

일회 방사선조사를 이용한 마우스 구강점막염 모델의 확립

울산대학교 의과대학 서울아산병원 방사선종양학과*, 울산대학교병원 방사선종양학과†

류승희* · 문수영* · 최은경* · 김중훈* · 안승도* · 송시열* · 박진홍* · 노영주† · 이상욱*

목적: 두경부 영역에 대한 방사선치료 시 발생하는 구강점막염은 방사선치료로 유발되는 급성 합병증 중에서 가장 심각하고 해결해야 할 문제점이다. 따라서 본 저자들은 마우스를 이용하여 방사선 구강점막염 모델을 확립하고자 본 연구를 진행하였다.

대상 및 방법: 본 실험에는 7~8주령의 20 g 내외의 웅성 BALB/c 마우스 55마리를 사용하였다. 1주일간 순화 후 대조군 5마리를 제외하고 체중에 따라 무작위로 3군으로 나누고 마우스의 두경부에 각각 16, 18, 20 Gy의 방사선을 조사하였다. 방사선조사 후 체중을 매일 측정하고 생존 유무를 관찰하였다. 방사선조사 후 1, 2, 3, 5, 7, 9, 14일째 마우스를 경추탈골사 한 후 설조직을 채취하고 hematoxylin & eosin (H&E) 염색으로 조직학적 변화를 확인하였다.

결과: 방사선조사군의 경우 5일 이후 급격한 체중감소를 나타내었고 18 Gy와 20 Gy군에서 마우스가 사망하였다. 16 Gy군에서는 5일부터 9일까지는 평균 체중이 감소하였으나 이후 회복되었다. 조직학적 변화를 관찰한 결과 방사선조사 후 시간경과에 따라 상피층의 두께가 얇아지면서 편평해지는 경향을 나타내었으며 7일과 9일째에 가장 심각한 상태를 나타내었다. 대조군에서 평균 $113.50 \pm 2.41 \mu\text{m}$ 이던 상피층 두께가 방사선조사 후 시간이 지남에 따라 유의하게 그 두께가 감소하였으며 7일째에는 43.9% 감소한 $63.70 \pm 3.28 \mu\text{m}$ 로 최저치를 나타내었다($p < 0.0001$). 14일째에는 $121.00 \pm 2.82 \mu\text{m}$ 로 대조군과 유의한 차이가 없어 정상적으로 회복되는 것으로 나타났다.

결론: BALB/c 마우스에서 방사선조사 후 마우스의 체중변화를 관찰 할 수 있는 적절한 방사선 선량은 16 Gy였다. 또한 구강 내 상피조직의 현저한 손상은 방사선조사 후 7일과 9일째 관찰할 수 있었고 9일째에는 심각한 궤양화가 나타났다. 18 Gy와 20 Gy 조사 후 9일과 10일째에 모든 마우스가 사망하였지만 16 Gy 조사군에서는 14일째 조직이 정상적으로 회복되었다.

핵심용어: 구강점막염, 방사선조사, 마우스, 상피층 두께

서 론

두경부암의 치료에 있어서 방사선치료는 매우 중요한 역할을 하고 있으며,^{1,2)} 방사선치료의 효과를 증진하고자 항암요법과 병용하기도 한다.^{3~5)} 하지만 두경부 영역의 방사선치료 또는 항암화학방사선요법 시 구강 및 인후에 발생하는 점막염은 가장 호발하는 합병증이면서 동시에 해결해야 할 가장 심각한 합병증이기도 하다.^{6~8)} 구내염은 식이섭취의 불량으로 삶의 질을 감소시킬 뿐만 아니라 심각한

한 경우에는 치료의 중단으로 환자의 전신적인 상태를 악화시켜 질병의 예후를 나쁘게 만들기도 한다.^{7,9,10)}

방사선치료 시 발생하는 구강 및 인후에 발생하는 점막염에 대한 근본적인 치료방법은 현재까지 없는 상태이다.¹¹⁾ 대부분 실제 임상에서 시도되는 치료는 증상을 완화시키고 2차 감염을 억제하는 수준이다. 최근 들어 각질세포성장인자 (KGF)가 미국 FDA의 승인을 받아 혈액종양 환자에서 발생하는 점막염 치료에 쓰이고 있지만 고형암에서는 적응증을 얻고 있지 못하다.¹²⁾ 국내에서는 표피세포성장인자 (EGF)를 점막염 치료제로 개발하기 위해서 현재 3상 임상시험이 진행 중이다.

점막염 치료제 개발 시 그 효과를 검증하기 위한 소동물 모델에 대한 연구결과가 충분하지 않다고 판단된다. 따라서 적절한 방사선조사량, 점막 검사시기 등에 대한 표준적 모델을 확립해보고자 본 연구를 진행하였다.

이 논문은 2008년 9월 4일 접수하여 2008년 10월 1일 채택되었음.
책임저자: 이상욱, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 방사선종양학과
Tel: 02)3010-4435, Fax: 02)486-7258
E-mail: lsw@amc.seoul.kr

본 연구는 2008년 아산생명과학연구소 연구비 지원(2008-308)에 의하여 이루어짐.

대상 및 방법

1. 실험동물

동물 실험은 서울아산병원연구소의 의학연구심의위원회(Institutional Review Board)에서 승인되었으며 특정병원체가 없는 7~8주령의 BALB/ c Cr slc 마우스(무게 22~27 g) 55두를 중앙실험동물(주)로부터 공급 받아 전문수의사의 검수 후 서울아산병원연구소 실험동물사육실에서 사육하였다. 이때 온도 22±2°C, 습도 45~55%, 조도 300 lux (단상 50~90 cm²) 및 명암주기 12시간의 환경에서 사육하였고 마우스용 고형 사료(삼양사, 슈퍼피드) 및 음료는 무제한으로 제공하였다. 실험동물은 1주일간의 순화과정을 거친 후 4군(대조군, 16, 18, 20 Gy)으로 나누어 실험에 이용하였다.

2. 방사선 조사

방사선 조사 전 3군으로 나누어진 마우스는 ketamin (80 mg/kg)과 xylazine (16 mg/kg)을 혼합하여 복강 주사 후 마취하였고, 6MV X-ray 선형가속기(CLINAC EX, Varian Cp., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분당 2 Gy의 선량률로 마우스의 두경부에 각각 총 16 Gy (16마리), 18 Gy (16마리), 20 Gy (18마리)의 방사선이 일 회 조사되었다(Fig. 1). 이 때 구강 내에 충분한 선량이 투여되게 하기 위해 1.0 cm bolus를 이용하였다.

3. 육안 및 조직학적 관찰

실험기간 동안 실험동물의 체중, 일반 증상 및 사망 동물을 관찰하였고, 2시간, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 14일에 군당 2마리씩 무작위로 선별하여 육안소견을 확인한 후 부검하였

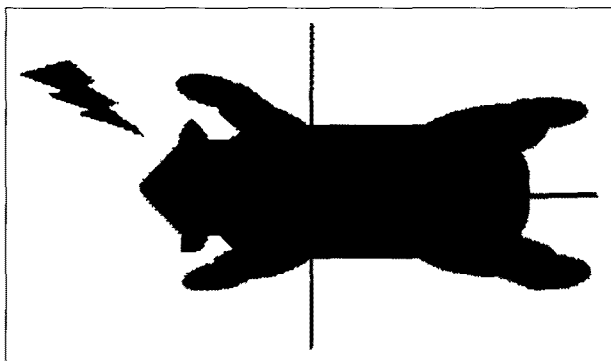


Fig. 1. Radiation area. Mice were anesthetized with the mixture of ketamin (80 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) and then irradiated 16, 18, and 20 Gy respectively to the head and neck using 6 MV X-ray linear accelerator at a dose rate of 2 Gy/minutes.

다. 혀 및 식도, 기관지를 적출하여 10% 중성 포르말린에 고정하여 조직표본을 제작하였고 조직학적 변화를 관찰하기 위해 haematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행하였다.

4. 통계분석

모든 측정치는 SigmaPlot (ver 10.0)으로 분석하여 평균± 표준오차로 표시하였고 통계학적 유의성은 student's t-test로 검정하였다. 이때 p<0.05 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

1. 체중 변화 및 사망률

모든 시험군에서 방사선조사 후 체중변화는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 정상대조군의 경우 체중의 감소 없이 2주 동안 서서히 체중이 증가한 반면 방사선조사군의 경우 5일 이후부터 급격한 체중감소를 나타내었다. 특히 20 Gy 조사군의 경우 5일째 대조군에 비해 유의적으로 체중감소가 나타났고, 7일 이후에는 18 Gy와 20 Gy 조사군에서 급격한 감소를 나타내었다. 이러한 급격한 체중감소는 마우스의 사망률에도 영향을 미쳐 18 Gy의 경우 방사선조사 후 9일과 10일에 각각 1마리씩 사망하였고, 20 Gy의 경우에는 그 정도가 심각하여 남아있던 6마리 모두 9일째 사망하였다(Table 1). 이와는 달리 16 Gy를 조사한 실험군의 경우에는 5일부터 9일까지는 평균 체중이 감소하였으나 이후 회복하여 14일째에는 23.36±2.14 g으로 체중이 증가하는 것으로 나타났다.

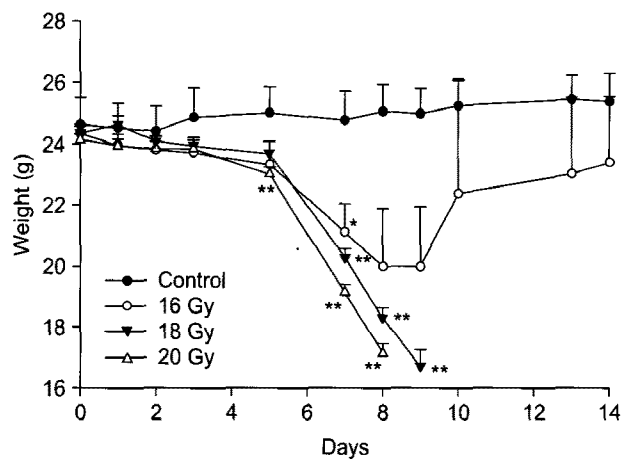


Fig. 2. The changes of body weight. Each data represent mean± standard error. *p<0.05, **p<0.01: significantly different between control group and radiation group.

2. 육안 및 조직학적 관찰

방사선 용량에 따른 조직의 변화를 관찰하기 위해 시간 대별, 용량별로 2마리씩의 마우스를 무작위로 선별하여 부검을 시행하였다. 채취된 설조직에서 H&E 염색으로 조직학적 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다(Fig. 3). 대조군에

Table 1. Number of Dead Mice during the Experiment

Group	Postirradiation days						
	5	7	8	9	10	13	14
No RT (n=5)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3*
16 Gy (n=16)	0/8*	0/6*	0/4	0/4*	0/2	0/2	0/2*
18 Gy (n=16)	0/8*	0/6*	0/4	1/4*	1/1		
20 Gy (n=18)	0/10*	0/8*	0/6	6/6			

Data present number of death/number of total mice at weighting point. *2 mice were sacrificed for histopathological evaluation at day 1, 2, 3, 5, 7, 9, and 14

서는 육안으로 어떠한 병변도 관찰되지 않았고 조직학적으로도 정상적인 상피조직을 가지고 있었으며 점막표피층과 진피층에서 아무런 이상증후를 발견할 수 없었다(Fig. 3A). 하지만 16 Gy 방사선 조사군의 경우 시간이 진행됨에 따라 상피층의 두께가 얇아지면서 편평해지는 경향을 나타내었으며 9일째에는 심각한 궤양화가 진행되어 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3E). 특히 5일째 이후 각질층의 박리가 나타났고 7일과 9일에는 그 정도가 심해졌다. 14일째에는 다시 정상조직에 가깝게 회복되어 있는 모습이 관찰되었다(Fig. 3F).

하나의 지표로 상피층의 두께를 측정된 결과(Fig. 4) 대조군에서 평균 $113.50 \pm 2.41 \mu\text{m}$ 이던 두께가 방사선 조사 후 시간이 지남에 따라 유의적으로 그 두께가 감소하였으며 7일째에는 43.9% 감소한 $63.70 \pm 3.28 \mu\text{m}$ 로 최저치를 나타내었다($p < 0.0000$). 두께가 증가된 14일째에는 $121.00 \pm 2.82 \mu\text{m}$ 로 대조군과 유의적인 차이가 없어 정상적으로 회복되는 것으로 나타났다.

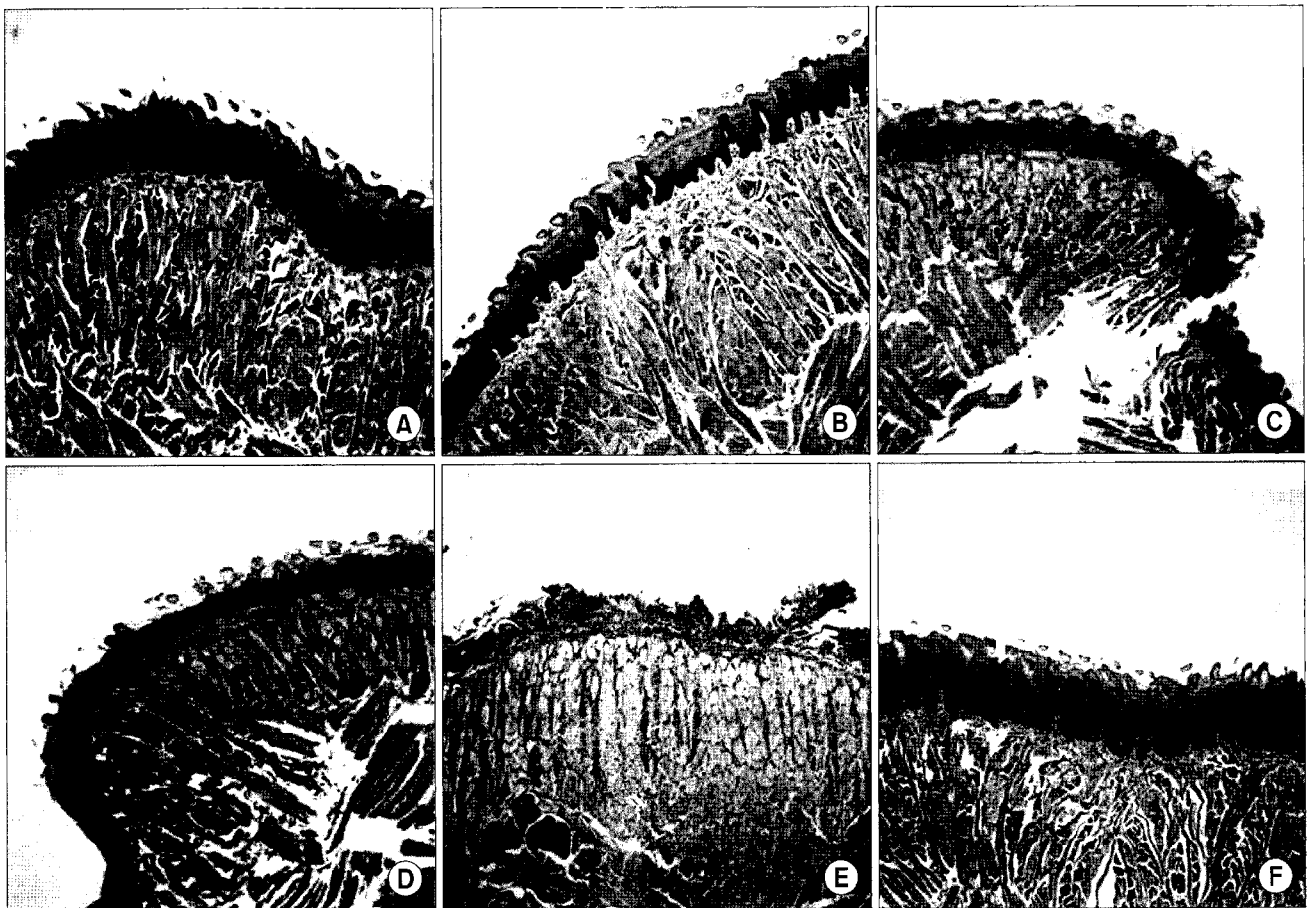


Fig. 3. Morphological changes of tongue on different time point after 16 Gy irradiation. The cellularity of both the entire epithelium and the basal layer was significantly reduced in the radiation group compared to the control tissue (A). Severe ulceration was revealed on day 9 (E) and epithelial layers were recovered on day 14 (F). A: control, B: day 3, C: day 5, D: day 7, E: day 9, F: day 14.

방사선량 차이에 대한 설조직의 조직학적 변화 역시 7일째에서 관찰되었다(Fig. 5). 그 차이가 크지는 않았지만 용량이 증가함에 따라 표피층이 헐거워서 쉽게 박리되었고, 상피층의 두께가 얇아지는 것을 관찰할 수 있었다. 9일째에는 20 Gy를 조사 받은 마우스가 모두 사망하여 비교할 수가 없었다.

고안 및 결론

두경부종양 환자에게 방사선치료 시 매우 흔하게 나타나는 구내염은 식이섭취의 불량으로 삶의 질을 감소시킬 뿐만 아니라 심각한 경우에는 치료의 중단으로 환자의 전신적인 상태를 악화시켜 환자의 예후를 나쁘게 만들기도 한다.^{7,9)} 특히 항암화학요법과 병행될 경우에는 그 정도가 심각하여 암환자 치료 시 많은 문제점을 야기하게 된다. 이

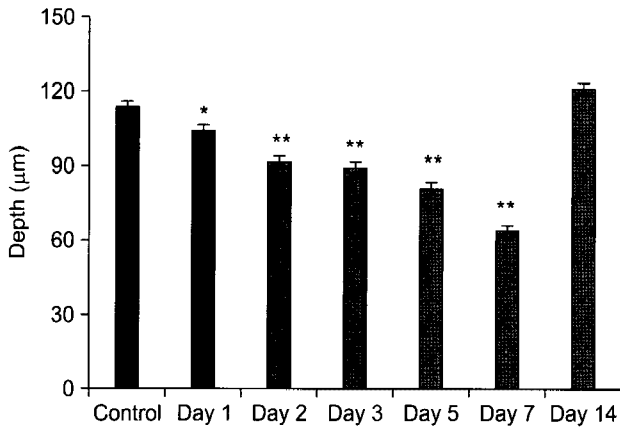


Fig. 4. Thickness of epithelium layer in the tongue of irradiated mice (16 Gy). Mucosal epithelial thickness was measured at 10 sites for each slides. Bar means average±standard error. *: p<0.05, **: p<0.01 compared to control.

에 많은 연구자들이 방사선 치료 후 발생하는 구내염에 대한 치료법으로 냉동요법, 레이저요법, Chlorhexidine, Amifostine, Pentoxifylline, Glutamine, palifemin 등을 제시하고 있으나 여전히 많은 논란이 있다.^{13,14)} 또한 효능을 연구하기 위한 적당한 모델이 확립되지 않아 구내염 연구에 어려움을 주고 있다. 구내염을 유발하기 위해 methotrexate¹⁵⁾나 5-fluorouracil^{16,17)} 같은 약제를 사용할 수도 있지만 방사선에 의해 유도되어진 구내염 모델로 이용하기에는 부적합하다. 또한 어떤 마우스를 실험에 사용하는가에 따라라도 구내염을 유발하는 방사선량에 차이가 나타나게 된다. C3H/Neu 마우스와 B6D2F1 마우스의 계통 차이에 따라 방사선으로 유도된 구내염을 연구한 결과에서도 궤양화를 유도하는 기간의 차이가 났다.¹⁸⁾ 특히 BALB/c 마우스가 방사선에 매우 민감하다는 것은 보고된 바 있으며^{19,20)} Okayasu 등²¹⁾에 의하면 방사선 조사 후 다른 종에 비해 BALB/c 마우스에서 DNA-PKcs 단백질 발현이 급격히 감소하였을 뿐만 아니라 DNA-PK 활성 역시 감소하였음을 보고한 바 있다. 즉, 다른 마우스 종에 비해 BALB/c마우스는 적은 양의 방사선 조사로도 손쉽게 구내염을 유발할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 BALB/Cr slc 마우스 모델을 사용하여 방사선량 및 조사부위, 구내염 발생 시간들을 정립하고 앞으로의 구내염 연구의 기초를 마련하고자 하였다.

Sonis가 제안한 바와 같이 점막염은 개시단계(initiation), 신호생성단계(message generation), 신호전달 및 증식단계(signaling/amplification), 궤양화 단계(ulceration), 그리고 치유단계(healing)의 5단계로 나누어질 수 있다.⁹⁾ 이러한 것을 바탕으로 가장 확실하게 설조직에서 구내염의 진행사항을 확인하기 위해서는 조직학적 변화를 살펴보는 것이 가장 정확하다고 여겨진다. 본 연구에서 설조직을 취해 슬라이드를 만드는 과정에서 동일한 지점에서 절단되어질 수 있



Fig. 5. Dose-dependent response of radiation induced damage of tongue at day 7. A: 16 Gy, B: 18 Gy, C: 20 Gy.

도록 방향이나 위치를 조절하여 더 객관적인 검사가 가능하도록 하였다.

결과에서 보듯이 방사선조사 후 설조직의 변화는 시간에 따라 뚜렷하게 나타났다. 초기에는 점막하층에서 세포 사멸이 나타나며 5일 이후부터 심각하게 진행되어진 표피층의 붕괴는 7일과 9일째에 최고조에 다다랐고 9일째에는 심각한 궤양화가 일어났다. 특히 9일째 설조직에서는 궤양의 전형적인 위막(pseudomembrane)의 형상을 보였다. 하지만 이후 점차 회복되어 정상 대조군과 유사한 정도의 상피 구조로 돌아왔다. 방사선량에 대한 반응성에 있어서도 농도에 의존적으로 그 변화가 나타났으며 비록 매 시간 단위 당 2마리의 마우스가 이용되었지만 그 차이는 거의 없어 비슷한 정도로 구내염이 진행됨을 알 수 있었다. 용량의 중요성은 18 Gy와 20 Gy 조사군에서 마우스의 생존율에서 확인되어진다. 과량의 방사선은 심각한 구내염과 염증반응을 유도하여 식이 섭취량을 감소시키고 결국에는 사망에 이르게 한다. 따라서 구내염 치료를 위한 약제 또는 물질의 효능을 검증하기 위해서는 마우스가 사망하지 않고도 구내염을 확실히 유발할 수 있는 방사선량을 확립하는 것이 중요한 것으로 보여진다. 본 연구결과에서 보듯이 BALB/c 마우스의 경우에는 16 Gy로 두경부에 조사하였을 경우 7일과 9일째에 최대로 구내염이 발전하였고 그 이후 점차 회복되어 14일 경에는 정상수준으로 돌아오는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 일회 방사선조사에 의한 마우스 설조직의 조직학적 변화를 살펴보았지만 이를 분할 조사 하였을 때 어떠한 변화가 일어나는지도 앞으로 연구되어야 할 것으로 보여진다.

참 고 문 헌

1. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 1991;324:1685-1690
2. Lefebvre JL, Chevalier D, Lubinski B, Kirkpatrick A, Collette L, Sahmoud T. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:890-899
3. Fung K, Lyden TH, Lee J, et al. Voice and swallowing outcomes of an organ-preservation trial for advanced laryngeal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:1395-1399
4. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol* 1998;16:1310-1317
5. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 2003;349:2091-2098
6. Alden ME, O'Reilly RC, Topham A, Lowry LD, Brodovsky H, Curran WJ, Jr. Elapsed radiation therapy treatment time as a predictor of survival in patients with advanced head and neck cancer who receive chemotherapy and radiation therapy. *Radiology* 1996;201:675-680
7. Garden AS, Chambers MS. Head and neck radiation and mucositis. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007;1:30-34
8. Epstein JB, Beaumont JL, Gwede CK, et al. Longitudinal evaluation of the oral mucositis weekly questionnaire-head and neck cancer, a patient-reported outcomes questionnaire. *Cancer* 2007;109:1914-1922
9. Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol* 2007;5:3-11
10. Trotti A. Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:1-12
11. Plevova P. Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: a review. *Oral Oncol* 1999; 35:453-470
12. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med* 2004;351:2590-2598
13. Garden AS, Lewin JS, Chambers MS. How to reduce radiation-related toxicity in patients with cancer of the head and neck. *Curr Oncol Rep* 2006;8:140-145
14. Beaven AW, Shea TC. The effect of palifermin on chemotherapy and radiation therapy-induced mucositis: a review of the current literature. *Support Cancer Ther* 2007;4:188-197
15. Sukhotnik I, Shehadeh N, Coran AG, et al. Oral insulin enhances cell proliferation and decreases enterocyte apoptosis during methotrexate-induced mucositis in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47:115-122
16. Suemaru K, Cui R, Li B, et al. Topical application of royal jelly has a healing effect for 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamsters. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2008;30:103-106
17. Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;69:437-443
18. Dorr W, Spekl K, Martin M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. *Cell Prolif* 2002;35(Suppl 1):60-67
19. Ponnaiya B, Cornforth MN, Ullrich RL. Radiation-induced chromosomal instability in BALB/c and C57BL/6 mice: the difference is as clear as black and white. *Radiat Res* 1997;147: 121-125
20. Ullrich RL, Ponnaiya B. Radiation-induced instability and its relation to radiation carcinogenesis. *Int J Radiat Biol* 1998;74: 747-754
21. Okayasu R, Suetomi K, Yu Y, et al. A deficiency in DNA repair and DNA-PKcs expression in the radiosensitive BALB/c mouse. *Cancer Res* 2000;60:4342-4345

Abstract

Establishment of a Single Dose Radiation Model of Oral Mucositis in Mice

Seung-Hee Ryu, M.D.*, Soo-Young Moon, M.D.*, Eun Kyung Choi, M.D.*, Jong Hoon Kim, M.D.*,
Seung Do Ahn, M.D.*, Si Yeol Song, M.D.*, Jin-hong Park, M.D.*, Young Ju Noh, M.D.[†] and
Sang-wook Lee, M.D.*

*Department of Radiation Oncology, Asan Medical Center, College of Medicine, University of Ulsan, Seoul,

[†]Department of Radiation Oncology, Ulsan University Hospital, College of Medicine,
University of Ulsan, Ulsan, Korea

Purpose: Oral mucositis induced by radiotherapy to the head and neck area, is a common acute complication and is considered as the most severe symptom for cancer patients in the early stages of treatment. This study was proposed to establish the oral mucositis mouse model induced by a single dose of radiation for the facility of testing therapeutic candidates which can be used for the oral mucositis treatments.

Materials and Methods: Fifty-five BALB/c mice were divided into four groups: control, 16 Gy, 18 Gy, and 20 Gy. Oral mucositis was induced by a single dose of radiation to the head and neck using 6 MV x-Ray from linear accelerator. After irradiation, body weight and physical abnormalities were checked daily. Tongue tissues from all groups were taken on days 1, 2, 3, 5, 7, 9, and 14, respectively and H&E staining was conducted to examine morphological changes.

Results: Body weight dramatically decreased after day 5 in all irradiated mice. In the 16 Gy treatment group, body weight was recovered on day 14. The histology data showed that the thickness of the epithelial cell layer was decreased by the accumulated time after radiation treatment, up to day 9. Severe ulceration was revealed on day 9.

Conclusion: A single dose of 16 Gy is sufficient dose to induce oral mucositis in Balb/C mice. Significant changes were observed in the Balb/C mice on days 7 and 9 after radiation. It is suggested that this mouse model might be a useful standard tool for studying oral mucositis induced by radiation.

Key Words: Oral mucositis, Radiation, BALB/c mouse model, Epithelial thickness