

전리방사선과 Cisplatin이 신경아세포종세포와 섬유모세포에서 Peroxiredoxin I과 II 발현 및 세포생존율에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 방사선종양학교실

김 성 환 · 윤 세 철

목 적: 항산화 효소인 peroxiredoxin (Prx) I과 II가 유해자극에 의해서 유발되는 세포내 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 방어기전에 관여하는지 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법: SK-N-BE2C (신경아세포종세포)와 Rat2 (섬유모세포)에서 PrxI과 PrxII 발현을 보기 위하여 방사선 조사, cisplatin 단독투여 및 cisplatin-방사선조사병합투여 후에 PrxI과 PrxII에 대한 western blot을 시행하였다. 또한 N-acetyl-L-cysteine (NAC)에 의하여 PrxI과 PrxII 발현에 미치는 영향과 세포생존율을 함께 조사하였다. 두 종류 세포에 방사선조사, 다양한 농도의 cisplatin을 단독투여 및 방사선조사와 병합투여 시 생존율을 각각 분석하였고 SK-N-BE2C의 각 군에서 시간별 생존율을 관찰하였다.

결 과: PrxI의 발현은 SK-N-BE2C에서 방사선조사 후 60분까지 증가하였으나 NAC 전처치한 경우 방사선조사 후 60분에서는 대조군에 비하여 약간 증가하였다. Rat2에서는 방사선조사 후 NAC 전처치 여부에 관계없이 증가하지 않았다. PrxII의 발현은 두 가지 세포 모두에서 방사선조사와 NAC 전처치 여부에 관계없이 증가하지 않았다. SK-N-BE2C와 Rat2에서 다양한 농도의 cisplatin 단독투여나 cisplatin-방사선조사병합시에는 PrxI 및 PrxII의 발현은 증가하지 않았다. SK-N-BE2C와 Rat2에서 NAC 전처치 여부에 따른 방사선조사군 및 cisplatin-방사선조사병합군의 생존율을 각각 비교한 결과 PrxI의 발현이 증가되었고, NAC 전처치하였으며 cisplatin의 농도가 낮을수록 유의하게 생존율이 높았다. SK-N-BE2C에서 NAC를 전처치한 방사선조사군의 생존율이 NAC 전처치 안한 방사선조사군에 비하여 높은 경향만 보였으나, Rat2에서는 유의한 차이로 NAC를 전처치한 방사선조사군의 생존율이 높았다. SK-N-BE2C에서 시간별 생존율을 측정한 결과는 방사선조사군과 cisplatin-방사선조사병합군을 비교하면 방사선조사군이 빠른 세포생존율의 감소를 보였으며 12시간 때에 최대의 차이를 보였으나 48시간에서는 cisplatin-방사선조사병합군의 세포생존율이 유의하게 낮았다.

결 론: 방사선조사로 반응성 산소종이 증가되면 PrxI 발현이 증가되었으며 반응성 산소종 청소제인 NAC의 전처치에 의하여 PrxI의 발현이 감소되었다. Cisplatin은 PrxI의 발현을 억제하여 반응성 산소종에 의한 세포손상을 증가시키며 방사선으로 인한 세포치사효과를 증가시켰다고 판단된다. 이상의 결과로 PrxI의 발현여부가 방사선조사나 cisplatin의 세포치사기전에 부분적으로 관여하고 있을 것이라고 생각한다.

핵심용어: PrxI, PrxII, 전리방사선, Cisplatin, 소아신경아세포종세포, 쥐섬유모세포

서 론

전리방사선조사(방사선조사)나 특정 항암제투여가 세포내에 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)를 증가시키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 반응성 산소종은 단백질과 지

질의 과산화(peroxidation) 및 DNA 염기의 변이 혹은 효소활성의 변화 등을 일으켜 세포에 손상을 초래하며 편평상피암 세포에서 apoptosis를 유발한다는 보고도 있다.²⁾ 반응성 산소종에는 과산화음이온(superoxide anion), 과산화수소와 수산화기(hydroxyl radical) 등이 포함된다. 한편 세포내에는 catalase, superoxide dismutase (SOD) 등 항산화 효소(antioxidant enzyme)가 있어 반응성 산소종에 대하여 세포를 보호하는 기전이 있다.^{3,4)} 또 이들 효소의 증가는 방사선이나 특정 항암제에 대한 세포의 내성을 나타내기도 한다.^{4~6)}

이 논문은 2006년 11월 20일 접수하여 2006년 12월 13일 채택되었음.
책임저자: 윤세철, 강남성모병원 방사선종양학과
Tel: 031)249-7565, Fax: 031)242-3734
E-mail: kimandre@catholic.ac.kr

Peroxiredoxin (Prx)은 최근에 발견된 항산화 효소이며 단핵생물에서 포유류까지 다양한 생물에서 발견되고 있다.⁷⁾ Prx는 세포증식과 분화에 관여하며, 단백질의 산화를 막고, 세포 내 신호전달에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ Prx의 작용기전은 과산화수소와 과산화지질을 thioredoxin이 제공하는 전자를 이용해 환원시키며 다른 peroxidase와 차이점은 금속이나 prosthetic group 같은 산화환원 보조인자를 갖지 않는다는 점이다.⁹⁾ Prx은 6개의 아군으로 나뉘어지며 PrxI, PrxII, PrxIV와 PrxV는 세포질에 위치하며 PrxIII는 마이트콘드리아에, PrxVI의 위치는 밝혀지지 않은 상태이다.^{10,11)} Prx의 역할에 대해서는 저산소 뇌손상, ceramide나 etoposide로 유발되는 apoptosis를 막는다고 알려져 있을 뿐^{12,13)} 방사선조사와 cisplatin의 병합사용이나 각각 사용에 어떠한 영향을 주는지 보고된 바 없으며 방사선량 변화나 cisplatin의 농도 차이에 대한 반응도 알려진 바 없다. 또한 반응성 산소종 청소제인 N-acetyl-L-cysteine¹⁴⁾의 전처치가 Prx에 어떤 영향을 끼치는지도 알려져 있지 않다.

방사선선량의 결정은 저자의 별도실험에서 20 Gy 미만의 방사선조사에는 Prx의 발현증가가 적었으나 20 Gy의 방사선조사로 SK-N-BE2C (신경아세포종세포)에서 Prx의 발현을 western blot으로 구분 가능하였기에 20 Gy의 방사선조사를 이 실험에서 사용하였다.

이 연구의 목적은 반응성 산소종에 민감하게 반응한다고 알려진 SK-N-BE2C (신경아세포종세포)와 Rat2 (섬유모세포)¹⁵⁾ 두 가지 세포주에서 반응성 산소종을 유발하는 방사선조사와 항암제인 cisplatin의 단독투여, cisplatin-방사선조사병합사용 시 PrxI과 PrxII 발현 및 세포생존율에 미치는 영향을 알아보고, 이 두 세포에서 N-acetyl-L-cysteine의 전처치유무에 따른 변화도 함께 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포배양

실험에서 사용한 세포주는 쥐 섬유모세포에서 얻어진 Rat2 세포주와 소아 신경아세포종에서 얻어진 SK-N-BE2C 세포주로서 American Type Culture Collection (ATCC)에 따르면 Rat2는 Rat1 세포주의 5-bromo-2'-deoxyuridine에 대한 내성을 가진 세포주에서 나왔으며, SK-N-BE2C는 미국 Memorial Sloan Kettering Cancer Center에서 소아 신경아세포종으로부터 얻어진 세포주이다. 각각의 세포주들을 10% fetal calf 혈장과 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Rockville, MD)이 섞인 Dulbecco's modified essential media (DMEM)를 사용해 습도가 자동조절되는 5% CO₂ 배양기에

서 배양하였다. 세포배양 시 자극을 가하기 위하여 세포를 18시간 동안 혈장이 없는 배지에서 동일 조건으로 배양하였다.

2. 방사선조사

방사선조사는 선형가속기(Digital Mevatron MX2, Simens, Concord, NH)를 이용하여 선원중심축거리 100 cm에서 6 MV X선을 이용하여 분당 2 Gy로 20 Gy를 실온에서 일회 조사하였다.

3. Cisplatin투여 및 실험군

Rat2 및 SK-N-BE2C 세포주 각각에 대한 1, 10, 100, 1,000 µg/mL 농도의 cisplatin(Cisplan[®], 동아제약, 서울, 한국)을 투여하고 1시간 동안 배양하였으며 cisplatin 및 방사선조사 병합시는 방사선 조사 직전에 cisplatin을 투여하고 1 시간 동안 배양한 후 배지를 DMEM으로 교환해 주었다. 1 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC)(Sigma, St. Louis, MO)을 방사선조사나 cisplatin투여 전 45분 동안 세포에 첨가하여 반응성 산소종 청소효과를 얻도록 조작했다. 실험군은 20 Gy의 방사선조사군, 1, 10, 100, 1,000 µg/mL 농도의 cisplatin을 단독투여한 군 및 cisplatin과 20 Gy의 방사선조사병합투여군(병합군)으로 나누고 NAC 전처치여부에 따라 방사선조사군과 병합군을 아군으로 나누었다.

4. Western blot

세포는 용해 완충제[10 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 1% Triton X-100, 10% glycerol, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride, leupeptin (5 µg/mL), aprotinin (5 µg/mL), 1 mM EDTA]에서 준비하였다. Lysates의 농도는 BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL)로 결정하였고 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 기준으로 사용하였다. 단백질은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하였고 분리된 단백질은 nitrocellulose 막으로 옮겼다. PrxI와 PrxII의 특이 항체를 1차 항체로 이용하였고 alkaline phosphatase가 결합된 항토끼 IgG를 2차 항체로 이용하여 BCIP/NBT phosphatase substrate system (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD)으로 발현 정도를 확인하였다.

5. 생존율분석

세포생존율은 비색정량분석법(colorimetric assay)인 cell proliferation kit II (XTT)(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하였다. 96 well plate (Falcon,

Recton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)에 한 well당 5.5×10^3 개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양 후 방사선이나 cisplatin투여 후 측정하고자한 시간에 한 well당 XTT용액(sodium 3'-[1-(phenyl amino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate)(XTT, Roche Molecular Biochemicals) 5 mL와 electron-coupling reagent (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) 100 μ L의 비율로 섞어 한 well당 50 μ L의 XTT혼합액을 넣고 6시간 배양 후 ELISA 기계(Microplate Autoreader, Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT)를 이용하여 490 nm의 파장으로 흡광도를 구한 후 생존율을 산출하였다.

6. 통계

생존율을 비교 시 student t-test로 검정하였으며 통계 프로그램으로 Statview (Abacus Concepts, Berkeley, CA)를 이용하여 유의수준은 5% 이하로 하였다.

결 과

1. PrxI 및 II의 발현

방사선조사와 다양한 농도의 cisplatin이 SK-N-BE2C와 Rat2 세포주에서 PrxI과 PrxII의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 western blot을 시행하였다. SK-N-BE2C에서는 방사선조사 30분 및 60분 후에 PrxI이 점차 증가하였으며 NAC 전처치 후 방사선조사 30분 후에 대조군보다 PrxI이 증가하였으나 60분 후에는 약간 증가하였으며 PrxII는 방사선조사 후 30분과 60분 경과 및 NAC 전처치에 관계없이 변함이 없었다(Fig. 1). Rat2에도 아무런 변화가 없었다.

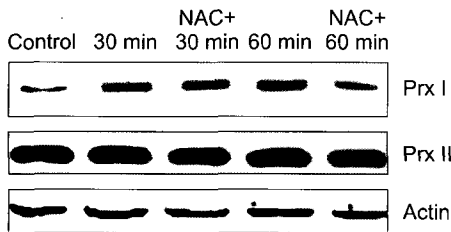


Fig. 1. Effects of 20 Gy irradiation and NAC (N-acetyl-L-cysteine) pretreatment on the expression of Prx (peroxiredoxin) I and PrxII in SK-N- BE2C cells. Western blot was done on the cells of control (no treatment), and 30 & 60 minutes following 20 Gy irradiation with or without NAC pretreatment. Compared to that of control, the amount of PrxI was increased up to 60 minutes either with or without NAC pretreatment, but there was a little decreased PrxI at 60 minutes after irradiation with NAC pretreatment. PrxII showed no changes.

SK-N-BE2C에서 방사선조사군에서는 PrxI이 증가함을 보였으나 cisplatin 단독투여나 병합군에는 PrxI 및 PrxII는 증가하지 않았다(Fig. 2). Rat2에서도 방사선조사군, cisplatin 단독투여군이나 병합군에서도 PrxI 및 PrxII의 변화는 없었다.

2. 세포 생존율

SK-N-BE2C와 Rat2 세포주에서 각각에 20 Gy의 방사선 조사와 1, 10, 100, 1,000 μ g/mL 농도의 cisplatin을 단독 혹은 20 Gy의 방사선조사와 병합투여하여 세포생존율을 분석하였다. 방사선조사군과 병합군에는 NAC으로 전처치여

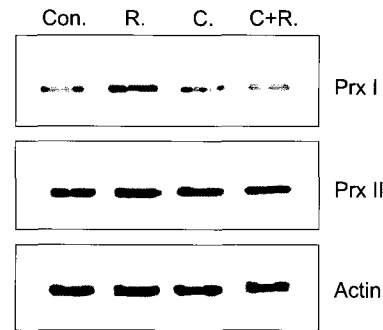


Fig. 2. Effects of 20 Gy irradiation, cisplatin and combination with cisplatin and 20 Gy irradiation on the expression of Prx (peroxiredoxin) I and PrxII in SK-N-BE2C cells. Western blot was done on the cells of control (Con.; no treatment), 20 Gy irradiation (R.), cisplatin (C.; 1 μ g/mL) and combination with cisplatin and 20 Gy irradiation (C+R.). The amounts of PrxI and PrxII did not change compared with that of control in all groups but a slight increase of PrxI was seen in irradiated group (R.).

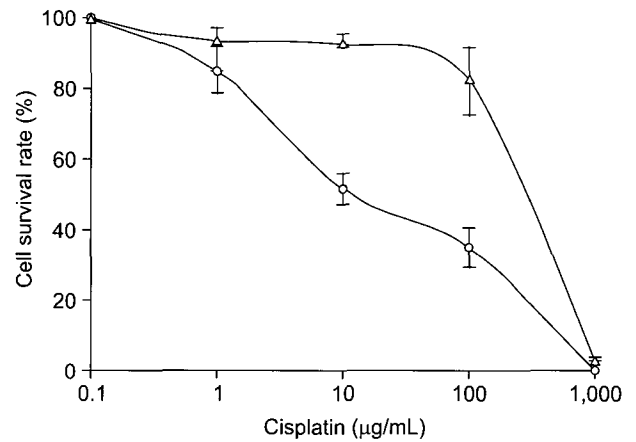


Fig. 3. Cell Survival rate (CSR) in SK-N-BE2C (○) and Rat2 (△) as a function of cisplatin concentration. CSR in SK-N-BE2C was decreased according to the increase in drug concentration. CSR in Rat2 showed the plateau at the initial low concentration and rapid decrease at higher concentrations.

부에 따라 별도 아군을 나누어 생존율을 구하여 비교 분석하였다.

Cisplatin 단독투여군의 생존율 결과를 보면 SK-N-BE2C에서는 cisplatin의 농도가 증가함에 따라 생존율이 반비례하여 감소함을 나타내었고 Rat2에서는 고평부를 이루다가 급격히 생존율이 감소하였다(Fig. 3).

방사선조사군과 병합군의 생존율을 보면 SK-N-BE2C에서 20 Gy의 방사선조사군은 5.18±0.84%의 생존율을 나타내었고 NAC를 전처치한 군에는 5.22±0.86%로 나와 NAC를 전처치한 군의 생존율이 높은 경향만 보였다(p=0.06)(Table 1). 또한 다양한 cisplatin 농도의 병합군에 대한 NAC 전처치 유무에 따른 생존율은 Table 1과 같다. NAC 전처치 안한 방사선조사군과 병합군을 비교하면 cisplatin 농도의 증가에 따른 생존율의 감소를 보이며 병합군의 생

Table 1. The survival rate of 20 Gy irradiation-only group and combination group with various concentrations of cisplatin and 20 Gy irradiation with or without N-acetyl-L-cysteine (NAC) pretreatment in SK-N-BE2C cell lines

Cisplatin concentration (μg/mL)	NAC pretreatment	No	Yes
Cisplatin & 20 Gy irradiation	0	5.18±0.84% [†]	5.22±0.86% [†]
	1	3.92±4.29% [†]	4.72±1.87%
	10	2.93±1.11% ^{*†}	5.50±0.17%
	100	1.94±0.52% ^{*†}	2.46±0.46% ^{*†}
	1,000	0.25±0.30% ^{*†}	0.10±0.45% ^{*†}

*p<0.05 vs. 20 Gy irradiation-only group, [†]p<0.05 vs. 20 Gy irradiation with NAC pretreatment group, [‡]p=0.06 20 Gy irradiation-only group vs. 20 Gy irradiation with NAC pretreatment group

Table 2. The survival rate of 20 Gy irradiation-only group and combination group with cisplatin and 20 Gy irradiation with or without N-acetyl-L-cysteine (NAC) pretreatment in Rat2 cell lines

Cisplatin concentration (μg/mL)	NAC pretreatment	No	Yes
Cisplatin & 20 Gy irradiation	0	1.95±0.16% [†]	2.92±0.47% [†]
	1	1.72±0.95% [†]	3.12±0.45%
	10	1.33±0.32% ^{*†}	2.35±0.07% [†]
	100	0.92±0.13% ^{*†}	1.54±0.32% [†]
	1,000	0.41±0.13% ^{*†}	0.71±0.14% ^{*†}

*p<0.05 vs. 20 Gy irradiation-only group, [†]p<0.05 vs. 20 Gy irradiation with NAC pretreatment group, [‡]p<0.05 20 Gy irradiation-only group vs. 20 Gy irradiation with NAC pretreatment group

존율이 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 1). NAC 전처치 안한 방사선조사군과 NAC 전처치한 병합군을 비교하면 100 μg/mL 이상에서 유의하게 병합군의 생존율이 낮았다(p<0.05)(Table 1). NAC 전처치한 방사선조사군과 NAC 전처치 안한 병합군의 생존율을 비교하면 모든 농도에서 병합군의 생존율이 낮았다(p<0.05)(Table 1). NAC 전처치한 방사선조사군과 NAC 전처치한 병합군을 비교하면 100 μg/mL 이상에서 병합군의 생존율이 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 1).

Rat2의 20 Gy의 방사선조사군과 병합군의 NAC 전처치 유무에 따른 생존율은 표 2과 같다. 즉 NAC 전처치 안한 20 Gy의 방사선조사군의 생존율은 1.95±0.16%이었고 NAC 전처치한 군은 2.92±0.47%로 유의한 차이가 있었다(p<0.05)(Table 2). 또한 NAC 전처치 안한 방사선조사군과 병합군을 비교하면 10 μg/mL 이상 농도에서 NAC 전처치 안한 병합군의 생존율이 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 2). NAC 전처치 안한 방사선조사군과 NAC 전처치한 병합군을 비교하면 1,000 μg/mL 이상에서 NAC 전처치한 병합군의 생존율이 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 2). NAC 전처치한 방사선조사군과 NAC 전처치 안한 병합군을 비교하면 NAC 전처치 안한 병합군이 모든 농도에서 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 2). NAC 전처치한 방사선조사군과 병합군을 비교하면 10 μg/mL 이상에서 병합군의 생존율이 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 2).

SK-N-BE2C에서 20 Gy의 방사선조사군, 1 μg/mL의 cisplatin 단독투여군과 병합투여군의 2, 6, 12, 48시간 세포생

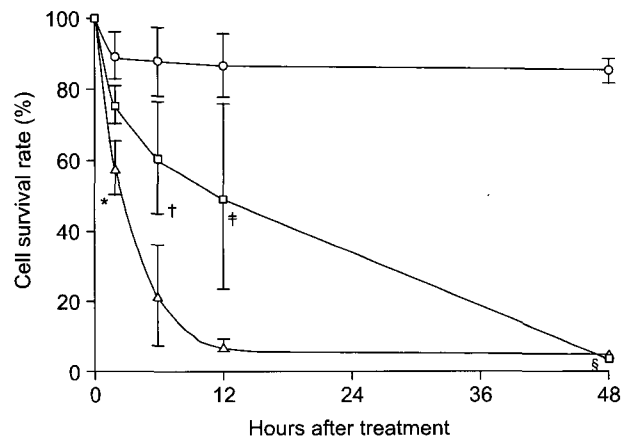


Fig. 4. Cell survival rate (CSR) in SK-N-BE2C as a function of time after treatment showed a rapid decrease in irradiation-only group (Δ) rather than in cisplatin only group (○) or combination group with both cisplatin and irradiation (□). Of these 3 groups, the irradiation only group revealed a statistically significant decrease in CSR before 48 hours but CSR in the irradiation only group and combination group was reversed at 48 hours. Each point represents mean±SD. *, †, ‡ and § represent statistical significance (p<0.05).

존율을 측정된 결과는 방사선조사군이 가장 빠른 세포 생존율의 감소를 보였다. 방사선조사군과 병합군을 비교하면 2시간 후부터 방사선조사군의 세포생존율이 유의한 차이를 보이며 감소했고($p < 0.05$) 12시간에 최대의 차이를 보였으나 48시간에서는 병합군이 유의하게 세포생존율이 낮았다($p < 0.05$)(Fig. 4).

고 찰

최근에 발견된 PrxI과 PrxII는 분자량이 25 kDa이며 다양한 세포의 세포질에 위치하며 비교적 양이 많다는 것이 밝혀졌다.¹⁰⁾ 항산화 효소로서의 작용기전은 PrxI과 PrxII는 thioredoxin이 공여하는 전자를 이용하여 과산화수소나 과산화지질을 환원시킨다.⁹⁾ 이러한 PrxI과 PrxII의 특징으로 catalase나 SOD보다 PrxI과 PrxII가 세포 내 반응성 산소종에 대한 방어작용에 중요한 부분을 차지할 것이라고 생각한다. Seo 등¹⁵⁾에 의하면 이산화규소와 같은 외부독성물질에 의해 유발된 반응성 산소종의 경우에는 PrxI과 PrxII가 빨리 소멸되는 것으로 나타나 반응성 산소종 제거에 관여한다고 보고하였다.

이 연구에서 SK-N-BE2C에 대한 전리방사선을 조사한 결과 통상 방사선치료시 사용되는 2 Gy의 방사선량에서는 PrxI의 발현이 변화하지 않고 10배나 많은 20 Gy에서 증가함이 관찰되었다. SOD의 경우 0.5 Gy의 방사선조사에도 유발되는 것¹⁶⁾에 비하면 상당히 많은 양의 방사선조사가 되어야 PrxI이 증가됨을 알 수 있었다. 그러므로 Seo 등¹⁵⁾의 결과로 볼 때 반응성 산소종을 제거하기 위해 PrxI이 증가했다고 판단된다. PrxI의 경우 20 Gy의 방사선조사 후 상당히 빠르게 단백질발현이 증가함을 알 수 있었다. Ueta 등²⁾에 의하면 SOD는 방사선조사 후 12시간에 가장 높은 발현도를 보이고 점차 감소하는 추세를 보였다. 이러한 결과를 보았을 때 PrxI은 방사선량이 어느 정도 이상에 도달해야 즉시 발현이 증가하는 항산화 효소라고 생각한다.

항산화 물질로 알려진 NAC를 전처치 후 방사선조사를 하면 60분 후에 PrxI의 발현이 감소하는데 이에 대한 이유는 NAC의 보호효과로 반응성 산소종이 감소되어 PrxI의 생산이 감소된 것이라고 생각된다. SK-N-BE2C에서는 20 Gy의 방사선조사 후에는 PrxI의 양이 증가되었으나 cisplatin 단독 투여군이나 병합군에서 PrxI의 양은 증가하지 않았다. Cisplatin은 DNA polymerase I, RNA polymerase와 RNA translation도 억제한다고 알려졌다.^{17~19)} 이러한 사실을 종합하여 볼 때 cisplatin이 DNA나 RNA에 작용을 하여 특정 단백질 발현을 억제하고 이에 따라 PrxI의 생산도 억제된

것으로 판단된다. 또한 병합군에서도 이러한 기전을 통해 방사선에 의해 유발되는 PrxI의 증가를 막는 것으로 판단된다. Rat2에서는 방사선조사군, cisplatin 단독투여군이나 병합군에도 PrxI이 증가하지 않아 PrxI의 방어기전이 안 생기거나 방사선 및 cisplatin 농도의 작용반응 시간 등이 관제할 것으로 생각한다.

이 연구의 세포생존율 결과에 의하면

첫째, NAC 전처치 안한 방사선조사군과 NAC 전처치한 방사선조사군의 생존율을 비교하면 SK-N-BE2C에서는 유의한 경향만을 보였는데 이것은 NAC 전처치 안한 군에서 PrxI의 발현 증가로 반응성 산소종에 대한 세포보호효과가 생기며 NAC 전처치군에서는 PrxI의 발현증가가 비교적 감소하였으나 NAC의 반응성 산소종에 대한 청소효과로 두 군의 반응성 산소종에 대한 비슷한 보호효과능력 때문인 것으로 판단된다. Rat2에서는 PrxI의 생산이 없기 때문에 반응성 산소종에 대한 세포보호작용이 작아서 NAC 전처치군에서 생존율이 유의하게 높았다.

둘째, NAC 전처치 안한 방사선조사군과 NAC 전처치 안한 병합군의 생존율을 비교하면 SK-N-BE2C에서는 cisplatin의 모든 농도에서 방사선조사군보다 유의하게 병합군의 생존율이 낮았는데 이는 cisplatin이 PrxI의 발현을 막아 생존율이 낮은 것으로 판단된다. Rat2에서는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상부터 유의하게 병합군의 생존율이 감소되었는데 이것은 일정 농도이상에서 cisplatin과 방사선의 효과가 상승효과를 보여 이러한 결과로 나타난 것으로 판단된다.

셋째, NAC 전처치 안한 방사선조사군과 NAC 전처치한 병합군의 생존율을 비교하면 SK-N-BE2C에서는 cisplatin의 농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상부터 방사선조사군보다 유의하게 병합군의 생존율이 낮았는데 이는 방사선조사군은 PrxI의 증가로 세포보호 작용이 있으며 병합군에서는 NAC의 보호 효과가 있으나 cisplatin의 농도가 증가함에 따라 cisplatin과 방사선의 상승효과가 NAC의 세포보호 작용을 상쇄시켜 생존율이 감소했다고 판단된다. Rat2에서는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게 생존율이 감소되었는데 이것은 방사선 조사군에서는 PrxI과 NAC의 세포보호효과가 없고 병합군에서는 NAC의 보호효과가 있어 일정농도 이하의 cisplatin에서는 생존율이 방사선조사군과 비슷한 것으로 생각한다.

넷째, NAC 전처치한 방사선조사군과 NAC 전처치 안한 병합군의 생존율을 비교하면 SK-N-BE2C에서는 cisplatin의 모든 농도에서 방사선조사군보다 유의하게 병합군의 생존율이 낮았는데 이는 방사선조사군에서 NAC 전처치로 PrxI의 발현증가는 비교적 적으나 PrxI과 NAC의 세포보호효과가 있고 병합군에서는 PrxI의 발현을 cisplatin이 억제하여

나온 결과일 것이라고 판단된다. Rat2에서는 병합군이 모든 cisplatin의 농도에서 유의하게 생존율이 감소되었는데 이것은 방사선조사군의 NAC로 인한 세포 보호효과로 판단된다.

다섯째, NAC 전처리한 방사선조사군과 NAC 전처리한 병합군의 생존율을 비교하면 SK-N-BE2C에서는 100 µg/mL 이상 cisplatin 농도의 병합군이 방사선조사군보다 생존율이 유의하게 낮았는데 이는 방사선조사군에서 PrxI의 발현 증가는 비교적 적었으나 PrxI과 NAC의 세포보호효과가 있고 병합군에서는 PrxI의 발현을 cisplatin이 억제하고 NAC의 세포보호효과만 있어 cisplatin의 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소한 것이라고 판단된다. Rat2에서는 병합군이 10 µg/mL 이상의 cisplatin 농도에서 유의하게 생존율이 감소되었는데 이것은 낮은 농도의 cisplatin에 대한 NAC의 세포 보호효과 때문으로 사료된다.

여섯째, SK-N-BE2C에서 시간별 생존율을 측정할 실험에서 1 µg/mL의 cisplatin을 사용한 이유는 cisplatin으로 인한 세포생존율의 감소를 적게 하기 위해서이며 다른 이유는 1 µg/mL의 cisplatin도 PrxI의 발현을 억제시켰기 때문이다. 결과를 보면 20 Gy의 방사선조사군이 1 µg/mL의 cisplatin과 20 Gy 방사선조사 병합군보다 생존율이 유의하게 빠르게 감소하였으며 12시간에 최대의 차이가 났으나 48시간 후에는 병합군이 유의하게 생존율이 낮게 관찰되었다. 이는 1 µg/mL의 cisplatin이 방사선으로 인한 세포사멸을 일정시간 동안 연장시켰다는 것을 의미한다. Caney 등²⁰⁾에 따르면 0.05, 0.25 혹은 1 Gy의 저선량의 방사선을 60분 전에 조사한 후 저 농도의 cisplatin을 투여하면 cisplatin에 대한 세포의 내성이 증가하며 cisplatin을 먼저 투여 후 저선량의 방사선을 조사하면 세포의 내성에는 차이가 없었다고 보고했다. Dempke 등²¹⁾은 방사선조사 후 cisplatin에 내성을 가지는 원인을 DNA손상에 대한 회복증진과 내성증가로 설명하였다. 이 연구에서는 세포종류가 다르며 사용한 방사선량이 높은 것을 제외하고 저농도의 cisplatin이 먼저 투여된 후 방사선이 조사되었으나 Caney 등²⁰⁾의 결과와 비교하면 반대의 결과가 나온 것으로 생각한다. 이에 대한 설명은 Cregan 등²²⁾에 의하면 사람 임파구에서 DNA를 손상시키는 약제들은 DNA손상에 따른 단백질 생산에 의존하는 느린 과정의 apoptosis를 유발하며 세포막의 산화와 관련된 물질은 단백질 생성과 관련이 없는 빠른 과정의 apoptosis를 유발한다. 또한 Giusti 등²³⁾에 의하면 전리방사선량이 증가함에 따라 세포막의 산화손상을 지수함수적으로 일으킨다고 하였다. 이 실험에서 조사된 20 Gy는 고선량으로써 세포막에 산화손상을 일으켜 빠른 과정의 apop-

toxis를 일으켰으며 먼저 투여된 1 µg/mL의 cisplatin이 느린 과정의 apoptosis를 먼저 일으켜서 20 Gy의 방사선으로 인한 빠른 apoptosis를 막는다고 생각한다. 그리고 48시간에 병합군이 방사선조사군보다 생존율이 유의하게 낮았는데 이것은 cisplatin이 PrxI 발현을 막아 생긴 현상으로 판단된다. 또한 PrxI의 발현이 비교적 단기적으로 세포생존율에 영향을 미치는 것이 아니라 비교적 장기적인 효과로 나타난다고 판단된다.

이상의 실험 결과로 PrxI이 방사선조사 후 빠른 시간에 증가함을 관찰하였으며 반응성 산소종 청소제인 NAC 전처리에 의하여 PrxI의 발현이 감소되었으며 방사선조사의 경우 반응성 산소종에 대한 세포반응으로서 PrxI이 증가한다고 판단된다. Cisplatin 단독투여는 PrxI을 증가시키지 않으며 방사선조사에 의해 유발되는 PrxI의 증가를 억제시키는 현상과 세포생존을 변화 등을 고려할 때 cisplatin과 방사선의 병합치료를 반응성 산소종에 대한 세포의 PrxI의 생성을 막아 세포치사효과를 상승시켜준다고 판단된다. 또한 방사선조사군이 병합군보다 생존율이 빨리 감소되나 48시간 후에는 병합군의 생존율이 더 감소되어 PrxI이 비교적 장기적으로 세포 생존율에 영향을 미치는 것으로 해석할 수 있다. 앞으로 동일한 세포주에서 PrxI의 유전자를 소실시킨 군과 PrxI 유전자가 존재하는 군에서 방사선조사나 cisplatin에 대한 생존율을 비교한다면 PrxI의 역할을 보다 잘 규명할 수 있을 것이라고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Zhang JG, Lindup WE. Differential effects of cisplatin on the production of NADH-dependent superoxide and the activity of antioxidant enzymes in rat renal cortical slices in vitro. *Pharmacol Toxicol* 1996;79:191-198
2. Ueta E, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Manganese superoxide dismutase negatively regulates the induction of apoptosis by 5-fluorouracil, peplomycin and gamma-rays in squamous cell carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1999;90: 555-564
3. An JH, Kim J, Seong J. Proteomics of protein expression profiling in tissues with different radiosensitivity. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 2004;22:298-306
4. Sun J, Chen Y, Li M, Ge Z. Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance. *Free Radic Biol Med* 1998;24: 586-593
5. Ramu A, Cohen L, Glaubiger D. Oxygen radical detoxification enzymes in doxorubicin-sensitive and -resistant P388 murine leukemia cells. *Cancer Res* 1984;44:1976-1980
6. Chlopkiewicz B, Gruber B. The in vitro study on genotoxic activity of adriamycin and bleomycin in cells of mice with

- different catalase and superoxide dismutase activity. *Acta Pol Pharm* 1997;54:437-441
7. **Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG.** Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994;269:27670-27678
 8. **Lee TH, Yu SL, Kim SU, Lee KK, Rhee SG, Yu DY.** Characterization of mouse peroxiredoxin I genomic DNA and its expression. *Gene* 1999;239:243-250
 9. **Chae HZ, Robinson K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG.** Cloning and sequencing of thiol-specific anti-oxidant from mammalian brain: Alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of anti-oxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7017-7021
 10. **Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG.** Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:101-112
 11. **Matsumoto A, Okado A, Fujii T, et al.** Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member. *FEBS Lett* 1999;443:246-250
 12. **Ichimiya S, Davis JG, O'Rourke DM, Katsumata M, Greene MI.** Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA Cell Biol* 1997;16:311-321
 13. **Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM.** Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* 1997;272:30615-30618
 14. **Tuttle S, Horan AM, Koch CJ, Held K, Manevich Y, Biaglow J.** Radiation-sensitive tyrosine phosphorylation of cellular proteins: sensitive to changes in GSH content induced by pretreatment with N-acetyl-L-cysteine or L-buthionine-S,R-sulfoximine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:833-888
 15. **Seo MS, Kim JK, Lim Y, et al.** Rapid degradation of PrxI and PrxII induced by silica in Rat2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:541-544
 16. **Yamaoka K, Kojima S, Nomura T.** Changes of SOD-like substances in mouse organs after low-dose X-ray irradiation. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1999;31:23-28
 17. **Gralla JD, Sasse-Dwight S, Poljak LG.** Formation of blocking lesions at identical DNA sequences by the nitrosourea and platinum classes of anticancer drugs. *Cancer Res* 1987;47:5092-5096
 18. **Rosenberg J, Sato P.** Messenger RNA loses the ability to direct in vitro peptide synthesis following incubation with cisplatin. *Mol Pharmacol* 1988;33:611-616
 19. **Corda Y, Anin MF, Leng M, Job D.** RNA polymerases react differently at d (ApG) and d (GpG) adducts in DNA modified by cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry* 1992;31:1904-1908
 20. **Caney C, Bulmer JT, Singh G, Lukka H, Rainbow AJ.** Pre-exposure of human squamous carcinoma cells to low-doses of gamma-rays leads to an increased resistance to subsequent low-dose cisplatin treatment. *Int J Radiat Biol* 1999;75:963-972
 21. **Dempke WC, Shellard SA, Hosking LK, Fichtinger-Schepman AM, Hill BT.** Mechanisms associated with the expression of cisplatin resistance in a human ovarian tumor cell line following exposure to fractionated X-irradiation in vitro. *Carcinogenesis* 1992;13:1209-1215
 22. **Cregan SP, Smith BP, Brown DL, Mitchel RE.** Two pathways for the induction of apoptosis in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1999;75:1069-1086
 23. **Giusti AM, Raimondi M, Ravagnan G, Sapora O, Parasassi T.** Human cell membrane oxidative damage induced by single and fractionated doses of ionizing radiation: a fluorescence spectroscopy study. *Int J Radiat Biol* 1998;74:595-605

Abstract

Effects of Ionizing Radiation and Cisplatin on Peroxiredoxin I & II Expression and Survival Rate in Human Neuroblastoma and Rat Fibroblast Cells

Sung Hwan Kim, M.D. and Sei-Chul Yoon, M.D.

Department of Radiation Oncology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose: This study investigated the influence of irradiation and cisplatin on PrxI & PrxII expression and on their survival rates (SR) in SK-N-BE2C and Rat2 cell lines.

Materials and Methods: The amount of PrxI & PrxII production with or without N-acetyl-L-cysteine (NAC) pretreatment was studied using a western blot after 20 Gy irradiation to determine the degree of inhibition of ROS accumulation. In addition, the amount of PrxI & PrxII production after cisplatin and after combination with cisplatin and 20 Gy irradiation was studied. The SRs of the cell lines in SK-N-BE2C and Rat 2 cells, applied with 20 Gy irradiation only, with various concentrations of cisplatin and with the combination of both, were studied. The 20 Gy irradiation-only group and the combination group were each subdivided according to NAC pretreatment, and corresponding SRs were observed at 2, 6, 12 and 48 hours after treatment.

Results: Compared with the control group, the amount of PrxI in SK-N-BE2C increased up to 60 minutes after irradiation and slightly increased after irradiation with NAC pretreatment 60 minutes. It did not increase in Rat2 after irradiation regardless of NAC pretreatment. PrxII in SK-N-BE2C and Rat2 was not increased after irradiation regardless of NAC pretreatment. The amounts of PrxI and PrxII in SK-N-BE2C and Rat2 were not increased either with the cisplatin-only treatment or the combination treatment with cisplatin and irradiation. SRs of irradiation group with or without NAC pretreatment and the combination group with or without NAC pretreatment were compared with each other in SK-N-BE2C and Rat2. SR was significantly high for the group with increased amount of PrxI, NAC pretreatment and lower the cisplatin concentration. SR of the group in SK-N-BE2C which had irradiation with NAC pretreatment tended to be slightly higher than the group who had irradiation without NAC pretreatment. SR of the group in Rat2 which had irradiation with NAC pretreatment was significantly higher than that the group which had irradiation without NAC pretreatment. Compared to the combination group, the irradiation-only group revealed statistically significant SR decrease with the maximal difference at 12 hours. However, at 48 hours the SR of the combination group was significantly lower than the irradiation-only group.

Conclusion: PrxI is suggested to be an antioxidant enzyme because the amount of PrxI was increased by irradiation but decreased pretreatment NAC, a known antioxidants. Furthermore, cisplatin may inhibit PrxI production which may lead to increase cytotoxicity of irradiation. The expression of PrxI may play an important role in cytotoxicity mechanism caused by irradiation and cisplatin.

Key Words: PrxI, PrxII, Ionizing radiation, Cisplatin, Rat2 cell line, SK-N-BE2C cell line