

멜라토닌이 생쥐 소낭 세포 재생과 아포토시스에 미치는 영향에 대한 연구

경희대학교 의과대학 방사선종양학교실*, 생화학교실†

강진오* · 하은영† · 백형환† · 조용호† · 홍성언*

목적 : 멜라토닌의 방사선 장애 방어 효과와 기전을 밝혀 방사선 치료제로서의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

방법 : 168 마리의 생쥐를 방사선량과 멜라토닌 투약 여부에 따라 28개 군으로 나누어 실험하였다. 방사선량은 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18 Gy를 조사하고 소낭의 생존 곡선을 보기 위하여 Withers와 Elkind의 방법을 이용한 microcolony survival assay를 시행하였고 아포토시스를 보기 위하여 TUNEL assay를 시행하였다.

결과 : 멜라토닌의 방사선 장애 방어 효과는 전 선량군에서 확인되었고 특히 고선량군에서 방어 효과가 많은 차이를 보였다. Apoptosis index는 8 Gy 방사선 조사 후 대조군에서 18.4%, 멜라토닌 투여군에서 16.5%이었고 18 Gy 방사선 조사 후 대조군에서 17.2%, 멜라토닌 투여군에서 15.4%로 나타나 통계적인 차이를 보이지 않았다.

결론 : 멜라토닌은 생쥐 소낭의 소낭 세포에서 방사선 장애 방어 효과를 나타냈으나 이의 기전은 아포토시스 억제 효과와는 관련이 없는 것으로 판단하였다.

핵심용어 : 멜라토닌, 아포토시스, 방사선 장애 방어

서 론

방사선에 의한 장 점막의 손상은 복부나 골반의 방사선치료를 받는 환자들에서는 피할 수 없는 부작용 중의 하나이며 이로 인해 방사선치료가 지연되거나 중도에 그만 두어야 하는 원인이 되기도 한다. 특히 소장 점막은 분화율이 매우 높고 세포 주기가 빠르기 때문에 방사선에 매우 민감하게 반응하는데 방사선에 의한 점막 세포 손상의 기전은 방사선에 의해 이차적으로 발생하는 유리기(free radical)의 생성에 의한 것으로¹⁾ 방사선에 의한 정상 세포의 손상을 억제하기 위해 유리기 제거제(free radical scavenger)나^{2,3)} 국소적으로 혈류를 감소시켜 산소 농도를 조절하는⁴⁾ 방법들이 시도되었지만 임상적인 유용성을 증명할 수 없었다. 현재로서는 방사선에 의한 소장 점막의 손상 방어에 높은 효과가 있으면서도 부작용은 거의 없고 임상적으로도 유용한 약제나 생체학적인 물질이 없으므로 이러한 물질 또는 약제의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다.

최근 인체내 송과선에서 분비되는 호르몬인 멜라토닌이

자외선에 의해 발생된 유리기를 in vitro 상에서 제거(scavenge) 한다는 보고가 있고⁵⁾ Tan 등⁶⁾은 in vivo 상에서도 멜라토닌이 백서의 간 세포에서 safole에 의해 유도된 DNA adducts 형성을 억제할 수 있다고 보고하였다. 특히 Blickenstaff 등⁷⁾은 생쥐를 대상으로 하여 방사선 조사하기 30분 전에 멜라토닌을 복강내 주사하고 850 cGy의 방사선을 조사한 경우 멜라토닌을 방사선과 같이 사용한 군에서 생존율이 증가 되었다고 보고하여 멜라토닌의 방사선 장애 방어제로서의 가능성을 제시하였다. 이에 저자는 유리기 제거제로 알려진 멜라토닌의 방사선 장애 방어의 정도와 방사선 조사후 점막 손상의 주요 기전인 아포토시스에 대해 관련성을 조사하여 방사선 생물학적인 기초 자료를 제공함으로써 향후 멜라토닌의 방사선 장애 방어제로서의 임상 적용에 도움이 되 고자 본 실험을 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

생후 12주의 성숙 ICR 암컷 생쥐를 이용하였다. 생쥐는 대한 실험동물 센터에서 분양받아 사용하였고 방사선량과 멜라토닌 투여 여부 그리고 관찰하고자 하는 현상 즉 아포토시스 관찰 또는 소낭세포 생존 곡선 관찰 여부에 따라 모두 28개 군으로 나눠 각 군당 6마리씩을 배정하여 총 168마

이 논문은 1999년 11월 29일 접수하여 2000년 2월 7일 채택되었음.

책임저자: 홍성언, 경희대학병원 방사선종양학과
Tel: 02)958-8661, Fax: 02)962-3002
E-mail: haustin@netsgo.com

리를 사용하였다. 실험동물은 12시간 간격의 밤, 낮 구분을 주어서 15일간 밤낮 주기를 주고 낮 시간은 오전 6시에서 오후 6시까지 조정하여 송과선에서 분비되는 멜라토닌의 변동 주기를 동기화하였다.

2. 방사선 조사

방사선은 ⁶⁰Co 원거리치료기를 이용하여 분당 1.1 Gy 선량률로 전신 조사하였다. 선량은 8, 10, 12, 14, 16, 18 Gy를 조사하였고, 방사선을 조사하지 않은 실험 동물을 대조군으로 배정하였다.

3. 멜라토닌의 투약

멜라토닌(N-Acetyl-5-methoxytryptamine, C₁₃H₁₆N₂O₂, FW 232.3, SIGMA Co, USA)은 100% 에탄올에 100 mg/mL 농도로 희석하여 보관하였다가 방사선 조사 30분 전에 생리식염수에 30 ug/mg로 희석하여 복강 내에 1회 주사하였다.

4. 소낭 세포 재생능 관찰

방사선 조사 후 3일째에 생쥐를 클로르포름을 흡입시켜 희생시킨 후 소장을 1 cm 길이로 6부분을 절취하고 10% 중성 완충 처리된 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀에 포매하고 4~6 um 두께로 잘라 슬라이드에 부착하고 일반 조직 표본의 관찰을 위해서 헤마톡실린과 에오신 염색하여 200배 배율의 현미경으로 관찰하였다.

5. 소낭 세포 아포토시스의 관찰

방사선 조사 후 24시간째에 생쥐를 클로르포름을 흡입시켜 희생시킨 후 소장을 1 cm 길이로 6부분을 절취하고 10% 중성 완충 처리된 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직을 파라핀에 포매하고 4~6 um 두께로 잘라 슬라이드에 부착하였다. 파라핀 제거와 함수화 과정을 거친 슬라이드에 아포토시스 검색 키트(BMS Co., USA)를 이용하여 TUNEL assay를 하였다. 송아지 흉선 세포에서 추출한 terminal deoxynucleotidyl transferase 50 ul를 label solution 450 ul에 섞고 혼합액을 슬라이드 위의 조직에 적용하여 37°C에서 1시간 반응을 시켰다. 1시간 반응 후 PBS로 3회 세척하고 mouse antiferrofluorescent antibody-POD를 1:100의 배율로 희석하여 슬라이드 위에 적용 후 37°C에서 30분 반응시켰다. Converter POD는 TUNEL-POD (BMS Co., USA)로 FITC-dUTP에 반응하는 antiferrofluorescein antibody, Fab fragment from sheep, conjugated with peroxidase이며 POD는 precipitating substrate에 의해 발색반응을 나타낸다. 슬라이드를 꺼내어 PBS로 3회 세척하고 AEC substrate를 슬라이드 위에 충분히 도포한 후 2~3 분 반응시켜 발색 반응을

보았다.

6. Apoptotic index

Apoptotic index와 labeling index는 400배 배율의 현미경을 이용하여 관찰하고 소낭의 개구부가 완전히 잘려 단면이 모두 노출된 상태의 소낭의 세포만 세었다. 각각의 index는 쥐 한 마리 당 평균 1,000개의 세포를 세어 평균을 내었다. 소낭 당 세포의 숫자는 8군데의 다른 소낭을 세고 각 군당 최소 5 마리의 생쥐를 이용 mean±SEM으로 표시하였다.

7. 생존률 분석과 생존 곡선

방사선 선량-반응곡선을 Withers와 Elkind¹⁰⁾의 microcolony survival assay를 이용하여 구하였다. 생존한 소낭의 구분은 최소한 10개 이상의 뚜렷한 핵과 적은 세포질을 갖는 기간 세포가 10개 이상 존재하는 소낭을 생존한 소낭으로 판정하였고 각기 4곳 이상의 다른 표본을 세어 단면당 소낭의 숫자를 세어 평균을 내었다. 세포 생존 곡선은 각각 해당하는 방사선량당 생존하는 세포의 숫자를 선형회귀분석법을 이용하여 작성하였다.

결 과

1. 소낭 수의 변화

방사선 조사를 하지 않은 대조군에서 소낭의 수는 평균 108±7이었고 10 Gy 후 생존하는 소낭의 숫자는 평균 97±8이나 18 Gy 방사선 후에는 3±1로 현저하게 감소했다. 멜라토닌을 사용한 그룹에서는 10 Gy 방사선 조사 후 소낭의 수는 103±6으로 대조군에 비해 약간 높았으며 선량이 증가할수록 소낭의 수가 감소되는 추세는 비슷하였으나 소낭의 생존율의 차이는 의미있게 증가하였다(Table 1). 소장의 생존 곡선에서 대조군의 D₀, D₁₀은 각각 180,414 cGy이었고 멜라토닌 처리군의 D₀, D₁₀는 각각 195,448 cGy이었다(Fig. 1).

Table 1. Number of Jejunal Crypts per Circumference

Radiation dose (Gy)	Crypt per circumference (mean±SD)		
	Control group	Melatonin treated group	p-value
0	108±7	110±6	0.566
8	107±7	108±6	0.773
10	97±8	103±6	0.134
12	42±5	44±3	0.444
14	29±6	35±9	0.234
16	10±4	18±7	0.026
18	3±1	5±2	0.016

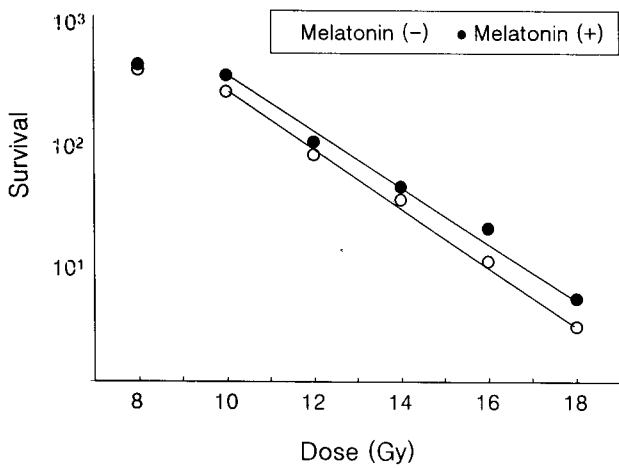


Fig. 1. Cell survival curves plotted as logarhythmic scale. D_{10} of control group is 180, 414 cGy and of melatonin treated group is 195 and 448.5 cGy.

2. 아포토시스의 변화

방사선 조사 후 24시간 후에 많은 아포토시스 세포를 성장대(成長帶, proliferative zone)에서 전반적으로 관찰할 수 있었으며 이들 중 대부분은 소낭의 기저부에서 주로 관찰되었다. 아포토시스 세포는 세포질이 적고 막에 싸여진 작은 세포 물질들이 포함되어 있으며 주변부에 진한 염색체 조각들을 함유하고 있는 세포로 관찰되는데 TUNEL법을 이용한 아포토시스 세포의 분포는 형태학적인 분류와 정확히 일치함으로써 아포토시스 세포에 선택적으로 작용하는 것을 볼 수 있었으며 형태학적으로 분류가 애매한 경우에도 염색에 양성을 보여 확실히 구분 할 수 있었다(Fig. 2).

Apoptosis index는 방사선을 조사하지 않은 군에서는 대조군과 멜라토닌 처치군 모두 1% 미만이었다(Table 2). 8 Gy를 조사한 경우 24시간에 소장 점막의 형태와 용모의 크기, 모양은 형태는 정상과 비슷한데 apoptosis index는 대조군에서는



Fig. 2. Apoptotic cells after 12 Gy irradiation. A. Control group, B. Melatonin treated group. The shape of crypt is relatively well preserved in melatonin treated group, but the number of apoptotic cell is not significantly different. (x200).

Table 2. Effect of Melatonin on Apoptotic Index

Dose (Gy)	Control Group (%)	Melatonin treated group (%)	p-value
0	<1	<1	
8	18.4 ± 5	16.5 ± 7	0.38
10	22.3 ± 4	19.2 ± 4	0.27
12	31 ± 8	21 ± 7	0.03
14	34.3	28.7	0.35
16	24.6	20.7	0.42
18	17.2 ± 8	15 ± 4	0.21

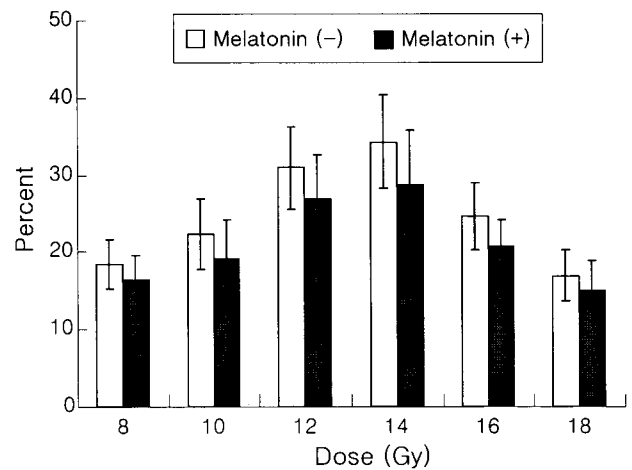


Fig. 3. Effect of melatonin on apoptosis index. Apoptosis index of melatonin treated group was slightly lower than control group, but the difference was statistically insignificant in all dose scale.

18.4% 멜라토닌 처치군에서는 16.5%이었고 방사선량이 증가함에 따라 apoptosis index가 증가하는 양상을 보였으나 16 Gy 이후에서는 apoptosis index가 오히려 감소하였다. Apoptosis index는 각각의 선량군에서 모두 멜라토닌 처치군이 대조군에 비해 낮게 나타났으나 모든 선량군에서 통계적인 차이가 없었다(Fig. 3).

고안 및 결론

복부 방사선 치료를 받는 환자에서 가장 큰 문제점은 방사선에 의한 장 점막의 손상으로 인해 정상적인 방사선 치료가 어렵고 방사선 치료의 잦은 중단과 지연으로 말미암아 완치율의 저하와 치료 실패로 이어지는 것이다. 이러한 복부 방사선 치료 환자의 부작용을 줄이기 위하여 여러 가지 약제나 물리적인 방법들이 도입이 되었는데 아직 임상적으로 유용한 치료방법은 없는 실정이다.

멜라토닌은 송과선에서 분비되어 신경내분비계-생식계에 작용하는 호르몬 조절 인자로 잘 알려져 있는데⁹⁾ 1990년대 초에 멜라토닌이 송과선 외에서도 발견된다는 여러 보고가 있는 후 내분비계를 제외한 장기에서 멜라토닌의 역할에 대한 관심이 증가하면서 연구가 활발하게 이루어지기 시작하였다. 멜라토닌의 유리기 제거 효과는 1993년 Tan 등⁶⁾에 의해서 보고되었는데, 과산화수소를 254 nm의 자외선에 노출시켜 발생되는 hydroxyl radical (OH·)의 중화능을 glutathion이나 mannitol 등의 다른 중화제와 비교하여 멜라토닌의 중화능이 훨씬 더 강력하다고 보고하였다. 이후 멜라토닌의 유리기 탐식 능력은 Fenton 반응 등의 다른 시험 방법을 통해서도 검증되었으며 Fenton 반응에서도 중화효과가 있다는 것은 indole을 생성하는 모든 유기체에서 멜라토닌이 antioxidant 역할을 할 수 있다는 것을 의미하는 것이다.¹⁰⁾ 멜라토닌은 hydroxyl radical 외에도 peroxy radical (LOO·)¹¹⁾이나 singlet oxygen (¹O₂) radical¹²⁾ 또한 중화 하는 것으로 보고 되었다.

멜라토닌이 방사선에 의해 발생하는 유리기를 제거하는 기전은 멜라토닌의 분자적인 구조식에 근거하여 제시되고 있다(Fig. 4). 방사선이 체내에 조사되면 세포의 80% 이상은 물로 이루어져 있으므로 대부분의 반응은 물과 일으키게 된다. X선이나 감마선 또는 전하를 가진 어떠한 입자들도 마찬가지로 세포 내에 들어오면 물 분자와 반응하여 H₂O → H₂O⁺ + e⁻의 반응 과정을 거쳐 물 분자의 이온화를 일으킨다. H₂O⁺는 매우 불안정한 이온기(ion radical) 상태로 10⁻¹⁰ 초 정도의 매우 짧은 시간 내에 유리기 형태로 바뀌는데 (H₂O⁺ + H₂O → H₃O⁺ + OH·) 전하는 소실되지만 쌍을 이루지

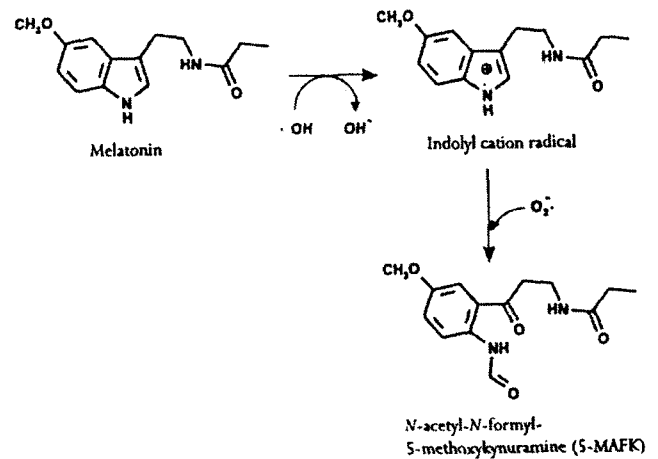


Fig. 4. Melatonin works as an antioxidant via electron donation. Indolyl cation radical scavenges the superoxide anion radical to produce 5-AMFK.

않은 전자를 계속 보유하는 상태가 된다. 물 분자의 경우에는 이 유리기의 형태가 hydroxyl radical (·OH)로 매우 강력한 반응 물질로 작용한다. 이 hydroxyl radical은 아홉 개의 전자를 가지고 있어 DNA helix 직경의 두 배 정도에 해당하는 비경거리를 갖고 있기 때문에 이 거리 내에 위치하는 세포 내 물질과 반응을 하게 된다. 방사선에 의한 세포 손상의 약 2/3는 이러한 과정을 거쳐 이차적으로 발생하는 유리기의 DNA에 대한 손상에 의한 것인데¹⁾ 최근 유리기 제거제로서 관심의 대상이 되고 있는 멜라토닌은 분자 구조상 이러한 유리기들의 전자를 공유함으로써 유리기를 안정화한다.

또한 멜라토닌은 유리기 제거제로서의 역할 외에도 antioxidant와 상호 작용하여 세포 손상을 줄이기도 한다. Poeggeler 등¹⁰⁾은 유리기 포획제(radical trapping agent)인 ABTS (2, 2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazone-6-sulfonic acid)를 Fenton reagent H₂O₂와 FeSO₄와 반응시켜 ABTS cation radical을 발생시킨 후 멜라토닌을 처리하여 chain-breaking antioxidant인 ascorbic acid, Trolox (vitamin E) 그리고 glutathion 등과 synergistic manner로 유리기 발생을 억제한다고 보고하였다.

멜라토닌은 직접적으로 DNA에 손상을 주는 인자들에 대한 방어 효과도 있다. Reddy 등¹³⁾은 생쥐에서 발암 물질인 safrole을 처리하여 DNA 손상을 발생시킨 후 post-labeling method를 이용하여 DNA 손상 정도를 비교한 실험에서 0.2 mg/kg 정도의 낮은 농도의 멜라토닌으로도 DNA 손상을 50% 이상 줄였다고 보고하였다.

멜라토닌은 in vivo 상에서도 safrole을 처치한 쥐의 간에서 DNA adduct의 발생을 억제시키며¹⁰⁾ glutathion 억제제를 사용한 쥐에서 유리기에 의한 수정체 단백질의 손상과 이로 인한

백내장의 발생을 예방 할 수 있다고 보고되었다¹⁴⁾.

멜라토닌은 화학적 물질 외에도 xenotoxic effect를 가진 lipopolysaccharide (LPS) 등의 물질에 의한 손상에 대한 방어 효과도 있다. Sewerynek 등¹⁵⁾은 대장균의 LPS를 처리하여 genotoxic 현상을 일으킨 후 멜라토닌을 사용하여 골수의 polychromatic erythrocyte에서 micronuclei의 형성을 억제하였다고 보고하였다.

Uz 등¹⁶⁾은 멜라토닌의 DNA 손상 방어 효과를 확인하기 위하여 TUNEL assay를 시행하였는데 상당한 신경 독성을 가진 glutamate non degradable analogue인 kainic acid를 처리하여 유리기를 발생시켜 신경의 DNA 손상을 일으킨 뒤 TUNEL 법을 시행하였다. 멜라토닌을 kainic acid를 사용하기 전후로 처리하고 비교하였는데 indole의 항산화 과정과 관련된 방어 효과가 있음을 시사하였다.

Vijayalaxmi 등^{17, 18)}의 보고에서 인체 백혈구에 ¹³⁷Cs 동위원소를 이용하여 150 cGy의 방사선을 조사하고 micronuclei의 숫자와 exchange aberration, acentric fragment의 숫자를 세어 각각의 기준에서 모두 70% 정도의 숫자의 감소를 볼 수 있었다. 또한 dimethylsulfoxide (DMSO)와 방어능을 비교하여 멜라토닌의 농도 0.2 mm 정도와 같은 효과를 보기 위해서는 2 M의 DMSO가 필요하여 멜라토닌의 방사선에 대한 방어 효과가 상당히 강력하다고 보고하였다. Vijayalaxmi^{17, 18)}는 이러한 근거로 방사선에 의해 발생하는 유리기에 의한 세포 손상을 방어하는데 있어 멜라토닌의 역할이 유용할 것이라고 제시하였다. 또한 Blinkenstaff 등⁷⁾은 치사선량의 방사선을 조사한 생쥐 들에서 멜라토닌을 처리함으로써 생존 기간을 늘릴 수 있었다.

이러한 일련의 보고들은 멜라토닌의 방사선 장애 억제제로서의 이러한 가능성을 한층 높여서 이에 대한 연구의 필요성이 강하게 제시되었지만 아직 멜라토닌의 방사선 장애 방어제로서의 임상 적용 예는 현재로서는 보고된 예가 없다. 또한 암 환자에서 멜라토닌을 사용한 임상 적용 가능성도 아주 적은 수의 보고에서만 시험이 되었다. Lissoni 등¹⁹⁾은 말기 암으로 cachexia 상태인 환자들을 대상으로 멜라토닌을 10 mg/kg의 용량으로 처치한 환자들 중 종양괴사인자(TNF, tumor necrosis factor)의 분비를 억제함으로써 cachexia의 진행을 억제할 수 있다고 보고 하여 암 환자에서 임상적 효과가 있음을 보고하였으며 이 과정에서 멜라토닌이 세포 전달 물질의 조절에도 관여함을 시사하였다.

멜라토닌은 유리기 제거나 항산화 효과 등을 통한 기전에 의해 이차적인 세포 전달 물질의 조절을 하는 것으로 생각되는데 방사선에 의한 장 점막의 손상은 소낭 세포의 아포

토시스에 의한 세포사 과정을 통하므로 멜라토닌의 방사선 장애 방어의 기전은 아포토시스와 관련이 있을 것이다. 기존의 연구들에 의해서 멜라토닌은 아포토시스와 관련이 있음이 확인되었다. 멜라토닌은 in vitro 상에서 rat의 신경세포¹²⁾와 흉선세포²⁰⁾에서 아포토시스를 억제하는 것으로 보고되었는데 Ruifrok 등²¹⁾은 쥐의 소장에서 방사선에 의해 유도되는 아포토시스를 조사한 연구에서 동일한 방사선량을 조사한 경우 방사선을 조사한 시간 또는 방사선 조사 후 쥐를 희생시킬 때까지의 시간 경과 등의 변화에 따라 아포토시스 발생률이 현저히 차이가 있음을 보고하였고 이는 멜라토닌의 일중 변화(diurnal variation)와 유관하다는 견해를 밝혀 멜라토닌이 소장 점막에서 발생하는 아포토시스와 연관이 있음을 시사하는 것이다. 따라서 멜라토닌의 소장 점막에서의 방사선 장애 방어 효과의 연구에서는 반드시 소장의 재생능과 아포토시스의 현상에 대한 연구가 같이 확인되어야 하는 것이다.

방사선에 의한 소장 점막의 아포토시스 세포사 또는 괴사 현상은 형태학적인 기준을 가지고 광학현미경 상에서 구분이 가능하지만 아포토시스의 경우 아포토시스 때 특징적으로 발생하는 DNA strand break을 in situ labeling을 효소적으로 식별 가능하게 하는 TUNEL assay 법이 광학 현미경적인 형태 구분에 의한 방법보다 민감도가 높다. TdT를 이용한 tailing reaction은 ISEL (in situ end labeling) 또는 TUNEL (TdT mediated dUTP nick end labeling) 이라고 하며 DNA 중합효소를 이용한 in situ nick translation에 비해 아포토시스 세포에 대한 labeling intensity가 ISNT보다 높아서 민감도가 높고 nucleotide가 부착되는 반응 시간이 빠르다는 장점을 가지고 있다²²⁾. 따라서 아포토시스에서 발생하는 DNA strand break을 선택적으로 반응함으로써 이는 아포토시스와 괴사의 구분이 가능하게 되고 cytostatic drug이나 방사선에 의해 유도된 primary DNA strand break의 구분도 가능하다²³⁾. 또한 아포토시스 세포를 형태학적으로 직접 관찰할 수 있으므로 괴사 상태의 세포에서 DNA breakage가 늦게 발생하는 경우²²⁾ 세포 분열 단계에 있는 세포에서 세포 분열이 일시 정지되어 아포토시스와의 구분이 불가능해지는 "mitotic catastrophe" 현상²⁴⁾과 telophase에서 chromatin condensation이 발생하여 유사성을 보이는 경우²⁵⁾에서도 TUNEL 염색은 이들의 구분을 용이하게 할 수 있다는 장점이 있다.

이에 저자는 강력한 유리기 제거 물질로 알려진 멜라토닌이 방사선 손상을 억제할 수 있는지를 알아보기 위해 Withers와 Elkind⁸⁾의 방법에 따라 microcolony assay를 시행하였고 멜라토닌의 방사선 장애 억제의 기전이 아포토시스와

연관이 있는지를 확인하기 위하여 Labet-Moleur²⁶⁾의 방법을 이용한 TUNEL assay를 시행하였다.

Withers와 Elkind의 방법에 따라 microcolony assay를 시행한 결과 방사선 조사를 하지 않은 대조군에서 소낭의 수는 평균 108 ± 7 이었고 10 Gy 후 생존하는 소낭의 숫자는 평균 97 ± 8 이나 18 Gy 방사선 후에는 3 ± 1 로 현저하게 감소했다. 또한 멜라토닌을 사용한 그룹에서는 10 Gy 방사선 조사 후 소낭의 수는 103 ± 6 으로 대조군에 비해 약간 높았으며 선량이 증가할수록 소낭의 수가 감소되는 추세는 비슷하였으나 소낭의 생존율의 차이는 의미있게 증가하여 멜라토닌이 방사선에 의한 소낭 세포의 손상 억제 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 멜라토닌을 처리한 군에서는 용모가 비교적 길고 잘 형태가 잘 유지되어 있는 반면 멜라토닌을 처리하지 않은 대조군에서는 용모가 짧고 불규칙적인 형태를 보여 멜라토닌이 분열 중인 세포 뿐만 아니라 분열이 끝난 세포에서도 방사선 방어 효과를 보이는 것으로 생각되었다. 그러나 낮은 선량에서 멜라토닌의 방사선 장애 방어 효과는 크지 않은 것으로 보이며 선량이 증가할수록 생존곡선의 차이가 유의하게 커져 높은 선량에서 유리기가 많이 발생 할수록 장애 방어 효과를 나타내는 것으로 생각되었다.

Apoptosis index는 방사선을 조사하지 않은 군에서는 대조군과 멜라토닌 처치군 모두 1% 미만이었다. 8 Gy를 조사한 경우 24시간에 소장 점막의 형태와 용모의 크기, 형태는 정상과 비슷하였지만 apoptosis index는 대조군에서는 18.4% 멜라토닌 처치군에서는 16.5% 이었고 방사선량이 증가함에 따라 apoptosis index가 증가하는 양상을 보였으나 16 Gy 이후에서는 apoptosis index가 오히려 감소하였다. 이는 16 Gy 이상의 고선량군에서 전체 세포의 숫자가 감소하였기 때문이며 아포토시스에 의한 세포사 보다는 괴사가 많이 증가하였기 때문으로 생각된다. Apoptosis index는 각각의 선량군에서 모두 멜라토닌 처치군이 대조군에 비해 낮게 나타났으나 모든 선량군에서 통계적인 차이가 없었고 멜라토닌의 방사선 장애 방어 효과는 아포토시스와는 관련이 없을 것으로 생각되었다. 이러한 현상을 보이는 것은 멜라토닌에 의한 아포토시스 억제 현상이 멜라토닌의 물리적인 자유기 제거 효과 또는 bcl-2와 연관된 항산화 기전에 관련 있다고 보고한 내용과^{12, 20)} Merritt 등²⁷⁾이 bcl-2 유전자의 발현과 방사선에 의해 발생하는 아포토시스의 정도는 분명한 역상관 관계를 갖고 있다고 보고한 것, 또한 Potten 등²⁸⁾의 보고에 의하면 소장에서는 bcl-2의 발현이 없다고 한 것을 고려하면 생쥐 소장에서는 bcl-2 유전자가 없기 때문에 멜라토닌의 아포토시스 억제 효과가 없었을 가능성을 제시할 수 있다. 그러나

멜라토닌이 bcl-2와 관련된 아포토시스 과정을 거치는 지는 생쥐 소장 세포에서 bcl-2 유전자를 형질 전환한 뒤 멜라토닌을 처리하고 아포토시스를 유발시켜 비교해 보아야지만 확인할 수 있기 때문에 이에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 할 과제라고 하겠다.

본 연구에서 멜라토닌을 처리한 생쥐와 대조군의 비교에서 방사선 조사 후 소낭의 재생이 의미있게 차이를 보임으로써 멜라토닌의 소장 세포에 대한 방사선 장애 방어 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 이 방사선 장애 방어 효과는 아포토시스의 억제현상과는 관련이 없을 것으로 보이며 장애 효과 자체는 직접적인 유리기 제거 효과에 의존한 것으로 생각된다.

결론적으로 본 실험은 유리기 제거제인 멜라토닌이 방사선 손상의 방어에 작용하는지를 알기 위하여 계획되었으며 실험의 결과로 멜라토닌을 처리한 군이 대조군에 비해 소낭의 생존율이 높게 나타나 멜라토닌이 방사선 장애 억제에 일정한 효과를 갖고 있음을 알게 되었다. 멜라토닌의 방사선 장애 방어 효과는 낮은 선량군에 비해 높은 선량군에서 차이가 두드러져 유리기의 발생이 많을수록 방사선 장애 방어 효과를 더 많이 볼 수 있었다. 또한 멜라토닌 처치군이 대조군에 비해 아포토시스 세포 발생 비율이 적었지만 두 군 사이에 통계적 차이를 보이지는 못하여 멜라토닌에 의한 장애 방어 효과는 아포토시스의 억제를 통한 장애 기전이 아닌 직접적인 유리기 제거 효과가 주 기전인 것으로 판단하였다.

참 고 문 헌

1. Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, et al. Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger. 1: Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1988; 53:875-890
2. Tomas-de la Vega JE, Banner BF, Hubbard M, et al. Cytoprotective effect of prostaglandin E2 in irradiated rat ileum. *Surg Gynecol Obstet* 1984; 158:39-45
3. Empey LR, Papp JD, Jewell LD, et al. Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation-induced enteritis in rats. *Dig Dis Sci* 1992; 37:205-214
4. Delaney JP, Bonsack M, Hall P. Intestinal radioprotection by two new agents applied topically. *Ann Surg* 1992; 216: 417-421
5. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, et al. Melatonin—a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738:419-420
6. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, et al. The Pineal

- Hormone Melatonin Inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 1993; 70:65-71
7. **Blickenstaff RT, Brandstadter SM, Reddy S, et al.** Potential radioprotective agents. 1. Homologs of melatonin. *J Pharm Sci* 1994; 83:216-218
 8. **Withers HR, Elkind MM.** Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Radiat Biol* 1970; 17:261-267
 9. **Reiter RJ.** The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Rev* 1980; 1:109-131
 10. **Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, et al.** Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J Pineal Res* 1993; 14:151-168
 11. **Pieri C, Mahra M, Moroni F, et al.** Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 1994; 55:271-276
 12. **Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, et al.** Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 1995; 18:222-226
 13. **Reddy MV, Randerath K.** Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 1986; 7:1543-1551
 14. **Abe M, Reiter RJ, Orhii PB, Hara M, et al.** Inhibitory effect of melatonin on Cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin. *J Pineal Res* 1994; 17:94-100
 15. **Sewerynek E, Ortiz GG, Reiter RJ, et al.** Lipopolysaccharide-induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 117:183-188
 16. **Uz T, Giusti P, Francheschini D, et al.** Protective effect of melatonin against hippocampal DNA damage induced by intraperitoneal administration of kainite to rats. *Neuroscience* 1996; 73:631-636
 17. **Vijayalaxmi, Reiter RJ, Meltz M, et al.** Melatonin: possible mechanisms involved in its 'radioprotective' effect. *Mutat Res* 1998; 404:187-189
 18. **Vijayalaxmi, Reiter RJ, Herman TS, et al.** Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1998; 397:203-208
 19. **Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, et al.** Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer* 1996; 32:1340-1343
 20. **Provinciali M, Di Stefano G, Bulian D, et al.** Effect of melatonin and pineal grafting on thymocyte apoptosis in aging mice. *Mech Ageing Dev* 1995; 90:1-19.
 21. **Ruifrok AC, Weil MM, Thames HD, et al.** Diurnal variation in the expression of radiation induced apoptosis. *Radiation research* 1998; 149:360-365
 22. **Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al.** Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest* 1994; 71:219-225
 23. **Gorczyca W, Bigman K, Mittelman A, et al.** Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias. *Leukemia* 1993; 7:659-670
 24. **Martin SJ, McGahon AJ, Nishioka WK, et al.** P34^{cdc2} and apoptosis. *Science* 1995; 269:106-107
 25. **Migheli A, Cavalla P, Marino S, et al.** A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after in situ end-labeling of DNA strand breaks. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53:606-616
 26. **Labat-Moleur F, Guillemet C, Lorimier P, et al.** TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem* 1998; 46:327-334
 27. **Merritt AJ, Potten CS, Watson AJM, et al.** Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108:2261-2271
 28. **Potten CS, Grant HK.** The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer* 1998; 78:993-1003

Abstract

**The Effect of Melatonin on Mouse Jejunal
Crypt Cell Survival and Apoptosis**

Jin Oh Kang, M.D.*, Eun Young Ha, B.S.[†], Hyung Hwan Baik, M.D.[†]
Yong Ho Cho, M.D.[†] and Seong Eon Hong, M.D.*

*Department of Radiation Oncology, [†]Biochemistry, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Purpose : To evaluate protective mechanism of melatonin against radiation damage and its relationship with apoptosis in mouse jejunum.

Materials and Methods : 168 mice were divided into 28 groups according to radiation dose and melatonin treatment. To analysis crypt survival, microcolony survival assay was done according to Withers and Elkind's method. To analysis apoptosis, TUNEL assay was done according to Labet-Moleur's method.

Result : Radiation protection effect of melatonin was demonstrated by crypt survival assay and its effect was stronger in high radiation dose area. Apoptosis index with 8 Gy irradiation was 18.4% in control group and 16.5% in melatonin treated group. After 18 Gy, apoptosis index was 17.2% in control group and 15.4% in melatonin treated group. Apoptosis index did not show statistically significant difference between melatonin treated group and control group.

Conclusion : Melatonin shows clear protective effect in mouse jejunum against radiation damage but its protective effect seems not to be related with apoptosis protection effect.

Key Words : Melatonin, Apoptosis, Radiation protection