

Comet assay를 이용한 복숭아씨 추출물의 림프구 DNA 손상에 대한 방사선 방어효과 분석

김진규, 박태원¹, 이창주, 채영규¹
한국원자력연구소, ¹한양대학교

Protective effect of peach kernel extracts on radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes in the comet assay

Jin Kyu Kim, Tae Won Park¹, Chang Joo Lee, Young Gyu Chai¹
Korea Atomic Energy Research Institute, ¹Hanyang University

요 약

Comet assay라고도 불리는 alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay는 *in vivo*와 *in vitro*에서 많은 화학적, 생물학적인 인자에 의한 DNA의 손상을 감지하는데 유용한 기법이다. 특히 Comet assay는 각각의 세포에서 DNA 단일 가닥 절단과 알칼리에 약한 장소를 평가하는 새로운 방법이다. Comet assay를 사용하여 복숭아씨 추출물이 방사선에 의하여 사람 림프구 DNA에 나타나는 손상을 보호하는 지 여부를 평가하였다. 림프구는 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 Gy의 방사선 조사 전에 복숭아씨 추출물로 처리하였고 방사선만을 조사한 임파구와 대조하였다. Comet assay에서 DNA strand breaks에 대한 표식인 tail moment의 증가는 방사선에 대한 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었으며 각 농도별 복숭아씨 추출물 처리 후 림프구의 DNA 손상은 현저히 감소하였다. Comet assay를 통한 평가결과 복숭아씨 추출물은 방사선에 의한 림프구 DNA 손상에 대한 방어효과를 나타내었다.

Abstract

The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, the comet assay, has been applied to the detection of DNA damage from a number of chemical and biological factors *in vivo* and *in vitro*. The comet assay is a novel method to assess DNA single-strand breaks, alkali-labile sites in individual cells. We evaluated the effect of peach kernel extracts on radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes

using the comet assay. The lymphocytes, with or without pretreatment of the extracts, were exposed to 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 Gy of ^{60}Co gamma ray. Significantly increased tail moment, which was a marker of DNA strand breaks in the comet assay, showed an excellent dose-response relationship. The treatment of the peach kernel extracts prominently reduced the DNA damage in irradiated groups compared to that in non-treated control groups. The result indicated that the extracts showed radioprotective effect on lymphocyte DNA when assessed by the comet assay.

서 론

Single cell gel electrophoresis (SCGE)라고도 불리는 comet assay는 각각의 세포에서 DNA 손상을 직접 가시화 하는 전기영동 기술로서 1984년에 Östling과 Johanson에 의해서 처음으로 소개되었다[1]. 그 후, 1989년에 Singh에 의해 강알칼리 조건으로 변형되어 사용되고 있다. 이러한 높은 pH 조건은 DNA 분자의 구조를 풀어 주는데 매우 중요하다[2]. 정상적인 조건에서 세포핵에 있는 DNA는 supercoil을 이루고 있으나 높은 pH는 DNA 구조를 완화시켜 DNA의 손상 정도를 쉽게 감지하고 측정할 수 있게 한다. 이 기술은 세포를 슬라이드 상의 얇은 아가로즈 겔에 끼워 넣어 세포막의 분해, 전기영동, 그리고 형광 염료로 염색하는 단계를 거친다. 전류는 전위를 가진 DNA를 핵으로부터 잡아당김으로써 완화된 DNA와 깨진 DNA 절편들은 이동시키게 된다. '혜성' 같은 모양에서 이름 붙여진 이 이미지가 DNA 손상정도를 결정하는데 측정되어 진다. Östling과 Johanson은 전기영동 동안 head로부터 떨어져 나오는 DNA의 양이 기능적인 방사선의 조사량을 나타냄을 관찰하였다. 혈액 임파구의 DNA가 화학물질과 방사선에 의해 손상되는 것도 알려졌다[3].

지난 수년 동안에 comet assay에 대해 많은 관심이 증대되어 왔고 많은 연구보고들이 comet assay를 사용하여 발표되었을 뿐 만 아니라 새로운 분야에 대한 응용결과도 점차 평가되고 있다. Comet assay의 독특한 특징은 각각의 세포에서 DNA 손상의 정도를 직접 보여주기 때문에 한 개체군 안의 모든 세포들이 같은 정도의 손상을 받았는지를 설명하는 것이 가능하다. 어떤 처리 동안에 세포들의 이종의 반응으로 저항성을 가질지 모르는 세포의 소 개체군들의 인식이 가능하기 때문에 특유의 처리절차에 대한 종양 반응의 예견을 도울 수 있다. SCGE는 다양한 실험조건들 하에서 DNA 손상과 수복을 조사하는데 유용하게 사용될 수 있는 수단이다.

재료 및 방법

혈액시료는 실험실 자원자로부터 채취하였으며 림프구는 Ficoll-histopaque gradient (pharmacia)를 사용하여 분리하였다. 분리된 림프구는 trypan blue exclusion에서 95%이상의 viability를 보였고 tube당 약 20,000개의 세포로 분주 되었다. 복숭아씨 추출물은 균질화한 후 여과하여 침전시키고 분말 상태로 준비되었고 PBS에 용해시켰다. 림프구는 두 실험군으로 구분하여 한국원자력연구소의 ^{60}Co 선원(선원강도 약 1.5×10^{14} Bq, Panoramic

irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하여 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 Gy를 조사하였고 또 다른 림프구 실험군은 조사 전에 분주된 세포 (약 20,000) 당 1ml의 복숭아씨 추출물을 10분간 처리하였다. 슬라이드 준비는 먼저 슬라이드 상에 1% agarose (Sigma)로 첫 번째 층을 덮고 고체화시키고 그 위에 림프구들을 37°C에서 low melting point (LMP) agarose (Sigma)의 최종 농도가 0.5%가 되도록 현탁시키고 두 번째 층을 덮는다. 간단히 고체화하고 세 번째 층은 0.5% LMP agarose를 사용하여 덮어졌다. 이렇게 구조된 슬라이드는 1% Triton X-100과 10% DMSO를 사용 전에 첨가한 colding lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-disodium, 10 mM Tris, pH=10)에 최소 1시간 동안 pH 10에서 detergent로 된 high salt solution에 잠기게 했다. 전기영동 전에 슬라이드는 higher pH (pH 13.5)로 된 알칼리성의 전기영동 용액에서 평형을 유지시켰다. 그 후 전기영동은 0.75V/cm, 300mA로 20분간 수행하였다. 전기영동 다음에 슬라이드를 세척하고 0.4M Tris buffer (pH 7.5)에서 중성화시킨 후 ethidium bromide로 염색하였으며 염색결과 생성된 comet을 광학현미경 (Olympus fluorescence microscope, x400) 하에서 검경하고 image analysis system (Komet 4.0, Kinetic imaging)을 통하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Comet assay에서 림프구의 DNA strand breaks 정도는 정상 세포와 손상 받은 세포의 형태학적으로 현격한 차이를 보인다. 정상적인 세포는 원형의 양상을 나타내고 손상 받은 세포는 head와 tail로 구성된 comet의 양상을 나타낸다 (Fig.1 및 Fig. 2) [4, 5]. 림프구의 DNA 손상을 평가하는데는 (1)식으로 다음과 같이 정의되는 tail moment 값을 사용하였다.

$$\text{Tail Moment} = (\text{tail mean} - \text{head mean}) \times \text{tail \% DNA} / 100 \quad \text{----- (1)}$$

감마선을 0에서 2.0 Gy 까지 조사한 후에 tail moment가 감마선 선량에 따라 증가하는 선량-반응 관계를 관찰하였다 (Fig. 3). 0.1 Gy 이하의 감마선에서는 복숭아씨 추출물의 처리가 방사선에 의해 유발된 DNA 손상에 영향을 미치지 않았다. 반면에 0.3에서 2.0 Gy까지의 선량범위에서는 추출물 처리에 따르는 방사선 방어효과를 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 이와 같이 특정물질의 처리에 따르는 방사선 방어효과는 비타민 C, E 등과 같은 항산화물질이 나타내는 방어작용[6,7]과 유사한 결과일 것수도 있으나 방사선이 추출물에 함유된 일부 또는 전체 성분에 영향을 주어 방사선 조사후 생성되는 자유라디칼 제거에 직·간접적 영향을 끼침으로써 방사선 방어효과를 나타낼 가능성도 있다. 사람 림프구에 있어서 복숭아씨 추출물 처리에 의하여 나타나는 방사선 방어효과의 자세한 기작은 후속연구를 통해 밝혀질 수 있을 것이다. 한편, 0.3 Gy 이상의 방사선량에 대하여 각 조사선량에 대하여 복숭아씨 추출물의 방어효과가 거의 일정하게 나타났다. 각 선량의 조사군마다 동량의 복숭아씨 추출물을 첨가하였기 때문에 추출물의 양과 방어 효과와의 상호관계가 있음을 예상할 수 있다.

방사선 방어효과를 보인 복숭아씨는 coumarin, malic acid, citric acid 등의 화합물과 함께 많은 양의 amygdalin이 함유되어 있다. Amygdalin은 독성이 없는 glucose, benzaldehyde

그리고 hydrogen cyanide로 구성되어 있다. 이 화합물은 β -glucosidase에 의해 가수분해되어 독성을 가지게 된다. β -glucosidase는 정상 세포보다 trophoblast에 3,000배나 더 많이 존재하고 정상세포에서는 Rhodenase가 생산되어 hydrogen cyanide를 sulfydryl group과 반응시켜 독성이 없는 thiocyanate로 전환되어 간으로 가거나 혈압을 조절한다. 또, benzaldehyde는 산소와 결합하여 독성이 없는 benzoic acid로 전환된다. 복숭아씨 추출물 함유성분의 하나인 amygdalin이 림프구 DNA에 대한 방사선 방어효과를 나타내는 요인의 하나일 가능성이 높다. 본 연구에 사용된 comet assay는 고등동물 세포에 대한 화학적, 생물학적 손상을 평가하는 새로운 방법으로서 다른 기존의 DNA 손상평가 방법보다 민감하고 신속하며 쉬운 방법이다. 특히 사람 세포에 대한 방사선의 영향을 신속하고 정량적으로 평가할 수 있기 때문에 특정물질의 방사선 방어 또는 민감화 효능의 평가는 물론 방사선 피폭자 세포의 생물학적 손상평가에 유용하게 활용될 수 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Östling O. and Johanson K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**:291-298 (1984).
2. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. and Schneider E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* **175**:184-191 (1988).
3. Anderson D., Yu T. W., Philips B. J. and Schmezer P. 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).
4. Darly W.F., Peggy L. O. and Kim L. O. The comet assay: a comprehensive review, *Mut. Res.* **339**:37-59 (1995).
5. McKelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P. and Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review, *Mut. Res.* **288**:47-63 (1993).
6. Umegaki k., Aoki S. and Esashi T. Whole body X-ray irradiation to mice decreased ascorbic acid concentration in bone marrow: comparison between ascorbic acid and vitamin E, *Free Radic. Biol. Med.* **19**:493-497 (1995).

7. Sies H, and Stahl W. Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**:1315-1321 (1995).

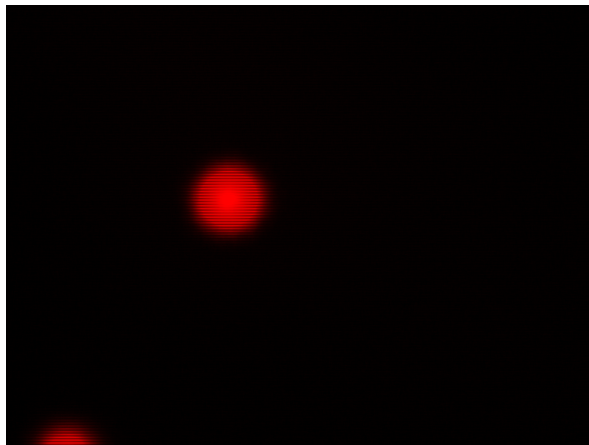


Fig. 1, DNA spot from untreated cell,

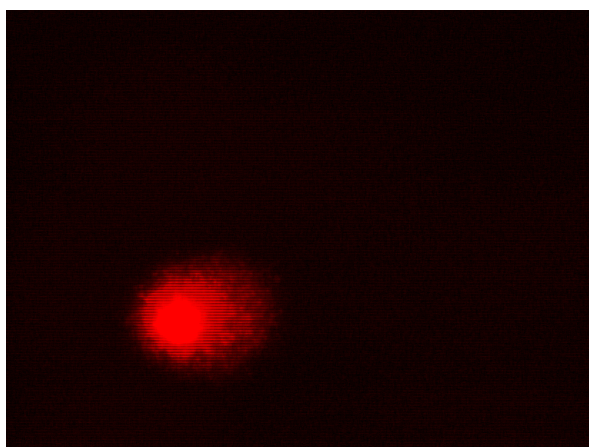


Fig. 2, DNA spot from irradiated cell with a head and a tail ; dose of 2Gy.

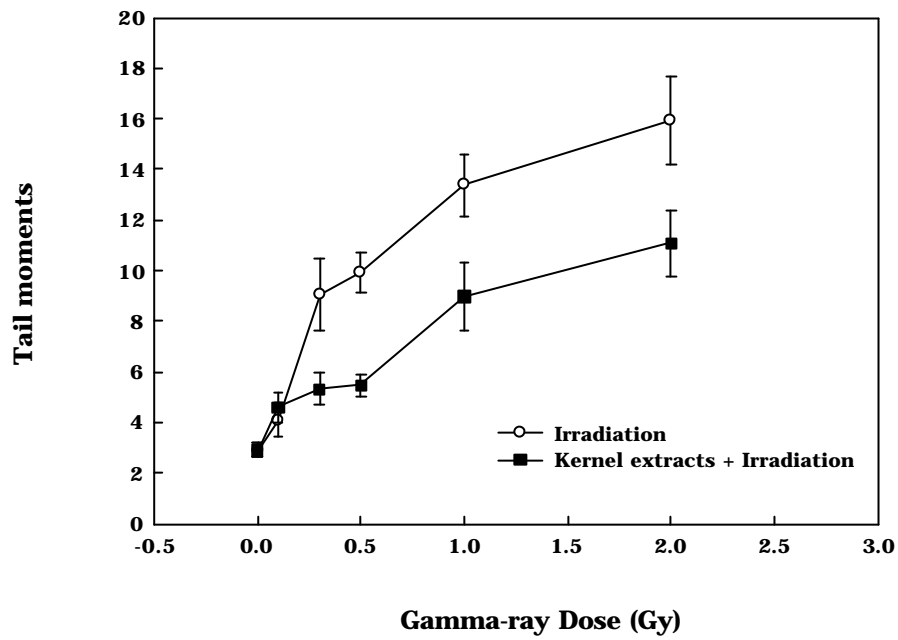


Fig. 3. Effect of peach kernel extracts on tail moment in human lymphocytes exposed to γ -ray doses from 0 to 2.0 Gy. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells.