

Evaluation of protective effect of peach kernel extracts on radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes in the single cell gel electrophoresis assay

Jin Kyu Kim, Tae Won Park*, Chang Joo Lee, Young Gyu Chai*
Korea Atomic Energy Research Institute, IHanyang University

단세포 겔 전기영동법을 이용한 사람 림프구 DNA 손상에 대한 복숭아씨 추출물의 방사선 방어효과 평가

김진규 · 박태원* · 이창주 · 채영규*

한국원자력연구소, *한양대학교

(1999년 6월 21일 접수, 1999년 7월 30일 채택)

Abstract - The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay, called 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. The effect of peach kernel extracts on radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes was evaluated by the SCGE 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 ⁶⁰Co 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 reduced the DNA damage by 30 % in irradiated groups as compared to that in non-treated control groups. The result indicates that the extracts shows radioprotective effect on lymphocyte DNA when assessed by the comet assay.

Key words: lymphocytes, peach kernel, radiation, single cell gell electrophoresis

요약 - Alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay는 일명 혜성분석이라고 부르며 *in vivo*와 *in vitro*에서 많은 화학적, 생물학적인 인자에 의한 DNA 손상을 감지하는데 유용한 기법으로 각각의 세포에서 DNA 단일 가닥 절단과 알칼리에 약한 장소를 평가하는 새로운 방법으로 인정되고 있다. 단세포 겔 전기영동법 (SCGE)을 사용하여 복숭아씨 추출물이 방사선에 의하여 사람 림프구 DNA에 나타나는 손상을 보호하는 지 여부를 평가하였다. 복숭아씨 추출물로 10분간 전처리한 림프구를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 2.0 Gy의 방사선으로 조사하였고 방사선만을 조사한 림프구 실험군과 비교평가하였다. 혜성분석에서 DNA 가닥 절단에 대한 표식인 tail moment의 증가는 감마선에 대해서 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었으며 각각의 농도별로 복숭아씨 추출물이 처리된 림프구의 DNA 손상은 현저히 감소하였다. 단세포 겔 전기영동법을 통한 평가결과 복숭아씨 추출물은 방사선에 의한 림프구 DNA 손상에 대한 탁월한 방어효과를 나타내었다.

중심어 : 림프구, 복숭아씨, 방사선, 단세포 겔 전기영동법

서론

Single cell gel electrophoresis (SCGE)라고도 불리는 혜성분석 (comet assay)은 각각의 세포에서 DNA 손상을 직접 가시화 하는 전기영동 기술로서 1984년에 Östling과 Johanson에 의해서 처음으

로 소개되었다 [1]. 그후, 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. '해성' 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 림프구의 DNA가 화학 물질과 방사선에 의해 손상되는 것도 잘 알려진 사실이다 [3].

지난 수년 동안에 해성분석에 대해 많은 관심이 증대되어 왔고 많은 연구보고들이 단세포 겔 전기영동법을 사용하여 발표되었을 뿐 만 아니라 새로운 분야에 대한 응용결과도 점차 팽창되고 있다. 해성분석의 장점은 많은 세포를 필요로 하지 않으며 실험이 24시간 안에 수행이 가능하며 절차가 매우 간단하다. 한편, 가장 독특한 특징은 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 사용될 수 있는 수단이다.

한편, 이온화 방사선의 이용에 수반되는 생물학적 손상은 DNA나 세포의 거대분자들의 손상과 관련된 자유 라디칼에 기인한다 [4]. 이러한 DNA의 손상은 비타민이나 식물이 자연적으로 생성하는 화합물인 항산화 물질을 동물이나 배양세포에 처리함으로써 조절될 수 있다 [5]. 본 연구에서는 비타민 B₁₇이라고도 불리는 아미그달린을 다량 함유하고 있는 복숭아씨 추출물을 전처리하였을 때 방사선에 의하여 유발된 사람 림프구 DNA 손상이 줄어드는 정도를 SCGE 분석법을 이용하여 평가하였다.

재료 및 방법

림프구 시료 : 건강한 실험실 자원자 (28세, 남)로부터 말초혈액을 채취하였으며 림프구는 Ficoll-histopaque gradient (Pharmacia)를 사용하여 분리하였다. 분리된 림프구는 trypan blue exclusion에서 생존률 (95 % 이상)을 확인한 다음 tube당 약 20,000개의 세포로 분주하였다.

복숭아씨 추출물 : 건조상태의 복숭아씨를 파쇄한

후 yield를 높이기 위해서 자연 발효를 시키고 isopropyl alcohol로 균질화한 후 여과하여 72 시간 이상 동안을 침전시키고 잔존하는 isopropyl alcohol을 제거하기 위해 ether로 세척하여 분말 상태로 준비되었고 이를 DMSO에 녹인 후 PBS에 희석하여 사용하였다 (0.1 g/100 ml). 방사선 조사 전에 분주된 세포군 (약 20,000) 당 1 ml의 복숭아씨 추출물을 4°C에서 10분간 처리하였다.

방사선 조사 : 방사선 조사는 기존에 보고된 방법을 따랐다 [6]. 한국원자력연구소의 ⁶⁰Co 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 선량률의 측정은 Friche dosimeter를 사용하였다.

슬라이드제작 및 전기영동 : 방사선 조사가 끝난 다음 손상된 DNA 분자의 수복을 방지하기 위하여 모든 절차는 4°C 하에서 이뤄졌다. 슬라이드 상에 200 μ l의 1 % agarose (Sigma)로 첫 번째 층을 입힌 다음 고체화시키고 그 위에 림프구들을 37°C에서 low melting point (LMP) agarose (Sigma)의 최종 농도가 0.5 %가 되도록 현탁시키고 100 μ l로 두 번째 층을 덮는다. 림프구가 포함된 두 번째 층을 간단히 고체화시킨 다음 100 μ l의 0.5 % LMP agarose를 사용하여 세 번째 층을 덮는다. 이렇게 주조된 슬라이드는 1 % Triton X-100 (Sigma)과 10 % DMSO (Merck)를 사용 전에 첨가한 colding lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-disodium, 10 mM Tris, pH=10)에 최소 1시간 동안 detergent로 된 high salt solution에 잠기게 했다. 이 단계에서 핵안의 protein들은 모두 제거된다. 전기영동 전에 슬라이드는 higher pH (pH 13.5)로 된 알칼리성의 전기영동 용액 (0.3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA)에서 20분 동안 전기영동에 방해가 될 detergent를 제거하면서 평형을 유지시켰고 동시에 DNA를 unwinding시켜 supercoiling을 풀어주었다. 그 후 전기영동은 0.75 V/cm, 300 mA로 20분간 수행하였다.

형광염색 및 검경분석 : 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. 그후 buffer를 제거하고 50 μ l의 ethidium bromide (20 μ g/ml, Sigma)로 염색하였으며 염색결과 생성된 comet을 CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 광학현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan) 하에서 excitation filter (515-

560 nm)와 barrier filter (590 nm)를 사용하여 x 400으로 확대하여 검경하고 Image Analysis System Software (Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통하여 분석하였다.

결과 및 고찰

림프구의 DNA 손상에 대한 정도를 측정하는 것은 일반적으로 체내의 세포 손상을 측정하는 대표적인 방법이라고 간주된다. 림프구는 면역 체계에서 중요한 역할을 하고 있고 이런 림프구의 산화적 손상은 암이나 노화 같은 다른 질병의 발생과 직접적인 관련을 가지고 있어 림프구의 산화적 손상에 대한 예방은 퇴화성 질병의 예방에 도움을 줄 수 있다 [7]. 혜성분석에서 림프구의 DNA strand breaks 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 양상을 나타낸다 (Fig. 1), [8, 9]. 실험에 앞서 실시된 분석에서 림프구의 생존률이 95 % 이상을 보

였다는 점은 혜성분석에서 방사선을 조사하지 않은 림프구의 모양 (intact cell)으로도 간접확인 가능하였다. 혜성분석 실험을 행하기 전의 죽은 림프구는 assay 후에 head와 tail이 완전히 구분되어 apoptotic comet의 양상으로 나타나기 때문이라는 쉽게 확인된다 (Fig. 1).

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 length만을 사용할 경우 실제 DNA 분자상에 유발된 손상이 지나치게 확대 해석될 수 있는 단점을 안고 있다. 전기영동후 얻어진 혜성모양의 DNA 상으로부터 측정된 head, tail 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 tail moment 값을 사용하여 전술한 단점을 보완할 수 있으며 본 연구에서도 다음과 같이 (1)식으로 정의되는 tail moment 값을 사용하였다.

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

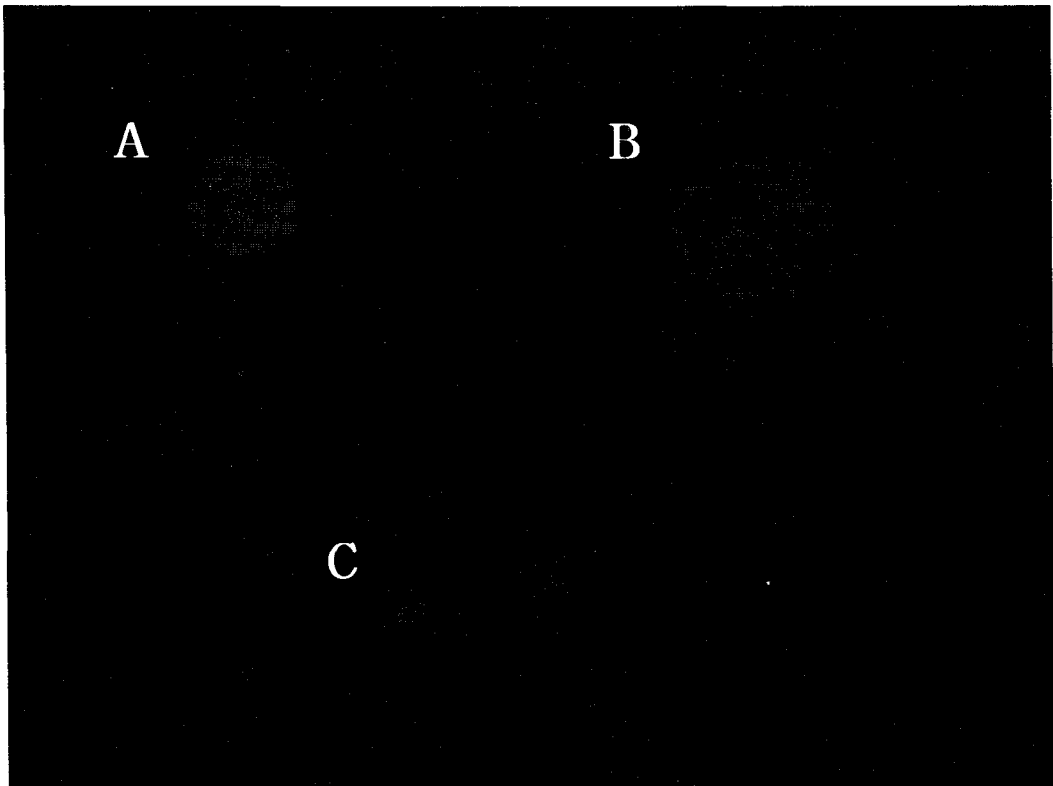


Fig. 1. Appearance of typical DNA comets. The unirradiated comet is shown in (A), the irradiated comet in (B), and the apoptotic comet in (C).

여기서, tail mean과 head mean은 각 부위의 염색장도의 평균값.

감마선을 0에서 2.0 Gy 까지 조사한 후에 tail moment가 감마선 선량에 따라 증가하는 선량-반응 관계를 관찰하였다 (Fig. 2). Fig. 2는 방사선을 조사하기 전의 복숭아씨 추출물을 처리한 것과 하지 않은 것을 평균값으로 나타내었다. 이러한 tail moment는 가장 낮은 실험선량인 0.1 Gy에 노출된 림프구에서도 증가하는 것이 확인되었으며 방사선이 조사되지 않은 대조군 림프구에 존재하는 DNA 손상의 경우도 일정한 값의 tail moment를 나타냄으로써 림프구 손상을 측정·평가하는데 tail moment가 매우 민감한 파라미터로서 사용될 수 있음을 확인하였다. 즉, 0.1 Gy 이하의 저선량 감마선에 의한 DNA 손상 추정에 해석분석법이 유용하게 활용될 수 있음을 알았다. 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 background 값을 포함하는 것이다.

(1995)은 감마선의 검출하한을 0.001 Gy로 보고하였으며 [10], Plappert (1995)은 X선에 대해서 0.01 Gy의 검출하한 선량을 보고하였다 [11]. 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 처리 시간을 증가시킴으로써 alkali-labile lesions의 노출을 강화할 수 있다. 두 번째로 electrophoresis time을 늘이는 것이다. DNA의 이동 거리는 전기영동 시간에 의존적이다. 그러므로, 이러한 두가지 조건을 적절히 변형시킴으로써 매우 낮은 방사선량에 의해 유도되는 DNA 손상도의 미묘한 증가를 감지할 수 있다. 이 실험에서 0.1 Gy 이하의 감마선에서는 복숭아씨 추출물의 처리가 방사선에 의해 유발된 DNA 손상에 영향을 미치지 않았다. 반면에 0.3에서 2.0 Gy까지의 선량범위에서는 추출물 전처리에 의해서 방사선에 의한 DNA 손상이 30% 이상 감소됨으로써 복숭아씨 추출물이 뚜렷한 방사선 방어효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이와 같이 특정물질의 처리에 따르는 방

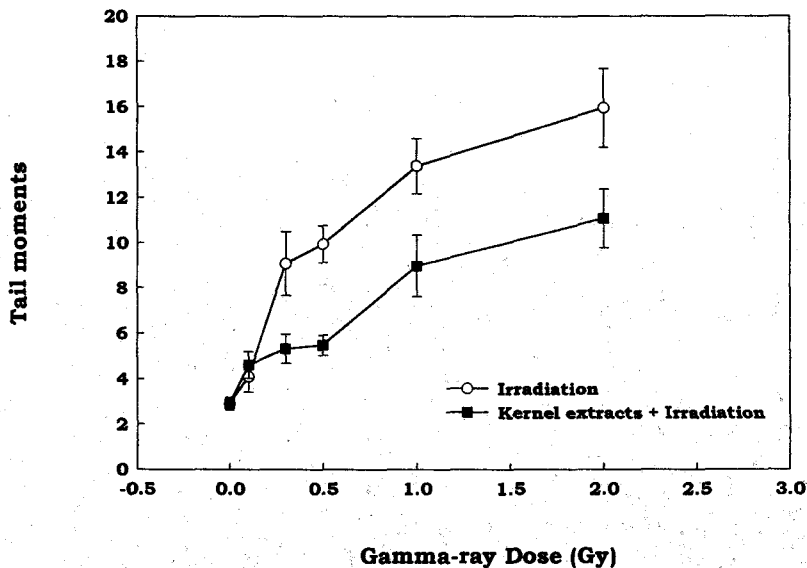


Fig. 2. Effect of peach kernel extracts on tail moment in human lymphocytes exposed to γ -ray doses from 0 to 2.0 Gy. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide).

지금까지 단세포 겔 전기영동 분석법을 사용하였을 때 사람 림프구 DNA 손상유발 선량의 감지 하한은 연구자에 따라 서로 다르다. Singh et al.

사선 방어효과는 비타민 C, E 등과 같은 항산화물질이 나타내는 방어작용 [12~15]과 유사한 결과일 수도 있으나 방사선이 추출물에 함유된 일부

또는 전체 성분에 영향을 주어 방사선 조사후 생성되는 자유라디칼 제거에 직·간접적 영향을 미침으로써 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 방사선량에서는 각 조사선량에 대해서 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 glucose, benzaldehyde 그리고 hydrogen cyanide로 구성되어 있는 화합물로 독성이 없다. 그러나, 이 화합물은 β -glucosidase에 의해 가수분해되었을 때 독성을 가지게 된다. β -glucosidase는 정상 세포보다 trophoblast에 3,000배나 더 많이 존재하고 정상세포에서는 Rhodenase가 생산되어 hydrogen cyanide를 sulfhydryl group과 반응시켜 독성이 없는 thiocyanate로 전환하여 간으로 가거나 혈압을 조절한다. 또, benzaldehyde는 산소와 결합하여 독성이 없는 benzoic acid로 전환된다. 본 실험에 사용한 복숭아씨 추출물에는 amygdalin이 다량 함유되어 있어 amygdalin이 림프구 DNA에 대한 방사선 방어효과를 나타내는 요인의 하나일 가능성이 높다.

Fig. 3.에서는 방사선만을 조사한 림프구와 방사선 조사 전에 추출물을 처리한 림프구의 선량에 따른 개개의 세포에서의 특성에 대한 distribution을 나타내었다. 측정된 0.1 Gy에서부터 2.0 Gy까지 복숭아씨 추출물을 전처리한 실험군은 방사선만을 조사한 실험군에 비해서 DNA의 손상 정도를 나타내는 tail moment가 개개의 세포 수준에서 줄어드는 것이 관찰되었다. 여기서는 Fig 2.에서

관찰되지 않았던 0.1 Gy의 방사선 방어 효과가 개개의 세포 수준에서는 미묘하게 관찰되었다.

각각의 선량이 조사된 실험군들과 방사선을 조사하지 않은 실험군을 t-test를 통하여 통계적으로 비교·분석하였을 때 유의성 있는 차이를 보였으며 ($P < 0.05$) 방사선 선량의 증가에 따른 tail moment의 유의한 증가를 보임으로써 방사선에 의한 DNA 분자의 손상이 뚜렷한 선량-반응 관계를 가지고 있음을 나타내었다.

본 연구의 핵심기법으로 사용된 단세포 겔 전기영동법에 의한 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.

결론

단세포 겔 전기영동법 (해성분석)을 이용하여 감마선에 의한 사람 림프구 DNA 손상을 손쉽게 평가할 수 있다. 해성분석에서 DNA 가닥 절단에 대한 표식인 tail moment의 증가는 감마선에 대해서 뚜렷한 선량-반응 관계를 나타내었으며 복숭아씨 추출물을 전처리한 경우 방사선에 의하여 유발되는 림프구 DNA 손상이 약 30% 이상 감소하였다. 복숭아씨 추출물이 방사선에 의한 생체분자의 손상을 보호하는 방어기능을 가지고 있음이 실험적으로 확인되었다. 단세포 겔 전기영동법은 미세한 수준의 DNA 손상을 감지할 수 있으므로 특정물질의 방사선 방어효능 또는 민감화 효능을 평가하는 데 유용하게 활용될 수 있다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. O. Östling and K. J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**:291-298(1984).
2. 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).
3. D. Anderson, T. W. Yu, B. J. Philips and P. Schmezer, "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).

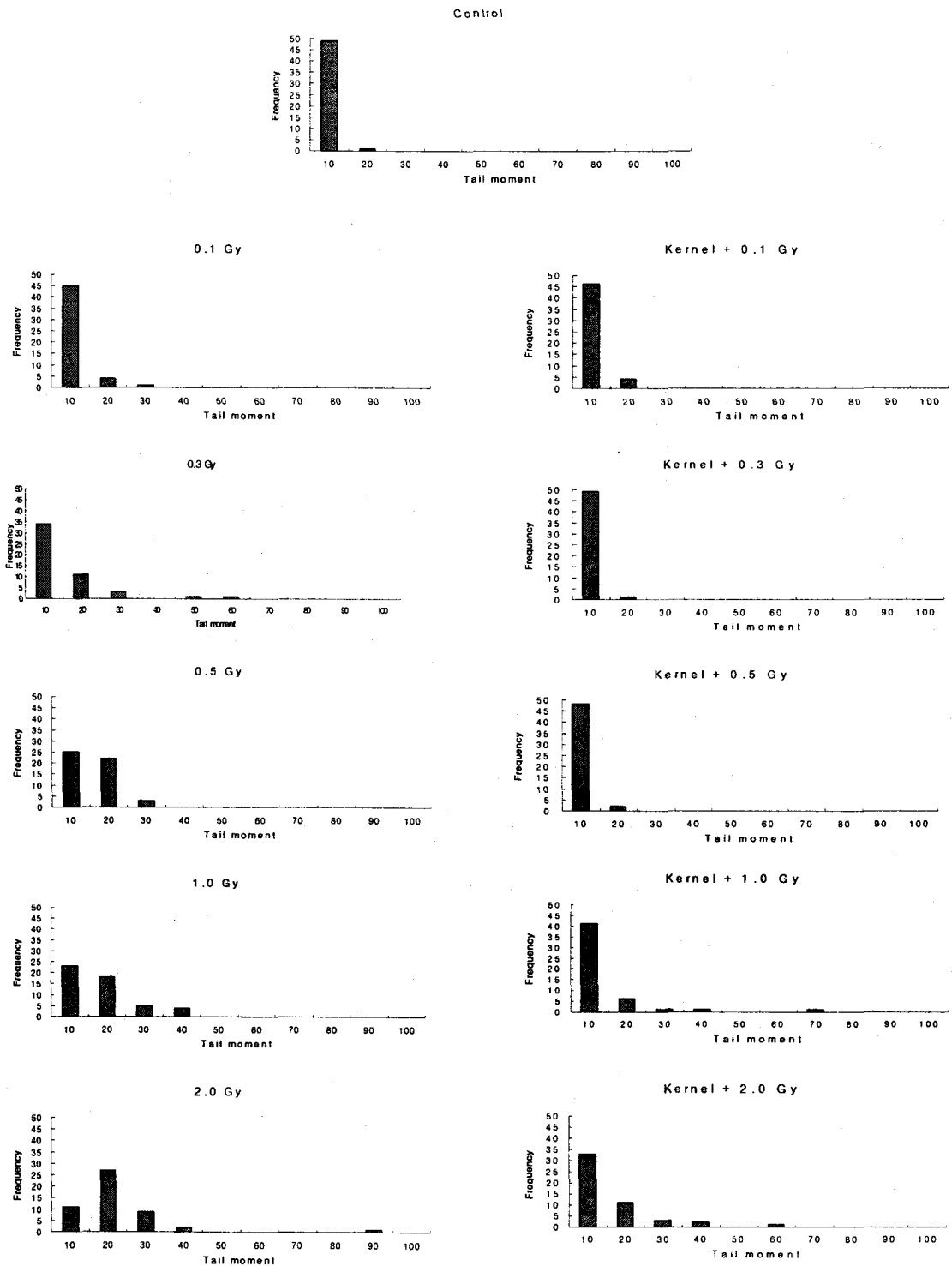


Fig. 3. Reduction of tail moment in the human blood lymphocytes pretreated with peach kernel extracts and then irradiated with gamma-radiation (0~2.0 Gy).

4. B. Holliwell and O. I. Aruome, "DNA-damage by oxygen-derived species", *FEBS Lett.*, **281**:9-19(1991).
5. W. R. Bonorden and M. W. Pariza, "Antioxidant nutrients and protection from free radicals", in: *Nutritional Toxicology*, Raven Press (Ed.), pp. 19-48(1987).
6. J. K. Kim, W. R. Kim, C. J. Lee, H. H. Chang and Y. K. Lee, "Protective effect of pesticide on radiation-induced cell damage in *Tradescantia* 4430 stamen hairs", *Korean J. Environ. Biol.*, **17**:21-26(1999).
7. B. N. Ames, "Micronutrients prevent cancer and delay aging", *Toxicol. Lett.*, **102-103**:5-18 (1998).
8. W. F. Darly, L. O. Peggy and L. O. Kim, "The comet assay: a com-prehensive review", *Mut. Res.*, **339**:37-59(1995).
9. 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).
10. N. P. Singh, M. M. Graham, V. Singh and A. Kahn, "Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ -rays", *Int. J. Radiat. Biol.*, **68**:563-569(1995).
11. 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).
12. M. H. L. Green, J. E. Lowe, A. P. W. Waugh, K. E. Aldridge, J. Cole and C. F. Arlett, "Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells", *Mut. Res.*, **316**:91-102(1994).
13. K. Umegaki, S. Aoki and T. Esashi, "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).
14. H. Sies and W. Stahl, "Vitamin E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants", *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**:1315-1321(1995).
15. M. Konopacka, M. Widel and J. Rzeszowska-Wolny, "Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells", *Mut. Res.*, **417**:85-94 (1998).