

감마선에 의한 몽고리안 저빌의 정모세포 및 비장림프구의 DNA 손상  
DNA damage of spermatocytes and splenic lymphocytes  
in Mongolian gerbil by  $\gamma$ -ray

천기정, 김지향, 김진규  
한국 원자력 연구소  
대전시 유성구 덕진동 150번지

요약

감마선은 동물 조직의 손상을 유발한다. 본 연구는 감마선에 의하여 유발되는 정모세포 및 비장 림프구에서의 DNA 손상정도를 규명하고자 시행하였다. 생후 8주령 Mongolian gerbil에 5 Gy 및 10 Gy의 감마선을 전신조사하였다. 조사직후, 7일, 14일에 고환 및 비장을 취하여 각각의 세포를 분리하여 혜성분석(Comet assay)을 실시하였다. 비장의 경우, 5 Gy 방사선 조사직후, 7일 및 14일후의 Tail moment 값은 모두 방사선을 조사치 않은 대조군과 거의 유사한 값을 나타내어 DNA 손상을 나타내지 않았으나 10 Gy를 조사받은 경우에는 조사직후에 Tail moment 값이  $0.42 \pm 0.11$ 로 대조군에서의  $0.22 \pm 0.06$  값보다 다소 높게 나타나 DNA 손상을 받을 수 있었으며 7일 후에는 회복됨을 알 수 있었다. 반면 정모세포의 경우는 5 Gy 및 10 Gy 방사선 조사시 방사선 조사직후 뿐만 아니라 7일 및 14일 후에 모두 방사선을 조사치 않은 대조군과 유사한 값을 나타내어 DNA 손상이 없음을 알 수 있었다. 따라서 정모세포가 비장림프구보다 방사선에 다소 저항성임을 보여주었다.

Abstract

Gamma-ray induces organ damages in animals. The present experiment was designed to study the DNA damage of spermatocytes and splenic lymphocytes in gerbil after irradiation. Eight week old male Mongolian gerbil were  $\gamma$ -irradiated with 5 Gy or 10 Gy. At day 0, 7 and 14, DNA damage in the spermatocytes and splenic lymphocytes were analyzed by Comet assay. Tail moment of DNA in splenic lymphocytes did not change at all days after 5 Gy irradiation. However, 10 Gy irradiation induced significant DNA damage in lymphocytes while the damage recovered at day 7 after irradiation. In addition, spermatocytes DNA at all experimental days until 14 days after irradiation with 5 Gy or 10 Gy did not show any damages. In conclusion, spermatocytes are slightly more radioresistant than splenic lymphocytes.

## 1. 서론

생물체는 방사선을 조사받으면 여러 가지 생물학적 손상을 초래한다. 생물학적 손상을 알기 위해서 널리 조직내의 효소 및 DNA등이 이용되곤 하였다. 오늘날 생물학 및 유전학의 발달로 DNA 손상을 관찰하는데 비교적 간단하면서 정확한 결과를 얻을 수 있는 Comet assay가 널리 이용되어 독성을 나타내는 광범위한 세포 유형의 DNA 손상을 검출할 수 있게 되었다. 이 방법은 주로 *in vitro* irradiation에 의한 DNA 손상을 규명하는데 이용된다. 포유동물 정모세포의 DNA는 체세포에 비해 프로타민(protamine)분자로 결합되어 있어 6배 이상의 콤팩트(compact)한 구조로 이루어져 있어 일반적인 세포 라이시스 프로토콜로는 효과적이지 못한 점이 있으므로 DNA single-strand breaks와 alkali-labile site를 검출하는 알카리성 전기영동 조건에서는 조사하지 않은 정자에서 핵으로부터 DNA migration이 상당히 나타남으로서 정자내 DNA migration은 alkali labile site와 연관이 있으며 이는 상당히 농축된 정자 DNA의 구조와 연관이 있을 것으로 밝혀졌으며 또한 정모세포에서 DNA 손상을 관찰하는데 Comet assay가 새로운 방법이 될 수 있으며 생식독성 실험에 이용될 수 있음을 밝혔다[1]. 한편 이온화 방사선의 이용에 수반되는 생물학적 손상은 DNA나 세포의 거대분자들의 손상과 관련된 자유 래디칼(free radical)에 기인한다[2]. 따라서 본 연구는 *in vivo* 실험으로 방사선을 전신 조사하여 면역세포의 생성에 관여하는 중요 장기인 비장의 splenic lymphocyte와 생식에 관여하는 정모세포(spermatocyte)를 이용하여 방사선에 의한 DNA 손상 정도를 1984년 Ostling과 Johanson에 의해 처음 소개된 Comet assay[2]에 1989년도 Singh에 의해 강알카리 조건으로 변형된 방법[3]을 이용하여 같은 방사선량에서의 두 세포간의 방사선 영향 정도를 파악하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

한국 원자력 연구소에서 생후 8주령 Mongolian gerbil 에 5 Gy 및 10 Gy를 전신 조사( $^{60}\text{Co}$ 선원, 선원강도 : 약 150 TBq, Panoramic Irradiator, AECL )하였다. 조사 직후, 그리고 조사후 7일, 14일에 비장 및 고환을 절제하여 림프구는 Ficoll-histopaque gradient(Pharmacia)를 사용하여 분리하였다. Fig. 1에서와 같이 슬라이드 상에 200  $\mu\text{l}$ 의 1% agarose(Sigma) 로 첫 번째 층을 입힌 다음 고체화시키고 그위에 림프구들을 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 low melting point(LMP) agarose(Sigma)의 최종 농도가 0.5%가 되도록 현탁시키고 100  $\mu\text{l}$ 로 두번째 층을 덮고 고체화 시킨다. 이렇게 구조된 슬라이드는 colding lysis buffer(2.5M NaCl, 100mM EDTA-disodium, 10mM Tris, pH=10, 1% Triton X-100, 10% DMSO)에 최소한 1시간동안 잠기게하여 핵안의 단백질들은 모두 제거하였다. 그후 알카리성 전기영동 용액(0.3M NaOH, 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , pH=13.5)에서 25분간 DNA를 unwinding시켜 supercoiling을 풀어주었다. 그다음 전기영동은 0.75 V/cm, 300 mA로 20분간 수행하였다. 슬라이드를 세척하고 0.4M Tris buffer(pH 7.5)로 중성화한 후 50  $\mu\text{l}$ 의 ethidium bromide(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 염색하였으며 생성된 comet은 CCD camera(Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 광학현미경(Olympus fluorescence microscope, Japan)하에서 excitation filter(515-500 nm)와 barrier filter(590 nm)를 사용하여 400배로 확대하여 검경하고 Image Analysis System Software(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통하여 분석하였다.

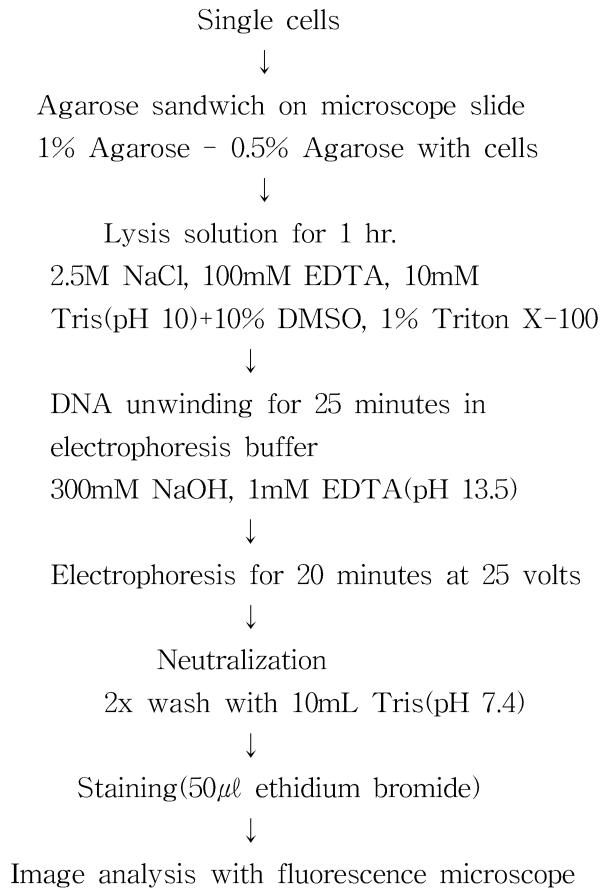


Fig. 1. Flowchart of the protocol for the comet assay.

### 3. 결과 및 고찰

비장은 생체에서 림프조직이 가장 많이 모여있는 기관이고 사람에서는 순환계통(circulatory system)에 있는 가장 큰 림프기관이며 포식세포가 풍부하며 순환하는 혈액(circulating blood)이 이세포들과 밀접하게 연관되어 있기 때문에 혈액으로 침투해 들어온 미생물을 방어하는 중요기관이며 혈액내에 있는 항원에 대해 바로 반응하므로 중요한 항체형성기관(antibody-forming organ)이다[2]. 따라서 비장은 혈액을 면역학적으로 여과하는 기관이라고 할 수 있기 때문에 매우 중요하다. 림프구는 면역체계에서 중요한 역할을 하고 있고 림프구의 산화적 손상은 질병의 발생과 직접적인 관련을 가지고 있을 수 있다[4]. 형성분석에서 정상세포와 손상된 세포간의 형태학적 차이는 현격하여 정상세포인 경우에는 원형인 반면 손상받은 세포에서는 머리와 꼬리로 구성된 혜성(comet)을 나타내므로서 쉽게 구분된다[5,6]. 실험동물 몽고리안 저빌을 이용하여 방사선 조사를 한 후 정모세포와 비장림프구를 분리한 다음 Comet assay를 이용하여 DNA 손상을 관찰한 결과, Table 1, 2 및 3에서와 같이 5 Gy의 방사선 전신조사직후의 Tail moment값은  $0.16 \pm 0.06$ , 대조군은  $0.22 \pm 0.06$ , 7일후에는  $0.25 \pm 0.06$ , 대조군은  $0.21 \pm 0.04$ , 14일 후에는  $0.13 \pm 0.03$ , 대조군은  $0.16 \pm 0.03$ 으로 비장 림프구의 DNA 손상이 나타나지 않았으나 10 Gy 조사직후의 Tail moment 값이  $0.42 \pm 0.11$ 로 대조군인  $0.22 \pm 0.06$ 보다 높게 나타났고 7일후에는  $0.21 \pm 0.03$ , 14일 후

에는  $0.15 \pm 0.03$ 으로 대조군과 거의 유사한 값을 나타내었다. 따라서 5 Gy 방사선 조사에서는 DNA 손상이 없었으나 10 Gy 방사선 조사직후에 DNA 손상이 다소 나타났고 7일후에는 거의 회복되는 것을 알 수 있었다. 또한 정모세포에서는 방사선 전신 조사직후의 Tail moment값이  $0.10 \pm 0.02$ , 대조군은  $0.11 \pm 0.02$ 였으며 7일 후에는  $0.11 \pm 0.02$ , 대조군이  $0.15 \pm 0.02$ 였으며 14일 후에는  $0.18 \pm 0.04$ , 대조군은  $0.14 \pm 0.04$ 였으며 10 Gy를 조사한 경우는 조사직후의 Tail moment 값이  $0.18 \pm 0.04$ , 7일 후에는  $0.2 \pm 0.04$ , 14일 후에는  $0.18 \pm 0.05$ 를 나타내므로서 5 Gy 및 10 Gy에서 모두 DNA 손상을 관찰할 수 없었다. 그러므로 같은 방사선 조사조건에서 전신 조사할 경우에 비장 림프구와 정모세포간의 방사선의 영향은 10 Gy 정도의 방사선 조사에서 비장 림프구에서 다소 손상이 나타남을 알 수 있었다. 고환의 상피는 세르톨리세포(Sertoli cell)인 지지세포(supporting cell)와 정자 발생세포(spermatogenic lineage)로 구성되는데 이들 세포는 여러차례 분열하며 마지막에는 분화하여 정자(spermatozoa)를 형성하게 된다[7]. 고환은 생체에 노출된 기관으로 생체내에 존재하는 다른 기관보다 방사선에 의한 손상이 클 것으로 사료되었으나 본 실험결과, 비장 림프구의 경우 5 Gy에서는 방사선 조사직후 뿐만아니라 7, 14일후에 DNA 손상이 나타나지 않았으나 10 Gy에서는 방사선 조사직후에 약간의 DNA 손상을 나타내었으며 그후에는 DNA 손상이 없으므로 고선량인 10 Gy에서는 방사선 조사직후에 방사선에 의한 생물학적 영향이 있음을 알 수 있었다. 또한 정모세포의 경우에는 5 Gy나 10 Gy에서 모두 방사선 조사직후에도 방사선에 의한 DNA손상이 없음을 나타내므로서 정모세포보다 비장 림프구가 감마선 전신조사시 방사선에 다소 저항성임을 알 수 있었다.

#### 4. 결론

생물체가 방사선을 조사받으면 어떤 경로를 통해서든 생물학적 영향을 초래하므로 방사선 강도에 따라서 다르겠지만 장기에 손상을 유발한다. 비장의 림프구와 고환의 정모세포간의 방사선에 의한 DNA 손상 정도를 Comet assay를 통하여 비교한 결과, 5 Gy에서는 비장 림프구와 고환의 정모세포의 DNA손상이 인지되지 않았으나 10 Gy에서는 비장 림프구의 경우 방사선 조사직후에 다소 DNA 손상을 인지하였으며 7일후에는 회복됨을 나타내어 비장림프구가 고환 정모세포보다 방사선에 다소 약함을 나타내었다.

#### 5. 인용 문헌

1. G. Haines, B. Marples, P. Daniel and I. Morris, " DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay ", Adv. Exp. Med. Biol., 444, 79,(1998).
2. O. Ostling and K. J. Johanson, " Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells ", Biochem. Biophys. Res. Commun., 123, 291,(1984).
3. N. P. Singh, M.T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, " A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells ", Exp. Cell Res., 175, 184,(1988).

4. B. N. Ames, "Micronutrients prevent cancer and delay aging", *Toxicol. Lett.*, 102-103, 5,(1988).
5. W. F. Darly, L. O. Peggy and L. O. Kim, "The comet assay: a comprehensive review", *Mut. Res.*, 339,37,(1995).
6. V. J. McKelvey-Martin, M. H. L. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, M. P. De M대 and A. Collins, " The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review", *Mut. Res.*, 288, 47,(1993).
7. L. C. Junqueira, J. Carneiro and R.O. Kelly, " Basic Histology ", Appleton & Lange,(1992).

Table 1. Tail moment of DNA in splenic lymphocytes and spermatocytes of Mongolian gerbil at day 0 after whole body  $\gamma$  - irradiation with 5 Gy or 10 Gy

Sample	Tail Moment (TM) of DNA		
	Non-irradiated	5 Gy irradiated	10 Gy irradiated
Splenic lymphocytes	0.22 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.11
Spermatocytes	0.11 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.04

This value represents S.D  $\pm$ S.E.

Table 2. Tail moment of DNA in splenic lymphocytes and spermatocytes of Mongolian gerbil at day 7 after whole body  $\gamma$  - irradiation with 5 Gy or 10 Gy

Sample	Tail Moment (TM) of DNA		
	Non-irradiated	5 Gy irradiated	10 Gy irradiated
Splenic lymphocytes	$0.21 \pm 0.04$	$0.25 \pm 0.06$	$0.21 \pm 0.03$
Spermatocytes	$0.15 \pm 0.02$	$0.11 \pm 0.02$	$0.20 \pm 0.04$

This value represents S.D.  $\pm$  S.E.

Table 3. Tail moment of DNA in splenic lymphocytes and spermatocytes of Mongolian gerbil at day 14 after whole body  $\gamma$  - irradiation with 5 Gy or 10 Gy

Sample	Tail Moment (TM) of DNA		
	Non-irradiated	5 Gy irradiated	10 Gy irradiated
Splenic lymphocytes	$0.16 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.03$	$0.15 \pm 0.03$
Spermatocytes	$0.14 \pm 0.04$	$0.18 \pm 0.04$	$0.18 \pm 0.05$

This value represents S.D.  $\pm$  S.E.