

자궁경부암 환자에서 방사선치료 시 발현되는 유전자의 규명

충남대학교 의과대학 피부과학교실*, 치료방사선과학교실†, 흉부외과학교실‡, 자연과학대학 생물학과§, 암공동연구소||

서은영* · 조문준† · || · 이증훈* · 이영숙† · 나명훈‡ · 이윤희§ · 김준상† · || · 김재성† · ||

목 적 : 임상에서 사용하는 방사선량을 조사하여 환자의 자궁경부암 세포에서 유도되는 유전자를 검색하고자 하였다.

대상 및 방법 : 자궁경부암 환자에서 방사선치료 전(대조군)과 1.8 Gy 조사후 40분 지나서(조사군) 자궁경부암 조직을 생검하여 각 군에서 total RNA를 추출하였다. differential display reverse transcription-polymerase chain reaction기법(DDRT-PCR)으로 발현이 증가 또는 감소된 유전자를 탐색하였다. 발현에 변화가 있는 cDNA를 추출하고 증폭하여 얻은 클론을 reverse Northern Blot방법을 이용하여 screening하였고, Northern Blot으로 확인하였다. sequencing을 실시한 후 NCBI database를 이용하여 blast search를 하였다. 발현이 감소한 유전자를 대상으로 다른 환자에서의 발현 양상을 확인하기 위하여 방사선치료를 받는 5명의 자궁경부암 환자를 대상으로 RT-PCR로 검사하였다.

결 과 : DDRT-PCR기법을 이용하여 방사선 조사군에서 발현이 증가 혹은 감소된 18개의 cDNA band를 발견하였다. reverse northern blot을 이용한 screening에서 발현이 증가된 10개의 클론과 감소된 1개의 클론을 확인하였다. 클로닝된 cDNA 조각들은 대부분 400~500 bp 정도 되었으며, 그중 1개의 클론은 잘 알려져 있는 chemokine receptor CXCR4 유전자와 높은 상동성을 보였으며, 4개의 클론은 Human ESTs로 확인되었고 5개의 클론은 기능이 아직 확인되지 않은 알려져 있는 염기서열로 확인되었다. 방사선에 의하여 발현이 감소한 CxCa-11 클론이 모든 환자에서 방사선치료 전 시료에서 발현을 보였으나, 방사선치료 후 시료에서는 그 발현량이 감소하거나 발현이 안되었다.

결 론 : DDRT-PCR을 이용하여 임상에서 자주 사용되는 방사선량을 환자의 자궁경부암에 조사했을 때 발현되는 유전자를 확인하였다. 이러한 유전자 발현의 확인은 방사선치료과정 중에 발생하는 일련의 기전들을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다.

핵심용어 : 자궁경부암, 방사선치료, 유전자발현

서 론

자궁경부암은 한국 여성에서 가장 호발하는 악성 종양중 하나이며 원격 전이가 동반되지 않은 경우 수술과 방사선치료를 표준 치료로 사용하며 49.8%에서 방사선치료를 받고 있다.¹⁾

최근 급속히 발전하고 있는 분자생물학적 기법을 이용하여 방사선조사 후 발현되는 분자생물학적 변화에 대한 지식의 축적은 자궁경부암에 대한 전통적 방사선 생물학적 지식 및 가설을 더욱 정확하게 이해 및 규명할 수 있게 되었다. Santucci 등²⁾은 자궁경부암 환자에서 방사선치료시 gadd45의

induction이 안되는 경우 국소관해율이나 무병생존율이 높은 것으로 보고하였다. Butz 등³⁾은 HPV감염된 자궁경부암 세포에서 방사선치료 시 gadd45의 induction이 증가되는 것을 보고하였다. Santin 등⁴⁾은 HPV감염된 자궁경부암 세포의 mitotic activity에 영향을 미치는 E6과 E7 oncogenes을 방사선이 의미있게 지속적으로 up-regulation하는 것으로 보고하였다. Harima 등은 Bax와 Bcl-2의 발현 정도로 자궁경부암의 방사선치료에 대한 반응을 예측할 수 있다고 발표하였으며,⁵⁾ 자궁경부암 IIIb 병기 환자를 대상으로 방사선치료 단독과 방사선치료와 온열치료를 병용한 치료군 사이에서 통계적으로 유의하게 병용군에서 Bax 발현이 높았고 아마도 apoptosis를 증가시켜 치료 결과도 좋은 것을 보고하였다.⁶⁾ 그러나 자궁경부암 환자의 방사선 치료효과를 예견하여 치료계획을 세우고 치료효과를 향상시키기 위해서는 방사선조사 후 세포 및 조직에 미치는 영향과 유전자 발현의 각 단계에 관여하는 유전자 및 전사요소 등을 규명하는 것이 필수적이나 아직 크게 미흡한 실정이다.

이 논문은 2001년 11월 11일 접수하여 2001년 12월 11일 채택되었음.

이 논문은 1998년도 충남대학교병원 대형공동연구비의 지원으로 연구되었음.

책임저자: 조문준, 충남대학교 의과대학 치료방사선과학교실
Tel: 042)220-7861, Fax: 042)220-7899
E-mail: mjcho@cnu.ac.kr

Subtractive hybridization, electronic subtraction, serial analysis of gene expression 등의 방법으로 세포내 m-RNA를 이용하여 유전자 발현의 차이를 찾아내는 방법이 사용되었으나 cDNA library를 먼저 만들어야하는 번거로움, 발현 양이 적은 유전자를 찾는 데는 한계가 있었다.

최근 빠른 기간 내에 결과를 확인할 수 있으며, 비교적 소량의 total RNA만으로도 실험이 가능하고, mRNA 발현의 증가와 감소를 동시에 확인 할 수 있으며, prevalence에 의존하지 않고 미량으로 존재하는 mRNA도 확인이 가능한 differential display (DD)이 개발되었다.⁷⁾ 이에 DD 방법을 이용하여 자궁경부암 환자에서 방사선치료 중 발현이 증가하거나 감소하는 유전자를 검색하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세 포

18세 이상이며 80세 미만으로 조직학적으로 확진된 악성 종양이며 종양은 육안적으로 확인 가능하고 접근이 가능한 부위에 위치하여 생검이 가능한 자궁경부암 환자를 대상으로 하였다. 180 cGy 방사선치료 후 40분에 자궁경부암 조직을 생검하여 방사선 조사군으로 하였고 환자에서 방사선치료 전에 생검하여 대조군으로 하였다.

2. 방사선조사

자궁경부암 환자에 대한 방사선 조사는 본과의 자궁경부암 치료 protocol에 따라 환자를 setup하고 선형가속기를 이용하여 180 cGy를 조사하였다.

3. RNA 분리

Total RNA는 Promega사의 SV total RNA 분리 system으로 manual에 따라 분리하였다. DD-PCR에 사용될 각각의 시료들은 반드시 DNase처리를 실시해서 genomic DNA 오염을 제거하였다. 약 1~5 µg의 total RNA에 1×DNase I buffer와 enzyme를 첨가하고 37°C 30분간 반응시켰다. 각 RNA sample들은 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 정량한 후 아가로스 겔 전기 영동하여 28s와 18s band를 확인하였다.

4. Differential Display

Differential Display는 Liang과 Pardee에 의해 고안된 방법에 의한 RNA Image와 Display system 회사의 display PROFILE-BASIC Eukaryotic kit을 이용하여 실시하였다.

1) Primer

display PROFILE kit에서는 total 64개의 arbitrary primer를 이용하였다.

2) mRNA의 역전사 반응

Total RNA에 존재하는 mRNA molecule을 역전사반응를 통하여 cDNA를 합성하였다. Total RNA 2 µg에 5×RT buffer 4 µl, H-T11M 2 µl, 250 µM dNTP 1.6 µl, dH₂O를 첨가해서 19 µl가 되게 한 후 thermal cycler에서 65°C 10분간 가온한 후 MMLV reverse transcriptase 1 µl를 넣고 37°C 1시간 반응시켰다. 75°C 5분 가온한 후 4°C에 보관하였다.

3) PCR

cDNA합성에 이용된 동일한 H-T11M primer와 kit에서 제공하는 10mer의 arbitrary primer를 갖고 증폭반응을 실시하였다. 각 PCR 반응액의 조성은 cDNA 2 µl에 10×PCR buffer 2 µl, 2 µM H-AP primer 2 µl, 2 µM H-T11M primer 2 µl, 25 µM dNTP 1.6 µl, 2000 µCi/mmol [α -³³P]dATP 0.2 µl, Taq polymerase 0.2 µl, dH₂O를 첨가하여 최종 20 µl가 되게 하였다. 반응조건은 94°C 30초, 40°C 2분, 72°C 30초에서 40 cycle을 돌린 후 72°C 5분 가온 후 4°C를 유지하였다.

4) PCR 산물의 전기영동

증폭된 PCR산물을 8M urea가 포함된 6% polyacryl amide 겔을 이용하여 분리하였다. 1200V에서 3시간 정도 running하여 BPB가 겔의 하단부분에 내려올 때까지 전기 영동하였다. 겔을 떼어낸 후 vacuum-dry시키고, alignment를 부착하여 필름을 넣고 24~48시간 -70°C에 보관하였다.

5) DNA band 회수 및 PCR 재증폭

필름을 현상한 후 방사선에 의해서 다르게 발현되는 band를 잘라내고 dH₂O 100 µl를 첨가해서 100°C 15분간 가열하여 DNA를 용출해 냈다. 용출된 DNA를 glycogen, sodium acetate, 100% EtOH를 첨가해서 침전시켰다. 건조된 DNA를 10 µl DW를 첨가해서 재 부유시켰다. 이중 4 µl를 위의 DD-PCR에서 사용한 동일한 조성과 조건에서 동일한 primer를 가지고 재 증폭하였다. 재 증폭된 PCR 산물을 1.5% agarose 겔에서 전기 영동하여 크기를 확인하였다

6) PCR product cleaning

Agarose 겔에서 확인된 DNA를 깨끗한 blade를 이용하여 오려낸 후 1.5 mL tube에 옮겼다. 겔 조각의 무게를 잰 후 QX1 buffer를 이용하여 겔 부피의 3배의 buffer를 첨가하고 잘 혼합하였다. QiaEX II 30 µl를 첨가한 후 50°C에서 10분 가온하였다. Sample을 원심분리하고 pellet을 500 µl QX1 buffer로 세척하였다. pellet을 PE buffer로 2번 세척한 후 공기 건조시키고, 20 µl DW에 잘 녹였다.

5. Reverse Northern Blot screening

1) cDNA membrane의 준비

Nylon membrane를 slot blot manifold의 크기에 맞게 자른 후 20×SSC에서 한시간 정도 담겼다. Membrane를 manifold위에 장착하고 고정시켰다. Differential display와 subtraction에서 얻어진 cDNA 산물을 1 N NaOH/2 mM EDTA하에서 10분간 가열해서 denature 시켰다. denature 된 DNA를 membrane에 점적하고 vaccum을 이용하여 흡입시켰다. membrane를 10×SSC buffer로 세척 후 manifold에서 떼어낸후 UV crosslinking하였다.

2) Probes의 준비

Total RNA를 RI로 표식하여 probe를 합성하였다. Total RNA 5 µg과 oligo (dT)primer, dNTP, MMLV reverse transcriptase를 첨가하고 RT반응을 시행하였다. 이 RT 반응물을 random primed labeling 방법을 이용하여 radioactive probes를 합성하였다. 먼저 cDNA를 100℃에서 10분동안 가열해서 denature 시킨후 얼음에서 5분간 방치하였다. 그런 다음 cDNA에 dATP, dGTP, dTTP 혼합물 3 µl, reaction mixture 2 µl, [³²P]dCTP 5 µl, Klenow enzyme (5 U/µl) 1 µl 첨가하고 37℃에서 15~30분간 incubation 시킨다. Labeling이 끝난 반응물을 즉시 Sephadex spin column을 이용하여 반응하지 않은 radioactive nucleotide를 제거하였다.

3) Hybridization and autoradiography

Membrane을 68℃ 오븐에서 ExpressHyb solution (CLONTECH)을 가지고 30분간 prehybridization 시켰다. prehybridization용액을 버리고 새로운 hybridization용액을 첨가한 후 3×10⁵ cpm/ml의 RI 표식 probe와 salmon sperm DNA를 첨가하였으며 68℃에서 overnight hybridization하였다. membrane을 조심스럽게 꺼낸 후 2×SSC와 0.1% SDS 세정액을 가지고 실온에서 15분씩 2번 세정하였다. 두 번째 세정액인 0.1×SSC와 0.1% SDS 세정액에 옮긴 후 60℃에서 30분간 세정하였다. membrane를 saran-wrap으로 덮고 초저온 freezer (-70℃)에서 증감지를 사용하여 X선 필름에 노광하였다. 대조군과 비교하여 현저한 차이가 나는 DNA를 Northern Blotting 통해 확인하였다.

6. Northern Blotting

Total RNA를 대조군 및 방사선 조사군에서 분리한 후 10 µg을 nylon membrane에 20×SSC를 가지고 downward capillary를 통하여 전이시킨 후 UV cross-linking 시켰다. Probe 합성은 slot blot screening을 통하여 확인된 다르게 발현되는

DNA들을 Random labeling 방법을 이용하여 [³²P]dCTP를 가지고 probe를 합성하였다. 이 probe 합성이 끝난 반응물을 즉시 Sephadex spin column을 이용하여 반응하지 않은 nucleotide를 제거하였다. slot blot에서 처럼 ExpressHyb Solution을 가지고 68℃에서 overnight hybridization 시켰다. hybridization후에 membrane을 2×SSC와 0.1% SDS 세정액을 가지고 실온에서 15분씩 2번 세척하였다. 두 번째 세정액인 0.1×SSC와 0.1% SDS 세정액으로 60℃에서 30분간 세척하였다. membrane를 intensifying screen 사이에 끼우고 X-ray 필름을 넣고 -70℃에서 1~7일동안 노출시켰다.

7. Cloning and sequencing of differentially expressed cDNA bands

Northern blot 분석으로 얻어진 DD-PCR 산물들을 cloning 및 sequencing에 이용하였다. cloning은 PCR2.1 TA cloning vector를 이용하였다(Invitrogen). Sequencing은 chain termination reaction에 의해 manual로 실시하거나 또는 Biomedical Research center에 있는 automatic system을 이용하였다. 클론된 유전자 서열은 BLAST network 서비스를 통한 GenBank database 가지고 search 하였다.

8. RT-PCR

본 연구에서 이용한 primer set는 바이오니아에 주문 합성하여 사용하였으며 Total RNA를 주형으로 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들고 이어서 PCR에 의하여 DNA를 증폭하였다. RT-PCR은 각각의 조건에서 2 µg의 total RNA를 이용하였다. 먼저 RNA시료를 65℃에서 5분간 가열하고 변성시키고 얼음에 급냉시킨 후 2 µl의 10× RT buffer, 2 µl의 dNTP (2.5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)을 가지고 10 µM의 oligo-dT15와 RNase inhibitor 및 1U의 reverse transcriptase를 가지고 총 반응액이 20 µl가 되도록 증류수를 가한 후 37℃에서 1시간 반응하여 cDNA를 얻었다. cDNA 산물은 95℃에서 5분간 가열하여 역전사 효소를 불활화시킨 다음 얼음에 담가 급냉하였다. 이렇게 생성된 cDNA산물을 가지고 다음과 같은 동일한 조건에서 PCR을 시행하였다. 즉, 4 µl의 10×PCR buffer, 4 µl의 2.5 mM dNTP mixture, 20 µM의 3'primer 및 5' primer, 1 U Taq DNA polymerase를 각 eppendorf tube에 첨가하여 총반응액이 40 µl가 되도록 증류수를 가한 후 PCR은 DNA thermal cycler를 사용하여 시행하였다. CxCa-11 mRNA 발현분석을 위한 PCR 조건은 denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 57℃에서 1분, extension은 72℃에서 1분간 시행하여 35회의 cDNA 증폭반응을 시행하였다.

결 과

1. Differential Display 분석

DD-PCR 방법을 이용하여 방사선 조사군에서 발현이 증가 또는 감소된 18개의 클론을 발견하였다(Fig. 1). 7개의 다르게 발현되는 DAN bands를 오려낸 후 겔로부터 cDNA 조각을 분리하였다. 깨끗하게 정제한 cDNA를 이전에 이용했던 primer를 이용하여 재증폭한 후 pGEM-T Easy vector를 사용하

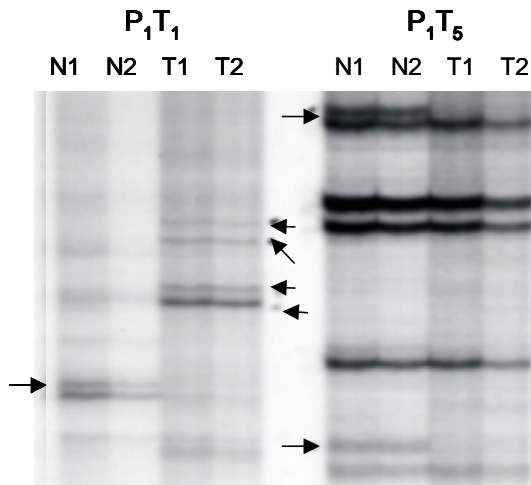


Fig 1. Differential display of cDNAs from paired irradiated and not irradiated cervical cancer tissue using multiple primer sets. Total RNA from irradiated (T) and not irradiated (N) cervical cancer tissue was transcribed with anchored oligo (dT) primers and generated cDNAs were amplified with arbitrary primers in the presence of [α - 32 P]dATP. The PCR products were then separated on 6% polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiographed. Putative differentially expressed cDNAs are indicated with arrows.

여 subcloning하였다.

2. Confirmation of Differential Expression

Reverse Northern Blot에서 발현이 증가된 10개의 클론과 감소된 1개의 클론을 확인하였다(Fig. 2). 11개의 클론을 각각 CxCa-4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15로 명명하였다(Table 1).

3. Sequencing of cDNA Fragments

클로닝된 cDNA 조각들은 대부분 400~500 bp 정도 되었으며, 그중 1개의 클론은 잘 알려져 있는 chemokine receptor CXCR4 유전자와 높은 상동성을 보였으며, 4개의 클론은

Table 1. Differentially Expressed Genes in not Irradiated and Irradiated Cervical Cancer Tissue

clones	BLAST search with DNA Sequence	ID	GenBank Accession No.
CxCa-4	No match		
CxCa-5	Human EST	98%	AA514190
CxCa-7	Human DNA sequence on chromosome 13	100%	AL138706
CxCa-8	Homo sapiens similar to proliferation-associated protein 204	97%	XM_049049
CxCa-9	Home sapiens chromosome 19	98%	AC005261
CxCa-10	Human EST	95%	BG360938
CxCa-11	Human EST	93%	T30167
CxCa-12	Homo sapiens chemokine receptor CXCR4	91%	XM_051229
CxCa-13	Human EST	97%	BGO24795
CxCa-14	Homo sapiens hypothetical gene	97%	XM-055861
CxCa-15	Human DNA sequence on chromosome 15	97%	ACO12195

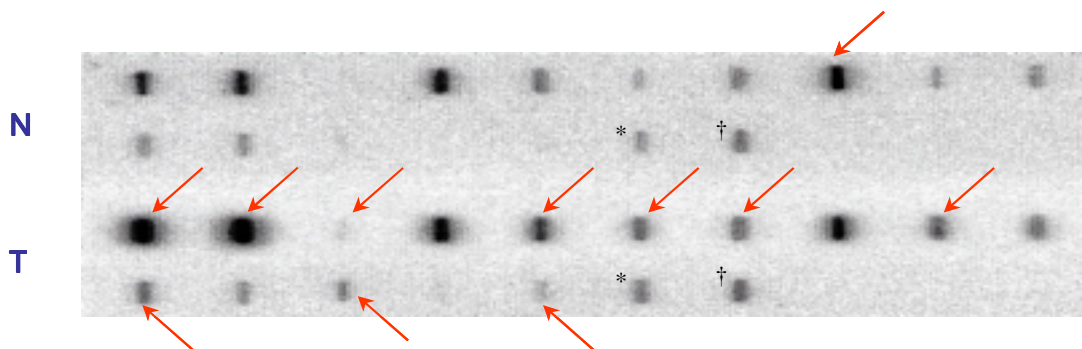


Fig 2. Reverse northern blot analysis. After denaturation and renaturation of cDNA fragments amplified by PCR, they blotted onto two replicas of nylon membrane. Membranes were hybridized with 32 P-labeled cDNA probes made from the RNAs of either not irradiated (N) or irradiated (T) cervical cancer tissue by reverse transcription. Arrows indicate the 1 differentially expressed cDNA fragments in not irradiated and 10 in irradiated cervical cancer tissue. * indicates β -actin and † indicates GAPDH, as a control to equalize differences in efficiency of reverse transcription.

```

1 aaactaccaaccaaggtactatTTTTnaaacatcgtgtgtcattccagcaaggcag
61 aagactgcacctcttccagtgacatgctgtgcatttttNaagtcctcttaattt
121 tagacacattttggtttatgTTTaaacaatgatgcctaaccagtcattctgtctgcac
181 caatgcaaaagggttctgagaggagtattctctatccctgtggatgaagacactggcat
241 ttcactatTTTTcccttctntTTaaaggatttaactttggaatcttccaaaggaagt
301 ttggccaatgncagatccccaggaattgggggggttttc tttctttca actg
    
```

Fig. 3. Nucleotide sequences of Human ESTs clone. Sequences of primer sets used for RT-PCR are underlined. Expected product size is 162 bp.

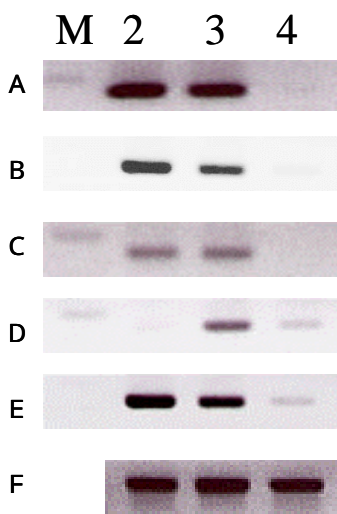


Fig. 4. Identification of EST clone by mRNA RT-PCR for 5 cervical cancer patients. 2µg of total RNA from different cancer patients (A, B, C, D, E) was transcribed with reverse transcriptase, the mRNA samples were obtained before (lane 2), after 180 cGy irradiation (lane 3), after 27 Gy irradiation (lane 4). And equal amount of cDNA were amplified with EST clone-specific primers. Lane F is GAPDH as a internal control. M is 200bp sized marker. EST clone expressed in not irradiated and decreased or did not express in irradiated cervical cancer tissue for all patients.

Human ESTs로 확인되었고 5개의 클론은 기능이 아직 확인되지 않은 알려져 있는 염기서열로 확인되었으며, 1개의 클론은 어떤 유전자와도 match되지 않았다(Table 1).

4. Confirmation of Reverse Northern blot

Reverse northern blot을 수행한 결과 CxCa-11 클론이 방사선조사 시 발현이 감소하는 양상을 보였다. 이 클론을 증폭할 수 있는 primer를 제작하여 5명의 자궁암환자들에서는 CxCa-11클론이 어떠한 발현양상을 보이는지 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 이때 사용한 primer sequence와 기

대되는 product size는 Fig. 3에 기술하였다. 모든 환자에서 방사선치료 전 시료에서 발현을 보였으나, 방사선치료 후 시료에서는 그 발현량이 감소하거나 발현이 안되었다(Fig. 4).

고안 및 결론

지금까지 많은 연구가 되어왔으나 세포의 방사선 인지부위가 정확히 밝혀지지 않았으며, 다만 방사선을 인체에 조사하면 방사선이 물과 반응하여 free radical을 생성하며, 이 free radical이 세포막의 지질이나 핵산에 손상을 유발하여 세포가 방사선을 인지하게되고 radiation induced signal transduction을 시작할거라고 추정하고 있다.

저자들은 DD RT-PCR 방법을 이용하여 방사선을 조사한 암환자 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자를 검색하고자 하였다. DD RT-PCR방법으로 방사선조사를 받은 자궁경부암 조직과 방사선조사를 받지 않은 자궁경부암조직에서 특이적으로 발현되는 18개의 클론을 얻었다. Reverse Northern blot으로 확인한 결과 1개의 클론은 방사선조사를 조사하지 않은 암조직에서 발현정도가 높았으며, 10개의 클론은 방사선 조사를 받은 암조직에서 발현정도가 높게 나타났다. DD-PCR의 단점이 잘못된 positive cDNA의 출현빈도가 높고, sequencing gel로부터 특이적으로 발현되는 cDNA를 오려낼 때 다른 것들이 포함될 확률이 높다는 것인데, 이러한 이유 때문인지 7개의 클론은 발현의 차이가 없었다. 11개의 클론을 automatic system을 이용하여 sequencing 한 후에 Genbank database에서 BLAST search program을 이용하여 상동성을 분석하였다. CxCa-4는 기존에 알려져 있는 유전자와 상동성을 전혀 보이지 않았으며, CxCa-5, CxCa-10, CxCa-11, 그리고 CxCa-13 등은 그 기능이 정확히 밝혀지지 않은 Human ESTs인 것으로 확인되었다. 또한 CxCa-7, CxCa-9 그리고 CxCa-15 클론은 각각 chromosome 13, 19 그리고 15번에 위치한 DNA sequence인 것으로 나타났다.

CxCa-8 클론이 세포증식과 관련된 Homo sapiens similar to proliferation-associated protein 204 단백질과 높은 상동성을 보였다. Halahan 등⁵⁾은 방사선에 의한 조기유전자 발현의 산물은 TNF, basic fibroblast growth factor, IL-1, 그리고 TGF- β 등의 secondary response gene을 발현시켜 각종 growth factor, cytokine을 분비시켜 결국 세포사망유도, 손상된 DNA의 회복, cell cycle perturbation, 세포생존, apoptosis 등을 일으킨다고 했다. 이런 점을 고려해보자면 CxCa-8 유전자가 방사선치료의 분자생물학적 기전에 관련이 있을 수 있을 것으로 사료되어 이를 확인하기 위하여 CxCa-8 클론의 완전한 유전자를 클로닝하고 그 유전자가 방사선치료 시 관여하는 분자생물학적인 기전에 어떤 역할을 하는지에 대하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 실험결과에서 저자들이 가장 관심을 갖고 있는 CxCa-12 클론은 방사선조사 후에 더 많은 발현정도를 보였으며 chemokine receptor인 CXCR4와 91% 상동성을 보였다. CXCR4에 대한 연구는 오래 전부터 많이 되어져왔으며,^{8,9)} 이것은 stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)의 specific receptor중 하나이며,¹⁰⁾ HIV 감염시에 coreceptor로도 작용한다.¹¹⁾ CXCR4와 SDF-1이 결합하여 말초 혈액 림프구와 혈관 내피 세포가 chemoattractant하게 한다.^{12,13)} Panomaryov 등은 SDF-1이 DNA damage가 일어났을 경우 host defense response에 관여한다는 보고를 하였다.¹⁴⁾ 본 실험에서 클로닝한 CXCR4를 고려해볼 때 방사선치료의 분자생물학적인 기전이 SDF-1이 관여하는 일련의 신호전달경로와 어떤 연관이 있음을 추정할 수 있으며, 그러한 과정에서 CXCR4가 방사선치료의 효과를 예측하는데 도움이 되리라고 사료된다.

CxCa-11클론은 방사선조사를 받지 않은 암세포에서 발현정도가 높았으며 기존에 밝혀진 유전자와는 전혀 상동성을 보이지 않는 새로운 유전자로서 Human Uterus Homo sapiens cDNA 5' end와 93%의 상동성을 보였다. reverse Northern 결과를 검증하기 위하여 Northern blot을 수행하였으나 결과를 얻지 못하였다. Northern blot은 RNA의 정성, 정량을 시행하기 위하여 가장 일반적으로 이용되는 방법으로서 RNA의 품질이 나쁘다든지 목적하는 mRNA의 prevalence가 매우 낮다든지, 또한 다른 실험방법 등에 오류가 있을 시에 그 결과를 얻기가 어렵다. 본 실험에서는 mRNA의 발현정도가 낮은 것이 원인일 것이라는 가정 하에 극히 소량의 경우에도 증폭이 가능하여 mRNA의 prevalence에 관계없이 그 존재유무를 확인할수 있는 RT-PCR 방법을 이용하였다. 이때 primer는 CxCa-11클론의 sequence를 이용하여 상용화된 primer design software를 이용하여 합성하였으며, 기대되는 product

크기는 162 bp였다. CxCa-11 클론이 방사선치료 시 작용하는 기전에 중요한 요인이라면 다른 방사선치료 중인 환자들에게서도 발현될 확률이 높을 것이라는 가정하에 방사선 치료중인 5명의 자궁경부암 환자를 대상으로 RT-PCR을 수행하였으며, 이때 방사선치료전, 180 cGy 방사선치료 40분 후, 그리고 27 Gy 방사선치료 후의 시료를 대상으로 실험하였다. CxCa-11 클론이 방사선치료 전 시료에서 발현이 되었으며, 180 cGy 방사선치료 후 시료와 27 Gy 방사선치료 후 시료에서는 그 발현이 현저히 감소하거나 발현이 안되어 reverse Northern blot의 결과와 일치하였다. 이는 CxCa-11클론이 방사선 치료 시 분자생물학적인 기전에 어떤 역할을 할 것을 강하게 시사한다. 앞으로 CxCa-11클론의 완전한 유전자를 클로닝하고 그 유전자가 방사선치료 시 관여하는 분자생물학적인 기전에 어떤 역할을 하는지에 대하여 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 실험에서 얻은 결과들은 자궁경부암에 대한 방사선치료 기전 연구에 초석이 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Ha SW, MK Kim. Forecasting facility and personnel for KOSTRO. J Kor Soc Ther Radiol Oncol 2000;18:s7-13
2. Santucci MA, Barbieri E, Frezza G, et al. Radiation-induced gadd45 expression correlates with clinical response to radiotherapy of cervical carcinoma, Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;46:411-416
3. Butz K, Whitaker N, Denk C, Ullmann A, Geisen C, Hoppe-Seyley F. Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells. Oncogene 1999;18:2381-2386
4. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-internati M, Pecorelli S, Parham GP. Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma, Cancer 1998;83:2346-2352
5. Halahan DE, Friedman AH, Kufe DW, Fuks Z, Weichselbaum. The role of cytokines in radiation oncology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Important advances in oncology. 1st ed. Philadelphia, PA: Lippincott Co. 1993:71-80
6. Harima Y, Nagata K, Harima K, et al. Bax and Bcl-2 protein expression following radiation therapy versus radiation plus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. Cancer 2000;88:132-138
7. Appel M, Bellstedt DU, Gresshoff PM. Differential display of eukaryotic mRNA: Meeting the demands of the new millennium. J Plant Physiol 1999;154:561-570
8. Rimland J, Xin W, Sweetnam P, Saijoh K, Nestler EJ, Duman RS. Sequence and expression of a neuropeptide Y

- receptor cDNA. *Mol Pharmacol* 1991;40:869-875
9. **Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM, et al.** Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* 1993;16:707-12
 10. **Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T.** Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993;261:600-603
 11. **Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.** HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-877
 12. **Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA.** A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996;184:1101-1109
 13. **Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM.** Chemokine receptors in human endothelial cells: functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1998;273:4282-4287
 14. **Ponomarev T, Peled A, Petit I, et al.** Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000;106:1331-1339

Abstract

**The Differentially Expressed Genes by Radiotherapy
in the Patients with Uterine Cervix Cancer**

Eun Young Seo, M.S.^{*}, Moon-June Cho, M.D.^{†,||}, Jeung Hoon Lee, M.D.^{*},
Young-Sook Lee, M.S.[†], Myung-Hoon Na, M.D.[†], Woong-Hee Lee, M.S.[§],
Jun-Sang Kim, M.D.^{†,||} and Jae-Sung Kim, M.D.^{†,||}

Department of Dermatology^{*}, Therapeutic Radiology[†], Thoracic & Cardiovascular Surgery[†], College of Medicine,
Department of Biology[§], College of Natural Sciences,
Cancer Research Institute^{||}, Chungnam National University

Purpose: To detect differentially expressed genes in the patients with uterine cervical cancer during the radiation therapy.

Materials and Methods: In patients with biopsy proven uterine cervical cancer, we took a tumor tissue just before radiation therapy and at 40 minutes after external irradiation of 1.8 Gy. Total RNAs isolated from non-irradiated and irradiated tumor tissue samples were analyzed using the differential-display reverse transcription-polymerase chain reaction (DDRT-PCR). Complementary DNA (cDNA) fragments corresponding to differentially expressed messenger RNAs(mRNAs) were eluted, and cloned. The differential expression of the corresponding mRNAs was confirmed by reverse northern blot. Differentially expressed cDNA bands were sequenced. Nucleotide sequence data were analyzed in the Gene Bank and EMBL databases via the BLAST network server to identify homologies to known genes or cDNA fragments. Expression pattern of down-regulated clone was examined using RT-PCR in 5 patients undergoing radiotherapy.

Results: We identified 18 differentially expressed bands by DDRT-PCR, which were eluted and cloned. There were 10 up-regulated clones and 1 down-regulated clone in reverse northern blot. One cDNA fragment had homology to chemokine receptor CXCR4, four were identified as Human ESTs in the EMBL database in EST clones. Down-regulated CxCa-11 was also down regulated in all patients.

Conclusion: Using the DDRT-PCR, we have identified 10 up-regulated and 1 down-regulated clone(s) in the patients with uterine cervix cancer during the radiation therapy. The clinical relevance and the functions of these genes will be further investigated.

Key Words: Uterine cervix cancer, Radiotherapy, Differentially expressed genes