

2007年 2月

博士學位論文

방사선조사 마우스에서 알긴산올리고당의
방사선 방어효과에 관한 생화학적 연구

朝鮮大學校 大學院

保健學科

崔 成 官

방사선조사 마우스에서 알긴산올리고당의
방사선 방어효과에 관한 생화학적 연구

A Biochemical Study on The Radioprotective Effect of
Algin-oligosaccharide(AOS) in Irradiated Mice

2007年 2月 日

朝鮮大學校 大學院

保健學科

崔 成 官

방사선조사 마우스에서 알긴산올리고당의
방사선 방어효과에 관한 생화학적 연구

指導教授 朴 鍾

이 論文을 保健學博士學位 申請 論文으로 提出함

2006年 10月

朝鮮大學校 大學院

保健學科

崔 成 官

崔成官의 博士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 _____

委 員 朝鮮大學校 教授 _____

2006年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 실험재료	5
(1) 실험동물	5
(2) 시약	5
(3) 혈청 분석장치	6
(4) 방사선 조사장치	6
2. 실험그룹 설정	7
3. 실험방법	8
(1) 방사선조사	8
(2) 시료투여	8
(3) 실험동물 희생 및 실험조직 채취	8
(4) 측정	9
4. 통계처리	11
III. 결 과	12
1. 세포 활성능 측정	12
(1) Apoptosis 진행 세포신호경로 중 Caspase-3 관찰	12
(2) Apoptosis 진행 세포신호경로 중 Caspase-9 관찰	15
2. 염증반응 측정	18
(1) NO (nitric oxide)	18
3. Cytokine 측정	21
(1) TNF- α	21
(2) IL-6	24
4. Serum 분석	27
(1) Glucose	27
(2) Creatinine	28
(3) BUN (blood urea nitrogen)	29
(4) UA (uric acid)	30
(5) TP (total protein)	31
(6) Albumin	32
(7) TC (total cholesterol)	33

(8) HDL cholesterol	34
(9) LDL cholesterol	35
(10) Triglycerides	36
(11) ALP (alkaline phosphatase)	37
(12) LDH (lactate dehydronase)	38
(13) GOT (glutamin oxaloacetic acid transaminase)	39
(14) GPT (glutamin pyruvic acid transaminase)	40
IV. 고 찰	41
V. 결 론	45
VI. 참고문헌	47

LIST OF TABLES

Table 1.	Classification of experimental groups	7
Table 2.	Caspase-3 in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	12
Table 3.	Caspase-3 in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	13
Table 4.	Caspase-9 in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	15
Table 5.	Caspase-9 in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	16
Table 6.	NO(nitric oxide) in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	18
Table 7.	NO(nitric oxide) in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	19
Table 8.	TNF- α in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	21
Table 9.	TNF- α in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	22
Table 10.	IL-6 in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	24
Table 11.	IL-6 in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	25
Table 12.	Glucose in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	27
Table 13.	Creatinine in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	28

Table 14. BUN (blood urea nitrogen) in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	29
Table 15. Uric acid in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	30
Table 16. Total protein in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	31
Table 17. Albumin in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	32
Table 18. Total cholesterol in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	33
Table 19. HDL cholesterol in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	34
Table 20. LDL cholesterol in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	35
Table 21. Triglycerides in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	36
Table 22. Alkaline phosphatase in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	37
Table 23. LDH in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	38
Table 24. GOT in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	39
Table 25. GPT in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	40

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Caspase-3 in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	14
Fig. 2. Caspase-9 in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	17
Fig. 3. NO(nitric oxide) in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	20
Fig. 4. TNF- α in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	23
Fig. 5. IL-6 in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment	26

ABSTRACT

A Biochemical Study on The Radioprotective Effect of Algin-oligosaccharide(AOS) in Irradiated Mice

Choi, Seong-Kwan

Adviser : Prof. Pak, Jong, M.D., Ph.D.

Department of Public Health,

Graduate School of Chosun University

In order to find out the Radioprotective effect of algin-oligosaccharide(AOS), this study, with a mouse of which whole frame irradiated by 3Gy radiation once, first, measured caspase-3 and caspase-9 amid cell signaling connected to apoptosis in order to observe cell activation, second, measured NO(nitric oxide) to observe cell inflammation, and third, measured TNF(tumor necrosis factor)- α and IL(interleukin)-6 in order to look at the radiation-induced cytokine. In addition, as a part of acquiring supplementary materials related to radioprotective effect of algin-oligosaccharide, it conducted a biochemical analysis for the serum of the same mouse.

Each finding was indicated by average and standard deviation (Mean \pm S.D.), the significance between each experiment groups was verified by ANOVA-test through the statistical program, SPSS 10.1, and Tukey-test was conducted as

post-hoc analysis for multiple comparisons between each experiment groups. Statistical verification was treated by significant level, $\alpha = 0.05$.

In Caspase-3 and Caspase-9 test for observing cell activation, both of Caspase-3 and Caspase-9 showed highly increased O.D. value in the irradiation control group, while the whole groups treated with algin-oligosaccharide before or after irradiation indicated lower O.D. value than the irradiation control group, especially showed big difference in 7 day's treatment group of before irradiation ($P < 0.001$). It confirmed that Caspase generation was restrained in AOS treatment group.

In Nitric Oxide test for observing cell inflammation reaction, small intestine and liver tissue generate less Nitric Oxide in the irradiation control group, while 3 day's treatment group of before irradiation showed significant increase of generation ($P < 0.001$), which confirmed algin-oligosaccharide increased creation of Nitric Oxide.

In TNF- α test amid radiation-induced cytokine, small intestine and liver tissue indicated highly increased TNF- α value in the irradiation control group, while small intestine tissue showed restrained generation of TNF- α in 7 day's treatment group of before irradiation ($P < 0.001$), and liver tissue showed suppressed creation of TNF- α in 7 day's treatment group of before irradiation, 3 day's treatment group of before irradiation, and 7 day's treatment group of after irradiation ($P < 0.001$). The finding confirmed TNF- α generation was restrained in AOS treatment group.

In IL-6 test amid radiation-induced cytokine, small intestine and liver tissue indicated highly increased IL-6 value in the irradiation control group, while restrained generation of IL-6 was shown in AOS treatment group ($p < 0.001$), which confirmed IL-6 generation was restrained in AOS treatment group.

Consequently, this study inquired into the fact that algin-oligosaccharide with superior antioxidant activity performed radiation protection by inducing restraint of Caspase generation, increase of Nitric Oxide generation, restraint of TNF- α and IL-6 generation, and confirmed that natural product with less chemical toxicity was able to be applied as radioprotector.

1. 서론

방사선의 사용은 의료나 산업 부문에서 다양하게 이루어지고 있으나, 이것이 우리 인간생활에 얼마나 유익한지 아니면 유해한지에 대해서는 논란의 여지가 많은 실정이다. 이러한 가운데 최근의 원자력시설 이용증대 및 핵 폐기장 주변지역의 방사성물질에 의한 오염 가능성, 그리고 방사선진단 및 방사선치료 목적의 인체에 대한 방사선 피폭기회 증대는 방사선방어의 필요성을 더욱 고조시키고 있다.

방사선은 선량의 크기가 일정치 이상으로 증가되어 조사될 경우 자극이후 수 시간 이내에 회복이 일어나는 “아치사장해(sublethal damage)”와, 보통은 치사로 이어지나 적절히 환경변화를 줄 경우 회복이 가능한 “잠재적 치사장해(potentially lethal damage)”, 그리고 불가역성으로써 회복이 전혀 불가능한 “치사장해(lethal damage)” 등의 3종류 방사선장해가 나타난다¹⁾. 특히 선량의 크기가 크면서 1회에 걸친 전신피폭일수록 방사선장해는 더욱 심각하게 나타난다.

일반인이 방사선에 노출될 수 있는 경우로는 자연방사선피폭, 의료피폭, 사고피폭 등이 있다. 자연방사선피폭은 공기나 땅속 그리고 우주로부터 생성되는 방사선 피폭을 말하며 이는 유해선량 이하의 미량피폭이다. 방사선진단이나 방사선암치료 시에 받게 되는 의료피폭은 건강을 지키기 위해 부득이하게 수반되지만 자칫 심각한 방사선장해를 일으켜 오히려 건강을 해칠 수 있다. 아울러 1986년 구소련 체르노빌 원자력발전소의 방사능 누출과 2006년 북한의 핵실험과 같은 갑작스런 사고 피폭의 경우에도 우리 인간에게 엄청난 재앙을 가져다줄 수 있는 위협요인이다.

방사선을 조사시키기 전이나 후에 생물체에 적당한 처리를 하여 방사선장해를 경감시키는 물질을 방사선방어제(radioprotector)라고 한다. 이 물질들은 방사선 조사 전 처리의 필요조건이 되는 보호와 조사 후 처리로서 유효한 수복의 두 가지 기능으로 분류된다.

방사선방어제의 종류를 살펴보면 먼저 화학제제로서 시안화염, 일산화탄소,

epinephrine, histamine, serotonin, cysteine, cysteamine, AET glutathione, WR-series, 고분자화합물(dextran sulfate²⁾, Lipopolysaccharide³⁾, carbon particle⁴⁾, polyacrylamide beads⁵⁾) 등이 있다. 다음으로 화학적 독성이 적어서 상시복용이 가능한 자연생약 보호제로서 인삼추출물을 비롯하여 vitamin C, vitamin E 등이 있다. 인삼추출물의 경우 투여시간에 따라 세포 회복능과 생존율이 큰 영향을 받았으며 최고의 방어효과는 방사선조사 24시간 전 투여하였을 경우였고, 고분자화합물의 경우에는 방사선조사 1~3일 이전에 투여하였을 경우 최대의 방어효과를 나타내는 것으로 보고되었다⁶⁾.

최근 국내 학계에서는 방사선장해를 경감시키는 화학적 방어물질로서 Macro Glucan, TMG(vitamin E 유도체), Guarana, propolis, EEM(extracts of edible mushrooms), green tea, thio 제제, melatonin, vitamin C, 인삼 등이 연구되어지고 있다⁷⁾⁸⁾. 하지만 vitamin 제제나 green tea, 인삼 등을 제외한 대부분의 보호물질은 유효용량에서 수반되는 강한 독성으로 인하여 사용에 한계를 나타내며 특히 방사선피폭 전에 처치하여야 하는 단점을 가지고 있다⁹⁾. 따라서 최근에는 인삼¹⁰⁾이나 홍삼¹¹⁾, 그리고 녹차의 주요 카테킨 성분인 EGCG(epigallocatechin gallate)¹¹⁾¹²⁾ 등의 생약과 같은 자연산생물의 방사선 생체반응변화에 대한 연구가 관심의 대상이 되고 있다.

방사선방어에 관한 해외연구도 매우 활발하게 진행되고 있다. FGF₁(acidic fibroblast growth factor)은 골수 줄기세포의 증식을 자극하는 기전을 통해 방사선 방어효과를 나타내고, 이 FGF₁은 단순하게 섬유아세포만을 자극하는 것이 아니라 골수세포와 내피세포 등과 같은 다양한 세포를 자극한다고 구명했다¹³⁾. CM(carbamoyl)-, MC(methoxycarbonyl)-, HM(hydroxymethyl)-PROXYL 등 3 가지 안정 니트록시드가 치사 X-선(8Gy) 조사 마우스의 DNA 손상을 얼마만큼 보호하는지를 관찰하기 위한 in vitro 실험에서, HM- > CM- = MC-PROXYL 순서의 방사선 보호효과를 발견하였다. 이 니트록시드에 의한 방사선 보호작용은 산화환원반응의 잠재력 및 반응성뿐만 아니라 약물의 체내 흡수나 배설과 같은 동태적 작용에 의해서도 영향을 받는다¹⁴⁾. 최근 AS101(ammonium trichloro-tellurate)은 방사선이 조

사되거나 다양한 화학 치료약물로 처치된 마우스의 조혈작용에 있어서 방사선방어 및 화학적 보호효과 양쪽 모두에 유의하다고 보고되었다. AS101의 처치는 반급성 기단백질 및 알부민의 양을 감소시킴으로써 과잉 방사선피폭이나 우발적인 방사선 피폭으로 인해 고통 받는 환자들의 조혈기능 회복에 있어서 매우 효과적인 것으로 나타났다¹⁵⁾. 인간의 IL-1 β nonapeptide는 염증성 내지는 발열성 특성이 없는 선천분자의 면역자극활동을 수행하는 팔미토일 잔기로서 잠재적 치사선량의 전리방사선에 피폭된 마우스를 상당히 유의하게 보호한다. 이러한 결과는 방사선방어에서 작은 펩티드 유도체화에 대한 중요성을 암시해줄 뿐만 아니라, 방사선 방어활동을 증가시킬 목적으로 독소 사이토카인이 생성된다는 것을 의미한다¹⁶⁾. 아치사선량 및 치사선량의 방사선이 조사된 마우스에서, IRS-19 투여는 골수와 비장의 조혈세포 재생을 촉진시킨다. 이러한 조혈 콜로니 자극활성화는 사이토카인의 단계적 반응과 결합하여 방사선 방어작용을 수행하게 된다¹⁷⁾. 이밖에도 미토콘드리아에서 생성되는 효소로서 활성산소 제거기능이 탁월한 MnSOD(manganous superoxide dismutase)가 방사선 방어효과를 보인다는 연구와¹⁸⁾, 방사선손상에 대해 임상부문에서까지 적용할 수 있는 사이토카인 접근법이 보고된바 있다¹⁹⁾.

알긴산은 미역이나 다시마 같은 갈조류의 세포막을 구성하는 성분으로서 해초산이라고도 불린다. 보통 산의 성질을 나타내기 때문에 나트륨염으로서 다루고, 점성이 높은 특성을 이용하여 의학, 식품, 산업 등의 다양한 목적으로 사용된다. 알긴산에서 추출한 알긴산올리고당은 항산화 효과가 탁월하여 생체 내 프리 라디칼이나 활성산소를 제거하는 기전을 통해 생체 방호기능을 수행한다고 알려져 있다²⁰⁾. 특히 이러한 작용기전은 생체에 방사선조사가 이루어질 때 물리적·화학적 작용에 의해 급격히 생성되는 이온이나 여기분자를 소거시킴으로써 생체고분자(DNA 등)에서 free radical, 활성이온, 여기분자 등이 발현되지 않도록 예방한다. 이 같은 점에서 향후 알긴산올리고당은 방사선으로부터 인간의 건강을 지키는 중요한 방어제로 활용될 수 있음을 암시해준다.

방사선피폭으로 인한 장애를 예방하려면 방사선조사 전이나 후에 적절한 방사선 보호제의 처치를 받아야 한다. 하지만 대부분의 방사선 보호약제는 강한 독성이

수반되는 화학제제로서 상시복용이 어려울 뿐만 아니라 일반인들의 구입 접근성이 떨어져 방사선장해에 대한 효과적인 방어수단이 될 수 없다. 따라서 알긴산올리고당과 같이 인체 건강에 유해하지 않으면서 일반인 누구나가 자유롭게 상시복용이 가능한 자연산생물의 방사선 방어효과에 관한 연구가 그 어느 때보다 필요한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 미역이나 다시마 등의 자연산생물에서 추출한 알긴산올리고당(algin-oligosaccharide; AOS)의 방사선 방어효과를 구명하는데 있다. 이를 위해 3Gy 방사선이 1회 전신 조사된 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 첫째, 세포 활성능을 관찰하기 위해 세포사(apoptosis)로 이어지는 세포신호경로 중 Caspase-3 및 Caspase-9를 측정하였고, 둘째, 세포 염증반응을 관찰하기 위해 NO(nitric oxide)를 측정하였으며, 셋째, 방사선 유도 사이토카인을 관찰하기 위해 TNF(tumor necrosis factor)- α 와 IL(interleukin)-6을 측정하였다. 아울러 알긴산올리고당의 방사선 방어효과에 관한 보조자료 획득 일환으로 동일 마우스의 혈청(serum)에 대한 생화학적 분석도 함께 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

(1) 실험동물

실험동물은 다물실험동물센터(한국)에서 생산, 공급하고 있는 C57BL/6 마우스 (체중 25~35 g)를 사용하였고, 실제 측정 시에는 실험 마우스의 소장과 간 조직 및 혈청을 분리하여 이용하였다. 마우스는 온도 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $45\pm 5\%$ 로 유지된 사육실에서 폴리카보네이트로 제작된 사육장($40\times 25\times 17$ cm)을 통해 사육하였으며, 사료(제일제당 제품)와 음수는 자유롭게 섭취시켰다.

실험에 사용된 마우스는 각 실험그룹별로 7마리씩 동일하게 적용하여 총 42마리를 사용하였다.

실험동물은 헬싱키선언의 취지에 따라 인류의 건강을 증진하고 보호하기 위한 목적으로 사용하였고, 환경에 좋지 않은 영향을 최소화하기 위한 적절한 조치를 취하였으며, 실험이 진행되는 전체기간 동안 실험동물의 최적 복지환경을 조성하기 위한 노력을 다하였다.

(2) 시약

본 연구에 사용한 시약은 Bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, USA), sodium nitrate (Sigma, USA), sulfanilamide (Sigma, USA), N-(naphthyethylene)diamine (Sigma, USA), Tris (Bio Basic, USA), Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA, Sigma, USA), sodium chloride (NaCl, Junsei, Japan), Triton-X 100 (Junsei, Japan), Caspase-3/CPP32 &

Caspase-9/Mch6 colorimetric assay kit (Biovision, USA) 등이고, TNF- α 및 IL-6의 단클론 항체는 ELISA kits (R&D system, MIN, USA)를 사용하였다. 또한 알긴산올리고당은 국내 (주)EcoBio에서 수입하여 공급한 제품 (Sigma, USA)을 사용하였다.

(3) 혈청 분석장치

마우스 혈액으로부터 원심분리한 혈청은 Auto analyser (7170A, Hitachi, 2004년식)을 사용하여 분석하였다.

(4) 방사선 조사장치

방사선조사를 위해 10Mev급 Linac X선 치료장치 (Clinac 21Ex, Varian, 2004년식)를 사용하였다.

2. 실험그룹 설정

실험그룹은 정상(normal), 방사선조사대조군(irradiation control), 방사선조사 전처치군(treatment group of before irradiation), 방사선조사 후처치군(treatment group of after irradiation)으로 설정했고, 다시 방사선조사 전처치군은 AOS treatment for 7 days + irradiation 군과 AOS treatment for 3 days + irradiation 군으로, 방사선조사 후처치군은 irradiation + AOS treatment for 3 days 군과 irradiation + AOS treatment for 7 days 군으로 나누었다(Table 1).

실험그룹은 총 6개로 설정하였고, 본 연구의 시료가 생체조직 내에 흡수되기까지 소요되는 시간이 다소 길게 진행된다는 특성을 고려하여 전처치군의 경우 7일간 및 3일간의 시간 인자를, 후처치군의 경우 3일간 및 7일간의 시간 인자를 적용하였다.

Table 1. Classification of experimental groups

Experimental groups		비 고
	normal	정상
	irradiation control	방사선조사대조군
Before	AOS for 7days + irradiation	방사선조사 전 7일간 처치군
	AOS for 3days + irradiation	방사선조사 전 3일간 처치군
After	irradiation + AOS for 3days	방사선조사 후 3일간 처치군
	irradiation + AOS for 7days	방사선조사 후 7일간 처치군

3. 실험방법

(1) 방사선조사

방사선장해에 대한 알긴산올리고당의 방어효과를 실험하기 위해 마우스에게 10Mev급 Linac X선 치료장치를 사용하여 생체조직의 생화학적 변화가 가장 활발하게 발현되는 선량역인 3Gy의 선량을 적용하여 300cGy/min 선량률로 1회 전신 조사 하였다.

(2) 시료투여

본 연구의 시료인 알긴산올리고당은 5mg/kg/day 기준에 의해 구강주입기를 통한 경구주입방식으로 마우스에게 투여하였다.

시료는 AOS treatment for 7 days + irradiation 군의 경우 방사선조사 전 7일 동안, AOS treatment for 3 days + irradiation 군의 경우 방사선조사 전 3일 동안, irradiation + AOS treatment for 3 days 군의 경우 방사선조사 후 3일 동안, irradiation + AOS treatment for 7 days 군의 경우 방사선조사 후 7일 동안 투여 하였다.

(3) 실험동물 희생 및 실험조직 채취

실험동물은 정상군과 함께 방사선조사대조군 및 방사선조사 전처치군의 경우 방사선 조사일로부터 3일 후 동시에 희생시켰고, 방사선조사 후처치군의 경우 시료투여 마지막 날로부터 3일 후에 희생시켰으며, 희생 직후 소장과 간 및 혈청 등의 실험조직을 채취하였다. 희생방법은 경추탈구법을 사용하였다.

(4) 측정

① Caspase-3 & Caspase-9

준비된 소장 및 간 조직을 각각 100 μg 씩 cell lysis buffer 100 μl 에 넣고 조직을 cell lysis한 후 10분간 ice에서 incubation 하였다. 10,000g에서 1분간 centrifuge한 후 상층액을 새로운 tube로 옮기고 나서 ice에 보관한 다음 단백질량을 수행하였고, 100~200 μg 의 단백질이 50 μl 의 cell lysis buffer에 존재하도록 희석하여 준비된 96 well plate에 옮겼다. 이어 2X Reaction buffer (반응시약, 10mM DTT함유) 50 μl 을 각 tube에 넣고, 4mM LEHD-pNA substrate 5 μl 를 넣어서 37°C에서 1~2시간 incubation한 후 microplate reader에서 Caspase-3/CPP32 & Caspase-9/Mch6 colorimetric assay kit로 측정하였다(microreader: 405 nm, USA).

② NO (nitric oxide)

소장 및 간 조직을 lysis buffer를 이용하여 완전 용해한 후 NO를 측정하였다. 소장과 간 조직에서 생성된 NO의 양은 NO_2^- 의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent (0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthylethylene) diamine in 0.5N HCl, Sigma) 100 μL 를 첨가하였다. 15분간 실온에서 방치한 후, 540 nm 파장에서 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 nitrite 농도를 측정하였고, Sodium nitrate (0.5~100M)를 nitrite 표준으로 이용하였다.

③ Cytokine

TNF- α 와 IL-6의 사이토카인 측정 방법은 manufacturers instruction에 따랐다.

맨 처음 50 μL 분석 희석액을 제공된 well에 각각 넣고, 각 사이토카인에 대한 표준액과 실험액을 각각 50 μL 씩 well의 중심부에 첨가하여 잘 섞이도록 plate를 가볍게 바닥에 두들긴 다음, 제공된 밀폐용 테이프로 덮어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 밀폐용 테이프를 제거하고 제공된 washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 측정하고자 하는 사이토카인의 conjugate 용액 100 μL 를 각 well에 넣고 밀폐용 테이프로 덮어 2시간 동안 반응시킨 후 washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 100 μL 기질용액을 각 well에 넣고 30분 동안 실온에서 차광 상태로 보관하면서 반응시킨 후, 정지용액을 각 well에 100 μL 씩 넣고 30분 이내에 측정하였다(microreader: 450 nm, wavelength correction: 570nm, USA).

④ 단백질량

단백질 농도는 BCA protein assay kit를 이용하여 측정했다. BCA를 표준물질로 사용하여 각각의 단백질 시료 25 μL 를 96 well plate에 분주하고 시약 A와 시약 B (50 : 1)로 구성된 BCA 약물(200 μL)을 각각 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)을 이용하여 540 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하였다.

4. 통계처리

각 실험결과는 평균 및 표준편차 (Mean±S.D.)로 표시하였고, 각 실험그룹간의 유의성 검정은 SPSS 10.1 통계프로그램을 통한 ANOVA를 실시하였으며, 각 실험그룹간의 다중비교를 위한 사후검정으로서 Tukey-test를 실시하였다. 통계적 검정은 유의수준 $\alpha = 0.05$ 수준으로 처리하였다.

III. 결 과

1. 세포 활성능 측정

(1) Apoptosis 진행 세포신호경로 중 Caspase-3 관찰

① Small intestine

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 소장 조직에 대한 Caspase-3를 관찰하였다. 405 nm에서의 O.D. 값은 irradiation control 군의 0.72 ± 0.045 와 비교하여 볼 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.31 ± 0.006 , AOS for 3days + irradiation 군이 0.64 ± 0.016 , irradiation + AOS for 3days 군이 0.64 ± 0.013 , irradiation + AOS for 7days 군이 0.62 ± 0.011 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였고($P < 0.001$), 특히 방사선조사 전 7일간 처치군에서의 차이가 가장 크게 나타났다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Caspase-3 in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment (O.D. : 405 nm)

Groups	Caspase-3 (mean±S.D.)
normal	0.02 ± 0.010
irradiation control	0.72 ± 0.045
AOS for 7days + irradiation	0.31 ± 0.006 ***
AOS for 3days + irradiation	0.64 ± 0.016 ***
irradiation + AOS for 3days	0.64 ± 0.013 ***
irradiation + AOS for 7days	0.62 ± 0.011 ***

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

② Liver

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 간 조직에 대한 Caspase-3를 관찰하였다. 405 nm에서의 O.D. 값은 irradiation control 군의 0.67 ± 0.046 과 비교하여 볼 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.40 ± 0.034 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였다($P < 0.001$)(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Caspase-3 in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(O.D. : 405 nm)

Groups	Caspase-3 (mean±S.D.)
normal	0.20 ± 0.060
irradiation control	0.67 ± 0.046
AOS for 7days + irradiation	0.40 ± 0.034 ***
AOS for 3days + irradiation	0.66 ± 0.018
irradiation + AOS for 3days	0.75 ± 0.113
irradiation + AOS for 7days	0.77 ± 0.062

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

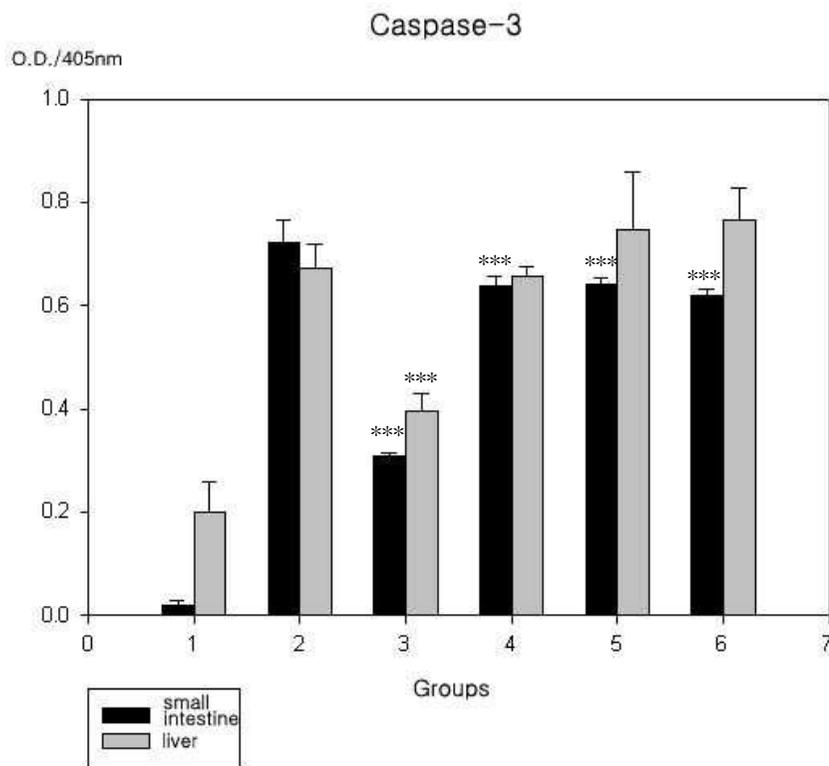


Fig. 1. Caspase-3 in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

***p<0.001 as compared with irradiation control group.

Group 1 : normal

Group 2 : irradiation control

Group 3 : AOS for 7days + irradiation

Group 4 : AOS for 3days + irradiation

Group 5 : irradiation + AOS for 3days

Group 6 : irradiation + AOS for 7days

(2) Apoptosis 진행 세포신호경로 중 Caspase-9 관찰

① Small intestine

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 소장 조직에 대한 Caspase-9를 관찰하였다. 405 nm에서의 O.D. 값은 irradiation control 군의 0.72 ± 0.024 와 비교하여 볼 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.30 ± 0.029 , AOS for 3days + irradiation 군이 0.61 ± 0.010 , irradiation + AOS for 3days 군이 0.64 ± 0.006 , irradiation + AOS for 7days 군이 0.66 ± 0.029 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였고($P < 0.001$), 특히 방사선조사 전 7일간 처치군에서의 차이가 가장 크게 나타났다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. Caspase-9 in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(O.D. : 405 nm)

Groups	Caspase-9 (mean±S.D.)
normal	0.09 ± 0.005
irradiation control	0.72 ± 0.024
AOS for 7days + irradiation	0.30 ± 0.029 ***
AOS for 3days + irradiation	0.61 ± 0.010 ***
irradiation + AOS for 3days	0.64 ± 0.006 ***
irradiation + AOS for 7days	0.66 ± 0.029 ***

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

② Liver

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 간 조직에 대한 Caspase-9를 관찰하였다. 405 nm에서의 O.D. 값은 irradiation control 군의 0.80 ± 0.092 에 비교하여 볼 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.32 ± 0.068 , AOS for 3days + irradiation 군이 0.62 ± 0.073 으로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였고 ($P < 0.001$), irradiation + AOS for 3days 군의 O.D. 값도 0.65 ± 0.072 로 나타나 유의한 차이를 보였으며 ($p < 0.01$), 특히 방사선조사 전 7일간 처치군에서의 차이가 가장 크게 나타났다(Table 5, Fig. 2).

Table 5. Caspase-9 in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(O.D. : 405 nm)

Groups	Caspase-9 (mean±S.D.)
normal	0.15 ± 0.029
irradiation control	0.80 ± 0.092
AOS for 7days + irradiation	0.32 ± 0.068 ***
AOS for 3days + irradiation	0.62 ± 0.073 ***
irradiation + AOS for 3days	0.65 ± 0.072 **
irradiation + AOS for 7days	0.69 ± 0.067

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

** $p < 0.01$ as compared with irradiation control group.

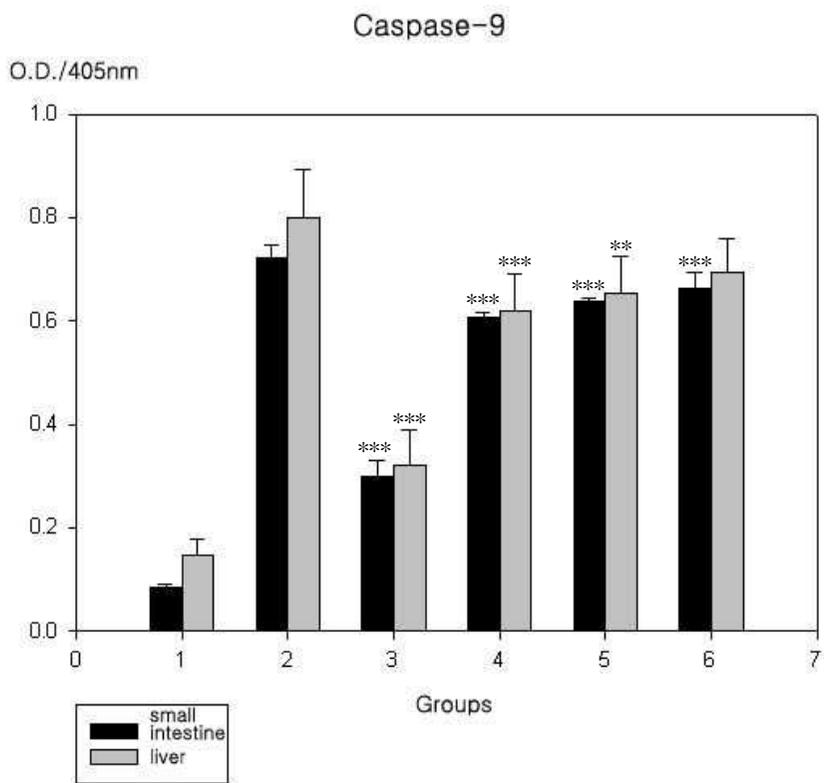


Fig. 2. Caspase-9 in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

***p<0.001 as compared with irradiation control group.

**p<0.01 as compared with irradiation control group.

Group 1 : normal

Group 2 : irradiation control

Group 3 : AOS for 7days + irradiation

Group 4 : AOS for 3days + irradiation

Group 5 : irradiation + AOS for 3days

Group 6 : irradiation + AOS for 7days

2. 염증반응 측정

(1) NO(nitric oxide)

① Small intestine

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 소장 조직에 대한 NO를 관찰하였다. irradiation control 군의 1.70 ± 0.068 과 비교하여 볼 때 AOS for 3days + irradiation 군이 3.36 ± 0.322 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였고 ($P < 0.001$), irradiation + AOS for 3days 군도 2.26 ± 0.331 로서 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.05$) (Table 6, Fig. 3).

Table 6. NO(nitric oxide) in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : nM/ μ g protein)

Groups	NO (mean \pm S.D.)
normal	6.02 ± 0.409
irradiation control	1.70 ± 0.068
AOS for 7days + irradiation	1.25 ± 0.086
AOS for 3days + irradiation	3.36 ± 0.322 ***
irradiation + AOS for 3days	2.26 ± 0.331 *
irradiation + AOS for 7days	1.88 ± 0.477

***p<0.001 as compared with irradiation control group.

*p<0.05 as compared with irradiation control group.

② Liver

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 간 조직에 대한 NO를 관찰하였다. irradiation control 군의 2.31 ± 0.246 과 비교하여 볼 때 AOS for 3days + irradiation 군이 1.74 ± 0.110 으로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였다 ($P < 0.001$)(Table 7, Fig. 3).

Table 7. NO(nitric oxide) in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : nM/ μ g protein)

Groups	Nitric Oxide (mean \pm S.D.)
normal	3.02 ± 0.167
irradiation control	2.31 ± 0.246
AOS for 7days + irradiation	2.09 ± 0.088
AOS for 3days + irradiation	1.74 ± 0.110 ***
irradiation + AOS for 3days	2.15 ± 0.140
irradiation + AOS for 7days	2.26 ± 0.100

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

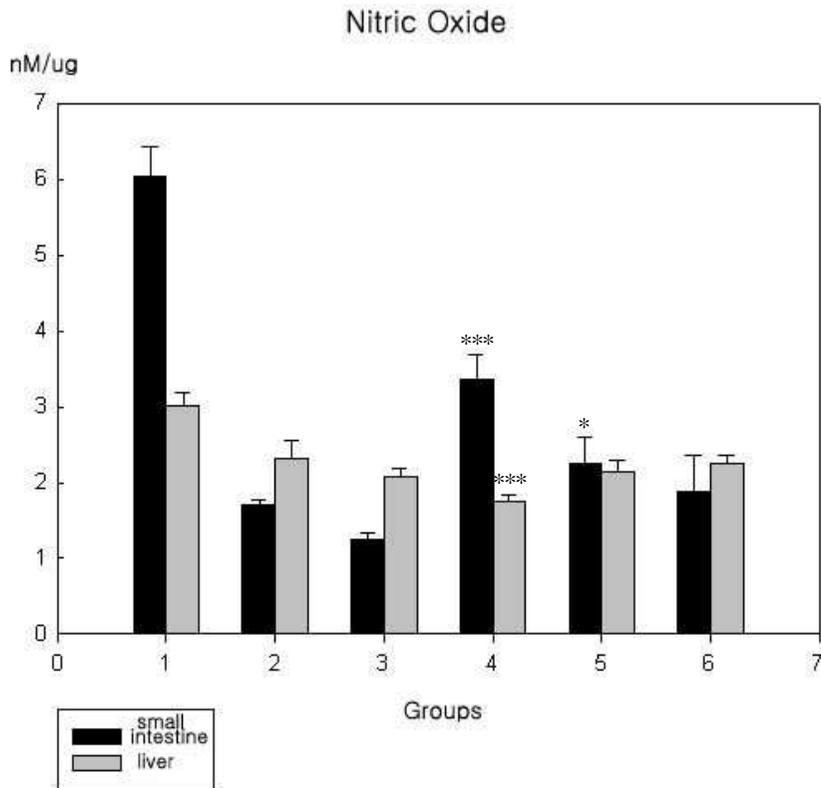


Fig. 3. NO(nitric oxide) in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

***p<0.001 as compared with irradiation control group.

*p<0.05 as compared with irradiation control group.

Group 1 : normal

Group 2 : irradiation control

Group 3 : AOS for 7days + irradiation

Group 4 : AOS for 3days + irradiation

Group 5 : irradiation + AOS for 3days

Group 6 : irradiation + AOS for 7days

3. Cytokine 측정

(1) TNF- α

① Small intestine

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 소장 조직에 대한 TNF- α 를 관찰하였다. irradiation control 군의 0.45 ± 0.108 과 비교하였을 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.29 ± 0.052 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$)(Table 8, Fig. 4).

Table 8. TNF- α in small intestine of 30y irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : pg/mG)

Groups	TNF- α (mean \pm S.D.)
normal	0.05 ± 0.014
irradiation control	0.45 ± 0.108
AOS for 7days + irradiation	0.29 ± 0.052 ***
AOS for 3days + irradiation	0.45 ± 0.040
irradiation + AOS for 3days	0.43 ± 0.035
irradiation + AOS for 7days	0.51 ± 0.046

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

② Liver

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 간 조직에 대한 TNF- α 를 관찰하였다. irradiation control 군의 0.33 ± 0.046 과 비교하였을 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.21 ± 0.020 , AOS for 3days + irradiation 군이 0.25 ± 0.025 , irradiation + AOS for 7days 군이 0.26 ± 0.009 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였고($p<0.001$), irradiation + AOS for 3days 군도 0.27 ± 0.016 으로서 유의한 차이를 보였다($p<0.01$)(Table 9, Fig. 4).

Table 9. TNF- α in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : pg/mG)

Groups	TNF- α (mean \pm S.D.)
normal	0.02 ± 0.008
irradiation control	0.33 ± 0.046
AOS for 7days + irradiation	0.21 ± 0.020 ***
AOS for 3days + irradiation	0.25 ± 0.025 ***
irradiation + AOS for 3days	0.27 ± 0.016 **
irradiation + AOS for 7days	0.26 ± 0.009 ***

*** $p<0.001$ as compared with irradiation control group.

** $p<0.01$ as compared with irradiation control group.

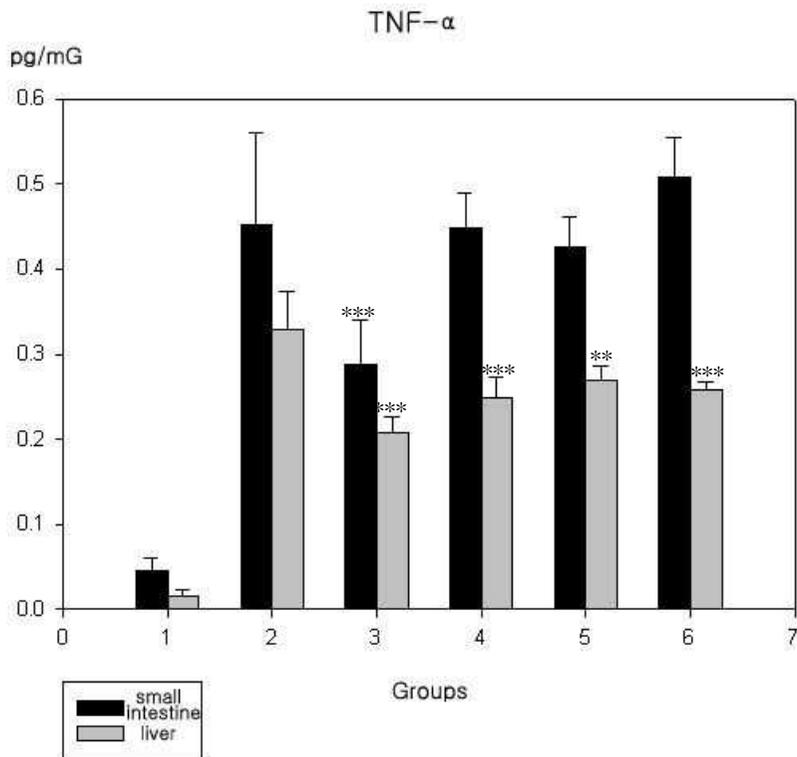


Fig. 4. TNF- α in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

***p<0.001 as compared with irradiation control group.

**p<0.01 as compared with irradiation control group.

Group 1 : normal

Group 2 : irradiation control

Group 3 : AOS for 7days + irradiation

Group 4 : AOS for 3days + irradiation

Group 5 : irradiation + AOS for 3days

Group 6 : irradiation + AOS for 7days

(2) IL-6

① Small intestine

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 소장 조직에 대한 IL-6을 관찰하였다. irradiation control 군의 0.040 ± 0.0081 과 비교하였을 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.022 ± 0.0034 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$)(Table 10, Fig. 5).

Table 10. IL-6 in small intestine of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : pg/mG)

Groups	IL-6 (mean±S.D.)
normal	0.005 ± 0.0030
irradiation control	0.040 ± 0.0081
AOS for 7days + irradiation	0.022 ± 0.0034 ***
AOS for 3days + irradiation	0.036 ± 0.0026
irradiation + AOS for 3days	0.036 ± 0.0020
irradiation + AOS for 7days	0.043 ± 0.0050

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

② Liver

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 간 조직에 대한 IL-6를 관찰하였다. irradiation control 군의 0.030 ± 0.0036 과 비교하였을 때 AOS for 7days + irradiation 군이 0.013 ± 0.0038 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$)(Table 11, Fig. 5).

Table 11. IL-6 in liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : pg/mG)

Groups	IL-6 (mean±S.D.)
normal	0.009 ± 0.0017
irradiation control	0.030 ± 0.0036
AOS for 7days + irradiation	0.013 ± 0.0038 ***
AOS for 3days + irradiation	0.028 ± 0.0036
irradiation + AOS for 3days	0.026 ± 0.0026
irradiation + AOS for 7days	0.032 ± 0.0034

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

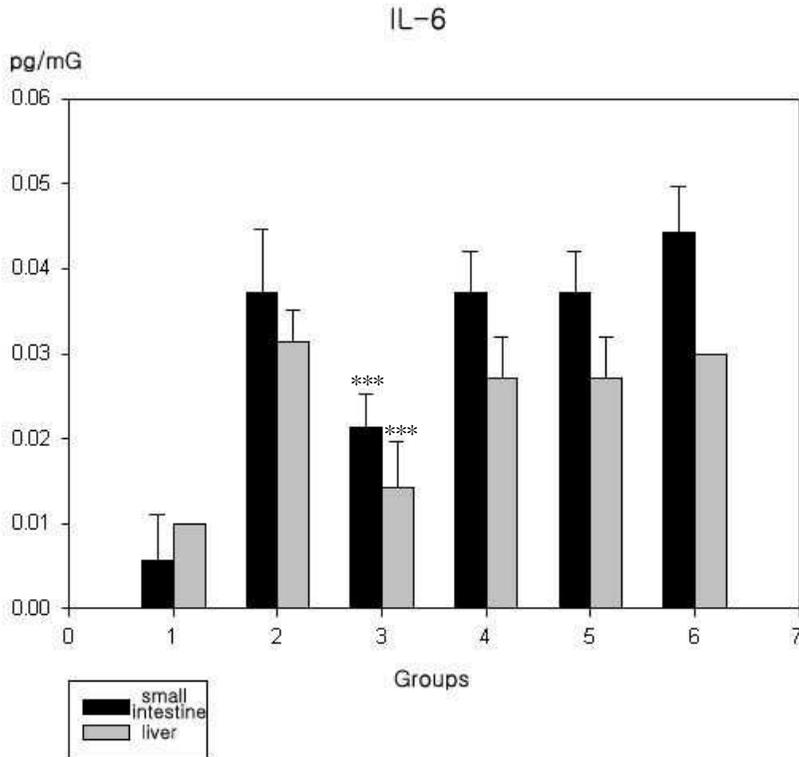


Fig. 5. IL-6 in small intestine and liver of 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

***p<0.001 as compared with irradiation control group.

Group 1 : normal

Group 2 : irradiation control

Group 3 : AOS for 7days + irradiation

Group 4 : AOS for 3days + irradiation

Group 5 : irradiation + AOS for 3days

Group 6 : irradiation + AOS for 7days

4. Serum 분석

알긴산올리고당의 방사선 방어효과에 대한 보조 자료를 획득하기 위하여 3Gy 1회 전신 조사된 마우스의 혈청에 대해 다음 14가지 생화학 검사를 실시하였다.

(1) Glucose

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 glucose를 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 12).

Table 12. Glucose in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	Glucose (mean±S.D.)
normal	185.43±14.93
irradiation control	220.00±17.58
AOS for 7days + irradiation	215.86±49.47
AOS for 3days + irradiation	192.29±54.47
irradiation + AOS for 3days	177.00±35.28
irradiation + AOS for 7days	247.86±38.14

(2) Creatinine

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 creatinine을 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 13).

Table 13. Creatinine in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	Creatinine (mean±S.D.)
normal	0.27±0.05
irradiation control	0.30±0.06
AOS for 7days + irradiation	0.26±0.05
AOS for 3days + irradiation	0.30±0.00
irradiation + AOS for 3days	0.30±0.00
irradiation + AOS for 7days	0.31±0.04

(3) BUN(blood urea nitrogen)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 BUN을 측정하였다. irradiation control 군의 15.70 ± 1.48 과 비교하였을 때 irradiation + AOS for 7days 군이 18.59 ± 2.49 로 나타나 평균값에 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$)(Table 14).

Table 14. BUN(blood urea nitrogen) in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	BUN (mean \pm S.D.)
normal	19.61 ± 1.65
irradiation control	15.70 ± 1.48
AOS for 7days + irradiation	14.19 ± 1.56
AOS for 3days + irradiation	13.79 ± 1.56
irradiation + AOS for 3days	16.51 ± 1.06
irradiation + AOS for 7days	$18.59 \pm 2.49^*$

* $p < 0.05$ as compared with irradiation control group.

(4) UA(uric acid)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 UA를 측정하였다. irradiation control 군의 1.96 ± 0.31 과 비교하였을 때 irradiation + AOS for 7days 군이 4.06 ± 1.00 으로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이가 있었고 ($p < 0.001$), AOS for 7days + irradiation 군의 경우 3.80 ± 0.76 으로 나타나 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$)(Table 15).

Table 15. Uric acid in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	UA (mean±S.D.)
normal	1.89 ± 0.56
irradiation control	1.96 ± 0.31
AOS for 7days + irradiation	3.80 ± 0.76 *
AOS for 3days + irradiation	2.09 ± 0.48
irradiation + AOS for 3days	2.96 ± 1.22
irradiation + AOS for 7days	4.06 ± 1.00 ***

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

* $p < 0.05$ as compared with irradiation control group.

(5) TP(total protein)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 TP를 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 16).

Table 16. Total protein in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : g/dL)

Groups	TP (mean±S.D.)
normal	4.13±0.20
irradiation control	4.03±0.14
AOS for 7days + irradiation	4.54±0.98
AOS for 3days + irradiation	4.34±0.46
irradiation + AOS for 3days	4.06±0.22
irradiation + AOS for 7days	4.10±0.16

(6) Albumin

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 albumin을 측정하였다. irradiation control 군의 2.89 ± 0.25 와 비교하였을 때 irradiation + AOS for 7days 군이 3.64 ± 0.21 로 나타나 평균값에 유의한 차이를 보였다 ($p<0.05$)(Table 17).

Table 17. Albumin in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : g/dL)

Groups	Albumin (mean±S.D.)
normal	3.19 ± 0.34
irradiation control	2.89 ± 0.25
AOS for 7days + irradiation	3.10 ± 0.72
AOS for 3days + irradiation	2.86 ± 0.40
irradiation + AOS for 3days	3.01 ± 0.55
irradiation + AOS for 7days	$3.64\pm 0.21^*$

* $p<0.05$ as compared with irradiation control group.

(7) TC(total cholesterol)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 TC를 측정하였다. irradiation control 군의 88.00 ± 3.65 와 비교하였을 때 irradiation + AOS for 3days 군이 71.43 ± 5.91 로 나타나 평균값의 매우 유의한 차이가 있었고 ($p < 0.001$), AOS for 7days + irradiation 군도 77.14 ± 6.39 로 나타나 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$)(Table 18).

Table 18. Total cholesterol in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	TC (mean±S.D.)
normal	86.00 ± 7.35
irradiation control	88.00 ± 3.65
AOS for 7days + irradiation	77.14 ± 6.39 *
AOS for 3days + irradiation	81.00 ± 8.52
irradiation + AOS for 3days	71.43 ± 5.91 ***
irradiation + AOS for 7days	84.00 ± 4.36

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

* $p < 0.05$ as compared with irradiation control group.

(8) HDL cholesterol

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 HDL cholesterol을 측정하였다. irradiation control 군의 55.14 ± 3.72 와 비교하였을 때 irradiation + AOS for 3days 군이 47.00 ± 3.83 으로 나타나 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$)(Table 19).

Table 19. HDL cholesterol in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	HDL cholesterol (mean \pm S.D.)
normal	57.57 ± 4.12
irradiation control	55.14 ± 3.72
AOS for 7days + irradiation	50.86 ± 5.55
AOS for 3days + irradiation	55.14 ± 5.76
irradiation + AOS for 3days	$47.00 \pm 3.83^*$
irradiation + AOS for 7days	55.43 ± 5.83

* $p < 0.05$ as compared with irradiation control group.

(9) LDL cholesterol

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 LDL cholesterol을 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 20).

Table 20. LDL cholesterol in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	LDL cholesterol (mean±S.D.)
normal	5.86±1.68
irradiation control	6.00±0.58
AOS for 7days + irradiation	6.14±2.54
AOS for 3days + irradiation	6.43±2.64
irradiation + AOS for 3days	6.14±1.21
irradiation + AOS for 7days	5.29±0.76

(10) Triglycerides

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 triglycerides를 측정하였다. irradiation control 군의 39.57 ± 20.58 과 비교하였을 때 irradiation + AOS for 7days 군이 77.57 ± 9.00 으로 나타나 매우 유의한 차이를 보였다($p < 0.001$)(Table 21).

Table 21. Triglycerides in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : mg/dL)

Groups	Triglycerides (mean \pm S.D.)
normal	31.43 ± 11.50
irradiation control	39.57 ± 20.58
AOS for 7days + irradiation	34.86 ± 08.11
AOS for 3days + irradiation	31.57 ± 08.92
irradiation + AOS for 3days	42.43 ± 11.00
irradiation + AOS for 7days	77.57 ± 09.00 ***

*** $p < 0.001$ as compared with irradiation control group.

(11) ALP(alkaline phosphatase)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 ALP를 측정하였다. irradiation control 군의 477.14 ± 43.04 와 비교하였을 때 AOS for 3days + irradiation 군이 316.29 ± 105.93 으로 나타나 평균값의 유의한 차이가 있었고 ($p < 0.01$), irradiation + AOS for 3days 군도 347.71 ± 73.30 으로 나타나 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$)(Table 22).

Table 22. Alkaline phosphatase in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : IU/L)

Groups	ALP (mean \pm S.D.)
normal	466.29 ± 068.43
irradiation control	477.14 ± 043.04
AOS for 7days + irradiation	417.71 ± 055.99
AOS for 3days + irradiation	$316.29 \pm 105.93^{**}$
irradiation + AOS for 3days	$347.71 \pm 073.30^*$
irradiation + AOS for 7days	374.00 ± 054.38

** $p < 0.01$ as compared with irradiation control group.

* $p < 0.05$ as compared with irradiation control group.

(12) LDH(lactate dehydronase)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 LDH를 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 23).

Table 23. LDH in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : IU/L)

Groups	LDH (mean±S.D.)
normal	1436.86±392.99
irradiation control	1446.43±644.68
AOS for 7days + irradiation	2247.14±644.05
AOS for 3days + irradiation	1450.29±460.18
irradiation + AOS for 3days	2139.14±873.88
irradiation + AOS for 7days	736.00±176.07

(13) GOT(glutamin oxaloacetic acid transaminase)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 GOT를 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 24).

Table 24. GOT in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : IU/L)

Groups	GOT (mean±S.D.)
normal	170.71±054.53
irradiation control	250.00±187.23
AOS for 7days + irradiation	327.71±289.55
AOS for 3days + irradiation	222.14±112.30
irradiation + AOS for 3days	384.14±326.55
irradiation + AOS for 7days	122.86±035.22

(14) GPT(glutamin pyruvic acid transaminase)

방사선 조사 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 혈청에 대한 GPT를 측정하였다. irradiation control 군과 비교하였을 때 어떤 실험그룹에서도 유의한 차이를 발견하지 못했다(Table 25).

Table 25. GPT in 3Gy irradiated mice with algin-oligosaccharide treatment

(unit : IU/L)

Groups	GPT (mean±S.D.)
normal	25.57±05.94
irradiation control	23.00±07.75
AOS for 7days + irradiation	21.86±09.94
AOS for 3days + irradiation	19.29±09.67
irradiation + AOS for 3days	28.14±10.14
irradiation + AOS for 7days	21.14±06.41

IV. 고 찰

알긴산올리고당은 항산화제 기능으로서 작용하여 각종 자극으로부터 발생한 활성산소와 유리기(free radical)를 소거시키는 기전을 가지고 있는 것으로 알려져 있고²⁰⁾, 이는 방사선 조사 전이나 후에 적절히 처치를 시행할 경우 방사선 피폭 직후의 전리 및 여기 작용으로 인해 생성된 악성 신생물질들을 신속하게 제거시킴으로써 생체에 대한 효과적인 방어수단이 될 수 있다.

방사선 자극 후 세포사로 이어지는 세포신호경로와 관련하여 Wang 등(2002)은 염증반응 발생과정 상의 중요한 신호전달물질인 NF- κ B는 전리방사선으로 촉발되는 형질도입경로 신호에 있어서 세포사 혹은 세포생존으로 이끌어가는 본질적인 요소라는 사실을 보고했고²¹⁾²²⁾, Zaidi 등(2004)은 8Gy의 전신 방사선조사 20시간 전에 가벼운 전신온열요법(39° C, 1h)으로 처치할 경우 전신 방사선조사로부터 유발되는 세포사를 상당부분 감소시킬 수 있다고 보고했으며²³⁾, 김영호(2002)는 방사성수은의 오염에 의해 유도된 염색체 이상을 키토산 처치로 상당 부분 억제시킬 수 있다고 보고했다²⁴⁾. Hong 등(1997)은 방사선조사로 반응하는 뇌 조직을 통해 뇌 신경세포의 급성발현 단백질 유전자인 c-fos 및 junB가 반응한다는 사실을 보고하였고²⁵⁾, Claudia 등(1998)은 방사선장해 유발인자로 알려진 단백질 키나아제 C나 스트레스반응 단백질 키나아제와 같은 효소들이 급성반응 유전자의 유도를 통해 G₁기의 세포분열 지연현상을 초래시킨다고 보고했다²⁶⁾. 세포사멸은 에너지를 필요로 하는 능동적인 과정으로 자외선²⁷⁾, 세포성장인자의 결핍²⁸⁾, 수용체에 대한 배위자의 결핍²⁹⁾, 반응기 산소대사물³⁰⁾, 이온화 방사선에 의한 DNA손상³¹⁾ 등과 같은 세포에 대한 여러 자극에 의해 유발되고, 자극의 정도에 따라 액틴과 액틴-결합 단백질인 fordrin의 분해로 인해 원형질막의 기포형성이 초래되어 세포사멸로 이어지며³²⁾³³⁾, 세포예정사의 신호전달과정을 자세히 파악할 경우 인위적인 세포 예정사 유발이나 억제가 가능할 뿐만 아니라³⁴⁾ 세포 예정사를 저해시킬 수 있는 약물

및 물리적 방법을 찾을 수 있다고 보고된바 있다³⁵⁾³⁶⁾. 본 연구에서는 방사선 자극 후 세포사(apoptosis)로 이어지는 세포신호경로 중 Caspase-3 및 Caspase-9를 관찰하였는데, Caspase-3 및 Caspase-9 모두 방사선조사대조군에서 0.D. 값이 매우 증가된 반면, 방사선조사 전이나 후에 알긴산올리고당을 처치한 모든 실험군에서의 0.D. 값은 방사선조사대조군보다 낮게 나타났고, 특히 방사선조사 전 7일간 처치군에서의 차이가 가장 크게 나타났다($P < 0.001$). 방사선 조사에 의해 apoptosis로 진행되는 세포에 있어서 Caspase는 핵 내의 세포자멸 억제 단백질을 분해·제거시킴으로써 손상이 심한 세포의 자멸사를 유도하는 역할을 수행하는데³⁷⁾, 알긴산올리고당이 항산화작용²⁰⁾을 통해 방사선손상을 방어한 결과 알긴산올리고당 처치군의 Caspase 0.D. 값을 하강 조절하였다고 사료된다.

염증반응 측정인자인 Nitric Oxide와 관련하여 Sethi 등(2004)은 자외선 피폭(50 mJ/cm²)을 받은 마우스를 통해 복막 대식세포의 활성화가 Nitric Oxide의 생성을 촉진시키고 자외선조사 후 24시간째에 최고점에 이른다는 사실을 보고했으며³⁸⁾, Nakagawa 등(2001)은 마우스 전신피폭의 경우 전리방사선에 의해 Nitric Oxide가 많은 기관에서 유도된다고 밝혔다³⁹⁾. 본 연구에서는 3Gy 방사선이 조사된 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 Nitric Oxide를 관찰하였는데, 소장 및 간 조직 모두 방사선조사대조군에서 Nitric Oxide 생성이 하강된 반면, 방사선조사 전 3일간 알긴산올리고당 처치군의 소장 조직에서는 방사선조사대조군보다 약 2배의 생성 증가를 보였다($P < 0.001$). Nitric Oxide는 세포에서 생성된 후 다른 세포막을 투과해 그 세포의 염증반응을 제어함으로써 감염에 대항하는 면역조절기능을 수행하는데⁴⁰⁾, 알긴산올리고당이 알긴산올리고당 처치군의 Nitric Oxide 생성을 증가시킴으로써 그 결과 염증반응 억제를 통해 방사선 방어효과를 수행한다고 사료된다.

방사선 유도 사이토카인 중 TNF- α 와 관련하여 Kyrkanides 등(1999)은 방사선조사 마우스의 뇌를 통한 실험에서 전리방사선은 TNF- α 와 ICAM-1을 심각하게 유발시키는 것으로 보고했고⁴¹⁾, Fagiolo 등(2002)은 유사분열이 활발한 혈액봉지에 방사선조사를 시행한 후 단핵구 세포에 대한 시간-반응관계를 살펴본 결과 방사선조사 24시간 이후부터 세포증식 억제현상이 나타나면서 TNF- α 생성이 상당한 수준

으로 증가된다고 보고했다⁴²⁾. Rube 등(2004)은 항암제치료와 흉부방사선치료 후에 발현되는 사이토카인을 분석한 결과 gemcitabine을 사용한 항암제치료와 흉부방사선치료를 병행 실시한 실험그룹은 단독 항암제치료그룹이나 단독 방사선치료그룹에 비해 모든 시간대에서 TNF- α 발현 정도가 높게 나타났다고 보고했고⁴³⁾, Akmansu 등(2005)은 두경부암으로 국소방사선치료를 받은 34명의 혈청을 통해 방사선치료 전과 5주 치료 후 시점을 기준으로 TNF- α 를 측정하고 수술 없이 단지 방사선치료만을 실시한 환자 모두에서 TNF- α 값이 급증했다고 보고했다⁴⁴⁾. Rube 등(2002)은 흉부에 12Gy의 방사선이 조사된 폐 조직을 통해 면역조절제인 pentoxifylline을 투여할 경우의 TNF- α 생성 여부를 관찰한 결과 단독 방사선 조사그룹에서 TNF- α 생성이 촉진되는 반면에 pentoxifylline 투여와 방사선조사가 병행된 실험그룹에서의 TNF- α 생성은 경미하게 나타남으로써 pentoxifylline은 TNF- α 생성을 하강 조절한다고 보고했고⁴⁵⁾, Laquerriere 등(2003)은 자외선에 피폭된 세포를 단백질 키나아제 A로 치료할 경우 TNF- α 의 증대한 억제가 나타난다고 보고했다⁴⁶⁾. 본 연구에서는 3Gy 방사선을 1회 전신 조사한 후 알긴산올리고당을 처치한 마우스 조직을 통해 TNF- α 를 관찰하였는데, 소장과 간 조직 모두 방사선조사대조군에서 TNF- α 값이 매우 증가된 반면, 소장 조직의 경우 방사선조사 전 7일간 처치군에서 TNF- α 생성 억제가 나타났고($P<0.001$), 간 조직의 경우 방사선조사 전 7일간 처치군과 방사선조사 전 3일간 처치군 그리고 방사선조사 후 7일간 처치군에서 TNF- α 생성 억제가 나타났다($P<0.001$). TNF- α 는 제암효과를 가진 생물학적 응답조절 단백질로써 방사선 등의 자극에 의해 유발되어 세포손상에 대한 보호작용을 수행하는데⁴⁵⁾, 알긴산올리고당이 항산화작용²⁰⁾을 통해 방사선손상을 방어한 결과 알긴산올리고당 처치군의 TNF- α 값을 하강 조절하였다고 사료된다.

방사선 유도 사이토카인 중 interleukin과 관련하여 Hidetoshi 등(1995)은 IL-2를 비롯해서 IL-4와 IL-7 면역인자가 방사선 유발 세포사로부터 CD⁺4 T세포와 CD⁺8 T세포 모두를 구제한다고 보고하였고⁴⁷⁾, Legue 등(2001)은 전신 방사선을 조사하기 전에 IL-6과 같은 사이토카인을 주입하면 세포생존율이 증가되어 방사선 방어효과를 나타내고 아울러 세르톨리 세포에서의 방사선 방어효과가 관찰된다고 보고

했으며⁴⁸⁾, Frasca 등(2000)은 젊은 층과 중년층의 X-선 조사 말초혈액 단핵구 세포를 통해 진핵세포 ku의 DNA 결합과정에서 생성된 사이토카인의 효과를 연구한 결과 젊은 층에서 ku 세포의 DNA 결합 활성이 대폭 증가됨으로써 IL-6 변형 사이토카인인 K-7/D-6이 생성돼 예정 밖의 DNA 회복이 유도된다고 보고했다⁴⁹⁾. 그리고 Meeren 등(1999)은 인간 내피세포에 방사선이 조사되면 IL-6 생성이 증가된다고 보고했고⁵⁰⁾, Ross 등(1997)은 인간 glioblastoma 세포라인에서 IL-6 mRNA는 높은 선량률이나 중등도 선량률보다 낮은 선량률이나 매우 낮은 선량률의 방사선조사에서 생성이 촉진된다고 보고했으며⁵¹⁾, Laquerriere 등(2005)은 자외선에 피폭된 인간 피부를 단백질 키나아제 C의 약리적 활성제인 PMA로 처리할 경우 케라틴 생성 세포인 keratinocyte의 NCTC 2544 세포라인에서 면역인자 IL-8이 상승 조절된다고 보고했다⁵²⁾. 본 연구에서는 3Gy 방사선이 1회 전신 조사된 마우스에게 알긴산올리고당을 투여한 후 IL-6를 관찰하였는데, 소장과 간 조직 모두 방사선조사대조군에서 IL-6 값이 매우 증가된 반면, 방사선조사 전 7일간 알긴산올리고당 처리군에서 IL-6 생성억제가 나타났다($p < 0.001$). IL-6은 혈구세포나 면역세포, 내분비세포, 신경세포 등의 세포 사이에서 면역 매개작용을 수행하는 활성물질로써 방사선 등의 자극에 의해 유발되어 세포에 대한 방사선 보호작용을 수행하는데⁴⁸⁾, 알긴산올리고당이 항산화작용²⁰⁾을 통해 방사선손상을 방어한 결과 알긴산올리고당 처리군의 IL-6 값을 하강 조절하였다고 사료된다.

김정삼(2003)은 키토산올리고당의 섭취가 방사선조사 마우스 혈액의 화학적 성분변화에 어떠한 영향을 주는지 관찰하기 위해 0.1% 키토산올리고당을 투여하여 관찰하였는데, 방사선조사대조군과 비교하여 볼 때 ALP(alkaline phosphatase)와 AST(aspartate aminotransferase)의 경우 방사선조사 전 14일 동안 키토산올리고당 처리를 실시할 경우 빠른 회복을 나타냈다⁵³⁾. 본 연구에서는 알긴산올리고당의 방사선 방어효과에 대한 보조 자료를 획득하기 위하여 3Gy 방사선이 1회 전신 조사된 마우스의 혈청을 원심분리한 후 14가지 생화학검사를 실시하였는데, 알긴산올리고당의 투여로 인해 회복을 나타낸 경우로는 BUN(blood urea nitrogen)과 albumin의 방사선조사 후 7일간 처리군이었다($p < 0.05$).

V. 결 론

알긴산올리고당의 방사선 방어효과를 구명하기 위해 3Gy 방사선이 1회 전신 조사된 마우스를 정상군 7마리, 방사선조사대조군 7마리, 방사선조사 전 7일간 처치군 7마리, 방사선조사 전 3일간 처치군 7마리, 방사선조사 후 3일간 처치군 7마리, 방사선조사 후 7일간 처치군 7마리 등 총 42마리를 대상으로 하여 첫째, 세포 활성능을 관찰하기 위해 세포사로 이어지는 세포신호경로 중 Caspase-3 및 Caspase-9를 측정하였고, 둘째, 세포 염증반응을 관찰하기 위해 Nitric Oxide를 측정하였으며, 셋째, 방사선 유도 사이토카인 을 관찰해보기 위해 TNF- α 와 IL-6 을 측정하였다. 아울러 알긴산올리고당의 방사선 방어효과에 관한 보조자료 획득 일환으로 동일 마우스의 혈청에 대한 생화학적 분석도 함께 실시하였다.

세포 활성능을 관찰하기 위한 Caspase-3 및 Caspase-9 검사에서는 Caspase-3 및 Caspase-9 모두 방사선조사대조군에서 0.D. 값이 매우 증가된 반면, 방사선조사 전이나 후에 알긴산올리고당을 처치한 모든 실험군에서의 0.D. 값은 방사선조사대조군보다 낮게 나타났고, 특히 방사선조사 전 7일간 처치군에서의 차이가 매우 크게 나타났다($P < 0.001$). 이로써 알긴산올리고당 처치군의 Caspase 생성이 억제됨을 확인하였다.

세포 염증반응을 관찰하기 위한 Nitric Oxide 검사에서는 소장 및 간 조직 모두 방사선조사대조군에서 Nitric Oxide 생성이 하강된 반면, 소장 조직의 방사선조사 전 3일간 처치군에서 유의한 생성 증가를 보였고($P < 0.001$), 이로써 알긴산올리고당이 Nitric Oxide 생성을 상승시킴을 확인하였다.

방사선 유도 사이토카인 중 TNF- α 검사에서는 소장과 간 조직 모두 방사선조사대조군에서 TNF- α 값이 매우 증가된 반면, 소장 조직의 경우 방사선조사 전 7일간 처치군에서 TNF- α 생성 억제가 나타났고($P < 0.001$), 간 조직의 경우 방사선조사 전 7일간 처치군과 방사선조사 전 3일간 처치군 그리고 방사선조사 후 7일간

처치군에서 TNF- α 생성 억제가 나타났다($P < 0.001$). 이로써 알긴산올리고당 처치군의 TNF- α 생성이 억제됨을 확인하였다.

방사선 유도 사이토카인 중 IL-6 검사에서는 소장과 간 조직 모두 방사선조사대조군에서 IL-6 값이 매우 증가된 반면, 방사선조사 전 7일간 알긴산올리고당 처치군에서 IL-6 생성억제가 나타났고($p < 0.001$), 이로써 알긴산올리고당 처치군의 IL-6 생성이 억제됨을 확인하였다.

알긴산올리고당의 방사선 방어효과에 관한 보조자료 획득 일환으로 실시한 혈청 검사에서는 BUN(blood urea nitrogen)과 albumin의 방사선조사 후 7일간 처치군에서 시료 투여에 의한 회복을 나타냈다($p < 0.05$).

결론적으로, 본 연구에서 항산화효과가 탁월한 알긴산올리고당은 Caspase 생성 억제, Nitric Oxide 생성 증가, TNF- α 생성 억제, IL-6 생성 억제 등을 유도함으로써 방사선 방어작용을 수행한다는 사실을 구명하였고, 화학적 독성이 적은 자연산생물이 방사선방어제로 활용될 수 있음을 확인하였다.

VI. 참고문헌

- 1) 최종학, 임한영, 이준일, 강정호, 김성수.. 「의료방사선생물학」 (서울 : 신광출판사, 2004): 93.
- 2) W.M. Ross and J. Peeke. "Radioprotection conferred by dextran-sulfate given before irradiation in mice." *Exp. Hematol.* 14: 147, 1986.
- 3) R.B. Mefferd, D.T. Herkel, and J.B. Loffer. "Effect of piromen on survival in irradiated mice." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83: 54, 1953.
- 4) K.J. Mori, A. Sato, and Y. Ito. "Reticuloendothelial system blockade as an effective method of radioprotection." *Experimentia* 31: 112, 1975.
- 5) F. Herodin, J.D. Laval, M. Fatome, and R.M. Fauve. "Radioprotective effect of an acute non-specific inflammation in mice." *Int. J. Radiat. Biol.* 51: 549, 1987.
- 6) 송지영. “인삼과 백굴채 다당체의 조혈 및 방사선 방어 효과.” 약학박사학위논문, 이화여자대학교, 1999.
- 7) KARP. Proceeding of the Korean Association for Radiation Protection, November: 3-4, 2000.
- 8) KARP. Proceeding of the Korean Association for Radiation Protection, November: 1-2, 2001.
- 9) 김성호, 오현, 이송은, 양정아, 정용운. “고선량 및 저선량 방사선피폭에 대한 홍삼의 방사선 방호효과” , *Korean J. Ginseng Sci.* Vol. 22, No 1: 67, 1998.
- 10) 이해준. “마우스에서 인삼의 방사선 장해 경감 효과 평가에 관한 형태학적 연구.” 수의학박사학위논문, 전남대학교, 2005.
- 11) 정진호. “사람의 피부에서 녹차 EGCG의 자외선에 의한 피부 손상 및 노화 억제 효과.” *한국식품과학회 국제녹차심포지엄*: 3-8, 2001.

- 12) 탁우정, 이창균, 서성준, 김명남, 노병인, 홍창권. "HaCaT 세포주에서 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)가 자외선 및 LPS에 의한 iNOS mRNA 발현 및 NO 생성에 미치는 영향." *대한피부과학회지* 42(1): 37-46, 2004.
- 13) I. Ding, T. Wu, H. Matsubara, J. Magae, M. Shou, J. Cook, and P. Okunieff. "Acidic fibroblast growth factor (FGF₁) increases survival and haematopoietic recovery in total body irradiated C₃H/HeNCr mice." *CYTOKINE*, Vol 9, No 1: 59-65, 1997.
- 14) K. Anzai, M. Ueno, A. Yoshida, M. Furuse, W. Aung, I. Nakanishi, T. Moritake, K. Takeshita, and N. Ikota. "Comparison of stable nitroxide, 3-substitute 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyls, with respect to protection from radiation, prevention of DNA damage, and distribution in mice." *Free Radical Biology & Medicine* 40: 1170-1178, 2006.
- 15) Y. Kalechman, A. Shani, M. Albeck, and B. Sredni. "Induction of acute phase proteins in mice and humans by treatment with AS101, an immunomodulator with radioprotective properties." *Immunopharmacology* 29: 149-158, 1995.
- 16) V.K. Singh, V. Srinivasan, T.M. Seed, W.E. Jackson, V.E. Miner, and K.S. Kumar. "Radioprotection by N-palmitoylated nonapeptide of human interleukin-1 β ." *Peptides* 26: 413-418, 2005.
- 17) P. Fedorocko, and N.O. Mackova. "Radioprotection of haemopoietic stem cells by a single injection of bacterial lysate - IRS-19 administered to mice before or after irradiation." *International Journal of Immunopharmacology* 22: 989-999, 2000.
- 18) G.H.W. Wong. "Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD." *Biochemica et Biophysica Acta* 1271: 205-209, 1995.
- 19) V.K. Singh, and V.S. Yadav. "Role of cytokines and growth factors in radioprotection." *Experimental and Molecular Pathology* 78: 156-169, 2005.

- 20) 배영훈, 안태훈, 임성철, 박석천, 이재창, 강남현, 배춘식. "토끼의 관절병증에 미치는 알긴산올리고당의 치료효과." 대한의학회지 42(2): 153-162, 2002.
- 21) T. Wang, X. Zhang, and J.J. Li. "The role of NF- κ B in the regulation of cell stress responses." *International Immunopharmacology* 2: 1509-1520, 2002.
- 22) D. Hallahan, E.T. Clark, J. Kuchibhotla, B.L. Gewertz, and T. Collins. "E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction." *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 217, No. 3: 784-795, 2005.
- 23) A.K. Zaidi, R.S. Bagewadkar, M. Subramanian, G.S. Kaklij, and M.S. Patil. "Effect of whole body hyperthermia (39° C, 1h) on radiation-induced apoptosis in Swiss mice." *Journal of Thermal biology* 29: 3-8, 2004.
- 24) 김영호. "생쥐에서 키토산의 조직학적 · 세포유전학적 안전성 및 방사성수은 흡착 효과," 이학박사학위논문, 조선대학교, 2002.
- 25) J.H. Hong, C.S. Chiang, J.R. Sun, H.R Withers, and W.H. McBride. "Induction of c-fos and junB mRNA following in vivo brain irradiation." *Molecular Brain Research* 48: 223-228, 1997.
- 26) S. Claudia, and G.B. Gerber. "Adaptive Response to DNA-Damaging Agents." *Biochemical Pharmacology*, Vol. 55: 941-951, 1998.
- 27) V. Duliac, W.K. Kaufmann, S.J. Wilson, T.D. Tlsty, E. Less, W.J. Harper, S.J. Elledge, and S.I. Reed. "p53 dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced." *Cell* 76: 1013-1023, 1994.
- 28) M.K.L. Collins, and A. Lopez-Rivas. "The control of apoptosis in mammalian cells." *Trends Biochem. Sci.* 18: 307-311, 1993.
- 29) S. Nagata. "Apoptosis-Mediating Fas antigen and its natural mutation." *Curr. Comm. Cell Mol. Biol.* 8: 313-326, 1994.
- 30) C. Ronnback. "Effects on fetal ovaries after protracted, external gamma

- irradiation as compared with those internal deposition." *Acta. Radiol. Oncol.* 22: 465-471, 1983.
- 31) L. Özkan, S. Özuysal, Ü. Egeli, and S.B. Adim. "Effect of Taxol plus radiation on the apoptotic and mitotic indices of mouse intestinal crypt cell." *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 433-438, 2001.
 - 32) A.H. Wylli. "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." *Nature* 284: 255-256, 1980.
 - 33) T.G. Cotter, S.V. Lennon, J.M. Glynn, and D.R. Green. "Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis." *Cancer Res.* 52: 997-1005, 1992.
 - 34) J.J. Cohen, and R.C. Duke. "Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death." *J. Immunol.* 132: 38-42, 1984.
 - 35) R.C. Duke, R. Chervenak, and J.J. Cohen. "Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation: An early event in cell mediated cytolysis." *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 80: 6361-6365, 1983.
 - 36) R. Maion, G.M. Fimia, P. Holman, B. Schaffhausen, and P. Amati. "Retinoblastoma antioncogene is involved in the inhibition of myogenesis by polymavirus large T antigen." *Cell Growth Differ.* 5: 231-237, 1994.
 - 37) K. Myung-Sook. "Signaling and functional of caspase and c-Jun N-terminal kinase in cisplatin-induced apoptosis." *Korean Society for Molecular and Cellular Biology.* Vol. 13, No. 2: 194-201, 2002.
 - 38) G. Sethi, and A. Sodhi. "In vitro activation of murine peritoneal macrophages by ultraviolet B radiation: upregulation of CD18, production of NO, proinflammatory cytokines and a signal transduction pathway." *Molecular Immunology* 40: 1315-1323, 2004.
 - 39) H. Nakagawa, N. Ikota, T. Ozawa, and Y. Kotake. "Dose-and time-dependence of radiation-induced nitric oxide formation in mice as

- quantified with electron paramagnetic resonance." *Nitric Oxide* 5(1): 47-52, 2001.
- 40) 조성경. "Nitric Oxide의 면역반응 조절 기능." 의학박사학위논문, 원광대학교, 1993.
- 41) S. Kyrkanides, J.A. Olschowka, J.P. Williams, J.T. Hansen, and M.K. O'Banion. "TNF- α and IL-1 β mediate intercellular adhesion molecule-1 induction via microglia-astrocyte interaction in CNS radiation injury." *Journal of Neuroimmunology* 95: 95-106, 1999.
- 42) E. Fagiolo, and C. Toriani-Terenzi. "IFN- γ and TNF- α production in γ -irradiated blood units by mononuclear cells and GVHD prevention." *Transfusion and Apheresis Science* 27: 225-231, 2002.
- 43) C.E. Rube, F. Wilfert, D. Uthe, J. König, L. Liu, A. Schuck, N. Willich, K. Remberger, and C. Rube. "Increased expression of pro-inflammatory cytokines as a cause of lung toxicity after combined treatment with gemcitabine and thoracic irradiation." *Radiotherapy and Oncology* 72: 231-241, 2004.
- 44) M. Akmansu, D. Unsal, H. Bora, and S. Elbeg. "Influence of locoregional radiation treatment on tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in the serum of patients with head and neck cancer." *Cytokine* 31: 41-45, 2005.
- 45) C.E. Rube, F. Wilfert, D. Uthe, K.W. Schmid, R. Knoop, N. Willich, A. Schuck, and C. Rube. "Modulation of radiation-induced tumor necrosis factor α (TNF- α) expression in the lung tissue by pentoxifylline." *Radiotherapy and Oncology* 64: 177-187, 2002.
- 46) A. Grandjean-Laquerriere, R.L. Naour, S.C. Gangloff, and M. Guenounou. "Differential regulation of TNF- α , IL-6 and IL-10 in UVB-irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway." *Cytokine* 23: 138-149, 2003.
- 47) H. Seki, K. Iwai, H. Kanegane, A. Konno, K. Ohta, K. Ohta, A. Yachie, N.

- Taniguchi, and T. Miyawaki. "Differential protective action of cytokines on radiation-induced apoptosis of peripheral lymphocyte subpopulations." *Cellular Immunology* 163: 30-36, 1995.
- 48) F. Legue, N. Guitton, V. Brouazin-Jousseau, S. Collet-Durel, K. Nourgalieva, and C. Chenal. "IL-6 a key cytokine in in vitro and in vivo response of sertoli cells to external gamma irradiation." *CYTOKINE* Vol. 16, No. 6: 232-238, 2001.
- 49) D. Frasca, P. Barattini, G. Tocchi, F. Guidi, S. Scarpasi, L. Guidi, C. Bartoloni, A. Errani, M. Costanzo, and G. Doria. "Modulation of X-ray-induced damage recognition and repair in ageing human peripheral blood mononuclear cells by an interleukin-6-type cytokine." *Mechanisms of Ageing and Development* 121: 5-19, 2000.
- 50) A.V. Der Meeren, C. Squiban, P. Gourmelon, H. Lafont, and M.H. Gaugler. "Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells." *CYTOKINE*, Vol. 11, No. 11: 831-838, 1999.
- 51) H.J. Ross, A.L. Canada, R.J. Antoniono, and J.L. Redpath. "High and low dose rate irradiation have opposing effects on cytokine gene expression in human glioblastoma cell lines." *European journal of cancer*, Vol. 33, No. 1: 144-152, 1997.
- 52) A. Grandjean-Laquerriere, R.L. Naour, S.C. Gangloff, and M. Geunounou. "Contribution of protein kinase C pathways in ultraviolet B-induced IL-8 expression by human keratinocytes." *Cytokine* 29: 197-207, 2005.
- 53) 김정삼. "생쥐에서 키토산올리고당의 감마선조사에 대한 예방 효과." 이학 박사학위논문, 조선대학교, 2003.

