

면역조혈계 및 재생조직의 방사선 손상에 대한 생약복합물(HIM-I)의 방호 효과

박혜란¹ · 김성호² · 이성태³ · 변명우¹ · 조성기^{1*}

¹한국원자력연구소 방사선식품생명공학팀

²전남대학교 수의과대학

³순천대학교 생물학과

Effect of a Herb Mixture (HIM-I) on the Protection of the Hematopoietic-Immune System and Self-renewal Tissues against Radiation Damage

Hae-Ran Park¹, Sung-Ho Kim², Sung-Tae Yee³, Myung-Woo Byun¹ and Sung-Kee Jo^{1*}

¹Radiation Food and Biotechnology Team, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

³Dept. of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

In previous studies, we evaluated the effect of the 6 energy-tonic or blood-building prescriptions of traditional oriental medicine, and observed that Si-Wu-Tang and Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang showed high activity in the protection of the gastrointestinal and hematopoietic organs in irradiated mice. But any of these prescriptions did not show a high activity in the activation of the immune cells. We performed this study to design an herb mixture which protects the self-renewal tissues and also promotes recovery of the immune system against radiation damage. In order to meet all the requirements, we designed a new mixture of 3 edible herbs listed in Korean Food Code. The mixture of *Angelica gigas* radix, *Cnidium officinale* rhizoma and *Paeonia japonica* radix was decocted with hot water, and the activities of the water extract (HIM-I) were evaluated. HIM-1 stimulated the immune cells in a much higher extent than the traditional prescriptions, and promoted dramatically the growth of bone marrow stem cells *in vitro*. Also, HIM-1 protected digestive and hematopoietic organs against radiation as effectively as the 2 prescriptions, Si-Wu-Tang and Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang. On the other hand, it showed high *in vitro* antioxidative activity that might be considered as a mechanism of the protective effects against radiation. Although the detailed mechanisms of those effects remain to be elucidated, these results indicated that HIM-I might be a useful agent for protection and recovery of body from various risk factor as well as radiation, especially since it is a relatively nontoxic natural product.

Key words: herb mixture, radiation protective, hematopoietic, immune, jejunal crypt, spleen

서 론

방사선 및 방사성 동위원소를 이용한 질병의 진단 및 치료의 빈도가 증가하고 있고, 또한 산업적으로도 방사선의 이용이 확대되고 있다. 이에 따라 방사선 이용의 부작용 또는 방사선에 전신이나 국소장기가 노출되는 경우에 일어나는 방사선 장애에 대한 관심도가 높아지고 있다. 따라서 방사선에 의한 생체손상의 예방 및 경감을 위한 방호제의 개발이 중요한 문제로 대두되고 있다(1,2).

방사선에 의한 생체 장애는 피폭된 방사선량에 따라 중추신경장애(100 Gy 이상), 위장관장애(10 Gy 이상), 골수(조혈)장애(3~8 Gy) 및 저선량 장애(1~2 Gy 이하) 등이며 각각은 급성, 지연 또는 유전효과를 나타내게 된다(3). 중추신

경장애에 의한 사망의 경우 의료적 처치방법은 전혀 없으며 위장관장애를 일으키는 방사선용량 이하에 대한 방호연구가 주로 수행되었다. 방사선 방호제에 대한 연구는 1949년 Patt 등(4)에 의해 cysteine의 방어효과가 최초로 보고된 이래 주로 thiol 기를 갖고 있는 합성물질들(5-7)의 방어효과가 연구되었다. 그 후 방사선 생체손상의 방어에 있어서 면역조혈계의 방어가 주요하다는 관점에서 interleukin-1(8), tumor necrosis factor와 같은 면역제제(9), granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) 등의 조혈 증강제(10) 및 glucan(11) 등에 대한 연구가 수행되었다. 이러한 물질들은 유효용량에서 수반되는 강한 독성 또는 미미한 효과에도 불구하고 암의 방사선치료 분야 등에 적용을 목적으로 연구되고 있다(12-14).

한편, 현대의학의 많은 발전에도 불구하고 아직은 다수의

*Corresponding author. E-mail: skjo@kaeri.re.kr
Phone: 82-42-868-8063. Fax: 82-42-868-4734

질병치료에 한계가 있으며, 약물의 부작용도 문제점으로 나타나고 있다. 따라서 독성이 적으면서 치료효과가 기대되는 천연물을 이용한 대체요법과 건강식품에 대한 수요가 증가하고 있다. 천연물에 의한 처방은 동아시아와 일부 유럽에서 응용되어 왔으며, 동양에서는 한의학의 처방으로 여러 종류의 생약을 혼합하여 열탕 추출한 것을 주로 사용하여 왔다. 이러한 한약처방은 약리적 작용기전 또는 유효성분이 명확히 밝혀져 있지 않은 상태로, 여러 종류의 급·만성 질병의 치료에 경험적으로 이용되어 왔다. 이와 같은 관점에서, 천연물이 방사선 생체반응에 수식효과를 나타낼 것으로 기대되고 있으며, 여러 가지 단일 생약재(15-22) 또는 몇 가지 한약처방제(23-28)의 방사선 방호효과에 대한 연구가 수행되었다.

방사선에 의한 생체손상은 세포분자의 직접적인 파괴로 인한 직접적인 손상과 생체 내 물 분자의 이온화로 생성된 라디칼(특히 ·OH)에 의한 세포분자의 산화적 손상으로 인한 간접적 손상으로 알려지고 있다. 특히, 적은 용량의 방사선에 의한 손상에서는 간접적 산화적 손상이 주 요인이며, 이때 생성된 라디칼은 다양한 경로로 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려졌다(3,29). 따라서 방사선방호제 연구에 있어서 이들 각각의 손상기작에 대한 종합적 검토가 필요하다. 이에 본 연구자들은 한약처방이 각기 다른 효과를 가지는 여러 가지 생약으로 구성된 복합제이므로 그의 방사선 방어효과가 기대되어, 이들 복합제 및 그 구성 생약의 방사선 방어효과를 검색하였다. 즉, 한의학에서 보기·보혈의 처방인 사물탕, 사군자탕 등 6가지 탕제의 방사선에 대한 재생조직 및 조혈계 조직의 방어효과를 중심으로 관찰하여 보고한 바 있다(30-34).

본 연구에서는 상기한 6가지 한약처방제의 방사선 방어효과 연구 결과를 바탕으로 방사선 장해를 효과적으로 극복할 수 있는 새로운 생약복합물을 개발하고자 하였다. 본 연구자들은 방사선 생체손상의 방어 및 회복을 위해서는 일차적으로 조직의 방어뿐만 아니라 이차적으로 재생조직 특히 면역조혈계의 회복 촉진이 필수적이라고 생각하였다. 이상의 여러 가지 측면을 고려하여, 방사선 조사 동물모델에서 재생조직 방어, 조혈계 방어, 면역조혈계 회복 증진 효과를 동시에 나타내는 새로운 생약 조합을 도출함으로써 방사선 장해로부터 생체를 방호하고 회복시킬 수 있는 생약복합물을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에는 7~8주령의 ICR 생쥐를 사용하였다. 내재성 비장 조혈세포집락 형성시험에는 수컷 생쥐를, 소장염 생존 시험 및 소장염 세포사멸(apoptosis) 시험과 그 외 실험에는 암컷 생쥐를 사용하였다. 생쥐는 대한바이오링크(주)에서 구입하여, 사육실 온도를 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로, 습도를 55~60%로 유지시키고 명암순환이 12시간 단위로 조절되는 표준 사육방법

으로 사육하였으며, 고형사료와 음수는 자유로이 공급하였다.

시료제조

생약재는 서울 경동 한약재 시장에서 국내산으로 원산지 증명이 되는 최고 상등품을 구입하였으며, 전통적인 분류방법으로 품종을 확인하였다. 구입한 생약재 3종 즉, 당귀(Dang-gui, *Angelica gigas* Nakai), 천궁(Chuanxiong, *Cnidium officinale* Makino), 백작약(Baishaoyao, *Paeonia japonica* Miyabe)을 동일한 무게비율로 혼합한 후, 혼합 생약재 100 g 당 증류수 1,000 mL을 가하고 4시간 열탕 추출하였다. 추출물 내의 고형분을 제거하고 감압농축하여 물추출물(HIM-I)을 얻었다. 이러한 방법으로 얻은 추출물은 동결건조하여 냉동(-75 °C) 저장하였으며, 실험 직전에 증류수에 녹여 사용하였다.

세포배양

실험에 사용한 세포배양액은 RPMI(Rosewell Park Memorial Institute) 1640 배지(pH 7.4)에 2 mg/mL sodium bicarbonate, 20 mM HEPES, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 0.05 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, 1% non-essential amino acid 및 10% 또는 20%의 우태아혈청(FBS; fetal bovine serum)을 첨가한 완전배지를 사용하였으며, 세포배양은 5% CO₂, 37 °C 포화습도 조건의 세포배양기에서 수행하였다. 모든 시약은 GIBCO BRL(Praisley, UK)에서 구입하였으며, 다만 2-mercaptoethanol은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

림프구 활성화 효과 측정

시료의 면역세포 활성화 효과를 알아보기 위하여, 각 시료가 시험관 내에서 비장 림프구를 자극하여 증식시키는 정도를 [³H]-thymidine(TdR) incorporation 방법으로 측정하였다(35). 생쥐로부터 분리한 림프구를 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에 부유시킨 후 96-well plate에 분주하였다 (2×10^5 cells/200 µL/well). 각각의 림프구 배양 well에 시료를 첨가한 후 세포배양기에서 2일 및 3일간 배양하였다. [methyl-³H]-TdR(Amersham Biosciences, Ltd, UK)을 배양액에 첨가하고(1.5 µCi/well) 4시간 동안 추가로 배양하였다. 세포는 cell harvester(Inotech, Switzerland)를 이용하여 glass fiber filter strip에 수거한 후 liquid scintillation counter(Packard Instrument Co, USA)를 이용하여 incorporation된 [³H]-TdR의 양을 cpm(count per minute)으로 측정하였다.

골수세포 증식효과 측정

골수세포는 생쥐의 대퇴골로부터 분리하여 사용하였다. 골수세포를 20% FBS가 포함된 RPMI 1640 배양액에 부유시킨 후 24-well plate에 2×10^6 개/2 mL/well의 농도로 분주하였다. 골수세포 배양액에 시료를 첨가한 후 세포배양기에서 10일간 배양한 후, trypan blue로 염색하여 살아있는 세포

의 수를 계수하였다.

생쥐에 대한 방사선 조사 및 시료투여

생쥐에 대한 방사선 조사는 실험용 방사선 조사기(Gamma-cell Elan 3000, Nordion International, Ottawa, Ontario, Canada)를 사용하여 ^{60}Co γ 선(선량율: 10.9 Gy/min)을 조혈모세포 생존시험에는 6.5 Gy, 소장용 생존시험에는 12 Gy, 소장용 세포자살 시험에는 2 Gy를 생쥐에 1회 전신 조사하였다.

시료투여는 생쥐 마리당 1 mg 즉 50 mg/kg body weight의 용량으로 방사선 조사 전 36시간과 12시간에 2회 복강내로 주사하였다.

내재성 비장 조혈세포집락(endogenous spleen colony) 형성시험

조혈계 모 세포(bone marrow stem cells)의 방사선 손상에 대한 시료의 방어효과 관찰을 위한 실험모델로 적용하였다(15). 면역조혈계 세포는 방사선에 매우 민감하여 방사선 조사(3~8 Gy) 후 급격히 소실되게 되고, 그 결과 혈액 내에 모자라는 면역세포 수를 보충하기 위해 비장적으로 비장(spleen)에서도 조혈작용이 일어나므로 일정 시일(9~10일) 경과 후 비장 표면에 형성된 조혈세포 집락을 관찰할 수 있다. 이 때, 비장 표면의 조혈세포 집락 수는 골수 내에 살아남은 조혈모세포 수와 비례한다. 이를 이용하여, 방사선 조사 전에 시료를 투여함으로써 골수 조혈모세포 손상의 경감 정도를 관찰할 수 있다(15).

실험군은 방사선(6.5 Gy) 조사 대조군과 각 시료병행 투여군으로 나누고, 각 군당 ICR 생쥐 8~9마리로 하였다. 생쥐에 시료를 투여한 다음 방사선을 조사시킨 후 9일에 각 실험군의 생쥐를 희생시켜 비장을 채취하여 Bouin 고정액에 2일간 고정하고 비장표면에 형성된 조혈세포집락을 실험현미경으로 관찰하였다(21).

소장용 생존시험(intestinal crypt survival)

재생조직의 방사선 손상에 대한 시료의 방어효과 관찰을 위한 실험모델로 적용하였다. 대표적인 재생조직의 하나인 소장용(intestinal crypt)은 일정량 이상의 방사선(12 Gy 이상)에 노출되면, 3~4일 후 많은 부분이 소실되게 된다. 이 때 방사선 조사 전에 시료를 투여함으로써 조직 손상의 경감 정도를 관찰할 수 있다(14).

실험군은 정상대조군, 방사선(12 Gy) 조사 대조군과 각 시료병행 투여군으로 나누고, 각 실험군에 ICR 생쥐를 6마리씩 충당하였다. 생쥐에 시료를 투여한 다음 방사선을 조사시킨 후 3.5일에 생쥐를 희생시켜 소장(공장) 부위를 채취하여 Carnoy 고정액에 1시간 고정하였다. 각 생쥐 당 8~10개의 소장편을 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하고 절편을 제작하였다. 각 생쥐 당 8개의 종절된 소장표본의 가장자리에 위치하는 소장용(crypt)의 수를 광학현미경으로 측정하고 실험군별 평균 및 편차를 산정하였다(14).

소장용 세포 자살 측정(apoptosis of intestinal crypt cells)

저선량 방사선(2 Gy 이하)에 의한 재생조직의 손상에 대한 시료의 방어효과 관찰을 위한 실험모델로 적용하였다.

실험군은 정상대조군, 방사선(2 Gy) 조사 대조군과 각 시료병행 투여군으로 나누고, 각 실험군에 ICR 생쥐를 4마리씩 충당하였다. 생쥐에 시료를 투여한 다음 방사선을 조사시킨 후 6시간에 생쥐를 희생시켜 소장(공장) 부위를 채취하여 Carnoy 고정액에 고정하고, 각 마우스당 8~10개의 소장편을 통상적 방법에 따라 파라핀 포매하여 절편을 제작하였다. Hematoxylin-eosin 염색 및 DNA fragments 측정을 위하여 in situ apoptosis detection kit(APOPTAGTM, Oncor, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 in situ DNA end-labelling(ISEL)을 실시하였다. 간단히 기술하면, 표본슬라이드에 terminal deoxynucleotidyl transferase를 첨가함으로써 fragmented DNA에 digoxigenin-nucleotides를 부착시키고, anti-digoxigenin-peroxidase antibody를 면역염색 방법으로 결합시킨 후 diaminobenzidine(Sigma Chemical Co., MD, USA)를 사용하는 통상적 방법으로 peroxidase enzyme 부위를 발색시켰다. 생쥐 마리 당 40개(군별 총 160개)의 소장용을 광학현미경으로 관찰하였다. 소장용의 편측 세포수가 17개 이상으로 Paneth 세포와 내장이 확연하고 정확히 종절된 용만을 선택하여 apoptotic cell의 수를 측정하였다. 소장용의 Paneth 세포를 제외한 4번째 세포까지를 기저부(base)로 하여, apoptotic cell을 기저부와 전체 소장 용에서 관찰되는 총수로 구분하여 산출하였다(36).

항산화 활성 측정

DPPH radical 소거 활성: 항산화 효과를 알아보기 위해서 시료가 라디칼 분자에 전자를 공여하는 능력(electron donating ability)을 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical을 이용하여 측정하였다. 반응은 시료 10 μL , 0.2 mM DPPH 0.99 mL을 혼합한 후 30분 동안 반응시켜 흡광도를 517 nm에서 측정하였다. DPPH radical 소거 활성은 다음과 같은 수식에 따라 계산하였다(37).

$$\text{EDA (Electron donating ability) (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} : 시료 비첨가군의 흡광도

A_{sample} : 시료 첨가군의 흡광도

지질과산화 억제 활성: 지질과산화 억제 실험은 흰쥐(rat)의 간에서 얻은 microsome을 이용하여 TBA(thiobarbituric acid) 반응법을 통해 수행되었다. 지질과산화 반응은 시료 10 μL , 50 mM phosphate buffer(PH 7.4) 740 μL , microsome 50 μL (10 mg protein/mL), 0.8 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 μL , 2 mM ascorbic acid 100 μL 를 혼합한 반응액을 37°C에서 1시간 동안 흔들면서 수행하였다. 이 때 생성된

TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하기 위하여 20% TCA 250 μ L와 1% TBA 250 μ L를 넣고 혼합하고 95°C에서 15분 동안 가열한 후 10,000 rpm에서 5분 동안 원심하여 침전물을 제거하고, 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. 지질과산화 억제 활성은 다음과 같은 수식에 따라 계산하였다(38).

$$\text{Inhibition of lipid peroxidation (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100$$

A_{control} : FeSO₄/ascorbic acid 첨가, 시료 비첨가군의 흡광도

A_{sample} : FeSO₄/ascorbic acid 첨가, 시료 첨가군의 흡광도

A_{blank} : FeSO₄/ascorbic acid 비첨가, 시료 비첨가군의 흡광도

통계분석

실험군간 차이에 대한 유의성 검정은 Student's *t*-test를 수행하여 분석하였으며, 분석 프로그램으로는 SPSS 7.0 for windows(SPSS Inc., IL, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

기존 한약처방제의 방호효과 비교검토 및 새로운 생약복합물(HIM-I) 도출

방사선에 대한 생체 방호 물질을 탐색하기 위하여, 먼저 기존 보기·보혈 한약처방제 6종의 효과를 검색하여 보고한 바 있다(30-34). 그 결과를 요약하면, 방사선 조사 동물모델에서 재생조직 방어에는 사물탕, 보중익기탕 순으로, 조혈계 방어에는 보중익기탕, 사물탕 순으로 높은 효과를 보였다. 한편, 저자 등은 방사선 장애로부터 생체를 방호하고 회복시키기 위해서는 일차적으로 조직의 방어뿐만 아니라 이차적으로 재생조직 특히 면역조혈계의 회복 촉진이 필수적이라고 생각하였다. 이에, 위의 6가지 한약처방제의 면역세포 활성화 효과를

검색한 결과 모두 높은 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 1).

따라서, 저자 등은 방사선 손상에 대한 조직 방어와 면역조혈계의 회복촉진 효과를 동시에 나타내는 새로운 생약조합을 도출하고자 하였다. 또한, 손상된 생체에 적용하기 쉽도록 독성이 거의 없는 원재료를 사용하기 위해 식품공전 상에 식품의 주원료 혹은 부원료로 등재된 식물소재를 대상으로 하였다. 특히, 선행연구에서의 구성 생약 각각의 조직 방어효과를 비교검토하고, 한편으로 각 단일 생약의 면역세포 활성화 효과를 검색한 결과를 바탕으로 각 지표 항목 모두에서 높은 효과를 나타내는 생약복합물을 도출하고자 하였다. 즉, 당귀, 천궁, 백작약을 동일 무게 비율로 혼합하여 열수추출한 것을 HIM-I으로 명명하고 그 효과를 관찰하였다.

생약복합물(HIM-I)의 면역세포 활성화 효과 검증

시험관 내에서 시료가 림프구를 자극하여 증식시키는 정도를 측정한 결과, 생약복합물 HIM-I 처리군에서 2일 및 3일 배양 후에 [3H]-TdR 흡수 정도(cpm)가 음성대조군에 비해 현저하게 증가되었다(Fig. 2A). 이는 한약처방제 6종 중 가장 높은 효과를 보인 보중익기탕보다 3배 이상 높은 수준이었다. 구성 생약 중에서는 당귀 및 천궁 처리군에서 현저하게 높은 증식 효과를 보임으로써, 이들이 면역세포 활성화에 유효 물질로 작용하며 복합으로 상승효과를 나타내는 것으로 평가되었다. 또한, 생약복합물 HIM-I 처리 농도 별로 보면 100 μ g/mL 농도까지 급격하게 증가하고 200 μ g/mL 농도 이상에서는 plateau를 나타내었다(Fig. 2B).

생약복합물(HIM-I)의 조혈계 촉진효과 검증

골수세포 증식효과: 조혈계 촉진효과를 알아보기 위하여, 시험관 내에서 골수세포 배양 시에 시료를 첨가하여 증식된 골수간질세포(bone marrow stromal cells)의 수를 측정하였다. 그 결과, 본 생약복합물 HIM-I 첨가 시험군에서 골수간질세포 수가 음성대조군에 비해 4.8배로 현저하게 증

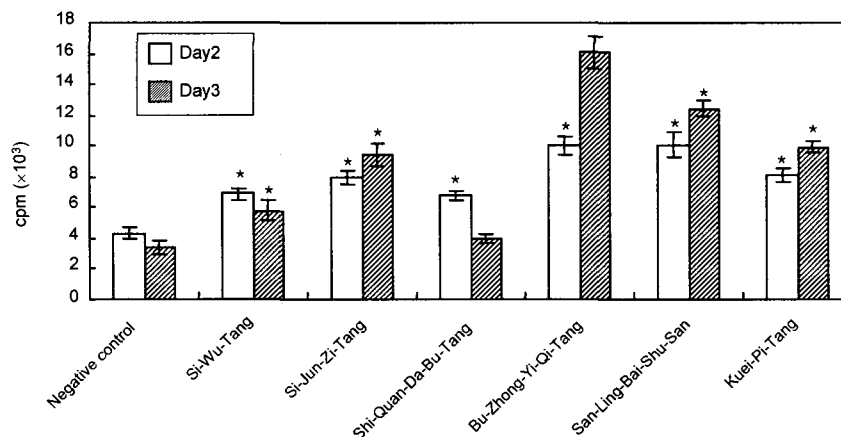


Fig. 1. Effects of traditional oriental herb prescriptions on the lymphocyte proliferation.

Mouse lymphocytes were cultured in the presence of samples (100 μ g/mL) for 2 or 3 days, and their proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation assay (mean \pm SD).

**p* < 0.01 as compared with the negative control.

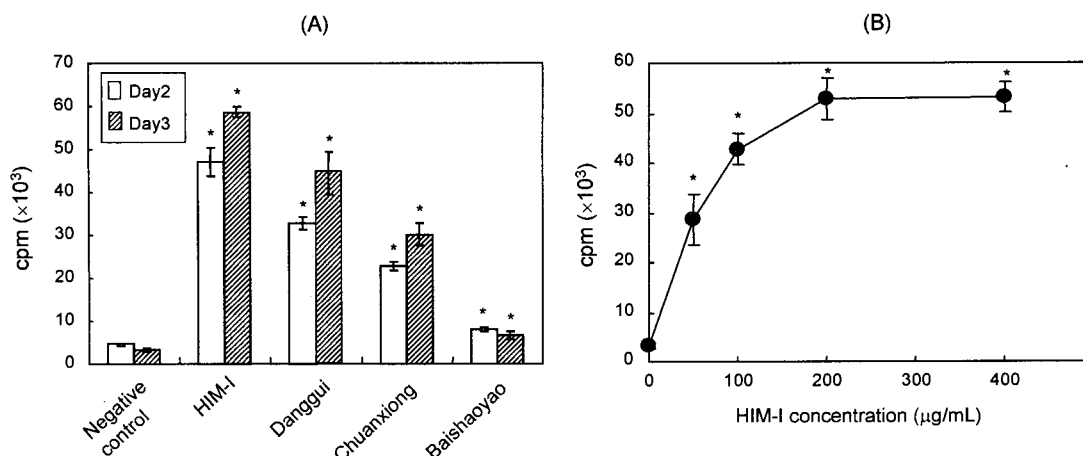


Fig. 2. Effects of HIM-1 and its ingredient herb extracts on the lymphocyte proliferation. Mouse lymphocytes were cultured in the presence of samples (100 µg/mL) for 2 or 3 days (A), or in the presence of various concentrations of HIM-1 for 3 days (B). At the end of the culture, lymphocyte proliferation was measured by [³H]-thymidine incorporation (mean ±SD). *p<0.01 as compared with the negative control.

가하였다(Fig. 3A). 구성 생약 중에서는 백작약 및 당귀가 조혈 촉진에 유효 물질로 작용하며 복합으로 상승효과를 나타내는 것으로 평가되었다. 또한, 생약복합물 HIM-I 처리 농도 별로 보면 100 µg/mL 농도까지 세포수가 급격하게 증가하고 200 µg/mL 농도 이상에서는 plateau를 나타내었다(Fig. 3B). 특히, 조혈계의 미세환경에서 골수간질세포는 조혈작용에 필요한 여러 가지 cytokine을 생산하고 조혈전구세포와의 접촉자극 등을 통하여 궁극적으로 조혈전구세포의 분화증식을 촉진시키는 것으로 알려지고 있으므로(39, 40), 본 생약복합물은 1차적으로 골수간질세포를 자극하여 증식시킴으로써 조혈촉진효과를 나타내는 것으로 생각된다.

생약복합물(HIM-I)의 조혈계 방어효과 검증
방사선(6.5 Gy) 조사 생쥐 모델에서 조혈모세포 방어 효

과를 관찰하기 위하여 비장내에 형성된 조혈세포 집락 수를 측정하였다. 그 결과, 생약복합물 HIM-I 투여군에서는 방사선 조사 대조군에 비해 약 5.4배(p<0.05)로 비장내 조혈세포 집락 수가 유의하게 증가되었다(Table 1). 이는 한약처방제 6종 중 높은 효과를 보인 보중익기탕 및 사물탕보다 다소 높은 수준이었다(30,34). 구성 생약 중에서는 백작약 및 천궁 투여군에서 비장집락수가 현저하게(p<0.05) 증가됨으로써, 이들이 유효 물질로 작용하는 것으로 나타났다.

생약복합물(HIM-I)의 재생조직 방어효과 검증
소장염 생존 증가 효과: 본 생약복합물 HIM-I 및 구성 생약이 대표적 재생조직의 하나인 소장염 생존에 미치는 영향을 검증하였다. 그 결과, 정상대조군의 공장단면 주변부의 염수는 평균 157개였으며, 방사선 조사(12 Gy) 대조군에서

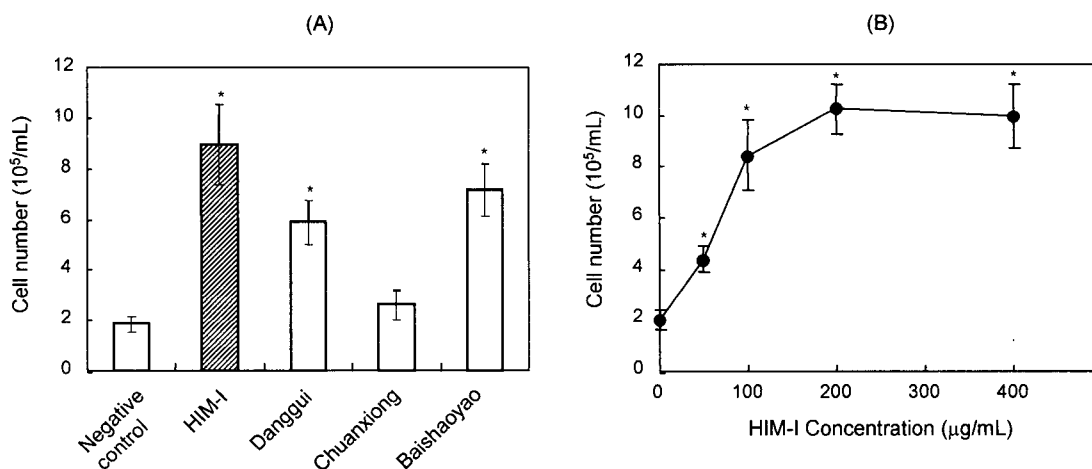


Fig. 3. Effects of HIM-1 and its ingredient herb extracts on bone marrow cell growth. Mouse bone marrow cells (1 × 10⁶ cells/mL) were cultured in the presence of samples (100 µg/mL) for 10 days (A), or in the presence of various concentrations of HIM-1 (B). At the end of the culture, the viable adherent cells were counted by trypan blue exclusion assay (mean ±SD). *p<0.01 as compared with the negative control.

Table 1. Effects of HIM-1 and its ingredients¹⁾ on endogenous spleen colony formation in irradiated mice

Groups	Number of colony
Irradiation control (6.5 Gy)	1.75±2.25 ²⁾
HIM-1 + irradiation	9.56±8.90*
Irradiation control	1.13±1.25
Danggui + irradiation	6.50±6.30*
Chuanxiong + irradiation	9.38±15.73
Baishaoyao + irradiation	15.00±17.33*

¹⁾HIM-1 or its ingredients (50 mg/kg of body weight) were given i.p. at 36 and 12 hours before irradiation.

²⁾Mean ± SD.

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

는 21개로 급격히 감소하였다. 생약복합물 HIM-1 병행 투여군에서는 방사선 조사 대조군에 비해 소장염 생존 수가 1.64 배(p<0.05)로 유의하게 증가되었다(Table 2). 이는 한약처방제 6종 중 높은 효과를 보인 한약처방제 사물탕보다 다소 낮은 평균 값을 보였으나, 개체 간의 편차를 감안하면 거의 같은 수준이었다(30,34). 구성 생약 중에서는 백작약 및 당귀

Table 2. Effects of HIM-1 and its ingredients¹⁾ on intestinal crypt survival in irradiated mice

Groups	Crypts per circumference
Unirradiated control	157.25±6.05 ²⁾
Irradiation control (12 Gy)	21.29±9.71
HIM-1 + irradiation	35.12±11.00*
Unirradiated control	157.00±14.82
Irradiation control	21.82±12.31
Danggui + irradiation	50.54±6.09**
Chuanxiong + irradiation	42.67±22.01
Baishaoyao + irradiation	49.05±12.64**

¹⁾HIM-1 or its ingredients (50 mg/kg of body weight) were given i.p. at 36 and 12 hours before irradiation.

²⁾Mean ± SD.

*p<0.05, **p<0.01 as compared with the irradiation control group.

투여군에서 소장염 생존이 유의하게(p<0.05) 증가됨으로써, 이들이 유효 물질로 작용한 것으로 생각되었다.

소장염 세포 자살(apoptosis) 억제 효과 : 낮은 방사선량에 의한 소장염 세포의 자살(apoptosis) 유발에 대한 방어 효과를 검증하였다. 그 결과, apoptotic cell은 염의 기저부에 주로 형성되었으며, H&E 염색상에서 핵염색질과 세포질의 농축 및 산호성 세포질의 특성을 나타내었고 ISEL 염색상에서 양성인 세포 및 apoptotic body가 관찰되었다(Fig. 4). Apoptotic cell의 수를 측정된 결과(Table 3), 정상대조군에서 염당 평균 0.084개가 관찰되었으며, 방사선 조사(2 Gy) 대조군에서는 현저하게 증가하였다. HIM-1 병행 투여군에서는 방사선 조사 대조군에 비해 유의하게(p<0.01) 감소되었다(억제율 37.4%). 이는 높은 효과를 보인 사물탕 및 보중익기탕보다 다소 높은 효과이었다(30,34). 구성 생약 중에서는 백작약 및 천궁 투여군에서 apoptotic cell의 수가 현저하게(p<0.05) 감소됨으로써, 이들이 유효 물질로 작용하는 것으로 나타났다.

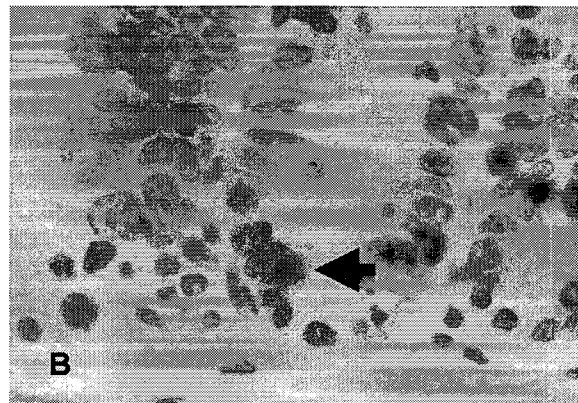
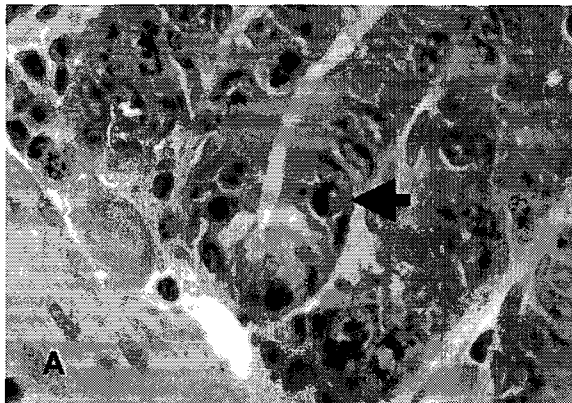
Table 3. Effects of HIM-1 and its ingredients¹⁾ on the incidence of cell death by apoptosis in crypt of intestine following irradiation

Groups	Apoptotic cells per crypt	
	Base	Total
Unirradiated control	0.062±0.032 ²⁾	0.084±0.024
Irradiation control (2 Gy)	3.688±0.444	3.906±0.536
HIM-1 + irradiation	2.212±0.415**	2.444±0.368**
Unirradiated control	0.068±0.032	0.084±0.024
Irradiation control	4.688±1.138	4.938±1.194
Danggui + irradiation	3.861±0.469	4.081±0.387
Chuanxiong + irradiation	2.519±0.335*	2.856±0.478*
Baishaoyao + irradiation	2.594±0.464*	2.806±10.429*

¹⁾HIM-1 or its ingredients (50 mg/kg of body weight) were given i.p. at 36 and 12 hours before irradiation.

²⁾Mean ± SD.

*p<0.05, **p<0.01 as compared with the irradiation control group.

**Fig. 4. Intestinal crypt cell apoptosis in mice exposed to γ -irradiation.**

Mice were exposed to 2 Gy of γ -irradiation and sacrificed 6 hours after the exposure. The slides in intestinal sections were observed under microscope ($\times 330$) after hematoxylin-eosin staining (A) or *in situ* DNA end-labeling (ISEL) (B). The arrow in (A) indicates the cell exhibiting pyknosis, and the arrow in (B) indicates the apoptotic cell.

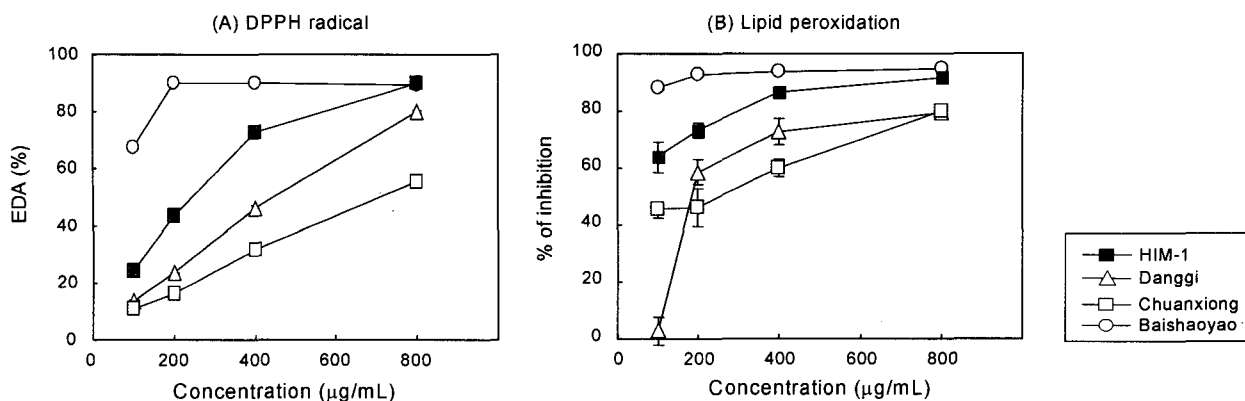


Fig. 5. Antioxidative activities of HIM-I and its ingredient herb extracts.

The antioxidative activities were measured by electron donating abilities (EDA) of samples toward DPPH radical (A), and by inhibitory activities on Fe^{2+} /ascorbate-induced lipid peroxidation of rat liver microsome (B).

생약복합물(HIM-I)의 항산화 효과 검증

항산화 효과를 알아보기 위해서, 시험관 내에서 DPPH radical 소거 활성 및 지질과산화 억제활성을 측정하였다. 그 결과, 생약복합물 HIM-I은 농도 100, 200, 400 µg/mL에서 각각 24.3, 43.4, 72.5%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며(Fig. 5A), 시험관 내에서 수산화 라디칼($\cdot OH$)에 의한 지질과산화에 대해서는 63.9, 73.5, 86.6%의 억제효과를 보였다(Fig. 5B). 구성 생약 중에서는 백작약이 가장 높은 항산화 효과를 보임으로써 유효 물질로 작용하는 것으로 나타났다. 특히, HIM-I의 항산화 효과는 방사선에 의한 생체손상의 많은 부분이 물 분자로부터 생성된 라디칼에 의한 산화적 손상이라는 점에서 그 작용기전의 일부를 해석하는 것이 될 것이다.

이상의 결과로 보아, 재생조직 방어, 조혈계 방어, 면역조혈 활성화 및 회복에 유효하게 작용하는 물질이 각각 서로 다르며, 본 생약복합물 HIM-I은 이 3가지 항목을 모두 충족시키는 생약복합물이라고 생각되었다. 또한, 방사선에 의한 산화적 손상이 주요인이 되는 동물모델에서 생체방호에 유효한 HIM-I은 최근 생체의 퇴행성 질환의 주 원인이 산화적 손상이라고 밝혀지고 있는 관점에서 관련 질환의 예방 및 회복에도 유용할 것으로 생각되었다.

요 약

방사선 생체손상의 방어 및 회복에 높은 효과를 나타내는 생약조합을 도출하고자 하였다. 이전의 연구에서 6가지 기준 보기·보혈 한약처방제의 방어효과를 검색하여, 재생조직 방어에는 사물탕 및 보중익기탕이, 조혈계 방어에는 보중익기탕 및 사물탕이 높은 효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서 기준 6가지 처방제의 면역세포 활성화 효과를 검색한 결과 모두 높은 효과를 나타내지 않았다. 따라서, 처방제의 구성 생약 각각의 효과검증 결과를 바탕으로 재생조직 방어, 조혈계 방어, 면역조혈계 회복 증진 효과

를 동시에 높게 나타내는 새로운 생약조합을 도출하였다. 즉, 당귀, 천궁, 백작약을 동일 무게 비율로 혼합하여 열수 추출한 것을 새로운 생약복합물 HIM-I으로 개발하였으며 그 효과를 검증하였다. 본 생약복합물 HIM-I은 면역세포 활성화에서는 상기한 한약처방제보다 월등하게 높은 효과를 보였으며, 조혈계 촉진효과도 높은 것으로 나타났다. 또한, 재생조직 및 면역조혈계의 방어 측면에서도 사물탕 및 보중익기탕과 같은 높은 효과를 보였다. 한편, 시험관 내에서 높은 항산화 효과를 나타내는 것으로 보아, 이 항산화 작용이 방사선 손상에 대한 방어효과의 작용기전 중의 하나로 생각되었다. 이상의 결과로 보아, 생약복합물 HIM-I은 재생조직 방어, 조혈계 방어, 면역조혈계 회복 증진 효과를 동시에 나타냄으로써 방사선뿐만 아니라 여러 가지 원인으로부터 생체를 방호하고 회복시키는데 유용할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- IAEA. 1978. Safety series No. 47: *Manual on Early Medical Treatment of Possible Radiation Injury*. IAEA, Vienna. p 74.
- NCP. 1980. Report No. 65: *Management of Persons Accidentally Contaminated with Radionuclides*. IAEA, Vienna. p 77.
- Hall EJ. 1988. *Radiobiology for the Radiologist*. 3rd ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. p 365-376.
- Patt H, Tyree M, Straube RL. 1949. Cystein protects against x-irradiation. *Science* 110: 213-214.
- Washburn LC, Carlton JE, Hayes RL. 1974. 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.

6. Sweeney TR. 1979. *A survey of compounds from the anti-radiation drug development program of the U.S. army medical research & development command*. Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC. p 55.
7. Cairnie AB. 1983. Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat Res* 94: 221-226.
8. Neta R, Douches S, Oppenheim JJ. 1986. Interleukin 1 is a radioprotector. *J Immunol* 136: 2483-2485.
9. Neta R. 1988. Role of cytokines in radioprotection. *Pharmacol Ther* 39: 261-266.
10. MacVittie TJ, Monroy RL, Patchen ML, Souza LM. 1990. 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.
11. Patchen ML, Macvittie TJ. 1983. Dose-dependent responses of murine pluripotent stem cells and myeloid and erythroid progenitor cells following administration of the immunomodulating agent glucan. *Immunopharmacology* 5: 303-313.
12. Milas L, Hunter N, Reid BO, Thames Jr HD. 1982. 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.
13. Milas L, Murray D, Brock WA, Meyn RE. 1988. Radioprotectors in tumor radiotherapy: Factors and settings determining therapeutic ratio. *Pharmacol Ther* 39: 179-189.
14. Potten CS. 1995. Interleukin-11 protects the clonogenic stem cell in murine small-intestinal crypts from impairment of their reproductive capacity by radiation. *Int J Cancer* 62: 356-361.
15. Miyanomae T, Frindel E. 1988. Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation. *Exp Hematol* 16: 801-806.
16. Ohta S, Sakurai N, Sato Y, Inoue T, Shinoda M. 1990. Studies on chemical protectors against radiation. XXX. Radioprotective substances of *Cnidii rhizoma*. *Yakugaku Zasshi* 110: 746-754.
17. Hsu HY, Lian SL, Lin CC. 1990. Radioprotective effect of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice. *Am J Chin Med* 18: 61-69.
18. Quan HX, Li HS. 1994. Effects of *radix Astragali* on hemopoiesis in irradiated mice. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih* 19: 741-743.
19. Yonezawa M, Katoh N, Takeda A. 1981. Restoration of radiation injury by *ginseng*. II. Some properties of the radioprotective substances. *J Radiat Res Tokyo* 22: 336-343.
20. Zhang JS, Sigdestad CP, Gemmell MA, Grdina DJ. 1987. Modification of radiation response in mice by fractionated extracts of *Panax ginseng*. *J Radiat Res Tokyo* 112: 156-163.
21. Kim SH, Cho CK, Yoo SY, Koh KH, Yun HG, Kim TH. 1993. *In vivo* radioprotective activity of *Panax ginseng* and diethyldithiocarbamate. *In Vivo* 7: 467-470.
22. Kim SH, Jeong KS, Ryu SY, Kim TH. 1998. *Panax ginseng* prevents apoptosis in hair follicles and accelerates recovery of hair medullary cells in irradiated mice. *In Vivo* 12: 219-222.
23. Ikeda S, Kaneko M, Kumazawa Y, Nishimura C. 1990. Protective activities of a Chinese medicine, hochu-ekki-to, to impairment of hematopoietic organs and to microbial infection. *Yakugaku Zasshi* 110: 682-687.
24. Ohnishi Y, Yasumizu R, Fan HX, Liu J, Takao-Liu F, Komatsu Y, Hosoya E, Good RA, Ikehara S. 1990. Effects of juzen-taiho-toh (TJ-48), a traditional Oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice. *Exp Hematol* 18: 18-22.
25. Hsu HY, Hau DM, Lin CC. 1993. Effects of kuei-pi-tang on cellular immunocompetence of gamma-irradiated mice. *Am J Chin Med* 21: 151-158.
26. Fujii Y, Imamura M, Han M, Hashino S, Zhu X, Kobayashi H, Imai K, Kasai M, Sakurada K, Miyazaki T. 1994. Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: nun-jin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *Int J Immunopharmacol* 16: 615-622.
27. Hsu HY, Ho YH, Lin CC. 1996. Protection of mouse bone marrow by Si-Wu-Tang against whole body irradiation. *J Ethnopharmacol* 52: 113-117.
28. Hsu HY, Yang JJ, Lian SL, Ho YH, Lin CC. 1996. Recovery of the hematopoietic system by Si-Jun-Zi-Tang in whole body irradiated mice. *J Ethnopharmacol* 54: 69-75.
29. Halliwell B, Gutteridge JM. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, New York. p 604-607.
30. Lee SE, Oh H, Yang JA, Jo SK, Byun MW, Yee ST, Kim SH. 1999. Radioprotective effects of two traditional Chinese medicine prescription: Si-Wu-Tang and Si-Jun-Zi-Tang. *Am J Chin Med* 27: 387-396.
31. Lee SE, Oh H, Yang JA, Chung CY, Jang JS, Jo SK, Byun MW, Kim SH. 1999. The radioprotective effects Sam-Ryung-Baek-Chul-San (San-Ling-Bai-Shu-San) as a prescription of traditional Chinese medicine in irradiated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 444-451.
32. Kim SH, Lee SE, Oh H, Yang JA, Chung CY, Jang JS, Yu YB, Jo SK. 1999. The radioprotective effects of Kuei-Pi-Tang as a prescription of traditional Chinese medicine in mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 698-704.
33. Jo SK, Yu YB, Oh H, Kim SR, Kim SH. 2000. The effects of Shi-Quan-Dai-Bu-Tang and ingredients on the survival of jejunal crypt cells and hematopoietic cells in irradiated mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 93-98.
34. Kim SH, Lee SE, Oh H, Kim SR. 2002. The radioprotective effects of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang: A prescription of traditional Chinese medicine. *Am J Chin Med* 30: 127-137.
35. Hartzman RJ, Bach ML, Bach FH. 1972. Precipitation of radioactivity labeled samples, a semi-automatic multiple-sample processor. *Cell Immunol* 4: 182-186.
36. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van Velde CJH, Cornelius CJ, Van Dierendonck JH. 1993. A new method to detect apoptosis in paraffin section: In situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41: 7-12.
37. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200.
38. Bidlack WR, Tappel AL. 1973. Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* 8: 177-182.
39. Till JE, McCulloch EA. 1980. Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 605: 431-459.
40. Metcalf D. 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 229: 27-30.

(2005년 3월 4일 접수; 2005년 5월 30일 채택)