

cDNA Microarray를 이용한 HL60 세포주에서 방사선 조사 관련 유전자의 검색 및 분석

계명대학교 의과대학 미생물학교실, 계명대학교 의과대학 면역학교실¹, 서남대학교 의과대학
미생물학교실², 대구가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실³

박건욱 · 황미선 · 서성일 · 서민호 · 권택규¹ · 박종욱¹ · 조재위² · 최은주³ · 백원기

=Abstract=

Analysis of X Irradiation Related Genes in HL60 Cells Using cDNA Microarray

Keon Uk Park, Mi-Sun Hwang, Seong-II Suh, Min-Ho Suh, Taeg Kyu Kwon¹,
Jong-Wook Park¹, Jae-We Cho², Eun-Ju Choi³ and Won-Ki Baek

Department of Microbiology, Keimyung University School of Medicine, Department of Immunology, Keimyung University School of Medicine¹, Department of Microbiology, Seonam University College of Medicine², Department of Obstetrics and Gynecology, Taegu Catholic University School of Medicine³

Recently developed cDNA microarray or DNA chip technology allows expression monitoring of expression of hundreds and thousands of genes simultaneously and provides a format for identifying genes as well as changes in their activity. In order to search for changes in gene expression after X irradiation in HL60 cells, cDNA microarray technique was done. In this study, expression of 588 human genes (including oncogenes, tumor suppressor genes, cell cycle regulator genes, intracellular signal transduction modulator genes, apoptosis related genes, transcription factor genes, growth factors and receptor genes, cytokine genes, etc) were analyzed. For cDNA microarray analysis mRNAs were extracted from control and 8 Gy-irradiated HL60 cells. As a result the changes in expression of several genes were observed. This alteration of gene expression was confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction. The expression of heat shock 60 KD protein, c-jun, erythroid differentiation factor, CPP32, myeloid cell nuclear differentiation antigen, MAP kinase-activated protein kinase, interleukin-8, monocyte chemotactic peptide 1 and RANTES genes was increased, but the expression of p55CDC gene was decreased after X irradiation.

Key Words: Irradiation, HL60, cDNA microarray, Apoptosis

서 론

암 치료에는 수술요법, 화학요법, 방사선 치료법 등이 사용되고 있으며 이중 방사선 치료법은 최근 분자생물학의 발달로 방사선 조사에 대한 세포의

반응과 방사선 내성의 분자생물학적 기전 등이 조금씩 밝혀지면서 정상세포의 손상을 최소화하면서 방사선 치료의 효과를 높일 수 있는 항암요법제 및 유전자 치료법 등의 병행요법이 개발되고 있으나 아직 그 결과는 미비한 실정이다^{4,9,18}. 방사선 치료법의 개선과 병합요법의 지속적인 개발에는 방사선

접수: 2000년 10월 10일, 게재결정: 2000년 12월 14일

책임저자: 백원기, 700-712 대구시 중구 동산동 194번지, 계명대학교 의과대학 미생물학교실
전화: 053-250-7443, Fax: 053-255-1398, E-mail: wonki@dsmc.or.kr

조사에 따른 유전자의 발현변화에 대한 방대한 지식의 축적이 요구되며 이러한 기틀 위에서 새로운 방사선 치료법 개발이 이루어질 수 있다. 그러나 방사선 조사에 대한 세포반응 즉 각종 유전자의 발현 유도나 억제 및 방사선 내성기전 등에 대한 분자생물학적 기전의 많은 부분은 아직 미지로 남아있는 상태이다.

사람의 유전자는 현재까지 분자생물학의 발달과 human genome project 등의 노력으로 많은 유전자들이 빠른 속도로 밝혀지고 있으나 그들의 생물학적 의미의 해석은 속도가 느린 것이 사실이다. 이러한 현실에서 최근 개발된 분자생물학 연구법 중의 중요한 발전은 세포에서 많은 유전자들의 상호 발현 차이를 빠른 시간 내에 동시에 연구할 수 있는 cDNA microarray (DNA chip) 기술의 개발이다. cDNA microarray 기술의 장점은 세포의 유전자 발현변화를 한 시점에서 동시에 많은 유전자를 대상으로 연구할 수 있다는 것, 즉 매우 짧은 시간 내에 수백 - 수천 종류 유전자의 발현을 동시에 분석할 수 있다는 것이다. cDNA microarray 기술은 화학 및 컴퓨터 기술과 접목되어 더욱 발전되고 자동화된 형태의 DNA chip이 개발 중에 있다^{5,8,13,19}.

방사선 조사에 의한 세포의 유전자 발현 조절반응 및 방사선 유도 apoptosis 등에 관여하는 유전자의 발견과 발현변화 분석은 암 질환을 비롯한 각종 질환에서 방사선 치료의 분자생물학적 기전 및 방사선 내성에 대한 많은 이해와 지식의 축적을 이루고 나아가 이를 이용한 새로운 방사선 치료 병합요법으로서의 각종 약품과 유전자 치료법이 개발되는 바탕이 될 수 있을 것이다.

저자들은 방사선 조사에 대한 세포의 유전자 발현 수준에서의 반응을 조사하기 위하여 580여 종류의 암유전자, 항암유전자, 세포주기 관련 유전자, apoptosis 관련 유전자, 세포내 신호전달계 관련 유전자와 전사인자, cell adhesion molecule, cytokine, 성장인자 등의 유전자 발현변화를 조사할 수 있는 cDNA microarray 기술을 이용하여 방사선 조사에 의해 유도되거나 억제되는 유전자 발현변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 방사선 조사

ATCC (American Type Culture Collection)에서 HL 60 세포주를 분양받아 실험에 사용하였다. 세포배

양은 10% fetal bovine serum이 함유된 RPMI1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하면서 실험하였다. 실험이 진행되는 동안 세포는 5~10×10⁵ cells/ml의 농도를 유지하면서 배양하였다. 방사선 조사시에는 3.5×10⁵ cell/ml 농도로 직경 100 mm 세포배양접시에 세포를 분주하고 선형가속기 (ML-15-MDX, 6MV X-선, Mitsubishi Co., Japan)를 이용하여 배양용기의 입사면에 1.5 cm, 후방에 6 cm 두께의 acryl을 두어 X-선의 build-up과 후방산란을 보정하고 세포에 200 cGy/min의 선속 (Dose rate)으로 방사선을 조사하였다.

2. DNA fragmentation assay

방사선을 조사한 0.5×10⁶ 세포를 eppendorf-tube로 옮긴 후 2,000 rpm에서 2분간 원심하여 세포를 얻은 후 20 µl의 lysis buffer (20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 0.8% (W/V) sodium lauryl sarcosine)와 2 µl의 RNase A (5 mg/ml)를 섞고 37°C에서 1시간 incubation한 후 20 µl의 proteinase K를 넣고 50°C에서 1시간 30분 incubation시켰다. 여기에 gel loading buffer 5 µl를 넣고 섞은 후 1.2% agarose gel로 dry gel electrophoresis를 실시하였다.

3. Propidium iodide 염색을 이용한 유세포 분석

HL60 세포를 PBS (Phosphate buffered saline)로 세척하고 2×10⁶ 세포 당 1 ml의 ethanol을 첨가하고 4°C에 15시간 두어 세포를 고정하였다. 1,000 rpm으로 원심한 후 상층액을 제거하고 1 ml의 PI solution (propidium iodide 50 µg/ml, RNase A 0.1 mg/ml, NP40 0.1%, Trisodium citrate 0.1%)으로 채부유시킨 다음 4°C에 1시간 둔 후 FACScaliver (Becton Dickinson Co., USA)로 분석하였다.

4. cDNA microarray 분석

cDNA microarray 분석은 Atlas Human cDNA Expression Array I (Clontech Laboratories Inc., USA)을 사용하여 제조사에서 제공하는 실험법에 따라 실험하였다.

1) mRNA 분리

방사선을 조사한 세포를 PBS로 세척하고 5×10⁶ 세포 당 RNazol B (Biotex Laboratories Inc., USA) 1 ml을 사용하여 total RNA를 분리하고 500 µg total RNA에 DNase I (Boehringer Mannheim Co., Germany) 50 unit로 처리하여 혼합되어 있는 DNA를 제거하고 Oligotex mRNA kit (QUIAGEN Co., Germany)를 사용

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Name		PCR primer sequence	Product size (bp)
GAPDH	Sense	5' CGTCT TCACC ACCAT GGAGA 3'	300
	Antisense	5' CGGCC ATCAC GCCAC AGTTT 3'	
Interleukin-8	Sense	5' CGGAA GGAAC CATCT CACTG 3'	822
	Antisense	5' CTTGT GGATC CTGGC TAGCA 3'	
Heat shock protein 60	Sense	5' AGAGC TGCTG TTGAA GAAGG 3'	334
	Antisense	5' TTAAC AGAGA GGCCA CACCA 3'	
c-Jun	Sense	5' CCGAA CTGCA CAGCC AGAAC 3'	419
	Antisense	5' CTTCC TCTCC GCCTT GATCC 3'	
Erythroid differentiation antigen	Sense	5' GTGAG CAGTG CCACC AGAGT 3'	377
	Antisense	5' GTGGA AGGAC AGTGA GGACC 3'	
CPP32	Sense	5' CTGCG TGGTG GTCAT TCTCT 3'	408
	Antisense	5' TCAAC GTACC AGGAG CCACT 3'	
Myeloid cell nuclear differentiation antigen	Sense	5' CAGTG GCCAG TAAGA CTCAA 3'	449
	Antisense	5' GTGAC TTCCA CACAC CAGTT 3'	
MAP kinase-activated protein kinase	Sense	5' AGTCA TGTGA CATGT GGTCC 3'	418
	Antisense	5' CGGTT GTTAG AGGTC TTCAG 3'	
Cell division control protein 20	Sense	5' GGCCA GTGGT GGTA A TGATA 3'	385
	Antisense	5' GCTCA TGGTC AGACT CAGGA 3'	
MCP1	Sense	5' AACTG AAGCT CGCAC TCTCG 3'	207
	Antisense	5' GGACA CTTGC TGCTG GTGAT 3'	
RANTES	Sense	5' ACGCC TCGCT GTCAT CCTCA 3'	208
	Antisense	5' GTTGG CACAC ACTTG GCGGT 3'	
SDF1- β	Sense	5' CAGAG CCAAC GTCAA GCATC 3'	393
	Antisense	5' TAAGC TGCTA CGTGT CGCCA 3'	

하여 mRNA를 순수 분리하였다.

2) cDNA probe 준비

분리한 1 μ g의 mRNA에 α -³²P-dATP, oligo dT (16 mer) primer, MMLV reverse transcriptase (50 unit/ μ l)를 mix하고 70°C 2분, 50°C 22분 반응시켜 first strand cDNA를 합성하였다.

3) Column Chromatography를 이용한 cDNA probe 분리

CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O column (Clontech Laboratories Inc., USA)을 사용하여 ³²P로 표지된 cDNA를 반응되지 않은 여분의 α -³²P-dATP와 0.1 Kb 이하의 small cDNA fragment에서 분리하였다.

4) Hybridization

준비된 cDNA probe로 cDNA microarray membrane에 hybridization을 시행하였다. Hybridization은 hybridization chamber를 사용하여 68°C에서 시행하였다. Salmon sperm DNA를 포함하는 hybridization solution (ExpressHyb hybridization solution, Clontech Laboratories Inc., USA)으로 68°C에서 30분간 prehybridization 후, denaturation시킨 cDNA probe (약 200 μ l, 2~5 \times 10⁶ cpm)를 포함하는 hybridization 용액으로 68°C에서 hybridization을 15시간 시행하였다. Sodium dodecyl sulfate와 SSC (Sodium Sodium Citrate)의 wash solution으로 세척하고 autoradiogram을 시행하였다.

5. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

배양된 세포에서 RNA의 분리는 RNAzol B (Bio-tecx Laboratories Inc., USA)를 사용하였다. 분리된 RNA 4 µg을 oligo dT (16 mer)를 사용하여 MuLV reverse transcriptase (Perkin-Elmer Co., USA)로 역전사 (reverse transcription)를 시행하였다. PCR은 10X reaction buffer (15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl) 5 µl와 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP 각 1 µl씩, 그리고 30 µM sense 및 antisense primer (Table 1)를 각각 1 µl를 넣은 혼합액에 1 µl의 반응 시킨 cDNA reaction mixture와 2.5 unit의 Taq polymerase (Perkin Elmer Co., USA)를 넣은 후 증류수로 50 µl로 용량을 맞추고 30 µl의 mineral oil을 증충한 후 DNA thermal cycler (Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 PCR을 시행하였다. GAPDH 유전자 증폭을 위해서는 22 cycle, 그 외의 다른 유전자들의 증폭을 위해서는 25~28 cycle을 시행하였다. 증폭된 PCR 산물은 agarose gel에 전기영동한 후 band의 density를 측정하여 GAPDH 유전자에 대한 RT-PCR 결과로 각 band의 density를 보정한 후 결과를 분석하였다.

결 과

방사선 조사에 따른 HL60 세포의 apoptosis를 확인하기 위하여 DNA fragmentation assay를 시행하여 8 Gy의 방사선 조사로 apoptosis가 유도됨을 확인하

였다 (Fig. 1). 8 Gy의 방사선을 조사하고 propidium iodide 염색 후 유세포 분석기로 분석한 결과 subG1 fraction이 증가하여 apoptosis가 유도됨을 다시 확인할 수 있었으며, G2/M fraction 세포수가 급격한 증가를 보여 방사선 조사에 의한 G2/M기 정지 유도도 확인되었다 (Fig. 2).

방사선 (8 Gy)을 조사한 HL60 세포와 조사하지

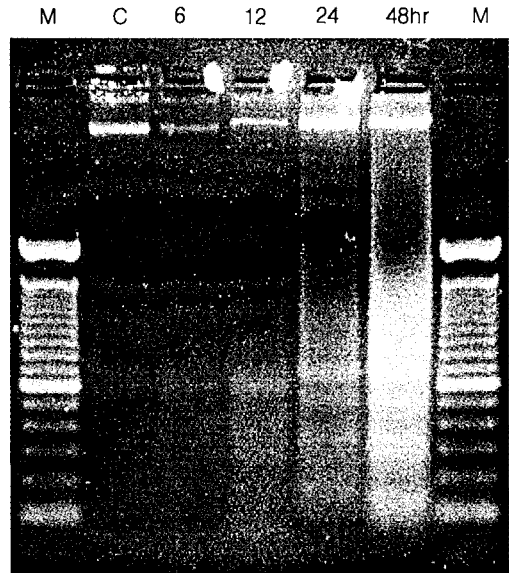


Figure 1. Photograph of electrophoresed gel showing apoptosis-like DNA ladders in HL60 cells after X irradiation (8 Gy). C: control HL60 cells, M: 100 bp DNA ladder size marker.

Table 2. Induced and repressed genes in HL60 cells after X irradiation

Atlas code*	Genbank accession	Gene
Induced		
A1l	J04111	Transcription factor AP-1 (c-Jun proto-oncogene)
F5f	Y00787	Interleukin-8
C4l	U56390	CPP32 (Caspase 3)
A2l	M81750	Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MCN-DA)
B6m	U09578	MAP kinase-activated protein kinase (3PK)
F7b	J03634	Erythroid differentiation antigen (Inhibin-beta)
B7j	M34664	Heat shock protein 60 KD (Chaperonin)
Repressed		
A5n	U05340	Cell division control protein 20 (p55CDC)

*Code of Atlas Human cDNA Expression Array I (Clontech Laboratories Inc., USA)

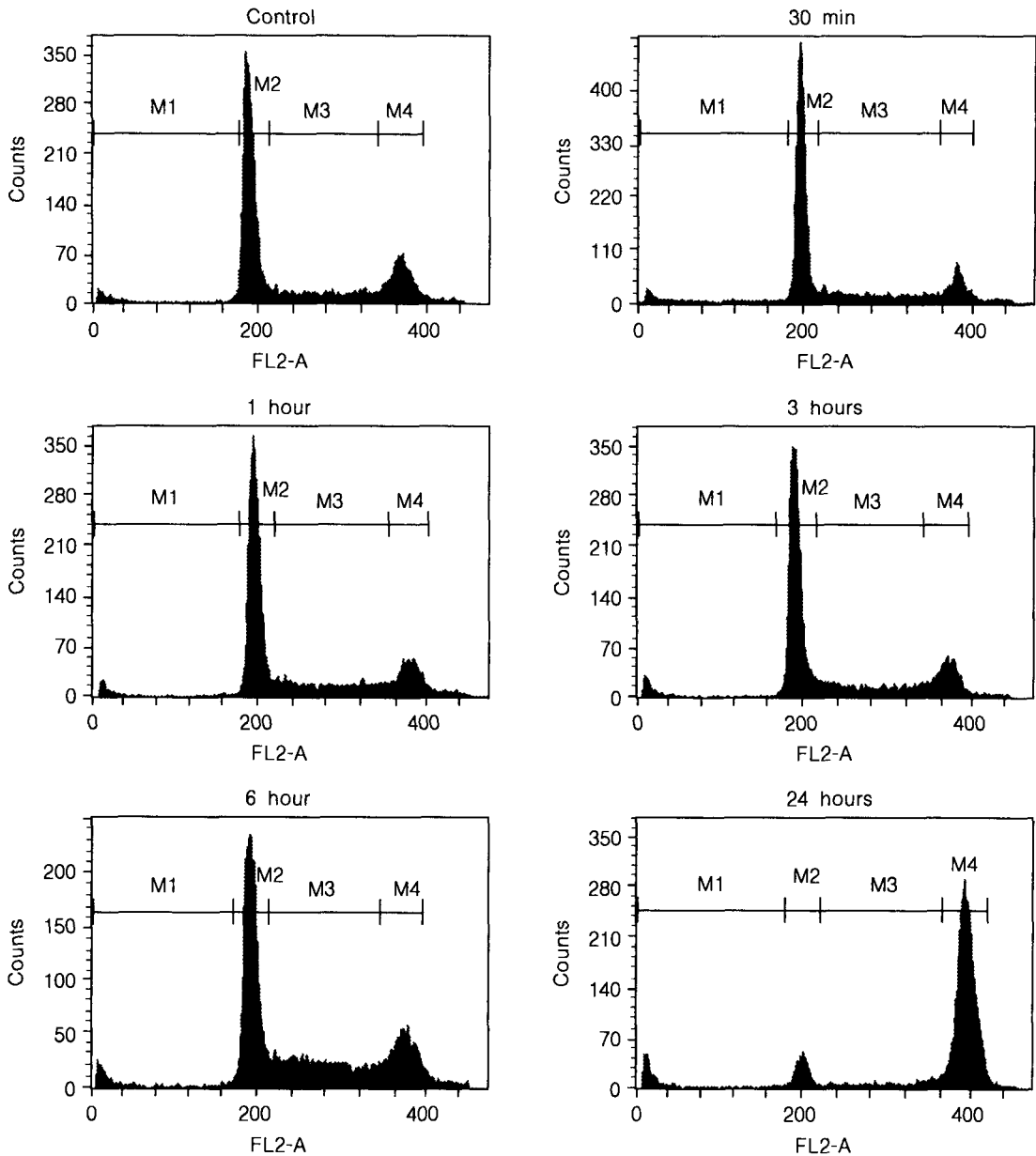


Figure 2. Flow cytometry analysis of HL60 cells after X irradiation (8 Gy). HL60 cells after irradiation (30 min, 1 hour, 3 hours, 6 hours and 24 hours) were stained with propidium iodide and analyzed as described in Materials and Methods.

많은 HL60 세포의 cDNA microarray autoradiogram (Fig. 3)을 서로 비교하여 α -tubulin, β -actin 등의 유전자 발현을 internal control로 보정하면서 발현 차이가 있는 유전자를 조사한 결과 전사인자인 AP-1 (c-jun proto-oncogene), interleukin-8 (IL-8), CPP32 (caspase 3), myeloid cell nuclear differentiation antigen (MCN-DA), MAP kinase-activated protein kinase (3PK),

erythroid differentiation antigen (EDF, Inhibin- β), Heat shock protein 60 KD (HSP60) 등의 유전자 발현이 증가되어 있었고, cell division control protein 20 (p55CDC) 유전자의 발현이 감소된 것으로 나타났다 (Table 2).

cDNA expression array 실험으로 발현변화가 있는 것으로 나타난 이들 유전자를 대상으로 방사선 조사량 (0.5, 1, 3, 5, 24 Gy 조사 6시간 후)과 방사선

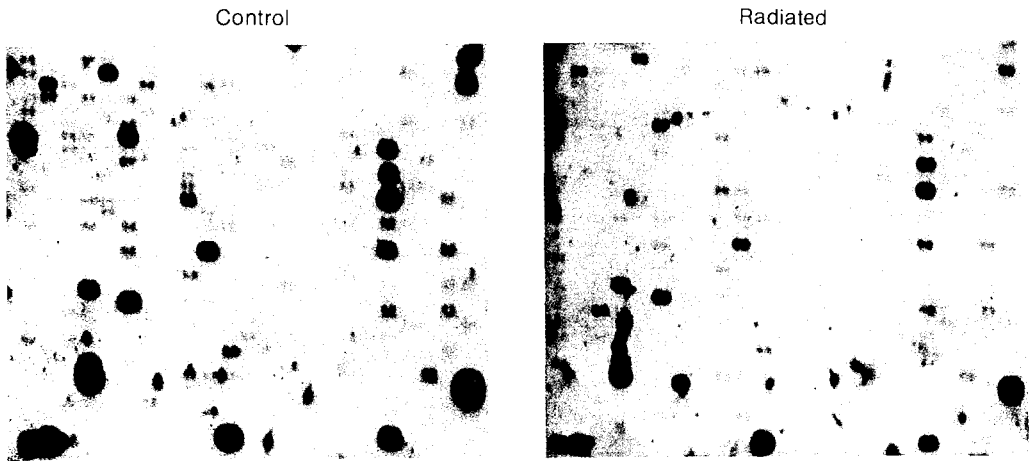


Figure 3. cDNA microarray analysis of changes in gene expression of HL60 cells after X irradiation (8 Gy).

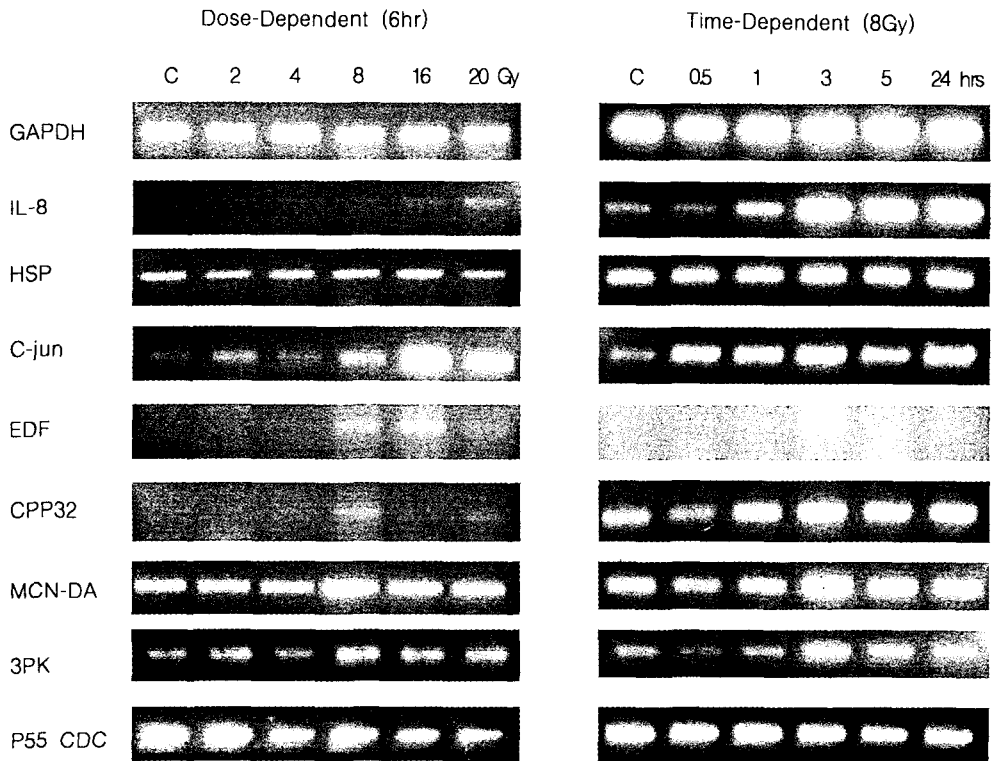


Figure 4. RT-PCR analysis of relative changes in IL-8, HSP, c-Jun, EDF, CPP32, MCN-DA, 3PK and p55CDC mRNA expression levels after X irradiation. Total RNAs from control and irradiated HL60 cells were subjected to reverse transcription. C: control cells.

조사 후 시간별 (8 Gy 조사 후 30분, 1시간, 3시간, 5시간, 24시간) 유전자 발현변화를 RT-PCR법으로

조사하였다 (Fig. 4). 이때 GAPDH 유전자의 발현량을 일정량으로 보정한 후 이를 기준으로 다른 유전

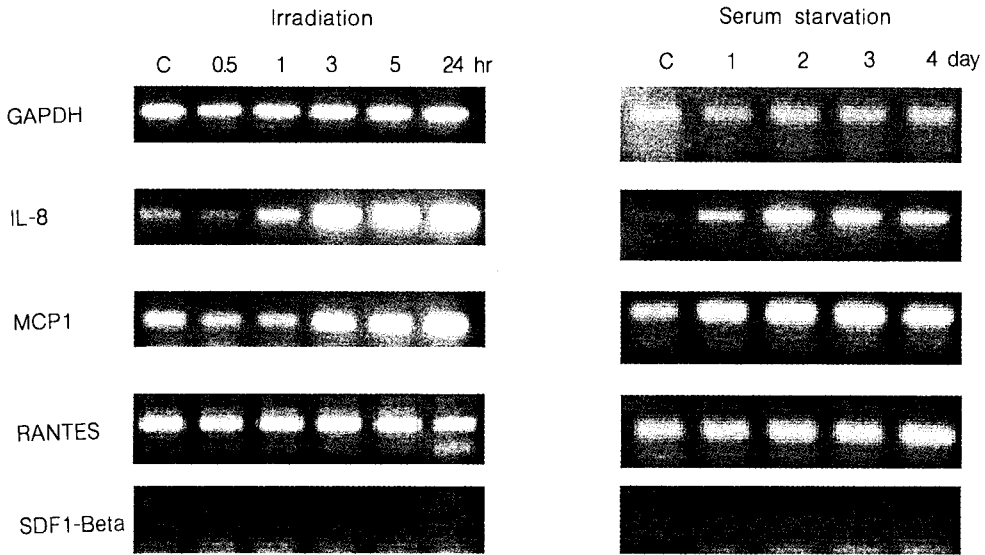


Figure 5. RT-PCR analysis of relative changes in chemokine genes expression of HL60 cells after X irradiation or serum starvation. Total RNAs from irradiated or serum starved HL60 cells were subjected to reverse transcription. C: control cells.

자들의 발현량을 조사하였다. IL-8, HSP60, c-jun 유전자의 발현은 시간 및 조사량의 증가에 비례하여 증가하였으며, EDF 유전자는 8 Gy 조사 후 3시간에 그리고 8~16 Gy 조사량에서 가장 증가되어 있었다. CPP32 유전자는 8 Gy 조사에서 발현이 가장 많았으며 시간의 경과에 비례하여 발현이 증가하였고, MCN-DA와 3PK 유전자는 조사량과 시간의 경과에 거의 비례하게 증가하였다. p55CDC 유전자는 조사량과 시간에 비례하여 발현이 점차 감소함을 보였다.

IL-8 유전자 발현증가 현상에 착안하여 다른 chemokine들의 발현변화도 있을 것이라 생각하여 monocyte chemotactic peptide 1 (MCP1), RANTES, stromal cell derived factor 1- β (SDF1- β)의 발현을 조사하여 보았다 (Fig. 5). MCP1과 RANTES가 방사선 조사 후 시간의 경과에 따라 증가하였으며, SDF1- β 는 발현이 관찰되지 않았다.

Chemokine의 발현 유도가 방사선 조사 유도 apoptosis의 고유한 효과인지 아니면 HL60 세포 apoptosis에 나타나는 일반적인 변화인지를 알아보기 위하여 apoptosis를 유발하는 다른 조건인 serum starvation 상태에서 chemokine의 발현을 조사하였다. Starvation 시간이 증가함에 따라 IL-8과 MCP-1의 발현은 증가하였으나 RANTES의 발현은 방사선 조사시

와는 달리 증가하지 않았다. SDF1- β 의 발현은 검출되지 않았다 (Fig. 5).

고 찰

방사선 조사에 의한 세포 유전자 발현 조절반응 및 방사선 유도 apoptosis 등에 관여하는 유전자의 발견과 발현변화 분석은 암 질환을 비롯한 각종 질환에서 방사선 조사의 분자생물학적 치료기전 및 방사선 내성에 대한 많은 이해와 지식의 축적을 이룰 수 있다. 저자는 이를 위하여 최근에 세포의 유전자 발현변화를 한 시점에서 동시에 수백 - 수천 종류 유전자의 발현을 분석할 수 있게 개발된 cDNA microarray 기술을 사용하여 580여 종류의 암유전자, 항암유전자, 세포주기 관련 유전자, apoptosis 관련 유전자, 세포내 신호전달계 관련 유전자와 전사인자, cell adhesion molecule, cytokine, 성장인자 등의 유전자 발현변화를 조사하였다.

방사선 조사에 의한 HL60 세포주의 apoptosis 유도를 DNA fragmentation assay와 propidium iodide 염색을 이용한 유세포 분석법으로 조사한 결과 8 Gy의 방사선 조사에 의해 apoptosis가 유도되고 이때 세포주기의 교란이 유도됨을 확인할 수 있었다. 방사선, 항암요법제 등의 DNA damaging agent에 의한

세포주기의 변화는 G1기 정지, S기 지연, G2기 정지 등이 있는 것으로 알려져 있다. 이때 G1기 정지는 주로 p53 유전자의 활성화에 따른 p21, GADD45 등의 활성화에 따른 것으로 알려져 있으며¹¹⁾, G2기 정지는 cyclin B 유전자의 발현억제 또는 cdc2 kinase의 활성화저하에 의한 것으로 보고되어 있다^{12,16)}. S기 지연은 replicon initiation의 억제나 DNA chain elongation의 억제에 의해 나타난다고 보고되어 있으나¹⁵⁾ 관여하는 인자에 대해서는 아직 명확히 알려져 있지 않다.

cDNA microarray 기술은 최근에 개발된 새로운 분자생물학적 기법으로 동시에 수많은 유전자의 발현정도를 조사할 수 있는 기법으로 알려져 있다. 이 실험에서 cDNA microarray 기법으로 발현변화가 나타난 유전자를 대상으로 다시 RT-PCR로 유전자 발현변화를 조사한 결과 두 실험의 결과가 일관성 있게 나와서 cDNA microarray의 유용성을 다시 확인할 수 있었다. 최근에는 여기에 각종 기술의 발전이 더해져 자동화된 시스템의 개발이 시도되고 있어 향후 아주 유용한 기법이 될 것으로 생각된다²³⁾.

cDNA microarray와 RT-PCR로 발현변화가 나타난 유전자 중 전사인자로 널리 알려진 AP-1 즉 c-jun은 방사선 조사에 의해 발현의 증가가 유도되었는데, c-jun은 조기반응 유전자로서 방사선 조사 후 조기에 발현이 증가하여 cytokine, 성장인자 등의 발현을 유도한다고 알려져 있다⁷⁾.

3PK 단백질은 JNK/SAPK (c-Jun N terminal kinase/stress-activated protein kinase)와 p38에 의해 인산화되는 downstream molecule로 최근에 분리된 단백질이다¹⁴⁾. 방사선 조사, 자외선 조사, heat shock 등 세포 stress 상황에서 유발되는 apoptosis는 JNK/SAPK와 p38 신호전달계의 활성화와 관련 있음이 알려져 있다. Stress 신호가 주어지면 MEKK1 (MEK kinase 1)의 활성화가 이루어지며 활성화된 MEKK1은 MKK3 및 6 (MAPK kinase 3 및 6)을 인산화하여 다시 p38을 활성화하거나, SEK1 (SAPK/ERK kinase 1) 또는 MKK4 (MAPK kinase 4)를 활성화하여 SAPK/JNK를 활성화함으로써 apoptosis를 유발한다. SAPK/JNK는 c-Jun의 Ser-63과 Ser-73을 인산화하여 AP-1의 조절을 받는 유전자의 발현을 효율적으로 증가시킨다고 알려져 있다²¹⁾. 이 실험에서 방사선 조사 후 3PK의 발현이 증가된 것은 p38, SAPK/JNK를 통한 단백질의 활성화 뿐만 아니라, 유전자 발현증가를 통해서도 방사선 유도 apoptosis에 관여됨을 시사한다.

발현이 증가된 CPP32 유전자는 apoptosis에 관여

하는 caspase cascade를 구성하는 단백질로서 Poly ADP-ribose polymerase (PARP) 등을 비롯한 각종 단백질을 절단하는 effector molecule로서 apoptosis 과정에 관여한다고 알려져 있어^{6,22)} 방사선 조사에 의해 유도된 HL60 세포의 apoptosis 과정 중에 증가한 것으로 생각된다.

HSP60은 chaperon 단백질 중 하나로 밝혀져 있다. Chaperon은 지금까지 정확히 그 기전이 다 밝혀져 있지는 않지만 heat shock 등으로 원래의 형태를 잃은 단백질, 즉 정상적인 구조에서는 단백질 구조의 외부로 노출되지 않는 hydrophobic region이 표면에 노출되어 irreversible multimeric aggregation이 일어날 수 있게 된 변성 단백질들을 인지하여 이들이 정상구조로 refolding 되도록 돕는 기능을 가진다³⁾. 최근의 연구 보고에 따르면 HSP60 단백질이 upstream activator caspase들에 의한 CPP32의 활성화 유도에도 중요한 역할을 한다고 알려졌다²⁶⁾. 이로 미루어 보아 방사선 조사에 의한 HSP60 단백질 유전자의 발현 유도는 방사선 조사에 의한 단백질 손상을 교정하기 위해서 나타났을 수도 있으며, 또는 apoptosis 유도에 따른 CPP32의 활성화와 관련되어 나타났다고 볼 수도 있다.

MCN-DA 단백질은 세포핵에 존재하면서 Nucleolin과 복합체를 형성하여 YY1 전사인자의 활성화에 기여하고, human myelomonocytic lineage cell의 분화에 관여하는 단백질로서 interferon- α 에 의해 발현이 증가한다고 알려져 있다^{2,27)}. EDF는 human monocytic leukemia cell line인 THP-1에 phorbol ester를 처리했을 때 배양 상층액에서 처음 발견된 단백질로서 K562, MEL 등의 세포들의 적혈구 분화에 관여하고 또한 HL60 세포의 monocyte differentiation에도 관여한다고 알려졌다^{17,20)}. 이들 MCN-DA나 EDF의 기능을 고려할 때 방사선 조사에 의해 나타난 MCN-DA 또는 EDF 유전자의 발현증가는 방사선 조사에 의한 세포손상이나 apoptosis에 의해 유도되었다기 보다는 방사선 조사에 의해 야기된 세포주기의 혼란에 기인한 간접적인 발현증가로 생각된다.

Chemokine은 chemotaxis를 유발하는 사이토카인으로서 아미노산 서열 특징에 따라 -CXC- 또는 -CC-chemokine으로 분류된다¹⁾. 이 실험에서는 IL-8, MCP1, RANTES, SDF1- β 의 발현에 대해 조사하였는데 이중 IL-8, MCP1, RANTES의 유전자 발현이 방사선 조사에 의해 유도되었다. 방사선 조사에 의해 발생하는 조직의 염증반응에 이들 chemokine의 발현증가에 따른 T 림프구 및 탐식세포 등의 침윤 유도가

관련된다고 유추할 수 있을 것이다¹⁰⁾. 방사선 조사가 아닌 다른 apoptosis 유도 조건인 serum starvation으로 chemokine의 발현변화를 조사한 결과 IL-8, MCP1의 유전자 발현이 증가하여 serum starvation에서도 chemokine의 발현을 유도할 수 있음을 보였다. 그러나 RNATES의 발현 유도가 없어 apoptosis를 유도할 수 있는 조건들에 따라 발현 유도되는 chemokine의 종류가 다를 수 있음을 시사하였다.

p55CDC는 세포주기 M기의 중기 (metaphase)-후기 (anaphase) 이행에 작용하는 *Saccharomyces*의 Cdc20, *Drosophila*의 Fizzy gene과 높은 homology를 가지는 유전자이다²⁵⁾. 포유류 동물세포에서 p55CDC는 세포주기 중 M기의 동원체 (kinetochore)에 농축되어 있으며 APC (anaphase promoting complex)와 Mad2와 상호 관계하여 세포주기 중 M기 조절에 관여하는 단백질이다²⁴⁾. 이 실험에서 방사선 조사 후 p55CDC의 발현감소가 보였는데 이는 방사선 조사에 의해 세포의 G2/M기 정지가 유도됨에 따른 즉 세포주기에서 p55CDC의 발현이 유도되는 시점 이전의 초기 G2/M기에서 세포주기의 정지가 유도되었을 것으로도 생각할 수 있으며, 역으로 방사선 조사에 의한 p55CDC의 감소가 G2/M기 정지의 유발에 관여한 것으로도 볼 수 있다. 이점에 대해서는 앞으로 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과들은 향후 방사선 조사에 대한 유전자 발현 수준에서의 세포반응 규명 및 방사선 치료의 분자생물학적 기전 이해에 중요한 자료로 활용될 것으로 생각된다. 또한 cDNA microarray 기법을 이용한 유전자 발현 분석법은 매우 정확하고 유용한 연구법으로 생각된다.

결 론

HL60 세포에 대한 8 Gy의 방사선 조사가 세포주기 G2/M기 정지 및 apoptosis를 유발하여 방사선 조사에 의한 세포손상이 apoptosis를 유도하고 세포주기의 혼란을 야기할 수 있음을 보였다.

방사선 조사에 의해 HL60 세포에서 유전자 발현이 증가한 유전자는 interleukin-8 (IL-8), heat shock protein 60 KD, c-jun, erythroid differentiation factor, CPP32, myeloid cell nuclear differentiation antigen, MAP kinase-activated protein kinase 등의 유전자였으며, 감소한 유전자는 cell division control protein 20 유전자였다.

IL-8의 유전자 발현이 증가하여, 다른 chemokine

들의 발현변화를 조사한 결과 monocyte chemotactic peptide 1 (MCP1)과 RANTES가 방사선 조사 후 시간의 경과에 따라 증가하였으며, apoptosis가 유도되는 serum starvation 상태에서도 IL-8과 MCP1의 발현이 증가하여 HL60 세포주의 apoptosis에 각종 chemokine이 관여될 것을 시사하였다.

이상의 결과들은 향후 방사선 조사에 대한 유전자 발현 수준에서의 세포반응 규명 및 방사선 치료의 분자생물학적 기전 이해에 중요한 자료로 활용될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**: 565-568, 1998.
- 2) Briggs JA, Burrus GR, Stickney BD, Briggs RC: Cloning and expression of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: regulation by interferon alpha. *J Cell Biochem* **49**: 82-92, 1992.
- 3) Bukau B, Horwich AL: The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366, 1998.
- 4) Culver KW, Vickers TM, Lamsam JL, Walling HW, Seregina T: Gene therapy for solid tumors. *Br Med Bull* **51**: 192-204, 1994.
- 5) DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Melzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM: Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* **14**: 457-460, 1996.
- 6) Green D, Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* **8**: 267-271, 1998.
- 7) Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML, Virudachalam S, Kufe D, Weichselbaum RR: Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 2156-2160, 1991.
- 8) Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW: Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2150-2160, 1997.
- 9) Iliakis G, Pantelias G, Kurtzman S: Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: Effect of BrdU on cell killing and interphase chro-

- mosome breakage in radiation sensitive cells. *Radiat Res* **125**: 56-64, 1991.
- 10) Johnston CJ, Wright TW, Rubin P, Finkelstein JN: Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. *Exp Lung Res* **24**: 321-337, 1998.
 - 11) Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW: Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**: 6304-6311, 1991.
 - 12) Lock RB, Ross WE: Possible role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* **50**: 3767-3771, 1990.
 - 13) Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL: Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnol* **14**: 1675-1680, 1996.
 - 14) Ludwig S, Engel K, Hoffmeyer A, Sithanandam G, Neufeld B, Palm D, Gaestel M, Rapp UR: 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol* **16**: 6687-6697, 1996.
 - 15) Makino F, Okada S: Effects of ionizing radiation on DNA replication in cultured mammalian cells. *Radiat Res* **62**: 37-51, 1975.
 - 16) Muschel RJ, Zhang HB, McKenna WG: Differential effect of ionizing radiation on the expression of cyclin A and cyclin B in HeLa cells. *Cancer Res* **53**: 1128-1135, 1993.
 - 17) Okafuji K, Kaku K, Seguchi M, Tanaka H, Azuno Y, Kaneko T: Effects of activin A/erythroid differentiation factor on erythroid and megakaryocytic differentiations of mouse erythroleukemia (Friend) cells: evidence for two distinct modes of cell response. *Exp Hematol* **23**: 210-216, 1995.
 - 18) Reed JC, Stein C, Subasinghe C, Haldar S, Croce CM, Yum S, Cohen J: Antisense-mediated inhibition of Bcl2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: Comparison of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* **50**: 6565-6570, 1990.
 - 19) Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW: Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10614-10619, 1996.
 - 20) Takahashi S, Yamashita T, Eto Y, Shibai H, Miyamoto K, Ogata E: Inducible gene expression of activin A/erythroid differentiation factor in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **167**: 654-658, 1990.
 - 21) Verheij M, Ruiter GA, Zerp SF, van Blitterswijk WJ, Fuks Z, Haimovitz-Friedman A, Bartelink H: The role of the stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radiother Oncol* **47**: 225-232, 1998.
 - 22) Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC: Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* **22**: 388-393, 1997.
 - 23) Wallace RW: DNA on a chip: serving up the genome for diagnostics and research. *Mol Med Today* **3**: 384-389, 1997.
 - 24) Wassmann K, Benzra R: Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11193-11198, 1998.
 - 25) Weinstein J, Jacobsen FW, Hsu-Chen J, Wu T, Baum LG: A novel mammalian protein, p55CDC, present in dividing cells is associated with protein kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4. *Mol Cell Biol* **14**: 3350-3363, 1994.
 - 26) Xanthoudakis S, Roy S, Rasper D, Hennessey T, Aubin Y, Cassady R, Tawa P, Ruel R, Rosen A, Nicholson DW: Hsp60 accelerates the maturation of pro-caspase-3 by upstream activator proteases during apoptosis. *EMBO J* **18**: 2049-2056, 1999.
 - 27) Xie J, Briggs JA, Morris SW, Olson MO, Kinney MC, Briggs RC: MNDA binds NPM/B23 and the NPM-MLF1 chimera generated by the t(3;5) associated with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* **25**: 1111-1117, 1997.