2001 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

이온화방사선과 살충제의 상승작용에 의한 사람 림프구 DNA 손상

DNA Damage in Human Lymphocytes due to Synergistic Interaction between Ionizing Radiation and Pesticide

김진규, 이경희, 이병헌, 천기정
한국원자력연구소
대전시 유성구 덕진동 150

요 약

농약사용에 따른 생물학적 위해가 우려되며 농약이 이온화방사선과 같은 물리적 요인과 인체에 상승적으로 작용할 경우 심각한 손상을 유발할 가능성이 있다. 다양한 인자에 의한 DNA 손상을 감지하는데 유용한 단세포 겔 전기영동법을 이용하여 살충제와 방사선에 의한 사람 림프구 DNA 손상을 평가하였다. 각기 다른 농도로 살충제를 10분간 전처리한 림프구와 정상 림프구에 2.0 Gy의 감마선을 조사한 다음 DNA 손상도를 평가하였다. DNA 가닥 절단에 대한 표식인 tail moment의 증가는 감마선에 대해서 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었다. 단세포 겔 전기영동법을 통한 평가결과 권장 사용농도 이상의 살충제는 림프구에 대한 유전독성을 나타내었을 뿐 아니라 방사선과 함께 상승작용을 일으켜 림프구 DNA 손상을 더욱 증가시키는 것이 확인되었다.

Abstract

Biological risks may arise from the possibility of the synergistic interaction between harmful factors such as ionizing radiation and pesticide. The effect of pesticide on radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes was evaluated by the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay. The lymphocytes, with or without pretreatment of the pesticide, were exposed to 2.0 Gy of gamma ray. Significantly increased tail moment, which was a marker of DNA strand breaks in SCGE assay, showed an excellent dose-response relationship. The present study confirms that the pesticide has the cytotoxic effect on lymphocytes and that it interacts synergistically with ionizing radiation on DNA damage, as well.

서 론

생물체가 이온화 방사선에 노출되었을 때 나타나는 생물학적 손상은 DNA나 세포의 거대분자들의 손상과 관련된 자유 라디칼에 기인하며 [1]. 방사선에 의하여 유발되는 DNA의 손상 정도는 방사선 이외의 물리화학적 요인에 의하여 달라지게 된다 [2,3]. 한편, 농업 생산성을 증대시키기 위하여 사용되는 살충제는 생물체에 대한 선택성이 낮기 때문에 포유동물과 사람에 대해서도 강한 독작용을 나타낸다. 사용량의 지속적으로 증가하고 있는 농약의 경우 인체에 대한 위해 요소로서의 위험성이 따라 증가되고 있을 뿐 아니라 농업 재해로 이어질 가능성을 안고 있기 때문에 살충제 사용에 따른 인체 세포의 손상정도를 평가하는 일은 그 의미가 크다.

이온화방사선과 농약 등 생물체에 대한 불리한 요인이 복합적으로 작용하게 되면 상승작용 (synergistic interaction)을 일으켜 각각의 단일 요인에 의한 손상의 합보다 더욱 큰 손상을 나타나는 경우가 많다 [4,5]. 반면, 두 가지 요인이 복합적으로 작용할 때 오히려 선작용 요인에 의한 생물학적 손상을 감소시키는 이른바 길항작용 또는 손상보호작용을 나타나기도 한다. 방사선 지표식물로 알려져 있는 자주달개비의 수술털세포를 이용하여 농업용 살충제와 방사선이 복합적으로 작용했을 때 나타나는 생물학적 영향을 평가한 실험결과에 따르면 권장사용농도의 살충제는 오히려 이 식물계에 있어서 이온화 방사선에 의한 세포유전자 돌연변이율을 감소시키는 효과를 가지고 있는 것으로 나타났다 [6].

사람 림프구는 다양한 물리·화학적 자극에 매우 민감한 세포군으로서 특정물질이나 요인에 의한 인체 손상도를 평가하기 위한 생물말단점으로 DNA가 많이 이용되고 있다. 세포 DNA의 손상도를 가시적으로 평가하기 위한 방법으로 단세포겔전기영동법 (SCGE ; single cell gel electrophoresis)이 있는데 많은 연구보고들이 이 방법을 사용하여 수행된 연구결과일 뿐 만 아니라 새로운 분야에 대한 응용결과도 점차 팽창되고 있다 [7,8,9,10]. SCGE 분석의 장점은 많은 림프구를 필요로 하지 않으며 각각의 세포에서 DNA 손상의 정도를 직접 보여주기 때문에 한 개체군 안의 모든 세포들이 같은 정도의 손상을 받았는지를 설명하는 것이 가능하다. 이러한 특징적 장점들 때문에 SCGE는 다양한 실험조건들 하에서 DNA 손상과 수복을 조사하는데 유용하게 사용되고 있다.

본 연구는 SCGE 붑석법을 이용하여 파리치온이 가지는 세포독성을 평가하고 특히 파라치온이 방사선과 복합적으로 작용하였을 때 나타나는 사람 림프구 DNA 손상에 대한 상승작용을 평가함으로써 환경내 농업재해에 다른 생물학적 위해 정보를 제공하는 한편 재해예방 조치 수립에 기여할 수 있는 실험적 근거 자료를 마련하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

건강한 남자 (28세)의 말초혈액을 채취하였다. Ficoll-Histopaque 1077 (Pharmacia Co.) 200 ㎕ 위에 헤파린이 처리된 혈액 100 ㎕와 10% FBS를 함유한 RPMI 1640 배지 (Sigma Co.) 200 ㎕ 혼합액을 넣고 4℃ 하에서 4분간 원심분리 (400 x g)하여 림프구를 분리하였으며 분리된 ficoll 층을 차거운 PBS 1 ㎖로 세척하였다. 분리된 림프구는 trypan blue exclusion에서 생존률 (95 % 이상)을 확인한 다음 tube당 약 20,000개의 세포로 분주하였다.

살충제의 처리는 상용중인 파라치온 유제 (제일화학)를 구입하여 1 ㎎ ℓ^{-1}를 기준으로 5, 및 10 ㎎ ℓ^{-1} (ppm)로 조제하여 4℃에서 10분간씩 처리하였다.

한국원자력연구소의 코발트 감마선원 (^{60}Co, 선원강도 150 TBq, Panoramic Irradiator, AECL)을 이용하여 4℃에서 림프구 시료에 0~2.0 Gy의 선량을 조사하여 선량반응 관계를 구하였다. 한편 파라치온과 방사선의 synergism을 분석하기 위하여 파라치온 전처리된 림프구 시료에는 2.0 Gy를 조사하였다.

방사선 조사가 끝난 다음 손상된 DNA 분자의 수복을 방지하기 위하여 모든 절차는 4℃ 하에서 이뤄졌다. SCGE 수행을 위한 모든 과정은 김 등 (1999)의 절차 [10]를 따랐다. 전기영동 다음에 슬라이드를 세척하고 0.4 M Tris buffer (pH 7.5)를 몇 방울 처리하여 5분간 중성화하고 다음의 염색 단계를 위해 이 과정을 2번 더 수행하였다. Buffer 제거후 50 ㎕의 ethidium bromide로 염색하였으며 염색결과 생성된 comet을 CCD camera가 부착된 형광현미경 하에서 검경하여 Image Analyzer (Komet 4.0, Kinetic Imaging, Ltd.)로 분석하였다.

결과 및 고찰

림프구의 DNA 손상 정도를 측정하는 것은 일반적으로 체내의 세포 손상을 측정하는 대표적 방법으로 간주되고 있다 [10]. SCGE 분석에서 림프구의 DNA 가닥절단 정도는 정상 세포와 손상 받은 세포의 형태학적으로 현격한 차이를 보인다. 정상적인 세포는 핵체로 생각되는 원형의 양상을 나타내고 손상 받은 세포는 head와 tail로 구성된 혜성 (comet)의 모양을 나타낸다 [11,12]. 실험에 앞서 실시된 분석에서 림프구의 생존률이 95% 이상을 보였다는 점은 혜성분석에서 방사선을 조사하지 않은 림프구의 모양 (intact cell)으로도 간접확인이 가능하였다. SCGE 분석을 행하기 전의 죽은 림프구는 assay 후에 head와 tail이 완전히 구분되어 독특한 apoptotic comet을 나타내기 때문에 쉽게 확인할 수 있다.

단세포 겔 전기영동법을 이용하여 림프구의 DNA 손상을 평가하는 데는 단순히 전기영동후 나타난 DNA 혜성의 tail length를 측정하여 평가 기준으로 삼기도 한다. 그러나 단순 측정된 tail length 만을 사용할 경우 실제 DNA 분자상에 유발된 손상이 지나치게 확대 해석될 수 있는 단점을 안고 있다. 전기영동 후 얻어진 혜성 모양의 DNA 상으로부터 측정한 head, tail 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 tail moment 값을 사용하여 전술한 단점을 보완할 수 있기 때문에 실험결과를 다음과 같이 정의되는 tail moment 값으로 표현하였다.

Tail Moment = | tail mean - head mean | x tail % DNA / 100

여기서, tail mean과 head mean은 각 부위의 염색강도의 평균값.

방사선만을 조사한 경우 림프구 DNA 손상을 지표하는 tail moment 값은 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었다 (Fig. 1). 방사선을 조사하지 않은 대조군 림프구의 tail moment 값은 2.9±0.28이었으나 0.1 Gy 조사군에서 4.1±0.67로 크게 증가하기 시작하여 0.5 Gy 조사군에서는 9.9±0.81, 그리고 2.0 Gy 조사군에서는 15.9±1.73dml 값을 보여 방사선량의 증가에 림프구 DNA의 손상도가 뚜렷하게 증가하는 것을 보여주었다.

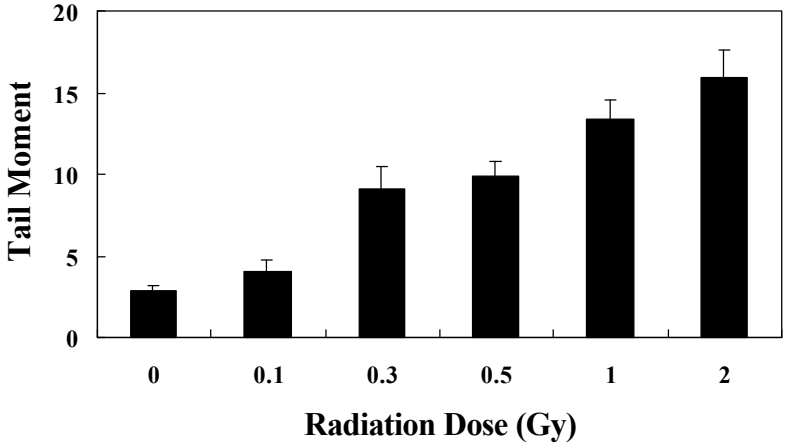

Fig. 1. Dose-response relationship of DNA damage in human lymphocytes exposed to γ-ray doses from 0 to 2.0 Gy. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide).

인체에 있어서 림프구는 방사선에 가장 민감한 세포군 [13]의 하나일 뿐 아니라 방사선 이외의 물리화학적 자극에 의해서도 쉽게 손상 받기 때문에 림프구 DNA는 환경 재해의 생물학적 영향을 파악하는데 매우 유용한 생물말단점인 것이다.

살충제 파라치온이 나타내는 인체독성을 확인하기 위해서 파라치온을 10 분간 처리한 림프구에 대하여 단세포 겔 전기영동을 실시한 다음 DNA 손상도를 평가하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 처리한 파라치온 농도가 높을수록 림프구 DNA에 나타나는 손상도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 저농도인 1 mg ℓ^{-1}인 경우 DNA 손상도는 별로 높지 않았으나 5 mg ℓ^{-1} 이상의 고농도에서는 아주 높은 tail moment 값을 보여 파라치온이 강한 유전독성을 가지고 있음을 나타내었다.

파라치온의 농업 권장 사용농도인 1 mg ℓ^{-1}에서 나타나는 DNA 손상은 대조군에 비해 약간 상승된 값을 보였으나 그 차이가 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 파라치온 1 mg ℓ^{-1} 농도를 전처리한 림프구를 2.0 Gy의 감마선에 노출시켰을 때는 두 가지 요인에 의한 상승작용이 뚜렷하게 나타났다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 DNA 손상도를 나타내는 tail moment 값은 2 Gy의 방사선만을 조사하였을 때 15.0 ±2.27, 파라치온 1 mg ℓ^{-1}만을 처리했을 때 5.3±1.13였으나 두가지 요인이 복합적으로 작용하였을 때는 21.3±2.17로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$).

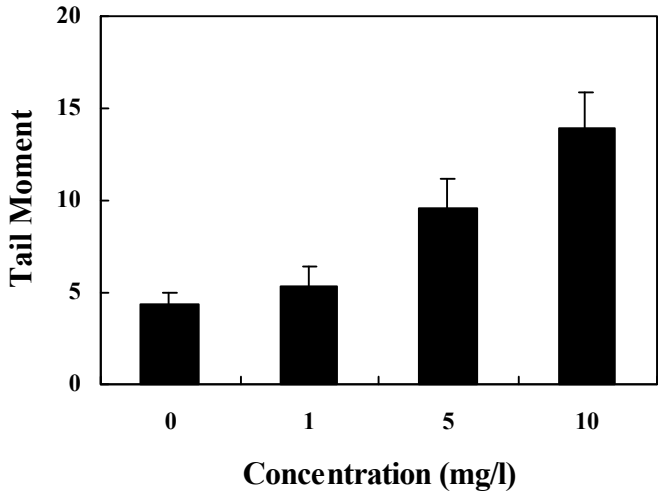

Fig. 2. DNA damage in human lymphocytes treated with various concentrations of parathion. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide).

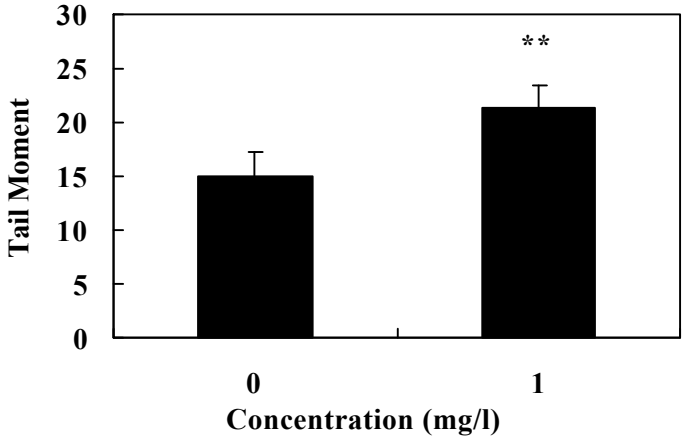

Fig. 3. DNA damage in human lymphocytes exposed to 2 Gy of γ-ray after pretreatment with 1 mg ℓ^{-1} of parathion. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide) (**, $p<0.01$).

권장 사용 농도 이하에서도 파라치온이 방사선과 함께 작용할 경우 synergistic interaction을 통해 뚜렷한 DNA 손상을 초래하게 된다는 것이 실험적으로 입증되었다. 한편, 파라치온의 생물학적 위해도는 평가에 사용된 생물체에 따라 각기 다르게 나타날 수 있다. 자주달개비 *Tradescantia* BNL 4430 식물체의 화서에 1 mg ℓ^{-1} 농도의 파라치온 만을 살포한 경우 수술털세포에 나타난 유전자돌연변이는 자발돌연변이율의 범위에 머무른다. 그러나 1 mg ℓ^{-1}의 파라치온을 24시간 전에 살포한 자주달개비 화서에 방사선을 조사한 경우 방사선 만을 조사한 경우보다 유전자 돌연변이율이 낮게 나타났다 [6]. 이같은 자주달개비세포에서의 방사선 손상 저감효과는 림프구에서 나타난 파라치온과 방사선의 상승작용과는 확연히 다른 결과이다.

방사선이 조사되지 않은 림프구에서 감지되는 tail moment 값은 통상적으로 2~3의 범위를 나타내며 이는 실제로 전기영동 전처리 과정에 기인하는 것과 방사선이 조사되지 않은 대조 림프구가 가지고 있는 DNA 손상의 기저 값을 포함하는 것이다. 지금까지 단세포 겔 전기영동법을 사용하였을 때 사람 림프구 DNA 손상유발 선량의 감지 하한은 연구자에 따라 서로 다르다. Singh *et al.* (1995) [14]은 감마선의 검출하한을 0.001 Gy로 보고하였으며 [14], Plappert (1995)은 X선에 대해서 0.01

Gy의 검출하한 선량을 보고한 바 있다 [15]. 이와 같이 아주 낮은 선량에 의한 DNA 손상을 감지하기 위해서는 다음과 같이 약간의 변형이 필요하다. 첫 번째로 unwinding time을 늘이는 것이다. 20분의 unwinding time에서는 모든 alkali-labile DNA damage가 노출되지 않는다. 그러므로, alkali 처리기간을 증가시킴으로써 alkali-labile lesions의 노출을 강화할 수 있다. 두 번째로 전기영동 시간을 늘이는 것이다. DNA의 이동 거리는 전기영동 시간에 의존적이다. 그러므로, 이러한 두 가지 조건을 적절히 변형시킴으로써 매우 낮은 방사선량에 의해 유도되는 DNA 손상도의 미묘한 증가를 감지할 수 있다. 본 연구에 있어서는 전술한 실험절차의 변형이 없이도 0.1 Gy의 선량에서도 유의한 DNA 손상도 증가를 감지할 수 있는 것으로 나타났으며 이 같은 선량검출에 있어서의 민감도는 사람 림프구가 방사선 사고나 농약사고 등의 환경 재해시 생물학적 위해 정보를 얻을 수 있는 신뢰성있는 생물말단이 될 수 있음을 뜻한다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 원자력중장기연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. B. Holliwell and O. I. Aruome. "DNA-damage by oxygen-derived species". FEBS Lett., 281, 9-19 (1991).
2. A. Cebulska-Wasilewska. "Interaction between radiation and chemical mutagens in the induction of somatic mutations". Nukleonika 33, 137-148 (1988).
3. A. Cebulska-Wasilewska, D. Nowak, W. Niedzwiedz, and D. Anderson. "Correlations between DNA and Cytogenetic Damage Induced after Chemical Treatment and Radiation", Mutat. Res. 421, 83-91 (1988).
4. J. K. Kim, V. G. Petin, and G. P. Zhurakovskaya. "The importance of synergistic interaction at low intensity of harmful environmental agents". Journal of Radiation Research (*in press*) (2001).
5. V. G. Petin, J. K. Kim, G. P. Zhurakovskaya, and A. V. Rassokhina.

"Mathematical description of synergistic interaction of UV-light and hyperthermia for yeast cells", J. Photochem. Photobiol. B:Biology, 55, 74-79 (2000).

6. 김진규, 김원록, 이창주, 장화형, 이영근. "자주달개비 수술털에서 방사선에 의해 유발되는 세포손상에 대한 살충제의 방어효과". 한국환경생물학회지, 17, 21-26 (1999).
7. O. Östling, and K. J. Johanson. "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 123, 291-298 (1994).
8. 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, 184-191 (1988).
9. D. Anderson, T. W. Yu, B. J. Philips, and P. Schmezer. 1994. "The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay". Mut. Res., 307, 261-271 (1994).
10. 김진규, 박태원, 이창주, 채영규. "단세포 겔 전기영동법을 이용한 사람 림프구 DNA 손상에 대한 복숭아씨 추출물의 방사선 방어효과 평가". 대한방사선방어학회지, 24, 93-99 (1999).
11. W. F. Darly, L. O. Peggy, and L. O. Kim. "The comet assay: a comprehensive review", Mut. Res., 339, 37-59 (1995).
12. V. J. McKelvey-Martin, M. H. L. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, M. P. De Meo, and A. Collins. "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review". Mut. Res., 288, 47-63 (1993).
13. 서두환, 김재록, 김진규. "원자력기초이론". 한국원자력연구소, 대전 (1995).
14. N. P. Singh, M. M. Graham, V. Singh, and A. Kahn. 1995. "Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ-rays", Int. J. Radiat. Biol., 68, 563-569 (1995).
15. U. Plappert, K. Raddatz, S. Roth, and T. M. Fliedner. "DNA-damage detection in man after radiation exposure - the comet assay - its possible application for human biomonitoring". Stem Cells, 13, 215-222 (1995).