

## 급성전골수성백혈병 HL-60 세포주에서 방사선조사에 의한 세포고사기전

원광대학교 의과대학연구소\*, 의과대학 방사선종양학교실†

김혜정\* · 문성근\* · 이재훈\* · 문성록\*†

**목적** : 방사선 조사에 의하여 유발되는 세포고사의 신호전달기전, 특히 caspase계 cysteine protease의 활성화, Bcl2 및 Bax 단백질, cytochrome c의 세포질내로의 방출, Fas 와 Fas-L 단백질의 발현양상 등의 조사를 통하여 방사선 조사에 의하여 유발되는 세포고사기전을 규명하고자 하였다.

**대상 및 방법** : HL-60 세포주에 6 MV의 X-선을 조사하고 세포생존율, caspase의 활성화도, Bcl2 및 Bax 단백질, cytochrome c의 세포질내로의 방출여부, 및 Fas 와 Fas-L 단백질의 발현양상을 조사하였다.

**결과** : 방사선조사 후 세포의 생존율은 조사선량과 조사 후 시간경과에 따라 감소되었다. 세포고사의 특징인 사다리형 DNA 분절은 방사선조사 4시간 후부터 시간경과에 따라 증가하였으며, 조사선량이 증가할수록 더욱 현저하였다. 방사선조사 후 caspase계 cysteine proteases 중 caspase-2, 3, 6, 8 및 9의 활성화가 시간경과에 따라 증가하였으며, 16 Gy의 방사선량조사 4시간 후에 poly (ADP-riboseyl) polymerase (PARP)의 분절과 Western blot을 이용한 procaspase-3의 분절을 확인함으로써 caspase-3의 활성을 간접적으로 증명할 수 있었다. Bcl2 단백질은 방사선조사 후 시간경과에 따라 감소하였으며, Bax 단백질은 시간경과에 따라 발현이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. 방사선조사 후 cytochrome c의 세포질내로의 방출을 확인하였다. 또한 Fas 및 Fas-L 단백질 모두 방사선조사 후 발현이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다.

**결론** : HL-60 세포주에서 방사선 조사에 의해 유발되는 세포사멸이 세포고사기전에 의해서 매개됨을 확인하였으며, 이는 세포내 caspase계 cysteine proteases, Bcl2, Bax, 세포질내로의 cytochrome c 방출 그리고 Fas, Fas-L가 관여하는 신호전달경로의 활성화에 의한 것임을 의미하였다.

**핵심용어** : HL-60, 세포고사, 방사선조사

### 서 론

세포에 대한 방사선조사의 효과는 일반적으로 일시적인 세포주기의 정지 및 DNA 손상복구의 증가와 복구할 수 없는 손상에 의해 세포사멸을 일으킨다고 알려져 있다.<sup>1)</sup> 방사선에 의한 세포사멸의 유형은 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)로 분류할 수 있으며 이중 세포고사는 각종 유전자의 발현과 발현산물인 단백질의 활성화가 동반되며, calcium-dependent endonuclease에 의하여 180~200 bp의 분절체가 나타나는 DNA의 사다리형 분절(ladder-pattern fragmentation)을 특징적으로 나타낸다.<sup>2~5)</sup> 방사선에 의한 세포사멸 기전은 현

재도 많은 논란이 있으며 세포고사의 생화학적 및 분자생물학적 기전에 대하여는 아직도 명확히 규명되고 있지 않다.<sup>6~9)</sup>

세포고사는 다세포 생명체에서 세포나 장기의 항상성(homeostasis) 유지를 위한 중요 기전<sup>10)</sup>으로, 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능발현 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다.<sup>11, 12)</sup> 항암 치료에 흔히 사용되는 방사선 조사, 다양한 종류의 화학요법제제들 및 온열요법 등이 여러 종류의 암 조직이나 세포주에서 세포고사를 유도함이 최근 연구에 의하여 밝혀져 있으며, 이는 항암 치료에 대한 내성 발현이나 감수성 저하 등이 세포고사 신호전달기전과 밀접한 관계가 있음을 제시하고 있다.<sup>6~8)</sup> 세포고사의 유도 기전으로는 Fas/Fas-L계, sphingomyelin/ceramide 경로, 조기발현유전자(early immediate gene) 발현, 단백질 분해효소인 caspase계 cysteine protease, DNA 분절을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되어 있으며,<sup>13)</sup> 최근에는 caspase계 cysteine proteases (caspase family cysteine proteases)나 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 중요성이 제시되고 있다.<sup>14~</sup>

<sup>16)</sup> 또한 방사선조사에 의한 세포고사 유도는 유전자 손상

이 논문은 1999년도 원광대학교 의과대학연구소의 연구비 지원으로 시행되었음

이 논문은 2001년 3월 23일 접수하여 2001년 5월 14일 채택되었음.

책임저자: 문성록, 원광대학교 의과대학 방사선종양학교실

Tel: 063)850-1527, Fax: 063)851-4749

E-mail: sunrmoon@wonkwang.ac.kr

즉 DNA 이중나선의 파손과 TNF- $\alpha$ 에 의해 유도되는 세포고사와 관련이 있다고 알려진 sphingomyelin 신호전달경로의 역할 등이 제시되고 있다.<sup>17,18)</sup> Sphingomyelin은 방사선 조사에 의하여 ceramide로 분해된 후 stress-activated protein kinase C/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/ JNK)를 활성화하여 미토콘드리아로부터 세포질 내로 cytochrome c를 방출하고, 이는 caspases의 활성화를 통하여 세포고사를 일으킨다고 한다.

따라서 본 연구에서는 암 치료법의 하나로 사용되는 방사선 조사에 의하여 유발되는 세포고사의 신호전달기전, 특히 caspase계 cysteine protease의 활성화와 세포고사에 관련된 Bcl<sub>2</sub> 및 Bax 단백질, Fas 와 Fas-L 단백질의 발현양상 및 세포질내로의 cytochrome c의 방출을 조사하여, 방사선조사에 의한 세포고사의 특성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. HL-60 세포주 배양

급성전골수성백혈병 암세포주인 HL-60 (ATCC, CCL-240) 세포주를  $2 \times 10^5$  cell/ml 내지  $1 \times 10^6$  cell/ml 농도로 10% fetal bovine serum (FBS : PAA Laboratories, Austria)이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA) 세포배양액으로 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서(37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 배양하였다. RPMI 1640 세포배양액을 48시간 주기로 교체하였으며, mid-log phase에 있는 세포에 방사선을 조사한 뒤 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 2. 방사선조사(Ionizing radiation : IR)

방사선조사는 선형가속기(ML6M, Mitsubishi, Japan)에서 발생하는 6 MV X-선을 이용하여 실온에서 시행하였다. 선형가속기의 조사부를 180도 돌려서 후방조사를 시행하였으며, 배양용기의 상방에 10 cm 두께의 조직등가 물질을 올려놓아 산란선을 충분히 받을 수 있도록 하였으며 하방에 1.5 cm 두께의 조직등가 물질을 두어 build-up을 보정하였다. 방사선 조사야는 35×35 cm<sup>2</sup>로 하였으며 460 cGy/min의 선량율로 1.5 cm 길이에 각각 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy, 및 32 Gy 씩 조사하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

HL-60 세포의 생존율은 MTT (Sigma Co, St. Louis, MO) assay를 이용하였다. 세포 배양판(24-well plate)에  $1 \times 10^5$  세포를 1 ml의 배양액에 넣어 분주하여 3시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 각 조건의 방사선을

조사한 다음, MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 최종농도가 100  $\mu$ g/ml이 되도록 넣어주었다. 생존율의 판정은 MTT 처리 4시간 후에 살아있는 세포에 의해 생성된 불용성의 보라색 formazan을 용해시키기 위하여 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액을 1 ml/well씩 첨가하여 24시간 동안 37°C 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 방치하여 녹인 다음, ELISA 분석기로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

### 4. DNA추출 및 전기영동

세포의 DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co, Wisconsin Medicine, WI, USA)를 이용하였다. 방사선이 조사된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer (100 mM NaCl, 40 mM Tris · Cl, pH 7.4, 20  $\mu$ M EDTA, 0.5% SDS)를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA 침전체를 용해한 후 260 nm와 280 nm 의 spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 optical density (OD) 값을 측정하여 DNA를 정량 하였다. DNA 5 $\mu$ g을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### 5. Hoechst 염색

방사선조사 후 세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 방사선을 조사한 세포들을 4% 포르말데히드(formaldehyde) 용액에서 10분 고정시킨 후 생리식염수(PBS, pH 7.4)로 2회 세척하고 Hoechst 33342 (Sigma Co. St. Louis, MO) 염색약을 생리식염수에 10  $\mu$ M이 되게 희석하여 1시간 염색한 후 다시 생리식염수에서 세척하여 형광현미경(Leica, MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

### 6. Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포( $2 \times 10^6$ )를 4°C에서 15분 lysing buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 20,000×g 로 15분 원심 분리 시켰다. 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic

acid (BCA, Sigma, St. Louis, MO)법으로 단백질을 정량하고, 세포 파쇄액(단백질양: 100  $\mu$ g)을 분석용 완충용액(100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시킨 후 Fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. 먼저 caspase-1과 caspase-3의 활성측정은 각각 기질로 fluorogenic substrate인 Ac-YVAD-AMC (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 50  $\mu$ M 및 Ac-DEVD-AMC (Calbiochem Co.) 50  $\mu$ M을 사용하였으며, 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380 nm) 와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. Caspase-6 효소활성은 기질로서 Ac-VEID-AMC (Calbiochem Co.) 50  $\mu$ M을 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 380 nm (excitation wavelength) 와 460 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다. Caspase-2, Caspase-8 그리고 caspase-9의 효소활성은 각각 기질로서 Z-VVDVAD-AFC, Z-IETD-AFC (Calbiochem Co.) 및 Ac-LEHD-AFC (Calbiochem Co.) 50  $\mu$ M을 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm (emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다.

## 7. Western blotting

HL-60 세포에 방사선을 조사한 일정시간 후에 세포를 채취하여, cold Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 RIPA 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)으로 얼음 속에서 30분 용해하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질: 200  $\mu$ g)에 2 $\times$  sample buffer (100 mM Tris · Cl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol 4% SDS (electrophoresis grade), 0.2% bromophenol blue 20% glycerol)와 섞어 100°C에서 3분 끓인 후, 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 nitrocellulose membrane으로 4°C, 30V에서 16시간 이동시킨 후 blocking buffer (10% skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Anti-poly (ADP-ribosyl) polymerase (Santa Cruz Co, CA, USA), anti-Bcl2 (Santa Cruz), anti-Bax (Santa Cruz), anti-Fas (Santa Cruz) 그리고 anti-Fas-L (Santa Cruz)의 항체를 0.05% (v/v)의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered sample buffer (TBST)에 1:1000 으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시킨 후 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxydase (HRP) (Santa

Cruz)를 상온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence kit (ECL kit: Amersham)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

## 8. Cytochrome c 방출측정

방사선을 조사한 세포의 세포질내 cytochrome c 방출은 streptolysin O를 사용하는 Barry 등<sup>19)</sup>의 방법을 약간 변형시켜, 먼저 미토콘드리아와 세포질분획을 얻는 것으로부터 시작하였다. 방사선이 조사된 HL-60세포를 채취 후 cold PBS로 2회 세척한다. 이 채취된 세포를 106세포당 60 unit의 streptolysin O가 100  $\mu$ l의 stabilization buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 250 mM sucrose, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM sodium EDTA, 1 mM sodium EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin)에 들어가도록 조정하여 37°C에서 20분 반응시켰다. 다음에 4°C, 16,000 $\times$ g 하에서 30분 원심분리하여 세포질내 cytochrome c를 함유하는 상층액만을 얻었다. 얻어진 세포파쇄액에 2X sample buffer를 섞어 100°C에서 3분 끓인 후, 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 이후의 과정은 Western blotting 방법을 사용하였다. 이때 cytochrome c를 검출하기 위한 anti-cytochrome c 항체는 Pharmigen (BD Pharmigen, CA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다.

## 결 과

### 1. 방사선 조사에 의한 HL-60세포의 생존율

급성전골수성백혈병 세포주 HL-60의 방사선 조사선량의 변화에 따른 생존율 변화를 알아보기 위하여 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy, 16 Gy 및 32 Gy의 방사선을 조사한 후 24시간 후에 각각의 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 결과는 각각 15, 23, 50, 57, 75%의 생존율 감소를 보였다(Fig. 1A). 또한, 방사선에 의한 HL-60 세포사멸의 시간에 따른 변화를 관찰하기 위하여 16 Gy의 방사선량을 조사한 후 HL-60 세포의 생존율을 시간별로 조사하였다. HL-60 세포의 생존율은 16 Gy 방사선량 조사 4시간 후부터 4시간 간격으로 같은 방법으로 측정하였다. 4시간부터 생존율의 현저한 저하가 시작되어 16시간 이후에는 HL-60 세포의 생존률이 50%이상 감소하여 시간 의존적인 생존율 감소를 나타내었다(Fig. 1B).

### 2. DNA 분절

방사선조사에 의한 HL-60 세포사멸의 기전이 세포고사 이전에 의함을 확인하기 위해 세포고사 현상의 특징인 사다리

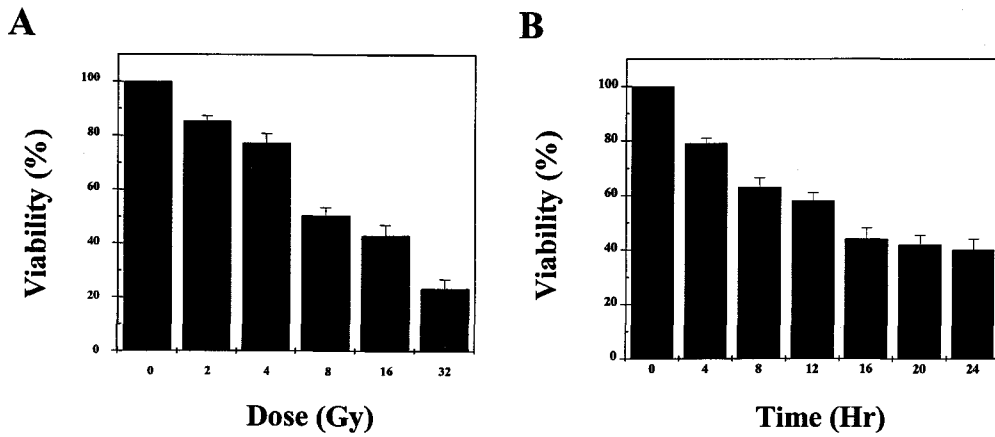


Fig. 1. Ionizing radiation decreased the viability of HL-60 cells in a dose and time-dependent manner. (A), Dose-dependant effect of cell viability. Cells were irradiated with different doses of ionizing radiation and cell viability was measured by MTT assay at 24 hours after irradiation. (B), Time dependent effect of ionizing radiation (16 Gy) on the viability of HL-60 cells. Data represent the mean  $\pm$  SD from triplicates.

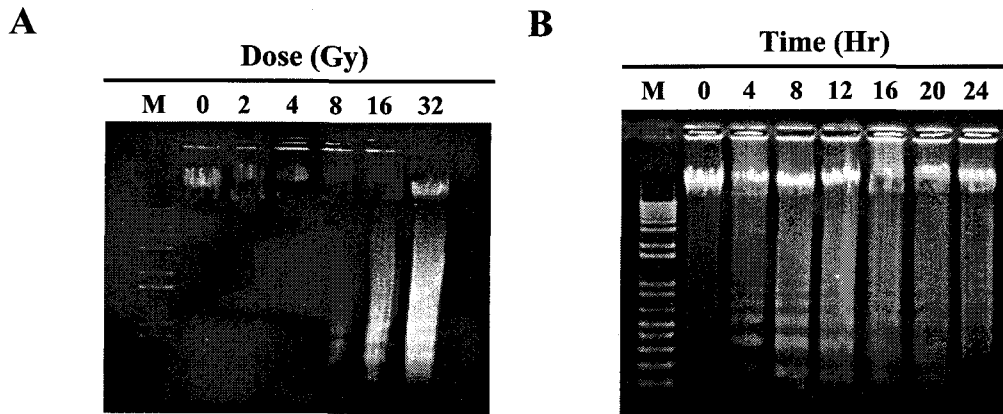


Fig. 2. Ionizing radiation induced the ladder pattern fragmentation of genomic DNA in HL-60 cells. (A), Cells were irradiated with different doses of ionizing radiation for 24 hours. Soluble cytoplasmic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gel. DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light. (B), Cells were irradiated with 16 Gy of ionizing radiation and DNA fragmentation was determined by agarose-gel electrophoresis in different times.

형 DNA 분절을 genomic DNA를 1.5% agarose gel 전기영동 방법으로 2, 4, 8, 16, 및 32 Gy의 방사선량을 조사한 24시간 후에 확인하였다. 8 Gy의 방사선량 조사 24시간 후에 사다리형 DNA 분절이 관찰되기 시작하여 16 Gy 및 32 Gy 방사선량 조사 후에는 현저한 사다리형 DNA 분절현상이 관찰되었다(Fig. 2A). 또한 방사선 조사에 의한 HL-60 세포의 세포고사 현상의 시간적 변화를 알아보기 위하여 16 Gy의 방사선량을 조사한 후 4시간 간격으로 DNA 분절현상을 관찰하였다. 16 Gy의 방사선량 조사 4시간 후 사다리형 DNA 분절이 관찰되다가 8시간 및 12시간 이후에는 더욱 현저한 사다리

형 DNA 분절이 형성되었다(Fig. 2B).

방사선조사 후 세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 16 Gy의 방사선량을 HL-60 세포에 조사한 후 Hoechst 염색을 시행하였다. 형광현미경을 이용한 검사에서 대조군 HL-60 세포핵은 타원형의 온전한 형태로 균질한 형광염색을 나타낸 반면, 방사선 조사군은 방사선 조사 12시간 후 핵이 여러 조각으로 분절된 형광 절편을 관찰할 수 있었으며, 이러한 현상이 방사선조사 후 24시간에 더욱 저명하게 관찰되었다(Data not shown). 이러한 결과는 방사선조사에 의한 HL-60 세포의 사멸은 세포고사 현상에 의하여 매개됨을 알 수 있

으며 방사선조사에 의한 HL-60세포의 세포고사 현상은 방사선조사선량과 조사 후 시간경과에 의존적임을 알 수 있었다.

**3. 방사선조사가 caspase 활성화에 미치는 영향**

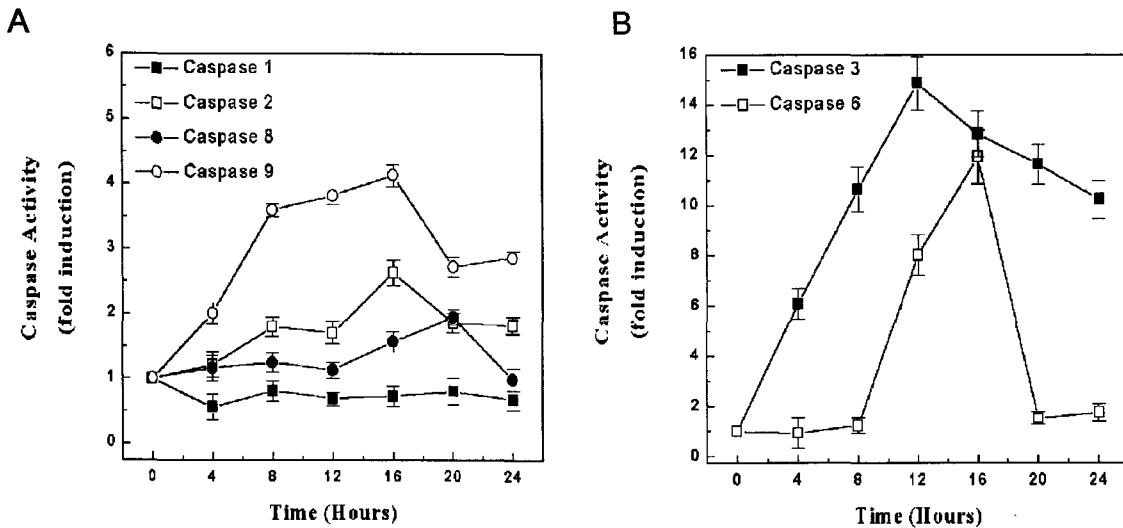
방사선조사에 의한 HL-60의 세포고사가 caspase의 활성화에 의한 것인지를 조사하기 위하여 caspase계 cysteine proteases 중에서 ICE-like cysteine protease라고 알려진 caspase-1 (YVAD- specific protease), caspase-2, CPP32-like cysteine protease라고 알려진 caspase-3 (DEVD-specific cysteine protease), caspase-6, FLICE라고 알려진 caspase-8 그리고 caspase-9의 효소적 활성을 이들 caspases의 형광기질을 이용하여 조사하였다. 16 Gy의 방사선량을 HL-60 세포에 조사한 후 4시간 간격으로 24시간 여러 caspase계 효소의 활성을 세포용해액으로부터 측정하였다.

Caspase-1은 대조군에 비교하여 방사선조사 24시간까지 시간경과에 따른 유의한 활성변화를 보이지 않았다. Caspase-2의 효소적 활성은 방사선조사 4시간 후부터 증가하기 시작하여 16시간에는 대조군에 비하여 2.7배의 증가된 활성을 보였으며 시간경과에 따라 약간 감소하였다. Caspase-8은 방사선조사 12시간까지 별다른 변화를 보이지 않았으나 16시간 및 24시간 실험군에서 점차 증가하여 24시간 후에는 대조군에 비하여 2배정도 증가된 후에는 바로 감소하였다. Caspase-9는 방사선조사 4시간부터 효소적 활성이 증가하다 16시간째에 최고치에(대조군의 4.2배정도) 달했으며 이후 서서히 감

소하였으나 24시간 후에도 2.8배의 증가된 활성을 보였다 (Fig. 3A).

Caspase-3는 방사선조사 4시간부터 효소적 활성이 증가하여 12시간 후에는 대조군에 비하여 15배의 증가된 효소적 활성을 보인 후 시간 경과에 따라 감소하였으나 24시간 후에도 10배정도의 증가된 효소적 활성을 보였다(Fig. 3B). 또한 caspase-3 활성화에 의한 세포내 단백질의 변화를 Western blotting을 통한 procaspase-3의 proteolytic processing 및 활성화된 caspase-3의 기질인 poly (ADP-ribsyl) polymerase (PARP) cleavage 정도를 통하여 확인하였다. 먼저, procaspase-3는 34 kDa의 분자량을 나타내며, 이 전구체로부터 상위 caspase, 즉 caspase-9 등에 의해 활성화 될 때 20 kDa과 11 kDa의 2개의 processing 된 fragments를 나타내게 되는데 그림 4A에서는 procaspase-3인 34 kDa과 이로부터 잘려 나온 p20과 p11을 보여주고 있다. Caspase-3의 기질중의 하나인 PARP는 핵안에 존재하면서 손상된 DNA복구에 관련된 단백질로써 세포고사가 일어나면 caspase에 의해 116 kDa 크기의 단백질이 절단되어 85 kDa 과 27 kDa 의 단편으로 절단되게 된다. PARP 또한, 방사선조사 4시간 후부터 116 kDa의 온전한 형태의 단백질이 85 kDa로 분절되었다(Fig. 4B).

Caspase-6 활성측정 결과는 방사선조사 8시간 이후부터 활성이 증가하다 caspase-3 보다는 느리게 16시간에 최고치에(대조군의 12배정도) 달했으며 이후 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 3B). 이상의 결과는 caspase-8의 활성이 caspase-3과



**Fig. 3.** Irradiation increased the catalytic activity of caspase family cystein proteases in HL-60 cells. Cells were irradiated with 16 Gy ionizing radiation. Cell lysates were used to measure the enzymatic activation of caspases by using fluorogenic substrate for caspase-1, 2, 8, 9 protease (A) and caspase-3, 6 proteases (B). Data represent the mean±SD from triplicates.

caspase-9에 비하여 뒤늦게 증가하며 또한 증가정도도 미약함을 알 수 있었다.

#### 4. 방사선조사가 Cytochrome c 방출에 미치는 영향

세포고사 자극 등에 의한 미토콘드리아의 membrane permeability potential의 변화가 야기되면, 이때 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 세포질내로 방출되어 Apaf-1, dATP 등과 complex를 형성하여 caspase-9 등의 활성화에 관여한다. 방사선조사에 의한 HL-60 세포고사시 세포질내로 Cytochrome c의 방출이 일어나는지 조사하였다. 이를 위해 16 Gy의 방사선량을 조사한 후 세포질 추출액 만을 얻은 후 Western blotting을 이용하여 세포질내 방출된 cytochrome c를 확인하였다. Fig. 5의 결과에서 보이는 바와 같이 cytochrome c (40 kDa)의 방출은 방사선조사 30분 후부터 시간경과에 따라 증가함을 확인하였다.

#### 5. 방사선조사에 의한 Bcl<sub>2</sub> 및 Bax 단백질 발현양상

세포의 생존을 위하여 세포사멸을 억제하는 기능이 밝혀진 Bcl<sub>2</sub>와 세포사멸을 촉진하는 Bax 단백질의 발현이 방사선 조사에 의해 유도되는 지를 조사하기 위하여 16 Gy의 방사

선량을 HL-60세포에 조사한 후 24시간 동안 4시간 간격으로 세포를 수거하여 Bcl<sub>2</sub> 및 Bax 단백질에 대하여 Western blotting을 시행하였다. Bcl<sub>2</sub> 단백질(29 kDa)은 방사선조사 후 시간이 경과함에 따라 감소하였다(Fig. 6A). 이와는 반대로 Bax 단백질(23 kDa)은 방사선조사 후 시간경과에 따라 발현이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 6B).

#### 6. 방사선조사에 의한 Fas 및 Fas-L 단백질 발현양상

Fas/Fas-L의 결합은 Fas-associated death domain (FADD) 단백질을 활성화시키고, 이는 연이어 caspase-8의 활성화로 이어져 caspase cascade를 활성화시킨다. 방사선조사에 의해 유도되는 HL-60 세포고사 과정에서 caspase계 cysteine protease의 활성화를 관찰하였기에 방사선조사 후 Fas 및 Fas-L 발현에 미치는 영향을 조사하였다. HL-60세포에 16 Gy의 방사선량을 조사한 후 4시간 간격으로 세포를 수거하여 Fas 및 Fas-L 단백질에 대하여 Western blotting을 시행하였다. Fas 단백질(45 kDa)과 Fas-L 단백질(40 kDa) 모두 방사선조사 후 발현이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 7A, 7B).

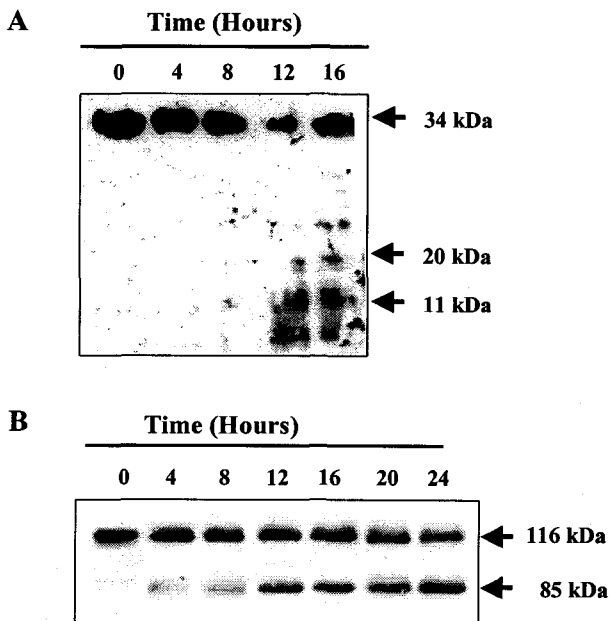


Fig. 4. Digestion of procaspase-3 and PARP by irradiation in HL-60 cells. Cells were irradiated with 16 Gy ionizing radiation for the various periods. Equal amount of protein (200 µg) from cell lysate was subjected on 12.5% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase-3 (A), and anti-PARP antibodies (B). The immunoreactive signals were visualized by Enhanced chemiluminescence (ECL) kit.

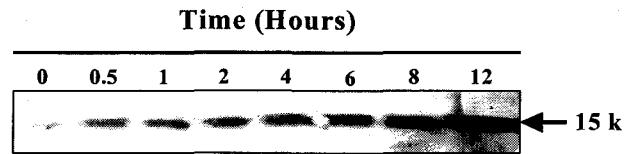


Fig. 5. Irradiation induced the release of cytochrome c from HL-60 cells in a time dependent manner. Cells were irradiated with 16 Gy ionizing radiation for the various periods. Cytoplasmic extracts were prepared by the methods described in "Materials and Methods", and measured the released cytochrome c by Western blotting using anti-cytochrome c antibody.

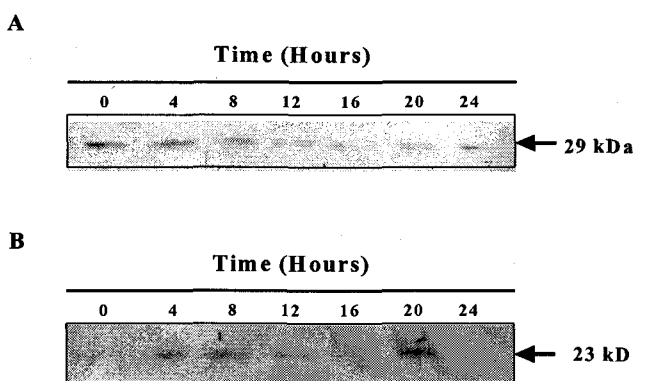
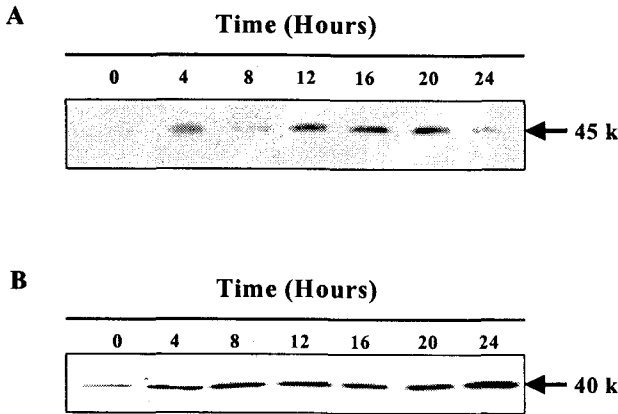


Fig. 6. The degradation of Bcl<sub>2</sub> as well as expression of Bax in irradiated HL-60 cells at the various periods after 16 Gy ionizing radiation. The expression of Bcl<sub>2</sub> and Bax were detected by Western blotting analysis using anti-Bcl<sub>2</sub> (A) and anti-Bax antibodies (B) (Santa Cruz Co, CA, USA).



**Fig. 7.** Induction of Fas/Fas-L in irradiated HL-60 cells at the various periods after 16 Gy ionizing radiation. The expression of Fas and Fas-L was detected by Western blotting analysis using anti-Fas antibody (A) and anti-Fas-L antibody (B) (Santa Cruz Co, CA, USA).

**고안 및 결론**

세포고사의 유발 요인으로는 여러 가지를 들 수 있는데 후천성 면역결핍증이나 알츠하이머병 등에서 세포고사가 증가되고, transforming growth factor-β (TGF-β), 온열요법, 항암제, 방사선조사시에도 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있다.<sup>6-8)</sup> 본 연구에서 사용된 HL-60 세포주에서도 방사선조사에 의해 세포고사 현상이 유도됨을 세포고사 현상의 특징 중 하나인 사다리형 DNA 분절과 Hoechst 염색을 통한 핵내의 분절된 형광절편을 확인하여 증명할 수 있었다.

세포고사의 작용기전으로는 Fas/Fas-L system, sphingomyelin/ceramide 경로, 조기발현유전자(early immediate gene) 발현, 세포고사관련 단백질 분해 효소인 caspase계 cysteine protease, DNA 절단을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다.<sup>20, 21)</sup> 세포고사 과정에서 DNA 분절에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 인정되고 있는 것으로 caspase계 cysteine protease를 들 수 있다. Caspase계 cysteine protease는 염증반응이나 포유동물의 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서 정상적으로 세포 내에 불활성화 효소 형태로 존재하다가 세포고사 유도 자극 시 활성화된다. 이러한 caspase는 지금까지 14종류가 알려져 있다.<sup>21)</sup>

Caspase-1은 합성된 pro-interleukin (IL)-1β를 processing 하여 활성화된 IL-1β로 만들어 주거나 다른 caspase들에 의해 활성화된 후 세포내 중요 단백질들을 절단하여 세포고사를 유도한다고 알려져 있다. 그러나 최근 Watson 등<sup>22)</sup>은 염증반응 등에서 진행되는 과립구의 세포고사시 활성화된 caspase-1

이 항세포고사역할(antiapoptotic role)도 수행할 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서 방사선조사에 의한 caspase-1의 활성변화를 관찰하였으나 방사선조사 후 caspase-1의 활성변화는 나타나지 않았다.

Caspase-2의 과발현은 다양한 세포에서 세포고사를 유발하나 FDC-P1 영양인자요구 세포주에서의 영양인자 결핍에 의한 세포사멸시 caspase-2의 antisense를 넣어주어 caspase-2의 합성이 저해되면 세포고사도 저해됨이 보고되어 있어 caspase-2의 세포고사경로에서의 역할을 잘 설명하고 있다.<sup>23, 24)</sup> 또한 최근 caspase-2는 전구체의 prodomain 부위가 TNF-R1 complex를 경유해서 일어나는 세포사멸 신호전달 과정에 관여하고 있다고 알려진 death adaptor molecule RAIDD와 결합하고 있다고 보고되었다.<sup>25)</sup> 한편 Harvey 등<sup>26)</sup>은 다양한 세포고사 자극에 의해 procaspase-2가 활성화되어 active caspase-2로 processing 되며 이러한 과정은 caspase-3의 활성화보다 미리 일어나는 결과를 확인하고 보고하였다. 본 연구에서 caspase-2의 활성은 방사선조사 후 16시간째에 대조군에 비해 2.5배 이상의 활성증가를 확인하였다.

Caspase-3는 protease cascade의 하방에 위치하여 여러 세포사망경로가 공통으로 통과하는 중요한 경로로 전구물질로부터 활성화되면 DNA 복구와 스트레스관련 발현유전자의 활성화와 기능유지에 중요한 PARP를 분해하여 세포고사에 작용한다. 또한 Nicholson 등<sup>27)</sup>은 세포고사시의 세포질 추출물과 건강한 핵을 이용한 cell free system 및 caspase-3 발현을 억제한 knockout mice 실험 등에서 caspase-3가 세포고사 유도에 필수적임을 규명하였다. 한편, Fas 혹은 TNF 매개성 세포고사에서의 caspase-3의 활성은 caspase-8에 의하여 매개된다고 보고되고 있다.<sup>28)</sup> 본 연구에서 caspase-3의 활성은 방사선조사 직후 증가되기 시작하여 12시간에는 대조군에 비하여 15배정도 증가함을 관찰하였고, 이러한 caspase-3의 활성도 증가는 caspase-9와는 거의 동시에 시작되었으며, caspase-6과 caspase-8은 이보다 뒤늦게 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다. 이러한 caspase의 활성변화와 시간경과에 따른 세포의 생존율 변화를 비교해 볼 때, 방사선조사에 의한 HL-60세포의 세포고사는 caspase-9와 caspase-3의 활성화가 먼저 일어나며 이들의 활성도 증가 정도가 주로 작용한 것으로 추정된다.

PARP는 손상된 DNA복구에 관여된 단백질로서 세포고사 과정 중 caspase에 의해서 잘려지는 것으로 보고되어 있다.<sup>29)</sup> PARP 절단은 세포고사 현상에서 DNA 분절과정에 필연적인 것으로 생각되어 왔으나 최근에는 DNA 분절과 PARP 절단은 서로 상호의존적이지는 않다는 보고도 있다.<sup>30)</sup> 본 연구에서 16 Gy 방사선조사 4시간 이후부터 PARP가 85 kDa단편으

로 잘려지는 것이 관찰되었다. 이는 방사선조사에 의한 HL-60의 세포고사에 활성화된 caspase-3에 의해서 PARP가 절단되면서 생기는 세포내 신호전달기전이 관여함을 의미하였다.

Bcl<sub>2</sub>는 사람의 림프종(human follicular lymphomas)과 유관한 암유전자로서 단백질의 분자량은 26 kDa이며, 다른 암유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여한다고 알려져 있다.<sup>31)</sup> Bcl<sub>2</sub>는 산화-환원(redox cycle) 상태조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase계 cysteine protease 활성화, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절화, 스트레스에 의한 세포고사 신호전달계(JNK 및 p38)의 활성화조절 등의 기능을 통하여 세포를 죽음으로부터 보호한다고 알려져 있다. Bax단백질은 Bcl<sub>2</sub>와는 달리 세포고사를 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있다. 본 연구에서도 Bcl2 발현은 시간경과에 따라 감소하였으며, 이와는 반대로 Bax 발현은 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 방사선조사에 의한 세포고사에 Bcl<sub>2</sub>와 Bax가 관여하였음을 시사하고 있다.

Cytochrome c는 정상적으로는 미토콘드리아의 내외막 사이에 존재하여 respiratory chain에서의 전자전달자의 역할을 수행한다. 그러나 세포고사시 cytochrome c가 초기에 세포질로 방출되며 방출된 cytochrome c는 Apaf-1, dATP등과 함께 caspase-9을 활성화시킨다.<sup>32)</sup> 이러한 cytochrom c의 방출기전에 대한 것은 아직 충분히 밝혀져 있지 않지만 Bcl2 및 Bcl-XL(방출저해) 그리고 Bax(방출촉진)등에 의해 조절되는 것으로 알려지고 있다.<sup>33)</sup> 이어서 활성화된 caspase-9는 다음 단계의 caspase-3를 활성화를 촉진한다. 본 연구 결과는 방사선조사에 의하여 Bcl<sub>2</sub> 발현감소 및 Bax 발현증가와 함께 빠른 시간내에 세포질로의 cytochrome c의 방출이 일어남을 보여주며 이어 caspase-9 및 caspase-3의 활성화가 진행됨을 알 수 있었다.

APO-1 혹은 CD95라고도 알려져 있는 Fas 및 이의 ligand인 Fas-L은 세포고사 신호를 전달하는 activation-induced cell death (AICD)의 mediator라고 알려져 있다. 특히 면역반응을 약화시키거나 cytotoxic T 세포의 활성화 혹은 자연살해세포를 활성화시켜 종양세포를 제거하는데 Fas/Fas-L system은 중요하다 알려져 있다. 또한 최근에 여러 종류의 항암 치료제가 Fas/Fas-L system을 통하여 세포고사 신호를 전달한다고 보고된 바 있으며<sup>13)</sup> Fas 수용체는 Fas-L의 결합에 의하여 세포고사 활성화 신호를 FADD에 전달하고 FADD는 비활성화 형태인 initiator caspase인 caspase-8을 활성형으로 전환시킨다고 알려져 있다. 본 연구에서도 방사선조사에 의한 Fas 및 Fas-L의 발현증가를 확인할 수 있었고, Fas 및 Fas-L의 발현이 증가된 이후에 caspase-8의 활성이 증가되는 현상을 관찰 할 수

있었다.

이상의 연구결과를 종합하면 방사선조사가 HL-60 세포에서 방사선조사선량과 조사 후 시간경과에 의존적으로 세포고사를 유발시키고, 이러한 세포의 사멸은 방사선조사가 Bcl2의 발현감소 및 Bax의 발현증가와 관련되어 미토콘드리아에서 세포질내로 cytochrome c를 방출시켜 caspase-9와 caspase-3의 활성도를 증폭 시켰고, 이때 활성화된 caspase-3은 caspase-6의 활성도를 증폭시키고 PARP를 분절시킴을 확인할 수 있었다. 또한 Fas 및 Fas-L 단백질의 발현을 증가시켜 caspase-8을 다소 증가시켰으며, caspase-2의 활성 증가도 확인할 수 있었다. 따라서 방사선조사에 의한 HL-60의 세포고사는 세포내 세포고사 신호전달기전 중 caspase계 cysteine proteases의 순차적인 활성화를 유도시켜 이루어지며 이때 Bcl2의 발현증가와 Bax의 감소 등에 기인된 cytochrome c의 세포질내로의 방출과정을 통하여 이루어지며, Fas, Fas-L가 관여하는 신호전달경로의 활성화도 연관되어 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Yarnold J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997;44:1-7
2. Carr AM, Hoekstra MF. The cellular response to DNA damage. *Trends Cell Biol* 1995;5:32-40
3. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol* 1995;18:137-153
4. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449
5. White E. Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes Dev* 1993;7:2277-2284
6. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2353-2362
7. Barry MA, Reynold JE, Eastman A. Etoposide induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* 1993;53:2349-2357
8. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257
9. Szumiel I. Ionizing radiation-induced cell death. *Int J Radiat Biol* 1994;66:329-341
10. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. *Science* 1993;262:695-700
11. Williams GT. Apoptosis in the immune system. *J Pathol* 1994;173:1-4
12. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and



- oncogenesis. *Cell* 1991;65:1097-1098
13. **Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S.** Sequential activation of ICE-like and CPP32-like protease during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996;380:723-726
  14. **Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, et al.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171
  15. **Blenis J.** Signal transduction via the MAP kinase. *Proc Nat Acad Sci USA* 1993;90:5889-5994
  16. **Xia Z, Dickens M, Raingaud J, Davis RJ, Greenberg ME.** Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-1331
  17. **Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D.** Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994;180:525-535
  18. **Ward JF.** DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation and repairability. *Proc Nucleic Acid Mol Biol* 1988;35:95-125
  19. **Barry EL, Gesek FA, Friedman PA.** Introduction of antisense oligonucleotides into cells by permeabilization with streptolysin O. *Biotechniques* 1993;15:1016-1018
  20. **Tewari M, Dixit VM.** Fas and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem* 1995;270:3255-3260
  21. **Thornberry NA, and Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316
  22. **Watson RW, Rotstein OD, Parodo J, Bitar R, Marshall JC.** The IL-1 $\beta$ -converting enzyme (caspase-1) inhibits apoptosis of inflammatory neutrophils through activation of IL-1  $\beta$ . *J Immunol* 1998;161:957-962
  23. **Wang L, Miura M, Bergeron L, Zuh H, Yuan J.** ICH-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 1994;78:739-750
  24. **Kumar S, Harvey NL.** Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death. *FEBS Lett* 1995; 375:169-173
  25. **Duan H.** RAIDD is a new "death adaptor molecule" *Nature* 1997;385:86-89
  26. **Harvey NL, Butt AJ, Kumar S.** Functional activation of Nedd2/ICH-1 (Caspase-2) is an early process in apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:13134-13139
  27. **Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis *Nature* 1995;376:37-43
  28. **Alnemri ES.** Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997;64:33-42
  29. **Hideki S, Masato E.** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391:96-99
  30. **Chinnaiyan AM, Dixit VM.** The cell-death machine. *Curr Biol* 1996;6:555-562
  31. **Reed JC.** Bcl<sub>2</sub> and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6
  32. **Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157
  33. **Kim CN, Wang X, Huang Y, et al.** Overexpression of Bcl-X(L) inhibits Ara-C-induced mitochondrial loss of cytochrome c and other perturbations that activate the molecular cascade of apoptosis. *Cancer Res* 1997;57:3115-3120

---

**Abstract**

---

## **A Study on Apoptotic Signaling Pathway in HL-60 Cells Induced by Radiation**

Hye Jung Kim, M.D.\*, Sung Keun Moon, M.D.\*,  
Jae Hoon Lee, M.D.\* and Sun Rock Moon, M.D., Ph.D.\*†

\*Medical Science Institute, †Department of Radiation Oncology  
Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea

**Purpose** : The mechanical insights of death of cancer cells by ionizing radiation are not yet clearly defined. Recent evidences have demonstrated that radiation therapy may induce cell death via activation of signaling pathway for apoptosis in target cells. This study is designed whether ionizing radiation may activate the signaling cascades of apoptosis including caspase family cysteine proteases, Bcl<sub>2</sub>/Bax, cytochrome c and Fas/Fas-L in target cells.

**Materials and Methods** : HL-60 cells were irradiated in vitro with 6 MV X-ray at dose ranges from 2 Gy to 32 Gy. The cell viability was tested by MTT assay and the extent of apoptosis was determined using agarose gel electrophoresis. The activities of caspase proteases were measured by proteolytic cleavages of substrates. Western blot analysis was used to monitor PARP, Caspase-3, Cytochrome-c, Bcl-2, Bax, Fas and Fas-L.

**Results** : Ionizing radiation decreases the viability of HL-60 cells in a time and dose dependent manner. Ionizing radiation-induced death in HL-60 cells is an apoptotic death which is revealed as characteristic ladder-pattern fragmentation of genomic DNA over 16 Gy at 4 hours. Ionizing radiation induces the activation of caspase-2, 3, 6, 8 and 9 of HL-60 cells in a time-dependent manner. The activation of caspase-3 protease is also evidenced by the digestion of poly (ADP-ribose) polymerase and procaspase-3 with 16Gy ionizing irradiation. Anti-apoptotic Bcl2 expression is decreased but apoptotic Bax expression is increased with mitochondrial cytochrome c release in a time- dependent manner. In addition, expression of Fas and Fas-L is also increased in a time dependent manner.

**Conclusion** : These data suggest that ionizing radiation-induced apoptosis is mediated by the activation of various signaling pathways including caspase family cysteine proteases, Bcl<sub>2</sub>/Bax, Fas and Fas-L in a time and dose dependent manner.

---

**Key Words** : HL-60, Apoptosis, Radiation