

# Retinoic acid가 사람 정상 구강각화세포의 방사선감수성에 미치는 영향에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소

\*서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실, 치학연구소 및 BK 21

\*\*강릉대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실

이 진 · 허민석 · 이삼선\* · 오성욱 · 이설미\*\* · 최항문\*\* · 최순철\* · 박태원

## Effect of retinoic acid on the radiosensitivity of normal human oral keratinocyte

Jean Lee, Min-Suk Heo, Sam-Sun Lee\*, Sung-Ook Oh, Sul-Mi Lee\*\*,

Hang-Moon Choi\*\*, Soon-Chul Choi\*, Tae-Won Park

Dept. of Oral and Maxillofacial Radiology and Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

\*Dept. of Oral and Maxillofacial Radiology, Dental Research Institute, and BK21, College of Dentistry, Seoul National University

\*\*Dept. of Oral and Maxillofacial Radiology, Kangnung National University

### ABSTRACT

**Purpose** : To evaluate the effect of all-trans-retinoic acid (ATRA) on the radiosensitivity of normal human oral keratinocyte (NHOK).

**Materials and methods** : Relative cell survival fraction including SF2 (survival fraction at 2 Gy) was calculated on the basis of colony formation assay. Data were fitted to the linear-quadratic model to establish the survival curve and calculate  $\alpha$  and  $\beta$  values. Using flow cytometry at 1, 2, 3, 4, and 5 days after exposure to 2 and 10 Gy irradiation, cell cycle arrest and apoptosis were analysed. To understand the molecular mechanism of the radiosensitization of ATRA on NHOK, proteins related with apoptosis and cell cycle arrest were investigated by Western blot analysis.

**Results** : Treatment with ATRA resulted in a significant decrease of SF2 value for NHOK from 0.63 to 0.27, and increased  $\alpha$  and  $\beta$  value, indicating that ATRA increased radiosensitivity of NHOK. ATRA increased LDH significantly, but increasing irradiation dose decreased LDH, suggesting that the radiosensitizing effect of ATRA is not directly related with increasing cell necrosis by ATRA. ATRA did not induce apoptosis but increased G2 arrest after 10 Gy irradiation, implying that the increased radiosensitivity of NHOK may be due to a decrease in mitosis caused by increasing G2 arrest. ATRA inhibited the reduction of p53 at 3 days after 10 Gy irradiation and increased p21 at 1 day after 10 Gy irradiation. Further study is required to determine the precise relationship between this effect and the radiosensitizing effect of ATRA.

**Conclusion** : These results suggested that ATRA increase radiosensitivity by inhibiting mitosis caused by increasing G2 arrest. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2003; 33 : 97-105)

**KEY WORDS** : keratinocyte; radiation, ionizing; retinoids

### 서론

세포가 DNA 손상을 야기할 수 있는 전리방사선이나 항암제에 노출되었을 때 세포는 세포사에 이르거나 세포주

기를 일시적으로 정지하여 분열을 지연하기도 한다. 세포사에는 세포괴사와 예정된 세포사인 apoptosis가 있으며 방사선에 의해 유도된 세포사의 유형은 세포의 종류에 따라 다르게 나타난다.<sup>1</sup>

인체를 구성하는 세포와 조직은 다양한 방사선감수성을 보이는데 이는 세포가 가지고 있는 고유의 방사선감수성과 방사선에 의한 손상을 회복할 수 있는 능력에 차이가 있기 때문이다.<sup>2</sup> 세포의 고유한 방사선감수성은 방사선조사 이후 세포가 나타내는 다양한 반응에 영향을 미치며,<sup>3</sup>

접수일 : 2003년 3월 20일; 심사일 : 2003년 3월 21일; 채택일 : 2003년 4월 30일  
Correspondence to: Prof. Sam-Sun Lee  
Department of Oral and Maxillofacial Radiology College of Dentistry, Seoul National University 28, Yeongon-Deong, Jongno-Gu, Seoul, 110-749, KOREA  
Tel) 82-2-760-3978, Fax) 82-2-744-3919  
E-mail) raylee@snu.ac.kr

세포의 종류,<sup>4</sup> 분화정도<sup>5</sup>와 관계가 있다. 일반적으로 정상세포에 비해 중앙세포가, 분화된 세포보다 미분화된 세포가, 간엽세포보다는 상피세포가 방사선감수성이 높다고 알려져 있다.<sup>6</sup> 그러나 같은 세포라도 방사선조사에 대한 세포의 반응은 방사선 흡수선량 이외에도 세포의 생리적 조건과 산소분압이나 온도와 같은 조사환경요인, 방사선방어제나 증강제 같은 약물요인에 의해서도 달라질 수 있다.

retinoic acid는 vitamin A의 유사체로서 태아세포와 상피세포를 포함한 다양한 세포의 분화 및 성장에 영향을 미친다.<sup>7</sup> 또한 자연계에 존재하는 vitamin A와 합성 vitamin A는 암생성의 과정을 억제함이 보고되었다.<sup>8</sup> all-trans-retinoic acid (ATRA)는 사람 정상 섬유모세포와 변형 섬유모세포, 사람 유방암세포, 사람과 생쥐의 흑색종세포, 두경부암세포에 대해 방사선감수성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>9-11</sup> retinoic acid가 방사선에 대한 세포의 반응에 영향을 미치는 것은 물리화학적인 효과라기 보다는 유전자 전사에 대한 조절에 의한 것으로 보고 있다.<sup>12</sup> 이제까지의 세포생물학이나 방사선생물학적 자료를 근거로 할 때 retinoic acid의 방사선감수성 증강효과는 손상에 대한 회복 과정을 방해함으로써 이루어지는 것으로 생각되나 명확하지는 않다.<sup>8</sup>

이 등<sup>13</sup>의 연구에 의하면 1 μM ATRA를 처리한 NHOK와 두경부 편평세포암종세포주에 방사선을 조사했을 때 2 Gy에서의 세포생존율인 SF2가 ATRA를 투여하지 않은 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켜 NHOK의 방사선감수성을 증가시켰다고 보고하였다. 그러나 ATRA가 NHOK에서 방사선감수성을 증가시키는 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않아 본 연구에서는 ATRA 투여시 NHOK에서 나타나는 방사선감수성 증가가 세포주기 지연, 세포괴사, apoptosis와 어떤 관련이 있는지 밝혀보고자 하였다.

NHOK에 1 μM ATRA를 투여한 후 방사선을 조사하여 집락형성정량(colonogenic assay)에 기초하여 세포생존율을 구하고 세포생존곡선을 그려 방사선감수성을 비교한 후, lactate dehydrogenase (LDH) 분석을 시행하고 세포주기의 변화와 apoptosis를 분석하였으며 세포주기와 apoptosis가 관련된 단백질의 발현정도를 관찰하였다.

Howard와 Stephen<sup>14</sup>은 DNA 합성과 세포분열사이의 G1기와 G2기가 존재하고 세포에 방사선을 조사하였을 때 G1기와 G2기가 연장되어 S기와 M기로의 이행이 지연된다고 하였다. 방사선조사 이후의 세포주기 지연은 DNA 복제나 세포분열 전에 손상을 회복하기 위한 것이며<sup>15</sup> 여러 연구에서 caffeine과 같은 G2기를 짧게 하는 약물을 첨가하였을 때 이러한 회복과정에 대한 방해 때문에 세포생존이 현저하게 감소하는 경향을 보였다.<sup>16,17</sup> DNA 복제나 세포분열에 앞서 손상을 회복하지 못했을 때는 돌연변이를 일으키고<sup>18,19</sup> 다양한 횡수의 세포분열을 한 뒤 결국 세포사가 일어나게되며 이러한 종류의 세포사를 mitotic death

라 한다. 이러한 형식의 세포사는 조혈세포가 아닌 세포에서 주로 일어난다.<sup>18</sup>

ATRA는 세포증식을 억제하고 분화를 촉진하며, 신경모세포종을 포함한 여러 암세포에 대해 apoptosis를 촉진하기 때문에 인체의 암종에 대한 치료방법이 되고 있다.<sup>19</sup> 또한 Dierov 등<sup>20</sup>은 ATRA가 성인의 T-세포 백혈병 세포에 대해서 apoptosis를 유발하고 p53 발현을 증가시켰다고 하였다. 그러나 Tieu 등<sup>21</sup>은 ATRA가 SH-SY5Y 신경모세포종에 대해서는 p53에 의존하는 apoptosis에 대해 저항을 갖게 한다고 하여, ATRA의 작용이 세포의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있음을 시사하였다.

CHO (chinese hamster ovarian)세포에  $6.7 \times 10^{-5}$  M의 retinoic acid를 첨가하여 방사선을 조사하였을 때 retinoic acid가 방사선 방어 효과를 나타냈으나 이 농도의 2배 농도를 투여한 경우에는 방사선감수성이 증가하였다는 연구가 있었다.<sup>22</sup> 또한  $10^{-2}$  M 정도의 고농도에서는 retinoic acid가 치명적인 손상으로부터의 회복을 방해하여 쥐의 섬유모세포의 방사선감수성이 증가됨이 보고되어<sup>23</sup> retinoic acid가 농도에 따라 방사선감수성에 미치는 영향이 다를 수 있었다.

Gurdrun 등<sup>7</sup>은 유방암세포에서 9-cis-retinoic acid를 interferon-γ와 함께 투여하면 방사선감수성의 증가를 더욱 상승시킨다고 보고하였다. Duchesne 등<sup>2</sup>은 방광과 폐의 암세포주에 대해 ATRA를  $10^{-9}$  M에서  $10^{-4}$  M까지 투여한 후 방사선을 조사하였을 때  $10^{-7}$  M 농도에서 세포의 형태나 세포주기의 변화 없이 방사선감수성을 증가시킨다고 보고하였다. 이때 2 Gy에서의 세포생존율 저하는 치유될 수 없는 손상에 의한 세포사를 나타내는 α값의 변화보다는 치유될 수 있는 손상에 의한 세포사의 정도를 나타내는 β값의 변화에 의하여 좌우되었다고 하였는데 α값과 β값은 방사선조사 후 세포의 복제율을 기술하기 위해 사용되는 세포생존율(S)과 방사선조사량(D)의 관계식인 cell survival (S) =  $\exp(-\alpha D - \beta D^2)$ 에 의하여 구해졌다.

Schiller 등<sup>8</sup>에 의하면 증식상태에 있는 정상 섬유모세포, 변형 섬유모세포, 생쥐의 흑색종 세포주에 10 μM ATRA를 투여후 방사선을 조사하였을 때 중앙세포 뿐만 아니라 정상세포인 섬유모세포도 방사선감수성이 증가하였으며 세포생존곡선에서 주로 β값의 변화보다는 α값의 변화가 컸다고 하였다. 이들은 α값의 변화는 세포의 고유한 방사선감수성의 변화를 반영한다고 하였다. Hoffman 등<sup>24</sup>에 의하면 두경부 편평세포암종에서 ATRA와 interferon-α의 투여가 방사선감수성을 크게 증가시켰으며 β값보다는 α값의 증가에 의한 것임을 보고하였다.

이와 같이 retinoic acid를 투여한 후에 나타나는 방사선감수성의 증가가 β값의 변화보다는 α값의 변화와 관계가 있다고 하였으나 Duchesne 등<sup>2</sup>의 연구에서처럼 β값의 변화에 의한다는 보고도 있어 세포 종류와 retinoic acid의 농

도에 따라 그 결과가 다양할 수 있음을 알 수 있었다.

## 재료 및 방법

### 1. 사람 정상 구강각화세포 배양

건강한 성인 남녀의 치은 조직을 칼슘과 마그네슘이 들어있지 않은 Hank's balanced salt 용액(CMF-HBSS: Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)에 담그고 3회 교체하였다. 상피조직만을 분리하기 위해 진피조직을 제거한 후 collagenase (type II, 1.0 mg/ml: Sigma, St. Louis, MO, USA)와 dispase (grade II, 2.4 mg/ml: Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)를 함유한 CMF-HBSS에 37°C에서 90분간 처리하였다. 분리한 상피를 잘게 잘라서 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA (trypsin-EDTA) (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)로 처리하여 각화세포를 분리하였다. 얻어진 세포는 성장인자를 보충한 keratinocyte growth medium (KGM: Clonetics Co., San Diego, CA, USA)에 섞어 60 mm 배양접시당  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 분주하고 7일간 배양한 뒤 2차 배양하였다. ATRA 투여군은 방사선조사 2일 전에 ATRA (R2625, Sigma, St. Louis, MO, USA)가 1  $\mu$ M의 농도가 되도록 배지에 넣어주었다.

### 2. 방사선조사

LDH 분석, 유세포 분석, Western 분석을 위한 방사선조사는 Cs-137 방사선 조사기 (IBL 437C, France)를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량율로 2 Gy와 10 Gy를 단회 조사하였고 집락형성정량을 위한 방사선조사는 2, 4, 6, 10 Gy를 같은 선량율로 단회 조사하였다. 배지는 방사선조사 직후와 방사선조사 3일 후에 교체하였다.

### 3. 집락형성정량과 세포생존곡선

ATRA가 NHOK의 방사선감수성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 집락형성정량을 시행하였다. 세포를 6-well culture plate (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에 낮은 밀도 (250-500 cells/well)로 분주하고 이틀간 배양한 후 방사선만 조사하는 군과 ATRA 투여군으로 나누었으며, ATRA 투여군은 1  $\mu$ M ATRA를 투여하고 48시간이 지난 후 방사선을 단회 조사하였다. 집락을 형성하도록 14일간 배양한 뒤 세포를 methanol로 고정하고 trypan blue로 염색하였다. 광학현미경 (Olympus CK40, Tokyo, Japan)으로 세포가 50개 이상인 집락수를 세었다.

세포생존곡선을 그리기 위하여 세포생존율은 아무것도 처리하지 않은 집락수를 1로 보고 다른 세포군의 집락수를 그에 대한 비율로 계산하여 결정하였으며 그 수치들을

대입하여 표준비선형회귀 (standard nonlinear regression) 방식에 의한 linear-quadratic (LQ) model에 적용하여 방사선 조사선량에 대한 함수로 그래프를 그렸다. 2 Gy에서의 세포생존율 (SF2)을 구하고  $\alpha$ 와  $\beta$ 값을 구하였다. D는 Gy로 표현된 방사선조사량이다.

$$\text{Cell survival (S)} = \exp(-\alpha D - \beta D^2)$$

### 4. LDH 분석

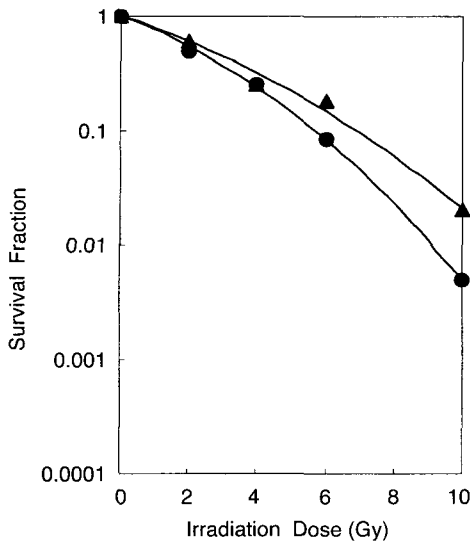
방사선을 조사한 세포를 1, 2, 3, 4, 5일간 배양한 후 60 mm 배양접시에서 배지 1 ml를 얻어 96-well plate에 50  $\mu$ l를 넣은 후 substrate mix (Promega, Cytotox 96R Non-radioactivity Cytotoxicity Assay) 50  $\mu$ l를 첨가하였다. 빛을 차단한 후 실온에서 30분간 배양 후 각각의 well에 50  $\mu$ l의 반응정지액을 넣고 ELISA reader로 490 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다.

### 5. 유세포 분석

방사선조사 1, 2, 3, 4, 5일 후에 trypsin-EDTA로 회수한 세포를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4 Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)으로 세척한 후  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 70% cold ethanol 5 ml로 고정하였다. 0.1% bovine serum albumin (BSA, Amresco, Cleveland, OH, USA)과 PBS로 세척한 후 각 tube에 25  $\mu$ l propidium iodide (PI, Sigma, St. Louis, MO, USA)/25  $\mu$ l RNase (Sigma, St. Louis, MO, USA)/200  $\mu$ l PBS를 넣은 후 어두운 상태를 유지하면서 1시간 이내에 유세포분석기 (FAC Star plus Flowcytometry, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)로 DNA 용적히스토그램을 얻고 DNA용적의 백분율을 구하여 세포주기와 apoptosis를 관찰하였다.

### 6. 단백질 검출 (Western blot analysis)

10 Gy 방사선조사 후 1일과, 3일째의 세포에서 얻어진 단백질 20  $\mu$ g을 이용하여 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 후 nitrocellulose membrane으로 단백질이 이동되도록 하였다. 반응을 정지시킨 후에 membrane을 primary antibody solution에서 1시간 동안 반응시켰다. primary antibody는 p53, bcl-2, bax, p21, cyclin B1에 대한 mouse monoclonal antibody (Santacruz Biotechnology, Santacruz, CA, USA)를 이용하였다. 세척해낸 후 horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden)를 반응시켰으며, ECL<sup>TM</sup> (Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 대상 단백질을 검출하고 자가방사기록법을 시행하였다.



**Fig. 1.** Survival curve of untreated (▲) and ATRA-treated NHOK (●). Relative cell survival fraction was calculated on the basis of colony formation assay. Data were fitted to a linear-quadratic model.

**Table 1.**  $\alpha$  and  $\beta$  values in cell survival curve of untreated and ATRA-treated NHOK

	NHOK	RA-NHOK
$\alpha$	0.222 ± 0.048	0.246 ± 0.084
$\beta$	0.017 ± 0.003	0.028 ± 0.021

Data were calculated from the linear-quadratic fit of the dose-response curves. Number represent average value ± SD (n = 3).

## 결 과

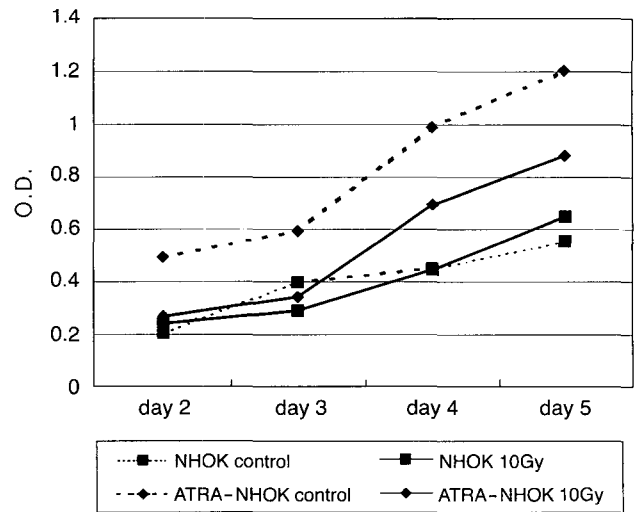
### 1. 세포생존곡선 및 SF2

세포생존곡선에서 ATRA 투여와 관계없이 방사선조사량이 증가함에 따라 세포생존율이 감소하였으며 ATRA를 투여한 경우에 더욱 급격한 세포생존율의 감소를 보였다 (Fig. 1).

ATRA 투여시 세포생존곡선에서  $\alpha$ 값과  $\beta$ 값이 모두 증가하고  $\beta$ 값의 변화에 비해  $\alpha$ 값의 변화가 더 크게 나타났으나 통계적 유의성은 없었다 (Table 1). 방사선을 조사하지 않은 경우를 1로 보았을 때 ATRA 투여만으로도 집락수가 0.56으로 유의성 있게 감소하였다. SF2는 ATRA를 투여하지 않은 경우에는 0.63, ATRA를 투여한 경우에는 0.27로 나타나 세포생존율이 유의성 있게 감소하였다.

### 2. LDH 분석

모든 세포군에서 방사선조사로 인한 LDH 증가는 관찰되지 않았으나 배양시간이 경과할수록 LDH가 증가하였으



**Fig. 2.** Optical density (OD) values of untreated and ATRA-treated NHOK.

**Table 2.** LDH analysis of untreated and ATRA-treated NHOK

		day 2	day 3	day 4	day 5
Control	NHOK	0.204 ±0.014	0.396 ±0.070	0.450 ±0.048	0.549 ±0.080
	ATRA-NHOK	0.495 ±0.047*	0.590 ±0.090*	0.983 ±0.051*	1.198 ±0.157*
2 Gy	NHOK	0.202 ±0.031	0.220 ±0.029	0.302 ±0.050	0.703 ±0.095
	ATRA-NHOK	0.373 ±0.008*	0.503 ±0.018*	0.806 ±0.056*	1.231 ±0.014*
10 Gy	NHOK	0.240 ±0.003	0.290 ±0.004	0.444 ±0.025	0.642 ±0.100
	ATRA-NHOK	0.270 ±0.007*	0.338 ±0.055	0.689 ±0.045*	0.877 ±0.088*

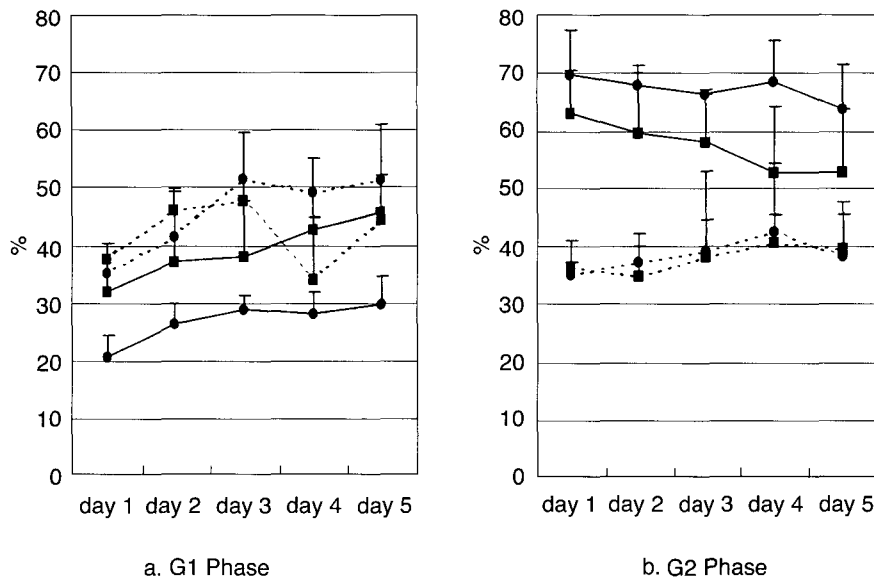
Data represent average OD value ± SD (n = 4).

\*: statistically significant between untreated and ATRA-treated NHOK (p < 0.05).

며 ATRA를 투여한 경우에는 LDH가 유의성 있게 증가하였다 (Table 2). ATRA를 투여한 경우 10 Gy의 방사선조사시 방사선을 조사하지 않은 경우에 비해 LDH가 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 2).

### 3. 세포주기 분석

방사선조사나 ATRA 투여는 pre-G1기에 존재하는 세포의 백분율에 영향을 미치지 않았다. 방사선을 조사한 후 1, 2, 3, 4, 5일째 세포주기를 분석한 결과, 방사선조사량이 증가함에 따라 S기와 G1기는 감소하고 G2기가 증가하는 결과를 나타내었다 (Table 3-5). 10 Gy 방사선조사시 G2기 정지가 뚜렷하게 관찰되었으며, 특히 조사 후 1일째에 최고치를 나타내었고 시간이 경과함에 따라 G2기 세포는 점차



**Fig. 3.** Relative percentage of untreated (●) and ATRA-treated (■) NHOK in G1 and G2 phase.

**Table 3.** Percentage of NHOK in G0-G1 period

		day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
NHOK	Control	37.6±2.7	46.1±3.8	47.7±11.8	34.0±10.6	44.2±7.7
	2 Gy	41.3±7.0	44.4±8.8	44.1±9.8	38.5±11.5	40.5±13.1
	10 Gy	32.1±8.3	37.3±12.0	38.0±9.8	42.6±12.3	45.5±13.1
ATRA-NHOK	Control	35.4±1.6	41.4±1.6	51.5±4.7	49.1±2.7	51.3±5.3
	2 Gy	35.5±2.5	41.0±3.4	49.1±2.7	44.2±3.2	48.3±1.5
	10 Gy	20.8±3.8	26.5±3.4	28.9±2.3	28.1±3.6	29.7±4.8

Data represent the percentage of untreated and ATRA-treated NHOK in G0-G1 period ± SD (n=3).

**Table 4.** Percentage of NHOK in G2-M period

		day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
NHOK	Control	36.5±4.6	34.9±7.3	38.1±14.9	40.5±13.8	39.4±8.2
	2 Gy	39.3±6.7	39.0±10.1	44.0±12.1	42.2±10.6	44.9±14.7
	10 Gy	63.0±7.6	59.6±10.4	57.9±9.1	52.6±11.6	52.2±11.2
ATRA-NHOK	Control	35.2±2.0	37.4±2.7	39.1±5.5	42.5±3.0	38.2±7.3
	2 Gy	41.2±4.2	44.2±1.6	44.3±4.9	50.5±4.8	43.2±4.2
	10 Gy	69.7±7.8	68.0±3.5	66.2±0.2	68.5±7.2	63.7±7.8

Data represent the percentage of untreated and ATRA-treated NHOK in G2-M period ± SD (n=3).

**Table 5.** Percentage of NHOK in S period

		day 1	day 2	day 3	day 4	day 5
NHOK	Control	25.9±2.6	19.0±5.0	14.2±3.7	25.6±19.3	16.4±5.7
	2 Gy	19.4±0.6	16.5±3.4	11.8±3.7	19.3±13.3	14.6±10.1
	10 Gy	4.9±2.3	2.8±2.4	4.2±2.8	4.8±4.3	7.1±2.7
ATRA-NHOK	Control	29.4±1.1	21.3±4.2	9.4±1.4	8.5±0.4	10.5±4.5
	2 Gy	23.4±2.2	14.9±4.9	10.9±6.4	5.3±2.6	8.5±3.3
	10 Gy	9.36±5.5	5.5±0.8	4.9±2.0	3.4±0.4	6.6±3.9

Data represent the percentage of untreated and ATRA-treated NHOK in S period ± SD (n=3).

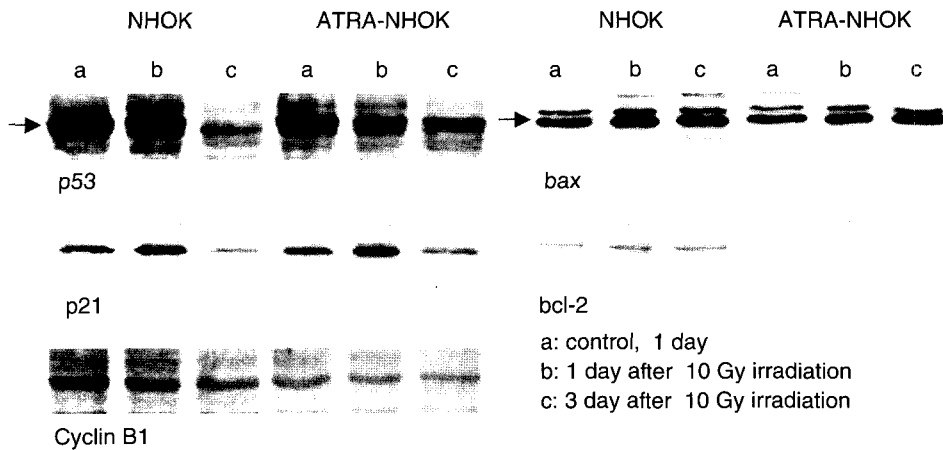


Fig. 4. Expression of p53, p21, cyclin B1, bax and bcl-2 in NHOK.

감소되고 G1기 세포수가 점차 증가되는 양상을 나타내어 G2기 정지로부터 회복됨을 시사하였다 (Fig. 3a, b). 한편 ATRA로 전처리한 경우에는 방사선조사에 따른 G2기 증가가 더욱 크게 나타났고, G2기 정지로부터의 회복이 뚜렷하지 않았다 (Fig. 3b).

#### 4. 단백질의 검출

10 Gy 방사선조사 후 3일째에 p53 단백질이 크게 감소하여 거의 관찰되지 않았다. p21은 방사선조사 후 1일째엔 단백질 양이 증가되었다. 한편 cyclin B1, bax, bcl-2는 방사선 조사에 의해 그 단백질 양이 변화되지 않았다. ATRA를 투여한 경우 단백질들의 변화양상은 ATRA를 투여하지 않은 경우와 크게 다르지 않았으나 다만 p53의 경우 방사선조사 3일째에 단백질의 양이 크게 감소하지는 않았다 (Fig. 4).

### 고 찰

본 연구에서 집락형성정량에 기초한 SF2로 비교하였을 때 ATRA를 투여하지 않은 경우는 0.63, ATRA를 투여한 경우는 0.27로서 2 Gy 방사선조사 후 NHOK의 세포생존율이 크게 감소하였다. 결과로 제시하지는 않았으나 생존세포수로 비교해 보았을 때는 2 Gy 방사선조사 후 ATRA를 투여한 경우에 대체로 생존세포수가 감소하는 경향을 보였으나 뚜렷하지는 않았다. 이로 보아 ATRA가 세포사보다는 세포주기 지연과 같은 세포분열 능력의 상실을 통해 세포생존율에 영향을 미치는 것으로 생각한다. 이번 연구에서 방사선을 조사하지 않고 1 μM의 ATRA만 투여해도 세포생존율이 감소하였는데 이는 You 등<sup>25</sup>의 연구결과와도 일치하였으며 retinoic acid가 NHOK에 대해서 세포증식억제효과를 가진다고 볼 수 있다. 이번 연구에서 ATRA 단독처리시 배양 3일째 이후 통계적으로 유의하지는 않았

으나 G1기 세포수가 증가하는 경향을 보였다. 또한 ATRA는 단독으로 LDH를 증가시켰으나 apoptosis를 증가시키지는 않았다. 이러한 결과는 ATRA 단독처리에 의한 세포생존율 감소가 세포괴사와 G1기 증가에 기인할 수 있음을 시사한다.

이번 연구에서 세포생존곡선은 ATRA를 투여한 경우에 더 급격하게 감소하는 양상을 보여 ATRA와 방사선이 세포생존율을 감소시키는데 서로 상승작용을 일으켰다고 볼 수 있겠다. SF2값도 급격한 감소를 보였는데 이는 방사선 감수성의 증가를 반영한다고 할 수 있다. 세포생존곡선에서 α값은 치유될 수 없는 손상에 의한 세포사를 의미하며, β값은 치유될 수 있는 손상에 의한 세포사를 의미한다.<sup>26</sup> 통계적으로 유의하지는 않았지만 ATRA를 투여한 경우에서 α값이 증가를 보여 ATRA가 NHOK의 고유한 방사선 감수성이 증가하도록 작용했을 것이라고 생각한다. 이러한 ATRA의 세포증식억제와 방사선감수성의 증가의 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 방사선에 의한 세포 손상의 회복을 방해하거나 세포의 최종 분화를 유도하는 것으로 보고 있다.<sup>27,28</sup>

LDH 분석결과 ATRA가 OD값을 증가시켰으며, 이는 ATRA의 투여로 인해 세포괴사가 증가되었다고 평가할 수 있다. 그러나 ATRA를 투여한 경우에 방사선조사량이 증가함에 따라 OD값이 감소하여 방사선조사량 증가에 따른 세포생존율 저하와 상반되는 결과로 나타나 ATRA 투여로 인한 세포괴사의 증가와 방사선감수성의 증가와는 직접적인 연관성은 없는 것으로 보인다.

방사선조사 이후에 나타나는 G1기와 G2기의 증가는 손상받은 DNA가 S기나 M기로 진행되는 것을 막고, 세포가 손상에 대처하는 회복기간이다. 따라서 G2기가 길어질수록 세포가 DNA 손상을 회복할 기회가 많아져서 암세포에 대한 방사선의 치료효과가 감소한다.<sup>29,20</sup> 또한 손상된 DNA가 급하게 세포분열로 진입했을 때 더욱 심한 염색체 손상을 초래하고 염색체 손실을 일으키며 결국은 세포사

에 이른다. 따라서 G2기가 상실되었을 때는 apoptosis가 증가하여 방사선감수성이 증가한다.<sup>31</sup> caffeine과 같은 약물은 유방암세포에서 G2기를 짧게 하고 세포생존율을 낮추어 방사선감수성을 증가시킨다고 보고되었다.<sup>32</sup> 또한 세포를 *ras*나 *myc*로 transfection시켰을 때는 G2기가 증가하고 세포의 방사선에 대한 저항성이 증가한다는 보고도 있다.<sup>29</sup>

이번 연구에서는 10 Gy를 조사하였을 때 ATRA를 투여한 경우가 ATRA를 투여하지 않은 경우에 비하여 G2기는 증가하였지만 apoptosis 유발율에는 변화가 없었으며, 방사선감수성이 낮아지지 않고 오히려 증가하였다. 본 연구의 결과가 암세포를 이용한 실험들의 보고<sup>30,32,33</sup>와 상반된 이유는 명확하지는 않으나, 아마도 사용된 세포의 차이일 것으로 생각된다. 암세포의 경우는 방사선조사 이후에 바로 세포사를 일으키지 않고 G2기가 지연되면서 회복되고 계속해서 증식할 기회를 부여받는 것으로 생각되나 NHOK는 G2기에서 세포분열로 이행하는 세포의 비율이 낮고, 세포분열을 하더라도 이후에 더 이상 세포분열을 할 수 없는 세포가 될 것으로 보인다. Hep3B세포주는 대조군에서 G1기에 있는 세포의 비율이 50% 이상인데 retinoic acid를 10  $\mu$ M 처리했을 때 G1기는 감소하고 G2기는 증가하였으며, apoptosis도 증가하였다.<sup>33</sup> 따라서 G2기가 증가한다고 해서 반드시 apoptosis가 감소하는 것은 아니라는 사실을 알 수 있었다. 세포주기에서 G1이나 G2기에 있는 세포가 단순히 증가하였다거나 감소하였다는 사실보다 세포주기 상에서의 동적인 변화양상이 더욱 중요한 것으로 보인다.

세포생존과 관련지어서 생각할 때 10 Gy의 방사선조사 시에 ATRA를 투여하지 않은 경우에는 ATRA를 투여한 경우에 비해서 G2기에 있는 세포의 비율이 낮았음에도 불구하고 시간이 경과함에 따라 G2기에서 벗어난 세포의 비율은 높았다. 세포가 G2기에서 벗어났다는 것은 세포가 죽거나 혹은 분열하였음을 의미한다. 이번 연구에서 ATRA를 투여하지 않은 NHOK의 SF2가 ATRA를 투여한 경우에 비해 더 높았고 G1기가 증가하는 양상이 ATRA를 투여한 경우에 비해 뚜렷하여 세포가 죽었다기 보다는 세포분열을 하고 G1기로 진행하지 않았을까 생각한다. 반면에 ATRA를 투여한 경우는 G2기에 있는 세포비율이 높았지만 G2기에서 벗어난 세포의 비율이 낮았으며 이는 세포가 G2기에서 벗어나지 못하고 오랫동안 정지해 있는 것으로 생각된다. 따라서 ATRA를 투여한 경우에 G2기에 있는 세포의 비율이 높으면서 또한 G2기에서 벗어나는 세포의 비율은 낮기 때문에 집락을 형성할 수 있는 능력이 ATRA를 투여하지 않은 경우에 비해 떨어져 방사선감수성을 증가시켰을 것으로 생각된다.

NHOK의 경우 방사선조사와 ATRA 투여로 인한 apoptosis의 유의한 증가는 관찰되지 않았다. retinoic acid를 투여할 경우 세포성장 억제가 어느 수준이상으로 증가하지 않으며, retinoic acid의 투여를 중단하면 세포가 다시 빠르

게 성장하는 것으로 보아 retinoic acid에 의한 세포성장억제는 apoptosis나 괴사와 같은 세포사 때문이 아니라 가역적인 cytostasis의 결과라는 보고가 있는데,<sup>34</sup> ATRA에 의한 집락형성 감소는 세포주기 지연에 의한 세포분열의 불가능에 의한 것으로 생각된다.

방사선조사 후 나타나는 apoptosis의 시기와 양상이 세포에 따라서 매우 다르기 때문에 방사선조사 이후의 세포생존을 판단하기 위해서 세포의 대사활동에 의존하는 방법보다는 집락형성에 의존하는 방법들이 흔히 사용된다. 세포에 따라서는 방사선에 의해 유도되는 세포생존을 저하에 non-apoptotic cell death가 중요한 영향을 주며, 특히 비조혈세포에서 집락형성정량으로 본 세포생존과 apoptosis를 양적으로 연관시켜보니 세포사의 주요한 경로는 apoptosis보다는 mitotic death였다는 보고가 있다.<sup>34</sup> 유방암 세포는 방사선을 조사하였을 때 세포가 사망하는 주요한 경로가 apoptosis라기 보다는 암세포성장억제의 지속에 의한 것이라 한다.<sup>35</sup> 따라서 방사선감수성을 오직 apoptosis에 기초하여 판단할 수는 없다.

세포의 apoptosis를 조절하는 것으로 알려진 여러 인자 중에서 bax는 apoptosis를 유발하고, bcl-2는 apoptosis를 억제하는 작용을 하며 p53은 bax를 활성화시키고 bcl-2의 발현은 저하시키는 작용을 한다.<sup>36-38</sup> 또한 세포가 apoptosis를 일으킬 것인지 아닌지를 결정하는데는 bax와 bcl-2의 비율이 중요한 것으로 여겨지고 있다.<sup>39</sup> 또한 세포가 DNA의 손상에 의한 apoptosis를 일으키는 것은 p53의 상태와 관계가 있는데,<sup>40</sup> 아마도 p53이 세포내에 존재하기는 하지만 bax나 bcl-2의 발현에 영향을 주지 않을 것으로 생각된다.

p53은 10 Gy의 방사선조사 후 3일째의 결과에서 ATRA를 투여하지 않은 경우에는 발현이 감소하였고 ATRA를 투여한 경우에는 발현의 감소가 뚜렷하지 않았다. 따라서 ATRA가 방사선조사 후 3일째에 p53이 감소하는 것을 억제하는 것으로 생각된다. p53은 apoptosis를 유발하기도 하지만 p21을 유도하여 G1기 정지에 관여하고 G2기 정지에도 관여함이 보고되었다.<sup>41,42</sup> 위암세포에 retinoic acid를 투여했을 때 G1기 증가에 의하여 위암세포의 성장억제가 일어났으며 이는 p21에 의한 것이라는 보고가 있다.<sup>43</sup> p21은 G1기 정지에 주로 작용하지만 G2기 정지와도 연관성이 있다.<sup>33</sup> 10 Gy의 방사선조사를 했을 때 나타나는 p21의 증가는 G2기 증가와 관련이 있을 것으로 생각되나, ATRA의 투여로 인한 p21 발현에는 차이가 없어 ATRA투여로 인한 G2기 증가와 p21을 연관지우기는 어려울 것으로 보인다.

G2기에서 M기로의 이행에는 cyclin B1-Cdk1 (또는 p34<sup>Cdk1</sup>)의 복합체가 주요한 역할을 하며, p53도 G2기 지연에 영향을 줄 수 있으나 이 두 기전과는 무관한 경로에 의해 G2기 지연이 일어날 수 있는 가능성을 배제할 수는 없다.<sup>44</sup> 모든 세포에서 항상 그러한 것은 아니지만 cyclin B1의 발현저하는 G2기를 증가시킨다.<sup>45</sup> 10 Gy의 방사선을

조사한 경우에 G2기 정지가 크게 나타났으며 ATRA를 투여한 경우에는 G2기가 더 증가하였으나 cyclin B1은 방사선조사와 ATRA에 의해서 영향을 받지 않아 ATRA 투여 후 나타나는 G2기 증가의 분자기전에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Muschel RJ, Soto DE, McKenna WG, Bernhard EJ. Radiosensitization and apoptosis. *Oncogene* 1998; 17 : 3359-63.
- Duchesne GM, Hutchinson LK. Reversible changes in radiation response induced by all-*trans* retinoic acid. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33 : 875-80.
- Peacock JH, Eady JJ, Edwards SM, McMillan TJ, Steel GG. The intrinsic alpha/beta ratio for human tumour cells: is it a constant? *Int J Radiat Biol* 1992; 61 : 479-87.
- Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol* 1984; 2 : 317-23.
- Quilty PM, Kerr GR, Duncan W. Prognostic indices for bladder cancer : an analysis of patients with transitional cell carcinoma of the bladder primarily treated by radical megavoltage X-ray therapy. *Radiother Oncol* 1986; 7 : 311-21.
- Malaise EP, Deschavanne PJ, Fertil B. The relationship between potentially lethal damage repair and intrinsic radiosensitivity of human cells. *Int J Radiat Biol* 1989; 56 : 597-604.
- Windbichler GH, Hensler E, Widschwendter M, Posch A, Daxenbichler G, Fritsch E, et al. Increased radiosensitivity by a combination of 9-*cis*-retinoic acid and interferon- $\gamma$  in breast cancer cells. *Gynecol Oncol* 1996; 61 : 387-94.
- Schiller U, Hoffmann W, Bamberg M, Rodemann HP. All-*trans*-retinoic acid modulates the radiosensitivity of proliferating cells. *Int J Cancer* 1997; 70 : 488-90.
- DeLaney TF, Afridi N, Taghian AG, Sanders DA, Fuleihan NS, Faller DV, et al. 13-*cis*-retinoic acid with  $\alpha$ -2a-interferon enhances radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Res* 1996; 56 : 2277-80.
- Rutz HP, Little JB. Modification of radiosensitivity and recovery from X ray damage in vitro by retinoic acid. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16 : 1285-8.
- Blase M, Zaruba MM, Santo-Hoeltje L, Bamberg M, Hoffmann W, Rodemann HP. 13-*cis* retinoic acid in combination with interferon-alpha enhances radiation sensitivity of human squamous cell carcinoma cells of the oral cavity. *Strahlenther Onkol* 1999; 175 : 563-8.
- DeLuca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991; 5 : 2924-33.
- 이은숙, 강범현, 허민석, 이상선, 최현배, 최순철 등. 두경부 편평세포암종세포주에서 retinoic acid가 linear-quadratic 모델을 적용한 방사선감수성과 apoptosis 유발에 미치는 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2001; 31 : 135-43.
- Maity A, McKenna WG, Muschel RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol* 1994; 31 : 1-13.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle check point determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 7491-5.
- Hain J, Jaussi R, Wurgler FE. Effects of ionizing radiation and caffeine treatment on cyclin dependent kinase complexes in V79 hamster cells. *Cell Signal* 1994; 6 : 539-50.
- Walters RA, Gurley LR, Tobey RA. Effects of caffeine on radiation-induced phenomena associated with cell-cycle traverse of mammalian cells. *Biophys J* 1974; 14 : 99-118.
- Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6 : 41-4.
- Ronca F, Yee KS, Yu VC. Retinoic acid confers resistance to p53-dependent apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells by modulating nuclear import of p53. *J Biol Chem* 1999; 274 : 18128-34.
- Dierov J, Sawaya BE, Prosniak M, Gartenhaus RB. Retinoic acid modulates a bimodal effect on cell cycle progression in human adult T-cell leukemia cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5 : 2540-7.
- Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells : involvement of bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res* 1999; 58 : 426-35.
- Mothersill C, Moriarty MJ, Seymour CB. Radiobiologic response of CHO-K1 cells treated with vitamin A. *Acta Radiol Oncol* 1986; 25 : 275-80.
- Rutz HP, Little JB. Retinoic acid inhibits the fixation of initial transformational damage in X-irradiated Balb/3T3 mouse fibroblasts in vitro. *Carcinogenesis* 1989; 10 : 2183-6.
- Hoffmann W, Blase MA, Santo-Hoeltje L, Herskind C, Bamberg M, Rodemann HP. Radiation sensitivity of human squamous cell carcinoma cells in vitro is modulated by all-*trans* and 13-*cis*-retinoic acid in combination with interferon- $\alpha$ . *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45 : 991-8.
- You YO, Lee G, Min BM. Retinoic acid extends the in vitro life span of normal human oral keratinocytes by decreasing p16<sup>ink4A</sup> expression and maintaining telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268 : 268-74.
- Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH. The radiobiology of human cells and tissues. In vitro radiosensitivity. The picture has changed in the 1980s. *Int J Radiat Biol* 1989; 56 : 525-37.
- Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 1991; 65 : 1097-8.
- Duvall E, Wylie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986; 7 : 115-8.
- McKenna WG, Iliakis G, Weiss MC, Bernhard EJ, Muschel RJ. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res* 1991; 125 : 283-7.
- Nagasawa H, Keng P, Harley R, Dahlberg W, Little JB. Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 1994; 66 : 373-9.
- Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Wurl P, Meye A, Bartel F, et al. Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int J Cancer* 2001; 96 : 110-7.
- Valenzuela MT, Mateos S, Ruiz de Almodóvar JM, McMillan TJ. Variation in sensitizing effect of caffeine in human tumour cell lines after  $\gamma$ -irradiation. *Radiother Oncol* 2000; 54 : 261-71.
- Giannini F, Maestro R, Vukosavljevic T, Pomponi F, Boiocchi M. All-*trans*, 13-*cis* and 9-*cis* retinoic acids induce a fully reversible growth inhibition in HNSCC cell lines: implications for in vivo retinoic acid use. *Int J Cancer* 1997; 70 : 194-200.
- Hsu SL, Chen MC, Chou YH, Hwang GY, Yin SC. Induction of p21<sup>cip1/waf1</sup> and activation of p34<sup>cdc2</sup> involved in retinoic acid-induced apoptosis in human hepatoma Hep3B cells. *Exp Cell Res* 1999; 248 :



- 87-96.
35. Rosen EM, Fan S, Rockwell S, Goldberg ID. The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest* 1999; 17 : 56-72.
  36. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80 : 293-9.
  37. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 protooncogene. *Science* 1992; 258 : 302-4.
  38. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9 : 1799-805.
  39. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74 : 609-19.
  40. Zhan Q, Fan S, Bae I, Guillouf C, Liebermann DA, O'Connor PM, et al. Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; 9 : 3743-51.
  41. Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR. p53 controls both G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92 : 8493-7.
  42. Stewart N, Hicks GG, Paraskevas F, Mowat M. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 1995; 10 : 109-15.
  43. Chou HK, Chen SL, Hsu CT, Chao YC, Tsao YP. Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J* 2000; 348 : 473-9.
  44. Hwang A, Muschel RJ. Radiation and the G<sub>2</sub>-phase of the cell cycle. *Radiat Res* 1998; 150 : S52-9.
  45. Datta R, Hass R, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Down-regulation of cell cycle genes by ionizing radiation. *Cell Growth Differ* 1992; 3 : 637-44.