

키토산의 방사선 저항 효과에 관한 연구

ABSTRACT

Effect of Radiation Resistance by Chitosan through Micronuclei Test after X-ray Irradiation

Dept. of Radiological technology, Mokpo Science College.

Kim, Jung-Sam

As the radiation is widely used in atomic power generation and medical parts. If it was not very carefully treated, Especially, to consideration of the perspicacity ability of radiation or radionuclide will be caused cytogenetic damages. To evaluation of mutagenicity by X-ray induced were often used chromosome aberration(CA), sister chromatid exchange(SCE), and micronuclei test which takes less time, and less cost in getting an exact result, is also generalized. Chitosan, a natural nontoxic chelator, was reported to reduce whole body retention of radiostrontium in mice. And, chitosan was effected elevated immune functions.

The purpose of this study, we are investigated to radiation resistance of chitosan after X-ray irradiation. In case of control group, the mice bone marrow cells were extracted from femur after X-ray irradiation. In experimental group, the mice were irradiated by X-ray irradiator after the feeding of chitosan solutions(1%) for sixty days(by per oral). Gamma dose was used from 1 to 5 Gy by Cs-137 gamma irradiator(central dose rate = 654Gy/h, Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada). The comparison of frequencies micronuclei was each groups.

Chitosan groups were not different with control group from 1 to 3 Gy. But, in case of from 4 to 5 Gy, chitosan groups were significantly decreased micronuclei numbers compared to control group($p < 0.05$).

We conclude that chitosan has a radiation resistance.

I 서론

방사선이 원자력산업과 의료기관 등에서 광범위하게 사용됨에 따라 인류에 대한 방사선의 직, 간접적인 피폭이 날로 증가되고 있다. Bergonie-Tribondeau의 법칙에 의하면 그 세포의 신생능력이 크면 클수록, 세포의 분열과정이 길면 길수록, 형태적, 기능적 분화의 정도가 낮을수록, 유약세포일수록 방사선 감수성은 높으므로, 생식조직이나 조혈조직이 방사선에 대해 가장 민감하다¹⁾. 핵무기를 이용한 핵실험, 핵발전소의 건설 등으로 인해 안전성에 주의를 하지 않을 경우 방사능 물질이 다량 방출되어 인류 및 환경에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 특히, 이러한 방사핵종들은 그 자체가 지닌 생물학적 특성인 반감기로 인하여 오랜 동안 인체내의 장기속에 잔존하면서 심각한 피해를 입힌다²⁾.

각종의 세포유전학적 독성을 평가하는데는 meta-phase analysis, sister chromatid exchange(SCE)등이 많이 사용되었으나, 요즘에는 시간의 소모가 적게 들면서 비용이 절약되면서 간편하게 정확한 결과를 도출시킬 수 있는 방법 중의 하나인 미소핵 검사도 널리 보편화되어 있다. 미소핵이란(micronucleus), 세포가 분열하는 동안 낭핵으로 흡수되지 못한 중심체가 없는 염색체 단편이나 염색체 분열의 역기능 산물을 일컫는 말로써 어떤 독성 물질이나 방사선 등에 의해 염색체가 손상되었을 경우 염색시 주홍빛 또는 검정빛의 원형의 작은 점으로 일반적으로 적혈구의 비해 직경이 1/20 또는 1/50의 구형으로 관찰이 된다³⁾. 미소핵검사(micronuclei test)는 1973년에 최초로 도입된 유전독성 검사 방법으로 마우스 골수(bone marrow)를 채취하여 도말한 후 다염성적혈구(PCE)를 측정하면서부터 널리 이용되어지고 있다⁴⁾. 인체의 경우는 말초혈액을 이용하여 세포질이 보존된 상태로 미소핵을 관찰하였으며⁵⁾, 그 후 세포의 종류, 각종 약제의 농도, 처리 시간 및 방사선조사 선량 등을 각기 달리하는 방법들이 개발되어 있다⁶⁾. 미소핵은 골수, 말초혈액, 체세포 조직 등 분화하는 세포 어느 곳에서도 관찰이 가능하지만, 그 중 적혈구가 핵을 가지고 있지 않으므로 관찰이 쉬어 많이 사용되고 있다. 적혈구에서 미소핵은 May-Grünwald Giemsa stain에 의해 미성숙 적혈구인 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 성숙한 적혈구인 정염성 적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)로

구분할 수 있다. 다염성 적혈구는 세포질 안에 RNA가 많은 양으로 존재하여 염색시 주홍빛으로 나타나며, 정염성 적혈구는 다염성 적혈구보다 소량의 RNA가 존재하여 노랑빛으로 염색이 되어 이를 쉽게 구분할 수 있는데, 일반적으로 다염성 적혈구의 출현 빈도수가 정염성 적혈구보다 높게 나타난다. 본 실험에서 적용한 골수도말법은 특별히 자동화된 시스템이 없어도 실험을 진행할 수 있다는 장점을 가지고 있는 방법 중의 하나이다.⁷⁾ 특히, Ogawa 등⁸⁾은 mitomycin C(MMC), caffeine, colcemid 등을 각각 CHL(chinese hamster fibroblast cell line)에 농도별로 투여한 후 염색체 변이와 미소핵의 변화를 관찰하였는데, MMC와 caffeine의 경우는 농도가 증가할수록 염색체 변이와 미소핵의 발생 빈도가 증가하였으나, colcemid의 경우는 이러한 현상이 발생하지 않음을 보고하여 현재 염색체 변이 및 미소핵 검사시 colcemid를 많이 사용하고 있다.

키틴은 셀룰로스와 유사한 화학구조를 가지고 있으며 환경중에 널리 분포되어 생물체에 의해 연간 1,000억 톤 이상이 생성되며 N-acetyl-D-glucosamine β 1 \rightarrow 4 결합에 의해 이루어진 다당류의 일종으로서 사상균, 효모, 오징어, 동물성 플랑크톤, 개, 새우 및 곤충 등의 균류 및 갑각류에 많이 분포되어 있다. 키토산은 키틴의 탈아세틸화 반응을 통해 유도된 물질로 2-amino-2-deoxy-D-glucose의 단위로 금속이온과 키토산 사이에 2당 잔기당 1개의 아미노기에 1개의 금속 양이온과 2개의 음이온과 1개의 물분자가 배치된 착화모형을 나타내며⁸⁾ 이러한 착화제 특성으로 인하여 2가 양이온을 흡착하는 성질이 있어 중금속 및 방사성동위원소 등의 흡착제로서 많이 작용한다⁹⁾. 최근의 연구를 통해 보면 천연무독성 다당류인 키토산이 체내 투여된 방사성 스트론튬 제거에 탁월한 효과가 있으며¹⁰⁾, Wykoff 등¹¹⁾은 수용성 키토산이 생쥐 체내에 오염된 방사성스트론튬 (⁸⁵Sr)을 제거하는데 큰 효과가 있음을 보고한 바 있다. 키토산은 다른 glycosaminoglycans, 예를 들어 N-acetyl-D-mannosamine이나 N-acetyl-D-galactosamine등이 NO 생산에 효과가 없는 반면, 특이하게 대식세포의 NO 생산과 주화성을 자극하는 효과를 가지고 있어서 면역에 관여하는 것으로 보고된 바 있다¹²⁾ 또한, 키토산, cellulose, pectin등을 랫트에 2주간 복용시킨 후 면역인자를 측정하였는데 IgE의 수치가 다른 것에 비해 높게 나옴이 보고된 바 있다¹³⁾.

본 연구에서는 면역 기능의 빠른 회복 및 촉진 기능

을 가지고 있다고 보고된 천연무독성 성분인 키토산을 이용하여 방사선에 조사된 마우스의 골수세포를 채취한 후 미소핵 검사를 통해 키토산이 방사선에 대해 저항성을 가지고 있음을 확인해 보고자 연구를 시행하였다.

II 재료 및 방법

1. 실험동물 및 방사선 조사

실험동물로는 삼육축산에서 생산, 공급하고 있는 ICR 계 수컷(체중 25~35g, 8~10주령)을 사용하였다. 생쥐는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $45 \pm 5\%$ 로 유지된 사육실에서 폴리 카보네이트로 제작된 사육장($40 \times 25 \times 17\text{cm}$)에서 사육하였다. 키토산은 수용성키토산 5%를 방사선 조사 60일 전부터 일반 분말 사료와 혼합시킨 후 *ad libitum*으로 공급하였다.

실험군은 1) 방사선 조사 후 일반 식이를 공급한 대조군, 2) 키토산을 60일간 공급한 실험군으로 각 실험군당 20마리의 생쥐를 사용하였다.

방사선은 Cs-137 감마선조사기(central dose rate = 654Gy/h, Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 사용하여 1-5 Gy를 조사하였다.

2. 미소핵 검사(micronucleus assay)

생쥐를 해부판 위에 고정시킨 후 양쪽 대퇴부 부위를 절단하여 우태아혈청(fetal bovine serum, 이하 FBS)이 들어 있는 1ml용 주사기를 한쪽 끝에 넣어 골수를 밀어내어 12ml짜리 원심분리용 시험관에 골수를 모은 다음 1000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 침전된 골수만을 잘 혼합하였다. 슬라이드 위에 골수세포를 한 방울 떨어뜨린 후 다른 슬라이드를 45도 각도로 세워 적당한 힘으로 도말하여 24시간 공기 건조하였다. 표본염색은 wright 용액에 3분, 동적의 완충액 용액에 5분 염색한 후 공기 건조하여 1,000배 광학현미경하에서 1,000개의 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte, 이하 PCE)에 존재하는 미소핵을 각각 계수하였다. 미소핵의 판정기준은 Countryman과 Heddle의 것을 따랐으며, 그 기준은 다음과 같다. 첫째, 직경이 주핵(main nucleus)의 1/3 이하이고 둘째, 염색상이 주핵과 동일해야 하며 셋째, 세포질 내에 위치해야 한다.

3. 통계처리

실험군간의 통계학적 유의성은 개인용 컴퓨터의 SAS 통계프로그램을 사용하여 Anova test 및 t-test에 의해서 검정하였으며, 각 P값은 0.05 미만의 것을 유의한 수준으로 처리하였다.

III 결과

각 선량별 방사선을 조사한 후 일반 식이를 공급한 대조군과 키토산을 방사선 조사 60일 전부터 선처치한 군과의 방사선 조사 후 미소핵의 변화를 Table 1에 나타내었다. 1Gy의 선량을 조사한 경우 대조군은 0.93 ± 0.04 , 키토산 처리군은 1.11 ± 0.07 , 2Gy의 경우 대조군 1.42 ± 0.43 , 키토산 처리군 1.20 ± 0.10 , 3Gy의 경우 대조군 3.60 ± 0.28 , 키토산 처리군 3.27 ± 0.16 등이 관찰되어 대조군과 키토산 처리군 사이에 특별한 차이점을 발견하지 못하였다. 하지만, 4Gy의 경우 대조군 6.30 ± 0.24 , 키토산 처리군 5.0 ± 0.23 , 5Gy의 경우 대조군 7.18 ± 0.21 , 키토산 처리군 5.63 ± 0.12 등이 관찰되어 대조군에 비해 키토산 처리군이 유의성이 있음을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

Table 1. Comparison with frequencies of micronuclei(MN) in irradiated mice at each doses.

Dose (Gy)	1	2	3	4	5
Control	0.93 ± 0.04	1.42 ± 0.43	3.6 ± 0.28	6.3 ± 0.24	7.18 ± 0.21
Chitosan	1.11 ± 0.07	1.20 ± 0.10	3.27 ± 0.16	$5.0 \pm 0.23^*$	$5.63 \pm 0.12^*$

* $p < 0.05$ as compared with control

IV 고찰 및 결론

핵무기를 이용한 핵실험, 핵발전소의 건설 등으로 인해 안전성에 주의를 하지 않을 경우 방사능 물질이 다량 방출되어 인류 및 환경에 심각한 영향을 미칠 수 있다. 핵 사고시 외부 환경 중으로 다량이 방출되는 방사

핵종으로는 근육에 침착되어 근육종을 유발시키는 Ra-
diocesium(¹³⁷Cs), 대부분 갑상선에 흡수되어 갑상선암
을 유발시키는 Radioiodine(¹³¹I), 흡수선량의 대부분이
골조직 등에 침착되어 백혈구 감소증, 백혈병, 골수암
등을 유발시키는 Radiostrontium(⁹⁰Sr) 등이 있다. 특
히, 이러한 방사핵종들은 그 자체가 지닌 생물학적 특
성인 반감기로 인하여 오랫동안 인체내의 장기속에 잔
존하면서 심각한 피해를 입힌다. 그 예로, 1986년의 구
소련 체르노빌 핵발전소의 사고로 인해 체르노빌 거주
민뿐만 아니라 그 인근 주변의 사람들에게까지 핵사고
휴유증을 유발시켰으며¹⁴⁾, 주변 환경이 심각히 오염되
어 현재까지도 사고에 대한 경각심을 크게 부각시키고
있다.

방사성 스트론튬(Radiostrontium)은 방사선 사고시
외부 환경으로 방출되는 방사핵종(Radionucleis)중의
하나로 생물학적인 관점에서 볼 때 인체 오염시 골조직
에 흡수량의 대부분이 흡착되어 암, 백혈구감소증, 백혈
병 등의 치명적인 질병 등을 유발시키는 가장 독성이 강
한 핵분열 생성물 중의 하나로 간주되어 대사과정 및 제
거에 주의가 집중되어 왔다. ICRP의 보고에 의하면,
순환혈액 중 스트론튬이 약 180 μ g정도 존재하여 골형
성 과정에 관여한다고 보고하였으며, 방사성스트론튬은
태반을 잘 통과하여 임신 중인 모체에 오염되는 경우 배
발생과정이나 태아에 대한 오염은 피할 수 없게 된다.
한편, 방사성스트론튬 및 기타 다른 방사독소(Radio-
toxin)등의 제거를 위해서 EDTA, DTPA, PDAT-Na,
PDTA-Ca-Na, Sodium tetra-methylene diamine-
tetraacetate, Sodium thioctate 등의 화학적 착화제
를 이용한 연구가 진행되어 동물실험 결과 유효한 치료
약제로 평가되었지만, 이들 화학적착화제는 자체가 지
닌 독성으로 인하여 핵사고시 실제로 임상에 사용하기
에는 연구 단계에 있으며, 특히 임신한 여성의 경우 치
명적인 독성을 입게되므로 태아를 고려하여 약품을 복
용할 수 없으므로 많은 문제가 야기될 수 있다. 그러므
로 안정성이 높은 무독성 천연 착화제의 개발이 시급하
다고 할 수 있다.

카이틴(Chitin)은 셀룰로스(Cellulose)와 유사한 화학
구조를 가지고 있으며 환경 중에 널리 분포되어 있어
최근 국내·외 학자들에 의해서 분자생물학, 식품영양
학, 생화학, 생리학, 생명공학적인 면에서 연구가 진행
중이며, 일본 등지에서는 인공 피부, 카이틴 분해효소
및 식물세포의 활성화제, 화장품, 혈중 콜레스테롤 강

화제, 의약품 전달제, 면역보조제등 여러 분야에 걸쳐
활발하게 이용 혹은 연구되고 있다⁶⁾.

본 연구에서는 키토산이 방사선에 저항성을 가지고
있는 지 여부를 관찰하기 위하여 마우스에 방사선 조사
전에 키토산을 60일간 분말 형태로 선처리하고 방사선
을 조사시킨 후 미소핵을 검사하였다. 키토산을 처리하
지 않은 대조군에 비해 키토산을 선처리한 경우 방사선
에 의한 미소핵 생성 감소 효과를 관찰할 수 있었다.

방사선에 의해 손상을 받은 염색체는 핵분열 시 방추
체에 의해 딸 핵으로 끌려가지 못하고 세포분열과정
에서 딸세포들의 어느 한 쪽에 분포하여 하나 또는 여러
개의 작은 핵을 형성하는데 이것이 미소핵이다. 미소핵
은 주로 DNA 함량 측정 실험에 의해 밝혀진 것처럼
acentric fragment로 구성된다. 미소핵은 세포분열에
의해 증식하는 조직의 모든 세포에서 관찰될 수 있는데
특히 골수에서 성숙 도중 주핵이 제거되는 세포인 적혈
구에서 가장 쉽게 관찰할 수 있다. 마우스 골수 적혈구
에서의 미소핵 검사는 Boller, Schmid, Heddle에 의해
제기되었다¹⁴⁾. Heddle¹⁴⁾은 생쥐에 X-ray를 조사시켜
다염성적혈구에서의 미소핵 빈도수를 관찰하였는데, 조
사 12시간 후에 3%의 미소핵이 관찰되었고 24시간 후
에는 6%로 관찰 빈도가 높아졌으나, 48시간 이후로부
터는 점점 감소하였다고 보고하였다. Hirano등¹⁵⁾은 흰
쥐의 신장 세포에 γ -ray를 조사시킨 후 미소핵의 유발
을 시간별 그리고 선량에 따라 관찰한 결과, 48시간부
터 72시간 사이에 12~20%로 가장 많은 미소핵 빈도수
를 나타냈고, 조사선량을 증가시켰을 때 미소핵 빈도수
도 높게 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서도 선량
증가에 따라 대조군 및 실험군 모두 미소핵 빈도수가
증가함을 관찰하여 위 결과와 일치한다고 할 수 있다.
Yamamoto 등¹⁴⁾은 인삼추출물을 경구 투여한 결과 골
수 세포와 적혈구 세포 모두에서 분열하는 세포수가 증
가한다고 보고하였으며, 인삼 추출물의 복강주사 또한
골수 세포에서 DNA, RNA, 단백질, 지질뿐만 아니라
serum albumin과 gamma-globulin의 합성율을 증가
시킨다고 보고하였다. Frissel등¹⁶⁾은 인삼추출물에 의해
혈소판의 수가 대조군보다 4일 먼저 회복되었고, 적혈
구수에 있어서도 회복이 가속됨을 관찰하였고, 방사선
노출 후 이 혈소판의 회복이 골수사로부터의 보호에 있
어 가장 중요한 인자로 추정하였다. Vaney등⁵⁾은 renal
carcinoma cell line을 1~5 Gy 방사선 조사 후 2, 3,
4, 5일 후 수확 후 미소핵을 검사하였는데, 고선량으로

갈수록 미소핵의 수가 증가하였는데, 특히, 3일째 5 Gy에서 최고치를 보이면서 4일, 5일째에 서서히 미소핵의 수가 감소하였다고 보고하였으며, 정상적인 생쥐 골수에서 다염성적혈구의 미소핵 빈도수는 0~5/1,000 PCE의 범위라고 보고하였다. Nishimura등¹⁷⁾은 정상적인 인체 말초혈액을 배양하여 미소핵의 빈도수가 5.0 ± 1.6 의 범위라고 보고하였다.

키토산의 처치가 고선량의 방사선에 노출되었을 경우 방사선저항성을 가짐을 확인 할 수 있었다. 하지만, 저선량에 노출 되었을 경우는 효과가 없는 것이 관찰되었는데, 정확한 이유 및 키토산의 방사선 저항 기전에 관해서는 충분한 연구가 진행되지 않아 고찰에서도 언급이 되지 못하였으나, 분자·생화학적 접근 방법을 통해 연구가 진행되어 진다면 기전을 밝힐 수도 있을 것으로 사료되며 추후 연구시 고려해야 할 점이다.

참고문헌

1. A. Auvinen, M. Hahama, H. Arvela, T. Rahola, and B. Soderman : "Fallout from chernobyl and incidence of childhood leukaemia in Finland", *British Medical Journal*, 309, pp.151-154, (1994).
2. A. Catsch, AE. Harmuth-Hoene and DP. Mellor : *The chelating of heavy metals*, (Pergamon press : 1969), pp.265-281.
3. A. Ortega and M. Gomez, "The removal of strontium from the mouse by chelating agents", *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 18, pp.612-616, (1989).
4. B. Slat and K. Kostial : "Reduction in the absorption and retention of strontium in rats", *Health Physics*, 21, pp.811-814, (1971).
5. B. Vaney, C. Friedli, J. J. Geering, P. Lerch : "Rapid trace determination of radiostrontium in milk and drinking water". *Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 134(1), pp.87-95, (1989).
6. D. Koga : Induction of chitinase for plant self-defense, *Chitin/Chitosan symposium*, Japan, pp.4-26, 1993.
7. D. Laurance, Hall and M. Yalpani : "Enhancement of the metal-chelating properties of chitin and chitosan", *Carbohydrate Res*, 83, C5-C7, (1980).
8. K. Ogawa and K. Oka : "X-ray study of chitosan-transition metal complexes", *Chem. Materials*, pp.726-728, (1993).
9. D. Newton, G. E. Harrison, J. Rundo, C. Kang and A. J. Warner : "Metabolism of Ca and Sr in the late adult life", *Health Physics*, 59(4), pp.433-442, (1990).
10. J. W. Stather, J. D. Harrison and G. M. Kendalls : "Radiation doses to the embryo and fetus following intakes of radionuclides by the mother", *Radiation Protection Dosimetry*, 41(2/4), pp.111-118, (1992).
11. M. H. Wykoff : "Distribution of strontium-85 in conceptuses the pregnant rat", *Radiation Research*, 48, pp.394-401, (1971).
12. K. Shiraishi, K. Yoshimizu, and H. Kawamura : "Daily intake of 11 elements in relation to reference Japanese man", *Health Physics*, 57(4), pp.551-557, (1989).
13. K. K. Turext and J. Laurence Ku : "Strontium content of human bones", *Science*, 124, pp.405-406, (1956).
14. P. A. Sandford : Chitosan Commercial uses and potential applications, in the 4th International Conference on chitin and chitosan, (chitin and chitosan), (1987).
15. S.M. Hirano, K. Iwata, H. Nakayama and H. Toda : "Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbit", *Agric. Biol. Chem*, 55, pp.2623-2625, (1991).
16. M. J. Frissel, R. O. Blaauboer, H. W. Koster, H. P. Leenhouts, J. F. Stoutjesduk and L. H. Vaas : "Radioactive contamination of food and the intake by man", *Radiat. Phys. Chem*, 34(2), pp.327-336, (1989).
17. Y. Nishimura, J. Inaba, K. Watari and N. Matsusaka : "Conceptus uptake the $^{106}\text{RuNO}$ -nitro complex in relation to gestational stages", *Radiation Research*, 31, pp.110-118, (1990).