뚜렷히 관찰된 pH 7.5 배양 배지 조건에 비하여 pH 6.6 배양 배지 조건에서 현저한 G2/M arrest가 관찰 되었다. apoptosis 관련 유전단백 분석에서는 Bcl-2 유전단백은 두 군 공히 발현의 차이를 관찰할 수 없었고, p53 및 p21은 pH 7.5 배양 배지 환경에서 뚜렷한 발현의 증가를 관찰하였고, p21은 pH 6.6 배양 배지 환경에서는 발현을 관찰할 수 없었다. Bax는 pH 7.5 배양 배지 환경에서 pH 6.6 환경에 비해 경미한 발현의 증가 및 지속성을 관찰하였다.

결 론:저자들은 SCK 선암 세포주를 대상으로 방사선조사 후 상이한 pH 7.5 와 6.6의 배양 배지 조건에 따른 apoptosis의 관찰에 영향을 주는 유전자 발현에 관한 연구에서 Bcl-2 family의 발현에 비해 세포주기 관련 유전단백들인 p53 발현과 이에 따른 p21의 발현차이가 확연한 p53-dependent apoptotic pathway를 확인하였다. 방사선 조사 후 pH 6.6의 배양 배지 조건에서의 apoptosis 현상을 관찰할 수 없었던 이유는 pH 6.6의 경우 50-60%의 세포가 G2/M arrest에서 세포주기를 순환하지 못함을 확인하였기에 G2/M arrest의 해지와 더불어 순환되는 세포주기의 결과에 따른 post-mitotic apoptosis 현상의 장애로 추론하였다.

핵심용어:방사선아포프토시스, 종양유전자, 세포주기

서 론

저자들은 SCK 선암 세포주를 이용하여 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에 관한 연구를 시행하고 보고한 바 있다.1) 통상적인 정성 분석 방법인 agarose 겔 전기영동 방법을 이용하여 방사선 조사량과 배지 pH 환경과의 관계를 관찰한 결과 8Gy, 12Gy의 방사선 조사량과 pH 7.5의 배양 배지 조건하에서 48시간째 DNA fragmetation의 지표인 laddering이 현저하였고 pH 6.6 조건에서는 관찰할 수 없었다. 또한 이러한 결과의 정량분석을 위해 실시한 3H-thymidine release assay, flow cytometry assay 및 TUNEL assay 등에서도 공히 산성 환경에서 양적으로 감소된 apoptosis 현상을 관찰할 수 있었다. 많은 연구자들이 세포내 산성환경이 apoptosis를 유발한다고 보고하였지만2 5) 방사선에 의한 apoptosis는 산성환경에서 apoptosis의 유발을 억제한다는 사실을 관찰할 수 있었다. 저자들은 상기한 관찰 결과의 기전 규명에 p53, Bcl-2 및 Bax와 같은 현재까지 방사선에 의해 유도되는 암세포의 apoptosis와 관련된 암유전자

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비(1997- 003-F-00146)에 의하여 지원되었음.
이 논문은 1998년 12월 29일 접수하여 1998년 2월 12일 채택되었음.
책임 저자:이형식, 동아대학교병원 치료방사선과
Tel:051)240-5380 Fax:051)254-5889

단백질들의 발현 또는 p21/WAF/CIP와 같은 세포주기와
관련된 암유전 단백질의 발현을 연구하는 것이 기전의 추론에 긴요하다고 생각하고 또한 실제 암 내부의 환경이 산성임을 감안할 때 세포 내 pH가 방사선에 의한 암세포의 apopt이형식 외 8인:SCK 선암세포주에서 방사선 조사에 의해 유도되는 Apoptosis에 미치는 암유전자의 발현 또는 실제
대한방사선종양학회지 1999;17(1):70 77
osis 유도에 미치는 영향에 관한 기초 연구는 암 환자의 치료에 긴요한 정보를 제시할 수 있으리라 생각하고 연구를 진행하였다.

대상 및 방법

1. 대상 세포주

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

2. 방사선 조사

세포주에 대한 방사선조사는 체외 X-선 방사선치료기를 이용하여 200 300cGy/min의 선량율로 12Gy의 방사선량을 균일하게 조사하였다. 방사선조사 1시간 전에 실험 조건에 맞춰 배양 배지의 pH를 조절하였다.

3. 세포 생존능 실험

세포의 생존은 세포막의 integrity를 판정하는 trypan blue dye 배제 방법을 이용하였다. 전처치한 세포들을 trypsinization후 0.4%(w/v) trypan blue와 1:1 혼합하여 hemocytometer를 사용하여 계수하였다.

4. DNA추출 및 전기 영동

Apoptosis 유발 유무를 정성적으로 확인하기 위하여 apoptosis로 인한 DNA 절편을 DNA 겔 전기영동 상에서 관찰하였다. 방사선 조사후 일정기간 배양한 세포를 회수하여 원심 분리하여 얻은 침전물을 인산 완충액(PBS; phosphate buffered saline)으로 세척한 후, lysis buffer(10mM Tris-HCI, pH 7.4; 10 mM NaCl; 10mM EDTA; proteinase K at 0.1mg/ml; 1% sodium dodecyl sulfate)에 재현탁하여 48℃ 수조에서 14시간 반응시켰다. 이 lysate에 cold(4℃) 5M NaCl을 첨가하여 강하게 15초간 진탕 후 1,000g에서 5 분간 원심 분리하여 상층액을 얻은 후, 동량의 2-propanol을 잘 혼합하여 -20℃ 에서 하룻밤동안 방치하여 DNA를 침전시켰다.

DNA pellet을 10,000g 에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 얻어진 DNA 침전물을 TE buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.4; 1mM EDTA)에 재부유시킨 다음 0.2mg/ml의 DNase-free RNase를 첨가하여 37℃ 에서 1시간 반응시켜 RNA를 제거하였다. 최종적인 DNA 함량은 UV 분광 광도기로 흡광도 A260/A280을 측정하여 계산하였다. 각 시료의 DNA 20μg 과 DNA 표준 분자량 표지(123 bp ladder, GIBCO/BRL, Grand Island, NY)를 전기 영동하였다. 전기 영동은 TBE buffer(89mM Tris base, 89mM Boric acid, 2mM EDTA)를 이용하여 1.5% agarose 겔에서 실시하였으며 ethidium bromide로 염색하였다.

5. Flow cytometry analysis

실험 조작으로 apoptosis가 유발된 세포군을 정량적으로 분석하기 위하여 flow 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 60 분간 반응시켰다. 각 시료는 2×104 개의 세포에서 PI 형광도를 분석하였다.

6. SDS-PAGE 와 Western blot

암 유전자의 발현정도를 알아보기 위하여 SDS-PAGE 및 Western blot을 실행하였다. Stacking 겔과 separating 겔은 4%와 12% polyacrylamide의 조성으로 하였다. BSA를 표준 단백질로 하여 Coomassie brilliant blue 방법으로 측정한 단백질을 약 2mg/ml가 되도록 조정하여 각 홈에 20μl씩 넣고 수직형 전기 영동을 200V에서 45분 동안 실시하였다.(BIO-RAD Mini-Protean II) 단백질 분자량은 SDS molecular weight markers kit(Sigma, MW-SDS-70L)를 기준으로 하였다. 상기방법으로 전기영동한 겔은 Mini transblot cell(BIO-RAD Mini- Protean Ⅱ)를 이용하여 4℃에서 250mA, 100V로 1시간동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 3% BSA가 포함된 25℃ Blotto solution(pH 7.4)에서 1 시간동안 blocking한 후 각 암유전자의 산물에 대한 항체가 들어있는 0.2% Tween-20이 함유된 4℃ 인산 완충용액에서 밤새 교반하였다. 이를 alkaline phosphatase conjugated anti-Rabbit Immunoglobulins(Sigma, A-2306)로 25℃에서 60분간 반응시키고 세척한 후 3% 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate p-toluidine salt

(BCIP)와 0.015% p-nitroblue tetrazolium chloride(NBT)가 들어있는 carbonate buffer(0.1M NaHCO3, 1.0mM MgCl2, pH 9.8)로 발색시켰다.

결 과

SCK 선암 세포를 12Gy의 방사선량을 조사한 뒤 pH 7.5 및 6.6의 배지에서 다양한 시간 간격으로(12, 24, 36 및 48 시간) 배양한 후 시행한 DNA 겔 전기 영동 실험에서 pH 7.5 배지에서 48시간동안 배양한 세포들에서 pH 6.6에서 배양한 세포들에 비해 뚜렷한 apoptosis 발현의 차이를 재확인 하였다(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 관찰할 수 있었고 이 결과는 이미 발표한 연구자의 기초 결과와1) 동일하였다. 이러한 관찰 결과를 기초로 하여 pH 7.5와 pH 6.6 조건의 배양 배지에서 안정화한 SCK 선암세포에 12Gy의 방사선량을 조사한 다음의 시간대에 anti-apoptosis와 관련한 Bcl-2는 pH 조건과 무관하게 방사선 조사에 따른 발현의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 반면 apoptosis 유발인자로 알려져 있는 Bax의 경우에는 pH 조건 변화와 방사선 조사에 따른 발현의 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

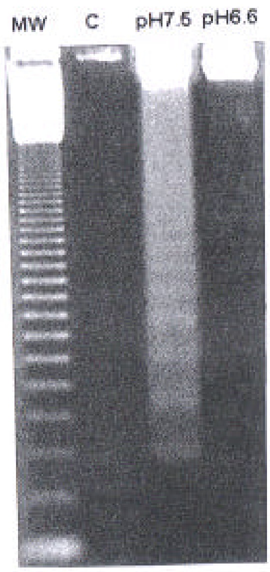

Fig.1. Agarose electrophoresis of DNA extracts from SCK mammary adenocarcinoma cells irradiated with 12 Gy. Cells were irradiated and incubated for 48 hours in PH 7.5 or 6.6media. C(Control): Cells were inclubated for 48 hours in pH 7.2~7.5 media

관여된 여러 유전자의 상호 연관 또는 분자생물학적 과정은 아직도 명확하게 규명되어 있지 않다. 방사선 조사에 의해pH 7.5의 조건에서는 방사선 조사 후 24시간대를 정점으로 지속적인 발현 증가를 보이다 이후에 천천히 감소하는 양상을 보였으나, pH 6.6의 조건에서는 발현 정도와 시간대에 있어서 전반적으로 감소되어 있는 차이를 확인할 수 있었다. 일반적으로 방사선에 의한 DNA 손상을 입은 세포들은 손상 부위의 회복을 위하여 G2/M phase에서 세포주기가 멈춘다고 알려져 있다. 이는 본 연구자들도 SCK 선암세포의 실험에서 관찰한 바 있으며1) 방사선조사에 의한 세포주기 분석 결과 전형적인 G2/M arrest 양상을 보였으나, 세포의 pH 환경에 따른 양상은 확연히 달랐다. pH 7.5 조건에서는 apoptosis가 관찰되는 24시간 이후로 G2/M arrest는 다소 해소되기 시작하여 외관상 정상적인 세포주기의 분포를 보인 반면 apoptosis에 내성이 강화된 pH 6.6 조건에서는 지속적인 G2/M arrest를 보였다(Fig. 4).

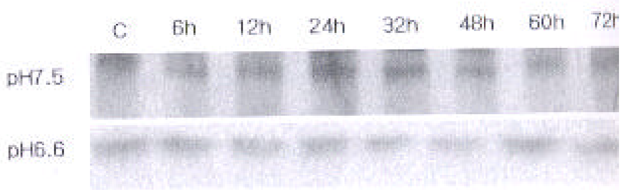

Fig.2. Western blot analysis of endogenous and radiationinduced Bcl-2 protein levels in SCK mammary adenocarcinoma cell line. Cell s were irradiated with 12Gy and incubated for varying lengths of time on pH 7.5 and 6.6 medium.Protein lysates of control (c) and irradiated,were subjected to SDS-PAGE and the Bcl-2 protein levels were monitored by immunoblotting. Coomassie of duplicate blots showed that equivalent amounts of protein were present in all samples anayzed.

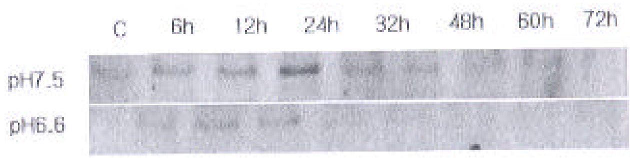

Fig.3.Western blot analysis of endogenous and radiationinduced Bax protein levels in SCK mammary adenocarcinoma cell line. Cells were irradiated with 12Gy and incubated for varying lengths of time on pH 7.5 and 6.6 medium. Protein lysates of control (c) and irradiated, were subjected to SDS-PAGE and the Bax protein levels were monitored by immunoblotting. Coomassie of duplicate blots showed that equivalent amounts of protein were present in all samples anayzed.

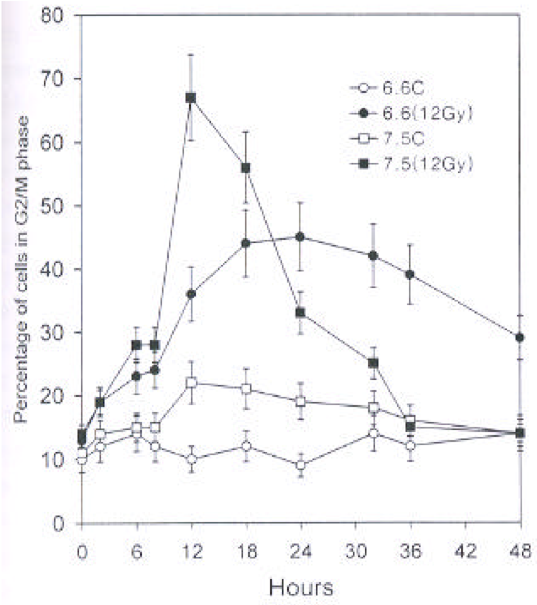

Fig.4. Percentage of cells in G2/M phase as determined with flow cytometric analysis. Cells were irradiated with 12Gy and incubated in pH 7.5 or 6.6 media for 0~48 hours. An average of five quadruplet experiments SD are shown.

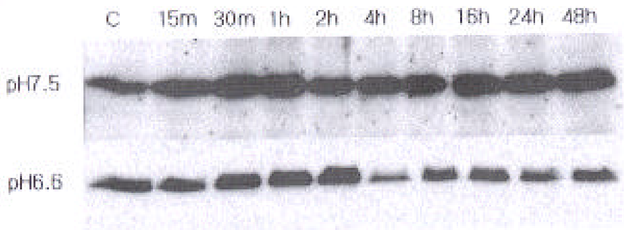

Fig.5.Western blot analysis of endogenous and radiationinduced p53 protein levels in SCK mammary adenocarcinoma cell line. Cells were irradiated with 12Gy and incubated for varying lengths of time on pH 7.5 and 6.6 medium. Protein lysates of control (c) and irradiated, were subjected to SDS-PAGE and the p53 protein levels were monitored by immunoblotting. Coomassie of duplicate blots showed that equivalent amounts of protein were present in all samples anayzed.

따라서 SCK 선암세포의 방사선에 의하여 유도되는 apoptosis는 세포주기상 G2/M phase의 해소 혹은 이에 연이은 세포주기 조절인자와 관련되어 있으렀으로 생각되어 p53 및 p21의 발현정도를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. PH7.5 조건에서는 방사선조사 직후부터 48시간까지 지속적인 p53의 발현 증가 및 방사선조사 후 16시간 및 24시간 실시한 실험에서 화연한 p21의 발현을 확인할 수 있었다.

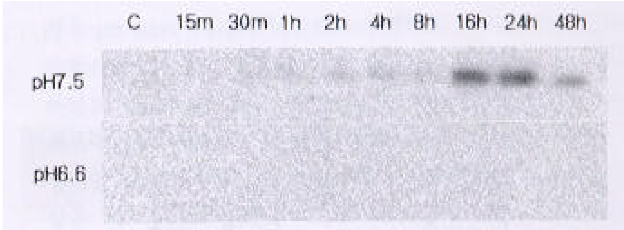

Fig.6.Western blot analysis of endogenous and radiationinduced p21 protein levels in SCK mammary adenocarcinoma cell line. Cells were irradiated with 12Gy and incubated for varying lengths of time on pH 7.5 and 6.6 medium. Protein lysates of control (c) and irradiated, were subjected to SDS-PAGE and the p21 protein levels were monitored by immunoblotting. Coomassie of duplicate blots showed that equivalent amounts of protein were present in all samples anayzed.

반면 pH 6.6 조건에서는 방사선조사에 따른 p53의 발현 증가 및 p21 발현을 관찰할 수 없었다(Fig. 5, 6). 이러한 결과는 Bcl-2가 전혀 pH에 따른 발현의 차이를 보이지 않았었고, Bax 발현의 차이 정도에 비하여 매우 뚜렷하였다. 따라서 SCK 선암세포는 방사선 조사에 의하여 손상된 DNA를 복구하기 위한 G2/M arrest와 동시에 p53 발현 증가로 인한 apoptosis 경로의 시작 내지는 준비가 동시에 진행되며, p21의 발현 즈음에 G2/M arrest의 해소와 연이은 세포주기에서의 apoptosis를 유발하는데 작용하는 것으로 사료된다.

본 실험에서는 이상의 결과로 방사선에 의하여 유도되는 SCK 선암세포의 apoptosis 현상에서 p53, p21 및 Bax의 역할을 확인함으로서 apoptosis 과정 및 산성 환경에서의 apoptosis에 대한 내성을 나타내는 기전 일부를 파악할 수 있었다.

고 찰

Apoptosis를 유도하는 유전자적 신호전달과정 및 분자생물학적 기전이 현재 많은 연구 중에 있다.6 9) 암세포의 종양 형성에는 proto-oncogene의 과발현이나 변이와 같은 유전적 변화가 필수적이기 때문에 이러한 일련의 proto-oncogene의 변화와 이들의 유전자 산물인 oncoprotein이 암세포의 apoptosis에 관여하는 과정에 대하여 많은 관심을 가지게 되었다. 그러나 자세한 기전은 아직도 알려져 있지 않으며 apoptosis에

일어나는 apoptosis에 관여된 유전자의 확인, 이들 유전자간의 상호 연관성 및 DNA fragmentation에 이르는 분자생물학적 과정에 관여된 신호전달체계 또이 과정에 이르는 환경 영향이 밝혀져야 하며 앞으로 많은 연구가 요구되고 있다.

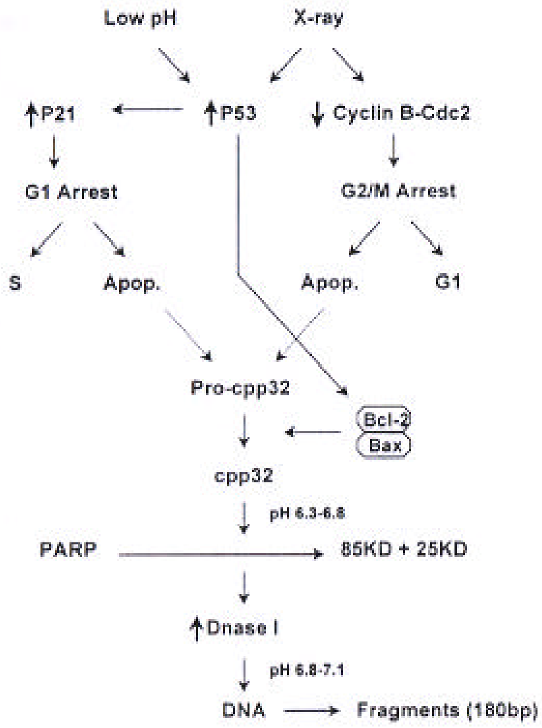

Fig. 7. Diagram for proposed hypotheses on radiation-induced apoptosis in SCK mammary adenocarcinoma cell line,1) Acidic stress itself increases p53 level which then alters the balance between the pro- and anti-apoptosis molecular signals such as Bcl-2 and resulting activation of cystein proteases which cleave PARP.2) Acidic environment inhibits the cells from passing through G2/M checkpoints after irradiation so that post-mitotic apoptosis is inhibited.

저자들은 Fig. 7에 도시된 바와 같이 세포내 산성환경은 방사선에 의해 apoptosis를 유도하는 유전인자의 활성화 및 상호연관관계 또는 방사선에 의한 세포 주기의 변화 등에 영향을 미쳐 방사선에 의한 apoptosis의 유발을 억제하는 것으로 추론하고 본 연구를 진행하였다.

방사선조사와 관련된 apoptosis에 관여되는 유전자들로서는 종양 억제 유전자인 p53과 Rb, 종양 유전자들로서는 c-myc 과 bcl-2 등이 대표적으로 알려져 있다.10 14) wild-type p53이 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에 절대적인 영향을 준다는 사실은 Lowe 등이15) mouse thymocytes에 방사선 조사를 하여 실행한 실험에서, 정상 thymocytes에서는 1Gy 이하의 방사선 조사량에도 apoptosis가 발생하지만 homozygous null p53 mice에서는 7 20Gy의 다량의 방사선 조사에도 불구하고 apoptosis의 발생을 관찰할 수 없었다는 보고와 Merritt 등16)이 mice의 소장과 대장에 8Gy의 방사선조사를 하고 crypts의 apoptosis를 관찰한 결과 homozygous p53 null mice는 p53 heterozygous 또는 wild-type mice에 비하여 현저히 적은 apoptosis를 관찰할 수 있었다는 보고를 정점으로 이러한 결과를 방사선치료의 감수성과도 연관을 지어 설명하기 시작하였다. 하지만 이러한 시도는 방사선에 의한 세포사의 기전은 단지 apoptosis로 모든 것이 설명될 수 없다는 것이 현재까지의 여러 연구자들의 결론임을 감안할 때 p53과 apoptosis의 연관성은 부인할 수 없지만 단순한 도식화는 시기 상조로 생각한다. p53을 갖고있지 않는 HL-60 세포들이 방사선에 의해 apoptosis로 사망하는 현상을 설명할 수 없으며, p53이 관여하지 않는 apoptosis 유도기전이 있다는데 많은 연구자들도 동의한다.17 22) 본 연구에서도 방사선조사 후 apoptosis가 현저하였던 pH 7.5 배양배지 조건에서는 p53 단백의 발현은 pH 6.6 배양 배지 조건에 비하여 발현 정도가 강하였고 지속적으로 관찰할 수 있었던 반면에 pH 6.6 배양 배지 조건에서도 발현 정도가 미약하였지만 발현 자체는 관찰할 수 있었기에 p53의 발현 여부만으로 apoptosis와의 연관성을 단정하는 것은 무리가 있을 것으로 생각한다.

Bcl-2와 Bax의 비율이 중요하다는 관점이 최근에 대두되고 있다. Bcl-2의 양에 비해 Bax가 소량이면 apoptosis는 억제되며 Bcl-2에 비해 Bax가 다량이면 apoptosis가 촉진된다. 그 다음 단계로서 단백질 분해효소인 ICE의 작용을 거쳐 DNA의 분해에 이른다. 즉 DNase I 또는 II가 활성화되어 DNA가 180 200bp가 단위가 되어 있는 oligonucleosome으로 분열된다고 보고되고 있다.23 26) 본 연구에서는 Bcl-2 family의 유전 단백 분석에서 Bcl-2의 경우 pH 7.5 배양 배지에서 배양하였을 때 방사선 조사 후와 조사하지 않은 세포군과 유전단백 발현의 차이를 관찰할 수 없었고, pH 6.6 배양 배지에서 배양하였을 때와도 차이점을 관찰할 수 없었다. Bax의 경우 pH 7.5 배양 배지에서 배양하였을 때 방사선 조사 후 점차 배양 시간이 경과함에 따라 24시간째까지 유전단백의 발현이 증가하는 양상을 보이다가 감소하는 반면 pH 6.6 배양 배지에서 배양하였을 때는 방사선조사 후 24 시간째까지는 비슷한 양상을 보이나 발현 정도가 미약하였고 지속적으로 관찰할 수는 없었다. 이러한 결과로 볼 때 SCK 선암세포주의 경우 Bcl-2 family가 세포내 산도의 차이에 따른 방사선에 의해 유도되는 apoptosis 현상에 결정적인 기여를 설명할 수 없을 것으로 사료되었다.

p21 암유전단백은 일반적으로 p53에 의해 유도되며 cyclin- dependent kinases를 억제하여 G1 arrest를 유발하는 세포주기 관련 유전단백으로 알려져 있다.27,28) 이는 wild-type p53을 가진 세포들을 대상으로 하였던 실험에서 이미 증명되었다.

하지만 최근에는 TGF β, nerve growth factor, vitamin D 및 높은 농도의 toxic oxygen species로 행한 실험들에서는 p53-dependent pathway를 밟는다는 보고들이 있다.29,30) 본 연구에서는 pH 7.5 배양 배지에서 배양하였을 때 방사선조사 후 16시간 및 24시간째 유전단백의 발현이 뚜렷이 증가하다가 48시간째는 감소하는 양상을 관찰하였고, pH 6.6 배양 배지에서 배양하였을 때는 대조군과 방사선조사 후 같은 시간 조건에서 관찰한 세포군에서도 p21의 유전단백의 발현은 관찰할 수 없었다. 이러한 관찰 결과를 p53의 발현과 연관 시켜보면 pH 7.5 배양 배지에서 배양하였을 때 방사선 조사 후 15분이 지난 후부터 증가하기 시작하여 48시간까지 지속적으로 뚜렷이 발현됨을 관찰하였고, pH 6.6 배양 배지에서 배양하였을 때는 방사선을 조사하지 않은 대조군에 비하여 발현 정도의 증가가 미약하였다. 궁극적으로 p53과의 연관성을 규명하기 위하여서는 p53(+) 또는 p53(−) 세포를 대상으로 하는 실험이 요구된다고 하겠다.

저자들은 SCK 선암세포의 방사선에 의하여 유도되는 apoptosis는 세포 주기상 G2/M phase의 해소 혹은 이에 연이은 세포주기 조절인자와 관련되어 있을 것으로 생각되어 시행한 flow cytometry를 이용한 세포 주기 관찰에서 pH 6.6 배지에서 배양하였던 세포에서의 G2/M phase의 세포들의 분획의 증가는 pH 7.5 배지에서 배양하였던 세포들에 비해 비교적 천천히 일어나고, G2/M phase에서 많은 양의 세포들이 집적되어 세포 주기를 순환하지 못하는 G2/M arrest 현상이 지속되는 결과를 관찰하였다. 이러한 결과를 토대로 분석할 때 pH 7.5 배양 조건에서는 방사선에 의한 G2/M arrest 양상이 일시적이고 G2/M arrest로부터 방출된 많은 세포들이 세포 주기를 순환하면서 방사선조사 직후부터 발현되는 p53의 발현과 더불어 연이은 p21의 발현이 관찰되고 이는 곧 apoptosis의 유도로 설명되지만, pH 6.6 배양 조건에서는 세포 주기 조절 장애가 p21의 발현과 apoptosis 유도 억제에 영향을 주는 것으로 추론하였다.

결 론

저자들은 SCK 선암세포주를 이용하여 방사선조사 후 상이한 pH 7.5 와 6.6의 배양 배지 조건에 따른 apoptosis의 관찰에 영향을 주는 유전단백들의 발현에 관한 연구에서, apoptosis가 현저히 관찰되었던 pH 7.5 배양 배지 조건의 경우 p53의 뚜렷한 발현과 더불어 관찰되는 p21 유전자 산물의 증가를 관찰하였다.

Bcl-2의 발현은 배양 배지의 pH에 따른 발현의 차이를 관찰할 수 없었고 Bax의 발현은 pH 7.5의 경우 pH 6.6에 비하여 미약하나마 증가되고 지속적인 현상을 관찰하였으나 p53 발현과 이에 따른 p21의 발현차이가 확연하였고, pH 6.6의 경우 50 60%의 세포가 G2/M arrest에서 세포주기를 순환하지 못함을 확인하였기에 방사선 조사 후 상이한 pH 7.5 와 6.6의 배양 배지 조건에 따른 apoptosis 현상은 세포주기와 관련된 G2/M arrest의 해지와 더불어 순환되는 세포주기의 결과에 따른 post-mitotic apoptosis 현상으로 추론하였다.

참 고 문 헌

1.**Lee HS, Park HJ, Lyons JC, et al.** Radiation-induced apoptosis in different pH environments in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 38:1079-1087

2.**Park HJ, Makepeace CM, Lyons JC, Song CW.** Effect of intracellular acidity and ionomycin on apoptosis in HL-60 cells. Eur J Cancer 1996; 32:540-546

3.**Park HJ.** Effect of intracellular pH on apoptosis in HL-60 human leukemia cells. Yonsei Medical J 1995; 36:473-479

4.**Li J and Eastman A.** Apoptosis in an interleukin-2 dependent cytotoxic T-lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. J Biol Chem 1995; 270:3203-3211

5.**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; 93:654-658

6.**Blank KR, Rudoltz MS, Kao GD, et al.** The molecular regulation of apoptosis and implications for radiation oncology. Int J Radiat Biol 1997; 71:455-466

7.**Maity A, Kao GD, Muschel RJ, et al.** Potential molecular targets for manipulating the radiation response. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 37:639-653

8.**Szumiel I.** Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. Radiat Res 1998; 150:S92-101

9.**Haimovitz-Friedman A.** Radiation-induced signal transduction and stress response. Radiat Res 1998; 150:S102-108

10.**Bowen C, Spiegel S, Gelmann EP.** Radiation-induced apoptosis mediated by retinoblastoma protein. Cancer Res 1998; 58:3275-3281

11.**Evans GI, Wyllie AH, Gilbert CS, et al.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell 1992; 69:119- 128

12.**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

13.**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

14.**Watson NC, Di YM, Orr MS, et al.** Influence of ionizing radiation on proliferation, c-myc expression and the induction of apoptotic cell death in two breast tumor cell lines differing in p53 status. Int J Radiat Biol 1997; 72:547-559

15. **Lowe SW, Schmitt EM, Osborne BA and Jacks T.** p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 1993; 362:847-849
16. **Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, et al.** Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M -associated cell death after gamma-irradiation. Oncogene 1997; 14:2759-2766
17. **Siles E, Villabobos M, Valenzuela MT, et al**. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumor cell lines. Br J Cancer 1993; 73:581-588
18. **Han Z, Chatterjee D, He DM, et al.** Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X- irradiation. Mol Cell Biol 1995; 15:5849-5857
19. **Strasser A, Harris AW, Jacks T, et al.** DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53- independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. Cell 1994; 79: 329-339
20. **Strobel T, Swanson L, Korsmeyer S, et al.** Radiation-induced apoptosis is not enhanced by expression of either p53 or BAX in SW626 ovarian cancer cells. Oncogene 1997; 14:2253-2258
21. **Aldridge DR, Radford IR.** Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. Cancer Res 1998; 58:2817-2824
22. **Yu Y and Little JB.** p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines. Cancer Res 1998; 58:4277- 4281
23. **Findley HW, Gu L, Yeager AM, et al.** Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997; 89:2986-2993
24. **Milner AE, Grand RJ, Vaughan AT, et al**. Differential effects of BCL-2 on survival and proliferation of human B-lymphoma cells following gamma-irradiation. Oncogene 1997; 15:1815-1822
25. **Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, et al**. Overexpression of bax enhances the radiation sensitivity in human breast cancer cells. Surg Today 1997; 27:90-93
26. **Kitada S, Krajewski S, Miyashita T, et al.** Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. Oncogene 1996; 12:187-192
27. **Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J, et al.** Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. EMBO J 1997; 15:3702-3712
28. **Burger H, Nooter K, Boersam AW, et al.** Expression of p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2, Bax, Bcl-x, and Bak in radiation- induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 41:415-424
29. **Gartenhaus RB, Wang P, Hoffmann P, et al**. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:265-268
30. **Marchetti A, Doglioni C, Barbareschi, et al.** p21 RNA and protein expression in non-small cell lung carcinomas: evidence of p53-independent expression and association with tumoral differentiation. Oncogene 1996; 12:1319-1324

Abstract

The Expression of Oncogenes on the Radiation-induced Apoptosis in SCK Mammary Adenocarcinoma Cell Line

Hyung Sik Lee, M.D.*, Hong Kyu Park, M.D.*, Chang Woo Moon, M.D.*,
Seon Min Yoon, M.D.*, Won Joo Hur, M.D.*, Su Jin Jeong, M.S.†,
Sang Hwa Lee, M.D.†, Min Ho Jeong, M.D.† and Heon Joo Park, M.D., Ph.D.‡

*Department of Radiation Oncology and Dong-A Cancer Center, †Microbiology, College of Medicine,
Dong A University, Pusan, Korea

‡Department of Microbiology, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Purpose: The expression of p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2, and Bax underlying the radiation-induced apoptosis in different pH environments using SCK mammary adenocarcinoma cell line was investigated.

Materials and Methods: Mammary adenocarcinoma cells of A/J mice (SCK cells) in exponential growth phase were irradiated with a linear accelerator at room temperature. The cells were irradiated with 12 Gy and one hour later, 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. Western blot analysis was used to monitor p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2, and Bax protein levels.

Results: The induction of apoptosis by irradiation in pH 6.6 medium was markedly less than that in pH 7.5 medium. The radiation-induced G2/M arrest in pH 6.6 medium lasted markedly longer than that in pH 7.5 medium. Considerable amounts of p53 and p21 proteins already existed at pH 7.5 and increased the level of p53 and p21 significantly after 12 Gy X-irradiation. An incubation at pH 6.6 after 12 Gy X-irradiation did not change the level of p53 and p21 protein levels significantly. Bcl-2 proteins were not significantly affected by radiation and showed no correlation with cell susceptibility to radiation-induced apoptosis in different pHs. An exposure to 12 Gy of X-rays increased the level of Bax protein at pH 7.5 but at pH 6.6, it was slight.

Conclusion: The molecular mechanism underlying radiation-induced apoptosis in different pH environments using SCK mammary adenocarcinoma cell line was dependent of the expression p53 and p21/WAF/CIP proteins. We may propose following hypothesis that an acidic stress augments the radiation-induced G2/M arrest, which inhibiting the irradiated cells undergo post-mitotic apoptosis. The effects of environmental acidity on anti-apoptotic and pro-apoptotic function of Bcl-2 family was unclear in SCK mammary adenocarcinoma cell line.

Key Words: Radiation-induced apoptosis, Oncogene, Cell cycle