

미역포자엽추출 푸코이단의 X-선 조사 흰쥐 폐장상해에 대한 방오기능 평가

김홍태 · 정의숙¹ · 정덕수² · 김기홍³ · 김종기^{4*}
 대구가톨릭대학교 의과대학 해부학교실, ¹(주)해원바이오테크, ²대구가톨릭대학교 의과대학 영상의학과, ³경운대학교 안경광학과, ⁴대구가톨릭대학교 의과대학 의공학교실

Protection Effect of *Undaria pinnatifida sporophylls*-derived Fucoidan in Rat Lung Injury from X-ray Irradiation

Hong-Tae KIM, Eui-Sook JEONG¹, Duck-Soo CHUNG², Ki-Hong KIM³ and Jong-Ki KIM^{4*}

Department of Anatomy, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 704-600, Korea
¹Haewon Biotech, INC. Seoul, Korea

²Department of Radiology, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 704-600, Korea

³Department of Visual Optics, Kyungwoon University, Gumi 730-739, Korea

⁴Department of Medical Engineering, Catholic University of Daegu School of Medicine, Daegu 704-600, Korea

The radioprotect effects of fractionated fucoidan, derived from *Undaria pinnatifida sporophylls*, were examined in lung injured rats treated with partial body irradiation. The right lung of Sprague-Dawley rats, eight separately grouped by including radiation only control group (ROG) and fucoidan+radiation treated group (FRG), were treated with various fraction of *Undaria*-derived fucoidan every other day by intraperitoneal injection 6 days prior to irradiation and during monitoring at 24 hours, 48 hours, 2 weeks, 4 weeks and 12-weeks post-irradiation of 6 Mev/2 Gy. The rats were euthanized at completion of the treatment. Tissue samples from the injured lung, fixed in formaldehyde using lung perfusion prior to extraction, were H/E stained for histological analysis using optical microscopy. Interstitial congestion (IC), hemorrhage in alveolar sac (HM), number of macrophage (MP) and alveolar wall thickness (AWT) as a measure of early indication of fibrosis were measured. AWTs in 24 hrs post-irradiation rats increased in comparison with $2.49 \pm 0.06 \mu\text{m}$ of control group by $3.67 \pm 0.09 \mu\text{m}$, $3.21 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($p=0.013$), $2.98 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($p=0.00$) in ROG, F1-fucoidan+radiation, and F3-fucoidan+radiation group, respectively. AWT of the ROG was further increased by $4.30 \pm 0.13 \mu\text{m}$ in the 12 weeks post-irradiation group, but AWT on average was $2.56 \pm 0.05 \mu\text{m}$ in the FRG. MP in the 24 hrs post-irradiation group markedly increased in comparison with $2.6 \pm 0.34/0.14 \text{ mm}^2$ of the control group by $8.0 \pm 1.48/0.14 \text{ mm}^2$ in the ROG, but it was only $3.6 \pm 0.48/0.14 \text{ mm}^2$ in F3-FRG. MP in the 12 weeks post-irradiation group was $7.2 \pm 1.28/0.14 \text{ mm}^2$ in ROG, but it was $2.8 \pm 0.37/0.14 \text{ mm}^2$ or $2.4 \pm 0.4/0.14 \text{ mm}^2$ ($p<0.05$) in the FRG. In addition, increased IC and HM in ROG were relatively smaller in FRG of the 24 hr and 12 weeks post-irradiation rats. In conclusion, *Undaria pinnatifida sporophylls*-derived fucoidan fractions exhibited radioprotectant activity on injured rat lung subjected to X-ray irradiation. However, success was variable according to the fractions and also time of injection post injury.

Key words: Radioprotectant, Fucoidan, Lung injury, Alveolar wall thicken, Inflammatory response

서 론

암환자에 대한 방사선 치료시 혹은 자연방사선으로부터 생체조직을 보호하기 위해 지난 수십년 동안 많은 방사선 방오제 개발이 진행되어 왔다 (Hosseinimehr, 2007). Amifostine, colchicine, pentoxifylline 등이 방사선에 의한 조직 손상을 예방 또는 감소시킬 목적으로 임상적으로 사용되어 왔으나 (Santini, 1999; Wrembel-Wargocka, 1996) 자체 독성에 의한 구토 등의 심각한 부작용을 나타내고 있어 (Rades, 2004), 최근에는 화학적 합성에 의한 방법보다 천연물로부터 방사선

방오제개발을 선호하고 있다 (Arora, 2005). 이미 인삼 (Kim, 2007) 및 알로에 (Wang, 2004) 등으로부터 추출된 다당체에서 이러한 기능이 보고된 바 있다.

푸코이단은 미역, 다시마 같은 갈조류에서 추출되는 함황 다당류로서 수 많은 생리활성 작용이 보고되어 왔으며 (Li, 2008). 특히 항산화작용, 항염증 및 면역유도작용도 여러 가지 모델 연구 등에서 보고 되었다. 위와 같은 푸코이단의 기능은 생체에 대한 방사선 조사시 생리 활성작용과 관련이 있으므로 푸코이단은 방사선 방오기능이 기대되어 왔다. Wu (2003)의 연구를 비롯하여 최근에 방사선 방오기능이 전신조사된 생체모델의 연구로부터 보고되었다 (Lee, 2008).

*Corresponding author: jkkim@cu.ac.kr

더구나 푸코이단의 함량성분이 많이 포함될수록 신생혈 관억제 및 항암작용이 증가된다는 보고도 있어 (Koyanagi, 2003; Teruyaa, 2007) 푸코이단의 분획에 따라 함량도와 분 자량이 다르므로 푸코이단의 생리활성은 분획에 따라 다르 게 나타날 것으로 기대된다. 또한 푸코이단의 생리활성은 푸코이단이 추출되는 해조류의 종류 및 산지에 따라 크게 다르다는 것이 최근에 보고되었다 (Cumashi, 2007). 임상에서 방사선 치료는 종양이 있는 특정 기관의 부분에 조사하기 때문에 전신 방사선조사 보다는 특정 조직에서 방사선에 노출된 경우 조직의 손상을 최소화하는 것이 우선적으로 중요하다. 이미 So et al. (2007)의 *in vitro* 연구에서 푸코이단은 자유기-유도 산화스트레스에 대해 방오기능이 있다고 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 국내산 미역포자엽으로부터 추출된 푸코이단 분획을 이용하여 *in vivo*에서 방사선 조사된 흰쥐의 폐장 상해의 방오효과를 조사하였다.

재료 및 방법

푸코이단의 추출과 분획정제

미역포자엽으로부터 Koo et al. (1995)의 방법에 준하여 추출한 85% 순도의 푸코이단을 (주)해원바이오테크로부터 분말 형태로 제공받았다.

1차 정제된 푸코이단으로부터 변형된 Koo et al. 방법 (2001)에 따라 cetylpyridinium chloride (CPC)을 이용하여 침전시킨 다음 NaCl 농도를 단계적으로 증가시키면서 (0.5 M-3.5 M) 적정하여 푸코이단의 산성도에 따라 분획하였다. 이 때 분말시료 33.2 g에 3350 mL 증류수를 가한 후 10% CPC 용액을 가하였으며, 용해된 분획은 원심 분리한 후 (9,000 rpm, 25분) 상층액에 다시 600 mL의 pentanol을 세 차례 가하여 재 원심분리하고 수용액층을 투석하여 동결건조 하였다. 갈조류에 부가적으로 포함된 폴리페놀계의 화합물을 추가로 대량 정제하기 위해 CPC 분획후 각 단일 분획을 대용량 hydrophobic column system (Teflon resin, FLASH 150, Biomac, US)과 UV 226 nm 검출기를 이용하여 제정제 하였다. 100% 증류수를 용매로 시료의 부과량에 (30-320 g) 따라 분당 60-100 mL로 용출하였다.

시료 및 실험동물처리

정제된 각 푸코이단 분획을 생리식염수에 녹여서 실험에 사용한 쥐에 5 mg/kg 용량으로 복강주사하였다. 실험동물은 Sprague-Dawley 수컷쥐 (체중 250 g) 를 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 습도조절되는 방에 두고 12시간 간격으로 밤낮조절을 하였으며, 표준 rat pellet diet 와 물을 공급하였다. 실험하기전 1주일 쯤 안정적인 기간을 거쳤다.

시험군과 X-선 조사 및 푸코이단 처리

시험쥐는 8개 그룹으로 나누었다; Group 1 (생리식염수 처리 대조군), Group 2 (푸코이단 분획1처리), Group 3 (푸코이단 분획2 처리), Group 4 (푸코이단 분획3 처리), Group 5 (X-

선 단일처리 대조군: ROG), Group 6 (X-선 조사+푸코이단 분획1 처리), Group 7 (X-선 조사+푸코이단 분획2 처리), Group 8 (X-선 조사+푸코이단 분획3 처리). 각 그룹은 2-4마리로 정하고, 이틀간격으로 푸코이단 재료를 5 mg/kg 복강 내에 주사하였고 대조그룹은 같은 양의 생리식염수를 주사하였다. 시험군에 대해서는 각 분획의 푸코이단 재료를 X-선 노출 시험 6일전부터 주사하기 시작했다. 푸코이단 적용 기간은 시험군과 대조군 모두 24시간, 48시간, 2주, 4주, 12주까지 주사하여 진행하였다. 마지막 주사는 동물을 희생시키기 2-3시간 전에 시행하였다. X-선은 제작된 cage에 고정하여 한쪽 우폐를 제외한 모든 부위를 차폐한 후 우측 폐에 6 Mev/2 Gy로 조사하였다.

혈액샘플채취

혈액샘플은 EDTA lab tube로 채취하였으며, Ketamine으로 시험동물이 마취된 상태에서 추출용관을 대동맥에 삽입하고 3 cc syringe/23-gauge 주사기를 이용하여 채취하였다. 백혈구 differential count를 시행하여 EDTA처리된 혈액 시료에서 림프구, 단핵구, 중성구, 호산구, 호염기구의 숫자를 측정하였다.

광학현미경적 허파조직 관찰

방사선 조사 후 24시간, 4주, 12주에 Ketamine으로 마취한 흰쥐의 기관을 노출 하고 기관 속으로 고정액이 든 시약병에 연결된 도관을 집어넣었다. 기관에서 20 cm 높이에서 고정액 (4% Paraformaldehyde, 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2)을 허파 속으로 흘려보내 폐포가 퍼지도록 한 후 기관을 묶고 허파를 적출 한 후 고정액에 보관하였다. 고정된 폐조직을 적당한 크기로 잘라 통상의 조직처리 과정을 거친 다음 파라핀에 포매하고 microtome으로 5 μm 두께의 박절편을 광학현미경 검경용 유리 슬라이드에 부착한 후 탈 파라핀 및 함수과정을 거쳐 hematoxylin/eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다. 허파 조직의 손상정도를 판단하기 위해 각 표본에서 무작위로 10곳을 선정하여 X20배의 대물렌즈와 AxioCam MRC5 디지털카메라로 영상을 얻었다.

방사선에 의한 허파 손상에 의한 간질 충혈 (interstitial congestion, IC), 폐포출혈 (hemorrhage in alvolar sac, HM)의 정도를 각각의 검사 면적에서 손상된 면적의 %로 다음과 같이 표시하였다: 1; 손상이 관찰되지 않은 경우 2; 25% 이하, 3; 25-50%, 4; 50-75%, 5; 75% 이상. 염증상태를 판정하기 위해 각 검사면적에서 관찰되는 폐포대식세포 (alveolar macrophage)의 수를 측정하였다. 각 표본 당 10개의 현미경 영상을 대상을 하여 손상정도를 측정하고 그 평균값을 취하였다. 방사선에 의한 섬유증 (fibrosis)의 정도는 폐포벽의 두께로 판정하였다. 각 표본에 대해 60곳에서 두께를 측정하였다. 두께는 현미경 영상을 얻는데 사용한 Zeiss사에서 제공하는 AxioVision AC 소프트웨어를 이용하였으며, 두께는 마이크로미터 (μm) 표시하였다.

통계처리

통계분석을 위해 SPSS를 이용하였다. 각각의 측정값은 평균±표준오차로 표시 하였으며, 각 표본간의 차이는 one-way ANOVA로 분석하였다. 유의수준은 0.05를 기준으로 하였다.

결 과

푸코이단의 폴리페놀제거

Crude 푸코이단에서 폴리페놀의 제거는 Fig. 1과 같이 색깔이 없어질 때 까지 반복하였으며, 최종 푸코이단은 무색 분말

의 형태를 보였다. Teflon 레진을 이용한 크로마토그래피에서 226 nm-UV검출기를 이용함으로써 페놀황산법과 달리 용출 물질을 직접 모니터링하면서 푸코이단을 검출할 수 있었다 (Fig. 2).

방사선조사 후 증가하는 현상과 푸코이단 투여의 영향 혈액에 미치는 영향

방사선 단일처리군에서 Fig. 3에서 보듯이 방사선 노출 후 24시간 뒤 백혈구의 양이 정상대조군대비 50% 가량 감소하였다. 시간이 경과할수록 감소 차이가 줄어들었다. 푸코이단

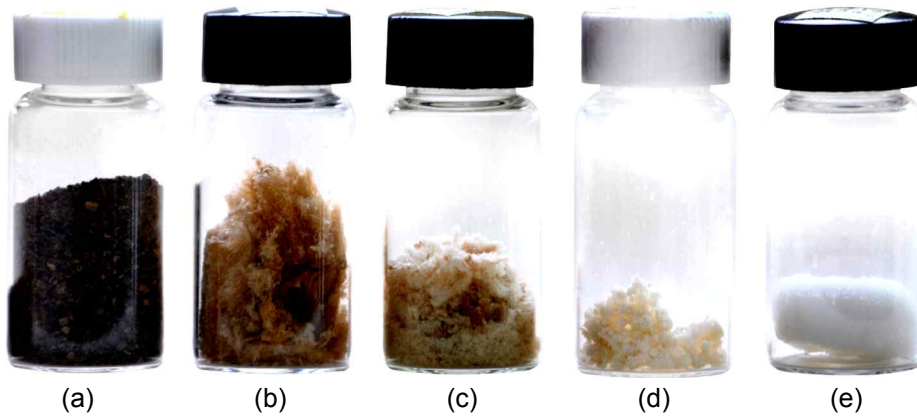


Fig. 1. Bottles of fucoidan after multiple purification steps until obtaining colorless fucoidan using a hydrophobic column system (Teflon resin, FLASH 150, Biomac, US), beginning from crude fucoidan (a) to final step (e). This process shows effective removal of polyphenol-like impurities in crude fucoidan.

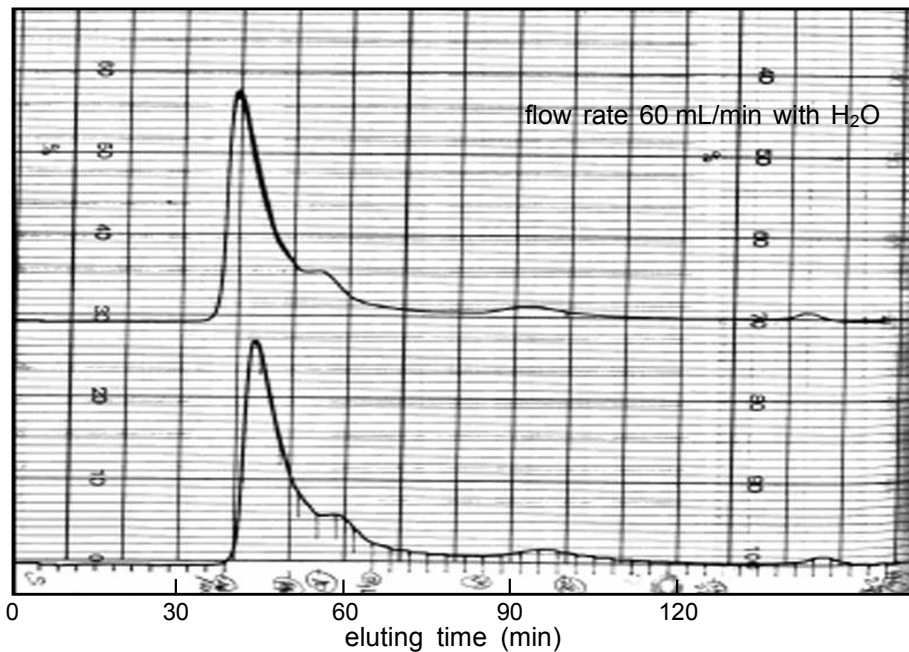


Fig. 2. Eluting profile of repurification of one fucoidan fraction (F3) obtained from fractionation with manual CPC titration in a hydrophobic column system (Teflon resin, FLASH 150, Biomac, US) with 226 nm UV detector to remove residual polyphenol. 100% water was eluted isocratically. This UV detecting system is convenient for collecting large quantity of fucoidan eluted in the column compared to conventional phenol-sulfide method for fucoidan purification using ion exchange column.

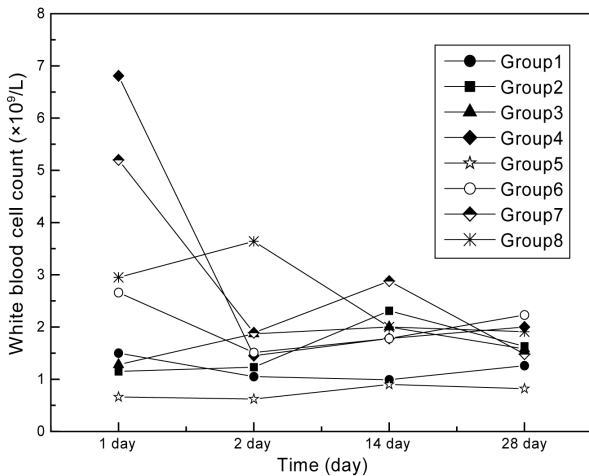


Fig. 3. WBC count of the blood samples from each experimental groups at each post-irradiation period. Group 1 is normal control, Group 2, 3, 4 represents fucoidan only treated groups with F1-fucoidan fraction, F2-fucoidan fraction, and F3-fucoidan fraction, respectively. Group 5 is radiation only group (ROG), and Groups 6, 7, 8 are fucoidan+radiation treated groups (FRG) with F1-fucoidan fraction, F2-fucoidan fraction, and F3-fucoidan fraction, respectively. Increased WBC in ROG is decreased and maintained gradually to normal control level in temporal manner. Initial increase in WBC was not observed in the FRG groups.

투여군에서는 F3분획에서 백혈구의 증가가 300%로 가장 컸으며, 2일째 이후로는 방사선 단일처리군대비 평균 100% 증가를 보였다. 방사선처리+푸코이단 투여군에서는 백혈구가 모든 분획에서 방사선 단일처리군 보다 증가하였으며, 2일 이후에도 평균 100% 증가를 보였다.

방사선노출 후 시간에 따른 폐포조직의 변화.

방사선 노출 후 24시간 이내에 방사선 처리군에서 간질성 충혈, 폐포출혈, 폐포벽의 두께, 폐포대식세포수가 정상대조군에 비해 증가됨이 관찰되었으며, 4주 이후에는 다소 감소하다가 12주째에는 다른 시험군에 비해 초기 변화가 그대로 유지되거나 폐포벽 두께 같은 경우 크게 증가하였다. 푸코이단+방사선 처리군에서는 초기에는 정상대조군에 비해 폐포 조직의 변화가 다소 증가하였고 방사선노출 군에 비해 폐포 조직의 변화가 전 항목에서 감소했으며 이러한 경향은 4주째-12주까지 지속되었다 (Fig. 4-5a, b, c, d). 12주째는 폐포충혈, 폐포대식세포, 폐포벽 두께 등이 푸코이단+방사선처리군에서 정상대조군과 비슷하게 유지됨이 관찰 되었다.

폐포벽 두께

방사선에 의한 허파 실질의 섬유증의 정도를 판단하기 위해 폐포벽의 두께를 측정하였다. 방사선에 노출된 허파의 폐포벽은 정상 대조군에 비해 현저하게 두꺼워져 있었으나 푸코이단+방사선 처리군에서는 폐포벽이 두꺼워지지 않았음을 관찰하였다.

방사선 노출 24시간 후 폐포벽의 두께 ($3.67 \pm 0.09 \mu\text{m}$)는 정상대조군 ($2.49 \pm 0.06 \mu\text{m}$)보다 증가되어 있었으나 ($p=0.00$) F1 푸코이단+방사선 처리군 ($3.21 \pm 0.08 \mu\text{m}$) ($p=0.013$)과 F3 푸코이단+방사선 처리군 ($2.98 \pm 0.08 \mu\text{m}$) ($p=0.00$)에서는 두꺼워지지 않았다. F2 분획의 폐포벽의 두께는 방사선에 노출되지 않은 경우 ($3.48 \pm 0.15 \mu\text{m}$)와 노출된 경우 ($3.43 \pm 0.09 \mu\text{m}$) 모두에서 정상 대조군에 비해 두꺼워져 있었다.

방사선 노출 4주 후 폐포벽의 두께 ($3.15 \pm 0.09 \mu\text{m}$)는 정상대조군 ($2.41 \pm 0.07 \mu\text{m}$)보다 증가되어 있었으나 ($p=0.00$) F3 푸코이단+방사선 처리군 ($2.47 \pm 0.07 \mu\text{m}$) ($p=0.00$)에서는 두꺼워지지 않았다. F2 푸코이단분획+방사선 처리군의 경우 폐포벽의 두께 ($3.55 \pm 0.09 \mu\text{m}$)는 푸코이단을 처리하지 않은 방사선 노출 군보다 두꺼워져 있었다. 방사선에 노출되지 않고 푸코이단만 처리한 군에서 정상대조군에 비해 폐포벽이 두꺼워지는 양상을 보였지만 F3 분획을 제외하고는 통계적으로 유의하지는 않았다.

방사선 노출 12주 후에는 방사선에 노출 되지 않은 정상대조군의 폐포벽 두께 ($2.47 \pm 0.05 \mu\text{m}$)는 푸코이단만 처리한 군들과 큰 차이를 보이지 않았다. 방사선에 노출된 허파의 폐포벽 ($4.30 \pm 0.13 \mu\text{m}$)은 현저하게 두꺼워져 있었지만 ($p=0.00$) 푸코이단 각 분획+방사선 처리군에서는 폐포벽이 두꺼워지지 않았다.

폐포대식세포

방사선에 의한 염증반응의 정도를 파악하기 위해 폐포대식세포의 수를 측정하였다.

방사선에 노출된 허파에서 폐포대식세포는 정상대조군에 비해 현저하게 증가되어 있었으나, 푸코이단+방사선 처리군에서는 폐포대식세포의 증가는 크지 않았다.

방사선 노출 24시간 후 폐포대식세포의 수 ($8.0 \pm 1.48 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$)는 정상 대조군 ($2.6 \pm 0.34 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$)에 비해 뚜렷이 증가 ($p=0.00$)하였으나, 푸코이단+방사선처리 군에서는 많이 증가 하지 않았다. 특히 F3 푸코이단 분획+방사선 처리한 경우의 세포 수 ($3.6 \pm 0.48 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$)는 방사선만 처리한 경우 보다 통계적으로 유의하게 적었다 ($p=0.001$).

방사선 노출 4주에 정상대조군에 비해 폐포대식세포가 증가하고, 푸코이단을 사전 처리한 경우에는 세포의 수가 감소하는 추세를 보였으나 그 차이는 통계적으로 유의 할 정도로 크지는 않았다. 오히려 푸코이단 (특히 F3 분획)만 처리한 경우에도 대식세포의 수가 증가하는 양상을 보이기도 했으며, 푸코이단 각 분획에 따라 서로 다른 양상을 보였다.

방사선 노출 후 12주가 지난 허파에서는 대식세포의 수 ($7.2 \pm 1.28 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$)는 정상 대조군 ($3.0 \pm 0.44 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$)에 비해 현저하게 ($p=0.006$) 증가 되었으나 F1과 F2 푸코이단 분획을 사전 처리한 경우에는 대식세포의 수 (각각 $2.8 \pm 0.37 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$, $2.4 \pm 0.4 \text{개}/0.14 \text{mm}^2$)는 많이 감소하였다 ($p < 0.05$). F3 푸코이단 분획+방사선 처리 군에서도 세포 수는 감소하는 추세를 보였으나 그 차이가 크지 않았다.

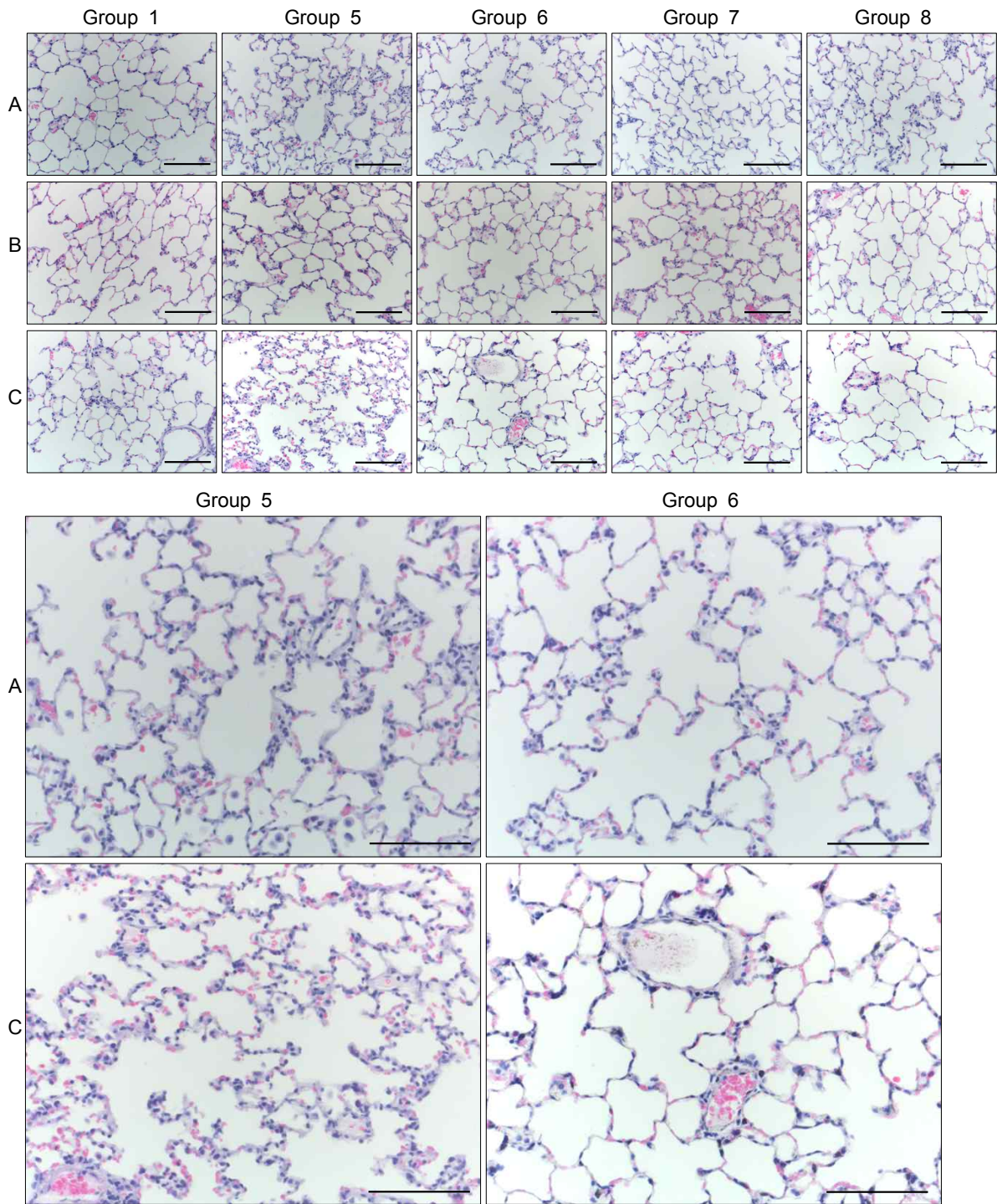


Fig. 4. Light micrographs of the lung injuries with hematoxylin and eosin-stained lung section at 1 day (A), 28 days (B) and 84 days (C) after radiation in various experimental groups. Group 1 is normal control. Group 5 is radiation only group (ROG), and Groups 6, 7, 8 are fucoidan+radiation treated groups (FRG) with F1-fucoidan fraction, F2-fucoidan fraction, and F3-fucoidan fraction, respectively. Lower micrographs are expanded ones from selected part of upper micrographs. Wall thickening and increased macrophage in ROG (Group 5) are compared with FRG group (Group 6) more clearly in the lower expanded portion. Magnification $\times 200$. Scale bar=100 μ m.

조직병리학적 소견
방사선에 노출된 허파는 정상 대조군과 비교하여 간질출혈

과 출혈 현상의 빈도가 높게 나타나는 양상을 보였다. 이러한 현상은 푸코이단을 전처리한 경우 상당히 감소되는 경향을

나타내었다.

폐포출혈현상은 푸코이단 투여군에서 방사선노출 후 24시간 이내에 매우 효과적으로 감소됨을 보였고 4주 이후 지속적으로 투여했을 시는 방사선처리군에 비해 감소되는 경향을 보였으나 정상대조군보다는 증가하였다. 간질 증혈도 출혈과 비슷한 양상을 보였다. 간질증혈과 폐포출혈은 방사선 처리군에서 초기 보다 12주에 이르러 다소 증가하거나 초기 값과 비슷한 양상을 보였다.

고찰

푸코이단의 방오기능 평가

방사선치료 후 폐암환자의 대부분이 섬유증을 호소하므로 이에 대한 방오효능을 가진 방오제 개발은 대단히 중요하다. 대개 섬유증은 방사선 치료후 4주-12주 이상 경과 시 관측된다. 본 시험에서는 방사선처리 대조군에서 방사선 노출 후 24시간부터 폐포벽두께가 정상군에 비해 증가하기 시작하여 12주째는 푸코이단+방사선 처리군에 비해 현저히 증가됨이 관측되고, 염증유발성, 폐포출혈 등과 동반하여 조직손상이 발생함을 보였다. 이에 반하여 푸코이단+방사선 처리군에서는 24시간부터 12주에 이르기까지 이와 같은 조직손상이 상대적으로 크게 감소함을 보임으로써 푸코이단투여시 조직손상이 방사선 노출 초기부터 장기적으로 억제됨을 보였다. 방사선노출로 인한 조직의 손상은 자유기발생에 따른 산화(oxidative stress) 작용으로 혈관내피세포의 손상과 폐간질의 근섬유모세포의 증식에 의한 교원질(collagen) 침착 등의 발생에 따른다(Fantone et al., 1982; Waters et al., 1996). 본 시험에서 관측되듯이 방사선 노출초기 부터 발생하는 폐포벽비후 현상은 교원질의 침착이 방사선 노출 초기에도 폐포벽에서 관찰됨이 보고된바 있어(Kim, 1998), 이러한 교원질의 침착에 의한 것으로 판단되며 따라서 후기에는 폐섬유화 및 세기관지폐포 과증식으로 진행된다고 할 수 있다. 그동안 함황다당류로서 푸코이단의 항산화작용은 *in vitro* (Choi, 2005; So, 2007; Kim and Joo, 2008) 및 *in vivo* 연구에서(Choi, 1999; Li et al., 2002) 보고가 되었다. 따라서 푸코이단은 자유기-유발 질병을 예방하는데 상당한 잠재력이 예견되어 왔다. 푸코이단은 슈퍼옥사이드 자유기에 대해서는 강한 제거력을 가지나 하이드록실 자유기에 대해서는 영향력이 약하다고 보고되듯이(Choi, 1999; Micheline 2007) 자유기의 종류에 따라서도 서로 다른 제거력을 가지며, 푸코이단의 분자량 또는 황화도에 따라서도 그 영향력이 다르다(Zhao, 2005; Wang, 2008). 더구나 푸코이단은 추출하는 해조류의 종류에 따라 분획간당배열 및 이러한 성질이 다르므로 자유기에 대한 항산화작용도 다를 것으로 기대된다. 본 시험에서는 푸코이단을 방사선 노출 6일전부터 투여를 하였으므로 시험군에서 방사선 노출에 의한 자유기의 발생을 억제하는 작용으로 조직손상을 막는다고 할 수 있다. 폐포벽비후의 경우는 푸코이단의 각 분획에서 비슷한 억제효과가 관찰되었다.

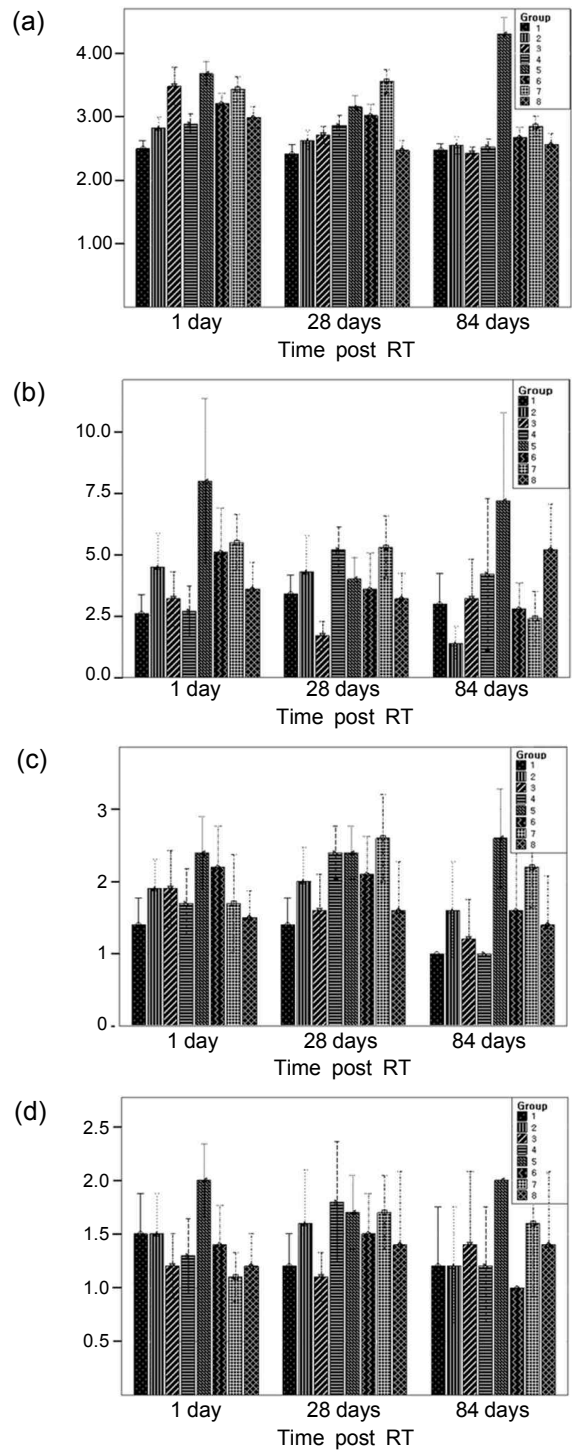


Fig. 5. Radio-Protective effect of fucoi dan on alveolar wall thickness (a), the macrophage number (b), the interstitial congestion (c), the hemorrhage (d) of rat lungs treated with radiation and/or fucoi dan fractions. Group 1 is normal control. Group 2-4 are fucoi dan only treated groups with F1 fucoi dan fraction, F2 and F3, respectively. Group 5 is radiation only group (ROG), and Groups 6, 7, 8 are fucoi dan+radiation treated groups (FRG) with F1-fucoi dan fraction, F2-fucoi dan fraction, and F3-fucoi dan fraction, respectively.

방사선에 의한 정상 폐조직의 구조적 변화는 염증 유발 물질들이 직접 혹은 간접으로 염증세포에 작용할 수 있으며, 관련하여 성장요소(TGF- β) 및 폐포대식세포의 증가가 유발된다(Hoyt et al., 1988; Backwich et al., 1989). 본 시험에서도 방사선 노출 초기(24시간)에 방사선단일 처리군에서 폐포대식세포가 현저히 증가하여 이러한 사실과 일치한다. 방사선노출+푸코이단 투여 군에서는 F1,2 분획이 초기와 후기에서 염증유발성 대식세포의 억제효과가 뚜렷하였으며, 상대적으로 함황도가 가장 많은 분획인 F3은 방사선 노출 후기에 상대적으로 억제효과가 감소되었다. 이는 장기적으로 계속 투여시 출혈반응과 상응하는 관계가 있을 수 있다.

방사선 노출후 폐간질충혈, 폐포출혈, 부종 등은 방사선노출에서 혈관내피세포의 손상으로 인한 투과성의 변화가 유발, 과열 등에 따른 효과로 발생하며(Fantone et al., 1982), 폐포벽비후 및 대식세포증가 등과 동반하여 유발되고 있다. 푸코이단 투여군에서는 방사선대조군에 비해 모든 푸코이단 분획에서 조직손상의 감소가 관찰되었다. 특히 방사선 노출후기 12주째에서는 푸코이단+방사선 처리군에서 폐섬유화에 관련되는 폐포벽비후는 뚜렷하게 감소하여 정상대조군과 같은 수준을 유지하였다.

분획간의 특이성

방사선을 조사하지 않고 F3분획 처리한 군에서는 지속적으로 출혈반응이 높았으나, 방사선조사와 함께 F3 투여한 군에서는 출혈반응도 방사선 대조군에 비해 감소시키는 현상을 보였다. F2분획 단일 처리군에서는 4주째 충혈, 폐포부종, 대식세포증가 등이 방사선대조군보다 높게 관찰되었다. 따라서 일반적 평가결과로는 F1분획+방사선 처리군에서 일관된 조직보호효과를 보였다고 할 수 있다.

항화도가 가장 높은 F3분획이 초기반응 조직보호기능이 관찰되나 한 달 이상 지속적인 투여시 대식세포증가, 폐포출혈항목에서 방오기능이 F1분획에 비해 현저히 감소한다. 이것은 항화도가 높은 분획의 항혈액응고 및 혈소판응집반응 증가에 따른 출혈 부작용에 기인하는 것으로 보이며(Mourao, 2004), 본 연구에서는 분획정제 후 분획마다 동일한 양을 각 시험군에 투여하였기 때문에 푸코이단 분획의 분자량이나 당배열 등의 성상이 다르므로 인해 방오효능의 차이가 발생했다고 볼 수 있다. 따라서 방오제품개발시에 제품 내에서 푸코이단 분획의 함량을 조절하여 투여함으로써 안전성을 확보하고 방오효능을 증강시키는 효과를 가져 올 수 있다.

사 사

본 연구는 지경부 지원 대구가톨릭대학교 해양바이오센터와 중기청으로부터 일부 연구비 지원으로 수행하였습니다.

참 고 문 헌

Arora, R., D. Gupta, R. Chawla, J. Prasad, S. Singh, A.K.

Sharma, R. Kumar, R.K. Sagar, N. Samanta and R.K. Sharma. 2005. Radioprotection by Plant Products: Present Status and Future Prospects. *Phytotherapy Research* 19, 1-22.

Backwich, P.R., J.P. Lynch and J. Larrick. 1986. Tumor necrosis factor production by human sarcoid alveolar macrophages *Am. J. Physiol.*, 125, 421-425.

Choi, J.H., D.I. Kim, S.H. Park, D.W. Kim, C.M. Kim and J.G. Koo. 1999. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan drinks on oxygen radicals and their scavenger enzymes in stressed mouse. *J. Kor. Fish. Soc.*, 32, 764-769.

Choi, E.M., A.J. Kim, Y. Kim and J.K. Hwang. 2005. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan in vitro. *J. Med. Food*, 8, 446-453.

Cumashi, A., N.A. Ushakova, M.E. Preobrazhenskaya, A. D'Incecco, A. Piccoli, L. Totani, N. Tinari, G.E. Morozevich, A.E. Berman, M.I. Bilan, A.I. Usov, N.E. Ustyuzhanina, A.A. Grachev, C.J. Sanderson, M. Kelly, G.A. Rabinovich, S. Iacobelli and N.E. Nifantiev, 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17, 541-52.

Fantone, J.C., D. Schrier and B. Weingarten. 1982. Inhibition of vascular permeability changes in rats by captopril. *J. Clin. Invest.*, 69, 1207-1211.

Hosseinimehr, S.J. 2007. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug. Discov. Today*, 12, 794-805.

Hoyt, D.G. and J.S. Lazo. 1988. Alterations in pulmonary mRNA encoding procollagens fibronectin and transforming growth factor- β precede bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246, 765-771.

Koyanagi, S., N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda and H. Shimeno. 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.*, 65, 173-179.

Koo, J.G., Y.S. Choi and J. Kwak. 2001. Blood-Anticoagulant activity of fucoidans from Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 34, 515-520.

Kim, J.H. 1998. Histomorpologic change of radiation pneumonitis in rat lungs: Catopril reduces rat lung injury induced by irradiation. *J. Kor Soc. Ther. Rad. Oncol.*, 17, 238-248.

Kim, M.H. and H.G. Joo. 2008. Immunostimulatory effects

- of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells. *Immunol. Lett.*, 115, 138-143.
- Kim, H.J., M.H. Kim, Y.Y. Byon, J.W. Park, Y. Jee and H.G. Joo. 2007. radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow-derived cells. *J. Vet. Sci.*, 8, 39-44.
- Koo, J.G., K.S. Jo, J.R. Do and S.J. Woo. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. *J. Kor. Fish. Soc.*, 28, 227-236.
- Lee, J.Y., J.T. Kim, C.J. Moon, S.H. Kim, J.W. Hyun, J.W. Park and T. Shin. 2008. Radioprotective effects of fucoidan in mice treated with total body irradiation. *Phytother. Res.*, 22, 1677-1681.
- Li, B., F. Lu, X. Wei and R. Zhao. 2008. Fucoidan: Structure and Bioactivity, *Molecules*, 13, 1671-1695.
- Li, D.Y., R.Y. Xu, W.Z. Zhou, X.B. Sheng, A.Y. Yang and J.L. Cheng. 2002. Effects of fucoidan extracted from brown seaweed on lipid peroxidation in mice. *Acta Nutr. Sin.*, 24, 389-392.
- Micheline, R.S., M. Cybelle, G.D. Celina, F.S. Fernando, O.R. Hugo and L. Edda. 2007. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.*, 19, 153-160.
- Mourao, P.A.S. 2004. Use of sulfated fucan as anti-coagulant and antithrombotic agents: Future perspectives. *Current Pharmaceut. Des.*, 10, 967-981.
- Rades, D., F. Fehlauer, A. Bajrovic, B. Mahlmann, E. Richter and W. Alberti. 2004. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients. *Radiother Oncol.*, 70, 261-264.
- Santini, V. and F.J. Giles. 1999. The potential of amifostine: from cytoprotectant to therapeutic agent. *Haematologica*, 84, 1035-1042.
- So, M.J., B.K. Kim, M.J. Choi, K.Y. Park, S.H. Rhee and E.J. Cho. 2007. Protective activity of fucoidan and alginic acid against free radical-induced oxidative stress under in vitro and cellular system. *J. Food Sci. Nutr.*, 12, 191-196.
- Teruyaa, T., T. Konishib, S. Uechib, H. Tamakib and M. Takob. 2007. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon Okamuraanus TOKIDA* in U937 cells. *International Journal of Biological Macromolecules* Volume, 41, 221-226.
- Wang, Z.W., J.M. Zhou, Z.S. Uang, A.P. Yang, Z.C. Liu, Y.F. Xia, Y.X. Zeng and X.F. Zhu. 2004. Aloe polysaccharides mediated radioprotective effect through the inhibition of apoptosis. *J. Radiat. Res.*, 45, 447-454.
- Wang, J., Q. Zhang, Z. Zhang and Z. Li. 2008. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 42, 127-132.
- Waters, C.M., J.M. Taylor and A. Molteni. 1996. Dose-response effects of radiation on the permeability of endothelial cells in culture. *Radiat. Res.*, 146, 321-326.
- Wrembel-Wargocka, J., H. Jabłońska and K. Chomiczewski. 1996. Clinical use of amifostine (WR-2721) as a preparation protecting healthy tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation therapy. *Przegl. Lek.*, 53, 820-825.
- Wu, X.W., M.L. Yang, X.L. Huang, J. Yan and Q. Luo. 2003. Effect of fucoidan on splenic lymphocyte apoptosis induced by radiation. *Chin. J. Radiol. Med. Prot.*, 23, 430-432.
- Zhao, X., C.H. Xue, Y.P. Cai, D.F. Wang and Y. Fang. 2005. The study of antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica*. *High Tech. Lett.*, 11, 91-94.

2009년 2월 5일 접수

2009년 3월 21일 수정

2009년 4월 13일 수리