

벵쿨은잎 투여가 방사선 조사 흰쥐에 미치는 영향

김정태 · 김희철 · 신태균*

제주대학교 생명자원과학대학 수의학과
제주대학교 방사선응용과학연구소

*690-756 제주도 제주시 제주대학로 66번지
제주대학교 생명자원과학대학 수의학과
전화: 064-754-3363
Fax: 064-756-3354
E-mail: shint@cheju.ac.kr

Effect of Ethanol Extract of *Callophyllis japonica* in Rats with Irradiation

Jeongtae Kim, Heechul Kim and Taekyun Shin*

Department of Veterinary Medicine and
Applied Radiological Science Research
Institute, Cheju National University, Jeju
690-756, Republic of Korea

ABSTRACT

The radioprotective activity of the red seaweed *Callophyllis japonica* (*C. japonica*) was investigated in rats with whole-body exposure of gamma-radiation. An ethanol extract isolated from *C. japonica* was used. Rats were divided into four equal groups. One day before radiation, groups I and II were treated (intraperitoneal injection) with 100 mg/kg *C. japonica*, while groups III and IV received saline. One day later, groups II and IV were exposed to 5.0 or 15.0 Gy whole-body ionizing radiation in a single fraction. Lipid peroxidation and apoptosis

were assessed in the liver and small intestine, respectively. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in the liver was measured in all groups, 72 hours after their exposure to radiation (5Gy). Whole-body radiation significantly increased TBARS level in the liver, while the extract significantly reduced hepatic TBARS level in irradiated rats. TUNEL reaction in the small intestine was measured in all groups, 24 hours after their exposure to radiation (15Gy). Radiation injury induced increased number of TUNEL-positive cells in the small intestine, while the number of TUNEL-positive cells was found to be decreased in irradiated rats with the treatment of *C. japonica* extract. These results suggest that *C. japonica* administration prior to radiation has a potential radioprotective role through the reduction of lipid peroxidation and cell death induced by radiation.

Keywords : Antioxidant, Apoptosis,
Callophyllis japonica, Lipid peroxidation

서 론

방사선은 인체에서 암치료를 위해 널리 사용되지만, 그에 따른 부작용이 나타난다. 특히 방사선은 조사 후 DNA손상 및 세포내에 활성산소종이 생성되며, 이들이 세포독성을 일으켜, 세포사에 이르고 더 나아가 조직괴사 등 여러 병리작용에 크게 관여한다 (Koc 등, 2003). 그 중 하나의 기전은 활성산소종이 지질과산화를 유도하여 세포손상을 일으키는 것이다 (Koc 등, 2003). 지질과산화는 지질손상의 하나의 표지로서, 일반적으로 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 함량을 측정하여 지질손상을 판정한다 (Karbownik 등, 2000). 이러한 산화적 손상에

대항하기 위하여 생체는 효과적인 항산화체계를 향상시켜야 한다. 따라서 생체 내에서 항산화능을 높이기 위한 방법으로는 항산화 효과를 가지는 식품의 섭취 혹은 항산화제제의 투여이다. 현재까지 방사선조사 후 세포 혹은 조직에서 많은 항산화제가 개발되고 있으며, 실험목적에 따라 생체내 거의 모든 장기에서 각각 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Arora 등, 2005).

벚꽃은잎(*Callophyllis japonica*)은 홍조류의 일종으로 우리나라 남해안과 제주도에 자생하며 주로 해안지역에서 식용으로 섭취되어 왔다 (강제원, 1968). 아직까지 벚꽃은잎의 약리적 효능은 알려진 바가 많지 않지만, 최근 연구에 의하면 벚꽃은잎은 산화적 손상을 받은 세포내에서 활성 산소종을 억제함으로써 항산화 기능이 밝혀지기도 하였다 (Kang 등, 2005; Park 등, 2005). 벚꽃은잎의 항산화 기능을 미루어 볼 때 벚꽃은잎의 급여가 방사선 조사에 따른 산화적 손상에 대항하여 생체 보호기능이 있을 것이라 생각되지만 아직까지 이에 대한 연구는 거의 없다.

이 연구에서는 벚꽃은잎 투여가 전신으로 방사선이 피폭된 흰쥐에서 어떤 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

벚꽃은잎 추출물

이 실험에서 사용된 시료는 제주도 서귀포시 성산리 앞바다에서 자생하는 벚꽃은잎을 구입하여 증류수에 여러 번 씻어 염분을 제거하고 에탄올을 첨가하여 실온에서 3시간동안 추출하였다. 그런 다음 에탄올 추출액을 진공농축기에서 농축하였다.

실험동물 및 방사선조사

수컷 5-6주령의 Sprague-Dawley 흰쥐를 중앙실험동물(서울)로부터 분양 받아 표준사육방법으로 사육하였다. 랫트는 총 4군으로 나누었다. 대조군은 saline만 투여하였으며, 실험군은 벚꽃은잎 추출물 100 mg/kg 투여군, Saline 투여 후 방사선 전신 조사군, 벚꽃은잎 추출물 100 mg/kg 투

여 후 방사선 전신 조사군으로 나누었다.

방사선 조사군은 방사선 조사 24시간 전에 각각 saline, 벚꽃은잎 추출물을 100 mg/kg 1회 복강내 투여하였고, chloral hydrate (375 mg/kg)를 복강내 주사하여 마취 후, 방사선 조사기 (Theratron-780 teletherapy unit)를 사용하여 실험목적에 따라 ^{60}Co 감마선 5 Gy 또는 15 Gy로 각각 1회 전신 조사하였다.

조직표본 준비와 조직 검사

소장조직 채취는 전신 15 Gy 방사선 조사 후 24시간째에 희생하여 각 4마리씩 ether로 마취후 희생시켜 소장을 채취하였으며 통상적인 방법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 고정된 조직은 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5 μm 의 두께로 조직 절편을 만들어 H-E염색을 실시하였다.

간 조직 채취는 전신 5 Gy 방사선 조사후 72 시간째에 희생하여 각 4마리씩 ether로 마취하여 희생시켜 간을 채취하여 지질과산화물을 측정하였다.

Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated d-Uridine 5' triphosphate Nick End Labelling (TUNEL) assay

TUNEL assay는 ApopTag *in situ* apoptosis detection kit (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 사용하였다. 먼저 실험군과 대조군의 소장 조직절편 파라핀을 제거하고, proteinase K로 세포막의 투과성을 증대시킨 후 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H_2O_2 가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰다. 세포의 oligonucleosome 크기로 분절된 DNA fragment의 끝에 digoxigenin-dUTP를 연결한 후 anti-digoxigenin-peroxidase conjugate를 처리하였다. 발색은 diaminobenzadine substrate kit (Vector, Burlingame, CA, USA)을 이용하였고, 반응이 끝난 슬라이드는 에탄올과 크실렌을 이용하여 탈수와 투명화 과정을 걸쳐서 봉입하여 광학현미경으로 TUNEL 양성세포를 세어 각 그룹간 비교하였다.

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

적출된 간 1 g을 1.15% KCl 완충액 9 ml에 넣은 후, glass homogenizer로 균질화하고 8겹의 거즈를 통과하였다 (Ko 등, 2005). 여과한 균질액 0.5 ml과 1% H₃PO₄ 3 ml, 그리고 0.6% thiobarbituric acid 1 ml을 혼합하여 100℃에서 45분간 반응시켰다. 이 반응액을 실온에서 냉각시켜 n-butanol 3 ml을 넣어 혼합 후, 3000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여, 상층액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 이때 측정값은 표준물질인 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma, St. Louis, MO, US)으로 표준곡선을 작성한 뒤 비교 정량하였다.

통계처리

본 연구의 실험결과는 *post-hoc* Student-Newman-Keuls의 다중 비교 방법을 이용하여 유의성을 검정하였다.

결 과

소장의 TUNEL 결과

Saline을 투여한 정상 환경의 소장에서 TUNEL 반응은 일부 상피세포에서 관찰되었다 (Fig. 1A) (양성세포 수: 32.33 ± 5.78). Saline 투여 후 15Gy 방사선 조사군의 소장에서 TUNEL 반응은 정상 대조군보다 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B) (양성세포 수: 139.67 ± 6.74; p<0.05). 벚붉은잎만 투여한 환경의 소장에서 TUNEL 반응은 정상 대조군과 큰 차이를 보이지 않았고 (Fig. 1C) (양성세포 수: 24 ± 2.88), 벚붉은잎을 투여 후 방사선을 조사한 군에서 TUNEL 반응은 정상 대조군보다 증가하였지만 (Fig. 1D), saline 투여한 방사선 조사군보다 유의적으로 TUNEL 반응이 감소한 것을 확인할 수 있었다 (양성세포 수: 70.66 ± 12.81; p<0.05) (Fig. 2). 이는 벚붉은잎 투여가 방사선 조사후 나타나는 소장 상피세포의 자연사를 억제하는 것으로 여겨진다.

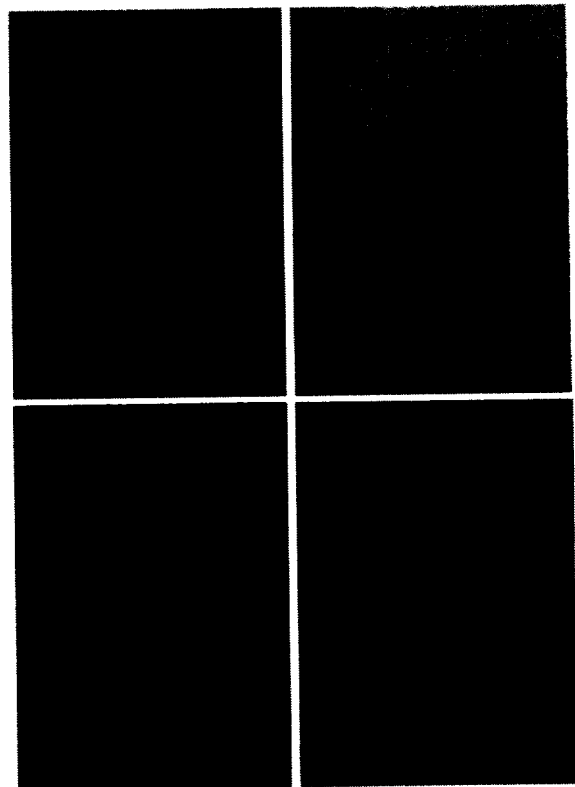


Figure 1. TUNEL reaction in the small intestine of the sham control (A), extract of *Callophyllis japonica*-treated (C), radiation treated (B), and radiation plus extract of *Callophyllis japonica*-treated (D). Arrows indicate TUNEL-positive cells. Scale bars = 80 μm.

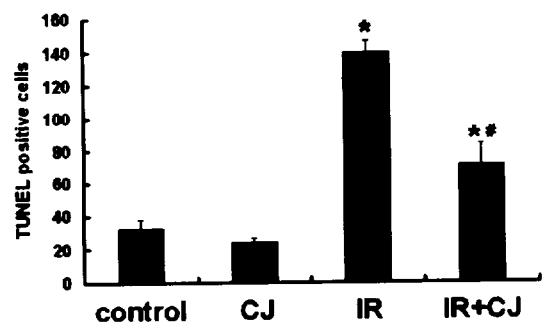


Figure 2. The summary of TUNEL positive cells in the small intestine 24 hours after exposure of rats to ionizing (IR) and/or pretreated with extract of *Callophyllis japonica*. Each group consisted of four rats. *p<0.05, compared to the sham control group. #p<0.05, compared to the radiation-only group.

간의 지질과산화물 (TBARS) 함량

Saline을 투여한 정상 흰쥐의 간에서 TBARS 함량을 측정된 결과 $22.48 \pm 5.08 \mu\text{M}/\text{mg}$ 이었다. Saline을 투여하고 방사선 조사한 간에서 TBARS 함량은 142.42 ± 11.13 으로 saline 투여한 정상 대조군보다 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 뽕잎을 투여하고 방사선 조사한 간에서 TBARS 함량은 73.18 ± 22.86 으로 정상 대조군보다 증가된 경향이 있었지만, saline을 투여한 방사선 조사군보다 유의적으로 함량이 적었다 ($p < 0.05$). 이는 뽕잎 투여가 방사선 조사 후 나타나는 간 조직내 지질과산화를 방어하는 것으로 여겨진다 (Fig. 3).

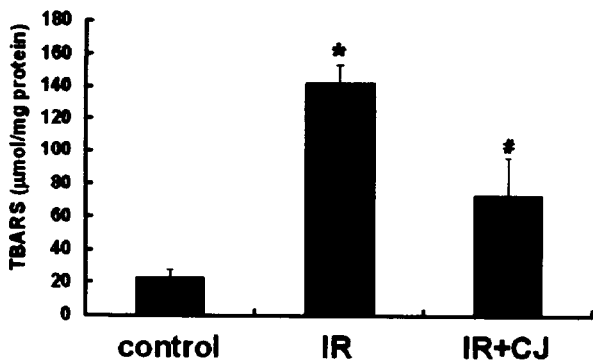


Figure 3. TBARS levels in the liver collected 72 hours after exposure of rats to ionizing (IR) and/or pretreated with extract of *Callophyllis japonica*. Each group consisted of four rats. * $p < 0.05$, compared to the sham control group. # $p < 0.05$, compared to the radiation-only group

고찰

방사선은 인체에서 암치료를 위해 널리 사용되지만, 방사선 조사 후 DNA손상 및 세포내에 활성산소종이 생성되고, 이들이 세포독성을 일으키며, 세포사에 이르고 더 나아가 조직괴사 등 여러 병리작용에 크게 관여한다 (Koc 등, 2003). 특히 방사선 조사에 의해 세포에서 활성산소종이 지질과산화를 유도하여 손상을 받는다 (Koc 등

2003). 아직까지 방사선에 대한 효과적인 방어제가 개발되지 않아 여러 후보물질들에 대한 평가가 계속되고 있다 (Arora 등, 2005).

지금까지 방사선 방어기능에 대해 조사된 식물은 병풀 (피박이풀; *Centella asiatica*) (Shobi 등, 2001), 징코 벨로바 (은행잎 추출물 + 빈포세틴; *Ginko biloba*) (Hannequin 등, 1986), 갈매보리수나무 (비타민나무; *Hippophae rhamnoides*) (Goel 등, 2003), 박하 (페퍼민트; *Mentha piperita*) (Samarth 등, 2003), 홀리 바질 (툴라시; *Ocimum sanctum*; Holy basil; Tulasi) (Ganasoundari 등, 1995), 인삼 (*Panax ginseng*) (Kim 등, 2001), 포도필럼 (메이애플; *Podophyllum hexandrum* Royale; Himalayan Mayapple) (Salin 등, 2001), 그리고 마카부하이 (*Tinospora cordifolia*) (Goel 등, 2002) 등이 있다 (Arora 등, 2005). 이상 식물의 수용성 또는 에탄올 추출물은 방사선을 조사한 생쥐 또는 흰쥐에서 증식세포의 자연사억제, 조혈기능 촉진, 체중감소·식욕저하 억제, 혈관 보호기능, 세포기능 유지와 생존률 향상의 효과를 나타냈다 (Arora 등, 2005).

본 연구에서는 항산화기능이 밝혀진 뽕잎이 방사선 손상에 어떻게 작용하는 알아보고자 뽕잎 투여 후 방사선 조사 후 소장과 간조직에서 TUNEL반응과 TBARS 함량을 관찰하였다. Saline을 투여하고 방사선을 조사한 소장에서 TUNEL 반응은 소장 상피세포에서 정상 대조군보다 유의적으로 증가하였고, 뽕잎 투여에 의해 TUNEL 반응이 감소한 것을 알 수 있었다. 또한 saline을 투여하고 방사선을 조사한 간 조직내 TBARS의 함량은 정상 대조군보다 유의적으로 증가하였고, 뽕잎 투여에 의해 TBARS의 함량이 감소한 것을 알 수 있었다. 따라서, 뽕잎 투여는 방사선 조사에 나타나는 세포내 DNA손상과 지질과산화를 억제시킴으로서, 뽕잎은 방사선 조사에 의한 세포 손상을 막을 수 있는 물질이라고 생각되어 진다.

감사의 글: 본 연구는 제주대학교 방사선응용과학연구소의 연구비 지원에 의해 수행된 결과입니다.

참 고 문 헌

- 강제원. 한국동식물도감 식물편 (해조류). 1968, 8, 249.
- 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.
- Ganasoundari A, Uma Devi P, Rao MNA. Protection against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow by *Ocimum sanctum*. *Mutat. Res.* 1997, 373, 271-276.
- Goel HC, Prem Kumar I, Rana SVS. Free radical scavenging potential of *Tinospora cordifolia*, a possible role in radioprotection. *Indian J. Exp. Biol.* 2002, 40, 727-734.
- Goel HC, Salin CA, Prakash H. Protection of jejunal crypts by RH-3 (a preparation of *Hippophae rhamnoides*) against lethal whole body gamma irradiation. *Phytother. Res.* 2003, 17, 222-226.
- Hannequin D, Thibert A, Vaschalde Y. Development of a model to study the anti-oedema properties of *Ginkgo biloba* extract. *Press Med.* 1986, 15, 1575-1576.
- Kang KA, Bu HD, Park DS, Go GM, Jee Y, Shin T, Hyun JW. Antioxidant Activity of Ethanol Extract of *Callophyllis japonica*. *Phytother. Res.* 2005, 19, 506-510.
- Karbownik M, Reiter RJ, Qi W, Garcia JJ, Tan DX, Manchester LC, Vijayalaxmi. Protective effects of melatonin against oxidation of guanine bases in DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. *Mol. Cell Biochem.* 2000, 211, 137-144.
- Kim SH, Son CH, Nah SY, Jo SK, Byun MW, Shin DH. Modification of radiation response in mice by *Panax ginseng* and diethyldithiocarbamate. *In Vivo.* 2001, 15, 407-411.
- Koc M, Taysi S, Buyukokuroglu ME, Bakan N. Melatonin protects rat liver against irradiation-induced oxidative injury. *J. Radiat. Res.* 2003, 44, 211-215.
- Ko JH, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* NAKAI protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in the mouse. *J Pharmacol Sci.* 2006, 101, 205-213.
- Miura Y. Oxidative stress, Radiation-Adaptive responses, and aging. *J. Radiat. Res.* 2004, 45, 357-372.
- Park DS, Lee KH, Kim H, Ahn, M, Moon C, Ko MS, Lee KK, Go GM, Shin T. Effects of *Callophyllis japonica* powder on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 2005, 5, 231-235.
- Salin CA, Samanta N, Goel HC. Protection of mouse jejunum against irradiation by *Podophyllum hexandrum*. *Phytomedicine.* 2001, 8, 413-422.
- Samarth RM, Kumar A. *Mentha piperita* (Linn.) leaf extract provides protection against radiation induced chromosomal damage in bone marrow of mice. *Indian J. Exp. Biol.* 2003, 41, 229-237.
- Shobi V, Goel HC. Protection against radiation-induced conditioned taste aversion by *Centella asiatica*. *Physiol. Behavior.* 2001, 73, 19-23.