방사선 손상 Balb/C 마우스 모델에서 누에 체액 (Silkworm Hemolymph)의 간조직 보호 효과

남유리[1] · 강정애[1,2] · 노종국[1] · 최미희[1,3] · Hayu Tyas Utami[1,4] · 장범수[1] · 박상현[1,*]

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

Protective Effect of Silkworm Hemolymph against Gamma Irradiation Induced Damage in the Liver of Mice

You Ree Nam[1], Jung Ae Kang[1,2], Jong Kook Rho[1], Mi Hee Choi[1,3], Hayu Tyas Utami[1,4], Beom Su Jang[1] and Sang Hyun Park[1,*]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea*
[2]*Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*
[3]*Department of Food Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*
[4]*Department of Radiation Biotechnology and Applied Radioisotope Science, Korea University of Science and Technology, Daejeon 305-350, Korea*

Abstract - This study was designed to evaluate the protective effect of silkworm hemolymph against γ-irradiation induced damage in the liver of mice. Female Balb/C mice (6 weeks old) were exposed to γ-irradiation (6 Gy) and administered orally to silkworm hemolymph (5 ml kg^{-1} BW) for 7 days post-irradiation. The body weight, spleen index, plasma aspartate transaminase (AST), plasma alanine transaminase (ALT), and liver malondialdehyde (MDA) levels were determined. Compared with irradiated control mice, the activity of plasma AST and the level of MDA were significantly decreased in mice treated silkworm hemolymph. These results show that silkworm hemolymph is found to have a protective effect against γ-irradiation induced damage in mice.

Key words : Gamma irradiation, Silkworm hemolymph, Balb/C mice, Liver tissue, Radioprotection

서 론

누에 (*Bombyx mori* L.)는 누에나방과에 속하는 유충으로서 《신농본초경 (神農本草經)》에 기록되어 있으며, 누에 분말은 당뇨병 환자에게 민간요법으로 널리 쓰이고 있다 (최 등 2000). 동물실험 및 임상시험 결과 누에분말은 장내 α-glucosidase 활성을 억제하여 혈당강하 효능이 있으며 간염 및 간경화 완화, 활성산소 생성 억제 및 제거효소의 활성을 증가 시키는 것으로 알려져 있다 (Chung *et al*. 1996; Shiomi *et al*. 1998; 최 등 2000). 누에 분말에 대한 연구뿐만 아니라 누에 고치의 가수분해물인 피브로인 및 실크 세리신은 간 조직에서 활성산소 억제, 항당뇨,

* Corresponding author: Sang Hyun Park, Tel. +82-63-570-3370, Fax. +82-63-570-3371, E-mail. parksh@kaeri.re.kr

혈중 콜레스테롤 저하, 알코올분해 기능 등 다양한 효능이 보고되고 있다(Sugiyama *et al*. 1985; 최 등 2000; 이 등 2002). 특히 누에 체액에 함유된 플라즈마 단백질은 다양한 화학물질들에 의한 세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제함으로서 세포의 수명을 연장시키는 것으로 보고되고 있다(Wyatt 1956; Wyatt *et al*. 1956; Kim *et al*. 2003).

최근 산업과 현대의학이 발전함에 따라 방사선 및 방사성 동위원소는 광범위하게 이용되고 있으며, 국민의 소득증가와 더불어 개인의 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 방사선의 의학적 이용도 더불어 증가되고 있다. 특히 방사선 및 방사성 동위원소는 의료분야에서 질병의 진단 및 치료에 많이 활용되고 있어 환자 및 방사선 작업종사자의 건강에 영향을 미칠 수 있다(이 등 2009). 방사선은 체내의 reactive oxygen species (ROS)를 증가시키며, ROS의 증가로 인해 DNA, 단백질 및 세포막의 손상을 초래하며, 조혈시스템에도 영향을 끼친다(Davles *et al*. 1982; Hosseinimehr 2007). 따라서 방사선 방호제의 연구 및 개발이 활발히 진행되고 있으며, 방사선에 의한 생체 손상을 방지하기 위한 방호제로서 WR-2721 (amifostine), WR-638 (aminoethylphosphorothioate) 등의 합성물질들이 개발되어져 있다. 하지만 이들은 독성이 강하고 가격이 고가인 단점이 있어 부작용이 적은 천연소재의 방사선 방호제 개발이 필요하다. 현재 hesperidin, troxerutin 등이 방사선에 의한 간 손상 보호 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Pradeep *et al*. 2008; Ping *et al*. 2012).

본 실험에서는 각종 생리활성 효능이 보고되고 있는 누에 분말 및 누에 고치에 비해 연구가 미미한 누에 체액을 이용하여 방사선 손상 동물 모델에서 간 보호 효능을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 누에 체액

누에는 경상북도 영덕의 태양농장에서 구매하였으며, 누에 체액은 5령 3일 된 누에를 12시간 절식 시킨 뒤 바늘로 배발(腹足)에 상처를 내어 체액을 채취하였다. 채취한 체액은 흑화를 방지하기 위해 60～65°C에서 30분간 가열하였다. 그 후 12,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리 한 뒤 상층액을 취하여 실험에 사용하였다(Ha *et al*. 1996).

2. 실험동물

생후 5주령 Balb/C 마우스 암컷 15마리를 (주)오리엔트(전라북도 익산)에서 구입하여 온도 23±2°C, 습도 50±5%, 12시간 dark/light cycle 조건을 유지한 사육장에서 1주일간 적응시켰으며, 고형 사료와 음용수는 자유로이 공급하였다. 이후 평균 체중이 비슷하게 임의로 5마리씩 3군으로 나누어 사육하였으며 마우스는 정상대조군(NC), 방사선조사대조군(RC), 방사선조사 누에체액투여군(RS)으로 나누었다. 본 실험은 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다.

3. 방사선 조사 및 시료 투여

방사선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 Gammacell 40 Exactor (MDS Nordion, Canada)를 이용하여 1.1 Gy min^{-1}의 선량율로 조사하였다. 실험동물의 간 손상을 주기 위하여 정상대조군(NC)을 제외한 두 군의 Balb/C 마우스를 아크릴 상자에 넣고 6 Gy의 감마선을 전신 조사하였다(Ping *et al*. 2012). 감마선 조사 1시간 뒤 정상대조군과 방사선대조군은 생리식염수, 방사선조사 누에체액투여군은 누에 체액을 체중 kg 당 5 ml을 경구투여 하였다. 누에 체액과 생리식염수는 1일 1회씩 7일 동안 투여 하였으며 마지막 투여 1시간 뒤에 희생하였다. 모든 실험동물은 희생 전 12시간 이상 절식 시켰다.

4. 실험동물 희생 및 시료 처리

혈액은 실험 물질의 마지막 경구 투여 1시간 후 isoflurane으로 전신 흡입 마취 시킨 뒤 개복하여 후대정맥에서 채혈한 다음 heparin 처리된 튜브에 채취하였다. 튜브는 5,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 뒤 상층액인 혈장을 실험에 사용하였다. 개복한 실험동물에서 간과 비장을 채취하여 생리식염수로 세척한 후 흡습지로 혈액을 제거한 다음 무게를 측정하였다. 채취한 간조직의 일부분은 PBS를 넣고 homogenizer를 이용하여 균질화한 후 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 지질과산화 분석에 사용하였다.

5. 조직 및 혈액의 생화학 분석

혈액의 aspartate transaminase (AST)와 alanine transaminase (ALT)는 Bergmeye (1978)의 방법에 따라 측정하였다. 간 조직의 지질과산화 실험은 MDA Quantitation kit 시약(Cell Biolabs, USA)을 사용하여 측정하였으며, MDA 함량은 단백질 mg 당 μmole로 표시하였다. 간 조직의 단백질 함량 측정은 Bradford (1976) 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로 사용하여 측정하였다. 비장 지수(spleen index)는 비장 무게를 체중으로 나

Table 1. Effect of silkworm hemolymph treatment on spleen index and body weight of mice exposed to γ-irradiation

Group[a)]	Spleen index[b)]	Body weight (g)
NC	0.40±0.06*	17.94±0.83
RC	0.12±0.01	16.64±0.72
RS	0.12±0.01	17.64±0.79

The results are Mean±SD for 5 mice in each group.
*$p<0.05$, compared with RC.
[a)]NC: Control mice administered with the vehicle alone.
RC: Mice exposed to γ-irradiation and treated with vehicle.
RS: Mice exposed to γ-irradiation and treated with 5 ml kg^{-1} BW of silkworm hemolymph.
[b)]Spleen index: (spleen weight/body weight)×100.

누어 계산한 값을 표기하였다.

6. 통계처리

실험결과는 SPSS/Windows 18.0을 이용하여 통계처리하였으며, 평균치와 표준편차(Mean±SD)를 구하였다. 세 군 간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실행 한 후, Duncan's multiple range test로 변인간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은 $\alpha=0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 논의

1. 비장 지수 및 체중

Balb/C 마우스를 감마선조사 후에 누에 체액을 7일간 투여한 뒤 장 지수 및 체중을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 비장 지수는 방사선조사대조군(RC)과 누에체액투여군(RS)에서 유의적인 차이는 없었지만 정상대조군(NC)과 비교하여 큰 차이가 나타났다. 비장과 같은 재생조직은 방사선에 의한 생체손상이 민감하게 나타난다(Hendry *et al*. 1992). 실험 결과 방사선으로 인한 비장 조직의 손상이 나타났음을 확인하였다. 체중은 세 군에서 통계학적 유의성은 보이지 않았지만 누에체액투여군(RS)이 방사선조사대조군(RC)에 비하여 체중이 증가하는 경향성이 나타났다.

2. 혈장 aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) 분석

방사선 조사 후 누에 체액을 투여한 마우스의 혈장 AST, ALT 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 측정 결과 ALT는 통계학적 유의성이 나타나지 않았다. 하지만 AST는 방사선조사대조군(RC)과 비교하여 정상대조군(NC), 누에체액투여군(RS)이 유의적으로 감소되었음을

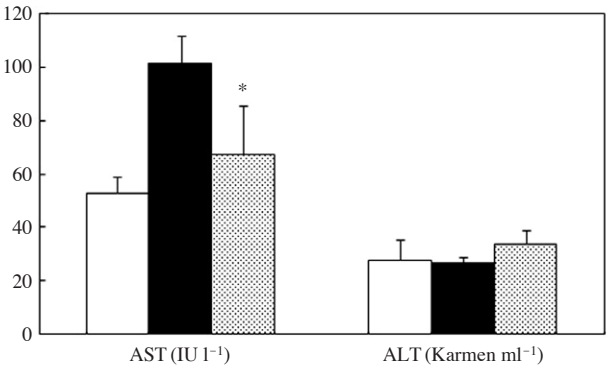

Fig. 1. Effect of silkworm hemolymph on the level of AST and ALT in the plasma of mice exposed to γ-irradiation. The results are expressed as Mean±SD for five mice in each group. □ Control mice administered with the vehicle alone (NC). ■ Mice exposed to γ-irradiation and treated with vehicle (RC). ▨ Mice exposed to γ-irradiation and treated with 5 ml kg^{-1} BW of silkworm hemolymph (RS). *$p<0.05$, compared with RC.

Table 2. Effect of silkworm hemolymph treatment on the level of MDA in the liver tissue of mice exposed to γ-irradiation

Group[a)]	MDA (μmole/mg perotein)
NC	33.21±7.02
RC	39.64±7.95
RS	25.27±1.70*

The results are Mean±SD for 5 mice in each group.
*$p<0.05$, compared with RC.
[a)]NC: Control mice administered with the vehicle alone.
RC: Mice exposed to γ-irradiation and treated with vehicle.
RS: Mice exposed to γ-irradiation and treated with 5 ml kg^{-1} BW of silkworm hemolymph.

볼 수 있다. AST와 ALT의 증가는 간세포의 파괴 정도를 반영하는 지표로 알려져 있다(Hsu *et al*. 1990; Ohta *et al*. 1990). AST는 amino acid와 α-keto acid 간의 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소로서 간 등에 많이 분포되어 있으며, 특히 급성간염의 경우 혈중에서 급격한 상승이 나타난다. 본 실험에서 방사선조사대조군(RC)의 AST가 유의한 증가를 보이므로 간 손상이 있음을 확인할 수 있었다. 누에체액투여군(RS)이 방사선조사대조군(RC)에 비하여 AST가 유의적인 감소를 보이므로 누에체액이 방사선에 의한 산화성 간세포 손상에 대한 방호효과가 있는 것으로 사료된다.

3. 간 조직의 malondialdehyde (MDA) 분석

간 조직에 있어서 MDA 함량은 Table 2와 같다. 지질과산화 정도를 나타내는 지표인 MDA의 경우 누에체액투여군(RS)이 방사선조사대조군(RC)보다 유의하게 낮았다. 이와 같은 결과는 누에 체액이 간 조직의 지질과

산화를 억제 시켰을 것이라 사료됨으로 방사선에 의한 간 손상을 경감시킨 것으로 판단된다.

결 론

방사선에 의한 간 손상 실험동물 모델에서 누에체액의 간 조직 보호 효능을 알아보기 위하여 6주령 된 Balb/C 마우스를 6 Gy로 감마선을 조사한 후에 누에체액을 체중 당 5 ml씩 7일 동안 경구 투여하였다. 그 결과 혈장의 AST와 간 조직의 MDA가 방사선조사대조군(RC)과 비교하여 통계학적 유의성이 나타났다. 이상의 실험 결과를 종합해 볼 때 누에체액은 6 Gy의 방사선을 조사한 마우스에서 간세포 손상보호에 효과가 있음을 확인하였다. 추후 누에체액이 조혈면역계에 미치는 영향 연구로 확대하여 방사선 방호제로서의 효능을 심도 있게 평가하고자 한다.

사 사

이 연구는 한국연구재단(2012M2A2A6011335)에서 시행하는 방사선기술개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

이두용, 김광진, 박희찬. 2009. 방사선 및 방사성동위원소 근로자 피폭실태. 한국콘텐츠학회논문지. **9**(6):247-255.

이성희, 조병남, 현창기, 주상섭. 2002. 실크 펩타이드의 생리기능적 특징; 항산화 효과 및 면역 기능을 중심으로. 식품과학과 산업. **35**(4):57-62.

최진호, 김대익, 박수현, 김정민, 조원기, 이광길, 여주홍, 이용우. 2000. 간장조직의 활성산소 및 그 제거효소에 미치는 실크 피브로인의 영향. 생명과학회지. **10**(6):577-583.

최진호, 김대익, 박수현, 김정민, 조원기, 이희삼, 류강선. 2000. 간장조직의 활성산소 및 그 제거효소에 미치는 누에(*Bombyx mori* L.) 분말의 영향. 생명과학회지. **10**(4):347-353.

Bergmeyer HU, Scheibe P and Wahlefeld AW. 1978. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* **24**:58-61.

Chung SH, Yu JH and Kang PD. 1996. Blood glucose lowering effect of silkworm. *Bull K.H. Pharma Sci.* **24**:95-100.

Davles KIA, Quintanilha AT, Brooks GA and Packer L. 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**:1198-1205.

Ha SH, Park TH and Kim SE. 1996. Silkworm Hemolymph as a substitute for fetal bovine serum in insect cell culture. *Biotechnol. Tech.* **10**:401-406.

Hendry JH, Roberts SA and Potten CS. 1992. The clonogencontent of murine intestinal crypts: dependence on radiation dose used in its determination. *Radiat. Res.* **132**:115-119.

Hosseinimehr SJ. 2007. Foundation review: Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discovery Today* **12**:794-805.

Hsu HY, Lian SL and Lin CC. 1990. Radioprotective effect of Ganoderma lucidum (*Leyss. ex.* Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice. *Am. J. Chin. Med.* **18**:61-69.

Kim EJ, Park HJ and Park TH. 2003. Inhibition of human cell apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph. *Biophys. Biochem. Res. Commu.* **308**:523-528.

Ohta S, Sakurai N, Sato Y, Inoue T and Shinoda M. 1990. Studies on chemical protectors against radiation X Radiotective substances of cnidii rhizoma. *Yakugaku Zasshi.* **110**(10): 746-754.

Ping X, Junqing J, Junfeng J and Enjin J. 2012. Radioprotective effects of troxerutin against gamma irradiation in mice live. *Int. J. Radiat. Biol.* **88**(8):607-612.

Pradeep K, Park SH and Ko GC. 2008. Hesperidin a flavanoglycone protects against gamma irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in sprague-Dawley rats. *Eur. J. Pharmacol.* **587**(1-3):273-280.

Shiomi SD, Habu D, Takeda T and Nishiguchi S. 1998. Significance of peptidoglycan in patients wigh chronic liver diseases. *J. New Remedies & Clinics* **47**:32-37.

Sugiyama K, Kuchima Y and Muramatsu K. 1985. Effect of sulfur containing amino acid and glycine on plasma cholesterol level in rats fed on a high cholesterol diet. *Argic. Bio. Chem.* **49**:3455-3461.

Waytt SS. 1956. Culture in vitro of tissue from the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Gen. Physiol.* **39**(6):841-852.

Wyatt GR, Loughheed TC and Wyatt SS. 1956. The chemistry of insect hemolymph; Organic components of the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, and two other species. *J. Gen. Physiol.* **39**(6):853-868.

Manuscript Received: April 29, 2014
Revised: May 14, 2014
Revision Accepted: May 19, 2014