

전신 X-선 조사 후 마우스의 대동맥 혈구에서 SEM을 이용한 프로폴리스의 방사선방어효과 연구

— Radioprotective Effect of Propolis on the Blood Corpuscle of a Mouse by SEM after X-irradiation on the Whole Body —

가야대학교 방사선학과

지 태 정

— 국문초록 —

선형가속기를 이용한 X-선 5Gy를 마우스 모델에 전신 조사 후 백혈구, 적혈구, 혈소판을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 또한 프로폴리스를 복강 주사 후 혈구들의 방사선 방어효과를 알아보았다. 혈구의 미세구조 관찰에서는 외관상 방사선 조사한 실험군에서 수가 줄어들었으며, 조사 후 10일에서 20일로 경과함에 따라 혈구의 엉김이 관찰되었다. 적혈구에서는 표면이 균열이 생기고 깨어진 형태와 변성구상적혈구들이 관찰되었다. 백혈구는 방사선조사군에서 혈구의 크기가 줄어들었으며, 가장자리 미용모들의 크기와 수가 대조군 보다 작은 것으로 관찰되었다. 프로폴리스 투여 후 방사선 조사군에서는 혈구들이 대조군과 유사한 형태로 확인되었다.

중심 단어 : 적혈구, X-선, 프로폴리스, 주사전자현미경

I. 서 론

전리방사선의 조직 내 손상 기전은 물 분자의 상호 작용에 의해 발생하는 간접효과로 일어난다¹⁾. 대표적 기작 (mechanism)은 방사선이 H₂O에 작용하면 H₂O⁺ + e⁻로 분리되어 이온기(ion radical)를 생성하고, H₂O⁺는 새로운 물 분자와 반응하여 H₃O⁺와 반응력이 강한 수산화(OH·)를 만들어 유리기(free radical)를 형성하게 된다^{2,3)}. 생체에 작용하는 유리기는 세포내 DNA의 수소결합을 끊고, 1사슬 절단 및 무기인산유리와 nucleotide의 back-

bond 분리 등을 일으키게 된다⁴⁾. 이 중 strand break가 가장 흔한 것으로 알려져 있다⁵⁾. 이러한 손상은 미분화된 세포에서 크게 작용하며, 체중의 13분의 1을 차지하고 있는 혈액에서 더욱 민감하게 일어난다. 일반적으로 혈액은 생명유지에 필수적인 영양소나 산소운반 및 호르몬 이동에 중추적인 역할을 하고 있으며, 생체방어와 항상성 유지에 관여한다. 또한 세포내 필수 미네랄의 이동에도 영향을 가져오므로 방사선 치료시 정상 조직 내의 혈액에 대한 방사선 방어는 매우 중요하다. 최근 Ji 등의 보고에 의하면 저선량 X-선 조사한 동물실험에서 미량원소의 함량이 변화되었다고 보고하였으며⁶⁾, Lee 등은 5Gy 방사선 조사 후 10일된 실험군에서 백혈구 및 혈소판의 수가 30% 이상 줄어들었으며, 혈장에서는 GOT의 활성이 감소한 것으로 보고하였다⁷⁾. 이러한 방사선에 대한 혈액의 감수성이 높은 것은 미분화된 조혈세포에 의해 혈구들이 만들어지는데 기인한다고 할 수 있다. 따라서 단백질로 구성된 혈장은 상대적으로 방사선에 대한 장해가 줄어들게

* 이 논문은 2008년 1월 29일 접수되어 2008년 3월 4일 채택 됨.
- 이 연구는 2007년도 가야대학교 연구지원에 의하여 수행된 것임.

책임저자: 지태정, (621-748) 경남 김해시 삼계동 60번지
가야대학교 방사선학과
TEL: 055-330-1185
E-mail: taejeong@kornet.net

된다. 현재까지 밝혀진 혈액세포 중에서는 임파구가 감수성이 가장 높은 것으로 보고되었으며 조사 후 2일에서 10일 사이에서 많이 감소하였다⁸⁾. 또한 방사선 피폭과 관련된 혈액 암의 경우에도 암 발생은 보고되고 있지만 기전은 아직 밝혀지지 않고 있어 그에 따른 혈구의 조직학적 연구는 필요하다. 하지만 대부분의 연구는 혈구 수의 변화와 혈장의 생화학적 효소 측정에 집중되어 있는 실정이다. 따라서 혈구 세포의 주사전자현미경을 이용한 미세구조 연구는 방사선 영향에 따른 가역적 세포손상과 반응을 이해할 수 있고 병리학적 기초연구에도 매우 필요하다. 지금까지는 액체 시료의 전처리에 대한 어려움으로 주사전자현미경적 연구가 부족하였으나 최근 새로운 기법과 과학기술의 도입으로 초미세구조를 관찰할 수 있게 되었다. 따라서 본 연구는 기존연구에서 항산화 및 방사선 방어효과가 있는 것으로 밝혀진 프로폴리스를⁷⁾ 마우스 모델에 복강 투여하여 방사선에 대한 혈구의 형태를 주사전자현미경(Scanning Electron Microscopy: SEM)을 이용하여 관찰하고, 병리학적 이해와 혈구 세포의 방사선 방어기작을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 준비 및 방사선조사

본 연구에 사용한 실험동물은 체중 20~25 g의 3~4개월 된 ICR계 수컷 마우스 20마리를 사용하였다. 방사선 조사는 선형가속기(Clinac 21 EX, USE)를 사용하였으며, 특수 제작한 가로 20 cm×세로 20 cm 크기의 아크릴 case에 마우스를 4마리씩 분리하여 윗 위면을 덮개로 고정 한 후 마취를 하지 않고 X-선을 조사하였다. 방사선에너지는 462.8 MU(5 Gy)로 Depth 2.5 cm, Field Size 25 cm×25 cm, SSD 97.5 cm으로 대향2분 조사를 실시하였다. 방사선 조사 후 10일 20일 간격으로 혈구세포를 관찰하였다.

2. 프로폴리스 추출 및 투여

실험에 사용한 프로폴리스는 경북 북부지역에서 채취한 양봉 봉고를 80% ethanol에 교반하여 숙성과정을 거쳐 추출하였다. 추출물은 왁스성분을 제거하기 위하여 -20℃에서 48시간 냉동 보관 후 반복 여과하여 얻은 추출물을 프로폴리스 농도 측정기(PROEM HB-62, Korea)

를 이용하여 40%의 프로폴리스를 제조하여 사용하였다. 실험동물에 투여는 프로폴리스 200 μ g을 생리식염수 800 μ g에 희석하여 1,000 μ g을 복강으로 투여하였다.

3. 혈액 추출 및 조직 시료의 적출

실험동물을 4시간 절식시킨 다음 Diethyl Ether 25 ml를 거즈가 깔린 비이커에 넣고 1분 20초 동안 전신 마취를 시행한 후 복강을 절개하여 복부 대동맥에서 혈액시료를 얻은 후 시료로 사용하였다.

4. 혈구의 SEM 관찰

SEM 관찰은 마우스의 복강 동맥에서 얻은 전혈 1 cc를 2.5% glutaraldehyde에서 2시간 전고정 하였고 0.1 M PBS로 3회 세척하였다. 다음 O_3O_4 에서 후고정 한 후 70%~100% ethanol에 탈수 과정을 거친 후 t-butyl alcohol로 치환하였다. 이후 freeze dryer(EYELA, FD-1000, Japan)를 사용하여 동결 건조한 후 stove에 부착하여 관찰하였다. 모든 단계에서 centrifuge(Hanil, Micro-12, Korea)을 사용하여 3,000 rpm으로 3분간 분획화 한 후 pellet 부분을 사용하였으며, gold coating하여 SEM(Hitachi, S-2500C, Japan)을 통하여 관찰하였다.

III. 결 과

1. 방사선 조사 후 혈구세포들의 SEM 관찰

혈구세포들은 대동맥에서 얻은 혈액을 분리 후 SEM으로 관찰하였다. 5 Gy 방사선 조사 후 10일과 20일된 실험군의 관찰에서는 백혈구가 대조군에 비하여 현저하게 줄어들었으며, 혈구의 크기도 줄어든 것으로 관찰되었다(Fig. 1, Fig. 2). 혈구의 형태 또한 대조군과 비교하여 변형되었으며 크기가 비교적 작고 불규칙한 모양으로 나타났다(Fig. 2. A, B). 5 Gy 조사 후 20일된 실험 군에서는 표면에 균열이 생기고 깨어진 적혈구들이 확인되었으며, 일부분의 혈구들은 한 곳에 엉켜있는 모양을 하였다. 병리적인 형태를 보인 적혈구 중 많이 관찰된 것을 보면, 가장자리가 움푹 파였거나 타원 형태를 나타낸 것이 많았으며 악성빈혈 등에서 확인되는 비대칭 거대 적혈구와 변성구상적혈구들도 관찰되었다(Fig. 2 B, C). 또한 퇴화된 세포에서 나타나는 작고 변형된 모양을 한 혈구도 관찰되

었다. 이형 혈구의 경우는 5Gy 조사 후 10일 보다 20일 경과된 실험 군에서 더욱 많이 관찰되었으며, 중앙에 도우넛 모양의 형태가 없고 삼각형 모양을 하거나 작은 구상 형태를 보인 적혈구들도 관찰되었다. 백혈구의 경우는 방사선 조사한 실험 군에서 거의 확인되지 않았으며, 일부 관찰된 혈구에서도 크기가 작았으며 가장자리에 미용모 수가 적게 붙은 형태를 볼 수 있었다(Fig. 2 D). 하지만 백혈구의 표면상 관찰로는 호중구, 호염기구, 호산구의 구별은 확인되지 않았다. 혈소판은 5Gy 조사 후 10일 된 실험 군에서 다량의 뾰족한 사상체로 보이거나 촉모 같은 돌출물이 많이 관찰되었고(Fig. 2 B), 조사 후 20일 된 혈구에서는 퇴행성 현상을 보이는 혈구들도 확인되었다. 전체 혈구들의 방사선 조사에 따른 특징은 혈구 주변에서 막의 형태를 갖는 환영의 그물들이 혈구 표면에서 관찰되었다(Fig. 2 B).

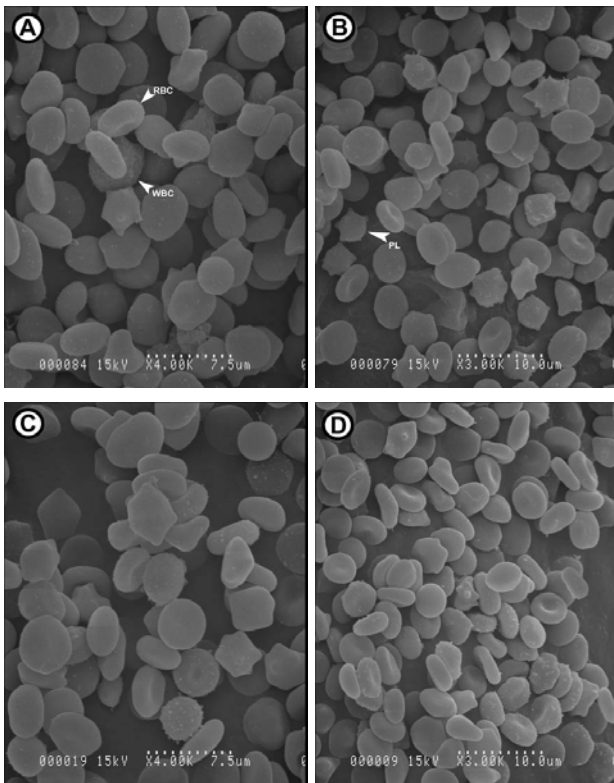


Fig. 1. Scanning electron microscopic views of blood corpuscle at control groups and propolis groups
A, B: control, C, D: abdominal injection propolis
RBC: Erythrocyte, WBC: Leucocyte, PL: Platelet

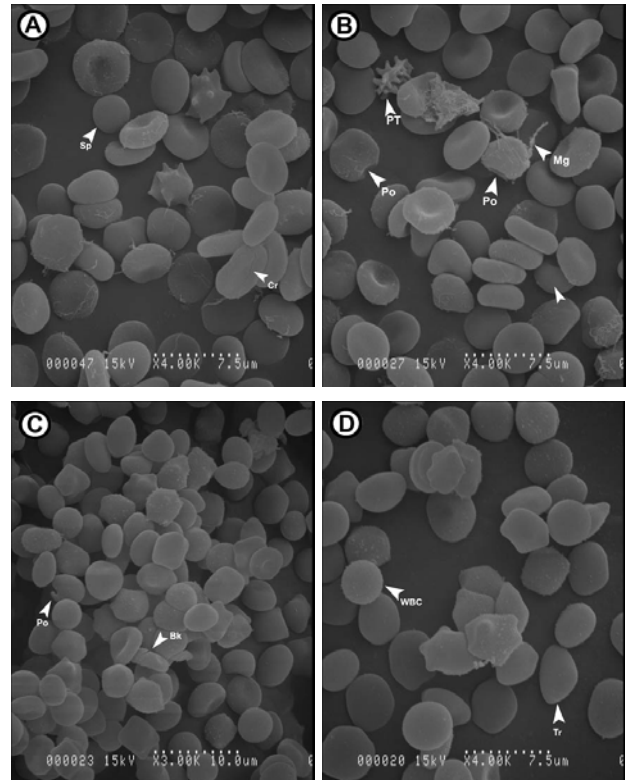


Fig. 2. Scanning electron microscopic views of blood corpuscle after 5 Gy irradiation
A, B: after 10 days, C, D: after 20 days
Sp: Spherocyte, PT: Platelet, Cr: Crack, Po: Poikilosperocyte, Mg: Membranous ghost, Tr: Triangular, WBC: Leucocyte, Bk: Break

2. 프로폴리스 복강 투여 후 혈구세포들의 SEM 관찰

프로폴리스 복강 투여 후 10일과 20일 경과된 혈구를 대조군과 비교해 보면 10일에서는 적혈구의 수가 대조군에 비해 큰 차이는 없었으나 조밀한 형태로 보였으며, 가장자리에서도 일정하게 매끈한 모양으로 관찰되었다. 20일 경과한 관찰에서는 백혈구의 미용모들이 더욱 선명하게 관찰되었고, 병적 모양을 보인 특이적인 적혈구의 관찰은 많이 줄어든 것으로 확인되었다(Fig. 3).

한편 동일하게 5Gy 조사 후 프로폴리스 투여군과 방사선만 조사한 군에서 혈구들의 관찰을 보면, 프로폴리스 투여 후 10일 지난 실험군에서 비정상적인 적혈구가 현저하게 줄어든 것으로 관찰되었다(Fig. 3 A). 20일 경과된 혈구를 보면; 백혈구는 대조군과 유사한 크기로 관찰되었고 미용모들도 선명하게 보였으며, 적혈구의 경우에서

도 크기가 일정하였고, 병적인 혈구의 관찰이 거의 확인되지 않았다(Fig. 3 B). 하지만 방사선만 조사한 관찰에서는 10일과 20일 모두에서 혈구들이 한 곳에 응집되어 엉켜 있었다. 프로폴리스 투여 후 혈구의 수에 따른 변화는 대조군과 비교시 소량 줄어든 것으로 나타났으나 방사선만 조사한 실험군 보다는 많이 관찰되었다. 더불어 혈구 표면에 형성된 환형의 그물막 구조물들도 프로폴리스 투여군에서는 확인되지 않았다.

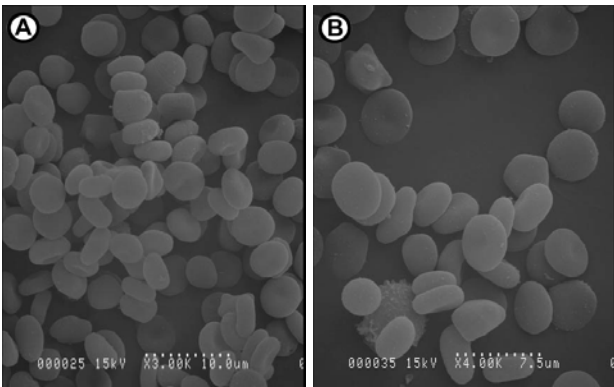


Fig. 3. Scanning electron microscopic views of blood corpuscle by 5 Gy irradiation after abdominal injection of propolis

A, B: 20 days

IV. 고 찰

모든 혈액세포는 미분화된 간세포(stem cell)로부터 분화되며 적혈구, 백혈구, 혈소판으로 나타난다. 이와 같은 미분화된 세포는 방사선에 민감하게 작용하며 임파구와 백혈구가 가장 감수성이 높은 것으로 보고되었다⁷⁾. 현재까지 암에 대한 전리 방사선의 치료 기술은 비약적으로 발전했지만 종양 조직만 완벽하게 치료할 수는 없고 주변 정상 조직도 일정 부분 방사선의 범위에 포함되는 것이 사실이다. 또한 종양과 정상조직에서는 혈액이 대사작용에 관여하고 그에 따라 방사선에 노출된 혈액세포는 전신 순환에 의해 새로운 질병과 면역력을 감소시키는 요인이 된다. 따라서 불필요한 정상조직의 방사선 방어는 매우 중요하며 부작용이 없는 천연물 완충제의 개발은 시급한 실정이다. 지금까지 혈액조직의 SEM 연구는 Zharskaya와 Chukhlovina가 Rat에 gamma선 0.25~1 Gy 전신 조사하여 적혈구의 손상을 보고⁹⁾하였으나 방어제 투여 후 혈구의 형태학적 관찰에 대한 연구는 부족하다. 하지만 최

근에는 천연물에 의한 방사선 방어 효과의 연구가 활발하게 진행되고 있으며 대표적인 연구로 홍삼추출물과 인삼 투여에서 골수장해와 DNA 손상을 경감시키는 것으로 보고되었다^{10,11)}. 또한 천연항생제로 알려진 프로폴리스의 플라보노이드 화합물에서도 항산화활성 및 방사선 방어효과가 있는 것으로 보고되었다¹²⁻¹⁴⁾. 그러나 치료용 방사선을 이용한 생체 이용에 관한 혈구의 전자현미경적 미세구조 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 방사선 조사에 의한 혈구의 미세구조 관찰과 더불어 방사선 방어 효과 알아보기 위해 프로폴리스를 마우스의 복강으로 정량 투여한 후 혈구 형태를 조사하였다.

혈구세포의 방사선에 대한 연구를 보면 2~6 Gy 조사에서 2~4일 내에 과립구 증가가 관찰되나 그 후 감소하여 4~5주간 백혈구의 감소가 계속되며 36일째부터 회복된다고 보고하였다^{7,15,16)}. 본 실험에서도 5 Gy 조사 후 10일과 20일된 실험군에서 백혈구의 수가 대조군에 비하여 감소한 것으로 관찰되었으며, 혈구의 형태는 변형되고 크기는 작고 불규칙한 모양으로 관찰되었다. 일반적으로 적혈구나 형질구의 핵은 모든 성숙단계에서 둥글어 지지만 대사적 이상이나 미성숙 세포들에서는 불완전한 형태를 보인다. 본 실험에서도 5 Gy 방사선 조사 후 10일과 20일군의 혈구세포에서 형태가 불규칙하고 한 곳에 엉켜있는 모습들이 관찰된 것으로 보아 방사선에 민감한 미성숙세포들이 일정부분 영향을 받은 것으로 사료된다. 또한 병적인 상태나 악성빈혈과 철 결핍성 빈혈에서는 세포 내에 혈색소가 부적당하게 형성되어 성숙단계가 흐트러지게 된다. 본 연구에서는 특히 적혈구에 많은 이상변화를 관찰할 수 있었으며 이와 같은 결과는 방사선이 조직에서 물과 상호작용을 하여 free radical을 형성하는 기전 때문에 비교적 산소가 많은 적혈구에서 형태 이상이 증가된 것으로 보여진다.

따라서 본 연구는 방사선 조사 후 기간이 20일로 경과된 실험군에서 적혈구가 깨어지고 균열이 생겼으며, 백혈구의 관찰이 잘되지 않고 크기가 작으며, 한 곳에 엉켜있는 모양들은 방사선에 영향이라고 할 수 있으며 이에 반해 프로폴리스 투여군에서는 혈구 주변에 그물 막 등의 엉김현상 없고 적혈구서는 외적인 균열이 없었으며, 병적 모양을 보인 혈구도 줄어든 것으로 나타났다. 또한 백혈구에서도 대조군과 유사한 크기를 보였고 가장자리 미음모들도 정상적으로 관찰되어 방사선에 대한 일정부분 방어효과가 작용하는 것으로 보이며 앞으로 백혈구에 대한 미세 구조 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구는 방사선에 의한 미세 혈구 세포의 손상을 조직학적으로 연구하고자 주사전자현미경으로 관찰하였다. 방사선 에너지는 선형가속기의 X-선 5 Gy을 마우스 모델에 전신 조사한 군과 프로폴리스를 복강 주사 후 5 Gy 조사한 군으로 나누어 대동맥에서 얻은 혈구의 형태를 연구하였다. 적혈구의 미세구조 관찰에서는 방사선 조사한 실험군에서 조사 후 10일에서 20일로 경과함에 따라 혈구의 엉김이 관찰되었고 크기가 대조군과 비교해 도우넛 모양을 하지 않은 작은 구형이 관찰되었다. 또한 병리적인 형태를 보이는 변성구상적혈구와 삼각형 모양을 하는 혈구들이 확인되었고, 주변에는 막 형태를 보인 환형의 그물도 관찰되었다. 혈구 표면은 균열이 생기고 깨어진 형태가 나타났다. 백혈구는 방사선 조사군에서 크기가 2배 정도 작고 수가 현저하게 줄어들었으며, 외부 가장자리에 붙어있는 미용모들의 관찰이 대조군과 많은 차이를 보였다. 혈소판은 조사 후 시간이 지날수록 거대혈소판들이 관찰되었다. 프로폴리스 복강 주사한 실험군에서는 백혈구는 정상적인 크기와 미용모들이 대조군과 유사하게 보였으며, 적혈구도 일정한 분포로 정상적인 모양을 확인할 수 있었다. 따라서 방사선에 대한 혈구의 손상은 조사 후 시간이 경과할수록 심하였으며, 프로폴리스 투여군에서는 대조군과 유사한 형태로 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. Michael A. Thompson: Radiation: Its Atomic and Nuclear Origins, in : Michael A. Thompson, Janice D. Hall, Marian P. Hattaway, Steven B. Dowd, Principles of Imaging Science and Protection, W. B. Saunders Co, 59-84, 1994
2. Yang TC, Mei M, George KA, Craise LM. DNA damage and repair in oncogenic transformation by heavy ion radiation. *Adv Space Res*, 18(1-2): 149-155, 1996
3. Mroczka NE, Mercer KR, Bernhard WA. The effects of lattice water on free radical yields in X-irradiated crystalline pyrimidines and purines : a low-temperature electron paramagnetic resonance investigation. *Radiat Res*, 147(5):560-568, 1997
4. Miller JH, Nelson JM, Ye M, Swenberg CE, Speicher JM, Benham CJ. Negative supercoiling increases the sensitivity of plasmid DNA to single-strand break induction by X-rays. *Int J Radiat Biol*, 59(4):941-949, 1991
5. McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C. The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1;49(2):373-377, 2001
6. Ji TJ, Min BI, Seo EW: Effect of propolis on blood components and tissues of mouse after low dose X-ray irradiation. *J. Exp. Biomed. Sci*, Vol 12(1) 43-48, 2006
7. Lee JH, Ji TJ, Seo EW: Effect of propolis feeding on rat tissues damaged by X-ray irradiation. *Journal of Radiation Protection*, Vol 32(2), 51-57, 2007
8. Eric J Hall, Amato J Giaccia. *Radio biology for the radiologist*, Six ed. Lippincott williams & Wilkins. USA, 335-337, 2006
9. Zharskaya VD, and Chukhlovin AB: Early post-radiation changes of red blood cell shape in rats. *Scanning Microsc*, 10(1):279-283, 1996
10. Kim T. H., Lee Y. S., Cho C. K., Park S., Choi S. Y., Yool S. Y.: Protective effect of ginseng on radiation-induced DNA double strand breaks and repair in murine lymphocytes. *Cancer Biother Radiopharm*, 11(4):267-272, 1996
11. Lee T. K., Johnke R. M., Allison R. R., O'Brien K. F, Dobbs LJ. Jr.: Radioprotective potential of ginseng. *Mutagenesis*, 20(4):237-243, 2005
12. Jeong I. Y.: Antioxidant Activity and Radioprotection of Two Flavonoids from Propolis. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 34(2):162-166, 2005
13. Montoro A., Almonacid M., Serrano J., Saiz M., Barquinero J. F., Barrios L., Verdu G., Perez J., Villaescusa J. I.: Assessment by cytogenetic analysis of the radioprotection properties of propolis extract. *Radiat Prot Dosimetry*, 115: 461-4, 2005
14. Scheller S., Gazda G., Krol W., Czuba Z., Zajusz A., Gabrys J., Shani J.: The ability of ethanolic extract of propolis(EEP) to protect

- mice against gamma irradiation. *Z Naturforsch*, 44:1049–1052, 1989
15. Vriesendorp H. M., van Bekkum D. W.: Role of total-body irradiation in conditioning for bone marrow transplantation. Berlin, Springer Verlag, pp.349–364, 1980
16. Lee JH, Ji TJ, Seo EW: Effect of propolis on the activity of antioxidant enzymes in rat liver irradiation by X-ray. *J Exp Biomed Sci*, vol 12, 427–433, 2006

• Abstract

Radioprotective Effect of Propolis on the Blood Corpuscle of a Mouse by SEM after X-irradiation on the Whole Body

Tae-Jeong Ji

Department of Radiological Science, Kaya University

After x-ray 5 Gy radiation on the whole body of a mouse using a linear accelerator, its leucocyte, erythrocyte, and platelet were observed by SEM. Also, after injecting propolis into the abdominal cavity, the radio-protective effect of blood corpuscles was studied. The observation of micromorphology in blood corpuscles revealed that the number of leukocyte, erythrocyte, and thrombocyte decreased in the experimental group and the lump got together in blood corpuscles after 10 and 20 days. In RBC, crack or break on the surface and poikilosperocytes were observed. In the irradiation group, the size of leucocytes was smaller than that in control group and the number of villus at the verge substantially decreased. The blood corpuscles in the propolis group, however, had the similar results to control group.

Key Words : erythrocyte, X-ray, propolis, SEM