2002 추계학술발표회 논문집
한국원자력학회

방사선 피폭 생쥐에서 생약복합조성물(HemoHIM)에 의한 조혈모세포 방호 효과

Protection of Mouse Hematopoietic Stem Cells by a Preparation of Herb Mixture (HemoHIM) against Whole Body Irradiation

정우희, 박혜란, 오헌, 정일윤, 조성기*
한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

요 약

방사선에 의한 위장관 및 조혈면역계의 장해를 동시에 극복하기 위하여 당귀 등 3가지 생약재로부터 생약복합조성물(HemoHIM)을 제조하였다. 본 연구에서는 방사선 피폭 생쥐에서 HemoHIM의 조혈모세포 방호 효과와 그 기전을 알아보고자 하였다. 방사선 피폭 생쥐에서 HemoHIM 투여에 의하여 비장내 조혈세포 집락의 형성이 유의적으로 증가하였으며, 골수세포의 계획세포사가 크게 감소하였다. 이러한 조혈모세포 방호의 기작을 살펴보기 위하여 cytokine의 발현을 조사한 결과, 배양된 복강대식세포와 골수세포에서 HemoHIM처리에 의하여 IL-1β, TNF-α, SCF, IL-6 등의 cytokine이 증가하였으며, 생쥐에 HemoHIM을 투여하였을 경우에는 비장세포에서 IL-1β, TNF-α의 발현이 증가함을 관찰하였다. 조혈모세포 방호의 다른 기전으로서 라디칼 소거활성을 살펴본 결과, HemoHIM이 DPPH 라디칼과 hydroxyl radical을 직접적으로 소거하는 활성을 나타내었다. 이상의 결과로부터 HemoHIM은 조혈모세포 방호효과가 있음이 확인되었으며, 이러한 효과는 방사선 방호반응을 유도하는 cytokine의 발현의 증가와 방사선에 의해 형성된 라디칼 소거를 통한 복합적 작용으로 나타나는 것으로 사료된다.

ABSTRACT

A preparation of herb mixture (HemoHIM) was designed from three medicinal herbs including Angelica gigantis Radix to protect gastrointestine, hematopoietic organs and immune system against radiation damage. In the present study, we investigated the radioprotective effects of HemoHIM on hematopoietic stem cells in γ-irradiated mice and the underlying mechanisms. The administration of HemoHIM significantly increased the formation of endogenous spleen colony and reduced apoptosis of bone marrow cells in γ-irradiated mice. These results showed that HemoHIM protected hematopoietic stem cells from irradiation. To investigate the mechanism of the protection, the effects of HemoHIM on expression of radioprotective cytokines was examined. HemoHIM increased the mRNA levels of IL-1β, TNF-α, SCF and IL-6 in bone marrow cells and peritoneal macrophages *in vitro*. *In vivo* administration of HemoHIM increased the mRNA levels of IL-1β, TNF-α in spleen. The examination of radical scavenging activity of HemoHIM as another mechanism revealed that HemoHIM was effective at scavenging DPPH radicals and hydroxyl radicals. From these results, it is suggested that HemoHIM exerts these radioprotective effects through the induction of radioprotective cytokines and/or through directly scavenging radicals produced by γ-irradiation.

* *Corresponding author*

1. 서 론

방사선 및 방사성 동위원소의 의학 및 산업적 이용과 원자력 시설의 이용이 증가되고 있다. 이에 따라 방사선 이용에 수반되는 부작용 또는 방사선 피폭 사고에 의해 발생되는 생체장해에 대한 관심도가 높아지고 있으며 방사선 피폭에 의한 생체 손상의 예방 및 경감을 위한 방호제의 개발이 중요한 문제로 대두되고 있다.

방사선 방호제에 대한 연구는 1949년 Patt 등(1)에 의해 cysteine의 방호효과가 최초로 보고된 이래 주로 thiol 복합체를 중심으로 한 합성물질들이 연구의 대상이 되었으며 그 후 interleukin-1, tumor necrosis factor와 같은 면역조절물질, granulocyte colony-stimulating factor 등의 조혈 인자에 대한 연구가 수행되었다(2-6). 이러한 물질들은 유효용량에 수반되는 강한 독성 또는 미미한 효과에도 불구하고 암의 방사선치료 분야 등에 적용할 목적으로 연구되고 있다(7, 8).

최근 방사선생체반응에 미치는 천연물의 효과에 대한 연구가 관심의 대상이 되고 있으며, 이와 같은 관점에서 생약재의 방사선 방호효과도 다수의 연구가 진행되고 있다. 그러나 대부분 한가지 생약에 관한 연구가 주를 이루고 있다(9-14). 그러나 한의학의 처방이 대부분 합방이라는 측면에서 볼 때 복합처방제 및 생약 혼합물의 방사선 방호효과에 대한 연구가 더 큰 의미가 있다고 사료된다.

본 연구에서는 방사선 장해에 있어서 위장관 점막, 조혈·면역계 조직 등 빠르게 재생하는 조직이 민감하며, 그 장해 및 회복 기작도 조직의 종류별로 서로 다르다는 점에 주목하여, 방사선 장해를 종합적으로 극복할 수 있는 생약복합조성물을 개발하고자 하였다. 한의학의 보기·보혈 탕제에 사용되는 생약재들을 대상으로(15, 16) 방사선 조사 마우스에서 장관 점막 하의 원줄기세포 생존, 골수 조혈모세포 생존 및 면역세포 활성화 등의 실험결과를 바탕으로 당귀 등 3종의 생약재로부터 생약복합조성물(HemoHIM)을 도출하였다. 본 실험에서는 HemoHIM의 방사선 방호 효과를 검증하기 위한 일환으로서, 방사선 피폭 시에 나타나는 조혈계 세포 장해 극복 효과 및 그 기작을 알아보기 위하여 방사선을 조사한 생쥐에서 비장내 조혈세포집락 형성, 조혈계 세포의 계획세포사, 조혈계세포의 방사선 방호에 관여하는 cytokine 발현에 미치는 영향, 그리고 시험관내에서 자유 라디칼을 직접적으로 소거하는 활성을 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험동물

실험에 사용한 ICR 및 C57BL/6 생쥐는 한국 대한실험동물센터에서 번식 사육한 특정병원체 부재(SPF) 생쥐를 구입하여 사용하였다. 생쥐 사육실은 온도가 22±2°C, 습도가 55~60%로 유지되며 명암 순환이 12시간 단위로 조절되는 환경이 되게 하였으며, 고형사료와 물을 제한 없이 공급하였다.

2.2 시료제조

동량의 3가지 생약재 (당귀(Angelica gigantis Radix) 등)를 혼합하여 증류수로 열수 추출한 뒤 고형분을 제거하고 감압·농축시켜 열수추출물을 얻었다. 총 열수추출물의 절반으로부터 ethanol-insoluble fraction(조다당 분획)을 제조하여, 나머지 절반의 열수추출물에 첨가하여 제조한 조성물을 HemoHIM이라 하고 시료로 사용하였다.

2.3 실험동물의 방사선 조사

동물에 대한 방사선 조사는 한국원자력연구소 소재 Co-60 감마선 조사시설을 이용하여 비장내 조혈세포 집락 형성 실험에서는 6.5 Gy, cytokine 발현 및 조혈세포 사멸 실험에서는 5 Gy의 감마선을 선량율 1.0 Gy/분으로 전신 조사하였다.

2.4 세포 배양

비장세포 및 골수세포의 배양은 RPMI 1640 (GIBCO) 배지에 20 mM HEPES buffer, 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 20 μM 2-mercaptoethanol 및 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin을 첨가한 완전배양액을 사용하여 37°C, 5% CO_2를 포함한 humidified 대기 조건의 배양기에서 수행하였다.

2.5 비장내 조혈세포 집락 형성 시험

8주령의 웅성 ICR 생쥐를 실험군 당 8~9마리로 하고, 방사선 조사 대조군과 시료병행 투여군으로 구분하였다. 시료양에 따른 효과를 보기 위하여 생쥐 마리당 시료를 0.5, 1.0 및 2.0 mg의 용량으로 방사선 조사 전 36시간과 12시간에 2회 복강 내로 주사하였다. 방사선 조사 후처리 효과를 살펴보기 위하여 방사선 조사후 30분과 24시간 후에 생쥐 마리당 2.0 mg의 시료를 복강내 주사하였다. 방사선 조사 후 9일에 각 실험군의 생쥐를 희생시켜 비장을 채취하여 Bouin 고정액에 2일간 고정하고 표면에 형성된 조혈세포 집락을 실체현미경으로 관찰하였다.

2.6 비장세포, 흉선세포, 골수세포 및 복강내 대식세포의 분리

생쥐를 경추 탈골로 희생시킨 다음 70% ethanol로 복부를 소독한 후 비장 및 흉선을 무균적으로 적출하여 멸균된 Hank's balanced salt solution(HBSS; GIBCO)이 담긴 petri-dish에서 세척 후, 5% FBS-HBSS가 담긴 petri-dish로 옮겨, 멸균된 수술용 칼로 칼집을 낸 뒤 핀셋으로 지분거려 세포를 부유시킨 후 약 1분간 정치시켜 조직파편을 제거한 후 1500 rpm에서 10분간 원심침전 시켰다. 비장세포의 경우, 혼입된 적혈구를 제거하기 위하여 cell pellet을 ACK buffer (Tris-NH4Cl)에 현탁하여 1분간 정치한 뒤 FBS 10ml을 첨가하고 HBSS로 2회 세척하였다. 골수세포를 분리하기 위해서 생쥐를 희생시킨 다음, 분리한 대퇴골 내부를 주사기를 이용하여 5% FBS-HBSS로 씻어내어 골수세포를 무균적으로 채취하였다. 복강대식세포는 생쥐의 복강내로 HBSS를 주사하고 복부를 주무른 후, 다시 주사기로 복강내의 HBSS를 수거한 후, 원심분리를 통해 대식세포를 수거하여 사용하였다.

2.8 DNA 분절화 현상 및 계획세포사 측정

C57BL/6 생쥐에 방사선을 조사(5 Gy)하기 5, 4, 3, 1.5, 1 일 전과 30 분 후에 HemoHIM 을 복강내에 (300mg/kg B.W.) 투여하였으며, 방사선 조사 4 시간 후에 비장, 흉선, 골수세포를 위에서 기술한 바와 같이 분리하여 DNA 분절화와 계획세포사 측정에 사용하였다. DNA 분절화를 측정하기 위하여 분리된 세포내의 분절된 DNA 를 Duke 등의 방법(17)에 따라 분리하여, 1.8% agarose gel 에서 전기영동한 후, EtBr 로 염색하여 관찰하였다. PI 염색법에 의한 계획세포사 측정을 위해 분리된 세포들을 70% 에탄올 용액에 부유시킨 후 -20°C 에서 1 시간 동안 방치하였다. 그 후 세포들을 PBS 로 2 번 세척한 후, PI (50 μg/ml)와 RNaseA(50 μg/ml)를 포함한 PBS 500 μl 에 세포를 부유시킨 후 빛을 차단하여 실온에 30 분간 방치하여 염색하였다. 염색된 세포를 Coulter 사의 Flow

cytometer 에서 이용하여 sub-diploid 세포의 비율을 측정함으로써 계획세포사가 일어나는 세포의 비율을 측정하였다.

2.9 RT-PCR에 의한 cytokine mRNA양의 변화 측정

시험관내에서 HemoHIM 이 대식세포와 골수세포의 cytokine mRNA 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 C57BL/6 생쥐에서 분리한 골수세포와 대식세포를 각각 5×10^6 cells/ml 과 2.5×10^6 cells/ml 의 농도로 RPMI 완전배양액에 희석시킨 후, HemoHIM 을 각각 0.3 과 0.1 mg/ml 의 농도로 처리하였다. 골수세포의 경우에는 0, 3, 6, 12, 24 시간, 대식세포의 경우에는 0, 4, 8 시간 후에 세포를 수거하여 PBS 로 씻어준 후, RNA SolB 를 이용하여 total RNA 를 추출하였다. Total RNA 로부터 MMLV-reverse transcriptase 를 이용하여 reverse transcription 을 한 후, Taq polymerase 를 이용하여 PCR 을 수행하였다. 각각의 cytokine 의 PCR 에 사용한 primer 는 다음과 같다. β-actin, sense, 5' - GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA –3' , antisense 5' - CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC –3' ; IL-1β, sense 5' - AAG CTC TCC ACC TCA ATG GA –3' , antisense 5' - TGC TTG AGA GGT GCT GAT GT –3' ; TNF-α, sense 5' -GCG ACG TGG AAC TGG CAG AAG-3' , antisense 5' -TCC ATG CCG TTG GCC AGG AGG-3' ; Stem cell factor (SCF), sense 5' -GCT ACC CAA TGC TGG GAC TA-3' , antisense 5' -GGC CTC TTC GGA GAT TCT TT-3' ; IL-6, sense 5' -TGG AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA G-3' , antisense 5' -TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCA C-3' .

2.10 자유라디칼 소거능

자유라디칼 소거능은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma)에 대한 라디칼 소거능으로서 측정하였다. 메탄올에 녹아있는 0.15 mM DPPH 용액 600 ㎕에 시료를 최종 농도가 50, 100, 200 및 400 ㎍/ml가 되도록 각각 가한 후 methanol 용액을 가하여 최종 부피를 3 ml로 만들었다. 이를 vortex mixer로 10초간 진탕하여 잘 섞은 후 520nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 DPPH 자유기의 소거 활성을 산정하였다.

Radical scavenging activity (%) = $\{(OD_{control} - OD_{sample})/OD_{control}\} \times 100$

Hydroxyl radical 소거 활성은 2-deoxyribose oxidation method (18)로 측정하였다. 시험관에서 0.1 mM $FeSO_4$/EDTA 용액 0.2 ml, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 ml 각기 다른 농도의 시료액 0.2 ml과 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.2 ml을 가하고, 10 mM H_2O_2 0.2 ml을 가하여 반응을 개시시켰다. 37°C 수조에서 4시간 반응시킨 후, 2.8% trichloroacetic acid 용액 1 ml을 가하여 반응을 중지시키고, 1% 2-thiobarbituric acid 용액 1 ml을 가하여 95°C에서 10분간 중탕한 후 냉각하였다. 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고, 다음과 같은 수식을 통하여 hydroxyl radical 소거활성을 구하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거 활성 (\%)} = \left(1 - \frac{Ab_s - Ab_o}{Ab_c - Ab_o}\right) \times 100$$

Ab_o: H_2O_2와 시료 모두 처리하지 않은 음성 대조군의 흡광도

Ab_c: H_2O_2만 처리하고 시료 처리하지 않은 양성 대조군의 흡광도

Ab_s: H_2O_2와 시료 모두 처리한 실험군의 흡광도

3. 결과

3.1 방사선 피폭에 대한 조혈모세포의 방호효과

방사선 피폭 생쥐에서 HemoHIM에 의한 조혈모세포 방호효과는 비장내 조혈세포 집락형성을 통해 살펴보았다 (Table I). 용량별 효능시험에서는 생쥐 마리당 0.5 mg과 1.0mg 복강내 주사군에서 비장내 집락수의 유의성있는 증가 효과가 나타났다 (Table I, experiment 1). 투여시기에 따른 효능시험에서는 방사선 조사전과 조사후 투여군에서 모두 유의성 있는 증가효과를 관찰하였다 (Table I, experiment 2).

3.2 방사선 조사에 의한 조혈 및 면역 세포의 계획세포사 억제효과

방사선 피폭에 의한 조혈 및 면역세포의 계획세포사에 HemoHIM이 미치는 영향을 살펴보았다. DNA 전기영동법으로 계획세포사의 특징인 DNA 분절화를 살펴본 결과 방사선에 피복된 생쥐의 비장, 흉선, 골수세포 모두에서 분절화된 DNA의 양이 크게 증가하였다 (Fig. 1A). HemoHIM을 투여한 경우, 비장과 흉선의 DNA 분절화에는 영향이 없었으나, 골수세포의 DNA 분절화는 크게 억제시켰다(Fig. 1A). PI 염색법으로 비장, 흉선, 골수 세포의 계획세포사의 관찰한 경우에도 HemoHIM이 골수세포의 계획세포사를 크게 억제하였으나, 비장 및 흉선 세포의 계획세포사에는 큰 영향을 미치지 않았다(Fig. 1B).

3.3 Cytokine 발현에 미치는 영향

방사선으로부터 조혈모 세포를 방호하는 것으로 알려진 cytokine들의 발현에 HemoHIM이 미치는 영향을 살펴보았다. 먼저 생쥐로부터 분리한 대식세포와 골수세포를 배양하면서 HemoHIM을 첨가하였을 때의 cytokine 발현 양상을 시간별로 살펴보았다(Fig. 2). 대식세포에 HemoHIM을 처리한지 4시간 후에 IL-1β와 IL-6의 발현이 크게 증가하였으며, 8시간 후에도 유지되었다(Fig. 2A). 골수세포에는 3시간 후에 IL-1β, TNF-α, stem cell factor(SCF)의 발현이 증가하였으나, 6시간 이후에는 다시 대조군 수준으로 감소하였다(Fig. 2B). HemoHIM과 방사선 조사가 생쥐의 생체내에서의 cytokine의 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과, HemoHIM을 투여한 생쥐의 비장세포에서 IL-1β와 TNF-α의 발현이 증가하였다(Fig. 3). 골수세포에서는 IL-1β, TNF-α, SCF 모두 HemoHIM 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

3.3 라디칼 소거활성

방사선으로부터 조혈모 세포를 방호하는 다른 기작으로서 HemoHIM 및 그 분획이 라디칼을 직접적으로 소거하는 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼의 소거활성에서는 HemoHIM 및 그 분획들 모두 소거활성을 나타냈으며, ethanol 분획> methanol 분획> water 분획> polysaccharide 분획> HemoHIM의 순으로 강하게 관찰되었다(Fig. 4A). Hydroxyl radical 소거활성에서도 HemoHIM 및 각 분획의 활성이 관찰되었으며, HemoHIM> water 분획= methanol 분획> ethanol 분획> polysaccharide 분획의 순으로 활성이 강하게 나타났다(Fig. 4B).

4. 고찰

방사선 증감제 및 방호제는 암치료를 위한 방사선 요법시 효과증대 및 부작용 경감 목적으로 연구되어 왔으나, 정상세포에 대한 심한 독성 때문에 임상적 이용에는 한계를 보였다. 생약과 같은 천연물들은 독성이 적고 특별한 부작용을 나타내지 않으며, 각종 질병이나 상해 회복에 효과적이다. 따라서 방사선장해를 예방 또는 경감시키는 효과를 가진 천연물이 탐색되어 왔다. 단일생약재에 의한 방사선 방호 연구에서는 인삼을 비롯하여 당귀, 천궁, 영지, 가시오가피, 만삼,

자리공 및 황기 등의 효과가 보고되었으며〔10-14, 19-21〕, 탕제를 비롯한 한방제에 대한 연구에서 사물탕 및 사군자탕, 소시호탕, 십전대보탕, 인삼영양탕, 귀비탕 및 육미지황 등의 효과가 단편적으로 보고되고 있다〔22-26〕. 생약제제에 의한 방사선방호 효과는 조혈조직의 방호 및 회복, 면역증강 등의 관점에서 연구가 진행되고 있으며, 조혈기능의 장해극복효과에 관한 연구가 주를 이룬다.

본 연구에서는 방사선 장해로부터 재생조직과 면역·조혈계를 동시에 방호하기 위하여 당귀 등 세가지 생약복합 조성물(HemoHIM)을 개발하였으며, 본 실험결과 방사선을 조사한 생쥐에서 HemoHIM은 비장내 조혈세포 집락을 증가시켰으며, 조혈모세포들을 포함하는 골수세포의 계획세포사를 억제하였다. 이로부터 HemoHIM이 방사선 조사에 대하여 조혈모세포를 방호함을 알 수 있었다. 이러한 조혈모세포 방호의 기작을 살펴보기 위하여 방사선에 대해 조혈모세포를 방호하는 것으로 알려진 여러 가지 cytokine의 발현을 살펴본 결과, *in vitro* 혹은 *in vivo*에서 IL-1β, TNF-α, IL-6 등의 cytokine의 발현이 HemoHIM에 의해 증가되는 것을 관찰하였다. 이들 cytokine들은 면역반응의 초기에 나타나는 cytokine들로서 이들 cytokine의 발현증가는 다른 여러 종류의 cytokine의 발현을 유도하여 조혈모세포의 사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과들로부터 HemoHIM에 의한 조혈모세포 방호 효과는 부분적으로는 cytokine의 발현을 통해 이루어지는 것으로 생각된다. 반면에 본 실험에서 HemoHIM의 라디칼 소거활성도 뛰어난 것으로 나타났다. 방사선에 의한 세포 손상이 라디칼을 통하여 발생된다는 점을 고려한다면, HemoHIM에 의한 직접적인 라디칼 소거가 조혈모세포 방호에 기여할 것으로 사료된다. 따라서 HemoHIM은 면역조절과 방사선 상해 경감 등의 복합적인 작용을 통하여 방사선에 대한 방호 효과를 보이는 것으로 생각된다. 이상의 결과들로부터 생약복합조성물인 HemoHIM은 독성이 거의 없는 천연물로서 방사선장해를 종합적으로 경감시킬 수 있는 방호제로 실제 적용이 가능할 것이라고 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

Table I. Effects of HemoHIM on endogenous spleen colony formation in irradiated mice.

	Groups	Number of colonies
Experiment 1	Irradiation control (6.5 Gy)	4.75 ± 3.33
	HemoHIM (0.5 mg) + irradiation	13.00 ± 6.63*
	HemoHIM (1.0 mg) + irradiation	13.33 ± 9.47**
	HemoHIM (2.0 mg) + irradiation	10.67 ± 9.04
Experiment 2	Irradiation control (6.5 Gy)	2.50 ± 3.30
	Pre-treatment : HemoHIM (1.0 mg) + irradiation	11.33 ± 9.47*
	Post-treatment : irradiation + HemoHIM (1.0 mg)	9.11 ± 7.62*

In experiment 1, different doses of HemoHIM (0.5, 1.0, 2.0 mg/mouse.) were administered i.p. at 36 and 12 hours before irradiation (6.5 Gy). In experiment 2, HemoHIM (1.0 mg/mouse) were administered i.p. at 36 and 12 hours before irradiation for pre-treatment group and at 30 min and 24 hours after irradiation for post-treatment group. Experiment 1 and 2 were performed independently. *p<0.05, **p<0.005 (Student' s *t*-test)

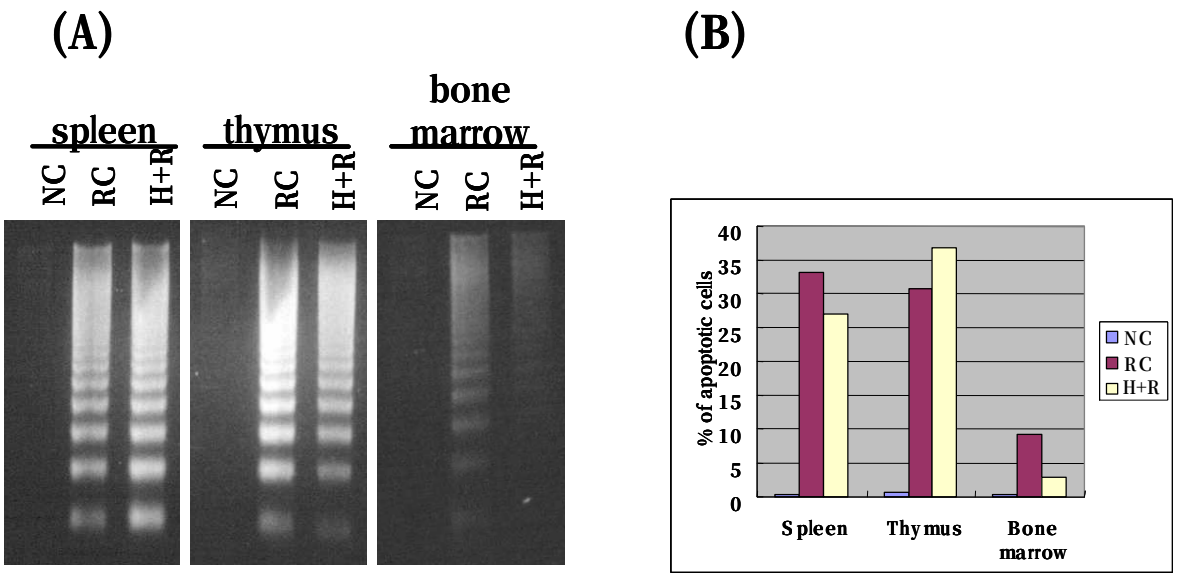

Figure 1. Effects of HemoHIM administration on radiation-induced apoptosis. C57BL/6 mice were administered with HemoHIM (300 mg/kg B.W.) 5, 4, 3, 1.5 and 1 day before and 0.5 hour after irradiation (5 Gy), and were sacrificed 4 hours after irradiation. Spleen, thymus and bone marrow cells were collected and analyzed for DNA fragmentation (A) and sub-diploid cell population (B). NC, non-treated control; RC, irradiation control; H+R, groups administered with HemoHIM before irradiation.

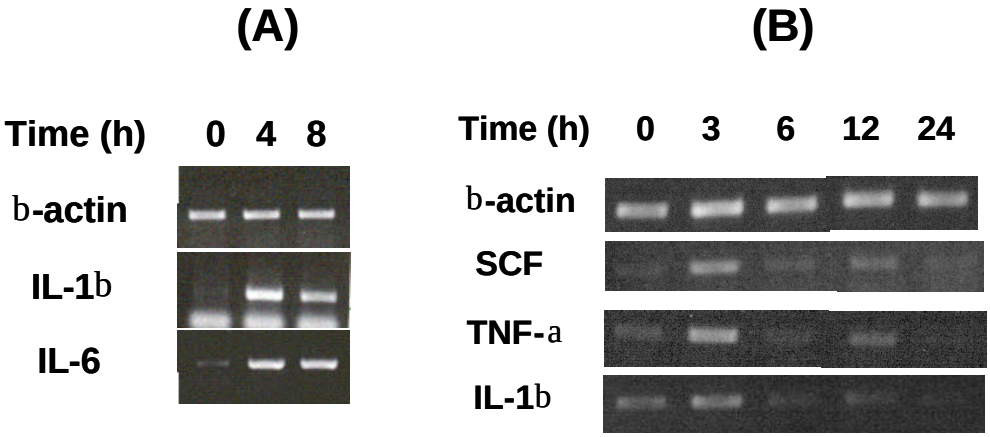

Figure 2. Effects of HemoHIM on production of cytokine mRNA *in vitro* cell culture. (A) Mouse peritoneal macrophages (2.5×10^6 cells/ml) were incubated for 0, 4 and 8 hours in the presence of 0.3 mg/ml HemoHIM. (B) Mouse bone marrow cells (5×10^6 cells/ml) were incubated for 0, 3, 6, 12 and 24 hours in the presence of 0.1 mg/ml HemoHIM. After treatments, total RNA was extracted, and mRNA levels of cytokines were analyzed by RT-PCR.

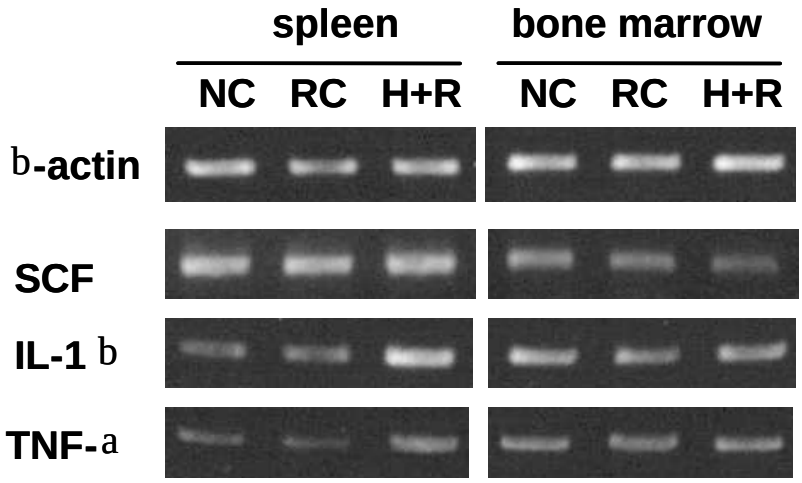

Figure 3. Effects of HemoHIM administration on cytokine mRNA levels in spleen and bone marrow cells in irradiated mice. C57BL/6 mice were administered with HemoHIM (300mg/kg B.W.) 5, 4, 3, 1.5 and 1 day before and 0.5 hour after irradiation (5 Gy) and were sacrificed 4 hours after irradiation. Spleen, thymus and bone marrow cells were collected and analyzed for cytokine mRNA level by RT-PCR. NC, non-treated control; RC, irradiation control; H+R, groups administered with HemoHIM before irradiation.

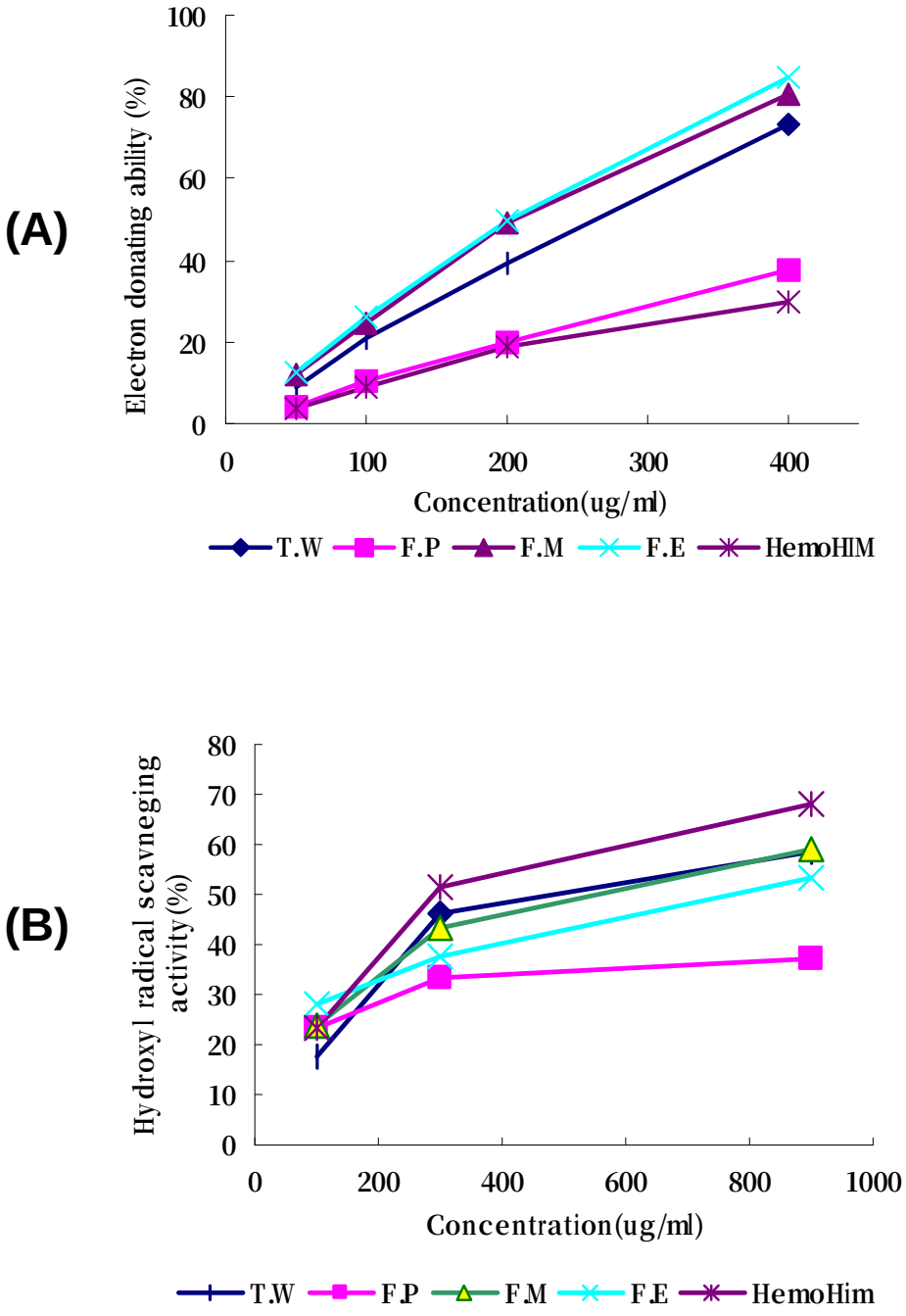

Figure 4. Radical scavenging activities of HemoHIM. Radical scavenging activities of HemoHIM against DPPH radicals (A) and hydroxyl radicals (B) were measured. T.W, total water extract; F.P, polysaccharide fraction of HemoHIM; F.M, methanol fraction of HemoHIM; F.E, ethanol fraction of HemoHIM.

5. 참고문헌

1. Patt, H., Tyree, M. and Straube, R. L. : Cystein protects against x-irradiation. *Science*, 110, 213-214 (1949).
2. Milas, L., Hunter, N. Reid, B. O. and Thames, Jr. H. D. : Protective effects of S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid against radiation damage of normal tissues and a fibrosarcoma in mice. *Cancer Res*., 42, 1888-1987 (1982).
3. Milas, L., Murray, D., Brock, W. A. and Meyn, R. E. : Radioprotectors in tumor radiotherapy: Factors and settings determining therapeutic ratio. *Pharmacol. Ther.*, 39, 179-189 (1988).
4. Neta, R., Douches, S. and Oppenheim, J. J. : Interleukin 1 is a radioprotector. *J. Immunol*., 136, 2483-2485 (1986).
5. Neta, R. : Role of cytokines in radioprotection. *Pharmacol. Ther*., 39, 261-266 (1988).
6. MacVittie, T. J., Monroy, R. L., Patchen, M. L. and Souza, L. M. : Therapeutic use of recombinant human G-CSF (rhG-CSF) in a canine model of sublethal and lethal whole body irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 723-736 (1990).
7. Washburn LC, Carlton JE, Hayes RL. Distribution of WR-2721 in normal and malignant tissue of mice and rats bearing solid tumors: dependence on tumor type, drug dose and species. *Radiat. Res.*, 59:483-575, 1974.
8. Cairnie AB. Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat. Res.*, 94:221-226, 1983.
9. Kim, S. H., Cho, C. K., Yoo, S. Y., Koh, K. H., Yun, H. G. and Kim, T. H. : *In vivo* radioprotective activity of Panax ginseng and diethyldithiocarbamate. *IN VIVO*, **7,** 467-470 (1993).
10. Mei, Q. B., Tao, J. Y. and Cui, B. : Advances in the pharmacological studies of *Radix Angelica sinensis(oliv.) Diels*(Chanese Danggui). *Chin. Med. J.*, 104, 776-781 (1991).
11. Hsu, H. Y., Lian, S. L. and Lin, C. C. : Radioprotective effect of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice. *Am. J. Chin. Med.*, **18,** 61-69 (1990).
12. Miyanomae, T. and Frindel, E. : Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus Harms* (Shigoka) administered before or after irradiation. *Exp. Hematol.*, **16,** 801-806 (1988).
13. Wang, H. B., Zheng, Q. Y., Ju, D. W. and Fang, J. : Effects of *Phytolacca acinosa* polysaccharides II on lymphocyte proliferation and colony stimulating factor production from mice splenocytes *in vitro*. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, **28**, 490-493 (1993).
14. Quan, H. X. and Li, H. S. : Effects of *radix Astragali* on hemopoiesis in irradiated mice. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, **19,** 741-743 (1994).
15. **한약위원회**, **조제지침연구소위원회** : **한약조제 지침서 해설**, **사단법인 대한약사회**(1995).
16. **약대 한약학 교재연구회** : **한약방제학**, **도서출판 정담** (1993).
17. Duke, R. C.; Chervenak, R.; Cohen, J. J. Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: an early event in cell-mediated cytolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80,** 6361–6315 (1983).
18. Chung, S.-K., Osawa, T. and Kawakishi, S. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). Biosci. Biotech. Biochem. **61**, pp. 118-123 (1997).
19. Almassy, Z., Krepinsky, A. B., Bianci A. and Koteles G. J. : The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl. Radiat. Isot.* 38, 241-249 (1987).
20. Singh, N. P., Stephens, R. E., and Schneider, E. L. : Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of ã-ray. *Int. J. Radiat Biol.*, 66, 563-569 (1995).
21. Muller, W. U. and Streffer, C. : Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Radiat Biol.*, 59, 863-873 (1991).
22. Vral, A., Thierens and de Ridder, L. : Study of dose-rate and split-dose effects on the *in vitro* micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays. Int. J. Radiat Biol., 777-784 (1992).
23. Kim, S. H., Cho C. K., Kim, T. H., Yoo, S. Y., Koh, K. H. and Yun, H. G. : Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-neutron irradiations. *Anticancer Res.*, 13, 1587-1592 (1993).
24. Collins, A. R., Ai-guo, M. and Duthie, S. J. : The kinetics of repair of oxidative DNA damage(strand break and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.*, 336, 69-77 (1995).
25. Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kermidy, G. and Stetima, R. : The comet assay: What can it really tells us? *Mutat. Res.*, 375, 183-193 (1997).
26. Andreoli, C., Leopardi, P. and Crebelli, R. : Dection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gell electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat. Res.*, 377, 95-104 (1997).