

인체세포주 A431에서 방사선 조사 후 DNA수선 유전자 발현과 세포고사와의 관계에 관한 연구

전남대학교 의과대학 핵의학교실,¹ 전남대학교 의과연구소,² 동강대학교 피부미용과,³ 전남대학교 치과대학 약리학교실⁴
범희승^{1,2} · 민정준¹ · 최근희³ · 김경근⁴

Relationship between Radiation Induced Activation of DNA Repair Genes and Radiation Induced Apoptosis in Human Cell Line A431

Hee-Seung Bom, M.D.,^{1,2} Jung-Jun Min, M.D.,¹ Keun-Hee Choi, PhD.,³ Kyung Keun Kim, M.D.⁴

Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School,¹

Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences,²

Department of Cosmetology, Dong Kang College,³

Department of Pharmacology, Chonnam National University College of Dentistry,⁴ Kwangju, Korea

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the relationship between radiation-induced activation of DNA repair genes and radiation induced apoptosis in A431 cell line. **Materials and Methods:** Five and 25 Gys of gamma radiation were given to A431 cells by a Cs-137 cell irradiator. Apoptosis was evaluated by flow cytometry using annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide staining. The expression of DNA repair genes was evaluated by both Northern and Western blot analyses. **Results:** The number of apoptotic cells increased with the increased radiation dose. It increased most significantly at 12 hours after irradiation. Expression of *p53*, *p21*, and *hRAD50* reached the highest level at 12 hours after 5 Gy irradiation. In response to 25 Gy irradiation, *hRAD50* and *p21* were expressed maximally at 12 hours, but *p53* and *GADD45* genes showed the highest expression level after 12 hours. **Conclusion:** Induction of apoptosis and DNA repair by ionizing radiation were closely correlated. The peak time of inducing apoptosis and DNA repair was 12 hours in this study model. *hRAD50*, a recently discovered DNA repair gene, was also associated with radiation-induced apoptosis. (**Korean J Nucl Med 2000;34: 144-153**)

Key Words: radiation, apoptosis, DNA repair genes

Corresponding Author: Hee-Seung Bom, M.D., Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hospital, 8 Hakdong, Kwangju 501-757, Korea
Tel: +82-62-220-5641 Fax: +82-62-232-0232
e-mail: hsbom@chonnam.ac.kr

*이 연구는 1998년도 과학기술부 원자력 기초연구의 지원에 의한 결과임.

서 론

세포고사 현상은 1972년 병리학자 Kerr¹⁾ 등이 지금까지 세포사의 전형으로 알려져 온 괴사와는 다른 형태학적으로 특징적인 변화를 나타내는 세포

사가 있다는 사실을 발표하고 'apoptosis'라고 명명한 후 현재까지 활발하게 연구되고 있다. 세포고사는 생체내에서 태생학적 발생과정, 면역계와 신경계의 발달, 정상세포의 분화 등과 같은 생리적 상태에서 관찰될 수 있고, 약물과 호르몬, cytokines, 열, 방사선 등 외부의 자극에 의한 세포 손상이나 종양 세포의 퇴행과 같은 병리적 상태에서 흔히 관찰되는 세포사의 한 형태로 그 본질은 개체유지에 불필요한 세포나 위험세포가 사망하도록 프로그래밍된 기전으로 알려져 있다.²⁾ 최근에는 암세포의 발생과정,³⁾ 약제⁴⁾나 방사선에 의한 살암세포과정⁵⁻⁶⁾ 및 분화유도과정에 깊은 관련성이 보고되어 암치료의 측면에서도 대단히 주목되고 있다.⁷⁻⁸⁾

세포고사의 초기 단계에 세포막의 2중 지질구조 중 세포 안쪽에 위치하는 phosphatidyl serine이 세포 밖으로 뒤집어져 나오는데,⁹⁾ 칼슘 존재 하에서 음이온을 띤 지질단백에 선택적으로 결합하는 annexin 단백질 중 annexin V가 특히 phosphatidyl serine과 선택적으로 결합한다는 사실이 밝혀졌으며,¹⁰⁾ annexin V에 형광을 내는 물질인 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 결합시키면 고사세포의 세포막에 붙어 형광을 내므로 유세포계측기(flow cytometer)에 의해 정량적으로 측정할 수 있게 된다. 세포핵의 손상은 propidium iodide (PI)를 이용한 유세포계측으로 알아 볼 수 있으므로 이상의 두 가지 형광물질을 이용하여 세포막과 세포핵의 변화를 동시에 검사하여 세포고사를 연구하는 것이 가능해졌다.¹¹⁻¹²⁾

세포고사의 유도인자로는 TNF- α (tumor necrosis factor), Fas리간드, glucocorticoid, 바이러스, prostaglandin E2, 항암제, 방사선, 열 등이 있다.¹³⁾ 방사선 조사에 의해 DNA에 손상을 받은 경우 이 손상에 대한 수선과정으로 p53 유전자의 발현이 유도되고, p53은 다른 유전자들을 조절하여 DNA 수선에 관여하며, 이 수선과정이 세포고사와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다.¹⁴⁾ p53 유전자에 의해 활성화되는 것으로 알려진 유전자로는 GADD45(Growth-Arrest- and DNA-Damage- inducible)와 p21 유전자를 들 수 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾ GADD45의 경우 인트론(intron)에 p53에 특이성이 있는 결합부

위가 있어서 p53에 의해 유도되는 DNA 수선유전자이고,¹⁵⁾ p21의 기저지 발현이나 방사선에 의해 유도되는 발현의 정도는 p53의 활성과 매우 밀접한 관계가 있다.¹⁹⁾ p53이 세포주기 억제제 세포고사에 작용한다는 사실은 이미 잘 알려져 있는 사실이고, p21 역시 p53에 의해 매개되어 세포고사에 작용하는 것으로 알려져 있으며, GADD45 유전자와의 관련성도 일부 알려져 있다.²⁰⁾ 최근 발견된 hRAD50 유전자의 경우 방사선에 의한 DNA 손상의 수선에 관련된다는 보고가 있었으나,²¹⁾ p53 유전자 및 세포고사와 어떤 관계를 가지고 있는지는 아직 알려지지 않았다.

본 연구에서는 피부세포인 A431세포주에서 방사선 조사에 의한 세포고사가 방사선량과 방사선 조사 후 경과시간에 따라서 어떻게 변하는지를 밝혀보고, 방사선에 의해 유도된 DNA 수선유전자의 발현을 방사선량별, 조사 후 시간경과별로 분석하여 세포고사와 어떤 관계를 가지고 있는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

한국세포주은행(Korea Cell Line Bank: KCLB)으로부터 분양받은 피부상피암 세포의 일종인 A431을 tissue culture flask(T25 cm², Nunc, Roskilde, Denmark)에 넣고 10% 우태아 혈청이 첨가된 성장배지(growth medium, Dulbecco's modified eagle medium: DMEM, GibcoBRL, New York, USA) 5 ml을 채운 다음 37°C, 5% CO₂ incubater에서 배양하였다. 배지는 1주일에 2회 교체하였고, 세포가 배양용기에 약 80%를 차지 할 정도로 자랐을 때 계대배양을 시행하였다.

2. 방사선 조사

방사선 조사는 Cs-137 세포조사기(Gammacell 3000 Elan, Nordion, Ontario, Canada)를 이용하였고, 감마선(central dose rate = 529 Gy/h)을 각각 5 Gy, 25 Gy씩 조사하였다.

3. 세포수확

대조군으로 방사선을 조사하지 않은 세포와 5 Gy와 25 Gy의 감마선을 조사한 세포를 각각 4, 12, 48시간이 지난 다음 0.25% trypsin을 처리하고 약 10분 후에 세포를 떼어내어 15 ml 원심관에 옮겨 1,200 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다.

4. 유세포분석기를 이용한 세포고사의 관찰

추출한 세포($10^5 \sim 10^6$ cell/ml)를 2 ml의 시험관에 옮기고 여기에 인산완충식염수(PBS, Sigma, St. Louis, USA) 500 μ l로 세포를 단일세포 부유액상태를 유지한 다음 annexin V-FITC kit (Trevigen, Gaithersburg, USA)를 사용하여 형광염색을 하였다. 즉, media binding agent 10 μ l, annexin V-FITC 배양액 1.25 μ l를 섞은 후 실온, 차광상태에서 15분간 배양한 다음, 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 배양액을 제거하고 결합완충액 500 μ l로 부유시킨 후 PI 10 μ l를 첨가하고 1시간 이내에 유세포계측기로 측정하였다.

Annexin V에만 염색된 세포를 고사세포로 간주하고 각 세포군에서 관찰된 고사세포의 비율 ($100 \times (\text{고사세포}/\text{전체 세포})$)을 구하여 5 Gy와 25 Gy 조사군에서 방사선 조사 후 4시간, 12시간, 48시간이 경과하였을 때의 변화를 관찰하였다.

5. RNA 제작 및 Northern Blot 분석

대조군, 5 Gy 또는 25 Gy 조사 후 4, 12, 48시간 후에 수확한 각각의 세포들을 PBS로 두 차례 세척한 다음 -70℃에 보관하였다. 각각의 세포들을 얼음 위에서 녹인 후에 1% β -mercaptoethanol이 첨가된 4M guanidium thiocyanate 2~3 ml에 넣고 polytron으로 세포파쇄한 다음 4℃ 10,000 rpm에서 5분간 원침시켰다. 상층액을 1 ml의 cesium pad solution (5.7M CsCl) 위에 덮어씌우고 40,000 rpm 20℃에서 8시간 이상 초원심 분리하였다. 원침 후 튜브 바닥부분을 절단하고 바닥에 붙어있는 RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPS) 처리된 물로 용해한 다음 에타놀 침전 후 260 nm에서 분광광도계로 정량하였다.

Northern 분석의 경우 10 μ g의 total RNA에 2배 용적의 glyoxal을 넣어 56℃에서 20분간 변성시킨 다음 1.0% agarose gel에 3시간 전기영동하고 Genescreen (DuPont, Wilmington, USA)에 하루 동안 이동하였다. Probe는 Nick translation kit (Boeringer Mannheim, Indianapolis, USA)를 이용하여 제조하였으며 보통 $2 \sim 3 \times 10^9$ dpm/ μ g 정도의 비방사능을 얻었다. 하이브리드 형성은 65℃에서 $4 \times \text{SSC}$, $2 \times \text{Denhardt's}$ 0.1% SDS와 500 μ g/ml salmon sperm DNA 용액에 20시간 정도 처리하였고, 세척은 65℃에서 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 용액으로 1시간 시행하였다. 이어 강화 스크린이 있는 카세트에 필름과 함께 넣고 -70℃에서 수일간 보관한 후 현상하였다. RNA 시료의 무결성은 하이브리드 형성 직전에 암실에서 단파 자외선을 genescreen paper에 비추어 확인하였다.

Northern blot 분석은 각 유전자의 RNA별로 5차례 이상씩 시행하였다. 정량적 분석은 Bioanalysis system 3000 (BAS 3000, Fuji, Tokyo, Japan)의 영상분석 소프트웨어인 Image Gauge를 이용하여 발현된 각각의 유전자의 밀도를 측정하고, 18S rRNA의 밀도에 대한 비율을 구하여 그 평균치로 방사선량별, 방사선 조사 후 시간경과별 변화를 관찰하였다.

6. 단백질 제작 및 Western blot 분석

대조군, 5 Gy 또는 25 Gy 조사 후 4, 12, 48시간 후에 수확한 각각의 세포들을 Nonidet p-40 완충용액(150 mM, NaCl, benzamidine 1 mM, 50 mM Tris, pH 8.0, Trypsin inhibitor, 5 mM EDTA, pH 8.0, Trypsin inhibitor 1 μ g/ml, 5 mM EDTA, pH 8.0, PMSF 1 mM, NP-40 1%)에 넣고 얼음 속에서 유리 분쇄기를 이용, 세포를 파쇄한 다음 10분간 얼음속에 방치하였다. 14,000 rpm으로 15분간 원침시켜 상층액을 분리한 다음 소량의 분취량으로 나누어 -70℃에 보관하였다. 단백질 농도의 측정에는 Pierce kit를 이용하였다. 상층액 1 μ l를 발색시켜 Pierce bovine serum albumin을 기준으로 해서 분광광도계로 농도를 측정하였다. 10% polyacrylamide gel에 각 레인당 100 μ g의 단백을 전기영동

한 다음 Towin 완충용액(25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, 20% methanol)을 이용하여 단백을 니트로셀룰로스 막에 4°C에서 20 mA로 12시간 이상 이동시켰다. 이동된 니트로셀룰로스 막은 차단 완충용액(5% nonfat drymilk, 1% ISSA 0.02% sodium azide in TBS)으로 2시간 동안 실온에서 처리한 다음 TBST 완충용액(20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween 20)으로 3번 씻고 각각의 1차 항체(Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) 7.5 μ l를 포함하는 항체희석용액(1% BSA, 0.02% sodium azide in TBST) 15 ml (1:2000)에 1시간 실온에서 처리하였다. 다시 TBST 완충용액으로 3번 씻고 P53, P21, GADD45는 anti-mouse IgG antibody (Sigma, St. Louis, USA), hRAD50은 anti-rabbit IgG antibody (Sigma, St. Louis, USA)가 함유된 항체희석용액에서 1시간 처리하였다. 다시 TBST로 3번 씻고 인 ECL 용액으로 감광시킨 후 암실에서 인화하였다.

Western blot 분석은 각 단백질별로 5차례 이상씩 시행하였다. 정량적 분석은 Bioanalysis system 3000(BAS 3000, Fuji, Tokyo, Japan)의 영상분석 소프트웨어인 Image Gauge를 이용하여 발현된

각각의 단백질의 밀도를 측정하고 그 평균치로 방사선량별, 방사선 조사 후 시간경과별 변화를 관찰하였다.

8. 통계 분석

각 실험군 간의 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 다변량분산분석(MANOVA test)에 의해 검정하였으며, p값 0.05 미만을 유의한 수준으로 판정하였다.

결 과

1. 방사선 조사 후 선량 및 시간에 따른 세포 고사(Fig. 1, Table 1)

5 Gy와 25 Gy의 방사선을 조사한 군 모두에서 조사 후 12시간째에 고사세포가 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$), 이후 48시간째는 큰 변화를 보이지 않았다. 5 Gy를 조사한 군에 비하여 25 Gy를 조사한 군에서 높은 비율로 세포고사가 나타났는데, 방사선 조사 12시간과 48시간 측정치에서 유의한 차이가 있었다($p < 0.05$).

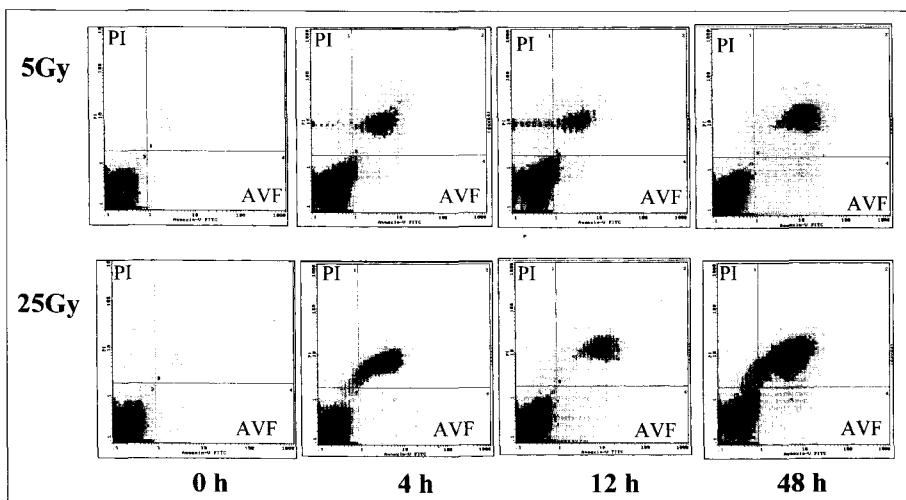


Fig. 1. Flow cytometric analysis of A431 cells after irradiation according to dose and time course. Percent of apoptotic cells increased as radiation dose increased. It increased most significantly at 12 hours after irradiation. AVF: annexin V-FITC, PI: propidium iodide

Table 1. Percent of apoptic cells to total cells after gamma irradiation according to dose and time in A431 cells

After irradiation	Time Dose		
	0 Gy	5 Gy	25 Gy
0 hour	0.4±0.3	7.2±2.1	9.6±3.7
4 hour	0.5±0.3	8.3±1.3	8.6±2.5
12 hour	0.7±0.4	19.6±7.8*	32.1±8.5*, †
48 hour	1.1±0.4	25.6±9.2	29.8±8.8 †

*p < 0.01 as compared with 4 hour data

†p < 0.05 as compared with 5 Gy data

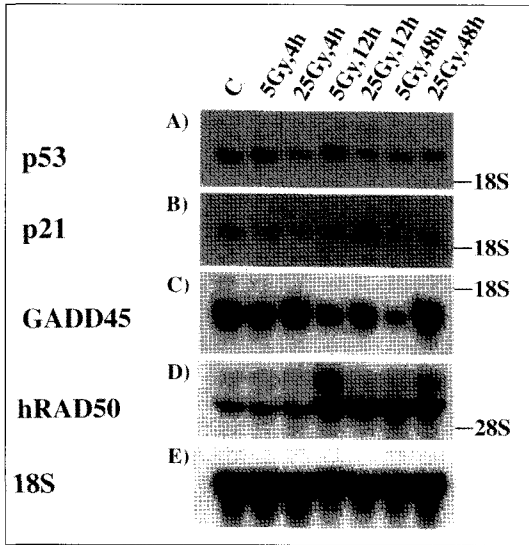


Fig. 2. Northern blot analysis of several cell cycle regulatory gene expression according to the radiation dose and time course in A431 cells. Parallel blots with total RNA from A431 cells in different stages were examined. The radiolabeled cDNA probes used for each blot were: *p53* (panel A), *p21* (panel B), *GADD45* (panel C) and *hRAD50* (panel D). Blots were also probed with a radiolabeled oligonucleotide complementary to mouse 18s rRNA (panel E) to confirm the integrity and quantity of the samples. The positions of the 18S and 28S ribosomal RNA bands are indicated on the right side. C: control.

2. 방사선 조사 후 선량 및 시간에 따른 DNA 수선유전자 발현(Fig. 2-4)

5 Gy 조사군에서 *p53*, *p21*, *hRAD 50* 유전자는 12시간째에 가장 높은 발현을 보였다가 이후 감소하였고, *GADD45* 유전자는 점차 감소하였다. 25 Gy 조사군에서는 *p53*은 48시간째에 가장 증가하였

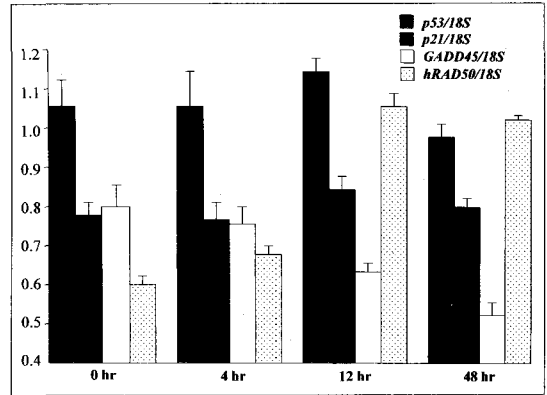


Fig. 3. Quantification of mRNA levels after 5 Gy irradiation by densitometric analysis of the autoradiogram shown in Fig. 2. Relative mRNA levels are the ratios at each time of the mRNA level of DNA repair genes to the mouse 18S rRNA level according to time passage after irradiation.

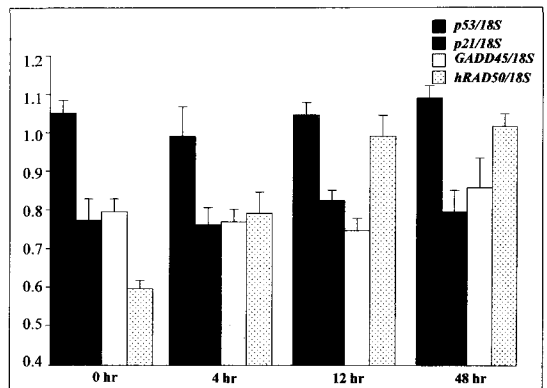


Fig. 4. Quantification of mRNA levels after 25 Gy irradiation by densitometric analysis of the autoradiogram shown in Fig. 2. Relative mRNA levels are the ratios at each time of the mRNA level of DNA repair genes to the mouse 18S rRNA level according to time passage after irradiation.

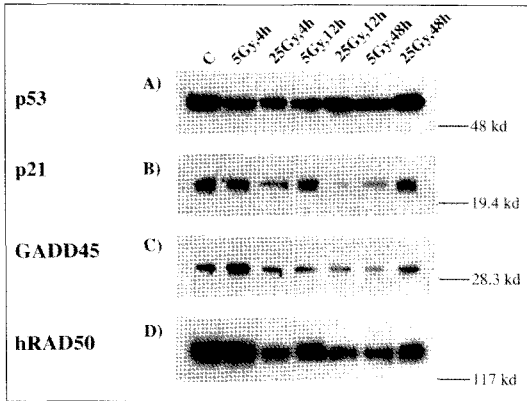


Fig. 5. Western blot analysis of several cell cycle regulatory protein expression according to the radiation dose and time course in A431 cells. Parallel blots with total protein from A431 cells in different stages were examined. The radiolafluorescent antibodies used for each blot were: p53 (panel A), p21 (panel B), GADD45 (panel C) and hRAD50 (panel D).

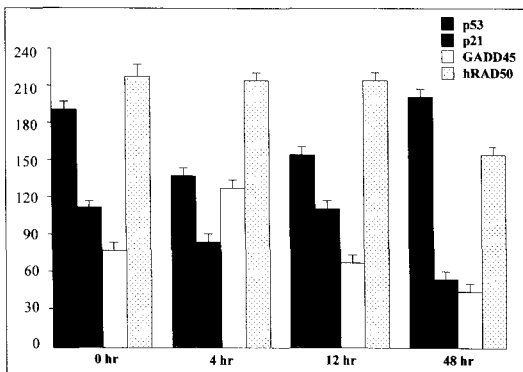


Fig 6. Quantification of protein levels after 5 Gy irradiation by densitometric analysis of the autoradiogram shown in Fig. 5. Relative protein levels are those of each DNA repair genes according to time passage after irradiation

고, p21이 12시간에 가장 증가하다가 48시간째 다시 감소하였으나, hRAD50은 12시간에 가장 현저한 발현증가를 보이고 48시간까지 점차 증가하였다. GADD45는 12시간까지 감소하였다가 48시간째 약간 증가하였다.

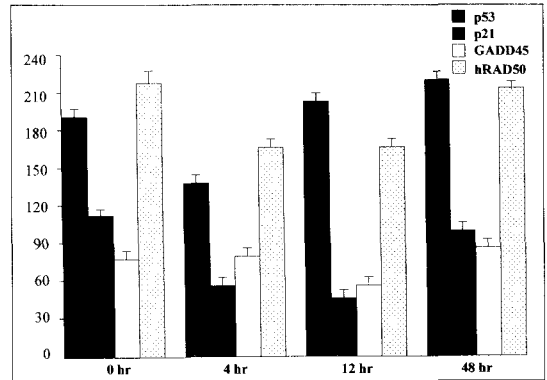


Fig 7. Quantification of protein levels after 25 Gy irradiation by densitometric analysis of the autoradiogram shown in Fig. 5. Relative protein levels are those of each DNA repair genes according to time passage after irradiation.

3. 방사선 조사 후 선량 및 시간에 따른 DNA 수선유전자 단백질의 발현(Fig. 5-7)

5 Gy 조사군에서 p21, hRAD50은 12시간째에 증가하였다가 이후 감소하였고 p53은 48시간까지 계속 증가하였으며, GADD45는 점차 감소하는 추세를 보였다. 25 Gy 조사군에서는 p53, p21, GADD45, hRAD50 등 모든 단백질이 일단 감소하였다가 48시간에 다시 증가하였다.

고 찰

본 논문은 피부상피암 세포주의 일종인 A431세포가 감마선에 조사되었을 때 세포고사에 빠지고, 특히 방사선 조사 12시간 후에 가장 현저해지며, 이 시간에 DNA수선 유전자인 p53, p21, GADD45 및 hRAD50 유전자의 발현도 가장 현저하여 세포고사와 DNA수선 유전자의 발현이 상관관계가 있음을 밝혔다.

본 실험실에서는 A431에서 방사선에 의해 유도되는 세포사를 분염법, 형광현미경에 의한 고사세포 관찰, 세포배양액의 젖산탈수소효소 활성도 측정, DNA ladder 관찰 등을 통해 관찰한 결과 방사선에 의한 세포사는 주로 세포고사를 통해 일어난

다는 사실을 알 수 있었고, 방사선 조사 12시간 후에 가장 현저해짐을 보고한 바 있다.²²⁾ 이번 연구에서 본 연구자들은 세포고사를 관찰하는 방법으로 유세포계측기를 사용하였다. 유세포계측기를 이용한 분석법은 최근 사용이 증가하는 방법이고 세포고사를 정량화할 수 있는 간편한 방법이다. 세포고사에 의해 죽어가는 세포는 대식세포에 잡아 먹히게 되는데, 최근 고사세포를 탐식하는 대식세포가 고사세포를 알아내는 기전이 세포막의 변화, 즉, 세포막의 이중 지질구조 중 안쪽에 위치하는 phosphatidyl serine이 밖으로 뒤집어져 나오는 것을 인식한다고 보고되었다.¹²⁾ 이를 이용하여 세포고사를 정량적으로 진단할 수 있는 방법이 고안되었는데, phosphatidyl serine에 annexin V가 결합하는 것을 이용하여 annexin V에 형광물질인 FITC를 붙이는 것이다. 이와 함께 세포핵에 결합하는 PI를 동시에 사용하면 세포막의 변화와 세포핵의 손상을 함께 정량적으로 측정할 수 있어 세포고사의 진행 상황을 알 수 있다. 본 연구에서는 5 Gy 조사 후 12시간 경과 후에 고사세포가 유의하게 증가하였다가 48시간까지는 큰 변화가 없었으나, 25 Gy 조사 후에는 48시간째에 약간 감소하는 양상을 보였다. 또한 48시간까지 고사세포의 비율은 30% 안팎으로 이전 연구²²⁾에 비해 비교적 낮은 점이 다소 다른 양상인데 25 Gy 조사 후 48시간째에는 괴사세포에 포함되어 있을 것으로 사료되고, 또한 유착능력이 강한 피부상피암 세포를 단일세포로 분리하기가 어려워, 특히 고선량의 방사선에 노출된 후 시간이 오래 경과할수록 오차의 범위가 넓어질 수 있을 것으로 사료된다.

세포주기의 초기, 즉 G₁기에 DNA에 손상이 오는 경우 p53 유전자가 발현되어 checkpoint를 활성화시키므로써 G₁기 정지를 일으켜 세포주기의 진행을 막는다.^{14,20)} 이 G₁기 checkpoint에 대한 작용은 또다른 유전자인 p21을 통하여 이루어지는데, p21은 손상된 DNA가 회복될 때까지 세포가 S기로 진행되는 것을 막는다. 그러나 손상받은 세포가 회복되기 이전에 S기로 진행한 경우 p53은 세포고사를 유발하는 것으로 알려져있다. GADD45는 intron에 p53에 특이성이 있는 결합부위가 있어서 p53에 의

해 유도되는 DNA 수선유전자이고, 최근 알려진 DNA 수선유전자로 hRAD50이 있다. 본 연구자들은 세포고사가 가장 현저해지는 방사선조사 후 12시간째에 이들 DNA 수선유전자의 발현도 증가하는 것으로 보아서 세포고사와 DNA 수선유전자 사이에 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

5 Gy 조사 후에는 p53, p21, hRAD50 유전자가 12시간째에 증가하였고, 이들 유전자의 단백질 역시 12시간 또는 그 이후에 발현을 보여 세포고사와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되었다. p53은 방사선 조사 후 1~2시간 이내에 증가하여 48~72시간이면 정상화되는 것으로 알려져 있는데,¹⁴⁾ 본 연구에서도 방사선 조사 후 12시간째에 가장 증가하였다가 48시간째에 감소하였다. GADD45의 경우 방사선 조사 후 지속적인 감소추세를 보였다. Papathanasiou 등²³⁾은 GADD45 mRNA는 2 Gy의 방사선을 조사하였을 때 수시간만에 3배 이상 증가하였음을 보고하였고, Kastan 등¹⁶⁾은 20 Gy 조사 4시간 후에 2배에서 10배까지 증가하고, p53에 의존하여 발현되며 세포마다 기능적인 p53의 활성도 다르므로 세포에 따라 다소 차이가 있는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 사용된 A431세포에서의 p53 유전자의 기능성에 관한 연구가 없는 실정으므로 GADD45의 발현이 시간이 지남에 따라 감소하는 것은 A431세포의 특성에 관한 문제인 것으로 추정되고 추후 더 많은 연구를 통하여 밝혀져야 할 문제로 사료된다.

25 Gy 조사의 경우 hRAD50과 p21이 12시간에 증가하여 세포고사와 관련이 있음을 보였고 p53과 GADD45는 12시간까지 별 변화가 없었으나 이후 증가하여 48시간에 가장 증가하였다. 이 유전자의 단백질들의 발현결과를 보면, p21과 hRAD50, GADD45는 12시간 이후에 발현이 증가하였고, p53은 12시간에 증가하여 48시간까지 증가하였다. p53은 mRNA가 해독된 단계 이후에 안정성이 증가하는 것으로 알려져 있으므로,¹⁴⁾ 본 연구결과에서 단백질이 12시간에 증가하는 소견은 세포고사와 관련된 연구결과와 매우 부합된다고 할 수 있다. GADD45의 경우 12시간째에 세포고사와는 상관관계가 약한 것으로 보이지만 48시간째에 유세포계측

에 의한 세포고사율이 가장 높은 결과와 부합되는 것으로 보아 *GADD45*는 12시간 이후에 세포고사에 관여되는 것으로 보인다. 또한 5 Gy에 대한 반응이 12시간 이후에 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보이고, 25 Gy에 대해서는 시간 경과에 따라 증가하는 양상을 보이는 것은 추후에 연구가 필요할 것으로 생각되지만 대상세포가 A431세포이고 피부상피암 세포인 점을 고려하여 세포자체의 특성일 가능성도 배제할 수는 없다. A431세포주는 wild type *p53*이 없고 돌연변이 형태의 mutated *p53*만 가지고 있다.^{24,5)} 따라서 이번 연구에서 방사선 조사 후 *p21*이나 *GADD45*의 발현은 *p53*에 의해 유도된 결과로 보기는 어렵다. *p21*이나 *GADD45*가 *p53*과는 무관하게 방사선 등에 의한 DNA 손상에 의해 유도될 수 있고, 몇몇 세포주에서 방사선 조사 후에 *p53*의 발현과는 독립적으로 세포고사가 일어난다는 보고가 여러 차례 있었다.²⁶⁻³⁰⁾ 이번 연구에서 *p21*과 *GADD45*의 발현은 *p53*과는 독립적인 경로를 통하여 이루어진 것으로 보이고, 이런 DNA 수선유전자의 *p53* 비의존적인 발현도 세포고사와 연관성이 있을 것으로 사료된다.

*RAD50*은 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 동정된 유전자로 DNA 이중가닥절단시 재조합에 관여하는 *RAD52* epistasis 군(*RAD50-RAD57*)에 속하는 것으로 알려져 있고,³¹⁾ 최근 인간을 포함한 포유동물에서도 동일한 유전자가 클로닝되어 *hRAD50*으로 명명하였다.³²⁻³³⁾ Carney 등²¹⁾은 세포주기 checkpoint에 결함을 가지고 있어 방사선에 감수성을 가지고 있고 암 발생률이 높은 Nijmegen 절단 증후군 환자의 세포에 이중가닥 수선에 관여하는 hMre11/hRAD50 복합체가 형성되어 있지 않은 점을 보고하여 이 복합체의 이중가닥 수선기전과 세포주기 checkpoint에서의 작용이 서로 연관되어 있을 것이라고 주장하였다. 이 유전자의 단백질은 153 kDa으로 재조합 수선 기전을 통하여 DNA 수선에 관여하는데 *p53* 단백질과는 항원결정부에 상동성을 갖는 것으로 알려져있지만,³³⁾ 그 작용이 다른 DNA 수선유전자와 관련이 있는지, 또는 방사선을 조사받은 세포가 고사에 빠져드는데 관련이 있는지 여부는 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구에서

는 *hRAD50*은 방사선을 조사한 후 초기에 증가하기 시작하여 12시간에 가장 현저한 증가를 보였고, 48시간까지 증가되어 있는 것으로 보아 *p53*, *p21*, *GADD45* 등 다른 수선유전자와 마찬가지로 세포고사와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되었다. 특히 mutated *p53*만이 존재하는 A431세포주에서 *p53*과 형태적 유사성만 갖고 있고 기능적 의존관계가 없는 *hRAD50*이 세포고사와 관련성이 높은 점으로 보아 *hRAD50*도 *p53*과 독립적으로 세포고사에 관련될 것으로 보이며, 다른 *RAD52* epistasis 군의 DNA 수선유전자들에서도 향후 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론적으로, 방사선 조사에 의한 세포사와 세포고사는 방사선 조사 후 12시간째에 가장 현저했으며, 이 세포에서 DNA 수선유전자의 발현도 이와 유사한 결과를 얻어 DNA 수선유전자의 발현과 세포고사와의 관련성을 입증하였다. 또한 최근에 알려진 DNA 수선유전자인 *hRAD50* 역시 세포고사와 관련이 있을 것으로 사료되었다.

본 연구의 제한점

본 연구에서는 5 Gy와 25 Gy의 방사선을 세포에 조사하였는데, 이 선량이 모두 지나치게 높은 선량이어서 세포고사와 세포피사를 정확히 구분하는데, 어려운 점이 있었다. 또한 유착능력이 강한 피부상피암 세포를 사용하였기 때문에 방사선에 노출된 후 시간이 오래 경과할수록 단일세포로 분리하기가 어려워 고사세포와 피사세포를 구분하는데 오차가 있을 것으로 사료된다. 하지만 본 실험의 결과가 이전에 보고한 본 연구실의 세포고사에 관한 연구결과²²⁾와 부합되므로 의의있는 결과로 생각되며, 앞으로 좀 더 낮은 선량에서의 연구가 추가로 시행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

목적: 피부세포인 A431세포주에서 방사선 조사에 의한 세포고사가 방사선량과 방사선 조사 후 경과시간에 따라서 어떻게 변하는지를 밝혀보고, 방

사선에 의해 유도된 수선유전자의 발현을 방사선량별, 조사 후 경과시간별로 분석하여 세포고사와 어떤 관계가 있는지 알아보려고 하였다. 대상 및 방법: 한국 세포주은행으로부터 분양받은 피부상피암 세포의 일종인 A431을 Cs-137 세포조사기를 이용하여 5 Gy, 25 Gy씩 조사하고 4, 12, 48시간이 지난 다음 세포를 모아 유세포계측법을 이용하여 고사세포를 계수하였다. 또한 이 세포들을 Northern blot analysis, Western blot analysis를 시행하여 방사선량별, 경과시간별로 유전자의 변화를 분석하였다. 각 실험군간의 통계적 유의성은 SPSS 통계프로그램을 사용하여 MANOVA test에 의해 검정하였으며, p값 0.05 미만을 유의한 수준으로 판정하였다. 결과: 유세포 계측기로 측정된 고사세포의 비율은 방사선 조사 후 12시간째에 가장 유의하게 증가하였다 ($p < 0.01$). DNA수선유전자의 발현은 5 Gy 조사 후 *p53*, *p21*, *hRAD* 유전자가 12시간째에 증가하였고, 25 Gy 조사 후에는 *hRAD50*과 *p21*이 12시간에 증가하였으며, *p53*과 *GADD45*는 12시간까지 별 변화가 없었으나 이후 증가하여 48시간에 가장 높은 발현을 보였다. 결론: 피부상피암세포에서 방사선에 의해 유도되는 세포고사는 방사선 조사 후 12시간에 가장 현저해지는 것을 알 수 있었으며, 이 세포고사에 DNA수선 유전자가 밀접한 관련이 있을 것으로 보이는데, 특히 최근에 발견된 *hRAD50* 유전자도 세포고사와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되었다.

참고문헌

- Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically show growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figure. *J Pathol* 1972;107:41-4.
- Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: A different type of cell death. *FASEB J* 1992;6:2450-5.
- Sankaranarayanan K, Chakraborty R. Cancer predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation induced cancers. I. background. *Radiat Res* 1995;143:121-43.
- Donaldson KL, Goolsby GL, Kiener PA, Wahl AF. Activation of p34cdc2 coincidence with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ* 1994;5:1041-50.
- Akagi Y, Hirokawa Y, Fujita M, Kiriu H, Kashimoto K, Kasiwada K, Ito K. Apoptosis in radiosensitive malignant tumors. *Nippon Igaku Hoshasen Gakki Zasshi* 1993;53:1082-4.
- Clifton CL, Chang HC, William XL. Apoptosis induced at different dose rates: implication for the shoulder region of cell survival curves. *Radiotherapy and Oncol* 1994;32:129-36.
- Clifton CL, Min G, Chang HC, Thomas D. Radiation induced apoptosis: Effects of cell age and dose fractionation. *Cancer Res* 1995;55:5207-12.
- Li YQ, Wong CS. Radiation induced apoptosis in the rat spinal cord: lack of equal effect per fraction. *Int J Radiat Biol* 1997;71:413-20.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidyl serine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophage. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
- Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidyl serine content. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:187-91.
- Zamai L, Falcieri E, Zauli G, Cataloà A, Vitale M. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 1993;14:891-7.
- Stein L, Wang JM. Detecting apoptotic cells by flow cytometry using annexin V. *Hot Lines* 1997;3:12-3.
- Tanuma SI. Molecular mechanism of apoptosis. In: Sluysen M. *Apoptosis in normal development and cancer*. 1st ed. London: Taylor & Francis; 39-59.
- Maity A, McKenna WG, Muschel RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol* 1994;31:1-13.
- Fornace AJ, Nebert DW, Hollander MC, Leethy JD, Papathanasiou M, Fargnoli J, Holbrook NJ. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol. Cell. Biol* 1989;9:4196-203.
- Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F,

- Jacks T, Walsh WV, Plunkett BS, Vogelstein B, Fornace AJ Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992;71:587-97.
17. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
 18. El-Deiry WS. p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;227:121-37.
 19. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 1995;82:675-84.
 20. Chin PL, Momand J, Pfeifer GP. In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene* 1997;15:87-99.
 21. Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998;93:477-86.
 22. Choi KH, Bom HS, Kim JY. Studies of the radiation induced apoptosis by morphological and biochemical analysis in A431 cells. *Korean J Nucl Med* 1999;33:306-15.
 23. Papathanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH, McBride OW, Alamo I Jr, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ Jr. Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 1991;11:1009-16.
 24. Kwok TT, Mok CH, Menton-Brennan L. Up-regulation of a mutant form of p53 by doxorubicin in human squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1994;54:2834-6.
 25. Park DJ, Nakamura H, Chumakov AM, Said JW, Miller CW, Chen DL, et al. Transactivational and DNA binding abilities of endogenous p53 in p53 mutant cell lines. *Oncogene* 1994;9:1899-906.
 26. Datto MA, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor β induces the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 through a p53-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:5545-9.
 27. Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, et al. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849-52.
 28. Aladjem MI, Spike BT, Roderwald LW, Hope TJ, Klemm M, Jaenisch R, et al. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* 1998;8:145-55.
 29. Kyprianou N, Rock S. Radiation-induced apoptosis of human prostate cancer cells is independent of mutant p53 overexpression. *Anticancer Res* 1998;18:897-905.
 30. de Vente JE, Kukoly CA, Bryant WO, Posekany KJ, Chen J, Fletcher DJ, et al. Pherbol esters induce death in MCF-7 breast cancer cells with altered expression of protein kinase C isoforms. Role for p53-independent induction of gadd-45 in initiating death. *J Clin Invest* 1995;96:1874-86.
 31. Game JC. DNA double-strand break and the RAD50-RAD57 genes in *Saccharomyces*. *Semin Cancer Biol.* 1993;4:73-83.
 32. Dolganov GM, Maser RS, Novikov A, Tosto L, Chong S, Bressan DA, Petrini JH. Human Rad 50 is physically associated with human Mre11: Identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol Cell Biol* 1996;16:4832-41.
 33. Kim KK, Daud AI, Wong SC, Pajak L, Tsai SC, Wang H, Henzel WJ, Field LJ. Mouse RAD50 has limited homology to p53 and is expressed in the adult myocardium. *J Biol Chem* 1996;271:27255-64.