

K562 세포주에서 Genistein에 의해 억제되는 Radiation-induced Apoptosis의 조절 유전자

동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 의과학연구소*

정수진* · 진영희* · 유여진* · 도창호* · 정민호* · 허기영* · 배혜란*
양광모 · 문창우 · 오신근 · 허원주 · 이형식

목적 : K562 세포를 대상으로 PTK inhibitor (herbimycinA와 genistein)에 의한 방사선 유도 apoptosis의 변화에 따른 관련 유전자를 탐색하고자 하였다.

대상 및 방법 : K562 세포는 2×10^5 cells/mL의 비율로 준비하여 대수증식기로 성장한 세포를 각각의 실험조건에 따라 처리하여 사용하였다. 방사선 조사는 6-MV X-Ray 10 Gy (Clinac 1800C, Varian, USA)를 200~300 cGy/min의 선량율로 상온에서 일정하게 조사하였다. Herbimycin A (HMA, Calbiochem, UK)와 genistein (Calbiochem, UK)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, UK)에 녹여서 각각 1 mM과 10 mM의 농축용액으로 조제한 각각 250 nM과 25 μ M의 최종농도로 처리하였다. 내성 변화의 조절에 관여하는 유전자를 찾고자 PCR-select cDNA subtractive hybridization을 실시하여 128개의 차별 발현되는 clones을 재선별하였다. DNA sequencing을 통하여 염기서열을 분석하였으며, GenBank database를 이용하여 이미 밝혀진 유전자들과의 상동성을 비교하였다. 상동성을 갖는 clone을 확인하여 이를 probe로 사용하여 방사선 단독조사한 실험군과 방사선과 HMA 또는 genistein을 동시 처리한 실험군들간의 mRNA 발현의 차이를 Northern hybridization을 통하여 확인하였다.

결과 : homo sapiens Smad6 유전자와 95%의 상동성을 갖는 clone을 확인하였다. 이를 probe로 사용하여 방사선 단독 조사한 실험군과 방사선과 HMA 또는 genistein을 동시 처리한 실험군들간의 mRNA 발현의 차이를 비교 분석한 결과, 방사선과 genistein을 동시 처리한 실험군의 mRNA 발현이 방사선 단독 조사한 실험군과 방사선과 HMA를 처리한 실험군들에 비하여 현저히 높았다.

결론 : Smad6와 방사선에 의해 유도되는 apoptosis의 억제에 관한 연관성을 보고한 문헌은 없으나, Smad6가 일부 세포에서 apoptosis를 억제한다는 보고들과, 본 연구에서 관찰한 genistein에 의한 방사선에 의해 유도되는 apoptosis의 억제에서 그 발현이 두드러지게 증가한 점 등을 미루어 보아 방사선에 의하여 유도된 apoptosis의 억제 및 방사선 내성의 조절에도 관여할 것으로 생각된다.

핵심용어 : 방사선, 아포토시스, K562, PTK 억제약물, Smad6

서 론

본 연구자들은 방사선에 의한 apoptosis의 유도에 비교적 저항성을 가진 세포로 알려진 K562 세포를 대상으로, 방사선에 의한 apoptosis 유도 기전과 저항성을 극복하기 위한 연구에 많은 관심을 가지고 있다. 그 일환으로 protein tyrosine kinase (PTK) 억제제에 주목하여, 연구를 진행 중 herbimycin A (HMA)와 genistein의 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에

대한 연구결과를 관찰하고 보고하였다.¹⁾ HMA는 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 활성화시키는 반면, genistein은 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 억제하였다. 본 연구는 PTK 억제제에 의해 변화되는 방사선에 의한 apoptosis에 관련된 유전자를 subtractive hybridization을 이용하여 탐색하고자 하였다.

PCR-select cDNA subtraction은 서로 다른 두 종류의 조직 또는 세포에서 서로 다르게 발현되는 유전자를 선택적으로 탐지할 수 있는 유용한 방법으로, 세포의 분화단계에서 중요한 역할을 하는 유전자나 종양 세포 등에서 특이적으로 발현되는 유전자를 클로닝하는데 효과적으로 이용되고 있다. 이 방법은 특이하게 발현되는 유전자를 증폭함에 있어서 suppression PCR을 이용하여 증폭함으로써 수가 적은 전사체의 획득 가능성을 매우 증가시킬 뿐 아니라, 전형적인 sub-

이 논문은 1999년도 동아대학교 학술 연구 조성비에 의하여 연구되었음.

이 논문은 2001년 3월 5일 접수하여 2001년 6월 8일 채택되었음.

책임 저자: 이형식, 동아대학교 의과대학 치료방사선과학교실

Tel: 051)240-5380 Fax: 051)254-5889

E-mail: hyslee@daunet.donga.ac.kr

traction 방법의 기술적인 제한을 극복할 수 있다고 판단하였다.^{2,3)}

대상 및 방법

1. 세포배양, 방사선 및 약물처리

K562 (ATCC CCL 243)는 American type of culture collection으로부터 구입하여 사용하였으며, 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA)과 penicillin (100 units/mL)/streptomycin (100 µg/mL) (Gibco BRL, USA)이 포함된 RPMI 1640 배양배지 (Gibco BRL, USA)로 사용하여, 37°C, 5% CO₂ 가 공급된 조건에서 배양하였다. 실험에 사용된 세포는 2×10⁵ cells/mL의 비율로 준비하여 대수증식기로 성장한 세포를 각각의 실험조건에 따라 처리하여 24시간 배양하였다. 방사선 조사는 6-MV X-Ray (Clinac 1800C, Varian, USA)을 이용하여 200-300 cGy/min의 선량율로 상온에서 10 Gy 조사하였다. herbimycin A (HMA, Calbiochem, UK)와 genistein (Calbiochem, UK)은 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, UK)에 녹여서 각각 1 mM 과 10 mM의 농축용액으로 조제한 각각 250 nM과 25 µM의 최종농도로 방사선조사 후 즉시 처리하였다.

2. Subtraction hybridization

PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 실시하였다.

1) Adaptor 및 Primer

본 실험에 사용된 oligonucleotide의 염기서열은 다음과 같다.

cDNA synthesis primer ; 5'-TTTGTACAAGCTT30N1N-3'

Adaptor1;

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCG GGCAGGT-3' and 3'-GGCCCGTCCA-5'

Adaptor2R;

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCC GAGGT-3' and 3'-GCCGGCTCCA-5'

PCR primer1; 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

Nested PCR primer1; 5'-TCGAGCGGCCGCCCCGGCAGGT-3'

Nested PCR primer2R; 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

2) cDNA 합성

(1) RNA 분리

Total RNA의 분리를 위하여 Ultraspec-II reagent (Biotec Lab, USA)를 세포침전물에 첨가하였으며, RNATack Resin에

결합한 RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma, UK)가 처리된 증류수로 용출시켜 분리하였다. 분리된 total RNA로 부터 PolyTract mRNA Isolation system (Promega, USA)를 이용하여 mRNA를 분리하였는데, biotin-labelled oligo (dT) 20 probe 와 결합한 mRNA를 streptavidin magnetic particles과 반응하여 분리하였다.

(2) 이중가닥 cDNA 합성

세포에 방사선만을 조사한 실험군을 driver로 방사선 조사 후 즉시 genistein을 처리한 실험군을 tester로 설정하였다. 각 조건별로 처리한 세포를 24시간 배양한 다음 분리한 2 µg의 mRNA에 대해 10 µM의 cDNA synthesis primer를 첨가하고, MJ Research PAC-150 Mini Cycler에서 70°C, 2분간 반응하였다. avian myeloblastosis virus (AMV)-Reverse Transcriptase (RT)를 혼합하여 42°C로 90분간 반응하고, 20×second strand enzyme cocktail을 첨가하여 16°C에서 2시간 동안 반응한 후 T4 DNA polymerase (6 units)를 첨가하였다. 16°C에서 30분간 더 반응한 후 20×EDTA/glycogen을 첨가하고 합성을 종결하여 phenol extraction 방법으로 정제하였다. 일부(2.5 µL)를 1% agarose gel에 전기 영동하여 합성정도를 확인하였으며, 나머지는 제한 효소 Rsa I로 절단하여, tester cDNA는 Adaptor 1과 Adaptor 2R과 결합시키기 위하여 T4 DNA ligase와 16°C에서 밤샘 반응하였다.

3) Hybridization

두 개의 다른 tube에 3 µg의 driver cDNA를 첨가하고, 100 ng의 Adaptor 1-ligated tester와 Adaptor 2R-ligated tester를 hybridization buffer에 재현탁하여, 98°C에서 90 초간 변성하여 68°C에서 8시간 일차 hybridization를 실시하였다. 이를 68°C로 유지하면서 새로운 tube에 1.5 µg의 driver cDNA를 hybridization buffer와 혼합하여, 98°C, 90 초간 변성시켜 만든 새로운 driver cDNA를 두 개의 일차 hybridization tube에 첨가하였다. 68°C에서 20시간 반응 후, 200 µL의 희석 buffer를 첨가하고 다시 7분간 반응한 다음 -20°C에 보관하여 사용하였다.

4) Selective PCR amplification

1차 PCR 반응은 이차 hybridization 산물과 10 µM PCR primer 1을 이용하여 75°C, 5분간 반응 후 95°C, 1분; 62°C, 1분; 72°C, 2분, 30 cycles, 72°C, 10분간 1 cycle을 실시하였다. 이차 PCR은 10배 희석한 일차 PCR 반응물과 10 µM nested PCR primer 1과 2R을 사용하여, 94°C, 1분; 68°C, 1분; 72°C, 2분, 20 cycles과 72°C, 10분간 1 cycle을 실시하였다. PCR 반응은 Perkin-Elmer 2400 PCR machine (Perkin-Elmer, USA)를 사용하였으며, 2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

3. DNA 클로닝

E. coli XL1-Blue MRF'를 숙주세포로 사용하였으며, 이차 PCR 산물을 pGEM-T easy vector system (Promega, USA)을 이용하여, T4 DNA ligase, 2×rapid T4 DNA ligase buffer 그리고 1/10 부피의 50% PEG (polyethylene glycol) 8000을 넣고 4°C에서 16시간 반응하였다. 형질전환 후 ampicillin (10 µg/mL)이 포함된 LB (Luria-Bertani) 한천배지에 흰색 집락을 형성한 것만을 선별하였다.

4. PCR-selected dot hybridization

PCR-Selected Differential Screening Kit (Clontech, USA)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 실시하였다. DNA 클로닝으로 얻어진 각각의 clones을 PCR 반응을 위한 주형으로 사용하여, 93°C, 30초간 가열한 후 95°C, 10초; 68°C, 3분. 28 cycles을 실시하였다. 각각의 PCR 산물을 96-well plate에서 동량의 0.6 N NaOH 용액과 혼합하여 DNA를 변성시켰다. Hybond N-Plus Membrane (Amersham, UK)을 Bio-Dot Micro-filtration Apparatus (Bio-Rad, USA)에 장착하고, 각각의 well에 변성시킨 DNA를 두 부분으로 나누어 첨가하였다. driver와 tester의 cDNA를 합성한 다음 random primed DNA labelling 방법을 이용하여 표지화된 probe와 membrane을 68°C에서 hybridization을 실시하였다. X-ray film으로 -80°C에서 24시간 감광하여, Fuji FPM 1200 방사능 자동현상기로 현상하여 tester cDNA에만 차별 발현되는 clones를 선별하였다.

5. DNA sequencing

선별된 clones에서 plasmid DNA를 Wizard Plus SV Mini-preps DNA Purification System (Promega, USA)를 이용하여 분리하고, 20% PEG 6000과 2.5 M NaOH을 사용하여 농축하였다. 다음 염기서열의 primers를 이용하여 DNA 염기서열분석을 실시하였다.

ALFred M13-40 primer

5'-cyanine-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3'

ALFred MB Reverse primer

5'-cyanine-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

염기서열의 분석을 위한 시료의 반응은 ALPexpress AutoCycle Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, UK)을 이용하였으며, 반응혼합물을 95°C, 2분간 가열하여, 95°C, 40초; 55°C, 40초; 72°C, 1분, 25 cycles, 72°C, 10분간 PCR 반응을 실시하였다. 5.5% Hydrolinker Long Ranger gel (FMC, USA)에 loading 하여, ALP Express AutoCycle Sequencing System (Pharmacia Biotech, UK)에서 약 13시간 동안 전기영동하고 결과를 분석

하였다. 분석된 DNA의 염기서열은 EMBL (European Molecular Biology laboratory)과 GenBank databases에서 조사하여 그 상동성을 비교하였다.

6. Northern hybridization

30 µg의 total RNA를 1.5% agarose-formaldehyde gel 전기영동한 다음 Sambrook 등¹⁴⁾의 방법에 따라 Hybond N-Plus Membrane (Amersham, UK)으로 capillary 방법에 의하여 이동하여, membrane을 Spectrolinker XL-1000 UV crosslinker (Spectronics, USA)에서 고정하였다. probe로 사용할 clone에서 plasmid DNA를 분리하여, PCR을 이용하여 삽입된 DNA 부분만을 증폭하였다. 1.5% agarose gel 전기영동하여 Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)로 정제한 다음, rediprime Random Primer Labelling Kit (Amersham, UK)로 표지화하여, RNA가 이동된 membrane과 다음의 방법으로 hybridization을 실시하였다. formamide (Sigma, UK) 50 mL과 mixed-bed resin (Bio-Rad, USA) 5 g을 혼합하여 4°C에서 4시간 동안 가볍게 흔들어서 deionized formamide를 제조한 후 hybridization buffer에 첨가하였다. membrane을 hybridization buffer에 넣고 42°C에서 2시간 동안 prehybridization을 실시하였다. 새로운 buffer로 교체하고 [α -³²P] dCTP labelled-cDNA probe를 95°C에서 5분간 가열한 다음 첨가하여 42°C에서 밤샘 반응하여 hybridization을 실시하였다. membrane 세척은 42°C에서 2×SSC/0.1% SDS, 1×SSC/0.1% SDS, 마지막으로 0.1×SSC/0.1% SDS의 순서로 각각 5분씩 2회 실시하였다. X-ray film으로 -80°C에서 24시간 감광한 후 Fuji FPM 1200 방사능 자동현상기로 현상하였다.

결 과

1. Subtractive hybridization

방사선 단독 조사한 실험군을 'driver'로 방사선과 genistein을 동시 투여한 실험군을 'tester'로 설정하였다. Driver와 tester의 mRNA로부터 합성된 각각의 cDNA를 두 차례의 hybridization을 실시한 다음 각각 일차와 이차 PCR을 실시하여 PCR 산물을 획득하였다. 이를 T/A-vector에 cloning하여 218개의 흰색 집락을 선별하였고, nested PCR primer 1과 2R을 사용하여 insert를 확인하였다. PCR 산물을 dot blotting을 실시하여 124개의 차별 발현되는 clone들을 검출하였다.

2. 유전자 분석

선별된 clones의 DNA의 염기서열을 분석한 후 blast search하여 유전자들을 확인하여, homo sapiens Smad6 유전자와

* gbIAF041065.1HSSMAD6S4

Homo sapiens Smad6 protein (SMAD6) gene, exon 4 and complete cds

- Length = 1677
- Score = 339 bits (168), Expect = 2e-91
- Identities = 196/206 (95%), Gaps = 2/206 (0%)
- Strand = Plus / Plus

```
Query: 1  gtacgaccaggccgctcagcatctctacgacctacctcaggccagcggctctgctctggg 60
Sbjct: 185  gtacgaccaggccgctcagcatctctacgacctacctcaggccagcggctctgctctggg 244

Query: 61  ccagctcaacctggggcagcgcasrvgtcgggtgcgcggaacgsgcagcaagatcg-ct 119
Sbjct: 245  ccagctcaacctgggagcagcgcagcagtcgg-tcggcggaacgscagcaagatcggct 303

Query: 120  tbggcatcctgctcagcaaggagcccsacggcgtgtgggctacaacccggcgagcacc 179
Sbjct: 304  tcggcatcctgctcagcaaggagcccgacggcgtgtgggctacaacccggcgagcacc 363

Query: 180  ccatcttgtaactccccgacgctg 205
Sbjct: 364  ccatcttgtaactccccgacgctg 389
```

Fig. 1. Sequences alignment of Smad6 gene. Query: differentially expressed clone in this study, Sbjct: homo sapiens Smad6 gene.

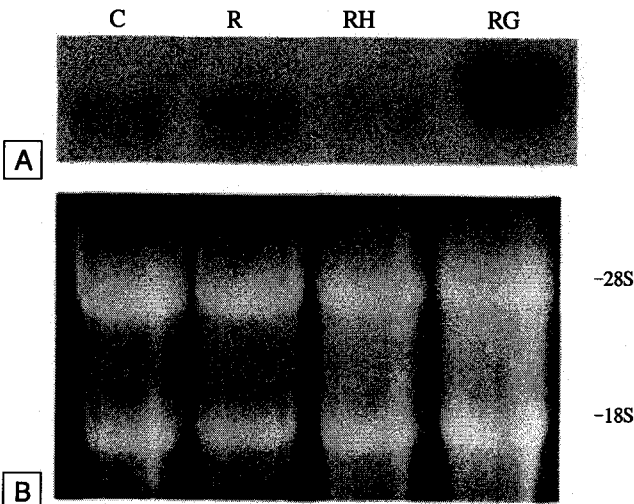


Fig. 2. Northern hybridization analysis of Smad6 gene. (A) Comparison of mRNA expression. Lane 1: untreated (C), Lane 2: 10 Gy X-ray irradiated (R; driver), Lane 3: combined treated with irradiation and 250 nM HMA (RH), Lane 4: combined treated with irradiation and 25 μM genistein (RG; tester). (B) Ethidium Bromide staining of 18S and 28S rRNA was used as a loading standard.

95%의 상동성을 나타내는 clone을 확인하였다. 상동성의 비교 결과는 Fig. 1과 같다.

3. Smad6 mRNA 발현조사

방사선과 genistein을 동시처리한 실험군의 발현이 방사선 단독 조사한 실험군과 방사선과 HMA를 처리한 실험군들에 비하여 현저히 높았다. 방사선과 HMA를 동시 처리한 세포

에서의 발현은 control과 비슷한 수준이었다(Fig. 2).

고안 및 결론

암세포의 연구에서 신호전달 및 유전자의 발현에 대한 관심이 날로 증가되고 있다. 그러나 이들의 범위는 너무 광범위하고 subtraction이나 DD-PCR을 통하여 이들을 찾아낸다는 것은 비용이나 시간이 많이 소모된다는 단점들이 있어 한계를 보인다. 본 연구에서는 방사선에 의한 apoptosis의 유도에 비교적 저항성을 가진 세포로 알려진 K562 세포를 대상으로, 방사선 저항성의 조절과 관련된 유전자를 조사하기 위하여 PCR-select cDNA subtraction 방법을 사용하였다. 이와 관련된 연구에 일반적으로 사용되는 DD-PCR법이 적은 양의 시료가 요구되고, 두 개 이상의 조건의 비교가 가능한 장점이 있으나, false positive의 위험성이 있고 재증폭이 어려우며 비특이적 발현이 많으며 시간이 많이 소요된다는 단점이 있어, 근래에는 subtractive hybridization 방법이 많이 이용되고 있는 실정이다. 전통적으로 수행되어온 subtraction의 방법은 수 차례의 hybridization을 반복해야 하는 방법상의 까다로운 단점이 있으며, 특히 유전자 발현이 미약한 경우 성공적으로 수행될 가능성이 희박하였다.^{4,5} 그러나 이러한 문제점을 해결하기 위하여 최근에는 상대적으로 발현되는 유전자 서열만을 선택적으로 증폭시키는 PCR-select cDNA subtraction 방법이 제시되고 있으며,^{2,3} 증폭과정에서 표적이 되는 유전자와 무관한 요소들이 동반되어 증폭되는 것을 막기 위하여 suppression PCR이 함께 이용되고 있다.⁶

본 연구에서는 방사선 단독 조사한 세포와 genistein을 동시처리하여 내성이 증가된 세포에 대한 subtractive hybridization을 실시하였다. 방사선을 단독 조사한 실험군을 “driver”로 genistein과 동시처리한 실험군을 “tester”로 설정하였다. 이 둘에서 합성한 cDNA를 이용하여 subtractive hybridization을 통하여 얻어진 차별 발현된 clones들에 대한 DNA sequencing을 실시하여 blast search하여 상동성을 조사하였다. 이들 중 homo sapiens의 Smad6 유전자와 95%의 상동성을 나타내는 clone이 존재하였는데, Northern hybridization을 통한 mRNA 발현의 차이를 조사함으로써 이를 검증하였다. tester cDNA는 driver에 비하여 매우 높은 발현이 관찰되었으며, 대조군으로 사용한 방사선조사와 HMA를 동시처리한 세포에서는 그 발현수준이 매우 미약하여 Smad6 유전자가 방사선 내성의 조절에 관련 혹은 동반되었을 가능성을 간접적으로 보여 주었다.

Smad6는 Smad family 단백질에 포함된 subfamily이다. Smad family는 몇몇 포유동물에서 *Drosophila Mad* 유전자와의 상동성이 보고되었으며, TGF- β /BMP (Bone Morphogenetic Protein) 신호전달의 downstream effector로서 알려져 있다.⁷⁾ 이는 8개의 subfamily들로 구성이 되는데 각각의 특이적인 기능을 갖는다. Smad 단백질들은 45~70 kDa의 분자량을 가지며 N-말단과 C-말단에서 염기서열의 높은 유사성을 갖는 두 개의 지역을 갖는다. 이들을 mothers against decapentaplegic (*mad*) homology (MH 1과 MH 2)라고 한다.⁸⁾ Smad 단백질은 사람의 조직에서 광범위하게 발견되며, 그들 중 일부는 엄격한 조절을 받는다는 것이 발견되었다.⁹⁾ Smad6은 Smad7과 함께 다른 Smad 단백질들과 구분하여 “inhibitory Smad”로 분류되는데 이로부터 그들의 기능을 예측할 수 있다. 이들은 serine/threonine kinase receptors에 안정적으로 결합하며, type I receptor에 의하여,¹⁰⁾ 또는 공통의 매개자인 Smad4와 다른 Smad subfamily의 heteromeric complex의 결합을 방해함으로써 다른 Smad subfamily들의 활성을 억제한다.¹¹⁾ 그리고 Smad6와 Smad7 mRNA는 혈관내피세포에서 shear stress에 의하여 발현이 유도된다고 한다.¹²⁾ 그러나 사람에서 Smad6와 7의 억제 기작은 서로 다른데, Smad7은 일반적인 TGF β family의 억제자로서의 기능을 갖는 반면 Smad6는 BMP의 signal을 선택적으로 억제한다.^{11, 13, 15, 16)} 예로써 다양한 폐암세포에서의 Smad6와 7의 발현 수준이 다르다는 것이다. Smad6의 구조는 다른 구성원들과는 매우 다르며, 다양한 자극원들에 의하여 mRNA 발현이 유도된다.¹⁷⁾ 최근에 보고된 SH2 단백질의 family인 SOCS/JAB/SSI가 JAK/STAT signaling 경로의 antagonist로서의 작용이 Smad6와 유사하다고 한다.^{18~20)}

Smad6의 apoptosis와 관련된 보고에서는 mouse hybridoma MH60 세포에서 apoptosis를 매개하는 BMP2 신호전달을 Smad6가 저해한다고 하였다. BMP2는 TGF 인산화를 유도하는데, Smad6는 TAK1에 직접적으로 결합하여 BMP2-induced TAK1 활성화와 p38 인산화를 억제하여 apoptosis에 대한 저항성을 나타낸다.²¹⁾ Smad1을 비롯하여 Smad2와 3은 Erk/MAPK를 통한 성장인자의 신호전달의 표적이다. Erk는 Smad1을 인산화하며 Smad1의 핵 내의 축적과 전사활성에 의존적인 BMP의 기능에 반대의 작용을 한다.²²⁾ 이에 대해서 Smad6의 작용을 상반되게 생각해 볼 수 있을 것이다. 또한 mouse B cell hybridoma HS-72 세포에서 Smad6는 hBMP-induced growth arrest와 apoptosis를 억제하는 작용을 하며, 이는 Smad6가 B lineage 세포에서 hBMP2에 의한 growth arrest와 apoptosis의 조절에 대하여 negative feedback loop에 관여한다는 것을 제시한다. 또한 Smad6는 Smad1과 5의 인산화에 대하여 BMP-induced signal을 약화시킴으로서 growth arrest와 apoptosis를 억제한다는 것이 보고되었다.²³⁾ 그러나 Smad6가 방사선에 의하여 유도된 apoptosis에 대한 저항성과 관련이 있다는 것은 아직까지 알려져 있지 않다. 본 연구의 결과에서 Smad6 mRNA의 발현이 driver에 비하여 방사선에 대한 내성이 강한 tester에서 강하게 증가한 점과 HMA를 방사선과 동시처리하여 내성이 감소된 세포에서 발현 수준이 낮았던 점들로 미루어 보아 방사선 내성과의 연관성 혹은 동반 가능성을 유추할 수 있다고 생각된다.

TGF- β 매개 신호전달은 mouse의 방사선 감수성을 증가시킨다.²⁴⁾ IL-1, TNF, IL-12, SCF (stem cell factor) 등의 cytokine의 작용이 방사선 치료에서 보호기능을 하는 반면 TGF- β 는 감수성을 향상시킨다.²⁵⁾ Smad6가 TGF- β 매개 신호전달에서 effector로 작용하는 다른 Smad 단백질들에 대하여 저해기능을 갖는 것으로 미루어보아 Smad6와 방사선 내성 및 apoptosis 내성 조절과의 관련성이 존재할 것이라 생각된다. 하지만 이러한 관련 여부 또는 동반되는 현상에 대한 규명은 현 단계에서는 단정하기 힘들며, 이를 증명하기 위한 보완실험들이 이루어져야 할 것이다. Smad6 유전자의 발현을 향상시키거나 antisense 염기서열의 사용이나 Smad6 유전자의 발현을 억제하는 약물들을 함께 사용함으로써 그 기능을 억제시킨 후 같은 실험과정을 진행함으로써 그 기능을 명확히 증명할 수 있을 것이며, 다른 방사선 보호제를 세포에 처리시 Smad6 유전자의 발현의 조사도 필요할 것으로 생각된다. 그리고 방사선 및 PTK 억제제 처리를 통한 세포의 신호전달이 Smad6의 upstream에서는 어떻게 조절되고 있는지 조사하여 가장 중심이 되는 인자를 밝혀내는 것도 추후 중

요한 연구 과제로 생각한다.

참 고 문 헌

1. 이형식, 문창우, 허원주 외. K562 백혈병 세포주에서 방사선에 의해 유도되는 Apoptosis에 미치는 PTK Inhibitors의 영향. 대한방사선종양학회지 2000;18:51-58
2. Diatchenko L, Chenchik A Siebert P. Suppression subtractive hybridization: A method of generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:6025-6030
3. Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. Anal Biochem 1996; 240:90-97
4. Duguid JR and Dinauer MC. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucl Acids Res 1990;18:2789-2792
5. Hara E, Kato T, Nakada S, Sekiya S, Oda K. Subtractive cDNA cloning using oligo (dT)30-latex and PCR: Isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. Nucl Acids Res 1991;19:7097-7104
6. Sieber PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA. An improved method for walking in uncloned genomic DNA. Nucl Acids Res 1995;23:2598-2602
7. Massague J, Hata A, Liu F. TGF β signalling through the Smad pathway. Trends Cell Biol 1997;7:187-192
8. Heldin CH, Miyazono K, Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. Nature 1997;390:465-471
9. Li M, Li J, Hoodless PA. Mothers against decapentaplegic-related protein 2 expression in avian granulosa cells is up-regulated by transforming growth factor beta during ovarian follicular development. Endocrinology 1997;138:3659-3665
10. Tsuneizumi K, Nakayama T, Kamoshida Y, Kornberg TB, Christian JL, Tabata T. Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in Drosophila wing development. Nature 1997;389:627-631
11. Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. Genes Dev 1998;12:186-197
12. Topper JN, Cai J, Qui Y et al. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:9314-9319
13. Imamura T, Takase M, Nishihara A. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. Nature 1997;389:622-626
14. Sambrook J and Russell DW. Molecular Cloning, Chapter 6. In: Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA, Argentine J, Third ed. New York, USA, 2001;6.39-6.46
15. Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A et al. Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. J Biol Chem 1998;273:25364-25370
16. Bai S, Shi X, Yang X, Cao X. Smad6 as a transcriptional corepressor. J Biol Chem 2000;275:8267-8270
17. Afrakhte M, Moren A, Jossan S et al. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. Biochem Biophys Res Commun 1998;249:505-511
18. Starr R, Willson TA, Viney EM et al. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. Nature 1997;387:917-921
19. Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature 1997;387:921-924
20. Naka T, Narazaki M, Hirata M et al. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. Nature 1997; 387:924-929
21. Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K, Taga T. BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of TASK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. J Biol Chem 2000;275(23):17647-17652
22. Kretzschmar M, Doody J, Massague J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF β family mediator Smad1. Nature 1997;389:618-622
23. Ishisaki A, Yamato K, Hashimoto S et al. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. J Biol Chem 1999;274:13637-13642
24. Vodovotz Y, Lucia MS, DeLuca AM, Mitchell JB, Kopp JB. Reduced hematopoietic function and enhanced radiosensitivity of transforming growth factor-beta1 transgenic mouse. Int J Cancer 2000;90:13-21
25. Neta R. Modulation with cytokines of radiation injury: Suggested mechanisms of action. Environ Health Perspect 1997;105 suppl.6:1463-1465

Abstract

Smad6 Gene and Suppression of Radiation-Induced Apoptosis by Genistein in K562 Cells

Soo Jin Jeong, M.S.*, Young Hee Jin, M.S.*, Yeo Jin Yoo, M.D.*,
Chang Ho Do, M.D.*, Min Ho Jeong, M.D.*, Gi Yeong Huh, M.D.*,
Hyë Ran Bae, M.D.*, Kwang Mo Yang, M.D., Chang Woo Moon, M.D.,
Sin Geun Oh, M.D., Won Joo Hur, M.D. and Hyung Sik Lee, M.D.

Department of Radiation Oncology, Institute of Medical Science*,
College of Medicine, Dong-A University, Pusan, Korea

Purpose: The genes involved on the suppression of radiation-induced apoptosis by genistein in K562 leukemia cell line was investigated.

Materials and methods: K562 cells in exponential growth phase were irradiated with a linear accelerator at room temperature. For X-ray irradiation and drug treatment, cultures were prepared at 2×10^5 cells/mL. The cells were irradiated with 10 Gy (Clinac 1800C, Varian, USA). Stock solutions of herbimycin A (HMA, Calbiochem, UK) and genistein (Calbiochem, UK) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, UK). After incubation at 37°C for 24 h, PCR-select cDNA subtractive hybridization, dot hybridization, DNA sequencing and Northern hybridization were examined.

Results: Smad6 gene was identified from the differentially expressed genes in K562 cells incubated with genistein which had been selected by PCR-select cDNA subtractive hybridization. The mRNA expression of Smad6 in K562 cells incubated with genistein was also higher than control group by Northern hybridization analysis.

Conclusion: We have shown that Smad6 involved on the suppression of radiation-induced apoptosis by genistein in K562 leukemia cell line. It is plausible that the relationship between Smad6 and the suppression of radiation-induced apoptosis is essential for treatment development based on molecular targeting designed to modify radiation-induced apoptosis.

Key Words: PTK inhibitors, Oncogene expression, Radiation-induced apoptosis, Smad6