

방사선조사가 사람 정상 구강각화 세포의 세포주기, 세포사 및 수종 단백질의 발현에 미치는 영향

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 치학연구소
*서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실, 치학연구소 및 BK21
**강릉대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
***인제대학교부속 상계백병원 치과학교실

강미애 · 허민석 · 이삼선* · 오성욱 · 이설미** · 전인성*** · 최순철* · 박태원

Effect of irradiation on cell cycle, cell death and expression of its related proteins in normal human oral keratinocytes

Mi-Ae Kang, Min-Suk Heo, Sam-Sun Lee*, Sung-Ook Oh, Sul-Mi Lee**, In-Seong Jeon***, 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, College of Dentistry, Kangnung National University*
****Dept. of Dentistry, Inje University, Sanggyepaik Hospital*

ABSTRACT

Purpose : To investigate the radiosensitivity of the normal human oral keratinocytes (NHOK), and the effect of irradiation on cell cycle and protein expression.

Materials and Methods : To evaluate the radiosensitivity of NHOK, the number of colonies and cells were counted after irradiation and the SF2 (survival fraction at 2 Gy) value, and the cell survival curve fitted on a linear-quadratic model were obtained. LDH analysis was carried out to evaluate the necrosis of NHOK at 1, 2, 3, and 4 days after 2, 10, and 20 Gy irradiation. Cell cycle arrest and the induction of apoptosis were analyzed using flow cytometry at 1, 2, 3, and 4 days after 2, 10, and 20 Gy irradiation. Finally, proteins related cell cycle arrest and apoptosis were analysed by Western blot.

Results : The number of survived cell was significantly decreased in a dose-dependent manner. The cell survival curve showed SF2, α , and β values to be 0.568, 0.209, and 0.020 respectively. At 20 Gy irradiated cells showed higher optical density than the control group. After irradiation, apoptosis was not observed but G2 arrest was observed in the NHOK cells. 1 day after 10 Gy irradiation, the expression of p53 remained unchanged, the p21^{WAF1/Cip1} increased and the mdm2 decreased. The expression of bax, bcl-2, cyclin B1, and cyclin D remained unchanged.

Conclusion : These results indicate that NHOK responds to irradiation by G2 arrest, which is possibly mediated by the expression of p21^{WAF1/Cip1}, and that cell necrosis occurs by high dose irradiation. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol 2003; 33 : 143-9*)

KEY WORDS : keratinocytes; radiation, ionizing; radiosensitivity

서론

세포가 방사선이나 기타 DNA에 손상을 주는 외부요인에 노출되면 각 주기에 세포가 축적되어 세포주기가 연장된다. 세포주기정지 동안 세포는 세포분열에 들어가는 것을 중지하고, DNA 손상을 회복하게 되는데 회복이 완료되

접수일 : 2003년 4월 21일; 심사일 : 2003년 4월 22일; 채택일 : 2003년 6월 10일
Correspondence to : Prof. Min-Suk Heo
Dept. of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, 28, Yeongseon-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-749, KOREA
Tel) 82-2-760-3016, Fax) 82-2-744-3919
E-mail) hmslsh@snu.ac.kr

면 분열을 다시 시작하나 제대로 회복되지 않으면 세포분열 도중에 세포가 사멸하게 된다.¹⁴ 세포사에는 세포괴사, 분열 세포사, apoptosis가 있다. 방사선에 의한 세포사 이외에 세포는 손상을 회복하기 위한 방어체계의 하나로 세포주기정지를 한다. DNA가 손상을 받았을 경우 세포의 종류에 따라 apoptosis가 발생할 수도 있고 세포주기정지가 발생하기도 하는데 림프구는 apoptosis가 발생하고 섬유모세포는 G1 정지가 발생한다.¹ 또한 같은 세포에서도 손상을 가하는 물질에 따라서 다른 반응을 나타낸다. G2 정지는 유사분열을 하는 모든 세포에서 관찰되며 높은 조사량 뿐만 아니라 세포에 따라서는 1Gy 이하의 낮은 조사량에 의해서도 관찰된다.⁵ G2 정지 양은 방사선조사량에 비례해서 증가하며 방사선에 저항성이 있는 세포주는 G2 정지 양이 더 크다. G2 정지 기간은 세포 손상이 회복되지 않은 정도와 관계가 있으며 이러한 G2 정지는 방사선감수성과 관계가 있다.⁶ 세포의 방사선감수성 차이는 세포의 종류, 분화 정도, 증식율과 조절기전에 따라 다르게 나타난다. 일반적으로 정상세포에 비해 종양세포가, 분화가 잘 된 세포보다 미분화세포가, 간엽세포보다 상피세포가 방사선감수성이 높다고 알려져 있다. 그러나, 같은 세포라도 방사선조사에 대한 세포반응은 방사선 흡수선량이외에도 세포의 생리적 조건, 산소 분압, 조사 환경 등에 따라 달라질 수 있다.

사람 정상 구강각화세포(normal human oral keratinocytes: NHOK)는 기저세포에서 유래하여 점차 분화하여서 표층으로 이동하고 결국에는 탈락되게 된다. 그 기간 동안 형태학적이거나 분자수준에서의 변화를 하여 복제, 복제노화(replicative senescence), 최종분화, 혹은 apoptosis가 발생하나,⁷ 복제노화와 분화사이의 구분은 아직까지 명확하게 정의되지 않았고, 분화의 맨 마지막에서 발생하는 apoptosis와 최종 분화와의 관계도 분명하지 않다.⁸ Kang 등⁹은 NHOK는 26.6±3.5시간의 배가시간으로 20일 동안 지수함수적으로 복제를 하다가 그 이후, 18일 동안 복제노화에 들어간다고 하였고, 최대 22.1±2.8 population doublings(pds)를 가진다고 하였다.

국내외에서 진행되고 있는 세포의 방사선감수성 연구로는 인체의 정상세포에 대한 연구,¹⁰ 인체의 정상세포와 암세포주에 대한 연구,¹¹ 인체 암조직으로부터 분리시킨 암세포주에 대한 연구¹² 등이 활발하게 진행되어 왔다. 그러나, NHOK는 일차배양이 쉽게 이루어지지 못하여 연구가 활발하게 진행되지 못하였다. 1991년 Park 등¹³이 NHOK의 배양에 성공을 거두면서 점차 NHOK를 이용한 연구^{9,14,15}들이 많이 보고되었다. 그러나, 이 연구들은 주로 NHOK의 특성을 밝히는 것이었고 Gujuluva 등¹⁶이 시행한 연구도 NHOK와 HPV-immortalized 사람 구강각화세포에 UV를 조사해서 세포주기와 생활력에 미치는 영향과 p53, gadd153, gadd45 유전자의 발현을 조사한 것이었다. 현재까지 NHOK에 방사선을 조사해서 세포의 반응과 단백질 발현

을 조사한 연구는 미흡하다.

이에 본 연구는 NHOK에 방사선을 조사한 후 세포의 방사선감수성, 세포주기 변화와 세포사 및 이와 관련된 단백질의 발현을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

지치 발치를 시행하는 건강한 사람의 지치 후방 구강점막에서 치은조직 절편을 채취하여 calcium과 magnesium이 포함되어 있지 않은 Hanks' balanced salt solution (CMF-HBSS, Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)으로 3회 세척하였다. 상피조직을 점막하 조직으로부터 분리시키기 위해 채취한 조직을 collagenase (type II, 1.0 mg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 dispase (grade II, 2.4 mg/ml, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA)가 포함된 CMF-HBSS를 사용하여 37°C, 95%의 공기, 5%의 CO₂ 조건하에서 90분간 처리하였다. 분리된 상피조직에서 얻어진 일차 배양한 NHOK를 0.15 mM 칼슘과 보조 성장인자(supplementary growth factor bullet kit, Clonetics Corp., San Diego, CA, USA)가 포함된 keratinocyte growth medium (KGM; Clonetics Corp., San Diego, CA, USA)에서 배양하였다. 약 70% 정도로 밀생했을 때, 일차 배양한 NHOK를 60 mm 배양접시에 1×10⁵개로 분주하여 7일간 배양한 뒤 2차 배양하여 2세대 세포를 실험에 사용하였다.¹⁴

2. 방사선조사

NHOK를 1×10⁵의 농도로 60 mm 배양접시에서 배양하고 2일 후 Cs-137 방사선조사기 (IBL437C, France)를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량율로 2, 10, 20 Gy의 방사선을 각각 단회 조사하였고 세포생존곡선을 조사하기 위하여 방사선을 2, 4, 6, 10, 20 Gy를 단회 조사하였다. 방사선을 조사하지 않은 NHOK를 대조군으로 하였다.

3. 생존세포수 측정

방사선조사 1, 2, 3, 4일 후에 생존세포수를 측정하였다. 세포를 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 처리하여 배양용기에서 분리시킨 후 0.4% trypan blue로 염색한 다음 혈구계(Marienfield, Germany)를 이용하여 생존세포수를 측정하였다. 통계학적으로 유의성을 검증하기 위해 SPSS for Window v10.0 (SPSS Inc, Chicago, IN, USA) 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석법을 시행하였다.

4. 세포생존곡선 (cell survival curve) 조사

세포를 3-5세대에 걸쳐 배양하여 지수증식(exponential

growth)에 이르게 한 후 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 세포를 분리하여 배양액에 담가 계수하였다. 일련의 희석 과정을 통해 세포를 6-well culture plate (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)에 낮은 밀도 (250-500 cells/well)로 접종하고 방사선을 단회 조사한 후 집락을 형성하도록 14일간 배양하고 세포를 methanol로 고정하고 trypan blue로 염색하였다. 광학 현미경 (Olympus CK40, Tokyo, Japan)하에서 100배 비율로 관찰하여 세포가 50개 이상인 집락수를 세었다. 집락수에 기초하여 세포생존율을 대조군에 대한 실험군의 비율로 계산하였으며 대표수치들은 방사선조사량에 대하여 표준비선형회귀 (standard nonlinear regression) 방식에 의해 linear-quadratic (LQ) 생존곡선으로 적합시켰다. 이 과정은 큰 세포생존율 값에 상대적인 비중을 두게 되며 α 와 β 매개변수는 비음수 값으로 제한하였다. 2Gy에서의 세포생존율 (SF2)과 α 와 β 값 계산은 표준화된 방정식¹⁷에 따라 행하였으며, 세포생존율과 α 와 β 매개변수의 관계는 다음 식으로 나타내어 α 와 β 값을 구하였다. 여기서 α 는 세포생존곡선의 linear component로서 생존곡선의 초기 기울기를 의미하며, β 는 세포생존곡선의 quadratic component로서 고선량 부위에서의 생존곡선의 기울기를 의미한다.¹⁸

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

5. LDH (Lactate dehydrogenase) 분석

세포들을 60 mm 배양접시에 1×10^5 으로 접종한 후 이틀간 배양한 다음 방사선을 조사하였다. 방사선조사 1, 2, 3, 4일째에 96 well plate에 배양액, 용해 배지와 1/10,000로 희석된 양성대조군 50 μ l씩을 넣은 후 substrate mix (Cytotox 96R Non-radioactivity cytotoxicity Assay, Promega, WI, USA) 50 μ l를 첨가한 다음 실온의 암실에서 30분간 유지하였다. 그 후 반응정지용액 50 μ l를 넣고 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 통계학적으로 유의성을 검증하기 위하여 t-test를 시행하였다.

6. 유세포 분석

방사선조사 후 1, 2, 3, 4일째에 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA · 4Na를 사용하여 세포를 회수해서 15 ml conical tube에 넣고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA)으로 총 10 ml로 맞춘 다음 원심분리하였다. PBS를 제거하고 뭉친 세포를 풀어준 다음 차가운 70% ethanol 5 ml을 넣고 4°C에서 하룻밤 보관하였다. 고정된 표본은 원심분리 (1,800 rpm, 4분)를 한 후 ethanol을 제거하고 PBS와 0.1% BSA (bovine serum albumin, Amresco, OH, USA) 5 ml을 넣고 다시 원심분리하였다. PBS와 0.1% BSA로 2회 세척 후 제거한 후 뭉친 세포

는 잘 풀어주고 propidium iodide (200 μ l PBS/25 cell PI/25 μ l RNase/tube) 용액을 넣고 어두운 상태에서 1시간 이내에 FACScan 유세포분석기 (Becton Dickinson, NJ, USA)로 세포주기를 분석하였고 pre-G1 peak의 DNA 용적의 백분율을 구하였다. 통계학적으로 유의성을 검증하기 위해 Wilcoxon rank sum test를 시행하였다.

7. 단백질 검출 (Western blot analysis)

10 Gy의 방사선조사 후 1일의 세포에서 배지를 제거하였다. 배지에 남은 단백질을 제거하기 위하여 PBS 10 ml로 세척하고 용해성 완충액 50 μ l를 첨가하여 얼음에서 30분간 보관한 후 원심분리 (10,000 rpm, 5분, 4°C)하여 상층액만 모아 냉동실에 보관하였다. 단백질 정량을 위해 시료를 희석하여 10 μ l를 준비한 후 1:50으로 희석한 BSA를 200 μ l씩 넣고 오븐에서 30분간 가열 후 570 nm에서 흡광도 값을 측정하여 단백질을 정량하였다.

정량한 20 μ g의 단백질과 분자 표지자를 10% Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAG)에 부하하여 100 V, 20 mA에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔은 틀에서 꺼내서 스테킹 겔을 제거한 뒤 겔과 흡착지 (Protran, Bremen, Germany), 흡수지를 포개어 이전 키트에 넣고 이전 완충액 (39 mM Glycine, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% Methanol)을 채운 후 250 V에서 2시간 동안 전기이전하였다. 단백질 이전이 끝난 후 흡착지를 꺼내어 TTBS (10 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)로 세척하였다. 흡착지는 차단 용액 (5% dry milk, 10% TBS, 1% BSA/TTBS)에 넣고 실온에서 1시간 이상 흔들었다. p53, bax, bcl-2, mdm2, cyclin D, cyclin B1, p21^{WAF1/Cip1}를 조사하기 위해 일차 항체로 생쥐의 단일클론성 항체를 1% BSA/TTBS 용액에 1:1000으로 희석하여 1시간 동안 흔들어 반응을 시킨 후 TTBS에서 10분간 흔들어 결합되지 않은 항체를 세척하였다. 이차 항체로 anti-fluorescent horseradish peroxidase conjugate RPN 3B22를 1% BSA/TTBS 용액으로 1:1000으로 희석하여 이차 결합시킨 후 TTBS에서 10분간 흔들어 결합되지 않은 항체를 씻어 내었다. Enzyme substrate를 막에 골고루 뿌린 후 CHP 필름 사이에 발색제를 바른 막을 넣고 X선 필름을 얹어 감광한 후 자동 현상기에서 현상하였다.

결 과

1. 생존세포수

방사선조사량에 따라 생존세포수가 감소하는 양상을 보였는데, 1일째와 3일째에서는 대조군에 비해 10, 20 Gy에서, 2일째와 4일째에는 대조군에 비해 2, 10, 20 Gy에서 생

방사선조사에 의해 괴사된 세포를 조사하기 위하여

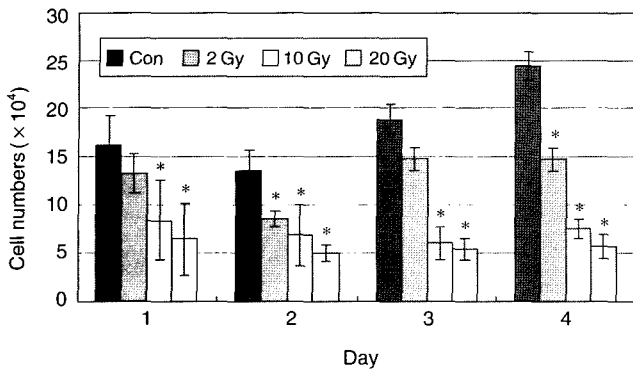


Fig. 1. Cell numbers of NHOK after irradiation ($\times 10^4$). Values represent means \pm SD of six independent experiments. *: Statistically significant compared with control group at $p=0.05$ level.

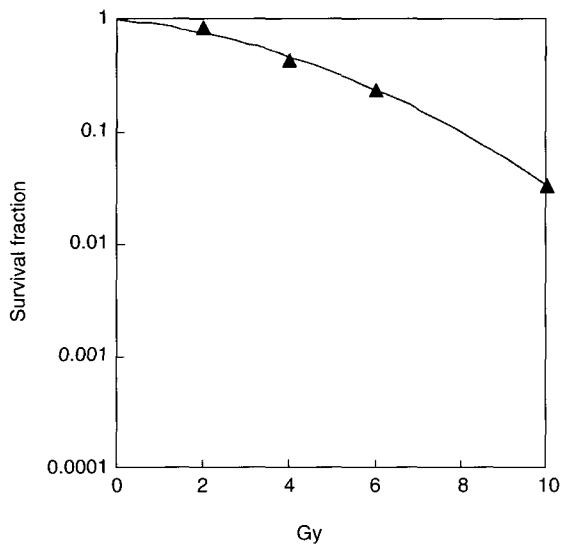


Fig. 2. Survival curve of NHOK after irradiation. Relative cell survival was calculated on the basis of colony-forming assay. Data were fitted to a linear-quadratic model.

존세포수가 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1).

2. 세포생존곡선

NHOK의 세포생존곡선은 방사선조사량이 증가함에 따라 세포생존율이 감소하는 비선형회귀 (non-linear regression) 형태를 보였다. 2 Gy 방사선을 조사하였을 경우 세포생존율이 0.568이었다. 세포생존곡선에서 α 값은 0.209이었고, β 값은 0.020이었다 (Fig. 2). 20 Gy의 방사선을 조사한 경우는 세포수가 50개 이상으로 형성된 집락이 없어서 결과에서 제외하였다.

3. 세포괴사

방사선조사에 의해 괴사된 세포를 조사하기 위하여

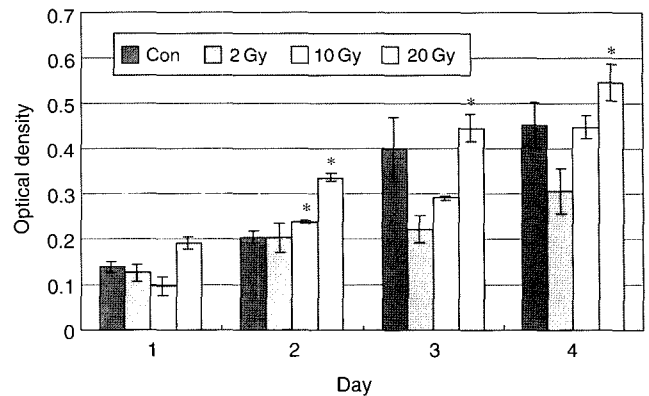


Fig. 3. Optical density of the LDH concentration according to the irradiation dose. Values represent means \pm SD of four independent experiments. *: Statistically significant compared with control group at $p=0.05$ level

LDH 분석법을 시행하였다. 방사선조사 후 1일째에는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았으나 2일째에는 10 Gy와 20 Gy에서 흡광도값이 대조군에 비해 유의성 있게 높았다 ($p < 0.05$). 3일째와 4일째에서는 20 Gy에서 대조군에 비해 흡광도값이 유의성 있게 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

4. 세포주기 분석

pre-G1 peak의 분석을 통해 세포의 apoptosis 정도를 측정된 결과 apoptosis는 발생되지 않았다. G0-G1기의 세포수는 방사선조사 후 3일까지 대조군보다 감소하는 경향을 보였으나, 4일째에는 20 Gy군을 제외하고 방사선조사군에서 대조군보다 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 4a). G2-M기의 세포수는 10 Gy 방사선조사 후 1일째와, 20 Gy 방사선조사 후 2일째에 대조군보다 세포수가 약 1.9배로 증가하여 최고값을 보였다 (Fig. 4b). 이 최고값을 정점으로 G2기 세포수 증가율은 시간에 따라 점차 감소하였다. S기 세포수는 모든 날짜에서 방사선조사군이 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 4c). NHOK는 2 Gy의 방사선을 조사한 경우 세포주기 변화가 크지 않았고 10, 20 Gy을 조사한 경우 세포주기 중 G2 정지가 발생하였다.

5. Western 분석

Western 분석을 시행한 결과 p53 단백질은 방사선조사 1일째와 방사선을 조사하지 않은 1일째 사이에 발현 차이가 없었으나 (Fig. 5a), p21^{WAF1/Cip1}은 방사선조사 후 1일째에서 방사선을 조사하지 않은 1일째에 비해 발현이 증가하였다 (Fig. 5b). mdm2는 방사선조사 후 1일째에서 방사선을 조사하지 않은 1일째에 비해 발현이 감소하였다 (Fig. 5c). cyclin B1, cyclin D, bax, bcl-2는 방사선을 조사한 것과 조사하지 않은 것 사이에 발현의 차이가 없었다 (Fig. 5d-g).

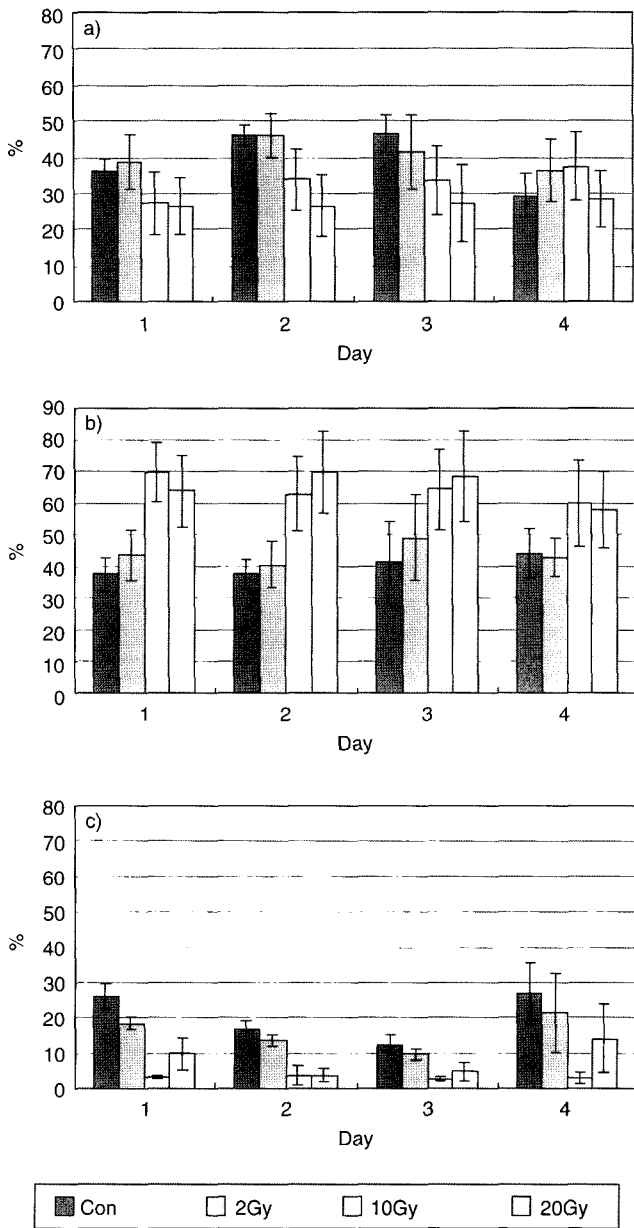


Fig. 4. Percentages of cells in a) G0-G1, b) G2-M, and c) S phase. Values represent means \pm S.D. of three independent experiments.

고찰

방사선을 조사받은 세포는 손상을 인지하고 그에 적절한 반응을 하게 되며 이러한 반응은 세포의 종류에 따라 다르게 나타난다. HeLa 세포를 대상으로 방사선조사에 의한 세포생존곡선이 작성된¹⁹ 이래 방사선감수성 연구에 이 생존곡선이 이용되고 있다. 방사선 치료시 분할 조사선량으로 주로 이용되고 있는 2 Gy에서의 세포생존율이 세포주의 방사선감수성을 결정하는 중요한 척도가 된다. NHOK의 SF2는 0.568이었는데 일차배양한 사람 섬유모세포의

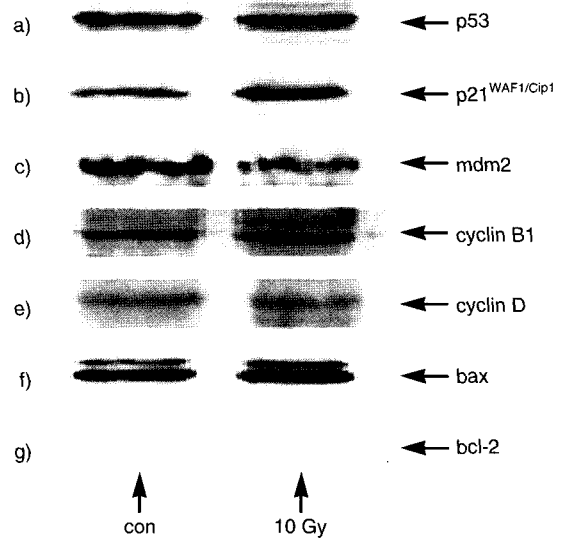


Fig. 5. Western blot analysis of electrophoretically separated proteins from normal human oral keratinocytes unexposed (con) and at 1 day after 10 Gy irradiation (10 Gy). a) p53, b) p21^{WAF1/Cip1}, c) mdm2, d) cyclin B, e) cyclin D, f) bax, and g) bcl-2

SF2인 0.02-0.23²⁰보다 세포생존율이 크게 나타나 섬유모세포보다 방사선에 저항이 큼을 알 수 있었다. 또한 암세포 중 방사선에 저항성을 보이는 HNSC-143 세포의 α 값 0.328과 β 값 0.003²¹을 비교해 보면 초기 반응도를 나타내는 α 값은 NHOK가 0.209로 NHOK가 방사선에 덜 민감한 반응을 보였으며, β 값은 NHOK가 0.020으로 HNSC-143 세포보다 고선량의 방사선에 민감함을 보였다.

방사선조사시 섬유모세포와 림프구는 질적으로나 양적으로 다른 반응을 나타내게 되며²² 종양세포도 종류에 따라 방사선조사 후 apoptosis의 발현정도가 다르다.²³ apoptosis는 방사선조사 직후에 나타날 수도 있고 G2 정지 후에 나타날 수도 있으며,²⁴ 한번 이상의 세포분열이 이루어진 후에 나타날 수도 있다.^{25,26} 흉선세포, 림프구, 장생세포 같은 방사선에 민감한 세포는 방사선조사 직후 세포 분열 없이 빠르게 apoptosis가 발생한다. Tauchi 등²⁴은 생쥐의 백혈병세포에 방사선을 조사하여 G2 정지가 유발됨을 보고하였고 apoptosis의 양은 G2 정지가 풀리는 시점에서 증가한다고 하였다. 이렇게 빠르게 발생하는 apoptosis와는 달리 Yanagihara 등²⁷은 사람의 위상피종양세포에서 방사선조사시 apoptosis가 G2 정지가 풀리는 시점인 방사선조사 후 12시간이 지난 후에 증가하기 시작해서 72-96시간에서 최대에 이르렀음을 보고하였다. 방사선조사 후 첫번째 세포 분열이 일어난 후에 최대의 apoptosis가 발생해서 apoptosis가 분열 세포사의 최종형태일 수 있다는 가정을 제시하였다. 신속한 apoptosis는 DNA의 이중나선분절에 의해서 유발되고 지연된 apoptosis는 염색체 변이에 의해서 촉진되는 것으로 알려져 있고,²⁸ 신속한 apoptosis는 p53

의 존재에 따라 좌우된다고 하였다.²⁹ 본 연구에서는 방사선조사에 의해 apoptosis 발생이 증가되지 않았으며, 이 결과를 확인하기 위해 시행했던 단백질의 발현 조사에서도 관련된 단백질이 발현되지 않았다. 이 결과는 비조혈세포에서 클론원성 세포생존과 apoptosis를 양적으로 연관시켜 본 연구에서 방사선조사 후 세포사의 주요한 경로가 apoptosis보다는 분열 세포사에 의한 세포사라는 연구결과^{30,31}와 일치한다.

세포주기를 분석한 결과 본 연구에서는 NHOK에 2 Gy의 방사선조사시에는 세포주기 변화가 크지 않았으나 10 Gy와 20 Gy의 방사선조사시에는 1일째와 2일째에서 G2 정지가 뚜렷하게 발생하였다. G2 정지가 3일째부터 감소하였고 4일째에는 감소가 뚜렷하게 나타났다. Gujuluva 등¹⁶은 NHOK에 UV를 조사했을 때 G1 정지가 방사선조사 후 36시간이 지나면서 뚜렷하게 나타났고 72시간이 지나면서 대조군과 유사한 양상의 세포주기를 보인다고 하였다. 같은 NHOK이지만 UV에 의해서는 G1 정지가 일어났고 방사선에 의해서는 G2 정지가 일어났으며 UV에 의한 G1 정지 시간이 방사선에 의한 G2 정지 시간보다 짧음을 알 수 있었다. G2 정지가 뚜렷하게 나타난 10 Gy의 방사선조사 1일째에 p53, cyclin B1, cyclin D는 대조군에 비해 발현에 차이가 없었으나 p21^{WAF1/Cip1} 단백질은 발현이 증가하였다. 이 결과로 볼 때 G2 정지가 p53과 무관하게 발생하며 p21^{WAF1/Cip1}과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. Kastan 등³²의 연구도 이 결과를 뒷받침하는데, 방사선조사 후에 나타나는 G2 정지가 p53 유전자의 상태와 무관하게 발생함을 보고 하였다. 반면에 DNA 손상 후에 발생하는 G2 정지가 p53과 관련이 있다는 연구도 있다. Hermeking 등³³은 결장직장암 세포에 전리방사선을 조사하여서 G1 정지와 G2 정지가 일어났으며, 이때 발생하는 G1 정지는 p53 단백질에 의해 조절되는 p21^{WAF1/Cip1} 단백질에 의한 것이고 G2 정지는 p53에 의해 발현되는 14-3-3σ 유전자에 의해 발생한다고 하였다. p21^{WAF1/Cip1}은 세포 증식을 억제하고 정상세포³⁴와 암세포³⁵ 모두에서 G1 정지를 유발한다고 알려져 있다. 최근에는 p21^{WAF1/Cip1}이 G1 정지 뿐만 아니라 G2 정지에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁶ p21^{WAF1/Cip1}은 보통 세포주기 억제 물질로 작용하는 반면 유사분열을 유도하는 자극에 의해서 발현이 촉진된다는 보고도 있다.³⁷ 아직까지 세포의 유사분열을 활성화시키는데 있어서 p21^{WAF1/Cip1} 발현의 중요성은 잘 알려져 있지 않다. G2 정지에 관여하는 것으로 알려진 단백질로 cyclin B와 p34^{cdc2}가 있다. Muschel 등³⁸이 연구한 바에 의하면 S기에 있는 HeLa 세포에 방사선조사시에 G2 정지가 발생되었는데 이때 G2 정지를 유발시키는 기전은 cyclin B mRNA 발현 억제에 의한 것임을 제시하였고, G2기에 있는 세포에 방사선을 조사한 경우는 cyclin B mRNA의 발현 증가에도 불구하고 cyclin B 단백질의 양이 감소해서 G2 정지가 일어남을 보고하였다. 이 결과에 따르

면 방사선을 조사한 세포의 세포주기에 따라서 mRNA 혹은 단백질 수준에서 cyclin B의 표현을 억제함을 알 수 있다. 또한 세포의 종류에 따라 G2 정지에 p34^{cdc2} 인산화 변화가 관여한다.³⁹ 같은 세포라 하더라도 손상 유발 물질의 종류에 따라 G2 정지의 작용기전이 다를 수 있고 G2 세포주기정지 기간도 세포사의 방향을 변화시킬 수 있다. Bernhard 등⁴⁰은 caffeine이나 staurosporine으로 G2 정지 기간을 감소시킴으로써 분열 세포사가 주로 발생하는 HeLa 세포에서 세포사의 경로를 apoptosis로 변화시켰다고 하였다. 본 연구 결과 NHOK는 HeLa 세포와는 달리 방사선조사 후의 G2 정지가 cyclin B, p34^{cdc2}와 관련이 없이 발생하는 것으로 생각된다.

본 연구에서 NHOK는 20 Gy 고선량에서는 세포피사가 일어났으며 방사선조사에 의해 apoptosis가 발생하기보다는 G2 정지가 발생하였다. G2 정지는 p53 단백질의 발현과 무관하게 p21^{WAF1/Cip1} 단백질의 발현에 의한 것으로 생각된다. 또한 NHOK는 방사선조사에 의한 세포사의 주경로가 apoptosis보다는 분열 세포사로 생각된다. G2 정지 후에 DNA 손상을 제대로 회복하지 못한 채 유사분열이 중지되거나 몇 번의 유사분열 후 세포사에 이르는 분열 세포사가 발생하여 이로 인해 세포집락형성이 감소하는 것으로 생각된다. 궁극적으로 분열 세포사가 세포피사로 갈 것인가 늦게 발생하는 apoptosis로 갈 것인가 하는 문제에 대한 연구가 계속 이어져야 할 것으로 여겨진다. 또한 관련 단백질의 발현이 mRNA 수준에서 조절되는지 단백질 수준에서 조절이 되는지 알기 위해서 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Yarnold J. Molecular aspects of cellular response to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997; 44 : 1-7.
2. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 : 239-57.
3. Packham G, Porter CW, Cleveland JL. c-myc induces apoptosis and cell cycle progression by separable, yet overlapping, pathways. *Oncogene* 1996; 13 : 461-9.
4. Olive PL, Durand RE. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro? *Int J Radiat Biol* 1997; 71 : 696-707.
5. Leeper DB, Schneiderman MH, Dewey WC. Radiation-induced cycle delay in synchronized Chinese hamster cells: comparison between DNA synthesis and division. *Radiat Res* 1973; 53 : 326-37.
6. McKenna WG, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A, Muschel RJ. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblasts: influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 1996; 12 : 237-45.
7. Nørsgaard H, Clark BF, Rattan SI. Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging in vitro. *Exp Gerontol* 1996; 31 : 563-70.
8. Maruoka Y, Harada H, Mitsuyasu T, Seta Y, Kurokawa H, Kajiyama

- M, et al. Keratinocytes become terminally differentiated in a process involving programmed cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238 : 886-90.
9. Kang MK, Bibb C, Baluda MA, Rey O, Park NH. In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp Cell Res* 2000; 258 : 288-97.
 10. Arlett CF, Harcourt SA. Survey of radiosensitivity in a variety of human cell strains. *Cancer Res* 1980; 40 : 926-32.
 11. Hall EJ, Marchese MJ, Astor MB, Morse T. Response of cells of human origin, normal and malignant, to acute and low dose rate irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1986; 12 : 655-9.
 12. 고정환, 하성환, 박찬일. 인체 상피암 세포주에서 방사선감수성과 손상회복의 상관관계에 관한 연구. *대한치료방사선과학회지* 1993; 11 : 17-27.
 13. Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991; 12 : 1627-31.
 14. Min BM, Woo KM, Lee G, Park NH. Terminal differentiation of normal human oral keratinocytes is associated with enhanced cellular TGF-beta and phospholipase C-gamma 1 levels and apoptotic cell death. *Exp Cell Res* 1999; 249 : 377-85.
 15. Woo KM, Lee G, Kook JK, Min BM. Conversion of normal human oral keratinocytes to tumorigenic cells is associated with the acquisition of resistance to TGF-beta. *Int J Oncol* 1998; 12 : 833-9.
 16. Gujuluva CN, Baek JH, Shin KH, Cherrick HM, Park NH. Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene* 1994; 9 : 1819-27.
 17. Dittmann K, Löffler H, Bamberg M, Rodemann HP. Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) modulates radiosensitivity and radiation-induced differentiation of human fibroblasts in culture. *Radiother Oncol* 1995; 34 : 137-43.
 18. Thames HD, Withers HR, Peters LJ, Fletcher GH. Changes in early and late radiation responses with altered dose fractionation: implications for dose-survival relationships. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982; 8 : 219-26.
 19. Curtis SB. Mechanistic models. *Basic Life Sci* 1991; 58 : 367-86.
 20. Wurm R, Burnet NG, Duggal N, Yarnold JR, Peacock JH. Cellular radiosensitivity and DNA damage in primary human fibroblasts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30 : 625-33.
 21. Schwartz JL. The role of constitutive and inducible processes in the response of human squamous cell carcinoma cell lines to ionizing radiation. *Radiat Res* 1994; 138 : S37-9.
 22. Crompton NE. Programmed cellular response to ionizing radiation damage. *Acta Oncol* 1998; 37 : 129-42.
 23. 박무순, 이삼선, 최순철, 박태원, 유동수. 인체의 암세포주와 치은 섬유모 세포주에서 방사선조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 1998; 28 : 59-72.
 24. Tauchi H, Sawada S. Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure. *Int J Radiat Biol* 1994; 65 : 449-55.
 25. Merritt A, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after γ -irradiation. *Oncogene* 1997; 14 : 2759-66.
 26. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33 : 781-96.
 27. Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, et al. Radiation-induced apoptotic cell death in human gastric epithelial tumor cells; correlation between mitotic death and apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1995; 67 : 677-85.
 28. Radford IR, Murphy TK. Radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. Part III. Different signals can lead to apoptosis and may influence sensitivity to killing by DNA double-strand breakage. *Int J Radiat Biol* 1994; 65 : 229-39.
 29. Radford IR. p53 status, DNA double-strand break repair proficiency and radiation response of mouse lymphoid and myeloid cell lines. *Int J Radiat Biol* 1994; 66 : 557-60.
 30. Ross GM. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 1999; 6 : 41-4.
 31. Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3 : 77-83.
 32. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 1991; 51 : 6304-11.
 33. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, et al. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1997; 1 : 3-11.
 34. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 19 : 805-16.
 35. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75 : 817-25.
 36. Dulic V, Stein GH, Far DF, Reed SI. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* 1998; 18 : 546-57.
 37. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54 : 3391-5.
 38. Muschel RJ, Zhang HB, Iliakis G, McKenna WG. Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation. *Cancer Res* 1991; 51 : 5113-7.
 39. Kao GD, McKenna WG, Muschel RJ. p34 (Cdc2) kinase activity is excluded from the nucleus during the radiation-induced G2 (2) arrest in HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; 274 : 34779-84.
 40. Bernhard EJ, Muschel RJ, Bakanauskas VJ, McKenna WG. Reducing the radiation-induced G2 delay causes HeLa cells to undergo apoptosis instead of mitotic death. *Int J Radiat Biol* 1996; 69 : 575-84.