

쥐의 간암 세포에서 Desferrioxamine에 의해 유도된 Hypoxia Inducible Factor-1 α 가 방사선 저항성을 초래함

부산대학교 의과대학 방사선종양학교실

권 병 현

목적: 저산소증은 방사선 감수성을 현저히 감소시키며, 이에 대한 적응 반응에서 hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)가 중요한 역할을 하고 있다. HIF-1 α 의 발현과 방사선 감수성과의 상관 관계를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법: 쥐의 간암 세포주인 hepa1c1c7 세포와 HIF-1 β 가 결손되어 HIF-1 α 의 기능이 억제된 hepa1C4 세포를 사용했다. 저산소 유사 물질인 desferrioxamine (DFX)을 전처치하고 6시간 뒤에 방사선조사를 하여 western blot으로 HIF-1 α 발현을 조사하였다. Apoptosis는 DNA 분절화, propidium iodide 핵염색, 그리고 apoptotic cell death detection ELISA kit를 이용하였다. MTT assay법으로 방사선 감수성을 측정하고 SF₂, SF₈, 그리고 mean inactivation dose (MID)를 산출하여 통계적 분석을 하였다.

결과: Hepa1c1c7 세포에서는 DFX 전처치를 한 경우 방사선에 의해 HIF-1 α 의 발현이 증가했으나, hepa1C4 세포주에서는 변화가 없었다. Hepa1C4 세포의 방사선 감수성은 DFX처리에 따른 영향이 없었으나 hepa1c1c7 세포의 방사선 감수성은 DFX를 전처치했을 때 유의하게 감소하였다.

결론: 저산소 유사 물질인 DFX에 의해 유도된 HIF-1 α 가 쥐의 간암 세포주에서 apoptosis와 방사선 감수성을 감소시켰다. 이러한 결과는 종괴내의 저산소 세포에서 방사선에 의해 HIF-1 α 가 유도되고 이로 인해 저산소 세포에서 방사선 감수성을 저하시키는 것으로 생각되었다.

핵심용어: Hypoxia-inducible factor 1 α , 방사선 감수성, 저산소증

서 론

임상적으로 종괴를 형성한 대부분의 고형암에는 산소 운반능과 산소 소비량의 차이 그리고 혈관의 구조나 기능상의 결함으로 인해 저산소(hypoxia) 분획이 존재하며 이는 방사선 치료 실패의 주요 원인이다.¹⁾ 자궁경부암, 두경부암, 폐암 등 많은 종류의 암에서 방사선 치료 전 저산소 상태가 치료 실패나 전이와 관련이 있음이 보고되었다.¹⁻⁴⁾ 그래서 저산소 세포의 방사선에 대한 저항성을 극복하기 위해 고압 산소 요법(hyperbaric oxygen therapy)을 사용하거나 산소와 비슷한 기능을 할 수 있는 물질인 hypoxic cell sensitizer를 투여하여 방사선 감수성을 높이는 시도가 진행

되고 있다.^{5,6)}

저산소 세포가 산소가 충분한 세포보다 방사선에 더 저항을 보이는 사실은 오래 전부터 알려졌다.⁷⁾ 지금까지 알려진 기전은 oxygen fixation hypothesis로 산소 분자가 방사선에 의해 생긴 DNA의 free-radical damage에 빠르게 반응하여 organic peroxide를 형성하여 DNA damage를 고착시켜 cell death를 유도한다.⁸⁾ 세포는 저산소 상태에서는 대사 활동이 저하되고 세포 내 여러 가지 신호 전달 물질의 변화도 동반되는데, 아직까지 저산소 세포가 방사선에 저항을 보이는 기전을 이러한 신호 전달 체계로는 이해하지 못한 상태다.

저산소 상태에서는 세포내 hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)이라는 전사 단백질이 증가하고 이 단백질이 저산소라는 스트레스로부터 세포 자신을 보호할 여러 단백질 발현을 유도한다.⁹⁾ HIF-1은 HIF-1 α 와 HIF-1 β 라는 두 subunit이 heterodimer를 형성하고 있다. HIF-1 α 는 세포질내에 존재하면서 normoxic 상태에서는 급격히 분해되고, 저산소 상태에서는 안정화되어 농도가 증가한다. 반면 HIF-1

이 논문은 2004년 5월 3일 접수하여 2004년 9월 6일 채택되었음.
This study was supported by Medical Research Institute Grant (2001-02), Pusan National University Hospital.
책임저자: 권병현, 부산대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 051)240-7383, Fax: 051)248-5747
E-mail: amdocror@pusan.ac.kr

β 는 산소농도의 영향을 받지 않고 세포질 내에 존재한다. 저산소 상태에서 증가된 HIF-1 α 가 HIF-1 β 와 dimer를 형성하여 세포질에서 핵내로 이동하게 되어 promotor로 작용한다. 이 중 전사 능력이 있는 것은 HIF-1 α 로 종양의 성장과 분화에 관여하는 단백질 발현을 돕는다.⁹⁾ Aebersold 등¹⁰⁾은 두경부암에서 HIF-1 α 가 많이 발현될수록 근치적 방사선 치료 후 국소 제어와 생존율이 떨어지고 림프절 전이가 많았다고 보고했다. 이러한 결과는 HIF-1 α 나 그에 의해 유도된 물질이 저산소 세포의 방사선 저항에 직접 관여하여 국소 제어와 생존율 저하를 초래했을 가능성을 시사했다. 또한 Zaman 등¹¹⁾은 desferrioxamine (DFX)와 cobalt chloride와 같은 iron chelator가 신호 전달 체계를 활성화하여 HIF-1과 그 표적 유전자 발현을 유도하여 oxidative stress-induced death를 억제한다고 보고했다. 이는 HIF-1과 그 표적 유전자가 oxidative stress의 일종인 방사선에 의한 cell death도 억제하는 데 관여할 것으로 생각된다.

저자는 저산소증이 방사선 저항성을 야기하는 과정에서 HIF-1 α 의 역할을 규명하고자 본 연구를 시작했다. 쥐의 간암 세포주인 hepa1c1c7와 HIF-1 β 가 결손되어 HIF-1 α 의 기능이 억제된 hepa1C4 세포에다 세포내의 free iron을 비활성화하여 인위적으로 저산소증과 유사한 상태를 만드는 물질인 DFX을 처리하여 HIF-1 α 발현을 유도한 뒤 방사선을 조사하여 세포 생존율과 apoptosis 정도를 관찰하였고, 이를 HIF-1 α 의 발현 정도와 비교하여 HIF-1 α 가 방사선 감수성에 미치는 영향을 평가하였다.

대상 및 방법

1. 세포 및 세포 배양

Hepa1c1c7과 MCF7은 American type of culture collection (ATCC, USA)으로 구입하였고, hepa1c1c7에서 HIF-1 β 가 결손된 hepa1C4는 Hankinson으로부터 얻어 사용하였다. 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA)과 penicillin (100 units/ml)/streptomycin (100 μ g/ml) (Gibco BRL, USA)이 포함된 RPMI 1640 배양배지(Gibco)를 사용하여, 37°C에서 5% CO₂가 공급된 조건에서 배양하였다.

2. 약물 처리 및 방사선 조사

대수 증식기의 세포를 배양배지에 희석하여 2 × 10⁴ cells/ml이 되게 하여 96 well 세포 배양판의 각 well에 200 μ l씩 넣어 24시간 배양하여 세포를 안정시킨 후 260 μ M desferrioxamine (DFX, Sigma, UK)을 각 well에 넣은 뒤 6시간 후에 방사선 조사를 했다. 방사선은 6-MV X-Ray

(Mevatron 67, Siemens, USA)을 이용하여 100 cGy/min의 선량율로 상온에서 조사했다. HIF-1 α 의 발현과 apoptosis의 정도를 관찰하기 위해 25 Gy의 방사선량을 한번에, 세포 생존 분획을 구하기 위해 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy의 방사선량을 단계별로 조사했다.

3. Immunoblot assays

방사선조사 후 6시간 후에 세포를 회수하여 인산 완충액 (PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 5분간 5,000 x g에서 원심 분리한 후 상층액은 버리고 세포 침전물을 얻었다. 침전물의 4배에 해당하는 ice-cold hypotonic lysis buffer (10 mM HEPES [N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, pH 7.9], 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma)) 넣어 가볍게 부유시킨 뒤 얼음에 15분간 두었다. 최종 농도가 0.2%가 되게 NP-40을 넣어 5분간 강하게 vortexing했다. 4°C에서 5분간 3,000 x g에서 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물을 얻어 침전물의 4배의 ice-cold extraction buffer (10 mM HEPES [N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, pH 7.9], 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)로 부유시켰다. 4°C에서 15분간 혼합시킨 뒤 31,000 x g에서 원심 분리한 뒤 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 SDS-polyacrylamide gel에서 100 volt로 1시간 동안 전기 영동시킨 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% tween-20를 포함하는 PBS (blocking 액)에 2시간 동안 방치하고 anti-HIF-1 α 항체(Novus Biologicals, USA)를 2시간 반응시켰다. 다시 PBS로 세척하고 horseradish peroxidase가 결합되어 있는 항 토끼 항 IgG 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)로 1시간 반응시킨 다음 ECL Western Blotting Detection System (Amersham, USA)을 사용하여 x-선 필름상에 나타나는 band의 농담으로 단백질 발현을 조사하였다.

4. MTT assay

세포의 생존율은 microtetrazoline (MTT) (Sigma) assay를 이용하였다. 방사선 조사 후 72시간이 경과된 뒤 배양기에서 96 well 세포 배양판 관을 꺼내어 MTT 용액(5 mg/ml in PBS)을 최종 농도가 100 μ g/ml이 되도록 넣어 주었다. MTT 처리 후 4시간에 10% sodium-dodesyl sulfate (SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액을 200 μ l/well씩 첨가하여 살아 있는 세포에 의해 생성된 불용성의 보라색 formazan을 용해

시킨 다음 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석기(Molecular Devices, USA)로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. DNA 분절화

방사선 조사 후 6시간 후에 세포를 회수하여 0.5 ml 추출용액(0.5% triton X-100, 10 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7.4)으로 얼음에서 20분간 반응시켜 용해하였다. 용해성 부분을 포함한 저 분자량의 DNA를 포함한 상층액을 10분간 15,000 x g에서 원심 분리한 후, 페놀과 클로로포름으로 3회 추출하고 에탄올 침전을 시킨 후 20 μ g/ml RNase A를 넣은 pH 8.0 Tris/EDTA에 녹인 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. DNA는 ethidium bromide로 염색한 뒤 2% agarose gel에 전기 영동하였다.

6. Propidium iodide (PI) nuclear staining

Propidium iodide (Sigma, P4170)를 증류수에 녹여 8×10^{-5} M이 되게 하여 빛이 차단된 곳에 4°C 이하 되는 곳에 보관 사용하였다. 방사선 조사 6시간 후에 PI 보관 용액을 배양된 세포에 넣고 생리식염수로 최종 농도가 4 μ M이 되게 하여, 빛이 없는 실온에서 10분간 배양했다. 그 후 생리식염수로 2회 세척한 다음 형광현미경으로 붉은 형광을 관찰하였다.

7. Apoptosis의 정량적 분석

Apoptosis의 정량적 분석을 위하여 apoptotic cell death detection ELISA kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)을 사용하였다. 방사선 조사 6시간 후에 세포를 회수하여 lysate를 만든 후 mouse anti-histone antibody (clone H114)를 흡착시킨 microtiter plates에서 배양하여 endonuclease에 의한 DNA 파괴에 의해 유리된 DNA oligonucleosome을 결합시켰다. Plate를 세척하고 blocking buffer로 비특이적 결합을 억제하였다. 결합된 nucleosome을 anti-mouse DNA monoclonal antibody (MCA-33)와 결합시킨 후 peroxidase로 conjugation하였다. 결합된 peroxidase의 양은 기질로 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS)를 사용하여 측정하였고 ELISA reader로 405 nm에서 측정하였다.

8. 세포 생존 분석 및 통계 처리

세포 생존 곡선은 linear-quadratic model을 사용하여 추정하였다. 이 모델은 $\ln S = -\alpha D - \beta D^2$ 로 생존분획 S는 방사선량 d Gy에서 흡광도로 구했으며, 이를 표준 선형 회귀 방법을 사용하여 생존 분획에 적합시켰다.¹²⁾ 만약 β 의 추

정 값이 음수이면 β 를 0으로 하고 $\ln S = -\alpha D$ 에 대해 회귀분석을 하고, α 의 추정 값이 음수이면 α 를 0으로 하고 $\ln S = -\beta D^2$ 에 대해 회귀분석을 했다. 각 실험 군별로 2 Gy (SF₂)와 8 Gy (SF₈)에서의 생존 분획을 계산했다.

방사선 민감도를 종합적으로 평가하기 위해 mean inactivation dose (MID)를 사용하였으며, 이는 추정된 linear quadratic parameter를 사용하여 생존 곡선을 적분하여 계산하였다.¹³⁾

실험 군 간의 차이는 unpaired student's *t*-test를 이용하여 검정하였으며, 유의성 수준을 0.05로 하였다.

결 과

1. 방사선에 의한 HIF-1 α 발현 변화

실험 대상 세포의 특성을 확인하기 위해 hepalc1c7, hepalc4 그리고 MCF7에 DFX 처리 후 immunoblot assay를 시행했는데 그 결과 hepalc1c7와 MCF7 세포에서는 DFX에 의해 HIF-1 α 이 증가했으며, HIF-1 β 가 결손되어 HIF-1 α 의 핵 내로의 이동이 이루어지지 않는 hepalc4 세포에서는 DFX처리에 의해 HIF-1 α 가 증가되지 않았다. 이들 세포에 25 Gy의 방사선만을 조사했을 때는 HIF-1 α 의 증가가 없었으나, DFX를 전처리한 뒤 같은 양의 방사선을 조사했을 때는 DFX만 단독 처리했을 때보다 HIF-1 α 가 더 많이 발현되어 방사선이 DFX에 의한 HIF-1 α 의 발현을 증강시켰다(Fig. 1).

2. 방사선이 세포 생존 분획에 미치는 영향

HIF-1 α 발현 유무가 방사선 감수성에 미치는 효과를 관찰하기 위해 DFX에 HIF-1 α 이 증가하는 hepalc1c7 세포와

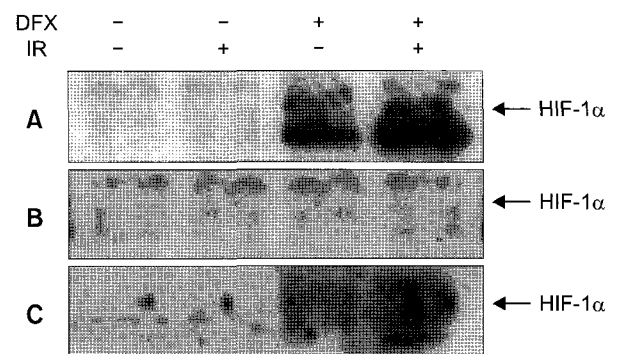


Fig. 1. Up-regulation of HIF-1 α protein level by irradiation 25 Gy (IR) in DFX treated cells. HIF-1 α protein levels in nuclear extracts of hepalc1c7 cells (A), hepalc4 cells (B), and MCF7 cells (C).

Table 1. Radiosensitivity Parameters for Hepa1c1c7 and Hepa1C4 Cells

Cell	Hepa1c1c7			Hepa1C4		
	SF ₂ (CVM)	SF ₈ (CVM)	MID (CVM)	SF ₂ (CVM)	SF ₈ (CVM)	MID (CVM)
Control	0.93 (0.06)	0.23 (0.04)	5.92 (0.31)	0.92 (0.08)	0.43 (0.12)	7.54 (0.21)
DFX	0.92 (0.13)	0.74 (0.11)	21.64 (0.43)	0.92 (0.05)	0.60 (0.14)	11.11 (0.23)
P values	0.546	<0.01	<0.01	0.698	0.132	0.084

SF₂: (geometric mean of) surviving fraction at 2 Gy, SF₈: (geometric mean of) surviving fraction at 8 Gy, CVM: coefficient of variation of the mean, MID: mean inactivation dose (Gy)

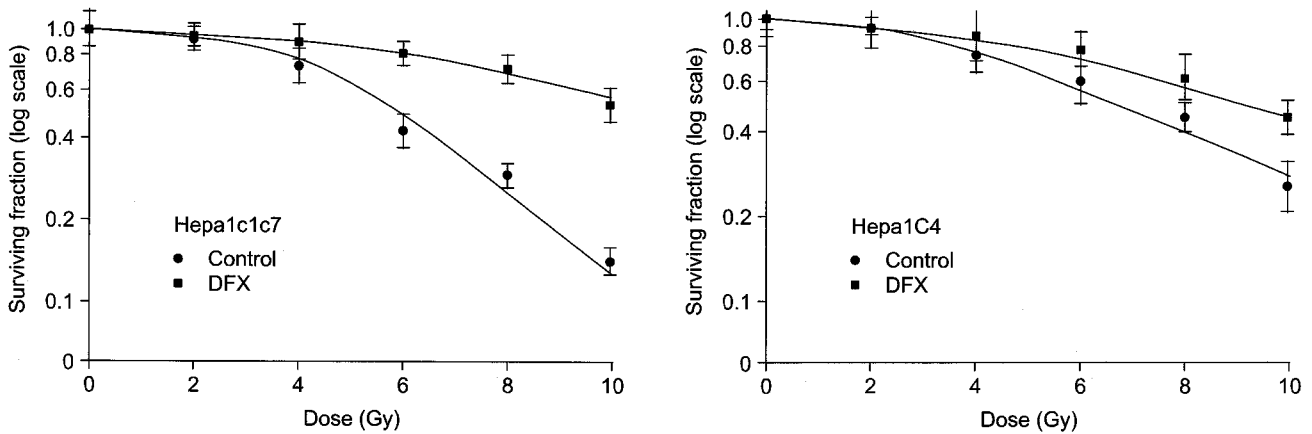


Fig. 2. Effects of DFX on radiation-induced cytotoxicity of hepalc1c7 cells (upper panel) and hepalc4 cells (lower panel). The cells were irradiated with ionizing radiation at the indicated doses. The cytotoxicity was measured by MTT assay after 3 days. Data represent the mean and SE for three independent experiments.

그렇지 않은 hepalc4 세포에 DFX 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹으로 나누어 방사선 조사를 하여 세포 생존 분획을 조사하고 SF₂, SF₈ 그리고 MID를 계산했다. hepalc1c7 세포에서는 SF₈과 MID이 p<0.05로 두 그룹 사이에 통계학적 유의한 차이를 보였으나, hepalc4 세포에서는 SF₂, SF₈, 그리고 MID 모두에서 두 그룹 사이에 통계학적 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 이를 세포 생존 곡선을 그려 분석했을 때 hepalc1c7 세포에서는 DFX를 처리함으로써 방사선 감수성이 크게 감소하는 것을 볼 수 있으나, hepalc4 세포에서는 DFX를 처리했을 때 방사선 감수성이 약간 감소하는 정도로 두 그룹 간에 DFX 처리에 따른 방사선 감수성의 차이를 보였다(Fig. 2).

3. DFX가 radiation-induced apoptosis에 미치는 효과

Hepalc1c7 세포와 hepalc4 세포를 DFX을 전처리하지 않은 그룹과 전처리한 그룹으로 나누어 각각 방사선 조사를 한 뒤 DNA 분절화 방법으로 apoptosis를 관찰하였다. hepalc1c7 세포에서는 DFX를 처리하지 않은 그룹에서는

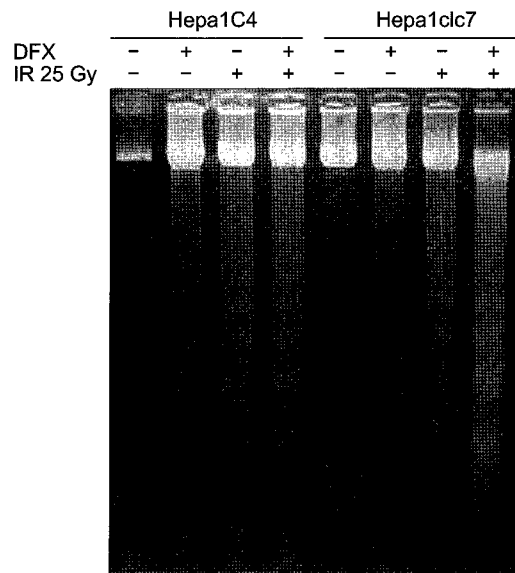


Fig. 3. Radiation induced apoptosis in hepalc1c7 cells and hepalc4 cells treated with (+) or without (-) DFX after 25 Gy radiation. Genomic DNAs extracted from cells were analyzed in 2% agarose gel.

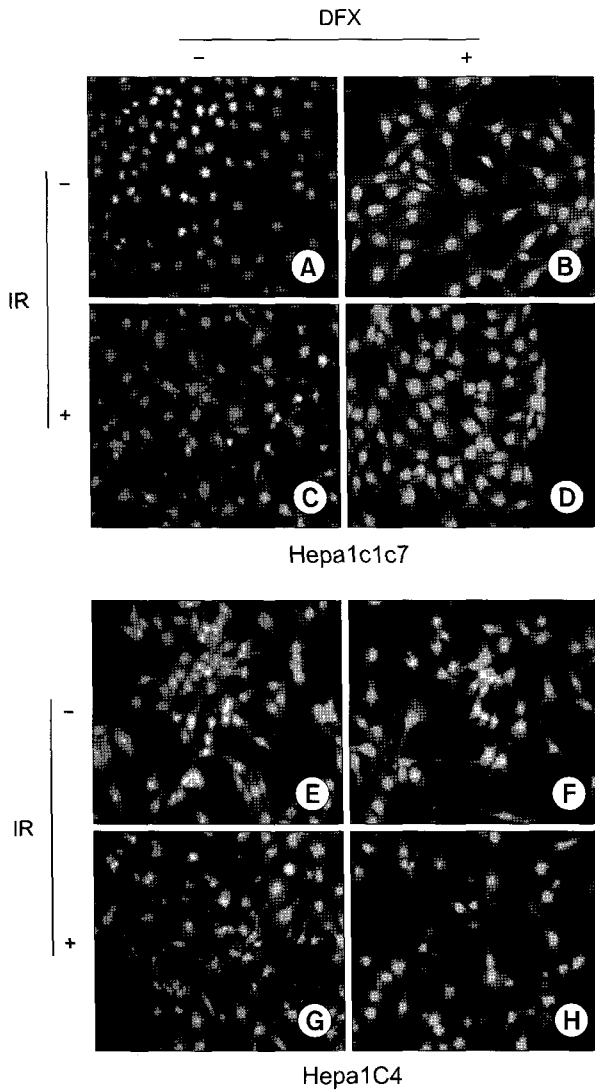


Fig. 4. Propidium iodide (PI) nuclear staining of hepa1c1c7 cells (A, B, C, D) and hepa1C4 cells (E, F, G, H) analyzed by fluorescence microscopy. Cells were incubated without (A, C, E, G) or with (B, D, F, H) 260 μ M DFX for 6 h, and then some group (C, D, G, H) were irradiated with 25 Gy. Cells were stained with PI after 48 h.

apoptosis가 관찰되었으나 DFX를 처리한 그룹에서는 apoptosis가 일어나지 않았으며, hepa1C4 세포에서는 DFX 처리 유무에 관계 없이 apoptosis가 일어났다(Fig. 3).

위와 같은 방법으로 DFX 처리 후 방사선 조사를 한 뒤 PI nuclear staining을 하여 형광 현미경으로 apoptosis 유무를 관찰했을 때 hepa1c1c7 세포에서는 DFX 전 처치함으로 방사선에 의한 apoptosis가 감소하였으나 hepa1C4 세포에서는 DFX 전 처치 유무에 따라 apoptosis 발현 정도에 차이를 보이지 않아 DNA 분절화 방법에 의한 결과와 유사하게 DFX가 radiation-induced apoptosis를 억제했다(Fig. 4).

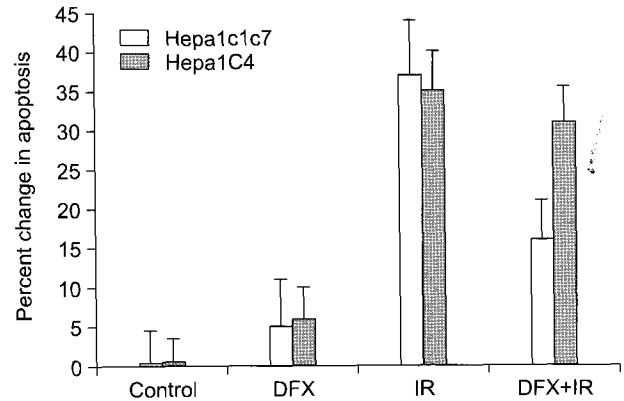


Fig. 5. Changes in apoptotic activity in hepa1c1c7 cells and hepa1C4 cells after treatment with 260 μ M DFX and/or 25 Gy radiation (IR). The percentage change in apoptotic activity was calculated by using the respective absorbance in the treated cells divided by the untreated cells.

Apoptotic cell death detection ELISA kit를 이용하여 apoptosis를 정량적으로 분석하였다. Hepa1c1c7 세포에서는 DFX만 처리한 그룹에서는 대조 그룹보다 apoptosis가 5%, 방사선만 조사했을 때는 37%, DFX 처리 후 방사선 조사를 했을 때는 16% 증가하였다. 반면 hepa1C4 세포에서는 DFX만 처리한 그룹에서는 대조 그룹보다 apoptosis가 4%, 방사선만 조사했을 때는 35%, DFX 처리 후 방사선 조사를 했을 때는 31% 증가하였다. 방사선만 조사한 세포 그룹과 DFX를 전처치하고 방사선 조사를 한 그룹 간의 apoptosis 정도 차이를 통계학적으로 분석했을 때 hepa1c1c7 세포에서는 유의한 차이가 있었고($p=0.03$), hepa1C4 세포에서는 차이가 없었다($p=0.95$)(Fig. 5).

고안 및 결론

암 조직과 같이 세포 증식이 왕성한 경우 암 세포의 증가 속도에 비해 혈관 생성이 따라가지 못해 혈관으로부터 150 μ m 이상의 거리에 있는 세포는 저산소 상태에 빠지며, 이는 종괴의 크기가 1~2 mm^3 이상으로 성장하면 거의 모든 고형암에서 볼 수 있는 현상이다.¹⁴⁾ 이러한 상태에서 자신의 대사 과정을 바꾸거나 저산소에 대한 저항성을 획득하지 못한 많은 암세포는 괴사 또는 apoptosis로 소멸되기도 한다.

이러한 과정에서 저산소 상태를 극복하고 생존하기 위해 여러 신호 전달 물질을 생성 분비한다. 저산소에 의한 신호는 HIF-1 α 단백질을 증가시켜 산소 운반을 높이거나 산소 소비를 줄이는데 관여하는 여러 유전자를 발현시키며, HIF-1 α 단백질이 저산소에 의한 유전자 발현의 조절

에 핵심 역할을 하고 있다.^{15,16)}

여러 보고에서 종양내의 산소 농도와 방사선 치료 후 성적과 밀접한 관련이 있음을 밝혔다.^{2~4)} Hockel 등^{17,18)}은 종양 내의 저산소 상태는 자궁 경부암의 수술 후 치료 실패와 관련이 있음을 관찰했고 종양의 생물학적 악성도와도 관련이 있다고 하였다. 또한 HIF-1 α 는 인간의 여러 종류의 종양에서 증가되어 있음이 확인되었다.¹⁹⁾ 악성도가 높은 악성 신경 교종(malignant glioblastoma)에서는 HIF-1 α 가 강하게 발현되어 HIF-1 α 의 발현 정도와 종양의 악성도와 관련이 있음을 시사했고, 특히 괴사 주변부에서 많이 발현되고 있어 만성 저산소 지역과 HIF-1 α 발현 지역이 일치하고 있음을 보였다.²⁰⁾

HIF-1 α 의 발현과 예후와의 관계에 대한 연구에서 Haugland 등²¹⁾은 자궁경부암에서 HIF-1 α 의 발현 정도와 무병생존율, 전이 그리고 종양의 크기를 비교하였을 때 통계학적 유의한 차이를 발견하지 못했으나, Birner 등^{22~24)}은 조기 자궁경부암, 상피성 난소종양, oligodendroglioma, 그리고 림프절 전이가 있는 유방암에서 HIF-1 α 의 과발현은 나쁜 예후 인자라고 했다.

본 연구에서는 쥐의 간암 세포주인 Hepa1c1c7 세포와 유방암 세포주인 MCF7 세포에 DFX를 처리하고 방사선을 조사했을 때 DFX만 처리했을 때보다 HIF-1 α 가 더 증가함을 관찰했다. 이는 저산소증의 유무에 따라 방사선에 의한 HIF-1 α 의 발현 정도가 차이가 있을 수 있음을 보여주었다 (Fig. 1).

또한 Hepa1c1c7 세포와 HIF-1 β 가 결손되어 HIF-1 α 의 기능이 억제된 세포주인 Hepa1C4 세포에 DFX 처리하여 HIF-1 α 의 발현을 유도한 뒤 방사선을 조사하여 방사선량에 따른 세포 생존율과 apoptosis를 HIF-1 α 발현 유무에 따라 비교하였다. Hepa1c1c7 세포의 경우 DFX를 처리하여 HIF-1 α 를 유도한 군이 그렇지 않은 군보다 세포 생존율이 높고 apoptosis가 적게 일어나 DFX에 유도된 HIF-1 α 가 방사선 저항성을 유발한 것으로 생각되었으나 Hepa1C4 세포의 경우는 DFX 처리를 해도 HIF-1 α 가 증가하지 않았고 DFX 처리에 따라 세포 생존율과 apoptosis의 변화도 없어 DFX가 방사선 민감도에 영향을 미치지 못한 것으로 생각되었다. 그 기전으로 iron chelator인 DFX가 hydroxyl radical (OH \cdot) 형성과 oxidative stress를 감소시켜 방사선에 의한 apoptotic cell death를 억제하였다고 생각할 수 있으나,^{25,26)} HIF-1 β 의 결핍으로 HIF-1 α 의 기능이 억제된 Hepa1C4 세포에서는 DFX의 이러한 apoptosis 추가 억제 효과는 관찰되지 않았고 방사선에 의해 DFX에 의한 HIF-1 α 의 발현이 증가한 점을 미루어 HIF-1 α 와 그 표적 유전자가 radiation

induced apoptotic cell death를 억제하는 데 관여했을 것으로 생각된다. 이러한 결과는 iron chelator가 HIF-1와 ATF-1/CREB 전사 인자를 유도하고 해당과정에 관여하는 효소, p21^{waf1/cip1}, 그리고 erythropoietin 유전자의 발현을 증가시켜 oxidative stress에 대해 세포보호 작용을 한다는 Zaman 등¹¹⁾의 주장과 유사하다.

Apoptosis에 대한 HIF-1의 역할에 대해서는 현재로서는 HIF-1이 apoptosis를 증가시킨다는 주장과 apoptosis를 억제한다는 상반된 주장이 있다.²⁷⁾ 저산소 상태에서 Bcl-2 family의 pro-apoptotic member인 Nip3가 증가하는데 HIF-1 α 가 결핍된 세포에서는 증가하지 않았고,^{28,29)} HIF-1 α 는 DNA damage에 대해 cell death 혹은 growth arrest에 중요한 역할을 하는 p53 종양억제 단백질을 안정화시켰으며 이는 HIF-1 α 의 축적과 평행하게 이루어지고 HIF-1 β 가 결핍된 세포에서는 이러한 것이 관찰되지 않았는데 이러한 결과는 HIF-1이 pro-apoptotic effect가 있음을 시사했다.^{30,31)} 그러나 몇몇 저자는 저산소 상태가 apoptosis를 억제하는 것으로 보고하고 있다. Dong 등은 저산소증이 staurosporine-induced apoptosis에 대해 콩팥의 근위 세뇨관 세포를 보호했으며, 이때 anti-apoptotic protein인 Mcl-1이 증가함을 보고했다.³²⁾ 또한 저산소증은 serum deprivation-induced apoptosis를 억제했으며 이때 Bax/Bcl-2 ratio가 감소했다는 보고도 있다.³³⁾ 또한 Akakura 등³⁴⁾은 췌장암 세포에서 HIF-1 α 가 과발현 됨으로 저산소증이나 영양 결핍에 대해 apoptosis가 적게 일어남을 보고하였다. 그러나 아직 HIF-1의 어떤 표적 유전자가 apoptosis를 억제하는지는 밝혀지지 않았다.

한편 방사선에 의한 cell death는 대부분 DNA의 double-strand break (DSB)에 의해 일어난다. 방사선에 의해 DSB이 발생하면 세포 내에는 DNA-damage response가 일련적으로 일어나며, 여기에 ATM 시스템과 ATR 시스템이 관여하는 것으로 알려졌다. DSB는 homologous recombination (HR)와 non-homologous end-joining (NHEJ) 두 가지 경로로 복구가 되며, 여기에는 많은 단백질이 관여하고 있다.³⁵⁾ 이들 DSB repair에 관여하는 단백질 발현에 결함이 있는 경우 방사선 감수성이 증가하는 것으로 보고되고 있다.³⁶⁾ 이중 세포의 oxidative DNA damage의 repair에 DNA base excision repair (BER) pathway가 중요하며 AP endonuclease인 Ape1/ref-1이 주요한 역할을 한다. 또한 Ape1/ref-1은 redox factor로서의 기능을 하여 Fos, Jun, HIF-1과 같은 암의 발달과 진행에 관여하는 여러 전사 인자를 유지하는데 관여한다.³⁷⁾ HIF-1 α 의 방사선 저항성에 대한 기전을 연구하기 위해서는 이들 단백질과 HIF-1 α 의 상호 작용에 대한 연구가 있어야

할 것이다.

본 연구에서 HIF-1 β 가 결손되어 HIF-1 α 의 기능이 억제된 세포와 그렇지 않은 세포에서 DFX로 HIF-1 α 를 유도하여 방사선 조사 후 세포 생존 곡선과 apoptosis를 관찰한 결과 유도된 HIF-1 α 에 의해 방사선 저항성을 나타냄을 관찰했다. DFX를 사용하여 생리적인 저산소 상태와는 다소 차이가 있을 것으로 생각되나 이러한 결과는 HIF-1 α 혹은 그 하위 신호 전달 물질이 방사선 저항성에 관여할 것으로 생각된다. HIF-1 α 가 방사선 저항성에 관여하는 구체적인 기전을 밝히는 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Dische S. Hypoxia and local tumour control. Part 2. *Radiother Oncol* 1991;20:9-11.
2. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 1998;48:149-156.
3. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, Dewhirst MW. Oxygenation of head and neck cancer: changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1999;53:113-117.
4. MacRae R, Shyr Y, Johnson D, Choy H. Declining hemoglobin during chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer is significant. *Radiother Oncol* 2002;64:37.
5. van den Breuk HA. Hyperbaric oxygen breathing and radiation therapy. *JAMA* 1971;217:948-949.
6. Coleman CN, Bump EA, Kramer RA. Chemical modifiers of cancer treatment. *J Clin Oncol* 1988;6:709-733.
7. Gray LH. Concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953;26:638-648.
8. Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol Med Today* 2000;6:157-162.
9. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4304-4308.
10. Aebbersold DM, Burri P, Beer KT, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-2916.
11. Zaman K, Ryu H, Hall D, et al. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. *J Neurosci* 1999;19:9821-9830.
12. Fertil B, Dertinger H, Courdi A, Malaise EP. Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves. *Radiat Res* 1984;99:73-84.
13. Taylor J. Calculating the mean inactivation dose [letter]. *Radiat Res* 1986;108:112.
14. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999;24:68-72.
15. Shimoda LA, Manalo DJ, Sham JS, Semenza GL, Sylvester JT. Partial HIF-1 α deficiency impairs pulmonary arterial myocyte electrophysiological responses to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L202-208.
16. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatr Res* 2001;49:614-617.
17. Hockel M, Schlenger K, Hockel S, Vaupel P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer Res* 1999;59:4525-4528.
18. Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509-4515.
19. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999;59:5830-5835.
20. Zagzag D, Friedlander DR, Margolis B, et al. Molecular events implicated in brain tumor angiogenesis and invasion. *Pediatr Neurosurg* 2000;33:49-55.
21. Haugland HK, Nygaard SJ, Tysnes OB. Combined effect of alkyl-lysophospholipid and vincristine on proliferation, migration and invasion in human glioma cell lines in vitro. *Anticancer Res* 1999;19:149-156.
22. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-4696.
23. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:1661-1668.
24. Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer* 2001;92:165-171.
25. Troy CM, Derossi D, Prochiantz A, Greene LA, Shelanski ML. Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J Neurosci* 1996;16:253-261.
26. Yonezawa M, Back SA, Gan X, Rosenberg PA, Volpe JJ. Cystine deprivation induces oligodendroglial death: rescue by free radical scavengers and by a diffusible glial factor. *J Neurochem* 1996;67:566-573.
27. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002;64:889-892.
28. Sower HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction

- of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001;61:6669-6673.
29. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9082-9087.
30. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 1994; 14:6264-6277.
31. An WG, Kanekal M, Simon MC, Maltepe E, Blagosklonny MV, Neckers LM. Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. *Nature* 1998;392:405-408.
32. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, et al. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276:18702-18709.
33. Baek JH, Jang JE, Kang CM, Chung HY, Kim ND, Kim KW. Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene* 2000;19:4621-4631.
34. Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, et al. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001;61:6548-6554.
35. Kim SH, Um JH, Dong-Won B, et al. Potentiation of chemosensitivity in multidrug-resistant human leukemia CEM cells by inhibition of DNA-dependent protein kinase using wortmannin. *Leuk Res* 2000;24:917-925.
36. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002;23:687-696.
37. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000;461:83-108.

Abstract

The Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 α by Desferrioxamine Induces Radioresistance in Mouse Hepatoma Cell Line

Byung Hyun Kwon, M.D

Department of Radiation Oncology, Pusan National University School of Medicine, Busan, Korea

Purpose: It is well known that the radiosensitivity of tumor cells can be significantly reduced under hypoxic conditions. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) plays a pivotal role in the essential adaptive responses to hypoxia. Therefore this study investigated the relationship between HIF-1 α expression and radiosensitivity.

Materials and Methods: Mouse hepatoma cell line hepa1c1c7 and HIF-1 β -deficient mutant cell line hepa1C4 were used to analyze the role of HIF-1 α on radiosensitivity. These cells were exposed for 6 h to desferrioxamine (DFX) before radiation. HIF-1 α expression was examined by Western blot. Apoptosis was assessed by DNA fragmentation, propidium iodide staining, and apoptotic cell death detection ELISA kit. Radiation sensitivity was determined using MTT assay. The radiobiological parameters, surviving fractions at 2 Gy and 8 Gy, and mean inactivation dose (MID) from the linear-quadratic model were used to assess radiation sensitivity in the statistical analyses.

Results: The expression of HIF-1 α was increased, whereas apoptosis was decreased, by radiation in the presence of DFX in hepa1c1c7, but not in hepa1C4. The radiosensitivity of hepa1C4 cells was not significantly affected by DFX treatment. The radiosensitivity of hepa1c1c7 cells was significantly decreased in the presence of DFX.

Conclusion: The expression of HIF-1 α by hypoxia-mimic agent DFX reduced apoptosis and radiosensitivity in mouse hepatoma cell line hepa1c1c7. These results suggested that HIF-1 α could be induced by irradiation in hypoxic cells of tumor masses, and that this might increase radioresistance in hypoxic cells.

Key Words: Hypoxia-inducible factor 1 α , Radiosensitivity, Hypoxia