생쥐에서 홍삼의 감마선조사에 의한 방어효과

승가연*, 이흥만*, , 김종상**, 이준행*

남부대학교 방사선학과*, 전남대학교 치의학전문대학원 약리학교실**

Radioprotective Effect of Red Ginseng in Irradiated Mice with ϒ-ray

Kayeon Seung*, Heungman Lee*, Junhaeng Lee*, jongsang kim**

*Department of Radiology, NamBu Universitylh, Korea. Department of Pharmacology, School of Dentistry, Chonnam National University***

<요약>

최근 의료계 및 산업계에서는 방사선 및 방사선동위원소의 이용 증가로 인한 방사선의 직접, 간접적인 피폭이 증가하고 있다. 방사선은 세포에 조사되어 생물학적 작용으로 free radical을 생성하고, 직·간접적으로 세포를 손상시킨다. 본 연구는 홍삼추출물인 사포닌을 방사선방어효과제로 이용하여 분자생물학적 측면인 세포수준(in vitro), 개체측면(in vivo)에서 사포닌의 효과를 살펴보고자 본 실험을 실시하였다.

세포수준(in vitro)실험에서는 마우스 중간엽줄기세포(mesenchymal stemcell)인 C3H/10T1/2 cells에 홍삼추출물인 사포닌(0, 0.05, 0.2, and 0.4 g/L)을 첨가 하여 세포 활성도를 실험하여 세포에 미치는 사포닌의 최적의 농도를 도출 하고, 최적의 농도에서 감마선을 각각 5 Gy, 10 Gy 조사하고 직후, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 후에 각각 XTT assay방법을 통한 세포생존율을 관찰하였다. 최적의 C3H/10T1/2 cells활성도를 위한 배양시간은 48시간으로 판단되었고, 0.05 g/L에서 최적의 활성도를 나타내었다. 따라서 0.05 g/L로 처리한 C3H/10T1/2 cells에 5 Gy를 조사하여 48시간 후에 활성도를 실험한 결과 10%증가를 보여주었다.

개체측면(in vivo) 실험에서는 6주령의 미성숙 생쥐(ICR계열)에 홍삼추출물인 사포닌을 100 mg/kg/day로 복강 내에 2주 동안 주사하고 마지막 복강주사 후 바로 감마선을 각각 5 Gy, 10 Gy의 선량으로 전신 조사하였다. 조사 48시간 후에 혈액을 채취하여 혈구세포수를 측정한 결과 백혈구 수의 감소폭이 홍삼 추출물인 사포닌 처리군에서 대조군보다 약 2.3배 줄었음이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 홍삼추출물인 사포닌은 세포수준 실험에서 방사선 피폭에 대한 방호효과가 있는 것으로 사료되었다. 동물실험에서는 혈구 세포수의 감소폭이 줄었음이 관찰되었고 향 후 다양한 연구가 선행되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

중심어 : 사포닌, 감마선, C3H/10T1/2 cell , XTT assay

<Abstract>

Recently, the incidents of direct or indirect radiation exposure due to increase of use of radiation or radioisotope are on the increase in medical and industrial circles. If cells are irradiated, free radicals are created through biological process, and cells are directly or indirectly damaged. This research intends to

Corresponding Author: 이준행

주소: 광주 광역시 광산구 월계동 864-1 남부대학교 방사선학과, E-mail: jj1809@nambu.ac.kr, Tel: +82-62-970-0158

투고 일자: 2009년 12월 22일, 심사일자: 2009년 12월 30일, 수정 일자: 2010년 02월 20일, 게재 확정일자: 2010년 03월 15일

explore into the effect of saponin at the level of cell (in vitro) and entity (in vivo), using red ginseng extract "saponin", as radioprotective agent.

In the experiment implemented at the level of cell (in vitro), degree of cell activity was measures by adding mouse mesenchymal stem cells "C3H/10T1/2 cells" into red ginseng extract "saponin(0, 0.05, 0.2, and 0.4 g/L)", and then the optimal concentration of saponin influencing cells was calculated,

in 24, 48, 72, and 96 hours after gamma irradiation at the optimal concentration of saponin, each cell survival rate was observed through XTT assay. The best time period of cultivation for the optimal activity of C3H/10T1/2 cells was as 48 hours, and the degree of optimal activity was shown at 0.05 g/L. In 48 hours after irradiation of 5 Gy to C3H/10T1/2 cells at 0.05 g/L, the degree of activity of cells increased by 10%.

In the experiment implemented at the level of entity (in vivo), red ginseng extract "saponin" at a dose of 100 mg/kg/day was injected into the abdominal cavity of six-week immature mouse for two weeks. Right after the last abdominal injection, total body irradiation of gamma rays was carried out at a dose of 5 Gy and 10 Gy. And after irradiation, the blood sample was taken, and then the number of red corpuscles was counted. In result, the decrement of experimental group treated with red ginseng extract "saponin" was 2.3 times larger than that of control group.

In view of the results so far achieved, it was revealed that red ginseng extract "saponin" has a radiation exposure protection effect in the experiment implemented at the level of cell (in vitro). In case of animal experiment, the decrement of number of red corpuscles decreased. Finally, it is necessary to carry out more various researches continuously.

I. 서론

옛 부터 홍삼을 "신비의 영약" " 만병통치약" 이라고 하였다. 우리나라 홍삼의 학명은 Panax Ginseng C.A. Meyer인데, 어원을 살펴보면 Panax의Pan은 '모든 것' Axos는 '의학'이란 뜻으로 '만병통치'라는 의미를 가지고 있다. 또 현대 의학에서 치료하기 어려운 난치병에도 홍삼의 신비한 효능을 발휘하는 사례가 많아 '신비의 영약' 이라 불리고 있으며 주성분인 사포닌은 항암 효과가 있다고 보고되고 있다.[1] Yamamot 등[2]은 인삼추출물을 경구에 투여한 결과 골수 세포와 적혈구 세포 모두에서 분열하는 세포가 증가한다고 보고하고 있다. 인삼 추출물의 복강주사 또한 골수 세포에서 DNA, RNA, 단백질, 지질 뿐만 아니라 serum albumin 과 Y-globulin의 합성율을 증가시킨다[3]고 보고되고 있다. 방사선 방호제는 1949년 Patt등[4]에 의하여 연구가 시작된 이래 합성물질에 대한 연구가 주종을 이루었으며, 다수의 후보물질이 자체의 심각한 독성에도 불구하고 암의 방사선 치료 분야 등에 적용을 목적으로 계속 연구되고 있다.[5][6] 본 연구는 홍삼추출물인 사포닌을 방사선방어효과제로 이용하여 분자생물학적 측면인 세포수준(in vitro), 개체측면(in vivo)에서 사포닌의 효과를 살펴보고자 본 실험을 실시하였다.

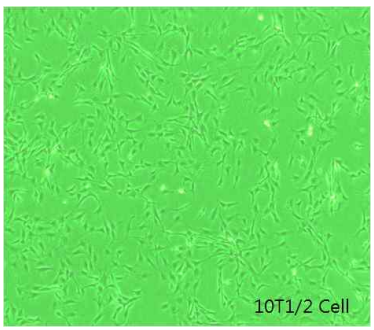
Ⅱ.재료 및 방법

서론에서 밝힌 바와 같이 본 실험은 분자생물학적 측면인 세포수준(in vitro), 개체측면(in vivo)의 두 가지 실험을 병행 실시하였다.

1. 세포수준(in vitro)

1.1 실험군 설정 및 세포 배양

Mouse embryo connective tissue에서 나온 cell line의 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell)인 [그림-1] C3H/10T1/2 cells을 100mm*20mm Cell Culture Dish에 넣고 10% 우태아 혈청이 첨가된 성장배지(growth medium,DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO)를 채운다음 37℃, 5% CO_2 incubater에서 배양하였다. 세포가 배양용기에 약 85%를 차지할 정도로 자랐을 때 계대배양을 시행하였다.



[그림-1] C3H/10T1/2 cells

1.2 세포의 사포닌 처리

Saponin fration(Panax ginseng)은 엠보연구소에서 구입하여 사용하였다. 홍삼추출물인 사포닌은 생리식염수에 10 mg/ml로 용해하였고 불용성 잔여물은 여과(필터링)하여 제거하였다. 96-well plate에 2×10^4 cells/mL의 C3H/10T1/2 cells를 배양하며, 배양된 C3H/10T1/2 cells은 농도를 조절 한 홍삼추출물인 사포닌을 [표-1]과 같이 A군(0g/L), B군(0.05g/L), C군(0.1g/L), D군(0.2g/L), E군(0.4g/L) 각각 투여한다.

[표-1] C3H/10T1/2 cells에 사포닌 처리

실험군	실험군 개체수	사포닌 농도(g/L)
A	2×10^4 cells/mL	××0
B	2×10^4 cells/mL	0.05
C	2×10^4 cells/mL	0.1
D	2×10^4 cells/mL	0.2
E	2×10^4 cells/mL	0.4

1.3 C3H/10T1/2 cells에 방사선 조사

전남대학교 호르몬연구센터에 있는 Cs-137 ϒ -ray(340 Ci with central dose rate = 9.75 Gy/min) 세포조사기(Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 이용하여 **배양된 C3H/10T1/2 cells**에 5 Gy, 10 Gy를 각각 조사하였다.

1.4 XTT assay

10% 우태아 혈청이 첨가된 성장배지에 있는 **C3H/10T1/2 cells를 96-well plate에** 세포배양액 100 ul (2×10^4 cells/mL)을 각 well 에 분주 한 다음 24시간 동안 배양 후 2% 우태아 혈청이 첨가된 성장배지로 배양액을 교체하였다. 그리고 다양한 농도의 사포닌을 10 ul 각 well에 첨가하고 CO_2 incubator에서 배양 후 실험조건에 맞추어 Assay solution (EZ-Cytox) 10 ul를 각 well 에 첨가 한다. 또 다시 1시간 동안 CO_2 incubator에서 배양 후 Spectrophotometer(ELISA reader)로 파장 450nm 에서 흡광도 측정한다.

2. 개체측면(in vivo)

2.1 실험군 설정 및 관리

실험동물은 5주령 ICR계의 수컷(대한 바이오링크) 생쥐로 7일 동안 예비사육으로 실험실 환경에 적응 시킨 후 6주령(21~25g)에 실험에 사용하였다. 사육 및 실험기간 동안의 사육실 환경은 실온이 22±2℃, 상대습도 40±10%를 유지하였고, 사육장에 5마리씩 넣어서 사육하였다. 사료와 식수는 자유로이 공급하였다.

2.2 생쥐에 사포닌 투여 및 방사선조사

홍삼추출물인 사포닌 처리는 실험군에 따라 [표-2]의 투여량으로 2주간 복강내로 주사 하였고, 최종 복강주사 48시간 후 [표-2]의 조사량으로 각각의 실험군에 세포실험에서와 동일한 감마선 조사장치(Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 이용하여 방사선을 조사하였다.

[표-2] 동물실험 사포닌 처리 및 조사량

실험군	투여량(mg/kg/day)	조사량(Gy)
A-1	0	0
A-2	0	5
A-3	0	10
B-1	100	0
B-2	100	5
B-3	100	10

2.3 혈구검사

생쥐에 에테르(0.6cc)로 전신 마취 후 복강을 열고 신장 후방 후대정맥에 주사침(27G)을 삽입하여 1 mL을 채혈하였다. 그리고 Blood cell counter로 혈구를 계

수하여 통계처리 하였다.

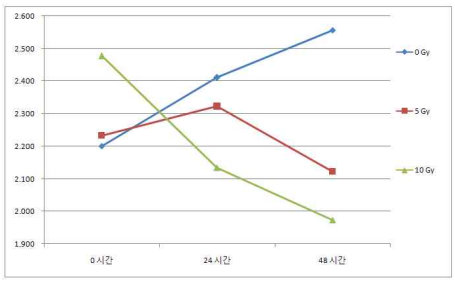
III. 결과

1. 사포닌의 C3H/10T1/2 cells내 독성

C3H/10T1/2 cells 세포독성 정도를 의미하는 생존율은 사포닌 처리48시간 후에 가장 높은 생존율을 보였으며 사포닌 농도 0 g/L, 0.05 g/L, 0.1 g/L, 0.2 g/L 및 0.4 g/L에서 각각 1.39±0.033, 1.44±0.008, 1.23±0.023, 0.92±0.074, 0.82±0.075로 사포닌 농도 0.05 g/L일 때 최적의 생존율을 보이는 것으로 [그림-2]와 같이 나타났다.

[그림-2] 사포닌 농도 및 시간경과에 따른 C3H/10T1/2 cells 세포독성

2. 방사선 단독 조시사 C3H/10T1/2 cells 생존율

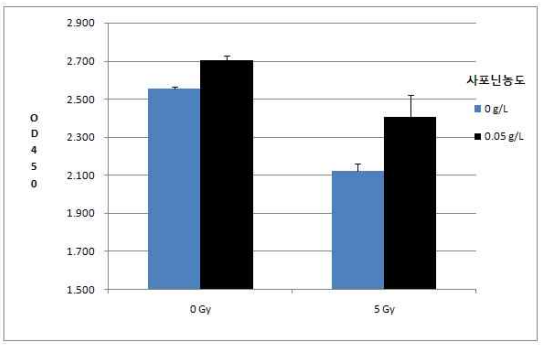


[그림-3] 방사선 조사 선량에 따른 C3H/10T1/2 cells 생존율

C3H/10T1/2 cells의 방사선 단독 조사 48시간 후에 세포 생존율은 방사선 조사량 0, 5, 및 10 Gy에서 2.557±0.008, 2.123±0.04, 1.973±0.068로 [그림-3]과 같이 각각 나타났다.

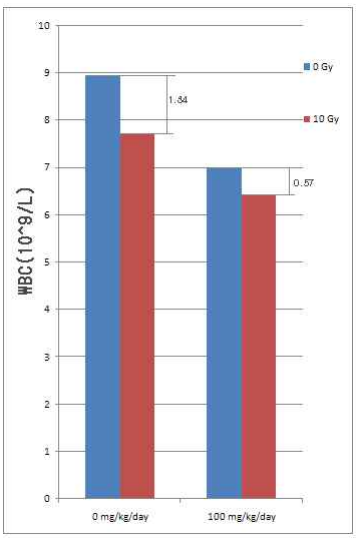
3. 사포닌과 방사선 조사 병용시 C3H/10T1/2 cells 생존율

방사선 조사 없이(0 Gy) 0 g/L, 0.05 g/L 사포닌 농도에서 2.557±0.008, 2.702±0.027 나타났고, 골수사를 유도 할 수 있는 선량범위(5 Gy)일때 0 g/L, 0.05 g/L 사포닌 농도에서는 2.123±0.04, 2.404±0.116로 [그림-4]와 같이 각각 나타났다.



[그림-4] 사포닌과 방사선 조사 병용시 C3H/10T1/2 cells 생존율

4. 혈액상의 혈구 변화



[그림-5] 혈액상의 백혈구 변화

방사선 조사 48시간 후 혈액 중 백혈구 감소폭은 대조군(0 mg/kg/day)에서 1.34×10^9/L, 홍삼 추출물인 사포닌 처리군(100 mg/kg/day)에서 0.57×10^9/L로 [그림-5]와 같이 나타났다. 혈액 중 백혈구 수는 홍삼 추출물인 사포닌 처리군이 대조군에 비해 감소폭이 줄어들었다.

IV. 결론 및 고찰

Bergonie-Tribondeau's law에 따른 방사선에 대한 세포의 감수성을 살펴보면 그 세포의 신생능력이 크면 클수록, 세포의 분열과정이 길면 길수록, 형태적, 기능적 분화의 정도가 얕으면 얕을수록, 유약세포일수록 방사선 감수성은 높다고 한다. 이에 따라 생식조직이나 조혈조직이 방사선에 대해 가장 민감하다고 인정되어 왔고, 쥐의 골수 및 말초혈액에서 인삼의 항방사선 효과에 대해 다양하게 연구되어져 왔다.[7]

본 실험에서 최적의 C3H/10T1/2 cells활성도를 위한 배양시간은 48시간으로 판단되었고, 홍삼추출물인 사포닌 농도는0.05g/L에서 최적의 활성도를 나타내었다. 따라서 사포닌 농도 0.05 g/L로 처리한 C3H/10T1/2 cells에 5 Gy를 조사하여 실험 48시간 후에 활성화한 결과 대조군(0 g/L)에 비하여 실험군(0.05 g/L)에서 10%증가를 보여 주었다. 동물실험에서는 조사 48시간 후에 혈액을 채취하여 혈구세포수를 측정한 결과 백혈구 수의 감소폭이 홍삼 추출물인 사포닌 처리군(100 mg/kg/day)에서 대조군(0 mg/kg/day)보다 약 2.3배 줄었음이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 홍삼추출물인 사포닌은 세포수준 시험에서 방사선 피폭에 대한 방호효과가 있는 것으로 사료되었고, 동물실험에서는 혈구 세포수가 감소폭이 줄었음이 관찰되었다. 실험에 있어서 향 후 다양한 연구가 선행되어야 할 것으로 사료되는 바이다.

참고문헌

[1] Jang SK, Kim JH, Jeong YS et al. Immune activity and antitumor effect of Korean red ginseng. Korean J Ginseng Sci, Vol.18, No.3, pp.151-159, 1994

[2] M.Yamamoto, Y. Hayashi, H.Ohshima. Effect of ginsenoside on DNA, protein and lipid synthesis in bone marrow. Symposia for WAKANYAKU(in Japan). Vol.6, pp.49-54, 1972

[3] H. Oura, S.Nakashima, K.Tsukuda and Y.Ohta. Effect of radix ginseng extract on serum protein synthesis. Chem. Phamd. Bull.. Vol.20, pp.980-986, 1972

[4] Patt, H., tyree, M. and Straube, R. L. : Science, Vol.110, pp.213, 1949

[5] Sweeney, T. R. : A Servey of Compounds from the Antiradiation Drug Development of the U.S. Army Medical Research and Development Command, Walter Reed Army Institute of Research. Washington D.C., 1979.

[6] Kligerman, M. M., Shaw, M. T., Slavid, M. and Yudas, J. M. : Cancer Clin Trials, Vol.3, pp.217, 1980

[7] M.Yamamoto, Y. Hayashi, H.Ohshima, E.Makino, T.Itaya., Y.Suzuki and A.Kumagai, "Effect of ginsenoside on DNA, Protein and lipid synthesis in bone marrow." Symposia for WAKAN YAKU(in Japaness), Vol.6, pp.49-54, 1972