

소핵형성과 단세포전기영동 분석에서 생약조성물의 방사선에 의한 DNA 상해
방호효과

Protection of DNA by Herb Mixture in HL-60 cells Exposed to γ -rays; Analysed by
Micronuclei Formation and Single Cell Gel Electrophoresis

오현·함연호·조성기*

한국원자력연구소

대전광역시 유성구 덕진동 150

김성호

전남대학교 수의과대학

광주광역시 북구 용봉동 300

요약

방사선에 의한 위장관 및 조혈면역계의 장해를 동시에 극복하기 위하여 당귀(*Angelica gigantis Radix*), 천궁(*Cnidii Rhizoma*), 작약(*Paeonia Radix*) 세 가지 생약재 혼합 추출물(HIM-I)을 제조하였다. 본 실험에서는 HIM-I과 열수추출물에 20%의 조다당분획을 가하여 제조한 조성물 P.P-I의 방사선에 의한 DNA 상해 방호효과를 소핵형성실험과 단세포전기영동법으로 검정하였다. 소핵형성실험에서 조사 전 4시간 시료처리군의 경우 열수추출물, 조다당분획, 메탄올분획, 에탄올분획 및 P.P-I이 모두 유의성있는 소핵 형성 억제효과를 나타냈으며($p < 0.05$), 조사 전 2시간부터 조사 후 2시간까지 시료처리군에서는 에탄올분획을 제외한 모든 분획이 방사선에 의한 소핵 형성을 억제하였다($p < 0.05$). 단세포전기영동법에서는 열수추출물, 조다당분획, 메탄올분획 및 P.P-I이 각 선량에서 DNA 손상을 억제하였다($p < 0.01$). 이상의 결과로 볼 때 HIM-I과 P.P-I은 방사선에 의한 DNA 상해를 효과적으로 방호하였으며 독성이 적은 천연물이라는 관점에서 유효성분과 작용기작이 밝혀진다면 방사선 방호제로 적용 가능할 것으로 사료된다.

Abstract

A herb mixture(*Paeonia Radix*, *Cnidii Rhizoma* and *Angelica gigantis Radix*; HIM-I) was designed to protect gastrointestinal, hematopoietic organs and immune system against radiation damage. In the present study, the protective effect of HIM-I and P.P-I (water extract of HIM-I added with 20% of its polysaccharide fraction) on DNA damage in HL-60 cells exposed to ^{60}Co γ -rays was evaluated using micronuclei formation and alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). The frequency of micronuclei was decreased in groups treated with water extract, methanol fraction, polysaccharide fraction and P.P-I before exposure to 200 cGy of γ -rays. In alkaline single cell gel electrophoresis, the DNA migration was decreased in groups treated with water extract, methanol fraction, polysaccharide fraction and P.P-I before exposure to 50, 100 and 200 cGy of γ -rays. These results indicated that HIM-I and P.P-I might protect DNA damage induced by γ -rays. Therefore, HIM-I and P.P-I might be a useful radioprotector, especially since it is a relatively nontoxic product.

(Key word : herb, radioprotector, DNA damage, micronucleous, single cell gel electrophoresis)

*Corresponding author

1. 서론

방사선 및 방사성 동위원소의 의학적 이용과 원자력 시설의 이용이 증가되고 있다. 이에 따라 방사선 이용에 수반되는 부작용 또는 방사선 피폭 사고에 의해 발생하는 생체장해에 대한 관심도가 높아지고 있으며 방사선 피폭에 의한 생체 손상의 예방 및 경감을 위한 방호제의 개발이 중요한 문제로 대두되고 있다.

방사선 방호제에 대한 연구는 1949년 Patt *et al*[1]에 의해 최초로 보고된 이래 주로 thiol 복합체를 중심으로 한 합성물질들이 연구의 대상이 되었으며 그 후 interleukin-1, tumor necrosis factor와 같은 면역조절물질, granulocyte colony-stimulating factor 등의 조혈 인자에 대한 연구가 수행되었다[2-6]. 이러한 물질들은 유효용량에 수반되는 강한 독성 또는 미미한 효과에도 불구하고 암의 방사선치료 분야 등에 적용을 목적으로 연구되고 있다[7, 8].

최근 방사선생체반응에 미치는 천연물의 효과에 대한 연구가 관심의 대상이 되고 있으며, 이와 같은 관점에서 생약재의 방사선 방호효과도 다수의 연구가 진행되고 있다. 그러나 대부분 한가지 생약에 관한 연구가 주를 이루고 있다[9-14]. 그러나 한의학의 처방이 대부분 합방이라는 측면에서 볼 때 복합처방제 및 생약 혼합물의 방사선 방호효과에 대한 연구가 더 큰 의미가 있다고 사료된다.

본 연구에서는 방사선 장해에 있어서 위장관 점막, 조혈·면역계 조직 등 빠르게 재생하는 조직이 민감하며, 그 장해 및 회복 기작도 조직의 종류별로 서로 다르다는 점에 주목하여, 방사선 장해를 종합적으로 극복할 수 있는 생약재 복합물을 개발하고자 하였다. 한의학의 보기·보혈 당체에 사용되는 생약재들을 대상으로[15, 16] 방사선 조사 마우스에서 장관 점막 하의 원줄기세포 생존, 골수 혈액 모세포 생존 및 면역세포 활성화 등의 실험결과를 바탕으로 당귀, 천궁, 백작약의 혼합 조성물(HIM-I)을 도출하였다. 본 실험에서는 HIM-I의 방사선에 의한 DNA 상해 방호효과를 소핵형성실험과 단세포전기영동법으로 검정하였다

2. 재료 및 방법

2.1 세포배양

Meyeloid leukemia cell인 HL-60 세포를 10% fetal bovine serum이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37℃ 항온기에 배양하였다.

2.2 시료제조

동량의 당귀(*Angelica gigantis Radix*), 천궁(*Cnidii Rhizoma*), 작약(*Paeonia Radix*)을 세절하여 10배량의 증류수를 가하고 2시간씩 열탕 추출한 뒤 고형분을 제거한 현탁액을 200×g에서 10분간 원심분리시키고 상층액을 여과하여 감압농축 후 동결건조시켰다. 동결건조한 생약재 혼합 추출물(HIM-I)은 열수추출물, 조다당분획, 메탄올분획 및 에탄올분획으로 분획을 실시하여 각각 시료로 사용하였다. 열수추출물에 20%의 조다당분획을 가하여 제조한 조성물을 P.P-I이라 하고 시료로 사용하였다.

2.3 방사선조사 및 시료처리

HL-60 세포는 멸균된 polystylen tube(Corning, No. 25310-15, NY)에 분주하여 ⁶⁰Co- γ 선을 50 cGy/min의 선량율로 1회 조사하였다. HIM-I 분획과 P.P-I의 처리는 최종농도가 400 μ g/ml이 되도록 하였다. 소핵형성실험의 경우 200 cGy를 조사하였으며, 조사 전 4시간, 조사 전 2시간부터 조사 후 2시간 그리고 조사 후 4시간 동안 시료처리군으로 나누어 실험을 시행하였다. 조사 전 4시간 시료처리군은 조사 직전 신선한 배지로 교환하여 방사선조사를 시행하였다. 단세포전기영동의 시료처리군은 조사 전 4시간동안 세포배양기에서 처리한 후 50, 100, 200 cGy를 조사하였으며 세

포는 방사선 조사 후 DNA 수복을 차단하기 위하여 전기영동을 시행하기 전까지 4°C를 유지하였다.

2.4 소핵 측정

(가) Cytokinesis-blocked method

Cytochalasin B(Cyt-B, Aldrich Chemical Co.)는 dimethylsulphoxide에 ml당 2 mg의 양으로 원액을 만들어 -70°C에 보관하였다. Cyt-B 처리는 조사 전 4시간 시료처리군은 조사 직후, 조사 전 2시간부터 조사 후 2시간동안 시료처리군은 조사 후 2시간째 그리고 조사 후 4시간 시료처리군은 조사 후 4시간째에 ml당 3 μ g의 양으로 첨가하였다. Cyt-B 처리 24시간 후에 세포를 수확하였으며 cytocentrifuge(Hanil Science Industry Co., Ltd., Korea)를 이용하여 검경용 표본을 만들고 건조 후 Giemsa 염색을 하였다.

(나) 소핵의 검경

소핵은 유침하에서 1000배 배율의 현미경으로 기존의 검경기준[17]을 적용하여 binucleated cell 1000개당 소핵 형성 세포를 계수하였다. 간단히 기술하면, 소핵은 주핵에서 분리된 구형으로 지름이 주핵의 50% 이하이며 세포질내에 존재하여야 하고 빛의 반사와 같은 형상이 없고 염색성이 주핵에 비하여 진하지 않은 것을 소핵으로 판정하였다(Fig. 1).

2.5 단세포 전기영동

Singh N.P. *et al*의 방법에 준해 시행하였다[18].

(가) 슬라이드 준비

Frosted slide에 0.6% agarose 130 μ l를 처리 후 cover glass로 덮고 4°C에서 10분간 방치하여 agarose를 굳힌 후 cover glass를 제거하였다. 세포를 0.5% low melting agarose 75 μ l와 혼합하고 이를 slide에 점적 후 coverglass로 덮고 4°C에서 10분간 굳힌 다음 lysis buffer(2.5M NaCl, 100mM Na₂EDTA, 10mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, pH 10)에서 4°C로 1시간동안 용해시켰다.

(나) 전기영동

Electrophoretic buffer(300mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% dimethyl sulfoxide, 10mM Na₄EDTA, pH>12.3)를 이용 22V, 300mA에서 25분간 전기영동을 시행하였다. 이후 Tris buffer(0.4M Tris, pH7.4)로 10분씩 3회 세척하여 슬라이드를 중화시키고 DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 ethanol에 1시간 이상 침적하였다.

(다) 염색 및 관찰

슬라이드를 건조시킨 후 60 μ l의 ethidium bromide(20 μ g/ml)로 염색하였다. 형광현미경을 사용하여 이미지분석 프로그램(IMT(VT) Image Analysis Program, Image and Microscope Technology)을 통해 60개의 세포를 선택하여 DNA 손상정도를 head를 포함한 tail의 길이로 분석하였다.

3. 결과

3.1 소핵형성 억제 효과

방사선 조사 후 선량별 소핵 형성은 정상대조군에서 binucleated cell 1000개당 5.5 ± 0.71 개였고 100~400 cGy의 조사선량 범위에서 형성된 소핵의 수는 $45 \pm 7.07 \sim 273.5 \pm 9.19$ 개로 조사선량에 비례하여 증가되었다(Fig. 2).

조사 전 4시간 시료처리의 경우 HIM-I의 모든 분획과 P.P-I이 유의성있는 소핵 형성 억제효과를 나타내었으며, 조사 전 2시간부터 조사 후 2시간동안 시료처리의 경우에는 열수충추출물, 조다당분획, 메탄올분획 및 P.P-I에서 방사선에 의한 소핵 형성을 억제하였다($p < 0.05$). 그러나 조사 후

4시간 시료처리의 경우에는 유의성있는 억제 효과를 관찰할 수 없었다(Table 1).

3.2 단세포전기영동분석에서 DNA 외가닥절단(single strand break) 억제효과

방사선에 의해 절단된 DNA 가닥은 전기영동 상에서 양극(+) 방향으로 이동하여 혜성 모양으로 관찰된다(Fig 3).

방사선 조사 후 tail의 길이를 측정된 결과 정상대조군에서 $29.474 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 였고 50~500 cGy의 조사선량 범위에서 tail의 길이는 $86.74 \pm 3.09 \sim 145.24 \pm 6.53 \mu\text{m}$ 로 조사선량에 비례하여 증가하는 양상을 나타냈다(Fig. 4). HIM-I 분획 중 열수추출물, 조다당분획, 메탄올분획과 P.P-I이 각 선량에 의한 DNA 손상을 보호하였다($p < 0.01$)(Fig. 5).

4. 고찰

방사선 증감제 및 방호제는 암 치료를 위한 방사선 및 화학요법시 함께 적용될 경우 큰 효과를 얻을 수 있을 것이라는 관점에서 주요 연구대상이 되어왔으나, 대부분이 독성 혹은 부작용 때문에 임상적 이용에 한계를 보였다. 그러나 이러한 합성물질과는 달리 생약과 같은 천연물질들은 각종 질병이나 상해회복에 효과적이며 독성이 적어서 특별한 부작용을 나타내지 않는다.

세포주를 이용한 세포질분열 차단 세포에서의 소핵 검사는 골수세포를 이용하는 전통적인 소핵 검사에 비하여 일회 분열의 확인 및 미분열세포의 배제가 가능하고 기존의 염색체 분석법에 비하여 특별한 숙련이나 기술 없이도 분석이 비교적 쉬우며 단기간에 수행될 수 있어 방사선생물학분야에서의 선량측정 및 반응조절물질의 효과 검정 시험에 많이 적용되고 있다[17, 19-21].

단세포전기영동법은 암유발원이나 돌연변이 유발원에 의한 DNA 손상을 평가하기 위해 개발되었으며 일명 comet assay라고도 불린다. 단세포전기영동법은 실험조건에 따라 DNA 양가닥절단 및 외가닥절단을 측정할 수 있는데 외가닥절단은 양가닥절단보다 훨씬 많이 생성되기 때문에 이온화 방사선을 포함하는 산화적 손상을 유발하는 유해물질에 노출되었을 때 민감한 측정방법으로 이용될 수 있다. 특히, alkali 조건의 단세포전기영동법은 DNA 외가닥절단과 alkali에 민감한 부위(Apurinic or Apyrimidinic site :AP site)를 측정할 수 있기 때문에 방사선을 포함한 암유발원이나 돌연변이 유발원을 감지하기 위한 생물학적 표지자로 각광을 받고 있다[22-24].

생약제 혼합 추출물의 방사선 방호효과를 γ 선을 조사한 HL-60세포에서 소핵형성과 단세포전기영동법을 통하여 관찰한 본 실험에서 소핵형성의 경우 조사전 4시간 처리군에서는 모든 분획과 P.P-I이, 조사전 2시간부터 조사후 2시간동안 처리군에서는 메탄올분획을 제외한 모든 분획에서 방사선에 의한 DNA 상해를 보호하는 효과를 보였다. 단세포전기영동법에서도 50, 100 및 200 cGy 선량에서 열수추출물, 조다당분획, 메탄올분획 및 P.P-I이 DNA 손상을 보호하였다.

이러한 결과로 보아 생약제 혼합 추출물은 방사선에 의한 DNA 상해를 효과적으로 방호하였으며 독성이 적은 천연물이라는 관점에서 유효성분과 작용기작이 밝혀진다면 방사선 방호제로 적용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

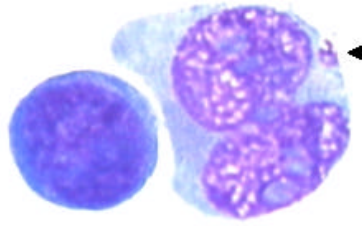


Fig 1. Cytochalasin blocked cells with micronucleus(arrow).

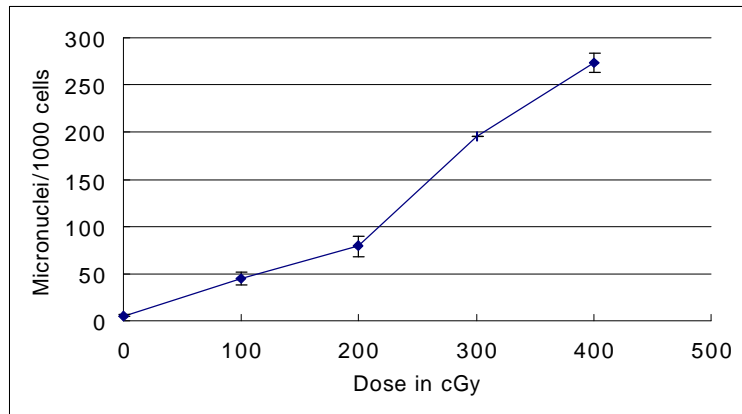


Fig 2. Frequency of micronuclei in the HL-60 cells after exposure to different dose of γ -rays.

Table 1. Effect of herb mixture(HIM-I) and P.P-I on the induction of micronuclei in HL-60 cells exposed to 200 cGy of γ -rays

Treatment ¹⁾	Micronuclei distribution per 1000 binucleate cells (Mean \pm SD)			
	One micronucleus	Two micronuclei	Three micronuclei	Total micronuclei
Radiation control	85 \pm 1	6.67 \pm 1.53	0.33 \pm 0.58	100.25 \pm 4.04
W ⁴⁾	79 \pm 1	3.33 \pm 1.53	0	84.75 \pm 4.04*
P ⁵⁾	67 \pm 1	4.33 \pm 1.53	0	75.25 \pm 2.08**
M ⁶⁾	64 \pm 10	4.67 \pm 2.08	0.33 \pm 0.58	73.50 \pm 6.66**
E ⁷⁾	75 \pm 1	6.67 \pm 1.53	0.33 \pm 0.58	90.00 \pm 2.31*
P.P-I ⁸⁾	80 \pm 2	4 \pm 2	0	87.50 \pm 2*

Treatment ²⁾	Micronuclei distribution per 1000 binucleate cells (Mean \pm SD)			
	One micronucleus	Two micronuclei	Three micronuclei	Total micronuclei
Radiation control	74.67 \pm 4.16	7 \pm 2	0.34 \pm 0.58	89 \pm 5.51
W ⁴⁾	47 \pm 15.72	2.67 \pm 1.53	0.34 \pm 0.58	55.75 \pm 11.24**
P ⁵⁾	48 \pm 7.21	4.67 \pm 2.08	1 \pm 1	60.25 \pm 0.58**
M ⁶⁾	45 \pm 10.82	2 \pm 1	0.34 \pm 0.58	45.75 \pm 11.53**
E ⁷⁾	82 \pm 1.73	3.67 \pm 1.53	0.67 \pm 0.58	91.75 \pm 1.53
P.P-I ⁸⁾	47 \pm 4.36	1.5 \pm 0.71	0	50.25 \pm 2.65**

Treatment ³⁾	Micronuclei distribution per 1000 binucleate cells (Mean \pm SD)			
	One micronucleus	Two micronuclei	Three micronuclei	Total micronuclei
Radiation control	73.33 \pm 3.21	7.33 \pm 1.53	1.66 \pm 2.08	95 \pm 5.29
W ⁴⁾	79.67 \pm 2.08	7.33 \pm 2.08	0.33 \pm 0.57	94 \pm 9.24
P ⁵⁾	100 \pm 0.58	1.34 \pm 0.58	0	103 \pm 1.15
M ⁶⁾	84 \pm 1.73	2 \pm 1.73	0.67 \pm 0.58	94 \pm 15.52
E ⁷⁾	89.67 \pm 2.89	3.67 \pm 2.89	0	97 \pm 3
P.P-I ⁸⁾	88.33 \pm 1.15	3.68 \pm 1.15	0.33 \pm 0.56	95.5 \pm 4.16

¹⁾The cells were incubated with herb mixture(HIM-I) & P.P-I for 4 hrs before irradiation.

²⁾The cells were incubated with herb mixture(HIM-I) & P.P-I for 2 hrs before irradiation and it was available to cells up to 2 hrs after irradiation.

³⁾The cells were incubated with herb mixture(HIM-I) & P.P-I for 4 hrs after irradiation.

⁴⁾Water extract of HIM-I. ⁵⁾Methanol fraction of HIM-I.

⁶⁾Ethanol fraction of HIM-I. ⁷⁾Polysaccharide fraction of HIM-I.

⁸⁾Water extract of HIM-I added with 20% of its polysaccharide fraction.

* p<0.05 as compared with irradiation control group.

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

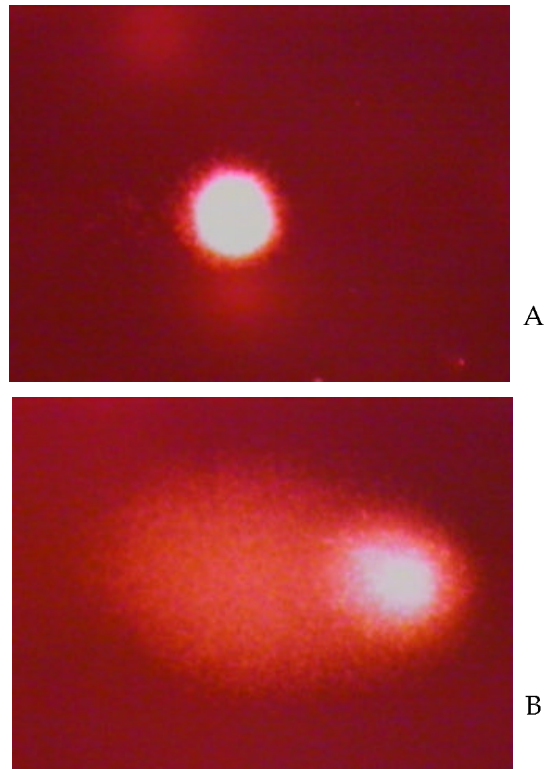


Fig. 3. Photomicrographs of DNA migration pattern (A) from typical control cell and (B) from a cell exposed to 200 cGy of gamma radiation.

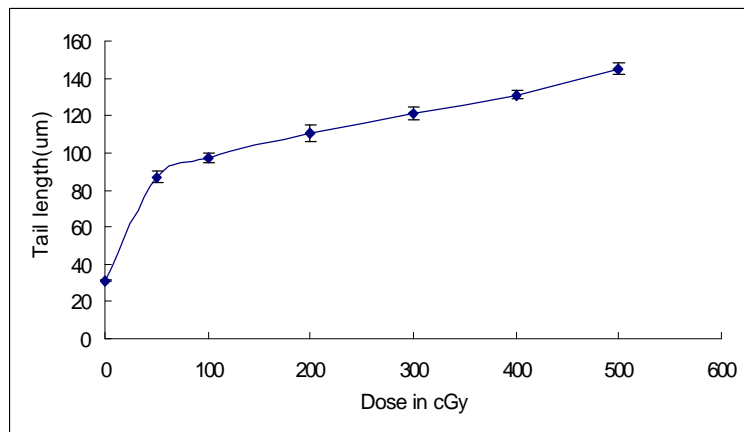


Fig. 4. The length of DNA migration after exposure to 0, 50, 100, 200, 300, 400 and 500 cGy of γ -rays. Each point represents the mean length of DNA migration from 60 cells. Error bars represent standard errors.

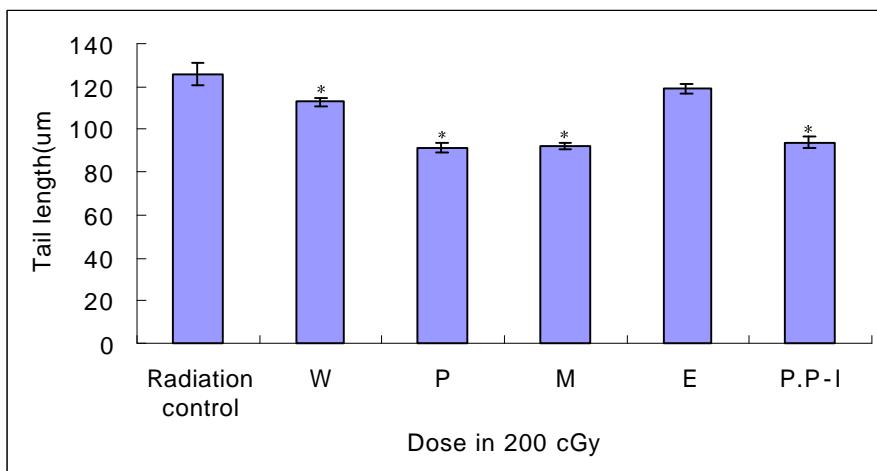
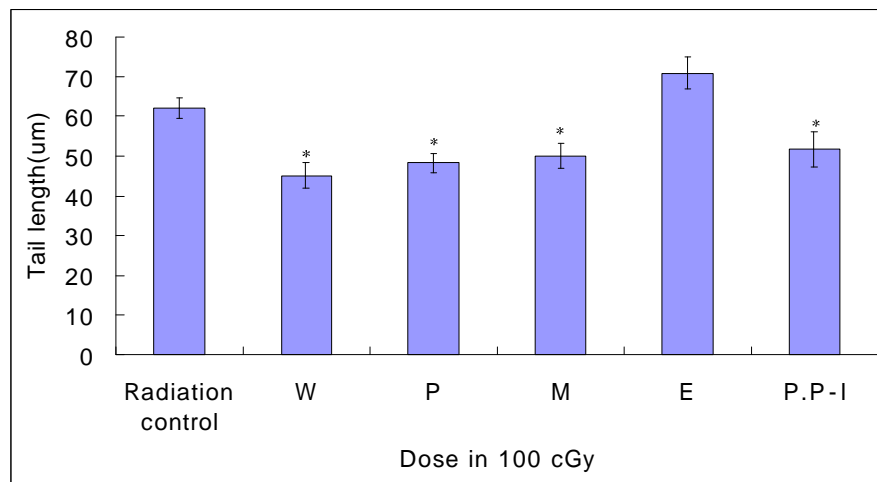
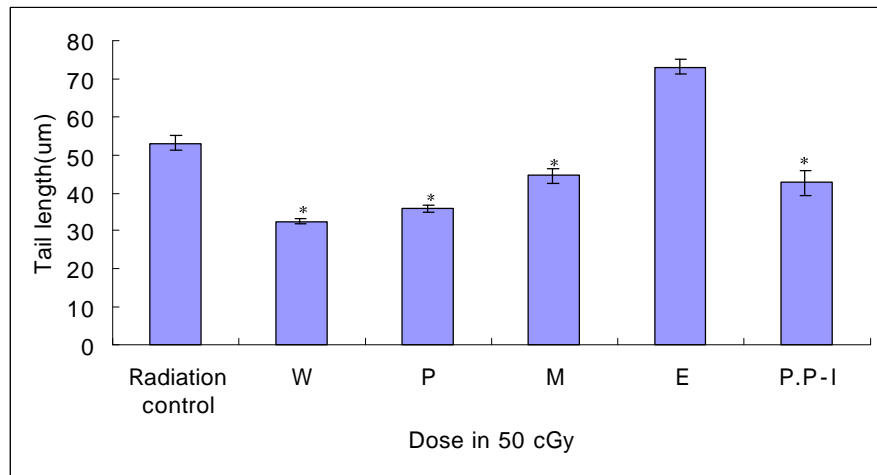


Fig. 5. Inhibitory effects of herb mixture(HIM-I) and its fraction on DNA damage induced by 50, 100 and 200 cGy of gamma radiation. Error bars represent standard error. *p<0.01 as compared with the irradiation control group.

5. 참고문헌

1. Patt, H., Tyree, M. and Straube, R. L. : Cystein protects against x-irradiation. *Science*, 110, 213-214 (1949).
2. Milas, L., Hunter, N. Reid, B. O. and Thames, Jr. H. D. : Protective effects of S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid against radiation damage of normal tissues and a fibrosarcoma in mice. *Cancer Res.*, 42, 1888-1987 (1982).
3. Milas, L., Murray, D., Brock, W. A. and Meyn, R. E. : Radioprotectors in tumor radiotherapy: Factors and settings determining therapeutic ratio. *Pharmacol. Ther.*, 39, 179-189 (1988).
4. Neta, R., Douches, S. and Oppenheim, J. J. : Interleukin 1 is a radioprotector. *J. Immunol.*, 136, 2483-2485 (1986).
5. Neta, R. : Role of cytokines in radioprotection. *Pharmacol. Ther.*, 39, 261-266 (1988).
6. MacVittie, T. J., Monroy, R. L., Patchen, M. L. and Souza, L. M. : Therapeutic use of recombinant human G-CSF (rhG-CSF) in a canine model of sublethal and lethal whole body irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 723-736 (1990).
7. Washburn LC, Carlton JE, Hayes RL. Distribution of WR-2721 in normal and malignant tissue of mice and rats bearing solid tumors: dependence on tumor type, drug dose and species. *Radiat. Res.*, 59:483-575, 1974.
8. Cairnie AB. Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat. Res.*, 94:221-226, 1983.
9. Kim, S. H., Cho, C. K., Yoo, S. Y., Koh, K. H., Yun, H. G. and Kim, T. H. : *In vivo* radioprotective activity of Panax ginseng and diethyldithiocarbamate. *IN VIVO*, 7, 467-470 (1993).
10. Mei, Q. B., Tao, J. Y. and Cui, B. : Advances in the pharmacological studies of *Radix Angelica sinensis(oliv.) Diels*(Chanese Danggui). *Chin. Med. J.*, 104, 776-781 (1991).
11. Hsu, H. Y., Lian, S. L. and Lin, C. C. : Radioprotective effect of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice. *Am. J. Chin. Med.*, 18, 61-69 (1990).
12. Miyanomae, T. and Frindel, E. : Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation. *Exp. Hematol.*, 16, 801-806 (1988).
13. Wang, H. B., Zheng, Q. Y., Ju, D. W. and Fang, J. : Effects of *Phytolacca acinosa* polysaccharides II on lymphocyte proliferation and colony stimulating factor production from mice splenocytes *in vitro*. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 28, 490-493 (1993).
14. Quan, H. X. and Li, H. S. : Effects of *radix Astragali* on hemopoiesis in irradiated mice. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 19, 741-743 (1994).
15. 한약위원회, 조제지침연구소위원회 : 한약조제 지침서 해설, 사단법인 대한약사회(1995).
16. 약대 한약학 교재연구회 : 한약방제학, 도서출판 정담 (1993).
17. Almassy, Z., Krepinsky, A. B., Bianci A. and Koteles G. J. : The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl. Radiat. Isot.* 38, 241-249 (1987).
18. Singh, N. P., Stephens, R. E., and Schneider, E. L. : Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ -ray. *Int. J. Radiat Biol.*, 66, 563-569 (1995).
19. Muller, W. U. and Streffer, C. : Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Radiat Biol.*, 59, 863-873 (1991).
20. Vral, A., Thierens and de Ridder, L. : Study of dose-rate and split-dose effects on the *in vitro* micronucleus yield in human lymphocytes exposed to X-rays. *Int. J. Radiat Biol.*, 777-784 (1992).
21. Kim, S. H., Cho C. K., Kim, T. H., Yoo, S. Y., Koh, K. H. and Yun, H. G. : Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-neutron irradiations. *Anticancer Res.*, 13, 1587-1592 (1993).
22. Collins, A. R., Ai-guo, M. and Duthie, S. J. : The kinetics of repair of oxidative DNA damage(strand break and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.*, 336, 69-77 (1995).
23. Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kermidy, G. and Stetima, R. : The comet assay: What can it really tell us? *Mutat. Res.*, 375, 183-193 (1997).
24. Andreoli, C., Leopardi, P. and Crebelli, R. : Dection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gell electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat. Res.*, 377, 95-104 (1997).