

CaSki 세포주에서 성장 상태에 따른 X-선에 의한 *c-jun*의 발현

충북대학교 의과대학 치료방사선과학교실

장 성 순 · 박 우 윤

목적 : 세포의 성장 상태 즉, 지수적 증식기와 평형기 세포에서 방사선에 의한 *c-jun*의 발현 양상의 차이를 파악하고, 방사선조사 후 세포주기 분포를 분석하여 이들의 상관 관계를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 사람 자궁경부암 세포주인 CaSki를 대상으로 낱짜 경과에 따른 세포성장곡선을 작성하여 지수적 증식기(제 4일)와 평형기(제 9일) 세포를 정하였다. 방사선조사는 6 MV 선형가속기를 이용해 2 Gy의 선량을 조사하였고, 이때 선량률은 3 Gy/min 이었다. 지수적 증식기와 평형기 세포 각각에 방사선조사 후 시간 경과에 따라 total RNA를 추출하여 northern blot analysis를 시행해 *c-jun*의 발현 양상을 관찰하였다. 또 방사선조사 후 시간 경과에 따라 세포를 얻어 유세포계측법을 이용해 세포주기 분포를 분석하였다.

결과 : 방사선조사 1 시간 후에 지수적 증식기와 평형기 세포 모두에서 최대의 발현이 관찰되었다. 그러나 이후 6 시간까지 지수적 증식기 세포에서는 지속적으로 발현이 증가한 반면, 평형기에서는 점차 발현이 감소되는 양상을 보였다. 방사선에 의한 세포주기의 변화는 지수적 증식기에서 시간 경과에 따라 G0-G1에서 S, G2-M 기로의 이동이 더 활발히 일어났다.

결론 : *c-jun* 은 방사선조사 후 성장상태에 따른 세포 증식의 조절과 관련 있을 것이다.

핵심용어 : *c-jun*, 세포 성장 상태, CaSki, 세포주기 분포

서 론

방사선은 대표적인 DNA 손상 유발 인자로 세포가 어떻게 방사선 신호를 인식하며, 정확한 감지체에 대해 아직 밝혀지지 않았으나 방사선 신호가 인식된 후 tyrosine kinase, protein kinase C (PKC), Raf-1 kinase, mitogen activated protein kinase (MAPK) 같은 여러 이차 전달물질들이 활성화되고 이것들이 조기반응 유전자의 전사를 조절하게 된다.¹⁾ 한편 조기반응 유전자군들의 산물은 전사인자로 작용하여 여러 성장인자나 cytokine 들의 발현에 관여한다.¹⁾ 원종양 유전자 *c-jun*은 여러 성장인자들이나 혈청, 방사선, 그리고 etoposide, ara-C, cisplatin 같은 화학요법제 등의 자극에 의해 발현되는 조기반응 유전자군으로 알려져있다.^{2,3)} *c-jun*의 산물은 jun 또는 fos의 leucine 기간에 분자적 상호작용에 의해 jun+jun homodimer 나 fos+jun heterodimer 를 형성하여 전사인자 activator protein-1 (AP-1)의 구성성분이 되며 AP-1은 DNA promoter element (5'TGAC/GTCA3')에 결합해 여러 성장인자나 cytokine의

전사를 조절하여 세포 증식의 조절에 관여한다.^{1,4)} 방사선에 의한 *c-jun*의 발현을 조절하는 기전에 대한 연구에서 Hallahan 등⁵⁾은 kinase 활성제인 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 나 H7 을 사용하여 protein kinase 활성을 억제하였을 때 발현의 현저한 감소를 관찰하여 PKC 의존성 기전을 보고 하였다. Datta 등⁶⁾은 TPA와 항산화약제 N-acetyl-L-cysteine (NAC)를 이용한 연구에서 reactive oxygen intermediates (ROI) 와 PKC를 통한 *c-jun* 발현 기전을 주장하였으며, 또한 Chae 등⁷⁾은 tyrosine kinase 억제제인 herbimycin이 방사선에 의한 *c-jun*의 발현을 효과적으로 억제함을 관찰해 tyrosine 인산화의 중요성을 보고하였다. 한편 Sherman 등²⁾은 HL-60 세포에서 방사선조사 후 cycloheximide로 단백질 합성을 억제하였을 때 *c-jun* RNA의 반감기가 연장됨을 관찰해 *c-jun* RNA의 교체에 영향을 미치는 불안정 단백질에 의한 후전사적 기전이 존재한다고 보고하였으나, 현재 최소한 PKC 의존성 전사적 기전이 주 조절 기전으로 받아들여진다.

세포의 성장 상태에 따른 방사선반응 양상의 차이는 잠재 치사손상 수복 면에서 다르다고 알려져 있는데 대개 빠른 성장 속도를 보이는 세포에서 방사선감수성이 크며, complete medium 보다 liquid holding medium에서, 지수적 증식기 보다 평형기 상태의 세포에서 잠재치사손상 수복이 증가하였다.⁸⁾ 이러한 현상에 대해 세포의 성장이 제한된 상황에서는

이 논문은 1999년 6월 9일 접수하여 1999년 8월 13일 채택되었음.

책임 저자 : 박우윤, 충북대학교병원 치료방사선과
Tel : 0431)269-6376 Fax : 0431)269-6387
E-mail : wupark@med.chungbuk.ac.kr

세포주기의 이동이 일어나기 전 세포가 손상을 수복할 수 있는 시간적 기회를 보다 많이 갖게되어 잠재치사손상의 수복이 증가할 것이라고 설명되었다. 그러나 방사선에 의한 생물학적 작용이 세포의 성장 상태에 따라 다른 이유는 아직 충분히 밝혀지지 않았다. 방사선에 의한 생물학적 작용은 일련의 유전자의 반응을 매개로 하며, 따라서 방사선반응의 초기 단계에 관여하는 *c-jun*의 발현도 세포의 성장 상태에 따라 다름을 추론할 수 있다. 그러나 대개의 시험관 내 연구는 지수적 증식의 세포를 대상으로 하였고 성장 상태에 따른 *c-jun*의 발현 양상이 차이는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 세포의 성장 상태 즉, 지수적 증식기와 평형기 세포에서 방사선에 의한 *c-jun*의 발현 양상을 알아보고, 방사선조사 후 세포주기 분포를 분석하여 이들의 상관 관계를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양 및 방사선조사

세포주로는 우리 나라 여성에서 가장 빈도가 높은 암인 자궁경부암에서 유래된 CaSki 세포(ATCC CRL 1550)를 생명공학연구소에서 구입하여 사용하였다. 직경 100 mm 배양 접시(Nunc, Denmark)에 55°C에서 30분간 불활성화된 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum) (Gibco, USA) 과 100 u/ml penicilline-streptomycin (Gibco, USA)을 포함한 RPMI 1640(Gibco, USA) 배지 10 ml 당 5×10^5 개의 세포가 들어가도록하여 5% CO₂, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다. 배양시작 후 2~3 일 마다 새로운 배지로 갈아주면서 매일 날짜 경과에 따라 4회에 걸쳐 세포수를 계측하여 성장곡선을 작성하였다. 배양용기의 배지를 제거한 다음, phosphate buffered saline (PBS)으로 배양용기의 바닥에 붙어있는 세포를 2회 세척하고 trypsin 을 처리하여 단일세포로 만든 다음 trypan blue 로 염색되지 않는 활성세포만을 hemocytometer에서 계측하였다. 방사선조사는 실온에서 6 MV 선형가속기(Siemens, USA) 를 이용하여 후방조사로 세포가 위치한 기저면에 최고 흡수선량이 위치하게 하였고, 10 cm 두께의 아크릴판을 세포배양접시 위에 올려놓아 후방산란선을 받도록 하였다. 조사선량은 임상적 방사선 치료에서 가장 흔히 사용되는 1회 분할조사량인 2 Gy 이었고, 이때 선량률은 분당 3 Gy 이었다.

2. Northern blot analysis

Northern blot을 위한 RNA의 추출은 방사선조사 후 15, 30, 45분, 1, 1.5, 2, 3, 6 시간에 하였다. 배지는 배양 시작 후

2~3일 마다 갈아주었고 특히 실험전 날(3일, 8일째) 10% 우혈청이 들어있는 새로운 것으로 갈아주었다. *c-jun* 발현의 양성 대조군은 24 시간 동안 무혈청배지에서 배양 후 10%의 우혈청을 첨가하여 1 시간 후에 RNA를 추출하였다(cs). 또 다른 대조군으로 방사선조사 시간동안 세포의 실온 방치에 의한 *c-jun* 발현의 가능성을 확인하기 위해 외부에 노출하지 않고 배양기 속에 그대로 넣어둔 군(ci) 과 방사선조사 시간 동안 실온에 둔 군(co) 등을 두었다. total RNA의 추출은 방사선조사 후 정해진 시간에 배양용기에서 배지를 제거한 후 PBS로 용기의 바닥을 세척하고 RNAzol B (Tel-Test, USA) 를 사용하여 guanidine isothiocyanate 추출법으로 실시하였다. 분광분석기를 이용해 RNA를 정량한 후 20 µg의 RNA를 1.2% agarose/formaldehyde gel (Amresco, USA) 내에서 전기영동을 실시하여 모세관현상을 이용하여 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham, USA) 에 전이하였다. 50% formamide 가 함유된 Hybrisol I (Oncor, USA) 용액으로 45°C에서 4 시간동안 prehybridization한 후 ³²P-labeled c-DNA probe로 12~16 시간동안 hybridization하였다. SSPE, 0.1% SDS 용액으로 membrane을 세척한 후 *c-jun*의 발현 농도를 Phosphor imager (Biorad, USA)로 분석하고, 같은 membrane에서 GAPDH의 발현을 측정하여 RNA loading 의 차이를 정량화하였다. 실험은 3회 반복 시행하였다. 본 실험에 사용된 *c-jun*의 probe는 EcoRI 에 의해 절단된 1.1kb 크기이다.

3. 세포주기 분석

방사선 조사 후 각각 0, 1, 3, 5, 7, 9 시간에 세포를 배지에서 회수하였다. 세포의 회수는 우선 배지를 제거한 다음 PBS로 2회 배양용기의 바닥을 세척하고 trypsin 처리를 하였다. 10% 우혈청이 들어있는 배지로 trypsin 을 불활성화시키고 단일 세포를 PBS로 세척하여 70% cold ethanol로 고정하였다. Propidium iodide (Sigma, USA)로 37°C에서 30 분간 염색한 후 filter로 세포 덩어리(agggregates)를 제거한 직후 유세포계측법(flow cytometry) (facsc caliber, Becton Dickinson, USA)을 이용해 세포주기의 분포를 분석하였고 위의 과정을 3회 반복 시행하였다. 세포주기별 시간에 따른 변화량은 ANOVA법으로 통계 분석하였다. 즉, 세포주기(G0G1;S;G2M)를 독립변수로 하고 방사선조사 9 시간 후에 각 주기별 세포 분포의 변화량(%)을 종속변수로 하여 변화의 차이를 검증하였다.

결 과

1. 세포 성장곡선

세포수의 증가는 날짜 경과에 따라 대략 Sigmoid 형을 나타냈는데(Fig. 1), 활성 세포수가 지속적으로 증가하는 시기에 있는 제 4일을 지수적증식기로, 일정하게 평형을 나타내고 있는 제 9일을 평형기로 정하였다. 4일째 세포는 약 70%의 포화도(confluency)를 보였으며, 6일째에는 거의 95% 이상의 포화도를 보였다. 95% 이상의 포화도에서도 세포수가 계속 늘어나는 것은 세포들이 서로 중첩해서 자라기 때문으로 생각된다.

2. *c-jun*의 발현

방사선조사에 의한 *c-jun* 발현의 변화는 대조군(co)를 기준으로 하였다. 지수적증식기 세포에서는 방사선조사 15분 후부터 발현이 증가하기 시작하여 1 시간 후에 최대 발현을 보였다(Fig. 2). 평형기 세포에서도 15분 후부터 발현이 증가하기 시작하여 역시 1 시간 후에 최대 발현이 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 최대 발현을 보인 1 시간 후부터 6 시간 후까지의 발현 양상은 세포 성장 상태에 따라 달랐다. 즉, 지수적 증식기 세포에서는 6 시간 후까지 지속적으로 발현이 증가한 반면, 평형기 세포에서는 대조군 보다는 높으나 점차 감소되어 가는 경향을 보였다. 외부노출에 의해 *c-jun* 발현은 증가하지 않았고, 지수적증식기와 평형기 모두에서 cs군의 발현이 증가하였다.

3. 세포주기의 분포

대조군에서 주기별 세포의 분포는 성장 상태에 따라 서로 비슷하였다. 즉, G0-1 기는 지수적증식기에서 48.9%, 평형기

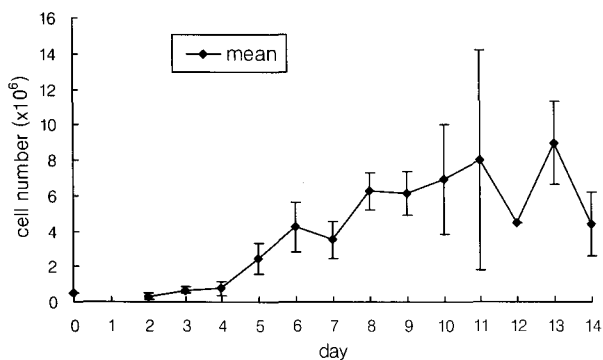


Fig. 1. Growth curve of CaSki cells according to the elapse of days.

에서 49.7% 이었으며, S 기는 각각 35.3%, 33.2%, G2-M 기는 각각 13.3%, 17.1% 이었다. 이는 평형기 상태에서도 지수적 증식기와 마찬가지로 지속적인 세포의 증식이 일어나지만 이와 더불어 사멸 등으로 인한 지속적인 손실(cell loss) 이 일어나는 것으로 생각된다. 그러나 방사선조사 후 세포주기의 변화는 성장 상태에 따라 차이를 보였다. 평형기 보다 지수적증식기 세포에서 시간 경과에 따라 G0-G1에서 S, G2-M 기로의 이동이 더 급격히 진행되었으며(Fig. 4, 5), 9 시간 후에 세포주기분포의 변화량은 지수적증식기에서 통계적으로 유의한 차이를 보였으나($p=0.0465$), 평형기에서는 유의한

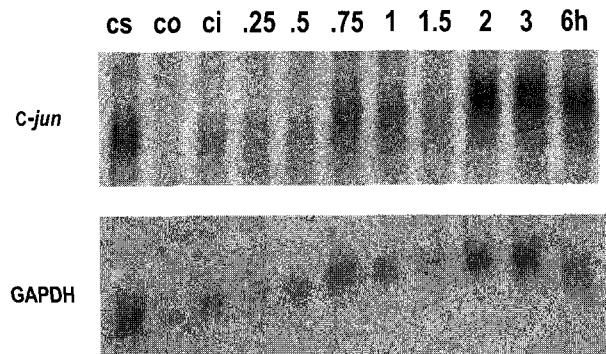


Fig. 2. Expression of *c-jun* in exponential growth phase. Northern blot analysis of total cellular RNA levels was performed in CaSki cells after treatment with 2 Gy of ionizing radiation. Hybridization was performed using a ³²P-labeled *c-jun* or GAPDH DNA probe. There were three nonirradiated control groups; cs (serum activation), co (room temperature during irradiation), ci (inside the CO₂ incubator during irradiation).

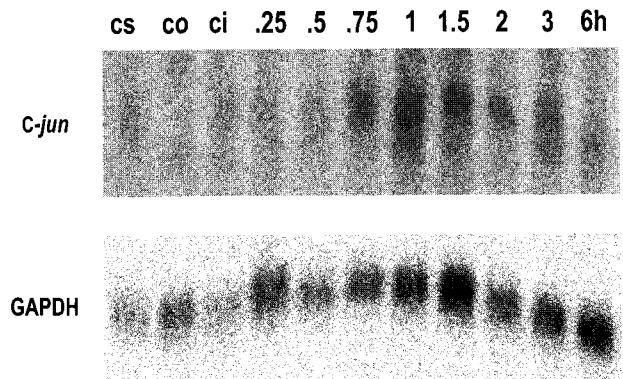


Fig. 3. Expression of *c-jun* in stationary phase. Northern blot analysis of total cellular RNA levels was performed in CaSki cells after treatment with 2 Gy of ionizing radiation. Hybridization was performed using a ³²P-labeled *c-jun* or GAPDH DNA probe. There were three nonirradiated control groups; cs (serum activation), co (room temperature during irradiation), ci (inside the CO₂ incubator during irradiation).

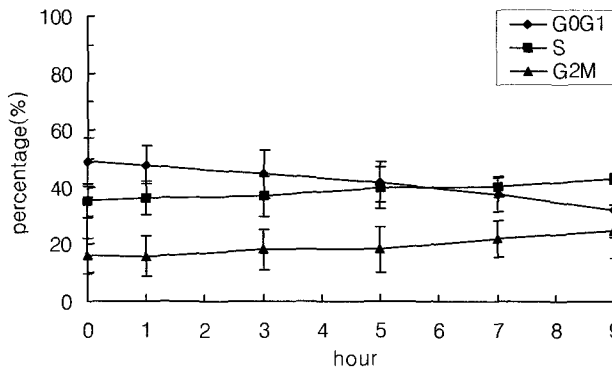


Fig. 4. Cell cycle distribution in exponential growth phase. Cell cycle distribution was analyzed using flow cytometry according to time course after 2 Gy irradiation.

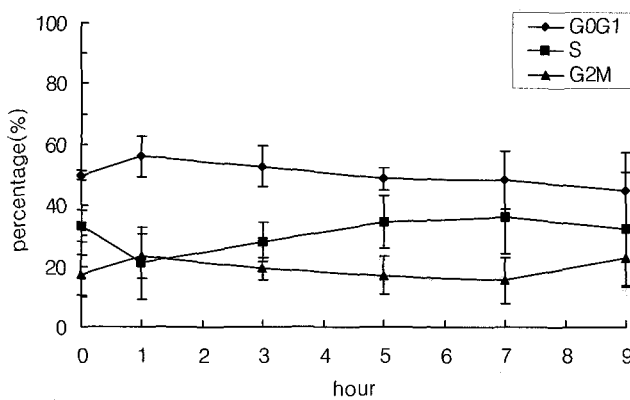


Fig 5. Cell cycle distribution in stationary phase. Cell cycle distribution was analyzed using flow cytometry according to time course after 2 Gy irradiation.

차이를 나타내지 않았다($p=0.5161$).

고안 및 결론

방사선조사 후 시간과 방사선량, 그리고 선량률에 따른 *c-jun* 발현 양상의 차이가 보고되는데 Sherman 등²⁾은 사람 HL-60 백혈병세포와 AG-1522 정상 섬유아세포에서 20 Gy의 선량, 14.3 Gy/min의 선량률에서 방사선조사 후 3 시간에 최대의 발현과 24 시간 후에 기저수준으로의 발현을 보고하였으며, 방사선량(2, 5, 10, 20, 50 Gy)에 따른 3 시간 후의 발현과 관련하여 선량 증가에 따라 점차적으로 증가되는 발현 양상을 관찰하였다. 또한 선량률에 따른 발현 양상에 대한 연구에서는 10 Gy 또는 20 Gy의 선량에서 선량률을 14.3 Gy/min 에서 0.67 Gy/min으로 낮추었을 때 증가된 발현을 보이는 역 선량률 효과를 관찰하였다. Manome 등³⁾은 사람 성

상세포종세포에서 20 Gy, 14.3 Gy/min의 방사선조사 후 3 시간에 최대 발현을 보이고 24 시간 후에 기저수준으로 돌아오는 일시적인 발현 양상을 보고하였다. Hallahan 등⁹⁾은 사람 육종세포 RIT-3 와 STSAR-5에서 20 Gy의 방사선조사 각각 1 시간과 3 시간 후에 최대의 발현을 관찰하였고 3 시간 이후에서는 더 이상 지속적인 발현의 증가는 보이지 않았다고 하였다. Prasad 등¹⁰⁾은 244B 사람 림프아형세포에서 저선량(0.25~2 Gy)에 의한 *c-jun* 발현에 대한 연구에서 0.5 Gy, 1.17 Gy/min의 방사선조사 후 1 시간에 관찰된 최대의 발현과 이후 시간 경과에 따라 점차 감소되어 12 시간 후 기저수준으로의 발현 양상을 보고하였으며, 여러 방사선량(0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 Gy)에서 1 시간 후의 발현은 0.5 Gy에서 최대의 발현을 보였다고 하였다. 한편 Collart 등¹¹⁾은 정상 섬유아세포, 백혈병세포, 흑색종, 육종, 상피세포암종에서 50 Gy, 1.5 Gy/min의 방사선조사 후 2 시간에 보인 발현 양상의 다양성이 세포의 기원과 유전적 이질성에 기인할 것으로 생각하였다. 지금까지 발표된 연구들을 종합해 볼 때 방사선에 의한 *c-jun*의 발현은 시간, 선량, 선량률 및 세포형에 따라 다양한 반응을 보인다. 그러나 *c-jun*은 대개 0.25~50 Gy의 방사선 조사 후 수분 내에 조기 발현하여, 1~3 시간에 최대의 발현을 보이며 이후 시간 경과에 따라 점차 감소되어 12~24 시간 후에 기저수준으로 낮아지며, 고 선량률보다 저 선량률에서 증가된 발현을 보인다.^{2, 3, 9, 10} 본 연구에서도 지수적증식기와 평형기 세포 모두에서 방사선 조사 후 1 시간에 최대의 발현을 관찰할 수 있었으나, 이후 방사선 조사 후 6 시간까지의 시간에 따른 발현은 지수적증식기 세포에서는 지속적으로 증가된 양상으로, 평형기 세포에서는 점차 감소되어 가는 양상으로 나타나 차이를 보였다. 이는 성장 상태에 따른 방사선에 대한 세포 반응 차이의 어떤 부분에서 *c-jun*이 관여함을 시사하는 것이다.

배양세포의 성장곡선에서 평형기는 영양공급(limited nutrient supply)이나 면적의 제한(density-inhibition)에 의해 유도될 수 있으며, 양자간에는 세포역동학적인 차이가 있다.¹²⁾ 즉, 영양공급이 계속되면 면적의 제한에 의해 성장이 억제된 경우에도 증식능력이 계속 유지되지만 영양공급의 중단에 의해 일시적으로 발생된 평형기의 많은 세포는 증식능력이 없으며, 또 정상세포는 영양공급을 계속해주어도 평형기에서는 contact inhibition 때문에 G0-1 기에 있는 세포들이 많다. 그러나 세포성장 상태에 따른 방사선감수성이나 세포역동학에 대한 연구는 대개 새로운 영양공급이 중단된 배양(unfed culture)에서 유도된 평형기 또는 정상세포에 의한 것이 대부분이다.^{13, 14)} 저자들의 경우 매 2~3일 마다 그리고 실험

전날 배지를 새로 갈아주었다. 따라서 저자들이 유도한 평형기는 contact inhibition이 없는 암세포에서 영양공급이 충분하지만 면적의 제한에 의한 것이다. 이 경우 종양의 성장곡선에서 후기에 plateau를 그리는 가장 큰 이유는 cell loss의 증가 때문이다.^{12, 15} 통상적으로 편평상피암의 경우 세포손실인자(cell loss factor)가 70% 이상으로 보고되고 있고, 따라서 세포의 성장 역동에 중요한 요인으로 인정되고 있다.⁸ 본 연구에서 사용된 CaSki 도 편평상피암으로, 세포주기의 변화보다는 세포 손실에 의해 평형기 상태가 유지되는 것으로 보인다. 악성도가 높은 암세포에서 영양공급의 제한 없이 단지 배양 면적의 제한에 의해 유도된 평형기의 세포들은 증첩해서 자라고 3개의 층으로 나눌 수 있다. 즉, 배양용기에 단단히 붙어 밀집해 자라는 층(제 1 층), 제 1 층에 위에 약하게 붙어 있는 층(제 2 층), 그리고 배지에 떠 있는 층(제 3 층) 등이다.¹² 저자들은 주기 분석을 위한 세포의 회수시 배지를 제거하고 PBS로 2번 세척을 했기 때문에 배지에 떠 있던 세포나 약하게 바닥에 붙어 있던 세포는 제거되고 강하게 붙어있는 세포만 분석되어서 지수적 증식기나 평형기나 세포주기의 분포에는 큰 차이가 없던 것으로 보인다. 그러나 방사선조사 후 그 상태에서 시간 경과에 따라 RNA를 뽑고, 주기분석을 하였기 때문에 영양공급과 면적이 충분한 지수적 증식기와 영양공급은 충분하지만 면적이 제한된 평형기간의 차이를 알 수 있다.

정상 세포와 종양 세포의 재증식은 방사선조사 후 가속될 수 있다.^{16, 17} 방사선조사 후 세포의 증식과 생존의 증가는 부분적으로 방사선에 의해 유도된 여러 성장인자나 cytokine들에 의해 일어나며, 더욱이 방사선이 G1 세포에서 DNA 합성을 유도한다는 최근 연구결과가 있는데 Hallahan 등¹⁵은 *c-jun*의 전사활성 영역을 전사억제 영역으로 치환시킨 dominant negative(delta 9)를 이용한 연구에서 방사선조사 후 G1기를 벗어나는 세포 비율의 감소와 세포 생존의 감소를 관찰하여 G1/S 전이와 세포 생존에 대한 *c-jun*의 역할을 강조하였다. 본 연구에서도 지속적으로 증가된 *c-jun*의 발현을 보인 지수적 증식기에서 방사선조사 후 G0-G1 기에서 S, G2-M 기로의 뚜렷한 이동을 보였다. 그러나 평형기에서는 *c-jun* 발현이 일시적이었으며, 세포주기의 변화도 지수적 증식기에 비해 느리게 이동하였다. 즉, 성장이 억제된 공간에서는 *c-jun* 발현도 제한적이었다.

세포의 성장 상태에 따른 방사선 반응의 차이는 전통적으로 잠재치사손상 수복의 차이로 설명되어왔다.⁸ 세포증식이 제한된 상황에서 세포주기 이동의 지체는 세포로 하여금 손상을 회복할 수 있는 더 많은 시간적 여유를 줄 것이며, 또

평형기 상태를 구성하고 있는 G1 기의 세포가 PLD 회복에 주로 관여할 것이라는 가정에서이다.¹⁹ 방사선 조사 후의 세포주기 이동의 지체는 잘 알려져 있다. 방사선에 의해 DNA가 손상을 받았을 때 세포주기 진행을 막기 위한 checkpoint가 활성화되어 세포주기의 지체를 일으키는데 현재 p53 의존성 G1 정지는 p53 발현에 의해 유도된 p21과 gadd (growth arrest and DNA damage)45 단백질에 의하여 일어나며, G2 정지는 MPF (mitosis promotion factor)로 알려진 cdc2-cyclin B 복합체의 인산화 과정의 장애나, elongation factor-1 δ (EF-1 delta) 발현의 증가, 그리고 cyclin B 발현의 감소 등에 기인한다.²⁰ 비록 방사선에 의한 DNA 손상이 G1 또는 G2 checkpoint를 통해 세포주기 지체를 일으키지만, 종양의 미세환경은 산소, 영양소, 성장인자, 종양 내 압력 등의 여러 면에서 다양하며 이런 미세환경들은 종양 세포의 행동과 치료에 대한 반응에 영향을 미치는 여러 유전자나 단백질의 발현에 중요하다. Abate 등²¹은 fos-jun heterodimer의 DNA에 대한 결합은 fos와 jun이 갖고 있는 DNA 결합 영역내의 cysteine 잔기의 산화환원 상태에 의해 조절된다고 보고하였고, Price 등²²은 저 산소 상태에서 G1 정지에 중요한 gadd45와 gadd153, 그리고 glucose-regulated protein 78 (GRP 78) mRNA가 증가됨을 관찰하였다. 따라서 본 연구의 지수적증식기와 평형기 세포에서 각각 다른 미세환경은 *c-jun*의 성장인자나 cytokine에 대한 전사적 조절 기전에 영향을 미칠 수 있고, 또한 방사선에 의해 유도된 gadd45뿐만 아니라 평형기 세포에서 상대적인 저산소 상태에 의해 유도된 추가적인 gadd45로 인해 세포주기 정지에 영향을 미칠 수 있다.

세포의 성장 상태에 따른 방사선의 생물학적 작용의 차이는 방사선 반응에 관여하는 여러 유전자의 발현의 차이에 기인하며, *c-jun*도 이에 관여한다. 본 연구에서 관찰된 지수적증식기에서 지속적으로 증가된 *c-jun*의 발현과 평형기에서의 상대적 감소는 방사선조사 후의 세포 증식의 조절과 관련이 있는 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Coleman CN. Beneficial liaisons: radiobiology meets cellular and molecular biology. *Radiother Oncol* 1993; 28:1-15
2. Sherman ML, Datta R, Hallahan DE, et al. Ionizing radiation regulates expression of the *c-jun* protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:5663-5666
3. Manome Y, Datta R, Fine HA. Early response gene induction following DNA damage in astrocytoma cell lines. *Biochemical Pharmacology* 1993; 45:1677-1684

4. Weichselbaum RR, Hallahan DE, Sukhatme V, et al. Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:480-484
5. Hallahan DE, Sukhatme VP, Sherman ML. Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2156-2160
6. Datta R, Hallahan DE, Kharbanda SM, et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of *c-jun* gene transcription by ionizing radiation. *Biochemistry* 1992; 31: 8300-8306
7. Chae HP, Jarvis LJ, Uckun FM. Role of tyrosine phosphorylation in radiation-induced activation of *c-jun* protooncogene in human lymphohematopoietic precursor cells. *Cancer Research* 1993; 53:447-451
8. Repair of radiation damage and the dose-rate effect., *Cell, tissue, and tumor kinetics*. In : Hall EJ. eds. *Radiobiology for the radiologist*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Co. 1994: 107-131, 191-210
9. Hallahan DE, Virudachalam SV, Beckett M. Mechanisms of x-ray-mediated protooncogene *c-jun* expression in radiation-induced human sarcoma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21:1677-1681
10. Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, et al. Induction of transcription of immediate early genes by low-dose ionizing radiation. *Radiation Research* 1995; 143:263-272
11. Collart FR, Horio M, Huberman E. Heterogeneity in *c-jun* gene expression in normal and malignant cells exposed to either ionizing radiation or hydrogen peroxide. *Radiation Research* 1995; 142:188-196
12. Zinnering GF, Little JB. Proliferation kinetics of density-inhibited cultures of human cells, a complex in vitro cell system. *Cancer Res* 1973; 33:2343-2348
13. Berry RJ, Hall EJ, Cavanagh J. Radiosensitivity and the oxygen effect for mammalian cells cultured in vitro in stationary phase. *British J Radiol* 1970; 43:81-90
14. Drewinko B, Yang LY, Barlogie B, et al. Cultured human tumor cells may arrested in all stages of the cycle during stationary phase: demonstration of quiescent cells in G1, S and G2 phase. *Cell Tissue Kinet* 1984; 17:453-463
15. Frindel E, Malaise EP, Alpen E, et al. Kinetics of cell proliferation of an experimental tumor. *Cancer Res* 1967; 27: 1122-1131
16. Hermens AF, Barendsen GW. Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after X-irradiation. *Europ J Cancer* 1969; 5:173-189
17. Hallhan DE. Radiation-mediated gene expression in the pathogenesis of the clinical radiation response. *Seminars in Radiation Oncology* 1996; 6:250-267
18. Hallhan DE, Dunphy E, Virudachalam S, et al. *c-jun* and Egr-1 participate in DNA synthesis and cell survival in response to ionizing radiation exposure. *J Biol Chem* 1995; 270:30303-30309
19. Bertrand M, Deen DF. Factors influencing the recovery from potentially lethal damage (PLD) in mammalian cells in vitro and in vivo. *Cancer Treat Rev* 1980; 7:1-3
20. Rudoltz MS, Kao G, Blank KR, et al. Molecular biology of cell cycle: potential for therapeutic applications in radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology* 1996; 6:284-294
21. Abate C, Patel L, Rauscher FJ, et al. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990; 249: 1157-1161
22. Price BD, Calderwood SK. Gadd45 and Gadd153 messenger RNA levels are increased during hypoxia and after exposure of cells to agents which elevate the levels of the glucose-regulated proteins. *Cancer Research* 1992; 52:3814-3817

Abstract

Expression of *c-jun* by X-ray According to Cell Growth State in CaSki Cell Line

Seong Sun Jang, M.D., Woo Yoon Park, M.D.

Department of Therapeutic Radiology, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Purpose: The expression pattern of *c-jun* by ionizing radiation according to cell growth state (exponential growth phase vs. stationary phase) and its relationship with cell cycle redistribution were investigated.

Materials and Methods: The exponential growth phase (day 4) and stationary phase (day 9) cells were determined from cell growth curve according to the elapse of days in CaSki. The cells were irradiated using 6 MV X-ray with a dose of 2 Gy at a fixed dose rate of 3 Gy/min. Northern blot analysis was performed with total cellular RNA and cell cycle distribution was analyzed using flow cytometry according to time-course after irradiation.

Results: The maximum expression of *c-jun* occurred 1 hour after irradiation in both exponential growth and stationary phase cells. After then *c-jun* expression was elevated upto 6 hours in exponential growth phase cells, but the level decreased in stationary phase cells. Movements of cells from G0-G1 to S, G2-M phase after irradiation were higher in exponential growth phase than stationary phase.

Conclusion: *c-jun* may be involved in the regulation of cellular proliferation according to the growth states after irradiation.

Key Words: *c-jun*, Cell growth state, CaSki, Cell cycle distribution