J Korean Soc Food Sci Nutr
44(5), 657~663(2015)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2015.44.5.657

BALB/c 마우스에서 감마선 조사로 유도된 조직 손상과 산화적 스트레스에 대한 헤스페레틴 투여 후의 방사선방호 효과

강정애[1,2] · 남유리[1] · 노종국[1,3] · 장범수[1,4] · 정영진[2] · 박상현[1,4]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소, [2]충남대학교 식품영양학과
[3]광명당제약 부설연구소
[4]한국과학기술연합대학원대학교 방사선동위원소 응용 및 생명공학

Radioprotective Effects of Post-Treatment with Hesperetin against γ-Irradiation-Induced Tissue Damage and Oxidative Stress in BALB/c Mice

Jung Ae Kang[1,2], You Ree Nam[1], Jong Kook Rho[1,3], Beom-Su Jang[1,4], Young-Jin Chung[2], and Sang Hyun Park[1,4]

[1]Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute
[2]Department of Food and Nutrition, Chungnam National University
[3]R&D Center, Kwangmyungdang Pharmaceutical Co., Ltd.
[4]Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, Korea University of Science and Technology

ABSTRACT Ionizing radiation induces cell damage through formation of reactive oxygen species. The present study was designed to evaluate the protective effects of post-treatment with hesperetin against γ-irradiation-induced cellular damage and oxidative stress in BALB/c mice. Healthy female BALB/c mice were exposed to γ-irradiation and administered hesperetin (25 mg/kg and 50 mg/kg, b.w., orally) for 7 days after 6 Gy of γ-irradiation. Exposure to γ-irradiation resulted in hematopoietic system damage manifested as decreases in spleen indexes and WBC count. In addition, hepatocellular damage characterized by increased levels of aspartate aminoransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in plasma. However, post-irradiation treatment with hesperetin provided significant protection against hematopoietic system damage and decreased AST and ALT levels in plasma. The results indicate that γ-irradiation induced increases in lipid peroxidation and xanthine oxidase (XO) as well as decreases in antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase) and glutathione (GSH) in the liver. These effects were also attenuated by post-treatment with hesperetin, which decreased lipid peroxidation and XO as well as increased antioxidant enzymes and GSH. These results show that post-treatment with hesperetin offers protection against γ-irradiation-induced tissue damage and oxidative stress and can be developed as an effective radioprotector during radiotherapy.

Key words: hesperetin, γ-irradiation, tissue damage, oxidative stress

서 론

방사선 및 방사성 동위원소의 의학적 및 산업적 이용의 증가, 원자력 발전소 같은 핵시설의 증가, 우주방사선 및 자연방사선 등에 따라 방사선에 대한 인체의 노출 위험도가 증가하고 있다. 최근 일본 후쿠시마 원자력 발전소 사고로 인해 방사선 피폭으로 인한 인체 장애나 인체 방어에 관하여 사람들의 관심이 집중되고 있다(1-4). 우리나라 역시 방사선 노출에 대한 불안감이 커진 가운데 생활주변에서 발생할 수 있는 방사선으로부터 불필요하게 노출되는 것을 방지하고자 '생활주변 방사선 안전관리법'이 시행되고 있다(5). 방사선은 암세포를 제거하거나 이의 성장을 저해함으로써 여러 조직의 암 치료와 암환자의 삶을 연장시키는 등 널리 사용되고 있으나 지속적인 노출로 인해 암 생존자들의 정상조직에 심각한 손상을 유발한다(6). 방사선은 세포에 직접적으로 영향을 주어 DNA에 손상을 주거나 간접적으로 세포 내 물 분자의 이온화로 생긴 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 의해 DNA, 단백질 및 세포막 등에 손상을 입혀 세포사멸 및 암을 유도한다(7). 따라서 방사선 노출 시 정상세포를 보호하면서 부작용이 없고 생체 손상의 예방 및 세포 보호를 위한 방사선보호제에 대한 연구가 시도되어 왔다(8). 방사선보호제에 대한 연구는 WR-2721(amifostine) 등의 thiol기를 갖는 합성물질, 사이토카인(cytokines), 면역조절제(immunomodulator) 등에 대해서 연구가 많이 이루어져 있다. 그러나 합성물질은 독성이 강하며 면역조절제

Received 29 December 2014; Accepted 10 February 2015
Corresponding author: Sang Hyun Park, Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea
E-mail: parksh@kaeri.re.kr, Phone: +82-63-570-3370

의 경우 부작용이 많고 고가여서 사용에 한계를 나타내고 있어 생체에 안정적이고 값이 싸며 효과적인 방사선보호제의 개발 필요성이 제기되고 있다. 최근 방사선에 의해 유도된 손상과 세포의 산화적 스트레스를 방지하기 위하여 자유라디칼 소거제(free radical scavenger)로서 플라보노이드(flavonoid)와 같은 천연 항산화 물질을 이용한 방사선보호제 연구가 이루어지고 있다(9).

플라보노이드는 폴리페놀(polyphenol) 화합물로 치환기의 구조와 위치에 따라 안토시아니딘(anthocyanidin), 플라본(flavone), 플라보놀(flavonol), 플라바논(flavanone), 플라바노올(flavanolol), 차르콘(chalcone), 카테친(catechin) 그리고 이소플라본(isoflavone)으로 나누어진다. 주로 식물 등에 풍부하며 지금까지 알려진 종류만 하여도 6,500가지가 넘는다(10,11). 헤스페리딘(hesperidin, $C_{18}H_{34}O_{15}$, M.W. 610.57)은 이당류(disaccharide) 루티노스(rutinose)와 결합된 플라바논 배당체(glycoside) 형태로 오렌지와 레몬과 같은 감귤류 식물에 존재한다. 헤스페리딘은 체내에서 당분해 효소에 의해 가수분해 되어 아글리콘(aglycone) 형태인 헤스페레틴(hesperetin, $C_{16}H_{14}O_6$, M.W. 302.27; Fig. 1)으로 분해된다(12). 이 헤스페레틴은 체내에서 위, 장으로 흡수된 후 생체 내에서 생리활성을 나타내며, 혈액 및 간장 등의 조직 내에서 헤스페레틴 형태로 검출되는 것으로 알려져 있다(13). 헤스페레틴과 헤스페리딘은 혈관시스템 보호효과, 항산화 효과, 항암 효과, 항염증 효과, 항알레르기 작용 등의 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(14-16). *In vitro*에서 자유라디칼 소거능을 중심으로 살펴보는 항산화 활성 연구에서 아글리콘 형태가 배당체 형태보다 항산화 활성이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다(17). *In vivo*에서 헤스페리딘의 방사선에 의한 세포보호 효과에 대한 연구는 이루어져 있지만(18) 헤스페레틴의 방사선에 의한 조직 손상 및 산화적 스트레스에 대한 회복 효과에 대한 연구는 아직 이루어져 있지 않다. 본 연구에서는 BALB/c 마우스에서 감마선 조사 후 헤스페레틴의 투여가 감마선 조사로 유도된 조직 손상과 산화적 스트레스 회복에 대한 헤스페레틴의 효과를 평가하였다.

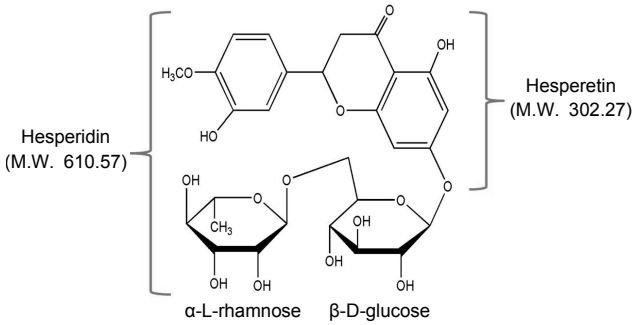

Fig. 1. Chemical structure of hesperetin and hesperidin.

재료 및 방법

시약 및 재료

헤스페레틴, 헤스페리딘, CMC(carboxyl methyl cellulose), DNPH(2,4-dinitro phenylhydrazine), BSA(bovine serum albumin), TCA(trichloroacetic acid), TBA(thiobarbituric acid), formalin은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

실험동물

6주령(19.4±1 g)의 BALB/c 마우스 암컷을 오리엔트바이오(주)(Seoul, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 23±2°C의 온도, 55±5%의 습도, 명암 순환은 12시간 단위로 유지되는 실험동물 사육장에서 1주일간 적응시켰으며 고형사료와 물은 자유로이 공급하였다. 본 연구를 위한 동물실험은 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

동물실험 수행 및 감마선 조사

감마선 조사 후 헤스페레틴의 투여가 감마선 조사로 유도된 손상에 대한 회복 효과를 보기 위하여 BALB/c 마우스를 6마리씩 6개 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험군은 7일 동안 CMC를 제공한 정상대조군, 7일 동안 헤스페레틴을 50 mg/kg(160 μM/dose)을 제공한 군, 6 Gy의 감마선을 조사한 후 CMC를 제공한 감마선 조사군, 6 Gy의 감마선을 조사한 후 7일 동안 헤스페레틴 25, 50 mg/kg(80, 160 μM/dose)과 헤스페리딘 100 mg/kg(160 μM/dose)으로 경구투여 한 군으로 나누었다. 시료는 감마선 조사 1시간 뒤 투여하여 1일 1회씩 7일 동안 존대(gastric tube)를 이용하여 식도 하단부까지 삽입하여 경구투여 하였으며 마지막 시료 투여 후 24시간 뒤에 분석시료를 채취하고 경추탈골 하여 희생하였다. 감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 내 Gammacell 40 exactor(MDS Nordion, Ottawa, Canada)를 사용하여 1.1 Gy/min의 선량율이 되게 조사하였다. 정상대조군과 7일 동안 헤스페리딘을 투여한 군을 제외한 BALB/c 마우스는 아크릴 상자에 넣고 ^{137}Cs선의 흡수선량이 6 Gy가 되도록 마우스 몸 전체에 조사하였다.

시료 채취

감마선 조사된 BALB/c 마우스를 7일이 지난 다음 12시간 절식시킨 뒤 전신 흡입마취를 시켰다(2% isoflurane). 그 후 개복하여 하대정맥에서 혈액을 채취하고 간, 골수, 비장, 흉골을 적출하여 냉식염수로 세척한 후 건조시켜 무게를 측정하였다. 비장 지수는 (비장 무게/체중)×100에 의해 계산되었다.

혈액에서의 혈구 및 생화학 분석

채취한 혈액을 혈액응고 방지제인 헤파린(heparin)이 처

리된 튜브에 채취하여 혈액 내 림프구 및 백혈구 수를 혈액학적 분석기(HEMAVET HV950, Drew Scientific, Inc., Dallas, TX, USA)를 이용하여 측정하였다. 나머지 채혈 튜브는 3,000×*g*로 20분 동안 원심분리 하고 혈장을 분리하여 4°C에서 저장하였다. 혈장 중 AST(aspartate aminotransferase)와 ALT(alanine aminotransferase)의 측정은 Bergmeyer 등(19)의 방법에 따라 측정하였다. AST와 ALT 기질액 1.0 mL를 각각 시험관에 가하여 37°C에서 5분간 방치한 다음 혈장 0.2 mL를 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 반응시킨 뒤 DNPH 1 mL를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시켰다. 마지막으로 0.4 M NaOH 용액을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 Multiskan FC microplate photometer (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

간조직의 생화학 분석

간조직은 인산염 완충액(0.1 M, pH 7.4)을 가한 후, 균질화기기인 Precellys 24-dual(Bertin, Villeurbanne, France)을 이용하여 10% 균질화 용액으로 만들었으며, 4°C에서 10,000×*g*로 10분 동안 원심분리 시켜 상층액을 생화학적 분석에 사용하였다. 방사선 조사에 의한 간조직의 지질과산화(lipid peroxidation) 정도를 알아보기 위해 Ohkawa 등(20)의 방법에 준하여 MDA(malondialdehyde)를 측정하였다. 상층액 100 µL를 취하여 8.1% SDS lysis 용액 100 µL, 20% TCA 용액 150 µL, 0.8% TBA 용액 150 µL를 넣고 100°C에서 1시간 동안 반응한 후 상온에서 식혀 4°C에서 3,000×*g*로 10분 동안 원심분리 하였으며, 상층액 300 µL와 n-butanol 300 µL를 섞어 10,000×*g*로 5분 동안 원심분리 한 후 상층액 200 µL를 취하여 Multiskan FC microplate photometer(Thermo Fisher Scientific Oy)를 이용하여 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. SOD(superoxide dismutase), catalase, GPx(glutathione peroxidase), GSH(glutathione), XO(xanthine oxidase)는 측정용 kit 시약(Biovision, Milpitas, CA, USA)으로 측정하였다. 간조직의 단백질 함량 측정은 Bradford(21) 방법에 따라 BSA를 표준품으로 사용하여 측정하였다.

흉골 조직의 조직병리

흉골 조직염색은 H&E(hematoxylin & eosin)로 실시하였다. 적출한 흉골을 10% 포르말린에 18시간 동안 고정시킨 후 흐르는 물에 12시간 동안 수세하였다. 에탄올(ethanol) 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 순으로 한 시간씩 담가 탈수하고 크실렌(xylene)으로 투명과정을 거친 후 파라핀을 침투시켰다. 포매된 조직은 미세절편기(Leica Microsystems, Biberach, Germany)를 이용하여 5 µm 두께로 자른 후 왁스를 제거시키고 H&E로 염색시켜 현미경으로 관찰하였다.

통계분석

실험에서 얻어진 결과는 SPSS 17.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 방사선에 의해 유도된 손상에 대한 헤스페레틴의 동물실험 결과는 일원 분산분석(one-way ANOVA)을 이용하여 수행되었고, 내부군 비교는 Tukey 다중비교분석(Tukey's multiple comparison test)을 이용하여 수행되었다. 수치는 각 군의 6마리에 대하여 평균±표준편차로 표현되었다. P<0.05인 경우 유의한 것으로 고려되었다.

결과 및 고찰

체중 변화

동물에 방사선을 조사할 경우 체중 감소 및 식이 섭취량 감소가 나타남을 볼 수가 있다(22,23). 본 연구에서는 감마선 조사 7일 후에 정상대조군의 체중이 102.24%로 나타났으며, 감마선 조사군의 체중은 89.51%로 정상대조군에 비해 감소하였다. 조사한 후 헤스페레틴 25, 50 mg/kg을 투여한 군은 각각 98.95, 96.84%, 헤스페리딘 100 mg/kg을 투

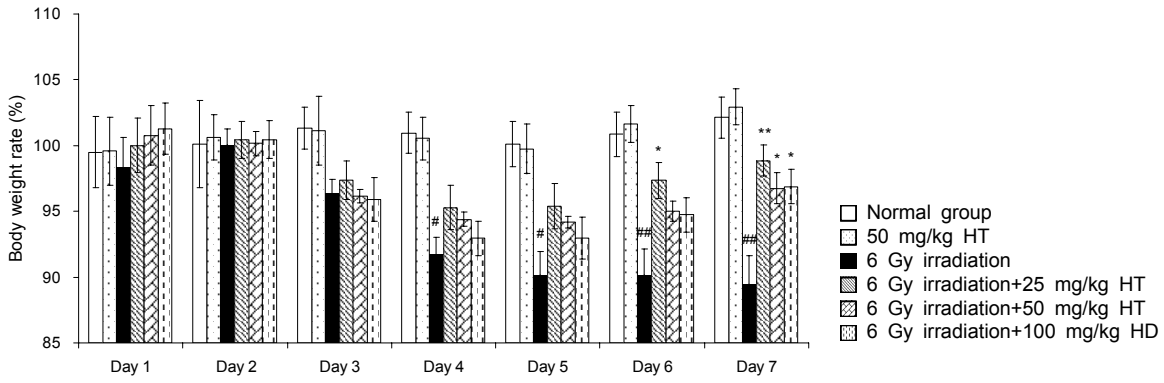

Fig. 2. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of body weight (%) of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#}P$<0.05 and $^{\#\#}P$<0.01 represent significant differences compared with normal group. $^{*}P$<0.05 and $^{**}P$<0.01 represent significant differences compared with 6 Gy irradiation group.

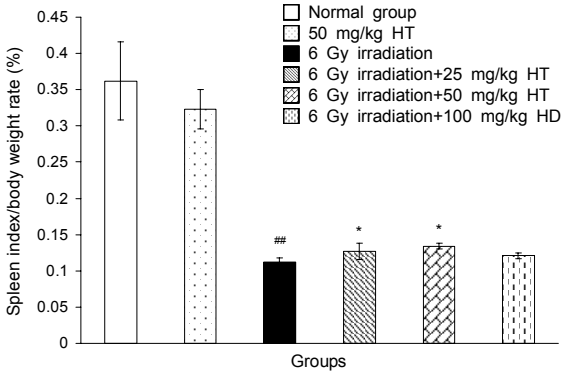

Fig. 3. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of spleen index of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#\#}P<0.01$ represents a significant difference compared with normal group. $^{*}P<0.05$ represents significant differences compared with 6 Gy irradiation.

여한 군은 96.96%로 감마선 대조군과 비교했을 때 체중이 회복되었다(Fig. 2).

비장 지수 변화

6.5 Gy 이상의 방사선 조사 후 생체 내에서는 방사선에 민감한 조혈 면역계 기관인 비장이 방사선 장해를 받게 되고 많은 수의 림프구 괴사가 일어나 비장의 부피 및 중량이 감소한다(24). 본 연구에서 정상대조군의 비장 지수는 0.362로 나타났으며 감마선 조사군의 비장 지수는 0.112로 정상대조군보다 유의적으로 감소하였다. 감마선 조사 후 헤스페레틴 25, 50 mg/kg을 섭취한 군은 각각 0.127, 0.134로 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가하여($P<0.05$) 방사선 손상에 의한 비장의 회복을 보여주었다(Fig. 3). 방사선 조사 후 헤스페레틴의 투여가 방사선 조사에 의한 조혈세포 손상에 대한 방호 또는 조혈세포 재생성을 촉진시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

혈구 성분 변화

감마선 조사 7일 후의 혈구 성분을 측정하였다. 방사선 조사 후에는 말초혈액 내의 면역세포 수가 급격히 감소하며 이들의 회복에 있어서 세포 수의 회복 및 성장이 중요한 요인이 된다는 연구가 보고되어 있다(25). 감마선 조사 7일 후 감마선 조사군은 정상대조군에 비해 백혈구(white blood cell, WBC), 호중구(neutrophil), 림프구(lymphocyte) 모두 유의적으로 감소하였다. 감마선 조사 후 헤스페리딘 100 mg/kg을 투여한 군은 감마선 조사군에 비해 백혈구, 호중구, 림프구가 유의적으로 증가하였으며($P<0.05$), 헤스페레틴 50 mg/kg을 투여한 군에서는 백혈구, 호중구, 림프구, 단핵구가 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

혈장의 생화학적 변화

AST와 ALT는 간세포 내에 존재하는 아미노기 전이효소로 주로 간세포가 손상을 받는 경우에 혈중으로 방출되어 활성이 증가하게 되므로 간독성 검사에 주로 사용된다. AST는 간조직 이외에 신장, 근육, 심장 등에 분포하고 있어 간 손상에 직접적인 원인이 아닐 수 있지만 ALT의 경우는 간조직에 대부분 분포하고 있기 때문에 ALT 수치가 상승하는 것은 간 손상과 직접적으로 연결되는 것으로 알려져 있다(26). 또한 랫트에 감마선을 조사할 경우 혈중 AST, ALT의 효소 활성이 급격히 증가되는 것으로 알려져 있다(23). 본 실험에서는 감마선 조사 7일 후 감마선 조사군의 혈장 중 AST, ALT는 정상대조군과 비교하였을 때 유의적으로 증가하여 간독성이 나타남을 보여주었다. 감마선 조사 후 헤스페레틴 25 mg/kg과 헤스페리딘 100 mg/kg을 투여한 군은 감마선 조사군에 비해 AST에서만 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 감마선 조사 후 헤스페레틴 50 mg/kg을 투여한 군에서는 감마선 조사군에 비해 ALT와 AST가 유의적으로 감소하여($P<0.05$) 간손상이 적게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 헤스페레틴이 방사선 조사에 따른 혈장 내 간 손상 지표 효소의 활성 상승을 억제한 것을 확인할 수 있었다.

간조직의 지질과산화와 XO 변화

감마선 조사 7일 후에 간조직의 지질과산화와 XO를 측정하였다. 생체막의 주성분인 지질은 X-ray, γ-ray와 같은 이온화 방사선에 의해 산화되어 지질과산화를 나타내는 MDA를 만들어 내며, 이는 산화적 스트레스의 지표가 된다(27). 생체 내에서 XO는 자유라디칼을 생성함으로써 세포에 손상

Table 1. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of white blood cell, neutrophils, lymphocytes, and monocytes of control and experimental animals

Groups	WBC (K/μL)	Neutrophil (K/μL)	Lymphocyte (K/μL)	Monocyte (K/μL)
Normal group	4.51±1.03	1.54±0.99	2.64±0.96	0.28±0.10
50 mg/kg HT	3.46±1.67	0.55±0.26	2.58±1.50	0.26±0.13
6 Gy irradiation	0.33±0.11$^{\#\#}$	0.08±0.03$^{\#}$	0.20±0.70$^{\#\#}$	0.04±0.02
6 Gy irradiation+25 mg/kg HT	0.35±0.03	0.12±0.03	0.17±0.27	0.04±0.01
6 Gy irradiation+50 mg/kg HT	0.58±0.44	0.14±0.10	0.25±0.14	0.17±0.28
6 Gy irradiation+100 mg/kg HD	0.86±0.29*	0.29±0.10*	0.44±0.16*	0.06±0.04

Values are expressed as mean±SD for six mice in each group.
$^{\#}P<0.05$ and $^{\#\#}P<0.01$ represent significant differences compared with normal group.
$^{*}P<0.05$ represents significant differences compared with 6 Gy irradiation group.

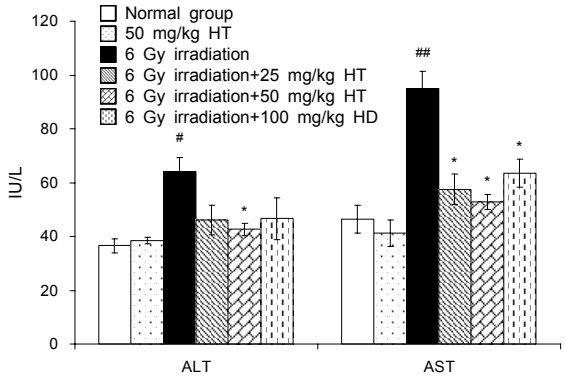

Fig. 4. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of ALT and AST in plasma of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#}P<0.05$ and $^{\#\#}P<0.01$ represent significant differences compared with normal group. $^{*}P<0.05$ represents significant differences compared with 6 Gy irradiation group.

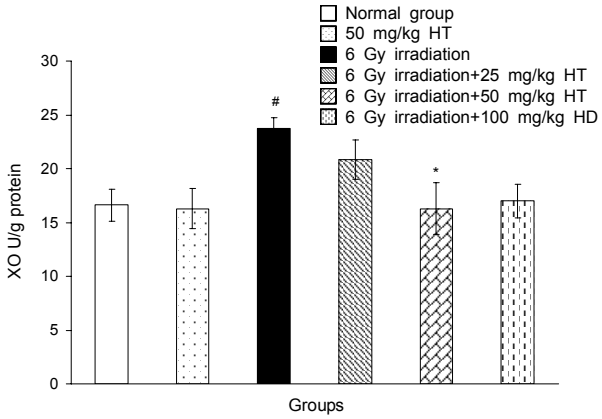

Fig. 6. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of xanthine oxidase (XO) in the liver tissue of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#}P<0.05$ represents a significant difference compared with normal group. $^{*}P<0.05$ represents a significant difference compared with 6 Gy irradiation group.

을 주어 지질과산화물을 생성하는 것으로 알려져 있다(28). 본 실험에서는 감마선 조사 7일 후 감마선 조사군의 MDA를 정상대조군과 비교하였을 때 유의적으로 증가하였다. 감마선 조사 후 헤스페레틴 25, 50 mg/kg을 투여한 군과 헤스페리딘 100 mg/kg을 투여한 군에서는 감마선 조사군에 비해 MDA가 유의적으로 감소하였다($P<0.05$, Fig. 5). 감마선 조사 7일 후 감마선 조사군의 XO는 정상대조군과 비교하였을 때 유의적으로 증가하였으며, 감마선 조사 후 헤스페레틴 50 mg/kg을 투여한 군에서 감마선 조사군에 비해 XO가 유의적으로 감소하였다($P<0.05$, Fig. 6). 따라서 헤스페레틴이 방사선 조사에 따른 간조직 내 지질과산화 작용 상승과 XO의 상승을 억제한 것을 확인할 수 있었다.

간조직의 항산화 물질 및 항산화 효소 변화

감마선 조사 7일 후 간조직에서 항산화 물질인 GSH를 측정하여 Fig. 7에 나타냈으며, 항산화 효소인 SOD, catalase, GPx는 Fig. 8에 나타내었다. 방사선에 의해 생성되는 과도한 자유라디칼은 생체 내의 항산화 물질이나 항산화 효소에 의해 제거되거나 생성이 억제된다. 생체 내에 존재하는 항산화 물질에는 환원형 GSH가 존재하며 이 물질은 자유라디칼의 소거제 역할과 H_2O_2 및 지질과산화를 대사시키는 GPx의 기질로 작용한다. 생체 내에 존재하는 항산화 효소에는 SOD, catalase, GPx가 존재하며 SOD는 O_2^-를 H_2O_2로 전환시키고, catalase와 GPx는 이 H_2O_2를 물로 분해하여 세포 내 라디칼을 제거하는 기능을 한다(29). 동물에 감마선

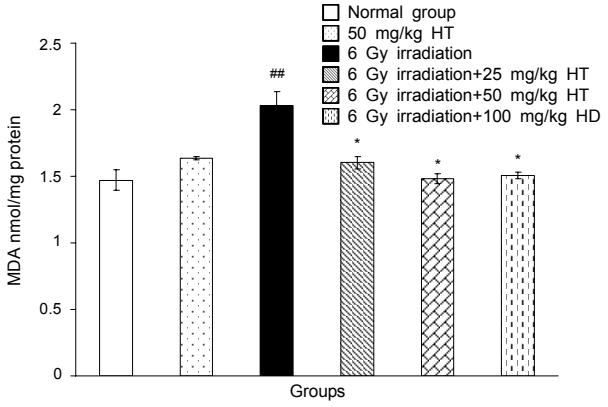

Fig. 5. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of lipid peroxidation in the liver tissue of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#\#}P<0.01$ represents a significant difference compared with normal group. $^{*}P<0.05$ represents significant differences compared with 6 Gy irradiation group.

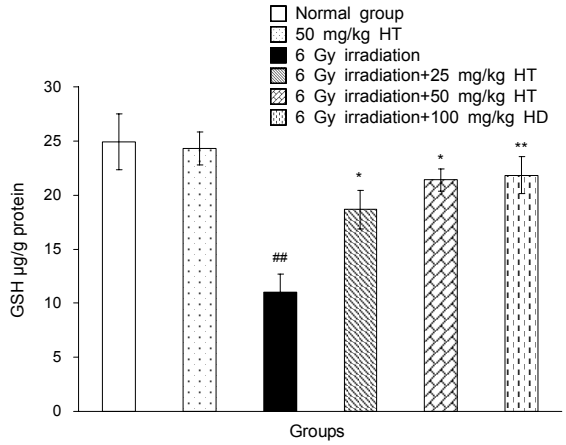

Fig. 7. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of reduced glutathione (GSH) in the liver tissue of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#\#}P<0.01$ represents a significant difference compared with normal group. $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$ represent significant differences compared with 6 Gy irradiation group.

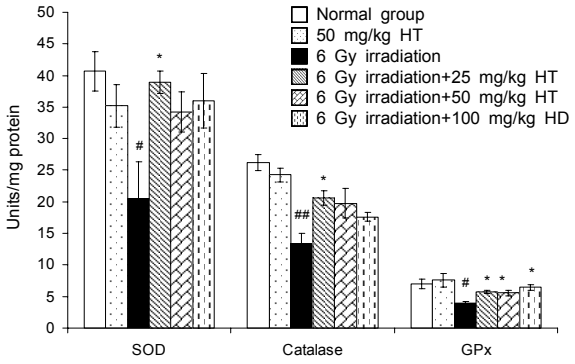

Fig. 8. Effect of post-treatment with hesperetin (HT) and hesperidin (HD) on the status of superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) in the liver tissue of control and experimental animals. Values are expressed as mean±SD for six mice in each group. $^{\#}P<0.05$ and $^{\#\#}P<0.01$ represent significant differences compared with normal group. $^{*}P<0.05$ represents significant differences compared with 6 Gy irradiation group.

을 조사할 경우 항산화 효소인 SOD, catalase, GPx와 항산화 물질인 GSH가 산화적 손상으로부터 세포를 보호하기 위해 활성의 감소가 나타나는 것으로 알려져 있다(18,30). 감마선 조사 7일 후 감마선 조사군의 GSH는 정상대조군에 비해 유의적으로 낮아짐을 볼 수 있으며, 감마선 조사 후 헤스페레틴 25, 50 mg/kg을 투여한 군과 헤스페리딘 100 mg/kg을 투여한 군에서 감마선 조사군에 비해 GSH가 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 감마선 조사 7일 후 감마선 조사군의 SOD, catalase, GPx는 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하였고 감마선 조사 후 헤스페레틴 50 mg/kg 투여군과 헤스페리딘 100 mg/kg 투여군에서는 GPx만 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가하였다($P<0.05$). 감마선 조사 후 헤스페레틴 25 mg/kg 투여군에서는 SOD, catalase, GPx가 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가함을 보였다($P<0.05$). 따라서 헤스페레틴이 방사선 조사에 따른 간조직 내 항산화 물질과 효소의 감소를 회복시킨 것을 확인할 수 있었다.

흉골 조직 분석

정상대조군, 헤스페레틴 단독 투여군, 감마선 조사군, 감마선 조사 후 헤스페레틴과 헤스페리딘을 투여한 군의 흉골을 적출하여 조직학적 형태를 Fig. 9에 나타내었다. 정상대조군과 헤스페레틴을 단독으로 투여한 군의 골수세포 충실도는 높았지만 감마선 조사군의 골수세포 충실도는 거의 소실된 상태였으며, 지방조직이 차지하는 면적이 증가하여 골수세포의 손상을 나타냈다. 감마선 조사 후 100 mg/kg 헤스페리딘을 투여한 군은 감마선 조사군보다 골수세포의 충실도의 소실이 적게 나타났으며, 지방조직이 차지하는 면적이 적게 나타났다. 감마선 조사 후 25, 50 mg/kg 헤스페레틴을 투여한 군에서는 감마선 조사군보다 골수세포 충실도의 소실이 적게 나타났으며 지방조직이 차지하는 면적이 적게 나타나 회복되는 경향이 관찰되었다.

요 약

본 연구는 BALB/c 마우스에 감마선 조사 후 헤스페레틴과 헤스페리딘을 7일 동안 경구투여 하여 감마선 조사로 유도된 조직 손상과 산화적 스트레스에 대한 회복 효과를 검토하였다. 감마선 조사 7일 후의 체중 변화에서 감마선 조사 후 헤스페레틴을 투여한 군이 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가하여 회복됨을 보여주었다. 감마선 조사 후 헤스페레틴을 투여한 군의 비장 지수는 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가하여 조혈면역계의 손상에 대해 치료 효과가 있음을 확인하였다. 감마선 조사 후 헤스페레틴을 50 mg/kg 투여한 군의 ALT와 AST가 감마선 조사군에 비해 유의적으로 감소하여 간세포 손상에 대해 치료 효과를 확인하였다. 감마선 조사 후 헤스페레틴을 투여한 군의 지질과산화는 감마선 조사군에 비해 유의적으로 낮게 나타남을 보여 방사선에 의한 장해를 회복시킨 것으로 판단된다. 감마선 조사 후 헤스페레틴을 50 mg/kg 투여한 군의 XO는 감마선 조사군에 비해 유의적으로 감소하였다. 감마선 조사 후 헤스페레틴을

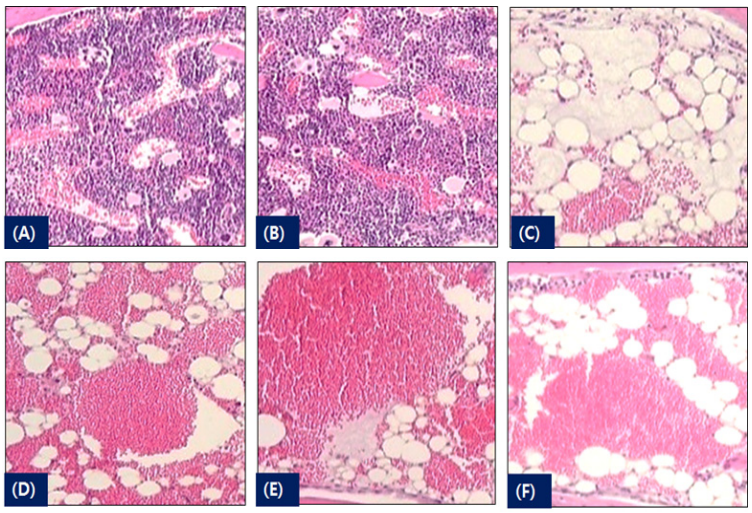

Fig. 9. Effect of post-treatment with hesperetin and hesperidin on histopathology of the bone marrow cell of mice exposed to γ-irradiation (magnification: ×200). (A) normal group; (B) 50 mg/kg hesperetin; (C) 6 Gy irradiation group; (D) 6 Gy irradiation+25 mg/kg hesperetin group; (E) 6 Gy irradiation+50 mg/kg hesperetin group; (F) 6 Gy irradiation+100 mg/kg hesperidin group.

투여한 군의 GSH는 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가하여 생체 내 항산화 방어 체계를 정상 범위로 회복시켰다. 감마선 조사 후 헤스페레틴을 25 mg/kg 투여한 군의 항산화 효소의 활성이 감마선 조사군에 비해 유의적으로 증가하여 방어체계를 회복시켰다. 이상의 결과를 통해 방사선 조사 후 헤스페레틴의 투여가 방사선에 의한 조혈계 및 간세포 손상과 산화적 스트레스에 대해 회복 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 헤스페레틴은 방사선 노출에 있어서 방사선방호제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 미래창조과학부에서 시행하는 방사선기술개발사업(Grant No. 2012M2A2A601135)의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Meister M. 2005. *The health effects of low-level radiation*. American Council on Science and Health, New York, NY, USA. p 2-4.
2. Hosoda M, Tokonami S, Sorimachi A, Monzen S, Osanai M, Yamada M, Kashiwakura I, Akiba S. 2011. The time variation of dose rate artificially increased by the Fukushima nuclear crisis. *Sci Rep* 1: 87.
3. Hosoda M, Tokonami S, Tazoe H, Sorimachi A, Monzen S, Osanai M, Akata N, Kakiuchi H, Omori Y, Ishikawa T, Sahoo SK, Kovács T, Yamada M, Nakata A, Yoshida M, Yoshino H, Mariya Y, Kashiwakura I. 2013. Activity concentrations of environmental samples collected in Fukushima Prefecture immediately after the Fukushima nuclear accident. *Sci Rep* 3: 2283.
4. Morino Y, Ohara T, Watanabe M, Hayashi S, Nishizawa M. 2013. Episode analysis of deposition of radiocesium from the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident. *Environ Sci Technol* 47: 2314-2322.
5. Nuclear Safety and Security Commission. 2012. Act on safety control of radioactive rays around living environment. Ministry of Government Legislation, Seoul, Korea. Article 1.
6. Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TE. 2005. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J* 2: 112-127.
7. Halliwell B, Gutterige JM. 1999. *Free radical in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, New York, NY, USA. p 604-607.
8. Phillips TL. 1981. Sensitizers and protectors in clinical oncology. *Semin Oncol* 8: 65-82.
9. Hosseinimehr SJ. 2007. Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today* 12: 794-805.
10. Rauha JP, Vuorela H, Kostiainen R. 2001. Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 36: 1269-1280.
11. Korkina LG, Afanas'ev IB. 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol* 38: 151-163.
12. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res* 15: 655-669.
13. Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rouseff RL. 1996. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther* 60: 34-40.
14. Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K, Hara A, Sumida T, Tanaka T, Ogawa H. 1997. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesiss* 18: 957-965.
15. Yang M, Tanaka T, Hirose Y, Deguchi T, Mori H, Kawada Y. 1997. Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer* 73: 719-724.
16. Shirazi A, Ghobadi G, Ghazi-Khansari M. 2007. A radiobiological review on melatonin: a novel radioprotector. *J Radiat Res* 48: 263-272.
17. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H. 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci* 78: 2872-2888.
18. Pradeep K, Ko KC, Choi MH, Kang JA, Chung YJ, Park SH. 2012. Protective effect of hesperidin, a citrus flavanoglycone, against γ-radiation-induced tissue damage in Sprague-Dawley rats. *J Med Food* 15: 419-427.
19. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. 1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 24: 58-73.
20. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
21. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
22. Lin IH, Hau DM, Chen WC, Chen KT, Lin JG. 1996. Effects of glycyrrhizae and glycyrrhizic acid on cellular immunocompetence of gamma-ray-irradiated mice. *Chin Med J (Engl)* 109: 138-142.
23. Pradeep K, Park SH, Ko KC. 2008. Hesperidin a flavanoglycone protects against gamma-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague-Dawley rats. *Eur J Pharmacol* 587: 273-280.
24. Gough GR, Boggs SS, Schwartz GN. 1977. Changes in thymus size observed radiographically during the course of spontaneous lymphoma in the AKR/J mouse. *Lab Anim Sci* 27: 627-634.
25. Patchen ML, MacVittie TJ, Williams JL, Schwartz GN, Souza LM. 1991. Administration of interleukin-6 stimulates multilineage hematopoiesis and accelerates recovery from radiation-induced hematopoietic depression. *Blood* 77: 472-480.
26. Recknagel RO, Glende EA Jr, Dolak JA, Waller RL. 1989. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Ther* 43: 139-154.
27. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. 2003. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58: 39-46.
28. McCord JM. 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163.
29. Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11.
30. Pratheeshkumar P, Kuttan G. 2011. Protective role of *Vernonia cinerea* L. against gamma radiation-induced immunosupression and oxidative stress in mice. *Hum Exp Toxicol* 30: 1022-1038.