

방사선조사와 당뇨병이 백서 악하선의 caspase-3 발현에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
이흥기 · 황의환 · 이상래

Effect of irradiation on the expression of caspase-3 in the submandibular gland of streptozotocin-induced diabetic rats

Heung-Ki Lee, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee

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

ABSTRACT

Purpose : To observe the histopathological changes and caspase-3 expression in the submandibular gland in streptozotocin-induced diabetic rats after irradiation.

Materials and Methods : The male Sprague-Dawley rats weighing approximately 250 gm were divided into four groups: control, diabetes, irradiation, and diabetes-irradiation groups. Diabetes mellitus was induced in the rats by injecting streptozotocin. Rats in the control and irradiation groups were injected with citrate buffer only. After 5 days, rats in irradiation and diabetes-irradiation groups were irradiated with a single absorbed dose of 10 Gy to the head and neck region. All the rats were sacrificed at 3, 7, 14, 21, and 28 days after irradiation. The specimen including the submandibular gland were sectioned and observed using histopathological and immunohistochemical methods.

Results : In the irradiation group, the condensed nucleus, karyolysis, and degeneration of the acinar cells and atrophy of the duct cells were observed in the early experimental phase. However, the acinar cells were found to be normal at 28 days after irradiation. In the diabetes group, the condensed nucleus, karyolysis, atrophy, and degeneration of the acinar cells were observed in the early experimental phase. However, the acinar cells were found to be normal at 21 days after diabetic state induction. In the diabetes-irradiation group, the ductal epithelial cells were predominant in their glandular tissues at 28 days after irradiation. In all of the experimental groups, the most prominent change of the acinar cells and ductal cells were observed at 14 days after diabetic state induction and irradiation.

Conclusion : The expression of caspase-3 in the acinar cells and ductal cells of the submandibular gland was weak after irradiation, but that in the acinar cells, ductal cells, and fibrous cells of the submandibular gland was prominent after diabetic state induction. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2005; 35 : 147-56)

KEY WORDS : Cranial Irradiation; Diabetes Mellitus; Salivary Gland; Caspase-3

서 론

우리나라 전체 인구의 약 5%가 이환된 것으로 보고되고 있는 당뇨병은 인슐린 분비의 절대 감소나 인슐린의 생물학적 활성저하가 이의 기본 병변으로 알려져 있다. 당뇨병에 이환되는 경우 포도당대사의 장애로 인한 고혈당증은

세포대사를 변조시켜 케톤증, 산증, 백내장, 신질환, 심혈관 질환 등의 합병증을 야기시키는데,^{1,2} Siperstein 등³은 혈관 벽과 기저막의 비후가 관련되는 미세혈관병증으로 인한 다양한 증상과 징후의 발생을, Bagdade 등,⁴ Ray와 Orban⁵은 백혈구 이동의 감소로 인한 염증 악화와 결합조직 구조의 변화를, Mowat와 Baum⁶은 다형백혈구와 임파구 반응의 저하를 각각 보고하였다. 또한 구강 내에서도 치아우식증, 치은염의 악화, 치조골 소실, 칸디다증, 발치창 치유 지연 등이 발생되는데,⁷⁻⁹ Glickman 등¹⁰은 당뇨병에 의하여 감염과 혈액순환의 장애가 야기되고, 교원질 합성과 골모

접수일 : 2005년 5월 24일; 심사일 : 2005년 5월 25일; 채택일 : 2005년 6월 15일
Correspondence to : Prof. Sang-Rae Lee
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University 1 Hoigi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
(Tel) 82-2-958-9404, (Fax) 82-2-965-1256, (E-mail) sangrae@khu.ac.kr

세포의 발육 및 신생골 형성장애로 인하여 치주조직의 염증반응이 증가되며 손상치은의 치유가 지연된다고 하였으며, Lamey 등⁹은 중증 치주질환, 높은 치아우식율, 구강건조증, 미각이상, 진균이나 세균의 감염, 구강작열감증후군 등이 발생된다고 하였다. 타액선조직 내에서는 지방축적과 지방변성, 타액선조직의 위축, 자율신경계의 변성 및 선포세포의 괴사에 따른 결합조직으로의 대체 등이 야기되고 정상인에 비하여 타액단백농도는 증가되지만 타액분비능은 현저히 감소된다.¹¹⁻¹³

한편, 두경부 악성 종양의 방사선치료시에 타액선은 이의 해부학적 위치와 크기로 인하여 방사선조사야에 자주 포함되며, 방사선감수성이 비교적 높기 때문에,¹⁴ 타액선에서는 형태적 및 기능적인 변화가 야기된다. 치료선량의 방사선조사시에 타액선의 조직학적 변화로서는 선포세포 핵의 농축과 용해, 이의 위축으로 인한 분비과립의 감소, 세포질의 변성과 공포화, 섬유화, 염증세포 침윤 등이 보고되었다.¹⁵ 또한 타액선의 기능적 변화는 구조적 변화보다 먼저 발현되는데,¹⁶ 홍반선량이나 그 이상의 조사선량에서는 타액의 분비가 일시적으로 정지되어 가역적 또는 비가역적 기능장애의 징후인 구강건조증이 발생되며,^{17,18} 10 Gy의 총치료선량 조사 후 첫 주에는 심한 타액선기능의 감소가 나타나고,^{19,20} 타액의 수소이온 농도의 감소와 점조도의 증가로 인하여 다발성 치아우식증과 연하장애 등이 이차적으로 유발된다.^{21,22} Phillips²³는 백서 이하선에서 방사선으로 유발된 구조적 및 기능적 변화에 대하여 선포세포의 급성위축과 괴사, 선포세포의 비대와 정상과 유사한 정도로의 기능회복기, 선포세포의 재위축기로 나누었는데 Tolmach와 Busse²⁴는 세포회복은 세포주기 중 G2기의 어느 한 시점이 결정적인 역할을 하여 G2기가 길수록 세포회복이 많이 일어난다고 하였으며, McKenna 등²⁵은 DNA를 회복시키는 세포주기의 지연으로 인하여 G2/M기에 많은 세포가 축적된다고 하였다. 세포가 방사선을 조사받으면 일시적인 세포주기의 정지와 회복할 수 없는 DNA손상에 의한 세포사멸과 Kerr 등²⁶에 의하여 형태학적으로 처음 연구된 세포자사(apoptosis)가 일어날 수 있다.²⁷⁻²⁹

세포자사는 세포사멸의 한 과정으로서, 배아발생과 같은 다양한 생리상태에서 발생되며 조직의 개형은 물론 정상적인 조직의 발육, 퇴행성 조직과 결합이 있는 세포를 제거하는 등 정상적인 조직의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데,^{30,31} Stephens 등³²은 두경부 악성 종양의 방사선치료시에 방사선유발 세포자사가 급성 타액선 기능장애의 주된 원인이라고 하였으며, Gazda 등³³은 타액선기능의 급성장애가 장액선세포의 조기 세포자사에 의하여 일어난다고 보고하였다. 또한 Kawakami와 Eguchi³⁴는 세포자사의 유발시기에 시스테인(cysteine) 단백질분해효소군의 하나인 caspase가 형태학적 변화에 깊이 관여한다고 하였는데,

Simon과 Almeida³¹는 caspase의 단백질분해작용에 의하여 세포가 파괴되며, caspase-3가 세포자사의 초기 표지자(early marker)의 역할을 한다고 하였다. Martin과 Baehrecke³⁵는 사멸하는 타액선 세포들은 자가탐식공포(auto-phagic vacuole)를 함유하지만 caspase를 포함한 세포자사 유전자를 이용하는 것 같다고 보고한 바 있다.

이와 같이 방사선조사시 타액선에서 발생하는 선포세포에서의 변화는 조직학적으로 많은 연구가 이루어져 있으며, 최근에는 방사선유발 세포자사와 타액선 기능과의 관련성에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 또한 당뇨병은 caspase-3 활성화 섬유모세포의 수를 증가시켜서 세균에 의하여 유발된 결합조직 손실에 대한 치유반응을 저해함으로써,³⁶ 당뇨병에 이환될 경우 치주조직에서의 변화는 물론 타액선에서의 변화를 면역조직화학적으로 구명하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 따라서 이 연구에서는 streptozotocin (STZ)을 이용하여 실험적으로 당뇨병을 유발시킨 백서의 두경부에 방사선을 조사한 후, 일정시간 경과 후에 타액선조직을 조직학적으로, 그리고 caspase-3의 발현 양상을 면역조직화학적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

동일한 조건하에 사육된 체중 250 gm 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 백서 32마리를 실험동물로 선택하였으며, 이들을 실험목적에 따라 대조군, 당뇨병군, 방사선조사군, 당뇨유발 방사선조사군으로 각각 나누었다.

2. 실험방법

1) 당뇨병 유발

실험에 사용된 당뇨병 유발물질은 STZ (Sigma Chemical Co., U.S.A.)으로, 이를 구연산 완충용액으로 희석하여 pH 4.5의 STZ으로 조제한 후, 45 mg/kg의 용량으로 당뇨병군과 당뇨병 및 방사선조사군 백서의 꼬리정맥에 주사하였고, 대조군과 방사선조사군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다. 또한 당뇨병의 유발을 확인하기 위하여 STZ 주사 후 매일 정시에 채혈하여, 이를 혈당측정용 테이프(ONE TOUCH Code 7, Johnson & Johnson Co., USA)와 혈당측정용 기기(ONE TOUCH II, Johnson & Johnson Co., USA)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 대조군과 방사선조사군은 평균 혈당치가 혈액 100 ml 당 125 mg으로 측정되었으나, 당뇨병군과 당뇨유발 방사선조사군 백서에서는 STZ 주사 후 5일 후의 평균 혈당치가 혈액 100 ml 당 320 mg으로 측정되어 당뇨가 유발되었고, 이후에도 실험 전 기간에 걸쳐 당뇨 상태가 지속되었음을 확인하였다.

2) 방사선조사

방사선조사군과 당뇨병 유발이 확인된 당뇨유발 방사선 조사군은 실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 체중 100 gm 당 0.02 ml로 근육주사하여 전신마취시켰으며, 특별히 고안된 방사선조사대에 두경부와 사지를 고정시킨 다음, Co-60 심부치료기 (Theratron 780, Atomic Energy of Canada Ltd., Canada)를 이용하여 방사선원과 피부간 거리 70 cm, 선량률 48.24 cGy/min으로 10 Gy의 흡수 선량이 되도록 두경부에 1회 조사시켰다.

3) 실험동물의 희생 및 관찰

각군의 실험동물들을 당뇨유발 및 방사선조사 후 3, 7, 14, 21, 28일에 관류고정하여 희생시킨 다음, 악하선을 적출하였다. 적출된 악하선을 드라이 아이스에서 급속 냉동시켜 보관한 후, O.C.T compound (PolyfreezeTM, Polysciences, Inc., USA)에 포매하고, 동결조직절편기 (Leica, Germany)를 이용하여 20 μ m의 두께로 절편을 제작한 후, toluidine blue 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적으로 caspase-3의 발현을 관찰하기 위하여 paraffin 포매 조직을 4-8 μ m 두께의 조직절편으로 만들어 양이온으로 도포된 RNA-free slide에 위치시킨 후, 99.9% alcohol과 acetone에 10분간 고정하였다. 고정 후, 절편을 0.01 M Tris buffered saline (TBS pH 7.4 \pm 0.05, Tris 0.05 M, NaCl 0.15 M, Lab Vision Corp., USA)용액에 3번 수세한 다음, 실온에서 3% H₂O₂를 함유한 methanol에 10분간 처리하고 증류수로 3번 수세하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위하여 염소의 정상 혈청으로 20분간 처리한 후, 농축된 시약 (PBS with carrier protein and 0.09% sodium azide)으로 희석시킨 anti-caspase-3 (H-277; Santa Cruz Biotechnology, USA)에 실온에서 2시간 흡입시키고, TBS 용액으로 수세하였다. 조직절편을 biotinylated goat-anti

rabbit immunoglobulin (Vector Laboratories, USA)에 상온에서 40분간 유지시킨 후, TBS 용액으로 수세하였다. 조직절편을 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit, Vector Laboratories, USA)에 40분간 작용시킨 후 TBS 용액으로 수세하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC kit; Vector Lab., USA)용액을 이용한 발색 반응을 유발시켜 면역반응을 확인하였다.

결 과

1. 대조군 소견

장액선 선포세포들은 대체로 피라밋 모양을 하고 그 첨단이 중앙에 있는 내강으로 향하여 있었으며, 핵은 둥글고 세포의 기저측 1/3에 위치하였다. 또한 선포세포 내의 가장자리로 핵이 뚜렷하게 위치하고 있었으며, 원주형의 세포가 관을 이루고 있는 도관을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1).

2. 당뇨유발군 소견

당뇨유발 3일에 장액선 선포세포에서 핵농축 현상이 관찰되었고, 도관세포에서는 구조 변화가 관찰되지 않았으나, 도관조직 일부에서 caspase-3에 중등도로 반응하는 소견이 있었다. 당뇨유발 7일에는 장액선 선포세포가 전반적으로 위축되었으며, 선포세포의 핵농축 현상이 심화되었고, 핵용해 현상도 관찰되었다. 도관조직에서는 일부에서 caspase-3에 중등도로 반응하는 도관세포가 관찰되었으며, 전반적으로 위축된 소견이 있었다. 당뇨유발 14일에는 장액선 선포세포가 전반적으로 변성되어 불분명한 세포 경계를 보였고, 핵용해 현상과 변성이 관찰되었으며, 도관조직도 전반적으로 매우 위축된 소견이 있었다. 한편 점액선 선포조직에서는 부분적으로 caspase-3에 양성 반응을 보이는 선포

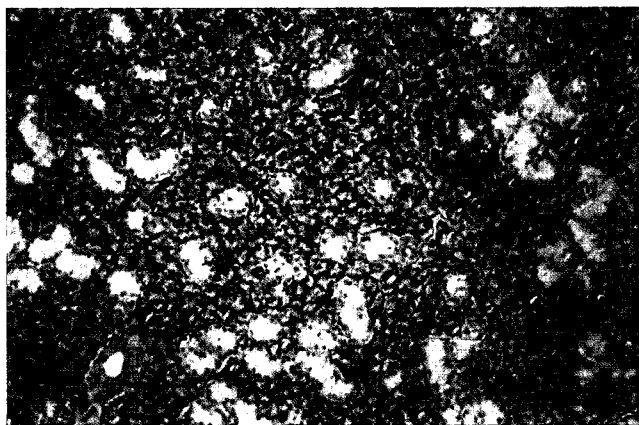


Fig. 1. Photomicrograph showing normal serous cells of the submandibular glands (toluidine blue staining, original magnification \times 40).

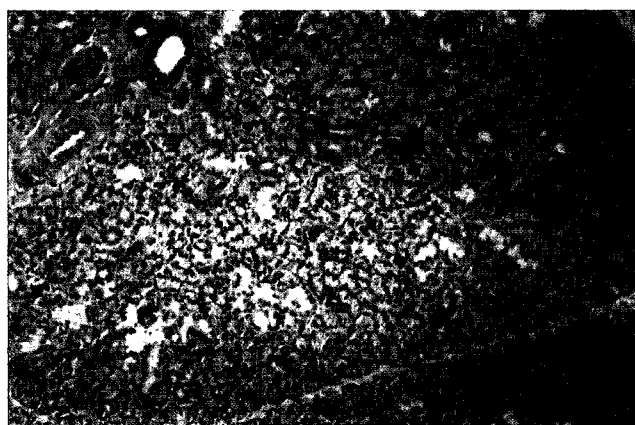


Fig. 2. Photomicrograph showing slight positive reaction to the caspase-3 on the ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification \times 40).



Fig. 3. Photomicrograph showing positive reaction to the caspase-3 on the serous cells and ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

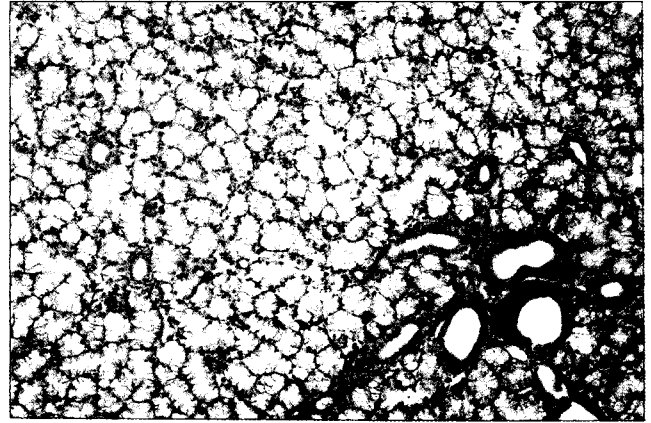


Fig. 4. Photomicrograph showing regenerated functional mucous cells and positive reaction to the caspase-3 on the ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

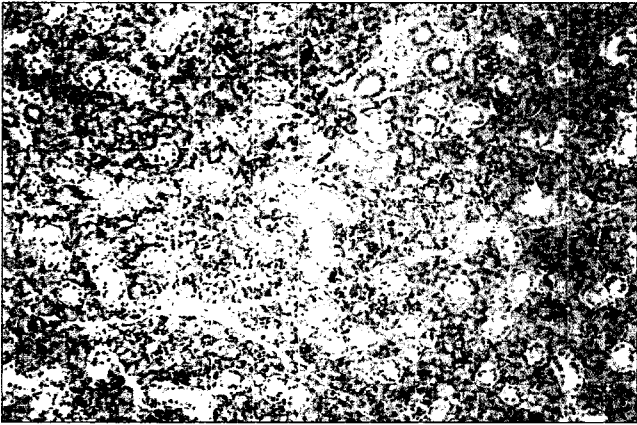


Fig. 5. Photomicrograph showing many regenerated serous cells with a few of degenerative cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

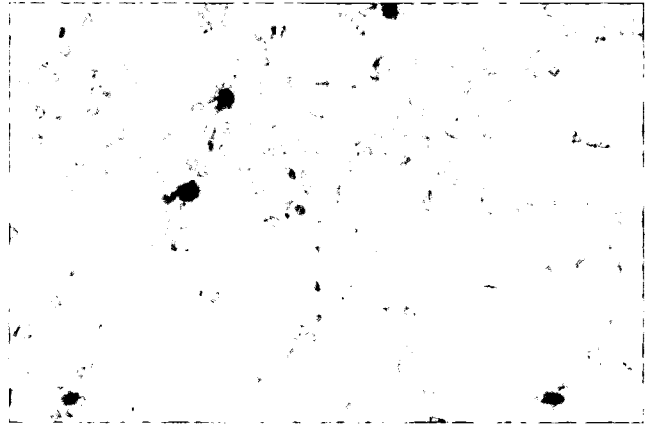


Fig. 6. Photomicrograph showing strong positive reaction to the caspase-3 on the fibroblasts between mucosal acini cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

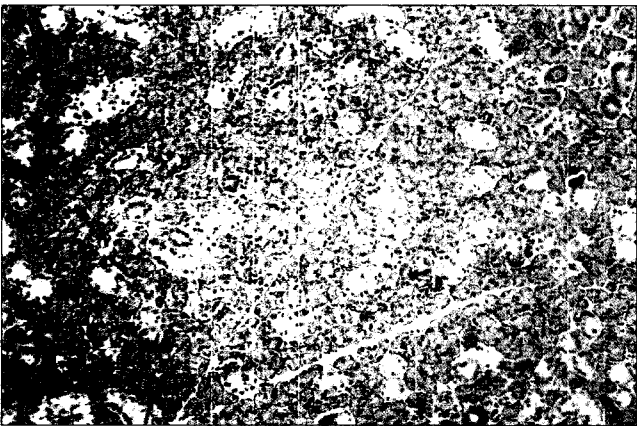


Fig. 7. Photomicrograph showing very slight reaction to the caspase-3 on the ductal cells and degenerative change on the serous cells and ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

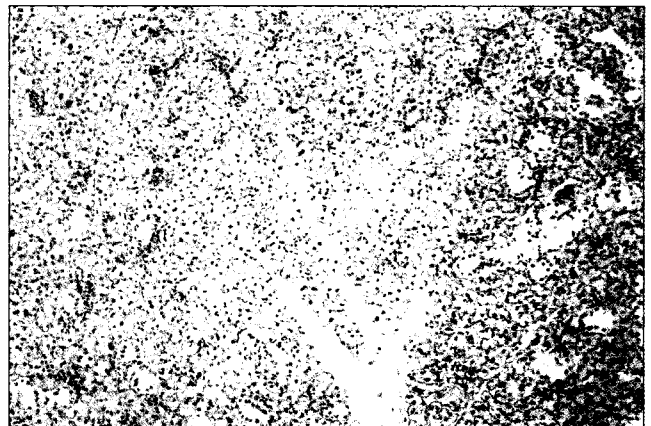


Fig. 8. Photomicrograph showing remarkable degenerative changes on the both of acini and ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

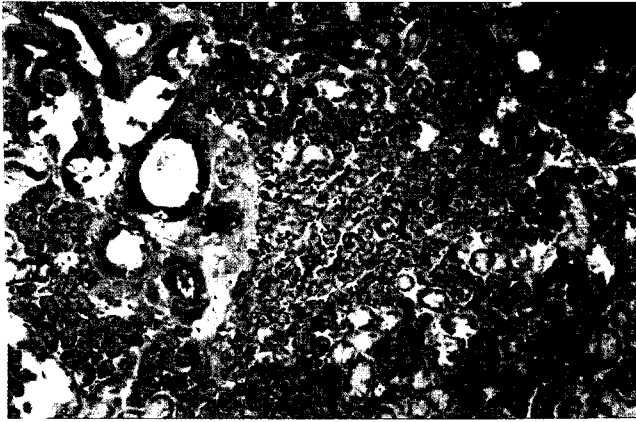


Fig. 9. Photomicrograph showing severe degenerative changes on the acini and ductal cells and even on the interlobular fibrous tissues (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

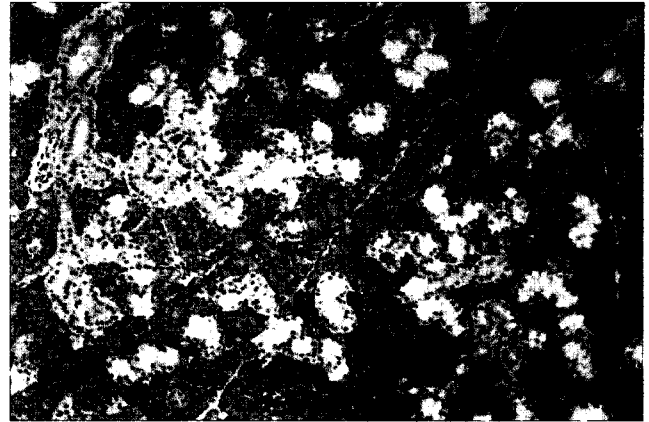


Fig.10. Photomicrograph showing regenerated serous acini cells and shows negative reaction to the caspase-3 on the serous salivary gland tissues (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

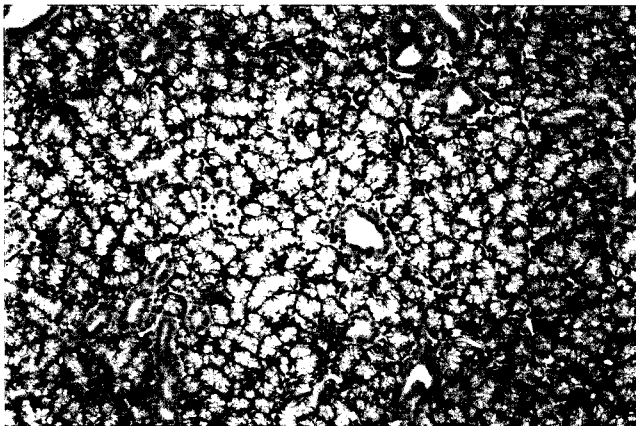


Fig.11. Photomicrograph showing regenerated mucous acini cells and shows negative reaction to the caspase-3 on the mucous salivary gland tissues (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

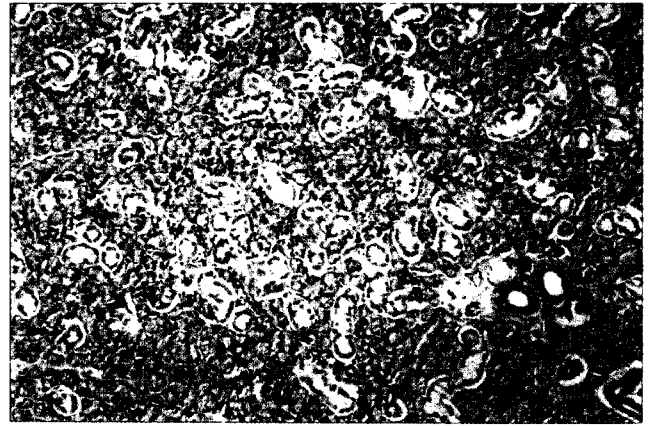


Fig.12. Photomicrograph showing severe atrophic changes on the ductal cells and slight reaction to the caspase-3 on a part of the ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 40$).

세포가 관찰되었으며, 선포세포도 다소 위축된 소견을 보였다. 당뇨유발 21일에는 장액선 선포조직에서 새로 분화되어 증식되는 작은 크기의 선포세포와 도관세포가 관찰되었으며, 작은 단위의 선엽으로 이루어진 경계가 분명하고 건강한 선포세포가 형성되는 소견도 보였다. 한편 점액선조직에서는 선포세포가 매우 건강한 기능적 형태로 회복되고 있었으나, 일부 도관세포에서는 caspase-3에 미약한 양성 반응을 보이고 있었다. 당뇨유발 28일의 장액선 선포세포에서는 농축되고 용해된 핵이 부분적으로 관찰되었으나, 대부분 건강한 기능 선포의 형태로 회복되었고, 점액선 선포조직은 거의 정상으로 회복되어 매우 건강한 기능적 형태를 보였으며, 선포간 조직에서 caspase-3에 강하게 반응하는 섬유세포를 다수 관찰할 수 있었다(Figs. 2-6).

3. 방사선조사군 소견

방사선조사 3일에 장액선 선포세포와 도관세포에서는 모두 핵농축 현상이 관찰되었고, 도관조직은 다소 위축되었으며, 선조직 전반에 걸쳐 caspase-3에 매우 미약한 반응을 보였다. 방사선조사 7일에는 장액선 선포세포가 전반적으로 위축되었으며, 핵농축 현상이 심화되었고, 핵용해 현상이 관찰되었으며, 도관조직은 더욱 위축되었고, caspase-3에 매우 미약한 양성 반응을 보였다. 방사선조사 14일에는 장액선 선포세포의 농축된 핵잔사가 전반적으로 관찰되었으며, 도관조직도 심하게 변성된 것이 관찰되었다. 방사선조사 21일에는 장액선 선포조직에서 새로 분화되어 증식되는 작은 크기의 선포세포와 도관세포가 관찰되었으며, 경계가 분명하지는 않으나 작은 단위의 선엽을 형성하는

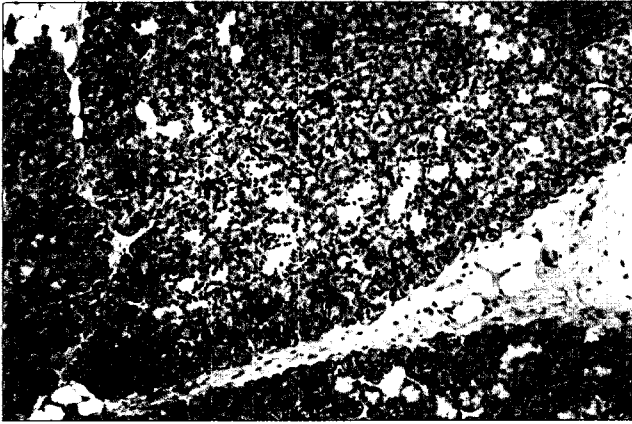


Fig. 13. Photomicrograph showing severe degenerative and atrophic changes on the acini and ductal cells and even on the interlobular fibrous tissues (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 100$).

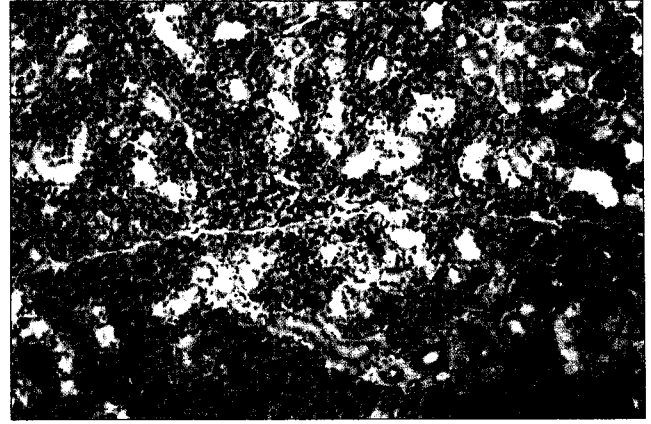


Fig. 14. Photomicrograph showing many regenerated irregular acini cells and moderate positive reaction to the caspase-3 on the ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 100$).

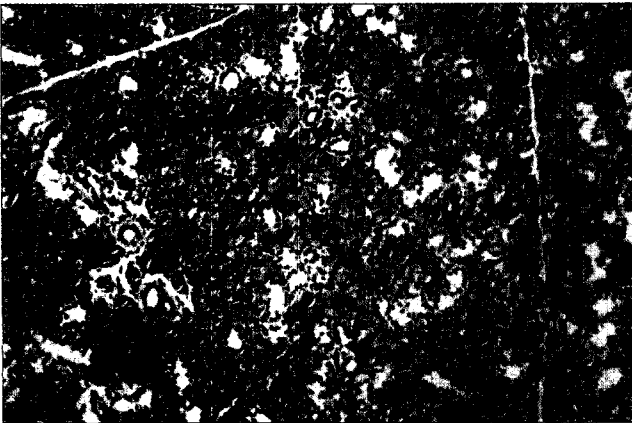


Fig. 15. Photomicrograph showing the regenerative small acini and ductal cells (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 100$).

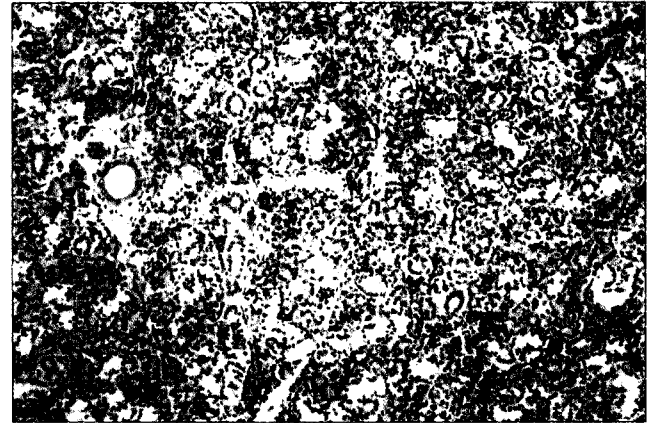


Fig. 16. Photomicrograph showing the regenerative small cells and ductal epithelial cell components on the salivary gland tissues (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 100$).

소견이 있었다. 방사선조사 28일에는 장액선 선포조직의 대부분이 건강한 기능 선포의 형태로 회복되었다. 그러나 실험 전 기간에 걸쳐 장액선조직과 점액선조직 모두에서 caspase-3에 대한 양성 반응이 실험 초기에 매우 미약하였고, 그 후에는 관찰되지 않았다(Figs. 7-11).

4. 당뇨유발 방사선조사군 소견

당뇨유발 방사선조사 3일에는 장액선 선포세포에서 핵농축 현상이 관찰되었고, 도관조직도 매우 위축되었으며, caspase-3에는 부분적으로 미약한 양성 반응을 보였다. 당뇨유발 방사선조사 7일에는 장액선 선포세포에서 핵농축 현상이 심화되었고, 핵용해 현상도 관찰되었으며, 선포세포들이 전반적으로 위축되어 있었다. 도관조직에서는 일부에

서 caspase-3에 미약하게 양성 반응을 하는 도관세포가 관찰되었으며, 전반적으로 위축된 소견이 보였고, 선엽간 섬유결합조직도 변성되어 있었다. 당뇨유발 방사선조사 14일에는 장액선 선포조직 내에 새로 증식되는 다수의 선포세포는 매우 불규칙하였고, caspase-3에 중등도의 양성 반응을 보이는 도관조직이 관찰되었다. 당뇨유발 방사선조사 21일에는 장액선 선포조직에서 새로 분화되어 증식되는 작은 크기의 선포세포와 도관세포가 관찰되었으며, 점액선조직은 선포세포가 건강한 기능적 형태로 회복되었으나, 일부 도관조직은 caspase-3에 미약한 양성 반응을 보이고 있었다. 당뇨유발 방사선조사 28일에는 장액선 선포조직에서 새로 분화되고 증식되는 세포들이 관찰되었으나, 선포조직의 대부분이 도관 상피성분으로 대체되어 있었다(Figs. 12-16).

고 찰

장기간 지속되는 당뇨병이 타액선 기능에 미치는 영향은 선포세포의 대사변조와 자율신경병증과 같은 종말기관의 이상이 원인이 되어 발현되며,³⁷ 방사선조사도 DNA 등의 핵내 구조와 분열기관의 손상을 일으켜 타액선의 일시적인 세포주기의 정지나 세포사를 야기시키기도 한다.^{38,39} 이 실험에서는 당뇨유발 백서 타액선에 방사선이 미치는 영향을 관찰하였는데, 당뇨 유발을 위하여서는 체장의 인슐린 분비 기능은 정상으로 유지시키지만 포도당에 대한 인슐린의 역할을 높여서 당뇨병을 유발시키는 STZ⁴⁰를 이용하였으며, 방사선조사는 타액분비능을 심하게 저하시키는 방사선량으로 알려진 10 Gy^{20,41}를 두경부에 1회 조사하였다. 당뇨병에 이환되는 경우, Cutler 등¹²은 분비단백 축적으로 인하여 선포세포의 퇴행성변화가 야기됨으로 세포사가 일어나고 선포세포는 결합조직으로 대체된다고 하였으며, Mori 등⁴²은 당뇨병에 의하여 야기된 대사장애로부터 세포 내에 지방이 축적된 결과 지방소적이 당뇨백서에서 관찰된다고 하였다. 또한 당뇨병 유발시에 타액선의 선포조직과 도관 주위의 혈관의 변화에 대한 보고가 활발하다. Garrett 등⁴³은 STZ로 유발된 당뇨백서 타액선의 모세혈관벽에서 결합친화력이 있는 GSAI-B4 (*Griffonia simplicifolia* isolectin)의 강염은 모세혈관의 병변이 있다는 것을 시사한다고 하였으며, Rohrbach와 Martin⁴⁴은 기저막의 두께증가는 diabetic membranopathy의 지표가 된다고 하였는데, Vracko⁴⁵는 당뇨환자의 근육 모세혈관들에서 기저막이 비후된다고 하였다. Iakovou 등⁴⁶은 당뇨환자에서는 덧대(stent)시술 후 재발혈착증의 위험성이 높다고 보고 한 바 있다.

또한 타액선을 포함한 조직과 기관에서 일어나는 세포사는 조직의 항상성과 노화 측면에서는 물론 발육 중에도 정상적으로 발생되는데,⁴⁶ 세포사에는 세포괴사와 예정된 세포사(programmed cell death)가 있다. 예정된 세포사는 형태학적 기준에 따라 세포자사와 자가포식성 세포사 등으로 분류된다.⁴⁷ 이 중 세포자사는 각종 유전자의 발현, RNA, 단백질 합성과도 관련되며,³¹ TGF- β (transforming growth factor- β), 종양괴사물질, 항암제, 방사선, 당뇨병 등에 의하여 발생된다.^{48,49} 이들 세포자사는 정상적인 조직의 발육, 조직의 개형, 퇴행성 조직, 비정상세포를 제거하여 정상적인 조직의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다.³⁴ 세포자사가 일어난 세포는 핵과 세포질이 농축되고, 분절되며 막에 둘러싸인 세포자사체를 형성하는데 이들 세포는 대식세포나 인접세포에 의하여 급속하게 포식된다.³¹ 이와 같이 세포자사는 생체기관에 중대한 손상이 없이 세포잔사를 제거하는데, 세포자사 조절의 실패로 인한 세포생존과 세포자사의 불균형이 이루어지면 악성 종양, 퇴행성 질환,

자가면역질환 등이 유발된다.^{31,34,35} 따라서 세포자사는 세포증식과 관련됨으로, 상대적으로 세포자사율이 낮으면 조직증식의 장애가, 반면에 세포자사의 비율이 높으면 조직의 위축성, 퇴행성 장애가 유발된다.³⁴ 한편, 세포자사의 실행시에 결정적인 역할을 하는 caspase는 시스테인 단백질 분해효소군의 하나로서 pro-caspase으로 불리우는 불활성 전구물질로 세포 내에 존재한다.^{31,34} caspase-8, -9과 같은 caspase 기시체는 caspase-3, -7과 같은 caspase 효과체를 직접 또는 간접적으로 활성화시키기 때문에,³⁴ 결과적으로 caspase의 단백질 분해 작용은 세포를 파괴시키는데 caspase-3는 사람세포에서 세포자사의 초기 표지자가 된다.³¹ 이와 같이 타액선의 선포세포 및 도관세포에서의 세포자사는 Sjögrene 증후군에서 타액선 분비능 상실의 주요기전의 하나로,⁵⁰⁻⁵² 이 증후군의 면역치료법을 개발하기 위해서는 이들 세포의 세포자사를 조절하는 분자간 상호작용의 구명이 필요하다고 생각된다.

이 실험의 당뇨유발군에서는 실험 14일에 타액선 선포세포와 도관세포에서 현저한 핵의 농축과 용해, 세포의 변성과 불분명한 형태가 관찰되었으며 caspase-3에는 실험 초기에 중등도의 양성반응을 보였으나, 실험 21일 이후에는 선포세포와 도관세포가 건강한 기능적 형태로 회복되었다. 그러나 점액선 선포세포는 장액선 선포세포에 비하여 조직의 변화가 늦게 발현되었지만 빠르게 기능적 형태로 회복되었으며, 실험 28일에는 선포간 조직에서 caspase-3의 강한 양성반응이 관찰되었다. 이러한 실험 결과는 당뇨유발 14일 이전에 타액의 분비장애가 유발되며 타액의 기능장애는 실험 14일 이후에 발생된다는 Cutler 등,¹² Anderson 등,⁵³과 이 등⁵⁴의 보고에서도 추정이 가능하다고 생각된다. 또한 장액선 선포세포와 점액선 선포세포간의 조직학적 소견의 차이는 당뇨병이 점액선보다는 장액선에 미치는 영향이 크다는 것을 시사해 주는 것으로 판단된다. 그리고 caspase-3에 대한 반응으로서, 장액선 선포세포에서는 실험 기간 동안 거의 양성 반응을 보이지 않았으나 도관세포에서는 실험초기에는 강한 양성 반응을 보이다가 이 이후에는 반응이 관찰되지 않았다. 이들 결과는 당뇨병에 의하여 장액선 선포세포는 대부분이 파괴되었으나 선포세포에 비하여 내성이 강한 것으로 추정되는^{36,55,56} 도관세포에서는 실험 초기에는 세포자사가 비교적 활발하게 일어나서 타액의 분비기능장애를 유발하였다고 판단되며 당뇨병에 의한 타액선 조직의 세포사는 주로 세포자사에 의해 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

또한 방사선은 타액선의 형태적 및 기능적인 장애를 유발시키는데, 방사선에 의한 타액선 조직의 변화는 조사선량과 조사방법에 의하여 차이가 있다. Santagelo와 Toto¹⁶는 타액선 선포세포의 핵 농축과 세포질 내의 과립 감소, 선포세포의 위축과 공포화, 섬유화 등이 발생된다고 하였으며, Friedrich 등⁵⁷은 방사선조사로 인하여 백서 악하선의

기능이 상실되며 섬유화가 야기되는데 정상 악하선에 비하여 분비도관, 피막, 중격 등에서는 collagen I의 분포가 총 방사선량이 20 Gy 이상에서 균일하지 못하다고 하였다. Kashima 등⁵⁸은 1,000 R을 인체에 1회 조사하면, 악하선의 점액선 선포세포에서는 조직변화상은 없으나, 장액선 선포세포에서는 퇴행성 변화가 유발된다고 하였으며, Stephens 등⁵⁹은 가토 타액선중 선포세포, 곡세관과 직세관, 엽외조직과 엽간조직의 순으로 방사선감수성이 높다고 하였고, Olive 등⁶⁰은 2.5-15 Gy, Zhivotovsky 등⁶¹과 Lennon 등⁶²은 1-10 Gy의 방사선량에서는 세포자사가 유발된다고 하였다. 방사선조사에 의한 세포자사의 정도는 DNA손상과 이 손상에 대한 세포의 반응에 따라 다르며,⁶³ Rich 등⁶⁴은 손상이 심하여 회복이 될 수 없는 세포에서는 세포자사가 시작된다고 보고한 바 있다. 이 실험의 방사선조사군에서는 실험 14일에 장액선 선포세포는 전반적으로 심하게 위축되면서 선포세포의 농축된 핵 잔사들이 있었으며, 도관세포도 현저히 위축되고 도관주위의 결합조직도 심하게 변성되었으나, 실험 28일에는 타액선 선포세포와 도관세포들이 대부분 건강한 기능세포로 회복되는 조직학적 소견을 보였는데 이 결과는 선학들의 연구보고들^{65,66}과도 비교적 일치되는 것으로 생각된다. 또한 타액선 조직들에서는 실험 초기에만 caspase-3에 매우 미약한 양성 반응이 있었으나 이 이후에는 반응이 없었으며 당뇨병유발군에 비하여 차이가 있었다. 이 결과는 당뇨병유발군에 비하여 방사선조사군에서는 세포자사율이 낮은 것을 시사하는 것으로, 10 Gy의 방사선량에서는 세포자사보다는 방사선의 간접작용과 직접작용에 의해서 세포의 괴사가 활발하게 일어난 것이 하나의 원인이 된 것으로 추정된다.

한편 이 실험의 당뇨병유발 방사선조사군에서 실험 14일에는 장액선 선포조직내의 신생 선포조직은 매우 불규칙하였고 도관조직에서는 caspase-3에 중등도의 양성 반응이 있었으나, 실험 21일 이후 caspase-3에 대한 반응은 극히 미미하였다. 실험 28일에 장액선 선포세포는 건강한 기능선포의 형태로 점차 회복되었으며, 도관조직은 대부분 비기능적인 상피성분으로 대체되었다. 실험 전반기에서 당뇨병유발 방사선조사군과 방사선조사군의 장액선 선포세포와 도관세포의 조직학적 변화는 유사하였으나 당뇨병유발군에서의 변화보다는 심하였으며, 도관세포에서 caspase-3에 대한 양성 반응도 방사선조사군에서의 양성 반응과 비슷한 경향을 보였다. 이러한 실험 결과는 실험 전반기에는 방사선이 당뇨병에 비하여 더 큰 영향을 미쳤으며, 실험기일이 경과됨에 따라 당뇨병에 대한 내성 획득의 영향도 있었을 것으로 추정할 수 있다.

고령화 사회로의 전환과 식생활 등의 변화에 의한 당뇨병의 이환율이 점차 높아지고, 악성 종양의 방사선치료 환자도 점점증하고 있는데, 당뇨병과 방사선이 각각 타액선의 형태적 및 기능적인 장애를 유발하는 것은 잘 알려져 있

다. 그러나 당뇨 유병자에서 악성 종양의 방사선치료시 구강과 타액선의 변화는 많은 임상적으로 의의가 있다고 판단되지만 이에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 향후 당뇨병 유발 상태에서 방사선조사선량에 의한 타액선의 형태와 기능의 변화를 상세하게 구명하기 위하여는 방사선조사선량을 다양하게 변화시킨 후, 세포자사와 기시체 및 효과체 caspase들을 이용한 연구도 체계적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Gabbay KH, O'Sullivan JB. The sorbitol pathway. Enzyme localization and content in normal and diabetic nerve and cord. *Diabetes* 1968; 17 : 239-43.
- Siperstein MD. The glucose tolerance test: a pitfall in the diagnosis of diabetes mellitus. *Adv Int Med* 1975; 20 : 297-323.
- Siperstein MD, Unger RH, Madison LL. Studies of muscle capillary basement membranes in normal subjects, diabetic, and prediabetic patients. *J Clin Invest* 1968; 47 : 1973-99.
- Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974; 23 : 9-15.
- Ray HG, Orban B. The gingival structures in diabetes mellitus. *J Periodontal Res* 1950; 21 : 85-95.
- Mowat A, Baum J. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971; 284 : 621-7.
- Ringelberg ML, Dixon DO, Francis AO, Plummer RW. Comparison of gingival health and crevicular fluid flow in children with and without diabetes. *J Dental Res* 1977; 56 : 108-11.
- 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.
- Lamey PJ, Darwazeh AMG, Frier BM. Oral disorders associated with diabetes mellitus. *Diabet Med* 1992; 9 : 410-6.
- Glickman I, Smulow JB, Moreau J. Postsurgical periodontal healing in alloxan diabetes. *J Periodontol* 1967; 38 : 93-9.
- Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am J Physiol* 1983; 245 : 431-7.
- Cutler LS, Pinney HE, Christian C, Russotto SB. Ultrastructural studies of the rat submandibular gland in streptozotocin induced diabetes mellitus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1979; 382 : 301-11.
- Mata AD, Marques D, Rocha S, Rranisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* 2004; 261 : 137-42.
- 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.
- Kaplan P. Mantle irradiation of the major salivary glands. *J Prothet Dent* 1985; 54 : 681-6.
- Santangelo MV, Toto PD. Radiation effects on mouse submandibular gland. *J Dent Res* 1965; 44 : 1291-8.
- 足立 忠. 放射線醫學. 第7版. 東京: 醫學書院; 1977. p. 169.
- Takinami S. Studies on the effect of irradiation in the salivary glands; relationship between xerostomia and secretory function of exposed

- salivary glands. *Dent Radiol* 1988; 28 : 17-32.
19. Cheng VST, Downs J, Herbert D, Aramany M. The function of the parotid gland following radiation therapy for head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981; 7 : 253-8.
 20. 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.
 21. Van den Brenk HA, Hurley RA, Gomez C, Richter W. Serum amylase as a measure of salivary gland radiation damage. *Br J Radiol* 1969; 42 : 688-700.
 22. Elzay RP, Levitt SH, Sweeney WT. Histologic effect of fractionated doses of selectively applied megavoltage irradiation on the major salivary glands of the albino rat. *Radiology* 1969; 93 : 146-52.
 23. Phillips RM. X-ray-induced changes in function and structure of the rat parotid gland. *J Oral Surg* 1970; 28 : 432-7.
 24. Tolmach LJ, Busse PM. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. IV. Progression delays and enhanced cell killing at high caffeine concentrations. *Radiat Res* 1980; 82 : 374-92.
 25. Mckenna WG, Iliakis G, Weiss MC, Bernhard EJ, Muschel RJ. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and V-myc. *Radiat Res* 1991; 125 : 283-7.
 26. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 : 239-57.
 27. Hendry JH, Potten CS. Intestinal cell radiosensitivity: a comparison for cell death assayed by apoptosis or by a loss of clonogenicity. *Int J Radiat Biol* 1982; 42 : 621-8.
 28. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267 : 1445-9.
 29. Martin SJ, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 18 : 137-53.
 30. Aiko K, Tsujisawa T, Koseki T, Hashimoto S, Morimoto Y, Amagasa T, et al. Involvement of cytochrome c and caspase in apoptotic cell death of human submandibular gland ductal cells induced by concanamycin A. *Cell Signal* 2002; 14 : 717-22.
 31. Simon CR, de Almeida JC. Programmed cell death in *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae) salivary glands presents apoptotic features. *Genesis* 2004; 40 : 22-31.
 32. Stephens LC, Schultheiss TE, Price TE, Ang KK, Peters LJ. Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer* 1991; 67 : 1539-43.
 33. Gazda MJ, Schultheiss TE, Stephens LC, Ang KK, Peters LJ. The relationship between apoptosis and atrophy in the irradiated lacrimal gland. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24 : 693-7.
 34. Kawakami A, Eguchi K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune disease. *Med Electron Microsc* 2002; 35 : 1-8.
 35. Martin DN, Baehrecke EH. Caspase function in autophagic programmed cell death in *Drosophila*. *Development* 2004; 131 : 275-84.
 36. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology* 2004; 145 : 2997-3003.
 37. Anderson LC, Garrett JR, Suleiman AH, Chan KM. Secretory oedema in diabetic submandibular glands during parasympathetic nerve stimulation: relationship to microvascular abnormalities in streptozotocin-treated rats. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol* 1992; 103 : 145-9.
 38. Beumer J, Brady F. Dental management of the irradiated patient. *Int J Oral Surg* 1978; 7 : 208-20.
 39. Yamold J. Molecular aspect of cellular responses to radiotherapy. *Radiother Oncol* 1997; 44 : 1-7.
 40. Ferner RE. Drug-induced diabetes. *Baillieres Clin Endocrinol Metabol* 1992; 6 : 849-66.
 41. Valdez IH. Radiation-induced salivary dysfunction: clinical course and significance. *Spec Care Dent* 1991; 11 : 252-5.
 42. 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.
 43. Garrett JR, Winston DC, Proctor GB, Schulte BA, Anderson LC. Changes in the lectin-binding of capillaries in rat salivary glands after streptozotocin-induced diabetes. *Arch Oral Biol* 1992; 37 : 759-61.
 44. Rohrbach DH, Martin GR. Structure of basement membrane in normal and diabetic tissue. *Ann NY Acad Sci* 1982; 401 : 203-11.
 45. Vracko R. Effects of aging and diabetes on basal lamina thickness of six cell types. In: Kefalides N. *Biology and chemistry of basement membranes*. New York: Academic Press; 1978. p. 483-93.
 46. Iakovou I, Mehran R, Dangas G, Lansky AJ, Stone GW, Mints GS, et al. Favorable effect of γ -radiation for in-stent restenosis: Effect of diabetes on angiographic and clinical outcomes. *Catheter Cardiovasc Interv* 2004; 62 : 303-7.
 47. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397 : 441-6.
 48. Afanas'ev VN, Korol' BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechtnikov VA, Umansky SR. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* 1986; 194 : 347-50.
 49. Bertrand R, Kerrigan D, Sarang M, Pommier Y. Cell death induced by topoisomerase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1991; 42 : 77-85.
 50. Kong L, Ogawa N, Nakabayashi T, Liu GT, D'Souza E, McGuff HS, et al. Fas and Fas ligand expression in the salivary glands of patients with primary Sjögren syndrome. *Arthritis Rheum* 1997; 40 : 87-97.
 51. Managanelli P, Quaini F, Andreoli AM, Lagrasta C, Pilato FP, et al. Quantitative analysis of apoptosis and bcl-2 in Sjögren syndrome. *J Rheumatol* 1997; 24 : 1552-7.
 52. Nakamura H, Koji T, Tominaga M, Kawakami A, Migita K, Kawabe Y, et al. Apoptosis in labial salivary glands from Sjögren syndrome (SS) patients: comparison with human T lymphotropic virus-I (HTLV-I)-seronegative and seropositive SS patients. *Clin Exp Immunol* 1998; 114 : 106-12.
 53. 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.
 54. 이승현, 황의환, 이상래. 방사선조사가 당뇨 백서의 약하선 선포세포에 미치는 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2003; 33 : 161-70.
 55. Cherry CP, Glucksman A. Injury and repair following irradiation of salivary glands in male rats. *Br J Radiol* 1959; 32 : 596-608.
 56. Pratt NE, Sodicoff M. Ultrastructural injury following x-irradiation of rat parotid glandular acinar cells. *Arch Oral Biol* 1972; 17 : 1177-86.
 57. Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Roser K, Lautenschlager C. The expression pattern of collagen I in irradiated mandibular salivary glands of rats. *Anticancer Res* 2003; 23 : 927-30.
 58. Kashima HK, Kirkham WR, Andrews JR. Postirradiation sialadenitis: study of the clinical features, histopathologic changes and serum enzyme variations following irradiation of human salivary glands.

- Am J Roentgenol 1965; 94 : 271-91.
59. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, King GK, Brock WA, Peters LJ. Target cell and mode of radiation injury in rhesus salivary glands. *Radiother Oncol* 1986; 7 : 165-74.
60. Olive PL, Frazer G, Banath JP. Radiation induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993; 136 : 130-6.
61. Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Exp Cell Res* 1999; 248 : 10-7.
62. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991; 24 : 203-14.
63. Zhao H, Spitz MR, Tomlinson GE, Zhang H, Minna JD, Wu X. Gamma-radiation-induced G2 delay, apoptosis, and p53 response as potential susceptibility markers for lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61 : 7819-24.
64. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407 : 777-83.
65. 이규찬, 이상래. 방사선조사가 백서 이하선에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 1986; 16 : 41-8.
66. 최원재, 이상래. 방사선조사가 타액선 도관세포에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. *대한구강악안면방사선학회지* 1988; 18 : 137-47.