대한방사선종양학회지 2000;18(3):214~219

방사선조사에 의해 발생되는 세포고사에 대한 Cysteamine의 효과

인제대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 건양대학교 의과대학 약리학교실†,
동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실‡

최영민* · 박창교† · 조홍래* · 이형식† · 허원주‡

목 적 : 방사선에 의한 세포고사의 경로와 방사선보호제의 일종인 cysteamine (β-mercaptoethylamine)이 방사선에 의한 세포고사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : HL-60 세포주를 대상으로 대조군, 방사선조사군, cysteamine 전처치군(1 mM, 10 mM) 으로 나누어서 실험을 하였다. 방사선은 6 MV로 10 Gy 일회 조사하였고, cysteamine은 방사선조사 1시간 전에 처치하였다. 세포고사의 경로를 알아보기 위하여 대조군과 방사선조사군에서 caspase-8의 활성도를 측정하였고, 세포고사에 대한 cysteamine의 영향을 알아보기 위하여 방사선조사 후 1.5, 3, 6, 24시간에서 각 실험군의 생존 세포 수, caspase-3의 발현과 활성도, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 발현 등을 측정하여 비교하였다.

결 과 : 세포사망수용체에 의한 세포고사의 발생과 관련이 있는 caspase-8의 활성도는 방사선조사에 영향을 받지 않았다($p>0.05$). 생존 세포 수는 방사선조사 6시간 후부터 감소되었는데($p>0.05$), 1 mM cysteamine 전처치군에서는 감소되지 않고 대조군과 비슷하게 유지되었다. 세포고사의 실행 단계라고 알려진 caspase-3의 발현은 각 실험군들 사이에 차이가 없었으나, 활성도는 방사선조사 후에 증가되었고($p>0.05$) 1 mM cysteamine 전처치에 의해 증가가 감소되는 경향이었다. Caspase-3의 활성에 의해 발생되는 PARP 분해산물(24 kD)의 발현이 방사선조사 후에 관찰되었는데, 1 mM cysteamine 전처치군에서는 발현의 감소가 관찰되었다.

결 론 : 방사선에 의한 세포고사는 세포사망수용체에 의한 세포고사와는 다른 경로를 거치고, 1 mM cysteamine 전처치는 방사선조사에 의한 세포고사의 발생을 억제하는 경향이 있는 것으로 생각된다.

핵심용어 : 방사선, 세포고사, Cysteamine

서 론

방사선에 의한 세포 사망의 기전에는 DNA 이중나선구조의 손상에 의한 유사분열사(mitotic death)와 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지 않지만 유사분열 과정 없이 세포의 손상을 인지하여 핵농축, 세포질의 응축, 핵붕괴 등과 같은 과정을 거치는 세포예정사(programmed cell death)가 있다. 방사선 노출 후 몇 차례의 유사분열 후에 발생하는 유사분열사에 비해 세포예정사인 세포고사(apoptosis)는 방사선 노출 후 비교적 조기에 발생한다. 방사선조사 후 모든 세포에서 세포고사가 발생하는 것은 아니지만, 방사선에 민감한 human promyelocytic leukemia cell인 HL-60 세포주는 방사선에 의한 세포 사망의 기전에서 세포고사가 차지하는 비중이 매우 높아서 세포고사와 관련된 연구들에서 많이 이용되고 있다.

이 논문은 2000년 6월 29일 접수하여 2000년 9월 5일 채택되었음.

책임 저자 : 최영민, 인제대학교 부산백병원 방사선종양학과
Tel : 051)890-6691, Fax : 051)891-1751
E-mail : cymin@nownuri.net

세포고사의 기전은 아직 완전히 알려져 있지는 않지만, TNF (tumor necrosis factor) 수용체의 일종인 CD95 (Fas)와 같은 세포사망수용체의 활성화,[1~3] 방사선이나 항암약물들에 의한 DNA 손상,[4, 5] 또는 IL-3, erythropoietin과 같은 생존 신호를 전달하는 cytokine의 결핍 등에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.[6] 이처럼 세포고사를 유발하는 원인들과 초기 반응들은 다양하지만, 세포고사가 실행되는 단계에서는 caspase 계열의 단백분해효소들이 주된 역할을 한다. Caspase가 활성화되는 경로는 세포사망수용체에 ligand가 결합하여 접합단백질(adaptor protein)인 FADD, TRADD 등이 결합하고[7] 이러한 반응에 의해 caspase-8 (FLICE)의 활성화를 시작으로 다른 caspase들이 단계적으로 활성화되는 것과,[8] 여러 가지 자극들에 의해 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 분비되면 접합단백질인 Apaf-1이 결합하여 caspase-9이 활성화되는 것 등이 알려져 있으며, 최종적으로는 caspase-3가 활성화되어서 세포고사가 유도된다.[1, 2, 4, 9] poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)는 DNA 손상을 복구하는 효소로서 apoptotic endonuclease를 억제하는 작용을 하지만,[10] 세포고사가 발생하면 caspase-3에 의해서 113 kD의 단백질이 89 kD과 24 kD으로

나누어져서 기능이 소실된다.[2, 11~13] 그러므로 caspase-3가 활성화되고 이에 의하여 PARP가 분해되는 것을 확인함으로써 세포고사의 발생 및 정도를 알 수가 있다. PARP 외에 DNA-PK, protein kinase Cδ, protein kinase Cθ 등도 caspase-3에 의하여 기능의 변화가 발생된다.[14~17]

방사선 손상을 감소하기 위한 보호제로 sulfhydryl기를 가진 아미노산들이 많이 연구되었는데, 이러한 sulfhydryl기 화합물들은 방사선에 의해 발생되는 유리기(free radical)가 산소와 반응하여 DNA 손상을 유발하기 전에 산소와 경쟁적으로 작용하여 유리기를 제거함으로써 방사선 보호효과를 갖는다. sulfhydryl기 방사선보호제들 중에서는 thiolamine이 가장 활성도가 높고, 이에는 cysteine, cysteamine, glutathione, WR-2721 등이 포함되는데, 생체 내에서 thiolamine은 종양조직에 비하여 정상조직으로의 흡수 및 분포가 항진되어 있어서 방사선에 의한 정상조직의 손상은 억제하지만 종양의 치료효과에는 부정적인 영향을 미치지 않는다.[18] 지금까지는 thiolamine이 방사선에 의한 유사분열사를 억제하여 방사선 보호효과를 갖는 것으로 알려져 왔으나, 방사선에 민감한 세포들에서는 세포 사망 중에서 유사분열사보다 세포고사의 비중이 높으므로 이에 대한 연구가 필요하다.

이 연구에서는 방사선에 의한 세포고사와 세포사망수용체의 활성화에 의한 세포고사와의 연관성을 알아보기 위하여 HL-60 세포주를 대상으로 방사선조사 후에 caspase-8의 활성도를 측정하였고, 방사선보호제의 하나인 cysteamine (β-mercaptoethylamine)이 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 방사선조사 전에 cysteamine을 처치한 다음, 방사선조사 후의 생존 세포 수를 측정하였고 세포고사의 실행 단백질인 caspase-3의 발현 및 활성도와 caspase-3가 활성화되어 생성되는 PARP 분해산물의 발현을 측정하여 비교하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

사람의 promyelocytic leukemia cell에서 유래된 HL-60 세포주를 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 RPMI 1640 세포배양액을 사용하여 37℃, 5% CO_2 환경에서 배양하였다.

2. 방사선조사 및 cysteamine 처치

실험군을 아무런 처치를 하지않은 대조군과 방사선조사군, cysteamine 전처치군(1 mM, 10 mM)으로 나누었으며, 6 MV 선형가속기를 이용하여 선원축간거리를 100 cm로 유지하고 분당 500 cGy의 선량율로 위, 아래 방향으로 일회에 10 Gy의 방사선을 조사하였다. 균일한 방사선량의 분포를 위하여 배양용기의 위, 아래에 5 cm씩 조직등가물질을 놓았다. Cysteamine은 방사선조사 1시간 전에 처치하였다.

3. 세포 생존능

방사선조사 후 1.5, 3, 6, 24시간에 각 실험군의 세포를 0.4% trypan blue와 1:1로 섞은 후 혈구계(hemocytometer)에 넣고 1분 후 생존 세포 수를 세어 비교하였다.

4. Caspase-8 및 caspase-3의 활성도 측정

방사선조사로 세포고사가 유발된 세포(10^6~10^7)를 1,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 발생한 pellet을 50~500 μL의 차가운 cell lysis buffer로 재부유시킨 다음 얼음에 10분간 두었다. 10000×g로 1분간 원심분리하여 상층액을 새 시험관으로 옮긴 후 얼음에 두었다. 단백질 함량을 측정한 후, 50 μL cell lysis buffer에 100~200 μg의 단백질이 포함되도록 희석하고 10 mM DTT가 함유된 2x reaction buffer를 50 μL 첨가하였다. Caspase-8 활성도 측정을 위해서는 5 μL의 4 mM IETD-pNA 기질을 첨가하였고 caspase-3의 경우에는 4 mM DEVD-pNA 기질을 첨가하여 37℃에 1~2시간 반응시킨 후 400 또는 405 nm에서 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

5. Western blot 법

세포고사와 관련이 있는 caspase-3, PARP의 변화를 관찰하기 위하여 방사선조사 후에 SDS-PAGE로 전기영동을 하고 Western blot 법을 시행하였다. 먼저 proteinase inhibitor cocktail을 함유한 lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시킨 후, 원심분리하고 상층액을 취하여 BioRad사의 단백질 정량 kit를 이용하여 정량하였다. SDS-PAGE를 이용하여 단백질들을 분리하고 nitrocellulose 종이로 electrotransfer하여 5% blotto 용액에서 진탕하였다. 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology)가 함유된 용액에서 2시간 반응시킨 후, TBS-T 용액으로 세척하고 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology)가 함유된 용액에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 다시 TBS-T 용액으로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham)를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다.

6. 통계 분석

방사선조사 전후의 caspase-8 활성도의 변화를 분석하고, 방사선조사 및 cysteamine 전처치에 의한 생존 세포 수와 caspase-3 활성도의 변화를 비교하기 위하여 각 실험군들 사이에 paired T-test를 하였다.

결 과

1. Caspase-8의 활성도

세포고사의 경로를 알아보기 위하여 측정한 caspase-8의 활성도는 대조군과 방사선조사군 사이에 차이가 없었고, 특히 방사선조사에 의해 생존 세포 수의 감소가 관찰되었던 6시간 및 24 시간에서도 현저한 변화는 없었다(Fig. 1, $p>0.05$).

2. 세포 생존능

방사선조사하기 전에 1.68×10^6/mL이던 세포 수가 대조군에서는 24시간 후에 1.73×10^6/mL로 다소 증가되었으나, 방사선조사군에서는 방사선조사 6시간 후부터 감소가 관찰되어 24시간에는 1.50×10^6/mL로 감소되었다($p>0.05$). 1 mM cysteamine을 전처치한 실험군에서는 세포 수가 감소되지 않고 대조군과 비슷하게 유지된 반면, 10 mM cysteamine 전처치군에서는 방사선조사 3시간 후부터 세포 수의 감소가 관찰되었고 6시간 후 부터는 급격히 감소되는 경향이 관찰되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Fig. 2, $p>0.05$).

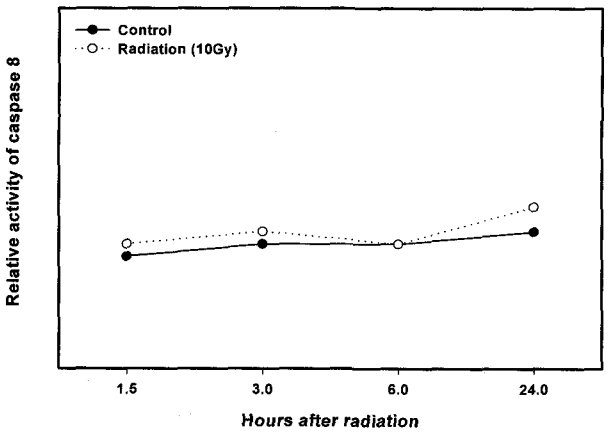

Fig. 1. The levels of caspase-8 activities in control and irradiated HL-60 cells.

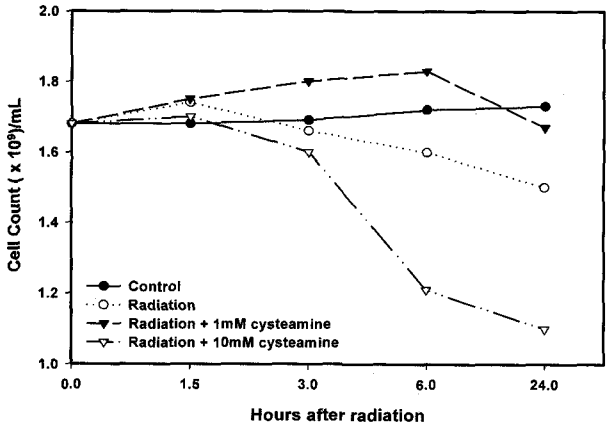

Fig. 2. The effects of cysteamines (1 mM, 10 mM) on the viable cell numbers of X-ray irradiated HL-60 cells cells (6 MV, 10 Gy). Control group was treated neither irradiation nor cysteamine. Cysteamine was administered 1 hour prior to irradiation.

3. Caspase-3의 발현과 활성도 및 PARP 분해산물의 생성

Cysteamine이 방사선에 의한 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 caspase-3와 PARP를 측정하였는데, 방사선조사 후 6시간에 측정한 caspase-3의 발현 정도는 대조군과 방사선조사군 사이에 뚜렷한 차이가 없었다(Fig. 3). 그러나 caspase-3의 세포내 활성도는 방사선조사 6시간 후부터 증가가 관찰되었고($p>0.05$), 이러한 활성도의 증가는 1 mM cysteamine 전처치에 의해 억제되는 경향을 보였다(Fig. 4, $p>0.05$). 세포고사가 발생할 때에 caspase-3가 활성화되어 생

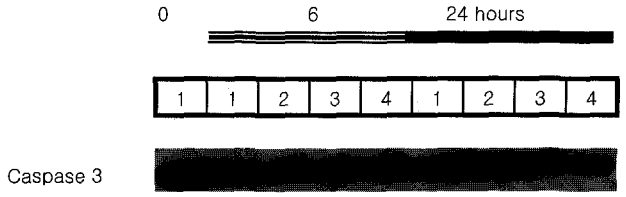

Fig. 3. Western blot analysis of caspase-3 proteins in HL-60 cells. Lane 1 : Control, lane 2 : 10 Gy irradiation, lane 3 : 1 mM cysteamine + 10 Gy irradiation, lane 4 : 10 mM cysteamine + 10 Gy irradiation.

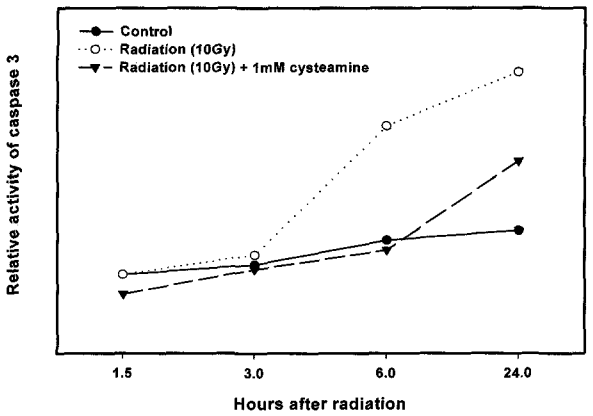

Fig. 4. The level of caspase-3 activities in HL-60 cells.

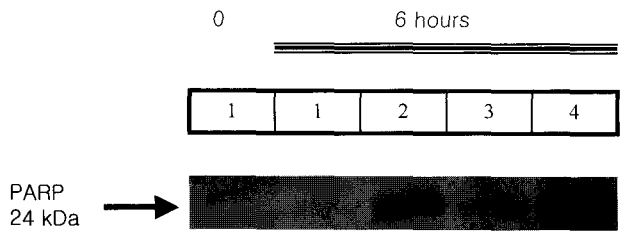

Fig. 5. Western blot analysis of PARP proteins in HL-60 cells. Lane 1 : control, lane 2 : 10 Gy irradiation, lane 3 : 1 mM cysteamine + 10 Gy irradiation, lone 4 : 10 mM cysteamine + 10 Gy irradiation.

성되는 PARP 분해산물의 발현을 방사선조사 6시간 후에 측정한 결과, 24 Kd의 PARP 분해산물이 대조군에서는 발현되지 않았으나 방사선조사군에서 발현되어서, 방사선조사에 의해 세포고사가 발생하였음을 알 수 있었고, PARP 분해산물의 발현이 방사선조사군에 비하여 1 mM cysteamine 전처치군에서는 다소 감소되는 양상을 보였고, 10 mM cysteamine 전처치군에서는 오히려 더 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 5).

고안 및 결론

Caspase-8은 세포사망수용체의 활성화에 의한 세포고사의 발생과 관련이 있는데, 세포의 종류에 따라서는 세포사망수용체와는 무관하게 방사선에 의해서도 활성화된다고 한다.[19] Caspase-8이 결핍된 세포에서는 세포사망수용체에 의한 세포고사 유도에 내성이 관찰되었고, caspase-8을 발현시켰을 경우 세포사망수용체에 의한 세포고사가 다시 유도되었다는 보고도 있으며,[20] caspase-8의 억제가 세포사망수용체에 의한 세포고사는 감소시키지만 약물이나 방사선에 의한 세포고사의 발생에는 영향을 주지 못하였다는 보고도 있었다.[21~23] 이 연구에서도 caspase-8의 활성도가 방사선조사에 의하여 변화되지 않았으므로, caspase-8은 방사선에 의한 세포고사의 발생에는 주된 역할을 하지 않는 것으로 생각되며, 방사선에 의해 발생하는 세포고사는 세포사망수용체의 활성화와는 관련이 없는 것으로 생각된다.

활성산화물(reactive oxygen intermediate)은 일련의 반응을 거쳐서 세포고사를 유발하고, 또한 항산화제제(antioxidant)에 의해 활성산화물이 제거되거나 중화되면 세포고사가 억제되므로 활성산소 자극이 세포고사를 일으키는 중요한 매개체이다.[24] 자외선이나 약물 등에 의해 발생하는 세포고사도 여러 가지 항산화제제에 의해 감소된다는 보고도 있다. Cysteamine은 sulfhydryl기를 가지고 있는 aminothiol계 방사선 보호제로서 방사선조사 시에 발생되는 유리기가 산소와 결합하여 활성산화물이 생성되는 것을 억제하여서 방사선 보호효과를 가지는 항산화제제의 일종이며, 그 농도가 1 mM에 이를 때 자외선과 과산화수소수에 의한 세포고사의 발생을 가장 현저하게 억제하였다고 한다.[25] 이 연구에서도 통계적으로 유의하지는 않았지만 방사선조사 후에 생존 세포 수의 감소가 관찰되었는데, 1 mM cysteamine 전처치군에서는 세포수가 감소되지 않고 대조군과 비슷하게 유지되어서, 1 mM cysteamine 전처치는 방사선조사에 의한 세포의 사망을 억제하는 경향이 있는 것으로 생각된다.

여러 연구들에서 방사선조사 후 세포고사가 발생할 때에 caspase-3가 활성화되고, caspase-3의 억제제를 투여하면 세포고사가 감소됨을 보고하고 있으므로, 방사선에 의한 세포고사의 발생에서는 caspase-3가 중요한 역할을 한다.[26, 27] 또한 caspase-3가 세포고사의 최종 실행효소라고 인지되고 있고 caspase-3가 활성화되면 PARP의 파괴가 발생된다고 알려져 있으므로, 여러 인자들에 의해 발생하는 세포의 사망이 세포고사에 의한 것인지는 caspase-3의 활성도와 PARP의 파괴를 조사함으로써 유추할 수 있다. 이 연구에서는 caspase-3의 발현과 활성도, PARP 분해산물의 발현 정도를 측정하였다. 세포질 내에 존재하는 caspase-3의 발현 정도는 방사선조사에 의하여 세포의 사망이 발생되었음에도 불구하고 대조군과 비교하여 뚜렷한 차이가 없었지만, caspase-3의 활성도는 방사선조사 후에 증가되는 양상이 관찰되었고, 대조군에서는 발현되지 않았던 PARP 분해산물이 방사선조사 후에 발현되어서, 방사선조사에 의한 세포의 사망이 세포고사에 의한 것임을 알 수 있었다. 1 mM cysteamine 전처치군에서는 방사선조사군에 비하여 caspase-3 활성도의 증가가 감소되는 경향이었고($p>0.05$), PARP 분해산물의 발현도 적게 관찰되었다. 방사선조사 후에 관찰되었던 생존 세포 수의 감소와 caspase-3 활성도의 증가가 통계적인 유의성은 없었지만 1 mM cysteamine 전처치에 의해 억제되는 것이 관찰되었고, 방사선조사 후에 발현되었던 PARP 분해산물의 생성도 1 mM cysteamine 전처치에 의해 감소되는 것이 관찰되었음으로, 1 mM cysteamine 전처치가 방사선에 의한 세포고사의 발생을 억제하는 경향이 있음을 알 수 있었다. 그러나 cysteamine 농도가 1 mM을 초과하는 경우에는 세포고사가 유발된다는 보고가 있는데,[25, 28] 이러한 현상은 이 연구의 예비실험에서 고농도의 cysteamine 단독 투여로 세포독성이 발생됨이 관찰되었고, 10 mM cysteamine 전처치군에서 방사선조사군보다 세포 수가 감소되었고($p>0.05$) PARP 분해산물의 발현도 증가되었으므로, 10 mM cysteamine 전처치는 오히려 방사선에 의한 세포고사의 발생을 항진시키는 경향이 있다고 생각된다.

이상의 결과들을 종합하면, 방사선에 의한 세포고사는 세포사망수용체에 의한 caspase-8의 활성화와는 다른 경로를 거치는 것으로 생각된다. 그리고 방사선조사에 의한 생존 세포수의 감소, caspase-3 활성도의 증가 및 PARP 분해산물의 발현이 1 mM cysteamine 전처치에 의해 일관되게 억제되는 양상이 관찰되었음으로, 1 mM cysteamine이 방사선에 의한 세포고사의 발생을 억제하는 경향이 있다고 생각되고, 따라서 thiolamine 계통의 방사선보호제는 기존에 알고있는 유사분열사 뿐만 아니라 세포고사를 억제하여서 방사선 보호효과를 갖는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. **Hasegawa J, Kamada S, Kamiike W, et al.** Involvement of CPP32/Yama(-like) protease in Fas-mediated apoptosis. Cancer Res 1996;56:1713-1718
2. **Schlegel J, Peters I, Orrenius S, et al.** CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in a Fas-mediated apoptosis. J Biol Chem 1996;271: 1841-1844
3. **Laster SM, Wood JG, Gooding LR.** Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic foams of cell lysis. J Immunol 1988;141:2629-2634
4. **Datta R, Banach D, Kojima H, et al.** Activation of the cpp32 protease in apoptosis induced by 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and other DNA-damaging agents. Blood 1996;88:1936-1943
5. **Sellins KS, Cohen JJ.** Gene induction by γ-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. J Immunol 1987; 139:3199-3206
6. **Kataoka S, Tsuruo T.** Physician Education : Apoptosis. Oncologist 1996;1:399-401
7. **Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, et al.** FADD/MORT1 is a common mediator of CD95(Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. J Biol Chem 1996;271:4961-4965
8. **Medema JP, Acaffidi C, Kischkel FC, et al.** FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex(DISC). EMBO J 1997;16:2794-2804
9. **Martin SJ, Amarante-Mendes GP, Shi L, et al.** The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. EMBO J 1996;15:2407-2416
10. **Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, et al.** posttranslational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. Trends Biochem Sci 1995;20:405-411
11. **Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, et al.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. Nature 1995;376:37-43
12. **Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, et al.** Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 1994;371:346-347
13. **Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, et al.** Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase : an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res 1993;53:3976-3985
14. **Datta R, Kojima H, Yoshida K, et al.** Caspase-3 mediated cleavage of protein kinase Cθ in induction of apoptosis. J Biol Chem 1997;272:20317-20320
15. **Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong T, et al.** Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair : a fundamental principle of apoptotic death. J Exp Med 1996;183:1957-1964
16. **Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, et al.** Proteolytic activation of protein kinase Cδ by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. J Exp Med 1996; 184:2399-2404
17. **Emoto Y, Manome G, Meinhardt G, et al.** Proteolytic activation of protein kinase Cδ by an ICE-like protease in apoptotic cell. EMBO J 1995;14:6148-6156
18. **Hall EJ.** Radioprotectors. In : Hall EJ, eds. Radiobiology for the Radiologist. 4th ed. Philadelphia, PA : Lippincott Co. 1994: 183-190
19. **Belka C, Heinrich V, Marini P, et al.** Ionizing radiation and the activation of caspase-8 in highly apoptosis-sensitive lymphoma cells. Int J Radiat Biol 1999;75:1257-1264
20. **Juo P, Kuo CJ, Yuan J, et al.** Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. Curr Biol 1998;8:1001-1008
21. **Boesen-de Cock JG, Tepper AD, de Vries E, et al.** Common regulation of apoptosis signaling induced by CD95 and the DNA-damaging stimuli etoposide and gammaradiation downstream from caspase-8 activation. J Biol Chem 1999;274:14255-14261
22. **Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, et al.** Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. J Clin Invest 1999;103:971-978
23. **Kataoka T, Schroter M, Hahne M, et al.** FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. J Immunol 1998;161:3936-3942
24. **Buttke TM, Sandstrom PA.** Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol Today 1994;15:7-10
25. **Verhaegen S, McGowan AJ, Brophy AR, et al.** Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 keukemia cell line. Biochem Pharmacol 1995;50:1021-1029
26. **Kurihara H, Torigoe S, Omura M, et al.** DNA fragmentation induced by a cytoplasmic extract from irradiated cells. Radiat Res 1998;150:269-274
27. **Yu Y, Little JB.** p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis

in human lymphoblast cell line. Cancer Res 1998;58:4277-4281

28. **Warters RL, Roberts JC, Wilmore BH, et al.** Modulation of radiation-induced apoptosis by thiolamines. Int J Radiat Biol 1997;72:439-448

Abstract

The Effects of Cysteamine on the Radiation-Induced Apoptosis

Young Min Choi, M.D.*, Chang Gyo Park, M.D.†, Heung Lae Cho, M.D.*
Hyung Sik Lee, M.D.‡ and Won Joo Hur, M.D.†

*Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Inje University, Pusan,
†Department of Pharmacology, College of Medicine, Konyang University, Nonsan,
‡Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Dong-A university, Pusan, Korea

Purpose : To investigate the pathways of radiation induced apoptosis and the effect of cysteamine (β-mercaptoethylamine), as a radioprotector, on it.

Materials and Methods : HL-60 cells were assigned to control, irradiated, and cysteamine (1 mM, 10 mM) pretreated groups. Irradiation was given in a single fraction of 10 Gy (6 MV x-ray) and cysteamine was administered 1 hour before irradiation. The activities of caspase-8 were measured in control and irradiated group to evaluate its relation to the radiation induced apoptosis. To evaluate the role of cysteamine in radiation induced apoptosis, the number of viable cells, the expression and activity of caspase-3, and the expression of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) were measured and compared after irradiating the HL-60 cells with cysteamine pretreatment or not.

Results : The intracellular caspase-8 activity, known to be related to the death receptor induced apoptosis, was not affected by irradiation($p>0.05$). The number of viable cells began to decrease from 6 hours after irradiation ($p>0.05$), but the number of viable cells in 1 mM cysteamine pretreated group was not decreased after irradiation and was similar to those in the control group. In caspase-3 analyses, known as apoptosis executioner, its expression was not different but its activity was increased by irradiation($p>0.05$). However, this increase of activity was suppressed by the pretreatment of 1 mM cysteamine. The cleavage of PARP, thought to be resulted from caspase-3 activation, occurred after irradiation, which was attenuated by the pretreatment of 1 mM cysteamine.

Conclusion : These results show that radiation induced apoptotic process is somewhat different from death receptor induced one and the pretreatment of 1 mM cysteamine has a tendency to decrease the radiation-induced apoptosis in HL-60 cells.

Key Words : Radiation, Apoptosis, Cysteamine