

방사선에 의한 암세포주 특이적 유전자 발현 양상

박지윤·김진규¹·채영규*

한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹한국원자력연구소 동위원소 방사선 응용팀

Cell-type-specific Gene Expression Patterns in Human Carcinoma Cells followed by Irradiation

Ji-Yoon Park, Jin-Kyu Kim¹ and Young Gyu Chai*

Department of Biochem & Mol. Biol, Hanyang University Ansan 426-791, Korea

¹RI Radiation Research Team, Korea Atomic Energy Research Institute 305-353, Korea

Abstract - Ionizing radiation is a well-known therapy factor for human carcinoma cells. Genotoxic stress mediates cell cycle control, transcription and cellular signaling. In this work, we have used a microarray hybridization approach to characterize the cell type-specific transcriptional response of human carcinoma MCF-7 and HeLa cell line to γ -radiation, such as 4 Gy 4 hr. We found that exposure to γ -ray alters by at least a \log_2 factor of 1.0 the expression of known genes. Of the 27 genes affected by irradiation, 11 are down-regulated in MCF-7 cells and 2 genes induced by radiation, 15 are repressed in HeLa cells. Many genes were involved in known damage-response pathways for cell cycling, transcription factor and cellular signaling response. However, in MCF-7 cells, we observed gene expression pattern in chromatin, apoptosis, stress, differentiation, cytokine, metabolism, ribosome and calcium. In HeLa cells, it showed clearly the expression changes in adhesion and migration, lysosome, brain, genome instability and translation. These insights reveal new therapy directions for studying the human carcinoma cell response to radiation.

Key words : irradiation, genotoxic stress, human carcinoma cells, expression pattern, cell type-specificity

서론

방사선 치료는 전리방사선이 생물체에 조사되어 나타나는 작용을 이용하는 것으로서, 현재 치료용으로 사용되는 방사선은 X선, γ 선, 전자선, 중성자선 등의 단파장이 있다(Helsper *et al.* 1967). 암세포주에 방사선 등의 유

전독성 스트레스를 노출하여 세포주기 조절(Wang *et al.* 1999), 세포사멸(Sheard *et al.* 1997), DNA 수선(Bashkirov *et al.* 2000), 신호 전달(Cartee *et al.* 2000) 등 다양한 유전자의 발현을 유도함으로써(Papathanasiou and Fornace 1991; Fornace *et al.* 1999a) 선택적인 조직파괴작용에 의한 방사선 치료가 가능하였다.

외부 유전독성 스트레스에 대한 반응성 연구를 위하여 방사선 조사에 민감한 MCF-7과 HeLa 세포를 선정하였고(O'Connor *et al.* 1997; Fornace *et al.* 1999b; Soto *et*

* Corresponding author: Young Gyu Chai, Tel. 031-400-5513, Fax. 031-406-6316, E-mail. ygchai@hanyang.ac.kr

al. 2000), 기존 연구인 MCF-7 (Park *et al.* 2003)과 HeLa 세포에 조사한 방사선량, 배양시간에 따른 유전자 발현 패턴으로부터 세포 특이적인 유전자 발현에 초점을 맞출 수 있었다.

따라서, 본 연구는 암세포주 특이적 유전자 발현 양상을 개괄적으로 분석함으로써, 방사선 치료를 보다 효과적으로 수행할 수 있는 지표를 마련하고자 MCF-7과 HeLa 세포에서 나타나는 특이적인 유전자 발현 패턴을 cDNA microarray 분석을 통하여 규명하였다.

재료 및 방법

1. 세포의 배양

MCF-7과 HeLa 세포는 각각 한국 세포주은행과 한양대학교 유전학실의 이철훈 교수 연구실로부터 분주 받았고, 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, USA) 100 units mL⁻¹의 penicillin, 100 µL mL⁻¹의 streptomycin (Gibco-BRL, USA)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL, USA)을 이용하여 5% CO₂와 37°C가 유지되는 배양기에서 12시간 배양하였다.

2. 방사선의 조사

방사선 조사는 서울대학교 의과대학의 방사선 조사기 (Cs-137 irradiator, USA)를 이용하였고, 사용된 방사선 기준량은 282.2 cGy min⁻¹이었다 (Park *et al.* 2003). 실험군은 MCF-7, HeLa 세포에 4 Gy의 방사선을 조사한 후 4시간 동안 배양하였다.

3. Total RNA 분리 및 확인

Total RNA의 분리는 Trizol 방법 (Gibco-BRL, USA)에 의해 정제하였고 (Chomczynski and Sacchi 1987), 얻어진 RNA의 확인은 1% 포름알데하이드 아가로스 겔에서 수행하였다 (Lehrach *et al.* 1977).

4. Probe 준비

MCF-7 세포와 HeLa 세포로부터 준비한 probe의 합성과정은 다음과 같다. 각각의 Cy5 probe와 Cy3 probe는 total RNA 50 µg, mRNA (1.0 kb), oligo-dT (1.5 µg), DEPC-처리된 멸균수를 첨가하여 각 probe의 부피를 20.5 µL로 맞추었다.

각 세포주에서 준비된 각각의 Cy3 probe, Cy5 probe는

70°C에서 5분 동안 열변성 과정을 거쳐 5× Avian myeloblastosis viral (AMV) reverse transcriptase (Promega, USA)에 의한 RT-PCR 과정을 수행하였다. RT-PCR 조건은 AMV buffer (Promega, USA) 8 µL, low dT NTP (5 mM dATP, dGTP, dCTP, 2 mM dTTP) 4 µL, Cy3-dUTP (Amersham Bioscience, USA) 4 µL, Cy5-dUTP (Amersham Bioscience, USA) 4 µL, RNase inhibitor 1 µL, AMV reverse transcriptase (20 unit µL⁻¹) 2.5 µL를 첨가하여 반응액의 부피를 40 µL로 맞추었다. 각각의 Cy3 probe, Cy5 probe를 42°C에서 1시간 동안 반응하여 AMV reverse transcriptase를 첨가하여 RT-PCR 반응을 수행하였다. 반응은 0.5 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 5 µL, 1 N NaOH 10 µL를 첨가하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 반응용액에 1 M Tris-HCl (pH 7.5) buffer 25 µL를 첨가하고 CentriSep spin column을 사용하여 1,000×g에서 3분간 원심 분리하였다. 원심분리가 끝난 반응액에 준비한 probe를 첨가하여 2.5배 부피의 100% 에탄올 250 µL, 0.1배 부피의 3 M sodium acetate 10 µL를 첨가하여 잘 섞은 후 -70°C에서 15분 동안 유지하였다. 침전된 cDNA는 15,000×g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하고 70% 에탄올 1 mL로 세정하여, 원심 분리를 통해 pellet을 분리하였다. Cy3 probe와 Cy5 probe는 건조하여 각각 hybridization buffer 7.5 µL씩 첨가하여 15 µL의 probe를 준비하였다.

5. Prehybridization of arrays

본 연구에 사용한 Human 0.48 K cDNA microarray (Macrogen, Korea)는 duplicated spotting chip으로서, cancer, cell cycle, chromatin, chromosome, stress, repair, proteasome, cytokine, cytoskeleton, hormone, metabolism, mitochondria 등의 250여개의 유전자와 50여개의 EST, 50여개의 unknown gene을 포함한 480여개의 유전자 정보를 지닌 chip으로서, 본 방사선 연구의 목적에 부합하는 유전자를 갖추고 있어 본 연구수행에 사용하였다. Array 위에 준비한 전하이브리드 용액 (prehybridization buffer) 15 µL를 떨어뜨리고, 덮개 유리를 덮어 상온에서 2시간 동안 반응하였다. 세정은 2× SSC (saline sodium citrate buffer), 0.2× SSC 용액으로 각각 2분간 세척하여 원심 분리로 140×g에서 3분간 건조하였다.

6. Hybridization and Scanning

합성된 DNA probe 15 µL를 단일 가닥으로 만들어, 덮개 유리를 덮은 후, 62°C 하이브리드 형성기 (hybridization incubator (Finemould Precision Ind. Co., Korea))에서

12시간 동안 하이브리드 반응을 수행하였다. 세정은 시트레이트 생리식염수 용액 ($2 \times \text{SSC}/0.2\%$ sodium dodecyl sulfate (SDS))을 이용하여 58°C 에서 30분 동안 2회 세척하고, $0.05 \times \text{SSC}$ 용액으로 5분간 상온에서 세척하여 원심분리로 $140 \times \text{g}$ 에서 3분간 건조하였다. 결과의 분석은 GMS418 스캐너 (Affimetrix, USA)와 Imagen 3.0을 이용하여 이미지 비교, 분석을 수행하였다 (Park *et al.* 2003).

결과 및 고찰

사람의 암 세포주에 방사선을 조사하여 유전자 발현 양상을 살펴본 대표적 선행 연구는 p53 wild type을 갖는 ML-1, Molt4, SR, A549, MCF7, RKO의 6개 세포주와 p53 mutant type을 갖는 CCFR-CEM, HL60, K562, H1299, RKO-E6, T47D의 6개 세포주에 20 Gy의 γ 선을 처리하여 4시간 배양 후 나타나는 유전자 발현 양상과 alkylating agent, UV를 조사하여 4시간 후 관찰되는 유전자 발현 양상을 아울러 분석한 결과였다 (Fornace *et al.* 1999b). 20 Gy의 γ 선을 MCF-7 세포주에 처리하여 4시간 배양 후 특이적인 발현 양상을 나타낸 유전자는 FRA1 9.5배, REL-B 4.4배, MDM2 2.5배, CIP1/WAF1 22.4배, BAX 2.9배로 증가되었다 (Fornace *et al.* 1999b).

본 방사선 연구의 목적은 방사선에 의한 암세포주 특이적 발현패턴을 조사하고자 방사선에 민감한 여성의 암유래 세포주인 MCF-7, HeLa의 두 세포의 유전자 발현 양상을 비교 및 분석하였다. 비교 유전자 (Control gene)는 lambda DNA를 사용하였고, 발현변화를 나타낸 유전자들은 표로 나타내었다 (Table 1~3). 유전자의 발현 변화는 \log_2 값을 기준으로 lambda DNA보다 1배 이상 변화된 유전자에 제한하였다 (Eisen *et al.* 1998). MCF-7 세포에서는 27개의 유전자의 발현이 증가되었고, 11개의 유전자의 발현이 감소하는 경향을 보였으나, HeLa 세포에서는 2개의 유전자의 발현이 증가하였고, 15개의 유전자의 발현이 감소한 것으로 관찰되었다 (Table 1). 발현양

Table 1. The transcriptional response of human carcinoma cells to γ -radiation

Treatment	Number of known genes	
	Induced	Repressed
MCF-7	27	11
HeLa	2	15

*We found that exposure to γ -ray alters by at least a \log_2 factor of 1.0 the expression known genes and of an equivalent number of expressed sequence tags in the following conditions of 4 Gy 4 hr.

상의 분석 결과, 두 세포에서 공통적으로 발현된 유전자는 cell cycle, transcription factor, signaling에 속하는 유전자들로 관찰되었다. 세포 주기 관련 유전자로서, HeLa 세포에서 pericentriolar materail 1 (PCM1) 유전자가 3.0배

Table 2. The transcriptional response of MCF-7 cells to γ -radiation

Induced genes (27)	\log_2 factor	Function
Cdc5-related protein (PCDC5RP)	6.8	cell cycle
Histone H2A.Z	6.2	chromatin
TRRAP protein/ATM-related protein	5.4	apoptosis
Eukaryotic translation initiation factor 1A	5.1	RNA
Monocyte differentiation antigen CD14 precursor	5.1	CD
p21/WAF1	4.8	cell cycle
Small zinc finger-like protein (DDP2)	4.6	transcription
Endozepine	4.4	cytokine
Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	3.9	coagulation
Heterochromatin protein 1 homolog gamma	3.7	chromatin
Amyloid-like protein 2 precursor	3.6	apoptosis
Hsp70	3.6	stress
Estradiol 17 beta-dehydrogenase 2	3.4	hormone
Interleukin-11 receptor	3.4	cytokine
Erythroblast macrophage protein EMP	3.0	differentiation
Glutathione peroxidase precursor	2.9	repair
Transposon-like element THE-7 sequence	2.8	transport
Ribosomal protein S3a	2.7	ribosome
Histone H1 (0)	2.7	chromatin
Ribosomal protein L14 (RPL14)	2.5	ribosome
Calmodulin	2.4	calcium
Retinoblastoma-binding protein (RbAp46)	2.3	cancer
c-myc binding protein/MM-1/CA repeat +	2.3	transcription
bcl-w/KIAA0271	2.2	apoptosis
Nucleoside diphosphate kinase A	2.1	metabolism
Hsp82	2.0	stress
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)	1.7	metabolism
Repressed genes (11)	\log_2 factor	Function
Chorionic somatomammotropin hormone CS-2	-5.9	hormone
Insulin-like growth factor II	-4.2	signaling
Guanidine nucleotide-binding protein, G (i)2, alpha-subunit	-3.8	signaling
Procholecystokinin precursor	-3.6	hormone
Oncoprotein 18 (Op18) gene, complete cds.	-2.6	cancer
Perosin	-2.5	unknown
60S acidic ribosomal protein P1	-2.1	ribosome
ERK activator kinase (MEK2)	-1.7	signaling
estrogen receptor	-1.5	EST
Eosinophil granule major basic protein precursor	-1.3	differentiation
Chorionic somatomammotropin hormone CS-2	-1.2	hormone

감소되었고, MCF-7 세포에서는 Cdc-related protein (PCDC5RP), p21/waf1 유전자가 6.8배, 4.8배 증가되는 것으로 나타났다. Transcription factor 관련 유전자에서는 HeLa 세포에서 zinc finger 220 (ZNF220), cyclic AMP response element-binding protein 2 (CREB2)가 -5.4배, -1.7배 감소되었고, MCF-7 세포에서는 small zinc finger-like protein (DDP2), c-myc binding protein이 4.6배, 2.3배 증가하였다. Signaling 관련 유전자에서는 HeLa 세포에서 insulin-like growth factor IA, growth hormone 2가 -2.9배, -1.8배 감소하여 나타났고, MCF-7 세포에서는 Insulin-like growth factor II, Guanidine nucleotide-binding protein G_i alpha subunit, ERK activator kinase (MEK2)가 각각 -4.2배, -3.8배, -1.7배 감소되어 관찰되었다.

방사선 조사에 따라 두 세포주에서 공통적으로 발현 변화를 나타낸 유전자와 동시에 각 세포주에서 특이적으로 발현된 유전자들을 살펴본 결과, 유방암 세포주인 MCF-7 세포에서는 chromatin, apoptosis, stress, differentiation, cytokine, metabolism, ribosome, calcium 등에 관한 유전자들의 발현 변화가 특이적으로 나타났다(Table

2). Chromatin 관련 유전자인 histone H2A.Z, heterochromatin protein 1 homolog gamma, histone H1 (0)이 각각 6.2배, 3.7배, 2.7배 발현이 증가되었고, apoptosis 관련 유전자인 TRRAP protein, amyloid-like protein 2 precursor, bcl-w/KIAA0271은 각각 5.4배, 3.6배, 2.2배의 발현이 증가되었으며, stress 관련 유전자인 Hsp70, Hsp82는 3.6배, 2.1배의 발현의 증가를 나타내었다. differentiation에 관한 유전자는 erythroblast macrophage protein EMP, eosinophil granule major basic protein이 각각 3.0배, 1.3배의 발현이 증가되었고, cytokine 유전자인 endozepine, interleukin-11 receptor는 4.4배, 3.4배의 발현 패턴을 보여주었으며, metabolism에 관련된 nucleoside diphosphate kinase A, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)는 각각 2.1배, 1.7배의 발현이 증가되었고, ribosome에 관련된 ribosomal protein S3a, ribosomal protein L14는 각각 2.7배, 2.5배 발현이 증가되었으나, 60s acidic ribosomal protein P1은 -2.1배로 발현이 감소되었다. 이밖에도, calcium과 관련하여 calmodulin 유전자의 발현이 2.4배 증가하는 패턴을 관찰할 수 있었다.

MCF-7 세포에서 특이적으로 발현되는 다양한 유전자들에 반해, HeLa 세포에서는 adhesion & migration, lysosome, brain, genomic instability, translation 등에 관련된 유전자들의 변화가 더욱 뚜렷하게 나타났다(Table 3). Adhesion & migration을 수행하는 laminin-binding protein이 -3.5배, lysosome 관련 protein인 cation-independent mannose 6-phosphate receptor가 -2.9배, brain에 관련된 tau microtubule-associated protein (MAPT)이 -2.9배, genomic instability에 관여하는 spermatogenesis associated protein 2 (SPATA2)가 -2.2배로 발현이 감소되었으며, translation에 관련된 유전자들은 발현이 다소 증가함을 보였다. Translation initiation factor 4C, 12S, 16S의 rRNA에 대한 mitochondrial gene 모두 1.0배로 발현이 증가된 것으로 관찰되었다.

MCF-7 세포에서는 chromatin, apoptosis, stress, differentiation, cytokine, metabolism, ribosome, calcium 관련 유전자들의 발현이 증가하였으나, HeLa 세포에서는 adhesion & migration, lysosome, brain, genomic instability, translation 관련 유전자들의 발현이 감소하는 경향을 나타냈다. 유방암 유래 세포주인 MCF-7 세포와 자궁암 유래 세포주인 HeLa 세포에서 관찰되는 발현 양상의 뚜렷한 경향은 breast, cervix 조직에서 특이적으로 발현되는 mRNA에 의한 전사물의 차이에 의해 비롯되는 것으로 고려되었다(Mueller *et al.* 2004). 이러한 조직 특이적 유전자 발현 양상의 분석은 향후 임상적인 암의 치료 및 예후의 판단을 위한 지표로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

Table 3. The transcriptional response of HeLa cells to γ -radiation

Induced genes (2)	log ₂	Function
Eukaryotic translation initiation factor 4C (EIF4C)	1.0	translation factor
Mitochondrial genes for tRNAs and 12S, 16S rRNAs	1.0	mitochondria
Repressed genes (15)	log ₂	Function
Zinc finger 220 (ZNF220)	-5.4	transcription factor
Immediate early response protein B61 (EFNA1)	-4.8	unknown
Laminin-binding protein (Laminin receptor 1: LAMR1)	-3.5	adhesion & migration
Pericentriolar material 1 (PCM1)	-3.0	cell cycle
Cation-independent mannose 6-phosphate receptor	-2.9	lysosome
Tau microtubule-associated protein (MAPT)	-2.9	brain
Insulin-like growth factor IA	-2.9	signaling
p53 induced protein (TP53)	-2.7	tumor suppressor
Spermatogenesis associated protein 2 (SPATA2)	-2.2	genomic instability
Phospholipase A2 group IVC (PLA2G4)	-2.0	unknown
Protein tyrosine kinase (TEC)	-1.7	transcriptional regulation
Growth hormone 2 (GH2)	-1.8	signaling
Cyclic AMP response element-binding protein 2 (CREB2)	-1.7	transcription factor
v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1 (ARAF1)	-1.0	growth & development

결 론

1. 본 연구는 방사선 조사에 의한 암세포 특이적인 유전자의 발현 양상을 cDNA microarray를 통하여 분석하였다.

2. 공통적으로 발현되는 유전자는 세포 주기(cell cycle), 전사 인자(transcription factor), 신호 전달(signaling) 관련 유전자였다.

3. 세포 특이적인 발현 양상을 나타낸 유전자로서, MCF-7 세포에서는 chromatin, apoptosis, stress, differentiation, cytokine, metabolism, ribosome, calcium 등의 유전자로 관찰되었으며, HeLa 세포에서는 adhesion & migration, lysosome, brain, genomic instability, translation 관련 유전자로 나타났다.

사 사

본 연구는 과학기술부 원자력연구기반확충사업(2003. 6. 01~2004. 5. 31)의 일환으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Bashkirov VI, JS King, EV Bashkirova, J Schmuckli-Maurer and WD Heyer. 2000. DNA repair protein Rad55 is a terminal substrate of the DNA damage checkpoints. *Mol. Cell. Biol.* 20:4393-4404.
- Cartee L, JA Vrana, Z Wang, JS Park, M Birrer, PB Fisher, S Grant and P Dent. 2000. Inhibition of the mitogen activated protein kinase pathway potentiates radiation induced cell killing via cell cycle arrest at the G2/M transition and independently of increased signaling by the JNK/c-Jun pathway. *Int. J. Oncol.* 16:413-422.
- Chomczynski P and N Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Eisen MB, PT Spellman, PO Brown and D Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14863-14868.
- Fornace AJ Jr, SA Amundson, M Bittner, TG Myers, P Meltzer, JN Weinstein and J Trent. 1999a. The complexity of radiation stress responses: Analysis by informatics and functional genomics approaches. *Gene. Expr.* 7:387-400.
- Fornace AJ Jr, SA Amundson, M Bittner, Y Chen, J Trent and P Meltzer. 1999b. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18:3666-3672.
- Helsper JT, GS Sharp and DE Rounds. 1967. The synergistic effect of laser radiation and ionizing radiation on malignant tumors *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.* 99:446-449.
- Lehrach H, D Diamond, JM Wozney and H Boedtker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751.
- Mueller A, DS Merrell, J Grimm and S Falkow. 2004. Profiling of microdissected gastric epithelial cells reveals a cell type-specific response to *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 127:1446-1462.
- O'Connor PM, J Jackman, I Bae, TG Myers, S Fan, M Mutoh, DA Scudiero, A Monks, EA Sausville, JN Weinstein, S Friend, AJ Fornace Jr and KW Kohn. 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57:4285-4300.
- Papathanasiou MA and AJ Fornace Jr. 1991. DNA-damage inducible genes. *Cancer Treat. Res.* 57:13-36.
- Park JY, CI Hwang, WY Park, JK Kim and YG Chai. 2003. Signal transduction-related gene expression analysis in MCF-7 flowed by γ -radiation. *Korean J. Environ. Biol.* 21:52-55.
- Pratt SE and MN Pollak. 1993. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res.* 53:5193-5198.
- Sheard MA, B Vojtesek, L Janakova, J Kovarik and J Zaloudik. 1997. Up-regulation of Fas (CD95) in human p53 wild-type cancer cells treated with ionizing radiation. *Int. J. Cancer* 73:757-762.
- Soto J, C Sainz, D Gonzalez-Lamuno, A Falkenbach and S Cos. 2000. Low radon doses sensitize MCF-7 human breast cancer cells to taxol. *Oncol. Rep.* 7:941-944.
- Wang XW, Q Zhan, JD Coursen, MA Khan, HU Kontny, L Yu, MC Hollander, PM O'Connor, AJ Fornace Jr and CC Harris. 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3706-3711.

Manuscript Received: February 14, 2005

Revision Accepted: April 28, 2005

Responsible Editorial Member: Jae-Seong Lee
(Hanyang Univ.)