



U-937 세포에서 이온화 방사선의 조사선량에 따른 감수성 유전자들의 발현 변화

김종수¹ · 임희영¹ · 오연경¹ · 김인규² · 강경선³ · 윤병수¹

¹경기대학교 자연과학부 생물학과, ²한국원자력연구소 방사선 생체 해석분야, ³서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

The mRNA Expression of Radio-Sensitive Genes Exposed to Various Dosage of Ionizing Radiation in U-937 Cell

Jong Soo Kim¹, Hee Young Lim¹, Youn Kyoung Oh¹, In Gyu Kim²,
Kyung Sun Kang³ and Byoung Su Yoon¹

¹Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 440-760

²Department of Radiation Biology, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600

³College of Veterinary Medicine, Seoul University, Suwon 441-774, Korea

Received December 8, 2003; Accepted March 8, 2004

ABSTRACT. We used cDNA microarray to assess gene expression profiles in hematopoietic cell line, U-937, exposed to low doses of ionizing irradiation. The 1,000 DNA elements on this array were PCR-amplified cDNAs selected from named human cancer related genes. According to the strength of irradiation, the levels of some gene expression were increased or decreased as dose-dependent manner. The gene expressions of *Tubulin alpha*, *protein kinase*, *interferon-alpha*, *-beta*, *-omega receptor* and *ras homolog gene family H* were significantly increased. Especially, *Tubulin* gene was shown 2.5 fold up-regulated manner under stress of 500 rad irradiation than 200 rad. On the other hand, *fibroblast growth factor 12* and *four and a half LIM domains*, etc. were significantly down-regulated. Also, *tumor protein 53(TP53)* related genes that *p53 inducible protein*, *tumor protein 53-binding protein* looks of little significance as radiation sensitive manner. The radio-sensitivity of *tubulin* gene etc. that we proposed could be useful to rapid and correct survey for the bio-damage by exposure to low dose irradiation.

Keywords: Radio-sensitivity gene, Tubulin, cDNA microarray, Gene expression, U-937 cell.

서 론

저 선량 방사선의 노출에서도 조사선량과 비례한 생체적 악영향이 측정되기에, 저 선량 방사선이 인체에 미치는 영향에 대한 관심은 크게 높아지고 있다(Beninson, 1996). 현재의 방사선 방호개념에서 비교적 무시되고 있는 저선량 노출은 방사선 관련 종사자가 받을 수 있는 조사선량이 아무리 소 선량이라고 하더라도 잦은 노출에 의한 선량 축적으로 발암이나 유전인자의 손상을 가져올 수 있다는 점에서 결코 간과할 수 없을 것이다(Mossmann, 1997).

방사선의 생체 반응 중 세포에 대한 초기 연구는 1906년에 Berhonie와 Tribondeau에 의하여 보고 되었으며, 이 연구에서 세포의 재생능력이 클수록, 형태적 기능적 분화의 정도가 낮을수록 그 세포들은 방사선에 대한 감수성이 크고, 따라서 세포분열이 왕성한 골수조직이나 임파조직과는 달리 순환혈액 내 적혈구, 과립백혈구, 혈소판 등은 일반적으로 방사선 조사에 대해 강한 저항성을 갖는다고 보고 되고 있다(Boothmab *et al.*, 1997). 그러나 혈구세포는 방사선에 대해 매우 민감하여 피폭에 따른 혈구세포의 변화가 가장 빠른 반응을 나타냄으로(Boothmab *et al.*, 1997; Hall, 1979) 방사선에 피폭되었을 경우에 피폭자의 혈구수의 변화는 피폭손상에 대한 판정법으로 쉽게 이용되고 있다. 이런 방사선의 생체조사 후 관찰되는 말초혈액 내 총 세포 감소증은 임파구를 제외하고는

Correspondence to: Byoung Su Yoon, Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Korea
E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

순환 혈구세포에 대한 직접적인 파괴보다는 골수의 손상에 의한 이차적인 변화라고 추정하고 있다(Hall, 1979; Ge *et al.*, 2001; Rathfuss, 2000). 1차적인 손상을 측정하고 반응의 초기 단계에서 변화를 측정하는 marker는 아직 밝혀지지 않았으나, 이온화 방사선에 의한 DNA 손상과 세포의 물리, 화학적 영향으로 인한 반응으로 추측해 볼 때 DNA의 손상은 세포 내 단백질과 효소 활성의 변화를 일으키는 주원인으로 추측하고 있다. DNA 손상 등에 의한 세포에서 나타나는 apoptosis, DNA repair 과정은 transcription factor P53 (p53)과 관련된 전사 조절의 신호 기작을 가장 잘 알려져 있으며(Mossmann, 1997), 세포막의 손상과 세포 내 물질 변화와 신호 변화 등 다양한 역할을 보이고 있다. 이러한 이유로 세포 활성의 주요한 marker로 p53 유전자와 p53관련 세포 내 신호들을 주목되고 있다.

본 연구에서는 방사선조사에 대하여 민감한 발현양상 변화를 보이는 유전자들을 검색하기 위하여, p53 관련 유전자 등 1,000개의 인간 암 관련 유전자들이 탑재된 cDNA-chip을 사용하였으며(Amundson *et al.*, 1999), 사람의 혈구세포인 U-937세포에서 저선량 이온화 방사선의 조사선량에 따른 각 유전자의 발현양 변화를 측정하고, 결과를 분석하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 방사선조사

본 실험에서는 사람의 hematopoietic lymphoma cell line인 U-937(Sundstrom and Nilsson, 1976; CRL-1593.2, ATCC, USA)을 실험 세포로 사용하였으며, 배지는 10% fetal bovine serum(Gibco-BRL, USA)를 함유한 RPMI 1640 배지(20 mM HEPES)를, 세포배양은 5% CO₂와 37°C를 유지시킨 배양기를 사용하였다. 방사선 조사는 세포농도 4×10^5 cells/ml인 배양액 30 ml를 ¹³⁷Cs의 광원으로 100 rad, 200 rad, 500rad(882 rad/min) 처리하였으며, 방사선 조사 24시간 후 total RNA를 분리하였다.

Total RNA 분리

Reaction당 5×10^6 cell양으로 U937 세포를 모아 원심 분리하여 배양액을 제거한 후 PBS로 2회 세척하여 ice에 5~7분 정치하였다. 1 ml의 TRIzol reagent(GIBCO BRL® Cat# 15596-018)를 넣고 cell lysis를 위하여 상온에서 5분간 정치하였으며, 0.3 ml chloroform을 넣고 잘 섞은 후 다시 상온에서 2~3분간 두었다가 4°C에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 약 600 µl의 상등액을

새 tube에 옮기고 0.5 ml isopropanol을 넣어 상온에서 10분간 두고 침전반응 시켰다. 11,000 rpm으로 4°C에서 20분 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 1 ml의 70% ethanol로 세척하고 다시 4°C에서 5분 11,000 rpm으로 원심분리하여 RNA를 침전시켰으며 pellet는 상온에서 건조시켰다. ddH₂O 10~20 µl를 넣고 60°C에서 10분간 incubation하여 잘 녹인 후 spectrophotometer로 RNA 농도를 측정하고 분주하여 사용하기 전까지 -70°C 보관하였다. 또한 전기영동에서 rRNA band의 강도로 농도와 순수도를 재확인하였다.

Probe 제작

U-937 세포로부터 얻은 total RNA 100 µg에 2 µl oligo-dT(2 µg/µl)를 넣고 증류수로 총 volume 15.4 µl가 되도록 하여 65°C에서 10분 동안 반응시킨 후 얼음에 1분간 정치시켰다.

6 µl 5×RT(reverse transcription)-reaction buffer, 3 µl 1 M DTT, 0.6 µl unlabeled dNTPs 용액(dATP, dCTP, dGTP 각 25 mM, dTTP 10 mM)으로 조성한 9.6 µl reaction mixture를 RNA-oligo-dT 용액에 넣은 후, Control reaction(un-irradiated cell의 RNA)에는 3 µl Cy3-dUTP(NEM, 1 mM)를, Test reaction(irradiated cell의 RNA)에는 3 µl Cy5-dUTP(NEM, 1 mM)를 각각 넣고, 2 µl Superscript II(invitrogen, 200 U/µl) enzyme를 첨가하여 각기 총 30 µl의 RT-반응액을 조성하였다. RT반응은 42°C에서 2시간으로 수행하였으며, 이 과정에서 Cy3-dUTP와 Cy5-dUTP가 생성되는 cDNA에 incorporation되게 하였다. 반응 후 각각의 반응액에 15 µl 0.1 N NaOH를 넣고 65°C에서 30분간 정치시켰고, 다시 15 µl 0.1N HCl을 넣어 중화시켰다.

중화반응이 끝난 후 QIA quick PCR purification kit(Qiagen, 28104)를 이용하여 정제하였다. 즉, 중화반응을 끝낸 60 µl 반응액에 5배 부피의 300 µl PB buffer를 넣고 혼합한 후 QIA column에 넣고 13,000 rpm 30~60 초 동안 원심분리 하였다. 다시 0.75 ml PE buffer를 넣고 13,000 rpm에서 1분 원심분리하여 buffer 용액을 통과시키고 다시 13,000 rpm에서 1분 동안 spin dry한 후, 새 tube에 column을 삽입하고 100 µl의 ddH₂O(pH 7)로 생성된 반응물(cDNA)을 회수하였다.

각 100 µl인 Cy3-control 반응액과 Cy5-test 반응액을 하나의 tube에 모아주고 10 µl ssDNA 10 mg/ml stock solution, 2 µl Poly A(Sigma Cat. P9403, 10 µg/µl) stock solution과 ddH₂O 288 µl를 넣고 잘 혼합 한 후, microcon30(Millipore)에 넣어 48 µl가 될 때까지 농축 원심분리하고 probe mix로 사용하였다.

Hybridization

효율적인 background 제거를 위하여 Pre-hybridization을 수행하였다. 3.5 ml 20×SSC, 0.2 ml 10% SDS, 10 ml BSA 20 mg/ml stock solution을 증류수와 함께 최종 volume 20 ml로 blocking solution을 조제한 후 50°C에 pre-incubation 하였다. DNA chip을 blocking solution에 담가 50°C에서 20분간 정치하고 멸균 증류수에 담가 세척한 후 isopropanol로 세척하였다. 젖어 있는 DNA chip slide를 50 ml tube에 넣고 600 rpm에서 5분간 원심분리하여 남아있는 습기를 모두 제거한 후 3시간 이내에 준비된 probe와 hybridization에 사용하였다.

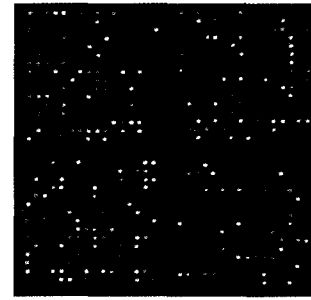
새 tube에 48 μ l의 probe mix를 넣고 10.2 μ l 20×SSC, 1.8 μ l 10%SDS 를 넣어 100°C에서 2분간 끓여 변성시키고 13,000 rpm으로 2분 동안 원심분리하여 다시 모은 후 hybridization 용액으로 사용하였다.

먼저 Hybridization chamber(GenomicTree사)내에 3×SSC를 3~5방울 떨어뜨려 증발을 대비하여 blocking 후 건조시킨 DNA-chip을 정치하였다. Cover glass는 labeling tape에 의해 양끝이 지지되게 올려놓았으며 slide glass와 cover glass 사이에 모세관 현상을 이용하여 hybridization 용액을 스며들게 하였다. Chamber의 뚜껑을 밀폐하여 절대 수평을 유지하고 65°C water bath에 넣어 10시간에서 16시간 incubation 하였다.

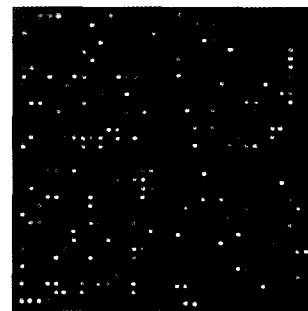
Microarray 분석

cDNA chip의 판독과 해석은 Axon사의 Microarray Scanner/GenePix 4000B를 이용하였다. 유전자 발현의 변화를 정확하게 확인하기 위해서 image로부터 얻어진 spot의 intensity를 구하였으며, 이 데이터를 Excel, Origen, Sigma-Polt software에서 개선하였다. 얻어진 spot에 대한 데이터의 신뢰도를 측정하기 위해서 다양한 파라미터들로 측정하였다.

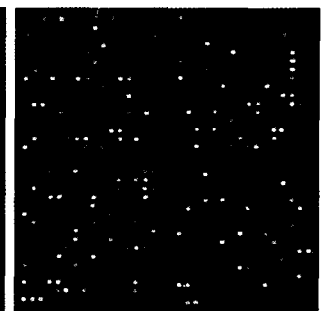
Spot circle에 접촉된 pixel들은 feature-indicator에서 배제되었다(Fig. 1). Feature-indicator 지름의 3배 되는 원 둘레 부분에서 중요한 feature-indicator의 pixels, feature-indicator에 접촉된 pixels, two pixel exclusion부분을 제거하였다. Image 분석에서 I_p , λ_k 는 파장 k에서 하나의 pixel이 갖는 값이며, I_b , λ_k 는 하나의 background pixel의 파장 k값이다. 프로그램에서 자동으로 spot의 범위를 설정하여 범위 내부의 pixel 각각의 $[(I_p, \lambda_k)n]median$ 을 계산하였으며 내부 pixel의 3배 면적을 설정하여 background pixel의 $[(I_b, \lambda_k)n]median$ 을 계산하였다. Control과 100 rad, 200 rad, 500 rad 각각의 결과는 중앙값(median)을 기준으로 하여 비교 분석하였다.



(a) 100 rad



(b) 200 rad



(c) 500 rad

Fig. 1. Color image of microarray used to analyze transcript level in cultured U937 cells after gamma-radiation of ^{137}Cs . Total RNA was extracted from U937 cells immediately 24 h after irradiation. Each RNA sample was used as a template for synthesis of cDNA probes. The probes were mixed and hybridized to a microarray slide (GenomicTree Co., Korea). The slides were scanned in laser scanning (Axon Instruments in U. S.). The control (0 rad) was labeled with Cy3-dUTP(green) and the radiated sample (100 rad, 200 rad, 500 rad) was labeled with Cy5-dUTP(red). (a) 100 rad of radiation (b) 200 rad of radiation (c) 500 rad of radiation.

$$\text{Control(Cy3)} = [(I_p, \lambda_1)n] \text{ median} - [(I_b, \lambda_1)n] \text{ median}$$

$$100 \text{ rad(Cy5)} = [(I_p, \lambda_2)n] \text{ median} - [(I_b, \lambda_2)n] \text{ median}$$

Scanner가 자동으로 계산한 spot의 지름이 사전에 설정된 blocks의 Feature diameter 140 μm 를 기준으로 볼 때 70%에 해당하는 100 μm 에 미치지 못하는 spot들은 모두 자료에서 배제하였고, F653 median - B635, F532 median - B532값이 모두 500에 미달하는 spot역시 모두 제거하였다. 500 이하의 data일 경우 image상에서 background와의 차이를 볼 수 없는 spot으로 눈으로 보아도 색이 나타나지 않는 spot은 모두 제거하고 bad spot으로 설정하였다.

결 과

DNA-Chip 분석

방사선 조사에 따른 U-937 cell에서 인간 암 관련 유전

자들의 발현변화는, 선량별 방사선 조사 세포에서 얻어진 cDNA(Test, Cy5-labelled)와 조사되지 않은 세포에서 얻어진 cDNA(Control, Cy3-labelled)를 DNA-chip에 탑재된 각 유전자들과 hybridization 실험을 통하여 얻어졌다. 각 100 rad irradiation한 세포와 대조군(control, un-irradiated), 200 rad irradiation한 세포와 대조군, 500 rad의 irradiation한 세포와 대조군의 DNA-chip 이미지 결과 사진은 Fig. 1과 같다.

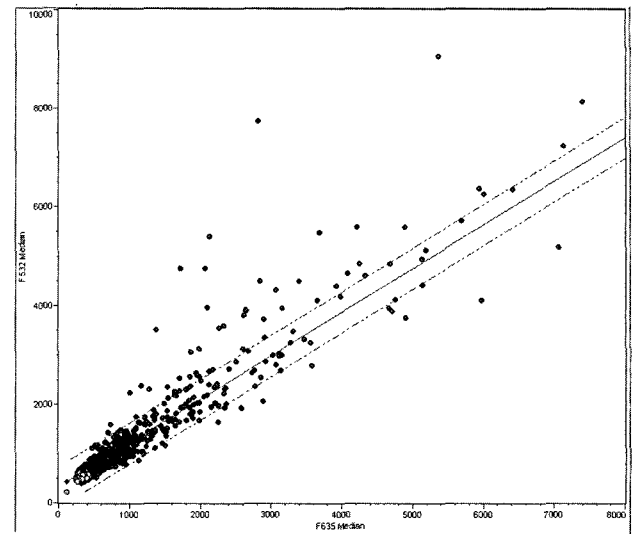
전체적으로 100 rad에서 보다 200 rad와 500 rad에서 mRNA의 발현에 증가를 보이는 붉은 색의 spot들이 증가함을 볼 수 있으며, data의 분석에서도 100 rad에서는 expression fold(EF) 값이 1.3배 이상의 유전자발현 변화는 나타나지 않았으며, EF 1.2 이상의 발현 증가를 보인 유전자는 2개, 0.5 이하의 expression fold값을 나타내는 유전자는 2개 정도의 결과를 보여 주었다.

한편, 200 rad 조건에서는 1.2 이상을 나타내는 expression fold값을 보인 유전자는 모두 49개의 유전자들이었으며, 1개의 유전자만이 0.5 이하의 값을 나타내었다.

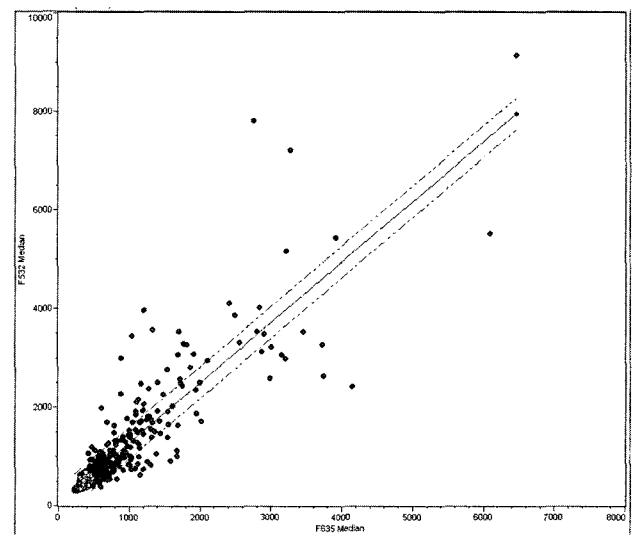
Scatterplots 패턴의 분석에서도 100 rad보다 200 rad, 500 rad의 조사조건에서 U-937 세포내 유전자 중 발현의 변화가 상대적으로 큰 유전자의 수가 증가됨을 볼 수 있었으며, 200 rad 및 500 rad의 조건에서 intensity values의 Scatterplots 분석결과를 Fig. 2에서 제시되었다.

본 분석에서는 Ratio of median 값을 expression fold를 나타내는 수치로 해석하였다. 100 rad의 조건에서 up-regulated, down-regulated gene으로 검색된 결과는 Tables 1, 2에 나타내었다.

100 rad 조사선량 조건에서 대체적으로 ration of median 값이 1.5 이상의 발현변화를 보이는 유전자는 없었으며(Table 1), 가장 큰 up-regulation의 변화를 보인 유전자는 thymine-DNA glycosylase 유전자로 약 1.3의 expression fold값을 나타내었다. v-myb avian myeloblastosis viral oncogene 역시 1.2의 expressin 증가를 나타내었으나 1.5 이하의 expression fold값은 사실상 발현변화를 인정하기 어려운 수치이며, 상기의 유전자들은 200 rad 및 500 rad의 결과에서 분명한 발현의 증가가 발견되지 않는, 즉 용량-반응의 패턴을 보여주지 않은 유전자이기에, 방사선 민감성 유전자로 인정될 수 없었다.



(a) 200 rad



(b) 500 rad

Fig. 2. Scatterplots of intensity values in cultured U937 cells after gamma-radiation of ^{137}Cs . (a) 200 rad of radiation. (b) 500 rad of radiation.

100 rad 조건에서 분명한 발현 감소를 보인 유전자로 expression fold가 0.5 이하를 나타낸 유전자는 Table 2에 나타내었다.

200 rad 조사선량 조건에서는 100 rad 조사조건에서

Table 1. List of up regulated gene exposed to in U-937 100 rad irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Symbol	Accession No. ^a	Ratio of median
thymine-DNA glycosylase	TDG	AA496947	1.289367
v-myb avian myeloblastosis viral oncogene	MYBL2	AA457034	1.205674

^aGene Bank Accession No.

Table 2. List of down regulated gene exposed to in U-937 100 rad irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Symbol	Accession No. ^a	Ratio of median
mutS (<i>E. coli</i>) homolog 2	MSH2	AA219061	0.4514107
dCMP deaminase	DCTD	AA448207	0.3538231

^aGene Bank Accession No.

보다 많은 유전자들의 발현 변화를 나타내었으며(Tables 3, 4), Ratio of median 1.5 이상인 13개의 유전자가 검색되었다(Table 3). 한편, 이 조건에서 발현 감소를 보인 유전자 중 ratio of median 값이 0.7 이하로 나타난 7개 유전자를 Table 4에 정리하였으며, 이 중 replication factor C는 0.399로 가장 낮은 유전자 발현의 감소를 나타내었다.

방사선 조사선량 500 rad의 조건에서도 200 rad에서와 같이 Ratio of median 값을 1.5 기준으로 하여 14개의 유전자를 검색하였으며(Table 5), 발현이 증가한 유전자 중에서 Tubulin alpha 2 유전자는 3.235의 값으로, 방사선 500 rad 조사 후에 유전자 발현 증가가 3배 이상인 결과를 보였다. 한편, 발현의 감소로 ratio of median 수치가 0.7 이하인 유전자는 54개로 나타났으나, 현격한

발현량 감소를 인정할 수 있는 EF 0.5 이하의 12개 유전자는 Table 6에 정리하였다.

감마선 조사에 의하여 유전자 발현에 큰 변화를 보이는 여러 유전자들 중에서 500 rad의 조사에서 현격한 발현의 증가 또는 감소를 보인 유전자들의 방사선 조사량에 따른 유전자 발현 증가 또는 감소의 패턴을 추적하였으며, 방사선 조사에 대하여 용량-반응 관계를 나타내는 유전자들 각 5개를 이들의 100 rad, 200 rad에서 발현변화를 비교하였다(Tables 7, 8).

이 비교에서 Tubulin alpha 2 유전자, protein kinase 유전자와 interferon alpha, beta, omega receptor 유전자, 그리고 ras homolog gene family, member H 유전자의 발현은 200 rad에 비교하여 500 rad 방사선 조사량에서 유전자 발현이 확실히 증가하였음이 확인되었다. 특히 Tubulin alpha 2 유전자는 200 rad 선량에서보다 500 rad에서 평균 2.5배 이상의 발현 증가를 보인 것이 주목된다(Fig. 4).

또한 fibroblast growth factor 12, early growth response 1, heat shock 70 kD protein 4, LIM domains 3, Translocating chain-associating membrane protein 유전자들은 500 rad 조사 조건에서 현격한 발현의 감소를 나타내었다. 이들 각 유전자들의 방사선 조사

Table 3. List of up regulated gene exposed to in U-937 200 rad irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Symbol	Accession No. ^a	Ratio of median
nuclear receptor subfamily 3	NR3C1	AA664219	1.834
small conductance calcium-activated channel	KCNN3	AA491238	1.723
SH3-domain binding protein2	SH3BP2	R48132	1.633
bone morphogenetic protein receptor	BMPR2	B20203	1.63
GS3955 protein	GS3955	AA458653	1.629
pleiographin	PTN	AA001449	1.604
telomerase reverse transcriptase	TERT	AI824948	1.583
ribonucleotide recudtase M2 polypeptide	RRM2	AA187351	1.554
core promoter element binding protein	COPEB	AA055585	1.54
5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein	TPBG	AA425666	1.538
deoxycytidine kinase	DCK	AA448685	1.532
histone deacetylase 1	HDAC1	AA465353	1.529
NIMA-related kinase	823794	AA490263	1.52

^aGene Bank Accession No.**Table 4.** List of down regulated gene exposed to in U-937 200 rad irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Symbol	Accession No. ^a	Ratio of median
ribosomal protein S16	RPS16	AA668301	0.688
serine/threonine kinase 24	STK24	AA425401	0.686
FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	FRAP1	AA608530	0.685
epidermal growth factor	EGF	AI480081	0.65
guanine nucleotide binding protein	GNB2L1	R96220	0.641
translocating chain-associating membrane protein	TRAM	H15707	0.534
replicaton factor C	RFC2	AA663472	0.399

^aGene Bank Accession No.

Table 5. List of up regulated gene exposed to in U-937 500 rad irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Symbol	Accession No. ^a	Ratio of median
Tubulin alpha 2	TUBA2	AA626698	3.235
Protein-kinase interfer-inducible	- ^b	AA790079	2.369
Interferon receptor	- ^c	AA485426	2.36
Pleiotrophin	PTN	AA001449	2.142
Ras homolog gene family member H	ARHH	N90273	2.101
Prohibitin	PHB	AA055656	1.91
Deoxycytidine kinase	DCK	AA448685	1.896
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	AK2	AA457097	1.862
Primase polypeptide 1	PRIM1	AA025937	1.831
Protease cystein 1	LGMN	AA425938	1.746
Growth arrest-specific 6	GAS6	AA461110	1.674
Rho GTPase activating protein 4	ARHGAP4	H70464	1.567
Manic fringe homolog	MFNG	H22922	1.562
Bone morphogenetic protein receptor type II	BMPR2	N20203	1.512

^aGeneBank Accession No.^bESTs gene.^cPartial mRNA CDs.**Table 6.** List of down regulated gene exposed to in U-937 500 rad irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Symbol	Accession No. ^a	Ratio of median
X-ray repair complementing defective repair	xrCC5	AA775355	0.493
Tousled-like kinase 1	- ^b	AA504521	0.493
Protein phosphatase 2	PPP2F5B	AA129171	0.481
Mouse double minute 4 human homolog	- ^b	N66001	0.477
Osteoclast stimulating factor 1	OSTF1	AA283693	0.474
Cathepsin C	CTSC	AA644088	0.457
Ferritin light polypeptide	- ^c	A1341028	0.449
Translocating chain-associating membrane protein	TRAM	H15707	0.425
Four and a half LIM domains 3	FHL3	AA460438	0.332
Heat shock 70 kD protein 4	HSPA4	AA633656	0.306
Early growth response 1	EIGR1	AA486533	0.299
Fibroblast growth factor 12	GFG12	H19129	0.236

^aGene Bank Accession No.^bESTs gene.^cPartial mRNA CDs.**Table 7.** List of up regulated gene exposed to in U-937 γ irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Accession. No. ^a	Dose		
		100 rad	200 rad	500 rad
Tubulin, alpha 2	AA626698	0.9525	0.9965	2.552
Protein-kinase, interferon-inducible	AA779079	1.269	1.051	2.369
Interferon (alpha, beta dn omega) receptor	AA485426	0.710	1.249	2.360
Pleiotrophin	AA001449	0.923	1.604	2.142
Ras homolog gene family, member H	N90273	0.834	1.211	2.101

^aGeneBank Accession number.**Table 8.** List of down regulated gene exposed to in U-937 γ irradiation identified by using the human cancer DNA chip

Name	Accession. No. ^a	Dose		
		100 rad	200 rad	500 rad
Fibroblast growth factor 12	H19129	1.152	0.576	0.236
Early growth response 1	AA486533	0.955	0.577	0.299
Heat shock 70 kD protein 4	AA633656	1.038	0.623	0.306
Four and a half LIM domains 3	AA460438	1.415	1.082	0.332
Translocating chain-associating membrane protein	H15707	0.707	0.534	0.425

^aGeneBank Accession number.

Ratio Image	Name	ID	Flags	Ratio of Medians	Median of Ratios	Rgn Ratio	Index
	Tubulin, alpha 2	AA626698	-	3.235	3.054	4.958	503 ←
	Tubulin, alpha 2	AA426374	-	2.446	2.447	3.299	505 ←
	protein-kinase, interferon-inducible dou	AA779079	-	2.369	2.494	4.611	335
	interferon (alpha, beta and omega) recep	AA485426	-	2.36	2.31	3.916	275
	Tubulin, alpha 2	AA626698	-	2.348	2.42	3.38	248 ←
	Tubulin, alpha 2	AA426374	-	2.192	2.179	3.104	250 ←

(a) 500 rad

↑

	Tubulin, alpha 2	AA426374	-	0.841	0.835	0.982	505
	Tubulin, alpha 2	AA626698	-	0.935	0.997	1.114	248
	Tubulin, alpha 2	AA626698	-	0.959	0.937	0.915	503

(b) 200 rad

Fig. 3. The result of GenePix interesting features report. (a) 500 rad exposed to U-937 (b) 200 rad exposed to U-937. Tubulin gene was up-regulated after exposed 500 rad than radiation of 200 rad.

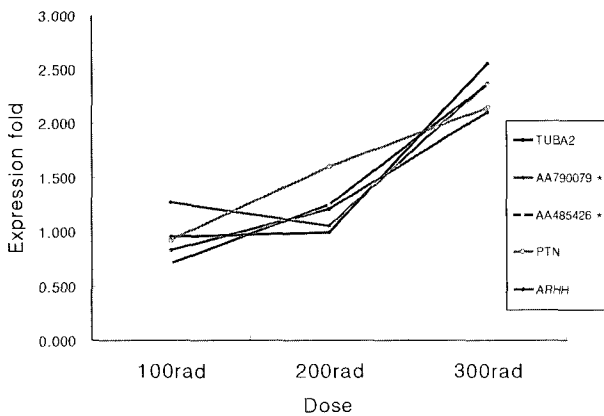


Fig. 4. Microarray analysis of up-regulated gene expression by IR-radiation. TUBA2, Tubulin alpha 2; PTN, pleiotrophin; ARHH, ras homolog gene family member H. *, non named, GeneBank No.

량에 따른 발현 감소는 Fig. 5에 도식화 하였다.

고찰

본 연구에서 U-937 세포를 이용하여 방사선 조사 24시 후에 나타나는 선량별 유전자 발현 변화를 분석하였다. 100 rad에서 가장 많은 발현의 증가를 나타낸 유전자는

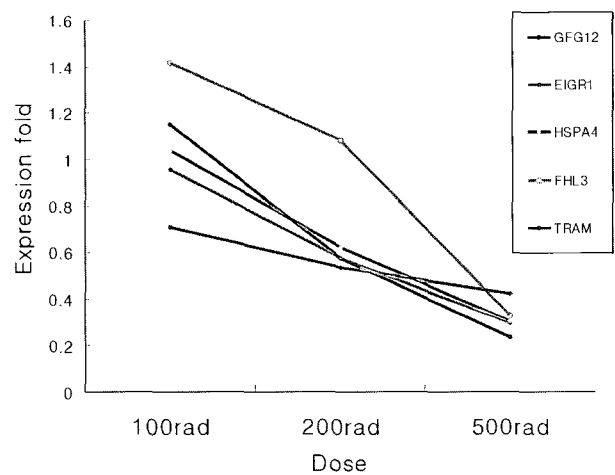


Fig. 5. Microarray analysis of down-regulated gene expression by IR-radiation. GFG12, fibroblast growth factor 12; EIGR1, early growth response 1; HSPA4 heat shock 70 kD protein 4, FHL four and a half LIM domains 3; TRAM, Translocating chain-associating membrane.

thymine-DNA glycosylase 유전자로 Ratio of median 값이 1.289로 나타났다. v-myb avian myeloblastosis viral oncogen은 1.205의 Ratio of median 값으로 다른 유전자들은 1.2 EF를 넘기지 않았다. 대체적으로 100 rad 방사선 조사 조건에서는 세포의 mRNA 발현의 변화

가 크게 나타나지는 않았다고 판단된다. Normalization으로 포함되기는 하나, 100 rad 조사조건에서 1.2 이상 증가를 보인 thymine-DNA glycoylase 유전자는 DNA damage에 관련 유전자로 molecular function으로 G/T-mismatch-specific thymine DNA glycosylase로 알려져 있다. 역시 100 rad 조사 조건에서 1.2의 expression fold를 나타낸 v-myb avian myeloblastosis viral oncogene 유전자는 transcription factor의 기능을 가지며 Anti-apoptosis의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 발현이 감소됨을 나타낸 mutS homolog 2 colon cancer nonpolyposis type 1 유전자는 DNA mismatch repair protein으로 알려져 있으며, 역시 발현의 감소를 보인 dCMP deaminase 유전자의 정식 명칭은 deoxycytidylate deaminase로 아직 정확한 기능을 밝혀져 있지 않으나 zinc binding motif를 가진 것으로 추측하고 있다. 역시 DNA에 관련한 효소로 nucleotide를 기질로 하는 thymidylate synthetase로 기능이 밝혀져 있다. 100 rad에서 적은 수치나마 발현의 증가와 감소를 보이는 유전자들은 대부분 DNA의 수복과 합성에 관련한 유전자들이며, 세포막이나 구조에 관여하는 유전자들의 변화에는 그 변화가 전혀 없음을 알 수 있다. 100 rad 방사선이 세포내부 DNA에 손상을 준 것으로 추측할 수 있으며 이에 대한 방어로 DNA 수복과 합성에 관련한 유전자들의 발현이 증가된 것으로 볼 수 있다.

한편, Tubulin은 세포내부에 cell skeleton의 구성에 주요한 역할을 담당하는 protein이며, 세포의 성장에서 특이한 발현 양 증감을 볼 수 없는 house-keeping gene으로 알려져 있다. 본 연구 결과(Table 7, Fig. 4)에서 보여준 바와 같은 방사선 조사에 따른 Tubulin 유전자의 특징적 발현 증가는 이 유전자의 방사선 민감성을 mRNA수준에서 처음으로 밝힌 것으로 사료되며, 방사선 피폭에서 Tubulin 단백질의 양이 특이적으로 증가한다는 것을 보여준 Porter *et al.*(2001)의 연구와 일치된 결과를 보여준다. Porter 등의 연구는 사람의 혈구세포 중에서 300 rad의 방사선조사에 의하여 Tubulin 단백질의 양이 특이적으로 증가되며, 이 단백질양의 증가는 조사선량이 증가됨에 따라 비례적으로 증가함을 보여주었다. 이는 DNA 손상에 대한 반응으로 DNA의 복구될 수 없는 손상을 입었을 경우 apoptosis을 일으키게 되며, 이 과정에서 cell skeleton에도 변화를 나타내고, apoptosis cell signalling에 관련하여 있을 것으로 추측되고 있다.

혈구세포는 방사선에 대해 매우 민감하여 피폭에 따른 혈구세포의 변화가 가장 빠른 반응을 나타냄으로 (Amundson *et al.*, 2000), 선량계를 착용하지 않고 방사선에 피폭되었을 경우에 피폭손상에 대한 판정법으로 피

폭자의 혈액검사를 통한 혈구수의 측정이 쉽게 이용될 수 있으며 그 외에 골수검사, DNA 손상 측정법 그리고 염색체 이상 빈도 및 micronuclei 측정법이 이용된다. Micronuclei 검사는 방사선에 의하여 손상을 받은 염색체는 핵 분열시 방추체에 의하여 daughter nuclei로 끌려가지 못하고, 세포 분열과정에서 daughter cell의 어느 한쪽에 분포하여 하나 또는 여러 개의 작은 핵을 형성한다고 알려져 있는 배경으로 하기에, DNA 손상에 의한 Tubulin 유전자의 반응은 매우 의의가 있는 것으로써 저선량의 방사선이 DNA에 일으키는 손상여부를 척도화 할 수 있음을 시사하고 있다.

따라서 본 연구에서 다시 한번 증명된 Tubulin 유전자의 방사선 피폭에 선량에 따른 발현 변화의 결과는 이 유전자가 방사선피폭에 대한 손상지표로 사용할 수 있는 유력한 유전자로써 제안하고자 한다.

이러한 Tubulin alpha 2 유전자의 이온화 방사선에 대한 감수성은 낮은 선량에 대한 피폭손상에 대한 신속하고 정확한 판정에 이용 가능할 것으로 사료된다. U-937 세포에서 저 선량의 방사선에 의한 유전자 발현의 변화를 추적하였으며, 이는 사람의 혈구 세포유래 종이므로 임상적인 결과의 응용에도 좋은 자료가 될 것으로 사료된다.

방사선 조사에 의하여 용량반응의 관계로 발현이 저해된 유전자들(Fig. 5)도 방사선량에 따라 발현감소반응을 보이는 지표로써 역시 이용이 가능할 것으로 기대된다.

반면, 유전적인 손상의 스트레스 반응에 중심적인 역할을 담당하는 tumor protein 53(*TP53*) 관련 유전자들 중 p53 inducible protein, p53-induced protein, tumor protein 53-binding protein에서는 선량에 따른 발현의 변화차이를 볼 수 없었다. Apoptosis관련 유전자들의 발현 증가에도 불구하고 p53 관련 유전자들의 변화는 normalization 범위에 속하여 발현변화를 나타내지 않은 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처 국가 원자력 중장기 연구개발사업의 연구비(과제번호 M20104000013-01A0400-01521)의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Amundson, S.A., Do, K.T., Shahab, S., Bitter, M., Meltzer, P., Trent, J. and Fornace, A.J. Jr. (2000): Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat. Res.*, **154**, 342-346.

- Amundson, S.A., Bitter, M., Chen, Y., Trent, J., Meltzer, P. and Fornace, A.J.J. (1999): Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene*, **18**, 3666-3672.
- Beninson, D. (1996): Risk of radiation at low doses, in; Proc. of 1996 International congress on radiation protection, I, 19-23.
- Boothmab, D.A., Burrows, H.L. and Yang, C.R. (1997): Damage-sensing mechanisms in human cells after ionizing radiation. *Stem. Cells*. **15**(suppl 2) 364-374.
- Ge, J.L., Jin, H.Y., Jin, L.F. and Gao, S.Y. (2001): Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Cancer Res.*, **61**, 5948-5949.
- Hall, E.J. (1979): Radiobiology for the radiologist, J. B. Lippincott co. Philadelphia, pp. 519-530.
- Mossmann, K.L. (1997): Radiation risk communication in human subject research. *Health Phys.*, **70**, 749-750.
- Porter, L.A. and Lee, J.M. (2001): alpha-, beta-, and gamma-Tubulin polymerization in response to DNA damage. *Exp. Cell. Res.*, **270**, 151-158.
- Rathfuss, A. (2000): Induced micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, **60**, 390-394.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer*, **17**, 565-577.