

당뇨병 유발 쥐에서 신경 세포 증식에 대한 저선량 방사선의 효과

경희대학교 의과대학 방사선종양학교실, 생리학교실*

김두순 · 강진오 · 홍성언 · 김상기 · 이택현* · 김창주*

목적: 저선량 방사선이 당뇨쥐의 해마에서 신경 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서이다.

대상 및 방법: 정상 쥐를 대상으로 방사선을 조사하지 않은 군, 0.1 Gy 방사선 조사군, 10 Gy 방사선 조사군으로 나눠 방사선이 정상 신경 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하였다. 당뇨쥐를 대상으로 한 이차 실험은 방사선을 조사하지 않은 정상 쥐, 방사선을 조사하지 않은 당뇨쥐, 0.01 Gy 방사선 조사한 당뇨쥐, 0.1 Gy를 조사한 당뇨쥐, 1 Gy를 조사한 당뇨쥐, 10 Gy를 조사한 당뇨쥐로 나눠 시행하였다. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)를 이용한 면역 염색을 시행하여 쥐 해마의 치아이랑 세포의 수를 세어 비교하였다.

결과: BrdU 양성 세포의 수는 대상으로 방사선을 조사하지 않은 정상쥐, 0.1 Gy 방사선 조사한 정상쥐, 10 Gy 방사선 조사한 정상쥐에서 각각 $45.96 \pm 3.42/\text{mm}^2$, $59.34 \pm 5.20/\text{mm}^2$, $19.26 \pm 2.98/\text{mm}^2$ 로 나타났다. 당뇨쥐를 대상으로 한 이차 실험에서 BrdU 양성 세포의 수는 방사선을 조사하지 않은 정상 쥐, 방사선을 조사하지 않은 당뇨쥐, 0.01 Gy 방사선 조사한 당뇨쥐, 0.1 Gy를 조사한 당뇨쥐, 1 Gy를 조사한 당뇨쥐, 10 Gy를 조사한 당뇨쥐에서 각각 $55.44 \pm 8.57/\text{mm}^2$, $33.33 \pm 6.46/\text{mm}^2$, $67.75 \pm 10.54/\text{mm}^2$, $66.63 \pm 10.05/\text{mm}^2$, $23.59 \pm 6.37/\text{mm}^2$, $14.34 \pm 7.22/\text{mm}^2$ 로 나타났다.

결론: 0.1 Gy 이하의 저선량 방사선은 당뇨쥐의 해마 치아이랑세포의 수를 증가시켜 세포 증식효과를 보이는 것을 확인하였다.

핵심용어: 방사선, 해마, 신경세포

서 론

당뇨병은 매우 흔하면서도 심각한 부작용을 초래하는 대사 질환 중의 하나이다. 장기간 지속된 당뇨병은 학습과 기억 능력에 관여하는 해마(hippocampus)의 치아이랑(dentate Gyrus)의 세포 증식을 억제하여¹⁾ 기억 장애나 인지 능력의 저하를 초래한다.²⁾ 해마의 치아이랑의 세포 증식에 관여하는 인자로는 세로토닌³⁾, 에스트로겐⁴⁾, 신체 운동⁵⁾ 등이 알려져 있으며, 증식 억제에 관여하는 인자로는 스테로이드 호르몬⁶⁾, 스트레스⁷⁾, 노화⁸⁾ 등이 보고되고 있다. 또한 방사선은 신경세포의 사망과 증식 억제에 관여하며 인지 능력을 저하시키는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 그러나 Feinendegen 등¹⁰⁾의 보고에 의하면 0.1 Gy 수준의 저선량 방사선은 고선량 방사선과는 달리 거의 모든 세포에서 보호 효

과를 보인다고 하였으며 Wolff 등¹¹⁾은 0.01 Gy의 낮은 선량의 엑스선에 노출된 후 1 Gy의 방사선에 재차 노출된 경우 유전자 손상이 절반으로 감소한다고 보고하여 방사선의 선량 수준에 따른 적응 효과(adaptive response)가 있음을 시사하였다. 이에 저자들은 저선량 방사선이 당뇨병에 의해 유발된 쥐의 신경 세포 손상 보호 효과와 차별적 효과(alternative response)가 있는지 확인하기 위하여 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

생후 7주 차 250 gm의 수컷 Sprague-Dawley 쥐를 12시간 간격의 낮, 밤 주기를 유지하여 적응시킨 후 당뇨병을 유발시키기 위하여 복강 내에 streptozotocin (STZ, 50 mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 주사하였다. 대조군은 같은 양의 생리식염수를 주사하였다. STZ 주사 후 2일 뒤 혈중 포도당 농도를 측정하여 300 mg/dL이 넘는 쥐만 실험 대상으로 사용하였다. 실험은 방사선을 조사하지 않은 대조군, 0.1 Gy 조사군 그리고 1 Gy 조사군 세 군으

이 논문은 2005년 5월 10일 접수하여 2005년 8월 26일 채택되었음.
책임저자: 강진오, 경희대학병원 방사선종양학과
Tel: 02)958-8664, Fax: 02)962-3002
E-mail: kangjino@khmc.or.kr

로 나눠 각 군당 최소 5마리씩 사용하였다. 대상 쥐는 방사선 조사하기 10분 전에 복강 내 50 mg/kg의 용량의 BrdU (Bromodeoxyuridine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 주입하고 선형가속기(Clinac 2100C, Varian Co., USA)를 이용하여 6 MV 엑스선을 선량률 240 cGy/min으로 전신 조사하였다. 대상 쥐들은 방사선 조사 후 2시간 뒤에 희생시켜 이랑세포의 수를 관찰하였는데 이는 저자들의 기존의 실험 방법^{5,12}에서 외부 자극 후 이랑 세포의 차이가 가장 많이 나타났던 시간을 고려한 것이다.

또한 STZ에 의해 당뇨병이 유도된 쥐의 해마 치아이랑의 세포의 증식과 사망에 방사선 선량의 영향을 보기 위해 대조군, STZ 당뇨병 유도군, STZ 당뇨병 유도된 쥐에 각각 0.01 Gy, 0.1 Gy, 1 Gy, 10 Gy 방사선 조사한 군으로 나눠 동일한 실험을 진행하였다.

실험 쥐는 Zoletil 50[®] (10 mg/kg, i.p.; Vibac Laboratories, Carros, France)로 마취시킨 후, 심장 내에 50 mM phosphate-buffered saline (PBS)를 주입하고 100 mM phosphate buffer (PB, pH 7.4)에 4% paraformaldehyde (PFA)를 사용하여 고정하고 뇌를 꺼내 동일한 고정제로 하룻밤 동안 이차 고정을 하였다. 다음 날 30% sucrose solution으로 옮겨 40 µm 두께로 절편을 만들었다.

각 절편은 PBS에 Triton X-100을 0.5% 농도로 만든 용액을 이용하여 20분간 보관하여 투과성이 생기도록 한 뒤 다시 65°C에서 50% formamide-2 x standard saline citrate에 2시간 보관하고 37°C에서 2 N HCl에 30분 보관하여 denaturation하고 100 mM sodium borate (pH 8.5)에서 두 차례 세척하였다. 이 절편에 BrdU-specific mouse monoclonal antibody (1 : 600; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 적용한 뒤 4°C에서 하룻밤 보관하여 항원-항체 반응을

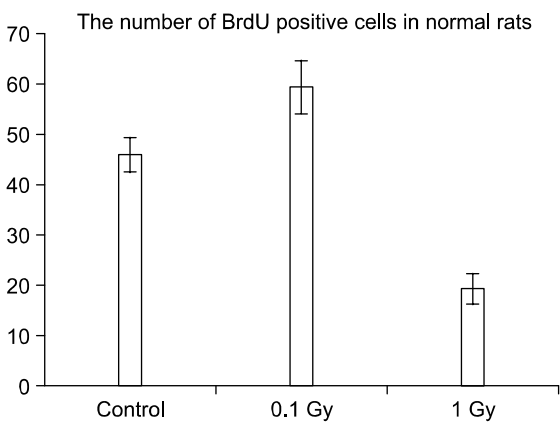


Fig. 1. The effect of irradiation on the number of BrdU positive cells in the dentate gyrus of normal rats. The number of BrdU positive cells was increased in 0.1 Gy irradiated group ($p < 0.05$).

유도하였다. 다음 날 PBS에 세 차례 세척 후 biotinylated mouse secondary antibody (1 : 200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)에 한 시간 동안 반응시키고 VECTASTAIN[®] Elite ABC Kit (1 : 100; Vector Laboratories)에 한 시간 동안 반응시켰다. 발색 반응은 0.02% 3,3'-diaminobenzidine containing nickel chloride (40 mg/mL)(nickel-DAB)와 0.03% H₂O₂ in 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)의 혼합액에 5분간 반응시켰다. 발색 반응이 끝난 절편은 Permount[®] (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)를 이용하여 봉입하였다.

해마 치아이랑의 과립층(granular layer)을 Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)를 이용하여 분석하였다. BrdU 양성인 세포의 수를 세어 과립층 제곱밀리미터당 세포 수로 기록하였다. 통계는 SPSS 10.0 프로그램을 이용하여 일원 분산 분석과 Duncan post-hoc test를 시행하였다. p값이 0.05 미만인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

STZ를 사용하지 않은 대조군에서 치아이랑의 BrdU 양성 세포의 수는 방사선을 조사하지 않은 군은 45.96±3.42/mm², 0.1 Gy군은 59.34±5.20/mm², 1 Gy 조사 군은 19.26±2.98/mm²로 나타나서 0.1 Gy 저선량 방사선 조사군에서 세포수가 증가한 것으로 나타났다($p < 0.05$)(Fig. 1).

방사선량에 따른 변화를 보기 위한 이차 실험에서 치아이랑의 BrdU 양성 세포의 수는 대조군에서 55.44±8.57/

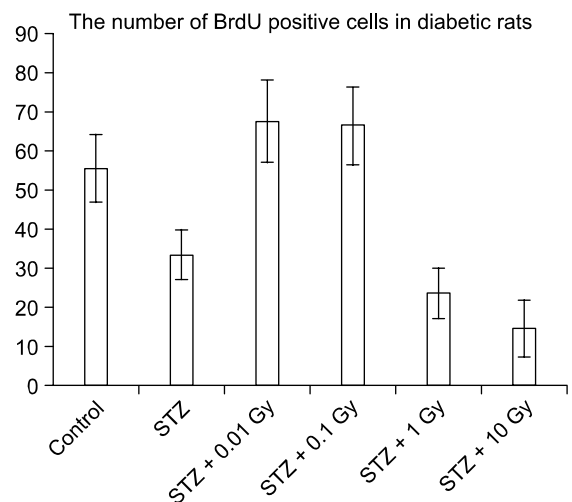


Fig. 2. The effect of irradiation on the number of BrdU positive cells in the dentate gyrus of diabetic rats. The numbers of BrdU positive cells were increased in both 0.01 Gy and 0.1 Gy irradiated group ($p < 0.05$).

mm², STZ로 당뇨병을 유발시킨 대조군은 33.33±6.46/mm², STZ 당뇨병 유발 쥐에 0.01 Gy, 0.1 Gy, 1 Gy, 10 Gy 방사선을 조사한 군은 각각 67.75±10.54/mm², 66.63±10.05/mm², 23.59±6.37/mm², 14.34±7.22/mm²로 나타났다(p<0.05)(Fig. 2).

위의 결과에 의하면 STZ에 의해 당뇨병이 유발된 쥐의 치아이랑의 세포 증식은 억제되며, 1 Gy 이상의 방사선이 조사된 경우 세포 증식 억제 효과가 더 심하게 나타났다. 그러나 0.01 Gy와 0.1 Gy의 저선량에서는 STZ에 의해 당뇨병이 유발된 쥐의 치아이랑의 세포 수가 증가하였다.

고안 및 결론

당뇨병은 쥐의 해마에서 아포토시스로 인한 세포사의 증가와 세포 증식의 저하를 일으켜 인지 장애를 초래하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ Revsin 등¹³⁾은 STZ에 의해 당뇨병이 유발된 쥐의 해마에서 교질화(astrogliosis)와 신경세포의 발생(neurogenesis)이 현저하게 억제된다고 보고하였는데, 본 실험에서도 치아이랑의 세포의 수가 당뇨병이 없는 대조군은 55.44±8.57/mm², STZ로 당뇨병을 유발시킨 대조군은 33.33±6.46/mm²로 당뇨병 유발군에서 약 60% 가량 감소한 것으로 나타나 당뇨병에 의한 세포 수의 감소를 확인할 수 있었다.

방사선 적응반응에 대한 연구는 많이 행해지지 않고 있으나 기존의 연구들에 의하면 대부분 1 cGy 내지 50 cGy의 저선량에서 이러한 반응이 나타난다고 보고되고 있다. Feinendegen 등¹⁴⁾은 10~20 cGy 이하의 선량에서 DNA 손상의 예방과 재생을 유발하는 adaptive protection이 존재하며 이는 수시간에서 수개월까지 유지된다고 하였는데 이러한 효과는 50 cGy보다 높은 선량에서는 관찰되지 않는다고 하였다. Shadley 등¹⁵⁾은 림파구를 이용한 실험에서 배양 후 28~30 시간에 50 cGy 방사선 조사 후 48시간에 1.5 Gy 방사선 조사를 하여 염색분체(chromatid)의 결손을 유도시켜 측정된 보고에서 선량과 선량률 모두 적응반응에 관여한다고 보고하였다. 또한 Wolff 등¹¹⁾은 1 cGy의 낮은 선량의 엑스선에 노출된 세포는 1 Gy의 방사선에 재차 노출된 경우 유전자 손상이 방사선에 미리 노출되지 않은 대조군에 비해 절반으로 감소한다고 보고하였다. 한편 Seong 등¹⁶⁾은 마우스 동종암주를 이용한 실험에서 정상 세포뿐만 아니라 종양 세포에서도 5 cGy의 저선량으로 적응반응이 나타남을 보고하였다.

본 연구에서도 STZ로 당뇨병을 유발시킨 쥐에서 1 Gy와 10 Gy의 방사선을 조사한 경우 1 Gy 방사선 조사군은

23.59±6.37/mm², 10 Gy 방사선 조사군은 14.34±7.22/mm²로 세포수의 감소가 더욱 심화되었다. 그러나 0.01 Gy와 0.1 Gy를 조사받은 쥐의 해마는 세포의 수가 각각 67.75±10.54/mm², 66.63±10.05/mm²로 늘어나 0.1 Gy 이하의 선량은 1 Gy 이상의 고선량에 비해 다른 반응을 보이는 것을 알 수 있었으며 기존의 보고들과 동일한 수준의 낮은 선량에서 적응반응이 발생하였음을 확인할 수 있었다.

저자들은 본 실험을 통해 당뇨병에 의해 유발되는 신경 세포의 손상에 저선량 방사선에 의해 신경 세포의 증식을 촉진할 수 있음을 확인하였으며 앞으로 더 많은 연구가 이루어지면 당뇨병에 의해 발생하는 신경 손상의 예방이나 치료에 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Jackson-Guilford J, Leander JD, Nisenbaum LK. The effect of streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett* 2000;293:91-94
2. Arvanitakis Z, Wilson RS, Bienias JL, Evans DA, Bennett DA. Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function. *Arch Neurol* 2004;61:661-666
3. Gould E. Serotonin and hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:46S-51S
4. Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 1999; 19:5792-5801
5. Kim YP, Kim HB, Jang MH, et al. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med* 2003;24: 114-117
6. Cameron HA, McKay RD. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 1999;2:894-897
7. Gould E, Tanapat P. Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* 1999;46:1472-1479
8. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996;16:2027-2033
9. Monje ML, Palmer T. Radiation injury and neurogenesis. *Curr Opin Neurol* 2003;16:129-134
10. Feinendegen LE, Loken MK, Booz J, Muhlensiepen H, Sondhaus CA, Bond VP. Cellular mechanisms of protection and repair induced by radiation exposure and their consequences for cell system responses. *Stem Cells* 1995;13 Suppl 1:7-20
11. Wolff S. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 1:277-283
12. Jang MH, Shin MC, Jung SB, et al. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate

- gyrus. *Neuroreport* 2002;13:1509-1513
13. Revsin Y, Saravia F, Roig P, et al. Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. *Brain Res* 2005;1038:22-31
 14. Feinendegen LE. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *Br J Radiol* 2005;78:3-7
 15. Shadley JD, Wiencke JK. Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol* 1989;56:107-118
 16. Seong JS PH, Chung EJ, Kim SH, Suh CO. Effect of small dose of radiation on induction of apoptosis in murine tumors. *J Korean Soc Ther Radiol Oncol* 1999;17:307-313

Abstract

The Effect of Low Dose Radiation on the Neuronal Cell Proliferation in Diabetic Rats

Doo Soon Kim, M.D., Jin Oh Kang, M.D., Seong Eon Hong, M.D., Sang Ki Kim, M.D., Taek-Hyun Lee, M.S.* and Chang-Ju Kim, M.D.*

Departments of Radiation Oncology and *Physiology, Medical College, Kyunghee University, Seoul, Korea

Purpose: To investigate the effect of low dose radiation on neuronal cell proliferation in diabetic rats.

Materials and Methods: A group of rats (first group) were divided into three subgroups (nondiabetic control, nondiabetic 0.1 Gy and nondiabetic 10 Gy groups) to determine the effect of radiation on normal hippocampal neuronal cell proliferation. A further group of rats (second group) were divided into six subgroups (nondiabetic control, diabetic control, diabetic 0.01 Gy, diabetic 0.1 Gy, diabetic 1 Gy and diabetic 10 Gy groups) to determine the effect of radiation on hippocampal neuronal cell proliferation under diabetic conditions. Using immunohistochemistry for 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), the number of neuronal cells in the dentate gyrus of all the groups was counted.

Results: The number of BrdU-positive cells in the dentate Gyrus of the nondiabetic control, nondiabetic 0.1 Gy and nondiabetic 10 Gy subgroups of the first group were 45.96 ± 3.42 , 59.34 ± 5.20 and $19.26 \pm 2.98/\text{mm}^2$, respectively. The number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus of the diabetic control, diabetic 0.01 Gy, diabetic 0.1 Gy, diabetic 1 Gy and diabetic 10 Gy subgroups of the second group were 55.44 ± 8.57 , 33.33 ± 6.46 , 67.75 ± 10.54 , 66.63 ± 10.05 , 23.59 ± 6.37 and $14.34 \pm 7.22/\text{mm}^2$, respectively.

Conclusion: Low dose radiation enhances cell proliferation in the dentate gyrus of STZ-induced diabetic rats.

Key Words: Radiation, Hippocampus, Neuronal cell