K562 백혈병 세포주에서 방사선에 의해 유도되는 Apoptosis에 미치는 PTK Inhibitors의 영향

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 미생물학교실†, 기생충학교실‡, 인하대학교 의과대학 미생물학교실§

이형식*·문창우*·허원주*·정수진†·정민호†·이정현‡·임영진§·박헌주§

목 적: 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에 내성을 가진 세포로 알려진 K562 세포를 대상으로, PTK inhibitors인 herbimycin A와 genistein을 이용한 방사선에 의한 apoptosis의 내성 기전을 연구하고자 하였다.

대상 및 방법: 6 MV 체외 X-선 방사선 치료기를 이용하여 200 300 cGy/min의 선량률로 10 Gy의 X-선을 세포에 균일하게 조사하였다. Apoptosis의 관찰은 agarose gel electrophoresis를 이용하여 DNA frgmentation의 지표인 ladder를 관찰하였고, TUNEL 염색을 이용하여 정량 분석을 시행하였다. Western blot 방법으로 apoptosis 관련 유전 단백인 bcl-2, bcl-X 및 bax들의 발현을 관찰하였다. 방사선 조사 및 약물 처치 후의 세포 주기 분석은 flow cytometry로 분석하였다.

결 과: Agarose gel electrophoresis 실험에서 방사선을 조사하지 않은 K562 세포와 방사선을 10 Gy 조사한 세포를 48시간에 걸쳐 12시간 간격으로 관찰하였을 때 DNA fragmentation를 관찰할 수 없었다. 이러한 현상은 genistein을 투여한 세포들에서도 동일한 현상을 관찰할 수 있었지만, 방사선 조사 후 herbimycin A를 투여한 세포들에서는 48시간째 확연한 DNA fragmentation을 관찰할 수 있었다. 이를 TUNEL assay에서 정량적으로 확인하였다. 방사선만 조사한 세포들과 방사선과 genistein 투여 후 48시간째 관찰한 세포들에서는 10% 미만의 apoptosis 양성 세포의 빈도를 관찰할 수 있었지만, 방사선 조사 후 herbimycin A를 투여한 세포들에서는 30 35% 빈도로 apoptosis 양성 세포들이 관찰되었다. Western blot analysis에서 bcl-2의 경우 방사선을 조사하지 않았던 대조군에 비하여 전체적인 발현은 증가되었지만 방사선 및 약제간의 발현의 차이는 없었다. 그 외 bcl-X과 bax는 대조군에 비해 방사선 및 약제간의 발현의 차이를 관찰할 수 없었다. K562 세포에 방사선을 10 Gy 조사하였을 때 나타나는 세포 주기의 변화는 시간이 경과함에 따라 전형적인 G2/M block의 소견을 보였다. 이러한 소견은 genistein을 투여했을 경우에는 특별한 변화를 보이지 않지만, herbimycin A를 투여했을 경우에는 12시간째부터 G2/M block이 소실되면서 세포가 세포 주기를 재 순환하는 양상을 보였고, 48시간째 관찰한 소견에서는 G2/M block이 거의 소실된 양상을 띠었다. 이러한 소견을 토대로 apoptosis 유도와의 상호 연관성을 유추할 수 있었다.

결 론: herbimycin A는 방사선에 의해 유도되는 apoptosis가 억제된 K562 세포에서 apoptosis를 유도할 수 있었다. 이러한 유도 기전에 apoptosis 관련 유전 단백들인 bcl-2, bcl-X 및 bax와 관련된 영향은 관찰되지 않았다. 세포 주기의 분석에서 G2/M block의 해소와 apoptosis 유도와의 연관성을 유추할 때, 세포 주기 관련 인자들에 대한 연구가 방사선에 의한 apoptosis의 내성의 극복 및 방사선에 의한 세포의 감수성 조절 약제로서의 역할에 이바지할 것으로 생각한다.

핵심용어: 방사선, 아포토시스, K562, PTK 억제 약물

이 논문은 1998년도 동아대학교 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.
이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음.
이 논문은 2000년 2월 7일 접수하여 2000년 3월 14일 채택되었음.
책임저자: 이형식, 동아대학교병원 치료방사선과
Tel: 051)240-5380, Fax: 051)254-5889
E-mail: hyslee@daunet.donga.ac.kr

서 론

Apoptosis는 세포의 위축, 세포질의 공동화, 핵 농축 및 DNA fragmentation 등을 특징으로 하는, 괴사(necrosis)와는 구별되는 생리적 세포사망 기전으로 알려져 있다.[1,2]

Apoptosis는 세포의 생존에 필요한 cytokines 배제, 세포 표면 Fas ligation 및 방사선, 항암 약제 등에 의한 DNA 손상 등과 같은 다양한 세포에 대한 자극에 의해서 유도되어진다.[3-5] 암 치료 분야의 대종을 이루고 있는 방사선요법, 항암화학요법 및 온열요법에 의해 일어나는 암세포의 사망이 apoptosis에 의한다는 것이 연구되어지면서 이 분야에 많은 관심이 집중되고 있다. 이에 대한 연구를 통하여 기존의 방사선 및 항암 약제의 치료에 도움을 주고자 하는 시도는, 분자 생물학의 발전에 따라 다양한 접근 방법으로 모색되고 있다. 하지만 이러한 치료법으로 유발되는 apoptosis의 기전 및 내성 기전에 대하여는 아직도 명확히 규명되지 않고 있다.

연구자들은 이러한 다양한 모색 중 protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor에 관심을 가지고 연구를 진행하였다. 본 연구에 이용한 K562 세포는 Philadelphia chromosome (Ph)-positive chronic myeloid leukemia (CML) 세포로 정상 abl protein에 비하여 PTK의 활성도가 증가된 chimeric bcr/abl oncoprotein ($p210^{bcr/abl}$)을 발현한다.[6] 또한 이러한 PTK의 활성화는 hemopoietic 세포들을 대상으로 cytokine withdrawl, Fas ligation 및 항암 약물 치료 등에 의한 여러 apoptosis 유도 실험에서 apoptosis의 유도를 억제하는 결과를 보고하며, 실제 CML 환자의 치료에 장해 요인으로 인식되고 있다.[3,4,7] 연구자들은 방사선에 의한 apoptosis에 비교적 내성을 가진 세포로 알려져 있는 Ph (+) K562 세포를 대상으로 대표적인 PTK inhibitors로 알려져 있는 herbimycin A (HMA)와 genistein을 이용한 방사선에 의한 apoptosis 유도를 관찰하고, 기전을 연구하여 방사선에 의한 apoptosis의 내성 극복의 가능성을 모색하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

K562 (ATCC CCL 243)세포를 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone Co., Logan, UT), 100 units/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin (Gibco/BRL, Grand Island, NY)을 함유한 RPMI 1640 (Gibco/BRL, Grand Island, NY)배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2 상태의 incubator에서 배양하였다. 세포는 25 cm^2 배양용 플라스크에 2×10^6/mL의 밀도로 배양하였으며 세포주의 생존은 Trypan blue dye 배제방법으로 관찰하였다.

2. 방사선 조사 및 약제 처리

6 MV 체외 X-선 방사선 치료기(Clinac 1800, Varian Co, USA)를 이용하여 200～300 cGy/min 선량률로 0.5 Gy부터 시작하여 2 Gy씩 늘려가며 기초 실험을 진행하였고, 본 실험의 기본 선량인 10 Gy의 방사선량을 균일하게 조사하였다. Herbimycin A (Calbiochem, UK)와 genistein (Sigma, UK)은 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, UK)에 녹여 사용하였으며, 기초 실험 단계를 거쳐 각각 500 nM과 50 uM의 농도로 처리하였다.

3. 전기 영동법에 의한 DNA fragmentation 관찰

Apoptosis 유발 유무를 정성적으로 확인하기 위하여 apoptosis로 인한 DNA 절편을 DNA 겔 전기 영동 상에서 관찰하였다. 방사선 조사 후 일정기간 배양한 세포를 회수하여 원심분리하여 얻은 침전물을 인산 완충액(PBS; phosphate buffered saline)으로 세척한 후, lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA; proteinase K at 0.1 mg/mL; 1% sodium dodecyl sulfate)에 재현탁하여 48°C 수조에서 14시간 반응시켰다. 이 lysate에 cold (4°C) 5 M NaCl을 첨가하여 강하게 15초간 진탕 후 1,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 얻은 후, 동량의 2-propanol을 잘 혼합하여 -20°C 에서 하룻밤동안 방치하여 DNA를 침전시켰다. DNA pellet을 10,000 g 에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 얻어진 DNA 침전물을 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM EDTA)에 재부유 시킨 다음 0.2 mg/mL의 DNase- free RNase를 첨가하여 37°C 에서 1시간 반응시켜 RNA를 제거하였다. 최종적인 DNA 함량은 UV 분광 광도기로 흡광도 A260/A280을 측정하여 계산하였다. 각 시료의 DNA 20 mL과 DNA 표준 분자량 표지(123 bp ladder, GIBCO/BRL, Grand Island, NY)를 전기 영동하였다. 전기 영동은 TBE buffer (89 mM Tris base, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA)를 이용하여 1.5% agarose 겔에서 실시하였으며 ethidium bromide로 염색하였다.

4. TUNEL (TdT-mediated dUTP biotin nick end-labelling) assay

DNA 절편을 정량적으로 분석하기 위하여, fluorescein in situ cell death detection kit (Beohringer Mannheim, USA)를 이용하여 세포를 표지하였으며, 실험 과정은 제조사의 지시에 따라 실시하였다. 각각의 실험 조건별로 5×10^4 cell/mL 원심분리를 통하여 회수한 후, phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하였다. 500 mL 4% paraformaldehyde (PFA)를 첨가하여 실온에서 30분간 고정하였다. PBS로 2회 세척한 후 200 ul permeabilization solution을 첨가하여 얼음속에 2 분간 방치하고, 50 mL

TUNEL reaction mixture를 첨가하여 37°C, 1시간, 어두운 조건에서 반응하였다. PBS로 2회 세척하여 250 500 nL PBS로 현탁한 후 형광현미경으로 관찰하였으며, 전체 세포수에 대한 TUNEL 양성 세포의 수의 비율을 계산하 였다.

5. 세포주기 분석

FACSanflow cytometer (FacsConsort 40, Becton-Dickinson, Boston, MA)를 이용하였다. 실험조작 후의 배양세포를 수거하여, 80% cold ethanol 10 mL로 4°C에서 하룻밤 동안 고정한 후, 원심 분리하여 PBS로 세척하고 최종적으로 2 mL PBS로 재부유하였다. 고정한 세포부유액에 30 units의 DNase- free RNase (Type 1-A, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)를 첨가한 후, 100 mL의 PI (Propium Iodide, Molecular Probes, Eugene, OR) 용액으로 가볍게 섞고 상온의 어두운 장소에서 60분간 반응시켰다. 각 시료는 2×10^4개의 세포에서 PI 형광도를 분석하였다.

6. Western Blot Analysis

Stacking 겔과 separating 겔은 4%와 12% polyacrylamide의 조성으로 하였다. BSA를 표준 단백질로 하여 Coomassie brilliant blue 방법으로 측정한 단백질을 약 2 mg/mL 되도록 조정하여 각 홈에 20 mL씩 넣고 수직형 전기 영동을 200 Volt에서 45분동안 실시하였다(BIO-RAD Mni-Protean II). 단백질 분자량은 SDS molecular weight markers kit (Sigma, MWSDS- 70 L)를 기준으로 하였다. 상기방법으로 전기영동한 겔은 Mni transblot cell (IO-RAD Mni-Protean II)를 이용하여 4°C에서 250 mA, 100 V로 1시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 그 후 3% BSA가 포함된 25°C Blotto solution (pH 7.4)에서 1시간 동안 blocking한 후 각 암유전자의 산물에 대한 항체가 들어있는 4°C 0.2% tween-20 in PBS에서 밤새 교반하였다. 이를 alkaline phosphatase conjugated anti-Rabbit Immunoglobulins (Sigma, UK, A-2306)로 25°C에서 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 (0.1 M $NaHCO_3$, 1.0 mM $MgCl_2$, pH 9.8)로 발색시켰다.

결 과

1. Agarose gel electrophoresis

K562 세포에 방사선을 10 Gy 조사한 후 48시간에 걸쳐 12시간 간격으로 관찰하였을 때, DNA ladder를 관찰할 수 없었다(Fig. 1A). 이러한 현상은 genistein을 투여한 세포들에서도 동일한 현상을 관찰할 수 있었지만(Fig. 1B), 방사선 조사 후 herbimycin을 투여한 세포들에서는 36시간째부터 시작하여 48시간째 확연한 DNA ladder를 관찰할 수 있었다(Fig. 1C).

2. TUNEL assay

형광현미경하에서 연두색의 형광을 나타내는 DNA fragmention이 일어난 세포를 apotosis가 일어난 세포로 간주하고, 이를 양성으로 계수하여 전체세포 수에 대한 percentage로 나타내었다. 방사선만 조사한 세포들과 방사선과 genistein 투여 후 48시간째 관찰한 세포들에서는 DNA fragmentation의 관찰이 힘들었고(Fig. 2A, B), 10% 미만의 apoptosis 양성 세포의 빈도를 관찰할 수 있었지만, 방사선 조사 후 herbimycin A를 투여한 세포들에서는 30 35% 빈도

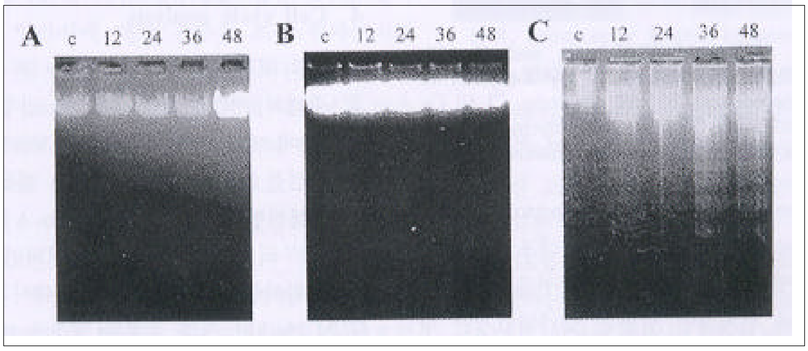

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of DNA extracts from K562 cells. **A)** Cells irradiated with 10 Gy X-ray, **B)** 10 Gy irradiated cells incubated with 50 uM genistein **C)** 10 Gy irradiated cells incubated with 500 nM herbimycin A. Cells were incubated for 12, 24, 36 and 48 h after initiation of all treatment C (Control).

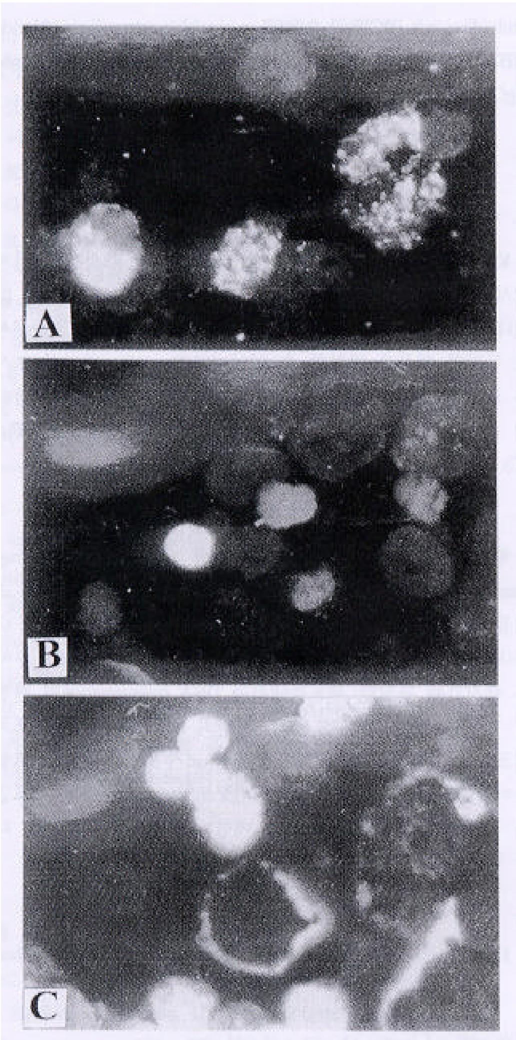

Fig. 2. Photomicrograph (400 ×) of K562 cells stained with TUNEL method. **A)** Cells irradiated with 10 Gy X-ray, **B)** 10 Gy irradiated cells incubated with 50 uM genistein, **C)** 10 Gy irradiated cells incubated with 500 nM herbimycin A. Cells were incubated for 48 h after initiation of all treatment.

로 apoptosis 양성 세포들이 관찰되었고 이러한 소견은 배양 시간을 길게 할수록 더욱 확연하였다(Fig. 2C, 3).

3. **Western blot analysis**

K562 세포에 방사선만 조사한 군과 방사선 조사 후에 herbimycin A 투여군 및 genistein 투여군의 anti-apoptosis 단백들인 bcl-2와 bcl-X와, promotor bax의 발현을 대조군과

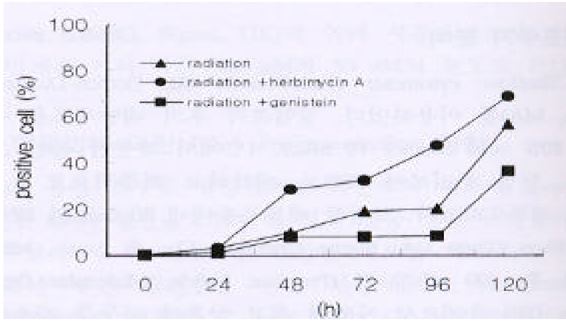

Fig. 3. Percentage of apoptotic cells with TUNEL assay in K562 cells treated with 10 Gy X-ray with genistein or herbimycin A. genistein was added 50 uM. herbimycin A was added 500 nM. Cells were incubated for 48 h after initiation of all treatment.

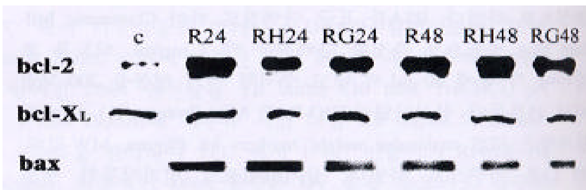

Fig. 4. Western blot analysis for bcl-2, bcl-X_L and bax protein expression in K562 cells incubated for 24 and 48 h with : R; Cells irradiated with 10 Gy X-ray, RG; 10 Gy irradiated cells incubated with 50 uM genistein, RH; 10 Gy irradiated cells incubated with 500 nM herbimycin A.

함께 24 및 48시간째 관찰하였다. bcl-2의 경우 방사선을 조사하지 않았던 대조군에 비하여 전체적인 발현은 증가되었지만 방사선 및 약제간의 발현의 차이는 없었다. bcl-X과 bax는 대조군에 비해 방사선 및 약제간의 발현의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 4). 다른 여러 연구자의 보고에서 여러 종류의 bcl-2 관련 유전 단백의 발현과 apoptosis와의 연관을 보고하는 연구 결과가 많지만, 본 연구에서 관찰한 herbimycin A 투여 후의 apoptosis 발현과 bcl-2 family와 연관성을 찾기 힘들었다.

4. **Cell cycle analysis**

K562 세포에 방사선을 10 Gy 조사하였을 때 나타나는 세포 주기의 변화는 Fig. 5A에서 관찰되는 바와 같이 시간이 경과함에 따라 전형적인 G2/M block의 소견을 보인다. 이러한 소견은 genistein을 투여했을 경우에는 특별한 변화를 보이지 않지만(Fig. 5B), herbimycin A을 투여했을 경우에는 12 시간째부터 G2/M block이 소실되면서 세포가 세포 주기를

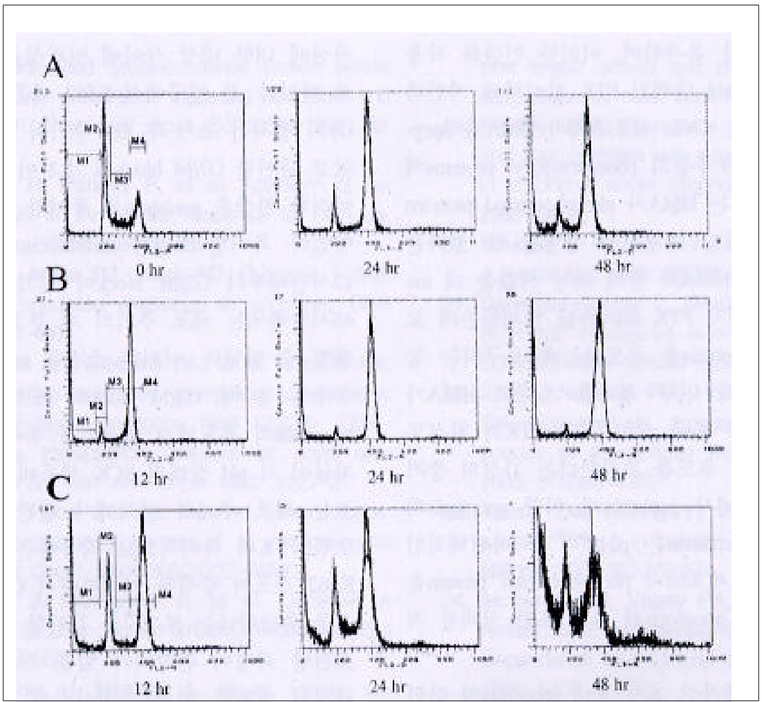

Fig. 5. Variations in cell cycle distribution of K562 cells incubated for 12, 24 and 48 h with : **A)** Cells irradiated with 10 Gy X-ray **B)** 10 Gy irradiated cells incubated with 50 uM genistein **C)** 10 Gy irradiated cells incubated with 500 nM herbimycin A (Markers M1, 2, 3 and 4 in the plots correspond to cells and cells in G0/G1, S, and G2/M phases, respectively).

재 순환하는 양상을 보이며, 48시간째 관찰한 소견에서는 G2/Mblock이 거의 소실된 양상을 띠며 이러한 소견은 apoptosis의 유도가 일어나는 시간대와 일치하는 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 5C).

고안 및 결론

방사선에 의하여 유도되는 여러 가지 유전자의 활성화 과정에 protein kinase (PK)의 작용이 관여한다고 알려져 있으며, Hallahan 등[8]은 staurosporine과 같은 PK 억제제를 이용하여 종양세포에서 방사선에 대한 감수성을 증강시키는 결과를 보고하여 PK의 방사선에 대한 감수성 조절 인자로서의 역할을 보고하였다. 방사선에 의하여 활성화되는 여러 가지 PK 중에서도 protein kinase C (PKC)의 역할에 대하여는 많은 연구 결과가 보고되었고, 방사선에 의한 PKC의 활성화는 전단계 과정에서 tyrosine phosphorylation을 필요로 한다.[9, 10] 또한 방사선에 의하여 c-Abl tyrosine kinase가 활성화되며, CML의 molecular hallmark인 $p210^{bcr/abl}$를 세포 유전자 전이에 의하여 표현하는 세포는 정상 세포에 비하여 방사선에 대하여는 높은 내성을 보인다는 연구 결과를 보고하여, 세포내 신호전달 과정 중의 PTK가 방사선에 대한 내성에 중요한 역할을 하고 있음을 시사하였다.[10, 11] Nishii 등[12]은 BaF3 세포를 대상으로 방사선 조사 또는 etoposide 처치 후에 관찰한 apoptosis의 유도 실험에서 p210 mutant의 활성화는 apoptosis의 유도를 억제함을 보고하여 chimeric protein의 anti-apoptosis 기전을 확인하였다.

이러한 PTK의 방사선에 의한 내성과 관련된 apoptosis 유도를 연구하기 위해 본 연구자들이 주목한 PTK inhibitors는 herbimycin A (HMA)과 genistein이다. HMA는 cell-permeable potent PTK inhibitor로 bone resorption에 관련된 c-src를 억제하며, non-receptor protein kinases에 선택적인 antagonist로 알려져 있다.[13, 14] Genistein은 soybean 및 tofu에 풍부히 함유된 receptor-type protein kinases의 선택적 antagonist로 알려져 있다.[15, 16] 본 연구에서 관찰한 apoptosis의 정성, 정량 분석에서, 방사선 조사 후 관찰할 수 없었던 apoptosis가 HMA 투여 후 관찰되는 결과는 HMA가 bcr/abl 및 src genes에 의해 encoded된 PTK를 비가역적으로 억제한다고 추론할 수 있었다. 이러한 결과는 Okabe 등[17, 18]

이 immune complex kinase assay에서 HMA로 처치한 Ph (+) K562 세포의 p210$^{bcr/abl}$의 활성화가 소실됨을 관찰하였던 연구 결과와 동일하였다. Riordan 등[7]은 방사선 조사와 상호작용에 필요한 HMA의 농도는 K562 세포에서 tyrosine residues에 인산화 상태의 단백질의 세포 양을 감소시키는데 요구되는 양과 유사하며, 이러한 인산화 작용들은 대부분이 chimeric bcr/abl 단백의 PTK 활성화에 기인하였다는 연구 결과와, 다양한 CML 세포주에서 HMA가 apoptosis를 유도하는 능력은 세포주들의 phosphotyrosyl proteins의 basal level과 반비례하며, 이는 HMA가 phosphotyrosyl proteins의 인산화의 감소와 직접적인 연관성을 설명할 수 있다는 연구 결과 및 K562 세포를 HMA와 함께 배양 시켰을 때 immune complex kinase assay에서 PTK activity를 억제하는데 요구되는 HMA의 농도는 apoptosis를 유도하는데 요구되는 농도와 유사하다는 여러 가지 연구 결과를 토대로 HMA가 K562 세포에서 방사선 조사 후에 p210$^{bcr/abl}$의 PTK의 활성도를 억제함으로서 apoptosis의 유도를 조장한다는 가설의 증거들을 제시하였다. 본 연구에서 genistein에 의한 apoptosis의 유도 실패의 분석에서는 genistein은 p210$^{bcr/abl}$에 비선택적인 PTK inhibitor 이므로 K562 세포에서 phosphotyrosyl protein을 감소하지 못할 뿐만 아니라 apoptosis의 유도 또한 실패한 것으로 추론하였다.

HMA가 K562 세포에서 방사선 조사 후에 apoptosis의 발현을 유도하는 기전 연구의 일환으로 연구자들은 apoptosis 관련 유전 단백 및 세포 주기의 변화에 주목하였다. 최근 여러 종류의 bcl-2 관련 유전 단백의 발현과 apoptosis와의 연관을 보고하는 연구 결과가 많고, anti-apoptotic protein으로 bcl-2와 bcl-X을 주목하였고 bax와 같은 promotors의 비(ratio)가 직접적인 영향을 준다고 보고하였다.[19, 20] 본 연구에서는 HMA의 작용에 따른 유전 단백의 변화는 bcl-2 family와 연관성을 찾기 힘들었다. Zhu 등[21, 22]도 bcr/abl transgenes의 발현은 bcl-2의 발현을 증가시킨다고 보고하여, HMA는 anti-apoptotic genes를 downregulation하여 궁극적으로는 p210$^{bcr/abl}$의 PTK의 활성도를 억제하는 기전을 가설으로 하여 연구를 진행하였다. 하지만 방사선 조사만 한 세포들과 HMA를 투여한 세포들 사이에서 최근 apoptosis와 관련된 유전 단백 발현의 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 Nishii 등[12]이 보고한 p210$^{bcr/abl}$을 발현하는 BaF3 세포에서 apoptosis와 연관된 bcl-2 관련 유전 단백의 변화를 관찰할 수 없었다는 보고와 유사하였다. 본 연구의 결과 또한 K562 cells에 의한 apoptosis의 유도는 이러한 apoptosis 조절 단백의 발현과의 상관성은 미약하다고 결론 지을 수 있었다.

세포 주기의 분석에서는 정상적인 세포에 방사선을 조사한 경우에는 G1 세포주기에서 세포의 성장이 멈추는 현상이 대부분에서 나타나며, 이 과정에 c-abl tyrosine kinase가 관여한다는 보고[23]와 여러 가지 종양세포에서는 방사선 조사 이후 G1 block이 소실되는 것을 관찰하였고, 이러한 현상과 방사선에 대한 내성 사이에 연관성을 시사하는 보고[24]를 기초로 하였다. 본 연구에서 K562 세포로 실험한 바에 의하면 10 Gy의 방사선 조사 후 G1 주기의 세포는 거의 관찰할 수 없었고 완연한 G2/M block의 소견이 48시간째까지 관찰되었다. 이러한 현상은 genistein을 투여한 실험에서도 동일한 결과를 얻었다. 특이한 소견은 herbimycin A를 투여한 세포들에서는 12시간째부터 G2/M block이 점차 해소되는 양상과 더불어 48시간째에는 세포 주기의 재 분포가 이루어지는 소견을 관찰할 수 있었다. 이러한 소견을 apoptosis의 발현과 연관하여 유추해 볼 때, G2/M block의 해소 혹은 G1 block의 회복과 apoptosis의 유도와의 연관성을 유추할 수 있으며, 이는 연구자들이 저 pH 상태의 SCK 세포에서도 apoptosis의 유도에 이르는 세포 주기의 변화에서 일관되게 관찰한 바 있었다.[25] 또한 PTK에 특이적으로 작용하는 억제제인 herbimycin A는 K562 세포의 증식을 억제하면서 G0/G1 phase에서 세포의 축적을 유발한다는 보고[26]를 감안할 때, PTK와 이와 관련한 신호전달 과정이 관련되어 있을 것으로 생각한다. 신호 전달 과정의 명확한 이해는 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에 대한 내성 극복의 향후 연구 과제로 인식된다.

참 고 문 헌

1. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972; 4:239-257
2. **Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death : The significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980; 68:251-306
3. **Bedi A, Zehnbauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ.** Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. Blood 1994; 83:2038-2044
4. **McGahon AJ, Nishioka WK, Martin SJ, Mahboubi A, Cotter TG, Green DR.** Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. J Biol Chem 1995; 270:22625-22631
5. **Dewey WC, Ling CC, Meyn RE.** Radiation-induced apoptosis : Relevance to radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 33:781-796

6. **Sawyers CL, Denny CT.** Chronic myelomonocytic leukemia :Tel-a-kinase what Ets all about. Cell 1994; 77:171-173
7. **Riordan FA, Bravery CA, Mengubas K, et al.** Herbimycin A accelerates the induction of apoptosis following etoposide treatment or gamma-irradiation of bcr/abl-positive leukaemia cells. Oncogene 1998; 16:1533-1542
8. **Hallahan D, Virudachalam S, Schwartz L, Panje N, Musafi R, Weichselbaum RR.** Inhibition of protein kinases sensitizes human tumor cells to ionizing radiation. Radiat Res 1992; 129:345-350
9. **Uckun FM, Tuel-Ahlgren L, Song CW, et al.** Ionizing radiation stimulates unidentified tyrosine-specific protein kinase in human B-lymphocyte precursors, triggering apoptosis and clonogenic cell death. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 9005-9009
10. **Kharbanda S, Ren R, Pandey P, et al.** Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. Nature 1995; 376:785-788
11. **Fuchs EJ, Bedi A, Jones RJ, Hess AD.** Cytotoxic T cells overcome BCR-ABL-mediated resistance to apoptosis. Cancer Res 1995; 55:463-466
12. **Nishii K, Kabarowski JH, Gibbons DL, et al.** ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. Oncogene 1996; 13:2225- 2234
13. **Workman P.** Signal transduction inhibitors as novel anticancer drugs:Where are we? Ann Oncol 1992; 3:527-31
14. **Park DJ, Min HK, Rhee SG.** IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in rat basophilic leukemia cells. J Biol Chem 1991; 266:24237-24240
15. **Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, et al.** Genistein, A specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J Biol Chem 1987; 262:5592-5595
16. **Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, et al.** Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. Am J Clin Nutr 1991; 54:1093-1100
17. **Okabe M, Uehara M.** New insight into oncoprotein-targeted antitumor effect:Herbimycin A as an antagonist of protein tyrosine kinase against Ph1-positive leukemia cells. Leuk Lymphoma 1993; 12:41-49
18. **Okabe M, Kawamura K, Miyagishima T, et al.** Effect of herbimycin A, an inhibitor of tyrosine kinase, on protein tyrosine kinase activity and phosphotyrosyl proteins of Ph1-positive leukemia cells. Leuk Res 1994; 18:213-220
19. **Findley HW.** Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-X, and Bax correlate with p53 status and sensitivy to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1997; 89: 2986-2993
20. **Szumiel I.** Review:Lonizing radiation-induced cell death. Int J Radiat Biol 1994; 66:329-341
21. **Sanchez-Garcia I, Grutz G.** Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:5287-5291
22. **Zhu J, Nabissa PM, Hoffman B, Liebermann DA, Shore SK.** Activated abl oncogenes and apoptosis:Differing responses of transformed myeloid progenitor cell lines.

Blood 1996; 87:4368-4375
23. **Yuran ZM, Huang Y, Whang Y, et al.** Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. Nature 1996; 382:272-274
24. **McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R.** Cell cycle arrests and radiosensitivity of human tumor cell lines : Dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. Cancer Res 1994; 54:3718-3722
25. **Lee HS, Park HJ, Lyons JC, Griffin RJ, Auger EA, Song CW.** Radiation-induced apoptosis in different pH environments in vitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 38: 1079-1087
26. **Hunakova L, Sedlak J, Klobusicka M, Duraj J, Chorvath B.** Tyrosine kinase inhibitor-induced differentiation of K-562 cells : Alteration of cell cycle and cell surface phenotype. Cancer Lett 1994; 81:81-87

Abstract

Radiation-induced Apoptosis is Differentially Modulated by PTK Inhibitors in K562 Cells

Hyung Sik Lee, M.D.[*], Chang Woo Moon, M.D.[*], Won Joo Hur, M.D.[*]
Su Jin Jeong, M.S.[†], Min Ho Jeong, M.D.[†], Jeong Hyeon Lee, M.D.[‡]
Young Jin Lim, M.D.[§] and Heon Joo Park, M.D., Ph.D.[§]

[*]Department of Radiation Oncology, [†]Microbiology, [‡]Parasitology,
College of Medicine, Dong-A University, Pusan, Korea
[§]Department of Microbiology, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Purpose : The effect of PTK inhibitors (herbimycin A and genistein) on the induction of radiation-induced apoptosis in Ph-positive K562 leukemia cell line was investigated.

Materials and Methods : K562 cells in exponential growth phase were irradiated with a linear accelerator at room temperature. For 6 MV X-ray irradiation and drug treatment, cultures were initiated at $2x10^6$ cells/mL. The cells were irradiated with 10 Gy. Stock solutions of herbimycin A and genistein were prepared in dimethyl sulphoxide (DMSO). After incubation at 37℃ for 0 48 h, the extent of apoptosis was determined using agarose gel electrophoresis and TUNEL assay. The progression of cells through the cell cycle after irradiation and drug treatment was also determined with flow cytometry. Western blot analysis was used to monitor bcl-2, bcl-X_L and bax protein levels.

Results : Treatment with 10 Gy X-irradiation did not result in the induction of apoptosis. The HMA alone (500 nM) also failed to induce apoptosis. By contrast, incubation of K562 cells with HMA after irradiation resulted in a substantial induction of nuclear condensation and fragmentation by agarose gel electrophoresis and TUNEL assay. Genistein failed to enhance the ability of X-irradiation to induce DNA fragmentation. Enhancement of apoptosis by HMA was not attributable to downregulation of the bcl-2 or bcl-X_L anti-apoptotic proteins. When the cells were irradiated and maintained with HMA, the percentage of cells in G2/M phase decreased to 30 40% at 48 h. On the other hand, cells exposed to 10 Gy X-irradiation alone or maintained with genistein did not show marked cell cycle redistribution.

Conclusion : We have shown that nanomolar concentrations of the PTK inhibitor HMA synergize with X-irradiation in inducing the apoptosis in Ph (+) K562 leukemia cell line. While, genistein, a PTK inhibitor which is not selective for $p210^{bcr/abl}$ failed to enhance the radiation induced apoptosis in K562 cells. It is unlikely that the ability of HMA to enhance apoptosis in K562 cells is attributable to bcl-2 family. It is plausible that the relationship between cell cycle delays and cell death is essential for drug development based on molecular targeting designed to modify radiation-induced apoptosis.

Key Words : Radiation, Apoptosis, K562 cells, PTK inhibitors