

성장기 마우스에서 방사선 유도 골소실 동물모델 확립

장종식*, 문창중†, 김종춘†, 배춘식†, 강성수†, 정우희†, 조성기†, 김성호†

*경북대학교 생태환경대학, †전남대학교 수의과대학, ‡정읍방사선과학연구소

2014년 10월 30일 접수 / 2015년 1월 21일 1차 수정 / 2015년 1월 26일 채택

성장기 동물에서 방사선 노출은 뼈의 변화를 일으킨다. 본 연구에서는 성장기 동물에서 방사선 유도 골소실 연구를 위한 동물모델을 확립하고자하였다. 성장기(4주령) 마우스에 방사선 노출(2 Gy) 후 시간경과(4, 8 및 12주)에 따른 경골 해면뼈 및 치밀뼈의 변화를 관찰하고, 방사선 비노출군과의 차이가 확인한 방사선 노출 후 8주에 방사선(0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 Gy)을 조사하고 조사선량에 따른 변화를 관찰하였다. 동물의 희생 전 악력을 측정하였으며, 경골의 해면뼈 및 치밀뼈를 미세단층촬영 분석하였고, 해면뼈에서 뼈과괴세포의 활성도를 관찰하였다. 혈청내 alkaline phosphatase (ALP) 농도 및 경골의 물리적 강도를 측정하였다. 해면뼈의 확인한 차이는 8주에 관찰되었으며, 조사선량증가에 비례하여 해면뼈량(trabecular bone volume, BV/TV) 및 골밀도(bone mineral density, BMD)의 감소가 관찰되었다. 방사선조사선량에 따른 변화를 나타내는 이차방정식은 $BV/TV (\%) = 0.9584D^2 - 6.0168D + 20.377$ ($r^2 = 0.946$, $D =$ 방사선조사선량, Gy), $BMD(mg \cdot cm^{-3}) = 8.8115D^2 - 56.197D + 194.41$ ($r^2 = 0.999$, $D =$ 방사선조사선량, Gy) 였다. 뼈의 물리적 강도, 길이 및 무게의 변화는 없었으며, 혈청ALP 농도 및 뼈과괴세포 활성도도 차이가 없었다. 본 연구의 결과는 성장기 동물에서 방사선에 의한 뼈손상 연구에 동물모델 기초자료가 될 수 있을 것이다.

중심어: 방사선, 골소실, 동물모델, 성장기, 미세단층촬영

1. 서론

암의 진단 및 치료 의학의 발달에 따라 암환자의 장기 생존율이 증가하고 있으며, 이에 따른 특이적이고 만성적인 합병증이 발생된다[1]. 방사선 치료를 포함한 암치료는 정상조직에도 장해를 일으킨다[2]. 고선량 방사선 치료에 따른 뼈손상이 발생되고, 주된 증상은 뼈위축 또는 외형적인 위축없이 구성 기능성분이 감소하는 것이다. 몇 가지 주된 요인은 뼈기질, 구성세포 및 혈관 등의 변화가 방사선에 의한 손상과 연관되며, 이차적인 골절이 유발된다[3,4].

소아암 환자에서도 방사선 치료는 연부조직 암의 경우, 수술과 병용 치료요법 또는 외과적 처치가 곤란한 경우, 선택적 치료법으로 적용되고 있다[5]. 소아암 환자의 경우에도 암치료 기술의 발달에 따라 생존율이 증가하고 있으나 방사선 치료에 따른 부작용으로 사지발달 장애가 문제가 된다[6,7]. 성장장애, 사지의 비대칭 성장 및 병적골절 등이 방사선치료 부작용으로 나타나며 이는 성장판 및 주변 뼈의 손상과 연관 된다[8,9]. 소아 혈액암 환자의 경우에도 높은 완치율을 보이고 있으나, 이 또한 뼈손상을 수반하는 것으로 보고되고 있다[10,11].

동물실험모델은 골격생물학 연구 및 뼈손상과 골절의

기전적 연구에 통상적으로 적용된다. 그러나 방사선에 의한 뼈의 변화 연구는 아직 미진하며, 이를 위한 설치류에서의 방사선 유도 뼈변화 연구를 위한 동물모델의 확립이 필요하다. 골구조에 대한 연구는 골다공증 연구를 중심으로 조직형태학적으로 수행되어왔으며, 최근에는 방사선 영상을 이용한 연구가 보고되고 있다. 방사선학적 진단에는 단순방사선 소견, 골 주사 검사(bone scan), 전산화 단층촬영(computed tomography, CT), 자기공명영상(magnetic resonance imaging) 및 정량적 단층촬영(quantitative CT) 등이 있으며, 골밀도 측정법으로는 이중에너지 방사선흡수법, 정량적 전산화단층촬영 등이 적용되고 있다[12,13]. 효소분석을 통한 골표지자로는 뼈 파괴세포나 뼈 형성세포에서 분비하는 물질, 골흡수 및 골형성과정에서 유리되는 골의 기질성분 등이 골질 평가에 간접적으로 사용된다[14]. 동물실험에서 뼈에 대한 형태학적 관찰은 동물의 뼈 조직을 채취하여 탈회, 통상적 조직처리 과정을 거친 후 염색하고 현미경 검경하는 방법이다. 이러한 방법은 장기간 탈회에 의한 조직손상, 염색 불량 및 2차원적 평가 적용에서 절편 부위의 불균일성에 따른 결과의 왜곡 등이 단점으로 지적되고 있다[15]. X-선 단층촬영술은 영상진단적으로 광범위하게 적용되고 있다. 미세단층촬영(micro-computed tomography, μ CT)은 골미세구조의 3차원 정량화가 가능하고, 골질의 정확한 평가 지표를 제공하기 때문에 이를 이용한 2차원적 및 3

책임저자: 김성호, shokim@chonnam.ac.kr
광주광역시 북구 용봉동 300 번지, 전남대학교 수의학과

차원적으로 뼈를 분석하는 연구가 최근 증가하고 있다. μ CT는 5-50 μ m의 voxel로 일반 CT의 백만배의 공간적 세밀도(spatial resolution)가 매우 높은 영상을 제공함으로써 소형설치류의 골조직 변화를 비롯한 방사선 미세영상 연구 분야에 유용한 기기로 적용되고 있다[16].

본 연구에서는 방사선에 의한 성장기 동물에서의 뼈 변화를 관찰하기 위한 동물모델 확립을 하고자, 방사선 조사 후 시간경과에 따른 변화와 적정 시간에서 방사선 조사선량 증가에 대한 뼈의 변화를 골밀도와 3차원적 구조분석을 통해 관찰하고 결과를 성숙동물에서의 보고[17]와 비교분석하였다.

2. 재료와 방법

2.1 실험동물

4 주령의 암컷 C3H/HeN 마우스(오리엔트바이오, 성남, 한국)를 사용하였다. 동물의 사육은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간은 12시간(오전 8시 점등-오후 8시 소등) 및 조도 200-300 lux로 설정된 시설에서 수행하였다. 순화기간을 거쳐 polycarbonate 사육상자에 3마리씩 수용하였고 실험동물용 고품사료(삼양사료, 원주, 한국)와 정수장치를 통과한 수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animal'에 준하여 취급하였으며 동물실험은 전남대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

방사선 조사 후 경시적 변화 관찰을 위해 대조군 및 방사선 조사군(2 Gy)으로 나누고 방사선 조사 후 4주, 8주 및 12주에 변화를 관찰하였다. 방사선 조사선량 별 변화를 관찰하기 위하여 0, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 Gy의 방사선을 조사하고 전실험에서 선정된 최적 관찰 시점에 골변화를 평가하였다. 각 시간 및 조사선량 실험군은 군당 6마리로 하였다.

2.2 방사선 조사

방사선조사는 실험용 방사선 조사기(Gamma-cell Elan 3000, Nordion International, Ottawa, Canada)를 사용하여 ^{137}Cs 감마선(선량율: $2 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$)을 1회 전신조사 하였다.

2.3 악력(grasping power) 및 뼈굴절강도 분석(biomechanical analyses) 평가

안락사 직전에 인장력측정기(Iwoo-G-500, 이우과학, 서울, 한국)를 이용하여 악력을 측정하였다. 측정눈금을 영점으로 하고, 측정봉에 양쪽 앞발을 잡게 한 다음 꼬리를 서서히 안정되게 잡아당겨 앞발이 측정봉에서 떨어질 때의 최대 악력을 측정하였으며 3회 실시하여 평균값을 산출하였다. 경골의 골강도를 측정하기 위하여 삼중점 굴곡 시험을 시행하였다. 부하는 14 mm 간격으로 떨어진 두 지지점의 중간 부위에 주고 원위부로부터 7 mm 되는 지점이 부하점이 되도록 경골을 배치하고 내외축

(medial-lateral axis)을 기준으로 굴곡을 주었다. 부하-변위 곡선은 servo-hydraulic material testing machine (Instron LTD, Buckinghamshire, England)과 x-ray recorder (Hewlett Packard 7090A, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 $1 \text{ mm} \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 크로스헤드 속도로 측정된다. 최대부하는 하중이 걸렸을 때 경골이 골절되는 순간의 최대 응력을 말한다.

2.4 시료 채취 및 혈청생화학적 측정

실험동물은 정기적으로 일반 임상증상을 관찰하였으며 부검시 각각 체중을 측정하였다. 안락사 후 부검을 시행하고 좌측 경골의 무게를 측정하였다. 좌측 경골은 관절 용기에서 복사까지의 최대 길이를 측정 후, 골밀도 및 전산화 단층촬영 시까지 70% 에탄올에 보관하고, 우측 경골은 강도 검사에 적용하였다. 경골은 μ CT 촬영 후 탈회하고 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매 절편을 제작한 후 hematoxylin-eosin 염색 및 뼈과괴세포의 활성 관찰을 위해 Kopp 등의 방법[18]에 따라 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 실시하였다. 부검시 동물의 후대정맥에서 혈액을 채취하고 혈청을 분리하였으며, alkaline phosphatase (ALP)는 혈청생화학분석기(FDC 3500s, Fuji film, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다.

2.5 미세전산화단층촬영

시료의 단층 영상은 μ CT (Skyscan 1172; Skyscan, Kontich, Belgium)를 이용하여 다음과 같은 조건하에 채득하였다. 원추형 빔(cone beam) 방식의 x-ray source를 이용하여 50 kV, 200 μ A 하에서 시료에 방사선을 조사하였고, 이때 해상도(spatial resolution)는 17 μ m로 조절하였다. 시료를 0.4도씩 회전시키면서 매회 1.2초간 방사선을 조사하였으며, 촬영은 포커스 스폿(focus spot)에서 방사된 빔이 시료를 투과하여 charge-coupled devices (CCD) 카메라에 영상이 맺히는 원리를 이용하였다. 채득된 영상은 NRecon 소프트웨어(Skyscan, Kontich, Belgium)를 이용하여 150개의 2차원 횡단면으로 재구성되었고, 각 단면간의 거리는 80 μ m로 설정하였다. 경골의 미세구조는 2차원적으로 채득된 영상의 뼈 영역만을 적용하여 CTan 소프트웨어(Skyscan, Kontich, Belgium)로 분석하였다. 해면뼈의 분석은 성장판 아래에서 1.5 mm를 측정 대상으로 하였다. 재구성된 2차원 이미지로부터 치밀뼈(cortical bone)와 해면뼈를 구분하여 관심영역(region of interest, ROI)을 설정한 후, 각 부분의 bone volume / tissue volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb,Th), trabecular separation (Tb,Sp), trabecular number (Tb,N) 등의 양적 분석과 structure model index (SMI), trabecular bone pattern factor (Tb,Pf) 등의 구조적 파라미터(structural parameters) 값을 측정하였다. 해면뼈의 ROI의 설정은 해면뼈의 일부를 포함하는 원형 ROI를 설정하여 성적을 비교하였다. 골밀도(bone mineral density, BMD)는 0.25와 0.75 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 의 hydroxyapatite standard phantom에 대한 Hounsfield unit (HU) 값을 얻은 후, 측정하고자 하는 시료편의 HU 값을 계산식에 대

응시켜 구하였다. 치밀뼈는 해면뼈 소실 부위 아래부터 1.0 mm 를 측정대상으로 하였으며, bone volume (BV), polar moment of inertia (pMOI)의 값을 측정하였다.

2.6 자료통계 및 분석

모든 실험에서 얻어진 자료는 one-way ANOVA (the post-hoc Student-Newman-Keuls)의 방법으로 유의성 검사하였고, 그들의 수치는 평균 ± 표준편차의 값으로 나타났다. 또한 유의성은 p 값이 0.05보다 작을 때 그 값을 유의성이 있는 값으로 하였다.

3. 결과와 논의

마우스를 이용한 근골격계 질환에 대한 연구가 다수 보고되고 있으나 방사선 노출에 따른 뼈변화 연구는 미비한 실정이며, 특히 성장기 동물에서의 변화 연구는 매우 드물다. 본 연구에서는 4주령의 성장기 동물에서 방사선 노출 후 해면뼈, 치밀뼈 및 골밀도의 변화를 관찰하였다.

성장기 암컷 마우스(4주령)에 2 Gy의 감마선 조사 후 관찰 기간 별 변화 실험에서 약력은 4주에 방사선 조사군에서 유의성있게 감소하였으나 8주 및 12주에는 차이가 없었다(Table 1). 체중 및 경골의 무게 및 길이 지표 수치는 방사선 조사에 따른 균일한 변화는 인정되지 않았다(Table 2). 방사선 조사에 의한 혈청 내 ALP의 농도도 변

Table 1. Time-related Changes in Grip Strength after Gamma-irradiation with 2 Gy in 4-week-old Mice.

Group	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Sham	1.42±0.05	1.42±0.05	1.44±0.15
IR	1.24±0.03*	1.25±0.17	1.45±0.11

Data are expressed as means ± SD (n=6) of maximum load (N).

*P<0.05, vs sham group at corresponding times.

Table 2. Time-related Changes in Body Weight, Tibia Weight and Length after Gamma-irradiation with 2 Gy in 4-week-old Mice.

Time after irradiation	Body weight(g)	Tibia	
		Weight (mg)	Length (mm)
4 weeks			
Sham	20.5±1.6	40.0±2.2	17.7±0.5
IR	20.7±0.7	38.8±2.5	16.8±0.4*
8 weeks			
Sham	24.1±1.0	46.5±4.7	18.5±0.4
IR	24.7±1.5	40.8±2.9	18.0±0.5
12 weeks			
Sham	25.8±1.8	45.4±3.3	18.5±0.4
IR	26.2±2.5	43.2±3.3	18.1±0.4

Data are expressed as means ± SD (n=6).

*P<0.05, vs sham group at corresponding times.

Table 3. Time-related Changes in Serum Alkaline Phosphatase (ALP) after Gamma-irradiation with 2 Gy in 4-week-old Mice.

Group	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Sham	506.0 ± 38.2	414.3 ± 22.0	447.4 ± 95.1
IR	431.0 ± 91.0	366.5 ± 34.0	442.0 ± 22.8

Data (IU/L) are expressed as means ± SD (n=6).

Table 4. Time-related Changes in Trabecular and Cortical Bone Properties after Gamma-irradiation with 2 Gy in 4-week-old Mice Tibia.

Parameter	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Trabecular bone			
BV/TV (%)			
Sham	11.12±2.06	15.26±3.37	20.43±5.63
IR	8.66±1.74	8.95±2.15*	13.51±6.29
Tb.Th (μm)			
Sham	69.77±2.62	74.10±4.79	80.69±8.65
IR	69.35±1.86	64.93±2.52*	75.02±6.91*
Tb.N (1 · mm ⁻¹)			
Sham	1.59±0.29	2.04±0.33	2.50±0.45
IR	1.25±0.25	1.37±0.29*	1.76±0.65
Tb.Sp (μm)			
Sham	370±90	298±62	268±40
IR	426±69	390±67	388±121
Tb.Pf (1 · mm ⁻¹)			
Sham	14.63±2.28	11.08±2.91	5.92±3.47
IR	16.02±1.95	18.19±2.95*	10.19±4.31
SMI			
Sham	1.77±0.11	1.56±0.10	1.33±0.16
IR	1.82±0.09	1.85±0.11 †	1.50±0.19
BMD (mg · cm ⁻³)			
Sham	70±41	129±35	191±46
IR	67±32	70±29*	117±46
Cortical bone			
BV (mm ³)			
Sham	0.689±0.031	0.767±0.062	0.857±0.025
IR	0.704±0.075	0.767±0.049	0.815±0.089
pMOI (mm ⁴)			
Sham	0.259±0.034	0.277±0.012	0.321±0.023
IR	0.243±0.050	0.274±0.039	0.290±0.044

Data are expressed as means ± SD (n=6).

*P<0.05, †P<0.01, vs sham group at corresponding times and parameters. BV/TV: bone volume/tissue volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation; Tb.Pf: trabecular bone pattern factor; SMI: structure model index; BMD: trabecular volumetric mineral density; BV: bone volume; pMOI: polar moment of inertia.

화가 없었다(Table 3). 해면뼈 변화 관찰에서 감마선 조사 후 8주 부터 골소실의 변화가 나타났으며, BV/TV 및 BMD의 평균치 기준으로 비조사대조군에 비해 각각 41.3% 및 45.7%로 8주에 가장 높은 골소실의 결과를 보였다(Fig. 1, Table 4). 치밀뼈의 경우 전체 관찰 기간 중

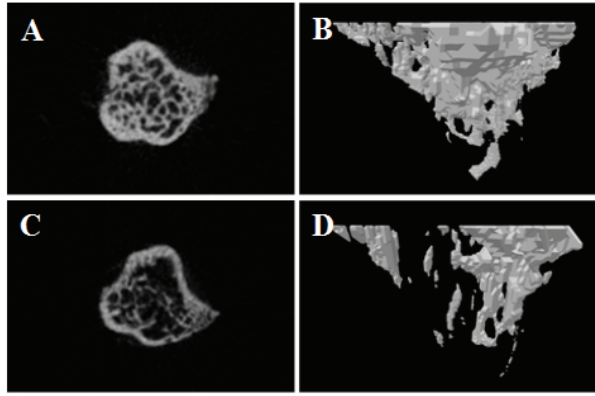


Fig. 1. Micro-CT images of the tibia for control (A, B) and irradiated (C, D) C3H/HeN mice. Sectional view (A, C) and reconstructed three-dimensional image (B, D).

Table 5. Dose-related Changes in Grip Strength at 8 Weeks after Gamma-irradiation in 4-week-old Mice.

Irradiation dose	Grip strength (N)
Sham	1,521±0,197
0.5 Gy	1,459±0,207
1.0 Gy	1,324±0,101
2.0 Gy	1,613±0,132
4.0 Gy	1,592±0,142

Data are expressed as means ± SD (n=6).

Table 6. Dose-related Changes in Body Weight, Tibia Weight and Length at 8 Weeks after Gamma-irradiation in 4-week-old Mice.

Irradiation dose	Body weight (g)	Tibia	
		Weight (mg)	Length (mm)
Sham	26,3±1,3	50,0±6,6	19,1±0,6
0,5 Gy	25,9±1,9	46,4±2,6	18,7±0,4
1,0 Gy	26,1±1,4	51,4±4,4	18,8±0,3
2,0 Gy	25,6±1,7	45,2±2,6	18,8±0,4
4,0 Gy	24,9±1,9	46,0±6,1	18,7±0,6

Data are expressed as means ± SD (n=6).

Table 7. Dose-related Changes in Serum Alkaline Phosphatase (ALP) Levels at 8 Weeks after Gamma-irradiation in 4-week-old Mice.

Irradiation dose	ALP (IU/L)
Sham	500 ± 41
0.5 Gy	453 ± 104
1.0 Gy	418 ± 71
2.0 Gy	473 ± 30
4.0 Gy	475 ± 36

Data are expressed as means ± SD (n=6).

차이는 없었다.

각 선량의 방사선을 조사하고 8주 후 뼈 변화관찰 실험에서, 악력, 체중, 경골의 무게 및 길이는 방사선 조사선량 증가에 의존적인 변화는 없었다(Table 5-6). 골모세포의 활성을 나타내는 혈청 ALP 수치에서 방사선 조사선량

에 의존적 변화는 없었다(Table 7). 해면뼈 변화 관찰에서 1 Gy부터 다수의 지표가 골소실의 변화를 나타냈으며, BV/TV 및 BMD의 평균치 기준으로 비조사대조군에 비해 각각 31.8% 및 25.1% 골소실의 결과를 보였으며, 방사선 조사선량 증가에 따라 급격히 변화하였다. 치밀뼈의 경우 조사선량의존적 변화는 없었다(Table 8). 방사선 조사에 따른 선량-반응식을 산출한바, linear-quadratic curve에 가장 높은 일치도를 나타냈다. 최적 일치 곡선은 아래와 같다. D는 방사선 조사량(Gy)을 나타낸다.

$$BV/TV (\%) = 0,9584D^2 - 6,0168D + 20,377 \quad (r^2 = 0,9461)$$

$$BMD (mg \cdot cm^{-3}) = 8,8115D^2 - 56,197D + 194,41 \quad (r^2 = 0,9997)$$

뼈과괴세포의 활성 관찰을 위해 TRAP 염색 후 뼈과괴세포 양성 길이 측정에서 비조사 대조군은 약 36%의 양성을 나타냈으며, 방사선 조사선량에 따른 변화는 없었다(Table 9).

최근 μ CT를 적용한 영상채득 기술의 발달에 따라 소형 실험동물에서의 뼈 미세구조의 양적 측정이 가능하게 되었다. 소형설치류를 이용한 연구는 유전적 특성과 다수의 정보를 바탕으로 많은 연구에 적용되고 있으며, 유전적 차이, 성별, 불용성 및 노화에 의한 뼈의 변화 등 각종 연구에 좋은 실험모델로 적용되고 있다[19,20].

2 Gy 감마선 조사 후 시간경과에 따른 변화 관찰 실험에서 8주 후의 악력, 골의 육안 해부학적 변화 지표는 변화가 없었으며, ALP도 방사선 조사에 의한 변화는 없어 민감 지표로 판단되지 않는다. 해면뼈에서는 감마선 조사 후 8주부터 다수의 지표에서 유의성 있는 골소실이 발생되는 것으로 관찰되었다. 치밀뼈의 변화는 관찰되지 않았으며 대부분 해면뼈의 변화를 지표의 기준으로 판단하고 있어[21], 방사선 노출 후 시간경과에 따른 변화 관찰 결과를 분석하면 성장기동물의 방사선에 의한 골소실 관찰 시점은 방사선 조사 후 8주가 적절한 것으로 사료되었다. 방사선 노출 후 12주에 가장 높은 골소실을 나타낸 성숙동물에서의 보고[17]와 비교하면, 성장기 동물에서는 보다 초기에 골소실이 발생되는 것으로 사료되었다.

각 선량의 방사선 조사후 8주 관찰 실험에서 악력, 골의 육안 해부학적 변화 지표는 변화가 없었으며, 혈청 ALP도 조사선량의존적 변화는 없어 민감 지표로 판단되지 않았다. 해면뼈 변화 관찰에서 1 Gy부터 다수의 지표가 골소실의 변화를 나타냈으며 조사선량의존적 결과를 보였다. 치밀뼈의 변화가 없어 해면뼈의 변화가 방사선에 의한 골소실의 판단 지표가 될 수 있다고 사료된다. 본 연구의 기간에서는 뼈과괴세포의 활성 변화는 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 성장기동물에서 방사선에 의한 골소실은, 2 Gy 이상 선량에서 유의성 있는 변화를 보인 성숙동물[17]에 비해 적은 선량인 1 Gy 이상의 선량 조사후에서 8주에 관찰하는 방법이 추후 방사선 골소실 관련 연구에 성장기 동물실험모델로서 적용 가능할 것으로 판단된다.

Table 8. Dose-related Changes in Trabecular and Cortical Bone Properties at 8 Weeks after Gamma-irradiation in 4-week-old Mice Tibia.

Parameter	Irradiation dose (Gy)				
	Sham	0,5	1,0	2,0	4,0
Trabecular bone					
BV/TV (%)	20.4±1.98	18.37±0.84	13.91±2.27*	12.89±0.30*	11.54±3.17*
Tb.Th (μm)	87.56±10.28	82.12±4.64	72.06±2.50 [†]	75.97±6.31	71.46±3.46*
Tb.N (1 · mm ⁻¹)	2.37±0.44	2.24±0.10	1.93±0.29	1.71±0.15 [†]	1.61±0.38 [†]
Tb.Sp (μm)	267.09±35.15	288.10±30.24	308.83±37.93	328.36±45.19 [†]	297.02±56.72
Tb.Pf (1 · mm ⁻¹)	7.27±2.64	7.80±1.56	12.58±3.12 [†]	12.94±1.53*	14.99±3.80*
SMI	1.46±0.26	1.45±0.1	1.67±0.18	1.72±0.12	1.76±0.21
BMD(mg · cm ⁻³)	195±19	168±8 [†]	146±30 [†]	118±17*	110±29*
Cortical bone					
BV (mm ³)	0.816±0.061	0.845±0.092	0.804±0.069	0.798±0.083	0.836±0.069
pMOI (mm ⁴)	0.312±0.030	0.302±0.034	0.295±0.038	0.284±0.031	0.283±0.027

Data are expressed as means ± SD (n=6).

*P<0.01, [†]P<0.05, vs sham group at corresponding times and parameters.

BV/TV: bone volume/tissue volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.N: trabecular number; Tb.Sp: trabecular separation; Tb.Pf: trabecular bone pattern factor; SMI: structure model index; BMD: trabecular volumetric mineral density; BV: bone volume; pMOI: polar moment of inertia.

Table 9. Dose-related Changes in Osteoclast Surface as a Percentage of Total Bone Surface (Oc.S/BS) at 8 Weeks after Gamma-irradiation in 4-week-old Mice.

Irradiation dose (Gy)	Oc.S/BS
0	35.58±5.95
0,5	27.83±13.26
1	49.93±9.36
2	46.79±7.32
4	33.55±12.10

Data are expressed as means ± SD (n=6).

방사선 노출 후 골소실이 뼈모세포의 손상 또는 뼈파괴세포의 활성 증가에 의한 반응이라는 보고[22,23]에 따라 본 연구에서 혈청내 ALP 농도와 TRAP 양성범위를 측정할 바, ALP 수치의 감소 또는 뼈파괴세포의 활성 증가가 8주 관찰 시점에는 인정되지 않아 뼈파괴세포의 활성 증가에 의한 골소실 또는 뼈모세포의 활성 감소에 의한 골소실의 검증은 해면뼈 구조 변화 관찰 시점 이전의 기간 설정이 필요할 것으로 사료된다.

일부 인체 역학연구에서 악력이 골질의 변화와 상관관계를 나타낸다는 보고[24]에 따라 본 연구에서 적용한 바 실험군간에 차이가 인정되지 않아 동물실험에서의 지표로는 부적절하다고 판단되며, 물리적 강도 측정법도 차이가 없어, 치밀뼈에서의 차이가 인정되지 않은 결과와 같은 경향이였다.

4. 결론

성장기마우스(4주령)에서 방사선 노출에 따라 경골해면뼈의 양적 골소실이 나타났으며, BV/TV 및 BMD는 2 Gy의 방사선 노출 후 8주에 가장 감소된 수치를 나타냈

고, 방사선 노출 선량에 비례하는 골소실을 나타냈다. 결론적으로 1 Gy 이상의 선량 조사 후에서 8주에 관찰하는 방법이 추후 방사선 골소실 관련 연구에 성장기 동물실험 모델로서 적용 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 경북대학교 학술연구비 및 교육과학기술부의 재원으로 시행하는 한국과학재단의 원자력 기술개발사업에 의하여 연구되었으며 동물실험은 전남대학교 동물의학연구소의 지원협조를 받았고 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robison LL. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *New Engl J Med.* 2006;355:1572-1582.
- Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2009;16:130-143.
- Ergün H, Howland WJ. Postradiation atrophy of mature bone. *CRC Crit Rev Diagn. Imaging.* 1980;12:225-243.
- Chen HH, Lee BF, Guo HR, Su WR, Chiu NT. Changes in bone mineral density of lumbar spine after pelvic radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2002;62:239-242.
- Merchant TE, Kushner BH, Sheldon JM, LaQuaglia M, Healey JH. Effect of low-dose radiation therapy

- when combined with surgical resection for Ewing sarcoma. *Med Pediatr Oncol.* 1999;33:65-70.
6. Koscielniak E, Morgan M, Treuner J. Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management. *Paediatr. Drugs.* 2002;4:21-28.
 7. Wall JE, Kaste SC, Greenwald CA, Jenkins JJ, Douglass EC, Pratt CB. Fractures in children treated with radiotherapy for soft tissue sarcoma. *Orthopedics.* 1996;19:657-664.
 8. Damron TA, Margulies B, Strauss J, Spadaro J, Farnum CE. Sequential histomorphometric changes following irradiation of the growth plate with and without radioprotectant. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:1302-1313.
 9. Margulies B, Morgan H, Allen M, Strauss J, Spadaro J, Damron T. Increased bone density following irradiation and the radioprotectant drug amifostine in a rat model. *Am J Clin Oncol.* 2003;26:e106-e114.
 10. Tabone MD, Leverger G. Outcome of children cured of acute lymphoblastic leukemia. *Bull Acad Natl Med.* 2009;193:1519-1528.
 11. Alves CH, Kuperman H, Dichtchekenian V, Damiani D, Della Manna T, Cristófani LM, Odone Filho V, Setian N. Growth and puberty after treatment for acute lymphoblastic leukemia. *Rev Hosp Clin Fac. Med. Sao. Paulo.* 2004;59:67-70.
 12. Mayo-Smith W, Rosenthal DI. Radiographic appearance of osteopenia. *Radiol Clin N Am.* 1991;29:37-47.
 13. Blake GM, Fogelman I. Bone densitometry and the diagnosis of osteoporosis. *Semin Nucl Med.* 2001;31:69-81.
 14. Eastell R, Hannon RA. Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proc Nutr Soc.* 2008;67:157-162.
 15. Kim SJ, Kim KW, Lee JH. A study on the trabecular change of femur according to 17β -estradiol dosage in ovariectomized rat. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2000;22:155-163.
 16. Guldberg RE, Lin AS, Coleman R, Robertson G, Duvall C. Microcomputed tomography imaging of skeletal development and growth. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72:250-259.
 17. Lee JH, Lee HJ, Yang M, Moon C, Kim JC, Jo SK, Jang JS, Kim SH. Establishment of a murine model for radiation-induced bone loss using micro-computed tomography in adult C3H/HeN mice. *Lab Anim Res.* 2013;29:55-62.
 18. Kopp HG, Hooper AT, Shmelkov SV, Rafii S. Beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histol Histopathol.* 2007;22:971-976.
 19. Beamer WG, Donahue LR, Rosen CJ, Baylink DJ. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. *Bone.* 1996;18:397-403.
 20. Bower AL, Lang DH, Vogler GP, Vandenberg DJ, Blizzard DA, Stout JT, McClearn GE, Sharkey NA. QTL analysis of trabecular bone in BXD F2 and RI mice. *J Bone Miner Res.* 2006;21:1267-1275.
 21. Bandstra ER, Pecaut MJ, Anderson ER, Willey JS, De Carlo F, Stock SR, Gridley DS, Nelson GA, Levine HG, Bateman TA. Long-term dose response of trabecular bone in mice to proton radiation. *Radiat Res.* 2008;169:607-614.
 22. Willey JS, Lloyd SA, Robbins ME, Bourland JD, Smith-Sielicki H, Bowman LC, Norrdin RW, Bateman TA. Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. *Radiat Res.* 2008;170:388-392.
 23. Willey JS, Lloyd SA, Nelson GA, Bateman TA. Ionizing Radiation and Bone Loss: Space Exploration and Clinical Therapy Applications. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2011;9:54-62.
 24. Bhattacharya A, Watts NB, Davis K, Kotowski S, Shukla R, Dwivedi AK, Coleman R. Dynamic bone quality: a noninvasive measure of bone's biomechanical property in osteoporosis. *J Clin Densitom.* 2010;13:228-236.

Establishment of a Murine Model for Radiation-induced Bone Loss in Growing C3H/HeN Mice

Jong-Sik Jang*, Changjong Moon†, Jong-Choon Kim†, Chun-Sik Bae†, Seong-Soo Kang†, Uhee Jung‡, Sung-Kee Jo,† and Sung-Ho Kim†

*College of Ecology and Environmental Science, Kyungpook National University

†College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

‡Advanced Radiation Technology Institute

Abstract - Bone changes are common sequela of irradiation in growing animal. The purpose of this study was to establish an experimental model of radiation-induced bone loss in growing mice using micro-computed tomography (μ CT). The extent of changes following 2 Gy gamma irradiation ($2 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$) was studied at 4, 8 or 12 weeks after exposure. Mice that received 0.5, 1.0, 2.0 or 4.0 Gy of gamma-rays were examined 8 weeks after irradiation. Tibiae were analyzed using μ CT. Serum alkaline phosphatase (ALP) and biomechanical properties were measured and the osteoclast surface was examined. A significant loss of trabecular bone in tibiae was evident 8 weeks after exposure. Measurements performed after irradiation showed a dose-related decrease in trabecular bone volume fraction (BV/TV) and bone mineral density (BMD), respectively. The best-fitting dose-response curves were linear-quadratic. Taking the controls into accounts, the lines of best fit were as follows: $\text{BV/TV (\%)} = 0.9584\text{D}^2 - 6.0168\text{D} + 20.377$ ($r^2 = 0.946$, D = dose in Gy) and $\text{BMD (mg} \cdot \text{cm}^{-3}\text{)} = 8.8115\text{D}^2 - 56.197\text{D} + 194.41$ ($r^2 = 0.999$, D = dose in Gy). Body weight did not differ among the groups. No dose-dependent differences were apparent among the groups with regard to mechanical and anatomical properties of tibia, serum ALP and osteoclast activity. The findings provide the basis required for better understanding of the results that will be obtained in any further studies of radiation-induced bone responses.

Keywords : Radiation, Bone loss, Murine model, Growing animal, Microcomputed tomography