

석사학위논문

골수세포에 대한 fucoidan의 방사선
방어효과: 세포생존율과 면역성증진

제주대학교 대학원

의 학 과

변 윤 영

2008년 12월

골수세포에 대한 fucoidan의 방사선 방어효과: 세포생존율과 면역성증진

지도교수: 유 은 숙

변 윤 영

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

2008년 12월

변윤영의 의학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	강 희 경	印
위 원	현 진 원	印
위 원	주 홍 구	印

제주대학교 대학원

2008년 12월

Radioprotective effects of fucoidan on bone
marrow cells: Improvement of the cell survival
and immunoreactivity

Yun-Young Byon

(Supervised by Professor Eun-Sook Yoo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for degree of
Master of Science in Medicine

2008. 12.

This thesis has been examined and approved.

DEPARTMENT OF MEDICINE

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

ABSTRACT

Fucoidan is a sulfated polysaccharide purified from brown algae including *Fucus vesiculosus* and has a variety of biological effects including mobilization of hematopoietic progenitor cells. Recent study demonstrated that fucoidan stimulates the antigen-presenting functions of dendritic cells. This study investigated the radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells (BMCs), which are the main cellular reservoir for the hematopoietic and immune system. To evaluate the effects of fucoidan, cell viability assays and immune responses were used. In a viability assay, fucoidan significantly increased the viability of BMCs. Based on the results of flow cytometric analysis, the increased viability of fucoidan-treated BMCs was attributed to the inhibition of radiation-induced apoptosis. Furthermore, fucoidan altered the production of immune-related cytokines from BMCs and increased the capability of BMCs to induce proliferation of allogeneic splenocytes. Taken together, this study demonstrated that fucoidan has radioprotective effects on BMCs with respect to cell viability and immunoreactivity. These results may provide valuable information, useful in the field of radiotherapy.

Key words; fucoidan, radioprotection, bone marrow cells, immunoreactivity

목 차

A B S T R A C T i

목 차 ii

LIST OF FIGURES

I. 서 론

II. 재료 및 방법

1. 실험동물과 시약
2. 골수세포의 준비와 세포생존율 측정
3. 방사선 조사
4. Interleukin-12 (IL-12)와 tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)의 정량
5. Flow cytometric analysis
6. Mixed lymphocyte reaction (MLR)
7. Western blot analysis
8. 통계분석

III. 결 과

1. Fucoidan에 의한 골수세포의 생존율 증가
2. Fucoidan 처리가 방사선 조사된 골수세포의 세포사멸을 감소
3. Fucoidan의 골수세포에 대한 bcl-2와 cIAP-1 발현증가 효과
4. Fucoidan처리에 의한 골수세포의 표면마커 발현 증가
5. Fucoidan처리에 의한 골수세포의 싸이토카인 생산 증가 효과
6. 비장세포를 이용한 골수세포의 항원제시능 분석에서 fucoidan에 의한 증진효과

IV. 고찰

V. 참고문헌

VI. 적요



LIST OF FIGURES

Fig 1. Fucoidan increases BMC viability.

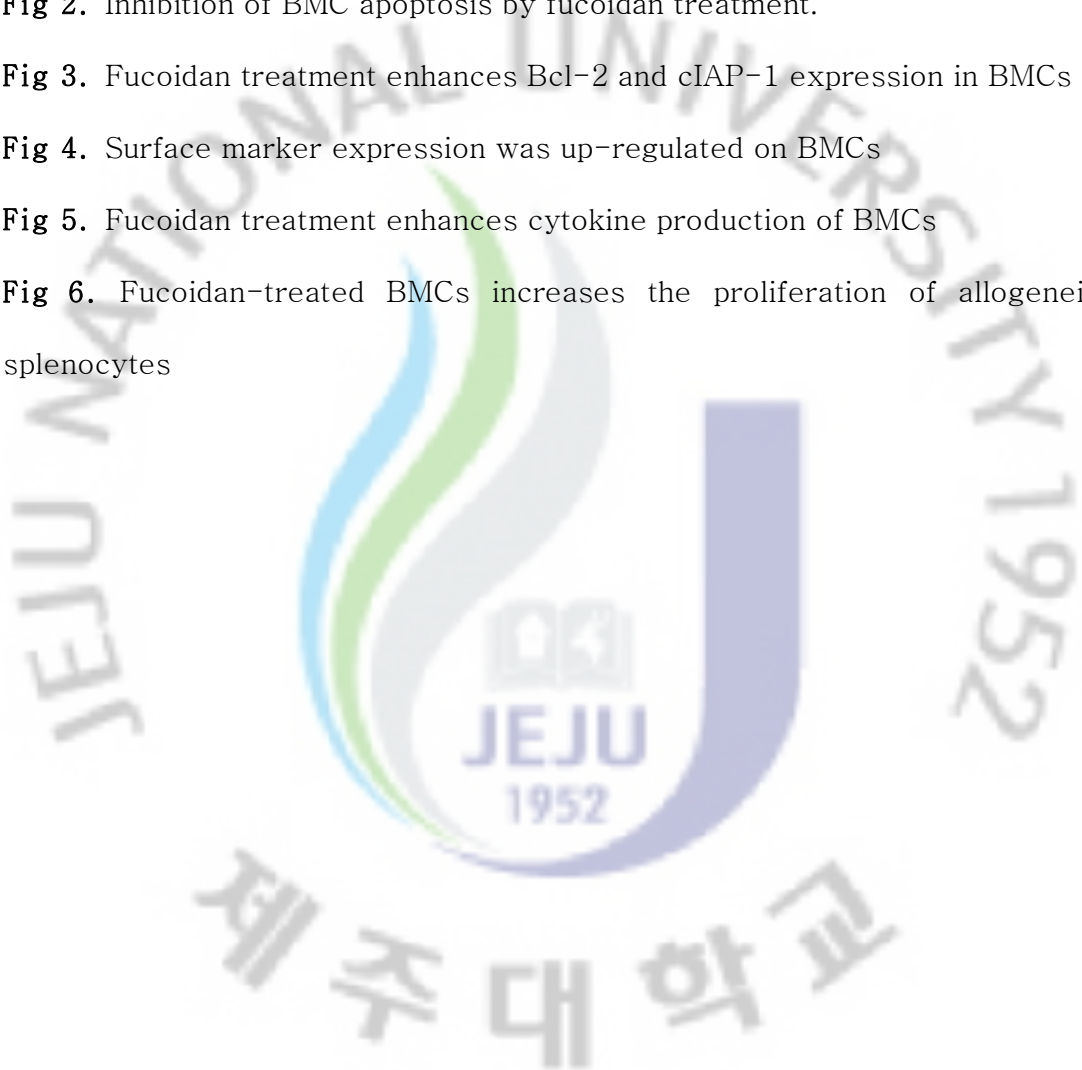
Fig 2. Inhibition of BMC apoptosis by fucoidan treatment.

Fig 3. Fucoidan treatment enhances Bcl-2 and cIAP-1 expression in BMCs

Fig 4. Surface marker expression was up-regulated on BMCs

Fig 5. Fucoidan treatment enhances cytokine production of BMCs

Fig 6. Fucoidan-treated BMCs increases the proliferation of allogeneic splenocytes



I. 서론

방사선치료는 화학요법제와 더불어 유용한 항암치료의 일종이지만 정상조직에 대한 방사선조사로 인해 조혈 및 면역체계에 대한 억제 등의 치명적인 부작용을 일으킬 수 있다. 다양한 세포를 포함하는 골수는 정상적인 조혈 및 면역체계를 유지하기 위해 필수적으로 요구된다. 전리방사선에 노출되면 골수는 심각하게 피해를 입고 그에 따른 면역억제가 발생한다. 그러므로 gamma radiation으로부터 골수세포를 보호하는 것은 방사선치료를 받거나 방사선에 노출될 위험이 있는 숙주에게 극히 중요하다.

방사선치료의 유해한 영향으로부터 환자를 보호하기 위해 수십 년간 다양한 방사선방어제 들이 개발되었다[1]. 비록 방사선방어제의 일종인 amifostine은 임상적으로 널리 사용되어 왔지만 구토, 오심을 포함한 심각한 부작용을 발생시켰다 [2-4]. 최근의 연구들은 정상세포에 대한 부작용을 최소화시키기위해 천연물질로부터 방사선방어제의 후보물질을 얻는데 초점이 맞춰져 있다[5]. 예를 들면 herb로부터 정제된 수 종의 다당류는 방사선방어효과와 더불어 숙주면역세포에 대해 자극효과를 보여주고 있다[6,7].

Fucoidan은 갈조류의 일종인 *Fucus vesiculosus*에서 추출한 황화다당으로서 다양한 생물학적효과를 보여주고 있다[8,9]. 이전의 연구 들에서 보면 fucoidan은 hematopoietic progenitor cells (HPCs)가 골수로부터 말초혈액까지 이동하는 과정에서 selectin 매개성 부착을 억제하여 그 이동을 촉진한다. 이에 더하여 HPCs의 fucoidan에 의해 유도된 이동은 생체 내에서의 stromal-derived factor-1의 혈장 내 함량의 증가와 연관이 있었다 [10]. 최근 연구에서 fucoidan은 면역계에서 강력한 항원제시기능을 하는 수지상세포의 여러 기능을 활성화시키는 사실이 증명되었다[11].

비록 조혈계와 면역계에서 fucoidan의 생물학적 기능이 수년동안 연구되어 왔지만 골수세포에 대한 fucoidan의 방사선 보호효과는 명료하지 않았다. 이 연구에서는 방사선을 쬐인 골수세포에 대한 fucoidan의 방어적 효과를 연구했으며 특히 세포 생존율, 면역사이토카인의 생산량, allostimulatory 능력 등 골수세포의 면역학적 부분에 초점을 맞추었다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물과 시약

C57BL/6와 Balb/C 마우스를 Orient BIO (Seongnam, Korea)사에서 구입한 후 실험실에서 사육하였다. 7~12 주령의 암컷마우스를 사용하였고 모든 동물실험은 제주대학교 동물실험 기준에 따라 수행하였다 (승인번호: 20070005). Fucoidan은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 인산완충액 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 녹여 사용하였다. Fucoidan 용액의 endotoxin 수준은 manufacturer's protocol에 따라 QCL-1000[®] Chromogenic LAL endpoint assay (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA)를 이용해 측정하였고 0.1 EU/ml 이하였다.

2. 골수세포의 준비와 세포생존율 측정

골수세포는 C57BL/6 마우스를 안락사 시킨 뒤 양쪽 대퇴골과 경골을 분리한 후 Hank's balanced salt solution (HBSS, Sigma)으로 세척하여 얻었다. 그 뒤 ammonium chloride-potassium carbonate (ACK) lysis buffer를 사용해서 혼입되어있는 적혈구를 용혈시켰다. 골수세포를 배양하기 위해 5% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지 (모두 Invitrogen)를 사용했다. 골수세포는 6-well plate에 배양했고 방사선조사 전에 fucoidan으로 처리했다.

3. 방사선 조사

방사선조사는 1 Gy로 1회 ⁶⁰Co gamma-ray source (MDS Nordion C-188 standard source)를 이용하여 제주대학교 방사선응용과학연구소에서 조사하였다.

4. Interleukin-12 (IL-12)와 tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)의 정량

세포매개성면역과 선천성면역의 대표적인 사이토카인인 IL-12와 TNF-alpha의 정량을 위해 골수세포의 상층액이 사용되었다. 상층액의 사이토카인의 정량은 CytoSet™ antibody pairs (Biosource International, Camarillo, CA, USA)를 manufacturer's manual에 근거해서 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용해 측정하였다.

5. Flow cytometric analysis

골수세포는 5% FBS, 0.1% sodium azide가 포함된 HBSS인 FACS staining solution으로 세척했다. 각 항체반응 후에 wash buffer를 사용하여 세포를 2회 세척하였고 avidin-FITC를 이용하여 세포표면에 발현된 marker를 염색했다. 1차 항체로서 biotin-labeled anti-Gr-1, anti-I-A^b (MHCII), anti-CD86 (B7.2) 단클론항체를 사용했고, streptavidin-fluorescein isothiocyanate (FITC)를 2차항체 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 사용했다. 세포사멸이 진행된 세포의 비율을 측정하기 위해 manufacturer's manual에 따라 annexin V-FITC/propidium iodide (PI) kit (Biosource International)를 이용해서 세포를 염색했다. 미토콘드리아의 기능을 확인하기 위해 세포를 10 µg/ml rhodamine 123 (Sigma)을 넣고 배양시켰다. 염색된 모든 세포는 FACS Calibur®와 CellQuest® (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용해서 분석했다.

6. Mixed lymphocyte reaction (MLR)

C57BL/6 마우스에서 얻은 골수세포를 6-well culture plate에 각각 대조군과 fucoidan처리군, 방사선대조군, 방사선-fucoidan처리군을 만들었고 2시간 후에 방사선용의 배양 plate만 1Gy로 조사한 후 CO₂ 배양기에 넣었다. 비장세포를 얻기

위해 Balb/C 마우스의 비장을 으깨어 세포를 추출한 후 용혈로 적혈구를 제거하였다. 5% heat-inactivated FBS가 포함된 RPMI-1640 배지에 1시간 배양하여 비장세포에 존재하는 부착세포를 제거한 후 림프구가 포함된 부유세포를 2×10^5 cells/well의 농도로 96-well culture plate에 넣은 후 배양했다. 전날 준비된 골수세포를 scraping해 회수한 후 15ml conical tube에 넣은 후 원심분리하였다. 이 후 상층액을 버린 후 10% lymphocyte complete medium (LCM)을 넣어서 세포생존율을 측정하였고 co-culture에서 stimulator로 사용하기 위해 전체 처리군 세포를 방사선 조사하였다. 2×10^5 cells/well의 농도로 맞춰놓은 비장세포에 방사선조사된 골수세포를 넣어 co-culture하였다. 5일 지난 후 마지막 18시간 동안 ^3H -thymidine을 1 μCi /well 농도로 넣은 후 세포에 함유된 radioactivity를 liquid scintillation counter (Wallac Microbeta TriLux; PerkinElmer, USA)로 측정하였다.

7. Western blot analysis

각 처리군의 골수세포를 이용해 western blot 분석을 위해 세포단백질을 얻었다. 세포는 lysis buffer를 이용하여 용해시킨 뒤 Bradford 법을 이용하여 단백질을 정량하였다. 12% gel을 만들어 사용했고 각 lane에 동일한 양의 단백질을 loading하여 전기영동을 실시하였다. Gel에 있는 단백질은 nitrocellulose membrane에 blotting하였으며 1차 항체로 anti-Bcl-2, Bcl-xL, Bax antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-cIAP-1, cIAP-2 antibody (Millipore, Billerica, MA, USA), anti- β -actin antibody (Sigma)를 사용하였고 일차항체를 인식할 수 있고 horseradish peroxidase가 결합된 이차항체와 ECL reagent인 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology, USA)를 차례로 사용해 특정 단백질의 band를 확인하였다.

8. 통계분석

대부분의 실험data는 세 번 이상의 동종의 실험을 통해 얻었고 Turkey-Kramer multiple comparison tests로 분석되었다. p value가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 인정되었다.



III. 결 과

1. Fucoidan에 의한 골수세포의 생존율 증가

골수세포 생존율에 있어서 fucoidan의 영향을 조사하기 위해서 골수세포에 fucoidan을 처리해서 배양했다 (Fig. 1). 세포를 배양한 후 CCK-8 solution을 더해서 well당 O.D.값을 측정했다. 방사선을 조사하지않고 fucoidan만을 처리한 경우 2-50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 방사선을 조사한 경우 10-50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 생존율을 증가시켰다. 골수세포는 생체 내에서 세포의 생존을 위해 각종 사이토카인이 필요하다. 그러나 본 실험에서는 fucoidan 처리에 대한 효과를 확인하기 위해 대퇴골이나 경골로부터 골수세포를 수거한 뒤 이러한 필수 사이토카인 없이 시험관 내에서 배양했다. 따라서 생체 내에서 존재했던 사이토카인이 없어지면서 자연적인 세포사멸과정이 나타나게 되어 골수세포의 생존율을 줄어뜨리게 한 것으로 보인다. 본 실험결과에서 보인 fucoidan의 생존율 증가효과는 자연적인 필수 사이토카인의 제거와 방사선조사에 의해 유도된 세포사멸과정으로부터 fucoidan이 골수세포를 보호하는 효과가 있는 것으로 추정된다.

2. Fucoidan 처리가 방사선 조사된 골수세포의 세포사멸을 감소

방사선 조사된 골수세포의 생존율에 fucoidan이 어떤 효과가 있는 지 더 확인하기 위해 annexin V-FITC/propidium iodide (PI) 염색과 세포크기를 기준으로 한 분석, rhodamine123을 이용한 염색을 이용하였다 (Fig. 2). Annexin V-FITC/PI 염색에서 (Fig. 2A), fucoidan은 살아있는 세포 (Annexin V-FITC negative/PI negative)의 수를 증가시켰다. 특히 방사선이 조사된 세포의 경우 15% 생존율을 보였는데 fucoidan 처리 후 그 생존율이 62%로 증가했다. 이에 더해 fucoidan은

세포사멸 말기의 세포 (annexin V-FITC positive/PI positive)의 비율을 감소시켰다. 세포크기를 기준으로 한 분석에서도 (Fig. 2B), fucoidan은 일관성 있게 죽은 세포의 비율을 감소시켰고 살아있는 세포의 수가 증가된 것이 관찰되었다. 일반적으로 미토콘드리아는 세포의 사멸과정에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Rhodamine123은 미토콘드리아의 막전압을 측정할 수 있는 염색약으로 본 실험에서 fucoidan은 방사선 조사에 의한 미토콘드리아의 막전압 감소를 회복시켰다 (Fig. 2C). 이러한 결과를 종합하면 fucoidan은 방사선 조사에 의한 골수세포의 생존을 저하를 막아주며 이는 세포사멸과정의 억제에서 기인한 것으로 보인다.

3. Fucoidan의 골수세포에 대한 bcl-2와 cIAP-1 발현증가 효과

Fucoidan의 골수세포 생존율에 대한 증가효과의 작용기전을 연구하기 위해 세포사멸 관련 단백질인 bcl-2 family 단백질과 c-IAP-1, 2의 발현에 대해 조사하였다. Western blot 분석결과 (Fig. 3), 골수세포에 대해 fucoidan을 처리한 결과 Bcl-2, Bax와 cIAP-1의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 fucoidan은 Bcl-2와 cIAP-1과 같은 세포사멸 방지 단백질의 발현 증가에 의해 골수세포에서 방사선 조사에 의해 유도되는 세포사멸을 억제할 것으로 추정된다.

4. Fucoidan처리에 의한 골수세포의 표면마커 발현 증가

골수세포는 숙주의 주된 면역세포 저장장소 중 하나이다. 방사선 조사된 골수세포의 면역기능에서 fucoidan의 회복효과를 결정하기 위해 주요 세포표면마커의 발현수준을 측정했다. Flow cytometric analysis에서 (Fig.4) granulocytes에 대한 phenotypic marker인 Gr-1발현이 fucoidan 처치에 의해 유의하게 증가했다. 반면에 면역과 관계된 표면마커인 B7.2 (결과에는 안보여진)와

MHC II의 발현은 유의하게 변화되지는 않았다. 이러한 결과에서 fucoidan이 BMC에서 granulocyte 마커의 발현을 유의하게 증가시켰고 fucoidan이 골수세포에서의 세포유형의 비율을 변화시킬 수 있다는 사실을 확인하였다.

5. Fucoidan처리에 의한 골수세포의 싸이토카인 생산 증가 효과

Fucoidan을 처리한 골수세포가 면역반응과 관계된 싸이토카인의 생산에 연관이 있는 지 여부를 조사했다. IL-12와 TNF-alpha는 각각 세포매개성면역과 자연면역에서 주요한 역할을 하는 대표적인 싸이토카인으로서 이번 연구에서 선택되었다. ELISA에서 (Fig. 5) fucoidan을 처리한 골수세포에서 IL-12와 TNF-alpha의 생산이 증가되었다. 그러나 fucoidan 처리 후 방사선을 조사한 골수세포에서 IL-12는 유의하게 증가하지 않았다. 이러한 결과로 fucoidan은 골수세포의 생존율뿐만 아니라 싸이토카인의 생산에도 영향을 미치는 것으로 여겨진다.

6. 비장세포를 이용한 골수세포의 항원제시능 분석에서 fucoidan에 의한 증진효과

Allogenic 비장세포의 증식을 활성화하는 골수세포의 능력에 대해 fucoidan이 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 골수세포는 전구세포 또는 성숙된 형태의 항원제시능을 갖는 각종 세포를 포함하고 있다. MLR 분석에서 C57BL/6 마우스의 골수세포가 stimulator로서 사용되었고 Balb/C 마우스의 비장세포가 allogeneic responder cell로서 사용되었다. Allogeneic 비장세포만의 증식을 측정하기 위해 모든 골수세포는 co-culture 바로 전에 방사선으로 조사되었다. Fucoidan처리한 골수세포는 setting시 처리된 방사선 조사와 관계없이 allogeneic responder cells의 증식을 향상시켰다 (Fig. 6). 이러한 결과에서 fucoidan 처리가 골수세포에 포함된 항원제시세포의 기능을 유의하게 증가시킬 수 있는 것으로 추정된다.

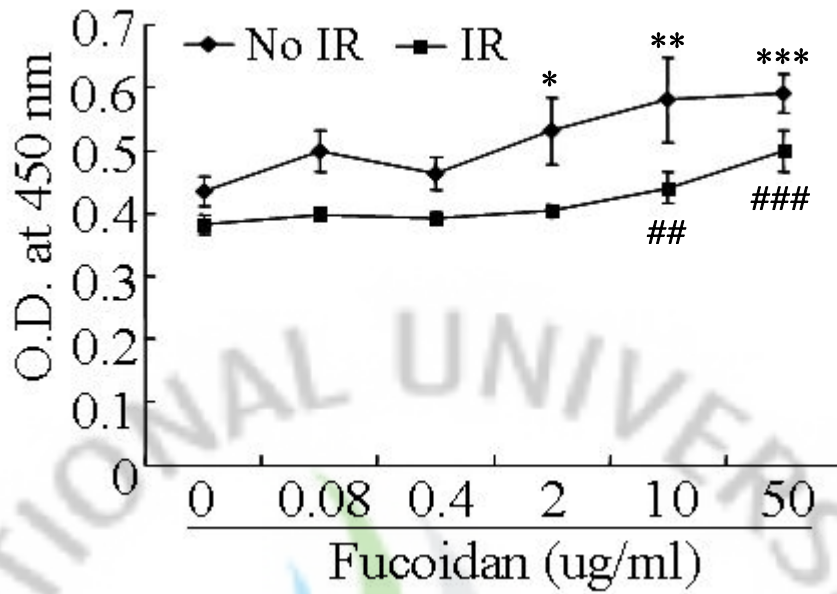
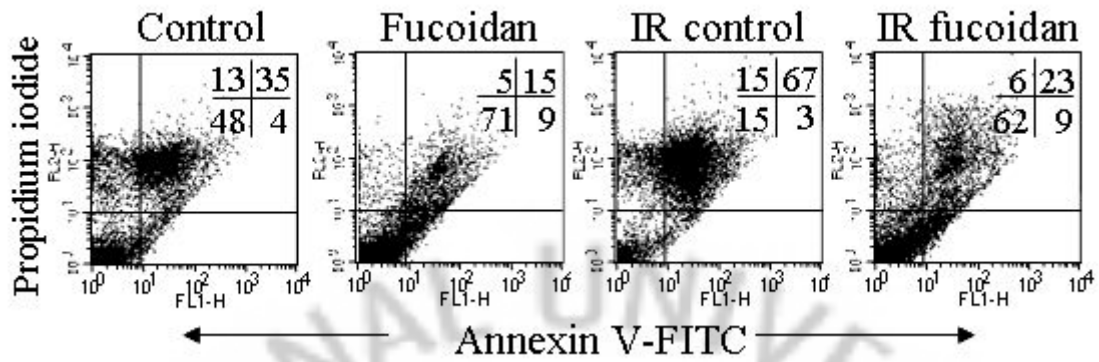
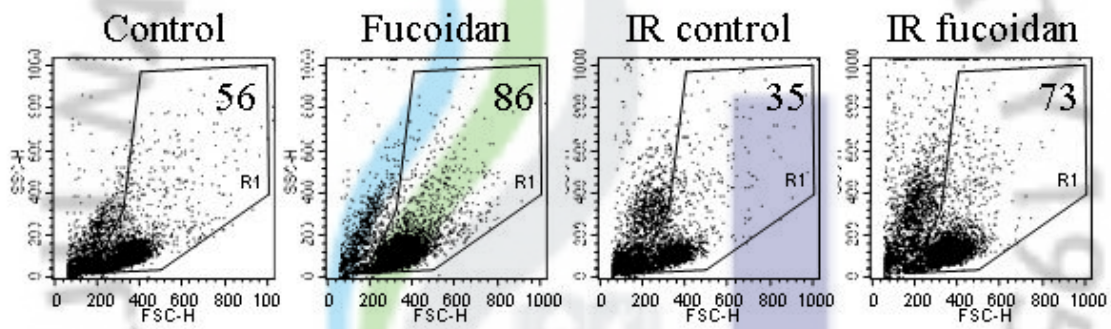


Figure 1. Fucoidan increases BMC viability. BMCs were cultured in 96-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/well. Cells were treated with fucoidan for 24 h and then irradiated (1 Gy). After 24 hr, CCK-8 solution was added as described in *Materials and Methods*. The O.D. of wells was analyzed. Results are expressed as mean \pm SD of 4 wells. Representative data of three independent experiments with similar results are shown. *, **, *** indicate $p < 0.05$, 0.01, 0.001 vs No IR control and ##, ### indicate $p < 0.01$, 0.001 vs IR control respectively.

(A)



(B)



(C)

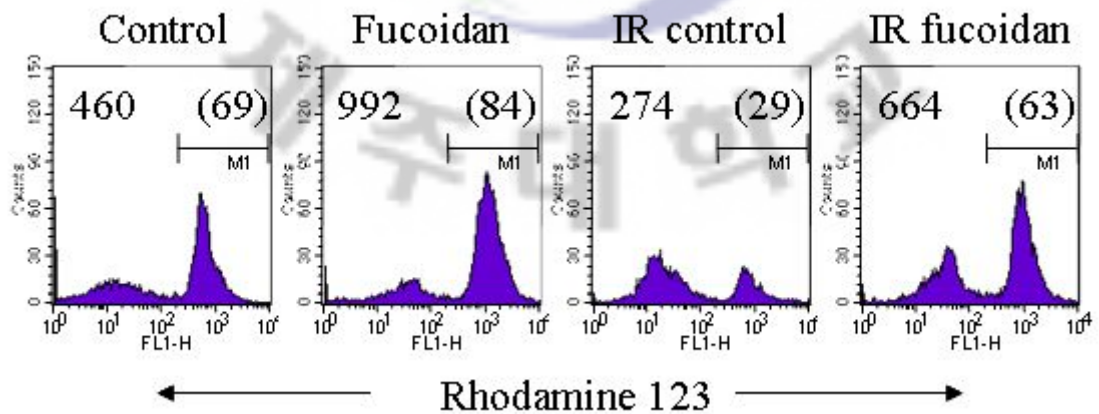
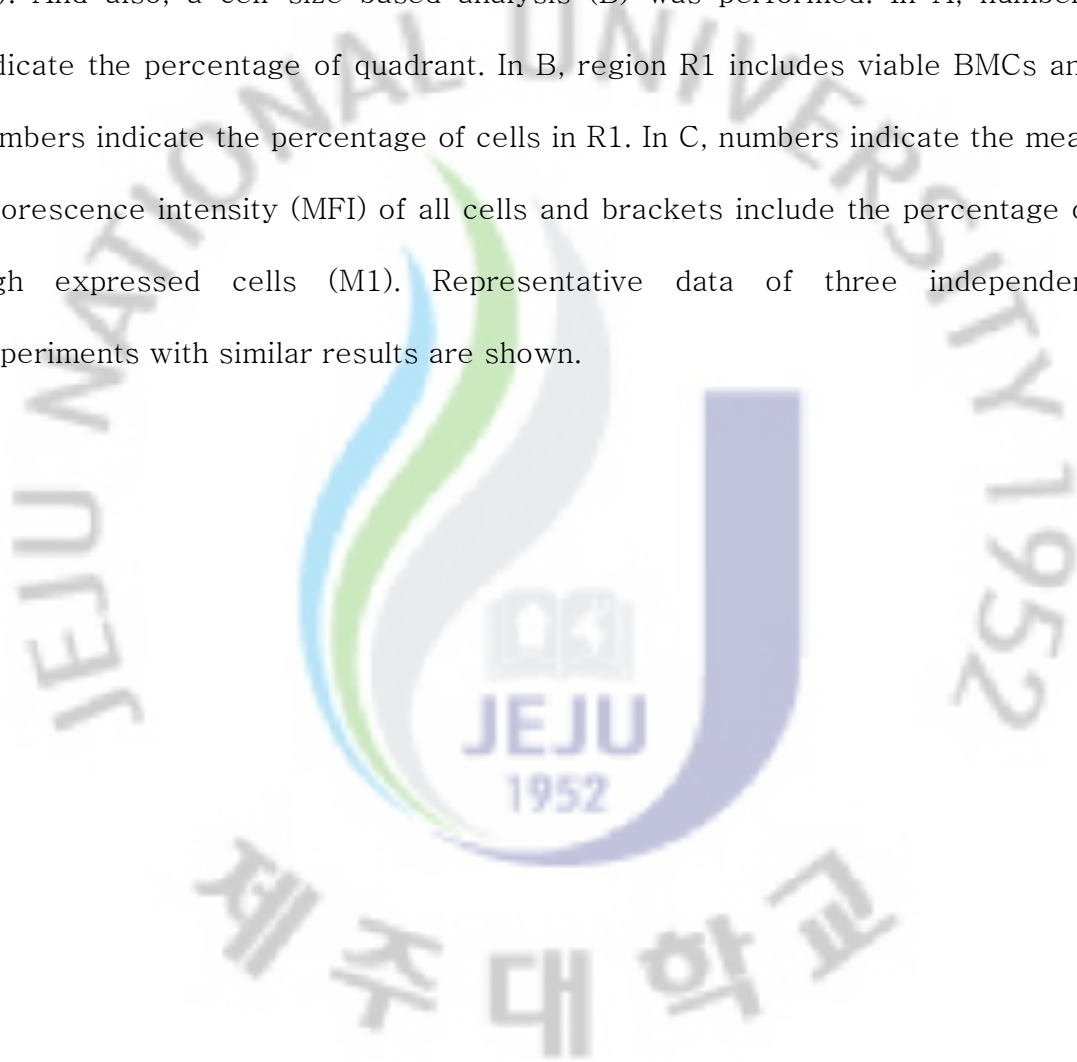


Figure 2. Inhibition of BMC apoptosis by fucoidan treatment. BMCs were cultured in 6-well plates at a concentration of 1×10^6 cells/ml. Cells were treated with fucoidan ($50 \mu\text{g/ml}$) for 24 h and then irradiated (1 Gy). After 24 h, cells were harvested and stained with annexin V-FITC/PI (A) or rhodamine 123 (C). And also, a cell-size based analysis (B) was performed. In A, numbers indicate the percentage of quadrant. In B, region R1 includes viable BMCs and numbers indicate the percentage of cells in R1. In C, numbers indicate the mean fluorescence intensity (MFI) of all cells and brackets include the percentage of high expressed cells (M1). Representative data of three independent experiments with similar results are shown.



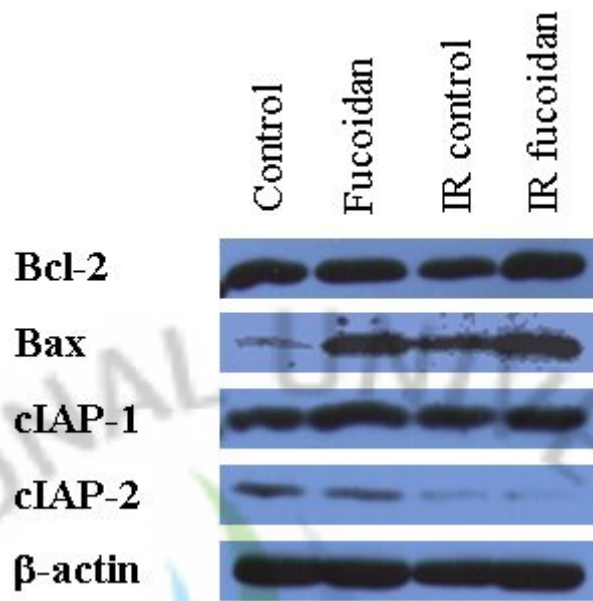
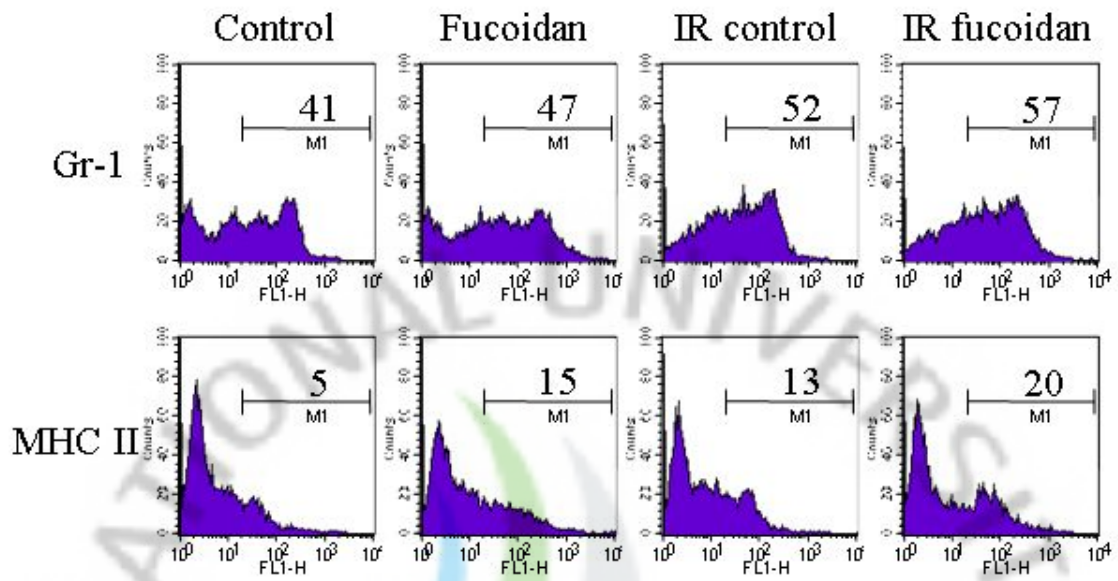


Figure 3. Fucooidan treatment enhances Bcl-2 and cIAP-1 expression in BMCs. Cells were cultured and treated as described in Fig. 2. Western blot analysis was performed as described in *Materials and Methods*. Representative data of three independent experiments with similar results are shown.

(A)



(B)

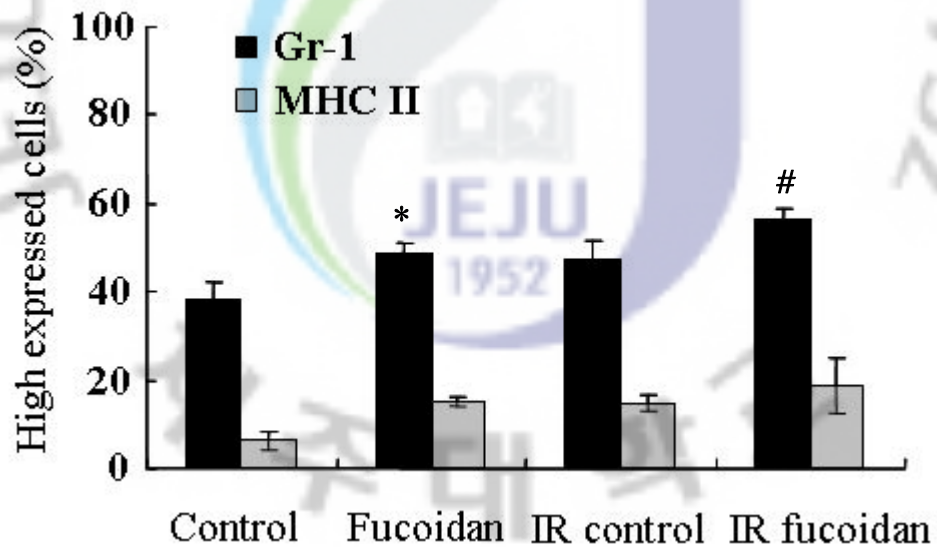
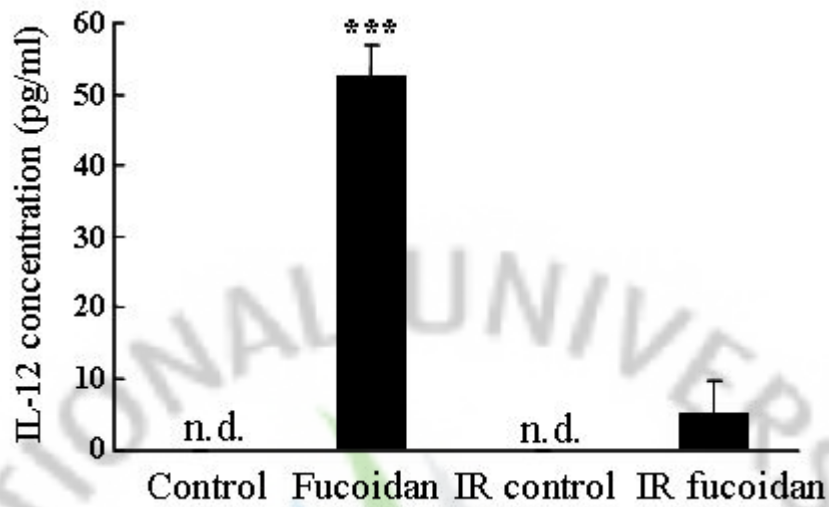


Figure 4. Surface marker expression was up-regulated on BMCs. Cells were cultured and treated as described in Fig. 2, and then stained as described in *Materials and Methods*. Representative data of three independent experiments with similar results are shown (A). The numbers indicate the percentage of high expressed cells (M1) compared to that of fluorescence control. In B, the percentages of high expressed cells were analyzed statistically. *, # indicate $p < 0.05$ vs control, IR control respectively.



(A)



(B)

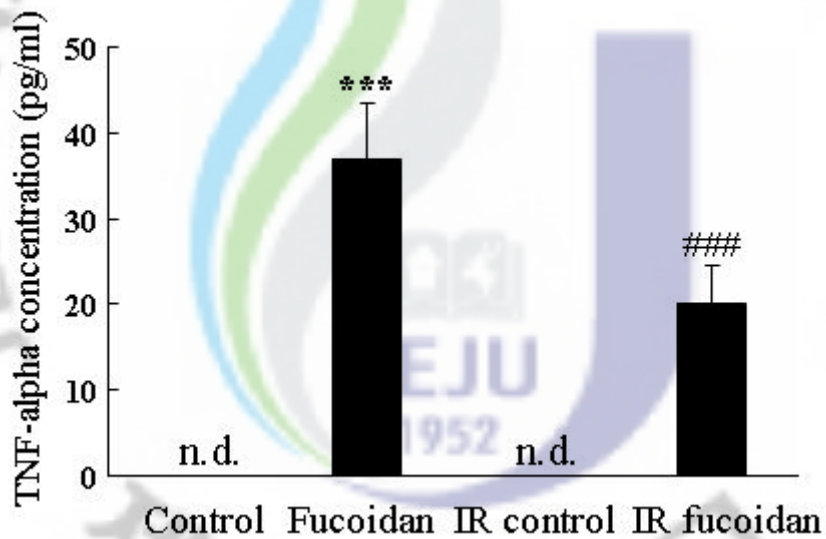


Figure 5. Fucoidan treatment enhances cytokine production of BMCs. Cells were cultured and treated as described in Fig. 2. The supernatants of BMCs were collected and ELISA was performed to quantify cytokine concentrations. Data were obtained from three independent experiments and are presented as the mean \pm SD. The n.d. means non-detectable level of cytokine. ***, ### indicate $p < 0.001$ vs control, IR control respectively.

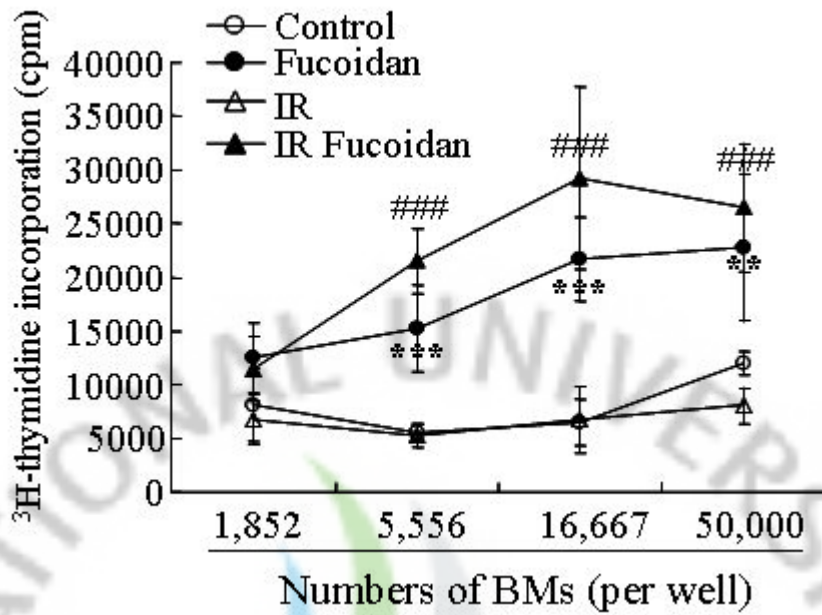


Figure 6. Fucoidan-treated BMCs increases the proliferation of allogeneic splenocytes. BMCs of C57BL/6 mice were cultured and treated as described in Fig. 2. Allogeneic splenocytes (2×10^5 cells/well) were cocultured with BMCs in 96-well culture plates. Data of incorporated radioactivity were analyzed from 5 individual wells and are presented as the mean \pm SD. Representative data of three independent experiments with similar results are shown. **, *** indicate $p < 0.01$, 0.001 vs control respectively and ### indicates $p < 0.001$ vs IR control.

IV. Discussion

Fucoidan은 생물학적으로 그 기능이 다양한 것으로 알려져 있다. 그리고 이 물질의 면역조절 활동은 여러 해 동안 광범위하게 연구되어져 왔다. 최근연구에서 fucoidan이 natural killer cells [13], 조혈줄기세포 [14], 혈관내피세포 [15], 그리고 수지상세포 [11]에서 매우 중요한 생물학적 효과를 갖는다는 것이 확인되었다. 비록 골수에 존재하는 HPCs의 이동에 관한 연구는 수행되었지만 골수세포에서 fucoidan의 직접적인 효과에 관한 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 세포 생존율과 면역자극활성을 확인하고 골수세포에서의 fucoidan의 방사선 방어효과를 조사하였다.

최근 방사선방어제 개발에 관한 연구는 의학적인 효과를 갖는 식물과 그로부터 추출된 순수 분리물질에 초점이 맞추어져 왔다 [16,17]. 다당류로 이루어진 순수분리물질 들은 biological response modifiers (BRMs)로서 역할을 하고 방사선 방어효과와 면역증진효과를 보였다. 면역증진기전에서의 신호전달이 방사선 방어작용의 일정부분 역할을 할 것으로 추정된다.

Flow cytometric analysis에서 fucoidan을 처리한 골수세포는 대조군에 비해 표면에 Gr-1 마커의 발현이 더 높았다. 골수는 조혈과 면역체계에서 주요한 세포공급원이며 각종 전구 또는 성숙된 림프구, granulocytes 그리고 기질세포를 가지고 있다. 이번 결과에서 Gr-1마커 양성인 granulocytes와 같은 특별한 골수세포가 fucoidan처리에 의해 방사선 조사 후 선택적으로 생존할 수 있다는 사실을 확인하였다. 앞으로의 연구는 fucoidan의 작용기전이 어떤 세포에서 일어나는지 초점이 맞춰져야 할 것으로 보인다.

방사선 조사에 의해 유도된 골수세포의 세포사멸로부터 fucoidan이 어떻게 보호하는지 조사하기 위해 세포사멸관련 단백질의 발현정도를 western blot analysis로 측정하였다. Bcl-2 family에 속한 단백질 중에 Bcl-2, Bcl-xL, Bax가 미토콘드리아를 포함하는 세포사멸과정에서 밀접하게 연관되어 있기 때문에 선택되었다 [18,19]. 추가로 cIAP-1과 cIAP-2와 같은 다른 세포사멸방지 단백질의 발현정도도 같은 샘플에서 조사되었다 [20-22]. Bcl-2, Bax, 그리고 cIAP-1의 발현은 대조군과 비교하여 fucoidan을 처리한 골수세포에서 더 높았다. 반면에 cIAP-2의 발현은 대조군과 fucoidan 처리군 사이에 유의한 차이가 없었다. 기존 연구에서 Bcl-2와 Bax 단백질은 세포사멸방지효과와 세포사멸촉진효과를 보여주지만 본 연구에서는 둘 다 발현이 증가하는 것으로 나타났다. Bax의 발현과 관련된 세포사멸촉진효과는 Bcl-2의 발현에 의해 상쇄되었을 가능성이 있고 cIAP-1과 같은 다른 세포사멸방지 단백질에 의해 fucoidan의 골수세포 세포사멸방지효과가 나타났을 것으로 추측된다.

Fucoidan을 처리한 골수세포는 대조군과 비교해서 allogeneic 비장세포를 자극하여 성장시키는 능력이 증강되었다. Fucoidan이 싸이토카인의 생산을 증가시키지만 면역과 관련된 표면마커 들은 증가시키지 않았다. 따라서 MLR에서 보여준 fucoidan의 항원공여기능 증가효과는 싸이토카인의 생산 증가와 방사선 조사된 골수세포에 Gr-1 양성세포의 비율 증가에 기인하였을 것으로 추정된다.

종합적으로 본 연구에서는 황화다당류인 fucoidan이 골수세포에서 방사선방어효과를 갖는 사실을 증명했다. 이러한 효과는 세포생존률의 증가와 면역조절활성 등 다양한 면을 포함하고 있다. 따라서 이번 연구의 결과는 독성이

줄어든 새로운 방사선 방어제의 개발을 할 수 있는 가능성을 보여주었다.



V. 참고문헌

- [1] Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 2007;12:794-805.
- [2] Santini V, Giles FJ. The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. *Haematologica* 1999;84:1035-42.
- [3] Wrembel-Wargocka J, Jablonska H, Chomiczewski K. Clinical use of amifostine (WR-2721) as a preparation protecting healthy tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation therapy. *Przegl Lek* 1996;53:820-5.
- [4] 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;70:261-4.
- [5] Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Prasad J, Singh S, Samanta N, Sharma RK. Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother Res* 2005;19:1-22.
- [6] Kim HJ, Kim MH, Byon YY, Park JW, Jee Y, Joo HG. Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells. *J Vet Sci* 2007;8:39-44.
- [7] Wang ZW, Zhou JM, Huang ZS, Yang AP, Liu ZC, Xia YF, Zeng YX, Zhu XF. Aloe polysaccharides mediated radioprotective effect through the inhibition of apoptosis. *J Radiat Res* 2004;45:447-54.
- [8] Frenette PS, Weiss L. Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and

- independent mechanisms. *Blood* 2000;96:2460-8.
- [9] Choi EM, Kim AJ, Kim YO, Hwang JK. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro. *J Med Food* 2005;8:446-53.
- [10] Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* 2002;99:44-51.
- [11] Kim MH, Joo HG.. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol Lett* 2008;115:138-43.
- [12] Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2001;69:555-64.
- [13] Maruyama H, Tamauchi H, Iizuka M, Nakano T. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mekabu). *Planta Med* 2006;72:1415-7.
- [14] Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Exp Hematol* 2007;35:989-94.
- [15] Lake AC, Vassy R, Di Benedetto M, Lavigne D, Le Visage C, Perret GY, Letourneur D. Low molecular weight fucoidan increases VEGF165-induced endothelial cell migration by enhancing VEGF165 binding to VEGFR-2 and NRP1. *J Biol Chem* 2006;281:37844-52.
- [16] Ivanova T, Han Y, Son HJ, Yun YS, Song JY. Antimutagenic effect of polysaccharide ginsan extracted from *Panax ginseng*. *Food Chem Toxicol* 2006;44:517-21.

- [17] Subramanian M, Chintalwar GJ, Chattopadhyay S. Antioxidant and radioprotective properties of an *Ocimum sanctum* polysaccharide. *Redox Rep* 2005;10:257-64.
- [18] Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 2003;4:410-5.
- [19] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-911.
- [20] Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-52.
- [21] Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4974-8.
- [22] Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 2003;22:8568-80.

VI. 적 요

Fucoidan은 갈색조류의 일종인 *Fucus vesiculosus*로부터 추출된 황화다당류이며 hematopoietic progenitor cell의 이동을 포함한 다양한 생리활성효과를 가지고 있다. 최근 연구에서 fucoidan은 수지상세포의 항원제시기능을 자극하는 사실을 보여 주었다. 이번 연구에서는 조혈 및 면역계의 주요한 세포공급원인 골수세포에 대해 fucoidan의 방사선방어효과를 조사하였다. Fucoidan의 효과를 측정하기 위해 세포생존율과 다양한 면역반응이 이용되었다. 생존율분석에서 fucoidan은 유의하게 골수세포의 생존율을 증가시켰다. 유세포분석의 결과에 근거하면 fucoidan이 처리된 골수세포의 생존율 증가는 방사선조사에 의해 유도된 세포사멸과정의 억제에 기인한 것으로 보인다. 더욱이 fucoidan은 골수세포에서 생산되는 면역관련 싸이토카인의 생산을 변화시키고 allogeneic 비장세포의 성장을 촉진시켰다. 종합하면 이번 연구는 fucoidan이 세포의 생존율과 면역반응성 측면에서 골수세포에 대한 방사선 방어효과가 있다는 사실을 보여 주었다. 이러한 결과는 가치있는 학술정보를 제공하고 방사선 관련분야에서 유용할 것으로 보인다.

Key words; fucoidan, radioprotection, bone marrow cells, immunoreactivity

감사의 글

대학원 졸업을 앞두고 많은 지도와 도움을 주셨던 유은숙 교수님, 논문을 정성껏 심사해 주신 강희경 교수님, 현진원 교수님, 주홍구 교수님과 학위과정 동안 가르침을 주셨던 조문제 교수님과 은수용 교수님께 깊이 감사 드립니다.

항상 음으로 양으로 도움을 주었던 약리실 이해자 박사님, 경진씨, 선순씨, 은진씨, 상철씨, 정일씨, 재희씨, 민경씨, 혜진씨에게 감사의 마음을 전합니다.

실험하면서 즐거움을 함께 했던 미형이에게도 고마운 마음을 전합니다.

자상하게 옆에서 지켜 봐주던 남편과 학위를 마치느라 잘 돌봐주지 못해서 항상 미안했던 귀여운 아들 다인, 다빈에게 진심으로 사랑을 전합니다.