

흰쥐 침샘의 방사선조사시 Apoptosis에 대한 Diltiazem과 Pentoxifylline의 효과

인제대학교 의과대학 방사선종양학교실

양 광 모 · 서 현 숙

The Effects of Diltiazem and Pentoxifylline on Apoptosis of Irradiated Rat Salivary Gland

Kwang Mo Yang M.D. and Hyun Suk Suh M.D.

Department of Radiation Oncology, Inje University Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea

Purpose : Xerostomia is a complication met by almost all patients who have radiotherapy for cancers of head and neck. Many studies for prevention of xerostomia will be necessary. Radiation-induced acute response of salivary glands has been defined as interphase death or apoptosis. Increased intracellular calcium level have an important role in radiation-induced apoptosis. Calcium channel blocker may prevent radiation-induced apoptosis of salivary glands. This study was designed to evaluate the effectiveness of diltiazem known as calcium channel blocker and pentoxifylline with inhibition of inflammatory response on the apoptosis as an acute response of radiation in rat salivary glands.

Materials and Methods : Sprague-Dawley rats with about body weight 200-250 g were divided into 5 study groups : control, radiation alone, diltiazem with radiation, pentoxifylline with radiation, and diltiazem and pentoxifylline with radiation. The diltiazem and pentoxifylline were injected intraperitoneally 20 mg/kg and 50 mg/kg, 30 and 20 minute before irradiation, respectively. Irradiation was given with a 4 MV linear accelerator. The 1600 cGy of radiation was delivered in a single fraction through a single anterior portal encompassing the entire neck. After 24 h of irradiation, rats were sacrificed and parotid and submandibular glands were removed and stained with hematoxylin and eosin. The quantification of apoptosis was performed by microscopic examination of stained tissue sections at a magnification of 200X and the percentage of apoptotic cell was calculated.

Results : In parotid glands, the percentage of apoptosis by radiation alone, diltiazem with radiation, pentoxifylline with radiation, and diltiazem and pentoxifylline with radiation were 1.72% (8.35/486), 0.64% (2.9/453), 0.23% (1.2/516), and 0.28% (1.1/399), respectively. The apoptosis was markedly reduced in the groups receiving drugs compared with groups receivinge.

radiation alone ($p < 0.05$). In serous cell of submandibular glands, the percentages of apoptosis of radiation alone, diltiazem with radiation, pentoxifylline with radiation, and diltiazem and pentoxifylline with radiation were 1.94% (11/567), 0.34% (1.9/554), 0.28% (1.8/637), and 0.22% (1.3/601), respectively. In the mucus cell of submandibular glands, the percentages of apoptosis were 0.92% (5.1/552), 0.41% (2.5/612), 0.29% (1.3/455), and 0.18% (1.0/562), respectively. The apoptosis was markedly reduced in the serous glands ($p < 0.05$), but there was no difference in development of apoptosis in each group of mucus gland.

Conclusion : These results suggest that radiation-induced apoptosis of serous cells of salivary glands may be decreased by diltiazem and pentoxifylline administration.

Key Words : Salivary gland, Radiation-induced apoptosis, Diltiazem, Pentoxifylline, Xerostomia

서 론

방사선 치료는 두경부 종양의 치료에 가장 보편적으로 사용되는 치료 방법이다. 두경부에 방사선 조사를 받는 경우, 침샘 전체 혹은 일부의 방사선 조사는 피할 수 없다. 따라서 두경부에 방사선 조사를 받은 대부분의 환자들은 구강 건조증의 심각한 부작용을 겪을 수 있다. 이와 같은 방사선에 의한 구강 건조증은 방사선을 받은 침샘의 용적과 침샘에 조사된 방사선량에 따라 그 정도가 달라진다.¹⁻⁴⁾ 구강 건조증이 발생하면 구강의 불편감과 동통을 유발하고 빈번한 구강 감염과 침의 정상변화(점액성, 산성)를 일으켜 충치의 발생이 높고, 저작, 연하, 대화에 장애를 유발시켜 결국 삶의 질을 저하시키게 된다. 방사선에 의한 구강 건조증은 적절한 방사선 치료 계획으로 최소한의 방사선이 최소한의 침샘에 조사되도록 하여 구강 건조증 발생을 예방하는 것이 가장 중요하다. 그러나 구강 건조증이 발생한 경우 인공타액 및 침샘 자극제 등이 사용되고 있다. 그러나 인공 타액은 일생 동안 수시로 사용해야 하는 불편함이 있고, 침샘 자극제로 pilocarpine hydrochloride, bromehexine bethanechol chloride, potassium iodide, neostigmine 등이 사용되나, 이들 약제는 약제에 반응할 수 있는 충분한 정도의 정상 침샘 세포가 존재하여야만 효과를 발휘할 수 있다. 따라서 방사선에 의한 구강 건조증은 침샘 세포 실질의 소실에 의한 침의 생성이 없거나 미미하기 때문에 발생하는 것으로서 침샘 세

포 실질의 감소를 직접 막을 수 있는 방법을 개발하여야 한다.

방사선에 의한 침샘 세포 실질의 소실 기전은 정상 침샘 조직의 세포 특성을 고려 할 때 세포의 유사 분열(mitosis)에 의해서 보다는 침샘 세포의 간기 사망(interphase death) 혹은 apoptosis에 의한다는 보고가 많다.⁵⁻⁹⁾ 그리고 방사선에 의한 apoptosis는 세포내의 칼슘농도의 증가와 관련이 있다는 연구 결과들이 있다.^{10,11)} 따라서 칼슘통로 차단제로 세포내 칼슘농도 증가를 억제하면 apoptosis에 의한 침샘 실질 세포의 소실을 방지할 수 있을 것이며 결국 방사선에 의한 구강 건조증을 예방할 수 있을 것이다.

본 연구는 칼슘통로 차단제인 diltiazem과 혈류개선제로써 방사선에 의한 급성반응을 완화시킬 수 있는 pentoxifylline을 사용하여 방사선에 의한 침샘의 급성반응으로 발생하는 apoptosis에 대한 효과를 실험하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

체중이 약 200-250g 인 흰쥐 10마리를 사용하여 대조군, 방사선조사 단독군, 방사선조사 전 diltiazem 혹은 pentoxifylline 투여군, 방사선조사 전 diltiazem과 pentoxifylline의 병합 투여군으로 나누었고 각군에 2마리씩 배정하였다. 흰쥐는 적절한 온도, 습도 및 환기가 잘 유지되는 방에서 사육되었으며 상품화된 사료를 먹었다.

2. 약물투여

한일약품의 diltiazem(Herben[®]주) 50mg을 5ml의 증류수에 용해시켜 방사선조사 30분전에 흰쥐 체중 kg 당 20mg을 복강내 주사하였다. diltiazem의 용량은 정맥주사시 50% 치사량(LD50)이 흰쥐 체중 kg 당 39mg임을 고려하여 50% 치사량의 반을 사용하였다.¹²⁾

한독약품의 pentoxifylline(Trental[®])을 방사선조사 20분전에 흰쥐 체중 kg 당 50mg을 복강내 주사하였다. pentoxifylline의 용량은 방사선에 의한 급성 및 만성 부작용에 대한 연구에서 인용하였다.^{13, 14)}

3. 방사선조사

Ketamine을 흰쥐 체중 kg 당 100mg을 복강내 주사하여 마취시켜서 방사선 조사시 움직이지 않도록 아크릴판에 고정시켰다. 두경부가 방사선 조사야에 포함되도록 하고 그 외 부분은 차폐하였다. 방사선은 SSD(Source Surface Distance) 63cm로 하여 깊이 1.5cm에 전방 단문 조사로 1600cGy를 1회에 조사하였다. 균일한 선량분포를 얻기 위해 0.5cm 두께의 bolus를 이하선 부위의 피부 표면에 사용하였다.

본 연구에서 조사된 방사선량은 인체보다 흰쥐의 침샘이 방사선에 저항성이 있기 때문에 분명한 apoptosis를 유발시키기 위해서는 충분한 방사선량이 조사되어야 한다는 연구 결과를 인용하여 1600cGy의 방사선량을 선택하였다.¹⁵⁾

4. 조직표본

흰쥐를 방사선조사 후 24시간에 마취제인 ketamine을 복강내 과용량을 주사하여 희생시킨 후 양측 귀 아래 이하선과 턱 아래 악하선을 제거하였다. 이들을 광학현미경 관찰을 위해 10% 중성 완충 포르말린액에 24시간 동안 고정하였다. 포르말린에 고정된 침샘 조직을 통상적인 방법으로 파라핀 블록을 만들고 3 μ m두께로 절편을 만들어 표본 슬라이드를 제작한 후 H & E 염색을 시행하였다.

5. Apoptosis의 정량화

각 조직 표본을 200배율의 광학 현미경하에서 무작위로 10-20곳을 선택하여 각 현미경 시야당 전체 장액성 혹은 점액성 세포의 수(T)를 측정하여 평균을 구하고 apoptotic body를 가지는 세포수(A)의 평균을 구하여 apoptosis의 백분율(A/T \times 100)을 구하였다.

6. 통계

각 군에서 apoptosis 발생의 백분율을 χ^2 test를 이용하여 95% 신뢰구간에서 유의성을 비교하였다.

결 과

방사선과 약제 투여를 받지 않은, 대조군에서 장액성 세포로 구성된 이하선의 apoptosis 백분율은 0.06%(0.3/509)이었다. 이하선에서 방사선조사 단독군과 diltiazem, pentoxifylline 단독 혹은 약제 병합 투여군에서 관찰된 현미경 시야의 전체 평균 세포 수는 각각 486, 453, 516, 399개였으며 apoptotic body의 현미경 시야당 평균수는 각각 8.35, 2.9, 1.2, 1.1개가 관찰되어 apoptosis 백분율은 각각 1.72%, 0.64%, 0.23%, 0.28%이었다(Table 1). 방사선조사 단독군에 비해 약제 투여군에서 통계적으로 의미 있게 apoptosis의 발생 빈도가 감소함을 보였다($p < 0.05$). 그러나 diltiazem과 pentoxifylline 단독 혹은 병합 투여군의 비교에서는 apoptotic body의 발생에 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다. Fig. 1은 이하선에서 방사선조사 단독, diltiazem, pentoxifylline, 두약제의 병합 투여군의 광학현미경 소견을 보여준다.

악하선에서 정상 대조군의 장액성과 점액성 세포의 apoptosis 백분율은 각각 0.06%(0.3/509)와 0.05%(0.3/616)이었다. 악하선의 장액성 세포에서 방사선조사 단독, diltiazem, pentoxifylline 단독 혹은 diltiazem과 pentoxifylline 병합 투여군에서 현미경 시야당 관찰된 평균 장액성 세포 수는 각 군에서 567, 554, 637, 601개였으며 apoptotic body의 평균수는 각각 11, 1.9, 1.8, 1.3개가 관찰되어 apoptosis의 백분율은 각각 1.94%, 0.34%, 0.28%, 0.22%이었다(Table 2). 방사선조사 단독 군과 약제 투여군의 비교

Table 1. Incidence of Apoptotic Body in Parotid Glands

	A/T	%	p-value
Control	0.3 /509	0.06	
RT	8.35/486	1.72	
RT+D	2.9 /453	0.64	<0.05 ¹⁾
RT+P	1.2 /516	0.23	<0.05 ²⁾
RT+D+P	1.1 /399	0.28	<0.05 ³⁾

RT : Radiation, D : Diltiazem, P : Pentoxifylline
A/T : No. of apoptotic body / Total No. of cells.

p-value : ¹⁾ RT vs RT+D, ²⁾ RT vs RT+P, ³⁾ RT vs RT+D+P

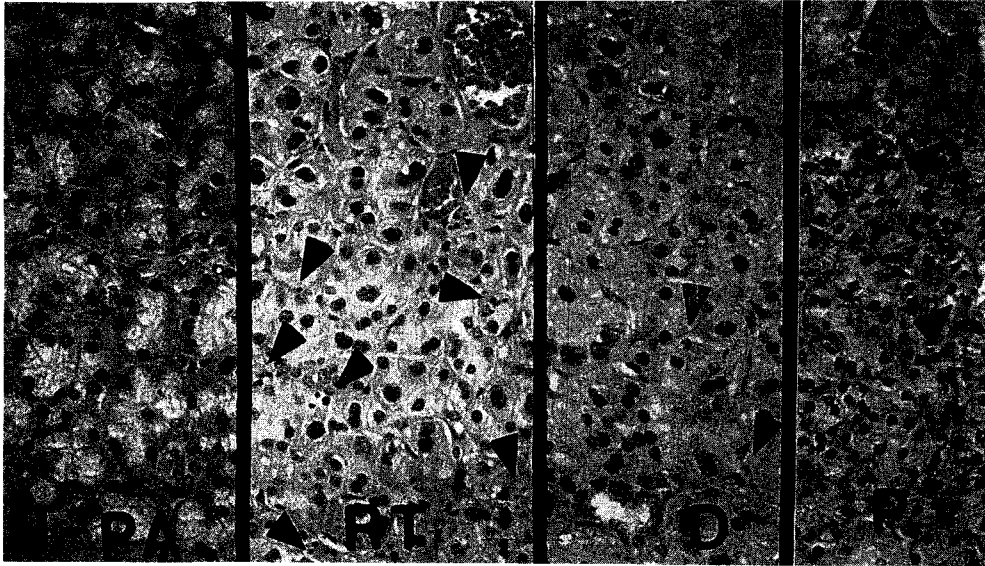


Fig. 1. Sections of parotid gland
 N-PA: Normal serous parotid gland, RT: Irradiated parotid gland,
 D: Diltiazem administrated parotid gland,
 P: Pentoxifylline administrated parotid gland
 (▶ : apoptotic body).

Table 2. Incidence of Apoptotic Body in Sub-mandibular Glands (serous glands)

	A/T	%	p-value
Control	0.3/509	0.06	
RT	11/567	1.94	<0.05 ¹⁾
RT+D	1.9/554	0.34	<0.05 ²⁾
RT+P	1.8/637	0.28	<0.05 ³⁾
RT+D+P	1.3/601	0.22	

RT: Radiation, D: Diltiazem, P: Pentoxifylline
 A/T: No. of apoptotic body / Total No. of cells.
 p-value : ¹⁾ RT vs RT+D, ²⁾ RT vs RT+P,
³⁾ RT vs RT+D+P

Table 3. Incidence of Apoptotic body in Sub-mandibular Glands (mucus glands)

	A/T	%	p-value
Control	0.3/616	0.05	
RT	5.1/552	0.92	
RT+D	2.5/612	0.41	<0.05 ¹⁾
RT+P	1.3/455	0.29	<0.05 ²⁾
RTD+P	1.0/562	0.18	<0.05 ³⁾

RT: Radiation, D: Diltiazem, P: Pentoxifylline
 A/T: No. of apoptotic body / Total No. of cells.
 p-value : ¹⁾ RT vs RT+D, ²⁾ RT vs RT+P,
³⁾ RT vs RT+D+P

에서 약제의 종류에 관계없이 약제 투여군에서 통계적으로 의미 있게 apoptotic body의 발생 빈도가 감소함을 보였다($p < 0.05$). 그러나 약제 투여군 간의 비교에서는 통계적으로 의미있는 차이를 보이지 않았고, 특히 diltiazem과 pentoxifylline의 병합 투여군에서 apoptotic body의 발생 빈도가 가장 낮았으나 통계적인 차이가 없었다. 악하선의 점액성 세포에서 방사선 조사 단독, diltiazem, pentoxifylline 단독 혹은 diltiazem과 pentoxifylline의 병합 투여군에서 현미경 시야당 관찰된 평균 점액성 세포의 수는 각 군에서 552, 612, 455, 562개였으며 평균 apoptotic body의 수는 각 군에서 5.1, 2.5, 1.3, 1.0개였고 apoptosis

백분율은 각각 0.92%, 0.41%, 0.29%, 0.18%였다 (Table 3). 방사선조사 단독군과 약제 투여군의 비교에서 apoptotic body의 발생 빈도는 통계적으로 의미 있는 감소를 보이지 않았다. 악하선의 장액성과 점액성 세포에서 방사선조사 단독군의 경우 각 세포에서 apoptotic body의 발생은 현미경 시야당 평균 각각 11개와 5.1개, apoptosis 백분율은 각각 1.94%, 0.92%로 장액성 세포에서 apoptotic body가 많이 발생하였으나 통계적인 차이는 없었다 (Table 2, 3).

고 찰

침샘 세포가 방사선 조사에 의해 소실되는 기전은 명백하게 밝혀져 있지 않으나 첫째 미세혈관의 손상에 의한 침샘 조직의 허혈성 손상(ischemic injury), 둘째 침샘 조직의 자가면역적 파괴, 셋째 침샘 세포 특히 방사선에 민감한 장액성 세포의 간기사망(interphase death) 혹은 apoptosis에 의한 직접 손상 등과 같은 몇 가지 가능성이 제시되고 있다.^{1, 16)} 그러나 위에서 제시된 기전중, 방사선을 받은 직후 침샘의 종창, 침 분비의 감소 같은 급성 임상증상과 손상으로 인한 세포의 감소가 있을 때 분열하는 감수분열 후 환원 세포(postmitotic reverting cell)인 침샘세포의 특징과 급성 병리소견을 고려할 때 방사선에 의한 침샘 세포의 치사가 apoptosis에 의한 것이라는 여러 연구 결과가 보고되었다.^{5-9, 16)} 따라서 방사선의 급성반응으로 발생하는 apoptosis를 억제하는 것이 방사선조사 후 초기에 발생하는 침샘 세포의 소실을 막을 수 있을 것이다.

apoptosis는 세포 괴사(necrosis)와 다른 세포의 특징적인 구조적 변화를 보이는 세포치사의 한 형태로 정상 상태에서나 혹은 면역학적 반응, 항암제, 호르몬, 방사선등과 같은 다양한 자극에 의해 발생할 수 있다. 특히 침샘의 장액성 세포는 방사선에 민감하여 apoptosis가 잘 일어난다고 보고되고 있다.^{8, 17, 18)} 방사선에 의해 apoptosis가 일어나는 기전은 완전히 밝혀져 있지 않고 여러 요소들이 복합적으로 작용하는 것으로 이해되고 있다. 그러나 기본적으로는 방사선이 세포의 DNA와 지질막에 손상을 주게 되고,¹⁹⁾ 이것이 신호가 되어 종양 유전자와 종양억제 유전자에 영향을 미치고 세포내 칼슘이온의 농도를 증가시키게 되며 세포내 칼슘이온의 증가가 bcl-2 유전자에 영향을 미쳐 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ 이와 같은 기전은 세포내 칼슘 킬레이트(chelator)인 acetoxymethyl-1, 2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N',N',N'-tetra acetic acid(AM- BAPTA)를 이용한 연구에서, 방사선에 의해 세포내 칼슘농도가 증가하고 apoptosis 발생이 빈번하였으나 세포내 칼슘 킬레이터의 존재로 세포내 칼슘농도가 감소되면 apoptosis 발생이 억제된다는 것이 확인되었다.^{10, 20)} 그리고 칼슘통로의 차단제인 diltiazem을 사용하여 방사선에 의한 세포 치사를 방지하였다는 연구 보고가 있다.²¹⁾ 따라서 본 연구에서는 L형의 전압 작동 통로(voltage operated channel)를 차단시키는 benzothiazepine계 칼슘통로 차단제로 알려진 diltiazem을 이용하여 방사선 조사 후의 급성 세포 손상을 감소시켜 보고자 하였다. 쥐를 이용한 실험 결과 diltiazem을 정맥 투여하였을 때 50%치사량(LD50)은 kg 당 39 mg이고 혈장 반감기는 3.5-10 시간이다. 본 연구에서는 방사선조사 30분전 50% 치사량의 절반인 kg 당 20mg을 복강내 주사하였으며 이는 칼슘 길항제를 사용한 방사선방어 효과를 알아보는 실험방법을 인용하였다.^{12, 21)} Pentoxifylline은 methylxanthine 유도체로써 혈류 개선제로 사용되고 있으며 매우 다양한 작용을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 혈류를 개선시켜 종양내 산소 농도를 높여 줌으로써 방사선의 효과를 증가시킬 수 있고²²⁾, 방사선 후유증으로 인한 연부조직 괴사에도 치유효과를 보인다는 보고가 있다.¹³⁾ 그리고 염증반응에 관여하는 여러 cytokines(TNF- α , IL-1)에 작용하여 방사선에 의한 폐의 초기반응을 감소시킬 수 있다는 보고가 있다.¹⁴⁾ 최근의 연구에 의하면 내독소(endotoxin)에 의해 증가된 세포내 칼슘농도를 pentoxifylline이 감소시킬 수 있다는 보고가 있다.²³⁾ 그리고 배양 세포에서 pentoxifylline이 과산화수소의 생성을 억제하여 apoptosis 발생이 억제된다는 보고도 있으나,²⁴⁾ poly(ADP-ribose) polymerase를 억제하여 칼슘/마그네슘 의존성 endonuclease를 활성화시켜 apoptosis를 촉진시킨다는 상반된 보고도 있다.²⁵⁾ 이와 같이 pentoxifylline의 다양한 작용기전과 효과가 있으나 일반적으로 pentoxifylline이 방사선에 의한 급성 및 만성 부작용을 감소시킬 수 있다는 임상적 연구들이 있었고, 본 교실에서 방사선에 의한 폐의 급, 만성 부작용에 대한 pentoxifylline의 효과를 실험한 경험이 있었기 때문에 pentoxifylline이 침샘 세포의 칼슘 농도에 영향을 미쳐 apoptosis에 관여한다는 명백한 근거가 부족하지만 경험적으로 pentoxifylline을 본 연구에 사용하게 되었다.

본 연구에서 선택된 방사선량과 방사선 조사 후 apoptosis의 관찰 시점은, 흰쥐 침샘에 200-2000 cGy 방사선 조사에 의한 침샘 세포핵의 분절(DNA fragment)을 관찰하는 연구에서 이하선인 경우 방사선량의 증가에 따라 핵의 분절이 증가하였고 악하선에서는 이와 같은 방사선량에 다소 저항성을 보였다는 보고,¹⁹⁾ 원숭이의 이하선에 250-1500cGy 방사선 조사에서 1500cGy에서 세포핵의 이상(nuclear aberration)이 가장 빈번히 발생한다는 보고⁸⁾, 원숭이의 침샘에 대해 250-2000cGy 조사 후 1-72시간에 침샘 장액성 세포 손상을 관찰한 연구에서 24시간에 세포 및 핵 손상이 가장 뚜렷하였다는 보고들을 근거로하

여 보다 분명한 세포핵 손상을 유발할 수 있고 방사선에 저항성이 있는 악하선에도 충분히 반응할 수 있도록 1600cGy를 조사하고 방사선조사 후 24시간에 apoptosis를 관찰하였다. 그러나 최근 흰쥐 침샘에 100-2500cGy 방사선이 조사된 후 6시간에 관찰한 연구에서 2Gy 에서도 apoptosis가 발생되나 5Gy 이상에서는 apoptosis의 발생정도가 거의 비슷하다고 보고하였다.²⁶⁾ 흰쥐 침샘에 200cGy 조사 후 시간에 따른 apoptosis를 관찰하는 연구에서 방사선조사 후 7.5 시간에 apoptosis 발생이 가장 많았다고 보고하였으며,²⁷⁾ 또 다른 연구에서는 흰쥐 침샘에 200cGy 조사 후 30분-6일까지 apoptosis 발생을 관찰한 결과 방사선 조사 후 7시간과 24시간 2회에 걸쳐 apoptosis 발생이 최고조에 달한다고 보고하였다.²⁶⁾ 이와 같이 1회의 방사선 조사에 의해 2번에 걸쳐 apoptosis 발생이 최고를 보이는 현상은 직접 혹은 간접(이차 신호 전달 계통) 세포 손상에 의해 apoptosis가 일어나는 것으로 연구자들은 추정하였다.²⁶⁾ 위의 연구 결과에 의하면 본 연구에서는 필요 이상의 고선량의 방사선이 조사되었고 방사선조사 후 보다 많은 시간이 경과한 후에 apoptosis를 관찰하였을 수 있다. 그러나 위의 연구 결과들을 보면 apoptosis 발생 정도는 방사선량에 의존성이 있을 수도 있고 어떤 선량 이상에서는 그렇지 않을 수도 있으며, 어떤 방사선량에서도 관찰하는 시점에 따라서 apoptosis를 관찰할 수 있는 정도가 달라질 수 있기 때문에 최고조의 apoptosis를 관찰한다는 것은 방사선량과 관찰시점이 복합적으로 관여할 수 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 우선적으로 방사선량에 따라 광학 현미경하에서 apoptosis를 최대한 잘 관찰할 수 있는 시점을 알아보는 실험이 선행되었어야 한다고 생각된다.

본 연구에서 방사선조사 후 침샘 조직에서 apoptotic body가 흔히 관찰되었으며 이는 방사선조사 후 급성변화가 apoptosis에 의한다는 여러 연구 결과와 일치하는 것으로 생각된다.^{5-9, 16)} 이하선에서 diltiazem, pentoxifylline 단독투여 혹은 병합 투여군에서 방사선조사 단독군에 비해 apoptosis의 발생이 크게 감소되었으며 이들은 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 그러나 투여 약제의 종류에 따른 apoptosis 발생 정도는 차이가 없었으며 특히 약제의 병합 투여군에서 apoptosis 발생 빈도가 가장 낮았으나 단독 약제 투여군과의 비교에서 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다. 이는 apoptosis 발생을 감소시킬 수 있는 각각의 약제를 병합 투여하였을 때 첨가 혹은 상승작용

을 보이지 못하는 것으로 생각된다. 이들 약제들이 apoptosis를 억제하는 기전이 다를 수 있으며 칼슘농도나 cytokine들에 어떻게 상호작용을 하는지에 대한 정확한 기전을 이 연구에서 밝힐 수 없었다. 그러나 이러한 현상은 1600cGy 조사 후 24시간에서의 관찰에서 일정량의 apoptosis가 발생되고 각각의 약제가 발생될 apoptosis를 충분히 억제할 수 있을 때 각각의 약제에 의해 apoptosis 발생을 억제할 수 있는 양의 합이 방사선에 의해 발생 되는 apoptosis 양 보다 클 경우 두 약제를 동시에 투여하였을 때 단독 약제로도 충분히 apoptosis를 억제할 수 있으므로 첨가 혹은 상승효과가 나타나지 않을 수 있다. 예로서 Table 1에서 보면 방사선 단독인 경우 평균 8.35개, diltiazem 투여군은 평균 2.9개의 apoptosis를 관찰할 수 있으므로 산술적으로 diltiazem 투여로 5.45개의 apoptosis 발생을 억제할 수 있고 pentoxifylline 투여군에서는 7.25개의 apoptosis 발생을 억제할 수 있다. 따라서 두 약제가 각각 반응을 한다면 최대 12.7개의 apoptosis 발생을 억제할 수 있으며 이는 방사선 단독에서 발생하는 8.35개보다 크기 때문에 두 약제의 동시 투여에서 첨가 혹은 상승작용이 없는 것으로 결과가 나타날 수 있다. 따라서 첨가 혹은 상승작용의 관계를 규명하기 위해서는 방사선에 의한 apoptosis를 최대한 발생시키고 각 약제의 투여 용량을 조절하여 apoptosis 발생 억제를 미미하게 하여 두 약제 각각에 의한 apoptosis의 발생의 합이 방사선 단독에 의한 apoptosis 발생보다 적게하여 두 약제의 병합효과를 확인하는 실험이 필요할 것이다.

흰쥐의 이하선은 장액성 세포로만 구성되어 있으나 악하선은 장액성과 점액성 세포로 구성되어 있다. 악하선의 장액성 세포와 점액성 세포에서 방사선에 의한 apoptosis 발생 정도에 따라 방사선의 민감도를 비교하면 장액성 세포에서 apoptosis 발생이 많아 방사선에 보다 민감한 것으로 생각되나 통계적인 차이는 없었다. 장액성 세포가 점액성 세포보다 방사선에 민감하여 수분분비의 주기능을 하는 장액성 세포의 방사선 손상에 의해 구강건조증이 주로 유발된다는 다른 연구 결과들과 일치하지 않았다.^{6, 9)} 그러나 본 연구에서 장액성과 점액성 세포 모두에 충분히 작용할 수 있는 1600cGy의 고선량 방사선이 조사되었기 때문에 민감도에 차이가 보이지 않았을 수도 있겠다.

본 연구로 방사선에 의한 침샘의 급성반응 기전이 apoptosis임을 관찰하였고 diltiazem과 pentoxifylline 이 apoptosis 발생을 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 그러나 방사선량과 방사선조사 후 관찰 시점에 따라 apop-

tosis를 보다 객관적으로 정량화할 수 있는 방법에 의해 본 연구의 결과를 재확인하는 연구와 각 약제에 의해 apoptosis가 억제되는 작용기전을 규명하는 연구가 필요하겠다. 그리고 이와 같은 apoptosis의 감소가 만성반응의 감소로 이어지는 가를 관찰하는 장기적 연구가 이루어져야 하겠다.

결 론

본 연구는 흰쥐 침샘의 방사선 조사에서 급성반응으로 발생하는 apoptosis를 관찰하고 이에 대한 diltiazem과 pentoxifylline 투여의 효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 방사선조사시 발생하는 급성반응으로 apoptosis가 빈번히 일어남을 확인하였다.
2. 이하선에서 방사선조사 전에 투여된 diltiazem 혹은 pentoxifylline으로 방사선에 의한 apoptosis 발생을 현저히 감소시킬 수 있음을 확인하였다.
3. diltiazem과 pentoxifylline 두 약제의 병합투여는 단독투여에 비해 apoptosis의 급격한 감소를 보이지 않았다.

따라서 diltiazem과 pentoxifylline은 이하선에서 방사선에 의한 급성반응인 apoptosis를 효과적으로 감소시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 apoptosis의 감소가 만성 구강 건조증을 예방할 수 있는가에 대한 연구가 필요하고 임상적인 연구에 의해 결과가 확인되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Greenspan D, Daniels TE. Effectiveness of pilocarpine in postradiation xerostomia. *Cancer* 1987; 59:1123-1125
2. Shannon IL, Starcke EN, Westcott WB. Effect of radiotherapy on whole saliva flow(Abstr). *J Dent Res* 1977; 56:693
3. Shannon IL, Trodahl JN, Starcke EN. Radiosensitivity of the human parotid gland. *Proc Soc Exp Med Biol* 1978; 157:50-53
4. Eneroth CM, Henrilson CO, Jakobsson PA. The effect of irradiation in high doses on parotid glands. *Acta Otolaryngol* 1971; 71:349-356
5. Stephens LC, Schultheiss TE, Price RE, et al. Radiation apoptosis of serous acinar cells of salivary and lacrimal glands. *Cancer* 1991; 67:1539-

- 1543
6. Sholley MM, Sodicoff M, Pratt NE. Early radiation injury in the rat parotid gland. *Lab Invest*, 1974; 31:340-354
7. Stephens LC, King GK, Peters LJ, et al. Acute and late radiation injury in rhesus monkey parotid glands. *Am J Pathol* 1986; 124:469-478
8. Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, et al. response fo parotid organ culture to radiation. *Radiation Reseach* 1989; 120:140-153
9. Abok K, Brunk U, Jung B, et al. Morphologic and histochemical studies on the differing radiosensitivity of ductular and acinar cells of the rat submandibular gland. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 1984; 45: 443-460
10. Voehringer DW, Story MD, O'neil RG, et al. Modulating ca^{+2} in radiation-induced apoptosis suppresses DNA fragmentation but does not enhance clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 1997; 71:237-243
11. Story MD, Stephens LC, Tomasovic SP, et al. A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated in vitro. *Int J Radiat Biol* 1992; 61:243-251
12. Am Soc Hospital Pharmacists. American Hospital Formulary Serice. *Drug Information* 94. 1994; 992-996
13. Dion MW, Hussey DH, Doornbos JF, et al. Preliminary results of a pilot study of pentoxifylline in the treatment of late radiation soft tissue necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19: 401-407
14. 김홍배, 서현숙. Pentoxifylline이 방사선조사로 인한 마우스 폐손상에 미치는 영향. *인제의학* 1996; 17:1-17
15. Pratt NE, Sodicoff M. Ultrastructural injury following x-irradiation of rat parotid gland acinar cells. *Arch Oral Biol* 1972; 17:1177-1186
16. Stephens LC, Ang KK, Schultheiss TE, et al. Targey cell and mode of radiation injury in rhesus salivary glands. *Radiother Oncol* 1986; 7:165-174
17. Szumiel. Review: ionizing radiation-induced cell death. *Int J Radiat Biol* 1994; 66:329-341
18. Vissink A, Down JD, Konings AWT. Contrasting dose-rate effects of gamma-irradiation on rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol* 1992; 63: 693-701
19. El-Mofty SK, Kahn AJ. Early membrane injury in lethally irradiated slivary gland cells. *Int J Radiat Biol* 1981; 39:55-62
20. Hallahan DE, Bleakman D, Virudachalam S, et

- al. The role of intracellular response to ionizing radiation. *Radiation Research* 1994; 138:392-400
21. Floersheim GL. Radioprotective effects of calcium antagonists used alone or with other types of radioprotectors. *Radiation Research* 1993; 133:80-87
22. 이인태, 조문준. Pentoxifylline과 nicotinamide의 병용에 의한 생체내 방사선 감수 증강 효과. *J Korean Soc Ther Radiol* 1991; 9:7-15
23. Todd JC, Mollitt DL. Leukocyte modulation inhibits endotoxin-induced disruption of intracellular calcium homeostasis. *J of Trauma* 1995; 39:1148-1152
24. Belloc F, Jaloustre C, Dumain P et al. Effect of pentoxifylline on apoptosis of cultured cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25(suppl2):S71-S74
25. Nelipovich PA, Nikonova LV, Umansky SR. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats. *Int J Radiat Biol* 1988; 53:749-765
26. Paardekooper GMRM, Cammelli S, Zeilstra LJW, et al. Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol* 1998; 73:641-648
27. Stephens LC, Schultheiss TE, Ang KK, et al. Pathogenesis or radiation injury to the salivary glands and potential methods of protection. *Cancer Bulletin* 1989; 4:106-114

= 국문 초록 =

흰쥐 침샘의 방사선조사시 Apoptosis에 대한 Diltiazem과 Pentoxifylline의 효과

인제대학교 의과대학 방사선종양학교실

양 광 모 · 서 현 숙

목 적 : 두경부에 방사선 조사를 받는 경우 대부분의 환자에서 구강 건조증을 겪게 된다. 이와 같은 구강 건조증은 침샘 세포의 소실에 의해 침이 생성되지 않거나 적게 생성되기 때문이다. 침샘 세포가 방사선 조사에 의해 소실되는 기전은 침샘 세포의 간기사망(interphase death) 혹은 apoptosis에 의한 직접 손상에 의해 발생된다는 것이 가장 가능성 있는 기전으로 알려져 있고 apoptosis는 세포내의 칼슘농도의 증가로 인해 일어난다. 따라서 본 연구는 흰쥐 침샘의 방사선조사에서 칼슘통로 차단제인 diltiazem과 방사선의 급성반응에 작용하고 세포내 칼슘농도를 감소시킬 수 있는 pentoxifylline을 방사선조사 전에 투여하여 apoptosis 발생이 감소되는 지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법 : 체중 약 200-250g의 흰쥐 10마리를 대상으로 대조군, 방사선조사 단독군, 방사선 조사전 diltiazem 혹은 pentoxifylline을 투여군과 두 약제를 동시에 투여군으로 나누었다. 방사선 조사는 침샘을 포함하는 두경부에 1600cGy를 단일 조사하고 diltiazem은 쥐의 체중 kg 당 30mg을 방사선조사 30분전, pentoxifylline은 쥐의 체중 kg 당 50mg을 방사선조사 20분전에 복강내 투여하였다. 방사선조사 후 24시간에 쥐를 희생시켜 이하선과 악하선을 제거하여 hematoxylin-eosin 염색을 한 후 200배의 배율에서 무작위로 10-20곳을 선택하여 현미경시야당 전체 세포수(T)에 대한 apoptotic body의 수(A)의 백분율(A/TX100)을 구하여 각 군을 비교하였다.

결 과 : 이하선에서 방사선단독, diltiazem, pentoxifylline 단독 투여군과 두 약제의 동시 투여군에서 관찰된 apoptosis 백분율은 각각 1.72%(8.35/486), 0.64%(2.9/453), 0.23%(1.2/516), 0.28%(1.1/399)이었다. 방사선조사 단독군에 비해 약제 투여군에서 apoptotic body의 빈도는 통계적으로 의미있는 감소를 보였다($p < 0.05$). 악하선의 장액성 세포에서 방사선조사단독군, diltiazem, pentoxifylline 단독 투여군과 두 약제의 병합 투여군에서 관찰된 apoptosis 백분

율은 각각 1.94%(11/567), 0.34%(1.9/554), 0.28%(1.8/637), 0.22%(1.3/601)이었고 방사선조사 단독군에 비해 약제 투여군에서 apoptotic body의 빈도는 통계적으로 의미 있는 감소를 보였다($p < 0.05$). 점액성 세포에서 apoptosis 백분율은 각 군에서 0.92%(5.1/552), 0.41%(2.5/ 612), 0.29%(1.3/455), 0.18%(1.0/562)였다. 방사선조사 단독군에 비해 약제 투여군에서 apoptotic body의 발생 빈도는 통계적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 악하선의 장액성과 점액성 세포에서 방사선 단독 투여군의 경우 apoptotic body 발생의 백분율은 각각 1.94% (11/567)와 0.92%(5.1/552)로써 두 세포간에 apoptotic body의 발생에 통계적인 차이가 없었다. 이하선과 악하선 모두에서 약제 투여 군들간의 apoptotic body 발생은 통계적으로 의미 있는 차이가 없었고 특히 약제의 병합 투여군이 단일 약제 투여군 보다 낮은 apoptotic body 발생빈도를 보이고 있으나 통계적으로 의미 있는 차이는 없었다.

결론: 본 연구 결과로 침샘의 방사선 조사에서 장액성 세포에서 발생하는 apoptosis는 pentoxifylline 혹은 diltiazem의 투여에 의해 효과적으로 감소되는 것이 관찰되었다. 따라서 향후 이들 약제에 의한 apoptosis의 감소가 침샘의 만성변화에도 영향을 미치는지에 대한 연구가 이루어져야겠다.