

The Effects of Melatonin and Ge-132 on Acute Hematopoietic Syndrome following Radiation Exposure

Seong-Soon Jang

Dept. of Radiation Oncology, The Catholic University of Korea

방사선피폭 후 급성조혈계증후군에 대한 Melatonin과 Ge-132의 효과

장성순

가톨릭의대 방사선종양학교실

(2004년 8월 13일 접수, 2004년 12월 7일 채택)

Abstract - The radioprotective effects of Melatonin and Ge-132 on acute hematopoietic injury was investigated in mice exposed to an acute whole-body radiation dose of 8 Gy. Melatonin was administered intraperitoneally 1 hour before irradiation at a dose of 200 mg/kg, and Ge-132 was administered orally from days 5 to 20 after irradiation at a dose 130 - 150 mg/kg/d. The radioprotective effects were evaluated for spleen using TUNEL assay, and in peripheral blood by counting lymphocyte & WBC. The 4 experimental groups (irradiation-only, melatonin pretreatment, Ge-132 posttreatment, and melatonin pretreatment plus Ge-132 posttreatment) were observed for survival analysis up to 30 days following irradiation. The apoptotic index (47.8% vs 45.9%, $p=0.385$), and the number of lymphocytes ($97/\mu\text{l}$ vs $101/\mu\text{l}$, $p=0.898$) were not significantly different between the irradiation-only and the melatonin pretreatment group, But the number of WBCs ($147/\mu\text{l}$ vs $306/\mu\text{l}$, $p=0.010$) was higher in the melatonin pretreatment group. The irradiation-only, melatonin, Ge-132, and melatonin plus Ge-132 treatments resulted in survival rate at 30 days of 21.4%, 100%, 35.7%, and 85.7%, respectively. The melatonin pretreatment group in survival analysis between groups was showed significantly higher survival than the irradiation-only($p=0.000$), or Ge-132 posttreatment group($p=0.0003$). These results indicate that the melatonin may have a potential as an effective radioprotector on acute hematopoietic syndrome following radiation exposure.

Key words : Melatonin, Ge-132, Radioprotector, Acute hematopoietic syndrome

요약 - 방사선피폭 후 급성조혈계 손상에 대한 Melatonin과 Ge-132의 방어효과를 8 Gy의 선량으로 급성, 전신피폭 된 마우스에서 연구하였다. Melatonin은 피폭 1시간 전에 200 mg/kg의 용량으로 복강 내 주사하였고, Ge-132는 130 - 150 mg/kg/d의 용량으로 피폭 후 5일째부터 20일째까지 경구복용 시켰다. 방사선방어 효과를 평가하기 위해 비장에서 TUNEL assay를 실시하였고, 혈액 내 림프구와 총 백혈구 수치를 측정하였다. 피폭 후 30일째까지의 생존분석을 위해 4 실험군들 (피폭단독군, melatonin 전처치군, Ge-132 후처치군, melatonin 전처치 및 Ge-132 후처치군)에서 날짜경과에 따른 사망을 측정하였다. 피폭단독군과 melatonin 전처치군 간에 세포고사지수 (47.8% vs 45.9%, $p=0.385$)와 림프구 수치 ($97/\mu\text{l}$ vs $101/\mu\text{l}$, $p=0.898$)에서 차이가 없었으나, 총 백혈구 수치는 melatonin 전처치군에서 유의하게 높은 수치 ($147/\mu\text{l}$ vs $306/\mu\text{l}$, $p=0.010$)를 보였다. 피폭 후 30일째의 생존율은 피폭단독군, melatonin 전처치군, Ge-132 후처치군, 그리고 melatonin 전처치 및 Ge-132 후처치군에서 각각 21.4%, 100%, 35.7%, 그리고 85.7%였다. 실험군들 간의 생존분석에서 melatonin 전처치군은 피폭단독군($p=0.000$)이나 Ge-132 후처치군($p=0.0003$)에 유의하게 높은 생존을 보였다. 본 연구결과는 방사선피폭 후 급성조혈계증후군에 대하여 melatonin이 방사선방어제로서 효능을 지님을 보여주고 있다.

중심어 : Melatonin, Ge-132, 방사선방어제, 급성조혈계증후군

서 론

방사선사고 시 발생하는 감마선피폭은 높은 투과력을 갖고 있어 피부이상을 투과하지 못하는 베타선이나 알파선피폭처럼 의복제거 및 피부세척만으로는 외부오염제거가 불가능하며 직접적인 생존과 관련된 급성방사선증후군을 일으킨다. 급성방사선증후군은 피폭선량이 증가함에 따라 조혈계, 위장관계, 그리고 뇌혈관계증후군의 형태로 나타나는데 조혈계증후군은 3 - 8 Gy의 선량에 전신피폭 시 조혈계 세포들의 손상으로 일어나는데 사람에서 피폭 후 약 30일째에 최대사망빈도를 보이나 60일째까지 사망이 계속되며 동물에서는 10 - 15일째에 최대사망빈도를 보여 30일째까지 사망이 지속되고 사람과 동물에서 LD₅₀수치는 각각 4 Gy와 7 Gy 정도로 알려져 있다. 위장관계증후군은 10 Gy 이상의 선량에 피폭 시 위장관계 상피세포들의 손상으로 발생하는데 보통 3 - 10 일 내에 모두 사망한다고 보고되며, 뇌혈관계증후군은 아직 연구결과가 부족해 정확한 기전은 알 수 없으나 30 Gy 이상의 선량에 피폭 시 2일 내에 사망 할 것으로 추정하고 있다. 감마선피폭 시 주 사망원인은 급성조혈계증후군으로, 즉 골수세포 손상에 의한 면역저하에 따른 감염성 사망에 기인한다[1].

주 사망원인인 급성조혈계증후군을 의학적으로 관리하기 위해 청결한 환경유지, 수액 및 전해질 요법, 혈구세포 수혈, 예방적 항생제 주사 및 특이감염의 치료 등 여러 보조적 치료법들이 기본적으로 행해지지만 보다 근본적인 치료로서 과립구-집락자극인자(G-CSF) 등의 Cytokine 주사, 골수이식, 그리고 방사선방어제의 사용 등이 추천된다. 방사선방어제는 대개 방사선에 의해 인체 내에서 생긴 활성산소물질들(reactive oxygen species, ROS)이 세포(주로 DNA)에 손상을 유발하기 전에 제거하는 유리기제거제(free radical scavenger), 또는 항산화제(antioxidant) 등의 전처치 형태로 연구가 있어왔고, 동물실험들에서 고용량 amifostine (WR-2721)이 현재까지 가장 뛰어난 방어효과를 지닌 방어제로 알려지나 약물자체의 부작용들(오심, 구토, 졸음, 저혈압, 저칼슘혈증, 활동도 저하 등)로 실전에서의 사용은 어려운 실정이다. 다만 임상적으로 두경부암 환자나 폐암 환자의 국소 방사선치료 시 방사선으로 인한 구강건조증, 식도염, 폐렴 등의 빈도를 줄이기 위해 저용량으로 사용되고 있다[2-4]. 피폭 후 사용 가능한 후처치제 형태의 방어제들은 주로 골수세포

증식 및 면역강화 작용 등의 기전을 이용하였으나 아직까지 효과적인 방어제는 개발되지 못하고 있으며, 최근에 방어효과는 향상시키며 부작용들을 줄이고자 전처치제와 후처치제를 복합 사용한 연구들이 있었다.

본 연구는 Melatonin의 강력한 유리기제거 기능과 림프구들을 자극해 Interferon gamma(IFN- γ) 유도체로서 Ge-132가 갖고 있는 면역강화 작용을 이용하여 방사선피폭 시 주 사망원인인 급성조혈계증후군에 대하여 melatonin 전처치가 갖는 방어효과를 알아보고 Ge-132 후처치가 생존율에 미치는 영향을 동물실험을 통해 연구하여 유효한 단독 또는 복합 방사선방어제로서의 활용가능성을 확인하고자 시행하였다.

재료 및 방법

고용량의 방사선에 의한 급성, 전신피폭 상황을 7 - 8주령의 수컷 ICR 마우스와 방사선 발생장치인 6MV 선형가속기(Siemens, PA)를 통해 재현하여 3 Gy/min의 고선량률로 급성조혈계 증상을 유발하기 위해 8 Gy의 선량을 전신피폭 시켰다. Melatonin(Sigma, St. Louis)은 70% DMSO 용액에서 완전히 용해시킨 후 200 mg/kg의 용량으로 피폭 1시간 전에 복강주사를 실시해 전처치하였으며, Ge-132(Sigma, St. Louis)는 피폭 후 감염에 가장 취약한 시기를 고려하여 피폭 5일째부터 20일째까지 130 - 150 mg/kg/d의 용량으로 식수에 녹여 경구복용 시켰다.

1) 림프구 생존수준 측정

(1) 세포고사지수(Apoptotic index, AI)

3 실험군(정상대조군, 피폭단독군, melatonin 전처치군)에서 피폭 6시간째에 Spleen을 절제하여 고정 후, 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절한 종단면 상에서 ApopTag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit(Intergen, NY)를 사용해 Terminal transferase-mediated dUTD-digoxigenin nick end labeling(TUNEL) assay를 시행하였다. xylene에 탈파라핀한 후 알코올로 함수과정을 거친 다음 PBS로 세척하였다. 40 μ g/ml 농도의 Proteinase K로 20분간 처리한 후 PBS로 세척하고 내인성 과산화효소 활성을 제거하기 위해 3% 과산화수소(H₂O₂)로 15분간 처리하여 즉시 PBS로 세척하였다. 20분간 equilibration buffer로 전처리한 후 TdT혼합액을 슬라이드 당

40 μ l씩 분주하여 37°C의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 슬라이드를 stop/wash buffer에 10분간 두어 효소작용을 중지시킨 후 PBS로 세척하였다. 실온에서 30분간 anti-digoxigenin conjugate 용액과 반응시킨 후 PBS로 세척하고 diethyl aminobenzidine(DAB)을 처리하여 5분간 발색반응을 거쳐 thionin blue로 대조염색한 후 봉입하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. 양성 대조표본은 쥐의 유선(mammary gland) 절편을 사용하였고 음성 대조표본은 TdT 혼합액 대신 equilibration buffer로 대체하여 사용하였다. AI는 Spleen white pulp당 TUNEL(+) 세포들의 %로 정의하였고 실험군 당 5 마우스, 그리고 마우스 당 5 white pulps에서 측정하였다.

(2) 혈액 내 림프구 수치 측정

3 실험군(정상대조군, 피폭단독군, melatonin 전처치군) 당 7 마우스에서 피폭 후 2일(44-46시간)째에 심장천자를 실시해 혈액을 채취하여 동물용 CBC 계측기인 HEMAVET® 850(CDC Technologies, Oxford, CT)로 총 백혈구 수치와 림프구 비율을 구하여 측정하였다.

2) 혈액 내 백혈구 수치 측정

3 실험군(정상대조군, 피폭단독군, melatonin 전처치군) 당 7 마우스에서 피폭 후 8일째에 심장천자를 실시해 혈액을 채취하여 총 백혈구 수치를 측정하였다.

3) 생존율 측정

4 실험군(피폭단독군, melatonin 전처치군, Ge-132 후처치군, melatonin 전처치 및 Ge-132 후처치군)에서 실험군 당 16 마우스를 배정하여 피폭 후 30일째까지 매일 날짜경과에 따라 사망한 마우스를 측정하였다.

4) 통계분석

SPSS를 이용하여 AI는 Student t-test로 피폭단독군과 melatonin 전처치군 간에 평균치 검정을 실시하였고, 림프구와 백혈구 수치들은 비모수 검정으로 Mann-Whitney U-test를 실시하여 분석하였다. 생존분석은 Kaplan-Meier method로 분석하였고, 실험군들 간에 생존율의 차이는 Log rank test로 유의성을 검정하였다. p값이 0.05이 하인 경우를 유의하게 판정하였다.

결과 및 논의

피폭 6시간째에 Spleen에서 시행한 TUNEL assay(Fig. 1)에서 진한 갈색으로 염색되는TUNEL(+) 세포들은 림프구들로 구성된 white pulps 내에서 주로 관찰되었으며, 실험군에 따른 평균 AI는 3.3%(정상대조군), 47.8%(피폭단독군), 그리고 45.9%(melatonin 전처치군)로 피폭단독군과 melatonin 전처치군 간에 유의한 차이가 없었고(p=0.385), 피폭 2일째의 평균 림프구 수치에서도 2367/ μ l(정상대조군), 97/ μ l(피폭단독군), 그리고

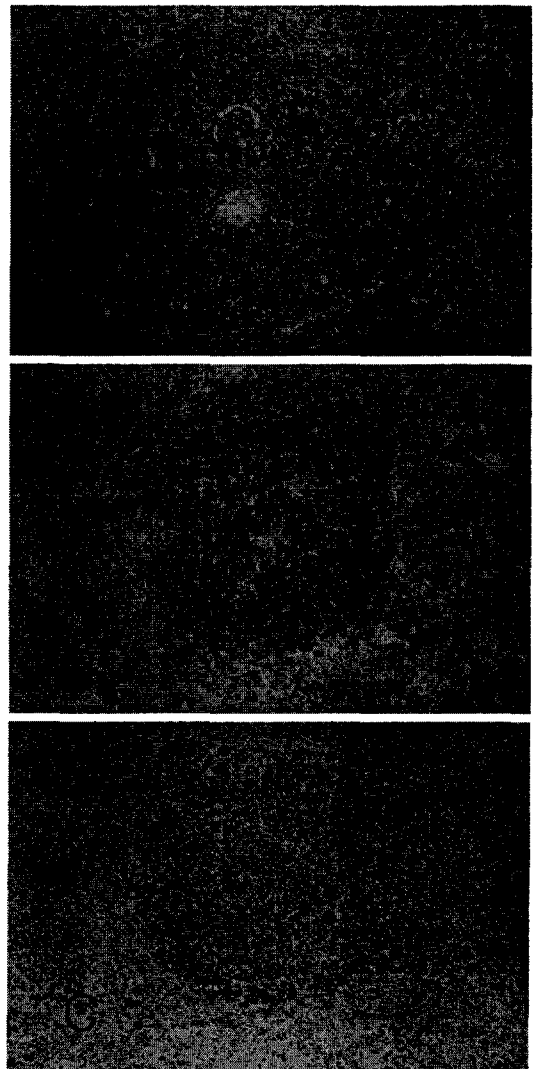


Fig. 1. TUNEL stainings of spleen of mice at 6 hours after 8 Gy irradiation. A. Control group, B. Irradiation-only group, C. Melatonin pretreatment group. (TUNEL, DAB, $\times 400$).

101/ μl (melatonin 전처치군)로 피폭단독군과 melatonin 전처치군 간에 유의한 차이가 없었다 ($p=0.898$).

피폭 8일째의 실험군별 평균 총 백혈구 수치는 3273/ μl (정상대조군), 147/ μl (피폭단독군), 그리고 306/ μl (melatonin 전처치군)로 피폭단독군에 비해 melatonin 전처치군에서 유의하게 높은 수치를 보였다($p=0.010$).

Kaplan-Meier method로 분석한 피폭 30일째까지의 생존을 그래프(Fig. 2)에서 피폭단독군은 피폭 후 12일째부터 23일째까지 사망이 관찰되었으며, 실험군별로 30일째의 생존율은 각각 21.4%(피폭단독군), 100%(melatonin 전처치군), 35.7%(Ge-132 후처치군), 그리고 85.7%(melatonin 전처치 및 Ge-132 후처치군)였다. 실험군들 간에 생존율의 차이는 melatonin 전처치로 인한 피폭단독군 ($p=0.000$)이나 Ge-132 후처치군($p=0.0003$)에 유의하게 비교되는 생존을 볼 수 있었고, 피폭단독군 vs Ge-132 후처치군($p=0.7030$), 그리고 melatonin 전처치군 vs melatonin 전처치 및 Ge-132 후처치군($p=0.1496$)간에는 유의한 생존율의 차이를 보이지 않았다.

Melatonin(N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 송과체(Pineal gland)에서 만들어지는 신경호르몬으로 여러 다양한 작용을 갖고 있으나, 방사선방어와 관련된 기전으로는 방사선에 의해 인체 내에서 생성되어 강력한 반응성을 지닌 hydroxyl radical을 melatonin의 안정화된 대사물인 3-hydroxymelatonin 형태로 변환시켜 직접적으로 hydroxyl radical을 제거하는 강력한 유리기 제거 기능을 지닌다고 최근연구들에서 보고된다[5, 6]. 또한, 항산화효소들의 활성을 증가시켜 여러 활성

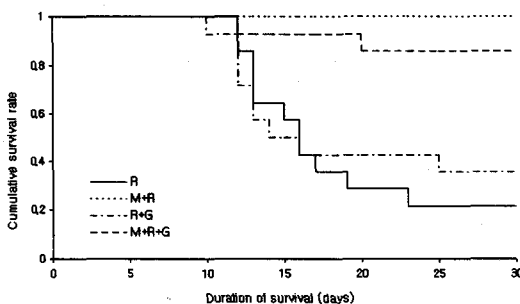


Fig. 2. Survival rate in 4 experimental groups according to the elapse of days. R. Irradiation only group, M+R. Melatonin pretreatment group, R+G. Ge-132 posttreatment group, M+R+G. Melatonin pretreatment plus Ge-132 posttreatment group.

산소물질들을 감소시키는 항산화성 방어기전을 갖고 있으며, 면역조절체로서의 기능도 있어 골수 내 과립구들에 대한 성장인자로 작용하거나 B-lymphocytes 및 macrophage들의 활성화에도 참여한다는 보고가 있다[7, 8]. 독성과 관련하여서는 동물실험에서 800 mg/kg, 그리고 사람에서는 300 mg의 단일용량 또는 30일까지 1 g/d의 용량에서도 안전한 약물로 보고된다[6]. 치료적 용량에서 melatonin의 가장 흔한 부작용들은 진정, 졸음, 그리고 경미한 저체온증 등이 보고되는데[9], 본 연구에서도 250 mg/kg이상의 용량으로 복강주사 시 약간의 활동도 저하가 관찰되어 200 mg/kg의 용량으로 조정하였다.

Ge-132(carboxyethylgermanium sesquioxide)의 주 작용으로는 helper T-lymphocytes을 자극하여 IFN- γ 를 유도함으로써 유도된 IFN- γ 가 macrophage나 NK cell 또는 cytotoxic T-lymphocytes을 활성화시켜 면역력을 강화시키며[10, 11], 그 외에 산소공급, 유리기 제거, 진통, 증금속 독성 제거 등의 작용이 있다고 알려져 있다[12]. Ge-132의 안전성에 대해서는 마우스 독성실험에서 10 g/kg의 단일용량이나 6개월 간 3 g/kg/d의 용량에서도 뚜렷한 독성이 보고되지 않았다[13]. Aso 등은 Ge-132 복용 48시간 전에 100R - 700R의 X선 피폭을 시행한 마우스에서 IFN- γ 유도가 증가하지 않았다고 보고하며, Ge-132가 IFN- γ 유도체로 작용하기 위해서는 림프구가 필수적으로 있어야 한다고 설명하였다[10].

본 연구에서 피폭 후 림프구 생존수준을 측정하기 위해 Spleen white pulps 내의 세포고사지수와 혈액 내 림프구 수치를 측정하였는데, 림프구 자체는 방사선에 매우 민감한 세포로 방사선 유도성 림프구 사망은 대개 세포고사성 사망(apoptotic death)으로 알려지며 피폭 후 6 - 8시간에 최대의 세포고사 빈도를 보인다고 한다. 또한 전신피폭 후 24 - 48시간째의 혈액 내 림프구 수치는 피폭의 정도를 예측하는데 유효한 정보로 이용되는데[14] 본 연구에서는 피폭 후 기저수준을 보이는 시기로 알려진 피폭 2일째를 측정 시기로 선택하였다. 결과에서 피폭단독군과 melatonin 전처치군 모두에서 정상대조군에 비해 현저히 낮은 수치를 확인할 수 있었고 8 Gy의 고선량 하에서 melatonin 전처치로 인한 림프구 보호효과를 확인할 수 없어, 이는 Ge-132 투여로 인한 림프구에서 IFN- γ 유도증가가 이루어지지 않아 감염에 의한 사망을 막을 수 없는 결과로 이어졌다고 판단된다. 전혈구 검사(CBC)는 임상적으로 골수억제 정

도를 파악하여 급성조혈계증후군의 발생유무를 예측하는데 가장 접근성을 지닌 검사라고 판단되는데 본 연구에서는 피폭 10 - 15일 후에 동물에서 급성조혈계증후군으로 인한 최대사망빈도를 보인다는 점과 피폭 후 7 - 10일째에 백혈구가 최저수준의 수치를 보이는 점을 고려하여 측정시점을 8일째로 선택하였다. 또한 본 연구에서 방어제들에 따른 LD_{50/30}수치를 구하여 실험군별로 선량감소계수(dose reduction factor, DRF)를 직접 비교하지는 않았으나 생존을 비교는 방어제들의 효과를 판정하는데 가장 널리 사용되고 실제 사용가능성을 예측하는데 가장 중요한 연구일 것이다. 대개의 연구들에서 전신피폭 시 위장관계증후군에 기인한 사망은 피폭 후 7 - 10일까지의 생존분석을 통해서, 그리고 조혈계증후군으로 인한 사망은 30일째까지의 생존분석으로 판단한다. 결과에서 피폭단독군에서 피폭 10일째까지 사망한 마우스는 관찰되지 않아 최소한 8 Gy의 선량 하에서 위장관계증후군으로 인한 사망은 없었다고 생각되며, melatonin 전처치군에서 총 백혈구 수치가 정상대조군 보다는 현저히 낮은 수치를 보이지만 피폭단독군과는 유의하게 비교되는 높은 수치를 보여 실험군들 간의 생존분석에서 melatonin 전처치로 인한 생존율에서 유의한 증가의 결과로 나타났다고 판단된다.

결 론

Ge-132 투여군에서 생존율 향상이 없었던 것은 8 Gy의 고선량 피폭 후 피폭단독군과 melatonin 전처치군 모두에서 피폭 후 생존립프구 수의 현저한 감소로 인한 IFN- γ 유도실패에 기인했다고 판단된다.

Melatonin 전처치는 피폭단독군에 비해 총 백혈구 수치에서 유의한 증가를 가져왔고, 피폭단독군이나 Ge-132 후처치군에 비교되는 생존율의 향상을 보였다.

본 연구결과는 방사선피폭 후 급성조혈계증후군에 대하여 melatonin 전처치제가 방사선방어제로서 효능을 지님을 보여주고 있으며, Ge-132 단독 및 추가 후처치로 인한 생존율에서의 향상은 관찰 할 수 없었다.

참 고 문 헌

1. E.J. Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, 5th Ed., pp. 124-135, Lippincott, Philadelphia (2000)
2. D. Antonadou, M. Pepelassi, M. Synodinou, M. Puglisi and N. Throuvalas, "Prophylactic use of amifostine to prevent radiochemotherapy-induced mucositis and xerostomia in head-and-neck cancer," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 52(3), 739-747(2002)
3. D.M. Brizel, T.H. Wasserman, M. Henke, V. Strnad, V. Rudat, A. Monnier, F. Eschwege, J. Zhang, L. Russell, W. Oster and R. Sauer, "Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer," *J Clin Oncol*, 18(19), 3339-3345(2000)
4. D. Antonadou, N. Coliarakis, M. Synodinou, H. Athanassiou, A. Kouveli, C. Verigos, G. Georgakopoulos, K. Panoussaki, P. Karageorgis and N. Throuvalas, "Randomized phase III trial of radiation treatment +/- amifostine in patients with advanced-stage lung cancer," *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 51(4), 915-922(2001)
5. A. Brzezinski, "Melatonin in humans," *N Engl J Med*, 336(3), 186-195(1997)
6. M. Karbownik and R.J. Reiter, "Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation," *Proc Soc Exp Biol Med*, 225(1), 9-22(2000)
7. P. Lissoni, S. Pittalis, F. Brivio, E. Tisi, F. Rovelli, A. Ardizzoia, S. Barni, G. Tancini, G. Giudici and A. Biondi, "In vitro modulatory effects of interleukin-3 on macrophage activation induced by interleukin-2," *Cancer*, 71(6), 2076-2081(1993)
8. M.C. Caroleo, D. Frasca, G. Nistico and G. Doria, "Melatonin as immunomodulator in immunodeficient mice," *Immunopharmacology*, 23(2), 81-89(1992)
9. J. Pepping, "Melatonin," *Am J Health Syst Pharm*, 56(24), 2520-2527(1999)
10. H. Aso, F. Suzuki, T. Yamaguchi, Y. Hayashi, T. Ebina and N. Ishida, "Induction of interferon and activation of NK cells and

- macrophages in mice by oral administration of Ge-132, an organic germanium compound," *Microbiol Immunol*, 29(1), 65-74 (1985)
11. A.K. Abbas and A.H. Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*, 4th Ed., pp. 260-261, Saunders, Philadelphia(2000)
12. S. Goodman, "Therapeutic effects of organic germanium," *Med Hypotheses*, 26(3), 207-215(1998)
13. 아사이 가즈히코, 게르마늄과 나, pp. 255-258, 한국관광문화연구소(1997)
14. D.G. Jarrett, *Medical Management of Radiological Casualties*, 1st Ed., pp. 20-25, Armed Forces Radiobiology Research Institute, Bethesda(1999)