

방사선조사가 백서 타액선의 clusterin 발현에 미치는 영향

경희대학교 치과대학 구강악안면방사선학교실
오규명 · 최용석 · 황의환 · 이상래

Effect of irradiation on expression of clusterin in the rat salivary glands

Gyu-Myeong O, Yong-Suk Choi, Eui-Hwan Hwang, Sang-Rae Lee

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

ABSTRACT

Purpose : To investigate clusterin expression in the acini and ductal cells of rat submandibular glands after Co-60 gamma irradiation.

Materials and Methods : The male Sprague-Dawley rats weighing approximately 250 gm were divided into control and experimental groups. The experimental group was irradiated with a single absorbed dose of 2, 5, 10, and 15 Gy on the head and neck region. All the rats were sacrificed at 1, 3, 7, 14, 21, and 28 days after irradiation. The specimens including the submandibular gland were sectioned and observed using an immunohistochemical method.

Results : In the 2 Gy group, clusterin expression was similar to that of the control group at 1 day after irradiation and it was observed in the striated ductal cells at 3 days after irradiation. In the 5 Gy group, clusterin expression was observed in the striated ductal cells at 1 day after irradiation and gradually increased in the 10 and 15 Gy groups. In the 15 Gy group, clusterin expression was prominent in the striated ductal cells at 1 day after irradiation, but it gradually decreased with the experimental period. The destruction of the striated ductal cells was observed in the 2 Gy group at 21 days after irradiation and in the 5, 10, and 15 Gy groups at 7 days after irradiation. The destruction of the acinar cells was observed in the 2 Gy group at 28 days after irradiation and in the 5, 10, and 15 Gy groups at 14 days after irradiation.

Conclusion : Clusterin expression was induced by low doses of irradiation and it appeared to be involved in the regulation of cellular response to irradiation. (*Korean J Oral Maxillofac Radiol* 2006; 36 : 33-40)

KEY WORDS : Cranial Irradiation; Salivary Glands; Apoptosis; Clusterin

서 론

타액선조직의 정상적인 구조와 기능을 유지하는데 있어 세포의 증식, 분화 및 세포자멸사(apoptosis)간의 상호 복합적인 관련성은 매우 중요하며, 따라서 타액선조직에서의 비정상적인 세포자멸사의 증가는 타액선 손상의 주요 원인의 하나로 간주되고 있다.^{1,2} 예정된 세포사(programmed cell death)라고도 불리는 세포자멸사는 생리적인 자극이나 병적 요인에 의하여 유발되는데,³ 이는 정상적인 배아발생과 변태 기간 동안 불필요한 세포를 제거하는 과정으로서,

기관의 크기와 형태 조절에 관여하고, 영양호르몬의 결핍으로 인한 내분비의존 조직의 수축과 관련되어 발생되지만,^{3,4} 글루코코르티코이드, 다양한 화학요법제 및 방사선에 대한 세포반응이나 면역반응으로도 나타난다.⁵⁻⁷ 특히, 방사선조사와 관련된 세포사의 경우 과거에는 비분열세포에서 관찰되기 때문에 간기사(interphase death)라는 용어가 사용되어 왔으나, 1980년대에 들어서는 저선량에서도 수 시간 이내에 타액선 세포의 핵 이상이 관찰됨에 따라 세포자멸사라는 용어로 교체되어 사용되기 시작하였다.⁸ Stephens 등⁹은 원숭이의 타액선을 대상으로 방사선 조사선량에 따른 핵 이상을 관찰한 결과, 타액선조직의 손상은 세포자멸사에 의해 이루어지고, 방사선에 의해 유도된 세포자멸사는 두 경부 악성 종양의 방사선치료시 타액선 손상을 일으키는 기본적인 기전이라고 언급하였으며, Gazda 등¹⁰도 타액선

접수일 : 2005년 11월 14일; 심사일 : 2005년 11월 17일; 채택일 : 2005년 12월 29일
Correspondence to : Prof. Sang-Rae Lee
Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School 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

기능의 급성 손상은 장액세포의 세포자멸사와 관련이 있다고 하였다. 따라서 최근에는 방사선조사로 인한 타액선 조직의 세포사를 세포자멸사로 인정하고 있다.^{8,11,12}

한편 testosterone-repressed prostate message-2 (TRPM-2), apolipoprotein J (ApoJ), sulfated glycoprotein-2 (SGP-2), complement lysis inhibitor (CLI)로도 알려진 clusterin은 Sertoli 세포에 의해 생산되는 세포응집 요소로 알려져 있는 이종이합체 당단백질로서, 숫양의 고환그물액으로부터 처음으로 추출되었으며, 전립선, 간, 비장, 신장, 심장, 폐, 뇌, 난소, 자궁, 골격근, 악하선 등 실험동물의 여러 기관이나 조직에서 다양한 조건 하에 발현되는 것으로 보고되고 있다.¹³⁻¹⁵ 이는 조직의 개형과 재생, 지질 수송, 세포막 보호, 보체 방어 및 세포자멸사를 포함한 광범위하고 다양한 생리적, 병적 과정에 관여하는 것으로 추정되고 있는데,¹⁴ 특히, 세포자멸사가 진행 중인 다양한 조직에서 이의 발현이 증가되므로 세포사의 표지자로 간주되고 있다.^{16,17} 세포자멸사와 clusterin과의 관련성에 대해서는, Montpetit 등,¹⁸ Leger 등¹⁹이 거세 백서의 전립선 퇴화에 따른 세포자멸사와 연관되어 clusterin이 발현됨을 처음으로 보고한 이래, Strange 등,²⁰ Guenette 등²¹은 유선과 같은 호르몬의존 조직의 세포자멸사 진행시 clusterin의 발현이 증가됨을, Bursh 등²²은 조직개형의 과정에 관여하는 단백질의 전신 대사기능과 연관된 간이나 신장과 같은 여러 장기에서 조직의 손상과 개형, 세포자멸사와 관련되어 clusterin이 발현됨을, McGeer 등²³은 알츠하이머병과 같은 신경장애에서, Laping 등²⁴은 다양한 악성 질환에서 clusterin의 발현이 증가됨을 각각 연구 보고하였다. 그러나 French 등²⁵은 세포배양을 통해 세포자멸사가 진행 중인 세포뿐만 아니라 인접 정상 세포에서도 clusterin이 발현된다고 하였고, Sensibar 등¹⁵은 clusterin의 발현 증가와 세포자멸사의 증가간의 관련성은 불명확하다고 하였으며, 최근에 Humphreys 등²⁶은 clusterin은 세포 생존을 돕는 역할을 담당하는 것 같다고 하였다.

이와 같이 clusterin의 다양한 생리적 기능과 역할에 대해서는 상반된 연구들이 보고되고 있어 이를 구명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 방사선조사가 타액선조직의 손상에 따른 세포자멸사에 미치는 영향이나 타액선조직에서의 세포자멸사와 clusterin 발현과의 관련성, 특히 방사선 조사선량에 따른 타액선조직에서의 clusterin 발현 양상에 관한 연구는 희유하므로 이에 관한 연구는 방사선생물학 분야에서 많은 의의가 있다고 판단된다. 또한 두경부 악성 종양의 방사선치료에 따른 가장 심각한 합병증은 타액선의 기능이상과 관련된 것들로서, 이들은 환자의 수명에는 직접적인 영향을 미치지 않으나, 치아와 구강 건강에 심각한 손상을 유발해 환자의 삶의 질을 극도로 저하시키며, 특히, 타액선조직의 실질세포를 파괴하는 방사선은 영구적인 구강건조증을 야기시킬 수 있으므로 방사선이 타액선조직의 세포자멸사에 미치는 영향을 구명

하는 것은 임상적으로도 매우 중요하다고 생각된다.

이에 본 연구에서는 백서의 두경부에 2, 5, 10 Gy 및 15 Gy의 흡수선량이 되도록 방사선을 각각 1회 조사한 다음, 일정시간 경과 후 타액선조직에서의 방사선유발 세포자멸사에 따른 clusterin의 발현 여부와 흡수선량 변화에 따른 clusterin의 발현 정도를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

동일한 조건에서 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 및 15 Gy 방사선조사군으로 다시 나누었으며, 이들 각 군에 12마리씩을, 정상대조군에는 2마리를 각각 배정하였다.

2. 실험방법

1) 방사선조사

방사선조사군에 실험동물용 마취제인 Zoletil (Vibrac Laboratories, France)을 0.02 ml/100 gm의 용량으로 근육 주사하여 전신마취시킨 후, 특별히 고안된 방사선조사대에 두경부와 사지를 고정시키고, Co-60 심부치료기(Theratron 780, Atomic Energy of Canada Ltd., Canada)를 이용하여 방사선원과 피부간 거리 80 cm, 선량률 206.88 cGy/min으로 2, 5, 10 및 15 Gy의 흡수선량이 되도록 두경부에 방사선을 각각 1회 조사하였다.

2) 실험동물의 희생 및 관찰

방사선을 조사한 후 1, 3, 7, 14, 21, 28일에 각 군의 실험동물을 관류고정하여 희생시킨 다음, 악하선을 적출하였다. 적출된 악하선을 10% 중성 formalin 용액에 충분히 고정된 후, 통법에 따라 paraffin 포매하고, 면역조직화학적으로 clusterin의 발현을 관찰하기 위하여 paraffin 포매조직을 4-6 μm 두께의 조직절편으로 만들어 poly-L-lysine이 피복된 slide에 위치시키고, xylene에서 탈paraffin하고 함수시킨 다음, phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) 용액으로 세척하였다. 이를 다시 실온에서 0.5% H₂O₂를 함유한 methanol에서 각각 5분간 2회 배양하고, 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS에서 10분간 배양하였다. 그 후 이를 rabbit Ig G anti-clusterin peptide (Pierce Rockford, USA)로 희석한 goat serum에 4°C에 24시간 흡입시키고, PBS에서 수세한 다음, biotinylated goat-anti rabbit immunoglobulin (Vector Lab., USA)을 상온에서 slide 상에 1시간 유지한 후 PBS로 세척

하고, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit, Vector Lab, USA)에 1시간 작용시켰다. 이상의 조작과정을 거쳐서 이를 100 mM Tris buffer (pH 7.4)에 희석한 0.05% diaminobenzidine hydrochloride 용액과 0.01% H₂O₂를 동량으로 혼합한 용액에서 발색반응을 유발시켜 면역반응을 확인하였다.

결 과

1. 정상대조군

백서 악하선의 장액선은 호염기성의 많은 과립과 기저부측에 위치한 둥근 모양의 선포세포로 구성되어 있었으며, 여러 개의 선포들이 결합조직 중격에 의하여 소엽을



Fig. 1. Photomicrograph showing positive reaction to clusterin on the intercalated ductal cells in the control group (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

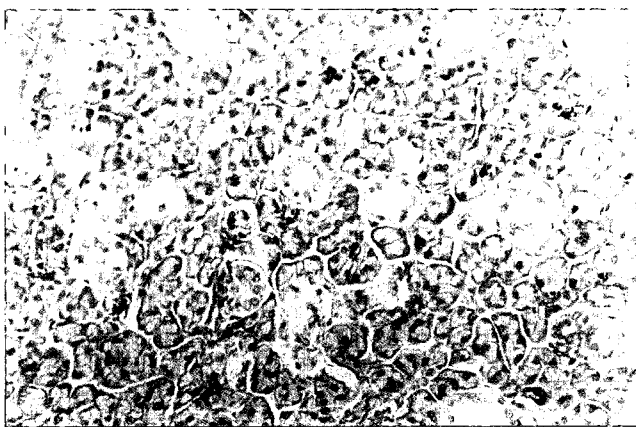


Fig. 2. Photomicrograph showing positive reaction to clusterin with almost same appearance of the control group at 1 day after 2 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

이루고, 선포세포 사이에는 단층의 키가 작은 입방세포로 이루어진 개재관과 모세혈관들이 산재되어 있었으며, 교원섬유가 주성분인 소엽간 결합조직 내에는 단층의 원주상피로 이루어진 선조관과 풍부한 소혈관이 관찰되었다. 또한 타액선조직에서 clusterin이 선포세포 및 선조관세포에서는 발견되지 않았으나, 개재관세포에서 부분적으로 농염된 소견이 관찰되었다 (Fig. 1).

2. 실험군

1) 2Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일에는 정상대조군과 유사하게 개재관세포에서 농염된 clusterin이 관찰되었으며, 방사선조사 후

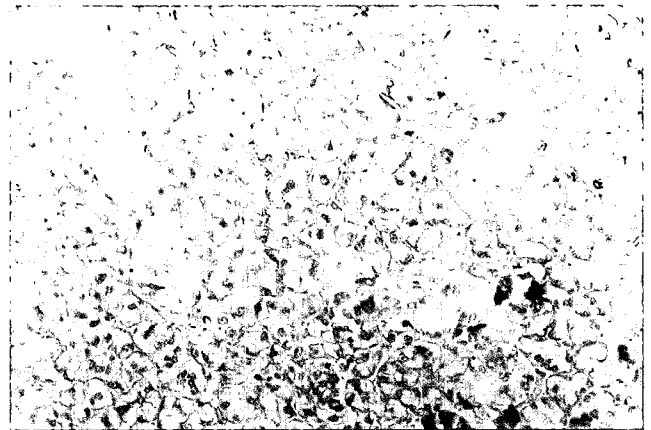


Fig. 3. Photomicrograph showing positive reaction to clusterin on the striated ductal cells, but markedly decreased reaction on the intercalated ductal cells at 3 days after 2 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

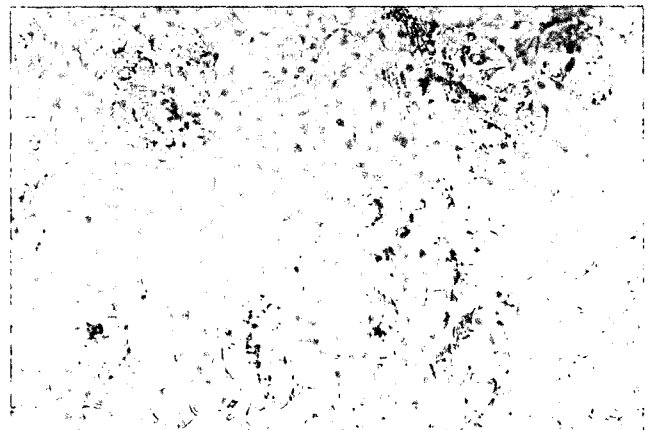


Fig. 4. Photomicrograph showing increased reaction to clusterin on the striated ductal cells and apoptotic changes on the ductal cells at 21 days after 2 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

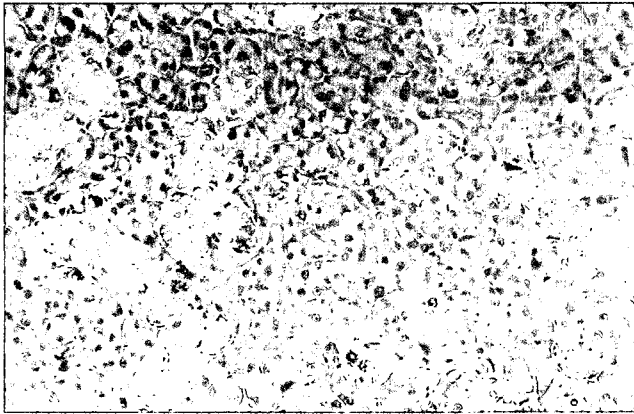


Fig. 5. Photomicrograph showing decreased reaction to clusterin on the striated ductal cells and apoptotic changes on the acini and ductal cells at 28 days after 2 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

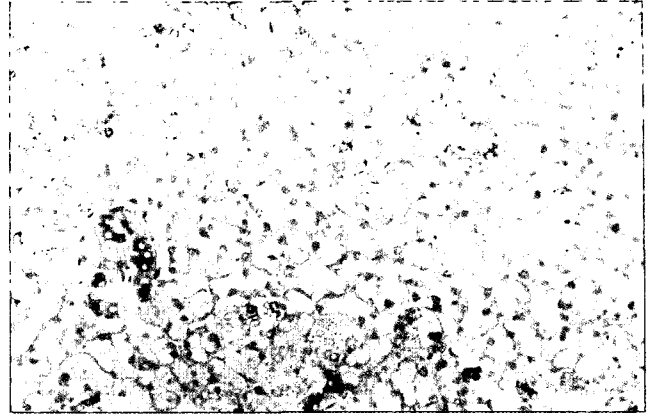


Fig. 7. Photomicrograph showing decreased reaction to clusterin on the striated ductal cells at 7 days after 5 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

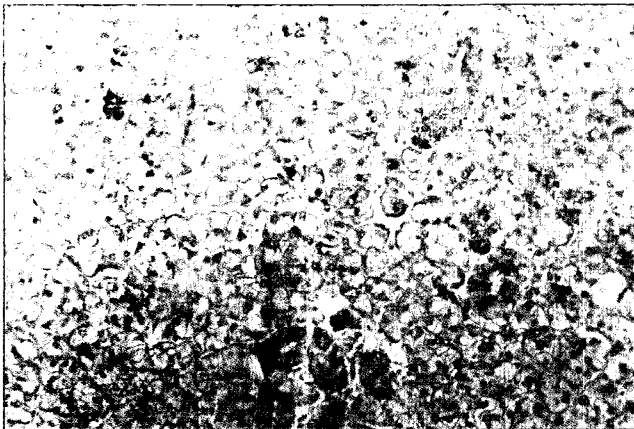


Fig. 6. Photomicrograph showing decreased number of intercalated ductal cells which is positive reaction to clusterin and striated ductal cells which is strongly positive reaction to clusterin at 1 day after 5 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

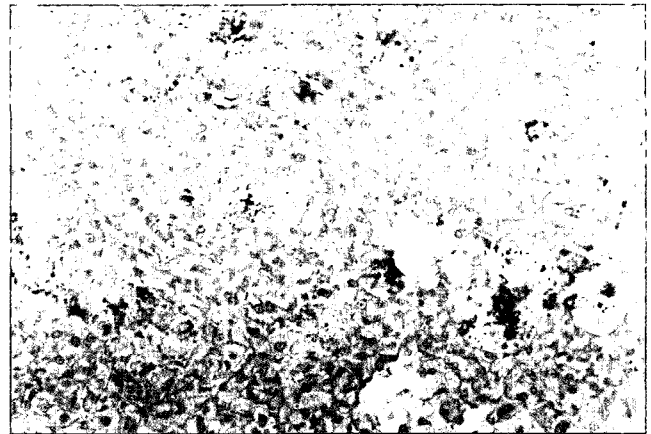


Fig. 8. Photomicrograph showing apoptotic changes of acini and ductal cells at 14 days after 5 Gy (immunolocalization of clusterin protein, ×200).

3일에는 선조관세포에서 clusterin의 발현이 관찰되었다. 방사선조사 후 7일 및 21일에는 선조관세포에서 clusterin의 발현이 점차 증가되는 소견이 관찰되었으며, 특히 방사선조사 후 21일에서는 선조관세포의 파괴상이 관찰되었다. 방사선조사 후 28일에는 clusterin의 발현을 보이는 부위와 소실된 부위가 혼재되어 관찰되었으며, 선포세포의 파괴상도 관찰되었다(Figs. 2-5).

2) 5 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일에 역시 개재관세포에서 농염된 clusterin이 관찰되었고, 선조관세포에서도 clusterin의 발현이 관찰되었다. 방사선조사 후 7일에는 개재관세포의 clusterin이 소실되었고, 방사선조사 후 14일에는 clusterin의 발현과

함께 선포세포 및 선조관세포의 파괴상이 관찰되었다. 방사선조사 후 28일에는 선조관세포 내에서 clusterin이 세포질 한편에 밀집되는 현상이 관찰되었다(Figs. 6-8).

3) 10 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일부터 선조관세포에서 clusterin이 관찰되었으며, 14일에는 선포세포 및 선조관세포에서 clusterin의 발현과 함께 국소적인 파괴상이 나타났다. 방사선조사 후 28일에는 선조관세포가 형태를 알아보기 못할 정도로 파괴되었다(Figs. 9, 10).

4) 15 Gy 방사선조사군

방사선조사 후 1일에는 선조관세포에서 clusterin이 강하게 발현되었으나, 방사선조사 후 3일부터 clusterin이 세포질 한편에 밀집되는 현상이 나타나기 시작하였다. 방사선

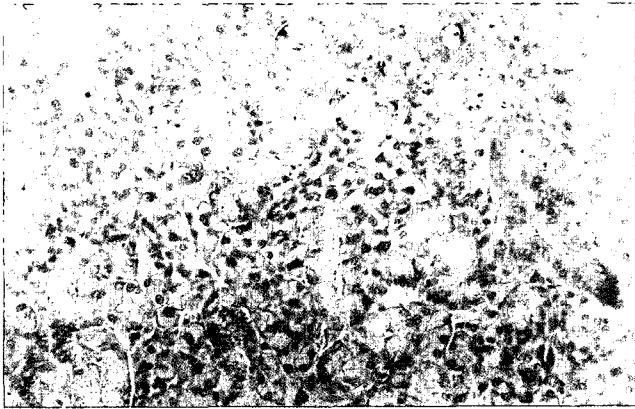


Fig. 9. Photomicrograph showing decreased reaction to clusterin on the striated ductal cells at 7 days after 10 Gy (immunolocalization of clusterin protein, $\times 200$).

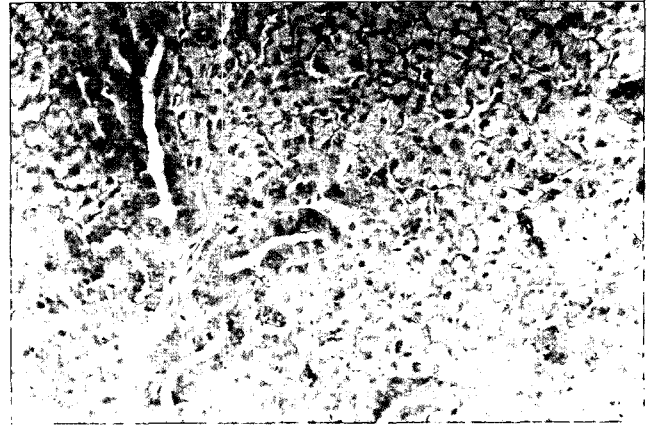


Fig. 11. Photomicrograph showing strongly positive reaction to clusterin on the striated ductal cells at 1 day after 15 Gy (immunolocalization of clusterin protein, $\times 200$).

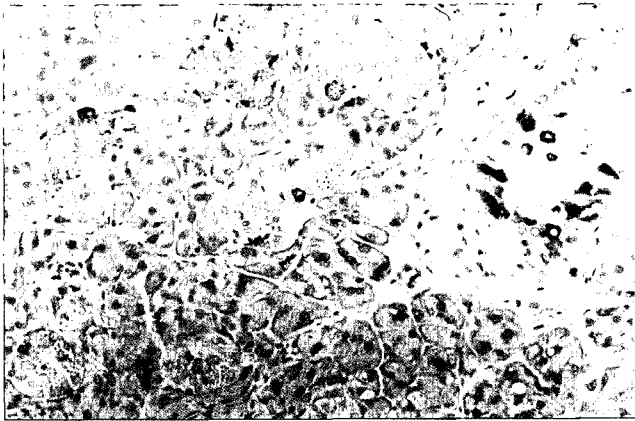


Fig. 10. Photomicrograph showing markedly decreased reaction to clusterin on the striated ductal cells and apparent apoptotic changes of striated ductal cells at 28 days after 10 Gy (immunolocalization of clusterin protein, $\times 200$).

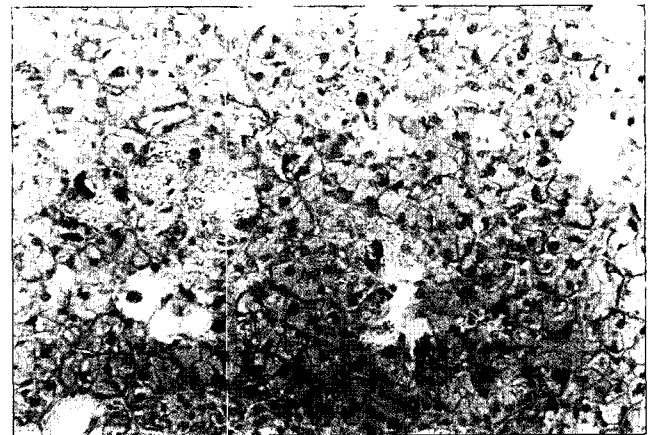


Fig. 12. Photomicrograph showing markedly decreased reaction to clusterin on the striated ductal cells and apparent apoptotic changes of striated ductal cells at 14 days after 15 Gy (immunolocalization of clusterin protein, $\times 200$).

조사 후 14일에는 clusterin의 발현이 감소되었고, 이후 선포세포 및 선조관세포의 파괴상이 관찰되었다 (Figs. 11, 12).

고 찰

방사선은 다양한 종류의 세포에 여러 가지 생화학적 변화를 일으켜 세포의 기능 이상 뿐만 아니라 세포사를 유발시키는데, 방사선은 생식사와 간기사라는 두 가지 과정으로 세포사를 일으킨다. 가장 흔히 나타나는 생식사는 세포주기, 자가복제능 및 유사분열과 관련이 있는 세포사로서, DNA 손상에 대한 세포회복능에 영향을 받으며, 방사선 조사 후 수 시간에서 수 주, 심지어는 수 개월이 소요된다. 이에 반하여, 간기사는 세포분열과는 무관한 비분열세포에

서 방사선조사 후 수 시간 이내에 발생된다. 실제로, 휴지기의 세포인 경우에도 고선량의 방사선이 조사되면 간기사가 유발되는 것으로 알려져 있으나, 림프계세포와 같은 특정세포군에서는 저선량의 방사선조사에 의해서도 간기사가 유발되는 경향을 보인다.⁹ Stephens 등⁸은 저선량의 방사선에 의해 생체 내 및 시험관 내 모두에서 장액세포의 간기사가 유발됨을 보고하였으며, 현재는 이러한 형태의 방사선에 의한 세포사를 세포자멸사라고 하는데, 방사선은 소장, 대장 및 림프조직의 비분열세포는 물론, 뉴선과 타액선의 비분열세포의 세포자멸사를 유발시킨다.^{27,28}

이와 같이 방사선은 급속히 증식하는 세포의 유사분열을 방해하는 것은 물론, 세포자멸사에 의한 세포사를 유발시키는데,⁹ 방사선에 의한 타액선조직의 손상시에는 실질

세포, 혈관내피 및 섬유모세포가 이의 표적세포로 간주된다.^{29,30} 이 중 선포와 분비도관을 구성하는 실질세포의 세포자멸사는 두경부 악성 종양의 방사선치료에 따른 가장 흔하고도 심각한 후유증의 하나인 타액선의 기능 손상과 타액의 분비 저하에 따른 구강건조증 및 이로 인한 저작장애, 연하장애 등을 일으키는데,³¹ 방사선에 의한 타액선조직의 손상은 급성 손상 이후의 회복단계 및 만기 손상단계의 2가지 경과로 나눌 수 있다.^{32,33} Guchelaar 등³¹은 세포자멸사는 방사선조사에 따른 타액선조직의 급성 손상에, Muhvic-Urek 등³⁴은 급성 손상은 물론 만기 손상에도 관여하며, 특히 타액선조직에 대한 방사선조사시 증가된 세포자멸사가 세포증식과 세포소실의 불균형을 유발하는 주요 요인이며, 증가된 세포자멸사로 인해 타액선조직의 손상이 유발된다고 하였다.

한편 clusterin은 세포분화와 같이 조직이 개형되는 시기는 물론이거니와 뇌질환이나 신장질환에서도 이의 발현이 증가되는데, 이러한 과정은 세포자멸사와 밀접한 관련성을 가지고 있으므로 clusterin은 세포자멸사에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다.³⁵ 따라서 세포자멸사가 진행 중인 조직에서는 이의 초기에 clusterin이 발현되는 것으로 보고되고 있는데,³⁶⁻³⁸ clusterin은 손상, 세포독성 화합물, 호르몬, 발육성 자극에 대한 반응으로 퇴행성 변화가 진행 중인 조직에서도 이의 발현이 증가될 뿐만 아니라,^{39,40} 저선량의 방사선에 대한 조직의 반응으로도 이의 발현이 증가되는 것으로 보고되고 있다.^{41,42}

일반적으로 방사선에 의한 타액선조직의 손상정도는 방사선 조사선량, 조사된 조직의 부피 등에 따라 다양하게 나타난다. Nagler 등⁴³은 백서의 두경부에 2.5 Gy의 선량을 1회 조사한 경우에도 타액선 기능의 심각한 장기간의 변화가, Valdez⁴⁴는 방사선치료시 총 흡수선량이 10 Gy에 도달되면 타액선의 기능저하가, Vissink 등⁴⁵은 10 Gy 이상의 흡수선량을 백서의 타액선에 조사한 경우 비가역적으로 타액의 분비 감소 및 성분의 변화가, Abok 등²⁸은 15 Gy의 흡수선량 조사 후 수 일 이내에 타액선 기능의 심각한 손상이 유발된다고 하였다.

따라서 본 실험에서는 타액선조직의 선포세포 및 도관세포에서 방사선유발 세포자멸사에 따른 clusterin의 발현 여부를 확인하고, 방사선 조사선량의 변화에 따른 clusterin의 발현 양상을 관찰하기 위하여 백서의 두경부에 타액의 분비기능에 이상을 초래하는 것으로 알려진 2, 5, 10 Gy 및 15 Gy의 흡수선량이 되도록 방사선을 각각 1회 조사하였으며, 방사선에 민감한 장액세포와 방사선에 저항성이 있는 것으로 알려진 점액세포로 구성되어 있는 악하선을 관찰대상으로 하였다.

본 실험에서는 우선 방사선유발 세포자멸사에 따른 clusterin을 발현 여부를 관찰하였는데, 정상대조군의 경우 선포세포와 선조관세포에서는 clusterin이 발현되지 않았으

나, 개재관세포에서 부분적으로 농염된 소견이 관찰되었다. 이에 비하여 2 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 1일에 정상대조군과 clusterin의 발현 양상이 유사하였고, 방사선조사 후 3일부터는 선조관세포에서 clusterin의 발현이 관찰되기 시작하여 방사선조사 후 21일까지 이의 발현이 점차 증가되었으며, 방사선조사 후 21일에는 선조관세포의 파괴상이, 방사선조사 후 28일에는 선포세포의 파괴상이 관찰되었다. 5 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 1일부터 개재관세포와 선조관세포에서 clusterin의 발현이 관찰되기 시작하였고, 방사선조사 후 14일에는 선포세포와 선조관세포의 파괴상이 관찰되었을 뿐만 아니라, 방사선조사 후 28일에는 선조관세포에서 clusterin이 세포질 한편에 밀집되는 현상이 나타났다. 10 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 14일까지 5 Gy 방사선조사군과 유사한 소견이 관찰되었으나, 방사선조사 후 28일에는 선조관세포의 심한 파괴상이 관찰되었다. 또한 15 Gy 방사선조사군에서는 방사선조사 후 3일부터 clusterin이 세포질 한편에 밀집되는 현상이 관찰되기 시작하여 방사선조사 후 14일에는 clusterin의 발현이 감소되었으며, 5, 10 Gy 방사선조사군에서와 같이 선포세포와 선조관세포의 파괴상이 관찰되었다. 따라서 본 실험에서는 2 Gy의 방사선조사에 의해 장액선 내 선조관세포에서도 clusterin이 뚜렷하게 발현되었으며, 실험시일이 경과됨에 따라 선포세포와 선조관세포가 모두 파괴되었고, 방사선 흡수선량이 증가됨에 따라 그 양상이 심화되었다.

방사선조사에 의한 타액선의 가장 전형적인 손상은 선포의 위축과 만성 염증으로, 조기 반응인 분비세포의 위축은 방사선유발 세포자멸사에 의해 비염증성으로 유발되며, 상대적으로 염증이 동반된 지연 반응은 방사선유발 세포괴사에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다.³¹ Stephens 등⁴⁶은 원숭이의 이하선에 2.5-15 Gy의 방사선을 1회 조사한 결과, 모든 선량에서 타액선의 급성 손상이 24시간 이내에 나타났으며, 조직학적으로 2.5 Gy, 또는 5 Gy의 방사선조사시 장액세포의 변성과 괴사가, 7.5-15 Gy의 방사선조사시 모든 선포의 괴사와 함께 선체의 광범위한 변성이 관찰되었다고 하였다. 따라서 장액세포는 분화가 잘된 비분열세포임에도 불구하고 2.5 Gy 정도의 낮은 선량에서도 방사선조사 후 수 시간 이내에 세포자멸사가 유발되며, 타액선의 만성 위축은 방사선에 의한 혈관계의 손상이라기보다는 방사선에 의한 직접적이고도 비가역적인 초기 손상에 의해 나타난다고 하였다. 또한 Peter 등,⁴⁷ Coppes 등³²은 타액선의 기능 손상이 방사선조사 후 1일부터 나타나기 시작하여, 시간과 선량에 비례하여 점차 진행된다고 하였고, Hendry와 Potten⁴⁸은 세포의 생식사에 비하여 세포자멸사는 저선량의 방사선에 의해 수 시간 이내에 발생된다고 하였다. 그러나 Paardekooper 등¹²은 백서의 이하선과 악하선에서 방사선유발 세포자멸사의 발현을 관찰한 결과, 2

Gy 미만의 흡수선량에서 2시간 이후부터 타액선조직에 전반적으로 세포자멸사가 산재되어 나타나기 시작하여, 5 Gy 이상부터 세포자멸사가 최대가 되었으나, 5-25 Gy의 흡수선량에서는 선량과 세포자멸사의 발현을 사이에 뚜렷한 상관관계를 관찰할 수 없었다고 하였다. 본 실험에서는 2 Gy의 방사선조사에 의해 장액선 내 선조관세포에서 clusterin이 뚜렷하게 발현되어 저선량에 의해서도 타액선조직에 세포자멸사가 유발됨을 확인할 수 있었다. 또한 실험시일이 경과됨에 따라 선포세포와 선조관세포가 모두 파괴되었고, 방사선 흡수선량이 증가됨에 따라 그 양상이 심화되었으나, 방사선에 의한 세포자멸사의 정확한 기전은 현재까지도 명확히 밝혀져 있지 않으며, 방사선유발 세포자멸사는 단백질과 RNA의 합성, 효소 활성화, 특정 유전자의 발현 등 여러 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다.^{49,50}

한편 clusterin은 두 가지 주요 유사형태로 발현되어 나타나는데, α 체인과 β 체인으로 구성된 이중이합체인 분비형 (secreted form) clusterin은 저선량에서 발현되어 세포를 보호하는 역할을 담당하고, 세포자멸사의 제거와 포식작용에 관여하며, 세포질 내에 전구물질의 형태로 존재하는 핵형 (nuclear form) clusterin은 고선량에서 활성화되어 세포자멸사를 유도하고, 세포의 성장을 억제하는 것으로 보고되고 있다.⁵¹ 따라서 clusterin은 세포자멸사와 세포의 생존 모두와 관련이 있는 것으로 알려져 있으나,^{26,52} 현재까지도 clusterin의 특정 역할은 불명하다.

본 실험에서는 clusterin의 발현 양상을 관찰한 결과, 2 Gy의 방사선조사시에는 실험 전 기간에 걸쳐 clusterin이 발현되었으나, 5 Gy 및 10 Gy의 방사선조사시에는 방사선 조사 후 1, 7, 14일에 clusterin이 발현되었고, 15 Gy의 방사선 조사시에는 방사선조사 후 1일에만 clusterin이 강하게 발현되었을 뿐 방사선조사 후 3일부터 clusterin이 세포질 한편으로 편재되는 현상이 나타나기 시작하였고, 이후부터는 clusterin의 발현이 감소되었다. 따라서 본 실험에서는 방사선 조사선량이 증가되고, 실험시일이 경과됨에 따라 clusterin의 발현이 감소되었으며, 선포세포와 선조관세포의 파괴상도 실험 초기에 관찰되어, 본 실험에서도 clusterin이 방사선에 의한 세포의 반응을 조절하는 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 방사선조사 후 발현되는 clusterin에 의한 세포의 반응은 손상의 정도와 종류, 세포의 종류, 세포주기 및 DNA 회복능 등을 포함한 여러 요소에 의해 결정될 뿐만 아니라,⁵³ 방사선에 의한 세포의 반응은 방사선 조사방법과 선량, 실험동물의 종과 연령, 세포의 증식과 분화 정도, 세포의 생리적 조건 등에 따라 상이하므로, 향후에는 이들 요인들을 면밀히 분석, 평가하여 실험조건을 개관화 시킨 다음 정상적인 구강생리에 많은 역할을 수행하는 타액선에 대한 방사선의 영향을 구명하는 것이 필요할 것으로 판단되며, 이와 더불어 방사선에 의한 세포자멸사 진행

시 clusterin의 발현에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 p53 tumor suppressor protein, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 등에 대한 연구도 병행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 779-87.
- Limesand KH, Barzen KA, Quissell DO, Anderson SM. Synergistic suppression of apoptosis in salivary acinar cells by IGF 1 and EGF. *Cell Death Differ* 2003; 10: 345-55.
- 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.
- Searle J, Kerr JFR, Brishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 1982; 17: 229-59.
- McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca^{++} concentration. *Arch Biochem Biophys* 1989; 269: 365-70.
- Eastman A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 1990; 2: 275-80.
- Yamada T, Ohyama H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int J Radiat Biol* 1988; 53: 65-75.
- Stephens LC, Schultheiss TE, Ang KK, Peters LJ. Pathogenesis of radiation injury to the salivary glands and potential methods of protection. *Cancer Bulletin* 1989; 4: 106-14.
- 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.
- 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.
- Stephens LC, Schultheiss TE, Small SM, Ang KK, Peters LJ. Response of parotid gland organ culture to radiation. *Radiat Res* 1989; 120: 140-53.
- Paardekooper GMRM, Cammelli S, Zeilstra LJW, Coppes RP, Koningsa WT. Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 641-8.
- Arai T, Kida Y, Harmon BV, Gobe GC. Expression and localization of clusterin mRNA in the small and large intestine of the irradiated rat: its relationship with apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1996; 69: 547-53.
- Rosenberg ME, Silkensen J. Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* 1995; 27: 633-45.
- Sensibar JA, Sutkowski DM, Raffo A, Buttyan R, Griswold MD, Sylvester SR, et al. Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCap cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* 1995; 55: 2431-7.
- Cannor J, Buttyan R, Olsson CAI. SGP-2 expression as a genetic marker of progressive cellular pathology in experimental hydronephrosis. *Kidney Int* 1991; 39: 1098-103.
- Kyprianou N, English HF, Davidson NE, Isaacs JT. Programmed cell death during regression of the MCF-7 human breast cancer following

- estrogen ablation. *Cancer Res* 1991; 51 : 162-6.
18. Montpetit ML, Lawless KR, Tenniswood M. Androgen-repressed messages in the rat ventral prostate. *Prostate* 1986; 8 : 25-36.
 19. Leger JG, Montpetit ML, Tenniswood MP. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147 : 196-203.
 20. Strange R, Li F, Saurer S, Burkhardt A, Friis RR. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. *Development* 1992; 115 : 49-58.
 21. Guenette RS, Corbeil HB, Leger J, Wong K, Mezl V, Mooibroek M, et al. Induction of gene expression during involution of the lactating mammary gland of the rat. *J Mol Endocrinol* 1994; 12 : 47-60.
 22. French LE, Wohlwend A, Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA. Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest* 1994; 93 : 877-84.
 23. Bursch W, Gleeson T, Kleine L, Tenniswood M. Expression of clusterin (testosterone-repressed prostate message-2) mRNA during growth and regeneration of rat liver. *Arch Toxicol* 1995; 69 : 253-8.
 24. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG. Distribution of clusterin in Alzheimer brain tissue. *Brain Res* 1992; 579 : 337-41.
 25. Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Rozovsky I, Young CC, Zarow C, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes: tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin. *Neuroscience* 1994; 58 : 563-72.
 26. Humphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, Wilson MR. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 1999; 274 : 6875-81.
 27. Sodicoff M, Pratt NE, Sholey MM. Ultrastructural radiation injury of rat parotid gland: a histopathologic dose-response study. *Radiat Res* 1974; 58 : 196-208.
 28. 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.
 29. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects on normal tissues. *Radiation Oncol* 2001; 61 : 223-31.
 30. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, et al. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001; 293 : 293-7.
 31. Gucehlaar HJ, Vermes A, Meerwaldt JH. Radiation-induced xerostomia: pathophysiology, clinical course and supportive treatment. *Support Care Cancer* 1997; 5 : 281-8.
 32. Coppes RP, Zeilstra LJ, Wissink A, Konings AW. Sialogogue-related radioprotection of salivary gland function: the degranulation concept revisited. *Radiat Res* 1997; 148 : 240-7.
 33. Muhvic-Urek M, Bralic M, Tomac J, Oncic J, Uhac I, Glazar I, et al. Early and late effects of X-irradiation on submandibular gland: a morphological study in mice. *Arch Med Res* 2005; 36 : 337-41.
 34. Muhvic-Urek M, Bralic M, Curic S, Pezeli-Ribaric S, Borcic S, Tomac J. Imbalance between apoptosis and proliferation cause late radiation damage to salivary gland in mouse. *Physiol Res* 2005; [Epub ahead of print].
 35. Klock G, Storch S, Rickert J, Gutacker C, Koch-Brandt C. Differential regulation of the clusterin gene by Ha-ras and c-myc oncogenes and during apoptosis. *J Cell Physiol* 1998; 177 : 593-605.
 36. French LE, Sappino A-P, Tschopp J, Schifferli JA. Distinct sites of production and deposition of the putative cell death marker clusterin in the human thymus. *J Clin Invest* 1992; 90 : 1919-25.
 37. Buttyan R, Olsson CA, Pintar J, Chang C, Bandyk M, Ng PY, et al. Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* 1989; 9 : 3473-81.
 38. Bettuzzi S, Troiano L, Davalli P, Tropea F, Ingletti MC, Grassilli E, et al. In vivo accumulation of sulfated glycoprotein 2 mRNA in rat thymocytes upon dexamethasone-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 175 : 810-5.
 39. Jenne D, Tschopp J. Clusterin the intriguing of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem Sci* 1992; 17 : 154-9.
 40. Blaschuk OW, Burdzy K, Fritz IB. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in rat rete testis fluid. *J Biol Chem* 1983; 258 : 7714-20.
 41. Boothman DA, Meyers M, Fukunaga N, Lee SW. Isolation of x-ray-inducible transcripts from radioresistant human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 7200-4.
 42. Yang CR, Yeh S, Leskov K, Odegaard E, Hsu HL, Chang C, et al. Isolation of Ku-70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Res* 1999; 27 : 2165-74.
 43. Nagler RM, Baum BJ, Miller G, Fox PC. Long-term salivary effects of single-dose head and neck irradiation in the rat. *Arch Oral Biol* 1998; 43 : 297-303.
 44. Valdez IH. Radiation-induced salivary dysfunction: clinical course and significance. *Spec Care Dent* 1991; 11 : 252-5.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. Hendry JH, Potten CS. Intestinal cell radiosensitivity: a comparison for cell death assayed by apoptosis or by loss of clonogenicity. *Int J Radiat Biol* 1982; 42 : 621-8.
 49. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162 : 156-9.
 50. Vaux DL. Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90 : 786-9.
 51. Yang CR, Leskov K, Hosley-Eberlein K, Criswell T, Pink JJ, Kinsella TJ, et al. Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 : 5907-12.
 52. Bach UC, Baiersdorfer M, Klock G, Cattaruzza M, Post A, Koch-Brandt C. Apoptotic cell debris and phosphatidylserine-containing lipid vesicles induce apolipoprotein J (clusterin) gene expression in vital fibroblasts. *Esp Cell Res* 2001; 265 : 11-20.
 53. Klokov D, Criswell T, Leskov KS, Araki S, Mayo L, Boothman DA. IR-inducible clusterin gene expression: a protein with potential roles in ionizing radiation-induced adaptive responses, genomic instability, and bystander effects. *Mutat Res* 2004; 568 : 97-110.