

**EFFECTS OF DENTAL RADIATION ON THE EXPRESSION OF
APOPTOTIC-RELATED GENE IN PRIMARY HUMAN BONE CELLS**

Mrs. Sakarat Pramojane

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Oral and Maxillofacial Radiology**

Department of Radiology

Faculty of Dentistry

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

ผลของรังสีทันตกรรมต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการจัดตัวเอง
ของเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกของมนุษย์

นางสาวรัตต์ ประโมจน์ีย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชารังสีวิทยาช่องปากและใบหน้า ภาควิหารังสีวิทยา
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

511584

สภารัตน์ ประโมจันย์ : ผลของรังสีทันตกรรมต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการจัดตัวเองของ เซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกของมนุษย์ (EFFECTS OF DENTAL RADIATION ON THE EXPRESSION OF APOPTOTIC-RELATED GENE IN PRIMARY HUMAN BONE CELLS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ทพ.ดร.สุนทรา พันธุ์มีเกียรติ, อ.ที่ปรึกษา : รศ.ทพ.ดร.ประสิทธิ์ กวสันต์, 72 หน้า.

รังสีปริมาณ 1 มิลลิเกรย์สามารถสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเอภายในนิวเคลียสซึ่งมีโอกาสนำไปสู่การตายของเซลล์ผ่านขบวนการจัดตัวเองของเซลล์ได้ ดังนั้นการถ่ายภาพรังสีทางทันตกรรมซึ่งมีปริมาณรังสีในระดับมิลลิเกรย์อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์กระดูกของมนุษย์ได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของรังสีทันตกรรมต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการจัดตัวเองของเซลล์ในเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกของมนุษย์ เซลล์กระดูกได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัมร้อยละ 15 เซลล์ได้รับการฉายรังสีในปริมาณ 0, 1, 2 เท่าของปริมาณรังสีที่ใช้ในการถ่ายภาพรังสีชนิดรอบปลายราก ตรวจสอบอันตรายจากรังสีต่อเซลล์กระดูกโดยวิธีเอ็มทีทีภายหลังการฉายรังสี 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการจัดตัวเองของเซลล์ ได้แก่ บีซีแอลทู แบกซ์ แบค บีซีแอลเอ็กซ์แอล คาสเปสเทรี โดยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ ภายหลังการฉายรังสี 4 ชั่วโมง

ผลการศึกษาพบว่ารังสีทันตกรรมไม่มีอันตรายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจากกระดูกของมนุษย์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังการฉายรังสี ผลการศึกษาส่วนใหญ่พบการลดลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการจัดตัวเองของเซลล์หลังการฉายรังสี 4 ชั่วโมง โดยพบว่ามีเพียงยีนแบกซ์และคาสเปสเทรีที่มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสรุปรังสีทันตกรรมมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการจัดตัวเองของเซลล์ ดังนั้นการส่งถ่ายภาพรังสีทางทันตกรรมควรคำนึงถึงความจำเป็น โดยยึดหลักให้ผู้ป่วยได้รับปริมาณรังสีน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้

ภาควิชา รังสีวิทยา
สาขาวิชา รังสีวิทยาช่องปากและใบหน้า
ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4976122432 : MAJOR ORAL AND MAXILLOFACIAL RADIOLOGY

KEY WORD : DENTAL RADIATION / HUMAN BONE CELLS / APOPTOSIS / BCL-2 FAMILY / CASPASE-3

SAKARAT PRAMOJANEE : EFFECTS OF DENTAL RADIATION ON THE EXPRESSION OF APOPTOTIC-RELATED GENE IN PRIMARY HUMAN BONE CELLS. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASSOC. PROF. SOONTRA PANMEKIATE, D.D.S., M.DSc., Odont. Dr., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. PRASIT PAVASANT, D.D.S., Ph.D., 72 pp.

Exposure to 1 milligray ionizing radiation could induce DNA lesions probably leading to cell death through apoptotic process. Thus, performing dental radiography in a milligray range might be dangerous to human bone cells. The purpose of this study was to investigate the effects of dental radiation on the expression of apoptotic-related gene in primary human bone cells. Human bone cells were grown in 15% DMEM and irradiated with 0, 1, 2 doses of a periapical radiograph. The cytotoxicity of irradiation was investigated by MTT assay after 24 hours. The level of apoptotic-related gene expression (Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-XL, Caspase-3) was analyzed by RT-PCR assay, four hours post irradiation

No cytotoxicity was observed at 24 hours after dental irradiation. Interestingly, most of the results demonstrated a decrease of apoptotic-related gene expression at 4 hours after dental irradiation. Only Bax and Caspase-3 were significantly decreased compared to the control. In conclusion, dental radiation affects apoptotic-related gene expression. Therefore, prescribing dental radiograph should be highly selective and the principle of ALARA (As Low As Reasonably Achievable) should be followed.

Department: Radiology

Field of study: Oral and Maxillofacial Radiology

Academic year 2008

Student's signature.....

Principal Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

The image shows three handwritten signatures in black ink. The top signature is the student's, the middle one is the principal advisor's, and the bottom one is the co-advisor's. Each signature is written over a dotted line corresponding to the label on the left.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was carried out at the Research Unit of Mineralized Tissue and the Department of Radiology in Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University during the years 2006-2007.

I wish to express my deepest gratitude to my both advisors, Associate Professor Dr. Soontra Panmekiate and Associate Professor Dr. Prasit Pavasant. I truly admire their spirit of teaching. I appreciate their patience, talent and kind supervision and enthusiastic help.

I wish to express my sincere appreciation to my thesis committee, Associate Professor Wichitsak Cholitkul and Dr. Nirada Dhanesuan as well as all of the instructors teaching in the Department of Radiology in Faculty of Dentistry. They have given valuable comments and constructive criticism during preparation of this thesis.

I warmly thank all my friends in the Research Unit of Mineralized Tissue. I would like to let them know I am very impressed for their kind help and useful recommendations as well as their companionship whenever I have got any difficulty when doing research. Moreover, I would like to acknowledge all of my colleagues in the Department of Oral Radiology, Faculty of Dentistry, Chiangmai University who support me to move forward for further study.

Finally, with all my inspiration, I would like to dedicate my work to my beloved parents and husband who are the wind beneath my wings.

TABLE OF CONTENTS

	Page
Abstract (in Thai).....	iv
Abstract (in English).....	v
Acknowledgements.....	vi
Table of Contents.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	x
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
Background and significance.....	1
Objectives.....	4
Hypothesis.....	4
Field of research.....	4
Limitation of research.....	5
Expected benefit.....	5
CHAPTER II: REVIEW OF RELATED LITERATURE.....	6
Biological effects of ionizing radiation.....	7
Factors influencing the effects of irradiation.....	12
Cellular responses to low dose radiation.....	17
Models of low-dose radiation effect.....	19
Apoptosis.....	23
Apoptosis vs Necrosis.....	24
Role of caspase-3.....	27
Role of Bcl-2 family.....	29
Radiation-induced apoptosis.....	34
Radiation effects on bone cells.....	38
CHAPTER III: RESEARCH METHODOLOGY.....	40

	Page
Cell culture.....	42
Cell irradiation.....	43
MTT assay.....	43
RT-PCR assay.....	44
Data analysis.....	45
CHAPTER IV: RESULTS.....	47
Primary bone cell cytotoxicity.....	46
The changes of apoptotic-related gene expression.....	47
Apoptotic-related gene expression after 4h dental irradiation.....	48
Bax/Bcl-2 ratio.....	54
CHAPTER V: DISCUSSION AND CONCLUSION.....	55
REFERENCES.....	59
VITA.....	74

LIST OF TABLES

ix

Table	Page
Table 1 Patient entrance dose distributions for intra-oral and panoramic x-ray sets....	7
Table 2 Radiosensitivity and cell type.....	15
Table 3 Primer sequences used in PCR.....	43
Table 4 The changes of apoptotic-related gene expression 4 hours after irradiated....	46

LIST OF FIGURES

x

Figure		Page
Figure 1	Schematic model of radiation-induced apoptosis pathway.....	3
Figure 2.1	Mechanism of DNA strand breakage linked to ionizing radiation.....	9
Figure 2.2	The various types of radiation-induced DNA lesion.....	10
Figure 2.3	Illustration of DSB induction and repair after irradiation in various dose.....	12
Figure 2.4	Two cell death pathways: necrosis and apoptosis.....	25
Figure 2.5	Illustration of apoptotic cell death.....	26
Figure 2.6	Scheme of caspase activation pathway.....	28
Figure 2.7	Structural features of anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 proteins.....	31
Figure 2.8	Scheme of apoptosis signaling pathways involving pro-apoptotic Bcl-2 members.....	33
Figure 2.9	Scheme of p53-dependent apoptotic pathway.....	37
Figure 4.1	Effect of dental radiation on human bone cytotoxicity.....	46
Figure 4.2	Effect of dental radiation on mRNA expression of Bcl-2.....	49
Figure 4.3	Effect of dental radiation on mRNA expression of Bax.....	50
Figure 4.4	Effect of dental radiation on mRNA expression of Bad.....	51
Figure 4.5	Effect of dental radiation on mRNA expression of Bcl-xl.....	52
Figure 4.6	Effect of dental radiation on mRNA expression of Caspase-3.....	53