

방사선 조사선량에 따른 백서 악하선의 caspase-3 발현양상

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실

*전북대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실 및 구강생체과학연구소

권기정 · 최용석 · 황의환 · 이상래 · 고헌준*

Effect of radiation dose variation on expression of caspase-3 in rat submandibular glands

Ki-Jeong Kwon, Yong-Suk Choi, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee, Kwang-Joon Koh*

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

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, and Institute of Oral Bio Science, Chonbuk National University

ABSTRACT

Purpose : To investigate the caspase-3 expression in the acinar and ductal cells of rat submandibular glands after the irradiation of various doses.

Materials and Methods : The male Sprague-Dawley rats weighing approximately 250 gm were used for this study. The experimental group was irradiated with a single absorbed dose of 2, 5, 10, and 15 Gy on the head and neck region. The rats were sacrificed on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th day after irradiation. The specimens including the submandibular gland were sectioned and observed using histopathological and immunohistochemical methods.

Results : The local destruction of the acinar and ductal cells and the karyopyknotic nuclei of the acinar cells were observed in the 2 Gy and 5 Gy irradiation groups later than in the 10 Gy and 15 Gy irradiation groups. And the expression of caspase-3 was prominent only in the ductal cells in the 2 Gy and 5 Gy irradiation groups.

Conclusion : This experiment suggests that radiation-induced apoptosis in the ductal cells of rat submandibular glands was induced by a low dose radiation associated with the activation of caspase-3 and radiation-induced necrosis was induced by a high dose radiation. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2006; 36 : 7-15)

KEY WORDS : Irradiation Dose; Submandibular Gland; Caspase-3

서 론

두경부 악성 종양의 방사선치료시 타액선은 해부학적 위치와 크기로 인하여 방사선조사야에 자주 포함되며,¹ 비교적 높은 방사선감수성으로 인해 방사선치료 후 단기간 내에 타액분비의 감소와 타액성분의 변화가 야기되어 비가역적이고 심한 구강 내 합병증이 유발된다.² 특히, 급성 구강건조증은 진균성 감염과 점막염 등의 합병증을 수반하며, 두경부 종양의 방사선치료를 받은 환자의 약 70% 이상에서 나타나는 지속적인 만성 구강건조증은 이차적으로 다발성 치아우식증, 미각상실, 연하장애, 식도염 등을 일으

켜 환자의 삶의 질을 크게 저하시킬 수 있으므로 두경부 종양의 방사선치료시 타액선조직의 손상을 최소화시켜 환자의 구강기능을 최대한 유지시키는 것이 매우 중요하다.^{2,3}

따라서 타액선조직에 대한 방사선의 영향에 관해서는 많은 연구가 이루어진 바 있어, Konings 등²은 타액선조직의 방사선감수성 및 급성 방사선손상에 대하여, Radfar와 Sirois⁴는 방사선에 의한 타액선조직의 기능적, 구조적 손상에 대하여, Stephens 등⁵은 타액선과 누선의 장액선포세포의 방사선유발 세포자멸사에 대하여, Paardekooper 등⁶은 방사선유발 세포자멸사가 타액선 기능의 급성 손상에 미치는 영향에 대하여 각각 연구 보고한 바 있다.

한편, 방사선조사에 의한 세포의 손상은 방사선의 직접 또는 간접작용에 의하여 DNA, RNA, 효소, 세포막 등이 손상되어 세포대사와 세포분열에 영향을 미침으로써 이루어

접수일 : 2005년 11월 3일; 심사일 : 2005년 11월 4일; 채택일 : 2005년 12월 28일
Correspondence to : Prof. Eui-Hwan Hwang
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, College of Dentistry, Kyung Hee University #1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea
Tel) 82-2-958-9405, Fax) 82-2-965-1256, E-mail) hehan@khu.ac.kr

지며, 방사선 조사선량이 증가됨에 따라 세포주기의 장애, 유사분열 이상, 세포사의 발생률이 높아질 수 있다.^{7,9} 일반적으로 방사선은 세포괴사나 세포자멸사의 두 가지 주된 기전에 의해 세포사를 일으키는데, 특징적으로 세포괴사는 유전적 영향 없이 저산소증이나 세포막에 유독한 독성물질과 같은 세포의 외부환경에 의해 야기되는 급성 세포손상으로, ATP의 고갈, 세포의 대사붕괴, 세포팽창과 용해 및 세포막의 파열이 일어나 세포 외부로 세포구성 물질을 방출하여 주변 조직에 비특이적인 염증반응을 일으킨다. 이에 비해 세포자멸사는 생리적인 세포사로서, 다양한 생리 상태에서 유전자의 제어에 의해 발생하여 세포 수의 조절 및 정상적인 조직의 재생과 항상성 유지에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.^{9,11} 이와 같이 세포괴사와 세포자멸사는 세포형태학적으로 뚜렷한 차이를 보이나, 분자생물학적 수준에서의 발생기전은 현재까지 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 최근에는 세포사의 유형 중 세포자멸사의 분자생물학적 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 여러 연구에서 세포자멸사를 유발시키는 유전자 효소 중 cysteine aspartate specific proteases (caspase)가 세포자멸사에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다.¹²⁻¹⁹

caspase는 건강한 세포에서 불활성 효소원 (inactive zymogens)으로 존재하며, 특정 사멸신호를 받아 활성화되는 시스테인 단백질분해효소군으로서,²⁰ 이는 caspase 기시체와 caspase 효과체로 대별된다. caspase-2, -8, -9과 같은 caspase 기시체는 caspase-3, -6, -7과 같은 caspase 효과체를 직접 또는 간접적으로 활성화시키고, 이들 활성화된 caspases 효과체는 DNA 수복에 필요한 caspase-activated DNase억제제 (ICAD), poly ADP-ribose polymerase (PARP) 등과 같은 세포기질을 변성시켜 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있는데,^{12-14,16,21} 이 중 caspase-3는 세포자멸사의 초기 표지자로 간주되고 있다.^{19,22} 세포자멸사와 관련된 caspase-3의 역할에 대하여, Porter와 Jánicke¹²는 caspase-3가 세포자멸사의 전형적인 특징으로 나타난다고 하였으며, Lee와 Baehrecke²³는 caspase-3가 세포자멸사의 형태적 소견인 DNA 분절과 염색질 응축에 필수적으로 관여한다고 하였고, Jiang 등²⁴은 사멸하는 타액선 세포는 자가포식성 공포를 포함하지만, caspase-3와 같은 세포자멸사 유전자를 이용하는 것으로 보이며, caspase 억제제인 p35의 발현이 타액선 세포자멸사와 DNA 분절을 억제한다고 하였다. 또한 Jimenez 등¹⁶은 Sjögren 증후군 환자의 타액선 상피세포에서 caspase-3의 과잉 발현을 보고한 바 있다.

이와 같이 caspase-3는 세포자멸사의 중요한 효과체로 알려져 있으나, 세포자멸사 과정에서 이들 caspase의 역할은 현재까지 불명하다. 또한 타액선 분비능 상실의 주요 기전의 하나인 타액선의 선포세포 및 도관세포에서의 방사선유발 세포자멸사를 구명하기 위해서는 세포의 형태학적 변화뿐만 아니라 분자생물학적 변화에 관한 이해가 매

우 중요할 것으로 사료된다.

따라서 본 실험에서는 백서의 두경부에 다양한 흡수선량의 방사선을 1회 조사한 다음, 일정시간 경과 후 흡수선량 변화에 따른 타액선조직의 형태 변화를 헤마톡실린-에오신 염색을 시행하여 광학현미경으로 검경하였으며, 세포자멸사 과정에 중요한 매개체로 작용하는 것으로 알려진 caspase-3의 발현 양상을 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

동일한 조건하에 사육된 체중 250 gm 내외의 Sprague-Dawley계 웅성 백서 50마리를 실험동물로 채택하였으며, 이들을 실험목적에 따라 방사선비조사군을 정상대조군으로, 방사선조사군을 실험군으로 정하였다. 실험군을 방사선 조사선량에 따라 2, 5, 10 Gy 및 15 Gy 방사선조사군으로 다시 나누었으며, 이들 각 군에 12마리씩을, 정상대조군에는 2마리를 각각 배정하였다.

2. 실험방법

1) 방사선조사

방사선조사군의 실험동물들에 실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 체중 100 gm 당 0.02 ml의 용량으로 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 80 cm, 선량률 207 cGy/min으로 2, 5, 10, 15 Gy의 흡수선량이 되도록 두경부에 1회 조사하였다.

2) 실험동물의 희생 및 관찰

각 군의 실험동물들을 방사선조사 1, 3, 7, 14, 21, 28일 경과 후 관류 고정하여 희생시킨 다음, 악하선을 적출하였다. 적출된 악하선을 10% 중성 formalin 용액에 충분히 고정된 후, 통법에 따라 paraffin 포매하고, 4-6 µm 두께의 연속절편을 만들어 헤마톡실린-에오신염색을 시행하여 타액선 조직의 변화를 광학현미경으로 관찰하였다. 또한 면역조직화학적으로 caspase-3의 발현을 관찰하기 위하여 paraffin 포매조직을 4-6 µm 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±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, TBS용액으로 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 Laboratories, USA) 용액을 이용한 발색 반응을 유발시켜 면역반응을 광학현미경으로 확인하였다.

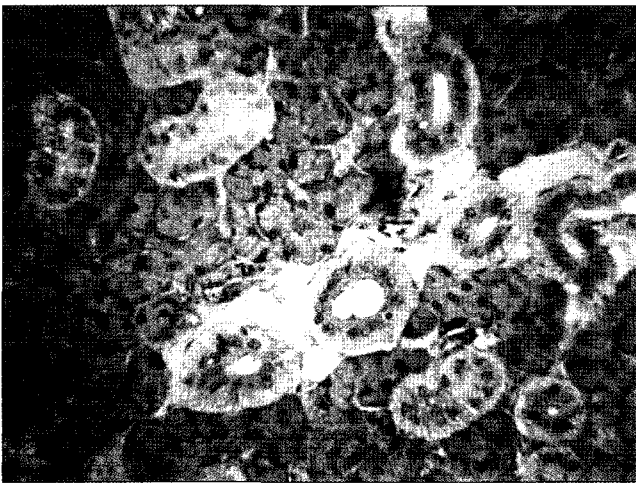


Fig. 1. Photomicrograph shows normal serous salivary gland with negative stained to caspase-3 on the intercalated ductal cells in the control group (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

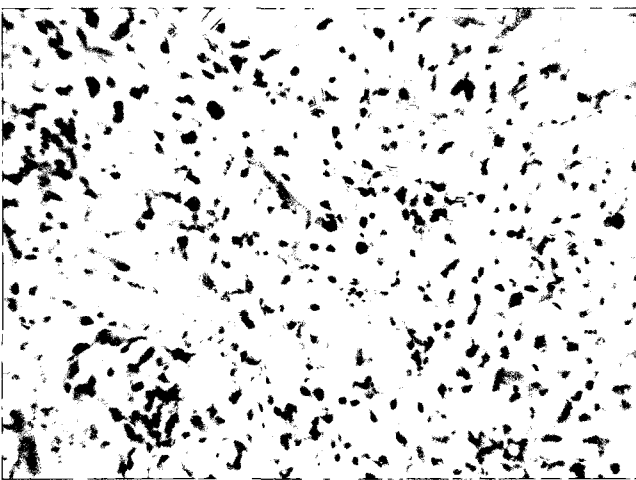


Fig. 2. Photomicrograph shows normal serous acinic cells and intercalated ductal cells on the submandibular salivary gland in the control group (H-E stain, original magnification $\times 200$).

결 과

1. 정상대조군

백서 악하선의 장액선은 염기호성의 많은 과립과 기저부에 위치한 둥근 모양의 선포세포로 구성되어 있었으며, 여러 개의 선포들이 결합조직 중격에 의하여 소엽을 이루고, 선포세포 사이에는 단층의 키가 작은 입방세포로 이루어진 개재관과 모세혈관들이 산재되어 있었다. 또한 교원섬유가 주성분인 소엽간 결합조직 내에는 단층의 원주상피로 이루어진 선 조관과 풍부한 소혈관이 관찰되었다. 정

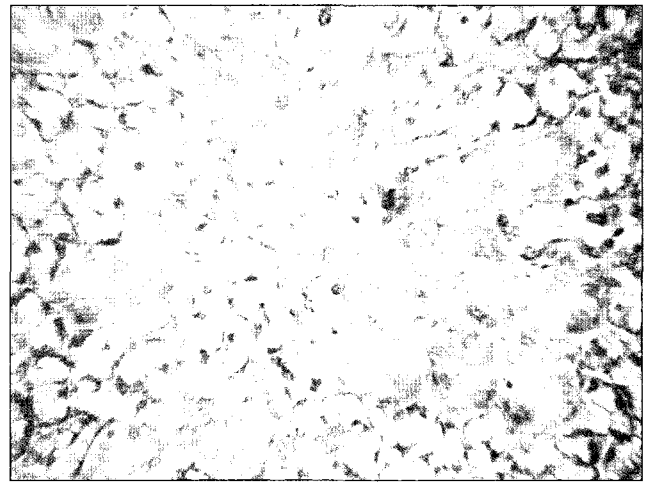


Fig. 3. Photomicrograph shows positive stained intercalated ductal cells to caspase-3 at 3 days after 2 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

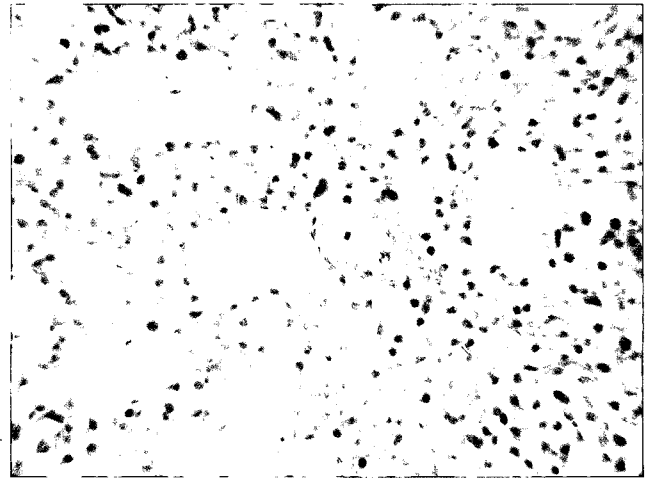


Fig. 4. Photomicrograph shows many condensing nuclei on the acinic cells at 14 days after 2 Gy irradiation (H-E stain, original magnification $\times 200$).

상대조군의 타액선조직에서는 caspase-3가 거의 발현되지 않았다 (Figs. 1, 2).

2. 2 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일에는 정상대조군과 유사한 소견을 보였으나, 방사선조사 후 7일에 선포 세포가 불규칙한 모양으로 서로 응집되는 현상이 관찰되었고, 방사선조사 21일에는 선포세포의 국소적인 파괴상과 함께 도관세포의 파괴상도 관찰되었다. 방사선조사 후 3일에 caspase-3가 도관세포에서 관찰되었으나, 방사선조사 후 1일 소견에 비해 점차 변성되고 감소되었다 (Figs. 3-6).

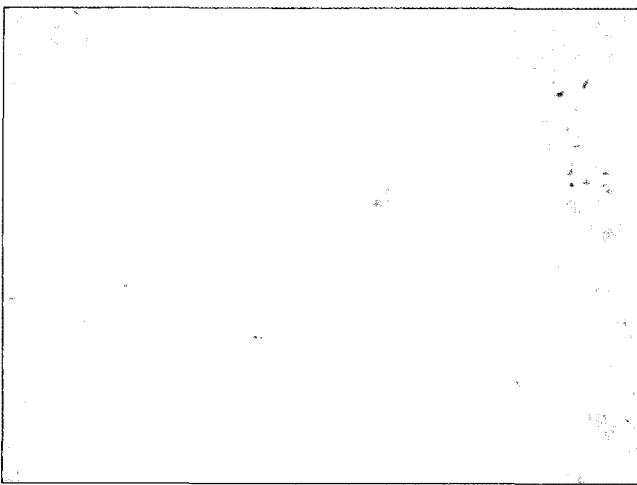


Fig. 5. Photomicrograph shows destruction of ductal cells and acini in part at 21 days after 2 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

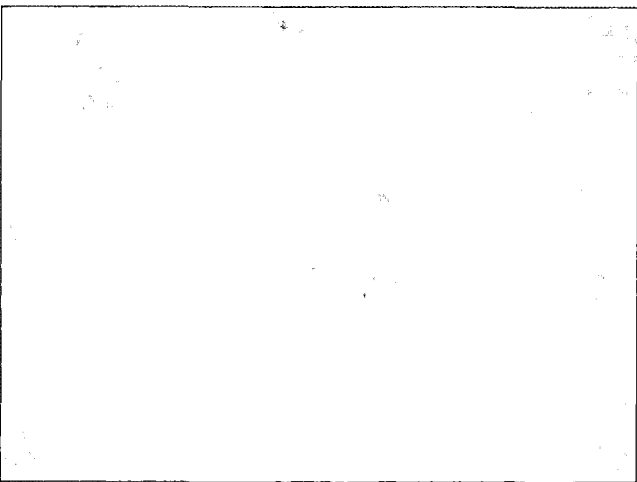


Fig. 6. Photomicrograph shows severe destruction of intercalated ductal cells 28 days after 2 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

3. 5 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일부터 선포세포는 불규칙한 모양으로 관찰되었으며, 방사선조사 후 14일에는 선포세포의 핵 농축과 함께 선포세포와 도관세포의 파괴상이 관찰되었다. 방사선조사 후 1일에 caspase-3가 도관세포에서 관찰되었으나, 점차 미약해져 실험 전 기간에 걸쳐 미약한 발현과 변성된 caspase-3의 흔적을 관찰할 수 있었다 (Figs. 7-9).

4. 10 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일에 선포세포의 핵 농축이, 방사선조사

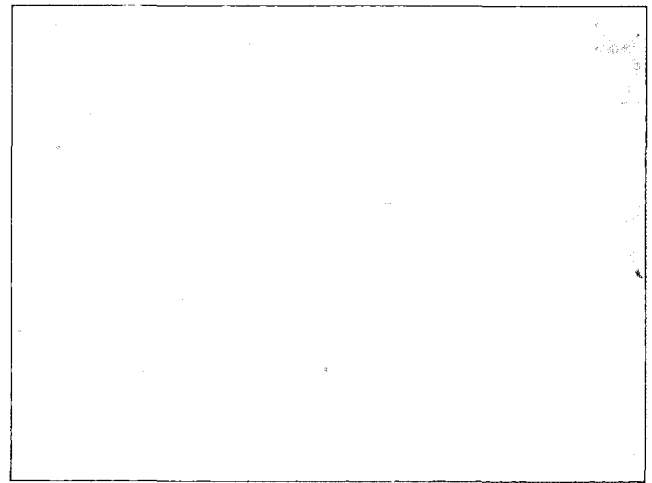


Fig. 7. Photomicrograph shows positive stained intercalated ductal cells to caspase-3 at 1 day after 5 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

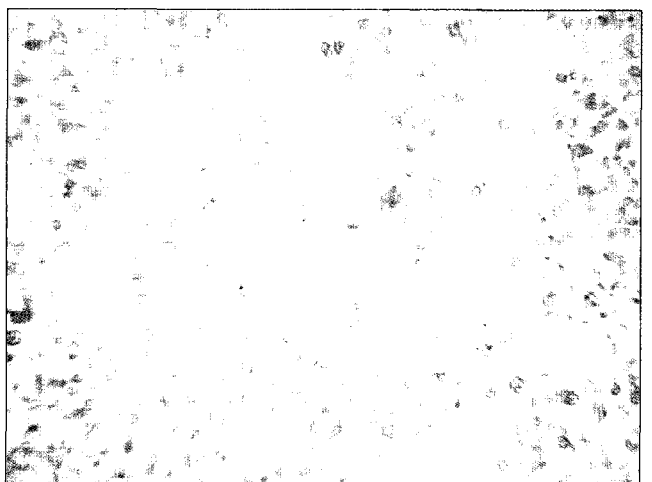


Fig. 8. Photomicrograph shows weakly positive stained ductal cells to caspase-3 and aggregated stains in part within cytoplasm at 14 days after 5 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

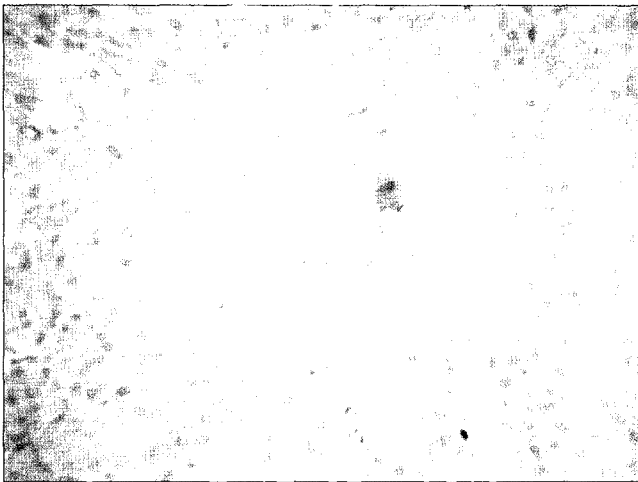


Fig. 9. Photomicrograph shows aggregated stains to caspase-3 in part within cytoplasm at 28 days after 5 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

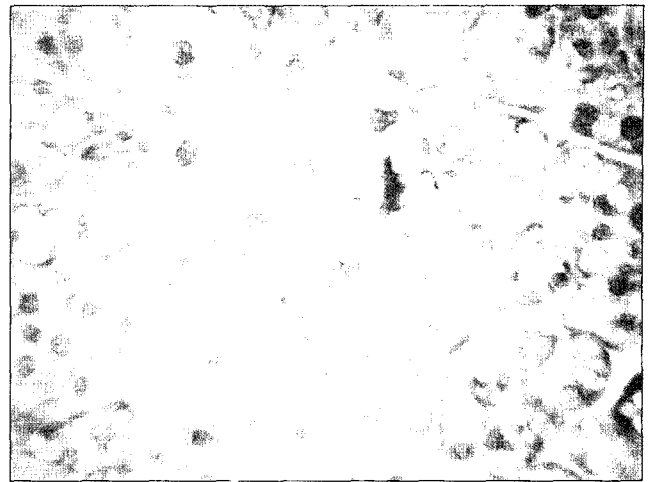


Fig. 11. Photomicrograph shows positive stained vacuolized acinic cells to caspase-3 and aggregated stains in part within cytoplasm at 14 days after 10 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 400$).

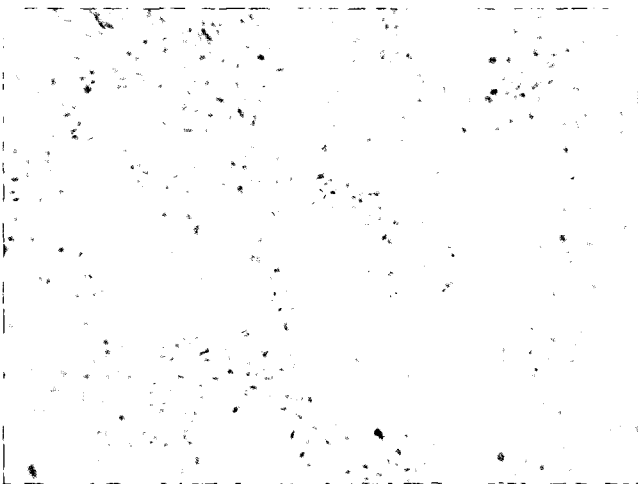


Fig. 10. Photomicrograph shows many condensing nuclei on the acinic cells at 1 day after 10 Gy irradiation (H-E stain, original magnification $\times 200$).

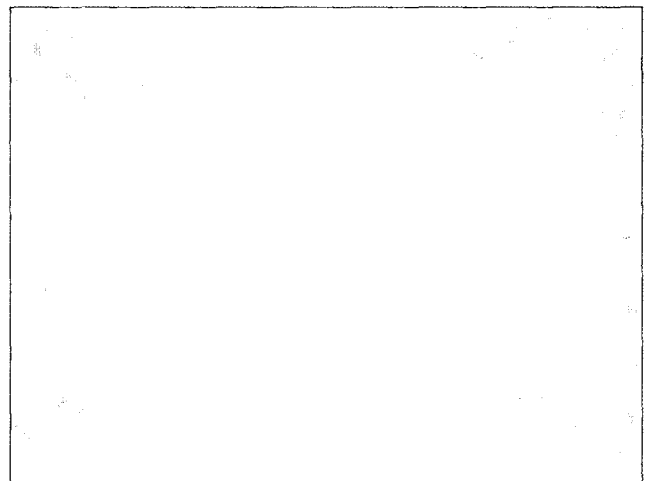


Fig. 12. Photomicrograph shows severely destructed ductal cells at 21 days after 10 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

후 14일에는 선포세포의 세포질내에 많은 수의 공포와 함께, 선포세포 및 도관세포의 극소적인 파괴상이 관찰되었고, 방사선조사 후 21일에는 도관세포의 형태를 알아보지 못할 정도로 심하게 파괴되었다. 방사선조사 후 1일에 caspase-3가 도관세포에서 매우 미약하게 관찰되었으며, 실험 전 기간에 걸쳐 매우 적은 양의 변성된 caspase-3가 관찰되었다(Figs. 10-12).

후 14일에는 선포세포와 도관세포의 파괴상이 관찰되었다. 10 Gy 방사선조사군과 동일하게 방사선조사 후 1일에 caspase-3가 도관세포에서 매우 미약하게 관찰되었으며, 실험 전 기간에 걸쳐 매우 적은 양의 변성된 caspase-3가 관찰되었다(Figs. 13-16).

5. 15 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일에 선포세포와 도관세포의 핵이 농축되었고, 세포 형태가 불규칙하게 관찰되었으며, 방사선조사

고 찰

타액선조직의 분비세포는 고도로 분화된 비분열세포로서, 세포의 교체가 서서히 진행됨에도 불구하고 방사선에 급성 반응을 보인다.⁵ 따라서 타액선은 비교적 저선량의

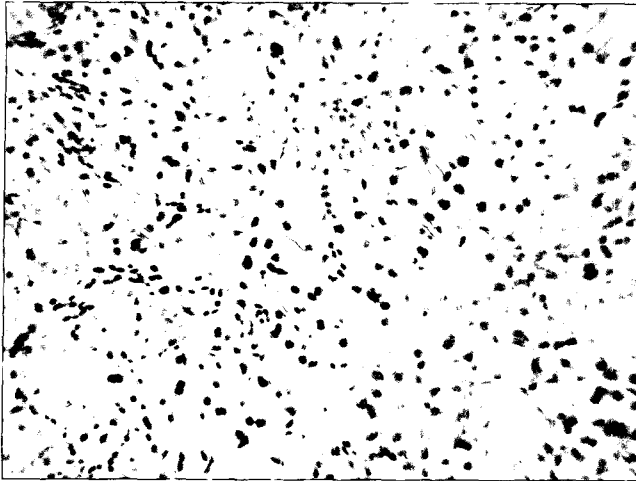


Fig. 13. Photomicrograph shows many condensing nuclei on the acinic cells at 1 day after 15 Gy irradiation (H-E stain, original magnification $\times 200$).

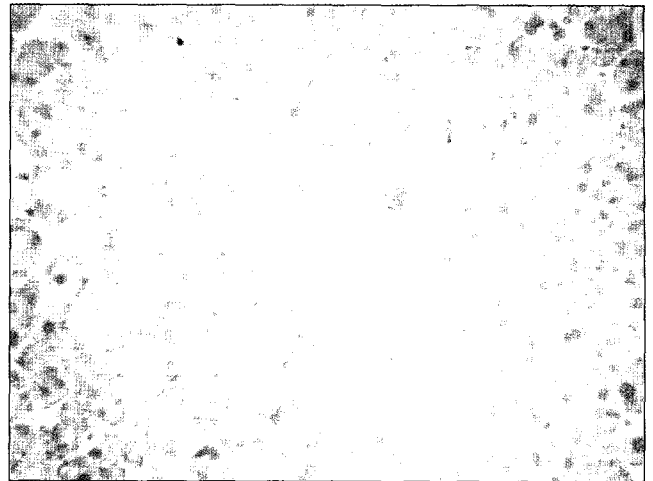


Fig. 15. Photomicrograph shows very weakly stained ductal cells to caspase-3 and very few aggregated stains within cytoplasm at 28 days after 15 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 200$).

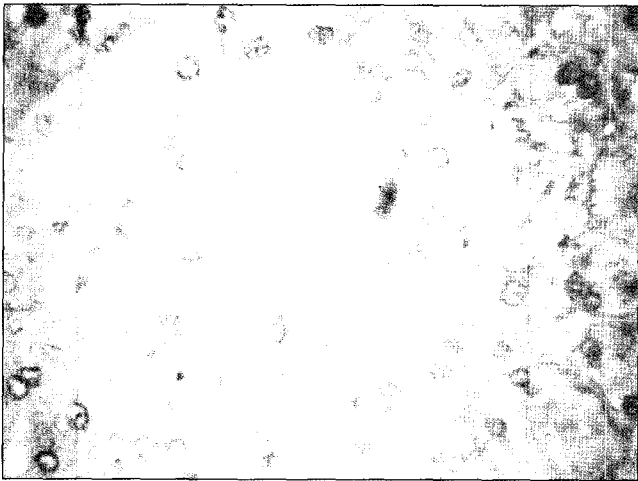


Fig. 14. Photomicrograph shows destruction of ductal cells at 14 days after 15 Gy irradiation (immunolocalization of caspase-3, original magnification $\times 400$).

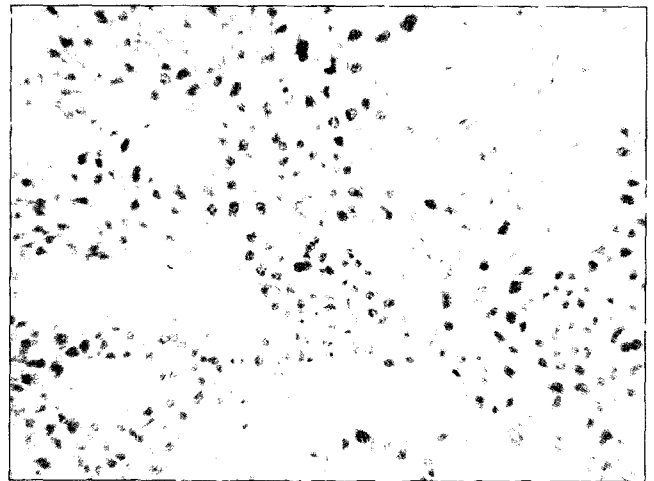


Fig. 16. Photomicrograph shows condensing nuclei and atropic changes of acinic cells at 28 days after 15 Gy irradiation (H-E stain, original magnification $\times 200$).

방사선조사에 의해서도 분비기능의 감소와 실질조직의 섬유화로 인한 구강건조증, 치아우식증, 미각장애, 연하장애, 칸디다증, 영양장애, 방사선골괴사 등의 심각한 합병증이 유발될 수 있다.^{4,25-28}

일반적으로 방사선은 DNA의 손상, 세포분열 장애 등을 야기하여 세포괴사나 세포자멸사를 일으키는데,⁷⁻⁹ 타액선 손상의 주요 원인의 하나로 간주되고 있는 세포자멸사는 면역반응, 조혈과정, 배아발생과 같은 다양한 생리상태에서 발생되며, 특징적으로 세포자멸사가 일어난 세포에서는 미세섬유의 소실, 원형질막 퇴화, 염색질 농축, 핵의 분절, 세포 위축 등과 같은 형태적 변화를 보인다. 또한 엔도뉴클리아제의 매개에 의한 DNA 분절 등과 같은 생화학적 변

화도 보이며, 세포자멸사체를 형성하지만 대식세포에 의하여 급속히 포식됨으로써 세포괴사에서 나타나는 염증반응을 보이지 않는다.^{7-11,29,30} 그러나 과량의 항암제 투여나 고선량의 방사선이 조사되면 DNA 손상 뿐만 아니라 세포질 내의 단백질과 효소, 세포막 인지질 등의 기능에도 영향을 미쳐 짧은 시간 내에 세포괴사가 야기될 수 있다.⁹

세포자멸사는 유전자의 제어에 의한 예정된 생리적 세포사로서, 세포자멸사를 유발시키는 유전자로는 c-myc, p53, Fas (APO-1), Interleukin-1 β converting enzyme (ICE) 등이, 세포자멸사를 억제시키는 유전자로는 bcl-2, bcl-x, c-abl, ras 등이 보고되고 있다.¹¹ Yuan 등³¹은 선충류의 일종인

Caenorhabditis elegans에서는 cell death gene-3 (ced-3)가, 척추동물에서는 ced-3의 동족체인 ICE와 nedd-2 gene이 시스테인 단백질분해효소(cysteine protease)로 작용하여 세포자멸사를 일으킨다고 보고하였다. 특히, caspase는 ced-3의 동족체로서, 염증반응이나 세포자멸사와 관련되어 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있는데,¹⁸ 현재까지 인간에서는 11가지 종류의 caspase가 발현되는 것으로 알려져 있다.³²

세포자멸사는 세포 표면의 death receptor 중재에 의한 I형 세포자멸사와 미토콘드리아 중재에 의한 II형 세포자멸사로 구분된다. I형 세포자멸사는 Fas (APO-1/CD95) 등이 관여하여 caspase 기시체인 caspase-8이 caspase 효과체인 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포자멸사를 일으키며, II형 세포자멸사는 미토콘드리아에 의해 분비된 cytochrome c 등이 관여하여 caspase 기시체인 caspase-9가 caspase 효과체인 caspase-3를 활성화 시킴으로써 세포자멸사를 야기한다. 특히, 자가면역질환인 Sjögren 증후군에서 나타나는 타액선 선포세포와 도관세포에서의 세포자멸사는 Fas뿐만 아니라 TNF- α 와 같은 cytokine이 관여하는 I형 세포자멸사의 양상을 보인다.^{14,16}

이와 같이 caspase-3는 세포자멸사 과정에서 많은 주요 세포 단백질의 분해를 촉진하는 사멸 단백질분해효소(death protease)로 작용하는데,¹² Shinomiya⁹는 고선량의 방사선에 의해 야기된 유사분열 전 세포자멸사와 관련하여 방사선 조사 후 수 시간 이내에 caspase-3가 신속하게 활성화된다고 하였으며, Simon과 Almeida²²는 caspase-3가 사람세포에서 세포자멸사의 초기 표지자 역할을 한다고 보고한 바 있다.

따라서 이번 실험에서는 타액선조직의 선포세포 및 도관세포에서 방사선유발 세포자멸사에 따른 caspase-3 발현 여부를 확인하고, 흡수선량에 따른 caspase-3의 발현 양상을 관찰하기 위하여 타액 분비기능에 이상을 초래하는 것으로 알려진 2, 5, 10, 15 Gy의 흡수선량을 백서의 두경부에 각각 1회 방사선조사하였으며, 방사선에 민감한 장액세포와 방사선에 저항성이 있는 점액세포로 구성되어 있는 악하선을 관찰대상으로 하였다.^{5,6,33,34}

방사선조사에 의한 타액선조직의 가장 전형적인 손상은 선포의 위축과 만성 염증의 유발로서, 방사선에 의한 타액선조직의 초기 반응인 비염증성 분비세포의 위축은 방사선유발 세포자멸사에 의해, 상대적으로 염증이 동반된 지연 반응은 방사선유발 세포괴사에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다.³⁵ 방사선에 의한 타액선조직의 초기 반응에 관하여, Stephens 등³⁶은 원숭이의 이하선에 2.5-15 Gy의 방사선을 1회 조사한 결과, 모든 선량에서 염증반응을 동반한 타액선의 급성 손상이 24시간 이내에 일어났으며, 2.5 Gy 또는 5 Gy의 방사선조사시에는 장액세포의 변성과 괴사가, 7.5-15 Gy 방사선조사시에는 모든 선포의 괴사와 함

께 선체의 광범위한 변성이 관찰되었다고 하였다. 또한 Paardekooper 등⁶은 백서의 이하선과 악하선에 1-25 Gy의 방사선을 1회 조사한 결과, 모든 선량에서 염증반응 없이 타액선조직에 2-3%의 세포자멸사가 산재되어 나타났으나, 12.5 Gy와 15 Gy의 고선량에서는 장액세포의 팽윤과 전체 선포세포의 광범위한 초기 파괴가 관찰되었다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 선포세포와 도관세포의 파괴가 2 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 21일에, 5, 10 Gy 및 15 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 14일에 나타나기 시작하여, 실험시일이 경과됨에 따라 점차 타액선조직의 파괴가 심화되었다. 따라서 현재까지 방사선에 의한 세포자멸사의 정확한 기전은 명확히 밝혀진 바 없으나, 본 실험에서는 실험의 전 기간에 걸쳐 염증세포의 침윤은 관찰되지 않아 방사선조사에 의해 세포자멸사가 유도되었음을 확인할 수 있었다. 또한 본 연구에서 세포자멸사의 표지자인 caspase-3의 발현이 2 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 3일에, 5 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 1일에 도관세포에서만 비교적 뚜렷하게 관찰되어 대부분의 방사선유발 세포자멸사가 악하선의 개재관세포에서 관찰되었다는 Paardekooper 등⁶의 보고와 일치하였다. 그러나 세포 종류에 따른 세포자멸사의 발생률의 차이는 극히 미약한 것으로 생각되며, 아주 적은 양의 세포 손실이라도 타액선의 줄기세포인 개재관세포와 같은 특정 세포의 손실은 방사선에 의한 타액선의 만성 위축을 가져와 심각한 기능감소의 원인이 될 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 선량에 따른 방사선유발 세포자멸사에 대하여, Stephen 등^{5,37}은 원숭이의 타액선을 이용한 연구에서 5 Gy의 방사선조사 후 핵의 이상이 실험 초기에 나타났으며, 세포자멸사의 발생률은 방사선을 조사하지 않았을 경우에는 15%, 10 Gy의 방사선을 조사한 경우에는 40%, 15 Gy의 방사선을 조사한 경우에는 55%로 증가되어 선량 의존성을 보인다고 하였다. 그러나 Peter 등³⁸은 백서 타액선을 이용한 연구에서 15 Gy의 방사선조사 후 3-4%의 핵에서만 이상을 보여 선량 의존성은 관찰되지 않는다고 하였고, Li 등,³⁹ Shinohara 등⁴⁰도 타액선조직과 유사한 비증식성 세포로 이루어진 백서 척수조직의 희돌기교세포(oligodendrocytes)와 뇌량세포(corpus callosum cells)를 각각 연구하여 세포자멸사의 발생률이 모두 3%이었다고 보고하였다. 최근 다수의 연구에서는 고선량의 방사선조사시 세포자멸사가 다소 증가하는 것으로 보고되고 있는데, Olive 등⁴¹은 TK₆ 세포를 이용한 연구에서 방사선을 조사하지 않은 경우에는 세포자멸사가 관찰되지 않았으나, 흡수선량을 서서히 증가시켜 흡수선량이 15 Gy에 도달되었을 때 100%의 세포자멸사의 발생률이 관찰되었다고 하였다.

본 연구에서는 선포세포에서의 핵 농축현상이 2 Gy와 5 Gy 방사선조사군에서는 14일 후에, 10 Gy와 15 Gy 방사선

조사군에서는 1일 후에 관찰되었으나, caspase-3의 발현은 2Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 3일에, 5, 10Gy 및 15Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 1일에 타액선조직에 전반적으로 산재되어 나타나기 시작하여 실험 전 기간에 걸쳐 매우 적은 양의 변성된 caspase-3가 관찰되어 선량에 따른 뚜렷한 상관관계는 관찰할 수 없었다. 그러나 본 연구결과는 백서 타액선에 2Gy의 방사선을 조사할 경우 방사선조사 후 24시간 이내에 세포자멸사의 발생률이 최대가 된다고 보고한 Paardekooper 등⁶의 연구결과와는 상이하였다. 이는 본 연구의 경우 관찰기간을 방사선조사 1일 후부터로 정하였기 때문에 세포자멸사의 발현 양상을 정확히 관찰하기가 어려웠기 때문인 것으로 사료된다.

이상과 같이 본 연구에서는 방사선에 의한 타액선조직의 손상은 주로 도관세포가 caspase-3의 영향을 받아 2Gy와 5Gy 정도의 비교적 저선량에서 세포자멸사의 과정을 거치며, 10Gy와 15Gy에서의 타액선조직의 손상은 세포자멸사보다는 방사선의 직접 또는 간접적인 작용에 의한 세포괴사가 일어난 것으로 추정 할 수 있었다. 그러나 현재 까지도 방사선에 의한 세포자멸사의 발생기전은 불명확 뿐만 아니라, 방사선에 의한 조직의 반응은 방사선조사 방법과 선량, 실험동물의 종과 연령, 세포의 증식과 분화 정도, 세포의 생리적 조건 등에 따라 상이하므로, 향후에는 이들 요인들을 면밀히 분석, 평가하여 실험조건을 객관화 시킨 다음 정상적인 구강생리에 많은 역할을 수행하는 타액선에 대한 방사선의 영향을 구명하는 것이 필요할 것으로 판단된다. 또한 이와 더불어 방사선조사로 인한 타액선조직의 세포자멸사와 타액선 기능과의 연관성에 대한 연구는 물론, 악성 종양, 퇴행성 질환, 자가면역질환 등과도 밀접한 연관이 있는 세포자멸사의 보다 상세한 구명을 위하여는 세포형태학적 변화뿐만 아니라 세포사 유형에 따른 생화학적, 분자생물학적 기전에 관한 연구가 중요하며, 전자현미경, TUNEL 분석 (Tdt-dUTP terminal nick end labeling assay), flow cytometry (FCM) 등 다양한 방법을 이용한 세포자멸사의 발생률의 측정도 필요할 것으로 생각 된다.

참 고 문 헌

- Cheng VS, 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.
- Konings AWT, Coppes RP, Vissink A. On the mechanism of salivary gland radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62 : 1187-94.
- Koukourakis MI, Danielidis V. Preventing radiation induced xerostomia. *Cancer Treat Rev* 2005; 31 : 546-54.
- Radfar L, Sirois DA. Structural and functional injury in minipig salivary glands following fractionated exposure to 70 Gy of ionizing radiation: An animal model for human radiation-induced salivary gland injury. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96 : 267-74.
- 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.
- 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.
- Stern MH, Turner JE, Jett LS, Mincer H, McGinnis. Electorn microscopic changes in rat parotid and submandibular glands subsequent to total body irradiation with fast neutrons. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42 : 620-30.
- Wills, ED. Effects of irradiation on subcellular components. I. Lipid peroxide formation in the endoplasmic reticulum. *Int J Radiat Biol* 1970; 17 : 217-28.
- Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 2001; 3 : 240-53.
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1133 : 275-85.
- 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.
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99-104.
- 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.
- Chosa N, Kyakumoto S, Kito N, Kamo M, Sato N. Mechanism of Fas-mediated cell death and its enhancement by TNF- α in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Eur J Oral Sci* 2004; 112 : 338-46.
- Daish TJ, Mills K, Kumar S. Drosophila caspase DRONC is required for specific developmental cell death pathways and stress-induced apoptosis. *Dev Cell* 2004; 7 : 909-15.
- Jimenez F, Aiba-Masago S, Hashimi IA, Vela-Roch N, Fernandes G, Yeh CK, et al. Activated caspase 3 and cleaved poly (ADP-ribose) polymerase in salivary epithelium suggest a pathogenetic mechanism for Sjögren's syndrome. *Rheumatology* 2002; 41 : 338-42.
- Martin DN, Baehrecke EH. Caspase function in autophagic programmed cell death in Drosophila. *Development* 2004; 131 : 275-84.
- Wang S, Miura M, Jung YK, Zhu H, Li E, Yuan J. Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* 1998; 92 : 501-9.
- 이흥기, 황의환, 이상래. 방사선조사와 당뇨병이 백서 악하선의 caspase-3 발현에 미치는 영향. *대한구강악안면방사선학회지* 2005; 35 : 147-56.
- Salvesen GS, Abrams JM. Caspase activation-stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 2004; 23 : 2774-84.
- Kawakami A, Eguchi K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune disease. *Med Electron Microsc* 2002; 35 : 1-8.
- Simon CR, de Almeida JC. Programmed cell death in *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae) salivary glands presents apoptotic features. *Genesis* 2004; 40 : 22-31.

23. Lee CY, Baehrecke EH. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development* 2001; 128 : 1443-55.
24. Jiang C, Baehrecke EH, Thummel CS. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 1997; 124 : 4673-83.
25. Frank RM, Herdly J, Phillippe E. Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. *J Am Dent Assoc* 1965; 70 : 868-83.
26. Dreizen S, Brown L, Handler S, Levy BM. Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. *Cancer* 1976; 38 : 273-8.
27. Valdez IH, Atkinson JC, Ship JA, Fox PC. Major salivary gland function in patients with radiation-induced xerostomia: flow rates and sialochemistry. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25 : 41-7.
28. Wolff A, Atkinson JC, Macynski AA, Fox PC. Oral complications of cancer therapies. Pretherapy interventions to modify salivary dysfunction. *NCI Monogr* 1990; 9 : 87-90.
29. Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Brishop CJ. Apoptosis In: Potten CS. Perspectives on mammalian cell death. New York: Oxford University Press; 1987. p. 93-119.
30. Searle J, Kerr JFR, Brishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982; 17 : 229-59.
31. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* 1993; 75 : 641-52.
32. Koenig U, Sommergruber W, Lippens S. Aberrant expression of caspase-14 in epithelial tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335 : 309-13.
33. Vissink A, 's-Gravenmade EJ, Ligeon EE, Konings AW. A functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res* 1990; 124 : 259-65.
34. Abok K, Brunk U, Jung B, Ericsson J. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virchows Arch* 1984; 45 : 443-60.
35. Gucehlaar HJ, Vermes A, Meerwaldt JH. Radiation-induced xerostomia: pathophysiology, clinical course and supportive treatment. *Support Care Cancer* 1997; 5 : 281-8.
36. Stephens LC, King GK, Peters LJ, Ang KK, Schultheiss TE, Jardine JH. Acute and late radiation injury in rhesus monkey parotid glands. Evidence of interphase cell death. *Am J Pathol* 1986; 124 : 469-78.
37. Stephens LC, Schultheiss TE, Ang KK, Peters LJ. Pathogenesis or radiation injury to the salivary glands and potential methods of protection. *Cancer Bulletin* 1989; 4 : 106-14.
38. Peter B, Van Waarde MA, Vissink A, s-Gravenmade EJ, Konings AW. The role of secretory granules in radiation-induced dysfunction of rat salivary glands. *Radiat Res* 1995; 141 : 176-82.
39. Li YQ, Jay V, Wong CS. Oligodendrocytes in the adult rat spinal cord undergo radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 1996; 56 : 5417-22.
40. Shinohara C, Gobbel GT, Lamborn KR, Tada E, Fike JR. Apoptosis in the subependyma of young adult rats after single and fractionated doses of X-rays. *Cancer Res* 1997; 57 : 2694-702.
41. 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.