

방사선조사가 당뇨 백서의 악하선 선포세포에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
이승현 · 황의환 · 이상래

Effect of irradiation on the acinar cells of submandibular gland in streptozotocin-induced diabetic rats

Seung-Hyun Lee, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University

ABSTRACT

Purpose : To observe the histologic changes and clusterin expression in the acinar cells of the submandibular gland in streptozotocin-induced diabetic rat following irradiation.

Materials and Methods : Mature Sprague-Dawley rats were divided into three groups: control, diabetic, and diabetic-irradiated groups. Diabetes mellitus was induced in the Sprague-Dawley rats by injecting streptozotocin, while the control rats were injected with citrate buffer only. After 5 days, rats in diabetic-irradiated group were irradiated with single absorbed dose of 10 Gy to the head and neck region. The rats were killed at 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days after irradiation. The specimen including the submandibular gland were sectioned and observed using histologic and immunohistochemical methods.

Results : Morphologic change of acinar cells was remarkable in the diabetic group, but was not observed in the diabetic-irradiated group. Necrotic tissues were observed in the diabetic-irradiated group. Coloring of toluidine blue stain was most increased at 14 days in the diabetic group, however there were no significant change throughout the period of the experiment in the diabetic-irradiated group. Expression of clusterin was most significant at 14 days in the diabetic group, but gradually decreased with time after 7 days in the diabetic-irradiated group. Degeneration of clusterin was observed in the diabetic-irradiated group.

Conclusion : This experiment suggests that the acinar cells of submandibular gland in rats are physiologically apoptosed by the induction of diabetes, but that the apoptosis is inhibited and the acinar cells necrotized after irradiation. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2003; 33 : 161-9)

KEY WORDS : cranial irradiation; diabetes mellitus; salivary glands

서 론

방사선치료시에는 종양 조직 뿐만 아니라 방사선조사야에 포함되는 정상 조직에도 방사선이 영향을 미치게 되는데, 구강악안면영역에서는 구강점막, 타액선, 악골, 치아의 성장발육 및 구조 등에 이상이 초래될 수 있다.¹⁻⁴ 특히, 방사선감수성이 비교적 높은 타액선에 방사선이 조사되면 구강점막을 보호하고, 윤활작용, 항균작용, 혈액 응고작용,

완충작용, 소화작용 및 수분대사의 조절 등을 담당하는 타액⁵의 분비가 저하되고, 타액의 수소이온농도(pH)가 낮아질 뿐만 아니라, 타액의 점조도가 증가되어 이차적으로 구강건조증, 구강점막염, 다발성 치아우식증, 미각상실, 연하장애, 식도염 등 다양한 합병증이 유발될 수 있다.^{6,8}

따라서 구강악안면영역의 방사선치료시 타액선은 이의 해부학적 위치와 크기로 인해 방사선조사야에 자주 포함되고, 이에 따른 많은 합병증이 유발될 수 있으므로 방사선이 타액선에 미치는 영향은 임상적으로 매우 중요한 관심의 대상이 되어왔다. Stern 등⁹은 타액선에 방사선이 조사되면 세포 내 핵의 크기와 형태가 변화되고, 선포의 위축과 공포화, 선포 내 과립의 감소, 세포의 분절 및 세포 내 구조의 붕괴 등이, Dreizen 등¹⁰은 방사선이 타액선에

접수일 : 2003년 6월 10일; 심사일 : 2003년 6월 11일; 채택일 : 2003년 7월 18일
Correspondence to : Prof. Eui-Hwan Hwang
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University 1 Hoigi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel) 82-2-958-9405 Fax) 82-2-965-1256
E-mail) hehan@khu.ac.kr

조사되면 타액의 분비 감소, 전해질 농도의 증가 및 완충 능력의 저하가 나타난다고 하였으며, Anderson 등¹¹은 타액선 조직 중 세포세포가 방사선에 가장 민감한 반응을 보인다고 하였다. 최근에는 O'Connell 등¹²이 방사선이 타액선 세포의 주기 및 세포사에 미치는 영향에 대하여, Paardekooper 등¹³이 방사선에 의한 세포자사(apoptosis)가 타액선의 급성 기능 손상에 미치는 영향에 대하여 각각 연구 보고한 바 있다.

한편 타액의 분비는 타액선에 분포되어 있는 설인신경과 안면신경 등의 부교감신경과 교감신경 등의 신경활동에 의해 조절되는데, 타액선질환이나 스트레스 등으로 인해 타액선에서 타액 자체가 생성되지 않거나 타액의 분비 기전에 이상이 생긴 경우 타액선의 가역적 또는 비가역적 기능장애 징후인 구강건조증이 나타난다.¹⁴ 이는 임상적으로 구강의 위생 및 건강 상태에 큰 영향을 미치는데, 구강건조증은 내분비계 질환의 하나인 당뇨병으로 인한 타액의 분비량과 성분 등의 변화에 의해서도 발생할 수 있다.

당뇨병은 현대인에게 가장 많이 발생하는 비전염성 만성 질환의 하나로써, 우리나라에서는 현재 전체 인구의 약 5% 정도가 당뇨병에 이환되어 있는 것으로 보고되고 있다. 이는 전신적으로 고혈당증, 케톤증, 당뇨 등을 유발시킬 수 있을 뿐만 아니라, 구강 내의 치주조직, 타액선 조직 등에도 영향을 미쳐 치주질환을 악화시키거나 치주농양, 구강궤양을 형성하고, 구강건조증 등 다양한 합병증을 일으킬 수 있으므로¹⁵ 치과 임상에서 중요하게 다루어야 할 전신질환의 하나이다.

당뇨병과 구강조직의 변화와의 관련성에 대해서는 많은 연구가 이루어진 바 있는데, Bissada 등,¹⁶ Glickman 등¹⁷은 당뇨병이 감염과 순환장애를 야기시키고, 교원질 합성, 골모세포의 발육 및 신생골 형성 등에 장애를 일으킴으로써 치주조직의 염증반응을 증가시키며, 치은 손상시 이의 치유를 지연시킨다고 하였고, Gibson 등,¹⁸ Lamey 등¹⁹은 당뇨병에 이환되면 구강작열감증후군, 진균이나 세균 감염, 미각 이상, 미란성 편평태선과 같은 구강점막 병소가 야기된다고 하였다. 또한 당뇨병시 타액선의 변화에 관해, Anderson,²⁰ Cutler 등²¹은 타액선의 위축, 자율신경계의 변성 및 세포세포의 괴사에 따른 결합조직으로의 대체에 의해 구강건조증이 발생된다고 하였으며, Gorlin과 Goldman²²은 당뇨병에 의한 구강건조증은 타액선 내의 지방 축적과 지방 변성이 원인이 되어 유발된다고 하였다. 이 외에 Hu 등,²³ Reuterving 등,²⁴ Mori 등²⁵은 당뇨병시 타액선의 무게 변화에 대하여, Anderson 등,²⁶ Murrah 등²⁷은 당뇨병시 타액선의 혈관 변화에 대하여 각각 연구 보고한 바 있다.

이와 같이 당뇨병시 구강조직이나 타액선의 변화에 대해서는 비교적 많은 연구가 이루어진 바 있으나, 당뇨병시 방사선조사가 타액선에 미치는 영향, 특히 세포자사와 관련이 있는 것으로 알려진 clusterin²⁸의 발현에 미치는 영향

을 관찰한 연구는 매우 드물어서 이에 관한 연구는 방사선 생물학적으로 의의가 있다고 사료되는데, clusterin은 Sertoli 세포에 의하여 생산되는 세포 응집요소로 알려져 있는 이종이합체 당단백질(heterodimeric glycoprotein)로서, 전립선, 간, 비장, 신장, 심장, 폐, 뇌, 고환, 난소, 자궁, 골격근, 흉선, 악화선 등 인체의 여러 기관들에서 발현되는 것으로 알려져 있다.²⁹ 또한 최근 의학의 발전에 따라 당뇨병 환자의 평균 수명이 연장되고 있을 뿐만 아니라, 생활의 변화에 따라 당뇨병 발생소인의 하나인 비만도 점차 증가되고 있어 치과외과가 당뇨병 환자를 접하는 기회가 증가되고 있으며, 두경부 악성 종양의 방사선치료시 방사선조사야에 자주 포함되는 타액선은 비교적 높은 방사선감수성으로 인하여 이의 형태적, 기능적 변화가 야기되어 구강건조증 및 이에 따른 심한 구강기능의 장애가 초래될 수 있으므로,^{30,31} 당뇨병시 방사선조사에 따른 타액선의 변화를 숙지하는 것은 치과 임상에서 매우 중요하다고 판단된다.

이에 저자들은 streptozotocin (STZ)을 이용하여 실험적으로 당뇨를 유발시킨 백서의 두경부에 10Gy의 방사선을 1회 조사한 다음, 일정기간 경과 후의 타액선 조직의 변화를 toluidine blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 검경하였으며, 세포자사와 관련이 있는 것으로 알려진 clusterin의 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

동일한 조건 하에 사육된 체중 300 gm 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 백서 44마리를 실험동물로 채택하였으며, 이들을 실험목적에 따라 대조군, 당뇨유발군 및 당뇨유발-방사선조사군으로 각각 나누었다.

2. 실험방법

1) 당뇨 유발

실험에 사용된 당뇨유발 물질은 STZ (Sigma Chemical Co., U.S.A.)으로, 이를 구연산완충용액으로 희석하여 pH 4.5의 STZ으로 조제한 다음, 45 mg/kg의 용량으로 당뇨유발군과 당뇨유발-방사선조사군 백서의 꼬리정맥에 주사하였고, 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다. 또한 당뇨유발을 확인하기 위하여 STZ 주사 후 매일 정시에 혈액을 채혈하여, 이를 혈당측정용 테이프 (ONE TOUCH Code: 7, Johnson & Johnson Co., U.S.A.)와 혈당측정기기 (ONE TOUCH II, Johnson & Johnson Co., U.S.A.)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 대조군은 평균 혈당치가 혈액 100 ml당 125 mg으로 측정되었으며, 당뇨유발군과 당뇨유발-방사선조사군은 STZ 주사 5일 후에 평균 혈당치가 혈액 100 ml당 320 mg으로 측정되어 당뇨가 유발되었음을 확인하였

고, 이후에도 실험 전 기간에 걸쳐 당뇨 상태가 지속되었다.

2) 방사선조사

당뇨유발이 확인된 당뇨유발-방사선조사군에 실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 체중 100 gm당 0.02 ml 근육 주사하여 전신 마취시킨 후, 특별히 고안된 방사선조사대에 두경부와 사지를 고정시키고, Co-60 심부치료기 (Theratron 780, Atomic Energy of Canada Ltd., Canada)를 이용하여 방사선원과 피부간 거리 70 cm, 선량률 62 cGy/min으로 10 Gy의 흡수선량이 되도록 두경부에 1회 조사하였다.

3) 실험동물의 희생 및 관찰

각 군의 실험동물을 당뇨유발 및 방사선조사 후 3일, 7일, 14일, 21일, 28일에 각각 희생시킨 다음, 악하선을 적출하였다. 적출된 악하선을 드라이아이스에서 급속 냉동시켜 보관한 후, O.C.T compound (PolyfreezeTM, Polysciences, Inc., U.S.A.)에 포매하고, 동결조직절편기 (Leica, Germany)를 이용하여 20 µm의 두께로 절편을 제작한 후, toluidine blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 면역조직화학적으로 clusterin의 발현을 관찰하기 위하여 위의 방법으로 제작한 절편을 tris buffered saline (TBS, pH 7.2) 용액으로 5분 동안 3번 수세한 후, 이를 실온에서 3% H₂O₂를 함유한 methanol에서 10분간 처리하고 증류수로 3번 수세하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 goat serum으로 20분간 처리한 후, rabbit IgG anti-clusterin peptide (Pierce Rockford, U.S.A.)로 희석한 goat serum에 실온에서 2시간 흡입시키고, TBS 용액으로 수세하였다. 이차 항체로써 biotinylated goat-anti rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories, U.S.A.)을 상온에서 slide상에 1시간 유지한 후, TBS 용액으로 수세하고 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit, Vector Laboratories, U.S.A.)에 1시간 작용시켰다. 이상의 조작 과정을 거쳐서 이를 100 mM TBS 용액에 희석한 0.05% diaminobenzidine hydrochloride 용액과 0.01% H₂O₂를 동량으로 혼합한 용액에서 발색 반응을 유발시켜 면역반응을 확인하였다.

blue 염색에서 선포세포의 염색도는 실험 시일이 경과됨에 따라 변화되어 당뇨유발 후 14일에 최고로 농염되었고, 이 염색의 염색상은 관찰되었으나, 이후에는 점차 이염색의 염색도가 감소를 나타내며 소실되었다. 또한 당뇨유발 후 28일에는 붉은 색으로 이염되는 비만세포 (mast cell)가 다수 관찰되었다 (Figs. 2-4).

3) 당뇨유발-방사선조사군

악하선 선포의 형태는 시일이 경과됨에 따라 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 선포간질의 섬유모세포가 현저하게 증가되었고, 당뇨유발 및 방사선조사 후 7일부터는 괴사된 선포세포와 선포간 결합조직 세포가 공존하는 괴사부위가 부분적으로 관찰되었다. toluidine blue 염색에서 선포세포의 염색도는 농염된 채로 실험 전 기간에 걸쳐 뚜렷한 차이를 나타내지 않았다 (Figs. 5-8).

2. 면역조직화학적 소견

1) 대조군

악하선의 분비도관세포에서는 clusterin의 발현이 미약하게 관찰되었으며, 선포세포에서는 음성 반응을 보였다.

2) 당뇨유발군

악하선의 선포세포에서 당뇨유발 후 3일에 clusterin의 발현이 부분적으로 관찰되었고, 당뇨유발 후 7일에는 clusterin의 발현이 전반적으로 증가되었으며, 당뇨유발 후 14일에는 clusterin의 발현이 가장 현저하게 관찰되었다. 그러나 당뇨유발 후 21일부터는 clusterin의 발현이 점차 소실되었다 (Figs. 9-12).

3) 당뇨유발-방사선조사군

악하선의 선포세포에서 당뇨유발 및 방사선조사 후 3일에 clusterin의 발현이 불규칙하게 관찰되었고, 당뇨유발 및 방사선조사 후 7일에는 clusterin의 발현이 부분적으로 소실되었다. 당뇨유발 및 방사선조사 후 14일 이후부터는 clusterin의 발현이 전반적으로 점차 소실되었으며, 변성된 clusterin도 관찰되었다 (Figs. 13-16).

결 과

1. 광학현미경 소견

1) 대조군

악하선 선포세포의 세포막은 그 경계와 형태가 분명하였고, 핵의 형태가 잘 구별되었다 (Fig. 1).

2) 당뇨유발군

악하선 선포의 형태는 시일이 경과됨에 따라 점차 불분명해져 당뇨유발 후 21일에 가장 현저하였고, 당뇨유발 후 14일부터 선포간질의 섬유모세포가 치밀해졌다. toluidine

고 찰

구강건조증은 타액선의 가역적, 또는 비가역적인 기능 장애로서, 이는 구강 내의 국소적 염증이나 타액선의 감염, 탈수, 신경안정제나 항히스타민제, 항콜린제 및 화학요법제 등의 약물투여, Sjögren 증후군과 같은 자가면역질환, 당뇨병과 같은 내분비계 질환, 방사선조사, 심인성 요인 등에 의한 타액선 도관의 폐쇄, 타액선 실질의 파괴, 그리고 분비기전의 변화 등에 의해 유발된다.¹⁴ 타액선 도관의 폐쇄는 대개 타석이나 외상에 의해 발생되며, 종종 도관 내의 압력을 증가시켜 선포세포를 위축시키고, 타액선 기능의

상실을 초래시키기도 하는데, 이러한 병적 상태는 타액선 도관의 폐쇄를 일으키는 요인을 제거하고 타액선 도관을 다시 회복시켜 줌으로써 치료될 수 있다. 그러나 타액선의 실질을 파괴하는 감염이나 자가면역질환, 방사선치료 등은 영구적인 구강건조증을 야기시킬 수 있으므로⁵ 임상적으로 이러한 요인들이 타액선 조직에 미치는 영향은 중요한 관심의 대상이 되고 있다.

따라서 본 실험에서는 타액 분비기능의 감소와 타액 성분의 변화로 인해 구강건조증을 유발시키는 것으로 알려진 당뇨병^{20,21}과 방사선이 당뇨유발 타액선 조직에 미치는 영향을 각각 관찰하기 위하여, 췌장의 인슐린 분비작용에 영향을 미치지 않으면서 포도당에 대한 인슐린의 역치를 증가시켜 당뇨를 유발시키는 STZ³²을 백서에 주사하여 실험적으로 당뇨를 유발시킨 다음, 타액 분비기능의 심한 장애를 유발시키는 선량인 10 Gy^{30,31}의 흡수선량을 두경부에 1회 조사한 후, 이의 변화를 관찰하였다.

본 실험에서는 우선 당뇨에 의한 타액선 조직의 변화를 관찰하였는데, 당뇨병은 절대적, 혹은 상대적인 인슐린 결핍으로 인해 지질 대사 및 단백질 대사에 이상이 초래되어 혈당을 상승시키는 질환으로 신경성 장애와 혈관성 장애에 의해 발병되는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 당뇨병에 의한 타액선 조직의 변화는 일반적으로 선포의 변화와 선포 외 조직의 변화로 구분할 수 있는데, 선포의 변화로는 선포세포의 위축이나 파괴, 선포세포 내의 지방축적, 선포 외 조직의 변화로는 선포와 도관을 둘러싸는 혈관의 변화와 선포간 결합조직의 변화가 보고되고 있다.²⁰⁻²² 당뇨병에 의한 선포의 형태적 변화에 대해, Cutler 등²¹은 당뇨병시에는 타액선 자율신경계의 변성으로 인해 선포세포의 위축이나 파괴가 발생되며, 선포세포가 파괴된 부위는 결합조직으로 대체된다고 하였다. Anderson과 Johnson³³은 alloxan으로 당뇨가 유발된 백서의 이하선에서 지방소적이 관찰되었는데, 축적된 지방은 혈당치와 밀접한 관계가 있기 때문에 당뇨로 인한 대사장애가 세포 내에 지방을 축적시킨다고 하였으며, Morris 등²⁵도 STZ으로 유발시킨 당뇨 백서의 타액선에서 선포간에 지방소적의 축적이 관찰된다고 보고한 바 있다. 당뇨병에 의한 선포 외 조직의 변화에 대해서는, Campbell³⁴이 당뇨병 초기에 대부분의 혈관, 특히 모세혈관의 기저막이 비후되었다고 보고하였고, Murrah 등²⁷도 사망한 당뇨 환자의 모세혈관을 관찰한 결과, 동일한 결과를 보고한 바 있다. 이에 대해, Reuterving 등²⁴은 비후된 모세혈관 기저막의 투과성과 여과성에 영향을 미쳐, 타액 생성에 지장을 초래한다고 하였으며, Russel³⁵은 당뇨병시 혈관강이 폐쇄되고, 이로 인해 인접한 세포의 물질대사가 장애를 받게 된다고 하였다. 또한 Anderson 등²⁶은 당뇨병시 병적으로 증가된 치밀한 모세혈관을 보고한 바 있어, 당뇨병시 혈관의 변화는 매우 중요한 변화라 하겠다.

본 실험에서는 대조군의 경우 악하선 선포세포의 세포

막은 그 경계와 형태가 분명하였고, 핵의 형태가 잘 구별되었다. 이에 비하여, 당뇨유발군에서는 선포세포의 형태가 점차 불분명해졌고, 선포간질의 섬유모세포가 치밀해졌다. 또한 조직화학적으로는 정상적인 타액선 선포세포로부터 생성되는 점액다당류에 양성으로 염색되는 toluidine blue의 염색이 당뇨유발 후 14일에 최고로 농염되었고, 그 후 점차 염색도가 감소되었다. 이러한 실험결과는 당뇨에 의한 타액선의 기능 장애가 당뇨유발 14일 이후에 발생되었을 가능성과 당뇨유발 14일 이전에 타액의 분비 장애가 발생되었을 개연성을 추측할 수 있었다. 또한 당뇨유발 후 28일에는 면역에 관여하는 것으로 알려진 비만세포가 관찰되어 당뇨병에 의한 타액선 조직의 변화에 대하여 생체가 생리적으로 반응하고 있다는 것을 시사하는 것으로 생각할 수 있었는데, 이러한 생리적인 반응을 보다 명확하게 구명하기 위해서는 투과전자현미경이나 조직화학적 방법을 이용한 부가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

한편 타액선에 방사선이 조사되면 방사선의 직접 또는 간접작용에 의하여 선포세포, 도관세포 등의 구조에도 많은 변화가 초래되고, 이의 기능도 영향을 받아 구강건조증 및 이에 따른 저작장애, 연하장애 등이 유발된다.³⁶ 이러한 타액 분비의 감소는 저선량의 방사선조사시 수 일 이내에 가역적으로 발생되지만, 고선량의 방사선조사에 의한 타액 분비의 감소는 비가역적으로 지속될 뿐만 아니라, 타액선 조직의 질량 감소가 동반되어 나타나는 것으로 알려져 있다.^{12,37}

일반적으로 타액선은 세포의 분화 정도는 높으나, 세포 분열 능력이 낮기 때문에 방사선감수성이 중등도인 것으로 알려져 있다.¹¹ Ito,² Shinn 등³⁸은 장액선이 점액선보다 방사선감수성이 높고, 대타액선 중에서 이하선이 가장 방사선감수성이 높으며, 선포세포가 도관세포에 비해 높은 방사선감수성을 보인다고 하였다. 따라서 본 실험에서는 방사선감수성이 높은 장액선 선포세포를 관찰하기 위하여 장액선과 점액선의 혼합선으로 이루어진 백서의 악하선을 실험대상으로 하였다.

방사선에 의한 타액선 조직의 변화에 대해, English 등³⁹은 선포세포의 분절화, 선포 내 공포화 및 선포 내 구조의 붕괴, 핵의 크기 및 형태 변화 등을, Cherry와 Glucksmann⁴⁰은 세포질 내에서 동질성으로 농염되는 분비과립, 핵의 심한 변성과 선포세포의 파괴로 인한 선포의 붕괴, 타액의 분비 억제 등을, Santangelo와 Toto⁴¹는 선포세포의 위축 및 수양성 변성, 공포화, 섬유화 현상과 세포질 내의 과립의 감소, 핵의 용해와 농축 현상 등을 보고한 바 있다.

본 실험의 당뇨유발-방사선조사군에서는 당뇨유발군에 비하여 선포의 형태가 시일이 경과됨에 따라 뚜렷한 차이를 보이지 않았으나, 당뇨유발 및 방사선조사 후 7일부터는 부분적인 괴사 부위와 선포간질의 섬유모세포 증가가 관찰되어 방사선조사로 인해 당뇨유발군에 비하여 타액선

의 기능 장애가 심화되었음을 알 수 있었다. 이러한 방사선조사에 따른 타액선의 기능 장애는 타액선의 기능성 세포 수의 감소에 따른 타액선 조직의 질량 감소에 의해 발생하는 것인지, 또는 부가적으로 방사선이 타액선의 생리적 변화를 유도하기 때문인지는 현재까지도 명확히 밝혀진 바 없다. 조직화학적으로는 toluidine blue 염색에서 선포세포의 염색도가 실험 전 기간에 걸쳐 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 방사선조사 이전에 선포세포에서 생산된 점액다당류가 더 이상 분비되지 못하고 세포 내에 잔존되었기 때문인 것으로 생각된다.

본 실험에서는 광학현미경에서 관찰된 이러한 당뇨 및 방사선에 의한 타액선 조직의 형태적 변화와 타액선의 세포자사의 연관성을 관찰하고, 당뇨 상태의 타액선에 방사선이 조사되면 세포자사를 촉진시키는지, 아니면 방사선에 의해 세포자사의 진행과정이 차단되는지를 알아보기 위하여 세포자사가 진행 중인 조직에서 나타나는 clusterin의 발현 정도를 면역조직화학적 염색을 시행하여 관찰하였다.

세포자사는 기능적으로 상이한 생리적 요인에 의해 발생하는 세포사로서, 세포의 성장과 증식을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있다.^{42,43} Lakins 등⁴⁴은 세포자사가 진행되는 동안 clusterin 합성이 증가되며, 새로 합성된 clusterin은 세포자사가 진행 중인 세포에 한정되어 발현된다고 하였다.

clusterin은 지방 수송, 생식, 조직의 분화 등과 같은 정상 조직의 생리적 과정에 관여할 뿐만 아니라 세포자사, 조직의 개형 및 세포의 보호와도 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다.^{28,45} Dvergsten 등⁴⁶은 clusterin이 세포자사에 의한 세포 소실 이후에 조직의 개형을 유도하는 역할을 한다고 보고하였으며, French 등,⁴² Miyake 등⁴⁷은 생존이 불가능한 세포에서는 clusterin을 관찰할 수 없으므로 clusterin이 세포의 보호와 밀접한 관련이 있다고 보고하였고, Sensibar 등⁴⁸은 clusterin의 소실시 세포자사가 시작되는 것으로 clusterin의 세포 보호기능을 확인할 수 있다고 하였다.

본 실험에서는 당뇨유발군에서 당뇨유발 후 3일에 타액선의 선포세포에서 clusterin이 관찰되기 시작하여 당뇨유발 후 7일에 clusterin의 발현이 전반적으로 증가되기 시작하였으며, 당뇨유발 후 14일에 clusterin의 발현이 가장 뚜렷하였다. 이러한 실험 결과는 toluidine blue 염색에서도 당뇨유발 후 14일에 염색도가 최고로 농염되었던 것으로 미루어 보아 French 등⁴²과 Miyake 등⁴⁷의 연구결과와 유사하게 당뇨유발 후 14일 후까지는 타액선 세포가 clusterin의 보호를 받아 정상적인 기능을 하고 있었던 것으로 생각되며, 이 후 clusterin의 발현이 점차 소실되고, toluidine blue 염색도도 점차 감소되었던 것은 세포가 세포자사 과정을 시작했기 때문인 것으로 판단된다. 이에 비하여, 당뇨유발-

방사선조사군에서는 당뇨유발 및 방사선조사 후 3일에 타액선의 선포세포에서 clusterin의 발현이 불규칙하게 관찰되었고, 당뇨유발 및 방사선조사 후 7일부터는 clusterin의 발현이 부분적으로 소실되었을 뿐만 아니라, 당뇨유발 및 방사선조사 후 14일 이후에는 clusterin이 점차 소실되면서 변성된 clusterin이 관찰되었던 것으로 보아 당뇨에 의한 세포자사가 방사선의 영향을 받아 생리적 반응이 원활하게 이루어지지 못했던 것으로 생각된다. 또한 당뇨유발-방사선조사군에서 실험 전 기간에 걸쳐 선포세포의 형태 변화가 그리 현저하지 않았던 것도 방사선이 당뇨에 의해 진행되는 생리적인 세포자사에 영향을 미쳐 생체의 이물질 처리 기전에 장애가 발생되었기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 현재까지도 clusterin의 특정 역할은 불명하므로, 향후에는 당뇨에 의한 타액선 세포자사의 정확한 기전 및 방사선조사에 의한 타액선의 세포자사, 변성, 또는 괴사 기전에 미치는 영향, 특히 당뇨가 유발된 타액선에 방사선이 미치는 영향에 대하여는 방사선조사 방법과 선량, 실험동물의 종과 연령, 세포의 증식과 분화 정도, 세포의 생리적 조건 등을 다양하게 적용하여 정상적인 구강생리에 많은 역할을 수행하는 타액선에 대한 방사선의 영향을 면밀히 분석, 평가하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 최승규, 이상래. 방사선 조사가 백서 협점막에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. 대한구강악안면방사선학회지 1987; 17: 7-25.
2. Ito M. Biologic effect of X-irradiation on salivary glands of mice. Radiat Res 1967; 30: 283-300.
3. Rankow RM, Weissman B. Osteoradionecrosis of the mandible. Ann Otol 1971; 80: 603-11.
4. Carl W, Wood R. Effects of radiation on the developing dentition and supporting bone. J Am Dent Assoc 1980; 101: 640-8.
5. Rankow RM, Polayes IM. Diseases of the Salivary glands. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1980. p. 41-51.
6. Brenk VD, Hurley RA, Gomez C, Richter W. Serum amylase as a measure of salivary gland radiation damage. Br J Radiol 1969; 42: 688-700.
7. Elzay RP, Levitt SH, Sweeney WT. Histologic effect of fractionated doses of selectively applied megavoltage irradiation on the major glands of the Albino rat. Radiology 1969; 93: 146-52.
8. Names JL, Wheatcroft MG, Leopold RS. Effects of total body X-radiation on salivary components of dogs. J Dent Res 1952; 31: 603-8.
9. Stern MH, Turner JE, Jelt LS. Electron microscopic changes in rat parotid gland and submandibular glands subsequent to total body irradiation with fast neutrons. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1976; 42: 620-30.
10. Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM. Radiation induced xerostomia in cancer patients: effect on salivary and serum electrolyte. Cancer 1976; 38: 273-8.
11. Anderson MW, Izutsu KT, Rice JC. Parotid gland pathophysiology after mixed gamma and neutron irradiation of cancer patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1981; 52: 495-500.

12. O'Connel AC, Lillibridge CD, Zheng C, Baum BJ, O'Connel BC, Ambudkar IS. γ -irradiation-induced cell cycle arrest and cell death in a human submandibular gland cell line: effect of E2F1 Expression. *J Cell Physiol* 1998; 177 : 264-73.
13. Paardekooper GMRM, Cammelli S, Zeilstra LJW, Coppes RP, Konings AWT. Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol* 1998; 73 : 641-8.
14. Wood NK, Goaz PW. Differential diagnosis of oral lesions. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1991. p. 98-9.
15. Jones JH, Mason DK. Oral manifestations of systemic disease. 17th ed. W.B. Saunders Co.; 1985. p. 1320-41.
16. Bissada NF, Schaffer EM, Lazarow A. Effect of alloxan diabetes and local irritation factors on the periodontal structures of the rat. *Periodontics* 1966; 4 : 233-40.
17. Glickman L, Smulow JB, Moreau L. Post-surgical periodontal healing in alloxan diabetes. *J Periodontol* 1967; 38: 93-9.
18. Gibson J, Lamey PJ, Lewis M, Frier B. Oral manifestations of previously undiagnosed non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Oral Pathol Med* 1990; 19 : 284-7.
19. Lamey PJ, Darwazeh AM, Frier BM. Oral disorders associated with diabetes mellitus. *Diabet Med* 1992; 9 : 410-6.
20. Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am J Physiol* 1983; 245 : 431-7.
21. Cutler LS, Pinney HE, Christian C, Russotto SP. Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1979; 382 : 301-11.
22. Gorlin RJ, Goldman HM. Thomas' oral pathology. 6th ed. St. Louis: The C.V. Mosby Co.; 1970. p. 989-90.
23. Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol* 1992; 263 : 607-14.
24. Reuterving CO, Hagg E, Henriksson R, Holm J. Salivary glands in long term alloxan-diabetic rats. A quantitative light and electron-microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1987; 95 : 131-6.
25. Mori Y, Muratsu K, Nara Y, Morioka T. The histopathological observation of the salivary gland in hamsters with streptozotocin induced diabetes. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1990; 81 : 298-302.
26. Anderson LC, Garrett JR, Suleiman AH, Chan KM. Secretory edema in diabetic submandibular glands during parasympathetic nerve stimulation: relationship to microvascular abnormalities in streptozotocin-treated rats. *Comp Biochem Physiol A* 1992; 103 : 145-9.
27. Murrach VA, Crosson JT, Sauk JJ. Parotid gland basement membrane variation in diabetes mellitus. *J Oral Pathol* 1985; 14 : 236-46.
28. Fritz IB, Murphy B. Clusterin. Insights into a multifunctional protein. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4 : 41-5.
29. Blaschuk O, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983; 258 : 7714-20.
30. Valdez IH. Radiation-induced salivary dysfunction: clinical course and significance. *Spec Care Dent* 1991; 11 : 252-5.
31. Jones RE, Takeuchi T, Eisgruch A, D'Hondt E, Hazuka M, Ship JA. Ipsilateral parotid sparing study in head and neck cancer patients who receive radiation therapy: results after 1 year. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 81 : 642-8.
32. Ferner RE. Drug-induced diabetes. *Baillieres Clin Endocrinol Metabol* 1992; 6 : 849-66.
33. Anderson LC, Johnson DA. Effects of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. *Comp Biochem Physiol* 1981; 70 : 725-34.
34. Campbell MJA. Periodontal disease in the diabetic patient and its treatment. *Austral Dent J* 1967; 12 : 117-22.
35. Russel BG. Gingival changes in diabetes mellitus. I. Vascular changes. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1966; 86 : 161-8.
36. Takinami S. Studies on the effect of irradiation in the salivary glands: relationship between xerostomia and secretory function of exposed salivary glands. *Dental Radiology* 1988; 28 : 17-32.
37. Mossman KL. Quantitative radiation dose-response relationships for normal tissues in man. II. Response of the salivary glands during radiotherapy. *Radiat Res* 1983; 95 : 392-8.
38. Sinn DP, Stoker NG, Epker BN. Effects of fractionated doses of cobalt 60 irradiation on rabbit submandibular glands: light microscopic studies. *J Oral Surg* 1972; 30 : 277-83.
39. English JA, Wheatcroft MG, Lyon HW, Miller C. Long-term observations of radiation changes in salivary glands and the general effects of 1000R to 1750R of x-ray irradiation locally administered to the head of dogs. *J Oral Surg* 1955; 8 : 87-99.
40. Cherry CD, Grucksman A. Injury and repair following irradiation of salivary glands in male rats. *Br J Radiol* 1959; 32 : 596-608.
41. Santangelo MV, Toto PD. Radiation effects on mouse submandibular gland. *J Dent Res* 1965; 44 : 1291-8.
42. French LE, Wohlwend A, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest* 1994; 93 : 877-84.
43. Savil JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport ME, Henson PE, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. *J Clin Invest* 1989; 83 : 865-75.
44. Lakins J, Bennett SAL, Chen JH, Arnold JM, Morrissey C, Wong P, et al. Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* 1998; 273 : 2787-95.
45. da Silva AM, Klein C. Cell adhesion in transformed *D. discoideum* cells: expression of gp 80 and its biochemical characterization. *Devel Biol* 1990; 140 : 139-48.
46. Dvergsten J, Manivel JC, Corea-rotter R, Rosenberg M. Expression of clusterin in human renal diseases. *Kidney Int* 1994; 45 : 828-35.
47. Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Cleave ME. Testosterone-repressed prostate message-2 is an antiapoptotic gene involved in progression to androgen independence in prostate cancer. *Cancer Res* 2000; 60 : 170-6.
48. Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 1995; 55 : 2431-7.

Explanation of Figures

- Fig. 1.** Normal submandibular gland (toluidine blue, × 100).
- Fig. 2.** Diabetic group at 14 days after diabetic state (toluidine blue, × 100).
- Fig. 3.** Diabetic group at 21 days after diabetic state (toluidine blue, × 100).
- Fig. 4.** Diabetic group at 28 days after diabetic state (toluidine blue, × 100).
- Fig. 5.** Diabetic-irradiated group at 3 days after diabetic state and irradiation (toluidine blue, × 100).
- Fig. 6.** Diabetic-irradiated group at 7 days after diabetic state and irradiation (toluidine blue, × 100).
- Fig. 7.** Diabetic-irradiated group at 21 days after diabetic state and irradiation (toluidine blue, × 100).
- Fig. 8.** Diabetic-irradiated group at 28 days after diabetic state and irradiation (toluidine blue, × 200).
- Fig. 9.** Diabetic group at 7 days after diabetic state (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 10.** Diabetic group at 14 days after diabetic state (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 11.** Diabetic group at 21 day after diabetic state (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 12.** Diabetic group at 28 days after diabetic state (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 13.** Diabetic-irradiated group at 3 days after diabetic state and irradiation (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 14.** Diabetic-irradiated group at 14 days after diabetic state and irradiation (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 15.** Diabetic-irradiated group at 21 days after diabetic state and irradiation (immunolocalization of clusterin protein, × 200).
- Fig. 16.** Diabetic-irradiated group at 28 days after diabetic state and irradiation (immunolocalization of clusterin protein, × 200).

방사선조사가 당뇨 백서의 악하선 세포세포에 미치는 영향



