대한방사선종양학회지 2003;21(4):306 ~ 314

세포주기 변화에 따른 방사선 유도 암세포 사망의 조절기전

동아대학교 의과대학 방사선종양학과*, 의과학 연구소†
원자력의학원 방사선종양학과‡

정수진†,정민호†,장지연†,조월순†,남병혁†,정민자†
임영진†,장병곤*,윤선민*,이형식*,허원주*,양광모‡

목 적: K562 세포의방사선에 의한세포사망은 mitoticcatastrophe 현상이위주로 나타나지만 herbimycinA(HMA)에 의하여 apoptosis 반응이 촉진되는 반면 genistein에 의하여 두 가지 형태의 세포사망이 모두억제된다. 본 연구에서는 HMA와 genistein에 의한 K562 세포의 방사선 유도세포주기 조절 변화와 세포사망양상의연관성을조사하였다.

대상 및 방법: 지수증식기의 K562 세포에 6 MV 선형가속기(Clinac 1,800 C, Varian)를 이용하여 200 ~ 300 cGy/min의 선량률로 10 Gy를 균일하게조사하였다. HMA와 genistein은 각각 250 nM와 25μM 농도로 방사선조사후즉시 투여하였다. 실험에서는세포주기, 조절인자의 발현및활성, 노화 및 분화정도 등에있어서의 시간에따른변화를 조사하였다.

결 과: 방사선 단독조사에서 K562 세포는 G2기의 정체를 보였으나 정상적인 p53을 가지는 세포와는 달리 지속적인 세포주기의정체를 보이지 않았다. G2 정체가유지되는 동안 cyclinB1의 점진적인증가를 관찰할 수 있었으며, 이는 염색체의 복제가 완료되지 않은 상태에서 M기로 진행하여 미성숙한 염색체 응축과 mitotic catastrophe 현상이 나타나는 것과일치한다. 방사선 조사와함께 HMA를 투여한경우에는 G2 정체가빠르게 해소되었으며 동시에 G1기에서 세포가정체되는양상을보였다. 세포주기조절인자 cdc2 kinase 활성증가와 cyclin E와 A 발현및CDK2 활성의 감소 등의 현상으로 설명되며, 이는 apoptosis의 증가와연관성을 갖는다. 반면 genistein의 경우에는 cyclin B1과 cdc25C 발현및 cdc2 활성이모두감소하는등 G2 정체를 계속유지하였다. 이와함께방사선에의한노화와 megakaryocyte로의 분화도 지속되는 것을 관찰할 수 있었다.

결 론: HMA와 genistein에 의한 K562 세포의 방사선 유도 세포사망의변화는 세포주기 조절과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. 이는 다양한 방사선 유도 세포사망의 기전을 이해하는 데 독창적인 모델을 제공하며, 방사선을 이용한 암 치료법의 개발에 새로운 표적을 제공할 수 있을 것이다.

핵심용어: 방사선 유도 세포사망, 세포주기, 노화, 분화, Herbimycin A, Genistein

서 론

인체조직을 구성하는 세포는 생명현상을 유지하기 위하여 다양한 생물학적 기능을 수행한다. 세포가 그러한 기능을 수행하기 위한 중요한 특징 중의 하나는 자기복제가 가능하다는 것이다. 일반적으로 자기복제의 과정은 세포의 성장, 염색체의 복제 그리고 세포분열 등을 포함한다. 이러한 자기복제는 모세포와 아주 유사하고, 그 기능을 반복 수행할 수 있는 딸세포를 만들도록 조정된 특이적인 조절 네트워크를 가진다. 이것은 염색체의 복제가 일어나는 S기, 염색체 및 세포질의 분리가 일어나는 M기, M기와 S기의 사이에 존재하는 G1기 그리고 S와 M기의 사이에 놓여 있는 G2기의 4단계(phase)로 나누어진다.[1,2] 각각의 주기는 cyclin과 CDK라는단백질들 간의 복합체에 의하여 각 단계마다 특이적인 조절이 이루어지며,[3,4] CDK는 CDK 억제인자(CDI)라는 작은 분자들에 의하여 조절되기도 한다.[5,6]

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-002-F00139).
이 논문은 2003년 6월 16일 접수하여 2003년 11월 26일 채택되었음.
책임저자: 양광모, 동아대학교 의과대학 연구소
Tel: 051)240-5343, Fax: 051)242-7265
E-mail: kmyang@kcch.re.kr

세포주기에서 일어나는 일련의 과정은 세포주기가 정상적으로 완전히 종료가 될 때까지 다른 과정의 수행이 방지되는 정밀한 작동 기작으로 이루어져 있다. 이를 checkpoint라고 하며(DNA 합성, 염색사의 조립, DNA 회복 등), 이 시기에서 세포주기의 순환을 정지시킴으로서 세포 복제 과정 중의 에러에 대하여 작용하게 된다. 방사선 조사도 많은 포유동물세포의 DNA에 손상을 가함으로서분열의지연을 야기한다.[7,8] 방사선 조사에 의한 DNA 손상에 대한 세포의 반응은 DNArepair 경로및세포주기의 checkpoint가 활성화되며, 연속적으로 DNA 회복 또는 세포사가 유도되며, 이들은 세포형태에 따라 차이를 보인다. 최근 방사선에 노출된 세포에서 형태학적 소견으로 apoptosis와 유사한 양상을 보이는 mitotic catastrophe라는 새로운 개념이 보고되고 있다. 이는 세포주기의불완전한 진행, 즉 DNA 복제(S기)가 완료되지 않은 상태에서 세포분열(M기)이진행되어유발된다. 이는 S와 M기 사이의 G2 checkpoint가 완전하게 작동하지 못한 결과이다. 이러한 세포들은 불완전 또는 부적절하게 응축된 염색질의 핵막소실에따른세포질핵분해효소에의하여 DNA 손상을 받게 되고 염색체의 불안전성이 유도된다.[9~11]

저자등은타이로신인산화효소(PTK) 억제제인 non-receptor tyrosine kinase 억제제인 herbimycin A (HMA)와 receptor tyrosine kinase 억제제인 genistein을 이용하여 K562 세포의 방사선에 의한 세포사멸 효과의 변화를 유도한 바 있다.[12] 만성 골수성 백혈병(chronic myeloblastic leukemia, CML)의 blast crisisis 상태에서 분리된 K562 세포는 p210bcr-abl과 p145abl 단백질이 발현된다. K562 세포는 apoptosis에 대한 내성을 지니며,[13] 내성에 있어서 bcr-abl kinase의활성이중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[14~16] CML의 분자적 hallmark인 p210bcr-abl를 세포 유전자 전이에 의한 표현으로 정상세포에비하여방사선에높은저항성을보인다.[13] 저자들은 K562 세포에 대한 대조군으로 acrute myleocytic leukemia (AML)에서 유래된 HL60 세포와 방사선반응을 서로 비교하여 K562 세포의 방사선 내성을 보여 주었다.[12] 또한 본 연구에 사용된 두 가지 PTK 억제제는 K562 세포의 방사선에 대한 세포사망의 형태와 apoptosis 유도에 있어서도 극명한 차이를 나타내었다. 방사선 단독조사에 내성인 양상을 보였으며, 방사선에 의하여 유도되는 세포사망은 oncotic necrosis, cytoplasmic apoptosis 및 mitotic catastrophe를 의심할 수 있는 형태학적인 소견을 보였다. 그러나 HMA는 방사선에 대한 감수성 증가와 방사선에 의한 세포사망을 촉진할 뿐만 아니라, 초기에 유도되는 세포사망은 전형적인 apoptosis에 의한 것이었다. 반면 genistein은 방사선에 의한 세포사망을 모두 감소시켰다. 이와 같은 기존의 실험결과를 바탕으로 본 연구에서는 K562 세포의 방사선 및 PTK 억제제 처리시 세포주기의 분석 및 조절에 대한 조사를 통하여, PTK 억제제에 의한 세포사망 차이의 기전을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

K562 (ATCC CCL 243)는 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL), penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 μg/ml) (Gibco BRL) 그리고 2 mM L-glutamate (Sigma)가 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL) 배양배지를 사용하여 37°C, 5% CO_2가 공급되는 조건에서 배양하였다.

2. 세포의 방사선 조사 및 약물의 처리

모든 실험에 사용된 세포는 2×10^5 cells/ml의비율로준비하여 대수증식기로 성장한 세포를 각각의 실험조건에 따라 처리하여 사용하였다. 방사선 조사는 6-MV X-Ray Machine (Clinac 1,800 C, Varian)을 이용하여 200~300 cGy/ min의 선량율로 상온에서 일정하게 조사하였다. HMA (Calbiochem)와 genistein (Calbiochem)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)에 녹여서 각각 1 mM과 10 mM의 농축용액으로 조제하였으며, 각각 250 nM과 25 μM의 최종농도로 세포 배양액에 직접 처리하였다(IC_{50}).[12]

3. 세포주기의 분석

세포를 회수하여 PBS 1 ml에 재현탁한 다음 가볍게 진탕하면서 95% 에탄올을 1 ml씩 차례로 4회 첨가하고 가볍게 혼합하여 세포를 고정하였다. 고정된 세포를 원심분리하여 에탄올을 제거한 후 propidium iodide 염색액에 재현탁하고 37°C의암소에서 1시간동안반응시켜세포를 염색하였다. 세포주기는 FACScan flow cytometry system (Becton Dickinson)를 사용하여 Modifit software로 분석하였다.

4. Western blotting

세포를 회수하여 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma)가 포함된 1×lysis buffer (0.5% noniodet (NP)-40, 120 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0) 250 μl에서 4°C에서 30분 이상 용해하였다. 상등액을 12,000 g에서 30분간

원심분리하여 취하였으며, Protein Assay Kit (Bio-Rad)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 세포주기조절 단백질의 발현 변화는 각각에 대한 항체를 이용하여 western blotting으로 확인하였다. 동량의 단백질을 포함한 시료를 12% sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)하고, 겔상의 단백질을 PolyScreen polyvinylinene difluoride (PVDF) membrane (NEN Life Science)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 membrane은 blocking 과정, 일차항체[cyclin D1, E, A, B1, CDK2, CDK4, p34cdc2, p16, p21 (Santa Cruz), p53 (Calbiochem), cdc25C (Oncogene Bioscience)] 반응과정, 그리고 이차항체(mouse or rabbit immunoglobulin, horseradish peroxidase-linked whole antibody, Amersham Pharmacia Biotech) 반응과정을 거쳐 Enhanced chemiluminoscence (ECL) system (Amersham Pharmacia Biotech)로 반응시킨 다음 Fujifilm luminescent analysis system (LAS)-1000 Luminescent Image Analyzer로 현상하고 Fujifilm Image Gauge Version 3.11 software를 이용하여 분석하였다.

5. Cyclin-dependent Kinase (CDK) 활성측정(Histone H1 kinase assay)

세포질 단백질 200 μg을 anti-CDK2 또는 anti-p34cdc2 항체와 protein A-sepharose를 이용하여 면역복합체를 형성하였다. Kinase buffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 4 mM $MgCl_2$)로 수 차례 세척한 다음 0.1 μCi [γ-^{32}P] dATP (Amersham)와 2 μg의 histone H1 기질이 포함된 kinase buffer 20 μl를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 시료에 5×SDS-PAGE sample loading buffer를 첨가하고, 95°C에서 5 분간 가열한 다음 12% SDS-PAGE로 전기영동하였다. 겔을 유리판으로부터 조심스럽게 분리하여 겔 건조기(Hoeffer)에서건조시킨후 X-ray 필름(Kodak)으로 -80°C에서 12시간 감광한 후 Fuji FPM 1200 방사능 자동현상기로 현상하였다.

6. Senescence의 측정

세포를 회수하여 cytospin하여 slide glass에 고정시키고, PBS로 1회 세척한 후, 2% paraformaldehyde에 3 ~ 5분간 고정하였다. 고정된 세포를 1 mM $MgCl_2$/PBS 용액으로 2 ~ 10분간 2회세척하고, SA-β-galactosidase 용액[1 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-Gal)/1 ml 40 mM citric acid/sodium phosphate (pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM patassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$]을 첨가하여 37°C에서 4 ~ 12시간 정도 반응하였다. 반응이 끝난 후 슬라이드를 PBS로 세척하고 Giemsa 용액으로 대조염색한 다음, 광학현미경으로 관찰하였다.

7. Magakaryotic differentiation의 측정

세포를 회수하여 차가운 PBS로 2회 세척하고, 2% FBS/PBS로 blocking시킨 후, 5 μl anti-CD61-FITC (BD, Bioscience)를 첨가하여 차가운 얼음에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2% FBS/PBS 1 ml로 3회 세척하였다. FACScan

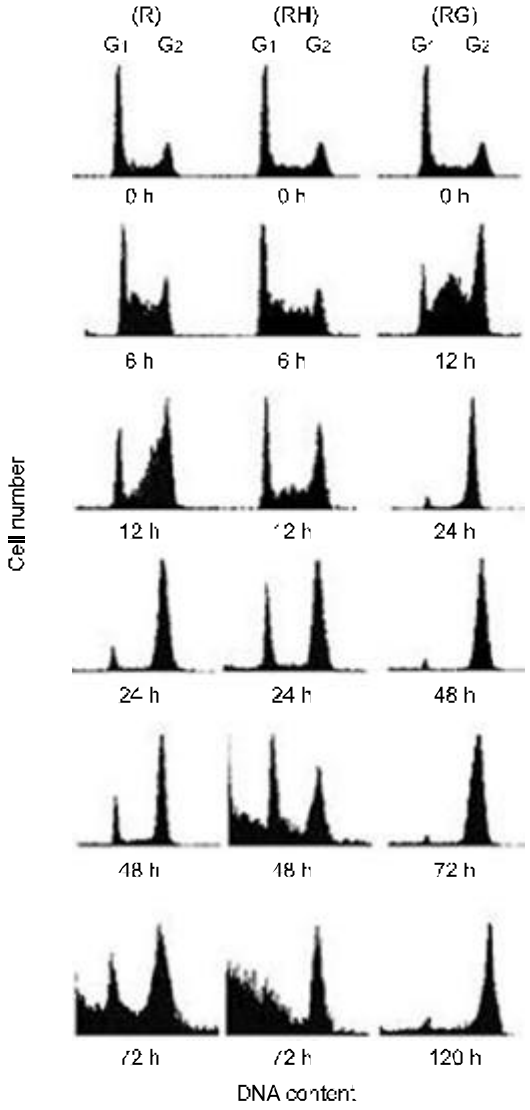

Fig. 1. Cell cycleanalysis ofK562cells.Cellswereexposedto10 GyofX-rays(R)andtreatedwith 250 nM herbimycin A (RH) or 25 μM genistein (RG), and incubated for indicated time. The histogram was obtained by flow cytometric analysis. The results presented are representative of three independent experiments.

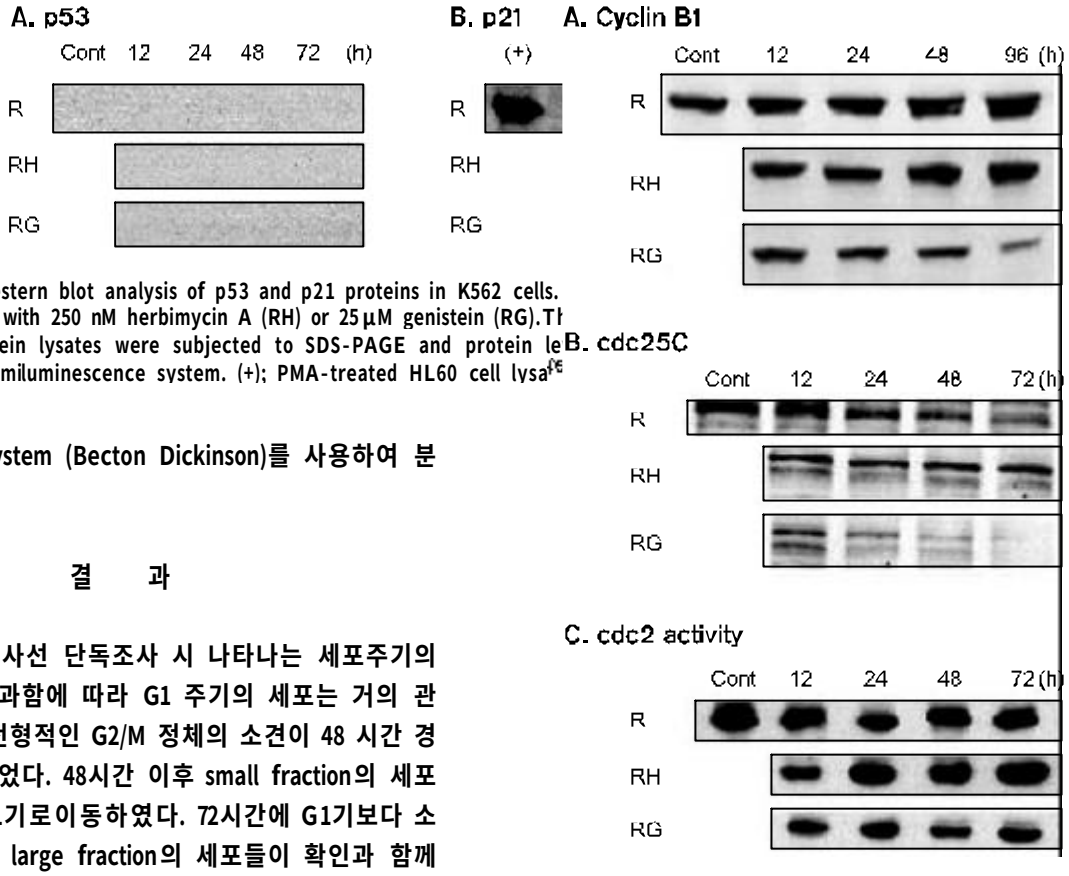

Fig. 2. Western blot analysis of p53 and p21 proteins in K562 cells. ortreated with 250 nM herbimycin A (RH) or 25 μM genistein (RG).Tl time. Protein lysates were subjected to SDS-PAGE and protein le electrochemiluminescence system. (+); PMA-treated HL60 cell lysa

Fig. 3. Western blot analysis of cyclin B1 andcdc25C, andcdc2 kinase activity inK562cells. Cells were irradiated with 10 Gyof X-rays (R), or treated with250nMherbimycinA(RH)or25 μM genistein (RG).Thereactionmixtureswereincubatedforindicated time. Protein lysates were subjected on SDS-PAGE and protein levels of cyclin B1 (A) and cdc25C (B) were detected by electrochemiluminescence system. For analysis of cdc2 kinase activiry, protein lysates were reacted with kinase buffer containing histone H1 substrate, [γ-32P] dATP, and anti-cdc2 antibody, subjected to SDS-PAGE and analyzes by autoradiography (C).

flow cytometry system (Becton Dickinson)를 사용하여 분석하였다.

결 과

K562 세포에 방사선 단독조사 시 나타나는 세포주기의 변화는 시간이 경과함에 따라 G1 주기의 세포는 거의 관찰할 수 없었고, 전형적인 G2/M 정체의 소견이 48 시간 경과 후까지 지속되었다. 48시간 이후 small fraction의 세포들이 G2기에서 G1기로이동하였다. 72시간에 G1기보다 소량의 DNA를 가진 large fraction의 세포들이 확인과 함께 세포주기의 재분포가 이루어졌다. 방사선과 HMA를 병합처리한 경우에는 G1 정체와 함께 G2/M 정체가 우세하게 나타나다가 48시간 경과 후부터 G2/M 정체는 해소되며 세포주기를 재순환하는 양상을 보였다. 반면에, 방사선과 genistein을 함께 투여한 경우에는 G2/M 정체가 120시간 경과 후까지 지속적으로 유지되었다(Fig. 1).

K562 세포는 p53이 발현되지 않는 것으로 이미 알려져 있으며, 본 연구의 western blot 분석 결과에서도 확인되었다(Fig. 2A). 이것은 방사선이나 PTK 저해제 등의 자극에 의해서도 회복되지는 않았다. 또한 p21은 HL60에 PMA를 처리한 positive control에서는 뚜렷한 발현을 관찰할 수 있었으나, K562 세포에서는 모든 조건에서 검출되지 않았다(Fig. 2B).

세포주기의 G2/M기의 조절은 cyclin B/cdc2 복합체에 의하여 이루어진다.[17,18] 방사선 단독 조사 시와 HMA 병합처리 하였을 때 cyclin B1의 발현은 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나, genistein과 병합처리 시 시간경과에 따라 발현이 점점 감소하였다(Fig. 3A). G2기의 정체는 cyclin B/cdc2와

함께 cdc25C의 작용억제에 의하여 유지되며, 이들은 활성화되어 세포질에서 핵으로 이동에 의하여 세포분열기로 진행한다. 본 연구에서 cdc25C의 발현은 방사선 단독조사 시 72시간 이후에 다소 감소하였으며, 방사선과 HMA를 병합처리 시 큰 변화는 없었다. 반면 방사선과 genistein 병합처리 시 발현이 매우 감소하였으며, 72시간 경과 후에는 거의 나타나지 않았다(Fig. 3B). Cdc2의 활성은 방사선 단독 조사 시와 HMA 병합처리 시 초기의 감소에 이어 다시 회복되는 양상을 보였으나(R은 24시간, RH는 12시간), 방사선과 genistein의 병합처리 시에는 지속적으로 감소하였다 (Fig. 3C).

G1 및 S기와 관련된 세포주기 조절인자의 변화를 조사하였다. G1에는 cyclin D/CDK4, G1/S에는 cyclin E/CDK2, 그리고 S기에는 cyclin A/CDK2 복합체가 각각 세포주기조절에 관여한다.[17,18] Cyclin D1의 발현은 모든 조건에서 특별한 변화를 볼 수 없었다(Fig. 4A). Cyclin E의 발현은 모두 시간경과에 따라 감소하였으며(Fig. 4B), Cyclin A의 발현은 HMA와 병합처리 시에 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4C). CDK4, CDK2, cdc2의 발현 변화도 조사하였으나, 예상한 대로 전반적으로 거의 변화가 없었다(data not shown). CDK2의 활성은 방사선 단독조사 시와 genistein 병합처리 시에는 약간 증가하는 양상을 보였으나, HMA과 병합처리 시에는 시간에 따라 감소하였다(Fig. 4D).

p16은 p21과 함께 CDK의 활성을 저해하는 CDI로 잘 알려져 있다. 본 연구에서 p16의 발현은 방사선 조사와 함께 발현되기 시작하였으며, 특히 방사선 조사와 함께 genistein을 병합 처리한 경우에 강한 발현 양상을 나타내었다(Fig. 5). 최근 p16이 p53 및 p21과 더불어 senescence 유도에 관여한다는 보고에 근거하여,[19~21] SA-β-gal 염색을 통하여 senescence를 측정하였다. K562 세포는 방사선 단독조사 시 초기에 급격한 senescence 반응을 보였으나, 세포가 다시 증식하기 시작하는 7일 경에는 거의

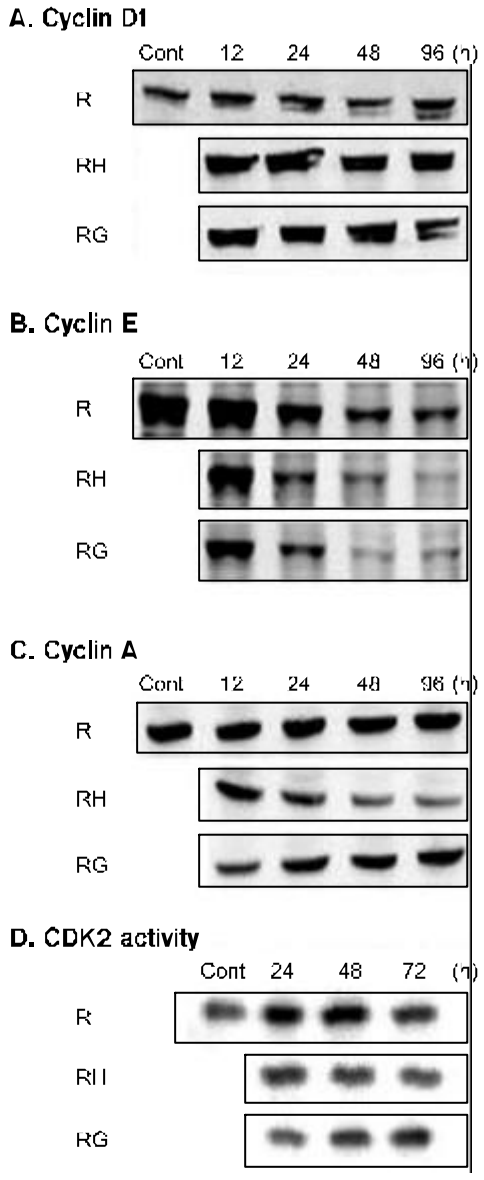

Fig. 4. Western blot analysis of cyclin D1, cyclin E and cyclin A, and CDK2 kinaseactivity in K562 cells.Cellswereirradiatedwith 10 GyofX-rays(R),ortreated with250nMherbimycin A (RH) or 25μM genistein (RG).Thereactionmixtureswereincubated for indicated time. Protein lysates were subjected on SDS-PAGE and proteinlevelsofcyclinD1(A),cyclinE(B)andcyclinA(C)were detected by electrochemiluminescence system. For analysis of CDK2 kinase activiry, protein lysates were reacted with kinase buffer containing histone H1 substrate, [γ-32P] dATP, and anti-CDK2 antibody, subjected to SDS-PAGE and analyzes by autoradiography (D).

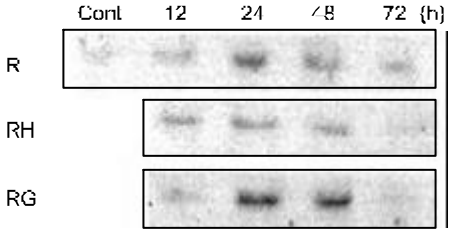

Fig. 5. Western blot analysis p16 in K562 cells. Cells were irradiated with 10 Gy of X-rays (R), or treated with 250 nM herbimycinA(RH)or25 μMgenistein(RG).Thereactionmixtures were incubated for indicated time.Protein lysateswere subjected to SDS-PAGE and protein levels of p16 were detected by electrochemiluminescence system.

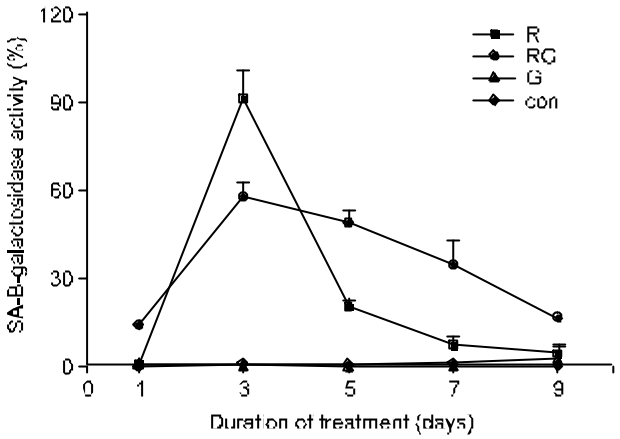

Fig. 6. Senescence of K562 cells. Cells were treated with 25μM of genistein with (RG)orwithout (G) the exposure of 10 Gy of X-rays. The cells were incubated for the indicated time. Cells were stained by SA-β-galactosidase solution at 37°C for 4~12 hours. The results presented are representative of three independent experiments.

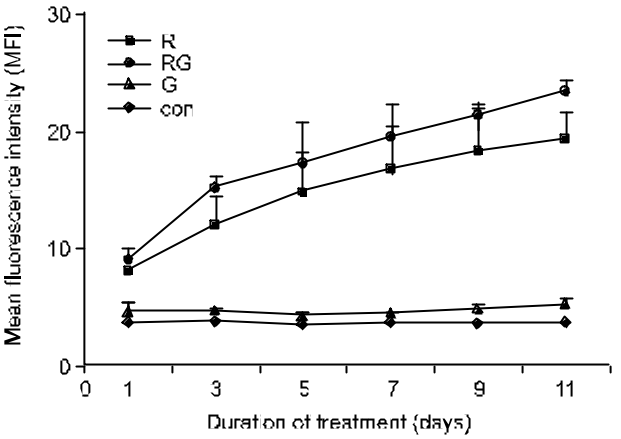

Fig. 7. Megakaryotic differentiation of X-irradiated K562 cells. Cells were treated with 25μM of genistein with (RG) or without (G) theexposure of 10GyofX-rays.Thecells were incubated for the indicatedtime.Cellswereincubated with anti-CD61-FITC antibodyin2%FBS/PBS for1hourandanalyzedbyflowcytometry system. The results presented are representative of three independent experiments.

senescence 반응을 나타내지 않았다. 반면 방사선과 genistein을 병합처리한 경우에는 상당기간 지속적인 반응을 보였으며 세포의 재증식도 관찰할 수 없었다(Fig. 6). 이와 함께 K562 세포의 megakaryotic differentiation 반응도 방사선 단독조사시에 비하여 genistein을 병합처리한 경우에서 증가되어 있는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

고안 및 결론

방사선에 의하여 손상된 DNA 복제 또는 이에 따라 나타나는 세포의 형질변환 등을 방지하기 위하여 세포 자체의 방어기전인 세포주기의 정체가 유도되며, 이들은 복잡한 생화학적 과정이 수반되는 checkpoint를 통하여 조절된다.[22] 정상적인 세포에 방사선을 조사하면 G1 세포주기에서 세포의 성장이 멈추는 현상이 대부분의 경우에서 나타난다.[23,24] 반면 여러 가지 종양세포에서는 방사선 조사이후의 G1 정체를 소실하는 것을 볼 수 있었으며, 이러한 현상과 방사선 내성 사이에 관계가 있음이 시사되었다.[25] 또한 DNA 손상을 유발하는 여러 가지 요인에 의하여 세포주기의 G2 정체가 야기되며, 이는 손상을 복구하도록 허용하는 과정으로 다음의 세포주기를 진행하기 전에 세포를 보호하는 기전으로 알려져 있다.[26~28]

본 연구에서 K562 세포의 세포주기의 변화는 방사선 단독조사 시 시간이 경과함에 따라 전형적인 G2/M 정체가 48 시간 경과 시까지 지속되다가 72시간 경과 후에 세포주기의 재분포가 이루어지는 현상이 관찰되었다. 최근 연구에서 DNA 손상에 의하여 유도된 G2기 정체는 세포내 p53이 존재하고 p21 또는 14-3-3σ을 전사적으로 활성화할 수 있을 때에만계속유지됨이보고되었다.[29,30] 특히 14-3-3σ는 G2/M 조절에 관여하는 cyclin B1/cdc2 복합체를 저해하여 세포주기의 정체를 유지시키며 mitotic catastrophe의 유도를 방해한다.[31] 즉 본 연구에서 방사선 단독조사 시 p53과 p21이 발현되지 않는 상태에서는 G2 checkpoint 유지가 지속되지 않고 M기를 진행하여 72시간에 2n 이하의 DNA 함량과 nuclear fragmentaion을 나타내었으며, 이와 같은 세포에서 14-3-3σ의 발현이 유도되지 못하여 mitotic catastrophe가 발생한 것으로 생각된다. 또한 G2 정체는 cyclin B1/cdc2와 함께 cdc25C의 작용억제에 의하여 유지된다.[32,33] 본 실험에서는 방사선 단독조사 시 cyclin B1의 발현과 cdc2 활성의 회복 및 초기 시간대의 cdc25C 발현 유지 등은 G2 정체가 유지되지 못함을 보여주며, 이는 이전 논문에서 보고한 바[12]와 같이 방사선에 의하여 K562 세포에 유도되는 mitotic catastrophe의 또 다른 증거를 제시한다.[34,35]

반면 방사선과 HMA를 병합처리한 경우에는 G1 정체가 어느 정도 유지되면서 48시간 경과 후부터 G2/M 정체가 해소되며 세포주기를 재순환하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 이전 논문에서 보고한 바[12]와 같이 apoptosis의 유도가 일어나는 시간대와 일치하는 것임을 알 수 있었다.

따라서 K562 세포의 PTK 억제제에 의한 방사선 반응성의 차이는 G2/M 정체의 해소 혹은 G1 정체의 회복과 apoptosis의 유도와의 연관성을 생각할 수 있다. 이와 관련하여 pentoxyfilline[36] 혹은 caffeine[37] 등의 약물은 방사선에 의한 G2 정체 기간을 단축하며 방사선 감수성을 증가시키는 것 등이 알려져 있다. 세포주기 조절단백질과 이들을 조절하는 인자들에 있어서 cyclin D1의 변화는 없었으며, cyclin E와 A의 발현 감소와 CDK2 활성의 감소를 하였다. 이는 방사선과 HMA 병합처리 시에는 p53, p21의 발현이 없음에도 불구하고 G1에서 S로의 진행이 지연되는 후기 G1정체가 유도됨을 보여준다. 즉 p53과 무관하게 작동하는 G1 checkpoint가 형성됨을 시사하며, 이와 apoptosis의 유도와의 상관관계를 제시한다.

방사선과 genistein을 병합처리한 경우에는 G2/M 정체가 120시간 경과 시까지 지속적으로 유지되었다. 이 경우의 cyclin B1의 발현 감소와 cdc2의 활성감소 및 cdc25C의 발현 감소는 G2와 M의 강한 정체현상을 뒷받침해 준다. G2/M 정체와 함께 K562 세포들은 megakaryocyte로의 분화와 지속적인 senescence 현상을 나타내었다. 즉, genistein에 의하여 K562 세포의 방사선에 대한 반응 변화를 유도하는 조절기작이 있는 것으로 생각된다.[38,39] 특히 senescence와 관련하여 cyclin D/CDK4 복합체에 특이적인 제해제로 작용하는 p16의 발현 증가를 관찰할 수 있었다.[19,40]

이상의 실험에서 방사선 단독조사에 의한 K562 세포의 사망반응인 mitotic catastrophe 현상은 불완전한 G2 기의 정체와 G2 정체가 유지되는 동안 cyclin B1의 점진적인 증가 등으로 인하여 염색체의 복제가 완료되지 않은 상태에서 M기로 진행한 결과로 설명된다. 방사선 조사와 함께 HMA를 투여한 경우의 세포사망 촉진과 조기 사망의 apoptosis 양상은 cdc2 kinase 활성 증가에 따른 빠른 G2 정체의 해소와 cyclin E와 A 발현 및 CDK2 활성의 감소 등으로 인한 p53과 무관한 G1기의 세포 축적등으로설명된다. 반면 방사선 조사와 genistein 병합처리의 경우의 세포사망 감소는 cyclin B1과 cdc25C 발현 및 cdc2 활성이 모두 감소하는 등 G2 정체의 지속적 유지에 의한 결과로 유도되는 노화와 megakaryocyte로의 분화 반응이 지속적으로 일어나는 결과로 설명된다. 따라서 본 실험을 통하여 HMA와 genistein에 의한 K562 세포의 방사선 유도 세포사망의 변화는 세포주기 조절과 밀접하게 연관되어 있음을 확인하였다. 이는 다양한 방사선 유도 세포사망의 기전을 이해하는 데 독창적인 모델을 제공하며, 방사선을 이용한 암 치료법의 개발에 새로운 표적을 제공할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. HayflickL,Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961;25:585-621
2. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploidcell strains. Exp Cell Res 1965;37:614-635
3. Morgan DO. Principles of CDK regulation. Nature 1995;374: 131-134
4. PoonRY, BandaraLR,AdamczewskiJP,ZamanianM,HuntT, Thangue NB. Cyclin A recruits p33cdk2 to the cellular transcription factor DRTF1. J Cell Sci Suppl 1992;16:77-85
5. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G_1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 1995;9:1149-1163
6. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulatorsofG$_1$-phaseprogression.Genes Dev 1999;13:1501-1512
7. Carr AM, Hoekstra MF. The cellular response to DNA damage. Trends Cell Biol 1995;5:32-40
8. Maity A, Kao GD, Mushel RJ, Mcknna WG. Potential molecular targets formanipulating the radiation response.International J Rad Biol 1997;37:639-653
9. IanziniF,CherubiniR,Mackey MA. Mitotic catastrophe induced by exposure of V79 Chinese hamster cells to low energy protons. Int J Radiat Biol 1999;75:717-723
10. Ianzini F, Mackey MA. Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. Mutagenesis 1998;13:337-344
11. Ianzini F, Mackey MA. Spontaneous premature chromosome condensation andmitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. Int J Radiat Biol 1997;72:409-421
12. Jeong SJ, Jin YH, Moon CW, et al. Protein tyrosine kinase inhibitors modulate radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in K562 cells. Radiat Res 2001;156:751-760
13. McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TG. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. Blood 1994;83:1179-1187
14. Amarante-MendesGP,NaekyungKC,Liu L,etal. Bcr- Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockageofmitochondrial release ofcytochrome C and activation ofcaspase-3. Blood 1998;91:1700-1705
15. DeoraAB,MirandaMB,RaoSG. Down-modulation of P210bcr/abl inducesapoptosis/differentiationinK562leukemicblastcells. Tumori 1997;83:756-761
16. Gambacorti-PasseriniC,leCoutreP,MologniL,etal. Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+leukemic cells and induces apoptosis. Blood Cells Mol Dis 1997;23:380-394
17. Murakami H, Nurse P. Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. Genes Dev 1999;13:2581-2593

18. Hall M, Peters G. Geneticalterations ofcyclins,cyclin-dependent kinases,and Cdk inhibitors in humancancer.AdvCancerRes 1996;68:67-108
19. Hirobumi M, Akikazu A, Yoshiho N, et al. Complex mechanism underlying impaired activationofcdk4andcdk2inreplicative senescence: roles of p16, p21, and cyclin D1. Exp Cell Res 1999;253:503-510
20. Igor BR,Eugenia VB, Bey-Dih C. If nor apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumorcell.Drug Resistance Updates 2001;4:303-313
21. Charanjit S, Donna MP, Joyce S. p16INK4A mediates cyclin dependent kinase 4 and 6 inhibition in senescent prostatic epithelial cells. Canser Research 2000;60:2616-2622
22. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 1993;362:847-849
23. YuranZM,HuangY,WhangY,etal. Roleforc-Abltyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage. Nature 1996; 382:272-274
24. AgarwalML, Agarwal A,TaylorWR,StarkGR. p53control both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversiblegrowtharrestinhumanfibroblast. ProcNatlAcad Sci USA 1995;92:8493-8497
25. Lotem J, Sachs L. Haematopoitic cells from mice deficient in wild-type p53aremoreresistanttoinduction ofapoptosisby some agents. Blood1993;82:1092-1096
26. McIlwrath AJ, Vasey PA, Ross GM, Brown R. Cell cycle arrests and radiosensitivityofhumantumorcelllines:Dependence on wild-type p53 for radiosensitivity. Cancer Res 1994; 54:3718-3722
27. Tobey RA. Different drugs arrest cells at a number ofdistinct stages in G2. Nature 1975;254:245-247
28. Palayoor ST, MacklisRM,BumpEA,ColemanCN. Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. Radiat Res 1995;141:235-243
29. BunzF,DutriauxA,Lengauer C, etal. Requirement forp53and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science 1998;282:1497-1501
30. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al. 14-3-3σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M. Mol Cell 1997;1:3-11
31. Chan TA. Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3sigma is required to prevent mitotic catastropheafter DNA damage. Nature 1999;401:616-620
32.BussePM,BoseSK,JonesRW,TolmachLJ. The action ofcaffeine on X-irradiated HeLa cells. Enhancement of X-ray induced killing during G2 arrest. Radiat Res 1978;76:292-307
33. Kumagai A, Yakowee PS, Dunphy WG. 14-3-3 protein act as negative regulators of themitotic inducercdc25 in Xenopus egg extract. Mol Biol Cell 1998;9:345-354
34. Stuschke M, Sak A, Wurm R,etal. Radiation-inducedapoptosis in human non-small-cell cancer cell line is secondary to cell-cycle progression beyondtheG2-phasecheckpoint.IntJ Radiat Biol 2002;78:807-819
35. Igor BR, Eugenia VB, Bey-Dih C. If nor apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cell. Drug Resistance Updates 2001;4:303-313
36. Kim SH, Khil MS, Ryu S, Kim JH. Enhancement of radiation response on human carcinoma cells in culture by pentoxyfilline. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1993;25:61-65
37.BussePM,BoseSK,JonesRW.TolmachLJ. The action ofcaffeine on X-irradiated HeLa cells. Enhancement of X-ray induced killing during G2 arrest. Radiat Res 1978;76:292-307
38.ChangBD,BroudeEV,Dokmanovic M, etal. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. Cancer Res 1999;59:3761-3767
39. Sato N,MizunotoK,NakamuraM,TanakaM. Radiation-induced centrosome overduplication and multiple mitotic spindles in human tumor cells. Exp Cell Res 2000;255:321-326
40. Robles SJ, Adami GR. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblast. Oncogene 1998;16:1113-1123

대한방사선종양학회지 2003;21(4):306 ~ 314

Abstract

Regulatory Mechanism of Radiation-induced Cancer Cell Death by the Change of Cell Cycle

Soo-Jin Jeong, Ph.D.[†], Min-Ho Jeong, M.D.[†], Ji-Yeon Jang, B.S.[†], Wol-Soon Jo, B.S.[†], Byung-Hyouk Nam, B.S.[†], Min-Za Jeong, M.D.[†], Young-Jin Lim, M.D.[†], Byung Gon Jang, M.D.*, Seon-Min Youn, M.D.*, Hyung Sik Lee, M.D.*, Won Joo Hur, M.D.* and Kwang Mo Yang, M.D.[‡]

*Department of Radiation Oncology, [†]The Institute of Medical Science, Dong-A University Hospital, College of Medicine, Pusan, Korea, [‡]Department of Radiation Oncology, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul, Korea

Purpose: In our previous study, we have shown the main cell death pattern induced by irradiation or protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors in K562 human myelogenous leukemic cell line. Death of the cells treated with irradiation alone was characterized by mitotic catastrophe and typical radiation-induced apoptosis was accelerated by herbimycin A (HMA). Both types of cell death were inhibited by genistein. In this study, we investigated the effects of HMA and genistein on cell cycle regulation and its correlation with the alterations of radiation-induced cell death.

Materials and Methods: K562 cells in exponential growth phase were used for this study. The cells were irradiated with 10 Gy using 6 MeV Linac (200-300 cGy/min). Immediately after irradiation, cells were treated with 250 nM of HMA or 25 μM of genistein. The distributions of cell cycle, the expressions of cell cycle-related protein, the activities of cyclin-dependent kinase, and the yield of senescence and differentiation were analyzed.

Results: X-irradiated cells were arrested in the G2 phase of the cell cycle but unlike the p53-positive cells, they were not able to sustain the cell cycle arrest. An accumulation of cells in G2 phase of first cell-cycle post-treatment and an increase of cyclin B1 were correlated with spontaneous, premature, chromosome condensation and mitotic catastrophe. HMA induced rapid G2 checkpoint abrogation and concomitant p53-independent G1 accumulation. HMA-induced cell cycle modifications correlated with the increase of cdc2 kinase activity, the decrease of the expressions of cyclins E and A and of CDK2 kinase activity, and the enhancement of radiation-induced apoptosis. Genistein maintained cells that were arrested in the G2-phase, decreased the expressions of cyclin B1 and cdc25C and cdc2 kinase activity, increased the expression of p16, and sustained senescence and megakaryocytic differentiation.

Conclusion: The effects of HMA and genistein on the radiation-induced cell death of K562 cells were closely related to the cell cycle regulatory activities. In this study, we represent a unique and reproducible model in which for investigating the mechanisms of various, radiation-induced, cancer cell death patterns. Further evaluation by using this model will provide a potent target for a new strategy of radiotherapy.

Key Words: Radiation-induced cell death, Cell cycle, Senescence, Differentiation, Herbimycin A, Genistein