



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학 석사학위논문

방사선치료에 의한 타액선의 파괴
메커니즘과 예방 및 치료법에 대한
고찰

2015년 2월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

김 민 수

방사선치료에 의한 타액선의 파괴 메커니즘과 예방 및 치료법에 대한 고찰

지도교수 이 상 훈

이 논문을 치의학 석사학위논문으로 제출함

2014년 10월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

김 민 수

김민수의 석사학위논문을 인준함

2014년 11월

위 원 장 김 종 철 (인)

부 위 원 장 이 상 훈 (인)

위 원 장 기 택 (인)

국문 초록

1. 연구목적

Raidotherapy 는 구강악안면 악성종양이나 cervical area의 악성 종양 치료에 적극적으로 활용되고 있는 항암치료중 하나이다. 방사선 치료의 부작용에는 여러 가지가 있지만 그 중 가장 공통적으로 발생하는 것이 타액선의 파괴이다. 타액선의 파괴는 곧 감소된 타액배출을 초래하며 이로 인해 구강건조증, 구강작열감증후군, 급성우식 등의 다양한 구강질환들이 발병하게 되어 환자의 구강 건강과 전신건강에 큰 영향을 미치게 된다. 타액선의 acinar cell 은 타 세포들과 비교하여 vesicle 내의 이온의 농도가 높기 때문에 ionizing radiation에 대한 취약성이 매우 높으며 일정 선량 이상에 노출되게 되면 높은 확률로 acinar cell 의 apoptosis 가 일어난다. 이러한 타액선의 파괴가 어떤 기작에 의해 발생하는지, 또 어떤 방법들이 이러한 타액선의 파괴를 방지하고, 또 타액선 기능을 증진시킬 수 있는지에 대해 알아보고 향후 어떤 접근이 효과적일지를 고찰해 본다.

2. 연구대상 및 방법

1988년부터 2014년 까지 발간된 연구와 리뷰논문을 Pubmed에서 Salivary gland apoptosis necrosis, irradiation, radiotherapy, salivary gland protection, gene delivery, drug delivery 등의 다양한 키워드를 이용하여 수집하였다.

3. 결론

2000년도 이전에 발간된 논문들은 주로 고량의 방사선에 노출된 타액선의 생리학적, 그리고 조직학적 변화를 기술하였으며 분자생물학적이나 후생유전학적 접근은 주로 2000년도 이후에 이루어 짐을

볼 수 있었다. 방사선치료후 발생하는 타액선의 파괴를 막기 위한 방법으로는 여러 가지가 있는데 큰 시류를 분석해 보면 2000년도 이전의 연구는 Amifostien 과 같은 화학약품을 사용한 접근이 유일 하였으나 2000년도를 기점으로 타액선 세포의 세포자살을 막는 siRNA 의 전달, 세포자살기전 단백질에 특이적으로 결합하여 기능을 차단하는 방법, AQP 계열의 유전자나 항산화 유전자를 전달하는 방법 등의 나노기술과 연계된 방식들이 주를 이루었다.

주요어 ; Salivary gland apoptosis/necrosis, irradiation, radiotherapy, salivary gland protection, gene delivery, drug delivery

학번 : 2011-22420

Abstract

Discussion about destructive mechanisms of irradiated salivary gland and current therapeutic approaches to regain its function.

Min Su, Kim
School of dentistry
The graduate school
Seoul National University

1. objectives

Radiotherapy is widely used anti-cancer treatment for brain, orofacial maxillary, and thyroid cancer. Numerous side effects of radiotherapy have been reported but among them, salivary gland destruction is one of the major side effects causing various related disease and serious discomfort. Destruction of salivary gland leads to the hyposalivation and related diseases such as xerostomia burning mouth syndrome, and rampant caries occur and thus threat patient's oral and systemic health. Acinar cells of salivary gland have vesicles containing high concentration of metallic ion and this characteristic makes salivary gland vulnerable to ionizing radiation. With certain dose of irradiation on salivary glands, it is likely to occur apoptosis of acinar and duct cells. In this review study, mechanisms of radiotherapy-induced salivary

gland destruction will be discussed to prospect the current and future methodologies of protecting salivary gland from irradiation.

2. methods

Review and research articles from 1988 to 2014 are widely collected from Pubmed. Salivary gland apoptosis necrosis, irradiation, radiotherapy, salivary gland protection, gene delivery, drug delivery were the major key words for the search.

3. results

Articles published before 2000 were reviewed to focus on the information about physiological and histological analysis of post-irradiated salivary glands. Molecular and epigenetic analysis were mainly concentrated in the articles published after 2000. Various approaches to resolve the problems related to post-irradiation salivary gland destruction were collected; articles published before 2000 were mainly about using chemical drugs and in contrast, articles published after 2000 were mainly about siRNA delivery, AQP gene delivery, manipulation of genes involving apoptosis.

Key Words ; Salivary gland apoptosis/necrosis, irradiation, radiotherapy, salivary gland protection, gene delivery, drug delivery

Student Number : 2011-22420

목차

I. Introduction	-----	1p.
II. Purpose and Method	-----	5p.
III. Results	-----	6p.
1. Ionizing radiation 피폭에 의한 타액선 파괴 및 타액분비율 감소 메커니즘	-----	6p.
2. 현재 시도되고 있는 방사선 치료로 인한 타액선 손상 예방법 및 management	-----	15p.
3. 새로이 연구되고 있는 타액선 보호 방법론	-	20p.
IV. Discussion and Conclusion	-----	30p.
V. Reference	-----	33p.

I. Introduction

두경부의 방사선치료는 현재 두경부에서 발생한 악성종양을 제거하는데 가장 중요한 치료 중 하나이다. 두경부에 위치하는 암의 발생률은 전체 암의 약 3~5% 정도이며 중요한 기관들이 다수 위치하는 위치이기 때문에 외과적 접근 뿐 아니라 비 침습적인 화학요법이나 방사선 요법이 많이 활용되고 있다[1]. 그러나 방사선 조사는 종양이 위치한 곳 뿐 아니라 그 외의 정상적인 조직과 구조물에게까지 영향을 미치게 되어 여러 가지 부작용이 발생하게 된다. 그 중 대표적인 부작용이 방사선 피폭으로 인한 타액선의 기능 저하 및 괴사, atrophy 이다[1,2,3].

타액선에서 생산되어 도관을 통해 구강으로 배출되는 타액은 치아의 건강과 구강의 구조 유지 및 구강 내의 미생물환경을 조절하며 구강내를 기계적으로 청소하는 역할을 한다[1,3]. 구강 내의 감염 방지 뿐 아니라 미각의 유지, food bolus 의 형성, 저작, 발음, 연하, 그리고 소화작용에 이르기까지 구강 및 전신적인 건강에 매우 중요한 역할을 지니고 있다. 생산되는 타액의 총량의 90%는 Parotid, submandibular, sublingual gland를 포함하는 주타액선(major salivary gland) 에서 생산되는데 resting 상태에서 2/3 정도가 submandibular gland에서 생산된다[1]. Submandibular gland에서 생산되는 타액은 점도가 높은 mucin 이 많이 함유되어 있는데 이들은 줄 serous 와 mucous acinar cell에서 생산된다. 이에 반해 sublingual gland 에서는 mucous acinar cell 의 함량이 1~2% 에 불과하다. Parotid gland 는 serous cell을 많이 함유하고 있으며 자

극시 parotid gland에서 생산되는 타액에는 다양한 단백질이 함유되어 있다. Parotid gland에서 생산되는 타액은 전체 타액량의 약 50% 정도를 차지한다. Minor salivary gland는 전체 타액량의 10% 정도만을 생산하는데 점막표면의 마찰을 줄여주고 윤활작용을 한다. 방사선 뿐 아니라 많은 원인으로 타액선의 기능에 이상이 생기고 이로 인해 타액 배출량이 줄어들게 되면 구강건조증이 오고 타액의 자정작용이 사라져 rampant caries, fungal, bacteria, viral infection 등이 동시다발적으로 발생하게 된다[1,2,3]. 또한 구강의 건조한 감각 자체가 통증으로 느껴져 구강작열감증후군이 발생할 확률도 증가한다. 환자가 자각할 수 있는 건조한 구강의 느낌은 비자극성 타액량이 40~50% 가량 감소하였을 때 발생하게 되며 이 주관적인 증상을 호소하는 것을 Xerostomia 라고 한다[4]. 타액분비율이 병적으로 줄어드는 것을 Hyposalivation 이라 하며 병적상태의 기준은 비자극시의 총 타액분비율이 0.1ml/min 미만일 때 그리고 자극시의 총 타액 분비율이 0.5ml/min 이하일 때이다[4].

두경부 방사선 치료시 major, minor 타액선이 다른 장기나 기관들 보다 더욱 크게 타격을 입게 되는데 이것은 두경부에 발생한 종양들로 향하는 해부학적인 직선 경로상에 타액선의 위치가 일치하는 경우가 많기 때문이다[1]. 또한 타액선의 acinar cell 에는 금속이온을 포함하는 granule 이 많기 때문에 ionizing radiation 에 의한 피해가 더욱 크다[5]. 방사선피폭으로 인한 타액선의 기능상실은 피폭되는 방사선의 선량에 따라 그 정도가 다양하다[1]. Munter MW et al. 의 연구에 따르면 두경부 종양의 치료에 사용되는 가장 대중적인 방사선 조사방식은 IMRT 로 Primary target volume 에 평균적으로 약 63.4Gy/day 의 누적선량을 조사하고 종양이 전이되는 경로인 경

부 림프노드(Secondary target volume)에 약 55.5Gy/day 의 누적 선량을 조사하게 된다. Primary 와 secondary target volume 에 방사선을 조사하여 치료하는 빈도는 1주에 5일 정도이며 이 치료기간 이 끝나면 1달 이상의 휴지기를 갖는다. 간접 조사로 인한 타액선 손상은 누적조사량 30~50Gy 이상부터 시작되는데 이 구간에서의 손상은 reversible 한 반면 그 이상의 조사량에서는 irreversible 한 타액선의 손상을 관찰하였다[6]. 그러나 Eisbruch et al. 은 타액선이 영구적으로 손상되는 역치값이 약 26Gy 라고 주장하였으며 두경부 방사선 치료는 타액선에게 26Gy 이하로 피폭시키는 범위 내에서 행해져야 한다고 주장하였다[7]. Grundmann et al. 은 방사선 조사량에 따른 타액선의 손상에 대해 연구한 논문들을 취합하여 선량에 따라 발생하는 손상을 정리한 바 있다[1]. Grundmann et al. 이 정리한 실험 대상은 rat, mouse , mini pig, rhesus monkey 네 종류였는데 이 중 인간과 가장 비슷한 Rhesus monkey 의 경우 2Gy에서 타액선의 기능이 상실과 acinar cell 의 apoptosis가 관찰되었다. 7.5Gy 부터는 염증반응으로 인한 connective tissue 의 양이 증가하였고 fibrosis가 발생하였다. Minipig 의 경우 Rhesus monkey 보다 타액선의 방사선 저항성이 높았는데 15Gy부터 fibrosis 와 기능상실이 발생하였다. 이와 같이 타액선의 방사선 감수성은 종에 따라서도 다르며 타액선의 종류에 따라서도 달라진다[1]. Munter MW et al. 은 타액분비율과 scintigraphy를 사용하여 타액선의 종류별로 선량에 따른 부작용 발생확률을 계산하였다. 결과에 따르면 Parotid gland 의 타액분비율이 50% 감소하는 선량은 약 34.8Gy 였으며 75% 감소하는 선량은 40.5Gy 였다(D50 value 기준)[6]. Submandibular gland 는 30Gy 이하의 선량에서만 타액분비율 변화가 없었으나

30Gy 이상의 선량에서는 가장 높은 감소율을 보였다. 이는 Parotid gland 가 복수로 존재하는 것 과는 달리 Submandibular gland 는 하나만 존재하며 따라서 방사선으로 인한 기능상실이 타액분비율에 주는 영향이 크기 때문이다[6]. 그러나 단일 gland 기준으로는 parotid gland 가 submandibular gland 보다 방사선 감수성이 높다고 알려져 있다[1,6]. 이렇듯 적은 양의 방사선 조사로도 타액선은 치명적인 타격을 입는다. 두경부 방사선치료는 타액선의 기능을 영구적으로 저하, 상실시키기에 충분한 양의 선량을 사용하고 있고 따라서 환자의 구강, 전신적인 건강, 그리고 삶의 질을 향상시키기 위해 여러 가지의 타액선 보호 방법들이 존재하고 또 개발되고 있다.

이 논문에서는 타액선이 방사선에 의해 파괴되는 메커니즘과 그 메커니즘에 기반하여 현재 어떤 management가 행해지고 있는지, 또 타액선의 기능회복과 보호를 위해 어떤 연구들이 행해지고 있는지 그 시류를 분석하고 향후에 어떤 접근법이 효율적인지를 알아보고자 한다.

II. Purpose and Method

Purpose of Study

1. Irradiation으로 인한 타액선의 파괴 메커니즘들을 분석, 통합한다.
2. 해당 메커니즘들에 의거하여 개발된 다양한 방식의 타액선 보호 방식들을 분석하여 장.단점 및 clinical efficacy를 논한다.
3. 현존하는 타 분야의 기술들을 이용한 새로운 salivary protection 방법들을 제시해 본다.

Method

1. Pubmed 에서 salivary gland atrophy, ionizing irradiation, salivary gland destruction, head and neck radiotherapy, dose threshold, salivary gland Tissue engineering, salivary gland stem cell, apoptosis, gene delivery, drug delivery, radioprotection 등의 검색어를 조합.
2. 리뷰논문, 실험논문, 임상보고를 선별, unpublished data 는 제외
3. 영어로 된 논문만 검색. 1900~2014 까지의 출판된 논문 모두 검색.

III. Result

1. Ionizing radiation 피폭에 의한 타액선 파괴 및 타액분비율 감소 메커니즘

1980년대 말과 1990년대 초 방사선에 의한 타액분비율 감소를 설명하는 여러 가지 가설들이 제시되었다. 1981년 El-Mofty et al. 은 타액분비율 감소가 free radical 로 인한 타액선 세포막의 손상때문이라는 가설을 제시했다[8]. 타액의 분비가 신경전달물질로 인한 자극과 칼슘의존적인 메커니즘에 의해 조절되는 점에 착안하여 방사선 조사가 위와 같은 생리적 메커니즘에 영향을 주기 때문이라는 가설도 제시되었다[9]. 또한 타액선 세포가 방사선으로 인해 fibrosis, inflammation을 일으켜 변성되기 때문에 타액분비율이 감소한다는 가설도 제기되었다[9]. 타액분비를 위해서는 타액선 세포의 basolateral side 로 유입되는 혈관이 중요하기 때문에 방사선이 타액선 세포 주위의 microvasculature 구조를 붕괴시켜 타액분비율이 감소된다는 주장도 제기되었다[9]. 그러나 1999년 O'Connell et al. 은 방사선이 Ca²⁺ signalling 과 신경전달물질의 양과 재흡수에 영향을 주지 않음을 밝혔으며 만성염증이나 fibrosis 에 의한 세포 변성도 원인이 아님을 증명하였다[9,10]. 또한 Hiramatsu et al. 은 방사선이 타액선의 microvascular 구조에 영향을 거의 주지 않는다는 것을 증명하였다[9,11]. O'Connell et al. 은 실제로 방사선에 의해 가장 영향을 많이 받는 것은 acinar cell 의 수라고 주장하였다[10]. 방사선에 의해 acinar cell 내부의 어떤 메커니즘에 의해 세포가 파괴되

고 파괴된 세포는 다시 재생되지 않기 때문에 타액분비율이 감소하는 것이다. 타액선이 방사선으로 인해 파괴되는 메커니즘은 크게 1) Free radical 로 인한 세포손상[1-3,12] 2) Proapoptotic gene 의 발현으로 인한 apoptosis 가 있으며 minor 하계는 Necrosis 와 Autophagy 등의 메커니즘이 있다[1-3]. 이 외에 타액분비율을 감소시키는 요인으로서는 3) Aquaporin과 같은 water channel 단백질의 발현량 감소 및 localization 장애를 들 수 있다[1-3]. 하나의 메커니즘이 단독으로 타액선 세포 파괴에 관여하는 것은 아니며 위의 메커니즘들이 서로 유기적으로 맞물리며 타액선의 세포가 파괴된다.

1.1. Free radical formation

생체 내에서 가장 흔하게 발생하는 free radical 은 Reactive Oxygen Species (ROS) 로 ROS 로 인해 생성된 singlet oxygen 은 즉시 Fenton's reaction을 통해 OH* 와 매우 반응성이 높은 peroxyxynitrite (ONOO-) 분자를 생성한다[13]. 이러한 반응성 높은 불안정한 형태의 분자들은 세포내의 이온이나 소기관의 구성물질 과 즉시 반응하여 그 구조를 변형, 분해 시켜 세포에 피해를 준다.

1.1.1. Transitional metal을 포함하는 granules로 인한 Free radical 과다 발생

X- ray 나 gamma ray 와 같은 고 에너지 광자나 electron 이나 proton 과 같은 하전입자(charged particle) 들은 주로 악성/양성종양 치료에 주로 사용되어 왔다. 이와 같은 에너지를 흡수한 세

포들에게서 일어나는 일은 여러 가지가 있지만 대표적인 현상이 DNA의 파괴이다. 분자적인 기작으로 파괴된 DNA를 수리하는 것에는 한계가 있고 특히나 빠르게 dividing 하는 종양세포의 경우 수리 메커니즘이 제대로 작동하지 않기 때문에 정상세포 보다 방사선에 더욱 취약하다고 볼 수 있다[1]. 그러나 타액선 세포의 경우 분화가 잘 되어있고 낮은 mitotic activity를 보임에도 불구하고 다른 기관의 세포보다 높은 방사선 감수성을 보인다. 연구 초기에는 이 기현상에 대한 원인을 파악할 수 없었다. 1990년 Vissink et al. 이 rat에서 parotid gland 가 submandibular gland 보다 높은 방사선 감수성을 보인다는 사실과 동일 선량에서 serous acini 의 파괴가 duct cell 이나 mucous acini 보다 많이 일어난다는 것을 보고하였다[14]. 따라서 serous acini cell 내의 serous secretory granule 내부에 존재하는 transitional metal 이온이 원인이 될 수 있다는 가설이 제기되었다. Transitional metal 은 고에너지에 노출되면 hydroperoxide activation을 유도하고 이어 hydroxyl radical 과 다른 다양한 oxidizing species를 생산해 낸다[12]. Nagler et al. 은 rat의 타액선 세포에 존재하는 granule 들을 약물을 사용하여 제거한 뒤 방사선을 조사하였는데 동일선량에서 granule을 제거하지 않은 세포보다 기능저하가 적게 일어남을 보고하였다[12]. 이러한 결과는 기존에 rhesus 나 rat 그리고 사람에게서 관찰되었던 acinar cell 의 조기파괴의 원인이 granule 내의 transition metal 로 인해 발생한 ROS 및 free radical 이라는 강력한 증거가 되었다.

1.1.2. NADPH oxidase 1 의 발현량 증가에 의한 ROS 과잉생산.

대식세포 등의 phagocytotic cell 에서는 singlet oxygen 은 NADPH oxidase 에 의해 생성된다고 알려져 있다. 이러한 NADPH oxidase complex 는 세포막에 함입되어 있는 flavocytochrome b558, 세포질 내에 존재하는 p67phox, p47phox, p40phox, Rac1, 그리고 Rac2 로 구성되어 있다[13]. Nox2 라 불리는 gp91phox 의 6가지 homologue 들은 NADPH oxidase Nox family로 분류되는데 이 family 에는 Nox1~Nox5, 그리고 Duox1, Duox2 라는 7개의 oxidase가 포함된다. 이러한 Nox family 들은 전신적으로 존재하며 세포의 종류에 따라 발현되는 양상이 다르다. 예를 들어 Nox2 는 phagocyte 에 많으며 Nox4 는 renal tubule cell 에 많이 존재한다 [13,15]. Y. Tateishi et al. 은 타액선기원인 NS-SV-AC(Acinar cell origin) 와 NS-SV-DC(ductal cell origin) cell line에 gamma ray를 조사하자 Nox1~4 의 발현이 증가함을 관찰하였다. NS-SV-AC cell line 에서는 10Gy 선량 조사 시 Nox1,2,4 가 발현되었으며 NS-SV-DC cell line 에서는 Nox2,3,4 가 발현되었다. 그러나 siRNA 로 각 Nox family를 하나씩 knock-down 시켜 본 결과 Nox1 이 방사선으로 인한 타액선 세포 내 ROS 증가와 가장 관련있었으며 나머지 Nox family 들은 통계적으로 유의미한 결과를 보여주지는 않았다. 이와 함께 방사선 조사 이후 두 세포주 모두에게서 apoptotic activity 가 관찰되었으며 세포내 ROS 레벨도 급격히 증가하였다[15]. 그러나 이에 비해 ROS scavenger 역할을 하는 Mn-Superoixde dismutase (Mn-SOD) 의 발현량은 크게 증가하지 않았다. Catalase 의 활성도는 조사 2시간 까지 증가하다 2시간부터 4시간까지 평형을 이루고 이후 감소하였다. 방사선 조사시 타액선 세

포의 SOD 발현량이 감소할 것이라는 주장이 제기된 적 있으나 이 연구로 인해 SOD 발현량은 크게 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있다[15]. Nox 1 의 발현을 증가시키는 메커니즘에는 여러 가지가 있고 정확히 어떤 메커니즘이 이러한 현상을 유도하는지는 밝혀내지 못하였으나 여러 pathway 가 복합적으로 작용할 것이라 추측하고 있다 [13,15]. Nox1 의 발현량 증가가 Acinar cell origin cell line 에서만 관찰되었고 Ductal cell origin cell line 과 Acinar cell origin cell line 간의 SOD 발현량과 catalase 활성도의 차이가 크게 없는 것으로 보아 acinar cell 의 높은 방사선감수성은 이 Nox1 의 발현으로 인한 것으로 보여진다[15].

1.2. Pro-apoptotic gene 의 발현으로 인한 타액선 세포의 apoptosis

1.2.1 Protein Kinase C delta (PKC-delta)의 발현량 증가로 인한 apoptosis

PKC-delta 는 apoptosis 과정에서 중요한 regulator 로 genotoxic stress 가 발생하면 p53, p73, 그리고 Fas receptor 없이도 독자적으로 c-Abl 이라는 다른 apoptotic mediator 와 함께 mitochondrial apoptosis를 유도한다[16]. PKC-delta 는 전신적으로 발현되는 단백질로 외부 스트레스나 자극이 없을 때는 세포질 내에 존재하다가 외부자극이 주어지면 몇가지 요소들에 의해 인산화 되어 핵 속으로 들어가 apoptotic 단백질들의 발현에 관여한다[17]. Humphries et al. 은 mouse에서 PKC-delta를 knock-out 하여 타

액선의 방사선감수성의 변화를 관찰하였는데 PKC-delta^{-/-} mouse의 경우 방사선에 대한 저항성이 높았으며 방사선 뿐 아니라 다른 cytotoxic damage 에 대한 저항성도 PKC-delta^{+/+} mouse 보다 높았다[18]. Sten M. Wie et al. 은 acinar cell 에 방사선을 조사 후 증가하는 singlet oxygen 로 인해 활성화된 c-Abl 과 c-Src 가 PKC-delta 의 Tyr -155 와 Tyr-64 위치를 인산화하는 것을 관찰하였다. 인산화 이후 PKC-delta 가 핵 속으로 들어가는 것을 관찰하였으며 c-Abl 이나 c-Src 둘 중 하나만 비활성화 되어도 apoptosis 가 급격히 감소하였다[19]. Tyrosine kinase inhibitor인 Dasatinib 를 사용하자 in vitro 상에서 10Gy 방사선을 조사받은 타액선 세포의 apoptosis 가 80% 이상 감소하는 것을 볼 수 있었다. In vivo 상에서도 Dasatinib를 사용한 쥐는 parotid gland 의 apoptosis 가 60% 이상 감소하였다[19]. 즉 PKC-delta 는 방사선으로 인한 타액선 세포의 apoptosis를 유도하는 factor 중 가장 큰 비중을 차지하는 pro-apoptotic 단백질이다. 현재 PKC-delta를 타겟으로 하는 tyrosine kinase inhibitor 나 siRNA delivery 가 방사선치료로부터 타액선을 보호하는 방법으로 많이 연구되고 있다.

1.2.2 Pro-apoptotic gene p53의 과발현으로 인한 타액선 세포의 apoptosis.

p53 은 tumor suppressor gene 으로 알려져 있으며 타액선의 방사선감수성 뿐 아니라 다른 세포의 방사선 감수성에도 크게 영향을 주는 pro-apoptotic gene 이다. p53 은 oncogene 의 활성화에 대응하여 발현/활성화 되며 DNA damage repair, cell cycle 의 정지,

apoptosis 에 관여한다[20]. Limesand et al. 은 in vivo와 in vitro 실험에서 mouse 타액선의 acinar cell 에 5Gy 의 방사선을 조사하자 p53 의 발현량과 활성화도, 그리고 apoptosis 의 증가가 관찰됨을 확인하였다. 또한 anti-apoptotic kinase 인 Akt1을 과발현하는 유전자 변형 쥐에게서는 p53 의 활성화도가 감소하였고 apoptosis 또한 저하됨을 관찰하였다[21]. Akt1 가 p53를 억제하는 메커니즘은 Murine Double Minute Clone 2 (MDM2) 라는 단백질의 활성화에 의해 매개되는데 이 MDM2 가 활성화되면 p53 에 결합하여 proteosome 으로 유도, 분해가 진행된다[22]. Avila et al. 은 p53 이 유전적으로 제거된 쥐에 2~5Gy 의 방사선을 조사한 뒤 3~30 일간의 타액분비량을 측정하였다. 그 결과 p53이 제거된 쥐에서는 방사선 조사 후에도 apoptosis 가 관찰되지 않았으며 타액분비량도 30일 까지 감소하지 않았다[23]. 즉 방사선 피폭은 타액선 acinar cell에서 p53의 발현과 활성화를 유도, apoptosis로 진행하는 매개체가 됨을 알 수 있다. 이를 억제하는 Akt1, 그리고 p53 siRNA 등이 방사선치료에서의 타액선 보호를 위한 타겟분자가 될 가능성을 시사한다.

1.3. 방사선이 타액선의 Water channel protein에 미치는 영향과 그에 따른 타액 분비율의 감소.

1.3.1 AQP5 의 발현량 감소에 따른 타액분비율 감소.

대표적인 water channel 로 알려진 Aquaporin family 는 그 종류가 1~9 가지에 이르는데 타액선에서 발현하는 것으로 알려진

AQP는 AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, 그리고 AQP8 이며 주로 기능하는 Aquaporin 은 AQP1 과 AQP5 이다. AQP 는 물의 이동, 즉 타액의 분비에 중요한 역할을 수행하며 현재 Xerostomia 의 치료용 타겟으로 연구가 활발히 진행되고 있다[24]. Li Z. et al. 은 rat 의 submandibular gland 에 15Gy의 방사선을 조사하였는데 submandibular gland 의 크기와 무게, 그리고 타액량이 38%까지 줄어들음을 관찰하였다[25]. 방사선을 조사한 rat의 타액분석결과 타액 내의 단백질의 농도와 osmolarity 가 상승해 있었지만 단백질의 총량은 차이가 없었다. 결국 이는 타액의 수분량이 감소함을 의미하며 물의 이동을 담당하는 AQP5,1 의 기능에 이상이 생겼음을 알 수 있다. 실제로 RT-PCR 결과 방사선에 노출된 쥐의 submandibular acinar cell에서 basolateral side 와 apical side 모두 AQP5 의 발현량이 현저히 저하(40~60% 감소) 되어 있었다. 그러나 AQP1 과 Na⁺/K⁺-ATPase 의 발현량은 정상보다 약간 감소된 수준이었다. 즉 타액선에 대한 방사선 조사는 AQP1 과 Na⁺/K⁺ ATPase 보다는 AQP5 의 발현량 저하에 큰 영향을 미침을 알 수 있다[25].

1.3.2. AQP5 의 localization 장애로 인한 타액분비율 감소.

Takakura et al. 은 AQP5 기능상실로 인한 타액량 감소를 예방하기 위해 15Gy 방사선 조사 전에 muscarinic agonist 인 Cevimeline을 투여하였더니 조사 28일 후 타액분비율이 증가하였다. 보통 muscarinic agonist 는 투여시 타액분비율이 감소하는 것으로 알려져 있고 이 실험에서도 방사선 조사 후에 투여 했을 때는 타액분

비율이 급감하였다[26]. AQP5 와 muscarinic agonist 와의 관계는 아마도 AQP5 의 membrane trafficking pathway 와 관련이 있을것 이라고 생각된다. AQP5 는 활성화된 M3 muscarinic acetylcholine receptor 에 의해 apical membrane 쪽으로 이동하는데 이는 세포내의 Ca^{2+} 이온의 농도가 증가함에 따라 이루어진다 [27]. 방사선이 조사된 acinar cell 은 endoplasmic reticulum에서 Ca^{2+} 를 유리하는 과정이 손상되어 세포내 칼슘이온 농도가 증가하지 못하는데 Cemivilline 은 세포내의 Ca^{2+} 농도를 증가시키기 때문에 AQP5 의 apical membrane 으로의 이동이 원활해 지는 것이다. 그러나 muscarinic agonist가 방사선 조사로 인해 손상된 AQP5 복구 메커니즘에 관여하는 것은 다소 불명확한데 그 이유는 O Connell et al. 의 연구에서는 방사선 조사가 Ca^{2+} signalling 에 영향을 주는 것이 불명확하다고 말하고 있으며[10] Nagler et al. 의 연구에서는 muscarinic agonist 와 adrenergic agonist 가 acinar cell 의 degranulation을 촉진하기 때문에[12] 앞에서 언급한 free radical 발생의 저하로 인해 타액분비율이 회복되었을 가능성도 있기 때문이다. 그러나 Cemivilline 으로 인해 AQP5 가 apical membrane 으로 더욱 원활하게 이동하는 것은 사실이며 다만 타액분비율의 회복에는 muscarinic receptor 의 여러 세포 내 pathway 또한 관여할 가능성이 있다는 것을 말하고자 한다.

2. 현재 시도되고 있는 방사선 치료로 인한 타액선 손상 예방법 및 management.

2.1 약제를 이용한 타액선 보호 및 타액분비율 증가

2.1.1 Pilocarpine

필로카핀은 xerostomia 에 많이 쓰이고 있는 cholinergic parasympathomimetic 약제로 muscarinic receptor를 자극하여 타액분비율을 증가시켜 준다. 필로카핀이 효과를 보이기 위해서는 방사선 치료 후에도 타액선 세포의 양이 어느 정도 이상 남아있어야 하며 non-selective 한 muscarinic receptor 자극을 유발하기 때문에 다한증과 같은 전신적인 부작용이 동반될 가능성이 높다. 필로카핀은 주로 Pilocarpine hydrochloride 의 형태로 사용되고 있는데 방사선으로 인한 타액선기능이상을 치료하기 위해 방사선 조사 전과 방사선 조사 후에 필로카핀을 투약하고 있다.

방사선 조사 후에 필로카핀을 투약하는 경우 주로 하루 3번 5mg 씩 투여하는 것이 가장 많이 쓰이는 용법이다[28]. 필로카핀을 투약하는 기간은 상황에 따라 다르지만 Jacobs CD et al. 과 같이 장기간(36개월) 투약하는 경우에도 짧은 시간 투약했을 때와 특별히 다른 부작용이 발생하지는 않는다[29]. Horiot JC et al. 에 의하면 필로카핀의 투약용량은 반드시 방사선 조사량에 비례하지는 않으며 [30] SB Jensen et al. 의 systemic review 에 의하면 주로 parotid gland 에 누적선량 40Gy 이상 50Gy 이하에서 가장 높은 효용성을

보인다고 한다. 또한 가장 이상적인 증상완화를 보이기 위해서는 방사선 조사 후 8주간 꾸준히 하루 3번씩 2.5mg 이상의 필로카핀을 복용해야 하며 일부 환자들의 경우 12 주 이상의 치료가 필요할 수도 있다[3]. 그러나 필로카핀의 효과에 대해 회의적인 결과들도 다수 존재한다. Niedermeier W et al. 의 임상연구 결과에 의하면 방사선 치료 후 필로카핀의 투약이 통계적으로 유의미한 parotid gland 의 타액분비율 증가를 달성하지 못하였다고 주장한다[31]. 또한 xerostomia 증상 개선이 총 타액량이나 parotid gland 의 타액분비율의 증가와는 관련이 적다고 주장하는데 그 이유는 필로카핀으로 xerostomia 증상이 개선되었다고 응답한 환자들은 많지만 실제로 필로카핀은 parotid 나 submandibular gland 와 같은 major gland 보다 minor gland 의 타액분비율을 더 극적으로 증가시켜 주기 때문이다[3]. 실제로 Niedermeier W et al. 의 연구에서 major gland 들이 필로카핀에 의해 10~15%의 타액분비율 증가를 보인 반면 minor gland 인 palatal gland 에서는 40~50%의 타액분비율 증가를 보였기 때문이다[31]. 이는 minor gland 들이 major gland 보다 방사선에 대한 저항성이 더 높기 때문이기도 하다. 여기서 간접적으로 유추할 수 있는 사실은 방사선에 의한 세포의 손실이 적을수록 필로카핀에 대한 반응성은 증가하며 이미 비가역적인 세포손실이 어느 범위 이상을 초과한 경우 필로카핀은 효용성이 급격하게 감소한다 [1,3,31].

필로카핀의 부작용은 여러 가지가 있지만 그 정도는 경미함에서 중등도 수준이다. 필로카핀에 대한 부작용은 투여용량에 비례하지만 효용성은 용량에 비례하지 않는다. 매일 3번 5mg 씩 필로카핀을 투여했을 때 가장 빈발하는 부작용은 다한증(15~55%) 이며 두통

(15%), 이노증(14%), 혈관확장(12%), 현기증(10%), 구토감(6~20%) 순이었다[3]. 결국 필로카핀은 장기간 규칙적으로 복용되어야 하는 약제이기 때문에 경미한 부작용도 장기적인 측면에서는 심각한 수준이 될 수 있다. 특히 고혈압이나 부정맥, 혹은 천식 등의 호흡기 질환이 있는 환자의 경우 지속적인 모니터링이 필요하며 glaucoma 나 조절불가능한 천식, 위궤양 등에는 투약이 금기되어야 한다[3].

2.1.2. Cevimeline

Cevimeline 은 필로카핀과 비슷한 기작을 가진 약제로 차세대 cholinergic agonist 이다. Cevimeline 은 muscarinic M3 receptor 에 높은 affinity를 가지고 있으며 이 receptor 는 타액선 세포에만 높게 발현하기 때문에 전신적인 효과가 적다는 장점이 있다 [32]. 방사선 치료 후 Cevimeline을 투약하는 경우 내복으로 하루 세 번 30~45mg을 52주간 복용하면 xerostomia 가 개선된다는 보고가 있다[32]. 이 약제는 비자극성 타액분비율을 매우 증가시켜 주지만 자극성 타액분비율과 총타액분비율은 증가시켜주지 못한다. Chambers MS et al. 에 의하면 Cevimeline을 복용한 환자들 중 70% 이상이 부작용을 경험하는데 이 부작용은 가벼운 것으로 가장 많이 호소하는 부작용은 소화불량이라고 한다[33].

2.1.3. Amifostine

Amifostine 은 직접적으로 방사선에 의해 생성된 ROS를 막아주는 약제로 방사선 치료시 전신적으로 투약한다. 이 약제는 1950년대 미 국방성이 핵공격의 방사능으로부터 병사들을 보호하기 위해

개발한 약제인 만큼 방사선에 대한 보호능력이 뛰어난 편이다[1,3]. Amifostine 은 몸 속에 흡수되면 Alkaline phosphatase 에 의해 탈인산화 되고 이어 -SH 기를 방출한다. 이 free thiol 기는 free radical을 중화시켜 세포손상을 방지한다. Amifostine 의 또 하나의 장점은 타액선과 같은 특정한 조직에만 고농도로 축적된다는 점인데 Utley et al. 에 의하면 Amifostine 의 대사물질인 WR-1065가 종양 세포보다 타액선과 같은 정상 조직에 7배 높은 농도로 축적된다고 한다[34]. 종양세포의 경우 alkaline phosphatase 의 활성이 정상세포보다 낮기 때문이다. 1999년도에 임상실험 3상에서 방사선에 대한 타액선 보호효과를 증명받고 FDA 승인을 받아 본격적으로 방사선에 의해 발생하는 xerostomia 의 예방용으로 쓰이기 시작했다. Rudat et al. 은 누적 선량 50~70Gy (2Gy/day) 의 방사선 치료에서 치료 15~30분 전 Amifostine을 복용하면 급성 xerostomia의 발병률을 78%에서 51%로 낮출수 있고 만성 xerostomia 는 57%에서 38%로 낮출 수 있다고 보고하였다. 그러나 Munter MW et al. 에 의하면 누적 조사량이 40Gy 미만일 때만 Amifostine 이 유의한 효능을 보인다고 한다[35]. Amifostine 은 부작용 또한 심각한 편인데 임상실험 3상에서 41%의 환자가 저혈압, 구토, 알러지 반응 등의 부작용으로 인해 Amifostine 의 투약을 중단하였다[36]. 부작용은 정맥주사로 투여시 심해지며 피하주사로 투약 시 그 독성이 일부 줄어든다고 한다 [3,35,36]. 피하주사로 Amifostine을 투약한 경우 저혈압이나 알러지 반응은 없어진 반면 구토/구역은 여전히 존재하였다. 또한 Amifostine은 종양세포까지 보호하는 부작용이 있어 과연 암환자들에게 Amifostine을 투약하는 것이 임상적으로 적절한 것인가에 대한 논란이 있어왔다[37]. 이 때문에 아직 Amifostine 의 사용에 대한 가

이드라인이 존재하지 않으며 임상가들 사이에서의 합의도 이루어지지 않고 있다[3].

2.2. Submandibular gland의 외과적 이식

이 술식은 방사선 조사 영역 내에 위치하는 submandibular gland를 적출하여 submental space 로 옮겨 방사선이 조사되는 경로에서 벗어나도록 하는 것이다. Oropharyngeal 과 hypopharyngeal cancer 환자의 경우 방사선 치료 전 외과적 종양 제거를 선행하는 경우가 많은데 이 때 submandibular gland를 submental space 나 전이가 일어나지 않은 림프노드 주변으로 옮겨 놓을 수 있다. Jha N et al. 은 필로카핀과 submandibular gland 의 translocation 의 효능을 비교하였는데 외과적 translocation 이 방사선 치료 3개월 후와 6개월 후에 필로카핀 투약보다 더 우수한 타액분비율을 보여주었다[38].

3. 새로이 연구되고 있는 타액선 보호 방법론.

3.1. Drugs

3.1.1. Tempol

Tempol(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl) 은 Amifostine 의 대체제로 개발된 약물로 정상세포 뿐 아니라 종양세포도 방사선으로부터 보호하는 부작용을 개선하였다. Tempol 의 화학적 조성은 기본적으로 안정적인 nitroxide 로 Ana P. Cotrim et al. 이 mouse 타액선에서 single dose 방사선 조사에 대한 보호능력을 입증한 바 있다[39]. 2007년 후속연구에서는 fractionated irradiation 에 대한 보호효과를 실험하였는데 470mmol/L 의 Tempol을 275mg/kg 의 투약량으로 정맥을 통해 주입하거나 tempol gel을 국소적으로 적용한 10 분뒤 6Gy의 방사선 조사를 하였다[40]. 이를 5일 연속 하루 간격으로 반복하였으며 8주 후 타액선이 받은 손상을 flow rate 로 측정하였고 Tempol 의 종양의 방사선 감수성 저하 부작용을 평가하기 위해 종양의 크기도 측정되었다. 결과 Tempol은 종양의 방사선감수성 저하에 영향을 주지 않으며 종양세포에 tempol 의 축적이 없음을 MRI를 통해 관찰하였다 [40]. 이는 Tempol 의 decay 속도가 종양세포에서 타액선세포보다 2 배 가까이 빠르기 때문인 영향도 있는데 종양세포내의 tempol 의 양이 2분만에 decay 되어 사라진 것과는 반대로 타액선에서는 2분이 지나도 50% 이상이 남아있었다. Tempol 의 타액선 보호효과도 뛰어났는데 타액분비율의 감소가 25%만 관찰된 반면 Tempol을 투여받지

않은 그룹은 약 65%의 타액분비율감소가 관찰되었다[40]. 또한 gel form 의 Tempol 과 injection 형태의 Tempol 의 타액선 보호효과는 거의 비슷하여 gel form을 이용하여 쉽고 전신적 부작용이 적은 국소적용이 가능할 것이라 생각된다[40].

3.1.2. Resveratrol

Resveratrol (RES)는 polyphenolic phytoalexin 으로 레드 와인이나 포도의 껍질 속 등 여러 과일과 식물속에 자연적으로 존재하는 물질로서 항산화 효과와 anti-inflammation 및 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다. 최근에 RES 는 자외선과 방사선으로 인한 chromosome 손상을 방지하는 기능을 가지고 있다는 결과가 in vitro 와 in vivo 상에서 나와 있다[41]. Simsek Y. et al 은 rat 에 전신적으로 방사선을 조사한 뒤 RES를 투여, ovarian cell damage 가 유의미하게 감소함을 관찰하였다[42]. 이러한 사실들에 바탕하여 RES 가 방사선에 의한 타액선 세포손상 또한 예방할 수 있다는 가능성이 제기되었고 RES의 타액선 보호기능은 Liping Xu et al. 에 의해 연구된 바 있다[43]. Mouse 의 submandibular gland 에 15Gy 의 방사선을 single dose 로 조사하였으며 RES 는 방사선 조사 3일 전에 투여되었다. 방사선 조사 이후 감소되었던 타액분비량과 타액내 아밀라아제의 활성도, 그리고 SOD의 발현량이 RES를 미리 투여한 그룹에서 조사 30일 이후 완전히 회복되었다[43]. 또한 방사선으로 인해 증가한 세포 내의 Malondialdehyde를 RES 가 흡수하여 세포내의 redox potential을 정상 범위 내로 유지시킴을 관찰하였다[43]. RES 는 방사선으로 인해 발현량이 증가한 TGF-beta1 도 정상 레벨로 회복시켰는데 TGF-beta1 은 과발현시 활성도 높은 cytokine 으

로 작용, 염증반응과 fibrillation 등의 세포변성을 가져오기 때문에 RES 가 TGF-beta1을 억제하는 기능은 매우 유용하다고 할 수 있겠다[43]. 부작용 또한 거의 발견되지 않았는데 사람에게 RES를 1주간 270mg 투여한 결과 어떤 부작용도 보이지 않았으며[44] 쥐에게 하루 6번씩 150mg 의 RES를 이틀간 투여했을때도 부작용이 관찰되지 않았다[45]. 여러 연구에서 RES 의 적정 투여 용량에 대해 보고한 바 있는데 1000mg/kg 의 고농도에서는 장 폐색이 발생하는 부작용이 관찰되었고 그 이하에서는 부작용이 발견되지 않았다[46]. 100mg/kg 과 10mg/kg에서 RES 의 효용성을 비교하였을 때 10mg/kg 이 mouse ovarian cell 보호에 더 우수한 효과를 보였다. Liping Xu et al. 은 기존의 이러한 연구결과를 바탕으로 가장 적절한 투여량은 20mg/kg 일 것이라고 예상하고 있다[43].

3.1.3. Growth factor

방사선 조사에 의한 세포 파괴에는 여러 가지의 cell signalling 이 작용하는데 주로 cell death 와 cell survival 에 관련된 pathway 가 많다. 때문에 growth factor를 이용하는 방법은 최근에 다양하게 연구되고 있다. Limesand et al. 은 Insulin-like growth factor (IGF-1) 이 Akt를 활성화 한다는 점에 착안하여 IGF-1을 세포자살을 막는 용도로 사용하였다[47]. 방사선으로 인한 타액선 세포자살을 유도하는 PKC-delta를 Akt 가 불활성화 시키기 때문에 많은 IGF-1을 사용한 실험들에게서 방사선 조사후의 MOUSE 타액선 ACINAR CELL 의 apoptosis 가 상당수 억제된다는 결론을 얻었다. 주로 IGF-1은 정맥주사를 통해 투여되었으며 타액선 보호 효과

는 acute 와 chronic phase 모두 우수하였다[47]. IGF 와 EGF를 동시에 사용한 그룹에서는 IGF 나 EGF를 각각 사용한 그룹보다 타액선 보호효과가 더욱 뛰어났다. Thula et al. 은 FGF(Fibroblast Growth Factor)를 사용하였는데 방사선 조사 4시간 전 정맥주사로 FGF를 injection 하자 submandibular gland acinar cell 의 손상이 44% 감소되었다고 보고하였다[48]. Brizel et al. 이 사용한 KGF(Keratinocyte Growth Factor) 의 경우 그 효과가 명확하지 않았는데 1.25Gy/day 로 조사한 그룹에서는 통계적으로 유의미한 보호 효과가 있었던 반면 2Gy/day 이상 조사한 그룹에서는 보호효과가 거의 없었다[49]. Growth factor를 이용한 실험 결과는 표1에 요약되어 있다.

Author	Growth factor	Efficacy	비고
Limesand et al.	Insulin like growth factor-1	IGF1 정맥주사시 SG damage 100% 예방	Akt 활성화
Brizel et al.	Keratinocyte growth factor	Mixed result (no protection 2Gy/day ; 1.25Gy/day 에서는 효과 있음)	효과 검증 미비
Thula et al.	Fibroblast growth factor	IR 4hrs 전 정맥주사 → SG damage 44% 감소	Nanoparticle 에 FGF loading AVV 를 이용한 transfection

표 1. Growth factor를 이용한 방사선 조사에 의한 타액선 손상 방지의 효능 비교.

3.2. Gene delivery

3.2.1. PKC-d siRNA delivery

PKC-d 는 방사선 자극에 의해 활성화 되는 pro-apoptotic gene 으로 방사선에 의한 타액선 세포 손상의 대부분을 차지하는 메커니즘이 apoptosis 라는 점을 생각한다면 가장 유용한 target 일 것이다. PKC-d 에 complimentary 한 siRNA를 전달하여 일시적으로 PKC-d를 mRNA level에서 저하시키는 방법이 주된 방법이지만 PKC-d 가 Tyr-155,64 위치의 인산화로 활성화 된다는 점에 착안하여 tyrosinase inhibitor 인 Dasatinib를 사용하여 25Gy 의 방사선 조사에서 apoptosis 발생률을 45%를 감소시킨 결과도 있다[50]. siRNA 를 사용한 PKC-d knock down 에 관한 연구로는 Szilvia Arany et al.의 연구를 들 수 있겠다. 2012년에 발표한 논문에서 Szilvia Arany et al. 는 pH responsive triblock co-polymer를 vector로 사용하여 PKC-d를 primary salivary gland cell culture 에 전달하여 7.5Gy 의 방사선 조사에 대해 40%의 apoptosis rate 감소를 관찰하였으며 비슷한 proapoptotic gene 인 BAX 의 siRNA 를 전달하였을 때에도 동일한 apoptosis 감소효과를 보였다[51]. 2013년 Szilvia Arany et al.는 비슷한 방법으로 mouse in vivo 상에서 실험을 진행하였는데 같은 pH responsive triblock co-polymer를 vector로 사용하였다. 이 vector 의 in vivo transfection efficiency를 보기 위하여 Nkcc1 siRNA를 먼저 전달하여 Nkcc1 이 in vivo submandibular gland 상에서도 효과적으로 knock down 되는 것을 관찰 한 뒤 PKC-d gene을 전달하였다 [52]. 10Gy 의 방사선이 single dose 로 조사되었고 조사 후 control 그룹에서는 PKC-d 의 발현량이 50%증가한 것에 반해

PKC-d siRNA를 처리한 그룹에서는 PKC-d 발현이 증가하지 않았다. TUNEL assay와 Caspase 3 를 발현하는 세포를 카운팅 한 결과도 PKC-d siRNA를 전달한 그룹에서 그렇지 않은 그룹의 33% 정도에 불과한 apoptosis를 보였다. 또한 방사선 조사로 인해 저발현된 AQP5의 양도 PKC-d siRNA 투여 그룹에서는 그 발현이 현저히 증가되었다[52]. Humphries et al. 역시 PKC-delta siRNA를 in vitro 상에서 전달하는 실험을 하였는데 7Gy 방사선 조사 후 apoptotic marker 가 현저히 감소함을 관찰하였다[53]. Humphries et al. 의 실험에서는 Thermosensitive micelle을 유전자 전달 vector 로 사용하였는데 apoptosis reduction 기준으로 in vitro 상에서의 효율은 Szilvia Arany et al. 의 pH responsive triblock co-polymer 와 비슷하게 보인다[51-54]. siRNA 는 세포내에서 분해되기까지 약 7일이 걸리는데 PKC-d 가 방사선 조사 후 48시간 후 발현되는 것을 생각하면 충분한 decay 기간이라고 생각된다. 이렇듯 siRNA를 이용한 gene silencing 의 경우 타겟 유전자가 방사선 조사 얼마 후에 발현되는지, 또 그 발현이 언제까지 유지되는지가 중요하다.

3.2.2. AQP1 gene delivery

AQP1 gene 은 FDA에서 승인된 therapeutic gene 으로 검증된 안정성으로 AQP5 보다 더 많이 전달용 유전자 타겟이 되고 있다. AQP1 은 앞에서 언급했듯이 water channel protein 으로 물과 같은액체가 acinar cell 로부터 apical side 로 secretion 되는 메커니즘의 가장 마지막 단계로 타액분비율에 큰 영향을 주는 단백질이다 [24]. 실제적으로 방사선의 조사가 직접적으로 AQP1, 5 의 발현을 억

제하는지에 대해서는 아직 명확한 결과가 없지만 Szilvia Arany et al. 의 결과에 따르면 AQP5 의 발현량은 10Gy dose 에 의해 크게 감소하였다[52]. Delporte et al. 은 rat submandibular gland에 AQP-1을 Adenovirus vector를 사용하여 전달하였는데 21Gy 의 방사선 조사 이후 control 그룹보다 타액분비율이 2~3배 증가한 것을 보고하였다[54]. Shan et al. 역시 adenoviral vector를 사용하여 AQP-1 cDNA를 miniature pig parotid gland 에 전달하였는데 20Gy 의 방사선을 parotid gland 에 조사한 후 17주 후 AQP1을 전달하였다[55]. 이후 정상의 80% 수준까지 타액분비율이 회복됨을 관찰하였다. O'Connell et al. 은 인간과 유사한 Rhesus 에 AQP1 전달을 수행하였는데 유인원의 경우 3마리 중 2마리만 salivary flow 가 회복되었다[56].

Author	Delivered gene	Efficacy	비고
Delporte et al.	Human aquaporin 1 (AQP-1)	21Gy IR 4개월 후 AQP1 transfection → salivary flow 가 control group 보다 2~3배 증가	In vivo (Rat)
Shan et al.		20Gy on parotid gland → 17주 후 AQP1 전달 → 정상의 80% 수준까지 salivary flow 회복	In vivo (Pig)
O'Connell et al.		3마리의 유인원 중 2마리만 salivary flow 회복	In vivo (Rhesus)
Humphries et al.	PKC-delta siRNA	7Gy IR 후 delivery → Apoptotic marker 감소.	In vitro, Thermosensitive micelle as vector
Szilvia Arany et al.	PKC-delta siRNA BAX siRNA	In vitro 상에서 7.5Gy 조사 후 40% apoptosis rate 감소 In vivo 상에서 10Gy 조사 후 66%의 apoptosis rate 감소	In vivo 상에서 AQP5 발현 증가 관찰. pH responsive triblock copolymer as vector

표2. Gene delivery를 이용한 방사선 조사에 의한 타액선 손상 방지의 효능 비교.

3.3. Tissue Engineering and Regenerative Medicine

3.3.1. Stem cell transplantation

타액선세포는 이미 분화가 거의 완료된 세포로 division 으로 인한 세포 손상 복구보다는 basal 쪽에 미분화 세포가 존재하여 상층 타액선 세포가 turn-over 되는 형식으로 재생이 이루어진다[1,3,57]. 이 사실에 기초하여 줄기세포를 타액선 부위에 이식하는 방법이 방사선으로 인한 타액선 손상을 복구하는데 많이 연구되고 있다. Lombaert et al. 은 mouse submandibular gland에서 줄기세포를 분리하기 위해 cell prep을 하여 primary cell line을 in vitro 상에서 유지시킨 후 줄기세포 마커를 사용하여 줄기세포를 분리해 내었다 [58]. 주로 acinar cell 은 줄기세포에 해당되지 않았으나 ductal cell들이 줄기세포 마커를 발현하고 있는 것으로 보아 타액선 세포재생에 관련된 줄기세포들은 duct 쪽에 많이 분포하는 것으로 추정된다. 이렇게 분리된 타액선 줄기세포들을 15Gy single dose 로 조사된지 1달이 지난 쥐에게 이식하였더니 이 줄기세포들이 acinar cell 로 분화하기 시작하였다. 90일 후 이 줄기세포들이 손상된 acinar cell을 대체하고 있는 것을 Y chromosome detection 으로 확인하였으며 이식을 받은 쥐는 거의 정상 수준의 타액분비율을 보였다[58]. 타액선의 줄기세포들은 3일이 지나면 pluripotency를 상실하기 때문에 30일이 지난 뒤 주로 발생하게 되는 acinar cell 손상을 복구하는 것에 무리가 있다[3,57]. 이와 같은 문제 때문에 줄기세포의 pluripotency를 지속적으로 유지하는 방법이 잘 연구된 다른 출처의 줄기세포를 이용하는 연구도 추진되었다. Jae-Yol Lim et al. 은 Human adipose tissue에서 채취한 Mesenchymal stemcell을 방사선손상을 입은 타액선에 이식하였다[59]. 15Gy single dose 방사선

조사 12주 후에 이식된 hADMSC 의 일부는 타액선 세포로 분화하였고 일부는 그대로 남아 섞인 채로 존재하였다. 분화하기 전의 hADMSC 는 주위의 타액선 세포들에게 여러 survival signal을 제공하며 이 때문에 hADMSC 의 존재만으로도 주위 타액선 세포의 apoptosis rate가 감소함을 관찰하였다[59]. Yuka Yamamura et al. 은 dental pulp cell을 이식하여 방사선손상을 받은 타액선을 복구하는 연구를 진행하였다. GFP를 발현하는 mouse에서 채취된 DPC를 dental pulp endothelial cell 로 분화시키고 이를 Matrigel 과 섞어 submandibular gland 에 15Gy 의 방사선을 조사 시킨 후 이식하였다[60]. 결과 DPEC 는 전형적인 endothelial 형태를 보였으며 CD31을 발현하였고 VEGF1 등의 growth factor 들을 생산하였다. Vascular endothelial cell 의 특징상 튜브와 같은 형태를 띠게 되었고 이를 이식하자 salivary epithelial cell 로 분화하여 손상된 타액선 세포를 대체하였다[60]. Yoshinori Sumita et al. 은 Bone marrow-derived stem cell을 이용하여 타액선에 이식하려는 시도를 하였다. mouse 의 골수에서 bone marrow derived cell을 채취, 18Gy single dose 로 조사된 mouse parotid gland 에 이식하였다 [61]. 그 결과 타액선 epithelial cell 로 성공적으로 분화하였으며 혈관도 세포 사이로 자라들어온 것을 관찰하였다. 이식부위 주위의 EGF 농도가 증가하였으며 방사선으로 인해 혈관이 괴사한 부위에도 새로운 혈관이 생성되었다. 타액분비율의 감소도 이식을 하지 않은 그룹보다 40%가량 적게 일어났다[61].

3.3.2. 인공타액선

타액선이 방사선에 의해 손상되면 여러 가지 변화가 일어나지만 그 중 약물전달이나 유전자 전달로 치료할 때 가장 장애가 되는 것이 타액선 세포의 fibrosis 이다[1,3]. 이 경우 타액선 세포의 성질이 바뀌게 되거나 타액선 세포 표면이 섬유화되어 약물이나 유전자의 전달이 어렵게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 조직공학을 이용한 인공 타액선을 개발, 타액선 부위에 이식하는 방법이 제기되었다. Tran et al. 은 2006년 생분해가 가능한 폴리머 튜브를 세포가 붙을 수 있는 extracellular matrix protein 으로 코팅한 뒤 polarity를 가지는 epithelial cell을 seeding 하였다[62]. 향후 이어진 연구에서는 Rhesus parotid gland를 채취 후 PLGA와 collagen 이 혼합된 plate 위에서 배양하였다. 인공타액선은 아직 그 발전단계가 미비하며 그 자체가 타액선의 기능을 수행한다기 보다 엄밀히 말하면 거대한 cell delivery vector 로써 기능한다. 이식후 scaffold 는 분해되어 사라지고 scaffold 위에 붙은 세포들은 주변 타액선 세포와 섞여 basal 쪽의 혈관에서 양분을 받아 성장할 수 있다.

Author	Type	Design
Tran et al.	Artificial Salivary gland	Polymer tube 위에 ECM 을 깔고 epithelial cell 을 seeding
Tran et al.	Artificial Salivary Gland	Rhesus parotid gland 를 채취후 PLGA-collagen coating 위에서 culture.
Lombaert et al.	Stem cell Transplantation (ductal stem cell)	Ductal stem cell 을 채취 후 3일간 culture 후 15Gy 로 IR 된지 1달 지난 쥐에게 주입. → acinar cell 로 분화하기 시작.
Jae-Yol Lim et al.	Stem cell Transplantation (Human adipose tissue derived MSC)	15Gy single dose irradiation 후 12주 지난 뒤 이식 → 일부는 타액선세포로 분화 일부는 그대로 남음. 주위 타액선세포의 apoptosis 억제효과.
Yuka Yamamura et al.	Stem cell Transplantation (Dental pulp stem cell)	15Gy single dose irradiation 후 8 주 지난 뒤 분화된 dental pulp cell을 matrigel 에 섞어 이식 → 타액선 epithelial cell로 분화. 본래의 cell marker 인 CD31 은 그대로 발현됨. 타액분비율 약 30% 증가.
Yoshinori Sumita et al.	Stem cell Transplantation (Bone marrow derived stem cell)	18Gy single dose irradiation 후 8 주 지난 뒤 BMDSC 를 이식 → 타액선 epithelial cell로 분화, 이식부 주위에 EGF 농도 증가, angiogenesis 증가, 타액분비율 감소량 40% 감소.

표3. Tissue engineering을 이용한 방사선 조사에 의한 타액선 손상 복구 효능 비교.

IV. Discussion and Conclusion

지난 십수년간 두경부 방사선치료에 의한 타액선 세포의 손상의 메커니즘은 자세하게 연구되어져 왔다. 세포 내의 granule, 그리고 세포 내의 NADPH-1 oxidase 의 증가 등으로 인한 free radical 의 증가가 세포손상을 유발하며[1,2,5,8,9,14,15] 방사선에 의해 활성화되는 PKC-delta 와 p53, 그리고 BAX 등의 proapoptotic gene 에 의해 apoptosis가 유발되기도 한다[1,3,9,16-23]. 타액선세포의 직접적인 손상 외에도 타액분비를 담당하는 Aquaporin 5 의 apical localization 이 저하되어 타액분비율이 줄어들기도 한다[24-27]. 이 외에도 타액선 세포의 necrosis, autophagy, 그리고 염증반응 및 fibrosis 등의 여러 가지 세포 및 조직손상이 일어나게 된다[1,2,9]. 이러한 메커니즘들에 기반하여 현재 다양한 타액선 보호 및 기능 회복 약물과 방법론들이 제시되었는데 그 중 대표적인 것이 Amifostine 이다. 세포내의 증가한 free radical 들을 흡수, 중화하는 역할을 하며 FDA 의 승인으로 그 효능과 안정성을 증명 받았으나 실제로는 부작용이 크고 종양세포의 방사선감수성을 저하시키기 때문에 현재는 사용에 대한 찬반 논쟁이 심하고 투약 가이드라인의 확립이 불분명한 상태이다[1,3,34-37]. 필로카핀과 과 Cemivelline 같은 신경 자극물질들은 전신적인 부작용이 큰 편이고 타액선의 손상이 심한 경우 효과가 급감하며 방사선 조사 이후의 만성적인 타액선세포 숫자의 감소를 막아주지는 못한다[1,3,9,28-33]. 타액선을 다른 위치로 옮겨심는 외과적인 수술법도 있으나 과정이 침습적이고 다양한 각도와 다양한 두경부 기관들에게 방사선 치료를 해야 하는 경우 그 효

과가 감소하는 단점들이 있다[3,40]. 이러한 기존의 타액선의 방사선 방호효과를 위해 개발된 방법들은 그 한계가 뚜렷하며 새로운 형태의 타액선 방사선보호법들이 연구되어야 함을 의미한다. 이를 위해 약 30개의 새로운 타액선 보호방법에 대한 논문이 리뷰되었으며 이 분야에 대한 연구 방향은 크게 Amifostine을 대체할 Tempol 이나 Resverastrol 과 같은 약물의 개발[1,3,39-45], Growth factor 의 전달, 타액선 세포의 apoptosis를 유도하는 signal mediator 의 siRNA를 이용한해[50-53], AQP1,5 와 같은 water channel 단백질 코딩 유전자의 전달[54-56], 그리고 다양한 출처를 가진 줄기세포들을 이식하거나 조직공학적 방법으로 인공적인 타액선을 개발하는 방향으로 요약될 수 있다[57-62]. 많은 새로운 방법들이 있지만 방사선에 의해 손상된 타액선에서 발생하는 섬유화나 세포변성으로 인해 약물감수성이나 유전자 전달 효율성이 감소하며 viral vector 의 사용시 염증반응과 host immune reponse 가 문제가 된다[1-3,9]. 또한 줄기세포의 경우 종양세포로 변이될 위험성이 있고 조직적합성에 대한 문제가 있으며 세포를 전달하는 방법이 침습적이고 효율이 떨어지기 때문에 실제 임상에서 쓰이기에는 문제가 많다. 인공타액선의 개발은 아직 기초적인 단계에 불과하며 in vivo 상에서 독립적으로 기능하는 인공타액선은 아직 개발되지 않았다. 또한 polymer sheet 나 3D scaffold 내에 seeding 된 세포들의 polarization 과 혈관화의 문제를 해결하는 것이 조직공학적 접근의 가장 큰 문제일 것이다 [57]. 미래의 타액선 보호 방법은 크게 약물+성장촉진인자+유전자 전달 조합과 조직공학+줄기세포 이식 의 조합으로 나뉘어 진행될 것으로 보인다. 특히 약물과 단백질, 그리고 유전자를 세포내로 효율적으로 타액선 내로 전달하는 방법의 개발이 가장 중요하며 그 효과가 6

개월 가량 오래 지속되는 형태로 개발하는 것이 중요할 것이다. 일례로 세포속에 들어간 플라스미드 벡터의 경우 CPG island 구간 때문에 세포내에서 급격하게 분해된다. 이를 해결하기 위해 해당 구간을 줄이거나 삭제한 플라스미드가 개발되고 있다[63-64]. 또한 약물과 단백질, 유전자 전달은 벡터의 설계가 중요한데 non-viral 벡터로 연구트렌드가 옮겨온 것으로 보아 고분자와 나노파티클을 응용한 전달 기술이 지속적으로 발전할 것으로 보인다. 방사선에 의해 손상을 크게 받은 세포에만 선택적으로 흡수될 수 있는 전달방식이 개발되어야 하며 이는 세포내의 free radical 의 레벨에 따라 약물과 고분자의 연결 부위가 선택적으로 cleavage 되거나 세포내의 pH level 에 따라 cleavage 가 일어나 약물이 방출되는 등의 나노기술이 적용될 수 있는 가능성을 보여준다[65]. 발전하는 나노 및 고분자 기술을 적극 활용하고 3D cell printing 등의 기계적인 조직공학 기술의 발전을 타액선의 재생에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 예상된다.

V. Reference

- (1) O. Grundmann et al. Sensitivity of Salivary Glands to Radiation: from Animal models to Therapies. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2009;10:894-903.
- (2) A. Vissink et al. Oral Sequelae of head and neck radiotherapy. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2003;14:199-212.
- (3) S.B. Jensen et al. A systemic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. *Support care*. 2010;18:1061-1079.
- (4) Ghezzi EM et al. Determination of variation of stimulated salivary flow rates. *Journal of Dental Research*. 2000;79:1874-1878.
- (5) Peter B et al. On the role of secretory granules in radiation-induced dysfunction of rat salivary glands. *Radiat Res*. 1995;252:176-182.
- (6) Marc W. Munter et al. Evaluation of salivary gland function after treatment of head and neck tumors with intensity modulated radiotherapy by quantitative pertechnetate scintigraphy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 2004;58:175-184.
- (7) Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA. Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999;45:577-587.

- (8) El-Mofty SK et al. Early membrane injury in lethally irradiated salivary gland cells. *Int J Radiat Biol Relat Sud Phys Chem Med.* 1987;45:55-62.
- (9) A.C. O'Connell. Natural History and Prevention of Radiation Injury. *Adv Dent Res.* 2000;14:57-61.
- (10) A.C. O'Connell et al. Radiation-induced progressive decrease in fluid secretion in rat submandibular glands is related to decreased acinar volume and not impaired calcium signaling. *Radiat Res.* 1999;151:150-158.
- (11) Hiramatsu Y et al. Rat salivary gland blood flow and blood-to-tissue partition coefficients following x-irradiation. *Arch Oral Biol.* 1994;39:77-80.
- (12) Nagler R, Marmary Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M . Irradiation-induced damage to the salivary glands: the role of redoxactive iron and copper. *Radiat Res* 1997;147:468-476.
- (13) W.M. Nauseef. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase, *Histochem Cell Biol.* 2004;122:277-291.
- (14) Vissink A, et al. A functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res.* 1990;124:259-265.
- (15) Yoshihisa Tateishi et al. Ionizing irradiation induces apoptotic damage of salivary gland acinar cells via NADPH oxidase 1-dependent superoxide generation. *BBRC.* 2008;366:301-307
- (16) Lasfer, M., Davenne, L., Vadrot, N., Alexia, C., Sadjji-Ouatas, Z., Bringuier, A. F., Feldmann, G., Pessayre, D., and Reyl-Desmars, F. Protein kinase PKC ζ and c-Abl are required for mitochondrial apoptosis induction by genotoxic stress in the absence of p53, p73

- and Fas receptor. FEBS Lett. 2006;580:2547-2552.
- (17) DeVries, T. A., Neville, M. C., and Reyland, M. E. Nuclear import of PKC ζ is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. EMBO J. 2002;21:6050-6060.
- (18) Humphries, M. J., Limesand, K. H., Schneider, J. C., Nakayama, K. I., Anderson, S. M., and Reyland, M. E. Suppression of apoptosis in the protein kinase C ζ -null mouse in vivo. J. Biol. Chem. 2006;281:9728-9737.
- (19) Sten M. Wie et al. Inhibiting Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase C delta Protects the Salivary Gland from Radiation Damage. J. Bio. Chem. 2014;289:10900-10908.
- (20) Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. Oncogene. 2007;26:1306-1316.
- (21) Limesand KH, Schwertfeger KL, Anderson SM. MDM2 is required for suppression of apoptosis by activated Akt1 in salivary acinar cells. Mol Cell Biol. 2006;26:8840-8856.
- (22) Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. J Biol Chem. 2002;277:21843-21850.
- (23) Avila JL, Grundmann O, Burd R, Limesand KH. Radiation-induced salivary gland dysfunction results from p53-dependent apoptosis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2009;73:523-529.
- (24) Akakura K, Takaki S, Takeda I, Hanaue N, Kizu Y, Tonogi M, et al. Effect of cevimeline on radiation-induced salivary gland dysfunction and AQP5 in submandibular gland in mice. Bull Tokyo Dent Coll. 2007;48:47-56.
- (25) Li, Z., Zhao, D., Gong, B., Xu, Y., Sun, H., Yang B. and

- Zhao, X. Decreased Saliva Secretion and Down-Regulation of AQP5 in Submandibular Gland in Irradiated Rats. *Radiat. Res.* 2006;165: 678-687.
- (26) Takakura K, Takaki S, Takeda I, Hanaue N, Kizu Y, Tonogi M, et al. Effect of cevimeline on radiation-induced salivary gland dysfunction and AQP5 in submandibular gland in mice. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2007;48:47-56.
- (27) Ishikawa Y et al. Identification of AQP5 in lipid raft and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289:1303-1311
- (28) SB Jensen et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. 2010;18:1061-1079.
- (29) Jacobs CD, van der Pas M . A multicenter maintenance study of oral pilocarpine tablets for radiation-induced xerostomia. *Oncology (Williston Park).* 1996;10:16-20.
- (30) Horiot JC, Lipinski F, Schraub S, Maulard-Durdux C, Bensadoun RJ, Ardiet JM, Bolla M, Coscas Y, Baillet F, Coche-Dequeant B, Urbajtel M, Montbarbon X, Bourdin S, Wibault M, Alfonsi M, Calais G, Desprez P, Pene F, Lapeyre M, Vinke J, Maral J. Post-radiation severe xerostomia relieved by pilocarpine: a prospective French cooperative study. *Radiother Oncol* 2000;55:233-239.
- (31) Niedermeier W, Matthaeus C, Meyer C, Staar S, Muller RP, Schulze HJ. Radiation-induced hyposalivation and its treatment with oral pilocarpine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:541-549.
- (32) Chambers MS, Posner M, Jones CU, Biel MA, Hodge KM,

- Vitti R, Armstrong I, Yen C, Weber RS. Cevimeline for the treatment of postirradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68:1102-1109.
- (33) Chambers MS, Jones CU, Biel MA, Weber RS, Hodge KM, Chen Y, Holland JM, Ship JA, Vitti R, Armstrong I, Garden AS, Haddad R. Open-label, long-term safety study of cevimeline in the treatment of postirradiation xerostomia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:1369-1376.
- (34) Utley JF, Marlowe C, Waddell WJ. Distribution of ³⁵S-labeled WR-2721 in normal and malignant tissues of the mouse^{1,2}. *Radiat Res*. 1976;68:284-291.
- (35) Munter MW, Hoffner S, Hof H, Herfarth KK, Haberkorn U, Rudat V, Huber P, Debus J, Karger CP. Changes in salivary gland function after radiotherapy of head and neck tumors measured by quantitative pertechnetate scintigraphy: comparison of intensity-modulated radiotherapy and conventional radiation therapy with and without amifostine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:651-659.
- (36) Rades D, Fehlaue F, Bajrovic A, Mahlmann B, Richter E, Alberti W. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients. *Radiother Oncol* 2004;70:261-264.
- (37) Brizel DM, Overgaard J. Does amifostine have a role in chemoradiation treatment? *Lancet Oncol* 2003;4:378-381.
- (38) Jha N, Seikaly H, Harris J, Williams D, Sultanem K, Hier M, Ghosh S, Black M, Butler J, Sutherland D, Kerr P, Barnaby P . Phase III randomized study: oral pilocarpine versus submandibular salivary gland transfer protocol

- for the management of radiation-induced xerostomia. *Head Neck* 2009;31:234-243.
- (39) Cotrim AP et al. The stable nitroxide Tempol facilitates salivary gland protection during head and neck irradiation in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2004;10:1807-1812.
- (40) Cotrim AP, Hyodo F, Matsumoto K, Sowers AL, Cook JA, Baum BJ, et al. Differential radiation protection of salivary glands versus tumor by Tempol with accompanying tissue assessment of Tempol by magnetic resonance imaging. *Clin Cancer Res* 2007;13:4928-4933.
- (41) Carsten RE, Bachand AM, Bailey SM, Ullrich RL. Resveratrol reduces radiation-induced chromosome aberration frequencies in mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 2008;169:633-638.
- (42) Simsek Y, Gurocak S, Turkoz Y, et al. Ameliorative effects of resveratrol on acute ovarian toxicity induced by total body irradiation in young adult rats. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 2012;25:262-266.
- (43) Liping Xu, MM et al. Resveratrol Attenuates Radiation-Induced Salivary Gland Dysfunction in Mice. *The Laryngoscope*. 2013;123:23-29.
- (44) Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcao A, et al. Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:7-15.
- (45) Wong RH, Howe PR, Buckley JD, Coates AM, Kunz I, Berry NM. Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;21:851-856.

- (46) Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 2004;82:614-619.
- (47) Limesand KH, Barzen KA, Quissell DO, Anderson SM . Synergistic suppression of apoptosis in salivary acinar cells by IGF1 and EGF. *Cell Death Differ.* 2003;10:345-355.
- (48) Thula TT, Schultz G, Tran-Son-Tay R, Batich C. Effects of EGF and bFGF on irradiated parotid glands. *Ann Biomed Eng* 2005;33:685-695.
- (49) Brizel DM, Murphy BA, Rosenthal DI, Pandya KJ, Gluck S, Brizel HE, et al. Phase II study of palifermin and concurrent chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26:2489-2496.
- (50) Ten M. Wie et al. Inhibiting Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase C delta Protects the Salivary Gland from Radiation Damage. *J. Bio. Chem.* 2014;289:10900-10908.
- (51) Szilvia Arany, S, Xu, Q, Hernady, E, Benoit, DS, Dewhurst, S and Ovitt, CE . Proapoptotic gene knockdown mediated by nanocomplexed siRNA reduces radiation damage in primary salivary gland cultures. *J Cell Biochem* 2012;113:1955-1965.
- (52) Szilvia Arany et al. Nanoparticle mediated Gene Silencing Confers Radioprotection to Salivary Glands in vivo. *The american society of Gene and Cell Therapy.* 2013;21:1182-1194.
- (53) Humphries MJ, Limesand KH, Schneider JC, Nakayama KI, Anderson SM, Reyland ME. Suppression of apoptosis in the PKCdelta null mouse in vivo. *J Biol Chem.* 2006;281:9728-9737.
- (54) Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell

- AC, Agre P, et al. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3268-3273.
- (55) Shan Z, Li J, Zheng C, Liu X, Fan Z, Zhang C, et al. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated miniature pig parotid glands. *Mol Ther*. 2005;11:444-451.
- (56) O'Connell AC, Baccaglini L, Fox PC, O'Connell BC, Kenshalo D, Oweisy H, et al. Safety and efficacy of adenovirus-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated parotid glands of non-human primates. *Cancer Gene Ther*. 1999;6:505-513.
- (57) IMA Lombaert et al. Salivary gland progenitor cell biology provides a rationale for therapeutic salivary gland regeneration. *Oral disease*. 2011;17:445-449.
- (58) Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T, et al. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS ONE*. 2008; 3(4):e2063.
- (59) Jae-Yol Lim et al. Systemic Transplantation of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Regeneration of Irradiation-Induced Salivary Gland Damage. *PLOS one*. 2013;8:issue8.
- (60) Yuka Yamamura et al. Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation with dental pulp cell. *Archives of Oral Biology*. 2013;58:935-942.
- (61) Yoshinori Sumita et al. Bone marrow derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2011;43:80-87.

- (62) Tran SD, Sugito T, Dipasquale G, Cotrim AP, Bandyopadhyay BC, Riddle K, et al. Re-engineering primary epithelial cells from rhesus monkey parotid glands for use in developing an artificial salivary gland. *Tissue Eng.* 2006;12:2939-2948.
- (63) Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; 8: 495-500.
- (64) Chen ZY, He CY, Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 126.131.
- (65) Annette Rosier et al. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2012;64:270-279.