대한방사선종양학회지 2003;21(3):222 ~ 226

방사선에 의한 Apoptosis에서 Fas/Fas L의 역할

연세대학교 의과대학 방사선종양학교실, 두뇌한국21 의과학 사업단

김 성 희,성 진 실

목 적:Fas 변이를 보이는 *lpr* 마우스와 Fas ligand 변이를 보이는 *gld* 마우스를 이용하여 *in vivo*에서 Fas와 Fas ligand의 발현이 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 어떤 역할을 하는지 조사하고자 하였다.

대상및방법: Fas의 변이를 보이는 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와 대조군인 C57BL/6J 마우스, Fas ligand 변이를 보이는 C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스와 대조군인 C3H/HeJ 마우스를 대상으로 하였다. 마우스는 8주령 웅성으로서 전신 방사선 조사하여 일정 시간 후 비장을 적출하였다. 조직을 hematoxylin-eosin 염색하여 apoptosis 유도 수준을 비교 분석하였다. 또한 apoptosis 조절 물질인 p53,Bcl-2, Bax, Bcl-X_L,Bcl-X_S에 대하여 Westernblotting을 시행하고 발현 수준을 densitometry로 분석하여 관련된 기전을 연구하였다.

결 과: 2.5 Gy와 10Gy 조사시에 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와 C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스에서대조군에비하여 방사선에의한 apoptosis가 유의하게감소되는 것으로 나타났다($p<0.05$).C57BL/6J 마우스와, C3H/HeJ 마우스에서 10 Gy 방사선 조사후 Bax가 8시간째에각각 3배,3.3배의 증가를보였으나 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와,C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스에서는 뚜렷한 발현증가가 관찰되지 않았다.

결 과: Fas의변이가있는 *lpr* 마우스와 Fas ligand의 변이가있는 *gld* 마우스에서 방사선에 의한 apoptosis가 대조군 보다 현저하게 낮으며 이는 방사선에의한 Bax의 유도가 미약한것과연관된것으로나타났다. 방사선에 의한 apoptosis 유도에 Fas의 역할이 매우 중요한 것으로 보인다.

핵심용어: 방사선, Apoptosis, Fas, *lpr*, Fas ligand, *gld*

서 론

종양 세포에 전리 방사선을 조사하면 수 시간 내에 apoptosis가 일어나게 된다.[1~4] 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.[5~8] 전리 방사선에 노출된 림프구, 뇌종양 세포와 약물 처리한 간암 세포의 세포사에 Fas:Fas ligand의 상호작용이 역할을 한다고 보고되었다.[5,9,10] 또한 전리 방사선은 여러 종류의 암세포에서 Fas에 의한 apoptosis를 유발할 수 있는 반응강화 물질로 작용한다.[11]

본 연구자들은 apoptosis의 수준이 Fas 유전자 변이에 의해 조절됨을 lpr 마우스에서 연구한 바 있다.[12] Fas 유전자 변이 마우스에서 방사선에 의한 apoptosis가 대조군에 비하여 감소하였으며 이는 p53의 발현 수준과 관련 있는 것으로 나타났다.

이를 더 확장하여 본 연구에서는 Fas 유전자 변이인 *lpr* 마우스와 Fas ligand 유전자 변이인 *gld* 마우스를 이용하여 전리 방사선에 의해 유도되는 apoptosis에서 p53과 apoptosis관련 유전물질이 Fas와 Fas ligand의 발현에 따라 apoptosis에 어떤 역할을 하는지 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 방사선 조사

Fas의 변이를 보이는 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와대조군인 C57BL/6J 마우스, Fas ligand의 변이를 보이는 C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스와 대조군인 C3H/HeJ 마우스를 사용하였다. 마우스는 8주령의 웅성 마우스로서 연세대학교 실험동물부에서 SPF (specific pathogen free) 상태로 공급받았으며

이 논문은 2003년 3월 19일접수하여 2003년 6월 27일채택되었음.

책임저자: 성진실, 연세대학교 의과대학 방사선종양학교실
Tel: 02)361-7631, Fax: 02)312-9033
E-mail: jsseong@yumc.yonsei.ac.kr

사육 상자 당 5마리씩 사육하였다. 이들은 연세대학교 실험동물부의 지침에 따라 온도(22°C), 습도(55%)가 일정하게 유지된 환경에서 무균음수와 멸균사료로 사육되었다. 방사선 조사는 치료용 선형가속기(Varian Co. Milpitas, CA, USA)를 이용하여 2.5 Gy, 10 Gy의 전신 방사선 조사를 시행하였다. 조사 후 4시간과 8시간에 마우스를 경추 탈구사시킨 후 비장을 채취하였다.

2. Apoptosis의 평가

채취한 조직의 일부를 고정액에 고정시켜서 파라핀에 포매하고 4 μm 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 이미 보고된 apoptosis의 형태학적 특징에 따라,[13] 마우스의 조직표본에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. Apoptosis의 평가는 400 X 광학 현미경 하에서 시행하며, 1000개의 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^3을 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 μg/ ml leupeptin, 2 μg/ml aprotinin 등을 포함한 냉각 완충액에서 1시간 처리하였다. 이를 4°C에서 20분간 원심분리하여 단백질이용해되어있는 상층액을 얻었다. 얻은 단백질 용액은 polyacrylamide 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 2시간처리하였다. 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.

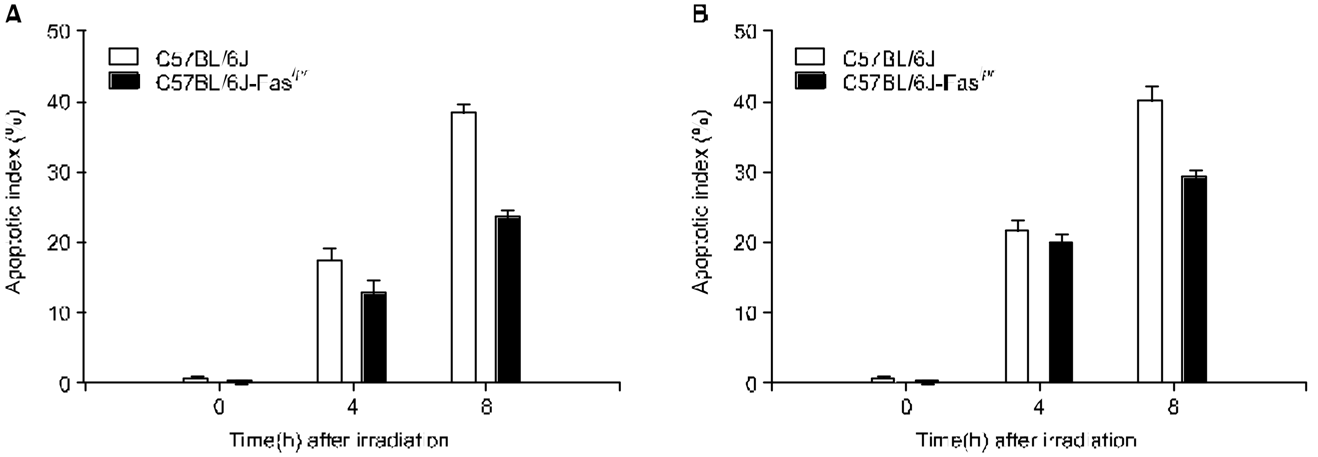

Fig. 1. Radiationinducedapoptosis bytimeinradiationdose,2.5Gy(A)and10Gy(B).DataareshownforC57BL/6J(?)andC57BL/6J-*Fas*^{lpr} (?). Apoptotic index is percent number of apoptotic body per 1000 nuclei. Vertical bars are standard errors of mean.

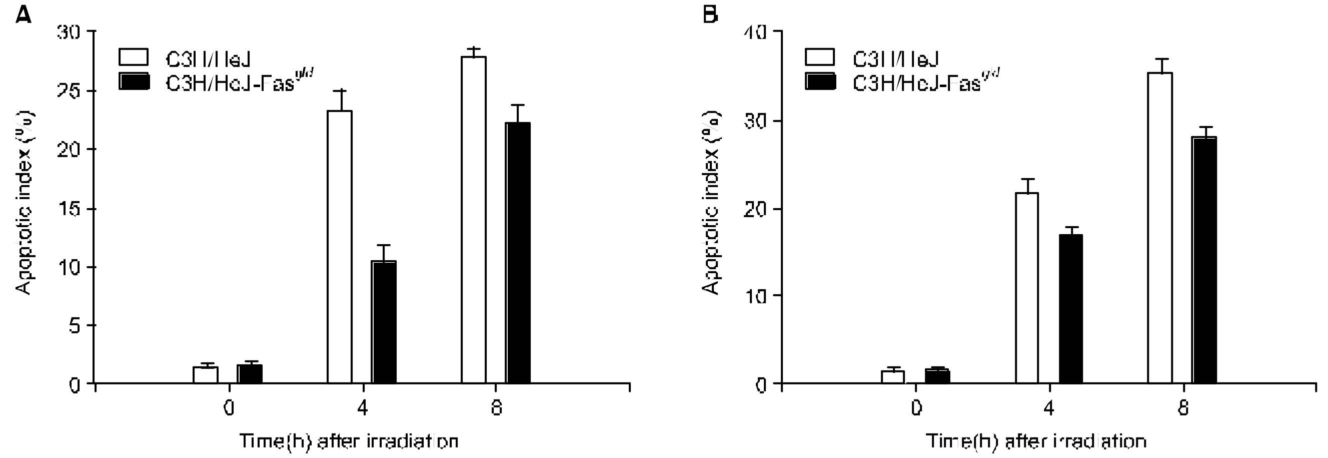

Fig. 2. Radiationinducedapoptosis by time inradiationdose,2.5 Gy (A)and 10 Gy (B). Data are shown forC3H/HeJ(?) andC3H/HeJ-*Fas*^{gld} (?). Apoptotic index is percent number of apoptotic body per 1000 nuclei. Vertical bars are standard errors of mean.

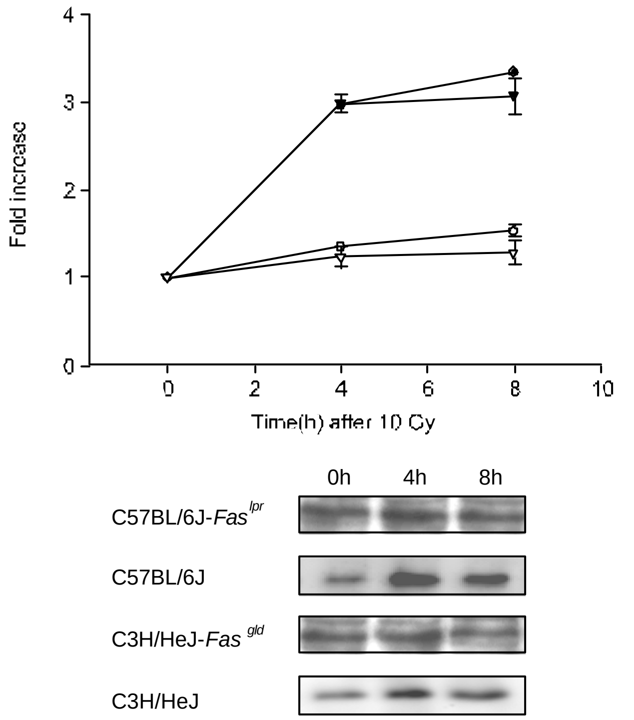

Fig. 3. Westernbolttinganalysis for Bax inspleen.Densitometric analyses are plotted for C57BL/6J-*Fas*^{lpr} (?), C57BL/6J (?), C3H/HeJ-*Fas*^{gld} (?)andC3H/HeJ(?)asafunctionoftimeafter 10 Gyirradiation. Vertical bars are standard errors of mean.

결 과

1. 방사선에 의한 apoptosis의 유도

전신 방사선 조사를 시행한 마우스에서 일정시간마다 채취한 비장을 hematoxylin-eosin 염색한 후 apoptosis의 형태학적 특징에 따라 400 X 광학 현미경하에서 apoptosis의 수준을 평가하였다. 10 Gy 방사선 조사 후 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와 C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스에서 이들의 대조군인 C57BL/ 6J 마우스와 C3H/HeJ 마우스에 비하여 상대적으로 apoptosis가 감소됨이 관찰되었다.

유도되는 apoptosis의 양적인 수준을 분석하여 보면, 2.5 Gy 조사 시에 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와 대조군인 C57BL/6J 마우스에서 방사선에 의한 apoptosis의 최대치 A.I.가 8시간 째 23.4±1.0%, 38.2±1.2%로 나타났다(Fig. 1A). C3H/HeJ- *Fas*^{gld} 마우스와 대조군인 C3H/HeJ 마우스에서는 22.2±1.5%, 27.8±0.7%로 나타나 Fas 유전자 변이 마우스와 Fas ligand 유전자 변이 마우스 모두에서 방사선에의한 apoptosis가 유의하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 1B)($p<0.05$). 10 Gy 조사 시에 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와 대조군인 C57BL/6J 마우스에서 apoptosis의 최대치 A.I.가 8시간 째 29.2±1.0%, 39.9±2.1%로 나타났으며, C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스와 C3H/HeJ 마우스에서 27.9±1.3%, 35.3±1.7%로 10 Gy에서도 유전자 변이 마우스에서 apoptosis가 유의하게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 2A, B)($p<0.05$).

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. C57BL/6J 마우스와, C3H/HeJ 마우스에서 10 Gy 방사선 조사 후 Bax가 8시간째에 각각 3배, 3.2배의 증가를 보였으나 C57BL/6J-*Fas*^{lpr} 마우스와, C3H/HeJ-*Fas*^{gld} 마우스에서는 뚜

렷한 발현증가가 관찰되지 않았다(Fig. 3). p53, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S 등의 발현 변화는 미약하였으며, 2.5 Gy에서는 관찰한 모든 유전자 산물의 발현 변화가 미약하였다.

고안 및 결론

Apoptosis는 p53같은 세포 내 조절물질이나 Fas/FasL 기작 같은 세포 외 신호전달을 통하여 활성화 될 수 있다. 조직의 종류, 독성 물질의 종류, 세포의 상태에 따라 apoptosis가 어떠한 기작으로 활성화될지 결정된다. 그러나 apoptosis의 활성화에 있어서 세포 내 조절물질과 세포 외 신호전달을 통한 기작 간의 상호관계는 잘 알려지지 않았다. 따라서 전리 방사선이 Fas/FasL의 발현에 따라 세포 내 apoptosis 조절물질에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

lpr 마우스와 *gld* 마우스에서 2.5 Gy와 10 Gy 방사선 조사 시 대조군에 비하여 apoptosis가 감소됨이 관찰되었다. 이러한 결과는 booker 등이 *in vitro*에서 연구한 결과와 일치하는 것으로 나타났다.[14] *lpr* 마우스는 C57BL/6J를 배경으로 하고, *gld* 마우스는 C3H/HeJ를 배경으로 하는 마우스로서 마우스 종류(strains)에 따라 방사선에 대한 반응이 달라 질 수도 있다.[15] 그러나 *lpr* 마우스와 *gld* 마우스에서 apoptosis가 감소된 것은 각각의 종류 차이에도 불구하고 Fas/FasL가 방사선에 의한 apoptosis에 역할을 한다는 것을 암시한다.

Fas와 Fas ligand의 유전자가 변이되었음에도 apoptosis가 관찰되는 것은 방사선에 의한 apoptosis 유도에 있어서 Fas나 FasL가 주요 역할을 담당한다면, 이들이 변이된 본 실험 설정에서 apoptosis의 발현이 나타나지 않아야 할 것이다. 그러나 본 연구결과 방사선에 의한 apoptosis가 감소된 상태로 발현된 것은 Fas/FasL 기작은 여러 가지 apoptosis 기작 중 하나이며 Fas/FasL가 완전한 기능을 못하더라도 다른 기작을 통하여 apoptosis가 이루어짐을 시사하고 있다. 이는 Reap 등이 연구 보고한 결과와 일치하고 있다.[5]

lpr 마우스와 *gld* 마우스에서 공통적으로 10 Gy 방사선 조사 시 대조군과 비교하여 p53, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-X_S 은 변화가 없는 반면, Bax의 발현은 대조군과 차이가 있는 것으로 나타났다. 즉 *lpr* 마우스와 *gld* 마우스, 각각의 대조군에서는 Bax의 발현이 방사선 조사 8시간째에 3.3배, 3배의 증가를 보였으나 Fas/Fas L 유전자 변이 마우스에서는 뚜렷한 증가가 관찰되지 않았다. 전리 방사선은 p53을 활성화시키고 이로 인해 Bax가 활성화되는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 p53 증가 없이 Bax의 변화가 나타난 것은 본 연구에서 관찰한 시간이비교적 후기였던 것과 유관하다고 생각된다. 즉 그간의 연구 결과에 의하면 전리 방사선에 의해 p53의 발현이 최고조에 이르는 시간이 조사 후 1~2시간 사이로,[16~19] 본 연구에서는 apoptosis가 최고에 이르는 4시간과 8시간 만을 관찰하여 p53의 뚜렷한 발현 변화를 보지 못하였다고 생각된다. 또한 2.5 Gy에서 모든 조절 물질의 발현 변화가 미약한 것도 관찰 시간에 따른 오차로 생각되어진다.

Fas의 변이가 있는 *lpr* 마우스와 Fas ligand의 변이가 있는 *gld* 마우스에서 방사선에 의한 apoptosis가 대조군 보다 현저하게 낮으며 이는 방사선에 의한 Bax의 유도가 미약한 것과 연관된 것으로 나타났다. 따라서 방사선에 의한 apoptosis 유도에 Fas/FasL의 역할이 매우 중요한 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. DeweyWC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. Int J Radiat Biol 1995;33:781-796
2. Yanafihara K, Nii M, Numoto M, et al. Radiation-induced apoptotic cell death inhumangastricepithelial tumor cells: correlation between mitotic death and apoptosis. Int J Radiat Biol 1995;67:677-685
3. OlivePL,BanathJP,DurandRE. Development of apoptosis and polyploidy in human lymphoblast cells as a function of position in the cellcycleatthetimeofirradiation.Radiat Res 1996;146:595-602
4. 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
5. 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
6. Cifone MG, DeMariaR,RoncaioliP,etal. Apoptotic signalling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. J Exp Med 1994;180:1547-1552
7. 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
8. Tepper CG, Jayadev S, Liu B,etal. Role for ceramide as an endogenous mediator of Fas-induced cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:8443-8447
9. 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

10. 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
11. Sheard MA. Ionizing radiation as a response-enhancing agent for CD95-mediated apoptosis. Int J Cancer 2001;96: 213-220
12. Kim SH, Seong J, Seong JK. The role of Fas in radiation induced apoptosis *in vivo.* J Korean Soc Ther Radiol Oncol *In press*
13. 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
14. Booker J, Reap EA, Cohen PL. Expression and function of Fas on Cells damaged by γ-irradiation in B6 and B6/lpr mice. J Immunol 1998;161:4536-4541
15. Embree-Ku M, Venturini D, Boekelheide K. Fas is involved in the p53-dependent apoptotic response to ionizing radiation in mouse testis. Biol Reprod 2002;66:1456-1461
16. 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
17. Seong J, Pyo HR, Chung EJ, et al. Effect of small dose of radiation on induction of apoptosis in murine tumors. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1999;17:307-313
18. Seong J, Kim SH, Suh CO. Enhancement of tumor radio-response by combined chemotherapy in murine hepatocarcinoma. J Gastroenterol Hepatol 2001;16:883-889
19. 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

Abstract

The Role of Fas/FasL in Radiation Induced Apoptosis *in vivo*

Sung Hee Kim, M.S. and Jinsil Seong, M.D., Ph.D.

Department of Radiation Oncology, Yonsei University Medical College,
Brain Korea 21 project for Medical Science, Yonsei University Medical College, Seoul, Korea

Purpose: The interaction of the Fas: Fas ligand has been recognized to play an important role in radiation-induced apoptosis. The purpose of this study was to investigate the role of Fas and Fas ligand mutations, in radiation-induced apoptosis *in vivo*.

Materials and Methods: Mice with a mutation in the Fas (C57BL/6J-Fas^{lpr}) and its normal control (C57BL/ 6J) and the Fas ligand (C3H/HeJ-Fas^{gld}) and its normal control (C3H/HeJ), were used in this study. Eight-week old male mice were given whole body radiation. After irradiation, the mice were killed at various time intervals, and their spleens collected. Tissue sample was stained with hematoxylin-eosin, and the numbers of apoptotic cells scored. The regulating molecules of apoptosis including the p53, Bcl-2, Bax, Bcl-X_L and Bcl-X_S genes were also analyzed by Western blotting.

Results: With 2.5 Gy and 10 Gy of irradiation, the levels of apoptosis were lower in the C57BL/6J-Fas^{lpr} and C3H/HeJ-Fas^{gld} mice than in the control mice ($p < 0.05$). With the expression of apoptosis regulating molecules, the Bax was increased in both the C57BL/6J and C3H/HeJ mice in response to radiation; the peak levels of Bax in the C57BL/6J and C3H/HeJ were 3 and 3.3-fold higher after 8hr, respectively. However the Bax was not increased in either the C57BL/6J-Fas^{lpr} or C3H/HeJ-Fas^{gld} mice. The p53, Bcl-X_L, Bcl-X_S and Bcl-2 showed no significant changes in the C57BL/6J-Fas^{lpr}, C3H/HeJ-Fas^{gld}, C57BL/6J and C3H/HeJ mice.

Conclusion: The levels of radiation-induced apoptosis were lower in the *lpr* and *gld*, than the control mice, which seemed to be related to the level of Bax activation due to the radiation in the *lpr* and *gld* mice. This result suggests that Fas/Fas L plays an important role in radiation-induced apoptosis *in vivo*.

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