대한방사선종양학회지 2001;19(3):265 274

백서모델에서 방사선 직장염 유발인자로서의 Nitric oxide의 역할

아주대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 국민건강보험공단 일산병원 해부병리학과†, 동아제약연구소‡

전미선* ·강승희* ·진윤미† ·오영택* ·길훈종* ·오태영‡ ·안병옥‡

목 적 : 방사선 직장염은 골반부위에 방사선치료를 받는 환자에서 나타나는 급성부작용 중의 하나이다. 이러한 방사선 직장염은 병리학적으로 염증성 대장질환과 유사한 소견을 보인다. 따라서 염증성 대장질환의 유발인자로서 최근 활발하게 연구되고 있는 nitric oxide (NO)의 과다생성이 방사선 직장염을 유발하는 주요 원인일 수도 있다. 이를 검증하기 위하여 본 연구자들은 적절한 방사선 직장염 동물모델을 확립하고 이 모델에서 NO의 과다생성과 직장점막의 손상 정도의 상호 관련성을 연구하였다.

대상 및 방법 : 암컷 백서(Wistar)의 직장에 10 30 Gy의 다양한 선량의 방사선을 조사하였다. 방사선조사 후 5일 및 10일째에 직장조직을 얻어 점막의 형태학적 변화를 육안적으로 및 조직학적으로 관찰하였다. 방사선에 의한 손상에 대한 NO의 과다 생성이 미치는 영향을 평가하기 위하여 iNOS의 발현과 nitrite 측정을 시행하였고 iNOS의 억제제 및 기질을 경구투여한 후 점막 손상의 변화를 형태학적 및 생화학적으로 관찰하였다.

결 과 : 육안적으로나 조직학적으로 17.5 Gy 이상의 선량에서는 직장 점막에 명백한 손상이 발생하였으나 15 Gy 이하에서는 일부 검체에서만 경미한 정도의 변화를 나타냈다. 20 Gy 이상의 방사선을 조사한 후에는 검체 대부분에서 등급 4의 조직학적 변화를 보였기 때문에 임상에서 흔히 경험하는 방사선 직장염을 재현할 수 있는 가장 적절한 일회 방사선조사량으로 17.5 Gy를 선택하였다. 직장 점막의 조직학적 손상정도가 방사선량 및 iNOS의 과발현과 유의한 상관관계를 보였다. 그러나 iNOS의 기질 및 억제제의 경구투여시 iNOS 발현양상, NO 생성 및 조직 손상 정도의 차이는 없었다.

결 론 : 임상에 적용할 수 있는 방사선 직장염 연구를 위한 동물모델로서 적절한 일회 방사선조사량은 17.5 Gy임을 확인하였다. 또한 본 연구결과는 NO의 과다생성이 방사선에 의한 염증 및 손상 정도와는 연관성을 가지나 직접적인 원인이 아님을 시사하고 있다.

핵심용어 : 방사선 직장염, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, 백서모델

서 론

골반부위 종양으로 방사선치료를 시행하는 경우 직장조직도 상당한 선량의 방사선을 조사받는다. 따라서 많은 환자들이 방사선 직장염으로 인한 통증, 배변장애, 혹은 항문이급후증(rectal tenesmus)을 경험한다. 심한 경우 직장출혈이 발생하기도 한다. 이러한 급성 부작용은 환자의 활동도를 감소시킬 뿐만 아니라 치료를 쉬거나 중단할 정도로 심한 경우도 있다. 대부분의 경우 방사선 직장염은 방사선치료 종료 후 합병증없이 소실되나 일부의 환자에서 수개월에서 수년 후에 직장루, 협착, 만성적인 직장출혈 등의 심각한 후유증을 남기기도 한다. 따라서 방사선치료 중의 급성 증상을 경감 혹은 예방하고 심각한 만성 부작용을 감소시키는 것은 환자의 삶의 질을 향상시키는데 있어 중요하다.

아직까지 방사선 직장염의 치료는 이미 발생한 증상을 완화시키는 소극적인 수준에 머물러 있다. Aspirin, 혹은 sulphasalazine과 같은 비스테로이드성 소염제가 즉각적인 효과를 나타낸다는 일부의 임상보고가 있기는 하지만[1, 2] 대개의 경우 치료효과는 만족스럽지 못하다. 또한 동물모델을 이용한 약제 효능 검증 실험에서도 효과적인 약물을 발견하지 못하였다.[3, 4] 그러나 실제 임상에서 흔하지 않은 등급 4(직장 폐쇄, 혹은 직장 협착)의 부작용을 유발하는 방사선량을 사용한 기존의 동물 모델은 약제의 효능을 검증하기에 부적절하다고 생각된다. 따라서 임상에서 관찰되는 방사선 직장염을 재현할 수 있는 적절한 동물모델을 이용하여 방사선 직장염의 기전을 규명하고 나아가 이의 억제물질을 찾는다면 보다 효과적으로 방사선으로 인한 부작용을 예방할 수 있을

이 논문은 1999년 원자력연구개발 중.장기계획사업의 위탁연구과제로 수행되었음.

이 논문은 2001년 1월 9일 접수하여 2001년 6월 20일 채택되었음.

책임 저자 : 전미선, 아주대학교 의과대학 치료방사선과학교실
Tel : 031)219-5884, Fax : 031)219-5894
chunm@madang.ajou.ac.kr

것이다.

방사선 직장염의 내시경과 조직학적 소견은 염증성 대장질환과 유사한 염증성 병변을 나타내며 최근 염증성 대장질환이 NO의 산화과정을 통한 위장관의 조직손상 및 염증에 의해 유발된다고 보고되고 있다.[5-7] 그러나 방사선 직장염과 NO의 연관성에 대한 연구결과는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서 방사선 직장염 연구에 적합한 동물모델을 확립하고 이를 이용하여 NO가 방사선 직장염 발생에 미치는 영향을 규명해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

150 220 g의 암컷 Wistar rat (Charles River Japan, Kanagawa, Japan)을 사용하였다. 모든 동물은 표준화된 환경(실내온도 22±3℃, 습도 55±10%, 12시간 조명/12시간 소등) 하에서 사육하였다. 실험동물은 표준화된 우리에서 5 6마리씩 사육하였으며 표준 사료(제일, 한국) 및 자외선 소독된 음용수를 사용하였다.

동물의 발육상태를 점검하기 위하여 방사선치료 직전 및 치료후 매 2일마다 체중을 측정하였다. 또한 설사나 직장출혈 등의 증상 유무를 기록하였다.

2. 방사선조사

방사선을 조사하기 전에 모든 백서는 sodium pentobarbital (Somnopentyl®)을 복강 내로 주사하여 마취시킨 후 1 cm 두께의 acryl plate에 3마리씩 배와위로 위치시켰다. 사지 및 꼬리를 테이프로 고정하고 직장이 위치한 골반강의 중앙에 3 ×4 cm 크기의 방사선조사영역을 표시한 후 나머지 부위는 납 성분의 차폐물로 가려주었다. 균등한 방사선 분포를 위하여 백서의 배 위쪽에 1 cm 두께의 볼루스를 올려 놓았다 (Fig. 1). 실험군은 방사선조사군과 대조군인 방사선 위조사군(sham irradiation)으로 나누어 각 군마다 5 6마리의 백서를 배정하였다. 방사선은 환자 치료용 선형가속기를 이용하여 6 MV의 에너지로 골반 전면에서 일문 조사하였다. 방사선 직장염 모델 확립 및 방사선에 의한 점막 손상 정도에 따른 iNOS의 발현양상의 변화를 관찰하기 위하여 여러 가지 방사선량을 사용하였다. 10 30 Gy까지 2.5 Gy씩 증가시키면서 일회에 조사하였다(선량율 300 cGy/min). 방사선 직장염에서 NO의 영향을 평가하기 위하여 위 실험으로부터 결정된 선량인 17.5 Gy를 일회 조사하였다.

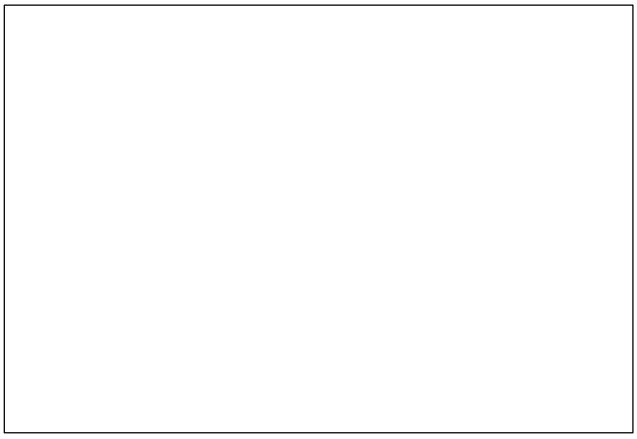

Fig. 1. Setup for Irradiation to the rectum of Wistar rats.

3. 약제의 투여

방사선 직장염 동물모델(17.5 Gy)에서 NOS 억제제로서 inducible form만을 특이적으로 억제하는 aminoguanidine (AG)을 사용하여 방사선에 의한 점막 손상의 감소여부를 실험하였다. AG는 방사선조사 2일전부터 조사후 7일째까지 총 10일간 1일, 2회씩 경구투여하였다(일회 투여량 50 mg/kg).

또한 iNOS의 기질인 L-arginine을 투여하여 점막 손상의 변화를 관찰하였다. 300 mg/kg의 L-arginine을 AG과 동일한 방식으로 경구투여하였다.

4. 육안 및 현미경에 의한 직장염의 관찰

다양한 선량의 방사선을 조사받은 백서를 방사선조사 후 5일 및 10일째에 희생시켜 직장 점막의 변화를 육안으로 관찰하였고 직장의 일부를 절제하여 조직슬라이드를 만들고 hematoxylin-eosin 염색을 하였다. 관찰시 편견을 최소화하기 위해 실험에 대한 사전 정보없이 한 명의 해부병리 의사에 의해 조직학적 변화가 관찰되었다. 육안 및 현미경적 소견을 아래에 서술한 기준에 따라 등급화하였다.[3] 관찰된 손상 정도의 결과를 근거로 방사선 직장염 모델에 적합하다고 생각되는 방사선량을 선택하였다.

확립된 방사선 직장염 동물모델에서 방사선조사(17.5 Gy) 후 시간경과에 따른 직장 점막의 형태학적 변화를 관찰하였다. 방사선조사 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 18, 21시간, 1 14일까지 매일, 및 6주째에 각각 백서를 희생시켜 형태학적 변화를 관찰하였다.

NO가 방사선 직장염에 미치는 영향을 평가하기 위하여 AG 및 L-arginine을 투여한 후 5일, 10일, 및 6주째에 백서를 희생시켜 동일한 방법으로 직장병변을 등급화하였다.

- 육안 관찰

0 : normal mucosa
1 : edema, mild hyperemia, or decreased vascularity
2 : diffuse hyperemia, multiple punctate areas of hemorrhage, or confluent areas of hemorrhage
3 : presence of erosions or frank hemorrhage
4 : ulcers

- 현미경적 관찰(Fig. 2)

0 : normal or minor alterations which cannot be ascribed with certainty to radiation
1 : slight radiation damage (mild inflammation and/or slight crypt change)
2 : mild damage (more significant inflammation, and/or crypt damage)
3 : moderate damage (must have prominent loss of epithelium, variable degree of inflammation)
4 : severe damage (ulcers, necrosis)

5. iNOS에 대한 면역조직화학염색

파라핀 블록을 5 μm 두께로 자르고 polyclonal (Rabbit) anti-iNOS antibody (ABR, USA)을 사용하여 streptavidine-biotin method로 염색하였다(Hsu 등, 1981). 염색 후 명백한 점막 병변이 있는 부위를 골라 400배율 하에서 임파구, 중성구, 및 염증세포들 중 면역염색에 양성을 보인 세포의 수를 세었다.

iNOS에 대한 비특이적 염색이 강해 면역염색 양성인 세포 수를 세는 것이 가능하지 않은 경우에는 염색 정도를 등급

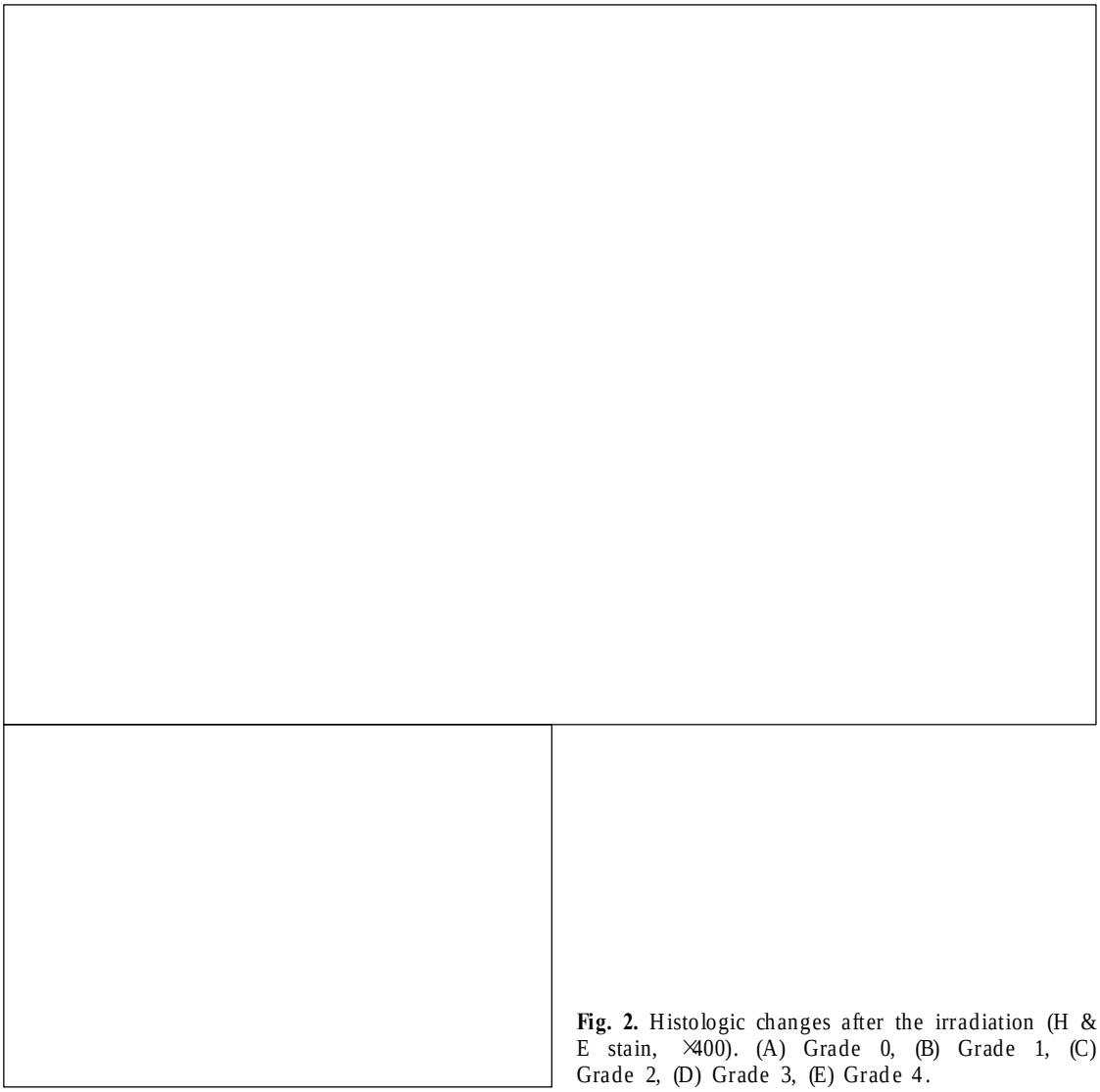

Fig. 2. Histologic changes after the irradiation (H & E stain, ×400). (A) Grade 0, (B) Grade 1, (C) Grade 2, (D) Grade 3, (E) Grade 4.

화하여 평가하였다(등급 0, 면역염색 양성 세포수 10개 이하; 등급 1, 20개 이하; 등급 2, 50개 이하; 등급 3, 100개 이하; 등급 4, 100개 초과).

6. Nitrite 농도측정

각각의 시기에 쥐를 희생시키고 20분 이내에 5 mm 길이의 직장조직을 떼어내어 무게를 측정한 후 1 mL의 세포 배양액이 들어있는 튜브에 넣고 24시간동안 배양한 후 상청액만을 취하여 사용할 때까지 얼려 놓았다.

Nitrite 농도는 Griess법으로 측정하였다.[5] 상청액 내에 들어 있는 단백질을 정량한 후 샘플과 표준용액(1 M sodium nitirite, 69,000 μL/mL in water) 50 100 μL/well씩을 넣고 동량의 sulfanilamide 용액(1% sulfanilamide solution in 5% phosphoric acid)을 각각의 well에 넣은 후 5분간 방치하였다. 동량의 NED 용액(0.1% N-1-napthylethlyldiamine dihydrochloride in water)을 넣고 다시 5분간 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. iNOS mRNA 발현 측정

iNOS의 mRNA를 신선한 조직으로부터 추출한 후 cDNA를 합성한 후 RT-PCR을 시행하였다. iNOS의 upstream primer의 염기배열은 5'-AGATGGATCAAGTGGACATC-3', downstream primer의 염기배열은 5'-CATGTTCTCCGGTTTCCAT-3'을 사용하였다.

8. 통계처리

실험으로부터 얻어진 자료는 평균값(mean±1 standard deviation)으로 나타내었다. 통계분석은 Spearman 상관분석 및 chi-squared test를 사용하였다. 유의수준은 $p<0.05$로 하였다.

결 과

1. 방사선조사에 의한 직장점막의 형태학적 변화

육안 관찰상 방사선조사 후 5일 및 10일째에 얻은 모든 조직에서 방사선량 증가에 따라 직장점막의 손상정도가 심화되었다($p<0.05$)(Table 1). 방사선조사 후 10일째가 5일째 보다 손상의 정도가 더 심하였다. 15 Gy 이하의 선량에서는 점막의 변화가 없었다. 17.5 Gy 조사군에서는 10일째에 일부 백서에서 등급 1의 변화를 보인 반면 20 Gy 이상에서는 모든 검체에서 등급 1 혹은 2의 병변을 관찰할 수 있었다. 이러한 변화는 대개 방사선이 조사되었던 직장의 원위부에서 관찰되었고 근위부의 점막은 정상소견을 보였다.

주요 조직학적 변화로 5일째에는 음와(crypt)의 확장, 급성 염증성 변화, 및 음와 상피세포의 위축인 반면 10일째에는 유사분열의 증가를 비롯한 상피세포의 재생 및 음와구조의 변형(distortion)이 우세하였다. 이러한 직장점막의 조직학적 변화는 육안소견과 비교할 때 더 낮은 선량에서부터(12.5 Gy) 변화를 보이기 시작하였으며(Table 1), 15 Gy 이상 조사한 경우 모든 조직에서 명백한 병변을 관찰할 수 있었다. 20 Gy 이상 조사시 대부분의 직장점막이 등급 4의 심한 손상을 나타냈다. 조직학적으로 직장점막의 손상정도가 방사선량의 증가에 따라 통계학적으로 유의하게 심화되었다.

이상의 결과로부터 방사선 직장염을 유발하는 동물모델로서 가장 적절한 일회 방사선조사량으로 17.5 Gy를 선택하였다. 17.5 Gy의 방사선을 조사한 후 시간에 따른 직장 점막의 변화를 조직학적으로 관찰하였다. 방사선조사후 24시간이내에는 육안적으로 아무런 변화가 관찰되지 않았으나 조직학적으로는 방사선조사 후 즉각적인 변화를 나타내기 시작하였다. 10시간까지는 음와의 변형이나 염증소견은 없었으나 음와 기저부에 세포자살체(apoptotic body)가 증가하였고 12시간 이후부터는 음와 기저부와 점막근층(muscularis mucosa)이 서로 분리되는 변화를 보였다. 방사선조사후 1일 경과 후부터 4일까지 육안적으로 직장점막에서 어떠한 변화도 관찰되지 않았고 5일째부터 점막 부종과 같은 1등급 정도의 변화를 보이기 시작하여 6일째부터 14일째까지 반 수 이상의 조직에서 미만성 충혈 혹은 다발성 점상출혈이 관찰되었다. 4주 이후에는 대개의 조직이 정상소견을 보였고 일부 조직에서 등급으로 분류할 수 없는 만성변화(섬유화로 인한 장막의 비후, 혹은 모세관확장(telangiectasis) 등)를 보여주었다. 방사선조사 후 시간 경과에 따른 직장점막의 조직학적 변화소견은 Table 2에 나타나 있다.

Table 1. Relationship between Gross and Microscopic Changes and Radiation Doses (Grade, Mean)

		Control	10 Gy	12.5 Gy	15 Gy	17.5 Gy	20 Gy	22.5 Gy	25 Gy	27.5 Gy	30 Gy
Day 5	Gross	0	0	0	0	0.2	0	0.2	0.2	0.8	0.8
	Micro	0	0	0	2	2	1.8	1.4	1.2	1.8	1.2
Day 10	Gross	0	0	0	0	0.4	1.2	1.6	2.6	2.2	1
	Micro	0	0	0.4	2.6	2.4	3.8	4	4	4	3.4

2. 방사선 직장염에 미치는 NO의 영향

1) iNOS에 대한 면역조직화학염색

점막손상의 정도가 명백한 10일째의 조직에서 방사선량 증가에 따라 조직학적 손상의 정도가 심화되면서 iNOS의 발현도 통계학적으로 유의하게 증가함을 관찰하였다($p<0.05$, Table 3).

17.5 Gy 조사 후 시간에 따른 iNOS 발현양상의 변화를 관찰하였다(Table 4). 면역염색상 비특이적 염색이 강해 iNOS에 양성을 보인 세포의 수를 정확히 세는 것이 가능하지 않아 등급으로 평가하였다. 방사선조사 후 7시간까지는 면역염색에 양성을 보인 세포의 수가 10개 이하로 대조군과 차이가 없었으나 이후 면역반응성이 지속적으로 증가하기 시작하여 9 11일 사이에 최고치를 보였다가 2 4주 사이에 두 번째 최고치를 나타내었다.

Table 2. Post-Irradiation (17.5 Gy) Histologic Changes in Rectum of Rat

Day after Irradiation	Histologic Findings
D 1 2	edema in the lamina propria
D 4	crypt dilatation with mild inflammation
D 6	marked crypt dilatation with epithelial atrophy inflammation with surface epithelial erosion
D 7 8	begining of focal regenerative change (crypt architectural distortion with increased mitosis)
D 9	multifocal ulceration with severe inflammation
D 10	ulceration with more prominent regenerative change
D 14	healing of ulceration with extensive regenerative change
W 4 6	complete regeneration, fibrosis with features of colitis cystica profunda
W 8 12	minimal inflammation with fibrosis in the lamina propria

2) Nitrite 측정 (Fig. 3)

17.5 Gy 1회 조사 후 시간에 따른 nitrite 생성 변화를 관찰하였다. 1일째부터 증가하기 시작하여 6일째에 최고치를 보인 후 감소하였으나 대조군보다 약간 높은 수준을 유지하였다. 방사선조사후 8일 이후부터는 일부 검체에서만 nitrite 수치가 매우 높게 측정되었다. 즉, 8일 이후에도 조직의 손상이 회복되지 않은 경우에만 nitrite 생성이 높게 측정되었다. 따라서 이러한 증가는 통계학적으로 유의하지 않았다.

3) RT-PCR법에 의한 iNOS 발현 측정 (Fig. 4)

대조군에 비해 17.5 Gy의 선량 조사후 1일째, 3 5일 사이, 및 8 일째에 iNOS mRNA의 발현이 증가되었다.

4) iNOS 기질 및 억제제의 경구투여 후 직장점막 병변의 변화

방사선 위조사군은 발육에 따라 정상적인 체중 증가를 보인 반면 두 실험군에서는 방사선조사 후 체중이 서서히 감소하여 10 14일 사이에 최저치를 보였으며 그 이후부터는 체중이 서서히 증가하기 시작하였다(Table 5).

iNOS의 선택적 억제제인 AG를 투여한 군이 방사선조사 단독군이나 iNOS의 기질인 L-arginine을 투여한 군에 비해 전 관찰기간동안 설사 빈도가 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$) (Table 6).

L-arginine 투여군의 6주째 육안 소견상 손상정도가 심하였으나 조직학적 소견이나 NO 발현양상에서는 차이를 발견할 수 없었다(Table 7). 또한 AG 투여군에서도 조직 손상의 정

Table 3. Relationship between Radiation Doses and Expression of iNOS in Irradiated Rectal Tissue of Rat (Mean number of positive cells in immunohistochemical stain for iNOS)(mean)

	Control	10 Gy	12.5 Gy	15 Gy	17.5 Gy	20 Gy	22.5 Gy	25 Gy	27.5 Gy	30 Gy
Day 5	3.6	1.8	2	3.2	8.6	13.2	2.2	3.4	13	10
Day 10	3	0.8	7.8	3.2	28.8	85	46.2	25.4	66	51.2

Table 4. Time Course of iNOS Immuno-Reactivity Changes in Irradiated Rectal Tissue of Rat with 17.5 Gy (Mean)

Time	C*	2H†	3H	4H	5H	6H	7H	8H	10H	12H	18H	21D‡	1D	2D	3D
Grade§	0.2	0.4	0.2	0.2	0.6	0.2	0.4	1.2	1.0	1.2	1.0	1.0	0.6	2.0	0.4
Time	4D	5D	6D	7D	8D	9D	10D	11D	12D	13D	2W	4W§	6W	8W	12W
Grade	2.2	2.2	2.8	2.4	2.8	3.2	3.0	3.4	1.4	2.0	2.6	2.8	1.4	0.4	1

C* : control, H† : hour, D‡ : day, W§ : week, ‖ Grade 0, ≤10 number of positive cells for iNOS; Grade 1, ≤ 20; Grade 2, ≤50; Grade 3, ≤100; Grade 4, >100

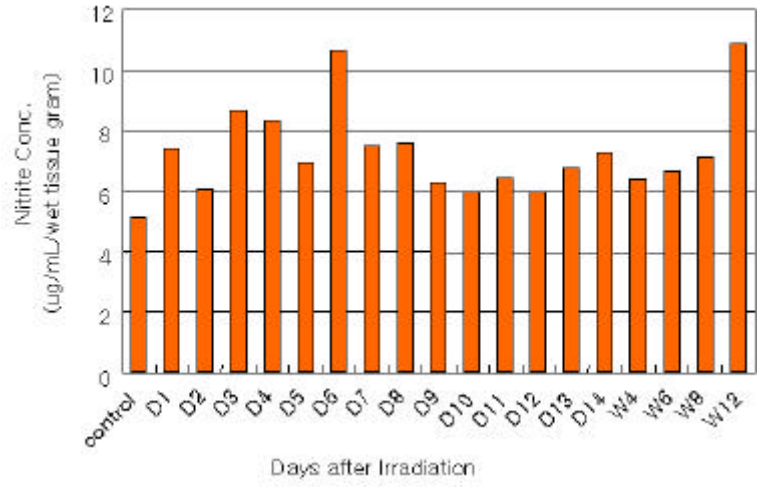

Fig. 3. Time course of nitrite production in irradiated rectal tissue.

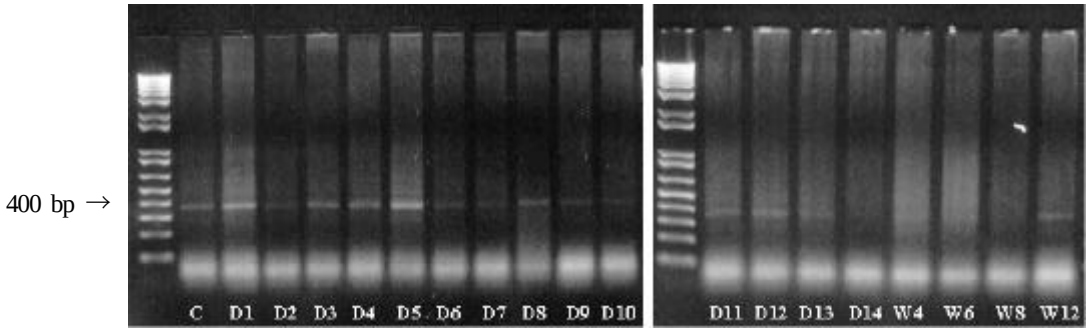

Fig. 4. Change of Expression of iNOS according to Time in Rectal Tissue after 17.5 Gy Irradiation by RT-PCR Method.

Table 5. Body Weight in Treatment Groups (Unit : kg) (mean±SD)

Time after irradiation	Day 0	Day 5	Day 10	Week 6
Normal	194.0±9.6	202.0±8.4	218.0±7.9	—
Radiation alone	202.8±10.8	190.0±15.9	163.0±5.5	195.0±1.4
R+Aminoguanidine	200.9±7.9	186.0±11.9	163.5±13.1	193.0±7.1
R+L-arginine	196.8±10.3	173.9±11.5	154.0±6.3	185.0±7.1

도 및 NO 발현이 감소하지 않았다.

고 찰

방사선 직장염은 방사선치료동안 환자에게 고통을 유발하며 이는 만성 부작용으로 연결되어 삶의 질을 감소시킨다. 그러나 지금까지 대부분의 연구들은 만성 방사선 직장염을 외과적으로 치료하는 방법들을 보고하였고 적은 수의 문헌들에서 내과적 치료에 대하여 보고하였다. 골반부위에 방사선치료를 받고 있는 환자에서 비스테로이드성 소염제인 aspirin, 혹은 sulphasalazine 등을 사용하여 즉각적인 증상 완화효과가 있음을 보여주었다.[1, 2] 반면에 Northway 등은 방사선 직장염 동물모델에서 다양한 비스테로이드성 소염제와 prostaglandin E1 유사체중 어느 약제도 방사선 직장염을 감소시키지 못했다고 보고하였다.[3] 또한 방사선 직장염의 손상에 관여하는 기전에 대한 명확한 연구결과들이 없기 때문에 치료방법도 경험에 의한 대증적인 치료에 머물고 있다.

본 연구에서 방사선량에 따라 직장점막의 손상이 증가하며 가장 심한 점막의 손상이 방사선조사 후 7 15일 사이에 나타난다는 Northway 등의 결과를 확인하였다. 임상에서 흔

Table 7. Comparisons of Morphologic Changes and Change of NO Expression according to Treatment Group (mean±SD)

	Gross (grade)			Micro (grade)			IHC‡ (grade)			Nitrite (ug/mL/tissue gram)		
	5day	10day	6wk	5day	10day	6wk	5day	10day	6wk	5day	10day	6wk
RT alone	0.3±0.5	1.7±0.6	2±1.4	1.3±0.6	3±0	3±1.4	0.3±0.6	2.7±0.6	1.7±0.6	32.5	6.8	14.9
RT+AG*	1±1.2	1.6±1	2.5±2.1	1.3±0.6	3.3±1.2	3±1.4	2±0	3±0	1.3±0.6	37.7	8.7	0.6
RT+Arg†	1.5±0.5	1.7±0.6	4±0	2±1	2.7±0.6	3.5±0.7	1±1	2.7±0.6	1.7±0.6	25.4	6.7	0.7

AG*, amioguanidine; Arg†, L-arginine; IHC‡, immunohistochemical stain (Grade 0, ≤10 number of positive cells for iNOS; 1, ≤ 20: 2, ≤50; 3, ≤100; 4, >100)

히 관찰되는 급성 방사선 직장염은 대개 만성부작용으로 이행하지 않고 치유되는데 반해 많은 문헌들에서 사용한 높은 선량은 섬유화, 직장출혈, 혹은 직장협착과 같은 심각한 손상을 유발한다. 본 연구에서는 20 Gy 이상의 선량을 받은 거의 모든 조직에서 등급 4의 심한 병변이 발생하였다. 또한 Hubmann 등에 의하면 직장폐쇄에 대한 ED10, ED50, ED90가 각각 17.5 Gy, 21.5 Gy, 27.5 Gy 임을 보고하였다.[8] 이에 근거하여 본 연구자들은 방사선직장염 동물모델을 위한 가장 적절한 선량으로 17.5 Gy를 제시하였다.

Buell 등은 수컷 Sprague-Dawley의 직장에 10 Gy의 방사선을 조사한 결과 방사선조사 후 4 8시간에 이미 미세혈관의 투과도가 증가함을 관찰하였는데 이는 방사선치료를 받기 시작한 첫 주부터 복부 팽만감을 호소하는 환자들의 증상을 설명할 수 있는 결과이다.[9] 본 연구에서도 17.5 Gy의 방사선 조사 후 10시간이내에 음와 기저에서 세포자살이 나타나며 12시간 이후부터는 명백한 점막하 부종이 관찰되었다.

방사선 직장염은 임상적 및 병리학적으로 염증성 대장질환과 유사한 염증성 병변을 유발하여 급성기에는 직장 전반에 걸친 부종, 점막의 충혈(hyperemia), 정상적인 혈관형태의 소실, 미란성 병변(erosion), 궤양, 및 염증성 변화를 나타낸다.[3, 10] 염증성 대장질환에 관한 연구에 의하면 염증성 세포에 존재하는 NOS의 생성물인 NO가 산화과정을 통해 조직손상 및 염증의 발생과정에 관여한다고 보고하고 있다.[3] Yamada 등은 peptidoglycan-polysaccharide를 이용하여 쥐에 만성 대장염을 유발하고 점막손상, 염증성 변화, 및 NO의 생성을 관찰하였는데 대식세포와 호중구에서 NOS의 활성도가 증가하여 NO의 생성이 증가함을 보여주었다.[11] 또한 Rachmilewitz 은 궤양성 대장염와 크론씨병을 갖고 있는 환자들로 부터 얻은 조직에서 NOS의 활성과 NO의 생성이 증가되어 있었으며 또한 대장염 동물모델에서 NOS 활성을 억제함으로써 손상의 정도를 감소시킬 수 있음을 증명하였다.[12, 13]

NO는 매우 짧은 반감기를 갖는 무기성 자유 라디칼 가스로서 구조적으로 여분의 전자를 갖고 있기 때문에 화학적으로 매우 높은 활성을 갖는다. NO는 Furchgott 등(1980)에 의해 처음으로 혈관의 이완작용을 유발하는 endothelial-derived relaxing factor (EDRF)로서 알려졌고[14] 1987년 Ignarro 등[15] 및 Palmer 등[16]에 의해 EDRF와 NO가 동일 물질임이 증명되었다. 이후로 많은 다른 세포에서 NO의 존재 및 생물학적 연관성이 입증되었다.[16, 17] NO는 혈관계, 신경계, 및 면역체계에서 중요한 세포신호전달물질로서 작용하며 활성화된 대식세포 및 혈관내피세포에 의해 고농도로 생성되는 경우에는 cytostatic/cytotoxic mediator로서 역할한다.[17 19] NO는 NOS에 의해 arginine을 기질로 하여 합성된다. NOS는 조직 내에 기본적으로 존재하는 constitutional form (cNOS)과 어떤 외부적 자극에 의해 유도되는 inducible form (iNOS)의 두가지 형태가 있다. cNOS는 혈관내피세포(ecNOS), 중추 및 말초 신경계의 신경세포(ncNOS)에 존재하며 iNOS는 endotoxin, 세포활성물질(cytokine), 미생물 및 이의 생성물, 일부의 종양세포 등의 자극에 의해 다양한 세포들(간세포, 연골세포, 선암세포, 각막세포 호흡상피세포, 및 대식세포)에서 발현된다.[20, 21] NO의 생성은 L-arginine의 구조적 유사체(structural analogs)인 L-NMMA, L-NNA, L-NAME와 NO의 negative feedback작용 등에 의해 억제된다.

NO는 농도에 따라 서로 상반된 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 조직 내에 저농도로 존재하는 경우, 예를 들어 저농도의 ethanol이나 고장성 수액과 같은 온건한 자극제는 NO의 생성을 통해 위장 보호효과를 나타내는 반면 endotoxin 등에 의해 iNOS가 유도되거나 체내에서 NO로 대사되는 물질이 외부로부터 주입됨으로써 부적절하게 과량의 NO가 생성되는 경우 점막의 통합성(integrity)를 손상시켜 병변을 유발한다.[22] 이러한 손상의 기전으로 점막의 혈관이완, 점막과 혈관의 투과성의 증가, 및 NO 라디칼 혹은 이로부터 유도되는 고활성의 hydroxy 라디칼에 의한 직접적인 세포손상 등이 보고되고 있다. Beckman 등은 NO의 기능이 전환되는 기전을 연구하였다.[23 25] Oxidative stress, reactive oxygen intermediates, 항산화 체계의 결함과 같은 요인이 있는 경우 NO가 supero-

xide와 diffusion-limited reaction을 일으켜 peroxynitrite을 생성하는데 이 물질은 광범위한 protein tyrosine nitration을 유발함으로써 세포를 직접 손상시킬 수 있으며 NO의 신호전달 기능을 변화시키는 작용을 한다고 하였다.

Nozaki 등은(1997) 쥐의 한쪽 폐에 40 Gy의 방사선을 조사한 결과 폐포 대식세포 및 폐포 상피세포가 iNOS 발현을 통해 NO를 생성하며 이로 인해 방사선에 의한 폐렴 및 폐섬유화가 유도됨을 관찰하였다.[26] 본 연구에서는 직장염 모델에서 면역조직화학염색상 방사선량 증가에 따라 iNOS의 발현이 통계학적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. 또한 17.5 Gy를 조사한 후 시간경과에 따른 조직점막 손상과 iNOS 발현의 연관성을 실험한 결과 10일 전후에 점막손상이 가장 심하였고 이 시기에 iNOS의 과발현도 가장 높은 수치를 보였다. 그러나 RT-PCR법의 결과와 NO의 최종 대사산물인 nitrite 수치를 측정한 실험에서 나타난 양상과는 차이가 있었다. 이는 각 실험에서 사용한 검체의 차이에서 비롯된 것으로 생각된다. 방사선을 조사받은 근위부의 직장은 방사선을 조사받지 않은 인접한 점막으로부터 정상세포들의 이동에 의해 원위부에 비해 탁월한 재생능력을 갖는다. 본 연구에서도 점막의 근위 1/3 1/2 부위는 정상소견을 보이고 원위부는 병변을 갖는 경우가 흔하였다. 따라서 면역조직화학염색시 명백한 병변이 있는 부위에서 검체를 취하였고 결과 판독시에도 점막의 변화가 가장 심한 곳을 골라 염색에 양성을 보인 세포의 수를 센 반면 RT-PCR법 및 nitrite 측정실험에서는 방사선을 받았으나 이미 손상이 복구되어 정상소견을 보이는 부위가 포함되어 있는 조직표본을 갈거나 배양하여 사용하였기 때문에 실험결과에서 차이를 보인 것으로 해석된다. 또한 nitrite 측정실험에서 12주째의 높은 수치는 모든 검체의 전반적인 증가때문이 아니라 한 개체의 높은 수치를 반영하는 것으로 궤양과 같은 심한 병변으로 인해 NO의 생성이 증가하여 나타난 결과라고 생각된다.

방사선에 의한 직장손상에 NO가 직접적인 원인물질인지를 확인하기 위하여 방사선조사 전 및 방사선조사동안 iNOS 억제제 및 iNOS의 기질을 함께 사용한 후에 직장점막의 변화를 관찰하였다. 그러나 방사선만을 조사한 대조군과 비교했을 때 약제 투여군에서 손상 정도의 차이를 발견할 수 없었고 단지 iNOS 억제제를 사용한 실험군에서 설사의 빈도가 적었다. 이는 Rachmilewitz 등이 실험적으로 대장염을 유발한 쥐에서 NOS 활성을 억제함으로써 손상의 정도를 감소시킬 수 있었다는 연구와는 상반된 결과이다.[13]

Nakamura 등은 trinitrobenzene sulphonic acid로 유발한 대장염에서 AG에 의한 방어효과가 AG의 농도와 관계있음을 보고하였다.[27] AG 1.5 μmol/kg 경구투여시 대장염의 정도 및 MPO 수치가 감소한 반면 150 μmol/kg에서는 전혀 방어효과가 없었다. 연구자들은 많은 양의 AG는 혈관에서 iNOS를 억제하여 혈관을 수축시킴으로써 대장점막의 혈류를 감소시킨 결과로 설명하였다. 또 다른 가능성으로 대량의 AG는 모든 NO의 생성을 억제하여 superoxide를 제거할 수 있는 양의 NO 조차도 남겨 놓지 않아 점막손상을 개선할 수 없음을 제시하였다. 이들은 또한 in vitro 실험에서 AG가 0.5 500 μM의 용량에서 용량반응적으로 대장점막세포의 증식을 가속화시키는 것을 관찰하여 AG가 항염증작용뿐만아니라 치료적인 효과도 있다고 하였다. 본 연구에서 사용한 AG의 용량에서 방어적 효과가 없었던 것이 Nakamura 등이 항염증 효과가 있다고 제시한 용량보다 높은 용량을 사용하였기 때문으로 생각할 수도 있으나 iNOS의 기질인 arginine을 사용한 경우에 점막의 손상이 심해지지 않은 점과 AG 사용군에서 설사의 빈도가 감소한 점을 감안할 때 단순히 AG의 용량만으로 방어적인 효과가 없음을 설명할 수는 없을 것으로 생각되며 확실한 결론을 내리기 위해서는 보다 많은 백서에서 다양한 용량의 AG를 사용한 실험이 필요할 것으로 판단된다.

설사 빈도가 AG 투여군에서 유의하게 감소하였는데 이는 방사선조사야에 포함된 소장 일부에 대한 방사선 영향이 AG의 항염증작용에 의해 개선된 것으로 생각된다. 그러나 이는 직장점막에서 관찰한 것과는 상반된 결과였다. 본 실험에서는 소장에 대한 형태학적 관찰을 시행하지 않았기 때문에 이러한 결과의 원인을 분석하기는 곤란하였다.

결 론

방사선조사량의 증가에 따라 육안적, 조직학적 변화의 정도가 유의하게 증가하였으며 손상이 심할수록 NO의 생성도 유의하게 증가하였다. 이러한 결과를 근거로 임상에 적용할 수 있는 동물모델로서 가장 적절한 일회 방사선조사량으로 17.5 Gy를 제시하였다. 17.5 Gy의 일회 조사후 시간에 따른 직장점막의 손상의 정도와 NO 발현이 통계학적으로 유의한 상관관계를 보여주었다. 그러나 방사선조사 전 및 방사선조사동안 iNOS 억제제, AG 50 mg/kg 일일 2회 경구투여는 방사선 직장염을 개선시키지 못하였고 iNOS의 기질을 함께 사용한 경우에도 방사선만을 조사한 대조군과 비교했을 때 손상 정도에 차이가 없었다. 따라서 NO는 방사선에 의한 염증정도와는 연관성을 가지나 방사선에 의한 점막손상을 일으키는 직접적인 원인은 아니라고 생각된다. 따라서 방사선 직장염의 기전으로 NO의 역할은 다른 reactive oxygen species와

의 유기적 관계에 의해 결정될 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. **Mennie AT, Dalley VM, Dinneen LC, Collier HOJ.** Treatment of radiation-induced gastrointestinal distress with acetylsalicylate. Lancet 1975;2:942-943
2. **Goldstein F, Khoury J, Thorton JG.** Treatment of chronic radiation enteritis and colitis with salicylazolsulfapyridine and systemic corticosteroids. Am J Gastroenterol 1976;65:201-208
3. **Northway MG, Scobey MW, Geiwinger KR.** Radiation proctitis in the rat: Sequential changes and effects of anti-inflammatory agents. Cancer 1988;62:1962-1969
4. **Breiter N, Trott KR.** The pathogenesis of the chronic radiation ulcer of the large bowel in rats. Br J Cancer 1986; 53(suppl. VII):29-30
5. **Rachmilewitz D, Karmeli F, Eliakim R, et al.** Enhanced gastric nitric oxide synthase activity in duodenal ulcer patients. Gut 1994;35:1394-1397
6. **Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E.** Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase. Gastroenterology 1995;109:98-106
7. **Ribbons KA, Zhang XJ Thomson JH, et al.** Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques. Gastroenterology 1995;108:705-711
8. **Hubmann FH.** Effect of x-irradiation on the rectum of the rat. Br J Radiol 1981;54:250-254
9. **Buell MG, Harding RK.** Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. Digest Dis Sci 1989;34:390-399
10. **Sher ME, Bauer J.** Radiation-induced enteropathy. Am J Gastroenterol 1990;85:121-128
11. **Yamada T, Sartor RB, Marshall S, Specian RD, Grisham MB.** Mucosal injury and inflammation in a model of chronic granulomatous colitis in rats. Gastroenterology 1993; 104:759-771
12. **Rachmilewitz D, Stramler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky D.** Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut 1995;36:718-723
13. **Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Bursztyn M.** Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. Gut 1995;37:247-255
14. **Forchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-376
15. **Ignarro LJ, Bugo GM, Byrns RE, Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:9265-9269
16. **Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S.** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327:524-526
17. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and Pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43:109-142
18. **Marletta MA, Poksyn SY, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS.** Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate : nitric oxide is an intermediate. Biochemistry 1988;27:8706-8711
19. **Li L, Kilbourn RG, Adams J, Fidler IJ.** Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. Cancer Res 1991;51:2531-2535
20. **Palmer RMJ, Moncada S.** A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1989;158: 348-352
21. **Busse R, Mulsch A.** Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. FEBS lett 1990; 275:87-90
22. **Konturek SK, Konturek PC.** Role of nitric oxide in the digestive system. Digestion 1995;56:1-13
23. **Beckman JS.** The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. J Dev Physiol 1991; 15:53-59
24. **Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.** Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87: 1620-1624
25. **Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, et al.** Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. Biol Chem Hoppe-Seyler 1994;375:81-88
26. **Nozaki Y, Hasegawa Y, Takeuchi A, et al.** Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats. Am J Physol 1997;272:L651-L658
27. **Nakamura H, Tsukada M, Oya M, et al.** Aminoguanidine has both an anti-inflammatory effect on experimental colitis and a proliferative effect on colonic mucosal cells. Scand J Gastroenterol 1999;11:1117-1122

Abstract

Radiation-Induced Proctitis in Rat and Role of Nitric Oxide

Mison Chun, M.D.*, Seunghee Kang, M.D.*, Yoon-Mi Jin, M.D.†,
Young-Taek Oh, M.D.*, Hoon-Jong Kil, M.D.*, Byoung-Ok Ahn‡ and Tae-Young Oh‡

*Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Ajou University
†Department of Anatomic Pathology, National Health Insurance Corporation Ilsan Hospital
‡Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co. Ltd., Korea

Purpose : Proctitis is one of acute complications encountered when radiotherapy was applied to the pelvis. Radiation-induced proctitis represents similar microscopic findings that are observed in inflammatory bowel disease (IBD). Nitric oxide (NO) plays an important role in the inflammatory process and many data suggest a close relationship between NO production and gastrointestinal inflammation. This study was aimed to establish the optimal radiation dose for radiation-induced proctitis in rat and to find a relationship between radiation proctitis and NO production.

Materials and methods : Female Wistar rats, weighing from 150 to 220 g, received various doses(10-30 Gy) of radiation to the rectum. On the 5th and 10th day after irradiation, rectal specimens were evaluated grossly and microscopically. In addition, the degree of NO production by irradiation dose was evaluated by study with NOS expression and nitrite production in the irradiated rectal tissue. To evaluate relationship between radiation proctitis and NO, we administered aminoguanidine, iNOS inhibitor and L-arginine, substrate of NOS to rats from 2 days before to 7 days after the irradiation.

Results : There were obvious gross and histological changes after 17.5 Gy or higher radiation dose but not with 15 Gy or less radiation dose. Twenty Gy or higher dose of radiation caused Grade 4 damage in most of rectal specimens which were more likely to be related to the late complications such as fibrosis, rectal bleeding and rectal obstruction. A single fraction of 17.5 Gy to the rat rectum is considered to be an optimal dose to produce commonly experienced proctitis in the clinic. The result demonstrated that severity of microscopic damage of rectal mucosa from irradiation significantly correlated with iNOS overexpression. However, administration of iNOS inhibitor or substrate of iNOS did not influence the degree of rectal damage.

Conclusion : A single fraction of 17.5 Gy irradiation to the rat rectum considered to be an optimal dose for radiation induced proctitis model. These results indicated that an excess production of NO contributes to pathogenesis of radiation-induced proctitis in part but was not the direct cause of rectal damage.

Key Words : Radiation proctitis, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Rat model