

방사선 적응반응에 의한 세포사멸 조절

Regulation of Cell Death by Radioadaptation

조은숙, 엄홍덕

원자력의학원 방사선의학연구센터

서울특별시 노원구 공릉동 215-4

요약

저 선량 방사선으로 유도되는 세포의 적응반응이 세포사멸에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 먼저 세포사멸 조건을 확립하기 위하여 사람의 정상조직에서 분리 배양한 섬유아세포를 0.5-1 mM H₂O₂로 48 시간 처리하고 세포의 생존 여부를 propidium iodide 염색을 통한 flow cytometry 방법으로 분석하였다. 그 결과 이 조건에서 섬유아세포의 사멸이 효과적으로 유도됨을 확인하였으며, 이러한 현상은 SAPK/JNK의 활성화를 동반함이 *in vitro* kinase assay를 통하여 관찰되었다. 이때 SAPK/JNK의 활성도를 SP600125를 사용하여 억제하면 세포사멸이 감소함이 확인되어, H₂O₂는 SAPK/JNK의 활성화를 통하여 섬유아세포의 사멸을 유도한다고 생각되었다. H₂O₂의 이러한 세포사멸 작용이 방사선에 의하여 조절될 가능성을 탐구하기 위하여 섬유아세포를 0.5 Gy gamma-ray로 24 시간 사전 처리한 후, 사멸농도의 H₂O₂로 재처리하였다. 흥미롭게도 방사선으로 사전 처리한 세포는 그렇지 않은 대조세포와 달리 H₂O₂ 재처리에 저항함이 관찰되었고, H₂O₂ 재처리로 유도되는 SAPK/JNK의 활성화도 방사선 사전 처리로 억제됨이 확인되었다. 이 실험 결과에 미루어 저 선량 방사선으로 유도되는 세포의 적응반응은 SAPK/JNK의 활성화를 억제함으로써 산화성 스트레스로부터 세포를 보호하리라 생각된다.

Abstract

To investigate whether radioadaptation can modulate cell death signaling, primary cultured human fibroblasts were exposed to 0.5-1 mM H₂O₂ for 48 hr. This treatment resulted in a cell death, as analyzed by the cellular ability to exclude propidium iodide. The cell death was accompanied by an activation of SAPK/JNK, and the specific inhibition of SAPK/JNK activity using SP600125 reversed the cell

death. Therefore, SAPK/JNK appeared to mediate the H₂O₂-induced cell death. Interestingly, this type of cell death was efficiently prevented when the cells were pre-exposed to 0.5 Gy gamma-rays 24 hr before the H₂O₂ treatment. Moreover, H₂O₂ failed to activate SAPK/JNK in these pretreated cells. The data suggests that low doses of gamma-radiation can induce a survival pathway that suppresses the H₂O₂-induced cell death by blocking the SAPK/JNK activation.

1. 서론

방사선은 선량에 따라서 상반된 양상으로 세포의 기능을 조절할 수 있다. 즉, 고 선량 방사선은 세포의 성장 및 생존도를 저하시키는 반면, 저 선량 방사선은 고 선량 방사선으로부터 세포를 보호할 수 있는 적응반응을 유도할 수 있다.¹⁾ 따라서 저 선량 방사선 처리로 적응반응이 유도된 세포에 다시 고 선량 방사선 처리를 하면, 고 선량의 유해한 효과가 저 선량으로 사전 처리를 하지 않은 대조세포에 비하여 줄어든다는 것이다. 저 선량 방사선은 방사선 시설 종사자들에게 그 노출의 위험이 있으며, 방사선 치료를 받는 암 환자의 경우에도 암세포 주변 정상조직들이 저 선량에 노출될 가능성은 충분하다. 그러므로 방사선 작업환경의 안전과 방사선 치료 부작용에 대한 대처 방안을 강구하기 위해서는 방사선 적응반응의 특성과 기전에 대한 이해가 필요하다.

세포 수준에서 방사선 적응반응에 대한 연구는 주로 colony forming assay를 사용하여 수행되어 왔다. 즉, 방사선 적응반응이 방사선에 대한 세포의 생존력, clonogenic survival을 높인다는 것이다. 이러한 현상은 적응반응이 세포의 성장 능력을 향상 시키거나 사멸 능력을 감소시킬 때 가능하지만, 이 두 가지 가능성이 체계적으로 분석된 경우는 드물다. 이에, 본 연구에서는 방사선 적응반응이 사멸자극에 대한 세포의 사멸반응을 약화시킬 가능성을 탐구하고자 하였다. 특히 세포사멸은 세포내 사멸 프로그램의 작동으로 유도된다는 개념에 미루어, 방사선 적응반응이 세포사멸 프로그램의 원활한 작동을 방해할 가능성에 초점을 두었다. 또한 암과 같이 변성된 세포보다는 정상세포가 저 선량 방사선에 노출될 가능성이 높다는 점에서 사람의 정상조직에서 직접 분리, 배양한 섬유아세포를 실험의 모델로 사용하여 실험 결과의 현실성과 적용 가능성을 높이고자 하였다.

2. 재료 및 시약

세포 및 처리: 포경수술시 제거되는 조직에서 피부 섬유아세포를 분리하여 DMEM과 F12 media를 3:1로 혼합한 배양액에 genamicin (50 ug/ml)을 첨가하여 배양하였다. 방사선 적응반응을 유도하기 위해서는 70-80% confluency를 보이는 섬유아세포에 0.5 Gy의 gamma-ray를 조사하고 24시간 37°C에서 방치하였다. 이렇게 사전 처리한 세포와 그렇지 않은 대조세포를 사멸 농도의 H₂O₂로 다시 처리하고 다양한 시간 배양하였다.

세포사멸 측정: 처리한 세포에 propidium iodide(PI)를 5 ug/ml의 농도로 가하고 PI 염색 정도와 세포의 크기를 동시에 분석하는 multiparameter flow cytometry를 실시하였다. 이때 정상적인 크기를 보이고 PI 염색정도가 상대적으로 낮은 세포를 생존한 것으로 보았고 나머지 세포들은 사멸한 것으로 파악하였다.²⁾

Western blot analysis: 세포를 0.5 % Nonidet P-40가 함유된 Tris-HCl (40 mM, pH 8) 용액을 사용하여 파괴하고, 13,000g에서 5 분간 원심분리 하여 상등액을 취하였다. 여기에 함유된 단백질 50 ug를 12% SDS-PAGE로 분리하고, Immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA) 으로 전기력을 사용하여 이동시킨 후 SAPK/JNK 항체 (Pharmingen/Transduction Laboratories, San Diego, CA)와 반응시켰다. 그 반응 band는 이차 항체를 사용한 chemiluminescence 방법으로 분석하였다.³⁾

In vitro kinase assay: 세포를 파괴한 상등액에 함유된 단백질 400 ug를 SAPK/JNK 항체와 반응시켜 면역 침전을 실시하였다. 이 침전물을 20 mM Hepes (pH 7.4) 완충액을 사용하여 다시 녹이고, SAPK/JNK의 기질인 c-Jun (New England Biolabs, Beverly, MA)과 ATP 및 [32 P]ATP를 가하였다. 적절한 시간이 지난 후 kinase 반응을 가열로 중지시키고, 그 결과를 12% SDS-PAGE와 Tina 2.0 프로그램을 사용한 PhosphoImager를 사용하여 분석하였다.⁴⁾

3. 결과 및 고찰

방사선 적응반응이 세포사멸을 조절할 가능성을 탐구하기 위해서는 세포가 사멸되는 조건을 설립할 필요성이 먼저 제기되었다. 이를 위하여 섬유아세포를 gamma-ray로 40 Gy까지 처리하였지만 PI 염색으로 분석한 세포의 생존도는 크게 변하지 않았다 (그림 1A). 이에 비하여 Jurkat leukemia cell은 방사선 처리에 민감하게 사멸됨이 관찰되었다. 따라서 본 연구에서 사용한 방법에 관한 정상세포는 암세포에 비하여 gamma-ray에 민감하게 사멸되지 않는다고 생각되었다. 이러한 정상세포를 좀 더 효과적으로 사멸시키기 위한 대안으로 H₂O₂ 처리를 하였다. 그림 1B에서 보듯이 섬유아세포를 0.5-1 mM 농도의 H₂O₂로 48 시간 처리하자 세포사멸이 농도 의존적인 경향으로 유도되었다.

H₂O₂로 유도되는 섬유아세포의 사멸이 방사선 적응반응으로 조절될 가능성을 탐구하고자 하였다. 이를 위하여, 섬유아세포를 0.5 Gy gamma-ray로 조사하고 24 시간이 지난 후 0.65 mM H₂O₂로 다시 처리하였다. 그리고 48 시간이 지나서 세포의 생존도를 분석한 결과, 방사선 사전처리는 H₂O₂로 유도되는 섬유아세포의 사멸을 억제함이 관찰되었다. 즉, 아무것도 처리하지 않은 세포와 방사선 사전 처리만 세포의 생존도는 약 80%였으며, H₂O₂만 처리하자 생존도는 5% 이하로 떨어졌고 방사선 처리 후 H₂O₂ 처리를 하자 생존도는 80% 가까이로 완벽하게 회복되었다 (그림 2). 이 실험 결과는 방사선 적응반응이 유도는 세포는 그렇지 않은 대조세포에 비하여 산화성 스트레스의 세포사멸 작용에 저항함을 제시한다.

상기 현상의 기전을 확립하기 위해서는 H₂O₂의 세포사멸 작용을 매개하는 신호 전달체를 확립할 필요가 있었다. 여러 가지 다른 실험조건에서 SAPK/JNK가 H₂O₂의 세포사멸 작용을 매개하는 인자로 작용할 수 있다는 기존의 보고에 미루어,^{4,5)} 본 실험조건에서도 SAPK/JNK가 같은 역할을 수행하는지 조사하고자 하였다. 먼저, 0.65 mM H₂O₂는 섬유아세포에서 SAPK/JNK의 활성화를 유도함이 *in vitro* kinase assay를 통하여 확인되었다 (그림 3). 또한 H₂O₂ 처리에 의하여 5% 이하로 떨어졌던 세포의 생존도가 SAPK/JNK의 억제제인 SP600125를 첨가하자 약 50% 가까이 회복됨이 관찰되었다. 이 실험 결과들은 H₂O₂에 의한 섬유아세포의 사멸도 SAPK/JNK에 의해서 매개됨을 제시하였다. 흥미롭게도 0.5 Gy gamma-ray로 사전 처리된 세포에서는 H₂O₂에 의한 SAPK/JNK 활성화가 감소됨이 관찰되었다 (그림 3). 따라서 방사선 사전 처리는 SAPK/JNK 활성화 억제를 통하여 세포사멸을 억제한다는 결론을 획득하였다.

방사선 적응반응은 1984년에 처음으로 기술된 이래⁶⁾ 20년 동안 수많은 연구자들에 의하여 그 특성과 기전이 연구되어 왔으나, 방사선 적응반응이 세포사멸 경로를 차단할 수 있음을 직접적으로 규명하기는 본 연구가 처음이라는 관점에서 그 의의가 있다. 본 연구 결과에 미루어 정상세포라도 저 선량 방사선에 노출되면 H₂O₂와 같은 활성산소의 작용에 대한 반응이 달라질 수 있다고 생각된다. 특히, 활성산소가 TNF- α , Fas ligand와 같은 cytokine들뿐만 아니라 다양한 항암제들의 세포사멸 작용에 공통으로 관여하는 신호전달 매개체라는 관점에서, 방사선 적응반응이 유도된 세포는 다양한 사멸자극에 대한 저항성을 획득하리라 생각된다. 이러한 세포 수준의 현상이 조직 및 개체 전체의 입장에서 어떠한 효과로 나타나는지는 향후 연구의 대상이다.

* 본 연구는 과학기술부 원자력중장기 연구개발사업으로 수행되었음.

4. 인용문헌

- [1]. Rigaud O, and Moustacchi E. (1996) Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response. *Mutation Res.* 358: 127-134.
- [2]. Mangan D, Welch GR, and Wahl SM. (1991) Lipopolysaccharide, TNF α , and IL-1 prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* 146: 1541-1546.
- [3]. Lee BR, and Um HD. (1999) Hydrogen peroxide suppresses U937 cell death by two different mechanisms depending on its concentration. *Exp. Cell Res.* 248: 430-438.
- [4]. Kim DK, Cho ES, Seong JK, and Um HD. (2001) Adaptive concentrations of hydrogen peroxide suppress cell death by blocking the activation of SAPK/JNK

pathway. *J. Cell Sci.* 114: 4329–4334.

- [5]. Kim DK, Cho ES, Lee SJ, and Um HD. (2001) Constitutive hyperexpression of p21/WAF1 in human U266 myeloma cells blocks the lethal signaling induced by oxidative stress but not by Fas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 34–38.
- [6]. Olivieri G, Bodycote J, and Wolff S. (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. *Science* 223: 594–597.

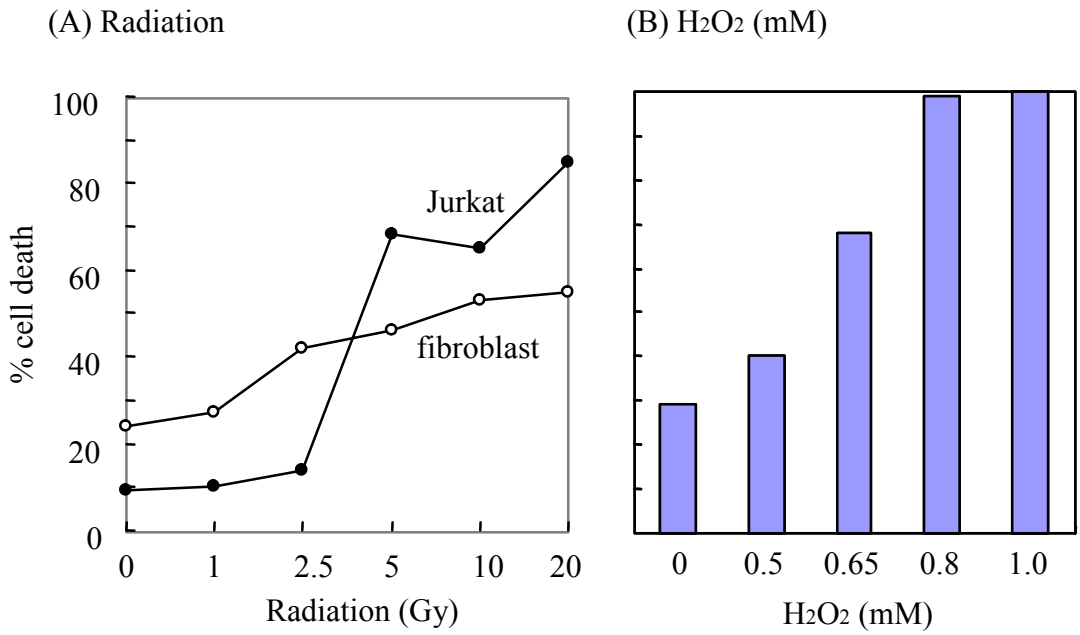


Fig. 1. death of fibroblast cells. Primary cultured human fibroblasts were exposed to indicated doses of either γ -ray (A) or H₂O₂ (B). Cellular viability was determined 48 hr after the treatment by a PI exclusion assay.

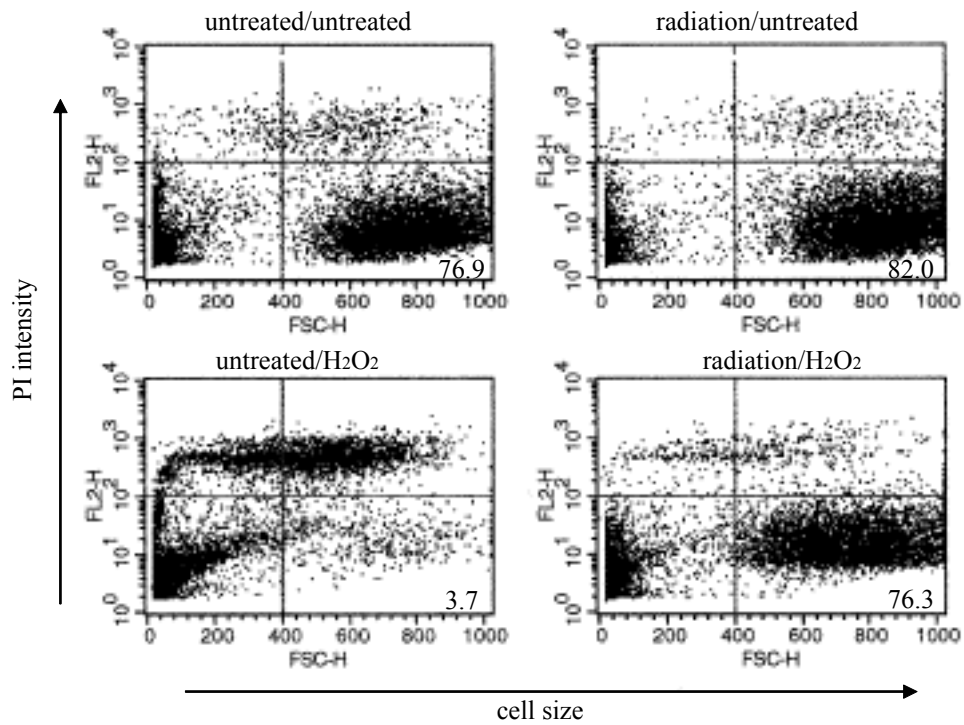


Fig. 2. Radioadaptation suppresses H₂O₂-induced cell death. Fibroblasts were exposed to 0.5 Gy of γ -rays. At the end of 24 hr of incubation, the treated and untreated control cells were challenged by 0.65 mM H₂O₂. Cellular viability was determined by flow cytometry 48 hr after the challenge.

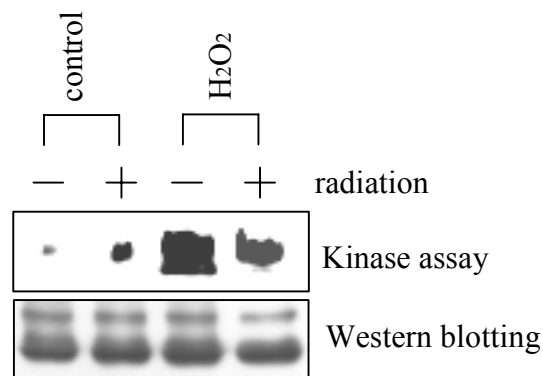


Fig. 3. Radioadaptation suppresses H₂O₂-induced SAPK/JNK activation. Fibroblasts were exposed to 0.5 Gy of γ -rays, and incubated for 24 hr. The treated and untreated control cells were challenged by 0.65 mM H₂O₂. The activity and content of SAPK/JNK were analyzed by *in vitro* kinase assay, Western blotting, respectively.