

수종의 상피기원 종양 세포주에서 방사선 조사와 표피성장인자 투여에 따른 세포 주기의 변화와 apoptosis 유발에 관한 연구

서울대학교 치과대학 구강악안면방사선학 교실 및 치학연구소
한원정 · 허민석 · 이삼선 · 최순철 · 박태원

The Effect of Irradiation and Epidermal Growth Factor on Cell Cycle and Apoptosis Induction in Human Epithelial Tumor Cell Lines

Won-Jeong Han, Min-Suk Heo, Sam-Sun Lee, Soon-Chul Choi, Tae-Won Park

Department of Oral and Maxillofacial Radiology & Dental Research Institute, College of Dentistry, Seoul National University

ABSTRACT

Purpose : This study was aimed to evaluate the cell cycle arrest and apoptosis induction after irradiation and epidermal growth factor (EGF) treatment in three human epithelial tumor cell lines (A431, Siha, KB).

Materials and Methods : Single irradiation of 2, 5 and 10 Gy was done on three cell lines with 5.38 Gy/min dose rate using Cs-137 irradiator at room temperature. Also, EGF of 10 ng/ml was added immediately after 10 Gy irradiation. Cell growth was evaluated by counting the living cell number using a hemocytometer at 1 day, 2 days, 3 days, 4 days and 5 days after irradiation. Cell cycle arrest and apoptosis induction were assayed with the flow cytometry at 8 hours, 12 hours, 1 day, 2 days, 3 days, 4 days and 5 days after irradiation.

Results : Growth of irradiated three cell lines were inhibited in proportion to radiation dose. EGF treatment after irradiation showed various results according to cell lines. On all cell lines, G2 arrest was detected after 8 hours and maximized after 12 hours or 1 day. Amount of G2 arrest was positively dose dependent. However, EGF showed no significant change on G2 arrest. G2 arrest was recovered with time at 2 Gy and 5 Gy irradiation. However, at 10 Gy irradiation, G2 arrest was continued. Apoptosis was detected at 10 Gy irradiation. On EGF treated group after irradiation, A431 and Siha cell lines showed slightly increased apoptosis but there was no statistically significant difference. KB cell line showed no marked change of apoptosis induction.

Conclusion : Irradiation effects on cell cycle arrest and apoptosis induction in three human epithelial tumor cell lines, however epidermal growth factor doesn't effect on. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2000 ; 30 : 71-79)

KEY WORDS : G2 arrest, apoptosis, cell cycle, irradiation, epidermal growth factor

서론

세포에 방사선을 조사하면 세포주기 지연이 일어날 수 있는데¹⁻³ 이때 세포주기 지연은 방사선에 의한 손상을 회복하는데 필요한 시간에 해당된다. 즉 방사선에 조사된 세포는 세포분열에 들어가는 것을 중지하고 손상을 회복하

게 되는데 회복이 완료되면 분열을 다시 시작하나 제대로 회복되지 않으면 분열 도중에 세포가 사멸하게 된다. DNA는 방사선의 중요한 표적이므로 방사선 조사 후 DNA의 손상이나 회복은 세포의 생존과 관계되며⁴ DNA 회복기전 이 얼마나 효과적인가에 따라 세포의 방사선감수성이 결정된다고 볼 수 있다. 즉 전리방사선에 노출된 세포는 세포주기의 진행을 지연시켜 손상된 DNA를 회복시킴으로써 세포의 성장을 조절하게 된다. Smeets 등⁵과 Su와 Little⁶은 방사선 조사 후의 G2 arrest에 대하여 연구하였던 바 분열 중인 세포에 방사선을 조사하면 대부분의 세포는 G2기에서 세포성장이 멈추게 된다고 하였다.

일시적인 세포주기의 지연과 DNA 손상회복의 증가 외에

접수일 : 1999년 12월 10일 채택일 : 1999년 12월 28일
본 연구는 교육부 1999년도 BK21 의생명분야의 지원으로 이루어짐.
Correspondence to : Soon-Chul Choi
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-749, Korea
Tel) +82-2-760-2645
E-mail) raychoi@snu.ac.kr

세포에 대한 방사선의 효과에는 회복될 수 없는 손상에 의한 세포사가 있다.⁷ 세포사는 괴사와 세포 예정사(programmed cell death)로 알려진 apoptosis로 분류할 수 있으며 apoptosis는 조직과 기관의 정상발육 과정 중에 발생된다고⁸ 소개된 이후방사선에 의해서도 발생할 수 있다고 보고되었다.⁹ 방사선 조사에 의해 apoptosis가 일어나는 기전은 완전히 밝혀져 있지 않지만 발생여부는 in vitro에서 여러 가지 방법으로 쉽게 알 수 있으며 apoptosis된 세포의 DNA 염색성의 감소를 이용한 유세포 분석법에 의해서 쉽게 정량화할 수 있다.¹⁰ 세포의 성장을 조절해 주는 과정을 알고자 표피성장인자에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔는데 표피성장인자는 상피 및 표피조직에서 강력한 분열촉진인자로 작용하는 가장 먼저 발견된 성장 호르몬중의 하나로 표피성장인자 수용체와 결합하여 세포의 증식과 성장에 관여한다.¹¹ 이 결합은 세포질막의 외면에서 이루어지며 수용체의 단백질을 변화시키고 세포질막의 내면에 있는 효소부위를 활성화시키게 된다.¹² 그러나 이러한 표피성장인자가 세포증식을 촉진시킬 것인지 아니면 억제할 것인지는 표피성장인자 수용체의 발현정도에 따라 달라진다.¹³ 표피성장인자 수용체의 높은 발현정도는 종양의 발생에 중요한 역할을 하며 종양세포의 방사선감수성과 저항성에 영향을 미친다. 대부분의 표피암종 세포주는 상당히 많은 표피성장인자 수용체를 가지며¹⁴ 다른 세포주에서 분열을 촉진해 주는 정도의 표피성장인자의 농도에서 오히려 세포성장이 저하되는 것으로 알려져 있다. 인체의 편평상피암종 세포주 A431에 방사선 조사를 하였을 때 방사선이 직접 단백질кина제의 활성화에 작용하여 표피성장인자와 세포의 결합능력을 약화시켜 세포증식을 억제시키며¹⁵ CaSki 세포주에 방사선 조사 후 표피성장인자를 투여하면 세포의 방사선감수성을 증진시킨다는 보고¹⁶와 함께 상피암종세포주에서 표피성장인자가 apoptosis의 유발에 관련이 된다는 보고가 있다.¹⁷

방사선 치료의 목적은 정상세포의 생존에는 영향을 미치지 않으면서 종양세포를 없애는데 있으며 방사선 조사 시 나타나는 여러 종양세포의 성장과 세포주기의 변화, apoptosis의 유발에 대해 이해를 하면 치료효과를 증대시킬 수 있으리라 여겨진다. 이에 따라 국내에서도 HL60 세포주에서 방사선 조사에 의한 apoptosis와 세포 주기 관련 유전자의 발현 변화에 대한 연구¹⁸가 있었고 SCK선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포주기에 미치는 영향에 대한 연구¹⁹가 있었으며 구강내 유포피암종 세포주에 방사선을 조사한 후에 유발된 apoptosis에 관한 연구가 있었다.²⁰ 그러나 상피기원의 종양세포에 방사선 조사시 나타나는 G2 arrest와 apoptosis에 관한 연구는 미약한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 수 종의 상피기원 종양 세포주에 방사선을 조사한 후 조사량에 따른 세포주기 변화와 apoptosis

유발 여부를 알아보려고 하였다.

또한 방사선 조사 후 표피성장인자를 투여한 경우의 세포주기 변화와 apoptosis 유발 여부를 관찰하여 방사선만 조사한 경우와 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 실험에서는 한국세포주은행에서 분양 받은 3종의 인체 암세포주인 자궁경부의 유포피암종세포주 A431, 자궁경부의 상피암종세포주 SiHa, 구강내 유포피암종세포주 KB를 사용하였다.

2. 연구방법

1) 세포배양

배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Media (DEME, Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, N.Y., USA)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였고 세포 배양기에서 5% CO₂ 및 37°C 조건으로 배양하였다.

2) 방사선 조사와 표피성장인자 투여

A431, SiHa, KB 세포를 60 mm petri dish에서 2일 동안 배양하고 방사선 조사군은 Cs-137 방사선조사기 (IBL 437C, France)를 사용하여 실온에서 5.38 Gy/min의 선량율로 2, 5, 10 Gy를 단회 조사하였다. 배지는 방사선 조사 직후와 방사선조사 3일 후 교환하였다.

방사선 조사와 표피성장인자 투여군은 10 Gy 방사선 조사 직후 10 ng/ml의 표피성장인자를 투여하였다. 방사선 조사 직후와 3일 후 배지를 교환하면서 표피성장인자를 재투여하였다.

대조군은 어떠한 처리도 하지 않은 상태의 각 세포주를 이용하였다.

3. 생존 세포수 측정

배지 5 ml에 A431과 KB는 1×10⁵개의 세포, SiHa는 1.5×10⁵개의 세포를 60 mm dish에서 2일 동안 배양하고 방사선 조사와 표피성장인자 투여 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 후에 생존 세포수를 측정하였다. 세포를 0.05% trypsin과 0.53 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Gibco BRL, USA)로 배양용기에서 제거하고 0.4% trypan blue로 염색한 다음 혈구계 (Marienfeld, Germany)를 이용하여 생존 세포수를 측정하였다.

4. 세포 주기 분포 분석

방사선 조사와 표피성장인자 투여 8시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일 후에 trypsin-EDTA로 회수한 세포를 15

ml tube에 넣고 phosphate buffered saline (PBS, ph 7.4, Gibco BRL, USA)으로 세척한 후 1×10^6 개의 세포를 70% cold ethanol 5 ml로 4°C에서 하룻밤 동안 고정시켰다. 원심 분리하여 ethanol을 제거하고 0.1% bovine serum albumin (BSA, Amresco, USA)을 첨가한 5 ml의 PBS로 세척하였다. 각 tube당 25 μ l propidium iodide (PI, Sigma, Germany)/25 μ l RNase (Sigma, Germany)/200 μ l PBS 용액을 넣은 후 어두운 상태를 유지하면서 1시간 이내에 유세포 분석기(FAC Star plus flowcytometry, Becton Dickinson, USA)로 DNA 용적히스토그램을 얻고 DNA 용적의 백분율을 구하였다.

5. apoptosis 유발 측정

방사선 조사와 표피성장인자 투여 8시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일 5일 후에 1×10^6 개의 세포를 취하여 70% cold ethanol로 고정하고 ethanol을 제거한 후 0.1% BSA를 첨가한 PBS로 세척하였다. PI 용액으로 염색한 후 유세포 분석기로 pre-G1기의 백분율을 구하였다.

연구 성적

1. 생존 세포수의 변화

A431, Siha, KB 세포주 모두 조사량이 증가할수록 대조군에 비해서 생존 세포수가 감소하였다(Figs. 1, 2, 3).

10 Gy의 방사선 조사 후에 표피성장인자를 투여한 경우에 A431 세포주는 방사선만 조사한 경우보다 생존 세포수가 감소하였고 Siha 세포주는 생존 세포수가 증가하였으나 유의성 있는 차이는 없었다($P > 0.05$). KB 세포주는 두 군간에 큰 차이를 보이지 않았다(Figs. 4, 5, 6).

2. 세포 주기 분포의 변화

A431 세포주에 2 Gy의 방사선 조사 8시간 후에 G2기

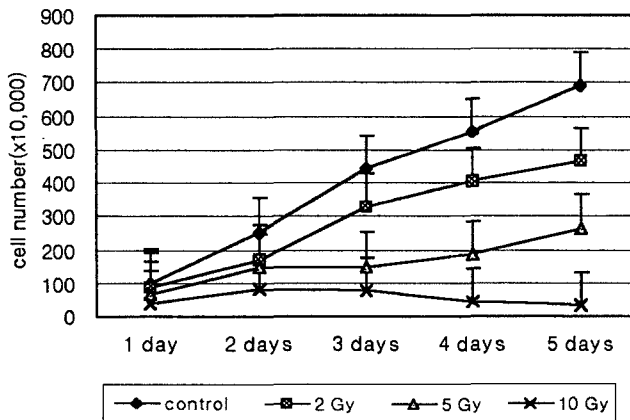


Fig. 1. Living cell number of irradiated A431. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

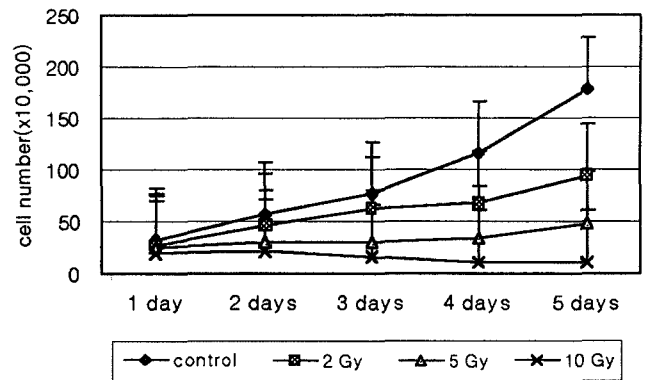


Fig. 2. Living cell number of irradiated Siha. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

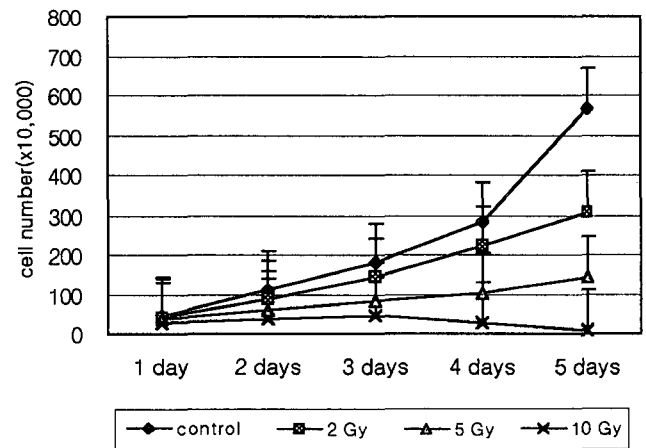


Fig. 3. Living cell number of irradiated KB. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

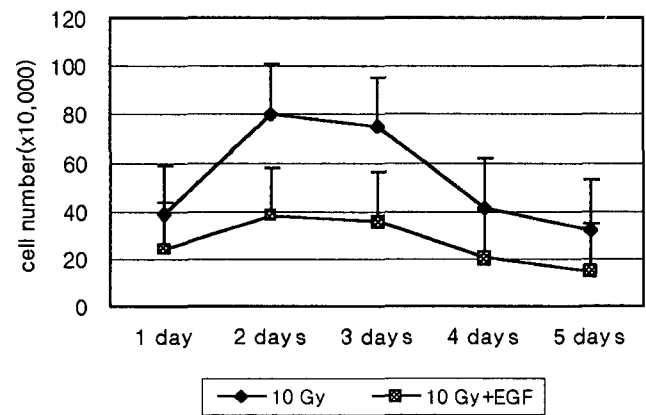


Fig. 4. Living cell number of A431 which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

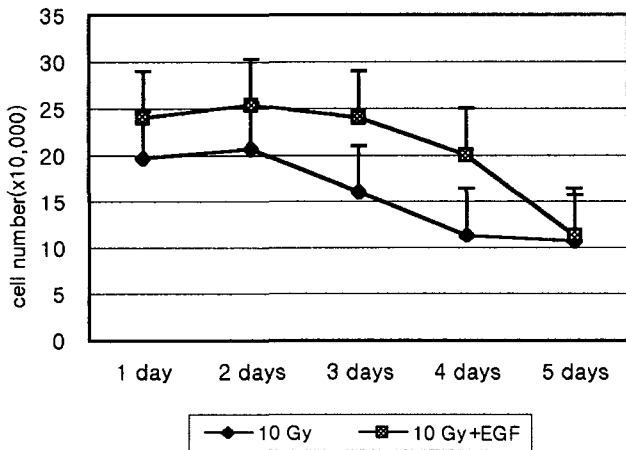


Fig. 5. Living cell number of Siha which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

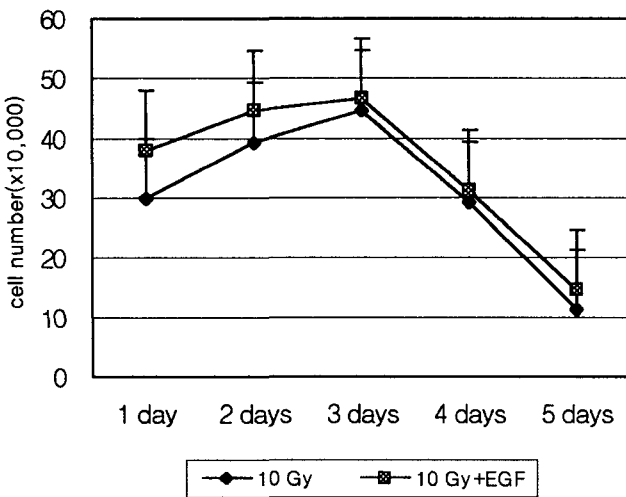


Fig. 6. Living cell number of KB which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

분포치가 23%로 증가되기 시작하여 12시간 후에는 24%로 증가되었다가 1일 (13%), 2일 (13%), 3일 (6%), 4일 (11%), 5일 후(7%)에는 대조군의 분포치 10%와 비슷한 수준이 되었다. 5 Gy 조사시 8시간 후에 G2기 분포치가 28%로 증가되기 시작하여 12시간 후에는 40%로 증가되었다가 1일 (16%), 2일 (17%), 3일 (12%), 4일 (15%), 5일 후(7%)에는 대조군의 분포치 10%와 비슷한 수준이 되었다. 10 Gy 조사시 8시간 후에 G2기 분포치가 19%로 증가되기 시작하여 12시간 후에는 49%로 되었으며 1일 (31%), 2일 (19%), 3일 (22%), 4일 (22%), 5일 후(18%)에도 대조군의 분포치 10%보다 증가된 상태였다(Fig. 7).

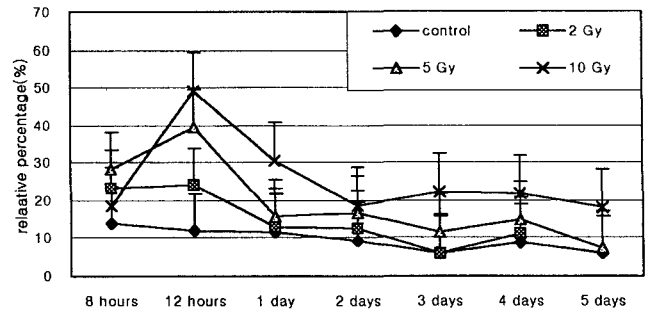


Fig. 7. G2 phase distribution of the A431 irradiated with 2, 5 and 10 Gy. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

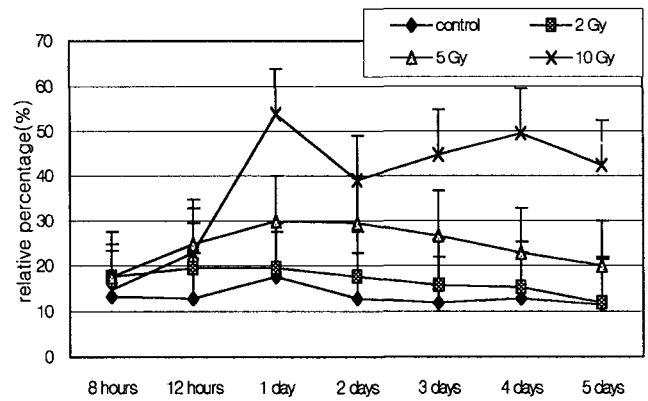


Fig. 8. G2 phase distribution of the Siha irradiated with 2, 5 and 10 Gy. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

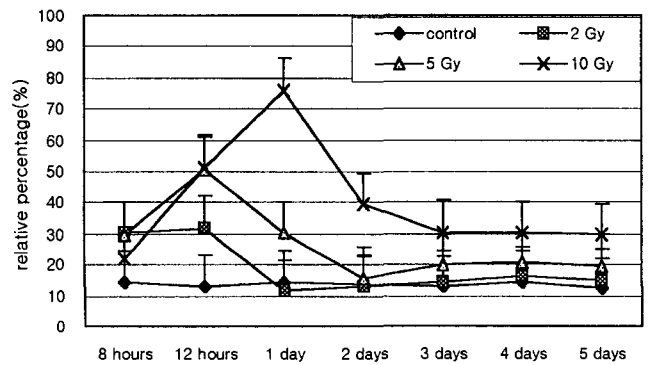


Fig. 9. G2 phase distribution of the KB irradiated with 2, 5 and 10 Gy. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

Siha 세포주에 2 Gy의 방사선 조사 8시간(18%), 12시간(20%), 1일(20%), 2일(18%), 3일(16%), 4일(15%), 5일 후(12%)의 G2기 분포치는 대조군의 분포치 13%와 비슷한 수준이었다. 5 Gy 조사시 8시간 후에 G2기 분포치가 18%

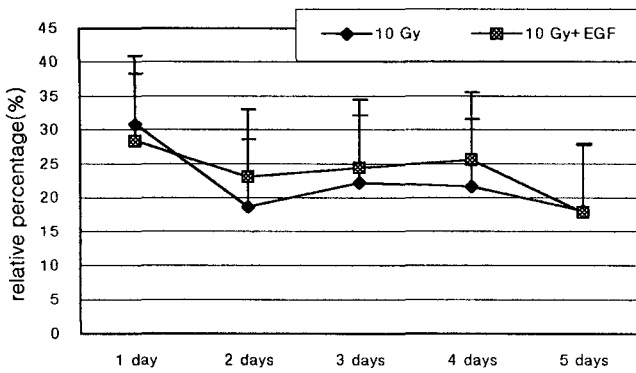


Fig. 10. Relative percentage of G2 phase of A431 which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

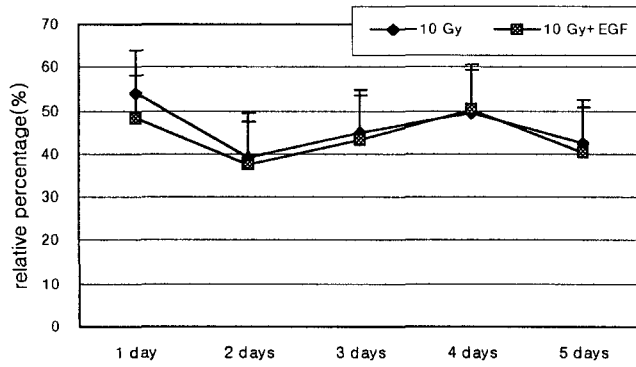


Fig. 11. Relative percentage of G2 phase of Siha which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

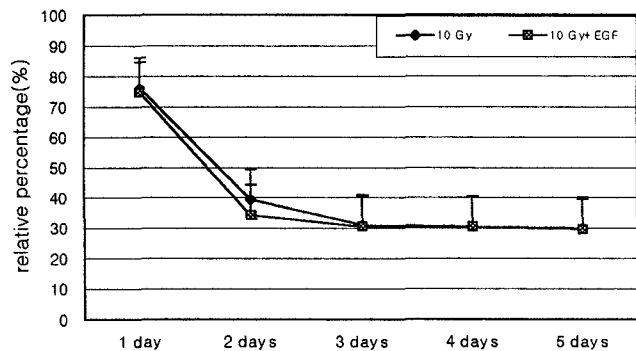


Fig. 12. Relative percentage of G2 phase of KB which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

로 증가하기 시작하여 1일 후에 30%로 되었다가 2일(30%), 3일(27%), 4일(23%), 5일 후(20%)에도 대조군의 분포

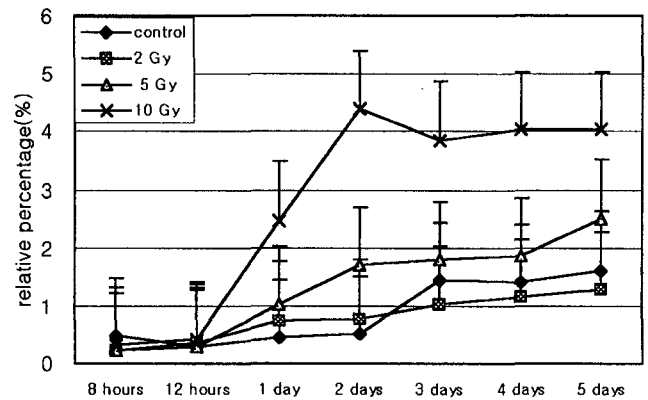


Fig. 13. Relative percentage of pre G1-phase according to the irradiation dose on A431. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

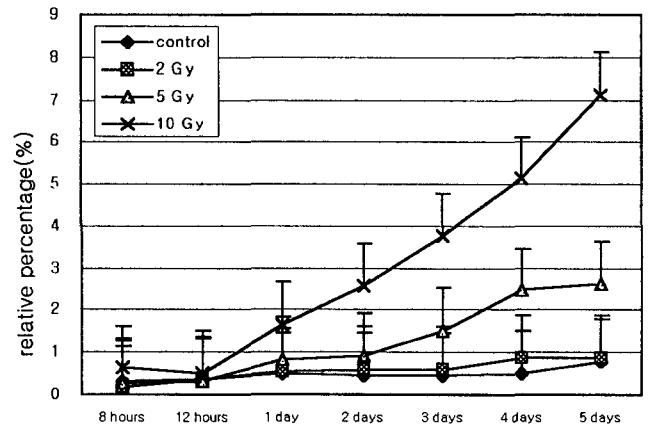


Fig. 14. Relative percentage of pre G1-phase according to the irradiation dose on Siha. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

치 13%보다 증가된 상태였다. 10 Gy 조사시 8시간 후(15%)와 12시간 후(23%)에 G2기 분포치가 증가하여 1일 후(54%)에 최고로 되었으며 2일(39%), 3일(45%), 4일(49%), 5일 후(42%)에도 대조군의 분포치 13%보다 증가된 상태였다(Fig. 8).

KB 세포주에 2 Gy의 방사선 조사 8시간 후에 G2기 분포치가 30%, 12시간 후에 32%로 증가되었으며 1일(12%), 2일(13%), 3일(14%), 4일(16%), 5일 후(15%)에는 대조군의 분포치 14%와 비슷한 수준이 되었다. 5 Gy 조사시 8시간 후에 G2기 분포치가 30%로 증가되어 12시간 후(51%)에 최고로 되었다가 1일 후(30%)에는 감소되기 시작하여 2일 후(16%)에는 대조군의 분포치 14%와 비슷한 수준이 되었다. 10 Gy 조사시 8시간 후에 22%로 증가되어 1일 후(76%)에 최고로 증가되었으며 2일(40%), 3일(31%), 4일

수종의 상피기원 종양 세포주에서 방사선 조사와 표피성장인자 투여에 따른 세포 주기의 변화와 apoptosis 유발에 관한 연구

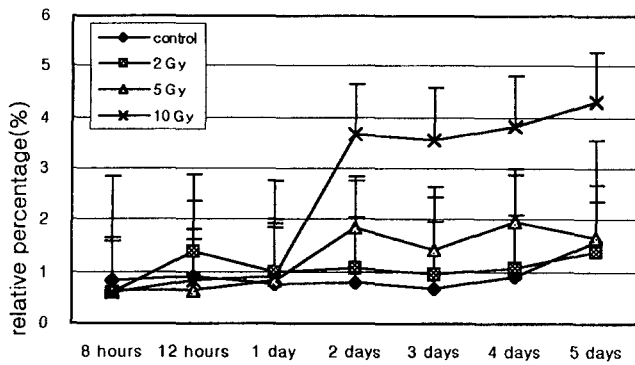


Fig. 15. Relative percentage of pre G1-phase according to the irradiation dose on KB. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

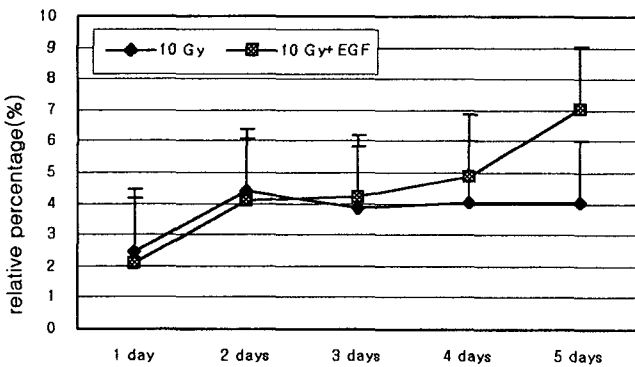


Fig. 16. Relative percentage of pre G1-phase of A431 which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

(31%), 5일 후(30%)에도 대조군의 분포치 14%보다 증가된 상태였다(Fig. 9).

10 Gy의 방사선을 조사한 후 표피성장인자를 투여한 경우에 A431 세포주는 G2기 분포치가 2일(24%), 3일(25%), 4일(30%), 5일 후(20%)에 방사선만 조사한 경우의 19%, 23%, 23%, 18%보다 다소 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었다($P > 0.05$) (Fig. 10). Siha와 KB 세포주는 두 군간에 차이가 거의 없었다(Figs. 11, 12).

3. apoptosis 유발

A431, Siha, KB 세포주 모두에서 2 Gy와 5 Gy 조사시에는 대조군에 비해서 pre-G1기의 양에 큰 변화가 없었으나 10 Gy 조사시에는 1일 후나 2일 후부터 증가되기 시작하였다. 즉 A431 세포주는 방사선 조사 1일 후에 pre-G1기의 양이 2%로 증가되기 시작하여 2일 후부터 5일 후까지 4% 수준을 유지하였으며(Fig. 13) Siha 세포주는 1일 후에 2%로 증가되기 시작하여 5일 후에 7%까지 꾸준한 증가 양

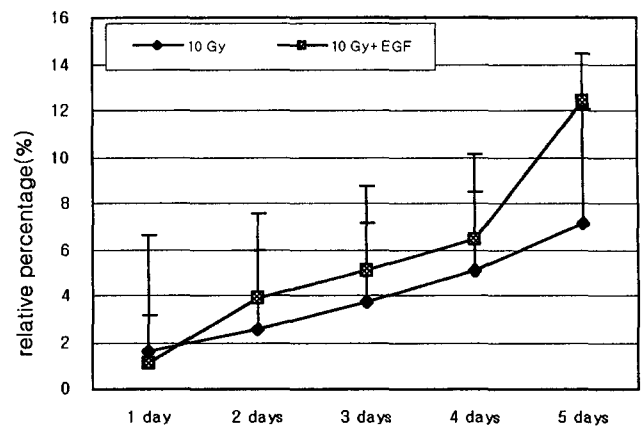


Fig. 17. Relative percentage of pre G1-phase of Siha which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

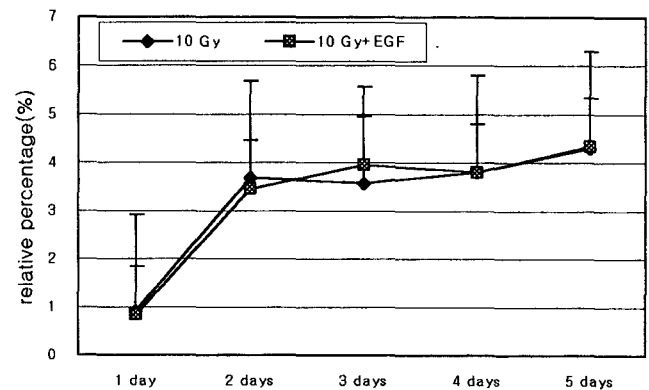


Fig. 18. Relative percentage of pre G1-phase of KB which was irradiated 10 Gy dose only and added to 10 ng/ml EGF after irradiation. Each value represents an average of at least three experiments. The bar at each point is the standard deviation.

상을 보였고(Fig. 14) KB 세포주는 2일 후에 4%로 증가되기 시작하여 5일 후까지 유지되었다(Fig. 15).

10 Gy 방사선 조사 후 표피성장인자 투여후의 apoptosis 유발정도를 조사한 결과 A431, Siha 세포주는 방사선만 조사한 경우보다 증가하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 없었고($P > 0.05$) KB 세포주는 차이가 거의 없었다(Figs. 16, 17, 18).

총괄 및 고안

세포에 방사선을 조사하면 일시적인 세포주기 정지와 회복할 수 없는 손상에 의한 세포사가 일어난다.⁷ 세포가 분열을 하고 일정한 시간이 지난 후 다시 분열을 하는 과정을 세포주기라고 하는데 세포가 방사선이나 기타 DNA에 손상을 주는 외부요인에 노출되면 세포주기가 길어지

게 되며 각 주기에 세포가 축적되어 세포주기가 지속되는 현상을 세포주기 정지라고 한다.²¹ 세포주기 정지는 G1기, S기 그리고 G2기에서 일어날 수 있다. G1 block은 대부분의 세포주에서는 일어나지 않으며 S기 delay는 5 Gy 이상의 높은 조사량에서 관찰된다.³ G2 arrest는 유사분열을 하는 모든 세포에서 관찰되며 높은 조사량 뿐만 아니라 세포에 따라서는 1 Gy 이하의 낮은 조사량에서도 관찰된다.³ SCK 선암세포주에 12 Gy의 방사선을 조사한 후 세포주기 분석을 시행한 결과 G2기에 많은 양의 세포들이 모여 세포주기를 순환하지 못하는 G2 arrest 현상이 나타났으나 G1기와 S기에는 세포들이 모이지 않았다.¹⁹

G2 arrest의 양은 방사선 조사량에 비례해서 증가하며 방사선에 저항성이 있는 세포주는 G2 arrest양이 더 크고 G2 arrest 기간은 세포 손상이 회복되지 않은 정도와 관계 있으며²² 이러한 G2 arrest는 방사선감수성과 관계 있다.²³ 본 연구에서는 방사선 조사 후 시간에 따른 세포주기 분석에서 G2 arrest를 확연히 관찰할 수 있었다. 그러므로 1 Gy에서 10 Gy 정도의 방사선을 조사 받은 세포에서는 G1 block과 S기 delay는 미비한데 반해 현저한 G2 arrest가 일어났다는 연구 결과^{21, 24}와 일치하였다.

Apoptosis는 증식하고 있는 조직에서 관찰되고 인위적으로 세포주기를 조절하여 억제시키거나 증진시킬 수 있기 때문에 세포주기와 깊은 관련이 있다.²⁵ 방사선을 조사 받은 세포는 손상을 인지하고 그에 따른 적절한 반응을 하게 되며 이러한 반응은 세포의 종류에 따라 다르게 나타난다. 즉 방사선을 조사하면 섬유모세포와 림프구는 질적으로나 양적으로 다른 반응을 나타내게 되며²⁶ 종양세포도 종류에 따라 방사선 조사 후 apoptosis의 발현정도가 다르다.²⁰ 유림프구 세포주들의 방사선감수성 차이는 얼마나 apoptosis가 빨리 발현되는가와 관계되며 방사선에 의한 apoptosis는 DNA의 손상에 대한 반응으로 비교적 빨리 사멸되는 세포주는 apoptosis가 세포주기 정지와 상관없이 나타나며 비교적 늦게 사멸되는 세포주는 G2기에 세포들이 축적된 후에 apoptosis가 일어난다.²⁷ 또한 방사선에 의한 apoptosis가 어느 세포주기에서 가장 민감하게 반응하는지에 관한 연구에서 혈액 종양세포와 같이 급속히 증식하는 세포의 경우 방사선 조사 후 첫 번째 맞이하는 분열기 전에 발생하기도 하지만 고형암 세포의 경우 분열기를 거친 후에 apoptosis가 유발된다는 보고²⁸⁻³⁰가 있으며 조혈 세포주는 일반적으로 방사선 조사 후 수 시간 내에 신속한 apoptosis가 일어나지만 비조혈 세포주는 수일 후에 지연된 apoptosis가 일어난다고 하였다.³¹ 신속한 apoptosis는 DNA의 이중나선분절에 의해서 직접적으로 유발되고 지연된 apoptosis는 염색체 변이에 의해서 촉진되며³² 신속한 apoptosis는 wild-type p53의 존재에 따라 좌우된다.³³

본 연구에서는 10 Gy 방사선 조사 후 12시간까지는 apoptosis의 유발정도가 대조군에 비해 큰 차이를 보이지 않았

고 A431과 Siha 세포주는 1일 후부터 크게 증가하였으며 KB 세포주는 2일 후부터 크게 증가하였다. apoptosis 발현 시간과 G2 arrest 발현시간과를 비교해 보면 A431과 KB 세포주는 G2 arrest가 최고조를 이루었다가 감소되기 시작했을 때부터 apoptosis가 발현되었으며 Siha 세포주는 G2 arrest가 최고조를 이룬 순간부터 apoptosis가 발현되었다. 또한 세 가지 세포주 모두에서 시간이 경과함에 따라 G2 arrest 정도가 감소되었음에도 불구하고 apoptosis 발현은 꾸준히 유지되었다.

표유류에서 세포의 성장과 분화는 성장인자들에 의해서 조절된다.³⁴ 표피성장인자는 세포표면의 수용체와 결합함으로써 다양한 형태의 세포의 증식을 유도할 수 있는 강력한 분열 유발성 능력을 갖고 있는 단백질이다.³⁴⁻³⁶ 표피성장인자 수용체는 다양한 세포의 세포막에 존재하는 분자량 170 kDa의 막투과성 당단백질이며^{36, 37} 표피성장인자 수용체 유전자의 정성적이나 정량적 비정상적 표현은 발암기전의 특정 단계와 깊은 연관성이 있을 수 있다.³⁵ 표피성장인자의 과발현은 A431 세포주에서 보고된 이래³⁸ 여러 종류의 종양에서 보고되었다.³⁹⁻⁴³ 이러한 표피성장인자 수용체의 과발현의 기전은 유전자 증폭 또는 mRNA의 과발현으로 추정된다.³⁴ 상피기원이 아닌 세포의 표피성장인자와 결합하는 수용체의 수가 10^4 에서 10^5 개인 반면에 인체의 상피기원 종양 세포주인 KB와 A431 세포주는 세포당 2×10^6 개의 수용체를 가지고⁴⁴ HN5와 CaSki 세포주는 각각 5.2×10^6 , 7.9×10^5 개의 수용체를 가지며 Siha 세포주는 1.1×10^5 개의 비교적 적은 수용체를 갖는다.⁴⁵ 상피기원의 종양 세포주에 50 ng/ml의 표피성장인자를 투여하였을 때 HN5 세포주는 뚜렷한 성장억제가 일어났으며 CaSki 세포주는 약간의 성장억제가 일어났고 Siha 세포주는 성장이 증진되었다.⁴⁵ 또한 A431 세포주에 1 ng/ml 이상의 표피성장인자를 투여하였을 때 성장이 억제되었다.^{46, 52} 표피성장인자수용체가 과발현된 세포의 증식을 억제시키는 표피성장인자의 능력은 잘 알려졌지만^{47, 48} 억제시키는 기전에 대해서는 정확히 알려져 있지 않다. 그러나 표피성장인자 수용체의 키나제 활성도와 세포성장의 정량적인 관계를 고려해 보면 적절한 키나제의 활성도를 초과할 경우 성장억제가 일어날 것으로 추정된다.^{14, 48}

표피성장인자 수용체가 과발현되어 있는 상피암세포에 방사선 조사 후 표피성장인자의 투여는 방사선에 대한 감수성을 증진시켰고^{17, 45, 49} 이러한 방사선감수성과 관련된 표피성장인자의 효과는 세포주의 표피성장인자 수용체의 발현 정도에 따라 다르다.⁵⁰ Kwok의 연구⁴⁹에서 방사선감수성의 증진은 표피성장인자에 의해서 성장이 억제된 A431, CaSki, HN5 세포주에서 관찰되었고 오히려 세포성장이 증진된 Siha 세포주에서는 방사선감수성 증진이 관찰되지 않았다. 표피성장인자와 연관된 방사선감수성 증진은 10 ng/ml의 표피성장인자 농도에서 최고로 나타났으나 최

대한의 성장억제를 일으키는 농도는 세포주마다 다르다고 하였다.⁴⁹ 본 실험에서는 표피성장인자 수용체가 비교적 많이 발현되는 A431과 KB 세포주와 상대적으로 적게 발현되는 Siha 세포주를 선택하여 10 Gy 방사선 조사 후 10 ng/ml의 표피성장인자 농도에서 생존 세포수를 측정하여 성장억제 정도를 관찰한 결과 표피성장인자 수용체가 많이 발현된 A431 세포주는 성장이 억제되는 경향을 보였고 Siha 세포주는 성장이 증가되는 경향을 보였다. 표피성장인자 수용체의 발현 정도 차이에 따라 성장억제 정도가 다르다는 연구결과^{45,46,50}와 일치하였다.

Laderoute 등⁵¹은 A431 세포주에 방사선 조사 후 표피성장인자를 투여하여 세포주기 변화를 관찰한 결과 방사선에 의해서 야기된 G2 arrest의 양이 증가되었다고 하였으나 Bonner 등⁵²은 방사선 조사 전에 표피성장인자의 투여는 세포주기 분포에 변화를 일으키지 않아 방사선감수성에 영향을 미치지 않는다고 하였다. 따라서 방사선 조사 전에 표피성장인자의 투여는 세포가 방사선에 예민한 세포주기로 들어가지 않게 하고 방사선감수성에 영향을 미치지 않는다는 가정 하에 본 연구에서는 방사선 조사 직후 표피성장인자를 투여하여 세포주기의 분포변화를 알아 보았다. 표피성장인자가 10 Gy 방사선 조사에 의해서 야기된 G2 arrest에 어떠한 영향을 미치는지를 조사한 결과 A431 세포주에서는 G2기가 다소 증가된 소견이 관찰되었으나 Siha와 KB 세포주에서는 G2기의 증가소견이 관찰되지 않았다. G2 arrest가 오래 지속되면 손상받은 세포가 회복될 수 있는 가능성이 적어져 세포사를 초래할 수도 있다. 예를 들면 chinese hamster ovary cell에 여러 가지 세포독성 물질을 투여한 결과 G2 arrest가 야기되었고 결과적으로 예정된 세포사가 나타났다.⁵³ 본 연구에서 방사선 조사 후 나타나는 apoptosis 유발에 표피성장인자가 미치는 영향을 관찰한 결과 A431과 Siha 세포주에서 apoptosis 유발 정도가 증가하는 경향을 보였으나 KB 세포주에서는 특별한 영향을 미치지 않았다. Kwok과 Sutherland가⁴⁹ 방사선 감수성을 최고로 증진시켰다는 10 ng/ml의 표피성장인자 농도를 이용하여 A431 세포주에서 성장억제를 관찰하였으나 유사한 상피성장인자 수용체의 발현 정도를 갖는 KB 세포주에서는 성장억제가 관찰되지 않았다. 그러므로 최대한 성장억제를 일으키는 표피성장인자의 농도는 세포주마다 다르다는 보고⁴⁹에 의해 10 ng/ml이 KB 세포주에서는 성장억제를 시키지 않은 것으로 생각되었으며 보다 다양한 세포주를 대상으로 최대한 성장억제를 시키는 표피성장인자 농도에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

참고 문헌

- Coleman CN. Beneficial liaisons. Radiobiology meets cellular and molecular biology. *Radiother Oncol* 1993; 28: 1-15.
- Dafta R, Hass R, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Down-regulation of cell cycle control genes by ionizing radiation. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 637-44.
- Maity A, McKenna WG, Muschel RJ. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: A review. *Radiother Oncol* 1994; 31: 1-13.
- Kysela BP, Michael BD, Arrand JE. Relative contributions of levels of initial DNA damage and repair of double strand breaks to the ionizing radiation sensitive phenotype of the chinese hamster cell mutant. *Int J Radiat Biol* 1993; 63: 609-16.
- Smeets MFMA, Mooren EHM, Begg AC. The effect of radiation on G2 blocks, cyclin B expression and cdc2 expression in human squamous carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Radiother Oncol* 1994; 33: 217-27.
- Su LN, Little JB. Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfected with activated *ras* oncogene and/or simian virus 40 T-antigen. *Radiat Res* 1993; 133: 73-9.
- Yarnold J. Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997; 44: 1-7.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
- Hendry JH, Potten CS. Intestinal cell radiosensitivity: A comparison for cell death assayed by apoptosis or by a loss of clonogenicity. *Int J Radiat Biol* 1982; 42: 621-8.
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13: 795-808.
- Gulli LF, Palmer KC, Chen YQ, Reddy KB. Epidermal growth factor-induced apoptosis in A431 cells can be reversed by reducing the tyrosine kinase activity. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 173-8.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979; 48: 193-216.
- Hagler H, Ash JF, Singer SJ, Cohen S. Visualization of fluorescence of binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A431. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 3317-21.
- Kawamoto T, Mendelsohn J, Le A, Sato GH, Lazar CS, Gill GN. Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermal carcinoma A431 cell. *J Biol Chem* 1984; 259: 7761-6.
- Nazmi MN, Dykes PJ, Marks R. Epidermal growth factor receptors in human epidermal tumors. *Br J Dermatol* 1990; 123: 153-61.
- Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Matsukuma K. EGF receptor phosphorylation is affected by ionizing radiation. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1358: 289-99.
- Kwok TT, Sutherland RM. Enhancement of sensitivity of human squamous carcinoma cells to radiation by epidermal growth factor. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1020-4.
- 김진희, 박인규. HL60 세포주에서 방사선 조사에 의한 apoptosis와 세포 주기 관련 유전자의 발현 변화. *대한치료방사선과학회지* 1998; 16: 377-87.
- 이형식, 박홍규, 허원주, 서수영, 이상화, 정민호 등. SCK 선암 세포주에서 방사선에 의한 apoptosis와 세포주기. *대한치료방사선과학회지* 1998; 16: 91-8.
- 박무순, 이삼선, 최순철, 박태원, 유동수. 인체의 암세포주와 치은 섬유모 세포주에서 방사선 조사가 apoptosis 유발에 미치는 영향에 관한 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 1998; 28: 59-72.
- Hall EJ. Radiosensitivity and cell age in the mitotic cycle. in Hall EJ, eds. *Radiobiology for the radiologist*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lip-

- pincott Co. 1994; 91-106.
22. Nagasawa H, Keng P, Harley R, Dahlberg W, Little JB. Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity. *Int J Radiat Biol* 1994; 66 : 373-9.
 23. Mckenna WG, Bernhard EJ, Markiewicz DA, Rudoltz MS, Maity A, Muschel RJ. Regulation of radiation-induced apoptosis in oncogene-transfected fibroblast: influence of H-ras on the G2 delay. *Oncogene* 1996; 12 : 237-45.
 24. Pines J. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin Cancer Biol* 1995; 6 : 63-72.
 25. Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* 1995; 58 : 160-74.
 26. Crompton NE. Programmed cellular response to ionizing radiation damage. *Acta Oncol* 1998; 37 : 129-42.
 27. David RA, Ian RR. Explaining differences in sensitivity to killing by ionizing radiation between human lymphoid cell lines. *Cancer Res* 1998; 58 : 2817-24.
 28. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33 : 782-96.
 29. Langley RE, Quartuccio SG, Kennealey PT, Coleman CN, Bump EA. Effect of cell cycle stage, dose rate and repair of sublethal damage on radiation-induced apoptosis in F9 teratocarcinoma cells. *Radiat Res* 1995; 144 : 90-6.
 30. Muschel RJ, Zhan 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.
 31. Olive PL, Durand RE. Apoptosis: An indicator of radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Biol* 1997; 71 : 696-707.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Chistensen ME, Therkildsen MH, Hansen BL. Epidermal growth factor receptor expression on oral mucosa dysplastic epithelial and squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992; 249 : 243-7.
 35. Yamamoto T, Kamata N, Kawano H. High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1986; 46 : 414-6.
 36. Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N. Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 1989; 59 : 559-62.
 37. Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1982; 257 : 1523-31.
 38. Merlino GT, Xu YH, Ishii S. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science* 1984; 224 : 417-9.
 39. Perez R, Pascual M, Macias A. Epidermal growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1984; 4 : 189-93.
 40. Veale D, Ashcroft T, Marsh C. Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1987; 55 : 513-6.
 41. Neal DE, Marsh C, Bennett MK. Epidermal growth factor receptors in human bladder cancer: Comparison of invasive and superficial tumors. *Lancet* 1985; 1 : 366-8.
 42. Bauknecht T, Kiechle M, Bauer G. Characterization of growth factors in human ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1986; 46 : 2614-8.
 43. Weichselbaum RR, Dunphy EJ, Beckett MA. Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines. *Head Neck* 1989; 11 : 437-42.
 44. Hunter T, Cooper JA. Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells. *Cell* 1981; 24 : 741-52.
 45. Kwok TT, Sutherland RM. Epidermal growth factor modification of radioresistance related to cell-cell interactions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20 : 315-8.
 46. Chajry N, Martine PM, Pages G, Cochet C. Relationship between the MAP kinase activity and the dual effect of EGF on A431 cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203 : 984-90.
 47. Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J. Apoptosis induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 1995; 95 : 1897-905.
 48. Goldkorn T, Mendelsohn J. Transforming growth factor beta modulates phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and proliferation of A431 Cells. *Cell Growth Differ* 1992; 3 : 101-9.
 49. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitization of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991; 64 : 251-4.
 50. Kwok TT, Sutherland RM. Cell cycle dependence of epidermal growth factor induced radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 22 : 525-7.
 51. Laderoute KR, Ausserer WA, Knapp AM, Grant TD, Sutherland R M. Epidermal growth factor modifies cell cycle control in A431 human squamous carcinoma cells damaged by ionizing radiation. *Cancer Res* 1994; 54 : 1407-11.
 52. Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJH, Spain K. The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29 : 243-7.
 53. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990; 40 : 2353-62.