

흰쥐 난포에서 저선량 방사선조사로 유도된 hormesis효과

이원정, 손성경¹, 이민아¹, 양윤석², 김원식
충남대학교 의과대학 해부학교실, ¹산부인과학교실
²울지대학교 의과대학 산부인과학교실

간추림 : Hormesis효과는 생물체가 자연속에 존재하는 정도의 저선량 방사선 또는 독성물질 등에 노출된 후 단기간 내에 나타나는 이로운 영향을 말한다. 저자들은 흰쥐 난포에서 저선량의 방사선을 조사한 후 고선량을 조사하여 hormesis효과를 알아보고자 하였다.

본 실험에서는 4주령의 암컷 흰쥐 (Sprague-Dawley계통)를 대조군, 2cGy조사군, 2cGy 조사후 2Gy조사군 및 2Gy조사군으로 나누고, 각 군별로 단회 방사선 조사후 24시간에 희생시켜 난소를 적출하고 통상적인 방법으로 처리한 후 H & E 염색과 TUNEL 면역염색을 실시하였다. 광학현미경으로 각 군 사이에 폐쇄난포의 비율과 난포의 발육단계별 정상난포의 비율을 비교하였다.

그 결과 난소내 전체 난포에서 차지하는 폐쇄난포의 비율은 2Gy조사군(55.35%)에서 2cGy+2Gy조사군(39.27%)에 비하여 현저히 증가하였으며, 난포의 발육단계에 따른 정상난포의 비율은 2Gy조사군(일차난포, 82.15%; 난포동형성전난포, 63.48%; 난포동 난포, 21.58%) 보다 2cGy+2Gy조사군(일차난포, 94.37%; 난포동형성전난포, 78.81%; 난포동 난포, 33.09%)에서 모든 발육단계에서 유의하게 증가 하였다.

이같은 결과는 저선량의 방사선에 의해 난포발육단계에 hormesis효과가 나타났음을 의미하는 것으로 앞으로 방사선 hormesis연구에 있어 한 모델로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : hormesis효과, 난포폐쇄, 세포고사, TUNEL염색

서 론

방사선이 인체에 미치는 영향은 1896년 뢰트겐 박사에 의해 X-선이 발견된 이래 (Hall 2000), 계속 주목되어 왔으며, 최근 들어 방사선 또는 방사성 물질의 이용이 의료용과 공업용 등 다각적인 용도로 활용되면서 직, 간접적으로 방사선에 노출될 기회가 많아졌고, 생활방사선 또한 날로 증가함에 따라 보건학적인 측면에서도 이들에 대한 관심이 점차 높아짐으로써, 방사선 생물학 분야에 대한 올바른 이

해가 절실히 요구되어지고 있는 실정이다.

생물체를 구성하고 있는 분자가 방사선 에너지를 흡수하면 물리, 화학작용을 거쳐 생화학적 및 생물학적 작용을 유발한다. 이때 방사선과의 화학반응으로 핵산, 단백질, 효소 등 생체고분자의 구조 및 기능이 변화하게 되고, 나아가 염색체나 기타 세포내 구조의 손상을 초래하게 되며 (Kang 등 1996), 이와 같은 세포의 손상이 생물 전체에 미치면 질병과 같은 신체적 장애가 나타나고, 특히 생식세포의 손상은 다음 세대에 전해져 여러 가지 유전적 장애를 수반하게 된다 (Choi 등 2004).

그동안 방사선이 생식에 미치는 영향에 대한 평가는 생식세포에서 일어나는 생화학적, 형태학적 생

교신저자 : 김원식 (충남대학교 의과대학 해부학교실)
전자우편 : wonsikk@cnu.ac.kr

식능력의 변화 및 유전적 영향 등이 연구되어져 왔고(Lindop 1969), 방사선으로 인한 세포고사(apoptosis)와 세포변형이 발암작용, 기형형성과 변이유발(Bentur 등 1991, Lee 등 2001)에 대해서도 광범위한 연구가 이루어져 왔다.

사람은 출생시 양쪽 난소에 60만~200만개의 1차 난모세포를 갖고 태어나지만, 많은 수가 어린시절 자연적인 난포폐쇄가 일어나 사춘기에는 약 40만개의 난모세포만이 남고, 이 중 약 100~200개 정도가 2차 난모세포로 되어 생식기간 동안 배란된다(Thomas 1992). 이러한 감소는 정상적인 난포폐쇄로 일어나며, 이 과정은 과립층세포의 세포고사를 통해서 일어난다(Tilly 등 1991, Hsueh 등 1994, Johnson 등 1996). 세포고사는 개체의 불필요한 세포나 일부분을 제거하는 중요한 기전으로, 난포 과립층세포의 세포고사에 대한 감수성은 난포의 크기와 발육 단계에 따라 다른 것으로 알려져 있다(Tilly 등 1991, Johnson 등 1996).

지금까지 난포에 미치는 방사선의 효과에 대한 연구들은 대부분 고선량 방사선에 의한 연구(Kim 등 1998, Kim 등 1999a, Kim 등 2002)들로서 대부분 방사선의 위해에 대한 것들이지만, 최근 연구에 의하면 난포 과립층세포나 난모세포는 발생 단계에 따라, 일부는 방사선에 대해 민감성을 나타내지만 일부 과립층세포들은 방사선 저항성이 있어 다시 회복되는 것이 보고 되어 있다(Song 등 2004). 이와 관련하여 저선량 방사선이 긍정적인 영향을 미친다는 hormesis개념이 Luckey (1980)에 의해 처음으로 확립된 이래, 저선량의 방사성 thymidine에 사람의 림프구가 일차 노출되면 적응반응이 유도되어 이어서 조사된 고선량의 방사선으로 초래된 염색체 손상이 유의하게 감소된다는 보고(Olivieri 등 1984)를 비롯하여 다수의 연구가 보고되었으며(Wiencke 등 1986, Shadley와 Wolff 1987, Sankaranarayanan 등 1989), 최근에는 인체 혈액 림프구와 마우스의 골수 세포에서 중기 염색체 분석법과 미소핵 검사법을 이용하여 방사선 적응반응을 밝힌 보고와(Min 등 1998), 핵의학 영상검사 중 가장 빈번히 시행하는 골 스inti그래피를 시행할 때 사용하는 방사성 의약품인 ^{99m}Tc methylene diphosphonate (^{99m}Tc MDP)에

의한 내부 피폭에 의해서도 방사선 적응반응이 유도된다는 보고(Bom 등 1998, Min과 Bom 1999) 등이 있다. 이들 저선량 방사선에 의한 hormesis효과 의 유도기전이 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만, 손상받은 DNA로부터 유전자가 발현되어 새로운 단백질이 합성될 것으로 추정하고 있다(Ernst 등 1998).

지금까지의 연구들을 살펴보면, 저선량 방사선에 의해 일어나는 방사선 hormesis효과에 대한 연구는 주로 면역세포들 중에서 방사선에 가장 민감한 것으로 알려진 림프구(Hall 2000)를 대상으로 하여 많이 이루어져 왔고, 마우스 골수세포와 정자세포에서도 보고(Cai와 Lui 1990, Min 등 1998)된 바 있다. 그러나 포유동물에서 세대를 이어가는데 필수적인 생식기관인 난소에 관한 연구는 아직 보고된바 없다. 이에 착안하여 저자들은 방사선에 민감한 난소 조직을 대상으로 저선량 방사선에 의한 hormesis효과를 밝히고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에사용된 흰쥐(Sprague-Dawley 계)는 대전 소재 한국화학연구소에서 생후 3주령의 암컷 80마리를 구입하여, 본 대학 동물사육장에서 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 10\%$ 로 일정하게 유지된 환경에서 일반식이(삼양사료주식회사, 한국)와 충분한 양의 수돗물을 공급하면서 임신이 가능한 4주령이 될 때까지 사육하여 실험 동물로 사용하였다.

2. 방사선 조사

실험동물을 정상대조군 10마리, 2cGy조사군 20마리, 2Gy조사군 20마리, 2cGy+2Gy조사군 20마리의 4군으로 나누어, polyurethane 상자내에 가두고 정상대조군을 제외한 3군을 4주령이 시작되는 날 오후 5시에 본 대학 치료방사선과에서 방사선을 400 rad/min 선량으로 2cGy+2Gy조사군에는 2cGy의 저선량을 단회조사하고 24시간후에 2Gy를 조사

하였고, 2 cGy 조사군과 2 Gy 조사군에는 각 선량을 단회 조사하였다. 이때 사용된 방사선속의 종류는 6MV-X선 (Mevatron67, Siemens, Germany)을 사용하였으며, 조사 면적은 30×30 cm, SSD (source-surface-distance)는 100 cm 거리에서 배쪽 방향으로 난소부위를 향해 단일 전신조사하였다. 사용된 6MV-X선은 피하 1.5 cm 깊이에서 최대선량이 형성되므로 난소에 최대선량이 균일하게 조사되도록 하였다.

방사선량의 결정은 타 문헌을 참고로 수차례 걸친 예비실험 결과, 저선량은 방사선 hormesis 효과를 일으킬 수 있는 범위인 2 cGy (Shadley와 Wolff 1987, Macklis와 Bresford 1991)로 하였고, 고선량은 2Gy (Min과 Bom 1999)로 하였다.

3. 광학현미경적 관찰

방사선 조사 24시간 후 실험동물은 목뼈탈구로 희생시킨 후 개복하고 난소를 적출하였다. 적출된 난소는 10% 중성포르말린용액에 24시간 고정된 후, 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하고 5µm 두께로 박절하여 슬라이드를 제작하였다. 방사선에 의한 난포의 형태학적인 변화와 난포의 발육단계를 파악하기 위해 H&E 염색을 실시하여 각 군을 관찰 비교하였다.

4. TUNEL 염색

난포의 폐쇄가 진행되면서 나타나는 난포 과립층 세포의 세포고사를 형태학적으로 관찰하기 위해 절편화된 DNA를 염색할 수 있는 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling) 염색을 실시하였다.

TUNEL 염색은 5µm 두께로 박절한 조직절편을 silanized coating slide (DAKO Corporation, USA) 위에 부착시켜 슬라이드를 제작하고 탈파라핀 후 ApopTag kit (Intergen Co., USA)를 사용하여 실시하였다. 파라핀이 제거된 조직절편을 0.05M phosphate buffered saline (PBS, PH 7.4) 용액으로 5분간 수세한 다음 proteinase K (20 µg/mL in 0.05M PBS)로 실온에서 25~30분간 반응시킨 후 증류수로 2분간 3회 수세하여 핵산을 둘러싸고 있는 단백질을 제거하였

다. 또한 내재성 peroxidase의 활성 제거를 위해 2% H₂O₂ 액에 30분간 반응시킨 다음 0.05M PBS 용액으로 5분간 2회 세척하고 equilibration buffer에 10분간 반응시켜 주변부에서 일어날 수 있는 비특이적 반응을 억제하였다. 이후 reaction buffer 77 µL와 terminal deoxy-nucleotidyl transferase (TdT) 33 µL를 혼합하여 working strength TdT (110 µL/slide)를 만든 후, 조직절편에 떨어뜨린 다음 커버글라스 (coverglass)를 덮고 37°C humidified chamber에서 1시간 동안 반응시켰다. 이들 조직은 37°C로 데운 working strength stop/wash buffer에 10분간 실온에서 반응시켰다. 이후 0.05M PBS 용액으로 5분간 3회 세척하고 anti-digoxigenin-peroxidase를 실온의 humidified chamber에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직절편은 0.05M PBS 용액으로 5분간 3회 세척 후 0.05% diaminobenzidine (DAB)에 0.3% H₂O₂를 첨가하여 20분간 실온에서 발색시켰으며, 0.1M sodium acetate buffer solution으로 0.5% methylgreen (PH 4.0)을 만들어 10분간 실온에서 대조염색을 하였다. 염색이 끝난 조직절편은 수세 후 100% ethanol로 탈수하고 xylene 처리한 다음 permanent mounting media (DAKO Corporation, USA)로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 관찰 방법

본 실험에서 얻은 H&E 염색표본에서는 난포의 형태학적 변화와 발육단계를, TUNEL 염색 표본에서는 난포폐쇄와 과립세포의 세포고사 정도를 광학현미경 (Nikon Eclipse E600, Digital Sight-UI, Japan) 하에서 영상을 촬영한 후 컴퓨터 모니터에 투사하여 한 난소당 전체 난포의 수와 각 발달단계 별로 폐쇄난포의 수를 계수하였다. 난포의 발육단계는 일차난포와 이차난포로 구분하였고, 이차난포는 다시 난포방형성전 난포, 난포방 난포로 분류하여 관찰하였다 (Clement 1992, Fukumatsu 등 1992) (Table 1).

일차난포와 난포방형성전 난포 및 난포방 난포를 배율 100배와 200배로 관찰하면서 정상난포와 폐쇄난포를 Table 2의 분류기준 (Byskov 1974, Hofmann 등 1990)에 따라 구분하였다.

Table 1. Classification of developmental stage of the follicles in rat ovaria^a

Stage	Characteristics
Primary	Below two to three layers of cuboidal to columnar follicle cells. As maturation progresses, the oocyte enlarges.
Preantral	Several (above three to five) concentric layers of granulosa cells surround the oocyte. Antrum is not formed. Theca interna layer is not yet apparent. Zona pellucida is appeared, encasing the oocyte.
Antral	Antrum is formed. Oocyte within cumulus oophorus projects into antrum. The theca layers are well developed. The wall of a antral follicle has three layers of cells 1) Avascular epithelioid granulosa layer adjacent to the antrum. 2) Vascularized theca interna layer separated from the granulosa layer by a thin basement membrane (not seen) 3) Outer theca externa layer composed of smaller flattened stromal cells.

^a : Classification and data taken from Clement (1992) and Fukumatsu *et al* (1992)

Table 2. Criteria for the identification of normal and atretic follicles in rat ovary in this experiment

	Normal follicles	Atretic follicles
Granulosa cells	No apoptotic body	Apoptotic body, one or more
Germinal vesicle	Round and clear	Irregular, absent
Basement membrane	Regular, undulating	Irregular
Antrum(in antral follicle)	Clear	Numerous cell

6. 분석방법

본 실험에서는 측정된 계측치들을 SPSSWIN (ver. 13.0) 프로그램을 이용하여, 전체난포에 대한 폐쇄난포의 비율과 난포의 각 발육단계에서 전체난포 중 정상난포의 비율을 구하여 평균±표준오차로 나타냈으며, Student's *t*-test를 이용하여 통계적인 유의성을 검증하였다.

결 과

1. H & E 염색표본의 광학현미경적 소견

H & E 염색표본을 광학현미경을 이용하여 난포의 발육단계와 형태학적인 변화를 관찰한 결과, 난포폐쇄가 진행되고 있는 난포는 과립층세포의 두께가 감소되고, 난포 과립층세포에서 세포고사체가 형성되는 소견을 관찰할 수 있었다. 세포고사가 진행되

면서 난포내에 세포고사체의 양이 증가하고 난포방내로 세포고사체 조각들이 떨어져 나와 세포조각들이 증가했으며, 과립층세포와 투명층 사이의 연결이 불명확해졌다.

난포 과립층세포의 세포고사는 층내의 위치와 관계없이 무작위적으로 시작되고 있었다. 이렇게 시작된 세포고사는 일정한 경로를 거치지 않고 층 전체의 과립층세포에 파급되는 양상을 보였으며, 세포고사를 일으킨 과립층세포들은 바닥막으로부터 분리되어 세포고사체를 형성하면서 난포방 내로 떨어져 나왔다. 이와 더불어 난모세포도 변형을 일으키면서 퇴화되기 시작했으며, 최종적으로 난모세포 주위에 있는 과립층세포들도 세포고사를 일으키는 것이 관찰되었다(Figs. 1~4).

2. TUNEL염색 소견

1) 폐쇄난포의 빈도

전체 난포 중에서 폐쇄난포의 비율은 정상대조군에서는 34.23±1.98%로 나타났으며, 방사선을 조사한 2cGy조사군, 2Gy조사군, 2cGy+2Gy조사군에서는 각각 33.6±2.47%, 55.4±1.85%, 39.3±1.95%로 나타나, 정상대조군과 2cGy조사군, 정상대조군과 2cGy+2Gy조사군간에는 유의한 차이가 없었지만, 정상대조군과 2Gy조사군과는 유의한 차이($p < 0.01$)를 보였다(Table 3).

Table 3. The ratio of atretic follicles to the total follicles in each experimental group (% , M±SE)

Experimental group	N	Number of follicle			Ratio †
		Total	Non-atretic	Atretic	
Control	10	49.7±5.52	32.5±3.41	17.2±2.36	34.2±1.99*
2 cGy	20	62.3±2.03	41.3±1.20	21.0±2.00	33.6±2.47*
2 Gy	20	63.0±2.93	27.9±1.52	35.0±2.16	55.4±1.86
2 cGy+2 Gy	20	64.4±3.03	39.1±2.44	25.2±1.61	39.3±1.95*

M±SE : mean ± standard error

N : number of rats

* : significantly different from 2 Gy group ($p < 0.01$)

† : percent of atretic follicle to the total number of follicle

Table 4. The ratio of normal follicles according to the developmental (% , M±SE)

Experiment group	N	Stage of follicular development		
		Primary	Preantral	Antral
Control	10	94.9±3.25	87.7±6.76*	39.9±1.92*
2 cGy	20	87.2±3.64	77.5±3.44	53.4±4.15*
2 Gy	20	82.2±2.77	63.5±2.40	21.6±2.29
2 cGy+2 Gy	20	94.4±1.40†	78.8±2.71*	33.1±1.88*

M±SE : mean ± standard error

N : number of rats

* : significantly different from 2 Gy group ($p < 0.01$)

2) 난포의 발육단계에 따른 정상난포의 빈도

난포의 각 발육단계에서 난포폐쇄가 일어나지 않은 정상난포의 비율을 보면, 방사선을 조사하지 않은 정상대조군에서는 일차난포의 비율이 94.87%로 나타났으나, 방사선을 조사한 군인 2 cGy, 2 Gy, 2 cGy+2 Gy 조사군에서 각각 87.2%, 82.2%, 94.4%로 나타났다. 난포방형성전 난포에서는 정상난포의 비율이 방사선을 조사하지 않은 정상대조군에서는 87.7%였으나, 방사선을 조사한 2 cGy, 2 Gy, 2 cGy+2 Gy 조사군에서는 각각 77.5%, 63.5%, 78.8%로 나타났다. 난포방 난포에서는 정상난포의 비율이 방사선을 조사하지 않은 정상대조군에서 39.9%로 나타났고, 방사선을 조사한 2 cGy, 2 Gy, 2 cGy+2 Gy 조사군에서 각각 53.4%, 21.6%, 33.1%로 나타났다.

본 성적에서 폐쇄난포에 대한 정상난포의 비율이 일차난포, 난포방형성전 난포, 난포방 난포의 모든 발육단계에서 2 Gy 조사군보다 2 cGy+2 Gy 조사군에서 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), 방사선을 조사하지 않은 정상대조군과 저선량만을 조사한 2 cGy

조사군, 저선량 조사후 고선량을 조사한 2 cGy+2 Gy 조사군 사이에는 일차난포, 난포방형성전 난포, 난포방 난포에서 유의한 차이가 없었다 (Table 4). 정상대조군과 방사선을 조사한 2 cGy, 2 Gy, 2 cGy+2 Gy 조사군에서 발육 중인 난포가 성숙할수록 정상난포의 비율이 점차적으로 감소하는 소견을 보였다 (Figs. 1~4).

고 찰

인체를 구성하고 있는 조직과 세포는 그 종류에 따라 방사선 감수성에 차이가 있다. 조직의 재생능력이 클수록, 세포분열 기간이 길수록, 또한 형태적으로나 기능적으로 미분화단계에 있을수록 감수성이 높은 것으로 알려져 있으며, 여기에 속하는 것들 중에 골수, 위장 상피, 수정체 상피 및 생식세포 등이 감수성이 매우 높은 것으로 알려져 있다 (Brent 1980, Erickson 1985).

본 실험에서 저자들은 비교적 방사선 감수성이 높은 시기로 알려진 (Strume 등 1987, Mathur 등 1991) 4주령의 흰쥐에, 또한 방사선 감수성이 높은 생식기관인 난소에 저선량의 방사선을 조사하여 난포의 유지와 성장에 중요한 역할 (Thomas 1992)을 하는 난포와 난포내 과립층세포들의 변화를 관찰하여 방사선 hormesis 효과를 연구한 것은 의미가 있는 것으로 생각된다.

일반적으로 방사선은 난포자극호르몬의 영향으로 일어나는 난포퇴화를 지연 혹은 억제시키고 (Kim 등 1998), 과립층세포에서 호르몬의 생합성 활동에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Lee 등 1998). 고

선량을 난소에 조사한 연구보고들에 의하면, 방사선은 난소의 전체 구조를 변화시켰으며 (Jarrell 등 1986), 정상적인 난포의 발육 과정에서 세포고사 (Tilly 등 1991, Hsueh 등 1994, Johnson 등 1996)를 통해서 일어나는 난포폐쇄를 촉진시켰고 (Kim 등 1999b), 또한 호르몬 변화에도 영향을 주어 성숙한 난포의 폐쇄를 촉진시켰는데, 이는 난모세포의 감수성 때문일 것이라고 하였다 (Jacquet 등 1997).

방사선에 의한 과립층세포의 세포고사에 관련된 보고들을 살펴보면, 난소의 기능장애와 난모세포의 염색체 손상으로 세포고사가 일어나는 것으로 보인다는 보고 (Chapman 1982, Hendry와 West 1997)와 방사선 조사후 과립층세포에서 일어난 세포고사와 염색체로 난포폐쇄가 일어나고, 큰포식세포와 큰포식세포양 과립세포 같은 면역세포와 백혈구들이 마우스 난포의 급성폐쇄에 영향을 줄 것이라는 보고 (Lee와 Yoon 2005)들이 있다. 또한, 방사선조사에 의한 과립층세포의 세포고사는 내재성 ceramide형성의 증가와 관련이 있으며, 이 ceramide형성은 과립층세포가 방사선에 민감성이 있는지에 따라 달라진다는 보고도 있다 (Witty 등 1996). Ceramide는 방사선이 일으키는 세포고사 과정에서 가장 중요한 결정인자로 방사선 조사후 수분안에 세포내에서 일시적으로 증가하며 (Vit와 Rosselli 2003), 방사선이 일으키는 세포고사에 저항성이 있는 세포에서는 ceramide신호가 없어졌다 (Watters 1999)는 보고도 있다.

최근 저선량 방사선에 의한 hormesis효과가 알려지면서 (Lucky 1980, Olivieri 등 1984), 방사선의 잇점을 이용하기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 저선량 방사선으로 일어나는 hormesis효과는 조직에 따라, 생체내의 세포에 따라, 실험 동물의 종류에 따라 다르게 유도되며 (Cai와 Lui 1990), 선량율 (Shadley와 Wiencke 1989), 유도선량의 조사간격 (Bai와 Chen 1993), 선속의 종류 (Shadley와 Wolff 1987, Ikushima 1989, Bai와 Chen 1993), 세포의 배양온도 (Cai와 Lui 1992) 등에 따라 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이 방사선 hormesis효과는 선량이 0.5 ~ 20 cGy 사이에서 일어난다는 보고 (Shadley와 Wolff 1987)가 있다. 본 연구에서 2cGy의 저선량을

조사하여 hormesis효과가 관찰된 것도 이들 선량의 범주에 들어 합리적인 선량이 사용되었음을 알 수 있었다.

저선량의 방사선을 조사한 후 4~6시간이 지나야 DNA회복이 일어나기 때문에 적응반응을 유도하기 위해서는 저선량 방사선을 조사한 후 최소한 4시간이 필요하고 (Shadley 등 1987), 24시간 이후까지 적응반응이 나타나고 (Cai와 Lui 1990), 유도된 적응반응의 효과가 3회의 세포주기 동안 지속되는 것으로 알려진 (Shadley와 Wolff 1987)바, 본 실험에서 유도선량인 저선량 2cGy를 조사한 후 24시간에 도전선량인 고선량 2Gy를 조사한 것도 적절한 것으로 생각된다.

난포는 실험동물에서 개체와 난포의 발육단계 (Strume 등 1987) 및 종에 따라 방사선 감수성이 다른 것이 확인되었으며 (Jacquet 등 1997), 또한 미숙한 난포일수록 방사선 감수성이 높아 조사 후 짧은 시간에 난포폐쇄가 급격히 일어났다는 보고 (Lee 등 2000) 등을 고려할 때, 본 연구에 사용된 흰쥐는 배란주기가 4~5일로 사람에 비해 매우 짧은 특징을 가지고 있고, 그에 따라 난포 과립층세포가 난포주기마다 성장, 증식 및 사멸하는데 걸리는 시간이 짧고 방사선 감수성이 크기 때문에 본 연구에 적합한 것으로 생각된다.

본 연구에서는 난포의 각 발육단계에서 전체 난포중 폐쇄되지 않은 정상난포의 비율이 2Gy 단독조사군 보다 2cGy를 조사한 후 24시간에 2Gy를 조사한 군에서 유의하게 증가하였는데, 이는 난포의 모든 발육 단계에서 저선량으로 인해 나타난 hormesis효과로 볼 수 있겠다. 실제로 고선량의 방사선을 조사한 후 6시간에 난포의 폐쇄가 급격하게 대량으로 일어났으나 12시간, 24시간 시간이 경과함에 따라 정상난포의 비율이 증가되었다는 보고 (Kim 등 2002)로 미루어 생각해 보면, 본 연구에서 2Gy조사군에서 일어난 난포폐쇄의 증가는 방사선에 의한 직접적인 작용으로 인해 난포 과립층세포의 세포사멸이 급격하게 대량으로 일어났기 때문이지만, 2cGy를 유도선량으로 미리 조사한 군에서는 저선량의 방사선에 의해 발현된 hormesis효과 때문에 2Gy의 고선량에 의한 과립층세포의 손상이

방지되고 동시에 시간이 경과하면서 방사선의 직접적인 영향이 사라지고 방사선에 의해 부분적으로 손상된 과립층세포들이 많이 회복되었기 때문으로 생각된다.

지금까지 저선량 방사선이 hormesis효과를 일으키는 기전은 분자수준에서의 DNA회복과 자유기의 해독, 세포 수준에서는 면역계통의 자극으로 hormesis효과가 일어 난다고 보고(Luckey 1991)하고 있으며, 본 실험에서는 저선량의 방사선이 난포 바닥막을 구성하고 있는 laminin, fibronectin, type IV collagen, heparan sulfate 및 proteoglycan 등 (Thomas 1992)을 변화시켜 고선량 방사선의 투과에 어느 정도 저항성을 일으키는 것으로 추정할 수 있겠다.

Hormesis효과는 생물체가 자연속에 존재하는 정도의 저선량 방사선 또는 독성물질 등에 노출된 후 단기간 내에 나타나는 이로운 영향을 말하고, 적응반응은 생물체가 오랜 기간 진화하면서 나타나는 구조적, 기능적, 생물학적인 변화와 유전자의 변화(염색체의 단백질, 염기서열 변화를 포함)를 동반하며 반드시 긍정적인 영향만을 가져오지는 않는다는 점에서 사뭇 다르다. 특히 본 실험은 그동안 보고되지 않았던 생식세포에서 저선량의 방사선에 의한 hormesis효과를 확인한 것으로 그 의미가 있으며 우리나라의 방사선 hormesis효과 연구에 유용한 자료로 활용될 것이고 생식의학적 연구에도 기여할 것으로 생각된다. 향후 저선량방사선의 hormesis효과에 관한 연구는 그 기전을 규명하는데 초점을 맞춰야 할 것이며 이를 위해서 앞으로 분자생물학적인 측면에서의 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Bai Y, Chen D : Accumulative effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes. *Mutat Res* 302: 191-196, 1993.
 Bentur Y, Horlatch N, Koren G : Exposure to ionizing radiation during pregnancy : perception of teratogenic risk and outcome. *Teratology* 43: 109-112, 1991.

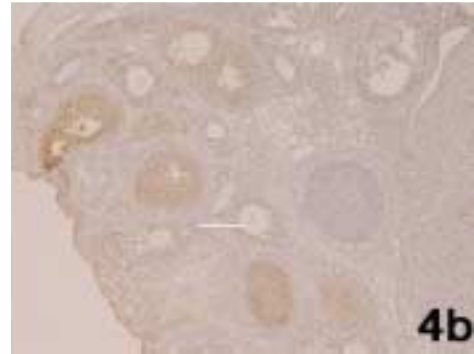
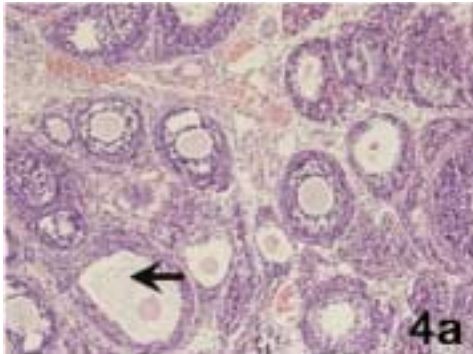
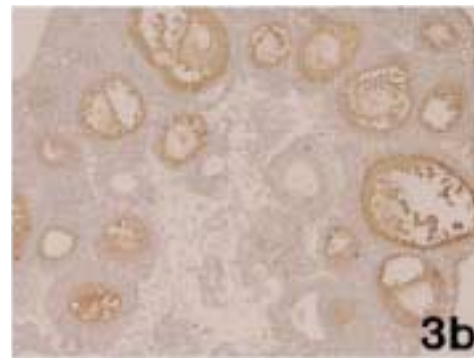
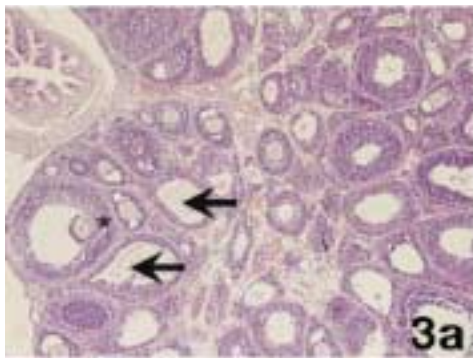
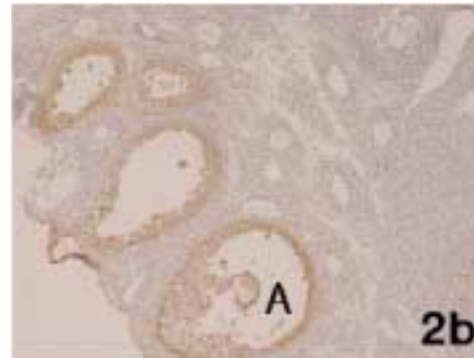
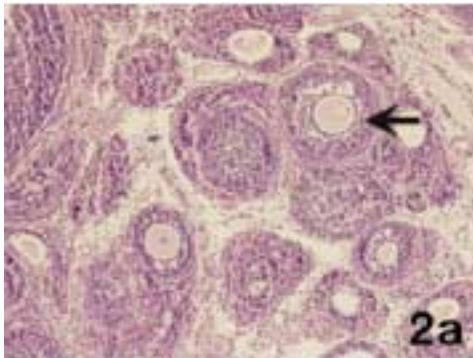
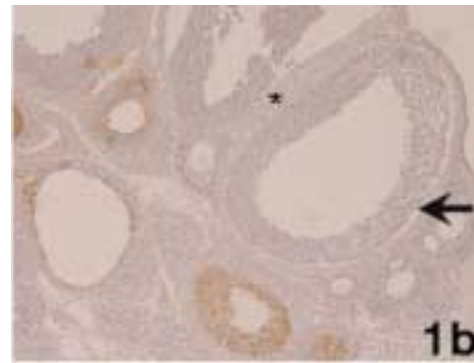
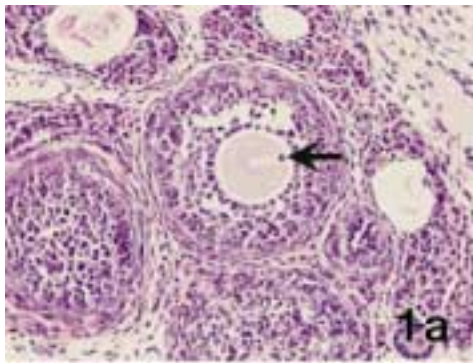
Bom HS, Song HC, Lee SY, Min JJ, Jeong HJ, Kim JY : Radiation induced cytogenetic adaptive response in lymphocytes of patients undergoing bone scintigraphy. *J Nucl Med* 39: 184-185, 1998.
 Brent RL : Radiation teratogenesis. *Teratology* 21: 281-298, 1980.
 Byskov AGS : Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fert* 37: 277-285, 1974.
 Cai L, Lui SZ : Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 58: 187-194, 1990.
 Cai L, Liu SZ : Study on the mechanism of cytogenetic adaptive response induced by low dose radiation. *J Chin Med* 105: 277-283, 1992.
 Chapman RM : Effect of cytotoxic therapy on sexuality and gonadal function. *Semin Oncol* 9: 84-94, 1982.
 Choi JH, Lim HY, Lee JI, Kang JH, Kim SS, Hong SY, Kim JS, Lee IJ, Choi SK : Radiation Biology in Medicine. Seoul. Shin-Kwang Publishing Co., pp 35-52, 2004 (in Korean).
 Clement PB : Histology for pathologists, 41. Ovary. New York. Raven press Ltd pp 765-792, 1992.
 Erickson BH : Effects of ionizing radiation and chemical on mammalian reproduction. *Ver Hum Toxicol* 27: 409-416, 1985.
 Ernst M, Freed ME, Zametkin AJ : Health hazard of radiation exposure in the son, Text of brain imaging research: Special consideration for children. *Nucl Med* 39: 689-698, 1998.
 Fukumatsu Y, Katabuchi H, Naito M, Takeya M, Takahashi K, Okamura H : Effect of macrophage on proliferation of granulosa cells in the ovary in rats. *J Reprod Fert* 96: 241-249, 1992.
 Hall EJ : Radiobiology for the radiologist. 5th ed. Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
 Hendry JH, West CM : Apoptosis and mitotic cell death: Their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol* 71: 709-719, 1997.
 Hofmann GE, Scott RT, Brzyski RG, Jones HW : Immunoreactive epidermal growth factor concentrations in follicular fluid obtained from in vitro fertilization. *Fertil Steril* 54: 303-307, 1990.
 Hsueh AJW, Billig H, Tsafirri A : Ovarian follicle atresia, a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev*

- 15: 707-724, 1994.
- Ikushima T : Radio-adaptive response : Characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res* 227: 241-246, 1989.
- Jarrell J, YoungLai EV, Barr R, O'Connell G, Belbeck L, McMahon A : An analysis of the effects of increasing doses of ionizing radiation to the exteriorized rat ovary of follicular development, atresia, and serum gonadotropin levels. *Am J Obstet Gynecol* 154: 306-309, 1986.
- Jacquet P, Saint-Georges LD, Buset J, Baatout S, Vankerkom J, Bagnuet- Mahieu L : Cytogenetic effects of X-rays in the guinea pig female germ cells. II. The maturing oocyte. *Mutat Res* 391: 193-199, 1997.
- Johnson AL, Bridgham JT, Witty JP, Tilly JL : Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and is related to endogenous levels of bcl-x long gene expression. *Endocrinology* 137: 2059-2066, 1996.
- Kang MS, Kim JB, Min BH, Jeong KH, Jeong HW : Radiation Biology. Seoul. Kyo-Hak Yongusa Co., pp 45-98, 1996 (in Korean).
- Kim JK, Lee CJ, Lee YK, Song KW, Yoon YD : Effects of follicle stimulating hormone on γ -ray irradiated immature mouse ovarian follicles. *J Korean Asso Radiat Prot* 23: 89-96, 1998.
- Kim JK, Lee CJ, Lee YK, Song KW, Yoon YD : Cell cycle evaluation of granulosa cells in the γ -irradiated mouse ovarian follicles. *J Korean Radiat Prot* 24: 17-22, 1999a.
- Kim JK, Lee CJ, Song KW, Do BR, Yoon YD : γ -radiation accelerates follicular atresia in immature mice. *In Vivo* 23: 21-24, 1999b.
- Kim SI, Han SR, Cho GJ, Hur DY, Lee YH, Cho MJ, Kim MK, Kim WS. Radiation-induced follicular atresia and radiation susceptibility of follicular cells in the rat ovary. *J Chungnam Med* 29: 1-17, 2002 (in Korean).
- Lee CJ, Park HH, Do BR, Yoon YD, Kim JK : Natural and radiation- induced degeneration of primordial and primary follicles in mouse ovary. *Anim Reprod Sci* 59: 109-117, 2000.
- Lee YK, Chang HH, Kim WR, Kim JK, Yoon YD : Effects of gamma-radiation on ovarian follicles. *Arh Hig Rada Toksikol* 49: 147-153, 1998.
- Lee CJ, Yoon YD : γ -radiation- induced follicular degeneration in the prepubertal mouse ovary. *Mutat Res* 578: 247-255, 2005.
- Lee WJ, Han SR, Jeong O, Kim SI, Cho MJ, Kim WS : Radiation-induced congenital anomalies in the rat fetuses. *Korean J Phys Anthropol* 14: 159-168, 2001 (in Korean).
- Lindop PJ : The effects of radiation on rodent and human ovaries. *Proc Soc Med* 62: 144-148, 1969.
- Luckey TD : Hormesis with ionizing radiation. CRC press, Boca Raton. 1980
- Luckey TD : Hormesis with ionizing radiation. CRC press, Boca Raton. 1991
- Macklis RM, Bresford B : Radiation hormesis. *J Nucl Med* 32: 350-359, 1991.
- Mathur S, Nandchahal K, Bhartiya HC : Radioprotection by MPG of mice ovaries exposed to sublethal gamma radiation doses at different postnatal ages. *Acta Oncologica* 30: 981-983, 1991.
- Min JJ, Bom HS : Induction of radiation adaptive response in lymphocyte of patients undergoing bone scintigraphy. *J Korean Nucl Med* 33: 172-177, 1999.
- Min JJ, Bom HS, Lee SY, Choi KH, Jeong HJ, Song HC, Kim JY : Cytogenetic radiation adaptive response assessed by metaphase analysis and micronuclei test in human lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Korean J Nucl Med* 32: 525-533, 1998 (in Korean).
- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S : Adaptive response of human lymphocytes to low concentration of radioactive thymidine. *Science*, 223: 594-597, 1984.
- Sankaranarayanan K, Duyn AV, Loos MJ, Natarajan AT : Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res* 211: 7-12, 1989.
- Shadley JD, Afzal V, Wolff S : Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X-ray to human lymphocytes. *Radiat Res* 111: 511-517, 1987.
- Shadley JD, Wiencke JK : Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol* 56: 107-118, 1989.
- Shadley J, Wolff S : Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2: 95-96, 1987.
- Song KI, Noh HT, Rhee YE, Son SK, Kim WS, Kim SI : Morphological study on the radiation-induced follicular

- atresia and the follicular macrophage. Korean J Obstetrics and Gynecology 47: 1940-1948, 2004 (in Korean).
- Strume T, Dobson RL, Kwan TC : Neutron RBEs and the radiosensitive target for mouse immature oocyte killing. Radiat Res 111: 47-57, 1987.
- Thomas MC : Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. Mutat Res 296: 89-106, 1992.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hseuh AJ : Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression Endocrinology 129: 2799-2801, 1991.
- Vit JP, Rosselli F : Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. Oncogene 22: 8645-8652, 2003.
- Watters D : Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. Immunol Cell Biol 77: 263-271, 1999.
- Wiencke JK, Afzal V, Olivieri G, Wolff S : Evidence that the [³H] thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. Mutagenesis 1: 375- 380, 1986.
- Witty JP, Bridgham JT, Johnson AL : Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. Endocrinology 137: 5269-5277, 1996.

Legends for Figures

- Fig. 1.** Light micrographs of ovarian follicles in the normal rat ovary. (1a) Nuclei of granulosa cells and zona pellucida (arrow) are observed in the ovary. H & E, × 100 (1b) Follicles of varying stages of development are located in the cortex. Brown-colored atretic follicles are observed in the ovary. arrow : basal lamina, * : theca layer. TUNEL, × 100
- Fig. 2.** Light micrographs of ovarian follicles at 24h after 2 cGy irradiation. (2a) Normal ovarian follicles are observed. arrow : granulosa cells. H & E, × 100 (2b) Brown-colored atretic follicles are observed in the ovary. A : antrum. TUNEL, × 100
- Fig. 3.** Light micrographs of ovarian follicles at 24h after 2 Gy irradiation. (3a) Many atretic follicles are observed in the ovary. arrow : apoptotic bodies, * : cumulus oophorus. H & E, × 100 (3b) Many atretic pre-antral and antral follicles are observed. TUNEL, × 100
- Fig. 4.** Light micrographs of ovarian follicles at 24h after 2 cGy+2 Gy irradiation. (4a) Normal ovarian follicles are observed. arrow : apoptotic bodies. H & E, × 200 (4b) Several atretic follicles are observed. TUNEL, × 100



Abstract

Low-dose Radiation-induced Hormetic Effect in the Rat Ovarian Follicle

Won-Jeong Lee, Sung-Kyong Son¹, Min-A Lee¹,
Yun-Seok Yang², Won-Sik Kim

*Department of Anatomy and ¹Department of Obstetrics & Gynecology,
College of Medicine, Chungnam National University*

²Department of Obstetrics & Gynecology, Eulji Medical University

Hormesis is the generally-favorable biological responses to low exposures to toxins and other stressors. Radiation hormesis is the theory that ionizing radiation is benign at low levels of exposure, and that doses at the level of natural background radiation can be beneficial. The purpose of this study is to reveal the hormetic effect of low-dose radiation of ionizing radiation on the ovarian follicles of 4-week old female mice. Mice were grouped into control group, 2 cGy irradiated group, 2 cGy and 2 Gy irradiated group (2 cGy pre-exposure group), and 2 Gy irradiated group.

Mice were sacrificed by cervical dislocation 24 hours after irradiation, removed ovaries, fixed in neutral formaldehyde solution for 24 hours, embedded with paraffin, stained with hematoxylin and eosin and TUNEL immunohistochemically, and observed light microscopically the atretic follicles and normal follicles in various follicular developmental stages.

In this experiment, the ratio of atretic follicles to entire follicles in an ovary increased significantly in 2 Gy-irradiated group compared with 2 cGy pre-exposure group, and the ratio of normal follicles to the entire follicles in an ovary in all the developmental stages were increased significantly in the 2 cGy pre-exposure group compared with 2 Gy-irradiated group. These results mean that low-dose radiation pre-exposure can induce the hormetic effect in the developing ovarian follicle.

Key words : Hormesis, Follicular atresia, Apoptosis, TUNEL