

MCF-7 세포주에서 γ 선에 의한 세포신호 전달 관련 유전자의 발현 양상의 분석

박지윤 · 황창일¹ · 박용양¹ · 김진규² · 채영규*

한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹서울대학교 의과대학 생화학교실,

²한국원자력연구소 동위원소 방사선 응용팀

Signal Transduction-related Gene Expression Analysis in MCF-7 followed by γ -radiation

Ji-Yoon Park, Chang-Il Hwang¹, Woong-Yang Park¹,
Jin-Kyu Kim² and Young-Gyu Chai*

Dept. of Biochem & Mol. Biol, Hanyang University Ansan 425-791, Korea

¹Dept. of Biochem, Seoul National University, College of Medicine Seoul 110-799, Korea

²RI Radiation Research Team, Korea Atomic Energy Research Institute 305-353, Korea

Abstract - There is considerable evidence that ionizing radiation (IR) mediates checkpoint control, repair and cell death. In this study, we have used a high density microarray hybridization approach to characterize the transcriptional response of human breast carcinoma MCF-7 cell line to γ -radiation, such as 4 Gy 4 hr, 8 Gy 4 hr, and 8 Gy 12 hr. We found that exposure to γ -ray alters by at least a log₂ factor of 1.0 the expression of 115 known genes. Of the 66 genes affected by γ -radiation, 49 are down-regulated. In our results, the cellular response to irradiation includes induction of the c-jun and EGR1 early response genes. The present work has examined potential cytoplasmic signaling cascades that transduce IR-induced signals to the nucleus. 40S ribosomal protein s6 kinase modulates the activities of the mitogen activated protein kinase (MAPK) and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK1) cascades in human monocytic leukemia (U937/pREP4) cells. 14-3-3 family members are dimeric phosphoserine-binding proteins that participate in signal transduction and checkpoint control pathways.

Key words : irradiation, MCF-7, cDNA microarray, cell signaling

서 론

방사선에 의해 유도되는 유전자의 발현 연구는 세포 내의 반응을 이해하는 데 매우 중요한 연구로서, 1967

년 이래 방사선 (ionizing radiation: IR)은 암의 치료에 사용되어 왔다 (Helsper *et al.* 1967). 방사선 치료는 방사선의 조직과피작용을 이용하는 것으로서 (Goldschmidt and Scherwin 1980) 방사선이 생체에 조사되면, 방사선 에너지가 생체를 구성하는 원자, 분자로 이동하여 화합물의 조성을 변화시켜 궁극적으로 세포 기능에 장애를 유도하고 세포의 증식을 저지하거나 세포사멸의 기작을

* Corresponding author: Young-Gyu Chai, Tel. 031-400-5513, Fax. 031-406-6316, E-mail. ygchai@hanyang.ac.kr

통해 방사선이 조사된 부분의 조직을 파괴한다.

방사선 치료의 주요 대상인 유방암은 임상적으로 중요한 질병이며 (Hortobagyi 1998) 이러한 질병의 치료를 위해 유선의 발암 기작을 이용한 호르몬제와 세포파괴제재가 현재 개발되고 있다. 방사선에 민감한 세포로 알려진 MCF-7 세포 (O'Connor *et al.* 1997; Fornace *et al.* 1999; Soto *et al.* 2000)는 외부의 유전독성 스트레스에 대한 반응성이 뛰어나 방사선 연구에 주로 적용되는 세포주이다.

유전독성 스트레스는 세포에서 스트레스 관련 신호를 유도하여 세포 내의 신호 전달에 작용한다. 방사선 처리에 의해 40S 리보솜 단백질 s6 키나아제 (40S ribosomal protein s6 kinase; Kharbanda *et al.* 1994)가 활성화 되면 c-jun, EGR1의 초기 유전자의 발현을 유도하여 세포질의 신호 전달체계에 작용하여 방사선에 유도된 신호를 핵으로 전달한다. 유사분열물질의 활성화 단백질 키나아제 (Mitogen activated protein kinase (MAPK))는 단구성 백혈병 (human monocytic leukemia (U937/pREP4)) 세포주에서 c-Jun 아미노기 말단 키나아제 (NH₂-terminal kinase (JNK1))의 신호 전달에 작용하는 것으로 보고되었다 (Cartee *et al.* 2000). 14-3-3 단백질은 이합체 포스포세린 결합 단백질 (dimeric phosphoserine-binding protein)로서 세포사를 억제하고, JNK1과 MAPK의 신호 전달에 관여한다 (Xing *et al.* 2000).

따라서, 본 연구는 방사선 조사에 따른 암의 치료 효과를 고찰하기 위해, MCF-7 세포에 조사한 방사선량과 방사선 처리 후 배양 시간에 따른 유전자의 발현 양상을 cDNA microarray를 사용하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포의 배양

방사선 조사에 사용된 MCF-7 (Pratt and Pollak 1993) 세포는 한양대학교 의과대학 유전학실의 이철훈 교수 연구실에서 분양받았다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, N.Y. USA), 100 units ml⁻¹의 penicillin, 100 μ l ml⁻¹의 streptomycin (Gibco-BRL, N.Y. USA) 이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco-BRL)을 이용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 12시간 배양하였다.

2. 방사선의 조사

방사선 처리를 위해 서울대학교 의과대학의 기기



Fig 1. Confirmation of total RNA in 1% agarose gel electrophoresis. lane 1: Total RNA of Control group, lane 2: Total RNA of 4GY4H, lane 3: Total RNA of 4GY8H, lane 4: Total RNA of 8GY12H.

(MK01-68 Cs-137 irradiator)를 이용하였고, 방사선 기준량은 282.2 cGy min⁻¹이었다. MCF-7 세포에 처리한 방사선 조사량과 방사선 조사 후 배양 시간에 따라 실험군 A, B, C로 나누었으며 (Cartee *et al.* 2000; Fornace *et al.* 1999), 각 실험군의 조건은 방사선 치료에 적용되는 10 Gy 이내의 방사선량을 조사하였으며, 각각의 실험군은 다음과 같다. 실험군 A는 4 Gy (1분 25초)의 방사선 조사 후 4시간 배양하였고 (4GY4H), 실험군 B는 8 Gy (2분 50초)로 쪼여준 후 4시간 배양하였으며 (8GY4H) 실험군 C는 8 Gy (2분 50초)의 방사선을 처리하여 12시간 배양하였다 (8GY12H).

3. Total RNA 분리 및 확인

Total RNA는 trizol 방법 (Gibco-BRL)에 의해 각 실험군 A (4GY4H), B (8GY4H), C (8GY12H)에서 분리하였다 (Chomczynski and Sacchi 1987). 정제된 RNA는 1% 포름알데하이드 아가로스 겔에서 확인하였다 (Lehrach *et al.* 1977).

4. Probe 준비

3개의 실험군 A, B, C로부터 DNA 프로브를 합성하여 cy3와 cy5를 혼합한 표지를 붙였다.

5. Prehybridization of arrays

본 연구에서는 마크로젠의 2.4 K cDNA microarray를 사용하였으며, array 위에 준비한 전하이브리드 용액 (prehybridization buffer) 15 μ l를 넣고 덮개 유리로 덮어 상온에서 2시간 동안 놓아 두었다. 방치 후에는 2 \times ssc (saline sodium citrate buffer), 0.2 \times ssc에서 각각 2분간 세정하고 원심 분리로 140 \times g에서 3분간 건조하였다.

6. Hybridization and Scanning

합성된 DNA 프로브 15 μ l는 단일 가닥으로 만들고 덮개 유리를 덮어 62°C 하이브리드 형성기 (hybridization incubator; Finemould Precision. Co. Combi-H)에서 12 시간 동안 하이브리드를 만들었다. 세정은 시트레이트 생리식염수 용액 (2 \times ssc/0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS))으로 58°C에서 30분 동안 2번, 0.05 \times ssc로 5분간 상온에서 씻어 원심분리로 140 \times g에서 3분간 건조하였다. 실험 결과의 분석은 GMS418 스캐너 (Genetic Micro System)의 Imagen 3.0 프로그램을 실행하여 각각 적색과 녹색 파장에서 이미지를 저장하였으며 이미지의 비교 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

1999년 보고된 Fornace 그룹의 연구는 1.2K의 cDNA microarray를 사용하여 ML-1, Molt4, SR, A549, MCF7, RKO cell에 20 Gy의 γ 선을 처리한 후 4시간 배양하였을 때 유전자 발현 양상을 분석한 연구였다. 이 연구에 따르면, 방사선 조사에 의한 발현 변화를 나타낸 유전자 중 38개의 유전자는 발현이 증가되었고, 11개의 유전자는 발현이 감소된 것으로 나타났다.

본 연구는 방사선의 조사량과 반응 시간에 따른 유전자의 발현 양상을 고찰하는 데 의의를 두었으며, 3가지 실험군 A, B, C에 따른 유전자 발현 패턴을 살펴보았다. 비교 유전자는 lambda DNA 단편을 사용하였고, 실험군 A, B, C로부터 각각 0.46, 0.47, 0.45의 Pearson 상관값을 얻어 3가지 실험군의 유의성을 확인할 수 있었다.

유전자의 발현 변화는 \log_2 값을 기준으로 발현의 증가 및 감소를 파악하였다 (Eisen *et al.* 1998). 이러한 기준에 따라 비교 유전자로 선택한 lambda DNA 단편보다 \log_2 값이 1배 이상 (즉, control보다 2배 이상) 발현된 유전자에 제한하여 발현의 변화를 고찰할 수 있었다. 115개의 발현의 변화를 나타낸 유전자들 중 66개의 유전자의 발현이 증가되었으며, 49개의 유전자의 발현이 감소되었다 (Table 1).

방사선에 의해 발현의 변화를 나타낸 스트레스 관련 유전자들은 14-3-3 eta 단백질, ERK1, 40S 리보솜 단백질 s6, c-myc 결합 단백질, ring finger 단백질, 전사조절 인자 IRF-1으로 관찰되었다 (Table 2).

MAPK는 단구성 백혈병 세포에서 2 Gy의 낮은 강도에 의해 JNK1의 신호 전달에 작용하는 것으로 보고되었으며 (Kharbanda *et al.* 1994), 본 연구에서는 MAPK 신호가 4 Gy의 높은 방사선에 의해 충분히 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

14-3-3 단백질은 세포사를 억제하고, JNK1과 MAPK의 신호 전달에 관여하며 (Cartee *et al.* 2000), 암 유전자 CpG island의 과메틸화 (hypermethylation)의 활성화를 억제함을 밝혀낼 수 있었다 (Suzuki *et al.* 2000).

결론

1. 본 연구는 유전자의 발현양상 변화의 고찰을 위해 MCF-7 세포에 방사선을 조사하여 cDNA microarray를 이용하여 유전자의 발현 변화를 살펴보았다.
2. 방사선 조사에 의한 발현 패턴의 변화를 나타낸 유전자는 세포의 신호 전달에 관련된 14-3-3 단백질, ERK1, s6 키나아제 유전자임을 밝혀낼 수 있었다.
3. Cyclin D1 농도는 동측 유방암재발 (ipsilateral breast tumor recurrence; IBTR)의 중요한 예후 판단의 지표로서 방사선 치료 결정에 작용할 것으로 파악된다.

Table 1. The transcriptional response of MCF-7 cell line to γ -radiation

Treatment	Number of known genes	
	Induced	Repressed
4 Gy 4 hr	27	11
8 Gy 4 hr	25	17
8 Gy 12 hr	14	21
Total	66	49

*We found that exposure to γ -ray alters by at least a \log_2 factor of 1.0 the expression of 115 known genes and of an equivalent number of expressed sequence tags in the following conditions of 4 Gy 4 hr, 8 Gy 4 hr, and 8 Gy 12 hr.

Table 2. Gamma-radiation induced fold changes in expression of genes involved in Ras/MAPK-related signaling pathways

Accession	Gene name	4Gy4H	8Gy4H	8Gy12H	Function
X80536	14-3-3 eta protein	3.2	1.5	3.0	MAPK regulation
AQ935927	ERK1, protein serine/threonine kinase	1.5	1.2	1.1	MAPK pathway
BF475811	40S ribosomal protein S6	2.4	1.8	1.5	MAPK signaling cascade
M55914	c-myc binding protein	2.3	1.8	1.2	c-myc upregulation
BF434894	Ring finger protein	1.8	2.3	1.1	Tumor suppression by BRCA1
AJ271052	Transcription factor IRF-1	2.4	2.2	1.2	Regulation of the interferon system

사 사

본 연구는 과학기술부의 원자력기초연구사업 (1999. 12~2001. 8)의 일환으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Cartee L, JA Vrana, Z Wang, JS Park, M Birrer, PB Fisher, S Grant and P Dent. 2000. Inhibition of the mitogen activated protein kinase pathway potentiates radiation-induced cell killing via cell cycle arrest at the G2/M transition and independently of increased signaling by the JNK/c-Jun pathway. *Int. J. Oncol.* 16:413-422.
- Chomczynski P and N Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Eisen MB, PT Spellman, PO Brown and D Botstein. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14863-14868.
- Fornace AJ Jr, SA Amundson, M Bittner, Y Chen, J Trent and P Meltzer. 1999. Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18:3666-3672.
- Fornace AJ Jr, SA Amundson, M Bittner, TG Myers, P Meltzer, JN Weinstein and J Trent. 1999. The complexity of radiation stress responses: Analysis by informatics and functional genomics approaches. *Gene Expr.* 7:387-400.
- Goldschmidt H and WK Sherwin. 1980. Reactions to ionizing radiation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 3:551-579.
- Helsper JT, GS Sharp and DE Rounds. 1967. The synergistic effect of laser radiation and ionizing radiation on malignant tumors *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med.* 99:446-449.
- Hortobagyi GN. 1998. Treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 339:974-984.
- Kharbanda S, A Saleem, T Shafman, Y Emoto, R Weichselbaum and D Kufe. 1994. Activation of the pp90rsk and mitogen-activated serine/threonine protein kinases by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5416-5420.
- Lehrach H, D Diamond, JM Wozney and H Boedtker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751.
- O'Connor PM, J Jackman, J Bae, TG Myers, S Fan, M Mutoh, DA Scudiero, A Monks, EA Sausville, JN Weinstein, S Friend, AJ Fornace Jr and KW Kohn. 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57:4285-4300.
- Pratt SE and MN Pollak. 1993. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res.* 53:5193-5198.
- Soto J, C Sainz, D Gonzalez-Lamuno, A Falkenbach and S Cos. 2000. Low radon doses sensitize MCF-7 human breast cancer cells to taxol. *Oncol. Rep.* 7:941-944.
- Suzuki H, F Itoh, M Toyota, T Kikuchi, H Kakiuchi and K Imai. 2000. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 5' CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res.* 60:4353-4357.
- Xing H, S Zhang, C Weinheimer, A Kovacs and AJ Muslin. 2000. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.* 19:349-358.

(Received 31 October 2002, accepted 10 January 2003)