

## 생쥐에서 키토산올리고당의 감마선 저항 효과

김정삼<sup>1,2</sup>, 노영복<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>목포과학대학 방사선과, <sup>2</sup>조선대학교 자연과학대학 생물학과

### Protective Effects of Chitosan oligosaccharide on Gamma Ray-Induced Hepatic Damage in Mice

Jung-Sam Kim<sup>1,2</sup> and Young-Bok Roh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Radiological Technology, Mokpo Science College, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Biology, College of Natural Science, Chosun University Korea

(Received June 2, 2003; Received June 16, 2003)

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effect the radiation resistance of chitosan on the mice. A healthy male ICR mice were used for experiment.

The SOD and MDA activity was measured from the liver of mice at 48 and 72 hours after the irradiation. The ultrastructural changes of the liver by irradiation was observed at 24, 48 and 72 hours after irradiation.

The experimental groups were divided into three groups. Group 1 was the control group which was not treated with chitosan oligosaccharide before or after irradiation. Group 2 was the prefeeding group which chitosan oligosaccharide solution was supplied by feeding *ad libitum* for 30 days before irradiation. Group 3 was the postfeeding group which chitosan oligosaccharide solution was supplied by feeding after irradiation. In all groups 10 mice were used.

The results were as follow:

The SOD and MDA activity of the prefeeding group was decreased significantly ( $P < 0.01$ ).

Control group The nuclei were condensed. The mitochondria and rough endoplasmic reticulum (rER) were extended and the ribosome was dropped from the rER.

Prefeeding group The nuclei were rounded. The mitochondria was elongated. And the rER attached ribosomes.

Postfeeding group The nuclei were slightly condensed. The mitochondria and the rER were extended and the ribosome was dropped from the rER.

It was concluded that the chitosan oligosaccharide was effective in the radiation protection. So, chitosan would have the potential as the radiation protection materials.

**Key words** : Chitosan oligosaccharide, Gamma ray, MDA, SOD, Ultrastructure

\* Correspondence should be addressed to Dr. Young-Bok Roh, Department of Biology, College of Natural Sciences, Chosun University, 375, Seosuk-dong, Gwangju, 501-759, Korea. Ph.: (062)230-6654, FAX: (062)230-7984. E-mail: ybno@chosun.ac.kr  
Copyright © 2003 Korean Society of Electron Microscopy

## 서 론

방사선은 직접작용과 간접작용으로 생물체내에서 반응한다. 직접작용은 전리방사선, proton이 이온 혹은 DNA에 직접 반응하는 경우이며, 간접작용은 전리방사선, proton 등이 free radical을 생성해서 생물학적 거대분자(예, DNA, RNA, proteins)에 피해를 입히는 경우이다. X-ray와 Gamma ray는 전리방사선에 해당되고, ultra violet(이하 U.V.라 함) 보다 훨씬 더 인체 내에 침투하기 쉽다. 방사선방어 작용을 위해서는 시간, 거리, 차폐 등이 고려되어야 하며, 방사선방어의 기본 원칙은 행위의 정당화, 방어의 최적화, 선량한도 등이다(Euclid, 1997).

생명체가 방사선에 피폭 당하면 DNA를 포함한 세포구성물에 치사, 세포괴사, 세포고사 등과 같은 심각한 피해를 준다. free radical은 초기 염증반응 신호분자로서 작용한다. 세포의 항산화 방어기전에는 민감성 물질(예, DNA) 분획, 항산화 효소(예, superoxide dismutase, 이하 SOD라 함)에 의한 reduced oxygen species(이하, ROS라 함) 제거, apoptosis 개시, cellular thios(예, glutathione)의 radical scavenger, DNA 복제 억제, chain-breaking 항산화제(예,  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate)등이 있다(Riley, 1994). 조직은 방사선에 피해를 입을 경우 쉽게 free radical, hydrogen peroxide를 발생한다. 세포는 glutathione, SOD, catalase, DNA repair enzymes 등 방사선에 대해 방어기전을 가지고 있지만, 방사선량이 증가하면 방어 기전도 힘들다.

살아 있는 세포의 방사선 및 약물에 의한 DNA 손상 및 산화적 손상을 측정하는 생물학적 지표로는 염색체이상(chromosome aberration, 이하 CA라 함), DNA-hydroxylation 산물, protein-hydroxylation 산물, FISH(Karbownik & Reiter, 2000; Vijayalaxmi et al., 1995) 등이며, 전리방사선에 의한 lipid의 피해는 polyunsaturated fatty acids(이하, PUFA라 함)와 free radical 반응을 통해 유도되어지는 malondialdehyde(이하, MDA라 함)와 4-hydroxy alkenals(이하, 4-HDA라 함) 등을 포함하고 있는 thio barbituric acid reactive substances(이하, TBARS라 함), isoprostane 등의 측정이 있다(Karbownik & Reiter, 2000).

방사선의 생체에 대한 방어물질로서 현재까지 학계에 보고된 물질로는 Macro Glucan( $\beta$ -1,3 glucan), TMG(D-glicopyranosyl Methyl-2, 5, 7, 8-Tetramethyl chroman, vitamin E 유도체, 이하 TMG라 함), Guarana(Paullinia cupana), propolis, EEM(extracts of edible mushrooms, 이하 EEM이라 함), green tea(Katiyar et al., 2001), vitamin(Ashraf et al., 1999; Helmut & Wilhelm, 1995), thio 제제(Murray et al., 1988), melatonin(Blickenstaff et al., 1993), cysteine, cysteamine과 같은 thio 제제(Patt et al., 1949) 등이 최근 국내, 외 학계에서 연구되어지고 있다(KARP, 2000, 2001). 하지만, 이들 물질 등은 현재 연구 진행 단계로 아직까지 효능 및 실용성에 대한 의문이 제기되어지고 있으며, 정상 세포와 종양 세포 표적 및 특성 등 심각한 임상적 어려움에 직면해 있다.

키틴(chitin)은 자연계에서 유일한 염기성 폴리머로 사상균, 효모, 오징어, 동물성플랑크톤, 게, 새우 및 곤충 등의 균류 및 갑각류에 많이 분포되어 있다. 이 키틴 성분은 이용성 분야에서 산, 염기 및 유기용매로 처리시 안정화되어 여러 기능성 물질로 실용화하는데 한계가 있다(Kim et al., 2001). 키틴은 외골격의 주요 구성 성분인 N-Acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ -1, 4로 결합한 점액다당류의 일종으로 이를 탈아세틸화(deacetylation, 이하 DAC라 함)하면 키토산(Chitosan)이 된다(Kim, 1997). 키토산은 D-glucosamine과 N-acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ (1.4)-글리코시드 결합으로 연결되어 있다. 키토산은 생체에 무독성이며, 생분해가 되므로 환경친화적인 천연 고분자 양이온이며(Arai et al., 1968), 방사성스트론튬 체외 배출 효과(Kim et al., 1997, 1999), 인공피부(Hirano et al., 1991), 항암작용(Okamoto et al., 1995), 상처치료제(Tsurutani et al., 1995), 키틴분해효소 및 식물세포의 활성화제(Koga, 1993), 화장품(Skjak et al., 1988), 혈중 콜레스테롤 강화제(Sugano et al., 1988), 의약품 전달체(Tokura et al., 1992), 유전자 운반체(gene carrier)로 사용이 가능하다(Simon et al., 1999; Lee et al., 2001).

본 연구에서는 인체에 심각한 피해를 유발시키는 감마방사선에 대해 키토산의 방사선 방어 효과를 알아보기 위하여 SOD, MDA 활성도, 간 미세조직의 변화를 생쥐를 통해 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. SOD 및 지질과산화 측정

#### 1) SOD 측정

간조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 homogenizer (10,000 × g, 2 min)로 균질화 하였다. 이 균질액을 4°C, 600 × g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미균질액 부분을 제거한 후 상층액을 4°C, 15,000 × g에서 20분간 원심분리하여 SOD 활성도 측정의 효소원으로 사용하였다. SOD 활성도를 측정하는 kit는 OxisResearch™ (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 실험 순서는 다음과 같다. kit에 준비된 buffer 900 µl에 시료 100 µl를 넣고 vortex에서 잘 섞었다. 그 후, 40 µl를 추출하여 kit R2 용액 30 µl를 첨가한 후 1분간 37°C에서 incubation 시키고, vortex에서 잘 섞었다. 시료를 추출한 후, UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하여 SOD 활성도를 확인하였다.

#### 2) 지질과산화 측정

간조직의 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer (pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 homogenizer (10,000 × g, 2 분)로 균질화하였다. 이 균질액을 4°C, 600 × g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미균질액 부분을 제거한 후 상층액을 4°C, 15,000 × g에서 20분간 원심분리하여 MDA 활성도 측정의 효소원으로 사용하였다. MDA 활성도를 측정하는 kit는 OxisResearch™ (U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 실험 순서는 다음과 같다. 먼저 kit에 준비된 proboicol 10 µl와 시료 200 µl를 tube에 넣은 후, kit R1 용액 640 µl를 넣고 vortex에서 잘 섞었다. 그 후, kit R2 용액 150 µl를 넣고 vortex에서 잘 섞은 다음 45°C incubator 속에서 60분간 보관하였다. 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 96 well 배양 용기에 각각의 시료를 담았다. UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 586 nm에서 흡광도를 측정하여 MDA 활성도를 확인하였다.

### 2. 전자현미경적 연구

실험군은 1) 방사선조사 후 일반 식이를 공급한 대조군, 2) 0.1 mg/ml 키토산올리고당 수용액을 30일간 음용수를 통해 *ad libitum* 방식으로 공급한 후 방사선을 조사한 군, 3) 방사선 조사 후 0.1 mg/ml 키토산올리고당 수용액을 음용수를 통해 *ad libitum* 방식으로 공급한 군으로 각 실험군 당 생쥐 10마리를 한 개 실험군으로 하였다. 각각 실험군별로 적출된 간조직은 신속하게 1 mm<sup>2</sup>의 크기로 잘라서 2.5% glutaraldehyde 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액, 4°C)에서 2시간 전고정 하였다. 전고정한 후, 동일 완충액을 사용하여 3회 수세하였다. 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) 용액 (pH 7.4, 0.1 M cacodylate 완충액, 4°C)로 2시간 후 고정한 후, 동일 완충액으로 3회 수세하였다. 저농도의 ethanol (50%)로 부터 ethanol 계열하에 탈수하고, propylene oxide를 사용하여 치환시켰다. epon mixture를 만들어 propylene oxide와 1:1, 1:2로 3시간씩 침투시켰으며, epon mixture 원액에서 over night 후 포매하였다. 그리고, 37°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 열중합하였다. epon block을 1 µm로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하여 특정부위를 정하고 삭정한 뒤 Diatome을 부착시킨 Ultramicrotome (MT-7000)으로 60 nm의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 투과전자현미경 (JEOL, JEM-2000 FX II)으로 가속전압 80 kV하에서 관찰하였다.

### 3. 실험동물 및 키토산 공급

본 실험에 사용한 실험동물로는 (주)샘타코에서 생산, 공급하고 있는 ICR계 수컷 생쥐 (체중 25~35 g)를 사용하였다. 생쥐는 23 ± 2°C, 습도 45 ± 5%로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장 (40 × 25 × 17 cm)에서 사육하였으며, 사료(제일제당 제품)와 급수는 자유롭게 섭취시켰다.

키토산올리고당은 수용성으로서 분자량 10,000 이하의 (cps 5 이하, DAC 90% 이상) 이코바이오 (한국) 제품을 구입하여 생리식염수와 혼합하여 0.1 mg/ml을 제조하여 물병을 통해 *ad libitum* 방식으로 사료와 함께 공급하였다.

#### 4. Gamma-ray 조사

Cs-137 gamma irradiator (Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada, central dose rate = 529 Gy/h)를 이용하여 0, 3 Gy 선량을 조사하였다.

#### 5. 통계 처리

각 실험군 간의 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터의 SAS 통계 프로그램을 사용하여 ANOVA test 및 t-test에 의해서 검정하며, 각 P값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 고려하였다.

### 결 과

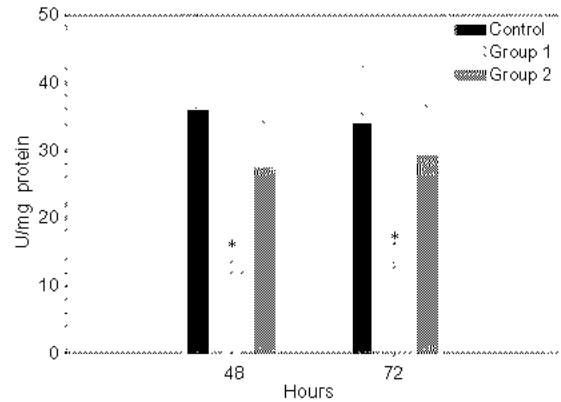
#### 1. 생쥐에서 방사선유도 SOD 활성도 측정

생쥐에 방사선을 조사한 후 시간 경과에 따른 SOD 활성도에 미치는 키토산올리고당의 효과를 관찰하였다 (Table 1, Fig. 1. 참조). 3 Gy 방사선을 조사한 후 일반 먹이를 공급한 대조군의 경우 48, 72시간째 SOD 수치는  $34.94 \pm 14.60$ ,  $33.72 \pm 10.00$  (unit: U/mg protein)이었다. 방사선을 조사하기 전 키토산올리고당을 30일간 선처치한 군에서는  $11.90 \pm 2.87$ ,  $12.45 \pm 3.62$ 이었으며 (unit: U/mg protein), 방사선을 조사한 후 키토산올리고당을 공급한 군에서는  $27.06 \pm 6.94$ ,  $28.92 \pm 7.39$  (unit: U/mg protein)의 수치를 보였다. 키토산올리고당을 방사선 조사 전에 선처치한 군의 경

**Table 1.** Changes of superoxide dismutase treated with chitosan oligosaccharide after irradiation

Times (hours)	Groups		Chitosan treatment (unit: U/mg protein)	
	Normal	Control	Chitosan treatment	
			Group 1	Group 2
48 h	$10.8 \pm 0.5$	$34.9 \pm 14.6$	$11.9 \pm 2.9^*$	$27.1 \pm 6.9$
72 h	$11.7 \pm 0.4$	$33.7 \pm 10.0$	$12.5 \pm 3.6^*$	$28.9 \pm 7.4$

\* $P < 0.01$  as compared with Control  
 Normal . No irradiation mice.  
 Control . General food was fed after irradiation.  
 Group 1. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied at 30 days by *ad libitum* before irradiation.  
 Group 2. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied by *ad libitum* after irradiation.



**Fig. 1.** Changes of superoxide dismutase treated with chitosan oligosaccharide after irradiation.

\* $P < 0.01$  as compared with control  
 Control. General food was fed after irradiation.  
 Group 1. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied at 30 days by *ad libitum* before irradiation.  
 Group 2. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied by *ad libitum* after irradiation.

우 SOD 수치를 감소시킴을 관찰하였다 ( $P < 0.01$ ).

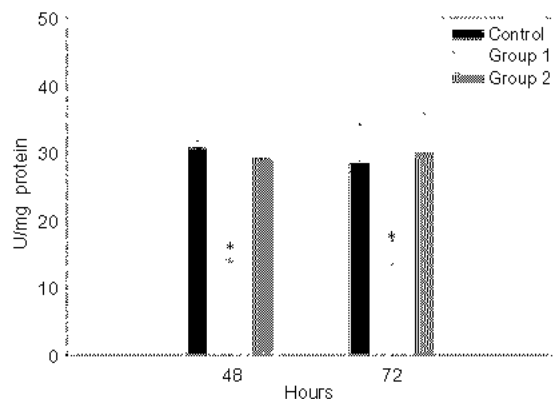
#### 2. 생쥐에서 방사선유도 MDA 활성도 측정

생쥐에 방사선을 조사한 후 시간 경과에 따른 MDA 활성도에 미치는 키토산올리고당의 효과를 관찰하였다 (Table 2, Fig. 2. 참조). 3 Gy 방사선을 조사한 후 일반 먹이를 공급한 대조군의 경우 48, 72시간째 MDA 수치는  $30.8 \pm 1.1$ ,  $28.6 \pm 5.8$  (nmol/g of tissue)이었다. 방사선을 조사하기 전 키토산올리고당을 30일

**Table 2.** Changes of malondialdehyde treated with chitosan oligosaccharide after irradiation

Times (hours)	Groups		Chitosan treatment (unit: nmol/g of tissue)	
	Normal	Control	Chitosan treatment	
			Group 1	Group 2
48 h	$12.6 \pm 0.6$	$30.8 \pm 1.1$	$13.8 \pm 0.5^*$	$29.3 \pm 1.3$
72 h	$13.7 \pm 0.5$	$28.6 \pm 5.8$	$13.4 \pm 3.6^*$	$30.0 \pm 5.9$

\* $P < 0.01$  as compared with Control  
 Normal . No irradiation mice.  
 Control . General food was fed after irradiation.  
 Group 1. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied at 30 days by *ad libitum* before irradiation.  
 Group 2. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied by *ad libitum* after irradiation.



**Fig. 2.** Changes of malondialdehyde treated with chitosan oligosaccharide after irradiation.

\* $P < 0.01$  as compared with control

Control. General food was fed after irradiation.

Group 1. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied at 30 days by *ad libitum* before irradiation.

Group 2. Chitosan oligosaccharide solution (0.1 mg/ml) was supplied by *ad libitum* after irradiation.

간 선처치한 군에서는  $13.8 \pm 0.5$ ,  $13.4 \pm 3.6$ 이었으며 (nmol/g of tissue), 방사선을 조사한 후 키토산올리고당을 공급한 군에서는  $29.3 \pm 1.3$ ,  $30.0 \pm 5.9$  (nmol/g of tissue)의 수치를 보였다. 키토산올리고당을 방사선 조사 전에 선처치한 군의 경우 MDA 수치를 감소시킴을 관찰하였다 ( $P < 0.01$ ).

### 3. 생쥐에서 방사선유도 간 미세조직의 변화

정상군에서 간세포의 핵은 비교적 원형을 이루고 있었으며, 여러 형태의 미토콘드리아가 풍부하게 분포하고 있으며, 조면소포체는 층판 구조가 관찰되었다 (Fig. 3).

방사선 조사 후 24시간째 간 미세구조의 변화는 다음과 같다. 키토산을 처치하지 않고 방사선을 조사한 실험군 1의 핵은 약간 불규칙 형태이며, 미토콘드리아는 팽대 되고 자가용해 현상이 관찰되며, 조면소포체는 내강이 팽대하고 분절된 상태로 관찰되었다 (Fig. 4A). 키토산을 선처치 한 실험군 2의 핵은 원형에 가깝고 미토콘드리아는 타원형 형태로 관찰되며, 조면소포체는 층판 구조를 형성함이 관찰되었다 (Fig. 4B). 키토산을 후처치 한 실험군 3의 핵은 약간 함입

되어 있고, 미토콘드리아는 팽대하며, 조면소포체는 일부에서 층판 구조를 형성하고 리보솜 탈락 현상이 관찰되었다 (Fig. 4C).

방사선 조사 후 48시간째 간 미세구조의 변화는 다음과 같다. 키토산을 처치하지 않고 방사선을 조사한 실험군 1의 핵은 약간 불규칙 형태이며, 미토콘드리아는 팽대되고 내강이 파괴됨을 관찰하였고, 조면소포체는 심하게 팽대되어 층판 구조가 파괴되고 다수의 용해소체가 관찰되었다 (Fig. 5A). 키토산을 선처치 한 실험군 2의 핵은 불규칙하고, 미토콘드리아는 약간 팽대되고, 조면소포체도 약간 팽대함을 관찰하였다 (Fig. 5B). 키토산을 후처치 한 실험군 3의 핵은 불규칙한 형태로 관찰되었고, 미토콘드리아는 팽대하며, 조면소포체는 약간 팽대하였으며, 리보솜 탈락 현상이 관찰되었다 (Fig. 5C).

방사선 조사 후 72시간째 간 미세구조의 변화는 다음과 같다. 키토산을 처치하지 않고 방사선을 조사한 실험군 1의 핵은 약간 불규칙 형태이며, 미토콘드리아는 팽대되고, 조면소포체는 내강이 팽대함이 관찰되었다 (Fig. 5A). 키토산을 선처치 한 실험군 2의 핵은 거의 원형에 가깝고 미토콘드리아는 원형 형태로 관찰되며, 조면소포체는 약간 팽대함이 관찰되었다 (Fig. 6B). 키토산을 후처치 한 실험군 3의 핵은 약간 함입되어 불규칙한 형태이며, 미토콘드리아는 약간 팽대하며, 조면소포체는 일부에서 층판 구조를 형성함이 관찰되었다 (Fig. 6C).

## 고 찰

Castillo et al. (2000)은 rutin, diosmin, ascorbic acid, (+)-catechin, *V. vinifera* seed extract (이하, GSE라 함)를 이용한 antioxidant capacity (이하, ABTS<sup>++</sup>라 함)를 관찰하기 위해 각각의 용액 50  $\mu$ M을 첨가한 후 항산화능력을 측정하였는데, GSE가 가장 높은 항산화능을 보였으며, rutin > (+)-catechin > diosmin > ascorbic acid 순이라고 보고하였다. Sasaki et al. (2000)은 *in vitro*에서 인체피부각막 (human keratinocyte, 이하 HaCaT라 함) 세포주에 DDC (0.1 mM, 1 mM)를 UVB (10, 20, 30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) 조사 90분 전에 세포 배양액

에 처치하고, Cu, Zn-SOD 발현량이 DDC 0.1 mM, 1 mM를 첨가한 실험군에서 DDC를 첨가하지 않은 실험군에 비해 SOD 발현량이 72%, 48% 정도 감소하였다고 보고하였다. Joksic et al. (2000)도 proton (22.6 MeV, dose rate 1 Gy/min)과 X-ray (300 KeV, dose rate 1 Gy/min) 0~4 Gy 선량을 인체 림프구에 조사하고, SOD의 발현을 관찰하였다. proton과 X-ray 조사 후 공통적으로 SOD는 proton의 경우 CuZnSOD, MnSOD 모두 선량이 증가할수록 대조군 (147.2 U/mg protein, 19.5 U/mg protein)에 비해 수치가 감소 (45.9~100.4 U/mg protein, 11~16.1 U/mg protein)하였고, X-ray의 경우 CuZnSOD 수치는 대조군 (141.24 U/mg protein)에 비해 0.5~1 Gy에서는 증가 (144.48~168.19 U/mg protein)하는 경향을 보이다가 2~4 Gy에서는 약간 감소 (113.91~132.29 U/mg protein)하는 경향이 나타났고, MnSOD 수치는 모든 선량에서 대조군 (15.3 U/mg protein)에 비해 증가 (16.25~29.85 U/mg protein)하였다고 보고하였다. 하지만, 전리방사선 종류에 따라서는 SOD의 경우 X-ray에서 MnSOD 측정이 효과적이지만, proton의 경우는 효과가 없다고 보고하였다. 또한, Ueda et al. (1993)은 ddy 생쥐에 dimethyl sulfoxide (이하, DMSO (i.p. 0.11 g/mouse)라 함)를 9 Gy  $^{60}\text{Co}$ -감마선 조사 30분전에 복강 처치하고 SOD 발현을 관찰한 실험에서 DMSO를 처치하지 않은 실험군의 경우  $30.65 \pm 2.2$  ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein)이고, DMSO를 처치한 군에서는  $22.93 \pm 1.42$  ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein)로 SOD 수치를 감소시켰다고 보고하였다. 본 실험에서는 3 Gy  $^{137}\text{Cs}$ -감마선을 생쥐에 전신 조사하고 SOD 발현량을 관찰하였는데, 키토산을 처치하지 않고 방사선을 단독 조사한 실험군에 비해 키토산을 방사선 조사 전 선처치한 군에서 30% 정도 감소함을 관찰할 수 있었다. 이는 키토산이 본 실험에서 간 조직의 빠른 회복을 유도하기 때문에 SOD 발현을 감소시킨 것이라고 생각된다. Lebrun et al. (2002)은 쥐에 8 Gy  $^{60}\text{Co}$ -감마방사선을 전신 조사한 다음, 조사 후 1, 4, 7일 후에 소장을 절개하여 방사선에 의한 MDA 및 막 효소(LAP)와의 상관 관계 연구를 통해서 조사 4일째 군에서 막 효소 활성능이 감소하면서 MDA 생산이 증가한다고 보고하였다. Kim et al. (2001)은 인체 피부 섬유아세포 (human skin

fibroblast)에 melatonin 처치 ( $10^{-5}\text{M}$ )한 후 8 Gy X-선을 조사한 후, 24시간째 MDA 발현의 경우 8 Gy 방사선 단독 조사 군에 비해 melatonin 처치 군에서 44% 감소한다고 보고하였다. 본 실험에서는 3 Gy  $^{137}\text{Cs}$ -감마선을 생쥐에 전신 조사하고 MDA 발현량을 관찰하였는데, 키토산을 처치하지 않고 방사선을 단독 조사한 실험군에 비해 키토산을 방사선 조사 전 선처치한 군에서 48, 72시간째에 44%, 46% 정도 감소함을 관찰하여 Kim 등의 연구 결과와 비슷한 결과를 알 수 있었다. 이는 전자현미경을 통한 조직학적 관찰에서 키토산을 선처치한 군에서 다른 실험군에 비해 간 세포의 핵막 구조가 원형에 가까운 정상적 구조를 보여 MDA 수치가 키토산을 처치하지 않은 실험군에 비해 감소한 것으로 생각된다.

Ueda et al. (1993)은 ddy 생쥐에 dimethyl sulfoxide (이하, DMSO (i.p. 0.11 g/mouse)라 함)를 9 Gy  $^{60}\text{Co}$ -감마선 조사 30분전에 복강 처치하고 전자현미경을 이용한 조직학적 관찰에서 방사선에 피폭된 간의 미토콘드리아가 확장되었으나, DMSO를 처치한 군에서는 특별한 변화가 없었다고 보고하였다. 본 실험에서는 3 Gy  $^{137}\text{Cs}$ -감마선을 생쥐에 전신 조사하고 전자현미경을 이용한 조직학적 관찰에서 모든 실험군에서 미토콘드리아의 팽대 현상이 관찰되었지만, 키토산을 선처치한 군에서 다른 실험군에 비해 원형에 가까운 미토콘드리아가 관찰되어 빠른 회복이 진행됨을 알 수 있어 Ueda 등의 실험 결과와 일치한다고 할 수 있다. 마우스에 3 Gy 방사선을 전신 조사시 간 세포의 미토콘드리아는 분절화 되기 시작하고, 소포체의 층판 구조가 파괴된다 (Lee et al., 1999). 본 실험에서 조면소포체는 키토산을 처치하지 않고 3 Gy 단독 조사군에서 내강이 심하게 팽대하고, 층판 구조가 파괴되고 분절된 상태로 관찰되었으며, 키토산을 선처치한 군에서는 내강이 약간 팽대함을 관찰할 수 있어 키토산 선처치가 방사선 방어 효과가 있음을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 감마방사선 조사 후 키토산이 SOD와 MDA 활성을 감소시켰고, 간 미세조직 손상이 빠르게 회복됨을 알 수 있어 키토산이 방사선 방어 예방 제재로서 가능성이 있음을 확인하였다. 하지만, 본 연구에서 보강해야 할 점으로는 방사선 유도

관련 단백질 발현, DNA 회복 과정과 키토산과의 상관관계 등과 같은 생화학적 및 분자생물학적 접근이 더 보강되어야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Arai K, Kinumaki T, Fujita T: Toxicity of chitosan. Bull Tokai Reg Fish Tes Lab 333 : 89-94, 1968.
- Ashraf BAN, Mohamed HAW, Foad FA: Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. Pharm Res 40(2) : 183-187, 1999.
- Blickenstaff RT, Brandstadter SM, Reddy S, Witt R: Potential radioprotective agents: 1. Homologs of melatonin. J Pharm Sci 83 : 216-218, 1994.
- Helmut S, Wlihelm S: Vitamin E and C,  $\beta$  carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr 62 : 1315S-1321S, 1995.
- Hirano SM, Iwata K, Nakayama H, Toda H: Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbit. Agric Biol Chem 55 : 2623-2625, 1991.
- Joksic G, Pajovic SB, Stankovic M, Pejic S, Kasapovic J, Cuttone G, Calonghi N, Masotti L, Kanazir DT: Chromosome aberrations, micronuclei, and activity of superoxide dismutases in human lymphocytes after irradiation in vitro. Cell Mol Life Sci 57 : 842-850, 2000.
- Karbownik M, Reiter RJ: Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. Exp Bio Med 225 : 9-22, 2000.
- KARP: Proceeding of the Korean Association for Radiation Protection, November 3-4, 2000.
- KARP: Proceeding of the Korean Association for Radiation Protection, November 1-2, 2001.
- Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H: Green tea polyphenol (epigallocatechin 3 gallate(EGCG) treatment of human skin inhibits ultra violet radiation induced oxidative stress. Carcinogenesis 22(2) : 287-294, 2001.
- Kim BC, Shon BS, Ryoo YW, Kim SP, Lee KS: Melatonin human skin fibroblasts. J Dermatol Sci 26 : 194-200, 2001.
- Kim JH, Yoo KJ, Song HC, Kim HK: Antiparasitic effects of chitosan oligosaccharides against scuticociliatids collected from Japanese flounder, *Paralichthys Olivaceus*. Kor J Chitin Chitosan 6 : 47-52, 2001.
- Kim YH, Bom HS, Kim KY, Kim HK, Kim JY: Inhibitory effect of chitosan on the milk transfer of radiostrontium from contaminated mice to their sucklers. Kor J Chitin Chitosan 4 : 15-18, 1999.
- Kim SE, Lee EH: Biocompatibility and medical applications of chitin and chitosan (Technical reports). Kor J Chitin Chitosan 2 : 39-74, 1997.
- Kim YH, Roh YB, Kim KY, Bom HS, Kim JY: Reducing Fetal Contamination of Radiostrontium by Water Soluble Chitosan. Kor J Biol Sci 1 : 337-340, 1997.
- Koga D : Induction of chitinase for plant self defense. Chitin /Chitosan symposium, in Japan. Chitin/Chitosan research 4 : 26, 1993.
- Lebrun F, Benderitter M, Berroud A, Voisin P, Griffiths NM: Potential role of the membrane in the development of intestinal cellular damage after whole body gamma irradiation of the rat. Can J Physiol Pharmacol 80 : 686-693, 2002.
- Lee MH, Nah JW, Kwon YM, Koh JJ, Ko KS, Kim SW: Water soluble and low molecular weight chitosan based plasmid DNA delivery. Pharmaceutical Res 18(4) : 427-431, 2001.
- Murray D, Vanankeren SC, Milas L, Meyn RE: Radioprotective action of aminothios *in vitro* and *in vivo*: comparison between effects on DNA damage and cell survival. Pharmac Ther 39 : 151-153, 1988.
- Okamoto Y, Ohmi H, Minami S, Matsuhashi A, Shigemasa Y, Okumura M, Fujinaga T: Anti tumor effect of chitin and chitosan on canine transmissible sarcoma. Chitin/Chitosan symposium, in Japan. Chitin/Chitosan res 1 : 76-77, 1995.
- Patt HM, Tyree EB, Staube RL, Smith DE: Cysteine protection against X irradiation. Sci 110 : 213-214, 1949.
- Riley PA: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. Int J Radiat Biol 65(1) : 27-33, 1994.
- Sasaki H, Akamatsu H, Horio T: Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT. J Invest Dermatol 114 : 502-507, 2000.
- Simon CWR, Hanno VJK, Ruth D: Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and

- protect DNA. International J Pharmaceutics 178 : 231-243, 1999.
- Skjak G, Anthonsen T, Sandford P: Chitin and chitosan : sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application. Elsevier Applied science. 1988.
- Sugano M, Watanabe S, Kishi A, Izume Z, Ohtakara A: Hypocholesterolemic action of chitosan with (ifferent viscosity in rats. Lipid 23 : 187-191, 1988.
- Tokura S, Miura Y, Kaneda Y, Uraki Y: Drug delivery system using biodegradable carrier. Chitin/Chitosan res, 314-324, 1992.
- Tsurutani R, Yoshimura M, Tanimoto N, Hasegawa A, Kifune K: Clinical application of chitin materials to ulcers. Chitin/Chitosan symposium, in Japan. Chitin/Chitosan res 1 : 78-79, 1995.
- Ueda T, Toyoshima Y, Kushihashi T, Hishida T, Yasuhara H: Effect of dimethyl sulfoxide pretreatment on activities of lipid peroxide formation, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the mouse liver after whole body irradiation. J Toxicol Sci 18 : 239-244, 1993.
- Vijayalaxmi, Belinda ZL, Thomas SD, Martin LM: Variability in adaptive response to low dose radiation in human blood lymphocyte: consistent results from chromosome aberration and micronuclei. Mutation Res 348 : 45-50, 1995.
- Lee Sang Suk, Park Young Sun, Kim Hong Tae, Ko Sung Jin : 『Radiation Biology』, Jung Mun Gak, 174-175, 250-251, 1999.
- Euclid Seeram : 『Radiation Protection』, Lippincott (U.S.A.), 73-85, 1997.

### <국문초록>

본 연구에서는 생쥐에서 키토산의 방사선저항성 효과를 알아보려고 하였다. 건강한 ICR 생쥐를 본 실험에 사용하였다.

SOD와 MDA는 방사선조사 후 48, 72시간째에 측정하였다. 간 미세구조는 방사선조사 후 24, 48, 72시간째에 측정하였다. 실험군은 세 가지로 나누었다. 실험군 1은 대조군으로 방사선 조사 후 키토산올리고당을 처치하지 않은 군, 실험군 2는 방사선조사 30일 전에 키토산올리고당 용액을 선처치 한 군, 실험군 3은 방사선조사 후 키토산올리고당을 처치한 군 등으로 각 실험군 당 10마리 생쥐를 사용하였다.

방사선조사 30일 전에 키토산올리고당 용액을 선처치한 군에서 SOD와 MDA 발현 수치가 감소함을 알 수 있었다( $P < 0.01$ ). 조직학적 결과는 다음과 같다. 방사선조사군 핵은 함입되어 불규칙한 형태이며 미토콘드리아는 팽대되고 내강이 파괴되었다. 조면소포체는 심하게 팽대되었고 리보솜의 탈락 현상이 관찰되었다. 선처치군 핵은 비교적 원형을 이루었고 미토콘드리아는 타원형의 형태로 관찰되었다. 조면소포체는 약간 팽대되었으나 리보솜이 부착된 형태로 관찰되었다. 후처치군 핵은 약간 함입되어 불규칙한 형태이고, 미토콘드리아는 약간 팽대되었다. 조면소포체는 약간 팽대되었고 일부에서 리보솜의 탈락 현상이 관찰되었다.

결론적으로 키토산올리고당이 방사선저항성 효과가 있어 방사선방어물질로 잠재력이 있다고 사료된다.



### FIGURE LEGENDS

\*All bar indicate 1  $\mu\text{m}$ .

N: nucleus

M: mitochondria

◀: rough endoplasmic reticulum

Ly: lysosome.

**Fig. 3.** An electron micrograph of hepatic cell of normal mice.

**Fig. 4A.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 24 hours (Irradiation control).

**Fig. 4B.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 24 hours (Prefeeding group).

**Fig. 4C.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 24 hours (Postfeeding group).

**Fig. 5A.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 48 hours (Irradiation control).

**Fig. 5B.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 48 hours (Prefeeding group).

**Fig. 5C.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 48 hours (Postfeeding group).

**Fig. 6A.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 72 hours (Irradiation control).

**Fig. 6B.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 72 hours (Prefeeding group).

**Fig. 6C.** An electron micrograph of hepatic cell of mice after irradiation at 72 hours (Postfeeding group).

