[UCI]I804:24011-200000233995

2007년 2월

博士學位論文

독소루비신 내성 백혈병세포에서 방사선 내성에 대한 분자기전

조선대학교 대학원

의 학 과

강 성 인

독소루비신 내성 백혈병세포에서 방사선 내성에 대한 분자기전

Molecular mechanism of radioresistance of the doxorubicin-resistant leukemic cell line

2007年 2月 23日

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

강 성 인

독소루비신 내성 백혈병세포에서 방사선 내성에 대한 분자기전

지도교수 최 철 희

이 논문을 의학박사학위 청구논문으로 제출함.

2006年 10月 日

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

강 성 인

강 성 인의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 임 동윤 인

위원 조선대학교 교수 오 윤경 인

위원 조선대학교 교수 기 근홍 인

위원 조선대학교 교수 윤 지수 인

위원 조선대학교 교수 최 철희 인

2006年 12月 27日

조 선 대 학 교 대 학 원

CONTENTS I

LIST OF TABLE ..... Ⅲ

LIST OF FIGURES ..... Ⅳ

ABSTRACT ..... Ⅴ

Ⅰ. 서론 1

Ⅱ. 연구 재료 및 방법 3

1. 세포 배양과 내성 세포주의 선별 3

2. 세포 독성실험 4

3. RT-PCR 분석..... 4

4. Western blot 분석 6

5. 미토콘드리아 단백질 추출 7

6. 핵 단백질 추출 7

7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 8

8. DNA chip 8

Ⅲ. 결과 11

1. 내인성 ROS-scavenging capacity가 증가되어 있는 독소루비신 내성세포 AML-2/DX100 세포에서 방사선에 대한 교차내성.....11

2. AML-2/DX100 세포에서 Bax의 미토콘드리아로의 translocation 변화 11

3. AML-2/WT와 AML-2/DX100세포사이에 방사선 감수성에 대한 MAPK 경로 11

4. AML-2/WT와 AML-2/DX100세포사이에 방사선 내성에 대한 NF-κB의 관여 12

5. cDNA microarray를 이용한 apoptosis에 관련된 유전자의 발현 양상의 측정 13

Ⅳ. 고찰 25

Ⅴ. 결론 30

Ⅵ. 감사의 글 31

Ⅶ. 참고 문헌..... 32

LIST OF TABLE

Table 1. Expression profiling for apoptotis-related genes by cDNA microarray analysis 14

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Resistance of AML-2/DX100 cells radiation 15

Fig. 2. Effect of radiation on expression and translocation to mitochondria of Bcl-2 and Bax 16

Fig. 3. Effect of MAPK and NF-κB inhibitors to radioresistance between AML-2/WT and AML-2/DX100 cells 17

Fig. 4. Effect of SB203580 on radiosensitivity in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells using MTT assay. 19

Fig. 5. Effect of SB203580 on radiosensitivity and p38 MAPK in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells 21

Fig. 6. NF-κB is activated through degradation of IκBα in AML-2/DX100 cells in comparison with AML-2/WT cells 22

Fig. 7. Expression of Bfl-1/A1 and granzyme H mRNAs was validated by RT-PCR assay in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells 23

Fig. 8. Two distinct pathways accounting for radiosensitivity of AML-2/WT and radioresistance of AML-2/DX100 cells 24

초록

독소루비신 내성 백혈병세포의 방사선에 의한 아포프토시스 내성의 분자기전

Molecular mechanism of radioresistance of the doxorubicin-resistant leukemic cell line

강 성 인
지도교수 : 최 철 희
조선대학교 대학원 의학과

This study investigated radioresistance mechanisms in the doxorubicin-resistant acute myelogenous leukemia (AML-2/DX100) cells. AML-2/DX100 cells also showed resistance to radiation. In AML-2/WT cells, radiation increased ratio of Bax/Bcl-2 expression and its translocation to mitochondria, consequently induced the release of cytochrome c from the mitochondria with the subsequent caspase-3 activation. On the contrary, in AML-2/DX100 cells, radiation neither increased Bax/Bcl-2 expression ratio nor its translocation to mitochondria. A specific p38 inhibitor SB203580 increased radioresistance in AML-2/WT cells but little in AML-2/DX100 cells. It inhibited radiation-induced Bax translocation in AML-2/WT cells but not in AML-2/DX100 cells, indicating that p38 MAPK is working after irradiation in AML-2/WT cells but not in AML-2/DX100 cells. Electrophoretic mobility shift assay and Western blot analysis revealed that NF-κB in AML-2/DX100 cells was more activated with degradation of cytosolic IκBα than was that of

AML-2/WT cells. cDNA microarray showed that Bfl-1/A1 and granzyme H in AML-2/DX100 were highly up-regulated (6.21-fold) and down-regulated (6.49-fold), respectively as compared with each of AML-2/WT cells, which were confirmed by RT-PCR assay.

Taken together, these results indicate that radioresistance mechanisms of AML-2/DX100 cells could be related to alterations in mitochondrial translocation of Bax and Bcl-2, and in expression of pro-apoptotic (granzyme H) and anti-apoptotic (Bfl-1/A1) genes. It has been shown that balance of p38 MAPK and NF-κB signals is a determinant in radiosensitivity of AML-2/WT cells and AML-2/DX100 cells.

I. 서론

암환자의 항암화학요법에 있어서 중요한 문제 중 하나는 항암제에 대한 약물내성으로, 다약물 내성(multidrug resistance, MDR)은 항암화학요법 치료 실패의 주된 원인이 되고 있다. 다약물 내성은 하나의 항암제에 노출되어 내성을 보이는 암세포가 원래의 항암제와 구조와 기능이 다른 항암제들에 대해서도 내성을 보이는 현상이다. 다약물 내성에 대한 여러 연구에서 임상적으로 유용한 기전으로는 세포들로부터 여러 가지 화학물질을 배출하는 세포막 단백질들(P-glycoprotein 등)의 활성화, 글루타치온 해독 시스템(glutathione detoxification system)의 활성화, apoptosis의 조절에 관여하는 유전자 및 단백질(p53, Bcl-2)의 변화 등이 알려져 있다(Stavrovskaya, 2000). 독소루비신은 중요한 급성 골수백혈병(acute myelogenous leukemia) 치료제이기 때문에, 독소루비신에 대해 내성을 갖게 되면 치료 실패의 원인이 될 수 있다(Puhlmann 등, 2005).

약물내성과 방사선 내성의 원인들 중 중복이 있을 가능성이 있고, 많은 항암제들과 방사선이 apoptosis를 공통된 사망 경로로 이용하므로, 항암제와 방사선에 의한 apoptosis의 조절이 암 치료에 있어 중요한 수단이 될 수도 있다(Bergman 등, 1997).

급성 골수백혈병의 치료에 대한 AML (acute myelogenous leukemia)-BFM-87 연구에 의하면 중추신경계 재발의 저위험군 환자들의 결과를 볼 때 전뇌 방사선조사(cranial irradiation)를 시행한 환자들에서 시행하지 않은 환자들보다 5년 무재발기간율이 의미 있게 더 높았으며 전뇌 방사선조사를 시행하지 않은 군에서는 중추신경계 재발이 약간 더 높게 나왔기에 전뇌방사선조사가 골수이식을 받지 않을 급성골수백혈병 환자들에게 필요한 치료라고 하였으며 중추신경계에 남은 모세포들(blasts)이 항암화학요법을 피하여 중추 신경계뿐만 아니라 골수에서의 재발을 초래하였을 것으로 보았다(Creutzig 등, 2005; Creutzig 등; 1992). 그러므로 약물내성과 방사선 내

성이 함께 나타나면 치료결과에 악 영향을 미치게 되므로 이러한 교차 내성의 기전을 알아내어 치료에 응용할 수 있으면 치료의 향상을 기할 수 있겠으나 아직까지는 약물내성이 방사선 내성에 어떻게 영향을 줄 수 있는지에 대한 분자 기전은 전체적으로 확실하게 알려지지 않았다. 항암제내성 백혈병 세포주에서 방사선에의 교차 내성에 대한 한 연구에서는 방사선 내성에 항암제 내성기전인 MRP, metallothionein, glutathion-S-transferase는 관여하지 않고 fibronectin과의 부착성과도 관계가 없으며 Bcl-2가 미토콘드리아로 translocation이 잘 되는 반면 Bax는 잘 안 됨으로써 cytochrome c의 세포질로의 유리가 저하되어 caspase 3의 활성화를 일으키지 못한 것이 관여된 것으로 보고하였다(서해동, 2005).

전리방사선은 다른 여러 가지 독성 자극들과 같이 여러 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway들과 nuclear factor-kB (NF-κB)를 동시에 보상적으로 활성화시키며 이 둘의 비율에 따라 세포생존이나 세포사망이 조절 된다 (Zhang 등, 2004). MAPK는 세 가지 subfamily가 있으며, ERK, JNK 및 p38MAPK이다. MAPK에 의한 apoptosis의 조절은 매우 복잡하고 논의의 여지가 있지만 ERK는 세포생존에 중요하고 JNK와 p38 MAPK는 apoptosis에 관계가 있다고 한다(Wada 등, 2004). NF-κB는 transcription factor로서 FLIP, Bcl-2 및 Bfl-1/A1과 같은 antiapoptotic protein들을 유도하여 apoptosis를 방해한다 (Kucharczak 등, 2003).

이에 본 연구에서는 항암제내성 세포인 AML-2/DX100 세포에서 방사선조사가 MAPK pathway 와 NF-κB에의 영향으로 apoptosis가 억제되어 방사선 내성을 초래하는지 여부와 그 분자 기전을 밝히고자 본 연구를 시행하게 되었다.

II. 연구재료 및 방법

1. 세포 배양 과 내성 세포주의 선별

1) 세포 배양

백혈병 세포주(OCL-AML-2)를 37℃, 5% CO_2와 습윤화된 배양기(Sanyo ElectricCo., Ltd., Osaka, Japan) 내에서 배양하였다. 배양액은 56℃에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL, Long Island, NY) 10%와 항생제(antibiotic-antimycotic, GibcoBRL, Long Island, NY)를 함유한 α-MEM (minimum essential medium alpha medium, GibcoBRL, Long Island, NY)배지를 AML-2세포에 사용하였다. 매우 낮은 온도(-196℃)에서는 세포내의 모든 대사 작용이 멈추게 되어 세포가 장기간 살아있는 상태로 유지되어 거의 영구적으로 보관이 가능하다(Grout 등, 1990). 그러므로 세포주의 변형, 오염, 배양기의 고장 등으로 인하여 세포주를 손실하게 되는 경우에 대비해 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) 10%, FBS 23.5%, 배양배지 66.5%를 혼합한 세포 동결배지와 함께 액체 질소에 보관해 두었다. 필요한 경우, 액체 질소에 보관되어 있는 동결 용기를 꺼내, 즉시 37℃의 수조에서 충분히 녹인 후 70% 알코올로 동결 용기의 외부를 소독하였다. DMSO는 세포 성장에 방해가 되므로 세포 동결 배지 10배의 배양 배지와 함께 원심 분리하여 상층 액을 버리고 세포만을 새 배양 배지에 부유하여 배양하였고 6시간 이후 배지를 교체해 주었다.

2) 내성 세포주의 선별

(1) 항암제 내성 백혈병 세포주의 선별

Doxorubicin (Sigma, St. Louis, MO)의 IC_{50}농도를 함유한 배양액에서 백혈병 세포주 AML-2세포를 배양하였다. 한 농도에서 약물을 3 일간 투여 후 약물을 제거하여 며칠 또는 몇 주 배양한 후 융합해지면 약물의 농도를 50%씩 증가시키는 방법으로 선별하여 IC_{50}의 10배 이상 되는 약물이 존재하는 배지에서도 잘 자라는 내성 아세포주를 수

립하였다. 내성 세포주를 수립한 후 안정될 때까지 일주일에 두 번씩 최소 6 개월 이상 계대 배양 후 실험에 사용하였다.

2. 세포 독성실험

Cytotoxicity 실험은 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinic dehydrogenase라는 효소가 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide]를 환원시켜 formazan을 형성시킬 수 있음을 근거로 formazan의 농도를 측정함으로써 생존한 세포수를 측정하는 MTT 방법을 이용하였다(Pieters 등, 1988). 대사과정이 정상적인 암세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띄는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다.

방사선 조사 세포독성 실험은 96 well microplate에 약물 없이 배양한 내성 세포주를 적절한 농도로 세포 부유액 100 ㎕씩을 각각 넣었다. 그리고 24 시간 후에 세포신호 억제제를 처치 후 30분 뒤 방사선을 조사하였다. 대조군 은 방사선을 조사하지 않고, 세포 대신 배양액만을 넣어 blank로 삼았다. 1일간 CO_2 배양기에서 배양한 후 모든 well에 MTT 용액(5 mg/ml PBS, Sigma, St. Louis, MO) 10 ㎕를 가해주고 다시 37℃, 5% CO_2에서 4-5 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 4-5 시간 후 각 well에서 80 ㎕ 씩 버린 다음 150 ㎕ DMSO를 넣고 10 분 동안 shaking해서 생성된 formazan 결정을 잘 녹여서 microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{세포 독성 작용 } \% = \frac{\text{항암제를 처치한 well의 흡광도}}{\text{항암제를 처치하지 않은 well의 흡광도}} \times 100\%$$

3. RT-PCR 분석

1) 총 RNA의 추출

TRIzol 시약(GibcoBRL, Long Island, NY)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. Polypropylene tube에 5×10^6 개의 세포를 침전시킨 후 TRIzol 1 ml을 넣고 5분 동안 15-30℃에서 반응시킨다. 200 ㎕ chlorofrom을 넣고 15 sec 동안 손으로 가볍게 섞어주고 2-3분 동안 15-30℃에서 반응시킨다. 4℃에서 13,200 rpm으로 15분간 원심분리하고 끝나면 상층 액을 tube에 옮긴다. 500 ㎕ isopropyl alcohol을 넣고 잘 섞어준 다음 10분 동안 15-30℃에서 반응시킨다. 4℃에서 13,200 rpm으로 15분 동안 원심분리하고 상층액을 버리고 75% EtOH를 RNA pellet에 넣고 vortexing한 후 4℃에서 13,200 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 다음 실온에서 pellet를 건조 시킨 후 0.1% DEPC water에 다시 녹였다. RNA 농도 (1 A260 unit of single-stranded RNA = 40 ㎍/ml)는 260 nm에서 측정하였고(DUR 650 spectrophotometer, Beckman), RNA 순도는 A260 (260 nm 에서의 흡광도)/A280 (280 nm 에서의 흡광도) 비로, RNA 보존도는 5 ㎍ RNA을 전기 영동하여 확인하였다.

이상에서 사용된 모든 용액은 제조한 후 하룻밤 동안 37℃에서 방치 후 121℃에서 20분간 고압 증기 멸균한 0.1% DEPC water를 가지고 만들었다.

2) 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

First strand cDNA를 1 U/㎕ RNasin (Promega, Madison, WI), oligo(dT) 450 ng, 40 mM tris-HCl (pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM each dNTP, 10 mM DTT (GibcoBRL, Long Island, NY)와 M-MLV reverse transcriptase (GibcoBRL, Long Island, NY) 200 U가 함유된 20 ㎕의 용액에서 총 RNA 1 ㎍으로부터 합성하였다.

PCR은 1 X PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 100 ㎍/ml gelatin, 0.05% triton X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각 primers 10 pM, 50 μM dNTP와 taq DNA polymerase (perkin-elmer life sciences, billerica, MA) 2.5 unit가 함유된 25 ㎕의 반응 액에서 시행하였다. PCR 반응에 사용한 Bfl-1/A1 primer의 sense, antisense는 각각 5'GACTATCTGCAGTGCGTCCTA-

CAG3' 와 5'AACATTTTGTAGCACTCTGGACGTT3'이며 granzyme H는 5'TGGC GGCATCCTAGTGAGAA3' 와 5'GCCCCCAAGGTGACATTTATG3' 그리고 β-actin은 5'ATGGATGACGATATCGCT3' 와 5'ATGAGGTAGTCTGTCAGGT3'이다. PCR 산물 을 1:5로 희석하여 사용하였다. PCR 기계는 GeneAmp PCR system 2400 (perkin-elmer life sciences, billerica, MA)을 사용하였으며 각 sample당 denaturation (at 95 °C for 30 s), annealing (at 60 °C for 30 s), 그리고 extension(at 72 °C for 30 s)로 32 cycle(β-actin은 25 cycle)로 실험하였으며 모든 PCR 산물을 72°C에서 5분간 마지막 extension하였다. 이 sample에 10X DNA dye (5 mg/ml bromophenol blue, 50% glycerol, 100 mM Tris, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 섞고 ethidium bromide이 첨가된 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 Kodak DC 290 digital camera를 사용하여 스캔하였다.

4. Western blot 분석

세포를 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 M DTT와 10 ㎍/ml leupeptin를 함유한 추출완충액 (1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS를 함유한 PBS용액)으로 용해시킨 후 sonication해서 DNA를 조각냈다. 단백질의 정량은 bovine serum albumin (BSA)를 표준으로 이용해서 bio-rad protein assay kit를 이용하여 측정했다. Western blot 방법은 Towbin 등 (1979)에 의해 처음 기술된 방법을 이용했다. 세포 총 단백질 50 ㎍을 0.1% SDS를 함유한 7% (w/v) polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 gel에 존재하는 단백질을 electroblotting 방법으로 nitrocellulose (NC) filter에 옮겼다. 비 특이적인 결합을 차단하기 위하여 NC filter를 5% 탈지분유를 함유한 tris-buffered saline-tween (TBST) 용액에 넣고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 0.05% TBST 용액으로 10 분간 1회, 15분간 1회 세척한 후 다시 새로운 TBST 용액에서 5분간 2회 세척했다. Filter를 1차 항체 Bcl-2, Bax (1:1000, Santacruz, Santa Cruz, CA), cytochrome c (1:1000, BD Pharmingen, San Diego, CA), caspase-3 (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), α-tubulin

(1:2000, Santacruz, Santa Cruz, CA), phosphorylated와 nonphosphorylated p38 MAPK (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA). IκBα (1:1000, Santacruz, Santa Cruz, CA), NF-κB (1:1000, Santacruz, Santa Cruz, CA) 그리고 β-actin (1:2000, Santacruz, Santa Cruz, CA)를 함유한 TBST 용액에 넣고 실온에서 1시간 동안 방치한 후 위와 같은 방법으로 세척하였다. 세척한 후 peroxidase가 표시된 sheep anti-mouse IgG (1:2000, Amersham, Piscataway, NJ)와 donkey anti-rabbit IgG (1:2000, Amersham, Piscataway, NJ)를 함유한 TBST 완충용액에 filter를 넣고 실온에서 각각 1시간 동안 방치한 후 TBST 완충용액으로 15분간 1회 5분간 4회 세척했다. Enhanced chemiluminescence (ECL^{R}) 방법을 이용하여 band들을 가시화했다.

5. 미토콘드리아 단백질 추출

세포를 차가운 PBS용액으로 2 회 세척하고 250 mM sucrose가 포함된 HMKEE완충액(20 mM HEPES-KOH, pH 7.0, 10 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 mM sodium EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10 μg/ml pepstatin A and 10 μg/ml leupeptin)을 넣어서 4℃에서 20분 동안 방치한 후 26-gauge needle 로 6-10회 통과 시킨 다음 1500 rpm에서 원심 분리하여 얻은 상층액을 13000 rpm에서 또 다시 원심 분리하여 상층 액은 취하여 세포질 단백질로 사용하고 남은 pellet은 2 mM PMSF, 0.1 M DTT와 10 μg/ml leupeptin를 함유한 추출완충액(1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS를 함유한 PBS용액)으로 용해시킨 후 sonication해서 DNA를 조각낸 후 원심분리하여 미토콘드리아 단백질로 사용하였다(Oh 등, 2004). Tubulin과 bax translocation에 대한 분석은 western blot방법을 시행하였다.

6. 핵 단백질 추출

세포를 차가운 PBS용액으로 2회 세척하고 1,2000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 Hypotonic buffer (10 mM HEPES/KOH, 2 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA, 10 mM

KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9) 400 μl으로 세포를 부유시킨 뒤 ice내에서 10분간 방치시키고 5,000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 세포질 단백질로 사용하고 남은 pellet은 차가운 PBS 1ml로 세척한 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하는 과정을 3번에 걸쳐 수행한다. 원심분리 후 남은 pellet을 saline buffer (50 mM HEPES/KOH, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9) 50μl로 부유시킨 후 ice에서 20분간 방치한다. Voltexing후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후 상층액을 취하여 핵단백질로 사용하여 western blot방법을 시행하였다.

7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

핵 단백질 5 μg에 bovine serum albumin은 20 μg, poly dI-dC (Pharmacia, Uppsala, Sweden)는 2 μg, buffer C (20 mM HEPES/KOH, 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)를 2 μl, buffer F (20% ficoll-400, 100 mM HEPES/KOH, 300 mM KCl, 10 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH 7.9)는 4 μl와 NF-κB sequence oligomer(5'-CAGAGGGGACTTTCCGAGAG-3')에 ^{32}P가 label된 probe를 500 cps를 섞어 총 시료양이 20 μl되게 한 후 실온에서 20분간 반응시킨다. DNA-단백질 복합체를 4% polyacrylamide gel에서 150 V로 1.5시간동안 전기영동시킨 후 gel을 건조해서 x-ray film (Fuji x-ray film)와 함께 -70℃에 노출시켜 autography를 시행하였다(Kawamura 등, 2001).

8. DNA chip

1) Total RNA 분리

Total RNA의 분리는 TRIzol reagant (GibcoBRL, Long Island, NY)을 이용하여 추출하였다. 세포를 원심분리로 수거하여 상층의 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 1 x 10^7 cell에 1 ml 의 TRIzol 을 넣어 부유 시킨 후 상온에 5분 정치하고, 0.3 ml chloroform을 첨가하여 다시 상온에서 2-3분간 정치하였다. 원심분리 하여 얻은 상층

액을 1.5 ml microtube에 옮긴 후 isopropanol 0.5 ml를 넣고 상온에서 10 분 정치한 다음 원심분리 하여 RNA를 침전시켰다. DEPC로 처리한 70% EtOH로 RNA를 세척 한 후 상온에서 건조시키고, 침전된 RNA를 ddH_2O에 녹인 후, spectrophtometer로(DU 650, Beckman, USA) RNA 농도를 측정하였다. Total RNA는 probe labeling을 수행하기 전까지 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

2) Probe 제작

RNA의 cDNA 역전사 반응과 Cylabeling 과정의 시약들은 DNA-chip hybridization kit (Digital Genomics, Seoul, Korea)를 사용하였다. 제작사의 지시에 따랐으며, 이를 간략히 기술하면 50 ㎍ total RNA에 1.5 ㎍ oilgo (dT)primer를 넣고 70℃에서 5분간 변성시킨 후 얼음에 정치하였고, 역전사 표지 반응은 1 mM dNTP, 0.4 mM dTT 및 0.15 mM Cy^3-, Cy^5-dUTP를 첨가하고 50 unit AMV reverse transcriptase를 사용하여 총 20 ㎕ 반응 액으로 cDNA를 labeling 하였다. 역전사 반응 후 Sephacryl S-100으로 labeling 된 cDNA를 정제하였으며 정제된 cDNA는 EtOH 침전으로 농축하고 sample 및 control 각 17.5 ㎕ hybridization buffer (6 x SSC, 0.2% SDS, 5x Denhardt Solution, 0.1mg/ml salmon sperm DNA)에 녹인 후 합하여 probe로 사용하였다.

3) Hybridization

cDNA chip은 TwinChip Human-8K (Digital Genomics, Seoul, Korea)를 사용하였다. Prehybridization buffer (6 X SSC, 0.2% SDS, 5 X Denhardt Solution, 1 mg/ml salmon sperm DNA) 30 ㎕ 를 cDNA chip에 넣고 cover glass로 덮은 후 밀봉하여 상온에서 2시간 정치하였다. 2 X SSC 와 0.2 X SSC로 cDNA chip을 세척한 다음 원심분리기를 이용하여 건조시켰다. Labeling된 probe 35 µl 를 95℃에서 2분간 정치하여 변성시킨 후 DNA chip위에 떨어뜨리고 cover glass로 덮었다. DNA chip을 100% 습도를 유지시킨 chamber안에 넣어 62℃에서 16시간 동안 hybridization하였다. Hybridization 후 60℃에서 세척용액(2 X SSC, 0.2 X SDS)으로 각각 30분씩 2회 세척

하였고 상온에서 0.05 X SSC에 5분간 세척한 후 원심분리로 건조시켰다.

4) Microarray 분석

cDNA chip의 판독과 해석은 ScanArray Lite (perkin-elmer life sciences, billerica, MA)와 Genepix 3.0 software (axon instruments, union city, CA)를 이용하였다. Cy^3와 Cy^5의 비율이 1이 되도록 프로그램으로 조절하고, 이를 중앙값 비를 기준으로 발현 증가와 감소를 분석하였으며, 이와 동시에 발현의 차이가 1.5배 이상 보이는 유전자들을 검색하여 분석하였다(Yang 등, 2002).

III. 결과

1. 내인성 ROS-scavenging capacity가 증가되어 있는 독소루비신 내성세포 AML-2/DX100 세포에서 방사선에 대한 교차내성

MRP가 과발현되어 있고 catalase가 감소되어 있는 특징을 가진 AML-2/DX100 세포를 AML-2/WT세포와 비교 시 방사선 내성이 1.6배 이상 증가되어 있다 (Fig 1).

2. AML-2/DX100 세포에서 Bax의 미토콘드리아로의 translocation 변화

본 연구에서는 AML-2/WT와 AML-2/DX100세포에서 방사선 조사 전·후에서 Western blot 기법을 이용하여 미토콘드리아로 translocation되는 Bcl-2와 Bax의 발현정도를 비교해 보았다. AML-2/WT세포에서는 방사선에 의해서 Bax가 미토콘드리아로 translocation이 증가하였으며 반면에 세포질에서는 감소하였다. 또한 미토콘드리아에서 Bax/Bcl-2 ratio를 비교해 보아도 방사선에 의해 증가 한 것을 볼 수 있었다. 미토콘드리아로 Bax의 translocation증가가 미토콘드리아에서 cytochrome c 를 방출하여 caspase-3를 활성화 시켜 apoptosis를 일으키는 기전은 이미 잘 알려져 있다. 반면에 AML-2/DX100 세포에서는, 방사선에 의해 세포질이나 미토콘드리아에서 Bax의 변화를 거의 볼 수 없으며, Bax/Bcl-2 ratio의 변화도 관찰할 수 없었다(Fig 2). 결과적으로, AML-2/WT세포에서는 방사선에 의해 미토콘드리아에서 Bax/Bcl-2 ratio의 증가로 apoptosis가 일어나지만, AML-2/DX100에서는 apoptosis가 거의 일어나지 않는다.

3. AML-2/WT와 AML-2/DX100세포사이에 방사선 감수성에 대한 MAPK 경로

전리 방사선은 복합적인 MAPK 경로 와 NF-κB의 활성을 동시에 보상적으로 유도하므로(Zhang 등, 2004), 이 경로에 대한 효과를 조사하였다. 먼저, AML-2/DX100

세포의 방사선에 대한 내성에 MAPK 경로의 저해제를 사용하여 실험하였다. 이 저해제는 MAPK인 p38MAPK, JNK 및 ERK를 각각 특이적으로 저해하는 SB203580, SP600125 및 PD98059를 사용하였다. 먼저 저해제로 30분전에 처치한 후 방사선 2-10 Gy로 조사하여 MTT분석을 이용해 AML-2/WT세포에 방사선 내성을 보이거나 또는 AML-2/DX100세포에 방사선 감수성을 갖게 하는 저해제를 찾기 위해 선별하였다. 먼저 JNK 저해제인 SP600125은 AML-2/WT세포에는 아무런 효과를 보이지 않았고 AML-2/DX100세포의 내성을 증가시켰다(Fig 3A). ERK 저해제인 PD98059은 AML-2/WT세포에 방사선 감수성을 증가시키고, AML-2/DX100세포에는 효과가 나타나지 않았다(Fig 3B). 마지막으로 p38MAPK의 저해제인 SB203580은 AML-2/WT에서 방사선 내성을 증가시켰으며, AML-2/DX100보다 내성 정도가 더 높게 나타나는 효과를 보였으나, AML-2/DX100에서는 거의 효과를 미치지 못했다(Fig 4A). SB203580에 대한 효과는 AML-2/DX100세포보다 AML-2/WT세포에서 방사선 내성 증가율이 더 높게 나타났으며 (Fig 4B) 이는 방사선에 의해 세포사가 일어나는 기전에 p38의 활성이 중요한 기전임을 증명해 준다. 8 Gy로 방사선 조사 후 p38MAPK의 활성과 발현 정도를 실험하였다. AML-2/WT세포에서는 방사선에 의해 증가된 p38MAPK의 인산화가 SB203580에 의해 저해되었으나 AML-2/DX100세포에서는 이러한 현상이 일어나지 않았다. 더하여 AML-2/WT세포에서 SB203580은 방사선에 의해 유도되는 Bax의 미토콘드리아로의 이동을 저해하였으나 AML-2/DX100세포에서는 이런 현상이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 5). 따라서 AML-2/WT세포에서는 방사선 조사 후 p38 MAPK가 활성화되고 Bax가 미토콘드리아로 이동되어 세포사가 일어나며 AML-2/DX100세포에서는 어떠한 현상도 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

4. AML-2/WT와 AML-2/DX100세포사이에 방사선 내성에 대한 NF-κB의 관여

IκB kinase (IKK)의 활성에 의해 인산화 된 cytosolic I kappa B alpha (IkBα)가 ubiquitination된 후 26S proteasom에 의해서 NF-κB와 같이 결합되어 있던 IκBα

가 조각나고 NF-κB는 핵내로 이동되므로(Magnani 등, 2000), 세포질내의 IκBα 발현은 AML-2/WT세포보다 AML-2/DX100세포에서 더 낮게 나타났다. 또한 Western blot분석과 EMSA기법을 이용하여 AML-2/WT세포보다 AML-2/DX100세포에서 핵내의 NF-κB 발현정도가 훨씬 높은 것을 밝혀냈다(Fig. 6). 또한 AML-2/DX100세포의 방사선 내성과 NF-κB의 관계를 규명하기 위해 NF-κB 저해제들을 사용하여 실험하였다. NF-κB를 저해하는 물질로 잘 알려진 PDTC와 IκB를 degradation시키는 26S proteasom의 저해제인 MG-132를 사용하여 방사선 내성과의 관계를 규명하였다. 두 저해제는 AML-2/WT와 AML-2/DX100세포 모두에서 방사선 감수성을 증가시켰다(Fig 3C D). 이는 방사선 내성에 NF-κB가 중요한 요소로 관여하고 있다고 생각된다.

5. cDNA microarray를 이용한 apoptosis에 관련된 유전자의 발현 양상의 측정

Human 8K Gene Chip을 이용하여 유전자 발현양상을 측정하였으며, AML-2/WT와 AML-2/DX100세포 사이에 2배 이상 차이를 나타내는 6가지 apoptosis 관련 유전자를 찾아내었다. cDNA microarray 분석결과 AML-2/DX100세포에서 보고된 바 있는 MRP가 과발현하고 catalase가 감소되어 있는 특징을 확인 할 수 있었으며(Choi 등, 1999; Kim 등, 2001), 이 같은 소견으로 cDNA microarray의 신뢰도를 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 AML-2/WT보다 AML-2/DX100세포에서 6.21배 높게 발현된 Bfl-1/A1과 6.4배 낮게 발현된 granzyme H를 RT-PCR분석으로 확인 한 결과 cDNA microarray를 확인 할 수 있었다(Fig. 7). 또한 AML-2/WT보다 AML-2/DX100세포에서 Caspase-7 (2.11배), caspase-5 (2.19배), tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3 (2.39배), programmed cell death 4 (3.03배) 그리고 Bcl-2-associated athanogene 4 (4.82배) 감소하였다(Table 1). 이 결과로 방사선 내성이 anti-apoptosis나 pro-apoptosis와 관계된 많은 유전자들에 의해서 조정되는 것을 알 수 있다. 이들 중 어떠한 유전자가 AML-2/DX100의 방사선 내성에 중추적인 역할을 하는지는 차후 측정되어야 한다.

Table legend

Table 1. Expression profiling for apoptotis-related genes by cDNA microarray analysis

Gene symbol	**Description of genes**	**Fold change vs. control**	**Function**
Bfl-1/A1	Bcl-2-related protein A1	+6.21	apoptosis inhibitory activity
CASP7	caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	-2.11	cysteine-type peptidase activity; hydrolase activity; caspase activity
CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	-2.19	cysteine-type peptidase activity; apoptosis regulator activity; hydrolase activity; caspase activity
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3	-2.39	zinc ion binding; signal transducer activity
PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	-3.03	unknown
BAG4	Bcl-2-associated athanogene 4	-4.82	apoptosis inhibitor activity; protein binding; chaperone activity
GZMH	granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)	-6.49	trypsin activity; chymotrypsin activity; hydrolase activity
CAT*	Catalase	-1.34	response to oxidative stress
ABCC1*	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	+1.88	drug resistance, transporter

+, up-regulation; -, down-regulation
*, published [7, 8]

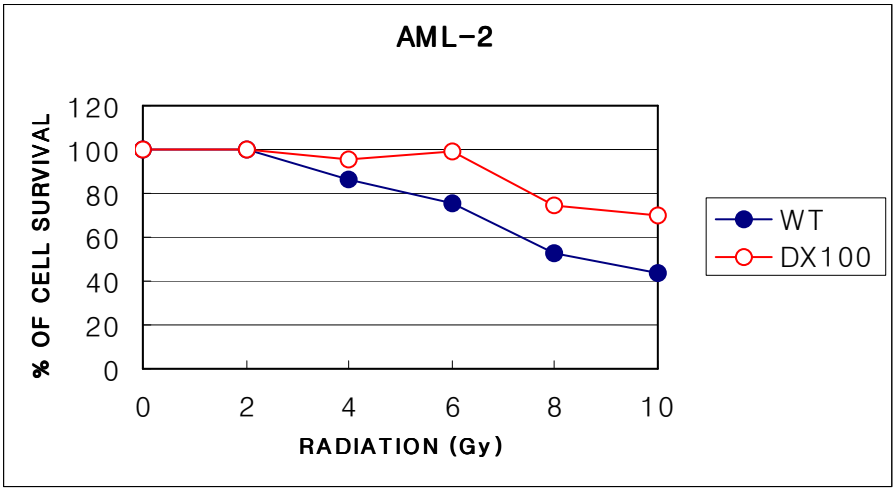


Figure 1. Resistance of AML-2/DX100 cells radiation. The cells were irradiated at a dose of 2-8 Gy and their survivals were then determined after 24 hours by MTT assay

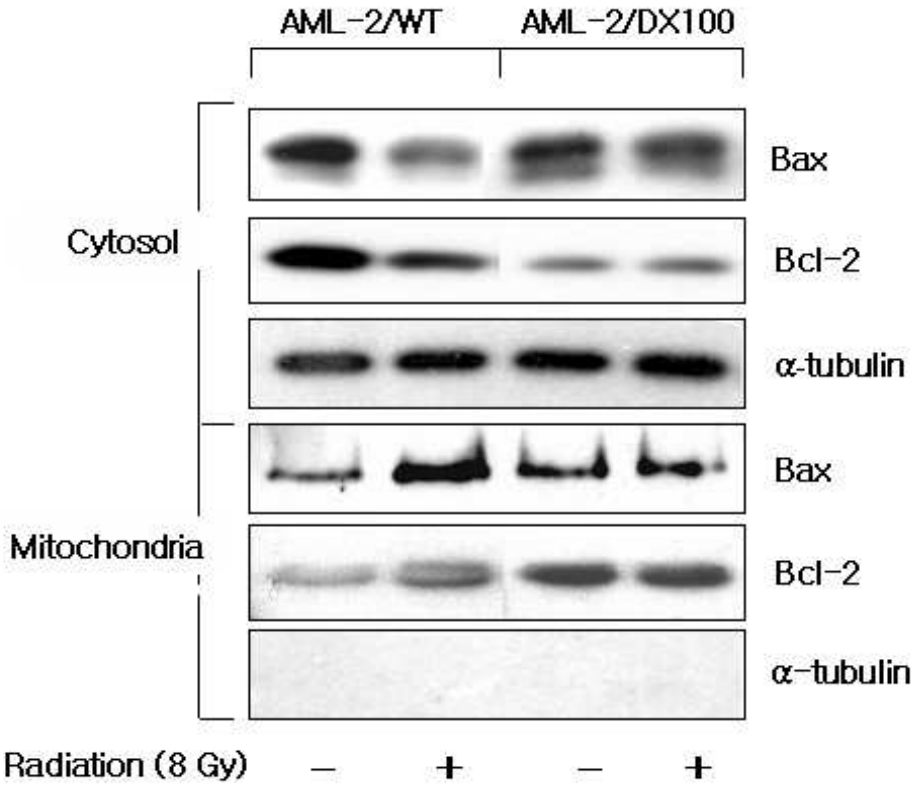
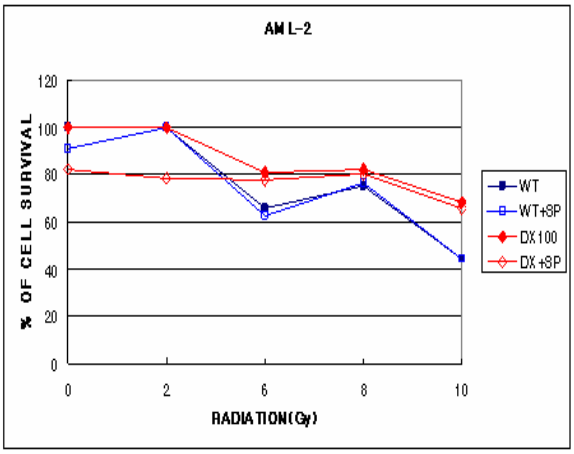
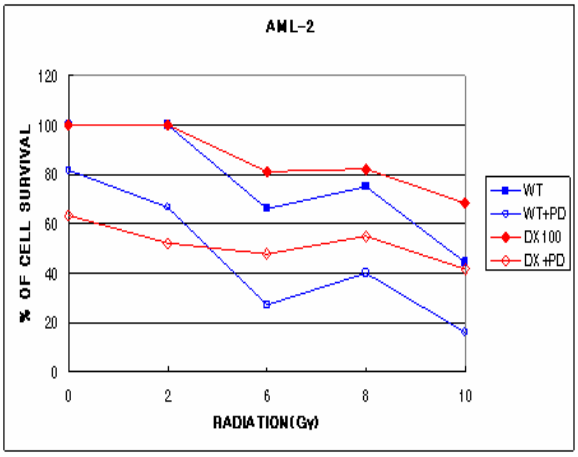


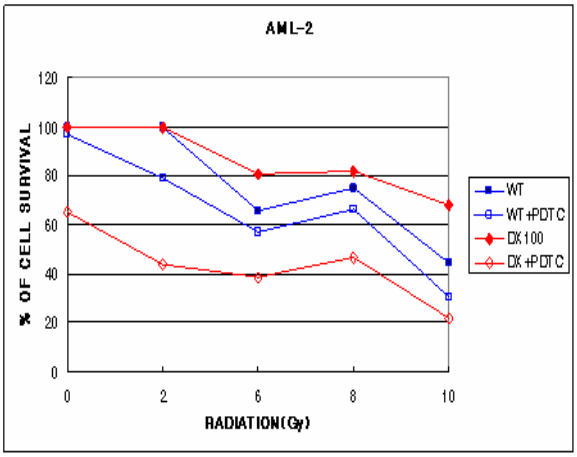
Figure 2. Effect of radiation on expression and translocation to mitochondria of Bcl-2 and Bax. The cytosolic and mitochondrial proteins were loaded on PAGE gels and analyzed by Western blot Analysis. The cytosolic and mitochondrial levels of α-tubulin were used for the control expression and the lack of contamination of the cytosolic proteins, respectively.


AML-2
% OF CELL SURVIVAL
RADIATION(Gy)
WT
WT+SP
DX100
DX+SP

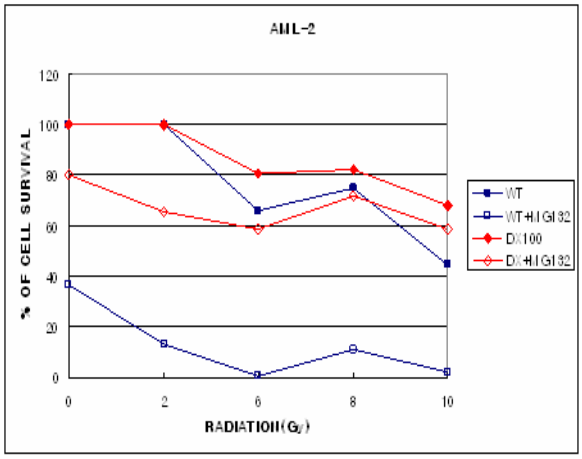
(A)


AML-2
% OF CELL SURVIVAL
RADIATION(Gy)
WT
WT+PD
DX100
DX+PD

(B)

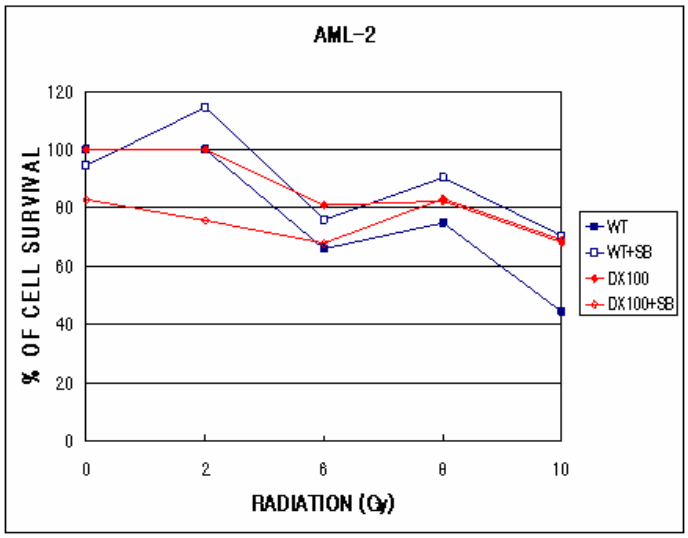

AML-2
% OF CELL SURVIVAL
RADIATION(Gy)
WT
WT+PDTC
DX100
DX+PDTC

(C)

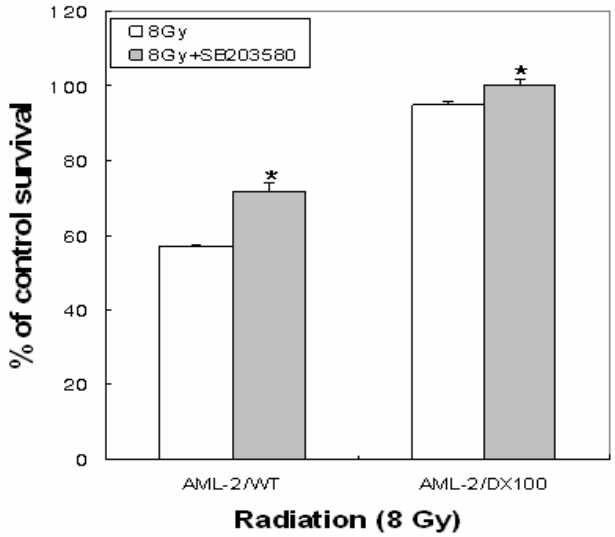

AML-2
% OF CELL SURVIVAL
WT
WT+HIGH32
DX100
DX+HIGH32

(D)

Figure 3. Effect of MAPK and NF-κB inhibitors to radioresistance between AML-2/WT and AML-2/DX100 cells. The cells were irradiated at a dose of 2-8 Gy with inhibitors and their survivals were then determined by MTT assay (A) SP (SP600125, 1 μM), JNK specific inhibitor, (B) PD (PD98059, 20 μM), ERK specific inhibitor, (C) PDTC (Pyrrolidine dithiocarbamate, 10 μM), NF-κB inhibitor (D) MG132 (MG-132, 1 μM), 26S proteasome inhibitor.


AML-2
% OF CELL SURVIVAL
120
100
80
60
40
20
0
0
2
6
8
10
RADIATION (Gy)
WT
WT+SB
DX100
DX100+SB

(A)


8Gy
8Gy+SB203580
% of control survival
120
100
80
60
40
20
0
*
*
AML-2/WT
AML-2/DX100
Radiation (8 Gy)

(B)

Figure 4. Effect of SB203580 on radiosensitivity in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells using MTT assay. (A) The cells were irradiated at a dose of 2-8 Gy with SB (SB203580, 5 μM, p38 specific inhibitor) (B) MTT assay was performed 24 hrs after 8 Gy radiation in the presence or absence of 5 μM SB203580 (n=6);

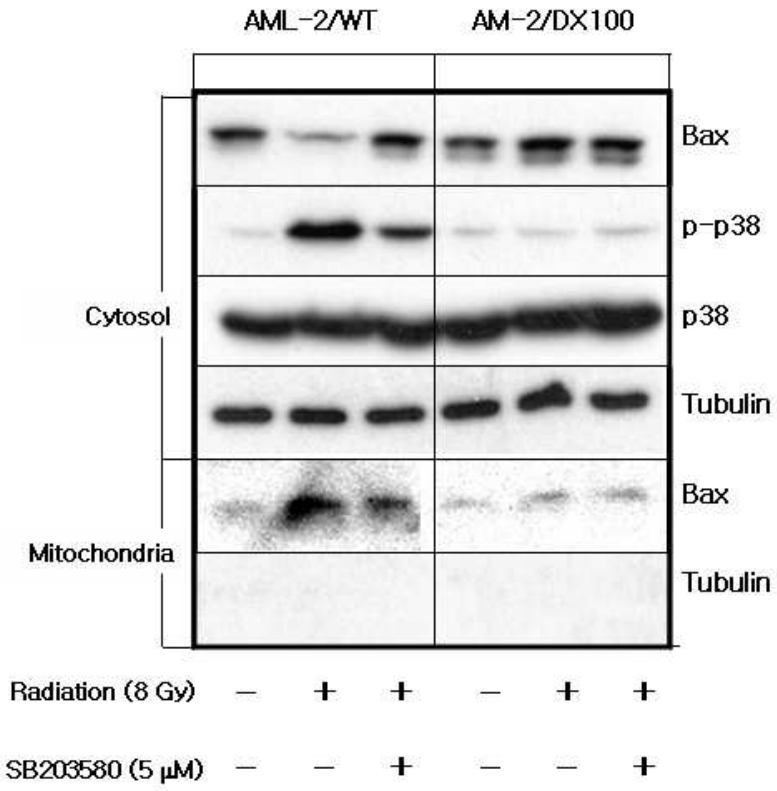


Figure 5. Effect of SB203580 on radiosensitivity and p38 MAPK in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells. Western blot analysis was carried out to determine the cytosolic and mitochondrial levels of Bax as well as the cytosolic levels of p-p38 and p38.

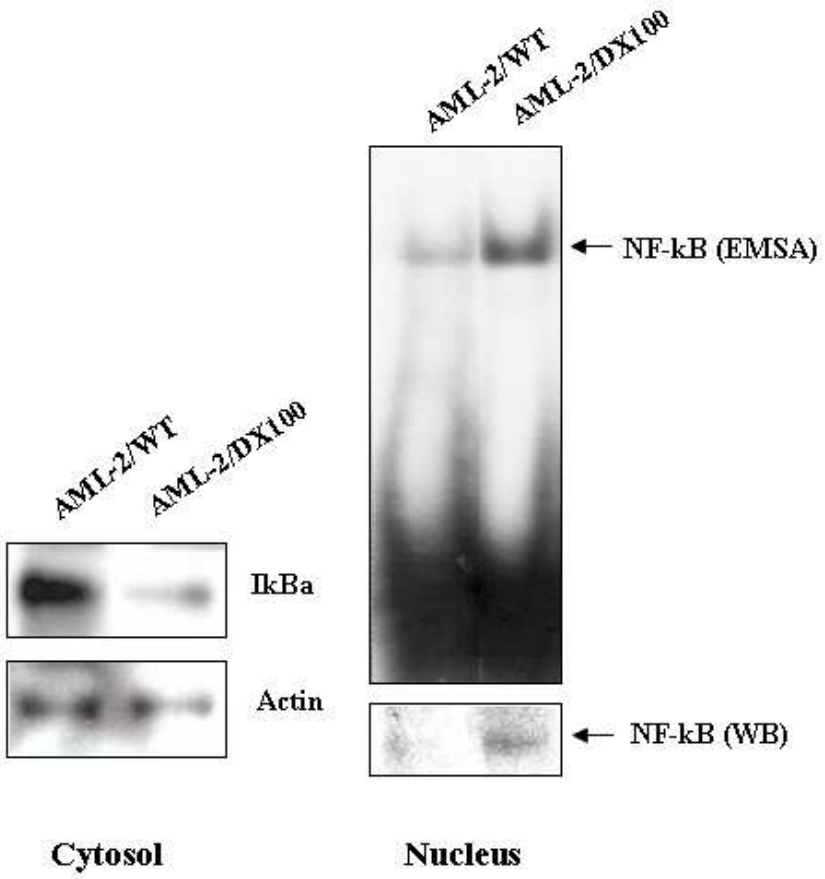


Figure 6. NF-κB is activated through degradation of IκBα in AML-2/DX100 cells in comparison with AML-2/WT cells. Nuclear or cytosolic lysate (each 50 μg protein) was subjected to Western blot analysis (WB) and nuclear lysate (5 μg protein) to Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA).

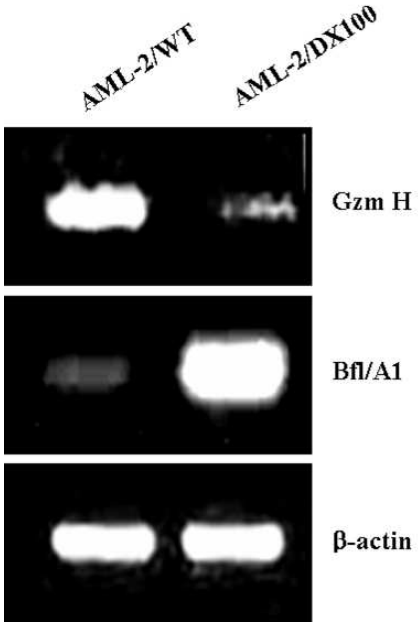


Figure 7. Expression of Bfl-1/A1 and granzyme H mRNAs was validated by RT-PCR assay in AML-2/WT and AML-2/DX100 cells. Each cDNA was diluted 1:5 with water and then were amplified for 32 cycles but 25 cycles for β-actin.

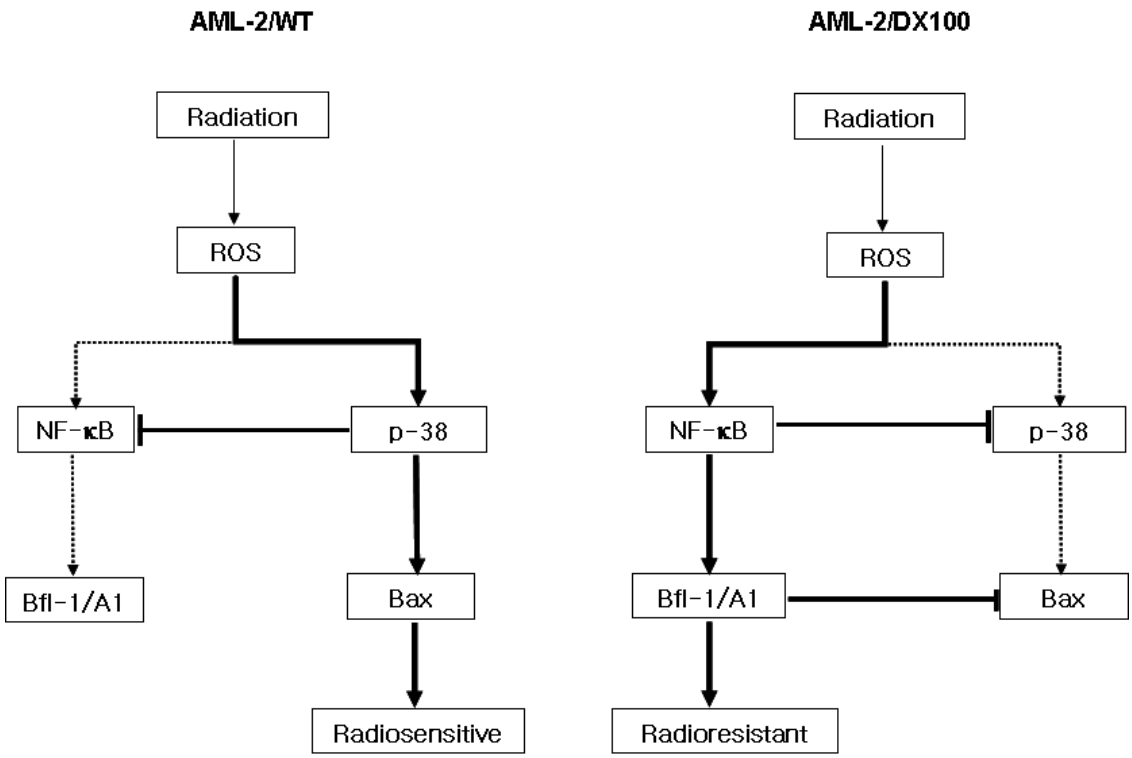


Figure 8. Two distinct pathways accounting for radiosensitivity of AML-2/WT and radioresistance of AML-2/DX100 cells. AML-2/WT cells are radiosensitive because the p38 MAPK pathway is dominant over the NF-κB-dependent signal whereas AML-2/DX100 cells are radioresistant because the NF-κB-dependent signal is dominant over the p38 MAPK pathway

Ⅳ.고찰

AML-2/DX100세포는 독소루비신을 함유한 배양액에서 잘 자라는 세포들을 선별하여 수립된 내성세포주로 MRP 과발현을 통해 항암제들에 내성을 보일 뿐만 아니라 방사선에도 내성을 보여 AML-2/WT세포와 비교 시 방사선에 대하여 1.6배 이상의 내성을 보였다. AML-2/DX100세포에서는 방사선조사 후 미토콘드리아 내의 Bcl-2/Bax의 비율이 AML-2/WT세포보다 더 높은 것으로 나와 이 점이 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 방해하여 방사선 내성에 관여하는 것으로 다른 연구에서 밝혀진 바 있다(서해동, 2005). 본 연구에서는 MAPK pathway, NF-κB가 미토콘드리아 내의 Bcl-2/Bax의 비율과 어떠한 관련이 있는지 알아보고자 하였다.

Apoptosis는 방사선치료, 화학요법 등 여러 가지 항암치료에서 유도되는 암세포 사망의 중요한 기전이다. Apoptosis 관련 유전자들이 많이 보고되었는데 그중에 방사선 조사에 의한 apoptosis와 관련된 유전자는 Bcl-2, Bax, cysteine proteases (caspase)등이다. DNA손상이 일어나면 Bax가 활성화 하고 anti-apoptotic 유전자인 Bcl-2의 발현을 저해한다. Bax는 caspase를 활성화시켜 PARP (poly ADP-ribose polymerase)등 세포내의 중요한 protein들을 분해하여 세포의 사망을 초래한다. Apoptosis의 신호를 받으면 Bax는 활성화 되면서 18 kDa 으로 분해되고 미토콘드리아내로 translocation하게 되면서 cytochrome c를 활성화 시키고 cytochrome c가 미토콘드리아에서 세포질로 이동하게 되면서 caspase를 활성화 시키며 PARP와 DNA분할이 진행 된다. Bcl-2와 Bax는 서로 hetero 혹은 homodimer를 이루어 작용하며 이들 단백질의 비율에 따라 역할이 변하게 되는데 heterodimer에서 Bcl-2가 많으면 apoptosis가 억제된다. 다른 한 연구에서 AML-2/DX100세포와 AML-2/WT세포에 8 Gy 방사선을 조사한 결과 미토콘드리아와 세포질내의 Bcl-2/Bax의 비는 AML-2/WT세포가 AML-2/DX100세포 보다 낮은 것으로 나타났으며 AML-2/WT세포의 미토콘드리아내의 cytochrome c는 방

사선 조사 후 감소되었으며 세포질의 cytochrome c는 현저한 증가를 보였고, caspase 3는 활성화되었음을 볼 수 있었다. 그러나 AML-2/DX100세포에서는 방사선 조사 후 미토콘드리아의 cytochrome c는 변화가 없었고 세포질내로의 이동을 볼 수 없었으며 caspase 3도 활성화 되지 않아 AML-2/DX100세포는 AML-2/WT 세포에 비해 방사선 조사 시 Bcl-2가 미토콘드리아로의 translocation이 잘 되는 반면 bax는 잘 되지 않아 cytochrome c의 세포질로의 유리가 저해되어 caspase 3의 활성화를 일으키지 못해 이러한 차이가 AML-2/DX100세포의 방사선 내성에 관여하는 것으로 보고되었다(서해동, 2005).

Bax가 미토콘드리아 내로 translocation되는 기전으로 두 가지 서로 다른 기전이 있는데 adaptor protein들과의 상호작용과 conformational change가 있다. adaptor protein에는 14-3-3 (Samuel 등, 2001), Ku 70 (Sawada 등, 2003), humanin (Guo 등, 2003), apoptosis-associated speck-like protein (ASC) (Ohtsuka 등, 2004)등이 있으며 이들은 Bax에 직접 결합하여 미토콘드리아 내로의 translocation를 방해하거나 촉진시켜 apoptosis를 조절한다. 건강한 세포에서는 Bax가 자신의 carboxyl-terminal transmembrane region이 hydrophobic pocket에 쑤셔 넣어 있어서 세포질 내에 불활성화 상태로 존재하고 있다. Apoptosis가 일어나는 동안 이러한 Bax는 amino-terminal exposure와 같은 구조적 변화를 겪어서 미토콘드리아 내로 translocate하여 apoptosis를 유발하는 인자들을 방출시킨다 (Schinzel 등, 2004). 지금까지 알려진 구조적 변화에 관여하는 기전으로는 integrin (Gilmore 등, 2000), PI3/Akt (Yamaguchi 등, 2001), p38 MAPK (Van Laethem 등, 2004), modulator of apoptosis-1 (MAP-1) (Tan 등, 2005), Hsp 70 (Stankiewicz 등, 2005) 등이 있다.

본 연구에서는 AML-2/WT세포에서 방사선에 의해 유도되는 Bax의 미토콘드리아 내로의 이동이 p38 MAPK저해제인 SB203580에 의해 최소한 일부라도 억제되었으므로 p38 MAPK가 미토콘드리아 내로 Bax이동에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 인간의 각질세포(keratinocyte)에 UVB조사를 하였을 때

p38 MAPK의 활성화가 미토콘드리아로의 Bax이동, cytochrome C 방출, apoptosis를 일으키는 데 요구된다는 다른 연구 결과와 일치 한다(Van Laethem 등, 2004). 방사선에 내성세포인 AML-2/DX100세포에서는 p38 MAPK가 방사선에 의해 활성화되지 않았다. MAPK pathway와 NF-κB의 비율이 세포의 생존 또는 사망을 조절하는데 AML-2/DX100세포에서 NF-κB signal이 활성화 된 것이 p38 MAPK를 강하게 억제할 수 있었을 것으로 생각되며 AML-2/WT세포에서는 이와 반대로 생각된다.

NF-κB 활성화가 정상세포와 종양세포에서 방사선 내성을 중재한다는 증거들이 증가하고 있는데 이 중에는 NF-κB survival pathway의 신호전달의 증가가 소아 B-precursor 급성 림프모구백혈병에서 방사선에 의한 apoptosis에의 내성이 증가된 것과 관련이 있다는 연구 결과도 있다(Cataldi 등, 2003; Weston 등, 2004). 그러므로 AML-2/WT세포에서 p38 MAPK pathway가 NF-κB신호전달보다 더 우세하고 AML-2/DX100세포에서는 NF-κB신호전달이 p38 MAPK pathway보다 더 우세할 것이라고 가설을 설정하였다.

이 가설을 검증하기 위해 apoptosis와 관련된 유전자들의 발현양상을 검사하기 위해 cDNA microarray를 시행하여 AML-2/DX100세포에서 AML-2/WT세포에서보다 Bcl-2 동족체(homolog)인 Bfl-1/A1이 6.21배 더 높게 발현되었으며 이는 RT-PCR assay를 통해서도 재확인되었다. Werner 등(2002)에 의하면 Bfl-1/A1은 Bid BHC domain을 통해 full length Bid와 truncated t(Bid)와 연관이 있고 CD 95와 Trail receptor에 의해 유도되는 cytochrome C 방출에 대해 방위하게 한다는 것으로 알려져 있다. 또한 Bfl-1/A1은 tBid가 미토콘드리아로 이동하는 것을 방해하지는 않으나 tBid에 강하고 선택적으로 결합하여 tBid와 미토콘드리아 내의 Bax 또는 Bak사이에 상호작용을 막는다고 한다. 그러므로 Bfl-1/A1이 미토콘드리아 내로 Bax의 이동을 방해하지 않으면서도 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 억제할 수 있는 것으로 생각된다. Bfl-1/A1은 또한 NF-κB의 직접적인 transcriptional target이기도 하는데 본 연구에서 EMSA와 western blot analysis를 통해서

AML-2/WT세포에서보다 AML-2/DX100세포에서 cytosolic I kappa B alpha (IkBα)의 degradation과 함께 NF-κB의 활성이 두드러짐이 확인 되었다(Zong 등, 1999). Bfl-1/A1의 up-regulation는 NF-κB의 억제에 의해 폐지되기 때문에 NF-κB활성화를 통한 Bfl-1/A1의 과발현은 AML-2/DX100세포의 방사선 내성에 최소한 일부 관련이 있다고 본다(Cheng 등, 2000).

Granzyme은 세포독성 T림프구와 natural killer cell의 cytotoxic granule에서 특별히 발견되는 granule serine protease family이다. Granzyme A와 B는 pox virus 감염외 림프구에 의해 일어나는 표적세포 apoptosis에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Smyth 등, 1996). Granzyme H는 사람에서 natural killer cell에 있는 granzyme B의 proapoptotic function을 보완하는데 역할을 한다고 알려져 있다(Sedelies 등, 2004). 본 연구에서는 granzyme H는 AML-2/WT세포에서 보다 AML-2/DX100세포에서 유의하게 down-regulation되어 있는데 그 기전은 아직 확실치 않다.

Bfl-1/A1의 upregularion과 granzyme H의 downregulation에 더하여 caspase 5, caspase 7, TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3), programmed cell death 4 (PCD4)가 AML-2/DX100세포의 방사선 내성에 확실한 역할을 하는 것으로 보였다. 그러나 Bcl-2 associated athanogene 4 (Bag-4)는 SODD (silencer of death domains)로 알려져 있는데 TNF receptor 1에 의해 신호전달을 억제한다(Eichholtz-Wirth 등, 2003). SODD/Bag-4 cDNA로 transfection시킨 stable clone들의 일부에서 방사선 감수성이 감소된다는 연구 보고가 있는데 AML-2/WT보다 AML-2/DX100세포에서 역설적으로 Bag-4가 downregulation 되어 있었다. 지금까지 포유동물에서는 Bcl-2의 17가지의 동족체와 최소한 15가지의 caspase가 밝혀져 있다(Krajewski 등, 1999). AML-2/DX100세포의 방사선 내성의 발현은 pro-apoptosis와 anti-apoptosis에 관련된 유전자들의 upregulation, downregul-ation의 복잡한 조합으로부터 초래되었음을 암시한다.

종합하여 보면 AML-2/DX100세포의 방사선 내성의 기전으로는 Bax의 미토콘드

리아로의 이동과 pro-apoptotic gene (granzyme H, caspase-5 and -7, TNF receptor-associated factor 3, and programmed cell death 4)과 anti-apoptotic gene (Bfl-1/A1)의 표현과 관련이 있다고 보며 p38 MAPK signal과 NF-κB signal 사이의 균형이 AML-2/WT과 AML-2/DX100세포에서 방사선 감수성의 결정요소의 하나로 생각된다.

Ⅴ. 결론

이 논문에서는 독소루비신 내성 백혈병세포 AML-2/DX100에서 보여 지는 방사선 내성에 대한 분자 기전을 연구하였다.

1. AML-2/WT세포에서 방사선에 의해 Bax의 미토콘드리아로의 이동이 증가하고 Bax/Bcl-2 ratio 역시 증가하였다. 이는 결과적으로 cytochrome C가 미토콘드리아에서 방출되고 caspase-3가 활성 되어 세포사가 일어났음을 의미한다. 반면에 AML-2/DX100세포에서는 방사선에 의해 Bax의 발현이나 미토콘드리아로의 이동은 증가되지 않았다.

2. AML-2/WT세포에 방사선을 처치하면 p38 MAPK가 활성화 되는 반면 AML-2/DX100세포에서는 p38에 변화가 없으며, p38 MAPK 저해제인 SB203580를 같이 처치 시 AML-2/WT세포에서는 방사선 내성을 증가시키지만 AML-2/DX100세포에서는 그렇지 않았다.

3. Electrophoretic mobility shift assay와 Western blot analysis 결과, AML-2/WT세포에서 보다 AML-2/DX100세포에서 cytosolic IκBα의 degradation과 함께 NF-κB의 활성이 증가되었다.

4. cDNA microarray 결과 AML-2/WT세포에서 AML-2/DX100세포에서 Bfl-1/A1는 6.21배 높게 granzyme H 는 6.49배 낮게 발현되었으며 이는 RT-PCR assay를 통해 재확인하였다. 결과적으로 AML-2/DX100의 방사선 기전은 Bax의 미토콘드리아로 이동과 pro-apoptotic (granzyme H) 과 anti-apoptotic (Bfl-1/A1) 유전자의 발현 양상의 변화와 관계가 있는 것으로 생각되어 진다. 또한 p38 MAPK 와 NF-κB의 신호체계 균형이 AML-2/WT세포와 AML-2/DX100세포의 방사선감작 차이에 대한 결정적 요인임을 보여준다.

Ⅵ. 감사의 글

많은 분들의 격려와 가르침이 있었기에 무사히 학위과정을 마칠 수 있었으며 알찬 논문을 낼 수 있었습니다. 여러 분들의 도움으로 만들어진 이 논문이 기초의학이나 임상에서 조금이나마 도움이 되었으면 합니다.

먼저 저에게 많은 관심을 갖고 세심히 지도해주신 최철희 교수님께 깊은 감사의 말씀 드립니다. 또한 많은 조언과 도움을 주신 방사선 치료과의 오윤경 교수님, 병리학 기근홍 교수님, 약리학 윤지수 박사님과 약리학 임동윤 교수님께 진심으로 감사드립니다.

실험을 하는데 정교한 실험기법이나 문제를 같이 해결해 주고 도와준 약리학교실의 박현 연구원과 박사과정 정주미 선생님, 카톨릭 의대에서 박사과정중인 서해동 선생님, 내성세포연구센터의 이태범 실장님께 감사드립니다.

마지막으로 존경하는 부모님과 묵묵히 기다려준 사랑하는 나의 가족에게 이 논문을 바칩니다.

Ⅶ. 참고문헌

서해동. "항암제 내성 백혈병 및 폐암 세포주에서 방사선에 대한 교차내성 기전의 규명", 『조선대학교 대학원 석사학위논문』 2005.

Bergman, P. J. and Harris, D.. "Radioresistance, chemoresistance, and apoptosis resistance." *The past, present, and future, Vet Clin North Am Small Anim Pract.* **27**:47-57,1997.

Cataldi, A. Rapino, M. Centurione, L. Sabatini, N. Grifone, G. Garaci, F. and Rana, R.. "NF-kappaB activation plays an antiapoptotic role in human leukemic K562 cells exposed to ionizing radiation." *J Cell Biochem.* **89**:956-963, 2003.

Cheng, Q. Lee, H. H. Li, Y. Parks, T. P. and Cheng, G.. "Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-kappaB inhibition." *Oncogene* **19**:4936-4940, 2000.

Choi, C. H.. Kim, H. S Rha, H. S. Jeong, J. H. Park, Y. H. Min, Y. D. Kee, K. H. and Lim, D. Y.. "Drug concentration-dependent expression of multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein in the doxorubicin-resistant acute myelogenous leukemia sublines" *Mol Cells* **9**:314-319, 1999.

Creutzig, U. Ritter, J. Heyen, P. Berthold, F. Henze, G. Kabisch, H. Lampert, F. Niethammer, D. Riehm, H. Schellong, G.. "Effect of cranial irradiation on

rate of recurrence in children with acute myeloid leukemia. Initial results of the AML-BFM-87 study." *The AML-BFM StudyGroup, Klin Padiatr.* **204:**236-4, 1992

Creutzig, U. Zmmermann, M. Ritter, J. Reinhardt, D. Hermann, J. Henze, G. Jurgens, H. Kabisch, H. Reiter, A. Riehm, H. Gadner, H. Schellong, G.. "Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials." *Leukemia* **19(12):**2030-42, 2005.

Eichholtz-Wirth, H. Fritz, E. and Wolz, L.. "Overexpression of the 'silencer of death domain', SODD/BAG-4, modulates both TNFR1- and CD95-dependent cell death pathways" *Cancer Lett.* **194:**81-89, 2003.

Gilmore, A. P. Metcalfe, A. D. Romer, L. H. and Streuli, C. H.. "Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization" *J Cell Biol.* **149:**431-446, 2000.

Grout, B. Morris, J. McLellan, M.. "Cryopreservation and the maintenance of cell lines." *Trends Biotechnol*. **8(10)**:293-7.1990

Guo, B. Zhai, D. Cabezas, E. Welsh, K. Nouraini, S. Satterthwait, A. C. and Reed, J. C.. "Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation." *Nature* **423:**456-461, 2003.

Kawamura, I. Morishita, R. Tsujimoto, S. Manda, T. Tomoi, M. Tomita, N.

Goto, T. Ogihara, T. and Kaneda, Y.. "Intravenous injection of oligodeoxynucleotides to the NF-kappaB binding site inhibits hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma in mice," *Gene Ther.* **8**:905-912, 2001).

Kim, H. S. Lee, T. B. and Choi, C. H.. "Down-regulation of catalase gene expression in the doxorubicin-resistant AML subline AML-2/DX100." *Biochem Biophys Res Commun.* **281**:109-114, 2001.

Krajewski, S. Krajewska, M. Turner, B. C. Pratt, C. Howard, B. Zapata, J. M. Frenkel, V. Robertson, S. Ionov, Y. Yamamoto, H. Perucho, M. Takayama, S. and Reed, J. C.. "Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer" *Endocr Relat Cancer* **6**:29-40, 1999.

Kucharczak, J. Simmons, M. J. Fan, Y. and Gelinas, C.. "To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis." *Oncogene* **22**:8961-8982, 2003.

Magnani, M. Crinelli, R. Bianchi, M. and Antonelli, A.. "The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-κB)" *Curr Drug Targets* **1**:387-399, 2000.

Oh, S. H. Lee, B. H. Lim, S. C.. "Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway." *Biochem Pharmacol.* **68(9)**:1845-55, 2004.

Ohtsuka, T. Ryu, H. Minamishima, Y. A. Macip, S. Sagara, J. Nakayama, K. I. Aaronson, S. A. and Lee, S. W.. "ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway" *Nat Cell Biol.* **6:** 121-128, 2004.

Pieters, R. Huismans, DR. Leyva, A. Veerman, AJ.. "Adaptation of the rapid automated tetrazolium dye based (MTT) assay for chemosensitivity testing in childhood leukemia." *Cancer Lett.* **41(3)**:323-32.1988

Puhlmann, U. Ziemann, C. Ruedell, G. Vorwerk, H. Schaefer, D. Langebrake, C. Schuermann, P. Creutzig, U. Reinhardt, D.. "Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells" *J Pharmacol Exp Ther.* **312(1):**346-54, 2005.

Samuel, T. Weber, H. O. Rauch, P. Verdoodt, B. Eppel, J. T. McShea, A. Hermeking, H. and Funk, J. O.. "The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax." *J Biol Chem* **276:**45201-45206, 2001.

Sawada, M. Sun, W. Hayes, P. Leskov, K. Boothman, D. A. and Matsuyama, S.. "Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria" *Nat Cell Biol.* **5:**320-329, 2003.

Schinzel, A. Kaufmann, T. Schuler, M. Martinalbo, J. Grubb, D. and Borner, C.. "Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168." *J Cell Biol.* **164:**1021-1032, 2004.

Sedelies, K. A. Sayers, T. J. Edwards, K. M. Chen, W. Pellicci, D. G. Godfrey, D. I. and Trapani, J. A.. "Discordant regulation of granzyme H and granzyme B expression in human lymphocytes." *J Biol Chem.* **279:** 26581-26587, 2004.

Sethi, T. Rintoul, R. C. Moore, S. M. MacKinnon, A. C. Salter, D. Choo, C. Chilvers, E. R. Dransfield, I. Donnelly, S. C. Strieter, R. and Haslett, C.. "Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo" *Nat Med.* **5:**662-668, 1999.

Smyth, M. J. O'Connor, M. D. and Trapani, J. A.. "Granzymes: a variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies" *J Leukoc Biol.* **60:**555-562, 1996.

Stankiewicz, A. R. Lachapelle, G. Foo, C. P. Radicioni, S. M. and Mosser, D. D.. "Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation" *J Biol Chem.* **280:**38729-38739, 2005.

Stavrovskaya, A. A.. "Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells." *Biochemistry(Mosc)* **65:**95-106, 2000.

Tan, K. O. Fu, N. Y. Sukumaran, S. K. Chan, S. L. Kang, J. H. Poon, K. L. Chen, B. S. and Yu, V. C.. "MAP-1 is a mitochondrial effector of Bax." *Proc Natl Acad Sci USA* **102:**14623-14628, 2005.

Towbin, H. Staehelin, T. and Gordon, J.. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci USA* **76:**4350-4354, 1979.

Van Laethem, A. Van Kelst, S. Lippens, S. Declercq, W. Vandenabeele, P. Janssens, S. Vandenheede, J. R. Garmyn, M. and Agostinis, P.. "Activation of p38 MAPK is required for Bax translocation to mitochondria, cytochrome c release and apoptosis induced by UVB irradiation in human keratinocytes." *Faseb J.* **18**:1946-1948, 2004

Zhang, Y. and Chen, F.. "Reactive oxygen species (ROS), troublemakers between nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)." *Cancer Res.* **64:**1902-1905, 2004.

Wada, T.and Penninger, J. M.. "Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation." *Oncogene* **23:**2838-2849, 2004.

Werner, A. B. de Vries, E. Tait, S. W. Bontjer, I. and Borst, J.. "Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit is collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax." *J Biol Chem.* **277**:22781-22788, 2002.

Weston, V. J. Austen, B. Wei, W. Marston, E. Alvi, A. Lawson, S. Darbyshire, P. J. Griffiths, M. Hill, F. Mann, J. R. Moss, P. A. Taylor, A. M. and Stankovic, T.. "Apoptotic resistance to ionizing radiation in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia frequently involves increased NF-kappaB survival pathway signaling" *Blood* **104:**1465-1473, 2004.

Yamaguchi, H. and Wang, H. G.. "The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change." *Oncogene* **20:**7779-7786, 2001.

Yang, Y. H. Dudoit, S. Luu, P. Lin, D. M. Peng, V. Ngai, J. and Speed, T. P.. "Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation." *Nucleic Acids Res.* **30:**e15, 2002.

Zong, W. X. Edelstein, L. C. Chen, C. Bash, J. and Gelinas, C.. "The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis." *Genes Dev.* **13:**382-387, 1999.

저작물 이용 허락서

학 과	의 학 과	학 번	20057437	과 정	박사
성 명	한글: 강성인 한문 :姜成仁 영문 : Sung-In kang				
주 소	광주광역시 서구 화정2동 1072 금호타운 101-1801				
연락처	E-MAIL : svc1230@hanmail.net				
논문제목	한글: 독소루비신 내성 백혈병세포에서 방사선 내성에 대한 분자기전 영문:Molecular mechanism of radioresistance of the doxorubicin-resistant leukemic cell line.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 조건부 동의( ) 반대( )

2006년 12월 27 일

저작자: 강 성 인 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하