

# 단세포 겔 전기영동법을 이용한 생쥐 비장 림프구 DNA 손상에 대한 비타민 C 및 시스테인의 방사선 방어효과

천 기 정, 김 진 규, 김 봉 희\*

한국 원자력 연구소, \*충남대학교 약학대학

## Radiation Protective Effect of Vitamin C and Cysteine on DNA Damage in Mice Splenic Lymphocytes by Single Cell Gel Electrophoresis Assay

Ki-Jung Chun, Jin Kyu Kim and Bong-Hee Kim\*

Korea Atomic Energy Research Institute,  
\*College of Pharmacy, Chung Nam National College, Taejon, Korea

### ABSTRACT

The alkaline comet assay, employing a single-cell gel electrophoresis (SCGE), is a rapid, simple and sensitive technique for visualizing and measuring DNA damage leading to strand breakage in individual mammalian cells. The protecting effect of pretreatment with vitamin C and cysteine on the DNA damage of gamma ray was investigated in mice splenic lymphocytes. Vitamin C and cysteine were administered orally for five consecutive days before irradiation. Four week old ICR male mice were irradiated with 3.5Gy of  $\gamma$ -radiation and were sacrificed 3 days later. Spleens were taken for DNA damage examination by Comet assay and the tail moments of DNA single-strand breaks in the splenic lymphocytes were evaluated. The results show that pretreatment with vitamin C and cysteine were effective in protecting against DNA damage by gamma ray. Administration of antioxidants like vitamin C and cysteine to mice before irradiation was effective in reducing the tail moment of splenic lymphocytes DNA.

**Key words** : DNA damage, gamma ray, antioxidants, vitamin C, cysteine

### 서 론

생체에서의 유전자 물질의 변화 예를 들면 손상조직의 회복이 되지 않던지 (misrepair), 손상정도가 아주 심한 경우 (severe damage)는 암을 유발할 수 있다. 이러한 유전자 물질의 변화는 환경 독성물질 (environmental toxin) 즉, 자외선, 전리 방

사선, 니코틴, 화학물질 등이 원인이 될 수 있다. 이중 전리방사선은 유전정보를 갖는 DNA에 첫번째 표적으로 세포 치사에 관여되는 것으로 알려져 있다. 이러한 DNA 손상을 측정하는 데는 여러 가지 방법이 이용되는데 현재까지 이용된 방법은 염색체이상 (chromosome aberrations), sister chromatid exchanges (SCEs) 및 micronucleus test (MN) 등이 주로 이용되어 왔다. DNA 손상에서 가장 민

감한 end point가 DNA single strand break의 측정이다. 이런 관점에서 개발된 방법이 "Comet assay"이다.<sup>1)</sup> 이 방법은 Rydberg 및 Johanson (1978)<sup>2)</sup>이 microgel상에서 각각의 세포의 DNA 손상을 직접 정량하는 것을 시초로하여 Ostling 및 Johanson (1984)<sup>1)</sup>에 의해 중성 전기영동을 통해서 DNA의 double-stranded breaks를 검출할 수 있게 개조되었으며 동시에 Singh 등 (1988)<sup>3)</sup>에 의해 알카리 전기영동에 의해 single-stranded breaks를 검출할 수 있게 되었다. 그러므로 이 방법은 위험한 환경 독성물질 노출시 생명의 기본적인 code인 cellular DNA의 손상 정도를 결정해 주며 DNA 손상을 직접 현미경상에서 관찰할 수 있는 비교적 새로운 기술로서 human biology, health protection 및 radiation safety에 중요한 의의를 갖는다.<sup>3,4)</sup> 따라서 방사선을 전신 조사받은 생쥐 비장 림프구의 DNA 손상 정도를 관찰하고 잘 알려져 있는 항산화제인 비타민 C 및 시스테인을 방사선 조사전 미리 투여하여 방사선에 의한 DNA 손상 정도를 파악하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 항산화제 투여

실험동물은 ICR계 생쥐(생후 4주) 숫컷 20마리를 사용하여 한그룹당 5마리씩으로하여 정상군, 방사선 조사군, 비타민 C 섭취군 및 시스테인 섭취군 등 4그룹으로 나누었다. 비타민 C 섭취군 및 시스테인 섭취군은 매일 8 mg,<sup>5)</sup> 0.8 mg<sup>6)</sup>씩 1일 1회로 5일간 경구 투여한 후 실험에 사용하였다.

### 2. 방사선 조사

한국 원자력 연구소 소재 코발트-60 선원(선원 강도 150 TBq, Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Limited)에서 선량률을 1 Gy/min로 하여 3.5 Gy를 전신 조사시켰다. 비장은 방사선 조사 후 3일 경과한 다음 적출하여 사용하였다.

### 3. 비장 림프구의 분리

생쥐 ICR계 암컷의 비장을 적출하여 주사기로 으깨어 PBS (pH 7.0)로 채취하여 비장 림프구는 Ficoll-histopaque gradient (Pharmacia)를 사용하여

24°C에서 400 rpm, 4분간 원침 (Mega 17 R, Hanil) 한 후 분리하고 4°C에서 250 rpm, 10분간씩 두 번 원침하여 Ficoll을 제거한 후 PBS (pH 7.0)에 희석하여 시료로 사용하였다.

### 4. 슬라이드 제작 및 전기영동

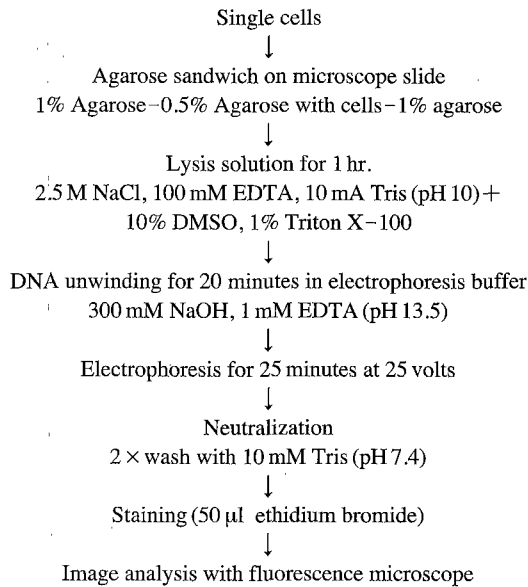
슬라이드에 200 µl의 1% agarose (Sigma)로 첫 번째 층을 입힌 후 그위에 splenocyte를 37도에서 low melting point (LMP) agarose (Sigma)의 최종 농도가 0.5%가 되도록 현탁시켜 100 µl로 두 번째 층을 덮어 고체화시킨다. 그 후 100 µl의 0.5% LMP agarose로 세 번째 층을 덮어 고체화 시킨다. 이렇게 완성된 슬라이드는 1% Triton X-100 (Sigma)과 10% DMSO (Merck)를 사용전에 첨가한 colding lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA-disodium, 10 mM Tris, pH 10)에 최소 1시간 동안 high salt solution에 담갔다. 그 후 알카리성의 전기영동 용액 (0.3 M NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA)에서 0.75 V/cm, 300 mA로 25분간 전기영동하여 DNA를 unwinding시켜 supercoiling을 풀어주었다.

### 5. 형광염색 및 검경분석

전기영동한 슬라이드는 물로 세척하고 0.4 M Tris buffer (pH 7.5)를 몇방울 떨어뜨려 5분간 중성화를 3번 수행하였다. 그 후 buffer를 제거하고 50 µl의 ethidium bromide (20 µl/ml, Sigma)로 5분간 염색하였다. 염색한 슬라이드는 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 ×400으로 확대하여 검경하고 Image Analysis System Software (Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)를 통하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

비장은 면역체계에서 매우 중요한 역할을 하는 기관으로 방사선 조사에 의한 비장 림프구의 DNA 손상 정도를 Comet assay (Fig. 1)를 이용하여 파악하는 것은 방사선 조사에 의한 생물학적 영향을 평가하는데 중요한 의의를 갖는다. Comet assay를 이용한 림프구의 DNA 손상을 평가하는 데는 단순히 전기영동 후 나타나는 DNA 형성의



**Fig. 1.** Flowchart of the protocol for the Comet assay.

**Table 1.** Tail moment of DNA in mice splenic lymphocytes after whole body  $\gamma$ -irradiation of 3.5 Gy pretreated with Vitamin C or cysteine

Treatments	Tail moment (TM) of DNA
Non-irradiated	0.55±0.11
3.5 Gy irradiated	0.76±0.19
Vitamin C + 3.5 Gy	0.57±0.12
Cysteine + 3.5 Gy	0.67±0.13

This value represents S.D.±S.E.

꼬리 길이만을 측정하여 평가 기준을 삼기도 하지만 이는 실제 손상 정도가 지나치게 확대 해석될 수 있는 단점이 있기 때문에 이 단점을 보완한 tail moment값으로 DNA 손상 정도를 평가하였다. Tail moment값은 전기영동 후 얻어진 혜성 모양의 DNA 상으로부터 측정된 머리(head), 꼬리(tail) 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 값으로 다음과 같이 정의되는 tail moment 값을 사용하였다.

Tail moment = [tail mean-head mean] × tail% DNA /100으로 여기서 tail mean과 head mean은 각 부위의 염색강도의 평균값이다.

비타민 C 섭취군 및 시스테인 섭취군에서의 방사선 조사에 따른 tail moment값은 Table 1과 같

다. Table 1에서와 같이 정상군은 0.55±0.11이였으며 3.5 Gy 방사선 조사군에서는 0.76±0.19로 정상군보다 다소 높음을 나타내었으며 비타민 C 섭취군에서는 0.57±0.12로서 거의 정상군과 같은 결과로 방사선 피폭을 감소시켜 비장 림프구에 대한 방사선 방어력을 인지할 수 있었다. 또한 시스테인 섭취군에서도 0.67±0.13으로 방사선 조사군보다는 비교적 낮은 결과로 방사선 방어력을 인지할 수 있었다.

인체의 산화적 스트레스나 과도한 신체적 운동 등에 의해 유도되는 산화적 DNA 손상에 관한 연구로서 항산화제 등 미량 영양소(micronutrient)의 공급이 방어효과를 모니터링하는데 Comet assay를 이용할 수 있음이 보고되고 있다. Green 등(1994)<sup>7)</sup>에 의하면 사람에게 Vitamin C를 투여했을 때 DNA 손상이 현저히 줄었으며 Hartmann 등(1995)<sup>8)</sup>에 의하면 단기간 Vitamin C를 사람에게 투여했을 때에도 같은 효과가 있음을 보고하였고 Pool-Zobel 등(1997,<sup>9)</sup> 1998<sup>10)</sup>에 의하면 6주간 여러 가지 야채를 투여했을 때도 oxidative DNA 손상이 현저히 저하됨을 보고하여 과일이나 야채를 풍부히 섭취하는 음식이 인체의 DNA 손상이나 돌연변이에 저항성 물질이 될 수 있음을 보고하였다. 또한 암유발을 적게 한다고 하는 역학적 연구에 대하여 방어물질이 될 수 있는 음식의 공급은 분자 생물학적 연구에서 DNA 손상의 biomarker로 이용될 수 있음을 보고하고 있다.<sup>11)</sup> 또한 Olive 등(1990)<sup>4)</sup>에 의하면 Comet assay는 방사선에 의해 유도되는 DNA의 손상정도를 파악할 수 있는 기초 결과가 될 뿐만 아니라 인체의 암(human cancer)에 방사선 치료함에 있어 유효성을 예견하는데 이용할 수 있음을 보고하였다. 그밖에 Collins(1992)<sup>12)</sup>는 DNA를 손상시키는 물질의 분석에도 이용할 수 있음을 보고하여 향후 이 방법을 도입하여 발전시키면 방사선 생물학 분야에 획기적인 발전을 이룩할 수 있을 것으로 사료된다.

Comet assay의 새로운 기술이 개발되기 이전에는 비장 세포로 FACS를 이용하여 비장 세포의 수적 분포도로서 방사선 방어력을 관찰하였으나 본실험 결과로 볼 때 Comet assay를 이용하여 DNA 손상 정도를 파악한 결과, 정상군에서는 tail moment가 가장 적게 나타났고 방사선 조사군과

항산화제 섭취군에서 비교할 때에는 항산화제 섭취군에서 tail moment가 방사선 조사군에서 보다 적게 나타남을 보여 항산화제 섭취가 방사선 피폭을 감소시키는 효과를 DNA 손상 정도를 통해서 알 수 있었다.

따라서 Comet assay를 통한 세포의 방사선 영향을 신속하고 정량적으로 평가할 수 있기 때문에 특정물질의 방사선 방어 또는 민감 효능 평가에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

방사선 방어제에 대한 생물학적 검색중 잘 알려진 항산화제중 비타민 C 및 시스테인을 방사선 선처리하여 비장 림프구의 DNA 손상 정도를 Comet assay를 이용하여 tail moment값을 조사한 결과, 비타민 C 및 시스테인이 방사선에 의해 유도되는 비장 림프구의 DNA 손상을 다소 감소하는 것으로 나타나 이들 항산화제가 비장 림프구에서 방사선 방어효과가 있음을 알 수 있었으며 또한 방사선 방어제 검색에 있어서 비장 림프구를 이용한 Comet assay가 유용한 방법이 될 수 있음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Osrling O and Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 123 : 291-298.
2. Rydberg B and Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells, in : Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox C.F.(Eds.), *DNA Repair Mechanism*, Academic Press, New York, 1978; 465-468.
3. Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exptl. Cell Res.* 1988; 175 : 184-191.
4. Olive PL, Banath JP and Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiat. Res.* 1990; 122 : 86-94.
5. Khan PK and Sinha SP. Ameliorating effect of vitamin C on murine sperm toxicity induced by three pesticides (endosulfan, phosphamidon and mancozeb) *Mutagenesis.* 1996; 11 : 33-36.
6. el Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J. Pharm. Belg.* 1998; 53 : 87-93.
7. Green MHL, Lowe APW, Waugh KE, Aldridge J, Cole CF and Arlett. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human white blood cells. *Mutat. Res.* 1994; 316 : 91-102.
8. Duthie SJ, Ma A, Ross MA and Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 1996; 56 : 1291-1295.
9. Pool-Zobel BL, Bub A, Muller H and Wollowski GR. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans : first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis.* 1997; 18 : 1847-1850.
10. Pool-Zobel BL, Bub A, Liegibel UM, Treptow-Van-Lishaut S and Rechkemmer G. Mechanisms by which vegetable consumption reduces genetic damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7 : 891-899.
11. Kassie F, Parzefall W and Knasmuler S Single cell gel electrophoresis assay : a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 2000; 463 : 13-31.
12. Collins AR. Meeting report of the workshop on single cell gel electrophoresis. *Mutagenesis.* 1992; 7 : 357.