대한방사선종양학회지 2002:20(3):246~252

# 방사선에 의한 Apoptosis에서 Fas의 역할

연세대학교 의과대학 방사선종양과학교실*, 연세대학교 임상의학연구센터 실험동물부†
두뇌한국 21 의과학 사업단

**김성희* · 성진실* · 성제경†**

**목 적** : 전리 방사선에 의해 유도되는 세포의 apoptosis에서 Fas : Fas ligand 상호 작용의 역할이 보고되고 있다. 본 연구는 Fas 변이를 보이는 lpr 마우스를 이용하여 *in vivo*에서 Fas의 발현이 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 어떤 역할을 하는지 조사하고자 하였다.

**대상 및 방법** : Fas의 변이를 보이는 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스와 이의 대조군으로서 MRL/Mpj 마우스를 대상으로 하였다. 마우스는 8주령 웅성으로서 이들에게 전신 방사선을 조사하고 일정 시간 후 비장을 적출하였다. 조직을 hematoxylin-eosin 염색하여 apoptosis 유도 수준을 비교 분석하였다. 또한 apoptosis의 조절 물질인 p53, Bcl-2, Bax, Bcl-$X_L$, Bcl-$X_S$에 대하여 Western blotting을 시행하고 발현수준을 densitometry로 분석하여 관련된 기전을 연구하였다.

**결 과** : 25 Gy 방사선 조사 후 MRL/Mpj 마우스는 8시간째에 apoptosis가 최대로 많이 일어났고 24시간째에 거의 정상 수준에 가깝게 회복이 되었다. 반면 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서는 4시간째에 apoptosis가 최대로 많이 일어났고 8시간째부터 회복되기 시작하였다. MRL/Mpj 마우스의 경우 apoptosis의 최대 유도 수준은 25 Gy 조사 후 8시간째에 52.3±7.8%이었으나, MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스는 같은 시간대에 8.0±8.6%로서 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서 apoptosis의 유도 수준이 유의하게 대조군 보다 낮은 것으로 나타났다($p<0.05$). 유전물질의 발현에서 25 Gy 방사선 조사 후 MRL/Mpj 마우스에서는 p53은 1시간부터 증가를 보여 8시간째에 최대치인 3배를 보였으며, Bcl-$X_L$과 Bcl-$X_S$은 1시간부터 증가를 보여 12시간째에 각각 최대치인 3.3배, 3배를 보였다. 그러나 Bcl-2와 Bax는 뚜렷한 증감을 보이지 않았다. MRL/Mpj 마우스에서 p53, Bcl-$X_L$ 및 Bcl-$X_S$ 등의 발현이 방사선에 의하여 유의하게 증가한 데 반하여 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서는 p53, Bcl-2, Bcl-$X_L$, Bcl-$X_S$ 및 Bax 등 분석한 유전자 산물 어느 것도 뚜렷한 증감을 보이지 않았다.

**결 론** : Fas의 변이가 있는 *lpr* 마우스에서 방사선에 의한 apoptosis가 대조군보다 현저하게 낮게 나타났고 이는 방사선에 의한 p53의 유도가 미약한 것과 연관된 것으로 나타났다. 방사선에 의한 apoptosis 유도에 Fas의 역할이 매우 중요한 것으로 보인다.

**핵심용어** : 방사선, Apoptosis, Fas, *lpr*

## 서 론

Fas (APO-I, CD95)는 type I membrane protein으로 tumor necrosis factor receptor family에 속하며, 대부분의 종양 세포에서 발현된다.[1~5] Fas는 세포에서 Fas ligand나 Fas의 항 단일항체와 결합하면 apoptosis를 일으킨다.[1] Fas와 death receptor에 의해 유도되는 apoptosis는 이미 잘 알려져 있다. 세포 표면에 위치한 Fas가 cross linking되면 Fas에 FADD/MORT-1이라는 adaptor protein이 결합되고 이는 procaspase-8의 결합을 유도하여 그 결과 자가촉매 활성화가 된다. 이는 궁극적으로 apoptosis를 유도하게 된다.[6, 7]

종양 세포에 전리 방사선을 조사하면 수 시간 내에 apoptosis가 일어나게 된다.[8~11] 전리 방사선은 death receptor에도 영향을 주어 종양 세포가 더 많은 apoptosis를 유도 할 수 있게 간접적으로도 작용하는데 Fas는 이러한 death receptor에 의한 apoptosis 유도에 역할을 한다.[12~15] 방사선 조사 후 Fas에 의해 유도되는 apoptosis는 Fas의 발현 증가와 Fas 신호전달체계의 영향을 받는다. 전리 방사선에 노출된 림프구, 뇌종양 세포와 악물 처리한 간암 세포의 세포사에 Fas : Fas ligand의 상호작용이 역할을 한다고 보고되었다.[12, 16, 17] 또한 전리 방사선은 여러 종류의 암세포에서 Fas에 의한 apoptosis를 유발할 수 있는 반응강화 물질로 작용한다.[18]

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제번호 : 02-PJ1-PG1-01CH04-0005).
이 논문은 2002년 4월 8일 접수하여 2002년 8월 6일 채택되었음.
책임저자 : 성진실, 연세대학교 의과대학 방사선종양과학교실
Tel : 02)361-7631, Fax : 02)312-9033
E-mail : jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

*lpr* 마우스는 Fas 유전자의 변이를 지닌 독특한 모델로서 *lpr* 마우스의 자가면역 질병과 림프구 증식 질병은 Fas 유전자의 변이에 의해 일어난다. *lpr* 마우스의 결함은 early transposable element (ETn)가 Fas 유전자의 두번째 intron에 삽입되어 발생한다.[19~22] 이러한 Fas의 retrovial transposon 삽입은 전사의 종결을 완성하지 못하게 하고, mRNA의 splicing을 방해하므로서 Fas의 mRNA와 protein 발현 모두를 감소시킨다. *lpr* 마우스로부터 추출한 비장세포에 전리 방사선을 조사하였을 때 *in vivo*나 *in vitro* 모두에서 apoptosis가 대조군에 비해 상대적으로 억제되는 것이 관찰되었다.[12]

본 연구에서는 Fas 유전자에 변이가 있는 *lpr* 마우스를 이용하여 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 p53과 apoptosis 관련 유전물질이 Fas 발현에 따라 apoptosis에 어떤 역할을 하는지 관찰하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물 및 방사선 조사

Fas의 변이를 보이는 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스와 이의 대조군인 MRL/Mpj 마우스를 사용하였다. 마우스는 8주령의 웅성 마우스로서 연세대학교 실험 동물부에서 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급 받았으며 사육 상자당 5마리씩 사육하였다. 이들은 연세대학교 실험동물부의 지침에 따라 온도(22℃), 습도(55%)가 일정하게 유지된 환경에서 무균음수와 멸균사료로 사육되었다. 방사선 조사는 치료용 선형가속기 (Varian Co. Milpitas, CA, USA)를 이용하여 2.5 Gy, 25 Gy의 전신 방사선 조사를 시행하였다. 조사 후 1~24시간까지 일정 시간마다 마우스를 경추 탈구사 시킨 후 비장을 채취하였다.

### 2. Apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 ㎛ 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라,[23] 마우스의 조직표본에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. Apoptosis의 평가는 400×광학 현미경 하에서 1,000개의 세포핵 당 나타난 apoptosis의 수를 apoptotic index (A.I.)로 나타내었다. 각각의 A.I.는 실험자 2명이 3번씩 계수하여 평균값을 구하였다.

### 3. Western blotting을 이용한 유전물질의 검사

채취한 조직의 일부를 Western blotting을 이용하여 apoptosis와 관련된 유전물질의 발현을 분석하였다. 채취한 조직의 약 1 mm$^3$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-glyceraldehyde-phosphate, 2 mM sodium fluoride, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 ㎍/mL leupeptin, 2 ㎍/mL aprotinin 등을 포함한 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4℃에서 20분간 원심분리하여 단백질이 용해되어 있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 polyacylamide 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 band의 농담을 조사하였다. 발현 수준의 평가는 densitometry (Amersham, UK)를 이용하여 분석하였다. 사용된 항체는 p53 (Ab7, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA), Bcl-$X_{L/S}$ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), Bcl-2 (N-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Bax (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), α-Tubulin (Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) 등으로 생산회사가 추천하는 농도를 사용하였다.

### 4. Data의 분석

각 data의 분석은 3회 반복의 실험 결과를 mean±SE로 나타내었다. Student-t 검정을 이용하여 유의수준을 검사하였다.

## 결 과

### 1. 방사선에 의한 apoptosis의 유도

2.5 Gy 조사시에 MRL/Mpj 마우스와 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스의 방사선에 의한 apoptosis 유도 수준은 최대치 A.I.가 각각 8시간 째 23.8±2.7%, 4시간째 25.6±3.8%로 최대치가 나타나는데 시간차를 보였다(Fig. 2). 25 Gy의 방사선 조사 후, MRL/Mpj 마우스는 apoptosis 수준이 현저하게 증가하여 조사 4시간부터 현미경 시야 하의 대부분 세포들이 apoptosis를 보였다(Fig. 1) 반면에 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서는 MRL/Mpj 마우스에 비하여 apoptosis의 유도 수준이 낮았다. 25 Gy의 방사선 조사 후, MRL/Mpj 마우스는 8시간째에 apoptosis가 최대로 많이 일어났고 24시간째에 거의 정상 수준에 가깝게

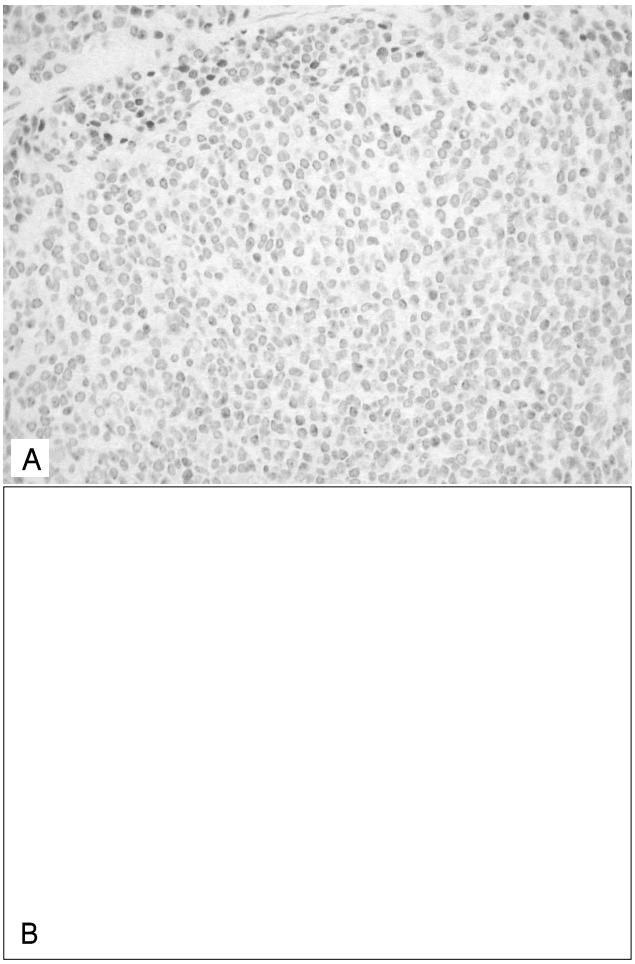


**Fig. 1.** Histologic view of MRL/Mpj spleen at control (A) and 8h after 25 Gy irradiation (B). Arrows indicate apoptotic cells.

회복이 되었다(Fig. 3). 반면 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서는 4시간째에 apoptosis가 최대로 많이 일어났고 8시간째부터 회복되기 시작하였다.

유도되는 apoptosis의 양적인 수준을 분석하여 보면 MRL/Mpj 마우스의 경우 최대치 A.I.가 25 Gy 조사 후 8시간째에 52.3±7.8%이었으나, MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스는 같은 시간대에 8.0±8.6%로서 MRL/Mpj 마우스에서 apoptosis가 유의하게 많이 유도되는 것으로 나타났다($p<0.05$).

## 2. 25 Gy에서 apoptosis 조절 물질의 변화

p53, Bcl-2, Bcl-$X_L$, Bcl-$X_S$ 및 Bax 등 유전자 산물들의 발현을 Western blotting으로 검사하고 발현 수준의 비교 평가는 densitometry를 이용하여 분석하였다. MRL/Mpj 마우스에서 25 Gy 방사선 조사 후 p53은 1시간부터 증가를 보여 8시간째에 최대치인 3배를 보였다(Fig. 4). Bcl-$X_L$과 Bcl-$X_S$은 1시간부터 증가를 보여 12시간째에 각각 최대치인 3.3배, 3배를 보였다(Fig. 5, 6). 그러나 Bcl-2와 Bax는 뚜렷한 증감을 보이지 않았다. MRL/Mpj 마우스에서 p53, Bcl-$X_L$ 및 Bcl-$X_S$ 등의

**Fig. 2.** Radiation induced apoptosis by time in radiation dose, 2.5 Gy. Data are shown for MRL/Mpj (●) and MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ (○). Apoptotic index is percent number of apoptotic body per 1,000 nuclei. Vertical bars are standard errors of mean.

**Fig. 3.** Radiation induced apoptosis by time in radiation dose, 25 Gy. Data are shown for MRL/Mpj (●) and MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ (○). Apoptotic index is percent number of apoptotic body per 1,000 nuclei. Vertical bars are standard errors of mean.

**Fig. 4.** Western boltting analysis for p53 in spleen. Densitometric analyses are plotted for MRL/Mpj (●) and MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ (●) as a function of time after 25 Gy irradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

**Fig. 5.** Western boltting analysis for Bcl-$X_L$ in spleen. Densitometric analyses are plotted for MRL/Mpj (●) and MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ (○) as a function of time after 25 Gy irradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

발현이 방사선에 의하여 의의있게 증가한 데 반하여 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서는 p53이 24시간째에 1.3배의 증가를 보이고, Bcl-$X_L$과 Bcl-$X_S$는 8시간째에 각각 1.4배, 1.8배의 증가를 보였다(Fig. 4~6). 이러한 양상은 MRL/Mpj 마우스와 비교할 때 현저하게 낮은 발현 수준인 것으로 나타났다($p<0.05$).

**Fig. 6.** Western boltting analysis for Bcl-$X_S$ in spleen. Densitometric analyses are plotted for MRL/Mpj (●) and MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ (○) as a function of time after 25 Gy irradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

## 고안 및 결론

전리 방사선에 의한 세포사에 Fas : Fas ligand의 상호작용이 역할을 한다고 보고되었다. Fas에 의한 apoptosis에 민감한 세포주인 human prostate carcinoma 세포에서 전리 방사선 조사 후에 Fas에 의한 apoptosis가 증가되는 것이 관찰되었다.[24] 전리 방사선이 조사된 정상 세포에서는 Fas의 발현이 현저하게 증가되는데 이때 일어나는 세포사는 Fas-IgG 융합단백에 의해서 Fas가 발현되는 세포와 FasL의 결합을 경쟁적으로 저해하므로 억제된다.[25] 이상의 연구결과는 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 Fas가 중요한 역할을 한다는 것을 암시하고 있다.

Fas 변이인 *lpr* 마우스를 이용한 일련의 실험 결과들은 전리 방사선에 의한 apoptosis에서 Fas : FasL의 작용이 중요한 역할을 한다는 것을 보이고 있다. *Lpr* 마우스로 부터 추출한 비장세포에 전리 방사선을 조사하였을 때 *in vivo*나 *in vitro* 모두에서 apoptosis가 대조군에 비해 상대적으로 억제되는 것이 관찰되었다. 이는 Fas 유전자 변이가 방사선에 의한 apoptosis 유도에서 중요한 역할을 담당하는 것을 암시한다. 그러나 지금까지의 연구는 *lpr* 마우스의 세포를 *in vitro*에서 분석

한 결과로서 *in vivo* 상태를 그대로 반영하는 것으로 유추하기 어렵다.

본 연구에서는 *lpr* 마우스를 전신 방사선 조사 후 apoptosis를 관찰하므로서 Fas 유전자 변이가 방사선에 의한 apoptosis에 미치는 영향을 *in vivo*에서 직접 관찰하였다. 2.5 Gy 조사시에 MRL/Mpj 마우스와 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스의 apoptosis 유도 수준은 최대치가 나타나는데 시간차를 보였다. 이는 2.5 Gy와 같은 저선량에서는 Fas를 통한 apoptosis가 충분한 기능을 하지 못하였을 가능성을 암시한다. 그러나 25 Gy 조사 후 8시간째에 MRL/Mpj 마우스에서 방사선에 의한 최대치 A.I.가 52.3±7.8%를 나타낸 반면 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스는 8.0±8.6%으로 방사선에 의한 apoptosis 유도가 현저히 저하되는 것으로 나타났다. 이러한 Fas 발현에 따른 apoptosis 유도의 차이는 *in vitro* 연구 결과와 동일한 양상을 보였다.

그러나 방사선 조사 선량에 따른 apoptosis 유도 수준은 차이를 보였는데 이는 방사선 조사 선량에 따라 Fas에 의한 apoptosis 유도 수준이 다양하다는 것을 암시한다. 이러한 차이를 보이는 정확한 원인은 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

방사선에 의한 apoptosis는 여러 가지 유전물질에 의해 조절되는 복잡한 과정이다. 이 과정에서 가장 중추적인 것은 p53이며 세포 독성 물질에 의하여 p53이 활성화되면 연속적으로 다른 유전 물질을 활성화 시킨다. Bcl-2, Bcl-$X_L$, Bcl-$X_S$ 및 Bax 등은 p53에 의하여 세포내 발현 수준이 증가 또는 감소되어 궁극적으로 apoptosis로 갈 것인지 아니면 생존 쪽으로  갈 것인지 세포의 운명이 결정된다.

이와 같은 유전자 발현의 변화는 apoptosis의 유도와 일치하며 *in vivo*에서는 Bcl-$X_L$와 Bcl-$X_S$가 apoptosis에 가장 연관이 깊은 조절인자로 작용한다. MRL/Mpj 마우스에서 25 Gy 방사선 조사에 의한 apoptosis 및 이의 조절물질 발현 양상은 본 연구실에서 그간 C3H/HeJ, C57BL6 등의 다른 마우스에서 얻은 결과와 일치되는 결과이다.[26~29] 그러나 MRL/Mpj 마우스에 비하여 MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서는 p53, Bcl-2, Bcl-$X_L$, Bcl-$X_S$ 및 Bax 등 분석한 유전자 산물 어느 것도 뚜렷한 증감을 보이지 않았다. 특히, MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ 마우스에서 p53의 발현 변화가 미약한 것으로 나타났으며, 이는 Fas가 방사선에 의한 p53의 활성화에 영향을 미친다는 것을 암시한다.

Fas의 변이가 있는 *lpr* 마우스에서 방사선에 의한 apoptosis가 대조군 보다 현저하게 낮게 나타났고 이는 방사선에 의한 p53의 유도가 미약한 것과 연관된 것으로 나타났다. 방사선에 의한 apoptosis 유도에 Fas의 역할이 매우 중요한 것으로 보인다.

## 참 고 문 헌


1. **Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al.** The polypeptide encoded by the c-DNA for a human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 1991;66:233-243
2.. **Leithause F, Dhein J, Mechtersheimer G, et al.** Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. Lab Invest 1993;69:415-429
3. **Nguyen PL, Harris NL, Ritz J, et al.** Expression of CD95 antigen and Bcl-2 protein in non Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. Am J Pathol 1996;148:847-853
4. **Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, et al.** Anti-Fas on nonhematopoietic tumors : levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. Cancer Res 1994;54:1580-1586
5. **Dirks W, Shone S, Uphoff C, et al.** Expression and function of CD95 (FAS/APO-1) in leukemia-lymphoma tumour lines. Br J Hematol 1997;96:584-593
6. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death resptors: signaling and modulation. Science 1998;281:1305-1308
7. **Nagata S.** Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-365
8. **Dewey WC, Ling CC, Meyn RE.** Radiation-induced apoptosis : relevance to radiotherapy. Int J Radiat Biol 1995;33:781-796
9. **Yanafihara K, Nii M, Numoto M, 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
10. **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
11. **Belka C, Rudner J, Wesselbourg S, et al.** Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation and CD95-induced apoptosis. Oncogene 2000;19:1181-1190
12. **Reap EA, Roof K, Maynor K, et al.** Radiation and stress-induced apoptosis; a role for Fas/Fas ligand interactions. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:5750-5755
13. **Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, et al.** Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. J Exp Med 1994;180:1547-1552
14. **Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, et al.** FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. Immunity 1995;2:341-351
15. **Tepper CG, Jayadev S, Liu B, et al.** Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:8443-8447
16. **Fulda S, Scaffidi C, Pietsch T, et al.** Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and -irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. Cell Death Differ 1998;5:884-

893

17. **Eichhorst ST, Muller M, Li-Weber M, et al.** A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. Mol Cell Biol 2000;20:7826-7837
18. **Sheard MA.** Ionizing radiation as a response-enhancing agent for CD95-mediated apoptosis. Int J Cancer 2001;96: 213-220
19. **Adachi MR, Watanabe-Fudunaga, Nagata S.** Aberrant transcription caused by the insertion of an early transposable element in an intron of the Fas antigen gene of lpr mice. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:1756-1760
20. **Chu JL, J Drappa A, Parnassa, et al.** The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, ETn. J Exp Med 1993;178:723-730
21. **Wu J, Zhou T, He J, et al.** Autoimmune disease in mice due to integration of an endogenous retrovirus in an apoptosis gene. J Exp Med 1993;178:461-468
22. **Kobayashi S, Hirano T, Kakinuma M, et al.** Transcriptional repression and differential splicing of Fas mRNA by early transposon (ETn) insertion in autoimmune LPR mice. Biochem Biophys Res Commun 1993;191:617-624
23. **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
24. **Kimura K, Gelmann EP.** Tumor necrosis factor-alpha and Fas activate complementary Fas-associated death domain-dependent pathways that enhance apoptosis induced gamma-irradiation. J Biol Chem 200;275:8610-8617
25. **Booker J, Reap EA, Cohen PL.** Expression and function of Fas on cells damaged by $\gamma$-irradiation in B6 and B6/lpr mice. J Imm 1998;161:4536-4541
26. **Seong J, Kim SH, Lee WJ, et al.** Strain-specific differences in radiation-induced apoptosis in murine tissues. J Korean Cancer Assoc 1997;30:1259-1268
27. **Seong J, Pyo HR, Chung EJ, et al.** Effect of small dose of radiation on induction of apoptosis in murine tumors. J Korean Soc Thera Radio Oncol 1999;17:307-313
28. **Seong J, Kim SH, Suh CO.** Enhancement of tumor radioresponse by combined chemotherapy in murine hepatocarcinoma. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:883-889
29. **Seong J, Kim SH, Pyo HR, et al.** Effect low-dose irradiation on induction of an apoptotic adaptive response in the murine system. Radiat Environ Biophys 2001;40:335-339

대한방사선종양학회지 2002:20(3):246~252

*Abstract*

## The Role of Fas in Radiation Induced Apoptosis *in vivo*

Sung Hee Kim, M.S.*, Jinsil Seong, M.D.* and Je Kyung Seong, Ph.D.†

*Department of Radiation Oncology, Yonsei University Medical College,
†Department of Laboratory Animal Science, Yonsei Medical Research Center,
Yonsei University Medical College, Seoul, Korea
Barin Korea 21 Project for Medical science


**Purpose** : It has been recognized that interaction of the Fas : Fas ligand plays an important role in radiation-induced apoptosis. The purpose of this study was to investigate the role of Fas mutation in radiation-induced apoptosis *in vivo*.

**Materials and Methods** : Mice with mutations in Fas, MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$, and its normal control, MRL/Mpj, were used in this study. Eight-week old male mice were given whole body radiation. After irradiation, the mice were killed and their spleens were collected at different time intervals. Tissue samples were stained with hematoxylin-eosin and the numbers of apoptotic cells were scored. Regulating molecules of apoptosis including p53, Bcl-2, Bax, Bcl-$X_L$, and Bcl-$X_S$ were also analyzed by Western blotting.

**Results** : At 25 Gy irradiation, the level of apoptosis reached the peak value at 8 hr after radiation and recovered to the normal value at 24 hr after radiation in MRL/Mpj mice. In contrast, the peak apoptosis level appeared at 4 hr after radiation in MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ mice. At 8 hr after radiation, the levels of apoptosis in MRL/Mpj mice and MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ mice were 52.3±7.8% and 8.0±8.6%, respectively ($p<0.05$). The expression of apoptosis regulating molecules, p53, Bcl-$X_L$ and Bcl-$X_S$, increased in MRL/Mpj mice in response to radiation; p53 with a peak level of 3-fold at 8 h, Bcl-$X_L$ with a peak level of 3.3-fold at 12 h, and Bcl-$X_S$ with a peak level of 3-fold at 12 h after 25 Gy radiation. Bcl-2 and Bax did not show significant change in MRL/Mpj mice. However in MRL/Mpj-*Fas*$^{lpr}$ mice, the expression levels of p53, Bcl-2, Bax, Bcl-$X_L$ and Bcl-$X_S$ showed no significant change.

**Conclusion** : The level of radiation-induced apoptosis was lower in Fas mutated mice, *lpr*, than in control mice. This seemed to be related to the lack of radiation-induced p53 activation in the *lpr* mice. This result suggests that Fas plays an important role in radiation-induced apoptosis *in vivo*.

**Key Words** : Radiation, Apoptosis, Fas, *lpr*