C3H/HeJ 마우스 종양에서 MEK 억제제에 의한 방사선 감수성 향상 효과

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 성 희

C3H/HeJ 마우스 종양에서 MEK 억제제에 의한 방사선 감수성 향상 효과

지도교수 성 진 실

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
김 성 희

김성희의 석사 학위논문을 인준함

심사위원________________________인

심사위원________________________인

심사위원________________________인

연세대학교 대학원

2002년 6 월 일

감사의 글

항상 부족한 저에게 세심한 관심과 따뜻한 격려로 지도해 주신 성진실 교수님께 감사 드립니다. 또한 이 논문이 있기까지 많은 조언을 해 주신 이원재 교수님과 정현철 교수님께도 깊은 감사 드립니다.

실험실 생활을 즐겁게 할 수 있게 도와준 예쁘고 착한 후배들 지영이와 선혜에게도 고마운 마음을 전합니다. 여러 가지 실험을 가르쳐주시고 격려 해주신 한성준 선생님께 감사 드리며, 힘들 때 마다 곁에서 도와 주신 김용식 선생님, 김연희 선생님, 김도균 선생님, 최건호 선생님, 남기범 선생님, 지환 선배, 인환 선배, 경섭 선배, 승범 선배에게 감사 드립니다. 항상 웃음으로 격려해준 은숙언니, 경은, 경화에게도 고마운 마음을 전합니다. 동물 실험에 많은 도움을 주신 김형관 선생님, 박지영 선생님과 바쁘신 중에도 방사선 조사실험을 도와 주신 윤종원 선생님, 안승권 선생님, 이석 선생님과 여러 기사 선생님께 감사 드립니다.

언제나 큰 힘이 되어 준 가장 소중한 친구들 자영, 인희, 현주, 열심히 공부 할 수 있게 독려해 준 정화, 소영, 미화에게 고마움을 전합니다. 철없는 막내 동생을 한결같이 지켜봐 주신 언니·오빠들과 사랑하는 조카들, 특히 곁에서 돌봐 주신 막내오빠 부부에게 감사 드립니다. 끝으로 제게 공부할 수 있는 기회를 주신 큰아버지, 큰어머니, 항상 사랑으로 보살펴 주시는 어머니와 언제나 제 마음속에 계시는 아버지께 이 논문을 바칩니다.

2002년 6월

김성희

목 차

그림 차례

표 차례

국문요약

C3H/HeJ 마우스 종양에서 MEK 억제제에 의한 방사선 감수성 향상 효과

Extracellular signal-regulated kinase(ERK)는 mitogen-activated protin kinase cascade의 일원으로서 다양한 종류의 세포독성 자극에 의해 유도되는 apoptosis를 억제한다. 마우스 간암인 HCa-I 는 50% 종양제어선량(TCD50)이 80 Gy 이상으로서 대표적인 방사선 내성 종양으로 알려져 있으며, 방사선 민감성을 증진 시키기 위해 다양한 항암제가 시도 되었으나 만족스러운 효과를 나타내지 못했다. 본 연구에서는 *in vivo*, 특히 방사선 내성 종양에서 ERK 신호전달 체계의 억제가 방사선에 의한 항암 작용을 증진시키는지 알아보고자 하였다. MEK의 특이적 억제제인 PD98059가 *in vivo*에서 ERK의 활성화를 억제 하는 것을 관찰하였다. PD98059를 25 Gy 방사선 조사 전(전 처리군) 또는 방사선 조사 후(후 처리군) 처리하여 방사선 감수성에 미치는 영향을 종양 성장 지연을 통해 분석하였다. 전 처리군과 후 처리군에서 증강지수가 각각 1.6과 1.9로 PD98059가 종양의 방사선 감수성을 증가시키는 것으로 관찰되었다. PD98059의 방사선 감수성 증진의 기작을 조사하기 위해 TUNEL을 통해 apoptosis를 계수하였다. Apoptosis index의 최대치는 방사선 조사군에서 1.4%, PD98059 처리군에서 0.9%, 전 처리군에서 4.9%, 후 처리군에서 5.3%를 나타내어 복합 처리군에서 apoptosis가 유의하게 증가하는 양상을 나타내어 방사선 감수성에 apoptosis가 작용함을 확인하였다. Apoptosis 조절 물질들을 Western boltting으로 관찰한 결과, p53, $p21^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S 의 발현이 방사선 조사군이나 PD98059 처리군에서는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 복합 처리군에서 현저히 증가되는 것이 관찰되었다. 모든 실험군에서 Bcl-2, Bcl-X_L, Bax는 뚜렷한 발현 변화를 보이지 않았다. 이러한 결과는 PD98059를 통한 마우스 간암조직의 방사선

감수성 증진은 p53, p21 $^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S 등의 apoptosis 조절 물질을 통한 apoptosis의 향상에 의해 이루어짐을 시사한다.

결론적으로 MEK 억제제를 방사선 내성 종양인 간암에 방사선 조사와 복합 처리 하면 p53, p21 $^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S 등의 apoptosis 조절 물질의 증가로 apoptosis가 유도되어 방사선 감수성이 향상되므로, MEK 억제제를 이용하여 방사선 내성 종양의 치료효율 상승을 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : PD98059, 전리 방사선, apoptosis, 간암

C3H/HeJ 마우스 종양에서 MEK 억제제에 의한

방사선 감수성 향상 효과

<지도교수 성 진 실>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 성 희

Ⅰ. 서론

전리 방사선은 많은 종류의 세포에서 다른 세포 자극 요인과 같이 apoptosis를 유도 한다[1]. 종양 세포에 전리 방사선을 조사하면 수 시간 내에 apoptosis가 일어나게 되며 이는 종양 세포를 제거하는데 강력한 도구로 이용 될 수 있다[2-5].

전리 방사선은 핵DNA 뿐만 아니라 여러 신호전달 체계를 활성화하는 세포막에도 영향을 준다[1]. 전리 방사선은 death receptor에도 영향을 주어 종양 세포가 더 많은 apoptosis를 유도 할 수 있게 간접적으로도 작용한다. 최근 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 세포막이 중요한 target으로 인식 되어지고 있다[6]. 전리 방사선은 epidermal growth factor receptor (EGFR), tumor necrosis factor receptor (TNFR)과 같은 cytokine receptors를 활성화 시키며, 방사선에 의해 활성화 된 EGFR은 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와

stress-activated protein kinase (SAPK/JNK)등의 신호전달 체계를 개시, 증폭시켜 세포의 증식과 생존을 조절하게 된다[7-12]. 또한 여러 연구에서 EGFR의 기능 상실이 종양 세포의 방사선 감수성을 높인다는 것이 증명되었다[13-16].

암 치료에 방사선 치료 효과는 종양의 방사선 민감성에 의해 결정되며, 따라서 방사선 감수성을 항진 시키기 위한 연구들이 시행되어 왔다. 두경부암에서 항-EGFR 단일항체와 방사선 조사를 복합 치료하여 국소적 종양 치료 효율이 상승됨이 보고 되었다[17]. 그러나 EGFR은 여러 신호전달 체계의 상위에 위치 하므로 EGFR의 억제는 정상 세포에서 많은 부작용을 초래하게 된다[18]. 따라서 좀 더 종양 세포에 한정적으로 작용할 수 있는 target을 필요로 하며 신호전달 체계에서 EGFR보다 하위의 물질을 조절하는 것이 한 방법이 될 수 있다.

세포가 전리 방사선에 노출되었을 때 EGFR을 통해서 MAPK 전달 체계가 활성화 될 수 있다[7, 19]. 이 MAPK family 중 가장 먼저 알려진 것은 extra-cellular signal-regulated protein kinase1 (ERK1)과 ERK2이다. ERK1/ ERK2는 proto-oncogene인 *ras*의 하위 체계로써 인산화되어 활성화 된다[20]. Ras는 Raf1을 활성화 시키고 이것은 MEK1을 활성화시키며, 활성화된 MEK1은 ERK1과 ERK2를 인산화 시킨다[21-24]. 이러한 MAP kinase는 세포 성장을 조절하는 전사 인자인 Elk-1 등 다양한 기질을 인산화 시킨다[25]. MEK1의 기질로써는 ERK1과 ERK2만이 알려져 있는데 이는 ERK1과 ERK2가 MAPK 신호전달 체계에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 그 기작은 아직 정확히 알려 지지 않았으나 전리 방사선에 의해 활성화된 MAPK 신호전달 체계는 방사선 내성을 갖게 한다[7, 8, 19, 26].

전리 방사선이 bovine aortic endothelial 세포와 U937 human monoblastic leukemia 세포에서 SAPK/JNK 전달 체계에 의해 apoptosis를 유도 한다고 보고 되었다[27]. 이와 반대로 증식에 관여되는 전달 체계인 MEK1/ ERK 신호전달 체계는 anti-apoptosis에 역할을 하고 ERK와 JNK 전달체계 사이의 균형에 의해 세포가 생존하거나 apoptosis된다[8, 28, 29].

지금까지의 연구결과 종양 세포에서 전리 방사선에 의한 ERK의 활성화는 방사선 내성 유발에 중요한 역할을 한다고 생각되어, ERK 신호전달 체계를 방사선 감수성 증진을 위한 target으로 하여, MEK 억제제를 이용한 방사선 감수성의 향상을 유도하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 마우스 동종암의 이식

실험 동물은 주령 8~10주되는 C3H/HeJ 웅성 마우스를 사용한다. 마우스는 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급 및 사육하며 온도 22 ℃, 습도 55% 가 일정하게 유지되는 사육환경에서 상자 당 5마리씩 사육하였다. 실험에 사용한 종양은 모두 C3H/HeJ 마우스 동종암으로서 hepatocarcinoma (HCa-I), fibrosarcoma (FSa-II), squamous cell carcinoma (SCC-VII), mammary carcinoma (MCa-K) 및 ovarian carcinoma (OCa-I)이다. 종양 세포는 괴사가 없는 부분을 기계적으로 부수어 0.025% trypsin 처리한 후 체로 여과시키고 Sweeney 필터로 통과시켜, 단일 부유화된 종양 세포만 얻었다. 종양 세포액을 4 ℃에서 1500 rpm으로 원심분리 시켜서 침전물만 얻어 이를 다시 재부유화 시켰다. 재부유화된 세포액 10 ㎕에 trypan blue 염색약 990 ㎕를 섞고 이중 10 ㎕만 취하여 100배 현미경 하에서 hemocytometer로 활성 세포수만 계수하였다. 계수된 세포수를 기준으로 1 X 10^6개의 세포를 마우스 대퇴부에 주사하였다. 종양의 성장은 주 2~3회 caliper로 측정하여 관찰하며 평균직경 8 mm에 도달하였을 때 실험을 시작하였다.

2. 방사선 조사 및 MEK inhibitor처리

방사선 조사는 치료용 선형가속기(Varian Co., Milpitas, CA, USA)를 이용하여 종양을 심은 대퇴부만을 특수 제작된 고정대에 고정하여 25 Gy를 조사하였다. PD98059 (Calbiochem, San Diego, CA, USA)는 0.16 ㎍/ 50 ㎕ 의 농도로 투여하였다. 종양 평균직경 8 mm 일 때 방사선 조사를 하거나 MEK 억제제인 PD98059를 종양에 직접 주사, 또는 두 가지를 복합 처리하였다. 방사선 조사와 PD98059 투여 후 일정한 시간 간격으로 마우스를 경추 탈구사 시킨 후 종양 조직을 채취하였다.

3. 종양 성장 지연 분석

종양 성장 지연은 방사선 조사와 약물처리에 대한 종양반응을 분석하는데 사용되었다. 종양이 평균직경 8 ㎜일 때 무작위로 실험군을 나누고, 방사선 조사나 약물처리 후 2-3일 간격으로 caliper로 크기를 측정하였다. 종양 성장 지연은 방사선 조사나 약물처리 후 종양이 평균직경 8 ㎜에서 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간에서 대조군의 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간을 감한 절대 성장 지연(absolute growth delay; AGD)으로 나타내었다. 증강 지수(enhancement factor; EF)는 표준 성장 지연(normalized tumor growth delay; NGD)을 절대 성장 지연으로 나눈 값이다. 표준 성장 지연은 방사선 조사와 약물 치료를 복합 처리한 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간에서 약물만을 처리한 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간을 감한 값이다[30]. 종양 성장 지연은 각 실험군 당 8-10마리를 기준으로 산출하였으며 각 실험은 2회 반복 시행하였다.

4. Apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 ㎛ 절편을 만들어 terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)을 하였다. TUNEL은 Apop Tag *in situ* detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 시행하였다. Apoptosis의 평가는 400배 광학현미경 하에서 시행하고 1000개의 세포핵 당 관찰되는 apoptosis를 계수하였다.

5. Western blotting

채취한 조직의 일부를 western blotting을 이용하여, ERK의 활성정도와 apoptosis에 관련된 유전물질의 발현을 분석하였다. 채취한 조직의 약 1 ㎣을 잘게 부수어 인산 완충액(pH 7.4)으로 3회 세척한 후 100 mM HEPES, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 2% NP40, 2 mM EDTA, 40 mM β-glyceraldehydephosphate, 2 mM sodium fluoride, 1 mM dit–

hiothereitol, 1 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride, 5 ㎍/㎖ leupeptin, 2 ㎍/㎖ aprotinin등을 포함한 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4 ℃에서 20분간 원심분리하여 단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 poly-acylamide gel에서 전기 영동 시킨 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% Tween-20를 포함하는 Tris-buffered saline (TBST)에 2시간 동안 처리하고 분석하고자 하는 각 유전자에 대한 1차 항체로 2시간 처리하였다. 다시 TBST로 세척하고 horseradish peroxidase가 접합되어 있는 2차 항체로 1시간 처리한 후 ECL Western blotting detection system (Amersham, UK)을 사용하여 luminescent image analyzer (Fuji film, Japan)로 조사하였다. 발현수준의 평가는 densitometry (Amersham)를 이용하여 분석하였다. 사용된 항체는 EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p-ERK (Cell Signaling Technology, Beverly, UK), p53 (Ab7, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-$X_{L/S}$ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), Bcl-2 (N-19, Santa Cruz Bio-technology), p21$^{WAF1/CIP1}$ (Santa Cruz Biotechnology), α-Tubulin (Oncogene Science)등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다.

6. Immunoprecipitation

EGFR의 활성정도를 관찰하기 위하여 위의 방법으로 얻은 단백질 용액으로 immunoprecipitation을 시행하였다. 300 ㎍의 단백질 용액을 5 ㎍의 항 EGFR항체와 단백 G-Sepharose beads (Amersham)로 immunoprecipitation 하였다. 침전물을 냉각된 RIPA 완충액으로 2번, 인산 완충액으로 1번 세척한 후 2X SDS (1X SDS= 250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% glycerol, 0.06% bromophenol blue, 2% β-mercaptoethanol) sample 완충액 30 ㎕을 넣어 100 ℃에서 5분간 끓였다. 얻은 단백질은 polyacylamide gel에서 전기 영동 시킨 후 항-phosphotyrosine 항체(PY20, Santa Cruz Biotechnology)를 1차 항체로 사용하여 위의 방법으로 진행하였다.

Ⅲ. 결과

1. 마우스 종양의 ERK 활성

세포의 종류에 따라 EGFR의 활성화에 의해 ERK가 활성 된다고 보고되고 있다[7, 8, 19]. 따라서 종양 종류에 따른 EGFR의 활성과 ERK의 활성의 상관 관계를 관찰하였다. EGFR의 활성수준(p-EGFR)을 알아보기 위해 5종류의 마우스 종양에서 항 EGFR 항체로 immunoprecipitation하여 항 phosphotyrosine 항체를 이용하여 관찰하였다. ERK의 활성수준(p-ERK)을 알아보기 위해 MEK 활성의 산물인 인산화된 ERK에 특이적으로 반응하는 항체를 이용하여 Western blotting으로 관찰하였다. 종양의 방사선 민감성은 50% 종양 제어 선량(TCD50)으로 나타낼 수 있는데 TCD50에 의하면 HCa-I, FSa-II, SCC-VII는 방사선 내성 종양으로 MCa-K, OCa-I는 방사선 민감성 종양으로 분류된다(표1)[30].

종양의 종류에 따라 EGFR과 p-ERK의 발현 수준에 차이를 보였다. EGFR의 발현 수준은 방사선 내성 종양인 HCa-I, FSa-II, SCC-VII에서 방사선 민감성 종양인 MCa-K, OCa-I 보다 2-2.5배 높게 발현되어 종양의 방사선 내성이 높을수록 EGFR의 발현 수준이 높게 나타났다. p-EGFR는 HCa-I에서 가장 높게 발현되었으며, MCa-K, OCa-I, FSa-II, SCC-VII 순으로 발현이 점차 감소됨이 관찰되었다. p-ERK의 발현 수준은 p-EGFR 의 발현과 비슷한 양상을 보였다(그림1). 이와 같은 결과로 마우스 종양에서 ERK의 활성은 EGFR의 활성에 영향을 받는 것을 알 수 있었다.

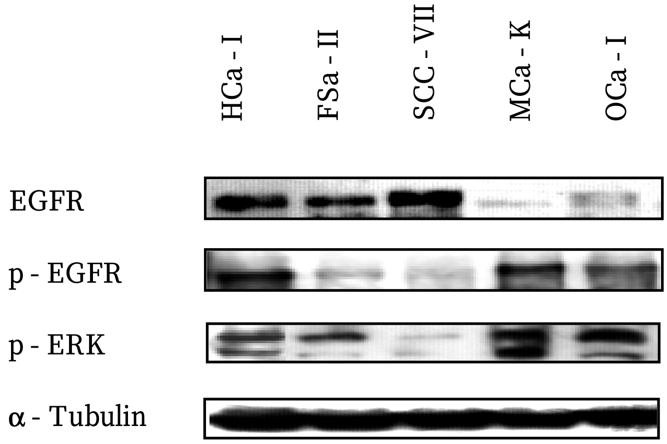

그림 1. 마우스 동종암에서 EGFR과 ERK의 활성
C3H/HeJ 마우스 동종암인 HCa - I, FSa - II, SCC - VII, MCa - K 및 OCa - I에서 ERK의 활성화를 인산화된 ERK에 특이적으로 반응하는 항체를 이용하여 Western blotting으로 관찰하였고(p - ERK), EGFR의 활성화를 항 EGFR 항체로 immunoprecipitation하여 항 phosphotyrosine 항체로 관찰하였다(p - EGFR).

	HCa - I	FSa - II	SCC - VII	MCa - K	OCa - I
TCD50 (Gy)	≥ 80	74.8	≃ 80	42.9	52.6

표 1. 마우스 종양의 50% 종양 제어 선량 (TCD50, Ref.30 Milas L et al. Cancer Res 1987; 47: 1069 - 1075)

2. *In vivo*에서 PD98059에 의한 ERK의 활성억제

5가지 마우스 종양 중에서 EGFR과 ERK의 활성이 가장 높은 HCa-I에서 PD98059 처리 후 ERK 활성 변화를 조사하였다. 1 X 10^6개의 세포를 마우스 대퇴부에 주사하여 평균직경 8 mm에 도달하였을 때 PD98059를 개체 당 0.16 μg/ 50 μℓ로 종양에 직접 주사한 후 일정 시간 간격으로 종양을 채취하였다. 채취한 종양 조직을 MEK 활성의 산물인 인산화된 ERK에 특이적으로 반응하는 항체를 이용하여 Western blotting으로 인산화된 ERK의 수준을 분석하였다.

PD98059 처리 1시간 째에 ERK 활성수준이 대조군에 비하여 0.5배 줄어들었으며, PD98059 처리 4시간부터 ERK 활성이 회복되었다(그림 2).

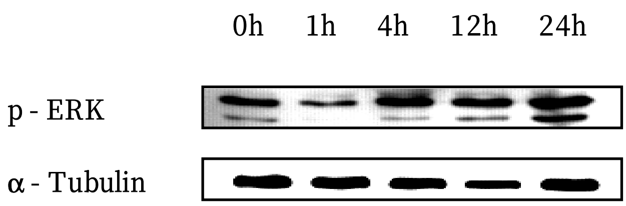

그림 2. HCa-I 마우스 종양에서 PD98059에 의한 ERK의 활성억제
종양 평균직경 8 mm 일 때 PD98059를 개체 당 0.16 μg/ 50 μℓ으로 종양에 직접 주사한 후 일정 시간 간격으로 종양을 채취하여 인산화된 ERK에 특이적으로 반응하는 항체를 이용하여 Western blotting으로 ERK의 활성수준을 관찰하였다.

3. PD98059에 의한 방사선 감수성 증가

ERK 신호전달 체계가 *in vivo* 마우스 종양의 방사선 감수성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 간암 종양인 HCa-I를 대퇴부에 이식하여 종양 성장 지연을 관찰하였다. 대조군, 25 Gy 방사선 조사군, PD98059 투여군, 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군, 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군의 실험군으로 나누어 종양 성장을 측정하였다. 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군은 약물이 종양 내로 흡수되는 시간을 고려할 때 방사선 조사와 동시적으로 약물이 작용하게 하고자 함이었고, 반면에 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군은 방사선 조사 후 종양 손상 회복(potentially lethal damage repair; PLDR)시에 약물이 작용하는 것을 보고자 함이었다.

PD98059는 약물 처리 단독으로는 절대 성장 지연이 0.7일로 뚜렷한 종양 성장 지연이 나타나지 않았다. 그러나 PD98059와 방사선 조사를 복합 처리한 결과, PD98059 15분 전 처리군에서 8 ㎜에서 12 ㎜가 되는 시간이 13.3일, 1시간 후 처리군에서 14.4일로 각각의 표준 성장 지연이 7.0일, 8.2일로 두 실험군 모두에서 종양 성장 지연을 보였다. 약물과 방사선 조사를 복합 처리한 실험군에서 약물에 의한 방사선 감수성 향상은 증강 지수로 정의되어 질 수 있는데, PD98059를 방사선 조사 15분 전과 방사선 조사 1시간 후에 처리한 실험군에서 증강지수가 각각 1.6과 1.9로 나타났다(표2. 그림3). 즉, PD98059에 의해 방사선 내성 종양인 마우스 HCa-I의 방사선 감수성 증가가 관찰되었다.

실험군	8 ㎜에서 12 ㎜까지 성장 시간(일)	절대 성장 지연 (AGD)	표준 성장 지연 (NGD)	증강 지수 (EF)
대조군	5.5±0.3			
Radiation(RT)	9.9±0.6	4.4		
PD98059(PD)	6.2±0.3	0.7		
PD - RT*	13.3±0.6	7.7	7.0	1.6
RT - PD**	14.4±0.7	8.9	8.2	1.9

표 2. HCa - I에서 방사선 조사군, PD989059처리군 및 복합 처리군의 종양 억제 효과

방사선 조사선량은 25 Gy이고, PD98059는 개체 당 0.16 ㎍/ 50 ㎕으로 종양에 직접 주사하였다. PD98059를 방사선 조사 15분 전에 주사하거나* 방사선 조사 1시간 후에 주사하였다**. 절대 성장 지연(absolute growth delay; AGD)은 방사선 조사나 약물 처리 후 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간에서 대조군의 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간을 감한 값이다. 표준 성장 지연(normalized tumor growth delay; NGD)은 방사선 조사와 약물을 복합 처리한 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간에서 약물만을 처리한 종양이 평균직경 12 ㎜까지 자라는데 걸리는 시간을 감한 값이다. 증강 지수(enhancement factor; EF)는 표준 성장 지연을 절대 성장 지연으로 나눈 값이다.

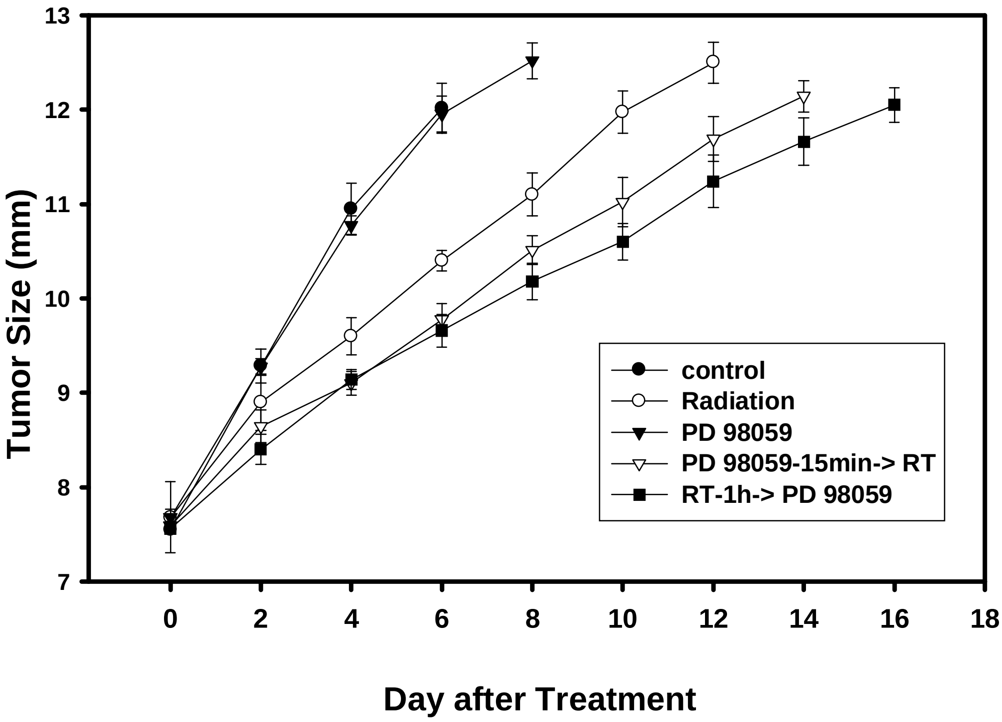

그림 3. PD98059와 방사선 조사 복합 처리시 종양 성장 지연

종양이 평균직경 8 ㎜일 때 무작위로 실험군을 나누고, 방사선 조사나 약물 처리 후 평균직경 13 ㎜가 될 때까지 2-3일 간격으로 caliper로 크기를 측정하였다. 실험군은 대조군(●), 방사선조사군(❍), PD98059 투여군(▼), 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군(□), 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군(■)으로 나누어 종양 성장을 측정하였다. 각 실험군 당 8-10마리의 개체를 사용하였으며 가로막대는 표준편차를 나타낸다.

4. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 apoptosis 유도

방사선 감수성의 증가는 apoptosis 유도증가에 의하여 이루어질 수 있으므로 PD98059와 방사선 조사 복합 처리시 apoptosis의 변화를 관찰하였다. 대조군, 25 Gy 방사선 조사군, PD98059 투여군, 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군, 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군의 실험군으로 나누어 각 실험군 당 일정 시간 간격으로 조직을 채취하여 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 ㎛ 절편을 만들어 terminal deoxy-nucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)을 하였다.

HCa-I는 방사선에 의한 apoptosis 유도 수준에 내성을 나타내어, 25 Gy 방사선 조사시 apoptosis 최고치는 4시간 째 1.4% 였고 PD98059 단독 투여 시에는 24시간 째 0.9 %의 최대치를 보였다. 그러나 복합 처리군에서는 PD98059 전 처리군에서 4시간 째 4.9%의 최대치를 보였으며, 후 처리군에서 12시간 째에 apoptosis 유도 수준이 5.3%의 최대치를 보였다. 방사선 조사나 PD98059 단독 처리시 보다 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 apoptosis 유도 증가가 관찰되었다(그림4).

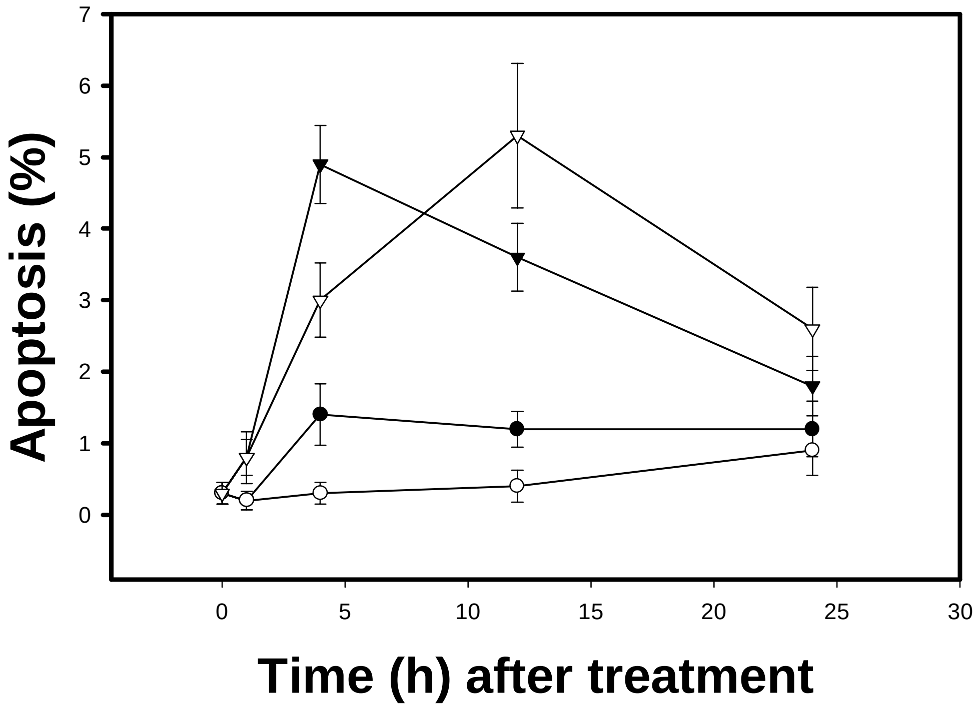

그림 4. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 apoptosis 유도
방사선 조사선량은 25 Gy이고, PD98059는 개체당 0.16 ㎍/ 50 ㎕으로 종양에 직접 주사하였다. 처리 후 일정 시간 간격으로 종양을 채취하여 파라핀에 포매하여 조직을 4 ㎛ 절편으로 만들어서 TUNEL을 하였다. 복합 처리군의 조직 채취 시간은 마지막 처리를 기준으로 하였다. 400배 광학현미경 하에서 1000 개의 세포핵 당 apoptosis를 계수하였다. 방사선 조사군(●), PD98059 투여군(❍), 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군(▼), 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군(□)으로 실험군을 나누었다.

5. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 apoptosis 조절 인자의 발현 변화

방사선 조사와 PD98059 복합 처리가 apoptosis 조절 인자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 방사선 조사군, PD98059 투여군, 복합 처리군에서 p53, $p21^{WAF1/CIP1}$ 및 Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S, Bax)의 발현을 분석하였다. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리군의 시간 간격은 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군, 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군으로 나누어서 일정한 시간 간격으로 종양 조직을 채취하여 Western blotting으로 관찰하였다.

25 Gy 방사선 조사 후 p53의 발현은 1시간 째부터 증가하기 시작하여 24시간부터 정상 수준으로 회복하기 시작하였다. PD989059 처리군에서 p53은 뚜렷한 발현 변화가 보이지 않았다. 그러나 복합 처리군에서 PD98059 전 처리군과 후 처리군 모두에서 24시간까지 대조군에 비해 2.7배, 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하였다. p53의 발현이 처리 1시간 째부터 발현 증가를 하여 24시간까지 지속되는 것이 관찰되었다(그림5). $p21^{WAF1/CIP1}$의 발현은 p53 발현 변화와 유사한 양상으로 특히 PD98059 후 처리군에서 방사선 조사군이나 PD98059 전 처리군과 비교하여 높은 발현수준을 보였으며 24시간까지 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하는 것으로 나타났다(그림6). Bcl-X_S는 25 Gy 방사선 조사나 PD98059 단독 처리군에서는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 복합 처리군에서는 전 처리군에서 4시간째 대조군에 비해 1.9배 증가를 보였으며 후 처리군에서는 1시간 후에 1.8배의 증가를 보였다(그림7). 모든 실험군에서 Bcl-2, Bcl-X_L, Bax는 뚜렷한 발현 변화를 보이지 않았다.

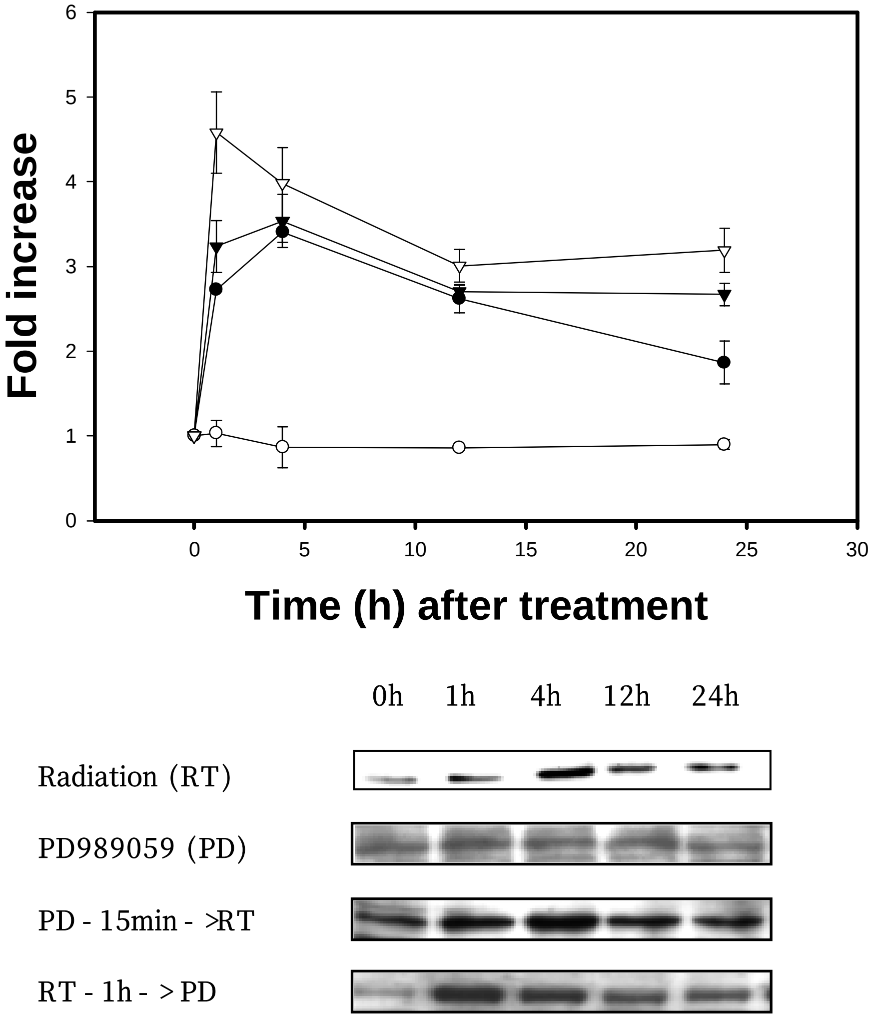

그림 5. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 p53의 발현 변화
방사선 조사선량은 25 Gy이고, PD98059는 개체 당 0.16 μg/ 50 μℓ으로 종양에 직접 주사하였다. 처리 후 일정 시간 간격으로 종양을 채취하여 Western blotting으로 p53의 발현 수준을 관찰하였다. 복합 처리군의 조직 채취 시간은 마지막 처리를 기준으로 하였다. Densitometry로 발현수준을 분석하여 도식화 하였다. 방사선 조사군(●), PD98059 투여군(❍), 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군(▼), 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군(□)으로 실험군을 나누었다.

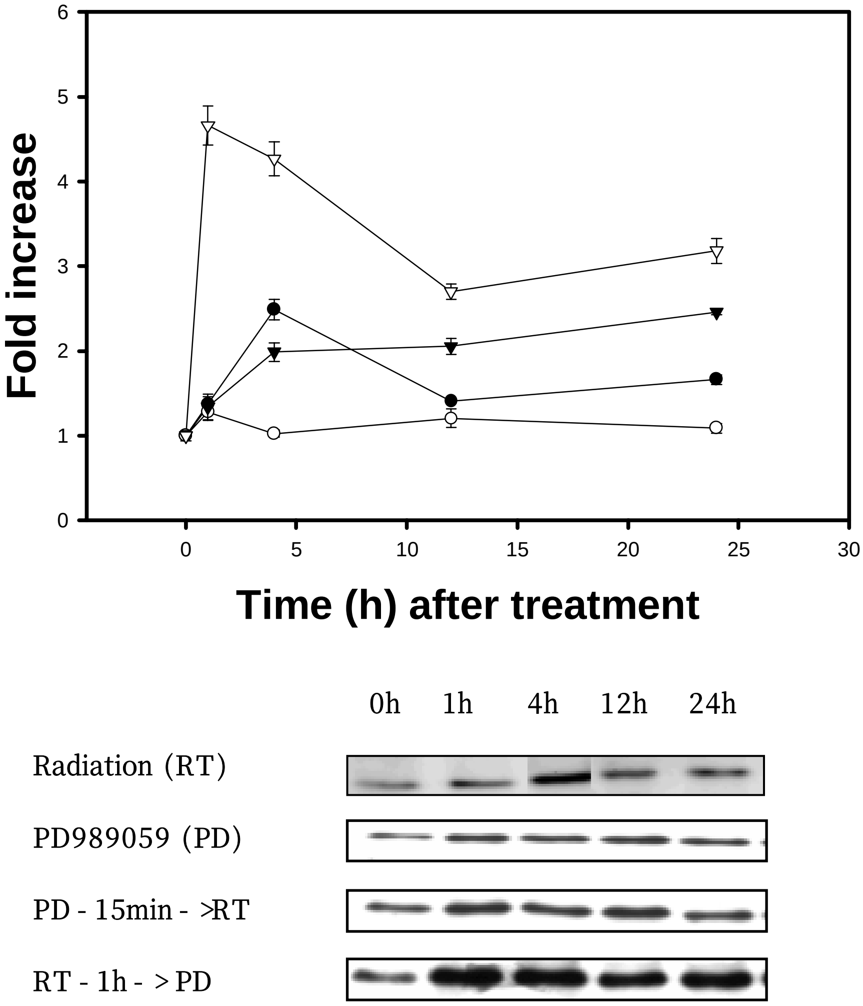

그림 6. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 $p21^{WAF1/CIP1}$의 발현 변화
방사선 조사선량은 25 Gy이고, PD98059는 개체 당 0.16 μg/ 50 μℓ으로 종양에 직접 주사하였다. 처리 후 일정 시간 간격으로 종양을 채취하여 Western blotting으로 $p21^{WAF1/CIP1}$의 발현 수준을 관찰하였다. 복합 처리군의 조직 채취 시간은 마지막 처리를 기준으로 하였다. Densitometry로 발현수준을 분석하여 도식화 하였다. 방사선 조사군(●), PD98059 투여군(❍), 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군(▼), 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군(□)으로 실험군을 나누었다.

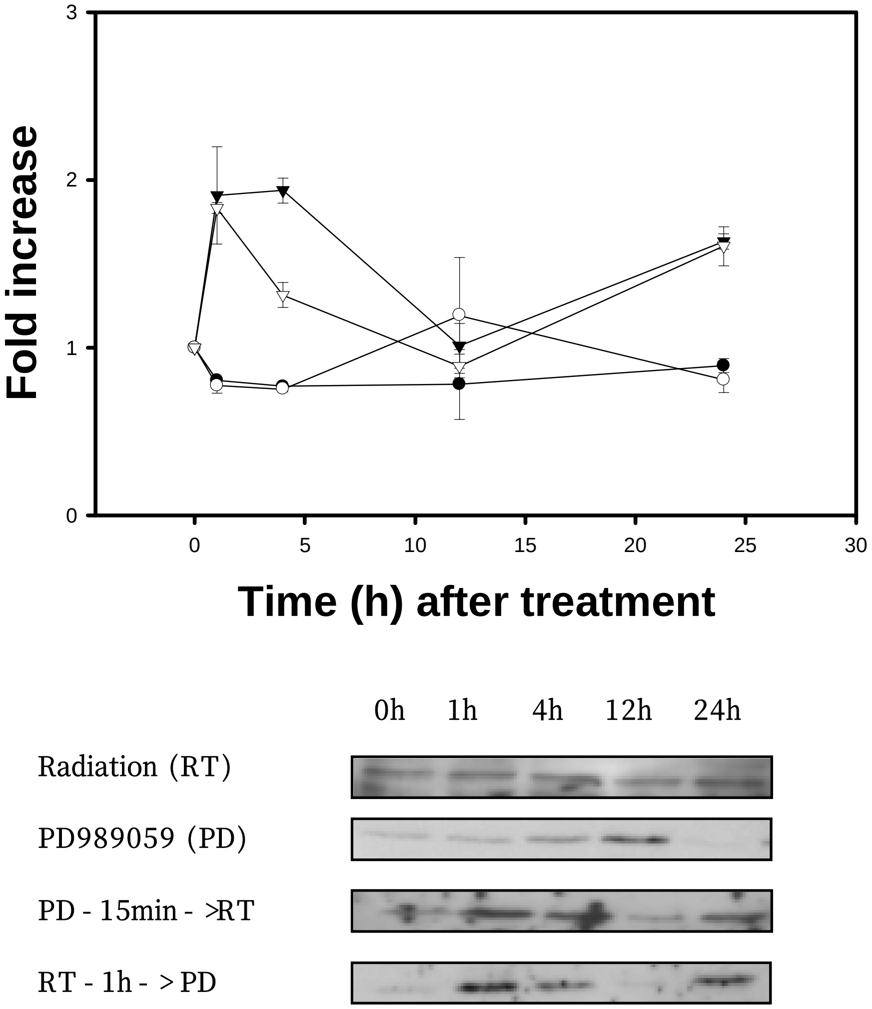

그림 7. 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 Bcl-X_S의 발현 변화

방사선 조사선량은 25 Gy이고, PD98059는 개체 당 0.16 ㎍/ 50 ㎕으로 종양에 직접 주사하였다. 처리 후 일정 시간 간격으로 종양을 채취하여 Western blotting으로 Bcl-X_S의 발현 수준을 관찰하였다. 복합 처리군의 조직 채취 시간은 마지막 처리를 기준으로 하였다. Densitometry로 발현 수준을 분석하여 도식화 하였다. 방사선 조사군(●), PD98059 투여군(❍), 방사선 조사 15분전 PD98059 투여군(▼), 방사선 조사 1시간 후 PD98059 투여군(□)으로 실험군을 나누었다.

IV. 고찰

국내 호발암인 간암은 그간 방사선 치료의 역할이 그리 부각되지 못하였으나, 최근 방사선 치료가 활발히 적용되기 시작하면서 방사선의 항암 효과를 항진 시키기 위한 일련의 노력들이 진행되어 오고 있다[31-33]. 본 연구에 사용된 마우스 간암인 HCa-I는 인체 간암과 유사한 몇 가지 특성을 가지고 있다. 방사선 감수성이 낮고, 전이가 잘 되며, 종양의 악성도가 높다는 점이다. 이 종양은 50% 종양 제어 선량(TCD50)이 80 Gy 이상이며 방사선에 의한 apoptosis의 유도 수준이 낮은 방사선 내성 종양으로 알려져 있다[30, 34]. 종양 치료에서 방사선과 약제의 복합 치료는 두 치료법간의 상승작용을 이용하여 종양 반응을 향상시키기 위해 시행되는데. 현재 간암의 치료에서 사용되고 있는 약물들 즉, 5-Fu, adriamycin, cisplatin등의 항암제는 방사선과 복합 치료시 뚜렷한 종양 반응 향상을 보이지 않고 있다[32,35, 36].

PD98059[2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl) oxanaphthalen-4-one]는 MEK-1를 선택적으로 억제하여 ERK의 인산화와 활성화를 억제한다[37]. MEK 억제제를 이용한 종양 성장 지연 실험으로 human squamous cell carcinoma에서 PD98059를 통한 침윤억제와, PD 184352를 사용한 colon 26 carcinoma의 종양 성장 지연에 관한 보고가 있다[38, 39].

여러 종류의 마우스 종양에서 ERK의 활성을 관찰한 결과, EGFR의 활성화 정도에 따라 ERK가 활성 되는 것으로 나타났다. 특히, HCa-I는 방사선 내성 종양으로 EGFR과 ERK의 활성이 높은 것으로 관찰되었다. HCa-I에 MEK 억제제인 PD98059를 사용하여 방사선 감수성을 실험한 결과, PD98059가 HCa-I의 방사선 감수성을 효과적으로 증가시키는 것으로 나타났다. 방사선 조사나 PD98059 단독 처리만으로는 뚜렷한 종양억제를 보이지 않았으나 복합 처리시 증강 지수(EF)가 전 처리군에서 1.6, 후 처리군에서 1.9로서 두 치료 간의 단순 부가작용 이상의 상승작용이 있음을 시사한다. 이는 지금까지의 연구에서 사용된 MEK 억제제의 용량보다 낮은 농도의 PD98059를 사용하여 얻은 결과로서 소량의 PD

98059를 이용하여 방사선 감수성을 높일 수 있음을 확인 할 수 있었다.

전리 방사선에 의한 종양 반응은 종양세포의 apoptosis 유도 향상을 포함하여 여러 가지 기작에 의해서 결정된다. 방사선 감수성의 증가는 apoptosis 유도증가에 의해 이루어질 수 있으므로 PD98059와 방사선 조사 복합 처리에 의한 apoptosis의 변화를 관찰하였다, TUNEL을 통한 apoptosis 계수 결과, 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 apop-tosis가 증가 되었다. 25 Gy 방사선 조사시 최고치는 4시간 후 1.4% 였고 PD98059 단독 처리시 24시간 후 0.9%의 최대치를 보였다. 그러나 복합 처리시 PD98059 전 처리군에서 4시간 후 4.9%의 최대치를 보였으며, 후 처리 군에서 12시간 후 apoptosis 유도 수준이 5.3%의 최대치를 보여 복합 처리군에서는 apoptosis가 현저히 증가됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 PD98059가 apoptosis를 증가시켜서 결과적으로 방사선 감수성 향상을 유도함을 암시한다. 이는 *in vitro*에서 PD98059에 의한 MEK의 억제가 방사선에 의해 유도되는 apoptosis를 증가시킨다는 일련의 결과들과 일치한다[40-41].

Apoptosis를 조절하는 단백질의 발현은 방사선 조사와 PD98059 복합 처리시 p53, p21 $^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S에서 뚜렷한 변화가 관찰되었다. p53은 방사선 단독 조사군에서 1시간 째부터 증가하여 24시간째부터 회복되기 시작한 반면 복합 처리군에서는 PD98059 전 처리군과 후 처리군 모두에서 24시간까지 대조군에 비해 2.7배, 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하였다. p21 $^{WAF1/CIP1}$의 발현은 p53 발현 변화와 유사한 양상으로 특히 PD98059 후 처리군에서 방사선 조사군이나 PD98059 전 처리군과 비교하여 높은 발현 수준을 보였으며, 24시간까지 3.2배의 높은 발현 수준을 유지하는 것으로 나타났다. Bcl-X_S는 25 Gy 방사선 조사나 PD98059 단독 처리 군에서는 뚜렷한 변화를 보이지 않았으나 복합 처리군에서는 전 처리군에서 4시간 후 대조군에 비해 1.9배 증가를 보였으며 후 처리군에서는 1시간 후에 1.8배의 증가를 보였다. 이러한 결과는 PD98059의 복합 처리에 의해 p53, p21 $^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S 등의 apoptosis 조절 물질의 증가되고 이러한 조절 물질의 증가로 apoptosis가 유도되어 방사선 감수성이 향상됨을 나타낸다.

향후 임상적 응용 가능성을 타진하기 위하여 이 약물 치료의 독성 연구가 더 진행되어야 한다. 임상에서 간암의 방사선 치료는 위 및 소장처럼 방사선 허용선량이 낮은 주변 조직의 합병증을 동반하게 되므로, 정상 조직에서 방사선 치료와 약물 복합의 효과가 어떠한 지가 임상 적용 전에 먼저 연구되어야 한다. 또한 임상에서는 방사선 치료시 분할 조사를 이용하는데 분할 조사시 MEK 억제제와 분할 조사간의 상호작용이 단일 조사와는 다른 생물학적 현상이 나타날 가능성이 있으므로 이에 대한 연구가 더 요구된다.

V. 결론

PD98059는 방사선 내성 종양인 마우스 HCa-I의 방사선 감수성을 향상시키는데 이러한 감수성의 증가는 p53, p21 $^{WAF1/CIP1}$, Bcl-X_S이 주요한 역할을 하여 apoptosis 유도를 증가 시킴으로써 나타난다. 따라서 방사선 내성 종양인 간암에 MEK 억제제를 방사선 조사와 복합처리 하므로 방사선 감수성을 향상시켜 치료 효율의 상승을 유도 할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Verheij M, Ruiter GA, Zerp SF, Blitterswijk WJ, Fuks Z, Haimovitz - Friedman A, et al. The role of the SAPK/JNK signalling pathway in radiation - induced apoptosis. Radiother Oncol 1998; 47: 225 - 232.
2. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation–induced apoptosis: relevance to radiotherapy. Int J Radiat Biol 1995; 33: 781 - 796.
3. Yanagihara K, Nii M, Numoto M, Kamiya K, Tauchi H, Sawada S, et al. Radiation–induced apoptotic ell death in human gastric epithelial tumor cells: correlation between mitotic death and apoptosis. Int J Radiat Biol 1995; 67: 677 - 685.
4. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Development of apoptosis and polyploidy in human lymphoblast cells as a function of position in the cell cycle at the time of irradiation. Radiat Res 1996; 146: 595 - 602.
5. Zhivotovsky B, Josep B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis. Exp Cell Res 1999; 248: 10 - 17.
6. Santana P, Pena LA, Haimovitz - Friedman A, Martin S, Green D, Mcloughlin M, et al. Acid sphinogomyelinase deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation - induced apoptosis. Cell 1996; 86: 189 - 199.
7. Schmidt - Ullrich R, Mikkelsen R, Dent P, Todd DG, Clerie K, Kavanagh BD, et al. Radiation induced proliferation of human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. Oncogene 1997; 15: 1191 - 1197.
8. Carter S, Auer KL, Reardon DB, Birrer M, Fisher PB, Valerie K, et al. Inhibition of the mitogen activated portein (MAP) kinase cascade potentates cell killing by low dose ionizing ra–

diation in A431 human squamous carcinoma cells. Oncogene 1998; 16: 2787 - 2796.
9. Balaban N, Moni J, Shannon M, Dang L, Murphy E, Foldkorn T. The effect of ionizing radiation on signal transduction: Antibodies to EGF receptor sensitize A431 cells to radiation. Biochem Biophys Acta 1996; 1314: 147 - 156.
10. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg M. Opposing effects of ERK and JNK - p38 MAP kinases on apoptosis. Science 1995; 270: 1326 - 1331.
11. Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress. Activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science 1996; 274: 1194 - 1197.
12. Pap M, Cooper GM. Role of glycogen synthase kinase - 3 in the phosphatidyl inositol 3 - kinase/Akt cell survival pathway. J Biol Chem 1998; 273: 19929 - 19932.
13. Contessa JN, Reardon DB, Todd D, Dent P, Mikkelsen RB, Valerie K, et al. The inducible expression of dominant - negative epidermal growth factor receptor - CD533 results in radiosensitization of human mammary carcinoma cells. Clin Cancer Res 1999; 5: 405 - 411.
14. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti - HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. Cancer Res 1998; 58: 2825 - 2831.
15. Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res 1999; 59: 1935 - 1940.
16. Dent P, Jarvis WD, Birrer MJ, Fisher PB, Schmidt - Ullrich RK,

Grant S. The roles of signaling by the p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway; a potential route to radio- and chemo- sensitization of tumor cells resulting in the induction of apoptosis and loss of clonogenicity. Leukemia 1998; 12: 1843-1850.

17. Robert F, Ezekiel MP, Spencer SA, Meredith RF, Bonner JA, Khazaeli MB, et al. Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. J Clin Oncol 2001; 19: 3234-3243.
18. Busam KJ, Capodieci P, Motzer R, Kiehn T, Phelan D, Halpern AC. Cutaneous side-effects in cancer patients treated with the antiepidermal growth factor receptor antibody C225. Br J Dermatol 2001; 144: 1169-1176.
19. Kavanagh BD, Dent P, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen R, Chen PB. Ca2+ dependent stimulation of mitogen activated protein kinase activity in A431 cells by low dose ionizing radiation. Radiat Res 1998; 149: 579-587.
20. Warne PH, Viciana PR, Downward J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*. Nature 1993; 364: 352-355.
21. Dent P. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and *in vitro*. Science 1992; 257: 1404-1407.
22. Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. Science 1992; 258: 478-480.
23. Her JH. Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein (MAP) kinase activation. Biochem J 1993; 296: 25-31.

24. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. Nature 1990; 343: 651 - 653.
25. Marais R, Wynne J, Treisman R. The SRF accessory protein Elk - 1 contains a growth factor - regulated transcriptional activation domain. Cell 1993; 73: 381 - 393.
26. Seger R. Purification and characterization of mitogen - activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor stimulated A431 cells. J. Biol. Chem 1992; 267: 14373 - 14381.
27. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, et al. Requirement for ceramide initiated SAPK/JNK signalling in stress - induced apoptosis. Nature 1996; 380: 75 - 79.
28. Canman CE, Kastan MB. Signal transduction. Three paths to stress. Nature 1996; 384: 213 - 214.
29. Cosulich S, Clarke P. Apoptosis: Does stress kill? Curr. Biol 1996; 6: 1586 - 1588.
30. Milas L, Wike J, Hunter NR, Volpe J, Basic I. Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: Association with tumor growth parameters and tumor radiocurability. Cancer Res 1987; 47: 1069 - 1075.
31. Seong J, Kim SH, Suh CO, Enhancement of tumor radio - response by combined chemotherapy in murine hepato - carcinoma. J Gastroenterol Hepatol 2001; 16: 883 - 889.
32. Park HC, Seong J, Han KH, Chon CY, Moon YM, Song JS, et al. Dose response relationship in local radiotherapy for hepatocellular carcinoma. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 2001; 19: 118 - 126.
33. Seong J, Keum KC, Han KH, Lee DY, Lee JT, Chon CY, et al.

Combined transcatheter arterial chemoembolization and local radiotherapy for unrespectable hepatocellular carcinoma. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1998; 16: 159 - 165.

34. Seong J, Hunter N, Milas L. Induction of apoptosis and expression of apoptosis–related gene products in response to radiation in murine tumors. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1997; 15: 187 - 195.
35. Steel GG. Combination of radiotherapy and chemotherapy. In: Steel GG, ed. Basic Radiation Biology. London: Edward Arnold Publishers, 1993; 151 - 162.
36. Venook AP. Treatment of hepatocellular carcinoma: Too many options? J Clin Oncol 1994; 12: 1323 - 1334.
37. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen - activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 7686 - 7689.
38. Simon C, Hicks MJ, Nemechek AJ, Mehta R, O'Malley BW Jr, Goepfert H, et al. PD 098059, an inhibitor of ERK1 activation attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma. Br J Cancer 1999; 80: 1412 - 1419.
39. Sebolt - Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, et al. Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors *in vivo*. Nat Med 1999; 5: 810 - 816.
40. Vrana JA, Grant S, Dent P. Inhibition of the MAPK pathway abrogates BCL2 - mediated survival of leukemia cells after exposure to low - dose ionizing radiation. Radiat Res 1999; 151: 559 - 569.
41. Cartee L, Vrana JA, Wang Z, Park JS, Birrer M, Fisher PB, et al. 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 2000; 16: 413-422.

Abstract

Enhancement of tumor response by MEK inhibitor in C3H/HeJ murine tumors

Sung Hee Kim

Brain Korea 21 Project for Medical Science
The Graduate School
Yonsei University

(Directed by Professor Jinsil Seong)

Extracellular signal-regulated kinase (ERK), one of mitogen-activated protin kinase cascade, opposes initiation of the apoptotic cell death program by diverse cytotoxic stimuli. Murine hepatocarcinoma, HCa-I is known to be highly radioresistant with a TCD50 (radiation dose yield in 50% cure) of more than 80 Gy. Various anticancer drugs have been tested to enhance radioresponse of this tumor but none was successful. The objective of this study was to explore whether selective inhibition of MEK could potentiate the antitumor efficacy of radiation in vivo, particularly in radioresistant tumor C3H/HeJ mice bearing 8 mm HCa-I, were treated with PD98059 (intratumoral injection of 0.16 μg in 50 μℓ) and 25 Gy radiation. PD98059 were administered 15min prior to (Group A), or 1h after (Group B) radiation. Tumor response to the treatment was determined by a tumor growth delay assay. In tumor growth delay assay, the drug increased the effect of tumor radioresponse with an enhancement factor (EF) of 1.6 (Group A) and 1.87 (Group B). Combined treatment of 25 Gy radiation with PD98059 significantly increased radiation induced apoptosis. Peak apoptotic index was 1.2% in radiation alone, 0.9% in drug alone and 4.9% (Group A), 5.3% (Group B) in the combination treatment group. The expression of regulating molecules was analyzed by Western blotting for p53, Bcl - 2, Bax, Bcl - X_S, Bcl - X_L and p21 $^{WAF1/CIP1}$. Analysis of apoptosis regulating molecules with Western blotting showed upregulation of p53, p21 $^{WAF1/CIP1}$ and Bcl - X_S in the combination treatment group (Group A and Group B) comparing to those in either radiation alone or drug alone group. Other molecules such as Bcl - X_L, Bax and Bcl - 2 remained less changed.

Selective inhibition of MEK in combination with radiation therapy may have potential benefit in cancer treatment.

Key Words: PD98059, ionizing radiation, apoptosis, hepatocarcinoma