

MCF-7 세포주에서 Glutathione S-Transferase K1 (hGSTK1) 과발현에 의한 방사선 내성의 유도

경북대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 영남대학교 의과대학 방사선종양학교실[†]

김재철* · 신세원[†]

목적 : 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포주를 대상으로 glutathione S-transferase K1 (hGSTK1) 유전자의 발현 정도 및 방사선 조사에 의한 hGSTK1 유전자의 발현 변화를 관찰하고 hGSTK1 유전자를 과발현시킴으로써 hGSTK1 이 방사선 감수성에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다.

재료 및 방법 : 사람의 모유두 세포 pBluescript phagemid cDNA library로부터 선별한 hGSTK1 cDNA를 pcDNA3.1/ Myc-His (+) vector에 결합시킨 후, 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포에 이입시켰다. hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포와 hGSTK1을 이입시킨 MCF-7 세포에 2~12 Gy의 엑스선을 조사하여 생존 분획을 비교하였다. hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포와 hGSTK1을 이입시킨 MCF-7 세포에서 방사선량, 분할조사 여부, 방사선 조사 후 경과 시간에 따른 hGSTK1 mRNA 발현의 차이를 보기 위하여 RT-PCR 분석을 시행하였다.

결과 : hGSTK1 유전자를 이입시키기 전의 MCF-7 세포보다 hGSTK1 유전자를 이입시킨 MCF-7 세포에서 생존 분획이 유의하게 높은 것으로 나타났다. hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포에서 2 Gy 생존 분획은 0.3250 ± 0.0319 였고, hGSTK1 유전자를 이입시킨 MCF-7 세포에서 2 Gy 생존 분획은 0.4125 ± 0.0325 였다 ($p < 0.05$). 그러나 RT-PCR에 의한 hGSTK1 mRNA 분석에서는 방사선량, 분할조사 여부, 방사선 조사 후 경과 시간에 따른 발현의 차이를 볼 수 없었다.

결론 : MCF-7 세포주에서 hGSTK1의 과발현은 방사선 감수성에 영향을 미쳐서 MCF-7 세포의 생존 분획을 증가시켰다고 볼 수 있으나 이에 대한 정확한 기전을 알기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

핵심용어 : Glutathione S-Transferase K1, MCF-7 세포, 유전자 이입

서 론

Glutathione S-transferase (GST)는 다양한 세포독성 물질과 glutathione (GSH)의 축합을 촉매하여 외부 독성 및 자극으로부터 세포를 보호하는 기능을 하는 효소이다. 세포질 내에 존재하는 사람과 쥐의 GST는 이중체 단백질로 구성된 효소군으로서 아미노산 배열의 상동성에 따라 α , μ , π , θ , δ 등 5개의 군으로 분류되어 왔다. 1996년에 θ 군으로 분류되어 왔던 GST13-13이 세포질 내에 있는 α , μ , π , θ , δ 등과 확연히 구분되는 특성을 가진 것으로 밝혀졌다. 쥐에서 클로닝된 이 GST는 κ 군으로 새로 분류되고 rGSTK1으로 명명되었다.¹⁾ 최근에 rGSTK1과 70%의 상동성을 보여 hGSTK1으로 추정되는 사람의 유전자가 클로닝되었다.²⁾

사람의 대장암, 난소암, 폐암, 전립선암, 유방암 등 다양한

이 논문은 2001년 8월 11일 접수하여 2001년 11월 9일 채택되었음

책임저자: 김재철, 경북대학교 의과대학 치료방사선과학교실

Tel: 053)420-5352 Fax: 053)426-3303

E-mail: jckim@knu.ac.kr

암세포에서 GST 유전자의 과발현이 보고되고 있다.^{3~7)} 또한 GSH와 GST의 활성 또는 발현 정도와 암세포의 항암제 내성과 관련이 있다는 여러 보고들이 알려져 있다.^{8~14)} 방사선 내성과 관련하여서는 폐암 세포주에서 전리방사선에 의한 손상을 제한적으로 보호한다는 보고¹⁵⁾가 있으며, 최근에는 자궁경부암 세포의 GSH 수치가 방사선치료에 대한 반응률과 관련이 있다¹⁶⁾고 하였으며, GST 발현 정도가 두경부 종양의 방사선치료 후 재발율과 관련있다¹⁷⁾는 등의 보고로, 종양의 치료에 있어서 GST가 항암제와 방사선 내성과 관련하여 매우 중요한 역할을 하는 것으로 주목받고 있다. 또한 GSH 및 GST의 활성을 조절하여 항암제 내성을 극복하려는 연구¹⁸⁾나, 폐암 세포에 GST 유전자를 이입시켜 항암제 및 방사선 감수성을 변화시키려는 연구¹⁹⁾도 있었다.

GST의 새로운 효소군의 하나로 추정되는 hGSTK1도 다른 GST 효소군과 마찬가지로 항암제 및 방사선 내성과 관련된 것으로 생각된다. 그러나 현재까지 GST 관련 연구 중 hGSTK1에 관련하여 암세포에서의 유전자 발현 정도 및 방사선 내성과의 관련성, 치료에 따른 예후와의 관련성에 관한

연구는 별로 없는 실정이다.

본 연구에서는 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포주를 대상으로 hGSTK1 유전자의 발현 정도와 방사선 조사에 의한 hGSTK1 유전자의 발현 변화를 관찰하고 hGSTK1 유전자를 과발현시킴으로써 hGSTK1이 방사선 감수성에 어떤 영향을 미치는 지를 관찰하였다.

재료 및 방법

사람의 유방암세포 MCF-7은 한국세포주은행으로부터 구입하였으며, hGSTK1 유전자가 함유된 사람의 모유두 세포 pBluescript phagemid는 기질세포유전자은행으로부터 구입하였다. hGSTK1 유전자를 과발현시키기 위한 vector로는 Invitrogen사(미국)의 pcDNA3.1/Myc-His(+) expression system을 사용하였다. 염기서열분석은 Amersham사(미국)의 DNA sequencing kit을 사용하였고, in vitro translation은 Promega사(미국)의 TNT T7 quick coupled transcription/translation system을 사용하였다. MCF-7 세포로의 hGSTK1 유전자 이입을 위해 Qiagen사(미국)의 Superfect를 이용하였다. PCR (polymerase chain reaction) 및 RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction)을 위한 hGSTK1의 primer들은 한국생공 제품을 사용하였다. 그 외의 일반 시약들은 시판 특급시약을 사용하였다.

1. hGSTK1 유전자를 함유한 pBluescript phagemid의 추출

사람의 hGSTK1 유전자는 모유두 세포 pBluescript phagemid cDNA library (Stratagene사, 미국)로부터 선별하였다. hGSTK1 유전자를 가진 E. coli로부터 hGSTK1 phagemid를 Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system (Promega 사, 미국)을 이용하여 추출하였다.

hGSTK1 유전자를 과발현시키기 위한 vector로 5.5 kb 크기의 pcDNA3.1/Myc-His(+) expression system version A (Invitrogen사, 미국)를 사용하였다. 이 vector에는 cytomegalovirus (CMV) 촉진자 부위가 있으며, CMV 촉진자 이하 부위에 hGSTK1 유전자를 결합시키면 유전자의 과발현이 유도된다.

2. hGSTK1 유전자의 PCR

hGSTK1 유전자의 증폭을 위하여 PCR을 시행하였으며, PCR 반응에서 5' primer는 T3 primer를 사용하여 pBluescript phagemid의 EcoRI 절단 부위가 포함되도록 하였고, 3' primer는 hGSTK1 유전자의 3' 부분의 종료 코돈부에 XhoI 절단 부위가 포함되도록 hGSTK1 유전자 3' 부분을 다음과 같이

변형하여 디자인하였다(CTTTAA → GAGCTC).

5' primer (5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3')

3' primer (5'-CTTACGGTCTGAGCTCCTAACGGGC-3')

hGSTK1 유전자의 염기서열에서 open reading frame의 크기는 680 bp로서²⁾ 5' primer 및 3' primer의 위치 및 크기를 고려하면 PCR product의 크기는 약 700 bp 정도로 추정되었는데, 이는 3' 부분을 변형시킨 hGSTK1 유전자의 PCR 산물의 전기영동 결과 약 700 bp 크기의 증폭된 DNA 띠와 일치하였다(Fig. 1). Wizard PCR Preps DNA purification system (Promega사, 미국)을 이용하여 PCR로 증폭시킨 DNA를 정제하였다.

3. hGSTK1 유전자와 pcDNA3.1/Myc-His(+) vector와의 결합

EcoRI 제한효소 및 XhoI 제한효소를 이용하여 hGSTK1 유전자 및 pcDNA3.1/Myc-His(+) vector의 재단을 시행하였다. Phenol extraction method를 이용하여 제한효소에 의한 반응을 마친 각각의 DNA를 추출하였다.

hGSTK1 및 pcDNA3.1/Myc-His(+)를 결합시키기 위하여 제한효소로 처리한 hGSTK1 유전자 30 fmol, pcDNA3.1/Myc-His(+) vector 10 fmol, 1 U/ μ l T4 ligase 1 μ l, 2 \times T4 rapid ligase 완충액[250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM dithiothreitol, 25% polyethylene glycol 8000] 5 μ l를 넣고 증류수로 전체 부피를 10 μ l로 맞춘 다음, 25 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시켰다.

4. 형질전환

100 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA 50

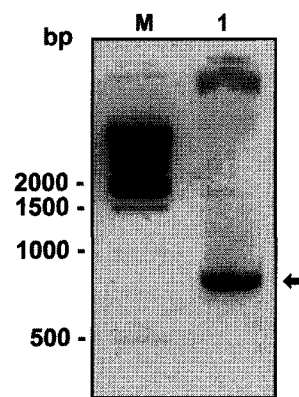


Fig. 1. PCR product of hGSTK1 modified for ligation with pcDNA3.1/Myc-His(+) vector. The arrow in lane 1 shows PCR product of hGSTK1 and the size of band is approximately 700 bp. M, DNA size marker.

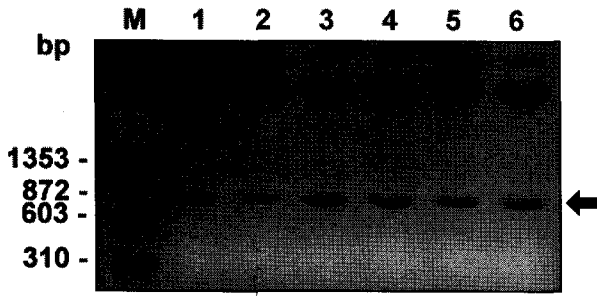


Fig. 2. Identification of hGSTK1 cDNA inserts in recombinant pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) plasmids. Plasmid DNAs containing hGSTK1 cDNA were prepared, digested with EcoRI and XhoI, and separated on a 1% agarose gel containing ethidium bromide. The arrow indicates the 700 bp hGSTK1 cDNA inserts. M, DNA size marker.

ml를 넣은 시험관에 배양한 E. coli를 옮기고 얼음 위에 10분간 두었다가 10분간 원심분리 후 상층액을 버렸다. 냉각된 100 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA 25 ml를 첨가하여 섞어주고 4°C에서 10분간 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 침전된 세포들을 100 mM CaCl₂, 15% glycerol 2.5 ml에 분산시킨 후, 100 µl씩 시험관에 분주하였다. 각 시험관에 pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) DNA 15 fmol을 첨가하여 살짝 저어준 후 얼음 위에 30분간 방치하였다. 90초간 42°C의 열을 가한 후 얼음 위에 2분간 방치하였다. SOC media 450 µl를 첨가하고 37°C에서 30분간 배양하였다. LB-ampicillin 배지에 20 µg/ml X-gal 25 µl 및 0.1 M IPTG

```

1                               CTCGTGCCGCTCTCCGGAGCCTGCAGC
29 ATGGGGCCCCTGCCGCGCACCGTGGAGCTCTTCTATGACGTGCTGTCCCCCTACTCCTGGCTGGGCTTCGAG
   M G P L P R T V E L F Y D V L S P Y S W L G F E
                                                                24
101 ATCCTGTGCCGGTATCAGAATATCTGGAACATCAACCTGCAGTTGCCGCCAGCCTCATAACAGGGATCATG
   I L C R Y Q N I W N I N L Q L R P S L I T G I M
                                                                48
173 AAAGACAGTGGAAACAAGCCTCCAGGTCTGCTTCCCCGAAAGGACTATACATGGCAAATGACTTAAAGCTC
   K D S G N K P P G L L P R K G L Y M A N D L K L
                                                                72
245 CTGAGACACCATCTCCAGATTCATCCACTTCCCCAAGGATTTCTGTCTGTGATGCTTGAAAAAGGAAGT
   L R H H L Q I P I H F P K D F L S V M L E K G S
                                                                96
317 TTGTCTGCCATGCGTTTCTCACCGCCGTGAAGTGGAGCATCCAGAGATGCTGGAGAAAGCGTCCCCGGAG
   L S A M R F L T A V N L E H P E M L E K A S R E
                                                                120
389 CTGTGGATGCGCTCTGGTCAAGGAATGAAGACATCACCGAGCCGACAGCATCCTGGCGGCTGCAGAGAAG
   L W M R V W S R N E D I T E P Q T I L A A A E K
                                                                144
461 GCTGGTATGTCTGCAGAAACAAGCCAGGGACTTCTGGAAAAGATCGCAACGCCAAAGGTGAAGAACCAGCTC
   A G M S A E Q A Q G L L E K I A T P K V K N Q L
                                                                168
533 AAGGAGACCACTGAGGCAGCCTGCAGATACGGAGCCTTTGGGCTGCCATCACCGTGGCCCATGTGGATGGC
   K E T T E A A C R Y G A F G L P I T V A H V D G
                                                                192
605 CAAACCCACATGTTATTTGGCTCTGACCGGATGGAGCTGCTGGCGCACCTGCTGGGAGAGAAGTGGATGGGC
   Q T H M L F G S D R M E L L A H L L G E K W M G
                                                                216
677 CCTATACCTCCAGCCGTAATGCCAGACTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAACAAAACTCATCTCAGAAGAG
   P I P P A V N A R L E S R G P F E G K L I S E E
                                                                240
749 GATCTGAATATGCATACCGGTATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTG
   D L N M H T E H H H H H H *
                                                                253
821 CCTTCTAG
    
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the recombinant pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) DNA. Nucleotide sequence of hGSTK1 cDNA in the recombinant pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) plasmid are confirmed using Sanger's dideoxy nucleotide chain termination method. Myc-His(+) tag sequence derived from vector is underlined.

25 μ l를 각각 첨가하고 건조시킨 후 형질전환된 E. coli 100 μ l씩을 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

5. pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) DNA의 염기서열 분석

Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system을 이용하여 E. coli로부터 pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) DNA를 정제하였다. 정제한 DNA를 다시 EcoRI 및 XhoI 제한효소로 절단하고 1% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 관찰한 결과 약 700 bp 크기의 DNA 띠가 확인되었다(Fig. 2).

정제한 DNA가 정확하게 삽입되었는지를 확인하기 위하여, Sanger's dideoxy nucleotide chain-termination method (Amersham사, 미국)로 DNA의 염기서열을 분석하였다. 3' 부분이 변형된 hGSTK1의 종료 코돈부 중 XhoI 제한효소 작용부위 이하가 pcDNA3.1/Myc-His(+) 중 XhoI 제한효소 작용부위 이하 부분으로 교체되어 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

6. In vitro translation

TNT T7 quick coupled transcription/translation system (Promega사, 미국)을 이용하여, 결합된 pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) DNA를 MCF-7 세포주에 이입시키기 전에 시험관 내에서 단백질 합성이 유도되는지 확인하였다. T7 quick master mix 40 μ l, ³⁵S-methionine (1000 Ci/mmol) 2 μ l, DNA 5 μ g을 시험관에 넣고, 증류수를 첨가하여 전체 부피 50 μ l로 조정하였다. 30°C에서 1시간 반응시킨 후, SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동을 마친 gel을 -70°C에서 24시간 엑스선 필름에 노출시킨 후 현상하여 합성된 단백질을 확인하였다. 염기서열로 계산한 단백질의 분자량인 28.7 kDa과 동일한 분자량을 가진 단백질 띠를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

7. MCF-7 세포주로의 이입

배양한 MCF-7 세포들을 trypsin-EDTA 처리하여 수확한 후, 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 DMEM 배양액을 제거하였다. PBS로 세척한 후, DMEM 배양액 3 ml를 첨가하고, 세포 수를 계산하였다. 직경 100 mm 배양접시에 2.5×10^6 개의 세포를 분주한 후 항생제 및 혈청이 첨가된 DMEM 배양액 4 ml를 첨가하였다. DMEM 배양액 100 μ l에 DNA 1, 2, 5 μ g을 각각 넣고 10 μ l의 Superfect transfection reagent를 첨가하여 섞어주고, 10분간 방치한 후 항생제 및 혈청이 첨가된 DMEM 배양액 1 ml를 첨가하여 섞어주었다. 혼합용액을 분주하여 가볍게 섞어주고 37°C, 5% CO₂에 3시간동안 배양하였다. 항생제 및 혈청이 첨가된 새 DMEM 배양액으로

갈아주고 48시간동안 추가로 배양하였다. Neomycin이 함유된 DMEM 배양액으로 1:10 계대배양을 시행하여 안정적으로 유전자 이입이 된 세포만을 선택하였다.

8. 엑스선 조사 및 생존분획 분석

hGSTK1이 이입된 세포와 hGSTK1이 이입되지 않은 MCF-7 세포들을 trypsin-EDTA 처리하여 수확한 후, 세포 수를 측정하였다. 5×10^5 개의 MCF-7 세포를 10 ml DMEM 배양액이 든 직경 100 mm 배양접시에 접종하였다. 엑스선 조사는 6 MV 선형가속기를 이용하였다. 비분할 조사는 각각의 배양접시에 2, 4, 6, 8, 12 Gy의 엑스선을 조사하였고, 분할 조사는 4 Gy의 엑스선을 조사하고, 4시간 후에 다시 4 Gy의 엑스선을 조사하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂ 배양기에 2주간 배양한 후 crystal violet으로 염색하여 colony를 측정하였다. 50개 이상의 세포로 구성된 colony만을 유효한 것으로 하였다. 동일한 실험을 5회 반복한 후, 엑스선량에 따른 생존분획을 Student's t-test를 이용하여 비교분석하였다.

9. 엑스선 조사에 의한 hGSTK1의 발현 측정

hGSTK1이 이입된 세포와 hGSTK1이 이입되지 않은 MCF-7 세포를 수확한 후 5×10^5 개의 MCF-7 세포를 직경 100 mm 배양접시에 분주하였다. 2 Gy 및 8 Gy의 엑스선을 비분할 조사하거나, 4 Gy 조사 후 4시간 후 다시 4 Gy를 분할조사하였다. 엑스선 조사 후 3, 6, 12, 24, 48시간에 세포를 취하

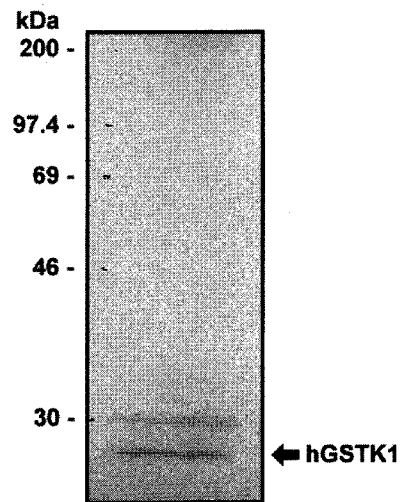


Fig. 4. In vitro transcription and translation of the recombinant pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) plasmid. Plasmid DNA was in vitro transcribed and translated with ³⁵S-methionine and separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel. The gel was exposed to an x-ray film for 24 hours at -70°C. The arrow indicates the ³⁵S-labeled hGSTK1 recombinant protein.

여 RNAwiz and Superscript II (Ambion사, 미국)를 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 다음과 같으며, 대조군으로 GAPDH를 사용하였다.

5' primer (5'-TCCAGATCCCATCCACTTC-3')
 3' primer (5'-CGGTCAGAGCCAAATAACAT-3')

성 적

1. 엑스선 조사 및 생존분획 분석

엑스선 조사에 따른 생존 분획의 변화를 Fig. 5에 나타내

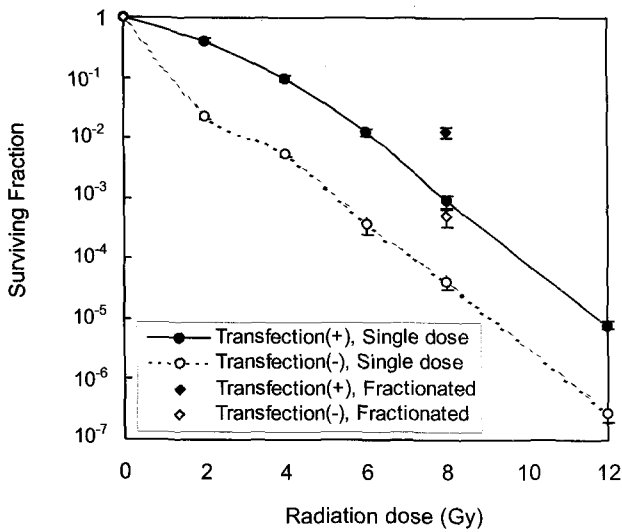


Fig. 5. Effects of x-irradiation on cell survival of MCF-7 cells transfected with or without the hGSTK1 gene. MCF-7 cells were transfected with or without recombinant pcDNA3.1/hGSTK1/Myc-His(+) DNA. The cells were irradiated with x-ray at the indicated doses. Following 14 days, the cell survival was measured.

었다. hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포주의 비분할 조사 후 2 Gy 생존 분획은 0.3250 ± 0.0319 였다. hGSTK1 유전자를 이입시킨 MCF-7 세포주의 비분할 조사 후 2 Gy 생존 분획은 0.4125 ± 0.0325 으로 hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포주에서보다 더 높게 나타났다 ($p < 0.05$). hGSTK1 유전자를 이입시킨 MCF-7 세포주의 4, 6, 8, 12 Gy 생존 분획도 hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포주에서보다 더 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 4시간 간격으로 4 Gy의 엑스선을 분할 조사한 경우에도 hGSTK1 유전자를 이입시킨 MCF-7 세포주의 생존 분획이 hGSTK1 유전자를 이입시키지 않은 MCF-7 세포주에서보다 더 높게 나타났다 ($p < 0.05$).

2. 엑스선 조사가 hGSTK1의 발현에 미치는 영향

2 Gy 및 8 Gy의 엑스선을 비분할 조사한 후 시행한 RT-PCR에서 시간에 따른 hGSTK1 mRNA 발현 정도의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 6). 4시간 간격으로 4 Gy씩 분할 조사한 후 시행한 RT-PCR에서도 시간에 따른 hGSTK1 mRNA 발현 정도의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 7).

고안 및 결론

전리방사선이 생체에 흡수되면 생체 내의 물 분자가 이온화되어 수산 유리기(OH·)와 같은 활성 산소종이 생성된다.¹⁹⁾ 이러한 활성 산소종을 제거하는 데에 sulfhydryl 기(SH-)가 매우 중요한 역할을 하며, 세포 내에서 가장 흔한 SH-로서 환원형 GSH를 들 수 있다.²⁰⁾ Sulfhydryl 기는 수소공여자로서, 수산 유리기가 표적 분자로부터 수소를 취하는 과정을 역전시키는 기능을 한다. 따라서 전리방사선의 조사

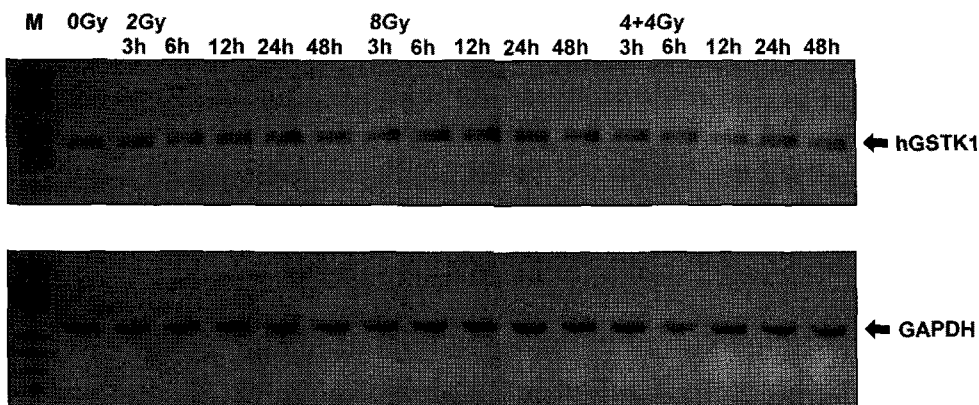


Fig. 6. Effects of x-irradiation on hGSTK1 expression in MCF-7 cells. The expression of hGSTK1 was measured by RT-PCR and GAPDH expression was used as a control. M, DNA size marker.

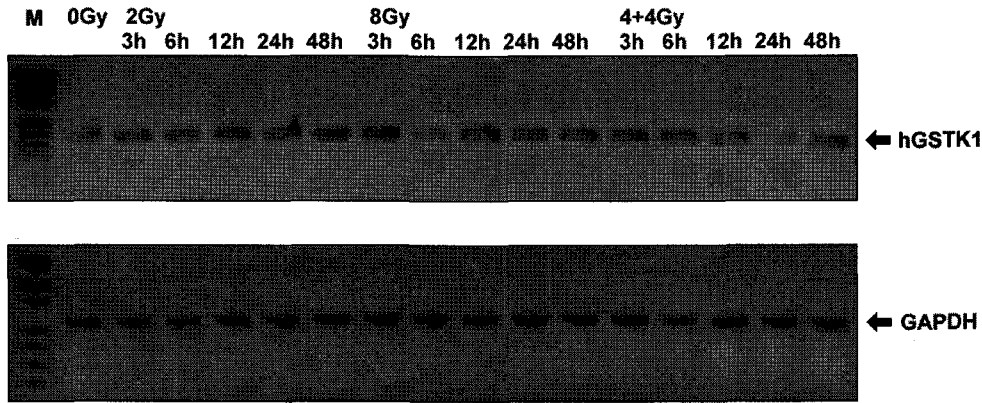


Fig. 7. Effects of x-irradiation on hGSTK1 expression in MCF-7 cells transfected with hGSTK1. The expression of hGSTK1 was measured by RT-PCR and GAPDH expression was used as a control. M, DNA size marker.

로 인하여, GSH의 대사와 관련된 효소 즉, GST의 발현 유도나 변화를 기대할 수 있다. Cholon 등²¹⁾은 GST 수치가 다른 세포간의 방사선 감수성 실험에서, 비록 감수성의 차이를 발견할 수는 없었으나, GST가 전리방사선에 의해 유발된 산화 자극에 대한 세포 반응에 관련될 것이라고 하였다. Kim 등²²⁾은 전리방사선 조사 24시간 후 쥐의 간에서 GST mRNA 발현이 높아짐을 보고하면서 GST와 방사선 감수성과의 관련성을 주장하였다. 또한 Kim 등²³⁾은 전리방사선 조사 후 쥐의 간에서 GST α mRNA 발현은 높아지나 GST π mRNA 발현에는 변화가 없음을 보고하였고, 전리방사선을 연속 조사하는 경우 GST α mRNA 발현이 플라토를 보이는 점으로 미루어, 전리방사선에 의한 세포증식의 정지 및 DNA 손상 복구가 복합적으로 방사선 감수성에 관여할 것으로 추정하였다.

암세포 및 정상 세포의 방사선 감수성을 결정하는 인자 중의 하나로 세포 내 GSH 및 GST의 농도가 제시되고 있으나, 아직까지 그 분자생물학적 기전이 명확하게 밝혀져 있지는 않다. GST 유전자의 발현 조절에 관한 연구는 1990년에 GST 유전자의 전사 활성화에 관여하는 antioxidant responsive element (ARE)가 발견되었고,²⁴⁾ GST 유전자의 촉진자 부분에 위치한 antioxidant responsive element-binding protein (ARE-BP) 군이 GST의 전사조절에 관여한다는 내용이 보고되었다.²⁵⁾

전리방사선에 의해 유도되는 유전자 중에서 자극에 의해 즉각적으로 유도되는 것을 조기반응 유전자라 하고, 이 조기반응 유전자에 의해 나중에 유도되는 것을 후기반응 유전자라 한다. 조기반응 유전자에는 jun, fos, egr-1, 스테로이드 호르몬의 수용체군 유전자 등이 있으며, 암세포와 정상 세포에서 전리방사선 조사 후 30~60분 사이에 일과성으로 발현된다.²⁶⁾ 후기반응 유전자에는 TNF, TGF- β , IL-1, bFGF 등이 있

다.²⁷⁾ Cholon 등²¹⁾에 의하면 전리방사선 조사 후 1시간 내에 GST 유전자의 발현이 감소되었는데, 비록 그 발현이 감소되기는 하였으나 GST를 조기반응 유전자로 분류할 수 있다고 하였다. 그러나 Kim 등²²⁾의 보고에 의하면, 방사선 조사 후 15~24시간 경과하여 GST의 발현이 증가하였으므로, 조기반응 유전자로 분류하기에는 적절하지 않은 부분도 있다. 이와 같이 GST 유전자는 그 발현 양상이나 발현 시점 등이 세포에 따라, 효소군에 따라 일관성을 보이지 않고 있는데, 본 연구에서의 hGSTK1 유전자도 비록 정확한 정량분석은 하지 않았지만 엑스선 조사 전후에 그 발현의 차이를 볼 수 없었다. 향후 더 다양한 세포주 및 GST 효소군에 대한 발현양상 분석이 필요하다고 사료된다.

유방암 세포에서 hGSTK1의 발현을 인위적으로 증가시킴으로써 방사선 감수성 변화를 관찰한 본 연구에서, 엑스선 조사 후 MCF-7 세포의 생존 분획은 hGSTK1 유전자 이입 전후에 유의한 차이를 보여주었다. 이는 hGSTK1 유전자가 MCF-7 세포의 방사선 감수성에 관여하였다는 것을 의미한다. 그러나 hGSTK1 mRNA에 대한 RT-PCR 분석에서는 엑스선 조사 후 시간 경과에 따른 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다. 이에 대한 설명으로는 유전자 및 단백질의 발현은 전사 자체의 증가 뿐 아니라, 전사의 가속, 전사 후 조절, 번역 후 조절 등 다양한 단계에서 조절될 수 있을 것으로 생각된다.

GSH의 농도와 GST의 발현과 관련하여 많은 임상 결과들이 보고되고 있다. Miyara 등은 사람의 폐암 세포에 GST π 유전자를 이입시킨 경우 방사선 및 항암제에 대한 내성이 중등도로 증가됨을 발견하여, 항암제 및 방사선 손상에 대한 GST의 역할이 매우 선택적임을 보고하였다.¹⁵⁾ Jadhav 등¹⁶⁾은 자궁경부암 환자의 방사선치료에서 1회 조사 후 혈액과 종

양에서 측정된 GSH 수치의 변화가 심할수록 방사선치료에 대한 반응이 우수함을 보고하면서 GSH 수치의 변화가 방사선치료 반응의 지표가 될 수 있다고 하였다. Tanita 등²⁸⁾은 두경부 종양 환자에서 10~70 Gy의 전리방사선조사 후 GST π 유전자가 소실되거나 감소함을 보고하였다. Miura 등¹⁷⁾은 후두암 환자에서 GST π 유전자가 발현되는 경우 재발의 위험요소로 작용할 수 있다고 하였다. Mulder 등²⁹⁾은 두경부 종양 환자에서 GST π 유전자 발현이 높음을 발견하고 이로 인하여 항암제 내성이 생긴다 하였고, GSH 수치가 높음으로 인해 방사선 내성까지 추가로 생긴다고 하였다. 또한 GST π 유전자가 대장암 환자의 생존율을 예측할 수 있는 지표로도 사용할 수 있다고 하였다.³⁰⁾ 이러한 임상관련 기초실험을 바탕으로 하여 향후 GST 유전자를 이용한 유전자치료와 같은 새로운 치료방법이 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 MCF-7 세포주에서 hGSTK1의 과발현은 방사선 감수성에 영향을 미쳐서 MCF-7 세포의 생존 분율을 증가시켰다고 볼 수 있으나 이에 대한 정확한 기전을 알기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. **Pemble SE, Wardle AF, Taylor JB.** Glutathione S-transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem J* 1996;319:749-754
2. **김재철, 박인규, 이규보, 손상균, 김문규, 김정철.** HL60 세포주의 분화 시 감소 특성을 보이는 glutathione S-transferase의 클로닝. *대한방사선종양학회지* 1999;17:151-157
3. **Butler RN, Butler WJ, Moraby Z, Fettman MJ, Khoo KK, Roberts TIC.** Glutathione concentrations and glutathione S-transferase activity in human colonic neoplasms. *J Gastroenterol Hepatol* 1994;9:60-63
4. **Hamada S, Kamada M, Furumoto H, Hirao T, Aono T.** Expression of glutathione S-transferase- π in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. *Gynecol Oncol* 1994;52:313-319
5. **Hida T, Ariyoshi Y, Kuwabara M, et al.** Glutathione S-transferase π levels in a panel of lung cancer cell lines and its relation to chemo-radiosensitivity. *Jpn J Clin Oncol* 1993;23:14-19
6. **Ripple M, Mulcah RT, Wilding G.** Characteristics of the glutathione/glutathione S-transferase detoxification system in melphalan resistant human prostate cancer cells. *J Urol* 1993; 150:209-214
7. **Moore M, Wang X, Lu YF, et al.** Benzol[α]pyrene-resistant MCF-7 human breast cancer cell. *J Biol Chem* 1994;269: 11751-11759
8. **Britten RA, Green JA, Warenus HM.** Cellular glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GST) activity in human ovarian tumor biopsies following exposure to alkylating agents. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;24:527-531
9. **Satta T, Isobe K, Yamauchi M, Nakashima I, Takagi H.** Expression of MDR1 and glutathione S-transferase- π genes and chemosensitivities in human gastrointestinal cancer. *Cancer* 1992;69:941-946
10. **Kenneth DT.** Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 1994;54:4313-4320
11. **Hayes JD, Pulford DJ.** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445-600
12. **Hansson J, Edgren MR, Egyhazi S, Hao XY, Mannervik B, Ringborg U.** Increased cisplatin sensitivity of human fibroblasts from a subject with glutathione deficiency. *Acta oncol* 1996;35:683-690
13. **Wilhelm D, Bender K, Knebel A, Angel P.** The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol Cell Biol* 1997;17:4792-4800
14. **Wang K, Ramji S, Bhatthana A, Lee C, Riddick DS.** Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines. *Xenobiotica* 1999;29:155-170
15. **Miyara H, Hida T, Nishida K, et al.** Modification of chemo-radiosensitivity of a human lung cancer cell line by introduction of the glutathione S-transferase π gene. *Jpn J Clin Oncol* 1996;26:1-5
16. **Jadhav GKR, Bhanumathi P, Devi PU, et al.** Possible role of glutathione in predicting radiotherapy response of cervix cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:3-5
17. **Miura K, Suzuki S, Tanita J, Shinkawa H, Satoh K, Tsuchida S.** Correlated expression of glutathione S-transferase and c-jun or other oncogene products in human squamous cell carcinomas of the head and neck: relevance to relapse after radiation therapy. *Jpn J Cancer Res* 1997;88: 143-151
18. **Richardson ME, Siemann DW.** Thiol manipulation as a means of overcoming drug resistance in a novel cyclophosphamide resistant cell line. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:781-784
19. **Hall EJ.** Radiobiology for the radiologist. 5th ed. Philadelphia; JB Lippincott Co, 2000:12-14.
20. **Sonntag CV.** The chemical basis of radiation biology. 1st ed. Basingstoke; Taylor & Francis Ltd, 1987:353-374
21. **Cholon A, Giaccia AJ, Lewis AD, Hickson I, Brown JM.** What role do glutathione S-transferase play in the cellular response to ionizing radiation? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;22:759-763
22. **Kim SG, Nam SY, Kim CW, Kim JH, Cho CK, Yoo SY.** Enhancement of radiation-inducible hepatic glutathione S-

- transferases Ya, Yb1, Yb2, Yc1, and Yc2 gene expression by oltipraz: possible role in radioprotection. *Mol Pharmacol* 1997; 51:225-233
23. Kim SG, Nam SY, Kim CW. In vivo radioprotective effects of oltipraz in γ -irradiated mice. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:1585-1590
24. Rushmore TH, Pickett CB. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J Biol Chem* 1990;265: 14648-14653
25. Wasserman WW, Fahl WE. Comprehensive analysis of proteins which interact with the antioxidant responsive element: correlation of ARE-BP-1 with the chemoprotective induction response. *Arch Biochem Biophys* 1997;344:387-396
26. Holbrook NJ, Fornace AJ Jr. Response to adversity. molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol* 1991;3:825-833
27. Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33:619-626
28. Tanita J, Tsuchida S, Hozawa J, Sato K. Expression of glutathione S-transferase- π in human squamous cell carcinomas of the pharynx and larynx. loss after radiation therapy. *Cancer* 1993;72:569-576
29. Mulder TP, Manni JJ, Roelofs HM, Peters WH, Wiersma A. Glutathione S-transferases and glutathione in human head and neck cancer. *Carcinogenesis* 1995;16:619-624
30. Mulder TP, Verspaget HW, Sier CF, Roelofs HM, Ganesh S, Griffioen G, Peters WH. Glutathione S-transferase π in colorectal tumors is predictive for overall survival. *Cancer Res* 1995;55:2696-2702

Abstract

Inductoin of Radioresistance by Overexpression of Glutathione S-Transferase K1 (hGSTK1) in MCF-7 Cells

Jae Chul Kim, M.D.* and Sei One Shin, M.D.†

*Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Kyungpook National University, Taegu, Korea

†Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea

Purpose : This study was conducted to assess the effects of x-irradiation on the expression of the novel glutathione S-transferase K1 gene.

Materials and methods : Human glutathione S-transferase K1 (hGSTK1) DNA was purified and ligated to a pcDNA3.1/Myc-His(+) vector for the overexpression of hGSTK1 gene. MCF-7 cells were transfected with or without the recombinant hGSTK1 gene, and irradiated with 6 MV x-ray. After incubation of 14 days, cell survival was measured and compared. The expression of hGSTK1 and the effect of x-irradiation on hGSTK1 expression were also estimated in MCF-7 cells transfected with or without the hGSTK1 gene by RT-PCR.

Results : Following 2 to 12 Gy of x-irradiation, the cell survivals were higher in the MCF-7 cells transfected with the hGSTK1 gene than in those without transfection. Despite the higher cell survival in the hGSTK1-transfected cells, RT-PCR for hGSTK1 mRNA revealed no significant differences according to radiation dose, fractionation, and time after irradiation.

Conclusion : The MCF-7 cells transfected with the hGSTK1 gene showed higher cell survival than those without transfection of the gene. The hGSTK1 gene might be associated with the radiosensitivity of MCF-7 cell line and further analysis should be needed.

Key Words : Glutathione S-Transferase K1, MCF-7 cell, Transfection