′00 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

생쥐에서 생약재 당귀의 방사선 방호효과

Radioprotective Effects of Danggui(Angelica gigas Nakai) in Mice

김성호 · 오헌 · 김세라 · 이종환 · 신동호
전남대학교 수의과대학

이성태
순천대학교 생물학과

변명우 · 조성기*
한국 원자력연구소 방사선 식품 · 생명공학기술개발과제

요 약

방사선 방호효과를 나타내는 천연물을 검색하기 위한 일환으로 한의학에서 보혈양혈 작용이 있는 것으로 알려져 있는 당귀(Danggui, *Angelica gigas*)의 효과를 검정하였다. 생쥐에 당귀 추출물을 투여한 다음 12 Gy, 6.5 Gy, 2 Gy의 감마선을 각각 조사한 후 소장 움 생존, 비장내 조혈세포 집락형성 및 소장 움 세포의 apoptosis 유발 등을 관찰하였다. 방사선 조사 전 당귀 투여군에서 소장 움의 생존율이 증가되었으며($p<0.0005$), 생존 조혈모세포에 의한 비장내 조혈세포 집락의 형성이 증가되었다($p<0.05$). 이 결과로 보아 당귀는 조혈모세포 뿐만 아니라 재생조직의 원줄기세포도 방호하는 것으로 사료된다. 방사선 방호에 있어 원줄기세포 방호 뿐만 아니라 조혈 및 면역기능 장해 극복도 중요한 문제이다. 이런 관점에서 당귀는 이미 다른 보고에서 조혈기능 증진 및 면역증강 효과가 부분적으로 알려져 있고 독성도 거의 없는 천연물로 밝혀져 있어, 당귀는 아주 좋은 방사선 방호 식품으로 실제 적용이 가능할 것이라고 사료된다.

Abstract

In order to determine the radioprotective effects of Danggui (*Angelica gigas*), known as a blood tonic in traditional Oriental herbs, the extract of Danggui was administered to mice and then the mice were irradiated with γ-rays. The effects of the extract on jejunal crypt survival, endogenous spleen colony formation and apoptosis in jejunal crypt cells were investigated in mice irradiated with 12 Gy, 6.5 Gy, 2 Gy of γ-rays, respectively. The administration of Danggui extract protected the jejunal crypts ($p<0.0005$) and increased the formation of endogenous spleen colony ($p<0.05$). These results indicated that Danggui might protect stem cells of renewal tissues as well as bone marrow hematopoietic system. For the protection of bio-organism from radiation, both protection of stem cells and augmentation of hemopoiesis and immune function might be required. In other reports, Danggui showed stimulatory effects on hemopoiesis and immune function. Therefore, Danggui might be a useful radioprotector, especially since it is a relatively nontoxic natural product.

(Key words : Danggui (*Angelica gigas*), radioprotector, jejunal crypt, spleen colony)

1. 서 론

방사선 및 방사성 동위원소의 의학적 이용 증가 및 원자력 시설의 이용 증대에 따라 방사선에의 피폭 가능성이 높아지고 있다. 따라서 전신이나 국소 장기가 방사선에 노출되어 일어나는 장해에 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 중심으로한 합성물질들이 연구의 대상이 되었으며, 그외 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 당귀(Danggui, *Angelica gigas*)의 방사선 방호효과를 확인하고자 하였다. 당귀는 생쥐에서 정맥내 주사시 50% 치사량이 체중 kg 당 100g으로 알려진 무독한 생약재로서 최근 조혈전구세포의 증식 및 분화촉진, 항염작용, 대식세포의 탐식능 증강효과, interleukin-2 산생효과 등이 보고되어 있으며 [10-14] , 이외 심혈관 혈액공급 증가 효과, 항부정맥 효과, 혈압강하작용, 혈전형성억제, 항통증작용 등이 알려져 있다.

본 실험에서는 방사선에 의한 장해가 피폭된 방사선량에 따라 다르게 나타남을 고려하여, 12, 6.5, 2 Gy의 방사선을 생쥐에 각각 조사하여 위장관 장해, 골수 장해, 저선량 장해를 유발시킨 모델에서 당귀의 방호효과를 검정하기 위하여 소장 움 생존, 비장내 조혈세포 집락 형성 및 apoptosis 유발 등을 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험동물

소장 움 생존시험과 apoptosis 측정시험에는 7주령의 ICR 암컷생쥐를 내재성 비장 조혈세포 집락 형성시험에는 7주령의 ICR 수컷생쥐를 사용하였다.

2.2 시료제조

시중에서 구입한 생약을 세절하여, 10배량의 증류수를 가하고 8시간씩 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}Co γ선(선량율: 10.9Gy/min)을 소장 움 생존시험에는 12Gy, 비장내 조혈세포 집락 형성시험에는 6.5Gy, apoptosis 측정시험에는 2Gy를 1회 전신 조사하였다.

2.4 소장 움 생존시험

8주령의 자성 ICR 생쥐를 실험군 당 6마리씩으로 하고, 정상 대조군, 방사선 조사 대조군과 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 소장부위를 채취하고 각 생쥐당 8-10개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하고 절편을 제작하여 각 생쥐 당 8개의 종절된 소장표본의 가장자리에 위치하는 소장 움의 수를 광학현미경으로 측정하였다.

2.5 비장내 조혈세포 집락 형성 시험

8주령의 웅성 ICR 생쥐를 실험군 당 9마리로 하고, 방사선 조사 대조군과 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 소장 움 세포의 apoptosis 측정

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

3. 결과

3.1 소장 움 생존율 증가

정상 대조군의 공장단면 주변부의 움수는 평균 157개 이었으며, 방사선 조사 대조군에서는 평균 20개로 급격히 감소하였다. 방사선 조사 전 당귀($p<0.0005$) 투여군에서 생존 소장 움의 수는 54개로 현저히 증가되었다(Table 1, Fig. 1).

3.2 비장내 조혈세포 집락 형성 증가

비장내 조혈세포 집락 형성은 방사선 조사 대조군에 비하여 방사선 조사전 당귀 복강내 투여군에서 평균 3.4배($p<0.05$)로 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 2).

3.3 소장 움 세포의 apoptosis 측정

apoptotic cell은 움의 기저부에 주로 형성되었다. H&E 염색상에서 핵염색질과 세포질의 농축 및 산호성 세포질의 특성을 나타내었으며, ISEL 염색에서 양성의 세포 및 apoptotic body가 관찰되었다. 정상 대조군에서 움당 0.091개가 관찰되었으며 방사선 조사 대조군에 비하여 평균치에서는 base부분에서 18.7%, total에서는 15.1% 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Table3).

4. 고찰

방사선 증감제 및 방호제는 암치료를 위한 방사선 및 화학요법 시 함께 적용될 경우 큰 효과를 얻을 수 있을 것이라는 관점에서 주요 연구대상이 되어왔다. Washburn *et al* 〔15〕 과 Cairnie 〔16〕 는 thiol기가 포함된 WR2721과 같은 화합물이 가장 강력한 방호효과가 있다고 보고하였으나 이러한 합성물질들의 대부분은 방사선 조사 후나 경구투여 시 효과가 경미하거나 거의 없기 때문에 조사 직전에 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. 생약제제에 의한 방사선 방호효과는 조혈조직의 보호 및 회복, 면역증강, 약재성분 중 미량원소의 흡수 등의 관점에서 연구가 진행되고 있으며, 조혈장기의 장해극복효과에 관한 연구가 주를 이룬다. 단일생약재에 의한 방사선 방호 연구에서는 인삼을 비롯하여 당귀 〔10〕 , 천궁, 영지, 가시오가피, 만삼, 자리공, 황기, 및 지황 등의 효과가 보고되었으며 탕제를 비롯한 한방제에 대한 연구는 사물탕 및 사군자탕, 보중익기탕, 소시호탕, 십전대보탕, 인삼영양탕, 귀비탕 및 육미지황 등의 효과유무가 단편적으로 보고되고 있다.

당귀는 생쥐에서 정맥내 주사 시 50% 치사량이 체중 kg 당 100g으로 알려진 〔10〕 무독한 생약재로서 최근 조혈전구세포의 증식 및 분화촉진, 항염작용, 대식세포의 탐식능 증강효과, interleukin-2 산생효과 등이 알려져 있으며 〔11-14〕 , 당귀의 방사선 방호효과는 30일 생존율 및 염색체이상의 경감 효과가 단편적으로 알려져 있다 〔10〕 .

본 연구결과 고선량, 중간 선량 및 저선량 방사선을 조사한 생쥐에서 당귀 추출물 투여에 의하여 소장 움 세포의 생존율이 증가되었으며, 비장내 조혈세포 집락의 수가 증가되었다. 이 결과로 보아 당귀는 방사선 피폭 시 재생조직의 원줄기세포 방호 및 조혈계 모세포의 방호효과를 나타내는 것으로 사료된다. 앞에서 고찰한 바와 같이, 당귀는 조혈기능 증진 및 면역증강 효과를 나타내며, 독성이 거의 없는 천연물로 알려지고 있다. 따라서, 방사선 장해 극복을 위해서는 원줄기세포 방호와 조혈 및 면역 증진이 관건이라는 점에서 당귀는 아주 좋은 방사선 방호 식품으로서 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. 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. Wang, Y. and Zhu, B. : The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of hematopoietic pregenitor cell. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih,* 76, 363-366 (1996).
12. Dzaki, Y. : Antiinflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo,* 40, 954-956 (1992).
13. Lu, S. J., He, D., Huang, H. L. and Huang, X. Y. : Enhancing effect of danggui injection on immunologic function. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih,* 14, 685-687 (1989).
14. Weng, X. C., Zhang, P., Gong, S. S. and Xiai, S. W. : Effect of immuno-modulating agents on murine IL-2 production. *Immunol. Invest.,* 16, 79-86 (1987).
15. 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.
16. Cairnie AB. Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat. Res.,* 94:221-226, 1983.

Table 1. Effect of Danggui on intestinal crypt survival in irradiated mice(Mean±SD)

Groups	Crypts per circumference
Untreated control	157.00 ± 14.81
Irradiation control (12Gy)	19.67 ± 6.09
Danggui + irradiation	54.90 ± 7.87*

Water extracts of Danggui (1mg/animal) was given i.p. at 36 and 12 hours before irradiation. *$p < 0.0005$ as compared with irradiation control group.

Table 2. Effect of Danggui on endogenous spleen colony formation in irradiated mice at ninth day after irradiation (Mean±SD)

Groups	Number of colony
Irradiation control (6.5Gy)	2.11 ± 1.69
Danggui + irradiation	7.2 ± 6.24*

Water extract of Danggui (1mg/animal) was given i.p. at 36 and 12 hours before irradiation. *$p < 0.05$, as compared with irradiation control group.

Table 3. Effect of Danggui on incidence of cell death by apoptosis in crypt of intestine following irradiation (Mean±SD)

Groups	Apoptotic cell per crypt	
	Base	Total
Untreated control	0.071 ± 0.036	0.091 ± 0.032
Irradiation control (2Gy)	4.688 ± 1.138	4.938 ± 1.194
Danggui + irradiation	3.812 ± 0.625	4.194 ± 0.124

Water extract of Danggui (1mg/animal) was given i.p. at 36 and 12 hours before irradiation.

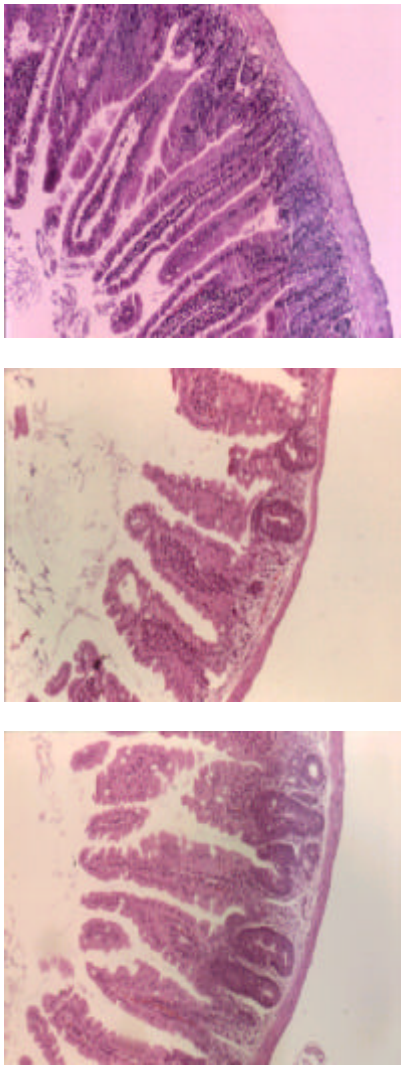

Fig. 1. Photomicrograph of transverse sections of mouse jejunum.
(Top, normal; Middle, radiation; Low, extract Danggui + radiation)