마우스 종양에서 저선량 방사선이 Apoptosis의 유도에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 치료방사선과학교실, 연세암센터

성진실 · 표홍렬 · 정은지 · 김성희 · 서창옥

목 적 : 방사선에 의한 apoptosis 유도에 저선량 방사선이 미치는 영향을 관찰하여 adaptive response 현상이 관계되는지를 마우스 종양에서 분석하고 관련되는 기전에 관하여 연구하고자 하였다.

대상 및 방법 : 마우스 동종암인 HCa-I, OCa-I에서 저선량 (0.05 Gy) 방사선 조사 후 고선량 (25 Gy)을 조사하여 이로부터 일정시간 후 종양에서 유도된 apoptosis 수준을 비교분석하였다. 또한, apoptosis의 조절 물질인 p53, Bcl-2, Bax, Bcl-X 등의 발현을 Western blotting으로 분석하여 관련된 기전을 연구하였다.

결 과 : OCa-I에서 0.05 Gy를 전처치 후에 25 Gy를 조사한 군에서 apoptosis의 유도 수준은 세포 1000개당 229로서 예상되는 값인 324 에 비하면 약 30%정도 감소된 결과로 나타나서($p<0.05$) 저선량의 방사선에 의하여 apoptosis의 유도 수준이 감소한 것으로 나타났다. 반면 HCa-I에서는 예상된 apoptosis수준과 실제 관찰치간에 변화가 없었다. 유전물질의 발현에서 p53은 두 종양 공히 0.05 Gy 조사군, 25 Gy 조사군 및 0.05+25 Gy 조사군에서 발현이 증가되었다. Bcl-2와 Bax는 두 종양 모두 발현 수준의 등락이 현저하지는 않았으나 OCa-I의 0.05+25 Gy 조사군에서 Bcl-2의 발현이 Bax를 상회하는 결과를 보였다. Bcl-X는 HCa-I에서 0.05 Gy 정도의 저선량에서부터 높은 상승을 보인 반면, OCa-I에서는 전혀 발현되지 않았다.

결 론 : 마우스 종양의 일부에서 0.05 Gy의 저선량이 고선량 방사선에 의한 apoptosis 유도에 대하여 adaptive response를 보이는 것으로 나타났다. 이는 Bcl-2, Bax의 발현 수준과 Bcl-X 등이 관련되는 것으로 보였다. 본 연구는 방사선에 의한 apoptosis에서 adaptive response의 관련성이 일정치 않다는 것을 마우스 종양에서 보여주었다.

핵심용어 : 방사선, Apoptosis, Adaptive response, **마우스 종양**

)

서 론

세포 혹은 개체가 소량의 변이유발소에 미리 노출된 경우에 대량의 같은 물질에 다시 노출되면, 이 물질의 독성 작용에 대한 저항성이 이전보다 증가하는 현상이 관찰되며,[1, 2] 이러한 현상을 adaptive response라고 한다. 방사선은 대표적인 변이유발소로서 저선량의 방사선에 대한 adaptive response가 존재함이 밝혀졌고,[3, 4] 본 연구자들도 이미 정상 세포주와 간암세포주에서 이 현상을 확인하여 보고한 바 있다.[5, 6] 생체내에서 저선량의 방사선이 미치는 영향은 정상 조직과 종양 모두에서 임상적으로 중요성이 있다. 즉 종양을 방사선 치료하는 기간 중 진단적 x-선 촬영을 시행하는 경우가 많으며 이것이 종양에 미치는 영향은 효과적인 암치료를 위해서 확실하게 규명되어야 할 필요가 있다. 그러나 생체를 대상으로 하는 실험적 연구로는 그간 보고된 연구가 매우 제한된 정보에 국한되고, 사실 이 현상의 존재 여부에 대해서도 논란이 일고 있는 실정이다.[7] 또한 그 기전에 있어서도 몇 가지 가설은 있으나[7] 아직 확실히 정립된 것은 없는 상태이다.

본 연구에서는 apoptosis 유도에 있어서 저선량 방사선에 의한 adaptive response 현상이 관계되는지를 생체내에서 관찰하고자 하였다. 마우스 종양에서 저선량 방사선에 의한 adaptive response 현상이 나타나는지, 나타난다면 방사선 감수성과 관련성은 없는지, 또한 관련되는 기전에 관하여 연구하였다.

대상 및 방법

1. 마우스 동종암의 이식

실험 동물은 주령 8 10주되는 C3H/HeJ 웅성 마우스를 사용하였다. 마우스는 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급 및 사육되었고 온도 22℃, 습도 55%가 일정하게 유지되는 사육환경에서 상자 당 5마리씩 사육하였다. 종양세포들을 마우스 대퇴부에 이식하여 종양을 성장시켰으며 종양 세포의 이식과정은 다음과 같이 하였다. 즉, 종양세포는 괴사가 없는 부분을 기계적으로 분쇄 후 0.025% Trypsin 처리한 후 체로 여과시키고 Sweeney 필터

본 연구는 1998년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 지원으로 시행되었음이 논문은 1999년 8월 24일 접수하여 1999년 9월 22일 채택되었음.책임저자 : 성진실, 연세대학교 의과대학 치료방사선과학교실 Tel : 02)361-7631, Fax : 02)312-9033 E-mail : jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

로 통과시켜, 단일 부유화된 종양세포만 얻었다. 종양세포액을 4℃에서 1500 rpm으로 원심분리시켜서 침전물만 얻어 이를 다시 재부유화시켰다. 재부유화된 세포액 10 μl에 trypan blue 염색약 990 μl를 섞고 이중 10 μl만 취하여 100배 현미경하에서 hemocytometer로 활성 세포수만 계수하였다. 계수된 세포수를 기준으로 5×10^5개의 세포를 마우스 대퇴부에 주사하였다. 종양의 성장은 주 2 3회 caliper로 측정하여 관찰하였으며 평균직경 10 mm에 도달하였을 때 실험을 시작하였다.

2. 실험 대상 종양의 특성

종양은 난소암인 OCa-I, 간암인 HCa-I로서 이들은 PCR- SSCP 검사상 p53이 둘다 자연형인 종양들이다. 방사선에 대한 감수성은 매우 대조적이어서 OCa-I과 HCa-I의 TCD50 검사 결과가 각각 52.6 Gy 및 80 Gy 이상이고,[8] 25 Gy 조사시 종양성장지연도 각각 12.7일, 0.3일에 이르고 있다.[9] 25 Gy 조사시 방사선에 의한 apoptosis의 유도 수준(apoptotic index) 역시, 최대치가 각각 12.9%, 1.1%으로 보고된 바 있다.[10] 즉, OCa-I은 방사선에 민감한 종양으로, HCa-I는 내성 종양으로 뚜렷이 대별되고 있다.

3. 방사선 조사 및 시료의 채취

방사선 조사는 cobalt-60 방사선 조사기(선량율 0.73 Gy/ min)를 이용하여 전신 방사선 조사를 시행하였다. 전처치 조사량으로 0.05 Gy를 조사하고 4시간 후에 치료량으로 25 Gy를 역시 전신 조사하였다. 치료량으로 25 Gy를 선택한 것은 방사선에 내성이 높은 HCa-I을 고려한 결과로서 동일선량에서 그간 많은 연구 결과가 축적된 바 있다.[9, 10] 25 Gy 조사 후 4시간째에 마우스를 경추 탈구사시킨 후 종양조직을 채취하였다.

4. Apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 μm 절편을 만들어 hematoxylin eosin 염색을 시행하였다. 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라,[11] 마우스의 조직 표본에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. Apoptosis의 평가는 400배 광학 현미경하에서 시행하며, 1000개의 세포당 apoptosis를 구하였다.

5. Western blotting

채취한 조직의 다른 일부는 western blotting 을 이용하여 apoptosis와 관련된 유전물질의 발현을 분석하였다. 채취한 조직 약 1 mm^3를 잘게 부수어 인산 완충액(PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 0.5% NP40, 1 μl/ml dithiothereitol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), 10 μl/ml of PMSF (Sigma), 20 mM Tris-hydrochloride (pH 7.6), 150 mM sodium chloride, 5 mM EDTA 등을 포함하는 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4℃에서 20분간 원심분리하여 단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 polyacrylamide gel에서 100 volt로 1시간 동안 전기영동시킨 후 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이를 5% 탈지유와 0.1% tween-20를 포함하는 PBS (blocking 액)에 2시간 동안 처리하고 분석하고자 하는 각 유전자에 대한 1차 항체로 2시간 처리하였다. 사용한 1차 항체로는 p53 (Ab 7, Oncogene Science, Manhassett, NY), Bcl-2 (Ab 7, Oncogene Science), Bax (p-19, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Ctuz, CA), Bcl-X (Ab 1, Oncogene Science) 등으로 생산 회사가 추천하는 농도를 사용하였다. 다시 PBS로 세척하고 horseradish peroxidase 가 접합되어 있는 항양 또는 항토끼 항 IgG 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 1시간 처리한 후 ECL Western Blotting Detection System (Amersham, Arlington Heights, IL)을 사용하여 x-선 필름상에 나타나는 band 의 농담으로 유전물질의 발현을 조사하였다. 발현 수준의 평가는 densitometry (CSC chemiluminiscence detection module, Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 분석하였다.

6. 통계적 분석

Apoptosis 수준의 비교 분석은 Student t-검정을 이용하여 유의성을 조사하였다.

결 과

1. 0.05 Gy 전처치에 의한 apoptosis 유도 수준의 변화

OCa-I에서 방사선 조사 후 4시간 째에 보이는 apoptosis 의 유도 수준은 0.05 Gy, 25 Gy 단독 조사시 세포 1000개당 각각 41, 292로 나타났다. 0.05 Gy를 전처치하고 4시간 후에 25 Gy를 조사한 경우에는 세포 1000개당 229였다(Fig. 1A). 0.05 Gy 및 25 Gy에 의하여 예상되는 apoptosis 수준은 두 경우의 apoptosis 수준의 합에서 대조군의 apoptosis 수준을 제한 값인 324에 비하면 약 30% 정도 감소된 결과이며 유의한 차이로 나타났다($p<0.05$). 반면 HCa-I에서는 예상된 apoptosis수준과 실제 관찰치가 일치하는 결과를 보이고 있다(Fig. 1B). 즉, OCa-I에서는 저선량의 방사선에 의하여 apoptosis의 유도 수준이 감소하였으나 HCa-I에서는 저선량의 방사선에 의한 영향이 관찰되지 않았다(Table 1).

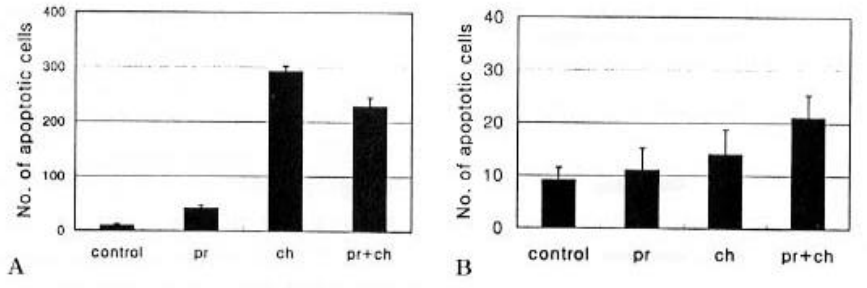

Fig. 1. Radiation induced apoptosis in murine tumors, OCa-I (A) and HCa-I (B). Tumor-bearing animals were given 0.05 Gy pretreatment alone (pr), 25 Gy challenging radiation alone (ch), or 0.05 Gy followed by 25 Gy (pr+ch). Shown are numbers of apoptosis per 1000 cells in mean± SE. Significant difference was seen between observed and expected level in OCa-I (A) at $p<0.05$ by Student's t-test.

Table 1. Effect of 0.05 Gy Pretreatment on 25 Gy-induced Apoptosis in Murine Tumors

	Control	0.05 Gy	25 Gy	0.05 Gy+25 Gy		observed/ expected
				expected	observed	
HCa-I	9	15	14	20	21	1.05
OCA-I	9	41	292	324	229	0.70

2. Apoptosis 조절 물질 발현의 변화

Apoptosis의 조절에 관여하는 유전 물질의 발현 양상을 Western blotting을 통하여 분석하였다. p53, Bcl-2, Bax, Bcl-X 등이 분석되었다. OCa-I에서 p53은 대조군에 비하여, 0.05 Gy 조사군, 25 Gy 조사군 및 0.05+25 Gy 조사군에서 각각 0.8, 1.5, 2.0 배의 증가를 보였다. 즉, 0.05 Gy의 전처치가 25 Gy 조사 후에 p53 의 유도 수준을 올린 것으로 보인다. Bcl-2와 Bax는 발현 수준의 등락이 현저하지는 않았으나 0.05+25 Gy 조사군에서 Bcl-2의 발현이 Bax를 상회하는 결과를 보였다. Bcl-X는 전혀 발현되지 않았다(Fig 2 A, B).

HCa-I에서 p53은 대조군에 비하여, 0.05 Gy 조사군, 25 Gy 조사군 및 0.05 25 Gy 조사군에서 각각 0.9, 2.1, 2.6배의 증가를 보여서 OCa-I의 경우와 유사한 증가 양상을 보였다. Bcl-2와 Bax는 발현 수준에 있어서 거의 변화를 나타내지 않았다. 반면 Bcl-X는 0.05 Gy 정도의 저선량에서도 2.7배로 상승하였고 25 Gy 조사군 및 0.05+25 Gy 조사군에서 각각 3.2,

3.3배로 상승 수준을 유지하였다(Fig 3. A, B).

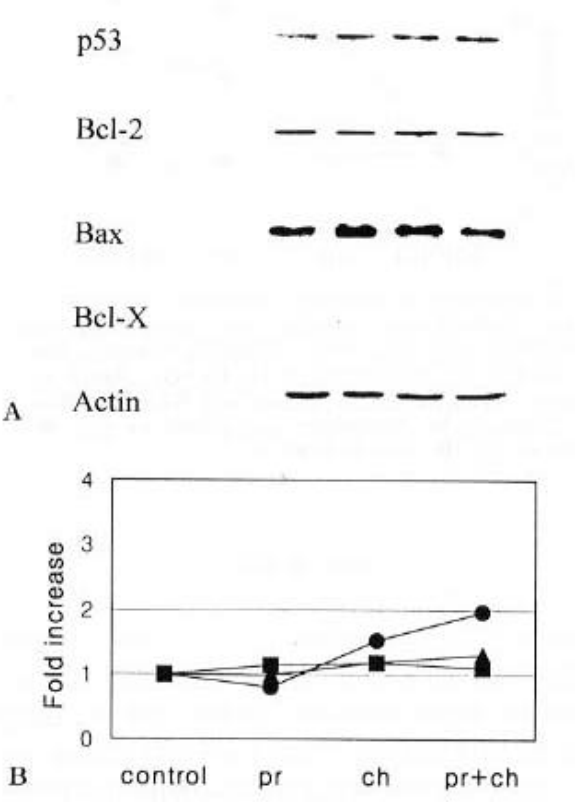

Fig. 2. Expression of apoptosis regulating molecules in OCa-I. Tumor-bearing animals were given 0.05 Gy pretreatment alone (pr), 25 Gy challenging radiation alone (ch), or 0.05 Gy followed by 25 Gy (pr+ch). Shown are Western blotting of p53, Bcl-2, Bax, and Bcl-X (A). These are quantitated by densitometry and plotted for p53 (●), Bcl-2 (▲), and Bax (■) (B).

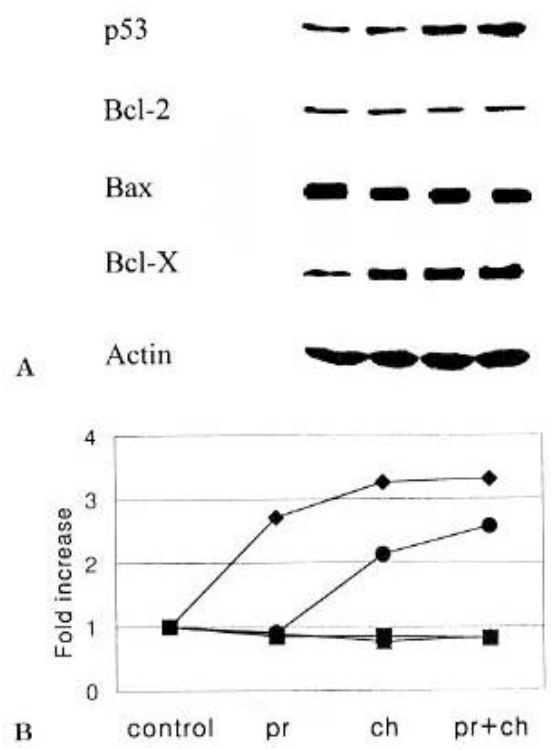

Fig. 3. Expression of apoptosis regulating molecules in HCa-I. Tumor-bearing animals were given 0.05 Gy pretreatment alone (pr), 25 Gy challenging radiation alone (ch), or 0.05 Gy followed by 25 Gy (pr+ch). Shown are Western blotting of p53, Bcl-2, Bax, and Bcl-X (A). These are quantitated by densitometry and plotted for p53 (●), Bcl-2 (▲), Bax (■), and Bcl-X(◆) (B).

고안 및 결론

저선량의 방사선에 대하여 다수의 포유류 세포에서 adaptive response가 나타나는 것이 확인된 바 있고,[12-15] 인간 세포에서도 adaptive response가 보고되고 있다.[1,2,4] Olivieri 등[3]은 임파구에 방사선을 조사한 후 chromatid breaks를 관찰하는 실험에서 흡수된 tritiated thymidine ([^{3}H]-dThd)에서부터 방사된 저선량의 방사선에 미리 노출된 경우에, 뒤이어 조사된 고선량의 X-ray에 대한 chromatid breaks가 감소하였음을 보고하였다. 그외에도 인간의 embryonic fibroblast,[16] VH-10,[17] keratinocyte,[18] human embryonic cell[19] 그리고 폐 상피세포[20] 등에서 adaptive response가 관찰되었다. 저자들도 인간의 정상세포주와 ataxia telangiectasia (AT) homozygote 세포주 그리고 AT heterozygote 세포주에서 모두 동일한 정도로 방사선에 대한 adaptive response가 나타남을 확인하였다[5]. 종양 세포에서도 마찬가지로 adaptive response 가 유도됨이 알려졌고,[19,21-24] 본 저자들도 간암 세포주를 이용한 실험을 통하여 이를 확인한 바 있다.[5,6] 그러나 마우스 비장세포에서는 시험관내, 생체내 공히 이 현상이 관찰되지 않았다.[25] 즉, 저선량의 방사선에 대한 adaptive response는 대부분의 다양한 세포에서 관찰되는 고유의 반응으로 생각되나 실험 모델에 따라서

예외도 있을 수 있는 것으로 생각된다.

생체내 환경에서 adaptive response에 관한 연구는 대부분이 실험 동물의 정상 조직에 국한되어왔다. 닭의 배자,[26] 토끼의 체세포 및 배아 세포,[12] 마우스의 임파구[27] 등에서 adaptive response가 관찰되었고, 마우스의 피부,[28] 신장,[29] 폐장[30] 등에서 저선량의 방사선 자체에 세포가 과민하여지는 이른바 low dose-hypersensitivity가 나타남도 보고된 바 있다. low dose-hypersensitivity는 adaptive response와 현상학적인 결과는 상반되지만 일종의 손상복구체계에 관련된다는 같은 기전을 공유하는 것으로 생각되고 있다.[7] 생체내 종양에서는 흰쥐의 횡문근육종에 대하여 다분할 방사선 조사를 시행한 것이 유일한 연구이다.[31] 이 연구는 adaptive response보다는 low dose-hypersensitivity가 나타나며 이로 인하여 저선량 다분할 조사방식이 종양의 치료에 유리할 것이라고 제시하고 있다. 따라서 in vivo 종양에서 저선량 방사선에 대한 adaptive response가 존재하는지조차 규명되지 않은 상태이다.

본 연구에서 조사한 두 마우스 종양 중 OCa-I에서만 apoptosis와 관련하여 adaptive response가 관찰되었다. 이는 생체내 종양에서 adaptive response의 발현이 다양할 것이라는 것을 암시하는 것으로 생각되나, 더 많은 수의 다양한 종양에 관하여 연구가 필요하다. 이 두 종양은 p53이 동일한 자연형이면서 방사선에 대한 민감도가 민감형, 내성형으로 대별되어 방사선에 대한 반응을 분자생물학적으로 설명할 때, p53과 무관한 독립적인 작용경로를 암시하는 좋은 예이기도 하다.[10] 방사선에 민감한 OCa-I에서만 adaptive response가 보인다는 것을 설명하기에는 현재 축적된 자료가 많지 않다. Joiner 등은 시험관내 실험에서 방사선 내성이 높은 세포주에서 low dose-hypersensitivity가 두드러지고 방사선 민감세포주에서는 low dose-hypersensitivity가 나타나지 않았다고 보고하였다.[7] 아직까지 adaptive response 및 low dose-hypersensitivity의 작용기전의 의문이 완전히 풀리지 않은 상태에서 앞서 언급된 연구 결과를 연계시키기는 무리일지 모르나, low dose-hypersensitivity는 adaptive response와 일종의 손상복구체계에 관련된 같은 기전을 공유하는 것으로 생각되고 있다는 점을 고려할 때, 본 연구 결과는 종양에 있어서 방사선 감수성과 adaptive response가 관련이 있으리라는 또하나의 자료일 수 있을 것이다.

Adaptive response의 기전에 대하여서도 아직까지 많은 논란이 일고 있다. 전처치 선량을 조사하면 새로운 단백질 혹은 transcript들이 생성되어 방사선에 의한 유전자 손상 수리에 관여

할 것도 가능한 기전이다.[32 34] 이에 관여하는 물질은 poly (ADP-ribose) polymerase,[35] protein kinase C의 활성화 및 그 다음 단계 유전 물질(NF-kB와 c-fos)의 유도[36] 등이 관찰되었다. 세포 분열주기의 변동으로 adaptive response의 기전을 설명하려는 시도는 여러 가지 상반된 결과들이 나오고 있다.[37 40] 또는 저선량의 방사선에 의하여 scavenging enzyme이 유도되어 직접적으로 초기의 유전자 손상 정도를 감소시킬 가능성도 있다.[41, 42]

Adaptive response와 apoptosis의 관련성에 대하여도 많은 논란이 일고 있다.[7, 43] Adaptive response에는 poly (ADP- ribose) polymerase (PARP)가 매우 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있는데,[35] 이 효소는 apoptosis의 마지막 단계에 관여하며 이는 apoptosis의 유도와 adaptive response와의 관련성을 암시한다. 최근 박 등[44]은 adaptive response의 기전의 일부분이 apoptosis의 저하에 기인함을 보고하여, 본 연구에서 저선량의 방사선에 의하여 그 뒤 고선량 방사선에 의한 apoptosis가 저하된다는 결과와 일치하고 있다.

Apoptosis는 p53을 비롯하여 여러 유전 물질의 발현이 관련된다.[45 47] 특히 p53이 활성화된 후 세포의 생사를 조절하는 과정에서 Bcl-2는 생존 신호로, Bax는 사멸 신호로 알려져 있으며 최근에는 Bcl-X의 아형인 Bcl-Xs, Bcl-XL도 각각 사멸, 생존 신호로 관계된다고 알려져 있다.[48] 본 연구에서 p53은 두종양 모두 유사한 발현 양상을 보였으나 OCa-I의 0.05+25 Gy군에서 Bcl-2가 Bax에 비하여 상대적으로 상승하는 것은 같은 실험군에서 apoptosis가 감소된 것과 무관하지 않아 보인다. 흥미로운 것은 Bcl-X가 OCa-I에서는 전혀 발현되지 않은 데 반하여 HCa-I에서는 0.05 Gy군에서부터 현저하게 상승한 점이다. 본 연구에서 Bcl-X의 상승은 apoptosis의 유도와 관련된 것으로 보이며 이는 Bcl-2 및 Bax의 발현 수준이 변화를 보이지 않은 HCa-I에서 저선량의 전처치와 상관없이 apoptosis가 진행되게하여 결과적으로 adaptive response가 발현되지 않은 것과 무관하지 않은 것으로 보인다. 상기한 바와 같이 Bcl-X는 Bcl-Xs, Bcl-XL의 두 아형이 정반대의 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 연구당시 마우스에 대한 이들 아형의 적절한 항체가 시판되지 않은 상황이어서 HCa-I에서 상승을 보인 Bcl-X가 어느 아형인지는 해석하기 어렵겠으나, 본 연구 결과는 방사선에 의한 adaptive response에서 Bcl-X가 매우 핵심적인 역할을 담당할 것이라는 것을 시사하고 있다. 따라서 향후 적절한 항체가 입수되는 대로 추가적인 연구를 시행할 계획이다.

Adaptive response에 대해서는 오래전부터 이 현상이 알려져 있고 방사선 생물학적으로 유용성이 높은데도 불구하고 아직까지 기전에 대해서는 확실하게 정립되지 못한 상태이다. 이는 임상적으로도 방사선치료시 항암 효과 또는 정상조직의 부작용에 관여될 수 있고 또다른 mutagen 물질인 항암화학제와의 교차 내성 혹은 교차 감수성에도 응용할 수 있는 가능성을 지니므로 향후 집중적인 연구가 요망된다.

참 고 문 헌

1. **Kaina B.** Studies on adaptation of V79 Chinese hamster cells to low doses of methylating agents. Carcinogenesis 1982; 4:1437-1443
2. **Samson L, Schwartz JL.** Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. Nature 1980; 287:861-863
3. **Olivieri G, Bodycote J, Wolff S.** Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. Science 1984; 23:594-597
4. **Shadley JD.** Chromosomal adaptive response in human lymphocytes. Radiat Res 1994; 138 (1 suppl):S9-S12
5. **Seong J, Suh CO, Kim GE.** Adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of gamma rays in human cell lines. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 33:869-874
6. **Seong J, Kim GE.** Adaptive response to ionizing radiation induced by low dose of gamma ray in human hepatoma cell lines. Yonsei Medical Journal 1994; 35:77-83
7. **Joiner MC, Lambin P, Malaise EP, Robson T, Arrand JE, Skow KA, Marples B.** Hypersensitivity to very-low single radiation doses : Its relationship to the adaptive response and induced radioresistance. Mutat Res 1996; 358: 171-183
8. **Milas L, Wike J, Hunter N et al.** Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: association with tumor growth parameters and tumor radiocurability. Cancer Res 1987; 47:1069-1075
9. **Milross CG, Mason KA, Hunter N et al.** Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. J Natl Cancer Inst 1996; 88;1308-1314
10. **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 Radio Oncol 1997; 15:187-195
11. **Stephens LC, Hunter N, Ang KK et al.** Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose. Radiat Res 1993; 135;75-80
12. **Cai L, Liu SZ, Sun SQ.** Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low dose X-irradiation. Int J Radiat Biol 1990; 58:187-194
13. **Farooqi Z, Kesavan PC.** Low dose radiation-induced adaptive response in bone marrow cells of mice. Mutat Res 1993; 302:83-89
14. **Zhou PK, Liu XY, Sun WZ, Zhang YP, Wei K.** Cultured mouse SR-1 cells exposed to low dose of gamma-rays become less susceptible to the induction of mutagenesis by radiation as well as bleomycin. Mutagenesis 1993; 8:109-111
15. **Marples B., Joiner M.C.** The response of Chinese hamster V79 cells to low radiation doses : evidence of enhanced sensitivity of the whole cell population. Radiat Res 1993; 133: 41-51
16. **Ishii K, Misonoh J.** Induction of radio-adaptive response by low-dose X-irradiation on chromosome aberrations in human embryonic fibroblasts. Physiol Chem Phys Med NMR 1996; 28:83-90
17. **Belyasev IY, Spivak IM, Kolman A, Harms-rengdahl M.** Relationship between radiation induced adaptive response in human fibroblasts and changes in chromatin conformation. Mutat Res 1996; 358:223-230
18. **Kleczkowska HE, Althaus FR.** Biochemical changes associated with the adaptive response of human keratinocytes to N-methyl-N`-nitro-N-nitroso-guanidine. Mutat Res 1996; 368: 121-131
19. **Ishii K, Watanabe M.** Participation of gap-junctional cell

communication on the adaptive response in human cells induced by low dose of X-rays. Int J Radiat Biol 1996; 69: 291-299

20. **Singh B, Arrand JE, Joiner MC.** Hypersensitive response of normal human lung epithelial cells at low radiation doses. Int J Radiat Biol 1994; 65:457-464
21. **Zhou PK, Xiang XQ, Sun WZ, Liu XY, Zhang YP, Wei K.** Adaptive response to mutagenesis and its molecular basis in a human T-cell leukemia line primed with a low dose of gamma-rays. Radiat Environ Biophys 1994; 33:211-217
22. **Lambin P, Martin JC, Legal JD, Begg AC, Parmentier C, Joiner MC, Malaise EP.** Intrinsic radiosensitivity and chromosome aberration analysis using fluorescence in situ hybridization in cells of two human tumor cell lines. Radiat Res 1994; 138:S40-S43
23. **Lambin P, Fertil B, Malaise EP, Joiner MC.** Multiphasic survival curves for cells of human tumor cell lines : induced repair or hypersensitive subpopulation? Radiat Res 1994; 138: S32-S36
24. **Wouters BG, Skarsgard LD.** The response of a human tumor cell line to low radiation doses : evidence of enhanced sensitivity. Radiat Res 1994; 138:S76-S80
25. **Wojcik A., Seemayer C.A., Muller W.U., Streffer C.** No indications of an enhanced UV-light-induced unscheduled DNA synthesis in splenocytes of mice following a low-dose irradiation in vivo or in vitro. Radiat Environ Biophys 1995; 34:121-125
26. **Tempel K., Schleifer S.** Adaptive response of the chicken embryo to low dose x-irradiation. Radiat Environ Biophys 1995; 34:177-183
27. **Wojcik A., Tuschl H.** Indications of an adaptive response in C57BL mice pre-exposed in vivo to low doses of ionizing radiation. Mutat Res 1990; 243:67-73
28. **Joiner MC, Denekamp J, Maughan RL.** The use of 'top-up' experiments to investigate the effect of very small doses per fraction in mouse skin. Int J Radiat Biol 1986; 49:566-580
29. **Joiner MC, Johns H.** Renal damage in the mouse : the response to very small doses per fraction. Radiat Res 1988; 114:385-398
30. **Parkins CS, Fowler JF.** The linear quadratic fit for lung function after irradiation with X-rays at smaller doses per fraction than 2 Gy. Br J Cancer 1986; 7(Suppl1):320-323
31. **Beck-Bornholdt HP, Maurer T, Becker S, Omniczynski M, Vogler H, Wurschmidt F.** Radiotherapy of the rhabdomyosarcoma R1H of the rat : hyperfractionation - 126 fractions applied within 6 weeks. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16:701-705
32. **Youngblom JH, Wiencke JK., Wolff S.** Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. Mutat Res 1989; 227:257-261
33. **Ikushima T.** Radio-adaptive response: involvement of specific genes induction by low doses of ionizing radiation, in: Suguhara T., Sagan L.A., Aoyama T. (Eds.), Low dose irradiation and biological defense mechanisms. Elsvier, Amsterdam, 1992; 255-258
34. **Boothman DA, Meyer M, Fukunaka M, Lee SW.** Isolation of X-ray-inducible transcripts in radioresistant melanoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:7200-7204
35. **Kleczkowska HE, Althaus FR.** The role of poly(ADP-ribosyl)ation in the adaptive response. Mutat Res 1996; 358:215-221
36. **Woloschack GE, Chang-Liu C, Jones PS, Jones CA** Modulation of gene expression in syrian hamster embryo cells. Cancer Res 1990; 50:339-344
37. **Meyer M, Caffrey JM, Odegaard E, Boothman DA.** X-ray inducible transcripts and altered cell cycle regulation are involved in adaptive survival responses in human cells. Radiat Res 1995; 141:119-124
38. **Aghamohammadi SZ, Savage JRK.** A BrdU pulse double-labelling method for studying adaptive response. Mutat Res 1991; 251:133-141
39. **Dominguez I, Paneerselvam N, Escalza P, Natarajan AT, Cortes F.** Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique. Mutat Res 1993; 301:135-141
40. **Wojcik A., Streffer C.** Application of a multiple regimen to study the adaptive response to ionizing radiation in lymphocytes of two human donors. Mutat Res 1995; 326:109-116
41. **Laval F.** Pretreatment with oxygen species increases the resistance of mammalian cells to hydrogen peroxide and γ - rays. Mutat Res 1988; 201:73-79
42. **Feinendegen LE, Bond VP, Vooz J.** Biochemical and cellular mechanisms of low dose radiation effects. Int J Radiat Biol 1988; 53:23-27
43. **Bradly GW, Arturo MS, Lloyd DK.** Low-dose hypersensitivity and increased radiores istance in a panel of human tumor cell lines with different radiosensitivity. Radiat Res 1996; 146:399-413
44. **Park SH, Lee Y, Jeong K.** Different influence of adaptive response to ionizing radiation in normal and neoplastic cells. Cell Biol Toxicol 1999; 15:111-119
45. **Korsmyer SJ.** Bcl-2: a repressor of lymphocyte death. Immunol Today 1992; 13:285-288
46. **Wyllie AH.** Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer Metastasis Rev 1992; 11:95-103
47. **Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ.** p53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. Cancer Metastasis Rev 1995; 14:3-15
48. **Reed JC, Miyashita T, Takayama S et al.** BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. J Cell Biochem 1996; 60:23-32

Abstract

Effect of Small Dose of Radiation on Induction of Apoptosis in Murine Tumors

Jinsil Seong, M.D., Hong Ryull Pyo, M.D., Eun Ji Chung, M.D.,
Sung Hee Kim, B.S, and Chang Ok Suh, M.D.

Department of Radiation Oncology, Yonsei University Medical College, Yonsei Cancer Center

Purpose : To investigate the presence of adaptive response by low dose radiation in murine tumors in relation to radiation induced apoptosis as well as related mechanism.

Materials and Methods : Syngeneic murine tumors, OCa-I and HCa-I, were given 0.05 Gy pretreatment followed by therapeutic dose of 25 Gy radiation. Induction of apoptosis was analyzed for each treatment group. Regulating molecules of apoptosis, p53, Bcl-2, Bax, Bcl-X, were also analyzed by Western blotting.

Results : In 0.05 Gy pretreatment group of OCa-I, 25 Gy-induced apoptosis per 1000 cells was 229, which was estimated at 30% lower level than the expected ($p<0.05$). In contrast, this reduction in radiation induced apoptosis was not seen in HCa-I. In the expression of apoptosis regulating molecules, p53 increased in both tumors in response to radiation. Bcl-2 and Bax did not show significant change in both tumors however, the expression of Bcl-2 surpassed that of Bax in 0.05 Gy pretreatment group of OCa-I. Bcl-X was not expressed in OCa-I. In HCa-I, Bcl-X showed increased expression even with 0.05 Gy.

Conclusion : Adaptive response by low dose radiation is shown in one murine tumor, OCa-I, in relation to radiation induced apoptosis. Apoptosis regulating molecules including Bcl-2/Bax and Bcl-X, appear to related. This study shows an evidence that adaptive response is present, but not a generalized phenomenon in vivo.

Key Words : Radiation, Apoptosis, Adaptive response, Murine tumor