

활성산소로 유도되는  
AR42J 세포의 사멸에서  
DNA 복구 단백질의 역할

연세대학교 대학원

의과학사업단

송 지 연

활성산소로 유도되는  
AR42J 세포의 사멸에서  
DNA 복구 단백질의 역할

지도교수 김 혜 영

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

송 지 연

# 송지연의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

## 감사의 글

처음 교실을 방문했던 때가 생각납니다. 낯선 실험기계들로 둘러싸여 거대하고 마냥 신기했었습니다. 2년의 세월은 이곳을 낫익고 친근한 공간으로, 교실원들을 ‘과학’이라는 탐구 정신 아래 서로의 기쁨과 슬픔을 공유하는, 또 하나의 가족원으로 변화시켰습니다. 훌륭하신 선생님들과 좋은 친구, 선·후배님들을 만날 수 있었기에 행복하고 소중한 시간이었습니다. 2년의 시간이 앞으로의 삶에 튼튼한 밑거름이 되리라 믿으며 부족하나마 이렇게 실험실에서 생활했던 자취를 남기게 되어 감사 드립니다.

따뜻한 사랑과 격려를 주시고 학문 탐구의 길을 열어 주신 김혜영 선생님 감사합니다. 세심한 지도와 좋은 말씀을 해 주시는 김경환 교수님, 올바른 연구를 할 수 있도록 끊임없는 관심과 충고로 이끌어 주신 이민구 선생님, 송시영 선생님께 감사 드립니다. 끝없는 학문에 대한 열정을 보여주신 안영수 선생님, 김동구 선생님, 장정원 선생님, 서정택 선생님께도 깊이 감사 드립니다. 또한 가까운 곳에서 연구의 기쁨을 마련해 주시고 힘든 상황에서도 격려를 아끼지 않으신 임주원 선생님 감사합니다. 편안한 친언니처럼 세심하게 가르쳐 주신 상희 언니, 지혜 언니, 항상 재미있는 유머를 선사하는 이장원 선생님, 지훈 오빠 그리고 사소한 일도 잘 따라주던 혜연이, 그밖에 사랑과 이해로 함께 해온 약리학 교실 식구들. 모두에게 고마움을 전하며 졸업의 기쁨을 나누고 싶습니다.

언제나 실험실 생활과 연구 활동에 관심을 보이고 힘이 되어준 사랑하는 부모님, 진규 오빠, 나의 오랜 벗들과 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

2002. 12

지연 올림

# 목 차

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	6
1. 췌장 선세포 배양 및 세포 손상 유도 .....	6
2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 측정 .....	6
3. ELISA를 이용한 DNA 분절 측정 .....	6
4. MTT 분석 및 trypan blue를 이용한 세포 수 측정 .....	7
5. 형질전환 (transient-transfection) 세포 만들기 .....	7
6. 세포 단백 추출 .....	8
7. Western blotting .....	9
8. 젤 지연 분석 .....	9
9. 단백질 합성과 분해 측정(Pulse-chase) .....	10
10. 통계처리 .....	10
III. 결 과 .....	11
1. Glucose/Glucose oxidase(G/GO) 처치에 의한 AR42J 세포의 사멸 .....	11
2. G/GO 처치에 의한 AR42J 세포에서의 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 생성 .....	11
3. G/GO 처치 후 세포고사 관련 단백질 변화 .....	13
4. G/GO 처치에 의한 세포 내 Ku 단백질 변화 .....	13
5. G/GO 처치에 의한 세포사멸 유도 시 Ku 단백질과 caspase-3와의 관계 .....	15
6. Ku DNA-end 결합 능 측정 .....	16
7. G/GO 처치 후 형질전환 세포군들의 세포사멸 비교 .....	17

8. G/GO 처치에 의한 세포 내 Ku 단백질의 합성, 분해 변화 ...	18
IV. 고찰 .....	20
V. 결론 .....	23
참고문헌 .....	24
영문요약 .....	27

## 차 례

그림 1. AR42J 췌장 선세포에 G/GO 처리 후 세포의 사멸 및 DNA 분절 .....	12
표 1. G/GO 처리 후 AR42J 세포 배양액 내 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 양 .....	12
그림 2. G/GO 처리 후 세포고사 관련 단백질의 변화 .....	13
그림 3. G/GO 처리 후 세포 내 Ku 단백질의 변화 .....	14
그림 4. Caspase-3 억제제 전처리 후 G/GO에 의한 Ku 단백질의 변화 및 세포의 사멸 .....	15
그림 5. G/GO에 의한 Ku DNA-end 결합 능력 변화 .....	16
그림 6. 유전자 형질전환 세포군들의 세포사멸과 DNA 분절 .....	17
그림 7. G/GO에 의한 세포 내 Ku 단백질의 합성과 분해 .....	19

## 국문요약

### 활성산소로 유도되는 AR42J 세포의 사멸에서 DNA 복구 단백질의 역할

활성산소에 의한 DNA 손상은 세포사멸을 유도하며 급성 췌장염 발병과 진행에 중요한 역할을 한다고 보고되었다. Ku70과 Ku80 단백질은 DNA 손상을 복구하는 단백질로 활성산소에 의한 세포사멸 시 Ku70/80이 관여할 것으로 예상된다. 본 연구는 활성산소를 만들어내는 효소체계인 Glucose/Glucose oxidase(G/GO)를 처치하여 췌장 선세포주인 AR42J에 세포 손상을 유도한 후 Ku70, Ku80 단백질의 변화를 관찰하고 이때 활성화되는 세포고사 단백질(poly[ADP-ribose] polymerase, p53, Bcl-2)의 변화를 관찰하고자 하였다. 또한 G/GO로 세포고사 유도시 caspase와 Ku 단백질의 관련성을 알아보고, 이를 통해 세포사멸의 손상 기전을 규명하고자 하였다. AR42J 세포는 G/GO 처치로 농도 및 시간 의존적으로 과산화수소 생성이 증가하였고 세포사멸이 증가하였다. 세포사멸과 함께 세포고사 지표 단백질들이 활성화를 확인함으로써 G/GO 처치에 의한 세포사멸시 세포고사 역시 일어남을 확인하였다. G/GO 처치시 세포 핵 내 Ku 단백질 양, Ku의 DNA-end 결합 능력이 감소하였으며 Ku 단백질의 감소는 caspase-3 억제제 처치에 의하여 억제되었다. Ku70 또는 Ku80 과다 발현 유전자나 Ku dominant-negative mutant 유전자로 형질 전환시킨 세포에서 G/GO 처치에 의한 세포사멸을 정상세포와 비교한 결과, Ku 단백질이 세포 생존 단백질로 세포 사멸을 억제함을 알 수 있었다. 이상의 결과로 보아 G/GO 처치에 의하여 생성되는 활성산소가 AR42J 세포의 DNA를 손상시키며 이 DNA 손상은 Ku70/80에 의해 복구되나, 과도한 활성산소가 세포 내 생성되면 caspase-3가 활성화되어 Ku70/80 단백질을 분해하여 DNA 손상과 세포 고사가 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 활성산소에 의한

췌장 선세포의 손상시 DNA 복구 단백질인 Ku70과 Ku80 단백질이 췌장 선세포의 방어기전으로 작용할 것으로 생각된다.

---

**핵심되는 말:** 활성산소, Ku 70/80, 췌장 선세포, caspase-3

# 활성산소로 유도되는 AR42J 세포의 사멸에서 DNA 복구 단백질의 역할

<지도 김 혜 영 교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

송 지 연

## I. 서 론

인체 내 산소 대사 과정에서 활성산소는 끊임없이 생성되며 여러 염증반응을 매개하는 중요한 인자로 알려져 있다.<sup>1</sup> 이러한 활성산소족에는 superoxide anion( $O_2^-$ ), 과산화수소( $H_2O_2$ ), 수산화기( $OH^-$ ) 등이 있으며 질병 초기에 생성되어 질병을 더욱 악화시키는 요인으로 작용한다. 특히, 활성산소는 급성·만성 췌장염 발병과 진행에 중요한 역할을 한다고 보고된다.<sup>2</sup> 인체 췌장염에서 극심한 선세포의 손상이 유도되며 광범위한 간질성 부종, 출혈 및 손상 부위로의 호중구의 이동 등이 관찰됨은 활성산소가 췌장염의 병인일 가능성을 제시하고 있다.<sup>3</sup> 만성 췌장염 환자를 대상으로 한 연구에서도 활성산소의 지표로서 측정된 glutathione의 감소 및 이물질 대사에 관여하는 cytochrome p450 활성이 증가하였으며, 또한 췌장염 환자의 담즙, 십이지장 내용물에서 지질과산화물 및 혈청 지질과산화물의 증가 그리고 내인성 항산화물질 selenium,  $\beta$ -carotene 그리고 vitamin C, E의 감소가 보고되었다.<sup>4,5</sup> 인체 췌장염의 중요한 현상은 염증반응 및 췌장 선세포의 사멸로 알려져 있으므로<sup>6</sup> 염증반응에 대한 연구는 오랫동안 이루어져 왔다. 하지만 췌장 선세포

의 사멸 기전에 대해서는 많이 알려지지 않았다. 췌장 선세포의 사멸은 세포 괴사 및 세포고사에 의해 일어나는데<sup>7</sup> 최근 연구에 따르면 급성 췌장염의 실험 모델에서 췌장 선세포의 사멸에 있어 세포고사의 기전이 중요함이 보고되어<sup>8,9</sup> 활성산소에 의한 췌장 선세포의 세포고사 기전을 연구함은 필요하다.

DNA 손상을 복구하는 대표적인 단백질로 DNA-dependent protein kinase(DNA PK)가 알려져 있으며 이 단백질은 regulatory subunits인 Ku70, Ku80 단백질 및 catalytic subunit인 DNA PKcs의 복합물로 이루어져 있다. Ku70/80 단백질은 DNA 이중나선 손상을 인식하여 그 부위에 결합한 후 DNA PK를 활성화시킴으로써 손상된 DNA 복구 과정을 개시한다.<sup>10,11,12</sup> DNA PK의 regulatory subunit으로서의 기능 외에도 Ku70/80은 손상된 DNA 복구 기능을 수행한다고 알려져 있다.<sup>11,13</sup> 토끼 척수 모델에서도 15분간 허혈을 준 다음 4, 18시간 재관류를 행하는 동안, Ku 단백질이 DNA와 결합하는 활성이 증가하며 60분간 허혈을 주고 재관류하게 되면 Ku-DNA 결합력이 감소함을 보여<sup>14,15</sup> DNA 복구 단백질인 Ku가 활성산소에 의한 DNA 손상을 방어하는 역할을 가짐을 제시하였다. Ku80 단백질이 결핍된 Ku80-null (Ku80<sup>-/-</sup>) 생쥐로부터 기원한 fibroblast 세포의 경우, 과산화수소로 유도되는 세포 손상에 대한 감수성이 정상 세포보다 높아 과산화수소에 의한 손상된 DNA 축적, 세포사멸이 정상 세포보다 많이 유도된다.<sup>16</sup> 이러한 연구들은 활성산소로 인한 DNA 손상 시 DNA 복구 단백질인 Ku70, Ku80의 역할이 중요함을 제시하며, 활성산소 노출에 의한 췌장 선세포 손상에서도 DNA 복구 단백질의 역할이 기대된다.

세포고사가 유도될 때 활성화되는 대표적인 조절 인자로 caspase 단백질 분해효소를 들 수 있다. Caspase는 활성을 나타내는 cystein 잔기에 5개의 펩타이드를 포함한 전구효소로 합성되어 세포질, 미토콘드리아 내막, 핵막에 분포하다가 어떤 자극에 의하여 활성화되면 세포 분화와 관련된 여러 단백질들을 분해시켜 세포고사를 유도한다.<sup>17,18,19</sup> 최근 보고에 의하면 활성화된 caspase-3 단백질이 핵 내로 재분포되어 Poly(ADP-ribose) polymerase, DNA-PKcs 등의 DNA 관련 단백을 분해함이 보고되었고<sup>18,20</sup>, 항암물질인 bleomycin에 의한

Ku 단백질 감소가 caspase-3 억제제에 의하여 억제됨이 관찰되어<sup>21</sup> caspase-3에 의한 세포핵 내 Ku 단백질 분해 또한 예상되어진다.

본 연구에서는 활성 산소에 의하여 유도되는 췌장 선세포의 세포사멸 시 DNA 복구 단백질 Ku70, Ku80의 역할을 밝히고자 하였다. 췌장 선세포주인 AR42J 세포를 사용하여 계속적으로 활성산소(과산화수소)를 만들어내는 효소체계인 Glucose/Glucose oxidase(G/GO)를 처치함으로써 췌장 선세포의 세포 손상을 유도한 후 세포사멸과 DNA 분절을 측정하고, 세포고사의 지표 단백질(poly[ADP-ribose]polymerase, p53, Bcl-2)의 변화를 관찰하여 활성산소에 의하여 췌장 선세포의 세포고사가 일어나는지 여부를 알아보았다. 세포고사 유발시 Ku70과 Ku80 단백질의 변화를 관찰하고 caspase-3 억제제를 사용하여 caspase의 활성 및 Ku 단백질의 관련성을 보고자 하였다. Ku70/80 과다 발현 유전자 형질전환 세포군과 정상세포군의 세포사멸을 비교함으로써 세포 생존에 관여할 것으로 보이는 Ku70/80의 역할을 규명하여 췌장 선세포의 세포고사 기전 및 방어 체계를 밝히고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 췌장 선세포 배양 및 세포 손상 유도

췌장 선세포는 랫트 췌장암 선세포인 AR42J 세포(pancreatoma, ATCC CRL 1492, ATCC, Rockville, Maryland, USA)를 사용하며, 배양액은 90% DMEM high-glucose medium, 10% fetal bovine serum(FBS), 100U/ml penicillin과 100g/ml streptomycin(GIBCO-BRL, Grand Island, New York, USA) 을 첨가하여 조성하였다. 세포는  $5 \times 10^4$  cells/ml로 24 well tissue culture plate에, 또는  $5 \times 10^5$  cells/ml로 100mm culture dish에 seeding하여 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, 90% O<sub>2</sub> 조건에서 실험에 사용하였다. 계속적으로 활성산소를 유발하는 물질로는 10mM  $\beta$ -D-Glucose/Glucose oxidase( mU/ml)(G/GO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하고, 이 물질을 세포에 처리 후 세포사멸 및 Ku 단백질의 변화를 관찰할 수 있는 적정 농도를 시간별, 농도별 처리하여 비교하였다.

### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 측정

AR42J 세포에 Glucose/Glucose oxidase<sup>22,23</sup>를 처리한 후 세포의 배양액을 취하여 배양액 내에 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량을 측정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량은 Thurman<sup>24</sup>의 방법을 변형하여 발색법으로 측정하였다.

### 3. ELISA를 이용한 DNA 분절 측정

G/GO를 처리한 AR42J 세포의 DNA 분절(DNA-fragmentation) 정도를 알기 위해 cell death detection ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) kit (Roche Molecular Biochemicals, Sandhofer, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 24시간 동안 G/GO를 처리한 세포에 lysis buffer를 넣고 30분간 상온에서 처리하여 세포 내 단백을 추출하고 원심분리한 후 streptavidin으로

처리된 plate에 상등액을 취하여 옮겼다. Peroxidase-conjugated DNA 항체, biotin과 결합된 histone 항체가 들어있는 용액을 더한 후, 2시간 상온에서 반응시킨 뒤 2',2'-azido-di[3-ethylbenziazolin]-sulfonate (ABTS)를 첨가하여 발색시킨 후 (405-490)nm 흡광도 차를 이용하여 DNA 분절을 정량하였다.

#### **4. MTT 분석 및 trypan blue를 이용한 세포 수 측정**

세포사멸을 측정하기 위하여 MTT 및 trypan blue를 이용한 세포를 계수하였다. 96 well culture plate의 well에 세포를 넣은 뒤 하룻밤동안 배양한 후 24시간 동안 G/GO를 처치하였다. 그리고 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0.5 mg/ml 농도로 well에 넣고 4시간 동안 배양하여 살아 있는 세포 내 mitochondrial dehydrogenase의 활성에 의해 보라색으로 발색되는 정도를 570nm/630nm에서 ELISA로 측정하였다. 세포를 24 well culture plate에  $5 \times 10^4$  cells/well을 넣고 하룻밤 동안 배양한 뒤 G/GO를 처치한 후 0.2% trypan blue(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)염색을 사용하여 hemocytometer로 세포를 계수하였다.

#### **5. 형질전환 (transient-transfection) 세포 만들기**

human Ku70/pET1a, Ku80/pET1a의 vector 에 있는 Ku 70,80 cDNA를 BamH I, EcoR I 으로 잘라 pcDNA3 (In vitrogen Corp., Carlsbad, California) vector에 삽입하여 Ku70, 80 overexpression vector를 제조하였다. C 말단 부분(427-732bp)만을 발현하는 Ku80 expression vector(Ku Dominant- Negative mutant)는 Kpn I 및 BamH I 제한효소 site을 가지고 있는 primer를 사용하여 Ku80 cDNA를 template로 PCR을 하여 Ku Dominant-Negative cDNA를 만든 후 Kpn I -BamH I 분절을 pcDNA에 삽입하였다. 사용된 sequences는 다음과 같다.

5-TGCAGGTACCTATCATGGAAGACTTGCG-3과 5-GGTACCTAGGTG

CTGGATATAGTACAGG-3.

제조한 plasmid를 Dotap reagent (N-1-(2,3-Dioleoyloxypropyl-N,N,Nitrimethyl ammonium nethyl- sulfate)(Roche Molecular Biochemicals, Sandhofer, Mannheim, Germany)를 사용하여 세포에 투여하였다. 이때, DNA는 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도가 되도록 50mM Hepes-buffered saline (HBS)으로 희석해 주었다. 형질 전환할 세포는 하루 전날 6 well plate에 배양하여 두고, 유전자로 형질전환된 세포는 20시간 후 새로운 배지로 갈아주고, G/GO를 처리하였다.

## 6. 세포 단백질 추출

세포를 모은 뒤 차가운 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어준 후 세포에 0.125 M Tris (pH 6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, 1.5% Mercaptoethanol이 포함된 단백질 추출 완충액(lysis buffer)을 넣고 95°C, 5분간 끓인 뒤 원심분리하였다. 상층액을 취하여 세포 내 전체 추출액으로 사용하였다. 세포질과 세포핵 추출액은 세포에 침전액을 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.3% NP-40을 포함한 완충액 A에 넣고 30분간 얼음 위에 놓고 원심분리 하여 상층액을 취하여 세포질 추출액으로 사용하였다. 세포질 추출액을 분리하고 남은 핵 침전물에 완충액 A로 한번 세척한 후 10 mM HEPES (pH 7.9), 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT를 포함한 추출액 B로 30분간 얼음 위에서 반응시켜 원심분리하고 그 상층액을 취하여 세포핵 추출액으로 사용하였다. 단백질 함량은 Bradford<sup>25</sup>의 방법으로 측정하였다.

## 7. Western blotting

100  $\mu\text{g}$  세포 내 전체 단백, 60  $\mu\text{g}$ 의 세포질 단백질과 30  $\mu\text{g}$ 의 핵 단백을 8% polyacrylamide 젤로 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 옮겼다. membrane에 5% 탈지분유를 함유한 TBS-T 용액 (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.15% Tween 20을 넣고 상온에서 2 시간 blocking한 후 1:1000으로 희석된 Ku70 또는 Ku80 ( Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA), 1:1000 Poly(ADP-ribose) polymerase-1(PARP), 또는 각각 1:200과 1:500으로 희석한 p53 (Pharmingen, Beckton Dickinson CO., San Diego, CA)과 Bcl-2 항체 (Transduction Laboratories, San Diego, CA)로 4°C에서 한밤동안 표지한 후 horse radish peroxidase로 conjugate된 anti-goat, anti-rabbit 2차 항체(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA)를 결합시켰다. 발광 반응의 측정에 enhanced chemiluminiscence kit (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK)을 사용하였다.

## 8. 젤 지연 분석(electrophoretic mobility shift assay)

Ku의 활성화 정도는 Li 등, Kim 등<sup>26,27</sup>의 방법을 변형한 젤 지연분석법 (electrophoretic mobility shift assay)을 통해 확인하였다. [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP로 표지한 double stranded oligonucleotide(5-GGGCCAAGAATCTTAGC-AGTTTCGGG-3) 0.0175 pmoles (  $>10^4$  cpm)와 1  $\mu\text{g}$ 의 poly dI · dC를 포함한 용액( 12% glycerol, 12 mM Hepes, pH 7.9, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 2  $\mu\text{g}$ 의 핵 단백질과 섞은 후 상온에서 30 분간 반응시킨 뒤 반응물을 6% non-denaturing gel에 부하하고, 부하 전 200V에서 2시간 먼저 전기영동한 후, 부하 후 100V에서 4시간 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝나면 젤을 건조시킨 후 자가 방사법으로 Ku DNA-end 활성도를 측정하였다.

## 9. 단백질 합성과 분해 측정(Pulse & Pulse-chase)

pulse실험은 대조군(아무런 처리도 하지 않은 군)과 G/GO 처치군을 정상 조건에서 배양한 후 마지막 4시간동안 [<sup>35</sup>S]methionine(100  $\mu$ Ci/ml) (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 함유한 투석된 10% FBS를 포함한 methionine, cystine이 없는 DMEM 배지 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 같이 투여하였다. pulse-chase 실험의 경우 세포를 [<sup>35</sup>S] methionine을 함유한 배지에서 4시간 배양한 다음, 정상배지로 갈아주고 일정 시간 동안 G/GO를 처치하여 실험을 수행하였다. 세포를 모은 뒤 세포에 10 mM Tris, pH7.4, 1.0% NP-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride를 포함한 radio-immuoprecipitation 용액으로 세포막을 파괴한 다음, 100  $\mu$ g의 세포 단백을 취하여 Ku70 또는 Ku80( Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) 항체로 4시간 결합시켰다. 항체와 결합된 단백질은 4°C에서 한밤동안 protein G-agarose bead(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)와 반응시킨 후 8% polyacrylamide 젤로 전기영동하고 젤을 건조시킨 후 자가 방사법으로 기록하였다.

## 10. 통계처리

모든 자료는 "평균값 $\pm$ 표준오차"로서 표현하고, 각 실험군 간의 변동 양상을 비교 검토하기 위해서 analysis of variance를 응용하고, F 값이 의의가 있을 때에는 Fisher's least significant difference법으로 각 군의 값을 비교하였다. 또한 Student's *t*-test가 알맞을 때에는 그 방법을 이용하고, 어느 경우든지 P 값이 0.05이하일 때에는 의의있는 변동으로 규정하였다.

### III. 결 과

#### 1. Glucose/Glucose oxidase(G/GO) 처치에 의한 AR42J 세포의 사멸

췌장 선세포 AR42J에 G/GO를 농도별로 24시간 처치하거나 10mM Glucose/5mU Glucose oxidase를 시간별로 처치한 후 세포사멸 정도 및 세포 고사 시 일어나는 DNA 분절 정도를 각각 trypan blue 염색과 DNA 분절 측정을 이용하여 관찰하였다. 살아있는 세포를 계수한 결과 0, 1, 5, 10 mU G/GO 처치로 각각 세포수가  $5.7 \pm 0.48$ ,  $4.9 \pm 0.56$ ,  $2.0 \pm 0.27$ ,  $0.4 \pm 0.18$  ( $\times 10^4$  cells/ml)이었고 0, 4, 12, 24 시간별 처치에 의하여 각각  $7.7 \pm 0.23$ ,  $7.3 \pm 0.28$ ,  $4.1 \pm 0.29$ ,  $2.4 \pm 0.21$  ( $\times 10^4$  cells/ml)이었다(그림 1A). ELISA 측정에 의한 DNA 분절은 대조군을 1.0으로 보아 1, 3, 5, 10 mU의 G/GO 처치에 의하여 각각  $1.4 \pm 0.36$ ,  $4.7 \pm 0.56$ ,  $18.5 \pm 3.24$ ,  $44.4 \pm 6.37$ 로 측정되었다(그림 1B). 세포 사멸은 농도, 시간 의존적으로 증가하였으며 5, 10 mU G/GO를 24시간 처리할 경우 및 10 mM G/5 mU GO를 12, 24 시간 처리 시 유의적인 증가를 관찰하였다.( $p < 0.05$ )

#### 2. G/GO처리에 의한 AR42J 세포에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성

세포사멸 시 생성되는 활성산소<sup>22,23</sup>의 양을 간접적으로 측정하기 위해 시간별, 농도별 G/GO를 처치하고 배양액을 분리하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하였다. 농도, 시간 의존적으로 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양이 증가함을 확인하였다(표 1).

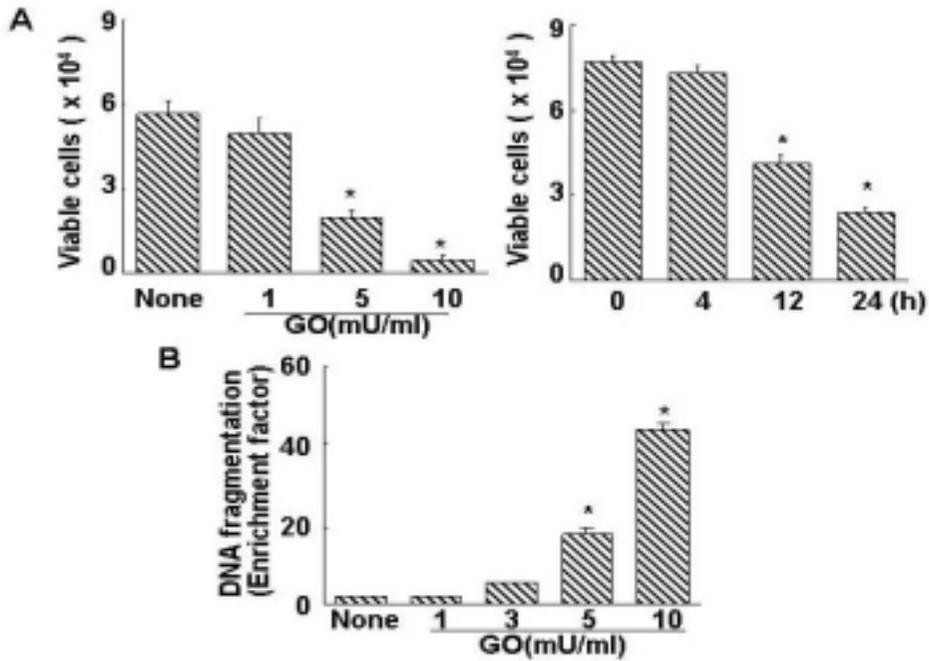


그림 1. AR42J 췌장 선세포에 G/GO 처치 후 세포의 사멸 및 DNA 분절. 췌장 선세포 AR42J에 24시간동안 G/GO를 농도별 처치하거나 시간별 10 mM G/5 mU GO를 처치한 후 세포를 계수하였다(A. trypan blue 염색법 사용). 24시간동안 처치 후 DNA 분절을 측정하였다(B). 각각의 양은 평균±표준오차로 표시하였다. None= 아무것도 처리하지 않은 군. \* 대조군에 비하여 p<0.05

$$\text{DNA fragmentation (Enrichment factor)} = \frac{\text{O.D}(405-490)\text{nm}}{\text{O.D } 490\text{nm}}$$

표 1. G/GO처리 후 AR42J 세포 배양액 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 양.

G/GO농도(mU/ml)	시간별 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 양(μM)	
	12시간	24시간
None	0.859±0.05	7.31± 1.59
1	2.84±1.12	30.17±5.02
5	17.11±2.1	64.03±8.1
10	32.08±1.61	115.16±7.31

농도별 G/GO를 12, 24시간동안 처치한 후 세포 배양액을 취하여 배지 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 양(μM)은 평균값±표준오차로 표시하였다.

### 3. G/GO 처리 후 세포고사 단백질의 변화

AR42J에 G/GO를 시간별 처리한 후 세포고사 단백질들의 변화량을 western blot법으로 관찰하였다. 대표적인 단백질분해효소인 caspase-3에 의한 Poly(ADP-ribose) polymerase[PARP]의 분해 정도를 알아보았다. 12시간부터 PARP가 85 kDa로 분해됨을 확인하였다(그림 2A). 세포고사가 유도될 때, 초기 단계에서 활성이 증가한다고 알려진 p53 단백질이 12시간 G/GO를 처리한 후 단백질 양이 증가함을 확인하였고 세포고사를 억제하는 bcl-2 단백질량이 감소함을 확인하였다(그림 2B). 그러므로 10 mM G/5 mU GO 처리에 의한 AR42J 세포사멸시 세포고사가 유도됨을 확인하였다.

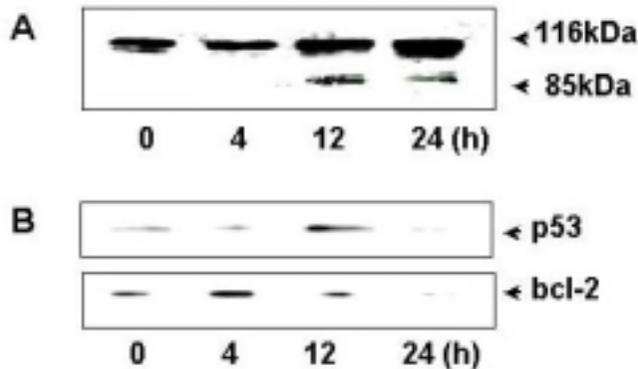


그림 2. G/GO 처리 후 세포고사 관련 단백질의 변화.

세포에 G/GO를 시간별 처리 후 세포고사의 지표로 알려진 PARP 단백질의 분해(A)와 bcl-2, p53의 활성 변화(B)를 western blot법으로 측정하였다.

### 4. G/GO 처리에 의한 세포 내 Ku 단백질의 변화

Ku70/80 단백질은 손상된 DNA 이중나선을 인식, 복구 기능을 수행한다고 알려져 있으므로<sup>9,10</sup> 세포사멸, 세포고사를 조절하는 기능을 할 것으로 예상된다. 따라서 세포 내 Ku 단백질의 감소나 분해는 DNA 손상을 유도 시 복구기능의 결여로 인해 세포 사멸 및 세포 고사를 유도할 것으로 여겨진다. G/GO를 농도별, 시간별 처리한 후 세포 내 단백질을 전체 분리하고, 또한 세포질과

핵 단백질로 분리하여 western blot법을 시행하였다. 농도, 시간 변화에 상관 없이 세포 내 전체 Ku70/80 단백질의 양은 변함이 없는 것을 관찰하였고( 그림 3A) 세포질과 세포핵 단백질을 분리하여 관찰한 결과 농도, 시간 의존적으로 세포질 내 Ku 단백질은 약간 증가하나 세포핵 내 Ku 단백질은 급격히 감소하는 것을 확인하였다(그림 3B).

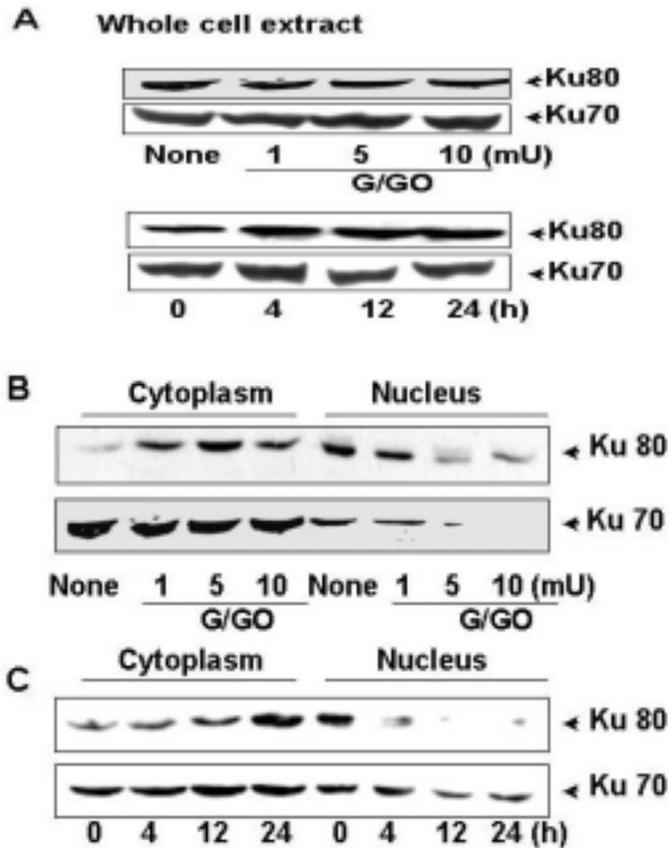


그림 3. G/GO 처치 후 세포 내 Ku 단백질의 변화.

AR42J에 G/GO를 12시간 농도별(0, 1, 5, 10 mU) 처치하거나 10 mM G/5 mU GO를 0, 4, 12, 24시간동안 처치 후 전체 세포 내 Ku 단백질(A) 및 세포질, 세포핵 내에 위치한 Ku 단백질의 양(B, C)을 western blot법으로 측정하였다.

## 5. G/GO 처치에 의한 세포사멸 유도 시 Ku 단백질과 caspase-3와의 관계

G/GO에 의한 핵 내 Ku의 감소 원인을 규명하기 위해 caspase-3 억제제 (z-DEVD-fmk, Calbiochem, San Diego, CA, USA)를 전처리하여 G/GO에 의한 Ku 단백질의 변화를 관찰하였다. 실험 결과, caspase-3 억제제 처리에 의하여 핵 내 Ku 단백질의 감소가 억제됨을 확인하였다(그림 4A). 또한 세포사멸도 caspase-3 억제제 처리에 의하여 유의적으로 줄어드는 것을 확인하였다 ( $p < 0.05$ )(그림 4B). 그러므로 G/GO 처치에 의한 AR42J 세포사멸 시 caspase 활성화에 의하여 핵 내 Ku 단백질이 분해됨을 알 수 있었다.

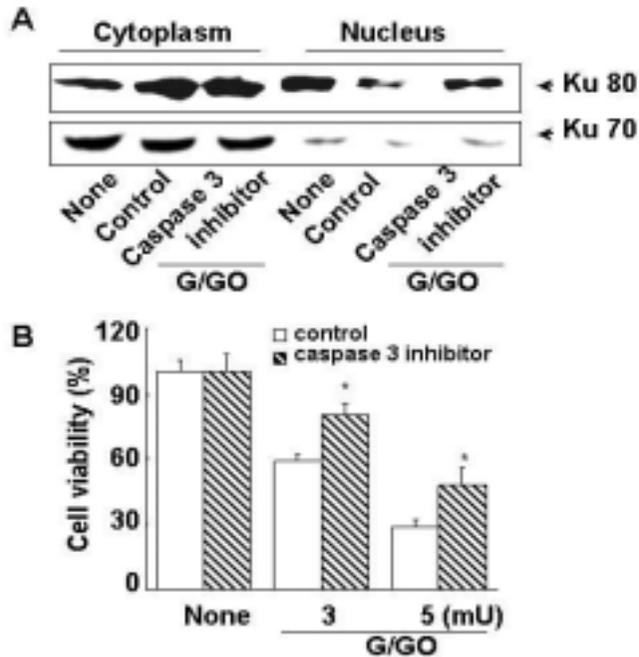


그림 4. Caspase-3 억제제 전처리 후 G/GO에 의한 Ku 단백질의 변화 및 세포의 사멸. AR42J에 G/GO를 12시간 처치한 후 세포질, 세포핵 내에 위치한 Ku 단백질의 양을 western blot법으로 측정하였다(A). 24시간 농도별 G/GO 처치한 후 세포사멸 정도(MTT 분석)를 측정하였다(B). caspase-3 억제제(z-DEVD-fmk)는 5 uM 농도로 4시간 전에 처리하였다. None=대조군, Control=10 mM G/5 mU GO를 12시간 처리한 군, Caspase 3 inhibitor= Caspase-3 억제제 전처리 후 G/GO 처리한 군.

\* 대조군에 비하여  $p < 0.05$ .

## 6. Ku DNA-end 결합 능 측정

Ku 단백질은 세포 핵 내에서 기능하는 DNA 복구 단백질으로 그 활성을 보기 위해서는 Ku DNA-end 결합 능력을 젤 지연 분석법으로 확인해 보아야 한다. AR42J 세포 내의 Ku-DNA 결합 능력을 살펴본 결과, 정상 세포군(Wild)과 pcDNA control vector 유전자를 일시적으로 형질 전환한 세포군의 Ku-DNA 결합 능력은 G/GO를 12시간 처치에 의하여 Ku DNA-end 결합 능이 감소되어 Ku 단백질의 활성이 감소됨을 관찰하였다. DNA 결합 부분이 제거된 Ku dominant-negative mutant 유전자로 형질 전환한 세포군의 경우, Ku DNA-end 결합 능력은 정상 세포군과 pcDNA control vector를 일시적으로 형질 전환한 세포군에 비하여 Ku DNA-end 결합 능이 감소되어 Ku dominant-negative mutant 유전자로 형질 전환될 경우, Ku DNA-end 결합 능이 감소됨을 알 수 있었다(그림 5).

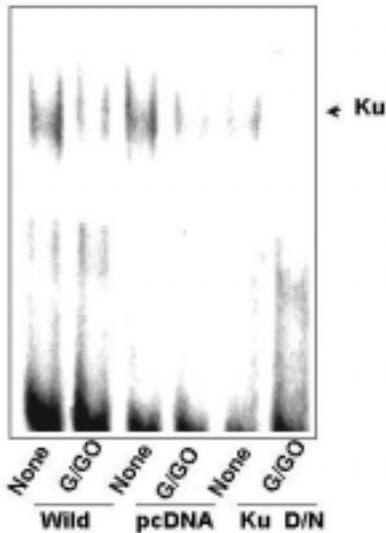


그림 5. G/GO에 의한 Ku DNA-end 결합 능 변화. AR42J 세포에 G/GO처리 후 Ku DNA-end 결합 능력을 젤 지연 분석법으로 관찰하였다. Wild= 정상 AR42J 세포군, pcDNA= pcDNA control vector를 형질전환시킨 군, Ku D/N= Ku dominant-negative mutant 유전자를 형질전환시킨 군, None= G/GO를 처치하지 않은 군, G/GO= 10 mM G/5 mU GO를 12시간 처치한 군.

## 7. G/GO 처리 후 형질전환 세포군들의 세포사멸 비교

췌장 선세포 AR42J에 pcDNA3, 또는 Ku70, Ku80 과다발현 벡터 (overexpression vector), Ku D/N(Ku dominant-negative) mutant 유전자를 일시적으로 형질 전환시켜 G/GO 처치에 의한 세포사멸 정도와 DNA 분절을 비교하여 Ku 단백질의 세포 생존 능력을 관찰하였다. 10 mM Glucose/Glucose oxidase를 3, 5 mU 농도로 24시간 처치한 후 세포 사멸과 DNA 분절 정도를 각각 trypan blue 염색과 DNA 분절 측정을 이용하여 관찰하였다. 0, 3, 5 mU GO를 처리하였을 때, 정상 세포(Wild)군의 세포 수는 각각  $12.0 \pm 0.71$ ,  $7.85 \pm 0.73$ ,  $4.87 \pm 0.38$  이었고 pcDNA 군은  $13.0 \pm 0.32$ ,  $8.5 \pm 0.44$ ,  $5.1 \pm 0.28$ 이었으며 Ku70을 과발현시킨 군은  $12.2 \pm 0.37$ ,  $9.4 \pm 0.44$ ,  $6.4 \pm 0.37$ , Ku80를 과발현시킨 군은  $12.6 \pm 0.18$ ,  $10.8 \pm 0.6$ ,  $7.1 \pm 0.4$  이고 Ku D/N를 과발현시킨 군은 각각

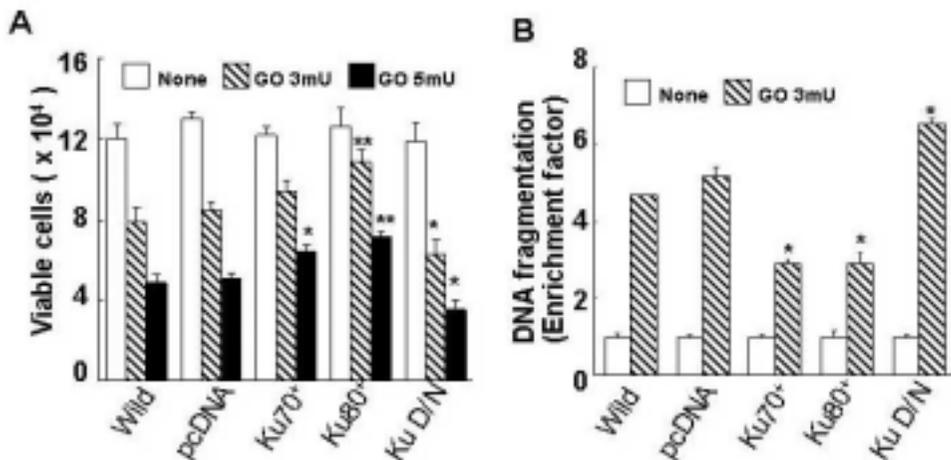


그림 6. 유전자 형질전환 세포군들의 세포사멸과 DNA 분절.

AR42J에 G/GO를 24시간 처치 후 농도별 세포 사멸 정도(trypan blue 측정)와 DNA 분절을 측정하였다. 각각의 양은 평균±평균오차로 표시.

$$\text{DNA fragmentation (Enrichment factor)} = \frac{\text{O.D}(405-490)\text{nm}}{\text{O.D } 490\text{nm}}$$

Wild= 정상 세포군, pcDNA= pcDNA를 형질전환시킨 군, Ku 70<sup>+</sup>/80<sup>+</sup>=Ku 70, 80 과다발현 벡터(overexpression vector)를 형질전환시킨 군, Ku D/N= Ku dominant-negative mutant 유전자를 형질전환시킨 군, None=G/GO를 처치하지 않은 군, GO 3, 5 mU= 각각 3, 5 mU의 G/GO를 24시간 처리한 군.

\* 대조군에 비하여  $p < 0.05$ , \*\*대조군에 비하여  $p < 0.01$

11.9±0.91, 6.3±0.69, 3.5±0.55(x 10<sup>4</sup> cells/ml)이었다(그림 7A). ELISA 측정에 의한 DNA 분절 정도는 대조군을 1.0으로 보아 정상 세포군 또는 pcDNA 군, Ku70, Ku80 그리고 Ku D/N를 과발현시킨 군에 3 mU의 G/GO 처리한 경우, 4.7±0.08, 5.2±0.06, 2.9±0.03, 2.9±0.13, 6.5±0.05로 나타났다(그림 7B). 이러한 결과를 통해 Ku70/80 단백을 과다 발현시켜 활성을 증가시킨 경우 정상 세포군의 세포사멸 및 세포고사가 억제되었으며 Ku D/N mutant 유전자에 의해 Ku 단백 활성을 억제할 경우 G/GO에 의한 세포사멸, 세포고사가 유의적으로 증가됨을 확인하였다(p<0.05). 따라서, Ku 단백질이 활성 산소로 유도되는 세포고사 기전에서 세포 생존 단백질로 기능함을 알 수 있었고 핵 내 Ku 단백질의 감소로 인한 DNA 복구 기능의 결여가 세포고사의 원인으로 작용할 수 있음을 의미한다.

## 8. G/GO에 의한 세포 내 Ku 단백질의 합성, 분해 변화

G/GO 처리에 의한 Ku 단백질의 합성 및 분해 변화를 관찰하기 위하여 각각 pulse 및 pulse-chase법으로 관찰하였다. 실험결과, 10 mM G/5 mU GO를 4, 12시간 처리하였을 때 Ku 단백질 합성이 G/GO를 처리하지 않은 군에 비하여 증가하고(그림 7A) Ku 단백질의 분해도 증가함을 관찰하였다(그림 7B). 앞서 그림 3의 결과를 통해 G/GO 처리에 의하여 전체 세포 내 Ku 단백질의 양에는 변화가 없었지만, 세포질 내 Ku 단백질의 증가, 핵 내 Ku 단백질의 급격한 감소가 일어남을 관찰하였다. 그러므로 G/GO 처리에 의하여 Ku의 합성과 분해가 동시에 증가되어 전체 세포 내 Ku 단백질의 양에는 변화가 없지만 핵으로 이동한 Ku 단백질은 G/GO에 의하여 분해되는 것을 알 수 있었다.

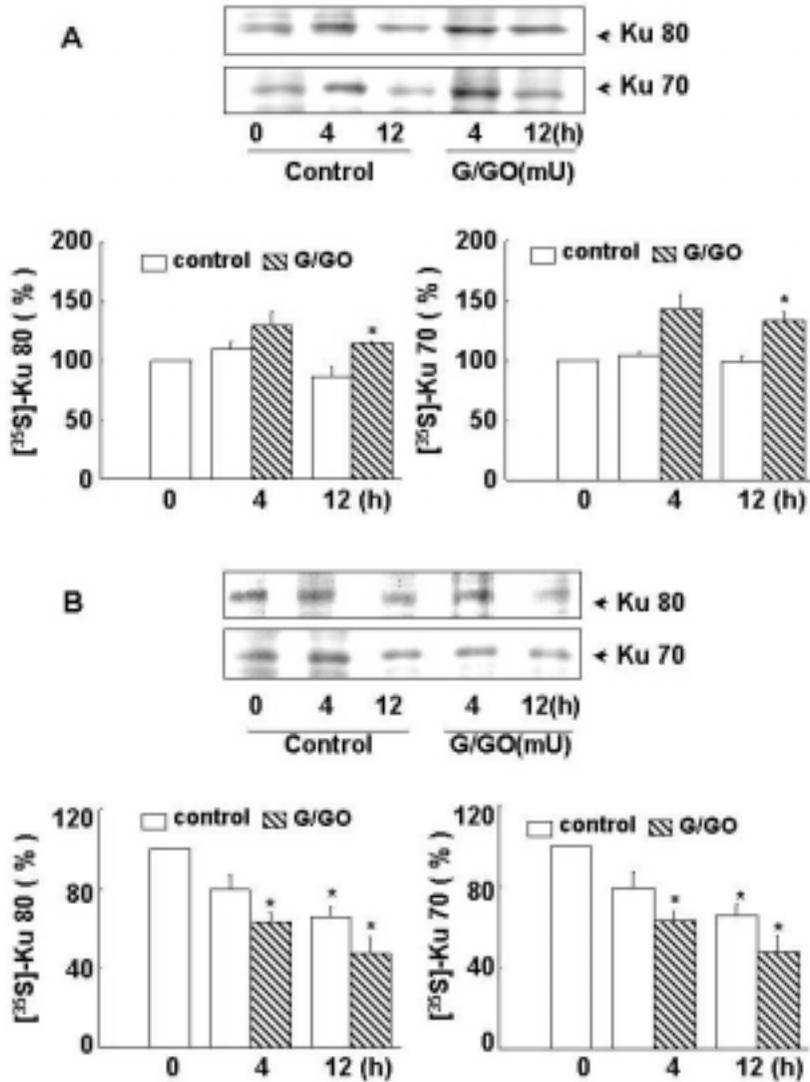


그림 6. G/GO에 의한 세포 내 Ku 단백질의 합성과 분해. 췌장 선세포 AR42J에 10mM G/5mU GO를 시간별 처리 후 S<sup>35</sup>로 label된 Ku 단백을 면역침강, 젤 전기영동을 통하여 확인하였다. pulse 실험의 경우, G/GO를 처리하기 마지막 4시간 동안 [S<sup>35</sup>]가 첨가된 methionine, cystine이 없는 배지로 배양한 후 실험에 임하였고(A) pulse-chase 실험은 4시간 동안 위의 배지로 배양한 후 G/GO를 시간별 처리하였다(B). 0 시간, G/GO를 처리하지 않은 세포군(대조군)의 Ku 단백질의 자기 방사 기록을 100%로 하여 각각의 방사 기록량을 수치로 나타내었다. \* 대조군에 비하여 p<0.05.

## IV. 고찰

급성 췌장염의 실험 모델에서 활성산소에 의하여 췌장 선세포의 세포고사가 유발됨이 보고되었으며<sup>8,9</sup> 만성 췌장염 환자를 대상으로 한 실험 결과, 췌장 조직에서 췌장 선세포의 세포고사와 함께 caspase-1 단백질이 활성화됨이 보고되었다.<sup>28</sup> 이러한 연구들을 통하여 활성산소에 의한 췌장 선세포의 세포고사 유도가 췌장염의 발병과 진행에 관여됨을 알 수 있으며 활성산소에 의한 췌장 선세포의 세포고사 기전을 밝히는 것이 임상적으로도 중요함을 제시한다.

Ku70과 Ku80 단백질은 DNA 이중나선 손상을 인식하여 그 부위에 결합한 후 DNA-dependent protein kinase(DNA PK)를 활성화시킴으로서 손상된 DNA 복구 과정을 개시한다.<sup>10,11</sup> Ku 단백질은 DNA PK의 regulatory subunit으로서의 기능 외에 자체로도 손상된 DNA 복구 기능을 수행한다고 알려져 있다.<sup>11</sup> Ku80 단백질이 결핍된 Ku80-null(Ku80<sup>-/-</sup>) 생쥐로부터 기원한 fibroblast 세포의 경우, 과산화수소로 유도되는 세포 손상에 대한 감수성이 정상 세포보다 높아 손상된 DNA가 축적, 세포사멸이 유도된다.<sup>16</sup> 과다한 활성산소의 생성은 DNA 손상을 유도하는데 토끼 척수 모델에서도 15분간 허혈을 준 다음 4, 18시간 재관류를 행하는 동안, Ku 단백질이 DNA와 결합하는 활성이 증가하며 60분간 허혈을 주고 재관류하게 되면 Ku-DNA 결합력이 감소함을 보였다.<sup>14,15</sup> 이러한 연구들은 활성산소로 인한 DNA 손상 시 DNA 복구 단백질인 Ku70/80의 역할이 중요함을 제시한다.

본 연구에서는 과도한 활성산소(과산화수소)를 생성하기 위한 발생원으로서 Glucose/Glucose oxidase 효소 체계를 사용하였고 이로 인하여 AR42J 세포손상(세포사멸, DNA 분절)을 유도하였을 때 caspase-3에 의하여 분해되는 Poly(ADP-ribose) polymerase[PARP]가 분해됨을 확인하였고, 세포고사 지표 단백질인 p53이 활성화되고 세포고사 시 감소되는 bcl-2 단백질이 감소함을 관찰하여 G/GO에 의하여 유도되는 세포사멸시 세포고사 또한 유도됨을 관찰하였

다. 이때 Ku 단백질의 변화를 살펴본 결과, 전체 세포 내 Ku 단백질의 양은 변함이 없는 반면, 세포질 내 Ku 단백질의 증가 및, 핵 내 Ku70/80 단백질의 급격한 감소를 관찰하였다. Ku 단백질의 활성을 알기 위해서 Ku DNA-end 결합 능력을 지연 분석법으로 관찰한 결과, G/GO에 의하여 Ku-DNA 결합 능력이 감소함을 확인하였다. 이상의 결과를 통해 G/GO에 의하여 AR42J의 세포고사가 유도될 때 핵 내 Ku 단백질의 양과 Ku가 DNA와 결합하는 활성이 감소함을 관찰하였다. Ku70 또는 Ku80 유전자를 과다 발현하거나 Ku dominant-negative mutant 유전자를 형질 전환시켜 세포 내 Ku 단백질의 역할을 확인한 결과, Ku 단백질이 세포고사를 막는 세포 생존 단백질로 작용함을 관찰하였다. 이는 G/GO 처치에 의하여 생성되는 활성산소로 AR42J 세포를 자극할 경우, 핵 내 Ku 단백질의 감소가 세포고사의 원인으로 작용할 수 있음을 시사한다.

Caspase는 전구효소로 합성되어 존재하다가 자가 분해 또는 단백질분해효소의 작용으로 활성형이 되고 과발현시키면 세포고사를 유발시킨다. Caspase는 기질단백의 aspartic acid 다음을 끊어주는 단백질분해효소로서 대표적인 기질단백으로 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), DNA-dependent protein kinase(DNA-PK) 등이 있다.<sup>15,16</sup> 본 연구에서는 활성산소에 의하여 체장 선세포의 세포고사가 유도될 때 핵 내 Ku 단백질의 감소에 대한 기전을 밝히기 위해 caspase-3 억제제를 사용하였다. caspase-3 억제제를 전처리한 후 G/GO 처치 시 핵 내 Ku 단백질의 감소가 억제되었고 세포사멸도 억제됨을 관찰하였다. 앞서 G/GO에 의한 세포 내 Ku 단백질의 변화를 western blotting을 통해 살펴보았을 때 전체 세포 내 Ku 단백질의 양이 변하지 않았으며 pulse, pulse-chase 방법을 통하여 Ku 단백질의 합성이 증가하고 Ku 단백질의 분해가 증가됨을 관찰하였다. 이 결과를 통하여 G/GO 처치로 세포고사가 유도될 때 활성화된 일련의 caspase에 의하여 핵 내 Ku 단백질이 분해됨을 의미한다. 최근 caspase가 활성화되어 핵 내로 재분포되어 단백질 분해 기능을 담당한다는 보고<sup>20</sup>와 함께 항암물질에 의한 Ku 단백질의 분해가 caspase-3에 의하여 매개된다는 보고<sup>21</sup>를 통하여 G/GO에 의하여 세포고사 유도 시 활성화되는 일련

의 caspase에 의해 핵 내 Ku 단백질이 분해됨으로서 DNA 손상 복구 기능이 결여되고 세포고사가 일어나리라 추측된다.

결론적으로 G/GO 처치에 의하여 생성되는 활성산소가 AR42J 세포의 DNA를 손상시키며 이 DNA 손상은 Ku70/80에 의해 복구되나, 과도한 활성산소가 세포 내 생성되면 caspase-3가 활성화되어 Ku70/80 단백질을 분해하여 DNA 손상과 세포 고사가 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 활성산소에 의한 췌장 선세포의 손상시 DNA 복구 단백질인 Ku70과 Ku80 단백질이 췌장 선세포의 방어기전으로 작용할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

활성산소로 유도되는 췌장 선세포의 세포고사 기전 및 방어 체계에서 DNA 복구 단백질인 Ku70/80 단백질의 역할에 대한 연구로서 AR42J 췌장 선세포에 Glucose/Glucose oxidase를 처치하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 췌장 선세포 AR42J에 Glucose/Glucose oxidase(G/GO)를 처치함으로써 배양액 내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성이 증가되었고 이에 따라 세포사멸이 유도되었다.

2. G/GO 처치에 의하여 세포고사 지표 단백질인 poly[ADP-ribose] polymerase가 분해되며, p53의 활성 증가, Bcl-2 단백질의 분해를 관찰하여 G/GO 처치에 의하여 췌장 선세포의 세포고사가 유도됨을 확인하였다.

3. 세포고사가 유도될 때, 전체 세포 내 Ku 단백질의 양은 변함이 없었고, 핵 내 Ku70/80 단백질의 양과 활성이 급격히 감소되었다.

4. Caspase-3 억제제는 G/GO에 의하여 유도되는 세포핵 내 Ku 단백질의 감소와 세포고사를 억제하였다.

5. Ku70 또는 Ku80 과발현 유전자, Ku dominant-negative mutant 유전자로 형질전환시킨 세포군과 정상세포를 비교한 결과, Ku70/80 단백질은 세포 생존 단백질로 작용하여 세포고사를 억제하였다.

6. G/GO 처치에 의하여 세포 내 Ku 단백질의 합성이 증가하며 핵 내로 이동된 Ku 단백질은 분해됨을 확인하였다.

이상의 결과를 보아 G/GO로 의하여 과다한 활성산소가 세포 내에 생성되면 caspase-3가 활성화되어 Ku70/80 단백질을 분해하여 DNA 손상과 세포 고사가 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 활성산소에 의한 췌장 선세포의 손상 시 DNA 복구 단백질인 Ku70과 Ku80 단백질이 췌장 선세포의 방어기전으로 작용할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983;94:407-411.
2. Sanfey H, Bulkeley GB, Cameron JL. The pathogenesis of acute pancreatitis: the source and role of oxygen-derived free radicals in three different experimental models. *Ann Surg.* 1985;201:63-69
3. Aho HJ, Nevalainen TJ, Havia VT, Heinonen RI, Aho AJ. Human acute pancreatitis: a light and electron microscopic study. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1982;90(5):367-373.
4. Schoenberg MH, Buchler M, Kirchmayer R, Gasper M, Berger HG, Klin W. Lipid peroxidation and selenium serum concentration in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg.* 1991;69:1025-1032.
5. Schenberg MH, Birk D, Berger HG. Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:1306S-1314S.
6. Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1996;10:299-303.
7. Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol.* 1995;269:C1295-1304.
8. Sandoval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, et al. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 1996;111:1081-1091.
9. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet.* 1993;341:1251-1254.
10. Smith GCM and Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Gene&Development* 1999;13:916-934; 1999.
11. Carol F, Stephen PJ. Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions. *Mutation Research* 1999;434:3-15.
12. Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, Sanchez M, Sokol K, Nussenzweig MC, Li GC, Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 1996;382:551-555.
13. Gu Y, Seidl KJ, Rathbun GA, Zhu C, Manis JP, van der stoep N,

- Davidson L et al. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 1997;7:653-665.
14. Kim GW, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Early decrease in DNA repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA Fragmentation After transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 2001;32:14071-14076.
  15. Shackelford DA, Tobaru T, Zhang S, Zivin JA. Changes in expression of the DNA repair complex DNA-dependent proteins kinase after ischemia and reperfusion . *The J Neurosci.* 1999;19(12):4727-4738.
  16. Arrington ED, Caldwell MC, Kumaravel TS, Lohani A, Joshi A, et al. Enhanced sensitivity and long-term G2 arrest in hydrogen peroxide-treated Ku80-null cells are unrelated to DNA repair defects. *Free Rad Biol Med.* 2000;29:1166-1176.
  17. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trend Biochem Sci.* 1997;15:7-10.
  18. Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He W-W, Dixit VM. ICE-LAP3, a Novel Mammalian Homologue of the Caenorhabditis elegans Cell Death Protein Ced-3 Is Activated during Fas- and Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 1996;271:1621-1625.
  19. Chandra J, Samali A, Orrenus S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 2000;29:324-333.
  20. Mandal M, Adam L, Kumar R. Redistribution of Activated caspase-3 to the Nucleus during butyric acid-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;260:775-780.
  21. Kim SH, Kim D, Han JS, Jeong CS, Chung BS, Kang CD, Li GC. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs. *Cancer Research* 1999;59:4012-4017.
  22. Violet GY, John HM. Comparison of the Glucose oxidase method for glucose determination by manual assay and automated analyzer. *J. Pharm and Toxic Met.* 2000;44:543-546.
  23. Li PF, Dietz R, Harsdorf Rv. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *Febs Letter* 1997;404:249-252.
  24. Thurman RG, Ley HG, Scholz R. Hepatic microsomal ethanol oxidation. *Eur J Biochem.* 1972;24:420-430.
  25. Bradford JC, Duszenkova IV, Nagradova NK. A rapid and sensitive

- method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
26. Li JJ, Westergaard C, Ghosh P, Colburn NH. Inhibitors of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation block the neoplastic transformation response. *Cancer Research* 1997;57:3569-3576.
  27. Kim SH, Um JH, Kim DW, Kwon B.H, Chung BS. and Kang CD. 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.
  28. Ramadani M, Yang Y, Gansauge F, Gansauge S, Beger HG. Overexpression of caspase-1(interleukin-1 beta converting enzyme) in chronic pancreatitis and its participation in apoptosis and proliferation. *Pancreas* 2001;22:383-387.

## **Abstract**

### **Oxidative stress, DNA repair proteins and Apoptosis in AR42J Cells**

**Ji Yeon Song**

*Department of Medical Science  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hyeyoung Kim)

Cell death linked to oxidative DNA damage has been implicated in acute pancreatitis. During DNA damage, DNA repair proteins, Ku70 and Ku80, prevent cell death but severe DNA damage beyond the capacity of the DNA repair proteins triggers necrosis or apoptosis. This study aims to investigate the role of Ku70 and Ku80 on apoptotic cell death, induced by oxidative stress in pancreatic acinar AR42J cells. We examined Ku expression (by western blotting), cell viability (by cell counting and MTT positive cells) and apoptosis (by DNA fragmentation and poly[ADP-ribose] polymerase cleavage, expression changes of p53 and Bcl-2) of the cells treated with or without hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which is continuously generated by glucose oxidase (GO) acting on  $\beta$ -D-glucose, G/GO, and also in the absence or presence of caspase-3 inhibitor. G/GO induced slight changes in cytoplasmic Ku70 and Ku80, but drastic decrease in nuclear Ku70 and Ku80 time- and concentration-dependently. Ku70 and Ku80 expression in whole cell extracts were not changed. G/GO-induced alterations in Ku expression were inhibited, in part, by caspase-3 inhibitor. G/GO-induced apoptosis, which was in parallel with loss of nuclear Ku70 and Ku80, in wild-type cells and the cells transfected with the control pcDNA3 vector. G/GO did not induce apoptosis in the cells transfected with either Ku70 or Ku80 expression gene, but increased apoptosis in those transfected with Ku dominant-negative mutant. Conclusively, nuclear loss of Ku70 and Ku80 may cause the loss of defense against oxidative

DNA damage and thus, underlie the mechanism of apoptosis in pancreatic acinar cells after oxidative stress.

---

Keywords- Reactive oxygen species, Ku70/80 proteins, Apoptosis, Pancreatic acinar AR42J cells