

## Mechanism of Radioresistance Induced by Low-Dose Irradiation

Sanghee Park, Chul Koo Cho\*,  
Seong Yul Yoo\*, and Yeonhee Lee

*Dept of Biology, Seoul Women's University;  
Dept of Therapeutic Radiology, Korea Cancer Center Hospital\**

(Received 12 May 1996; Accepted 1 October 1996)

### 저준위 방사선에 의해 유도된 방사선저항의 기전

박상희, 조철구\*, 류성렬\*, 이연희

서울여자대학교 생물학과, 원자력병원 치료방사선과\*

**Abstract** - After high-dose irradiation(8 Gy), the viability of lymphocyte with a prior low-dose irradiation was 3.7-fold higher than that without a prior low-dose irradiation. The viability could be increased by the reduction of oxygen radicals or the removal of damaged molecules -DNA, protein, lipid membrane, or the removal of damaged cells. In this paper, we studied the radioresistance mechanism in lymphocytes and lymphoma cells by examining the activities of radical scavengers(catalase, peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase), and a radical protector(glutathione). Different enzymes were induced in lymphocyte and lymphoma with low-dose irradiation. The activity of peroxidase increased most(133.3%) in lymphoma, while the enzymes increased most in lymphocyte were superoxide dismutase(138.5%), glucose-6-phosphate dehydrogenase (122.4%) and glutathione(120.8%). The activities of these enzymes were highest when the interval was 7 hours between low-dose and high-dose irradiation.

*Key words* : radical scavenger, radiation protector, low-dose irradiation, radioresistance mechanism

**요약** - 림프구와 림프종에 고준위 방사선(8 Gy)을 조사했을 때, 저준위 방사선을 먼저 조사한 경우 세포 생존률이 3.7배 증가하는 것이 관찰되었다. 세포 생존률은 고준위 방사선 조사로 발생하는 산소 라디칼의 제거, 변성된 유전자와 단백질의 제거, 변화된 세포의 제거 등으로 증가할 수 있다. 본 연구에서는 저준위 방사선 조사로 유도되는 방사선 저항기전을 알아보기 위하여, 고준위 방사선 조사시 발생하는 산소 라디칼을 제거하는 효소들의 활성과 방사선 보호제로 알려진 glutathione의 양을 측정하였다. 림프종의 경우 저준위 방사선 조사시 peroxidase의 활성이 133.3%로 증가하였다. 림프구의 경우는 superoxide dismutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase와 glutathione의 활성이 각각 138.5%, 122.4%, 120.8%로 증가하였으며, 이들 효소들의 활성은 저준위방사선 조사 간격이 7 시간일 때 가장 증가되었다.

중심단어 : radical scavenger, 방사선방어제, 저준위방사선, 방사선저항기전

## 서 론

고준위 방사선 조사시 물분자는  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $O_2^-$  등의 라디칼을 생성하게 되며, 이런 라디칼들은 인접한 DNA와 단백질 분자들에 이차 이온화 반응을 초래하게 되어 세포 손상을 일으키게 된다. 본 실험실에서는 정상 림프구와 림프종 세포를 저준위 방사선에 노출시킬 경우 고준위 방사선에 의한 피해가 감소되는 것을 관찰하였다. 1984년 Olivieri 등이 이온화 방사선에 대한 인체 림프구의 적응 반응을 발표한 이래(1), 저준위 방사선 조사가 방사선에 대한 저항성을 유도한다는 보고가 발표되었다(2-8). 고준위 방사선에 대한 저항기전은 방사선에 의해 발생된 산소 라디칼이 감소되거나, DNA, 단백질, 지질막 등 손상된 분자들이 신속하게 복구되거나, 손상된 세포가 제거됨으로써 획득되는 것으로 생각된다(9, 10). 하지만 아직도 어떠한 기전으로 저항성을 갖게 되는지 명확하게 밝혀져 있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 이를 밝혀내기 위해 저준위 방사선 조사가 세포 생존률을 증가 시키는지와 또한 고준위 방사선 조사로 발생하는 산소 라디칼이 감소되는지를 연구하였다. 이를 위해 방사선 조사 후 쥐의 정상 림프구와 림프종에서 catalase, peroxidase, superoxide dismutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase 등의 라디칼 제거 효소들의 활성 변화와 방사선 보호제인 glutathione의 세포내 농도 변화를 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

B cell lymphoma인 A20(mouse BALB/C, ATCC #TIB 208)는 10% fetal bovine serum, 20 mM HEPES, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 g/ml), 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoethanol 등이 첨가된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5%  $CO_2$  하에서 배양하였다.

### 림프구의 분리 및 배양

정상 림프구는 8-10 주령의 ICR mouse의 비장을 채취하여 Current Protocols in Immunology [11]에 명시된 방법에 따라 아래와 같은 방법으로 분리하였다. 비장을 HBSS로 세척한 후 10 ml의 HBSS가 담겨있는 petri-dish에서 과쇄하여 세포를 부유시킨 다음 Ficoll-Paque gradient를 이용하여 림프구만을 분리하였다. 분리된 림프구는 HBSS로 세척하여 RPMI 1640 배지로 37°C, 5%  $CO_2$ 하에

서 배양하였다.

### 방사선 조사

저준위 방사선(0.01 Gy) 조사를 위해  $^{137}Cs$  감마선을 분당 0.0014 Gy의 선량률로 조사하였고, 고준위 방사선(8 Gy) 조사는 Theratron 780 cobalt-60 source(Atomic Energy of Canada, Ltd., Canada)를 이용하여  $^{60}Co$  감마선을 분당 1.321 Gy의 선량률로 조사하였다.

### 생존률 측정

방사선 조사 후 일정 시간마다 세포를 분취하여 Current Protocols in Immunology[12]에 명시된 trypan blue dye-exclusion 방법으로 생존 세포수를 계수하였다.

### 세포내 단백질 분리

세포를 200  $\mu$ g에서 10 분간 원심분리하여 침전시킨 후 0.2% 3-[(3-choramidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)가 포함된 50 mM MES/Tris buffer (pH 6.0)에 현탁시켜 4°C에서 1 시간 동안 방치하였다. Sonicator (Fisher Sonic Dismembrator Model 300, U.S.A)를 이용하여 30 초씩 5 번 분쇄한 다음 4°C, 10,000 x g에서 15 분간 원심분리 후 상층액만 회수하여 효소 활성 측정에 사용하였다.

### 효소활성 측정

#### 가. Catalase assay

Catalase 활성 측정은 Beers 등의 방법[13]을 이용하여 아래와 같이 수행하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 444  $\mu$ 에 시료 50  $\mu$ 를 넣고 9.6 mM  $H_2O_2$ 를 혼합한 다음 240nm에서 10분간 흡광도 변화를 측정하였다(UV/Visible spectrophotometer, Beckman DU-68, U.S.A). 분당 1  $\mu$ mol의  $H_2O_2$ 를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 정하였다.

#### 나. Peroxidase assay

Peroxidase 활성은 Claiborne와 Fridovich의 방법[14]에 따라 다음과 같이 수행하였다. 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.5)에 0.5 mM o-dianisidine과 시료 50  $\mu$ 를 넣은 후 4 mM  $H_2O_2$ 를 가하여 460 nm에서 10 분간의 흡광도 변화를 측정하였다.  $A_{460}$ 의 흡광도가 분당 0.01 증가하는 효소의 양을 1 unit으로 정하였다.

다. Superoxide dismutase assay

Superoxide dismutase 측정은 Paoletti와 Mocali의 방법(15)에 따라 아래와 같이 측정하였다. 0.2 mM NADPH, 2.5 mM EDTA, 0.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 시료 50 $\mu$ l (대조군으로는 Milli-Q 50 $\mu$ l)를 혼합한 후 triethanolamine-diethanolamine (100mM each)-HCl buffer (pH7.4)를 가하여 최종 부피가 450 $\mu$ l가 되도록 하였다. 이를 30 $^{\circ}$ C가 되도록 평형시키고 여기에 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol을 첨가한 후 340 nm에서 15 분간 흡광도 변화를 측정하였다. 대조군의 NADPH 산화 속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit으로 정하였다.

라. Glucose-6-phosphate dehydrogenase assay

Glucose-6-phosphate dehydrogenase의 효소 활성 측정은 Worthington Manual(16)에 명시된 방법에 따라 아래와 같이 수행하였다. 430 $\mu$ l의 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 15 $\mu$ l의 32 mM glucose-6-phosphate, 5 $\mu$ l의 23mM NADP를 혼합한 후 sample 50 $\mu$ l를 넣고 340nm에서 NADP의 감소를 측정하였다. 분당 1 $\mu$ mol의 NADP를 감소시키는 효소의 양을 1 $\mu$ unit으로 정

하였다.

마. Total glutathione assay

세포내 glutathione의 양은 Griffith(17)의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. 447 $\mu$ l의 phosphate buffer(123mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.3 mM EDTA)에 11 $\mu$ l의 10 mM NADPH, 10 $\mu$ l의 30mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)를 혼합한 후 25  $\mu$ l의 시료를 넣고 30 $^{\circ}$ C가 되도록 평형시켰다. 여기에 0.5  $\mu$ unit의 glutathione reductase를 첨가하여 412 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. Glutathione의 양은 표준곡선을 기초로 하여 계산하였다.

결과 및 고찰

본 실험실에서는 저준위 방사선에 의해 유도되는 방사선 저항기전을 알아보기 위하여 림프구와 림프종에서 생존률을 측정하였다. 방사선을 조사하지 않은 림프구와 저준위 방사선만을 조사한 림프구에서 (그림 1) 12 시간까지는 두 실험군의 생존률에 변화가 없었다. 그러나 고준위 방사선을 조사한 경우 생존률은 8 시간 후 22.3%, 12 시간 후 13.6%를 보였다(그림 2). 이에 반해 저준위 방사선 조사 후

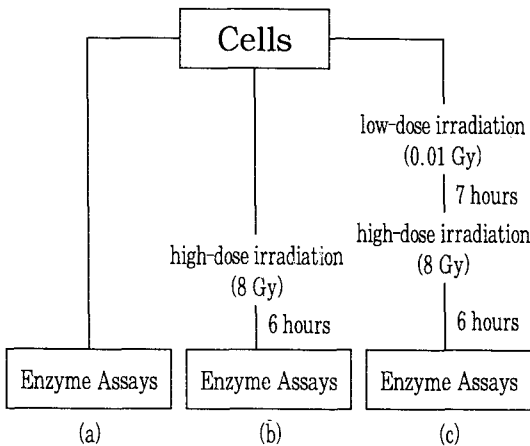


Fig. 1. Scheme of irradiation. Lymphocyte and lymphoma cells were irradiated at low-dose (0.01 Gy) using <sup>137</sup>Cs $\gamma$ - rays and at high-dose(8 Gy) using a Theratron 780 cobalt-60 source(Atomic Energy of Canada, Ltd., Canada). Cells were grouped into three: (a), control(without irradiation); (b), a high-dose only irradiated group; (c), a high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation.

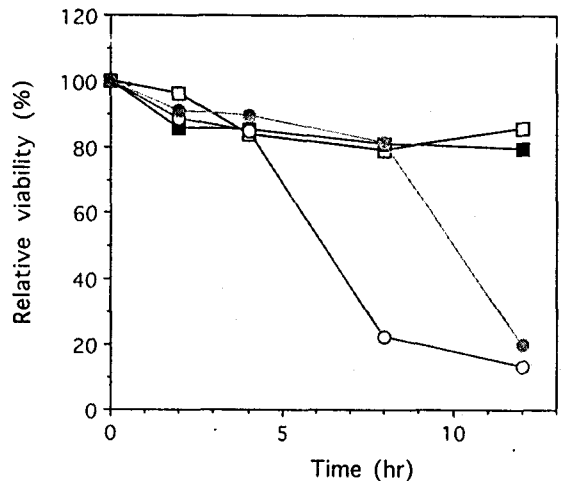


Fig. 2. Viability of lymphocyte after irradiation. Viability was measured using a dye-exclusion assay. Cell suspension was mixed with 1/2 volume of 0.4% trypan blue solution. After 5 min, live cells were counted under a microscope. □, control; ■, a low-dose only irradiated group; ○, a high-dose only irradiated group; ●, a high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation.

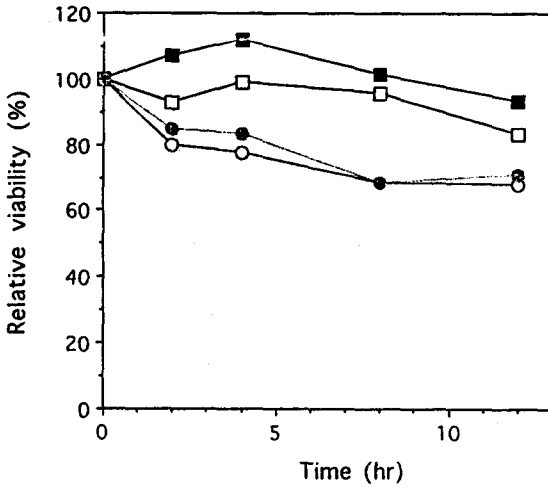


Fig. 3. Viability of lymphoma cells after irradiation. Viability was measured using a dye-exclusion assay. Cell suspension was mixed with 1/2 volume of 0.4% trypan blue solution. After 5 min, live cells were counted under a microscope. □, control; ■, a low-dose only irradiated group; ○, a high-dose only irradiated group; ●, a high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation.

고준위 방사선을 조사한 경우에는 8 시간 후 생존률이 81.4%로 매우 높았으며, 12시간 후에는 20.1%로 급격히 감소하였다. 즉 저준위 방사선에 의한 hormetic effect가 8시간까지 유지되는 것으로 생각된다. 이러한 저준위 방사선에 의한 hormetic effect는 저준위 방사선(0.01 Gy)을 조사한 인체 림프구에서 DNA 손상 복구가 더 잘 일어나는 것을 관찰한 Wolff[2]의 결과와 쥐에 저준위 방사선(0.025 - 0.075 Gy)을 조사하였을 때, 면역세포의 수가 증가하고 면역 기능이 증가하는 것을 관찰한 Liu 등의 결과에서도 보여진다[18].

림프종의 경우, 정상 세포인 림프구에 비해 고준위 방사선에 대해 높은 저항성을 나타내 고준위 방사선 조사 12 시간 후에도 60% 이상의 높은 생존률을 보였다. 저준위 방사선만 조사한 경우 대조군의 생존률 (83.1%)보다 약간 높은 93.1%의 생존률을 보였다(그림 3). 이것은 저준위 방사선에 노출된 식물의 무게나 길이 등이 방사선에 노출되지 않은 식물보다 10% 정도 증가된다고 발표한 Miller 등의 결과 [19]에서 처럼 저준위 방사선에 의해 유도된 hormetic effect로 생각된다. 그러나 림프종의 경우 저준위 방사선을 미리 조사하고 고준위 방사선을 조사한 경우 생존률은 고준위 방사선만 조사한 실험군에 비해 근소한 증가(2.7%)만이 있었다.

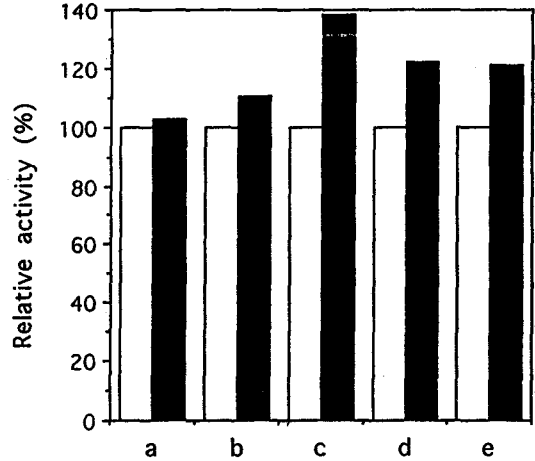


Fig. 4. Enzyme activities in lymphocyte after irradiation. Cells were obtained at 6 hours after high-dose irradiation. Enzyme activity in a high-dose only irradiated group was considered as 100%. a, catalase; b, hydrogen peroxidase; c, superoxide dismutase; d, glucose-6-phosphate dehydrogenase; e, glutathione; □, a high-dose only irradiated group; ■, a high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation.

방사선 저항성은 방사선에 의해 생성된 라디칼의 신속한 제거로 획득될 수 있다는 가정하에 저준위 방사선에 의하여 여러가지 라디칼 포착제의 활성이 증가하는 지 알아보았다.

Yoshida 등은 쥐의 림프구에서 저준위 방사선에 의해 유도된 적응 반응을 관찰한 실험에서 적응 반응은 저준위 방사선 조사 후 7 시간일 때 최대로 나타나며 12 시간 이내에 점차 감소되고, 적응 반응이 유도되는 최적의 방사선 조사량은 0.05 - 0.1 Gy라고 보고하였다[4]. 그러나 hormetic effect가 최대로 나타나는 시간 간격은 여러 보고서에 따라 다르게 관찰되었으므로[4, 7] 저준위 방사선과 고준위 방사선 조사 시간 간격을 먼저 결정하였다. 저준위와 고준위 방사선 조사의 시간 간격에 따른 여러가지 효소의 활성의 변화를 측정했을 때 7 시간 간격으로 조사한 경우 활성이 크게 나타났다 (data not shown). 고준위 방사선 조사에 의한 효소 활성의 변화를 알아보기 위해 방사선 조사 후 효소 활성을 시간별로 측정했을 때, 효소의 활성이 6 시간 후까지 서서히 증가하다 그 이후에는 감소되는 것이 관찰되었으며 (data not shown) 이것은 저준위 방사선에 의해 유도되는 hormetic effect가 일시적임을 보여주는 것이라 하겠다.

본 연구에서는 저준위 방사선 조사 후 7 시간이

Table 1. Specific activities (U mg<sup>-1</sup>) of enzymes in lymphocyte.

	Catalase	Peroxidase	SOD <sup>c</sup>	G-6-PDH <sup>d</sup>	Glutathione <sup>e</sup>
A high-dose only irradiated group <sup>a</sup>	0.15±0.01	1.03±0.03	2.83±0.05	0.08±0.06	56.30±4.00
A high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation <sup>b</sup>	0.16±0.01	1.14±0.02	3.92±0.30	0.10±0.06	68.00±4.00

<sup>a</sup> Cells were irradiated at 8 Gy.

<sup>b</sup> Cells were irradiated at 0.01 Gy. After 7 hours, cells were irradiated at 8 Gy.

<sup>c</sup> Superoxide dismutase

<sup>d</sup> Glucose-6-phosphate dehydrogenase

Table 2. Specific activities (U mg<sup>-1</sup>) of enzymes in lymphocyte.

	Catalase	Peroxidase	SOD <sup>c</sup>	G-6-PDH <sup>d</sup>	Glutathione <sup>e</sup>
A high-dose only irradiated group <sup>a</sup>	0.11±0.01	0.03±0.01	12.70±0.48	0.03±0.00	20.65±4.76
A high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation <sup>b</sup>	0.13±0.00	0.04±0.02	14.10±0.27	0.03±0.05	23.78±6.22

<sup>a</sup> Cells were irradiated at 8 Gy.

<sup>b</sup> Cells were irradiated at 0.01 Gy. After 7 hours, cells were irradiated at 8 Gy.

<sup>c</sup> Superoxide dismutase

<sup>d</sup> Glucose-6-phosphate dehydrogenase

<sup>e</sup> The amount of total glutathione was presented as nmol/mg.

경과한 뒤 고준위 방사선을 조사하고 다시 6 시간 후 각종 효소의 활성을 측정하였다(그림 1). 고준위 방사선 조사시 각각의 효소 활성을 100%로 했을 때, 림프구의 경우 저준위 방사선을 미리 조사한 실험군에서는 superoxide dismutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione 등의 활성이 각각 138.5%, 122.4%, 120.8%로 증가하였다(그림 4와 표 1 참조). 이에 반해 림프종에서는 peroxidase의 활성만이 133.3%로 증가하는 것이 관찰되었다(그림 5와 표 2 참조). 저준위 방사선에 의한 라디칼 포착제의 일시적 증가는 Feinendegen 등의 관찰 결과와 유사하였다[20, 21]. 따라서 저준위 방사선 조사에 의해 일시적으로 증가한 라디칼 포착제가 고준위 방사선 조사시에 발생하는 라디칼을 보다 신속하게 처리하여 방사선 저항성을 나타낸 것으로 생각된다.

물론 이런 라디칼 제거 효소들의 작용만으로 저준위 방사선에 의한 hormetic effect가 발현된다고는 할 수 없다. 그러나 적어도 저준위 방사선에 의해 라디칼 제거 효소들의 활성이 증가하며, 림프구

와 림프종에서 다른 효소들이 활성화되는 것이 밝혀졌다. 이러한 라디칼 포착제의 역할은 쥐를 모델로 하여 방사선 조사 직전에 catalase와 superoxide dismutase를 정맥 주사하였을 때 catalase에 의해 손상이 감소되는 것을 관찰한 Jones 등의 실험에서 증명될 수 있다 [9].

이상과 같은 실험 결과로 저준위 방사선의 유익한 효과가 증명되었으며, 림프종보다 림프구에서 hormetic effect가 확실하다는 결론을 내릴 수 있었다. 이에 근거하여 방사선 치료시 저준위 방사선을 정상세포에 조사하여 방사선 저항성을 유도한다면 방사선 치료시의 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 생각되며, 림프구와 림프종에서 활성화되는 효소가 다르다는 것이 관찰되었으므로 이 차이점을 이용한다면 더욱 좋은 방사선 치료 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 말

이 논문은 과학기술처 “국가 원자력 연구개발 사

업"의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

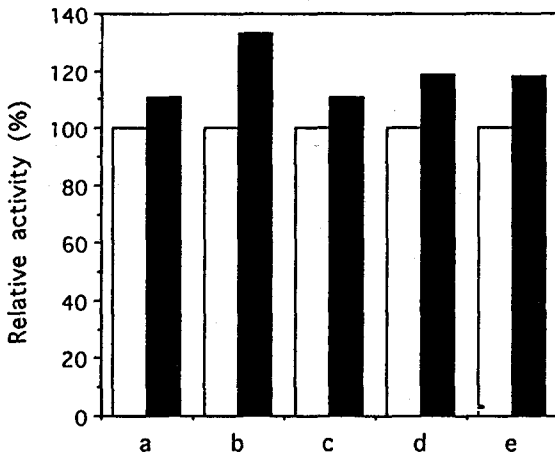


Fig. 5. Enzyme activities in lymphoma, A20 after irradiation. Cells were obtained at 6 hours after high-dose irradiation. Enzyme activity in a high-dose only irradiated group was considered as 100%. a, catalase; b, hydrogen peroxidase; c, superoxide dismutase; d, glucose-6-phosphate dehydrogenase; e, glutathione; □, a high-dose only irradiated group; ■, a high-dose irradiated group with a prior low-dose irradiation.

### 참고문헌

- G. Olivieri, J. Bodycote and S. Wolff, "Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine.," *Science*, **223**, 594-597 (1984).
- S. Wolff, V. Afzal, J. K. Wiencke, G. Olivieri and A. Michael, "Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as to chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA.," *Int. J. Radiat. Biol.*, **53**, 39-48 (1988).
- L. Cai and S. Z. Liu, "Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cell in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation.," *Int. J. Radiat. Biol.*, **58**, 187-194 (1990).
- N. Yoshida, H. Imida, N. Kunugita and T. Norimura, "Low dose irradiation-induced adaptive survival response in mouse spleen T-lymphocytes in vivo.," *J. Radiat. Res.*, **34**, 269-276 (1993).
- M. C. Joiner, "Evidence for induced radioresistance from survival and other end points: An introduction.," *Radiat. Res.*, **138**, S5-S8 (1994).
- L. E. Feinendegen, H. Muhlensiepen, V. P. Bond, C. A. Sondhaus, "Intracellular stimulation of biochemical control mechanisms by low-dose, low-LET irradiation.," *Health Phys.*, **52**, 663-669 (1987).
- J. D. Shadley, "Chromosomal adaptive response in human lymphocytes.," *Radiat. Res.*, **138**, S9-S12 (1994).
- S. Santier, R. Gilet, and E. P. Malaise, "Induced radiation resistance during low-dose-rate  $\gamma$  irradiation in plateau-phase *Chlorella* cells.," *Radiat. Res.*, **104**, 224-233 (1985).
- J. B. Jones, H. M. Cramer, W. R. Inch and H. B. Lampe, "Radioprotective effect of free radical scavenging enzymes.," *J. Otolaryn.*, **19**, 299-306 (1990).
- S. Zheng, G. L. Newton, J. F. Wald and R. C. Fahey, "Aerobic radioprotection of pBR322 by thiols: Effects of thiol net charge upon scavenging of hydroxyl radicals and repair of DNA radicals.," *Radiat. Res.*, **130**, 183-193 (1992).
- A. M. Kruisbeek, "Isolation of mouse lymphocytes.," *Current protocols in immunology*. in: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, Eds., 3.1.2-3.1.5, Wiley, New York (1991).
- W. Strober, "Trypan blue exclusion test of cell viability.," *Current protocols in immunology*. in: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober, Eds., A3.3, Wiley, New York (1991).
- R. F. Beers and I. W. Sizer, "A spectrophotometric method for measuring breakdown of hydrogen peroxide by catalase.," *J. Biol. Chem.*, **195**, 276-287

- (1952).
14. A. Claiborne and I. Fridovich, "Purification of the o-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B." *J. Biol. Chem.*, **254**, 4245-4252 (1979).
  15. F. Paoletti and A. Macali, "Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation." *Method in Enzymology*, **186**, 209-220 (1990).
  16. L. A. Decker, *Worthington Enzyme Manual.*, Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, (1977).
  17. O. W. Griffith, "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine." *Anal. Biochem.*, **106**, 207-212 (1980).
  18. S. Z. Liu, W. H. Liu and J. B. Sun, "Radiation hormesis: Its expression in the immune system." *Health Phys.*, **52**, 579-583 (1987).
  19. M. W. Miller and W. M. Miller, "Radiation hormesis in plants." *Health Phys.*, **52**, 607-616 (1987).
  20. L. E. Feinendegen, H. Muhlensiepen, V. P. Vond and C. A. Sondhaus, "Intracellular stimulation of biochemical control mechanisms by low-dose, low-LET irradiation." *Int. J. Radiat. Biol.*, **52**, 663-669 (1988).
  21. L. E. Feinendegen, V. P. Vond, J. Booz and H. Muhlensiepen, "Biological and cellular mechanism of low dose effects." *Int. J. Radiat. Biol.*, **53**, 23-27 (1988).