

## 생쥐에서 생약재 백작약의 방사선방호 및 조혈증진 효과

### Radioprotective and Hematopoietic Effects of Baishaoyao(Paeoniae Radix) in Mice

조성기\* · 오현 · 박혜란  
한국원자력연구소

김성호  
전남대학교 수의과대학

이성태  
순천대학교 생물학과

#### 요 약

방사선 방호 효과를 나타내는 천연물을 검색하기 위한 일환으로 한의학에서 보혈양혈 당제에 널리 사용되는 백작약(Baishaoyao, Paeoniae Radix)의 효과를 검정하였다. 생쥐에 백작약 추출물을 투여한 다음 12 Gy, 6.5 Gy, 2 Gy의 감마선을 각각 조사한 후 소장암 생존, 내재성 비장집락형성 및 apoptosis 유발 등을 관찰하였다. 백작약 투여군에서 소장암의 생존율이 증가되었고( $p < 0.0005$ ), 생존 조혈모세포에 의한 내재성 비장세포 집락의 형성이 증가되었으며( $p < 0.05$ ), apoptosis는 감소되었다( $p < 0.05$ ). 또한, 시험관 내에서 백작약 추출물은 골수세포 증식효과를 보였다. 이 결과로 보아 백작약은 방사선에 대하여 조혈모세포와 재생조직의 원줄기세포를 방호하는 것으로 사료되며, 조혈작용을 증진시키는 것으로 생각된다. 방사선 방호에 있어 원줄기세포 방호뿐만 아니라 조혈기능 장애 극복도 중요한 문제이다. 이런 관점에서 백작약은 독성이 거의 없는 천연물로서, 아주 좋은 방사선 방호제로 실제 적용이 가능할 것이라고 사료된다.

#### Abstract

In order to screen a radioprotective material from nontoxic natural products, the effects of Baishaoyao (Paeoniae Radix), known as a blood tonic of traditional Oriental herbs, were investigated in irradiated mice. The water extract of Baishaoyao was administrated to mice and then the mice were irradiated with  $\gamma$ -rays. The jejunal crypt survival, endogenous spleen colony formation and apoptosis in jejunal crypt cells were investigated in the mice irradiated with 12 Gy, 6.5 Gy, 2 Gy of  $\gamma$ -rays, respectively. The administration of Baishaoyao extract protected the jejunal crypts ( $p < 0.005$ ) and increased the formation of endogenous spleen colony ( $p < 0.05$ ) and decreased the apoptosis frequency ( $p < 0.05$ ). And also, proliferation of bone marrow cells *in vitro* were increased by Baishaoyao. These results indicated that Baishaoyao might protect stem cells of renewal tissues as well as bone marrow hematopoietic system, and that might augment hematopoiesis. For the protection of bio-organism from radiation, both protection of stem cells and augmentation of hematopoiesis were required. Therefore, Baishaoyao might be a useful radioprotector, especially since it is a relatively nontoxic natural product.

(Key words : Baishaoyao (Paeoniae Radix), radioprotector, jejunal crypt, hematopoietic)

## 1. 서론

방사선 및 방사성 동위원소의 의학적 이용 및 원자력 시설의 이용이 증가되고 있다. 이에 따라 방사선 이용에 수반되는 부작용 또는 방사선 피폭 사고에 의해 발생하는 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 *et al* [1] 에 의해 최초로 보고된 이래 주로 thiol 복합체를 중심으로 한 합성물질들이 연구의 대상이 되었으며, 그의 interleukin-1, tumor necrosis factor와 같은 면역조절물질, granulocyte colony-stimulating factor 등의 조혈 인자에 대한 연구가 진행되고 있다 [2-6]. 이러한 물질들은 유효용량에서 수반되는 강한 독성 또는 실제 적용에서의 미미한 효과에도 불구하고 암의 방사선치료 분야 등에 적용할 목적으로 연구되고 있다 [9, 10].

한편, 최근에는 급·만성 질병의 치료 및 예방을 위하여 독성이 거의 없으면서 효과가 입증된 천연물을 이용하는 대체요법과 건강식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 이와 같은 관점에서 생약재 등 천연물의 방사선 방호효과 연구도 부분적으로 진행되고 있다.

본 연구에서는 한의학에서 보혈양혈 작용이 알려져 있으며 [8, 9] 많은 처방에 사용되는 백작약(Baishaoyao, Paeoniae Radix)의 방사선 방호효과를 확인하고자 하였다.

본 실험에서는 방사선에 의한 장해가 피폭된 방사선량에 따라 다르게 나타남을 고려하여, 위장관 장해, 골수 장해, 저선량 장해에 미치는 백작약의 영향을 검증하기 위하여 12, 6.5, 2 Gy의 방사선을 생쥐에 각각 조사하고 소장암 생존, 비장내 조혈세포 집락 형성 및 apoptosis 유발 등을 관찰하였다. 또한, 조혈작용 증진효과를 확인하기 위하여 시험관 내 골수세포 배양계에 백작약 추출물을 첨가하여 세포 증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 실험동물

소장암 생존시험과 apoptosis 측정시험에는 7주령의 비근교계 ICR 암컷생쥐를, 내재성 비장조혈세포집락형성시험과 골수세포 증식시험에는 7주령의 근교계 C57BL/6 수컷생쥐를 사용하였다.

### 2.2 시료제조

시중에서 구입한 생약재 백작약을 세절하여, 10 배량의 증류수를 가하고 2시간씩 열탕 추출한 뒤 고형분을 제거한 현탁액을 200g에서 10분간 원심분리시키고 상층액을 여과하여 감압농축하고 동결 건조시켰다.

### 2.3 실험동물의 방사선 조사

실험용 방사선 조사기(Gamma-cell Elan 3000, Nordion International, Canada)를 사용하여  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  선(선량율: 10.9Gy/min)을 소장암 생존시험에는 12Gy, 내재성 비장집락측정시험에는 6.5Gy, apoptosis 측정시험에는 2Gy를 1회 전신 조사하였다.

### 2.4 소장암 생존시험

7주령의 자성 ICR 생쥐를 실험군 당 6마리씩으로 하고, 정상대조군, 방사선(12Gy)조사대조군과 시료병행 투여군의 3군을 나누었다. 시료 투여는 생쥐 마리 당 1mg의 용량으로 방사선 조사 전 36 및 12시간 전에 복강내로 2회 주사하였다. 방사선 조사 후 3.5일에 생쥐를 희생시켜 소장부위

를 채취하고 각 마우스당 8-10개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하고 절편을 제작하여 각 생쥐 당 8개의 종결된 소장표본의 가장자리에 위치하는 소장염의 수를 광학현미경으로 측정하였다.

## 2.5 비장내 조혈세포 집락 형성 시험

7주령의 웅성 C57BL/6 생쥐를 실험군 당 9마리로 하고, 방사선(6.5Gy)조사대조군과 시료병행 투여군으로 구분하였다. 시료 투여는 생쥐 마리당 1mg의 용량으로 방사선 조사 전 36시간과 12시간에 2회 복강내로 주사하였다. 방사선 조사 후 9일에 각 실험군의 생쥐를 희생시켜 비장을 채취하여 Bouin 고정액에 2일간 고정하고 표면에 형성된 조혈세포 집락을 실체현미경으로 관찰하였다.

## 2.6 Apoptosis 측정

7주령 자성 ICR 생쥐를 실험군 당 4마리씩으로 하고, 정상대조군, 방사선(2Gy)조사대조군과 방사선 조사 전 복강내 투여군으로 나누었다. 방사선조사 후 6시간에 생쥐를 희생시켜 소장을 채취하고 Carnoy's 고정액에 고정하고 각 마우스당 8-10개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하고 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색 및 DNA fragments 측정을 위하여 *in situ* apoptosis detection kit(APOPTAG™, Oncor, Gaithersburg, MD, U. S. A.)를 사용한 *in situ* DNA end-labeling (ISEL)을 실시하였다. 마우스 마리당 40개의 소장염을 광학현미경으로 관찰하였으며, 측정에 사용된 소장염은 염의 편측세포수가 17개 이상으로 Paneth cell과 내장이 확연히 나타나는 정확히 종결된 염만을 선택하여, 소장염의 Paneth cell을 제외한 4번째 세포까지를 기저부 (base)로 하고, apoptotic cell을 기저부와 전체 소장염에서 관찰되는 총수로 구분하여 산출하였다. 여러 개의 apoptotic body가 그 크기와 형태를 고려할 때, 한 세포의 잔유물로 나타날 때는 한 개의 세포로 측정하였다.

## 2.6 골수세포 증식효과 측정

7주령 웅성 C57BL/6 생쥐를 희생시킨 다음, 분리한 대퇴골 내부를 주사기를 이용하여 5% FBS가 첨가된 HBSS로 씻어내어 골수세포를 무균적으로 채취하였다. 분리한 골수세포를 세포배양액으로 시험관 내에서 배양할 때 백작약 추출물을 첨가하였다. 배양 7일 후 비부착성 세포를 수거하여 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수를 계수하였다. 부착성 세포는 7일간 더 배양한 후 같은 방법으로 세포수를 계수하였다. 세포배양액은 RPMI1640(GIBCO)에 20 mM HEPES buffer, 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine,  $2 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol 및 100U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin을 첨가한 완전배양액을 사용하였다.

## 3. 결과

### 3.1 소장염 생존율 증가

정상대조군의 공장단면 주변부의 염수는 평균 157개이었으며, 방사선 단독 조사군에서는 평균 21.8개로 급격히 감소하였다. 방사선 조사 전 백작약 투여군에서 생존 소장염의 수는 49개로 현저히( $p < 0.005$ ) 증가되었다(Table 1, Fig. 1).

### 3.2 비장내 조혈세포 집락형성 증가

비장내에 형성된 조혈세포 집락수는 방사선 조사 대조군에서 평균 4개이었으며, 이에 비하여 방사선 조사전 백작약 투여군에서는 평균 8.3개로 약 2배 이상( $p < 0.05$ ) 증가되었다(Table 2).

### 3.3 Apoptosis 유발 억제

apoptotic cell은 움의 기저부에 주로 형성되었으며 H&E 염색상에서 핵염색질과 세포질의 농축 및 산호성 세포질의 특성을 나타내었으며, ISEL 염색에서 양성의 세포 및 apoptotic body가 관찰되었다. 정상대조군에서 움당 0.091개의 apoptotic cell이 관찰되었으며, 방사선 조사 대조군의 4.938개에 비하여 백작약 투여군에서는 2.806개로 평균 43.9%( $p < 0.05$ ) 감소하였다(Table 3).

### 3.4 골수세포 증식효과

생쥐 골수세포의 시험관 내 배양 시에 백작약 추출물을 첨가한 결과 비부착성 조혈 전구세포는 배양 7일 후 대조군에 비해 2배로, 부착성 조혈계 세포(bone marrow stromal cells)는 배양 12일 후 대조군에 비해 4배로 각각 증식되었다(Fig. 2).

## 4. 고찰

방사선 증감제 및 방호제는 암치료를 위한 방사선 및 화학요법시 함께 적용될 경우 큰 효과를 얻을 수 있을 것이라는 관점에서 주요 연구대상이 되어왔다. Washburn *et al* [10] 과 Cairnie [11] 는 thiol 기가 포함된 WR2721같은 화합물이 가장 강력한 방호효과가 있다고 보고하였으나 이러한 합성물질들의 대부분은 방사선 조사 후나 경구 투여시 효과가 경미하거나 거의 없기 때문에 조사직전에 주사하여야 하며 또한 정상세포에도 심한 독성을 나타내는 단점을 가지고 있어 실제 적용에는 많은 한계가 있다.

생약과 같은 천연물들은 각종 질병이나 상해회복에 효과적이며, 독성이 적어서 특별한 부작용을 나타내지 않는다. 따라서 방사선장해를 예방 또는 경감시키는 효과를 가진 천연물에 대한 연구도 관심의 대상이 되고 있다. 단일생약제에 의한 방사선 방호 연구에서는 인삼을 비롯하여 당귀, 천궁, 영지, 가시오가피, 만삼, 자리공 및 황기 등의 효과가 보고되었으며 당제를 비롯한 한방제에 대한 연구는 사물탕 및 사군자탕, 소시호탕, 십전대보탕, 인삼영양탕, 귀비탕 및 육미지황 등의 효과유무가 단편적으로 보고되고 있다 [12~24]. 생약제제에 의한 방사선방호 효과는 조혈조직의 보호 및 회복, 면역증강 등의 관점에서 연구가 진행되고 있으며, 조혈기능의 장해극복효과에 관한 연구가 주를 이룬다.

본 연구결과 고선량, 중간 선량 및 저선량 방사선을 조사한 생쥐에서 백작약 추출물 투여에 의하여 소장 움 세포의 생존율이 증가되었고, 비장내 조혈세포 집락의 수가 증가되었으며, 소장움 세포에서 apoptosis 유발이 억제되었다. 또한, 시험관 내에서 백작약 추출물은 골수세포 증식효과를 보였다. 이 결과로 보아 백작약은 방사선 피폭 시 조혈계 모세포의 방호 뿐만 아니라 재생조직의 원줄기세포 방호 효과도 나타내는 것으로 사료되며, 조혈기능을 증진시키는 것으로 생각된다. 방사선 방호에 있어 원줄기세포 방호뿐만 아니라 조혈기능 장해 극복도 중요한 문제이다. 이런 관점에서 백작약은 독성이 적은 천연물로서, 유효성분과 작용기작이 밝혀진다면 좋은 방사선 방호제로 실제 적용이 가능할 것이라고 사료된다.

**감사의 글:** 본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

## 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. Kligerman, M. M., Shaw, M. T., Slavid, M. and Yudas, J. M. : Phase I clinical studies with WR2721. *Cancer Clin. Trials*, 3, 217-221 (1980).
8. 한약위원회, 조제지침연구소위원회 : 한약조제 지침서 해설, 사단법인 대한약사회(1995).
9. 약대 한약학 교재연구회 : 한약방제학, 도서출판 정담 (1993).
10. 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.
11. Cairnie AB. Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat. Res.*, 94:221-226, 1983.
12. 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).
13. 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).
14. Ohta, S., Sakurai, N., Sato, Y., Inoue, T. and Shinoda, M. : Studies on chemical protectors against radiation. XXX. Radioprotective substances of *cnidii rhizoma*. *Yakugaku Zasshi*, 110, 746-754 (1990).
15. 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).
16. 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).
17. Zneg, X. L., Li, X. A. and Zhang, B. Y. : Immunological and hematopoietic effect of *Codonopsis pilosula* on cancer patients during radiotherapy. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 12, 607-608 (1992).
18. 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).
19. 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).
20. Fujii, Y., Imamura, M., Han, M., Hashino, S., Zhu, X., Kobayashi, H., Imai, K., Kasai, M., Sakurada, K and Miyazaki, T. : Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: nunjin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *Int. J. Immunopharmacol.*, 16, 615-622 (1994).
21. Hsu, H. Y., Ho, Y. H., Lian, S. L. and Lin, C. C. : Preliminary study on antiradiation effect of kuei-pi-tang. *Am. J. Chin. Med.*, 19, 275-284 (1991).
22. Ohnishi, Y., Yasumizu, R., Fan, H. X., Liu, J., Takao, Liu F., Komatsu, Y. Hosoya, E., Good, R. A. and Ikehara, S. : Effects of juzu-taiho-toh (TJ-48), a traditional Oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice. *Exp. Hematol.*, 18, 18-22 (1990).
23. Hsu, H. Y., Ho, Y. H. and Lin, C. C. : Protection of mouse bone marrow by Si-Wu-Tang against whole body irradiation. *J. Ethnopharmacol.*, 52, 113-117 (1996).
24. Lu, G., Yang, M., Shen, Y. and Meng, J. : The absorption of Fe, Zn, Cu in siwu, sijunzi, and Liuwei dihuang decoction by small intestine in rats. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 16, 297-298 (1991).

**Table 1.** Effect of Baishaoyao on intestinal crypt survival in irradiated mice

| Groups                     | Crypts per circumference<br>(Mean ± SD) |
|----------------------------|---|
| Untreated control          | 157.00 ± 14.82                          |
| Irradiation control (12Gy) | 21.82 ± 12.31                           |
| Baishaoyao + irradiation   | 49.05 ± 12.64*                          |

Water extracts of Baishaoyao (1mg/animal) was injected intraperitoneally at 36 and 12 hours before irradiation.

\*p<0.005 as compared with irradiation control group.

**Table 2.** Effect of Baishaoyao on endogenous spleen colony formation in irradiated mice on day 9 after irradiation

| Groups                      | Number of colony<br>(Mean ± SD) |
|-----------------------------|---------------------------------|
| Irradiation control (6.5Gy) | 4.07 ± 2.55                     |
| Baishaoyao + irradiation    | 8.33 ± 3.87*                    |

Water extract of Baishaoyao (1mg/animal) was injected intraperitoneally at 36 and 12 hours before irradiation.

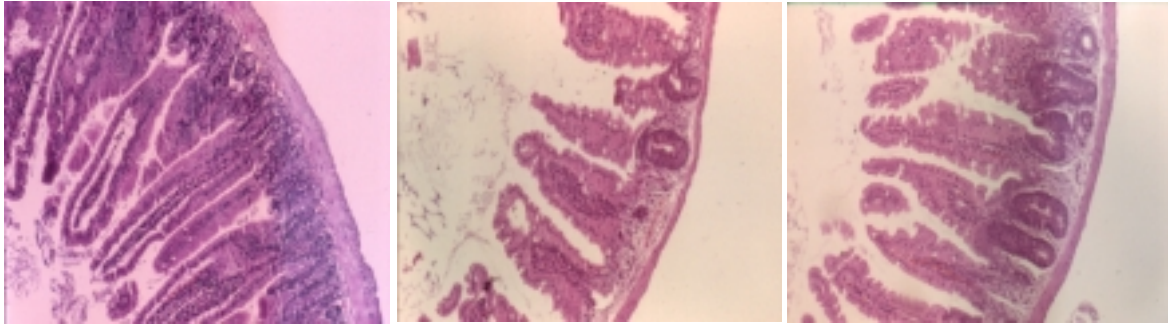
\*p<0.05 as compared with irradiation control group.

**Table 3.** Effect of Baishaoyao on incidence of cell death by apoptosis in crypt of intestine following irradiation

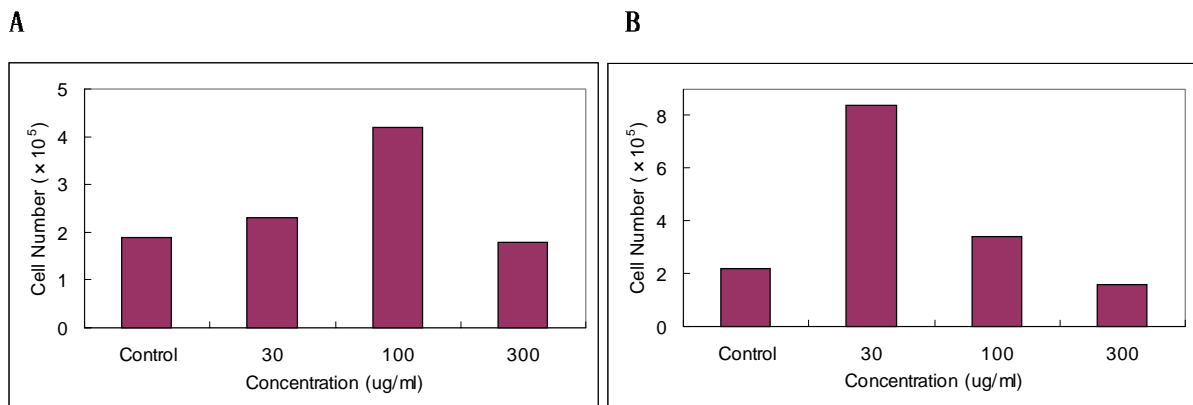
| Groups                    | Apoptotic cell per crypt<br>(Mean ± SD) |                |
|---------------------------|---|----------------|
|                           | Base                                    | Total          |
| Untreated control         | 0.068 ± 0.032                           | 0.084 ± 0.024  |
| Irradiation control (2Gy) | 4.688 ± 1.138                           | 4.938 ± 1.194  |
| Baishaoyao + irradiation  | 2.594 ± 0.464*                          | 2.806 ± 0.429* |

Water extract of Baishaoyao (1mg/animal) was injected intraperitoneally at 36 and 12 hours before irradiation.

\*p<0.05 as compared with irradiation control group.



**Fig. 1. Photomicrograph of transverse sections of mouse jejunum.**  
 (Left, normal; Middle, radiation; right, extract Baishaoyao + radiation)



**Fig. 2. The effects of Baishaoyao on the growth of bone marrow cells *in vitro*.**  
 Bone marrow cells were cultured with extract of Baishaoyao(*Paeonia japonica*). On day 7, nonadherent supernatant-derived mononuclear cells were harvested and counted by staining with trypan blue(A). On day 12, stromal cells were counted(B).