

<원 저>

## 방사선을 조사한 마우스에서 비장세포에 대한 톡의 보호 작용

김아름<sup>1</sup> · 빙소진<sup>2</sup> · 조진희<sup>2</sup> · 안긴내<sup>3</sup> · 이지혁<sup>4</sup> · 전유진<sup>4</sup> · 이병길<sup>5</sup> · 지영훈<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 차세대융복합과학기술협동과정, <sup>2</sup>수의과대학 수의학과,  
<sup>4</sup>해양과학대학 해양생물자원이용공학연구소 및 <sup>5</sup>토목공학과  
<sup>3</sup>전남대학교 수산해양대학 해양바이오식품학과

(접수: 2015년 2월 25일, 수정: 2015년 3월 12일, 게재승인: 2015년 3월 19일)

### Protective effect of *Hizikia fusiforme* on radiation-induced damage in splenocytes

Areum Kim<sup>1</sup>, So Jin Bing<sup>2</sup>, Jinhee Cho<sup>2</sup>, Ginnae Ahn<sup>3</sup>, Ji-Hyeok Lee<sup>4</sup>, You-Jin Jeon<sup>4</sup>,  
Byung-Gul Lee<sup>5</sup>, Youngheun Jee<sup>1,2,\*</sup>

Departments of <sup>1</sup>Advanced Convergence Technology & Science, <sup>2</sup>Veterinary Medicine,  
<sup>4</sup>Marine Life Sciences, and <sup>5</sup>Civil Engineering, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea  
<sup>3</sup>Department of Marine Bio-Food Sciences, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

(Received: February 25, 2015; Revised: March 12, 2015; Accepted: March 19, 2015)

**Abstract :** The immune system is specifically sensitive to oxidative stress induced by ionizing radiation because of its rapid proliferative activity. For this reason, an instructive immune system is one of the best ways to minimize side effects, such immunodeficiency, of gamma radiation. Over the past few decades, several natural plants with antioxidant and immunomodulatory properties have been identified as adjuncts for nontoxic and successful radiotherapy. *Hizikia fusiforme* extract (HFE) containing plentiful dietary fiber and fucoidan is known for its instructive antioxidant capacity, immunomodulation abilities, and immune activation. In this study, we determined whether HFE protects radiosensitive immune cells from gamma radiation-induced damage. C57BL/6 mice were irradiated with gamma-ray. The effect of HFE on the ionizing radiation damage of immune cells was then evaluated with an MTT assay, 3H-thymidine incorporation assay, and PI staining. We found that HFE stimulated the proliferation of gamma-ray irradiated immune cells without cytotoxic effects. We also observed that HFE not only decreased DNA damage but also reduced gamma radiation-induced apoptosis of the immune cells. Our results suggest that HFE can protect immune cells from gamma-ray damage and may serve as an effective, non-toxic radioprotective agent.

**Keywords :** gamma-ray, *Hizikia fusiforme*, immune cell, natural functional product, oxidative stress

## 서 론

방사선과 방사성 동위원소는 의학, 공학 및 산업 등의 여러 분야에서 이용되고 있으며 사용 빈도 또한 지속해서 증가하는 추세이다. 의학 분야에서의 방사선 및 방사성 동위원소의 이용은 질병의 진단과 치료에 이용되고 있다 [18]. 방사선을 이용한 항암치료 시, 방사선은 종양세포뿐만 아니라 주변 조직에도 영향을 미쳐 DNA 손상을 일으키는 직접적인 영향과 세포 내 물 분자의 이온화로 생성된 활성산소(reactive oxygen species)에 의해 세포 손상을 일으키는 간접적인 영

향을 끼치는 것으로 알려졌다. 이러한 방사선의 직·간접적 영향으로 DNA 및 단백질 손상의 정도에 따라 세포의 기능 상실 및 말초 면역세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도한다. 또한, 세포 분열 및 증식이 빠른 세포가 방사선에 민감하며 그에 대한 손상으로 인하여 여러 부작용이 나타나게 된다. 따라서 방사선 치료 시 나타나는 부작용을 완화해줄 수 있는 방사선 방어 물질의 개발이 중요한 문제로 대두하였으며 [23], 방사선 방어 물질에 대한 연구는 1949년 Patt 등 [33]에 의해 cystein이 방사선 방어 효과가 있음을 밝힌 연구를 시작으로 합성물질로 이루어진 방사선 방어제에 대한 연구

\*Corresponding author  
Tel: +82-64-754-3374, Fax: +82-64-756-3354  
E-mail: yhj@jejunu.ac.kr

가 다수 보고되었다. 현재 대표적인 방사선 방어 물질인 WR-2721[Amifostine; S-2-(3-aminopropoylamino) ethylphosphorothiotic acid]은 조혈장기에 방사선 방어 효과가 있다고 보고되었으나 일부 장기에서 방사선 방어 효과가 저해되었다는 보고 또한 있었으며, 중간 대사산물로 인한 부작용이 나타나는 문제가 제기되었다 [2]. 따라서 현재까지 개발된 방사선 방어제가 갖는 부작용이 나타나지 않으면서 방사선 방어 효과가 있는 천연물질(natural product)을 찾기 위한 연구가 국내·외에서 활발히 진행되고 있다 [1, 30]. 천연물질 중 인삼, 오가피, 알로에, 다시마, 미역 등 식물추출물은 DNA 회복 기능 [1], 지질 과산화 감소 [7], 항산화 효과 [11], 면역자극 효과, 세포증식 효과 [36], 항염 및 항균 효과 [6], 글루타메이트 레벨(glutamate levels) 증가 효과 [9] 등을 지니며 또한 방사선 방어 효과를 나타내기도 한다고 보고되어 있다 [15].

본 연구에 사용된 톳 추출물(*Hizikia fusiforme* extract, HFE)은 갈조류(*Phaepta*) 모자반과의 바다말로 뿌리에서 새싹이 돋아 매년 번식을 거듭하는 다년생 해조류이다 [39]. 톳은 칼슘, 비타민 A, 철, 요오드, 마그네슘 및 식이섬유소가 풍부하며 [28], 미생물 번식 억제 효과 및 항균 효과 [21], 혈액응고 저해 [12], 지질대사 개선 효과 [19], 항염 효과, 항암 효과 [35], 항산화 효과 [22, 31]가 보고되었다. 특히, 톳을 포함한 해조류 추출물에서 B세포와 대식세포를 활성화하고 면역반응을 조절한다고 보고되었다 [29].

따라서 본 연구에서는 방사선에 의한 말초 면역세포의 손상에 대한 톳 추출물의 보호 작용 및 그 기전을 확인하여 방사선 방어 효과를 규명하고자 하였다. 이를 위하여 방사선 조사로 인하여 손상된 말초 면역세포에 대하여 톳 추출물이 미치는 영향을 평가하기 위해 세포독성, 항산화능을 측정하였고, 톳 추출물에 의한 세포자멸사 억제 효과를 검증하기 위하여 톳 추출물이 방사선 조사로 인해 손상된 말초 면역세포의 DNA에 미치는 영향, 세포자멸사 초기 단계(early apoptosis) 및 세포자멸사 말기 단계(late apoptosis)에 미치는 영향을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

실험동물은 C57BL/6 7~10주령 마우스(오리엔트바이오, 한국)를 사용하였으며, 실험동물은 표준 사육조건인 온도  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 습도  $50 \pm 5\%$ 로 유지하였다. 사료는 NIH-07를 급여하였으며, 음수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 시료 병행 처리군으로 나누어 실험하였다. 본 연구에서의 동물실험 및 관리는 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 윤리적 기준에 의거하여 시행되었으며, 동물실험 계획서는 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았다.

### 시료 추출

본 실험에 사용한 톳(*Hizikia fusiforme*)은 2013년 2월~4

월 사이에 한국 제주도 연안에서 채집하였고, 염분과 기타 불순물을 제거하기 위하여 수세하였다. 수세한 톳은 동결 건조한 후 곱게 갈아 1g을 취한 후, 100 mL 증류수에 섞어  $100^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 추출하여 여과하였다. 여과된 상층액을 동결 건조하여 본 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 톳 추출물(HFE)은 제주대학교 해양과학대학 해양생물자원이용공학연구실로부터 제공받았다.

### 방사선 조사

C57BL/6 마우스 비장 세포의 방사선 조사는 제주대학교 원자력과학기술연구소의  $^{60}\text{Co}$  감마선 조사기(Theratron-780 teletherapy; C-188 9.9TBq; Nordion, Canada)를 이용하여 분당 1.5 Gy의 선량율로 1.5 Gy를 100 cm 거리에서 조사하였다.

### 마우스의 비장세포 부유액 준비

본 실험에 사용한 비장세포는 마우스를 희생시킨 후 비장을 적출하여 세포여과기를 이용해 단일세포 부유액을 얻었다. 그 후 염화암모늄(ammonium chloride) 용액을 첨가한 후 10분 동안 실온에서 배양한 뒤 인산 완충용액(Dulbecco's phosphate-buffered saline [DPBS]; Gibco-BRL, UK)으로 세척하였다. 마우스 비장세포는 10% 소태아혈청(Gibco-BRL)과 1% 페니실린, 스트렙토마이신(Gibco-BRL)이 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco-BRL)에 부유시켰다. 이 후 톳이 비장세포에 미치는 독성과 증식력을 평가하기 위하여 72시간 배양하였으며, DNA 손상 및 세포자멸사에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 세포자멸사가 가장 잘 관찰되는 방사선 조사 후 6시간을 배양시간으로 정하였다.

### MTT assay를 통한 세포 독성 평가

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 톳에 의한 세포독성이 나타나는지 알아보기 위하여 MTT assay 실험법으로 말초 면역세포의 생존율을 측정하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한 부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톳 추출물을 처리한 실험군으로 나누어 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well로 넣었고, 실험군에는 3.1, 6.3, 12.5, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톳 추출물을 처리하여 72시간 배양하였다. 그 후 MTT 용액을 각각의 well에 15  $\mu\text{L}$ 씩 넣고 4시간 동안 배양한 다음 solubilization buffer(pH 4.7)를 각각의 well에 100  $\mu\text{L}$ 씩 처리하여 570 nm, 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### $^3\text{H}$ -thymidine incorporation을 통한 세포 증식능 평가

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 톳에 의한 증식능을 알아보기 위하여  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation 실험을 수행하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한 부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톳 추출물을 처리한 실험군으로 나누어 96-well plate에  $4 \times 10^5$  cell/well로 넣었고, 실험군에는 3.1, 6.3, 12.5, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톳 추출물을

처리하여 54시간 배양하였다. 그 후  $^3\text{H}$ -thymidine(42 Ci/mmol; Amersham, USA)을 각각의 well에  $1\ \mu\text{Ci}$ 씩 넣어 18시간 배양시킨 후 유리섬유 여지에 세포를 포획하였고 유리섬유 여지를 건조시킨 다음 방사능 측정기(MicroBeta TriLux; Perkin Elmer, Germany)를 이용하여 방사성 동위원소의 양을 측정하였다.

#### DCF-DA assay를 통한 산화적 손상 측정

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 톷 추출물이 산화적 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) assay를 수행하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한 부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톷 추출물을 처리한 실험군으로 나누어 96-well plate에  $1 \times 10^5$  cell/well로 넣었고, 실험군에는  $6.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톷 추출물을 처리하여 2시간 배양하였다. 그 후  $25\ \mu\text{M}$ 의 DCF-DA를 처리한 후 30분간 배양한 다음 DPBS로  $200\ \mu\text{L}$ 로 세척한 후 485 nm, 520 nm에서 형광광도를 측정하였다.

#### Comet assay를 통한 DNA 손상 측정

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 톷 추출물이 DNA 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Comet assay를 수행하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한 부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톷 추출물을 처리한 실험군으로 나누어 24-well plate에  $5 \times 10^4$  cell/well로 넣었고, 실험군에는  $6.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톷 추출물을 처리하여 12시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 1 mL의 DPBS로 세척하고 0.7% low melting point agarose (Invitrogen, USA)와 섞어준 후 1% normal melting point agarose (Sigma, USA)가 코팅된 슬라이드 위에  $75\ \mu\text{L}$ 를 도포하여 굳혀 lysing solution( $2.5\ \text{M NaCl}$ ,  $100\ \text{mM Na-EDTA}$ ,  $10\ \text{mM Tris-HCl pH 10}$ ,  $1\% \text{ DMSO}$ ,  $1\% \text{ Triton X-100}$ ,  $1\% \text{ N-lauroulsarcosinate}$ )에 슬라이드를 넣고  $4^\circ\text{C}$  암실에서 1시간 동안 침지하여 용해시켰다. 용해시킨 다음 슬라이드를 전기영동장치에 배열하고 unwinding buffer( $300\ \text{mM NaOH}$ ,  $10\ \text{mM Na}_2\text{-EDTA}$ , pH 8)를 넣어 20분 동안 unwinding 시킨 후  $25\ \text{V}/300\ \text{mA}$ 에서 20분 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 슬라이드를 neutralization buffer( $0.4\ \text{M Tris}$ , pH 7)로 15분 동안 세척하고 ethidium bromide로 슬라이드의 nucleotide를 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 세포 핵 이미지는 Komet 5.5 program(Andor Technology, UK)을 사용하였고, 각각의 슬라이드 당 100개 세포의 tail DNA %, olive tail movement(mm), tail length(mm)를 측정하여 분석하였다.

#### PI staining을 통한 세포자멸사 분석

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 세포자멸사에 톷 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 propidium iodide (PI) staining을 수행하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한

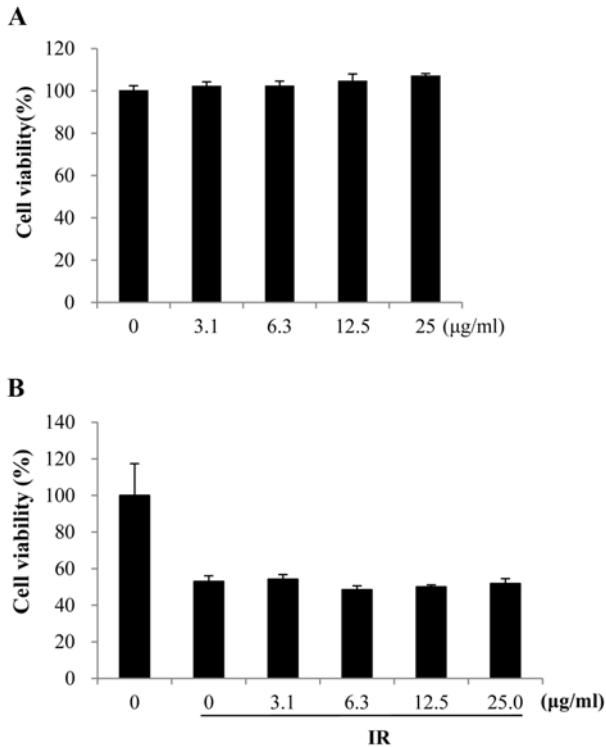
부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톷 추출물을 처리한 실험군으로 나누어 24-well plate에  $2 \times 10^6$  cell/well로 넣었고, 실험군에는  $6.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톷 추출물을 처리하여 배양하였다. 12시간 배양한 후 세포를 수확하여 DPBS로 세척한 뒤 차가운 70% 알코올로 세포를 고정시켜 PI reagent( $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  propidium iodide,  $200\ \mu\text{g}/\text{mL}$  RNase)를 각각  $500\ \mu\text{L}$ 씩 넣고 30분 동안 배양하여 flow cytometry(FACS Calibur; BD biosciences, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### Annexin V/7-AAD assay를 통한 세포자멸사 초기 및 말기 단계의 평가

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 세포자멸사 초기 단계 및 세포자멸사 말기 단계에 톷 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 annexin V/7AAD assay를 수행하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한 부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톷 추출물을 처리한 실험군으로 나누어 24-well plate에  $2 \times 10^6$  cell/well로 넣었고, 실험군에는  $6.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톷 추출물을 처리하여 12시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포를 1 mL의 차가운 DPBS로 두 번 세척한 뒤  $1 \times$  binding buffer에 다시 부유시켜 5 mL culture tube에  $1 \times 10^5$  cell/tube로 분주하였다. 그 후 annexin V(BD Biosciences, USA)와 7-AAD(BD Biosciences)를 각각  $2.5\ \mu\text{L}$ ,  $5\ \mu\text{L}$ 씩 처리한 후 실온 ( $25^\circ\text{C}$ ) 암실에서 15분 동안 반응시킨 뒤  $400\ \mu\text{L}$ 의  $1 \times$  binding buffer를 첨가하였다. 측정 및 분석은 FACS Calibur flow cytometer와 Cell-Quest software(BD Biosciences)를 이용하였다.

#### Western blot을 통한 p53, Bcl-2, Bax발현 양상 평가

방사선을 조사한 말초 면역세포에서 세포자멸사를 촉진하는 p53, Bcl-2, Bax의 발현에 톷 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blotting을 수행하였다. 비장세포를 단일세포로 분리한 부유액을 정상대조군, 방사선 조사 대조군, 방사선 조사 후 톷 추출물을 처리한 실험군으로 나누어  $1 \times 10^8$  cell/well로 넣었고, 실험군에는  $6.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 톷 추출물을 처리하여 12시간 배양한 후 세포를 수확하였다. 세포를 수확한 후 용해액[lysis buffer,  $40\ \text{mM Tris}$ ,  $120\ \text{mM NaCl}$ ,  $1\ \text{mM phenylmethylsulfonyl fluoride}$ ,  $10\ \text{mg}/\mu\text{L}$  leupeptin,  $2\ \text{mM sodium orthovanadate}$ ,  $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin (Sigma)]에 넣어 단백질을 추출하였고 추출한 단백질을 정량하여 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(10% SDS PAGE)를 이용하여 전기영동 하였다. 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 25 V에서 10분 동안 전이시킨 후 비특이적 반응을 방지하기 위하여 2% 탈지우유(skim milk)를 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse를 사용하여 실온에서 45분 동안 반응시키고 단백질 밴드는 ECL detection kit(Amersham)로 발



**Fig. 1.** (A) Effect of HFE on the viability of non-irradiated splenocytes. Viability of splenocytes was measured by MTT assay at 72 h after HFE treatment (0-25 µg/mL). (B) Effect of HFE on the viability of 1.5 Gy gamma-ray irradiated splenocytes. Viability of splenocytes was measured by MTT assay at 72 h after HFE treatment (0-25 µg/mL). Results are representative of more than three independent experiments.

현시켜 Fusion Solo(Vilber Lourmat Deutschland, France)를 이용하여 이미지를 얻었다. 각각의 밴드는 Bio-1D program(Vilber Lourmat Deutschland)을 이용해 분석하였고, 단백질 발현 intensity는  $\beta$ -actin 발현 정도와 비교하여 측정되었다.

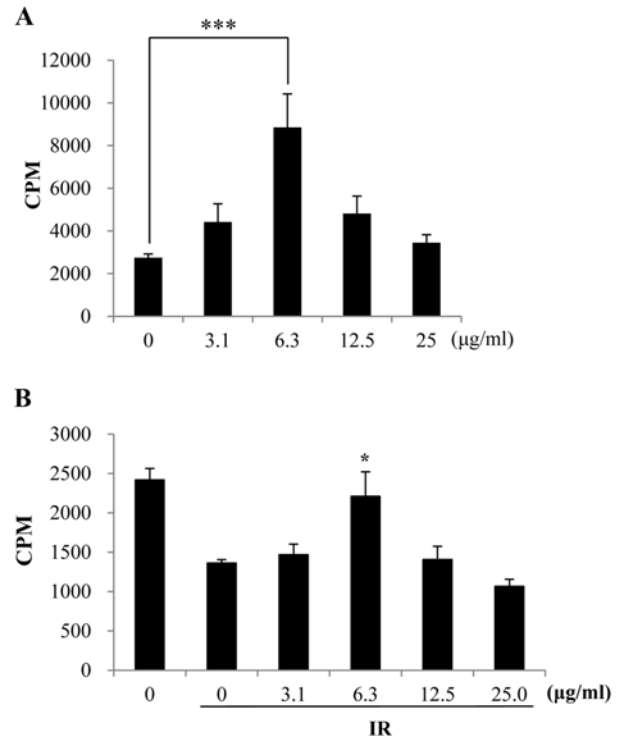
#### 통계 처리

각 실험은 3회 이상 반복(각 군당  $n=3$  이상) 하였으며, 각각의 실험결과는 평균값  $\pm$  표준편차로 나타내었다. dBSTAT 프로그램을 이용하여 ANOVA test를 실시하였으며  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.005$ 의 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

#### 툇 추출물에 의한 세포 독성 평가

툇 추출물이 말초 면역세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 방사선을 조사하지 않은 정상 대조군에서 툇 추출물 3.1 µg/mL에서 25.0 µg/mL까지의 농도에서 말초 면역세포에 대한 독성을 나타내지 않았으며, 1.5 Gy의 방사선을 조사한 말초 면역세포에 대해서도 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).



**Fig. 2.** (A) Effects of HFE on the proliferation of non-irradiated splenocytes. Proliferation was measured by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay at 72 h after HFE treatment (0-25 µg/mL). (B) Effects of HFE on the proliferation of 1.5 Gy gamma-ray irradiated splenocytes. Proliferation was measured by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay at 72 h after HFE treatment (0-25 µg/mL). The vertical axis shows radioactivity count per minute (CPM). Data are shown as means  $\pm$  SE ( $*p < 0.05$ ). Results are representative of more than three independent experiments.

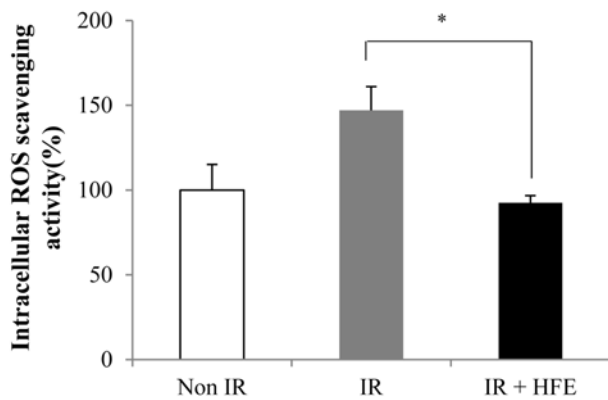
이상의 결과로부터 툇 추출물은 방사선을 조사하지 않은 말초 면역세포 및 1.5 Gy의 방사선을 조사한 말초 면역세포 모두에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다.

#### 툇 추출물에 의한 말초 면역세포의 증식능에 미치는 영향 평가

툇 추출물이 마우스의 말초 면역세포의 증식능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 말초 면역세포에 방사성 동위원소인  $^3\text{H}$ -thymidine을 처리함으로써 새로운 DNA 복제 시 방사성 동위원소가 포함된 양에 따라 그 세포의 증식능을 판단할 수 있는  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation 실험을 실시하였다. 방사선을 조사하지 않은 정상 대조군에서 툇 추출물을 처리하지 않았을 때, 2,747  $\pm$  646 cpm, 3.1 µg/mL의 툇 추출물을 처리하였을 때는 4,422  $\pm$  1,567 cpm, 6.3 µg/mL의 툇 추출물을 처리하였을 때는 8854  $\pm$  820 cpm으로 저농도의 툇 추출물을 처리한 말초 면역세포의 증식능이 유의적으로 증가함을 보였다. 특히, 툇 추출물 처리 대조군에 비하여 6.3 µg/mL의 농도로 처리한 군에서 말초 면역세포의 증식능이 3.2배 증가함을 보였다(Fig. 2A,  $p < 0.001$ ). 또한 1.5 Gy의

방사선을 조사한 말초 면역세포에 톳 추출물을 처리한 결과, 방사선 대조군에 비해 말초 면역세포의 증식능을 유의성 있게 증가시켰다. 톳 추출물을 6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리군에서  $2,209 \pm 310$  cpm으로 정상 대조군( $2,418 \pm 145$  cpm)과 비슷한 수치를 보였다(Fig. 2B,  $p < 0.05$ ).

이상의 결과로부터 저농도의 톳 추출물 처리에 의해 말초 면역세포의 증식능이 유의성 있게 증가함을 확인하였다. 따라서 이후 실험에서는 6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 톳 추출물을 사용하였다.



**Fig. 3.** Effect of HFE on intracellular ROS scavenging activity in splenocytes. The intracellular ROS was measured by ionizing radiation using DCF-DA assay. Splenocytes irradiation was performed with 1.5 Gy gamma-ray. The treated with HFE 6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  after gamma ray irradiation. Data are shown as means  $\pm$  SE ( $*p < 0.05$ ). Results are representative of more than three independent experiments.

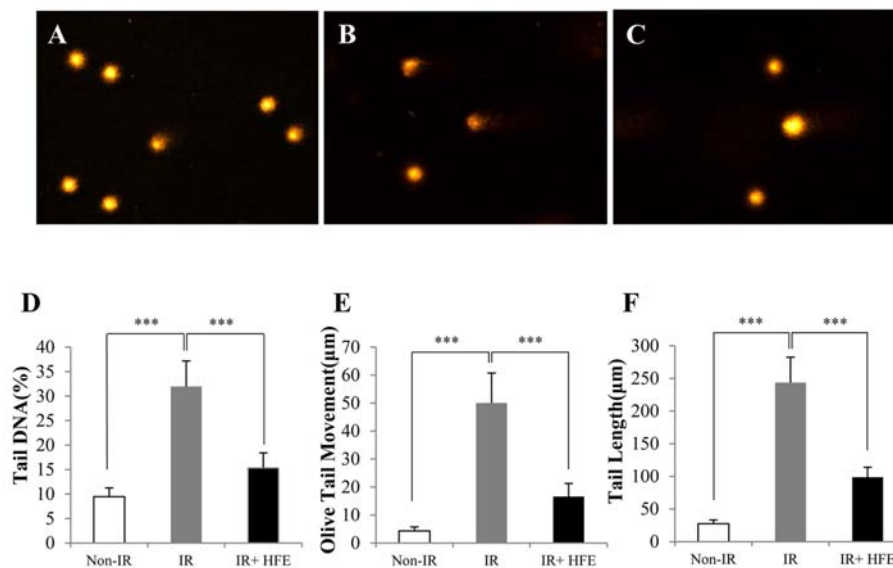
### 톳 추출물에 의한 말초 면역세포에서의 산화적 손상 억제

DCF-DA assay는 DCF-DA가 세포 내에서 활성산소에 의하여 산화되면서 나타나는 형광 광도를 측정하여 활성산소의 생성량을 판단할 수 있는 실험법이다. 이를 통하여 방사선에 의해 생성된 활성산소가 일으키는 말초 면역세포의 산화적 손상에 대한 톳 추출물의 효과를 평가하였다. 방사선을 조사하였을 때  $147.0 \pm 13.98\%$ 로 방사선을 조사하지 않은 정상 대조군  $100.0 \pm 15.09\%$ 에 비하여 형광 광도가 증가함을 확인하였고, 톳 추출물을 6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리군에서는  $92.5 \pm 4.22\%$ 로 톳 추출물을 처리한 말초 면역세포의 활성산소 생성량이 유의성 있게 감소함을 보였다(Fig. 3,  $p < 0.05$ ).

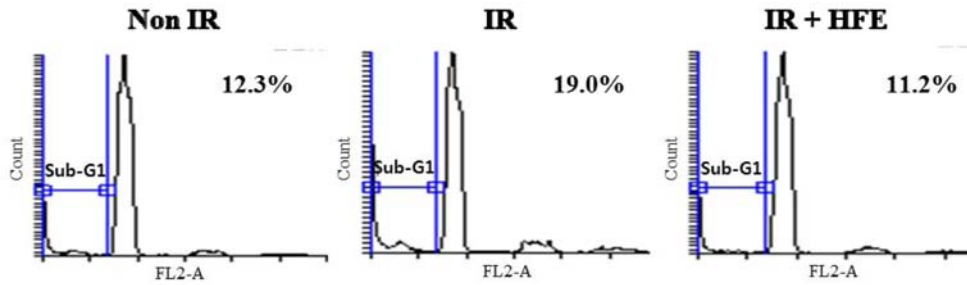
이상의 결과로부터 방사선을 조사한 말초 면역세포에 톳 추출물을 처리하였을 때 활성산소의 생성량이 감소한 것으로 미루어 볼 때, 톳 추출물이 말초 면역세포의 산화적 손상의 억제를 확인할 수 있었다.

### 톳 추출물에 의한 말초 면역세포에서의 DNA 손상 억제

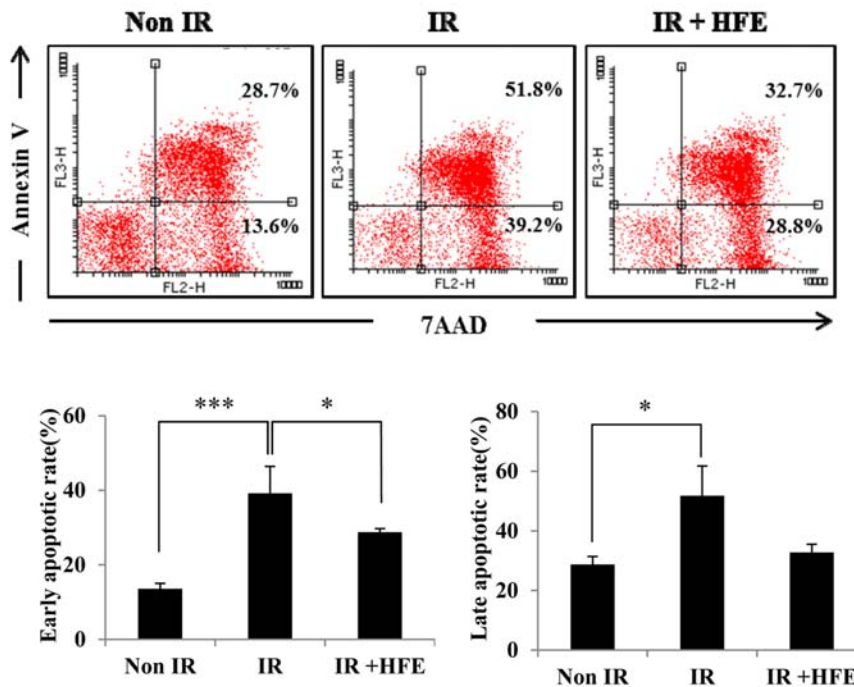
Comet assay는 DNA 손상을 비교적 간단한 방법으로 측정할 수 있어 다양한 연구에 사용되고 있다. 방사선에 의한 DNA 손상에 대한 톳 추출물의 효과를 평가하기 위하여 Comet assay를 실시하였다(Fig. 4). DNA 분열 정도를 나타내는 tail의 길이를 분석한 결과 방사선 조사를 하였을 때 정상 대조군에 비하여 tail의 길이가 길어짐을 확인할 수 있었고 방사선 조사 후 톳 추출물을 처리하였을 때 tail의 길이가 정상 대조군과 비슷한 길이로 짧아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A~C). 또한, 방사선을 조사한 마우스의 말초 면역세포의 tail DNA%, olive tail movement, tail length는 각각  $31.9 \pm 5.20\%$ ,  $50.0 \pm 10.69$   $\mu\text{m}$ ,  $243.6 \pm 38.71$   $\mu\text{m}$ 으로



**Fig. 4.** Effect of HFE on DNA damages in splenocytes after 1.5 Gy gamma-ray irradiation. The radiation induced DNA damage was detected by comet assay. Comparison was (A) Non-irradiated, (B) 1.5 Gy gamma-ray irradiated, (C) 1.5 Gy gamma-ray irradiated after 6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HFE treatment. (D) percent of tail DNA, (E) olive tail movement, (F) tail length. The percent of tail DNA was counted in 100 cells. Data are shown as means  $\pm$  SE ( $***p < 0.001$ ). Results are representative of more than three independent experiments.



**Fig. 5.** Inhibition of apoptotic cell death in 1.5 Gy gamma-ray irradiated splenocytes were treated with HFE (6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Effect of HFE on 1.5 Gy gamma-ray irradiation-induced apoptotic cell death. The type of cell death was measured staining of splenocytes with propidium iodide. For each analysis were gated into sub-G1 phase as represented the histogram. The group was divided into three groups; non irradiation, 1.5 Gy gamma-ray irradiation only and irradiation after treated with HFE (6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Results are representative of more than three independent experiments.



**Fig. 6.** The apoptosis of splenocytes both with and without HFE (6.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) treatment was evaluated by Flow cytometry. (A) Apoptosis analysis using annexin V/7-AAD double staining. (A and B) Annexin V positive splenocytes population mean early apoptosis and (A and C) annexinV/7-AAD double positive splenocytes population means late apoptosis. Data are shown as means  $\pm$  SE. Results are representative of more than three independent experiments.

정상 대조군에 비하여 크게 증가한 반면, 방사선 조사 후 톳 추출물 처리군에서는  $15.3 \pm 3.06\%$ ,  $16.5 \pm 4.69 \mu\text{m}$ ,  $98.5 \pm 15.37 \mu\text{m}$ 로 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4D~F,  $p < 0.005$ ).

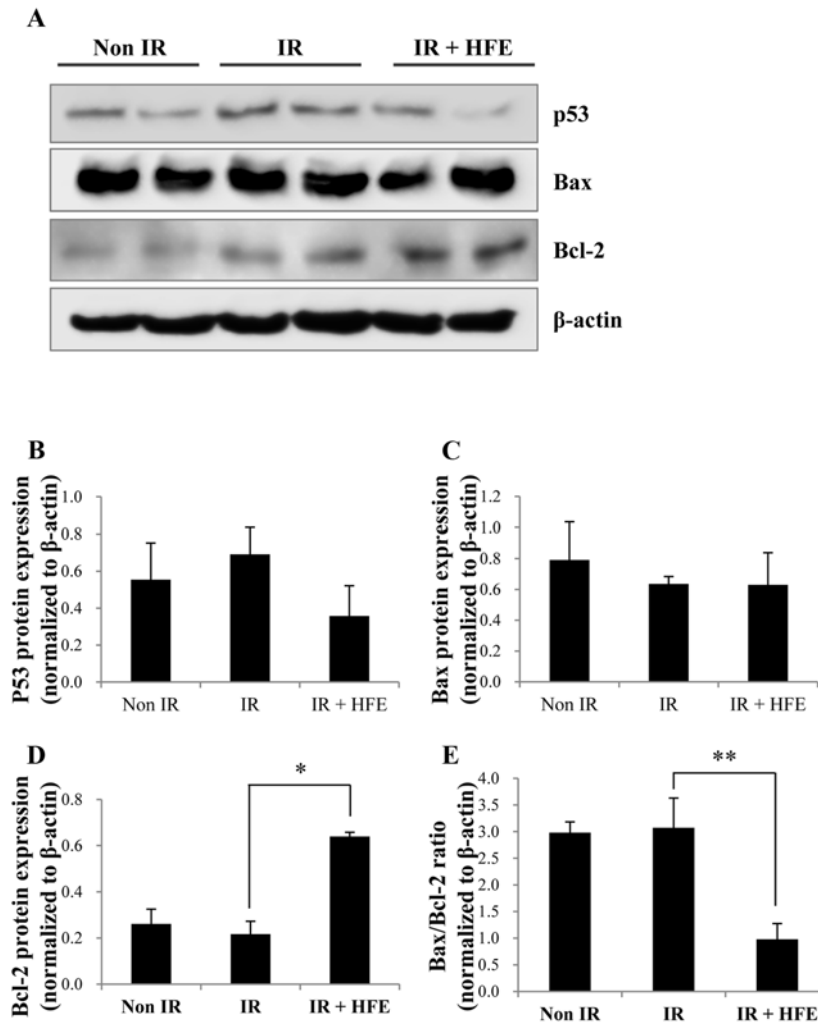
이상의 결과로부터 방사선 조사 후 톳 추출물을 처리하였을 때 방사선으로 인한 DNA 손상이 유의적으로 감소하는 것으로 보아, 톳 추출물이 방사선에 민감한 말초 면역세포의 DNA 손상 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

**톳 추출물에 의한 말초 면역세포에 대한 세포자멸사 분석**

톳 추출물이 방사선에 의한 말초 면역세포에 대한 세포자멸사를 분석하기 위하여 PI 염색을 실시하였다. 핵을 염색시키는 PI는 정상세포의 경우 세포막에 가로막혀 염색되지 않

지만, 세포자멸사가 일어나 세포막에 구멍이 생긴 세포의 핵은 PI에 염색되게 된다. 이러한 원리를 통하여 세포자멸사를 알아보기 위해 세포자멸사를 나타내는 sub-G1기를 분석하였다. 방사선을 조사한 마우스의 말초 면역세포에서 세포자멸사를 나타내는 sub-G1의 비율이 19.0%를 나타내었고, 방사선 조사 후 톳 추출물 처리군에서는 11.2%로 정상대조군의 12.3%와 비슷한 수치를 나타내었다(Fig. 5).

이상의 결과로부터 방사선 조사 후 톳 추출물을 처리하였을 때 sub-G1기의 비율이 감소하는 것으로 보아, 톳 추출물이 방사선에 민감한 말초 면역세포의 세포자멸사를 억제함을 확인할 수 있었다.



**Fig. 7.** The radioprotective effect of HFE was evaluated in splenocytes by the western blots. p53, Bax, Bcl-2 protein expression in splenocytes 12 hours after 2 Gy irradiation. Representative Western blots of (A and B) p53, (A and C) Bax, (A and D) Bcl-2, (E) Bax/Bcl-2 ratio and (B-E) densitometric analysis. Data are shown as means  $\pm$  SE (\* $p$  < 0.01). Results are representative of more than three independent experiments.

#### 톷 추출물에 의한 말초 면역세포의 세포자멸사 억제

톷 추출물이 방사선에 의한 말초 면역세포의 세포자멸사 초기 단계 및 세포자멸사 말기 단계를 억제하는지 확인하기 위하여 annexin V, 7AAD 이중염색을 실시하였다. annexin V는 세포자멸사 초기 단계에 세포막의 변성으로 인해 세포 내막에 있던 인지질이 세포막 표면에 노출되는데 이 때, annexin V와 결합하며 7-AAD는 세포자멸사 말기 단계에 핵막이 파괴되면서 핵에 염색된다. 때문에 annexin V 양성/7-AAD 음성인 세포는 세포자멸사 초기단계 세포, annexin V 양성/7-AAD 양성인 세포는 세포자멸사 말기 단계 및 괴사(necrosis) 세포로 분석하여 백분율로 나타내었다.

방사선 조사 후 톷 추출물 처리군은 방사선 조사 대조군에 비해 세포자멸사 초기단계가 다소 감소하는 경향을 보였으며, 말기 단계에서는 방사선 조사 대조군에 비하여 약 3.7 배 유의성 있게 감소하였다(Fig. 6,  $p$  < 0.001).

#### 톷 추출물에 의한 말초 면역세포에 대한 세포자멸사 관련 단백질의 발현 변화

방사선 조사 후 세포자멸사에 관련된 단백질인 p53, Bcl-2, Bax의 변화를 western blot을 통하여 확인하였다(Fig. 7).

세포자멸사를 유도하는 분자인 p53의 발현 intensity는 방사선을 조사한 마우스의 말초 면역세포에서  $0.69 \pm 0.14$ 로 정상 대조군의  $0.55 \pm 0.20$ 보다 다소 증가하는 경향을 보였으며, 방사선 조사 후 톷 추출물 처리군에서는  $0.36 \pm 0.16$ 로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7A and B). 세포자멸사를 유도하는 또 다른 분자인 bax의 발현 intensity 또한 p53과 비슷한 경향을 보였다(Fig. 7A and C). 세포자멸사를 억제하는 기능을 가진 bcl-2의 발현 intensity는 정상대조군  $0.26 \pm 0.06$ 보다 방사선을 조사한 마우스의 말초 면역세포에서  $0.22 \pm 0.06$ 로 다소 감소하는 경향을 보였으며, 방사선 조사 후 톷 추출



물 처리군에서는  $0.64 \pm 0.02$ 로 유의성 있게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 7A and D). Bax와 bcl-2의 비율을 측정된 결과 정상 대조군과 방사선 조사군에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 방사선 조사 후 톿 처리군에서 크게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7E).

이상의 결과로부터 방사선 조사 후 톿 추출물을 처리하였을 때 세포자멸사를 유도하는 분자인 p53과 bax의 발현이 감소함을 확인할 수 있었고, 세포자멸사를 억제하는 분자인 bcl-2의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다.

## 고 찰

방사선에 의한 생체의 손상은 세포의 DNA 직접적 파괴에 따른 직접적인 손상과 세포 내 물 분자의 이온화로 생성된 활성산소에 의한 DNA, RNA, 단백질 또는 세포막 손상인 간접적 손상으로 알려졌다 [37]. 특히 분화능력이 크고, 세포 주기가 짧은 면역 조혈계는 이러한 방사선에 의한 직·간접적 손상에 감수성이 매우 커서 방사선 피폭 또는 방사선 치료 후 급성시기에 관찰되는 면역력 저하와 연관이 있다 [10]. 방사선 노출 후 나타나는 대표적인 현상인 면역력 저하 현상은 생체의 전반적인 방어체계의 붕괴로 인하여 외부 물질에 대항하는 정상적인 방어작용이 일어나지 못해서 사망에까지 이를 수 있는 중요한 증상 중 하나이다. 이러한 현상을 막기 위하여 과거부터 방사선치료법의 발달과 함께 다수의 면역저하 억제제가 개발되어왔으나 현재까지 개발된 면역저하 억제제(G-CSF, OK-432 등)는 유효 용량에서 수반되는 강한 독성과 복수의 약제와의 병용에 의한 복합부작용이 있다는 문제가 있다 [17].

방사선 노출에 따른 생체 손상을 감소시키면서 합성 방사선치료제의 투여에 따른 부작용을 최소화하기 위하여 최근에는 천연물 및 그 추출물의 방사선 방어 효능 및 방어제로서의 가능성이 대두하고 있다 [16]. 일부 해양 갈조류에 존재하는 후코이단(fucoidan)은 수용성의 고분자 다당체로서 항암, 항바이러스, 면역조절작용 등의 다양한 기능이 보고되어 주요 유효 활성 성분으로 관심이 집중되고 있으며 [26], 본 연구팀에서도 감태에서 분리한 후코이단의 면역조절기능 및 방사선 방어 효능을 보고한 바 있다 [8, 24, 25]. 본 연구에서 사용한 톿 역시 해양 갈조류의 일종으로서 약 2.7%의 후코이단을 함유하고 있으며 [27], 2013년에는 톿에서 추출한 수용성 다당체의 항산화 효능이 보고되기도 하였다 [40]. 본 연구에서도 톿은 방사선 조사로 인해 손상된 마우스의 말초 면역세포의 산화적 손상을 유의적으로 감소시키는 것을 관찰할 수 있었는데, 이는 톿이 함유한 유효 활성 성분인 후코이단에 의한 것으로 본다.

방사선 조사에 따른 DNA 손상은 산화적 스트레스에 의한 것뿐만 아니라 직접적으로도 일어날 수 있으며 세포의 생명과 기능에 결정적인 영향을 미치기 때문에, 방사선 방어 효능을 평가하는 데 있어 DNA 손상의 평가는 중요한 의미를 가진다. 본 연구에서 alkaline comet assay를 통하여 톿이

방사선 조사에 의한 DNA 손상 정도에 미치는 영향을 평가한 결과, 방사선 조사 대조군보다 톿 병행 처리군에서 유의적으로 DNA 손상 정도가 감소함을 확인하였다. 이러한 톿의 유전자 보호 효능(genoprotective effect)은 앞서 설명한 톿의 항산화 효능과 연관이 있을 것으로 보인다.

면역세포와 같이 방사선 민감도가 높은 세포에서는 DNA 손상 후 몇 시간 이내에 일어나는 세포자멸사는 쉽게 관찰된다 [38]. 방사선에 의해 일어나는 세포자멸사는 주로 p53 의존적인 경로를 거쳐 일어난다고 알려졌으며 [13], DNA 염색 후 유세포 분석기(flow cytometry)로 분석 시 sub-G1 DNA 분획에서 관찰된다. 본 연구에서 톿이 방사선 조사된 면역세포의 세포자멸사에 미치는 영향을 관찰한 결과, 방사선 조사 대조군보다 톿 병행 처리군에서 sub-G1기의 세포가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 세포자멸사의 초기 단계는 세포막의 기능은 유지하고 있으나 세포변성으로 내막에 있던 인지질(phosphatidylserine, PS)이 세포 외막에 표현되는데 이를  $Ca^{2+}$  의존성 결합 단백질인 annexin V를 통하여 염색하여 관찰한 결과 [14], 톿 병행 처리는 초기 및 말기의 전 단계에 걸쳐 세포자멸사가 감소하는 경향을 보였다. 방사선에 의한 세포자멸사의 초기 단계에서 활성화되는 p53은 bax 단백을 직접 활성화해 미토콘드리아의 막 전위에 영향을 주어 세포자멸사를 유도한다 [20]. Bax 단백질은 미토콘드리아 막 전위에 영향을 미치는 bcl-2 family 중 하나이며, 또 다른 bcl-2 family 단백질인 bcl-2에 의해 억제된다 [34]. 본 연구에서 톿에 의한 면역세포의 세포자멸사 억제 효과는 p53과 bax의 감소에 의한 것보다 bcl-2의 증가로 인하여 나타난 것으로 보였다. 특히, 미토콘드리아의 막 전위 변화에 있어서 bax 단백질과 bcl-2 단백질의 상대적인 비율이 각각의 절대적인 수치보다 중요하다고 여겨진다 [5]. 본 연구에서도 톿 처리군의 bax/bcl-2 비율이 많이 감소한 것으로 보아, 톿이 미토콘드리아를 경유하는 세포자멸사를 억제했다고 생각한다. 이러한 결과는 천연물의 방사선이 유도하는 세포자멸사 억제 효능에 관한 이전 보고들과 일치하는 것이다 [4, 32].

방사선 노출에 따른 면역력 저하를 억제하기 위해서는, 면역세포의 DNA 손상과 세포자멸사뿐만 아니라 세포의 증식능 역시 빠른 세포주기를 가진 면역 조혈계에서 중요한 요소로 간주한다 [3]. 본 연구에서 이러한 면역세포의 증식능을 관찰한 결과, 방사선 조사 대조군보다 톿 병행 처리군에서 독성 없이 증식능이 증가함을 확인하였다. 따라서 톿이 DNA 손상에 따른 세포자멸사의 억제뿐만 아니라, 방사선 때문에 감소한 면역세포의 증식능을 크게 상승시키는 것으로 생각한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 제주 연안에서 자생하는 갈조류인 톿이 방사선에 민감한 면역세포의 손상을 완화하고, 방사선에 의해 억제된 세포의 증식능을 향상시키는 것으로 보인다. 앞으로 톿의 면역 조혈계에 대한 방사선 방어 효능은 추가적인 동물실험 연구가 필요하지만, 본 연구 결과는 단순 식품으로만 사용되었던 톿을 화학 요법제나 방사선 치료 시 보조 요법제로 사용할 가능성을 시사하고 있다.



## 감사의 글

이 논문은 2014년 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원(제주씨그랜트사업)과 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업(114022-02-1-HD030)에 의해 이루어졌습니다.

## References

1. Arora R, Gupta D, Chawla R, Sagar R, Sharma A, Kumar R, Prasad J, Singh S, Samanta N, Sharma RK. Radioprotection by plant products: present status and future prospect. *Phytother Res* 2005, **19**, 1-22.
2. Antonadou D, Coliarakis N, Synodinou M, Athanassiou H, Kouveli A, Verigos C, Georgakopoulos G, Panoussaki K, Karageorgis P, Throuvalas N; Clinical Radiation Oncology Hellenic Group. Randomized phase III trial of radiation treatment ± amifostine in patients with advanced-stage lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, **51**, 915-22.
3. Bergonié J, Tribondeau L. Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. 1906. *Yale J Biol Med* 2003, **76**, 181-182.
4. Bing SJ, Ha D, Kim MJ, Park E, Ahn G, Kim DS, Ko RK, Park JW, Lee NH, Jee Y. Geraniin down regulates gamma radiation-induced apoptosis by suppressing DNA damage. *Food Chem Toxicol* 2013, **57**, 147-153.
5. Bladon J, Taylor PC. Extracorporeal photopheresis: a focus on apoptosis and cytokines. *J Dermatol Sci* 2006, **43**, 85-94.
6. Bouter A, Carmelle R, Gounou C, Bouvet F, Degrelle SA, Evain-Brion D, Brisson AR. Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta* 2015, **29** (Suppl 1), S43-49.
7. Burton GW, Ingold KU. β-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984, **224**, 569-573.
8. Byon YY, Kim MH, Yoo ES, Hwang KK, Jee Y, Shin T, Joo HG. Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cells: improvement of the cell survival and immunoreactivity. *J Vet Sci* 2008, **9**, 359-365.
9. Chandra Jagetia G, Rajanikant GK, Rao SK, Shrinath Baliga M. Alteration in the glutathione, glutathione peroxidase, superoxide dismutase and lipid peroxidation by ascorbic acid in the skin of mice exposed to fractionated γ radiation. *Clin Chim Acta* 2003, **332**, 111-121.
10. Denekamp J. Cell kinetics and radiation biology. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986, **49**, 357-380.
11. Devasagayam TPA, Kesavan PC. Radioprotective and antioxidant action of caffeine: mechanistic considerations. *Indian J Exp Biol* 1996, **34**, 291-297.
12. Dobashi K, Nishino T, Fuiihara M, Nagumo T. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res* 1989, **194**, 315-320.
13. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 2010, **31**, 363-372.
14. Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 1998, **5**, 551-562.
15. Goel HC, Prasad J, Singh S, Sagar RK, Kumer IP, Sinha AK. Radioprotection by a herbal preparation of *Hippophae rhamnoides*, RH-3, against whole body lethal irradiation in mice. *Phytomedicine* 2002, **9**, 15-25.
16. Hosseinimehr SJ. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 2007, **12**, 794-805.
17. Iida S, Matsuoka S, Kudo C, Moriya Y, Yoshida T, Saito M. Combination chemo-immunotherapy of murine solid tumor with OK-432, G-CSF, IL-2, and chemotherapeutics. *Int J Immunopharmacol* 1995, **17**, 973-980.
18. International Atomic Energy Agency (IAEA). IAEA Safety Series No. 47. Manual on Early Medical Treatment of Possible Radiation Injury. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1978.
19. Jung BM, Ahn CB, Kang SJ, Park JH, Chung DH. Effects of *Hizikia fusiforme* extracts on lipid metabolism and liver antioxidative enzyme activities in triton-induced hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2001, **30**, 1184-1189.
20. Kalina I, Némethová G. Variability of the adaptive response to low dose radiation in peripheral blood lymphocytes of twins and unrelated donors. *Folia Biol (Praha)* 1997, **43**, 91-95.
21. Kim SH, Lim SB, Ko YH, Oh CK, Oh MC, Park CS. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. *Korean J Fish Aquat Sci* 1994, **27**, 462-468.
22. Ko MS, Shin KM, Lee MY. Effect of *Hizikia fusiforme* ethanol extract on antioxidative enzymes in ethanol-induced hepatotoxicity of rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2002, **31**, 87-91.
23. Kuntić VS, Stanković MB, Vujić ZB, Brborić JS, Uskoković-Marković SM. Radioprotectors-the evergreen topic. *Chem Biodivers* 2013, **10**, 1791-1803.
24. Lee SH, Ko CI, Ahn G, You S, Kim JS, Heu MS, Kim J, Jee Y, Jeon YJ. Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydr Polym* 2012, **89**, 599-606.
25. Lee W, Ahn G, Lee BJ, Wijesinghe WJJP, Kim D, Yang H, Kim YM, Park SJ, Jee Y, Jeon YJ. Radio-protective effect of polysaccharides isolated from *Lactobacillus brevis*-fermented *Ecklonia cava*. *Int J Biol Macromol* 2013, **52**, 260-266.
26. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* 2008, **13**, 1671-1695.
27. Li B, Wei XJ, Sun JL, Xu SY. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res* 2006, **314**, 1135-1146.
28. Lim SB, Kim SH, Ko YH, Oh CK, Oh MC, Ko YG, Park CS. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* and *Aloe vera* Linne by supercritical carbon dioxide and antimicrobial activity of their extracts. *Korean J Food Sci Technol* 1995, **27**, 68-73.
29. Liu JN, Yoshida Y, Wang MQ, Okai Y, Yamashita U. B cell stimulating activity of seaweed extracts. *Int J Immunopharmacol* 1997, **19**, 135-142.
30. Mo SJ, Hong HW, Bang J, Cho KW. Optimal condition for eicosapentaenoic acid production and purification from psychrophilic marine bacterium *Shewanella* sp. L93. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011, **39**, 218-223.

31. **Park KE, Jang MS, Lim CW, Kim YK, Seo YW, Park HY.** Antioxidant activity on ethanol extract from boiled-water of *Hizikia fusiformis*. J Korean Soc Appl Biol Chem 2005, **48**, 435-439.
32. **Park SJ, Ahn G, Lee NH, Park JW, Jeon YJ, Jee Y.** Phloroglucinol (PG) purified from *Ecklonia cava* attenuates radiation-induced apoptosis in blood lymphocytes and splenocytes. Food Chem Toxicol 2011, **49**, 2236-2242.
33. **Patt HM, Tyree EB, Straube RL, Smith DE.** Cystein protection against X irradiation. Science 1949, **110**, 213-214.
34. **Rudner J, Jendrossek V, Belka C.** New insights in the role of Bcl-2: Bcl-2 and the endoplasmic reticulum. Apoptosis 2002, **7**, 441-447.
35. **Ryu HS, Kim HS.** Effect of *Zingiber officinale* and *Hizikia fusiforme* water extracts on NO production in macrophage of mice. Korean J Food Nutr 2006, **19**, 327-331.
36. **Song JY, Han SK, Bae KG, Lim DS, Son SJ, Jung IS, Yi SY, Yun YS.** Radioprotective effects of ginsan, an immunomodulator. Radiat Res 2003, **159**, 768-774.
37. **Toyokuni S.** Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol Int 1999, **49**, 91-102.
38. **United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR).** Effects of Ionizing Radiation. UNSCEAR 2006 Report. Vol. 2. Scientific Annexes C, D and E. United Nations Publication, Vienna, 2009.
39. **Watanabe T, Hirayama T, Takahashi T, Kokubo T, Ikeda M.** Toxicological evaluation of arsenic in edible seaweed, *Hizikia* species. Toxicology 1979, **14**, 1-22.
40. **Wu M, Wu Y, Qu M, Li W, Yan X.** Evaluation of antioxidant activities of water-soluble polysaccharides from brown alga *Hizikia fusiformis*. Int J Biol Macromol 2013, **56**, 28-33.