

프로폴리스가 X-선에 노출된 마우스 정소에 미치는 방사선 방어 효과

지태정 · 김종식¹ · 정형진² · 서울원^{1*}

가야대학교 방사선학과, ¹안동대학교 자연과학대학 생명과학과, ²안동대학교 생명자원과학부 생약자원전공

Received March 20, 2007 / Accepted May 3, 2007

Radioprotective Effects of Propolis on the Mouse Testis Exposed to X-ray. Tae Jung Ji, Jong Sik Kim¹, Hyung Jin Jeong² and Eul Won Seo^{1*}. *Dept. of Radiological Science, Kaya University, Goryeong 717-802, Korea, ¹Dept. of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea, ²School of Bioresource Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea* – The propolis is natural product produced by honeybees and is known to have many biologically useful properties such as anti-microbial, anti-oxidative and anti-tumorigenic activity. However, its radio-protective property has not been well studied. To investigate radio-protective effect of propolis on mouse testis, mice were supplemented with propolis after 5 Gy irradiation. The histological changes of testis were detected by TEM. The results indicate that propolis may protect tissue deformation which is induced by 5 Gy of ionizing radiation. Furthermore, to elucidate the potential molecular mechanisms involved in radio-protective property of propolis, we performed microarray experiments using oligo DNA microarray. We found 65 up-regulated genes and 224 down-regulated genes, whose expression levels were affected more than 2-fold by propolis treatment in mice irradiated at 5 Gy. We confirmed microarray data with reverse transcription-PCR using gene specific primers. The results of RT-PCR are highly correlated with those of microarray. These results may help understanding molecular mechanisms of radioprotective effects by propolis in mouse model.

Key words – propolis, radio-protection, microarray, testis

서 론

사람을 포함한 생물체에 방사선이 피폭되면, 물 혹은 세포와의 직접적인 상호작용을 통해 원자는 이온화되거나 여기 상태로 되며 분자는 변형된다. 방사선의 간접 작용에 의해 유리기와 이온기가 발생하게 되면 세포막의 불포화 지방산을 포함한 지질에 작용하여 과산화 반응을 촉진시키며, 세포의 산화적 손상을 유발하여 조직 형태의 변형을 초래하거나 기관의 기능 저하를 유도하게 된다[9,21]. 또한 방사선 에너지에 의해 DNA 이중 결합의 파괴나 분리를 초래하여 핵산 본래의 특성을 변화시킴으로써[4,19], 세포의 직접적인 사인이 되기도 하며, 손상을 입은 체세포가 잠재적으로 노화, 백혈병, 암과 같은 질병을 유발하는 요인으로 작용하기도 한다[5,6]. 방사선에 의한 이러한 부작용은 치료에 사용되는 진단용 방사선에 의해서도 발생하며[10,24], 고선량의 방사선이 조사되면 세포내 항산화 작용이 저하되고 이로 인해 유리 라디칼의 생성이 증가되기도 한다.

현재 질병의 진단 및 종양 치료에 방사선의 사용량이 증가됨에 따라, 이의 부작용을 완화시켜줄 수 있는 방사선 방어물질에 대한 연구가 필요한 실정이다. 현재 개발된 대표적인 방사선방어 물질로는 Walter Reed 연구센터에서 개발한

WR-2721인 amifostin으로, 조혈장기에 방어효과가 있다고 보고되었으나[25], 중간 대사산물의 유해성으로 인해 문제가 되고 있다. 따라서 천연 추출물을 이용한 방사선 방어제의 개발이 관심을 받고 있다. Kim 과 Chang[12]은 홍삼추출물을 사용하여 감마선 조사 전에 홍삼추출물을 투여하면 신장 내 Cu, Zn-SOD(27.8%) 및 Mn-SOD(31.9%)의 활성이 증가되며, 지질과산화의 함량이 81% 감소되었다고 보고하였고, 6.5 Gy의 감마선을 조사한 마우스의 생존율이 40% 증가하였다고 보고한 바 있다[13]. 또한 녹차 추출물은 감마선 조사에 의한 장해 발생의 경감에 효과가 있는 것으로 보고되었다[14]. 이러한 연구 결과에도 불구하고 인공 및 천연 추출물에 의한 방사선의 방어효과에 대한 연구는 매우 부족한 실정이다.

최근에는 꿀벌에 의해 만들어지는 프로폴리스(propolis)가 방사선 방어 효과가 있는 것으로 보고되었다[11,18,23]. 프로폴리스는 식물이 생장점을 보호하기 위하여 분비하는 수지상 물질을 꿀벌들이 모아 타액 효소와 혼합하여 만들게 된다. 이러한 프로폴리스를 꿀벌이 벌통 내표면에 발라 미생물로부터 여왕벌의 알과 유충을 보호하는 천연항생물질로 알려져 있다[1]. 더불어 프로폴리스는 항산화효과와 항균 및 항염증 효능이 있다고 알려져 있으며[3], 프로폴리스에 의한 방사선 방어 연구를 보면 프로폴리스 성분이 감마선 조사 후 염색체의 손상을 50% 감소시키는 것으로 보고되었다[18].

본 연구는 천연 추출물의 방사선 방어 효과를 탐색하기 위하여 임상에서 종양 치료에 많이 사용하고 있는 X-선을 마

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5462, Fax : +82-54-823-1627

E-mail : ewseo@andong.ac.kr

우스에 조사 한 후 유발되는 세포의 부작용을 최소화하고, 전구 증상을 완화시킬 수 있는 방어물질로서 프로폴리스의 유용성에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

프로폴리스의 정제 및 추출

프로폴리스는 경북 북부지역의 예천, 청송지역에서 채취한 양봉 봉고를 80% ethanol에 녹여 교반한 다음 60일간 숙성과정을 거친 후 추출하였다. 추출물은 왁스성분을 제거하기 위하여 -20℃에서 48시간 냉동 보관 후, 24시간마다 4회 반복 여과하여 얻은 추출물을 프로폴리스 농도 측정기(PROEM HB-62, Korea)를 이용하여, 40% 프로폴리스를 제조하여 본 연구에 사용하였다.

프로폴리스의 투여 및 방사선 조사

본 연구에 사용한 실험동물은 체중 20-25 g의 3-4 개월 된 ICR계 수컷 마우스 190마리를 사용하였다. 이중 130마리의 마우스는 프로폴리스 섭취 실험군에 사용되었고, 90마리는 프로폴리스 복강 투여 실험군에 사용되었다. 프로폴리스 섭취 실험군의 경우 방사선 조사 전에 프로폴리스를 사료에 섞어 직접 섭취토록 하였다. 사료는 8% 프로폴리스가 함유되게 제조하여 사용하였으며, 물에도 0.05% 프로폴리스를 넣어 자유롭게 수분 섭취토록 하였다. 프로폴리스 복강 투여 실험군에는 방사선 조사 전에 20% 프로폴리스 1 ml를 직접 복강에 투여하였다.

방사선은 임상에서 종양치료에 사용하고 있는 선형가속기(Clinac 21 EX, USA)의 X-선을 이용하였다. 방사선 조사는 마우스를 가로 20 cm × 세로 20 cm 크기의 특수 제작한 아크릴 case에 넣은 다음 마취를 하지 않은 상태로 전신 방사선 조사를 하였다. 프로폴리스 섭취 실험군의 방사선조사는 Depth 1.3 cm, Field Size 25 cm × 25 cm, SSD 97.5 cm로 1분 조사를 하였다. 방사선 에너지는 1 Gy(92.6 MU), 5 Gy(462.8 MU), 10 Gy(925.6 MU)로 조사하였다. 프로폴리스 복강 투여 실험군의 방사선조사는 Depth 2.5 cm, Field Size 25 cm × 25 cm, SSD 97.5 cm로 대향 2분 조사를 하였으며, 방사선 에너지는 5 Gy(229.2 MU)를 조사하였다.

정소의 형태학적 관찰

실험동물은 해부하기 전 4 시간동안 절식시킨 다음 diethyl ether로 전신 마취를 시행한 후, 복강을 절개하여 정소 조직을 적출하였다. 광학현미경을 이용한 관찰의 경우, 적출한 정소 조직을 일반적인 paraffin method에 따라 표본을 제작하였다[8]. 적출한 조직은 PBS (pH 7.2)에 세척하여 10% FAA 용액에 넣어 24시간 고정하였다. Ethyl alcohol을 이용하여 탈수하였고, xylene으로 치환한 후 paraffin block을 만

들었다. 각 block은 8μm로 section하여 표본을 제작하였고, 표본은 hematoxyline 과 eosin으로 이중염색을 한 후 관찰하였다. 전자현미경에 의한 조직 관찰의 경우, 적출된 정소 조직을 glutaraldehyde에서 3시간 동안 전고정하였고, osmium tetraoxide로 1시간 30분 동안 후고정 하였다. Ethyl alcohol을 사용하여 계대 탈수과정을 행하였으며, propylene oxide로 치환하였다. 그리고 epon resin에 포매하여 60℃ 배양기에서 48시간 중합하여 block을 제작하였다. Ultra microtome을 이용하여 80 nm로 박절 후 uranyl acetate와 lead nitrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(H-7000, Hitachi, Japan)을 통하여 관찰하였다.

Total RNA 추출

마우스의 정소조직으로부터 microarray 실험과 RT-PCR 실험을 수행하기 위하여 total RNA를 추출하였다. 우선 trizol 시약 (Life technologies, Inc., USA)을 이용하여 total RNA를 정제한 후, 이차적으로 Qiaquick RNeasy mini kit (Qiagen, USA)을 이용하여 정제하였다.

DNA microarray 실험

전체적인 microarray 실험의 수행 및 데이터 분석은 대전에 위치한 (주) 지노믹트리에 위탁하여 수행하였다. 사용된 DNA chip 은 미국 Microarrays Inc. (Nashville, TN, USA)에서 제작한 38,500개의 유전자가 집적되어 있는 mouse whole genome chip을 사용하였다. 실험의 간단한 절차는 다음과 같다. 먼저 1차 cDNA 합성을 위하여 추출한 total RNA 2 μg을 사용하였다. RNA 주형으로부터 reverse transcriptase를 이용하여, 2시간 동안 42℃에서 역전사반응을 수행하였다. 1차 cDNA 합성액을 주형으로 하여 DNA polymerase I 을 이용하여 2차 cDNA를 합성하였다. 반응 후 0.5 M EDTA 용액으로 반응을 중지하고 반응 산물을 Qiaquick purification kit (Qiagen, USA) 으로 정제하였다. 그 다음, 단일 가닥의 cDNA 증폭을 위하여, 3 μl 10X polymerase buffer, 1 μl 10mM AA-dUTP/dNTP mix, 1 μl High-Heel primer, 그리고 2 μl Taq polymerase를 이중가닥의 DNA 용액에 섞어 반응하였다. 증폭 cycle은 95℃에서 1분 동안 반응한 다음, 95℃에서 1분, 72℃에서 2분 과정을 30 cycle 반복 후, 마지막으로 72℃에서 5분간 extention 과정을 수행하였다. 증폭된 cDNA는 Microcon YM-30에 의해 농축하여 최종 부피를 8 μl로 하였다. 그다음, cyanine-3 혹은 cyanine-5 dye를 이용하여 cDNA를 표지하였다. 정제된 cDNA는 hybridization 용액 100 μl에 녹인 후, 100℃에서 2분간 열을 가한 후, microarray에 직접 처리하였다. Hybridization은 42℃에서 12-16시간 실시한 후, microarray는 2X SSC/0.1% SDS 용액에서 5분간, 0.1X SSC/0.1% SDS에서 10분간, 마지막으로 0.1X SSC 용액에서 2분간 2번 세척하였다. 세척을 마친 mi-

croarray는 원심 분리하여 즉시 말렸다.

데이터 분석

Hybridization을 마친 microarray는 Axon GenePix 4000B scanner를 이용하여 scan 한 다음, Agilent사의 GeneSpringGX 7.3을 이용하여 분석하였다. Normalization 방법은 intensity dependent (LOWESS) normalization 방법을 사용하였다. 유전자의 filtering은 median 값의 합이 1,000 이상이 되는 유전자를 선별하였다.

Reverse transcription-PCR

1 µg RNA sample에 15 pmol oligo dT primer를 첨가하여 65°C에서 10분간 반응한 후 얼음에서 식혔다. 각 sample에 7.5 µl reaction mixture (50 mM Tris-Cl (pH 8.3 at 25°C), 3 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 10 mM DTT), 200 unit reverse transcriptase (Finzyme, Finland), 5 unit 의 RNase inhibitor (RNasin; Promega) 와 0.25 mM dNTP mixture를 첨가한 후 42°C에서 역전사 반응을 수행하였다. 반응 후 65°C에서 10분간 반응하여 중지하였다. PCR 반응은 3 µl cDNA, 2.5 µl 10X Taq buffer, 5 unit Taq polymerase, 2 µl 2.5 mM dNTP mixture, 1 µl 10 pmole/µl Primer-Sense, 그리고 1 µl의 10 pmole/µl Primer-Antisense를 넣은 다음 최종 부피를 25 µl 만든 다음 수행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5 min간 denaturation, 94°C에서 45 sec, 50°C에서 45 sec, 72°C에서 45 sec간 25 cycle을, 마지막으로 72°C에서 5 min 간으로 하였다. PCR 반응물은 2% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide 용액에서 염색 후 자외선에서 사진촬영을 하였다.

결 과

정소 조직의 광학현미경적 관찰

1) 프로폴리스 섭취 실험군의 정소 조직

프로폴리스를 사료에 섞어 먹인 실험군은 방사선을 1문 조사하였다. 방사선 조사는 1 Gy, 5 Gy, 10 Gy로 마우스 전신에 조사한 후 정소 조직에 대한 변화를 관찰하였다. 방사선조사 후 방사선 선량이 증가할수록 마우스의 사료 섭취가 현저하게 줄어들었으며, 프로폴리스 섭취군에서는 방사선만 조사한 군보다 외적인 형태에서는 털이 윤기를 보이고, 활동이 많은 것으로 조사되었다.

1 Gy 방사선을 조사한 마우스군(1Gy군)과 대조군, 프로폴리스를 섭취시킨 후 방사선을 조사한 군(1GyP군)을 각각 비교해 보면, 1 일과 5 일에서는 특이한 변화를 관찰할 수 없었으나 10 일째에서는 대조군에 비해 1Gy 조사군에서 정세관의 크기가 줄어들었으며, 곡세정관의 크기는 넓어진 것으로 관찰되었다. 그러나 1GyP군의 경우 세정관이 대조군과 같은

크기를 보였으며, 분화 과정에 있는 각 단계별 세포에서도 세포질이 가득 차 있었다. 또한 간질세포도 대조군과 같이 균일하게 관찰되었다. 따라서 낮은 방사선 조사의 경우 프로폴리스에 의한 방사선 보호효과가 관찰되었다.

5 Gy 방사선을 조사한 경우에는 정세관의 가장자리에서 불규칙한 공포가 관찰되고, 정모세포 단계인 태사기와 세사기의 분화세포들이 관찰되지 않았다. 프로폴리스 섭취 한 후 5Gy 방사선 조사군(5GyP군)에서는 태사기가 드물게 확인되었으며, 간질의 레이디히 세포는 일정한 배열을 이루고 있다 (Fig. 1B).

10 Gy 방사선 조사 후 10 일된 조직에서는 선량의 증가로 정세관과 간질의 세포액이 현저하게 줄어든 것이 관찰되었으며, 정원세포와 정모세포는 거의 관찰되지 않고 정자세포만 확인되었다. 남아있는 간질세포는 공포화 되었거나 여기 되었으며, 곡세정관의 넓이도 커져 있는 것으로 확인되었다 (Fig. 1C, D). 이와 같은 세포의 형태학적 변화는 방사선 에너지에 따라 많은 변화가 있었으며, 치사선량 이상에서는 프로폴리스에 대한 변화가 없었다. 한편 5 Gy 이하의 선량에서는 프로폴리스 투여한 마우스에서 미분화된 세포의 손상을 줄이는 것으로 조사되었다.

2) 프로폴리스 복용 투여 실험군의 정소 조직

프로폴리스를 복용 투여한 마우스는 단일 5 Gy 방사선을 전신에 대항 2문 조사하였다. 방사선 조사 후 10 일된 정소조직을 방사선만 조사한 군(5Gy군), 프로폴리스 복용 투여 후 방사선 조사군(P5Gy군)을 비교해 보면, 5 Gy 조사에서는 정세관의 막이 파괴되었고, 대부분의 분화단계에 있는 세포들이 소실되어 곡세정관이 커져 있었으며, 간질세포의 수도 많이 줄어든 것으로 확인되었다(Fig. 2A). 5 Gy 방사선 조사 후

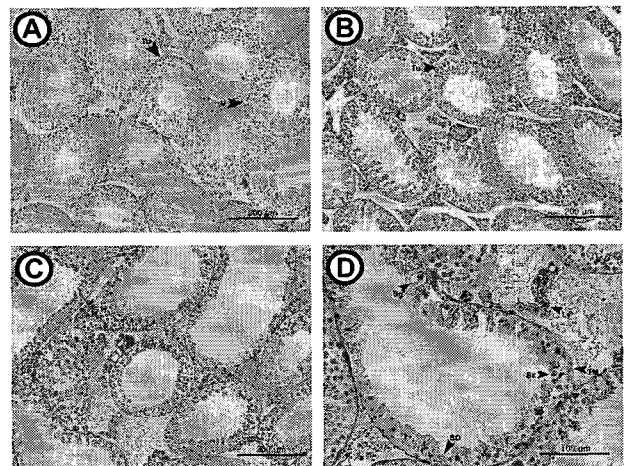


Fig. 1. The light micrography of testis extracted from mouse supplemented with propolis. A, normal testis; B, testis exposed to 5 Gy irradiation; C,D, testis exposed to 10 Gy irradiation. Tu: seminiferous tubules, Sz: Spermatid, Ly: Leydig cell, v: Capillary, Sg: Spermatogonia

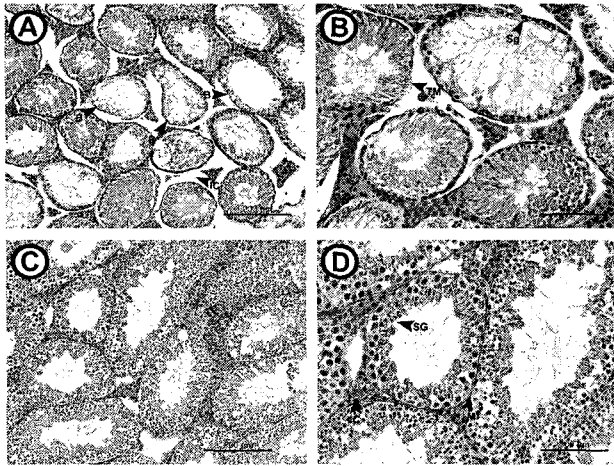


Fig. 2. The light micrography of testis extracted from mouse given abdominal injection of propolis. A,B; testis exposed to 5 Gy irradiation without propolis injection, C,D: testis exposed to 5 Gy irradiation after propolis injection. TM: Seminiferous tubules membrane, Sg: Spermatogonia, IC: Interstitial cells

20 일된 정소조직에서는 새롭게 회복되는 정원세포들이 관찰되었으나 손상된 정세관의 막은 회복되지 않았다(Fig. 2B). 그러나 프로폴리스를 복강 투여한 후, 방사선 5 Gy로 조사한 정소조직에서는 세정관의 막이 정상적으로 관찰되었거나 손상이 적었다. 또한 정모세포와 정자세포가 세정관 가장자리에 많이 관찰되어 곡세정관도 좁은 상태로 조사되었다. 또한 간질세포인 레이디히 세포는 대조군과 비슷하게 관찰되었다 (Fig. 2C,D).

프로폴리스 섭취 실험군과 비교해보면 복강 투여 실험군에서 간질세포와 정모세포의 수가 더 많이 관찰되었으며, 정세관의 크기에는 큰 차이가 없었다. 방사선 조사방식에 따른 세포 손상의 변화는 1문 조사보다 대향 2문 조사에서 심부선량 증가로 정세관의 분화단계의 세포와 간질세포들이 현저하게 줄어 든 것으로 관찰되었다.

정소 조직의 투과전자현미경적 관찰

방사선을 조사하지 않은 대조군(Fig. 3A,B)과 방사선을 10 Gy로 조사한 후 5 일이 경과된 조직을 비교해 보면, 방사선을 조사한 군의 경우 정모세포의 한쪽 가장자리에서 핵막의 이중구조가 손상되고 염색체가 흩어진 것으로 관찰되었으며, 정자세포에서는 선체가 심하게 손상되었다(Fig. 3C, D). 또한 세포질의 소기관에서도 가장자리가 손상되어 형태가 불완전 하거나 공포화된 것이 관찰되었다. 프로폴리스 섭취 후 5 Gy로 조사한 마우스의 정소 조직에서는 방사선만 조사한 정소보다 미분화세포인 정원세포, 정모세포의 손상이 크게 줄어들었을 뿐만 아니라, 정세관과 미토콘드리아의 이중막도 정상으로 관찰되었다(Fig. 4C, D). 또한 sperm tail의 principal piece 부분의 cross section 모양도 정상적으로 관

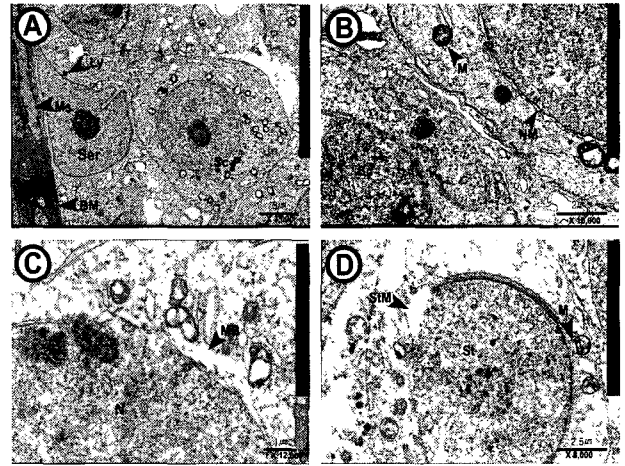


Fig. 3. Transmission electron micrography of testis extracted from mouse supplemented with propolis. A,B. normal tissue, C,D. tissue exposed to 10 Gy irradiation. Ly: Lysosome, BM: Base membrane, Ms: Myofibroblast, Ser: Sertoli cells, ScP: Spermatocyte pachytene, M: Mitochondria, StM: Forepart of spermatids, N: Nucleus, St: Spermatids

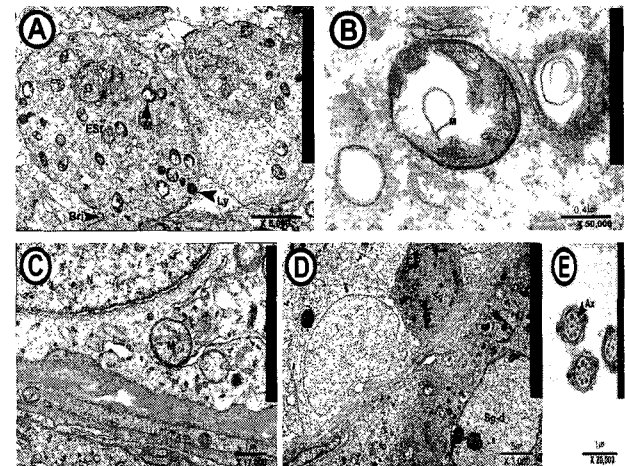


Fig. 4. Transmission electron micrography of testis exposed to X-ray with or without propolis. Mice were exposed to 5 Gy irradiation without(A,B) or with (C,D,E) propolis.

찰되었다. (Fig. 4E). 대향 2 문으로 5 Gy 방사선을 조사한 정소 조직의 경우, 정소조직의 핵 속 염색질이 흩어져 있었으며, 핵막도 크게 손상을 받은 것으로 관찰되었다(Fig. 5A, B). 그러나 프로폴리스 복강 투여 실험군에서는 정원세포와 정세관의 바닥막 속의 근육섬모세포, 리소솜, 정모세포들이 정상적인 형태로 관찰되었다(Fig. 5C). 또한 정자의 선체와 미토콘드리아도 손상되지 않았다(Fig. 5D). 전자현미경적 관찰에서 정소 조직에 대한 프로폴리스 투여는 세포의 이중막 손상을 크게 줄이는 것으로 조사되었으며, 복강 투여한 조직에서 섭취한 조직보다 손상의 회복 차이가 큰 것으로 관찰되었다.

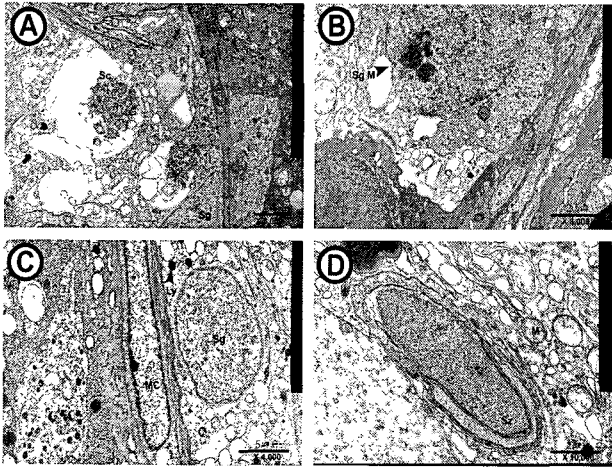


Fig. 5. Transmission electron micrography of testis exposed to 5 Gy irradiation without(A,B) or with(C,D) abdominal injection of propolis.

Microarray 실험 결과

프로폴리스에 의한 방사선 방어효과를 유전자 발현 수준에서 연구하기 위하여 DNA 마이크로어레이 실험을 수행하였다. 마이크로어레이 실험을 위하여 대조군(C), 프로폴리스 복강 투여군(P), 5Gy 방사선 조사군(5Gy) 및 프로폴리스 복강 투여 후 5Gy 방사선 조사군(P5Gy)의 마우스 정소 조직으로부터 각각 total RNA를 추출하였다. 일차적으로 대조군의 정소 조직과 각각 처리된 마우스의 정소조직에서의 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다. 프로폴리스를 투여한 마우스의 정소조직과 대조군 마우스의 정소조직의 유전자 발현을 비교한 결과, 33개의 유전자가 2배 이상 과대 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 반대로 35개의 유전자의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. 5 Gy 방사선 조사군(5Gy)과 대조군을 비교한 마우스의 정소조직에서 유전자 발현을 보면 1,543개의 유전자가 2배 이상 과대 발현되었고, 1,151개의 유전자의 발현이 2배 이상 감소되었다. 마지막으로 프로폴리스 복강 투여 후 5 Gy 방사선 조사군(P5Gy)과 대조군의 마우스 정소조직에서 유전자 발현을 비교해 본 결과 P5Gy군에서 1,963개의 유전자의 발현이 2배 이상 증가하였고, 이에 반해 1,682개의 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다.

프로폴리스에 의한 방사선 방어효과를 유전자 발현 차원에서 연구하기 위하여, 5Gy 실험군과 P5Gy 실험군의 결과를 각각 5Gy 실험군의 결과로 나누어 2배 이상 증가하거나 감소하는 유전자 군을 선별하였다. 그 결과 프로폴리스의 투여에 의해 65개의 유전자가 2배 이상 증가하였고, 224개의 유전자가 2배 이상 감소하였다. 이 중 증가율과 감소율이 가장 높은 유전자를 각각 2개씩 선별하였다. 유전자 발현이 증가되는 유전자 군에서 Gusb (NM_010368, Glucuronidase, beta)와 Gp38 (NM_010329, Glycoprotein 38)를 선택하였고, 감소되는 유전자 군에서는 Ibsp (NM_008318, integrin binding

sialoprotein)와 Cyp4a12 (NM_172306, cytochrome p450, family 4)를 선택하였다(Table 1).

Reverse Transcription-PCR

Microarray 실험 결과를 증명하기 위한 연구의 일환으로 선택된 4개의 유전자를 대상으로 각 유전자의 염기 서열 특이적인 oligo primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다 (Table 2). 감소 발현되는 유전자인 Cyp4a12와 Ibsp인 경우는 microarray 결과와 마찬가지로 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 이에 반해 microarray 결과에서 증가되

Table 1. The representative genes differentially expressed by propolis treatment after 5 Gy irradiation

No	GenBank Acc. No	Gene Name (Gene Symbol)	Fold Change
1	NM_010368	Glucuronidase, beta (Gusb)	10.2
2	NM_010329	Glycoprotein 38 (Gp38)	5.1
3	NM_172306	Cytochrome P450, family4, sub-family a, polypeptide 12 (Cyp4a12)	0.2
4	NM_008318	Integrin binding sialoprotein (Ibsp)	0.1

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene name	GenBank Acc. No	Oligonucleotide Sequences
GUSB	NM_010368	Forward : 5'-agctgaatagccagtttgag-3' Reverse : 5'-tctctctcgcaaaataaagg-3'
GP38	NM_010329	Forward : 5'-tctgaccttggaaaactaaa-3' Reverse : 5'-gggtggaatgtgtatgtat-3'
CYP4a12	NM_172306	Forward : 5'-gcctgtcagctcttttcaac-3' Reverse : 5'-taggtgacggaaaggtaaa-3'
IBSP	NM_008318	Forward : 5'-ttgttttagtggcttctt-3' Reverse : 5'-tgtgataaaggaacgtcaca-3'
GAPDH	NM_001001303	Forward : 5'-aacctgccaaagtatgatgac-3' Reverse : 5'-gtcagggttcttactct-3'

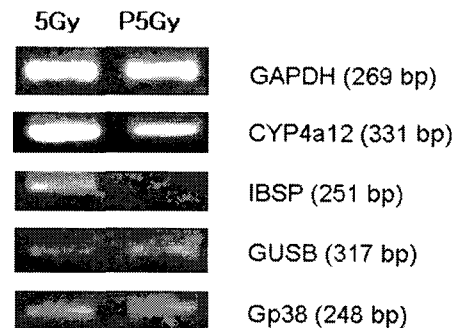


Fig. 6. The results of reverse transcription-PCR. Total RNAs were isolated from samples and then RT-PCR was performed using gene-specific primers.

는 유전자인 Gusb 유전자는 미세한 증가정도를 보여 주었고, Gp38의 경우는 유전자의 발현의 차이가 관찰되지 않았다. 프로폴리스 복강 투여에 의한 Cyp4a12와 Ibsp 유전자의 발현 억제 현상은 매우 의미 있다고 생각된다. 그러나 이러한 유전자 발현의 변화와 프로폴리스에 의한 방사선 방어 효과에 대한 관련성은 앞으로 좀 더 연구가 진행 되어야 한다.

고 찰

최근 암 환자의 발생 증가로 진단 및 치료방사선의 사용이 증가하고 있다. 이러한 방사선 조사에 따른 부작용은 대부분이 간접작용에 의해 일어나며, 세포에 작용하는 기작은 유리 라디칼에 의해 이루어진다[7]. 또한 세포의 80%를 차지하고 있는 물에 작용하여 전자와 양이온 및 여기 물 분자를 형성하여 에너지원으로 작용하는 세포에 영향을 미친다고 알려져 있다. 결국 치료의 본래 목적보다 부작용을 유발하는 요인이 되기 때문에 방사선에 대한 천연물 완충제의 개발이 시급한 실정이다. 지금까지 천연물에 의한 방사선 방어 효과에 연구를 보면 홍삼추출물과 인삼 투여에서 골수장해와 DNA 손상을 경감시키는 것으로 보고되었다[15,16]. 또한 천연항생제로 알려진 프로폴리스의 플라보노이드 화합물에서도 항산화활성 및 방사선 방어효과가 있는 것으로 보고되었다[11,18,20]. 그러나 치료용 방사선을 이용한 생체 이용에 관한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 프로폴리스를 섭취 및 복강 투여 후 프로폴리스가 마우스 정소조직에 미치는 방사선 방어 효과를 조사하였다.

방사선조사에 의한 조직의 형태학적 관찰은 방사선 조사 후 1Gy, 5Gy에서는 20 일까지 조직관찰을 할 수 있었다. 그러나 10Gy 방사선을 조사한 30 마리에서는 첫날부터 먹이를 먹지 않았으며 3 일째 2 마리가 죽고, 6 일째 13 마리가 죽었으며, 7 일째 4 마리가 죽어서 방사선 조사 후 10 일째 되는 조직에서만 관찰 할 수 있었다. 본 실험의 광학현미경적 관찰을 보면 방사선량이 증가할수록 대부분의 조직 손상이 큰 것으로 나타났다. 정소 조직은 미분화 세포로 구성되어 있어 방사선에 감수성이 높은 것으로 보고되고 있다[26]. 본 실험에서도 정소는 방사선에 민감하게 작용하였으며, 정원세포와 정모세포에서 많은 손상이 관찰되었다. 또한 프로폴리스를 복강 투여한 조직이 구강 투여한 조직 보다 방사선에 의한 손상이 적었으며, 1문 조사 보다 대항 2문 조사에서 정세관내 조직의 손상이 많이 관찰되었다. 전자현미경의 조직 관찰을 보면 정소 조직에서 방사선 조사 후 선량이 증가할수록 세포막의 손상과 세포질의 소기관들이 파괴되어 관찰되었다. 특히 에너지원으로 작용하는 미토콘드리아와 핵막의 손상이 심하였다. 그러나 프로폴리스를 투여한 조직에서는 정세관의 미분화 세포와 소기관들의 이중막에서 손상이 크게 줄어들었다. 이것은 프로폴리스에 의해 유리 라디칼이 줄어

든 것으로 보이며, 에너지원으로 작용하는 이중막에 대한 방어는 더욱 의미 있는 결과를 보이고 있다. 방사선에 의한 손상은 저산소 세포에서 방사선 감수성이 낮아지므로 방어제의 개발도 이를 유지하는데 중심을 두고 있다.

프로폴리스에 의한 방사선 방어효과를 유전자 발현 차원에서 분석하기 위하여 DNA microarray 실험을 수행하였다. 방사선을 정소 세포에 조사하게 되면, 암 억제 유전자인 p53이 유도되는데[2,17], 이러한 p53은 DNA repair, 세포주기, 세포사멸 등에 관련되는 다양한 유전자의 발현을 유도하는 전사조절인자로서의 기능을 수행하게 된다[22]. 그러나 본 연구에서는 방사선 조사한 정소 조직의 경우 p53 유전자의 발현차이는 확인되지 않았으나, p53에 의해 유도되는 여러 가지 유전자들의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 여러 가지 세포 사멸에 관련된 유전자 발현의 증가도 볼 수 있었다. 방사선을 조사 후 프로폴리스를 처리한 군과 처리하지 않는 군을 비교 하였을 때, 가장 유전자의 발현의 변화가 많은 4개의 유전자를 선택하여 RT-PCR 을 수행하였다. 이중 Cyp4a12(NM_172306) 유전자는 cytochrome p450 의 super-family의 하나로서, 약물, 농약, carcinogen 등에 의해 강하게 유도되는 효소로 procarcinogen을 mutagen으로 활성화 시킬 수 있으므로, 프로폴리스에 의한 유전자의 억제 현상은 매우 의미가 있다. 앞으로 이러한 유전자들에 의한 기능 연구는 프로폴리스에 의한 방사선 방어효과의 기전을 밝히는 데 매우 중요한 단서를 제공해 줄 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 종합해 볼 때 프로폴리스 투여 후 방사선 조사에서 조직의 형태학적 관찰에서는 산소와 작용하는 미토콘드리아에서는 방사선에 의한 손상이 많이 관찰되었으나, 프로폴리스 투여 군에서는 현저하게 손상을 줄어든 것으로 관찰되어 방사선에 의한 유리 라디칼의 발생을 줄이는 것으로 판단된다. DNA 마이크로어레이 실험에서도 유전자 발현의 변화가 프로폴리스 투여 군에서는 대조군 보다 2배 이상 증가되거나 감소된 유전자군을 확보하였다. 이 중 일부 유전자는 프로폴리스의 방사선 방어효과와 밀접한 관련이 있었다. 따라서 프로폴리스는 마우스 모델에 있어서 부분적으로 방사선에 대한 방어 효과가 있는 것으로 사료된다.

요 약

프로폴리스는 꿀벌에 의해 생산되는 천연물질로서, 항미생물, 항산화, 항암 활성이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 프로폴리스에 의한 방사선 방어효과에 대한 특성은 잘 연구되지 않았다. 마우스 정소조직을 대상으로 프로폴리스에 의한 방사선 방어효과를 연구하기 위하여, 프로폴리스를 섭취시키거나 복강 투여한 후 각각 방사선을 조사한 후, 마우스의 정소조직을 광학현미경과 전자현미경을 통해 관찰하였다. 그 결과 방사선에 의해 유도된 세포의 변형이 프로폴리

스에 의해 회복됨을 알 수 있었다. 또한 이러한 방사선 회복 효과의 분자기전을 이해하고자 DNA microarray 실험을 수행하였다. 그 결과 방사선만 조사한 마우스에 비해 방사선과 프로폴리스를 동시에 처리한 마우스의 정소에서 2배 이상 증가되는 유전자 65개를 선별하였고, 반대로 2배 이상 감소되는 유전자 224개를 선별하였다. 이 중에서 각각의 유전자군에서 2개의 유전자를 선별하여 RT-PCR을 수행하여 마이크로어레이 결과를 검증하였다. 이러한 결과들은 마우스 모델에서 프로폴리스에 의한 방사선 방어효과의 분자기전을 이해하는데 도움이 될 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Bankova, V. S., S. Popov and N. L. Marekov. 1983. A study on flavonoids of propolis. *J. Nature Prod.* **46**, 471-474.
- Beumer, T. L., H. L. Roepers-Gajadien, I. S. Gademan, P. P. van Buul, G. Gilgomez, D. H. Rutgers and D. G. de Rooij. 1998. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ.* **5**, 669-677.
- Brumfitt, W., J. M. T. Hamilton-Miller and I. Franklin. 1990. Antibiotic activity of natural products. *Microbios.* **62**, 19-22.
- Chen, Y. J., M. L. Tu, H. C. Kuo, K. H. Chang, Y. L. Lai, C. H. Chung and M. L. Chen. 1997. Protective effect of tetrandrine on normal human mononuclear cells against ionizing irradiation. *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 1160-1164.
- Datta, K., S. Sinha and P. Chattopadhyay. 2000. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl. Med. J. India.* **13**, 304-310.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.
- Eric, J. H. and J. G. Amato. 2006. Radiobiology for the Radiologist. pp 11-13, 6ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia .USA.
- Fujita, H. and T. Fujita. 1988. Textbook of Histology part 1. pp 1-21, 3rd. Igaku-Shoin Ltd. Tokyo.
- Hall, J. and S. Angele. 1999. Radiation, DNA damage and cancer. *Mol. Med. Today.* **5**, 157-164.
- Jamme, I., E. Petit, D. Divoux, A. Gerbi, J. M. Maixent and A. Nouvelot. 1995. Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport.* **29**, 333-337.
- Jeong, I. Y. 2005. Antioxidant activity and radioprotection of two flavonoids from propolis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 162-166.
- Kim, D. J. and C. C. Chang. 1994. The effect of red ginseng extracts on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of the kidney in γ -postirradiated mice. *Korean J. Ginseng Sci.* **18**, 25-31.
- Kim, D. Y. and J. C. Chang. 1998. Radioprotective effect of ginseng components on antioxidant enzymes glutathione and lipid peroxidation of liver in γ -irradiation mice. *Korean J. Ginseng Sci.* **22**, 1-10.
- Kim, S. R., H. J. Lee and S. H. Kim. 2003. The radioprotective effects of green tea and its fraction in gamma-irradiation mice. *Korea J. Vet. Res.* **43**, 633-639.
- Kim, T. H., Y. S. Lee, C. K. Cho, S. Park, S. Y. Choi and S. Y. Yoo. 1996. Protective effect of ginseng on radiation-induced DNA double strand breaks and repair in murine lymphocytes. *Cancer Biother. Radiopharm.* **11**, 267-272.
- Lee, T. K., R. M. Johnke, R. R. Allison, K. F. O'Brien and L. J. Dobbs Jr. 2005. Radioprotective potential of ginseng. *Mutagenesis.* **20**, 237-243.
- Lee, Y. S., T. J. Ji and H. S. Jung. 1998. Apoptosis of spermatogenic cells by γ -irradiation. *Korea J. Genetics.* **20**, 265-276.
- Montoro, A., M. Almonacid, J. Serrano, M. Saiz, J. F. Barquintero, L. Barrios, G. Verdu, J. Perez and J. I. Villaescusa. 2005. Assessment by cytogenetic analysis of the radioprotection properties of propolis extract. *Radiat. Prot. Dosimetry.* **115**, 461-4.
- Morales, A., M. Miranda, A. Sanchez-Reyes, A. Biete and J. C. Fernandez-Checa. 1998. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **42**, 191-203.
- Scheller, S., G. Gazda, W. Krol, Z. Czuba, A. Zajusz, J. Gabrys and J. Shani. 1989. The ability of ethanolic extract of propolis(EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch.* **44**, 1049-1052.
- Stewart, C. and H. Bushong. 1984. Radiologic science for technologist. pp 425-504, Mosby Co, USA.
- Striteska, D. 2005. The tumor suppressor gene p53. *Acta medica. suppl.* **48**, 21-25.
- Takagi, Y., I. S. Choi, T. Yamashita, T. Nakamura, I. Suzuki, T. Hasegawa, M. Oshima and Y. H. Gu. 2006. Immune activation and radioprotection by propolis. *Am. J. Chin. Med.* **33**, 231-40.
- von Deutsch, A. W., C. D. Mitchell, C. E. Williams, K. Dutt, N. A. Silvestrov, B. J. Klement, I. K. Abukhalaf and D. A. von Deutsch. 2005. Polyamines protect against radiation-induced oxidative stress. *Gravit. Space Biol. Bull.* **18**, 109-110.
- William, T., N. William and H. Battifora. 1979. Radiation oncology. pp 417-439, 5th ed. Mosby, London.
- Yuhás, J. 1980. Active versus passive absorption kinetics as the basic for selective protection of normal tissue by S-2-(3-aminopropylamino)-ethyl-phosphorothioic acid. *Cancer Res.* **40**, 1519-1524.