ICR 마우스에서 감마선 조사로 유도된 조혈조직 손상 모델 확립

강정애[1,2] · 노종국[1] · 장범수[1] · 정영진[2] · 박상현[1,*]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소
[2]충남대학교 식품영양학과

Establishment of γ-irradiation-induced Hematopoietic Tissue Damage Model in ICR Mice

Jung Ae Kang[1,2], Jong Kook Rho[1], Beom-Su Jang[1], Young-Jin Chung[2] and Sang Hyun Park[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Deajeon 305-764, Korea*

Abstract - Ionizing radiation causes the massive generation of reactive oxygen species, resulting in cellular and tissue damage. The present study was performed to evaluate γ-irradiation induced cellular damage in ICR mice. The mice were divided into four groups with ten mice in each group. Group 1 served as an unexposed control group. Groups 2, 3, and 4 were exposed to 3, 5, and 7 Gy of γ-radiation, respectively. Five mice per group were sacrificed 1 and 7 days after γ-radiation. Exposure to γ-irradiation resulted in hematopoietic damage in a dose-dependent manner when compared with the unexposed control group, which featured a significantly decreased spleen index. However, the exposed mice showed no significant differences in their serum AST, ALT and in the histopathological change of their liver. These results suggest that γ-irradiation is a good tool to prepare a hematopoietic damage model. This animal model can be employed to study the hematopoietic efficacy of biologically active compounds.

Key words : γ-irradiation, Hematopoietic damage, Spleen index

서 론

인간은 끊임없이 자연과 인공적인 광원으로부터 이온화 방사선에 노출되어진다. 방사선 치료 및 방사성 동위원소의 의학적 이용증가, 우주방사선을 비롯한 자연방사선의 노출증가, 최근 일본 대지진으로 인한 후쿠시마 원자력발전소 사고로 인체가 방사선에 피폭 받을 빈도가 증가하고 있으며 피폭으로 인한 인체장애나 인체방어에 관하여 사람들의 관심이 집중되고 있다(Meister 2005). 우리나라 역시 방사선 노출에 대한 불안감이 커진 가운데 '생활주변 방사선 안전관리법'이 시행되어 생활주변에서 발생할 수 있는 방사선으로부터 불필요하게 노출되는 것을 방지하고자 하고 있다. 방사선은 직접적인 조직 손상과 생체 물질의 이온화 현상에 의한 간접 손상을 유발하게 되며 방사선에 의해 간접적으로 생성된 자유라디칼(reactive oxygen species, ROS)은 DNA, 단백질

* Corresponding author: Sang Hyun Park, Tel. +82-63-570-3370, Fax. +82-63-570-3371, E-mail. parksh@kaeri.re.kr

및 세포막 등의 세포손상과 세포사멸을 유도한다(Halliwell and Gutterige 1999). 따라서 방사선 노출 시 정상세포를 보호하면서 부작용이 없고 생체손상의 예방 및 경감을 위한 방사선보호제에 대한 연구가 시도되어 왔다(Phillips 1981). 방사선보호제에 대한 연구는 WR-2721 (amifostine) 등의 thiol기를 갖는 합성물질, 사이토카인(cytokines), 면역조절제(immunomodulator) 등에 대해서 연구가 많이 이루어져 있다. 그러나 합성물질은 독성이 강하며, 면역조절제의 경우 부작용이 많고 고가여서 사용에 한계를 나타내고 있다. 따라서 독성이 적은 항산화 기능을 갖는 천연물을 이용한 방사선보호제 연구가 많이 이루어지고 있다(Hosseinimehr 2007).

방사선 조사 동물 실험 모델로 랫트(rats)는 충분한 혈액 시료 확보가 용이하여 많이 사용되어 왔지만(Pradeep *et al.* 2012), 마우스에 비해 유지비용이 많이 들고 시료처리 시 많은 양이 요구되는 단점이 있다. 그러므로 본 연구에서는 방사선 조사로 인한 세포 손상 모델을 만들기 위해 일반 독성을 포함한 각종 실험에 많이 사용되고 있는 ICR 마우스를 이용하였고, 방사선 조사로 유도된 조혈기능 및 간세포 손상 평가 지표를 발굴하고 방사선보호제 개발을 위한 동물 모델을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

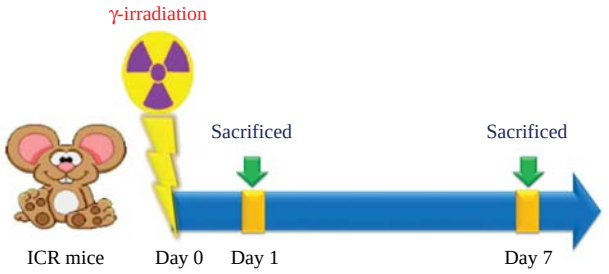
1. 실험동물

5주령(22±1 g)의 ICR 마우스 암컷을 오리엔트바이오(주)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 23±2°C의 온도, 55±5%의 습도, 명암순환은 12시간 단위로 유지되는 실험동물 사육장에서 1주일간 적응시켰으며, 고형사료와 물은 자유로이 공급하였다. 본 연구를 위한 동물실험은 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다. Tabel 1과 같이 ICR 마우스를 감마선 조사 후 1일차와 7일차로 나눠 그룹당 5마리씩 4개 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

2. 감마선 조사

감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 내 Gammacell 40 exactor (MDS Nordion, Canada)을 사용하여 1.1 Gy min^{-1}의 선량율이 되게 조사하였다. 정상대조군을 제외한 ICR 마우스는 아크릴 상자에 넣고 ^{137}Cs-γ선의 흡수선량이 3, 5, 7 Gy가 되도록 마우스 몸 전체에 조사하였다.

Table 1. Experimental design



Post-irradiation	Exposure dose
Day 1	Normal (n=5) 3 Gy of γ-radiation (n=5) 5 Gy of γ-radiation (n=5) 7 Gy of γ-radiation (n=5)
Day 7	Normal (n=5) 3 Gy of γ-radiation (n=5) 5 Gy of γ-radiation (n=5) 7 Gy of γ-radiation (n=5)

3. 시료 채취

감마선 조사 후 1일과 7일이 지난 다음 ICR 마우스를 흡입마취제로 전신 마취시키고, 개복하여 후대정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 3,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하고 혈청을 분리하여 4°C에서 저장하였다. 이후, 마우스를 희생하고 간 및 비장을 적출하여 냉식염수로 세척한 후 건조시켜 무게를 측정하였다. 비장 지수는 (비장 무게/체중)×100에 의해 계산되었다.

4. 혈청 중 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 측정

혈청 중 AST와 ALT 측정은 효소법에 의한 정량용 kit (아산 제약)로 측정하였다. AST와 ALT 기질액 1.0 ml를 각각 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2 ml를 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 반응시킨 뒤 정색시약 1 ml를 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치시켰다. 마지막으로 0.4 M NaOH 용액을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치 한 후, Multiskan FC microplate photometer (Thermo, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

5. 간 조직의 조직병리

간 조직은 조직병리학적 분석을 위해 10% 포르말린에 고정시켰다. 간조직을 에탄올(ethanol)과 크실렌(xylene)에 순차적으로 세척하고, 파라핀 왁스에 넣는 과정을 진행하였다. 미세절편기 (Leica Microsystems, Germany)을

Table 2. Body weight of the mice at day 1 and 7 after various dose of γ-irradiation

Radiation Dose	Day 1		Day 7	
	Initial B.W.	Final B.W.	Initial B.W.	Final B.W.
0 Gy	21.9±1.17	24.3±0.89	21.9±1.17	26.78±2.33
3 Gy	21.9±1.14	23.68±1.18	21.9±1.14	25.28±1.78
5 Gy	21.94±1.58	24.88±1.11	21.94±1.58	25.64±0.8
7 Gy	21.94±1.58	23.98±1.1	21.94±1.58	25.68±1.45

Values are expressed as mean±S.D. for five mice in each group.

이용하여 5 μm 두께로 잘랐다. 왁스를 제거시키고 헤마톡실린 (Hematoxylin)과 에오신 (Eosin)으로 염색시켜 현미경으로 관찰하였다.

6. 통계분석

실험에서 얻어진 결과는 SPSS/Windows 18.0을 이용하여 일차원 분산분석 (one-way ANOVA)으로 수행되었고, 내부 군 비교는 Tukey 다중비교분석 (Tukey's multiple comparision test)를 이용하여 수행되었다. 수치는 각 군의 5마리에 대하여 평균±표준편차로 표현되었다. P값 <0.05인 경우 유의한 것으로 고려되었다.

결과 및 논의

1. 체중 변화

각 군에 대한 체중을 측정하여 Table 2에 나타내었다. 동물 모델에서 방사선 조사로 인해 체중감소 및 식이섭취량 감소가 나타나는 것으로 알려져 있다 (Linn *et al.* 1996; Pradeep *et al.* 2008). 이는 위장관 손상으로 설사와 식욕감퇴를 유발하여 체중이 감소한다고 보고하고 있다 (Quastler 1956). 본 연구에서는 감마선 조사 후 1일차와 7일차 그룹의 마우스 체중을 조사한 결과 체중감소가 보이지 않고 처음 체중보다 증가함을 보였으며, 정상 대조군과도 차이가 없었다.

2. 비장 지수 변화

각 군에 대한 비장 지수를 계산하여 Fig. 1에 나타내었다. 6.5 Gy 이상의 방사선 조사 후 생체 내에서는 방사선에 민감한 조혈 면역계 기관인 비장이 방사선 장해를 받게 되고, 많은 림프구의 괴사가 일어나 비장은 부피 및 중량이 감소하는 것으로 알려져 있다 (Gough *et al.* 1977). 또한 랫트에 감마선을 1, 3, 5 Gy로 조사할 경우 비장 지수가 흡수선량이 증가할수록 감소함을 보였다 (Pradeep

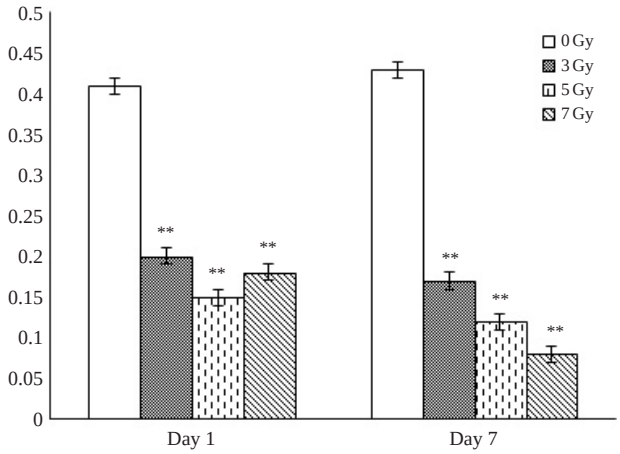


Fig. 1. Radiation-induced spleen index of the mice at day 1 and 7 after various dose of γ-irradiation. Values are expressed as mean±S.D. for five mice in each group. *p<0.05 and **p<0.001 represent significant differences compared with group 1.

Table 3. Status of AST and ALT of the mice at day 1 and 7 after various dose of γ-irradiation

Radiation Dose	Day 1		Day 7	
	AST (IU l^{-1})	ALT (IU l^{-1})	AST (IU l^{-1})	ALT (IU l^{-1})
0 Gy	21.94±9.74	9.29±2.56	28.39±9.49	11.69±10.58
3 Gy	23.86±1.51	6.82±1.21	26.14±7.03	8.49±2.55
5 Gy	28.71±15.08	10.16±4.89	20.05±6.2	2.31±1.69
7 Gy	29.76±8.52	6.49±1.65	26.45±8.13	5.86±5.37

Values are expressed as mean±S.D. for five mice in each group.

et al. 2008). 본 연구에서는 감마선 흡수선량이 증가할수록 비장 지수가 정상 대조군보다 유의적으로 감소하였으며, 감마선 조사 후 7일차의 비장 지수가 1일차에 비해 적게 나타남을 확인할 수 있었다. 이를 통해 감마선 흡수선량에 비례적으로 비장 지수가 감소하며 이러한 변화는 7일차에도 같은 경향으로 유지되었다. 방사선에 감수성이 높고 민감한 조혈면역계를 보호하고 이들의 회복을 촉진시키는 것이 필수적이므로 (Schwarts *et al.* 1988), 비장 지수를 이용하여 방사선에 대한 방사선 보호제 발굴에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

3. 혈청 중 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 상태

각 군에 대한 혈청 중 AST, ALT의 활성도를 Table 3에 나타내었다. AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 아미노기 전이효소로 주로 간세포가 손상을 받는 경우에 혈중으로 방출되어 활성이 증가하게 되므로 간독성 검

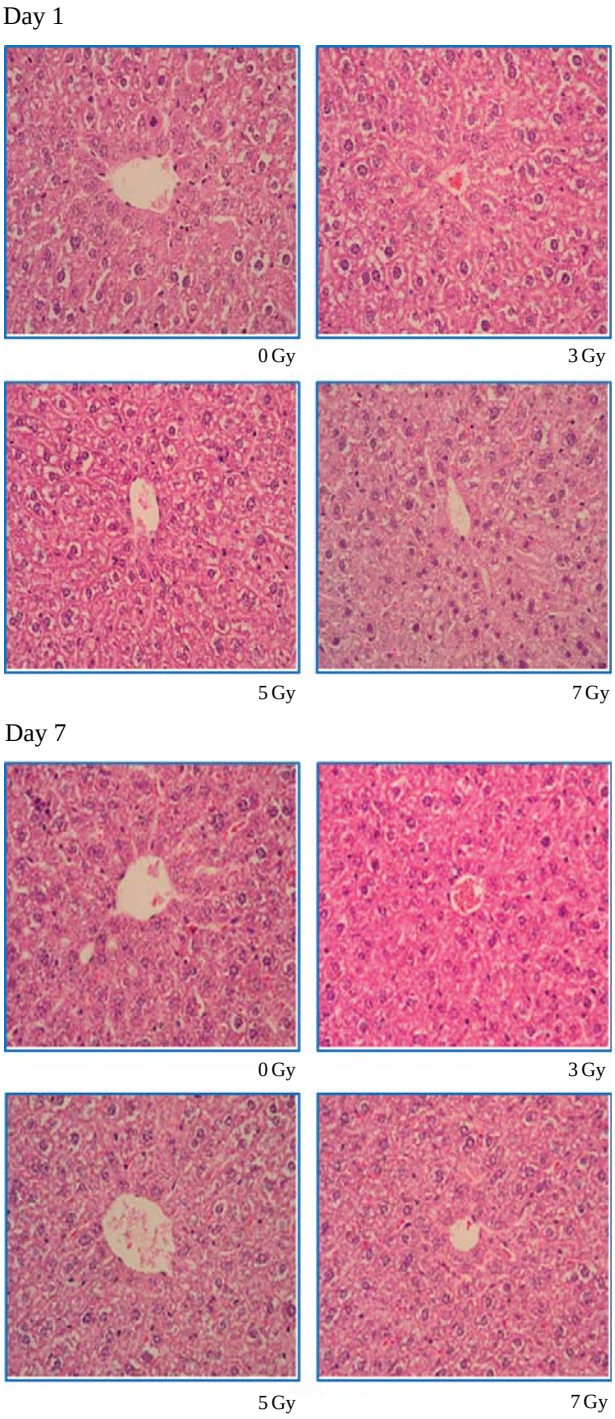


Fig. 2. Histopathology of liver tissue of the mice at day 1 and 7 after various dose of γ-irradiation.

사에 주로 사용된다. AST의 경우 간 조직 이외에 신장, 근육, 심장 등에 분포하고 있어 간 손상에 직접적인 원인이 아닐 수 있지만 ALT의 경우는 간 조직에 대부분 분포하고 있기 때문에 ALT 수치가 상승하는 것은 간 손상과 직접적으로 연결된다(Recknagel *et al.* 1989). 방사선의 급성 생리효과로 AST와 ALT의 증가가 있으며(Hsu *et al.* 1990; Ohta *et al.* 1990), 랫트에 감마선을 조사할 경우 혈중 AST와 ALT의 효소 활성이 급격히 증가함을 보였다(Pradeep *et al.* 2008). 그러나 본 실험에서는 마우스에 감마선을 3, 5, 7 Gy를 조사할 경우 혈중 AST와 ALT는 정상 대조군과 비교하였을 때 유의한 차이를 나타내지 않았다.

4. 간 조직 분석

정상 대조군과 감마선 조사군의 간을 적출하여 조직학적 형태를 Fig. 2에 나타내었다. 동물 모델에서 방사선을 조사한 간 조직은 혈관이 두꺼워지고, 문정맥 손상과 중심정맥이 불규칙하며 주변 간 소엽의 모세혈관들도 방사선에 영향을 받아 일정한 배열을 이루지 않는다(Pradeep *et al.* 2012). 정상 대조군의 마우스로부터 적출한 간은 혈관의 형태가 비교적 안정적이며, 혈관 주위의 핵과 세포의 형태가 규칙적으로 관찰되었고, 세포 괴사 또는 사멸 현상이 일어나지 않았으며, 정상 내피 세포를 나타내었다. 본 실험의 감마선 조사 후 1일차와 7일차 마우스로부터 적출한 간에서는 간조직 및 간세포 손상은 관찰되지 않았다.

결 론

본 연구에서는 방사선 조사로 유도된 조혈 기능 및 간세포 손상 동물 모델을 확립하기 위해 5주령된 ICR 마우스에 감마선을 3, 5, 7 Gy로 조사한 후 1일과 7일 후에 손상 정도를 확인하였다. 본 연구에서 수행된 혈액 화학치 분석 결과에서는 방사선 조사로 유도된 간세포 손상은 관찰되지 않았다. 비장지수는 감마선 흡수선량이 증가할수록 유의하게 감소하여 조혈 기능 손상 모델의 좋은 평가 지표로 발굴되었으며, 이러한 조혈 기능 손상은 최소 7일 이상 지속되는 것으로 확인되었다. 본 동물실험 모델은 방사선에 의한 조혈 기능 손상을 평가할 수 있는 모델로 활용 가능하며 방사선보호제 발굴에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 연구는 미래창조과학부에서 시행하는 방사선기술개발사업 (Grant No. 2012M2A2A601135)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

Gough GR, Boggs SS and Schwartz GN. 1977. Changes in thymus size observed radiographically during the course of spontaneous lymphoma in the AKR/J mouse. *Lab Anim. Sci.* **27**:627-634.

Halliwell B and Gutterige JM. 1999. Free radical in biology and medicine. 3rd ed. pp. 604-607. Oxford University Press. New York.

Hosseinimehr SJ. 2007. Foundation review: Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov. Today* **12**: 794-805.

Hsu HY, Lian SL and Lin CC. 1990. Radioprotective effect of Ganoderma Lucidum (Leyss. ex. Fr) karst after X-ray irradiation in mice. *Am. J. Chin. Med*. **18**(1-2):61-69.

Linn IH, Hau DM, Chen WC, Chen KT and Lin JG. 1996. Effects of glycyrrhizae and glycyrrhizic acid on cellular immunocompetence of gamma-ray-irradiated mice. *Chin. Med. J.* **109**:138-142.

Meister M. 2005. The health effects of low-level radiation. pp. 2-4. American Council on Science and Health. New York.

Ohta S, Sakurai N, Inoue T and Shinoda M. 1990. Studies on chemical protectors against radiation. XXX. Radioprotective substances of cnidii rhizoma. *Yskugaku Zasshi* **110**(10): 746-754.

Quastler H. 1956. The nature of intestinal radiation death. *Radiat. Res*. **4**:303.

Phillips TL. 1981. Sensitizer and protectors in clinical oncology. *Semin. Oncol.* **8**:65-82.

Pradeep K, Ko KC, Choi MH, Kang JA, Chung YJ and Park SH. 2012. Protective effect of hesperidin, a citrus flavanoglycone, against γ-radiation-induced tissue damage in Sprague-Dawley rats. *J. Med. Food* **15**(5):419-427.

Pradeep K, Park SH and Ko KC. 2008. Hesperidin a flavanoglycone protects γ-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Spraque-Dawley rats. *Eur. J. Pharmacol*. **587**:273-280.

Recknagel RO, Glende JE, Dolak JA and Waller RL. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol. Ther*. **43**:139-154.

Schwarts GN, Neta R, Vigneulle RM, Patchen ML and MacVittie TJ. 1988. Recovery of hematopoietic colony-forming cells in irradiated mice pretreated with interleukin 1 (IL-1). *Exp. Hematol*. **16**(9):752-757.

Manuscript Received: June 4, 2013
Revised: July 30, 2013
Revision Accepted: August 1, 2013