Korean J. Environ. Biol. 19(1) : 19~24(2001)

환경재해 방지를 위한 생물정보로서의 사람 림프구 DNA 손상에 대한 방사선과 살충제의 상승작용

김 진 규

한국원자력연구소

Synergistic Interaction of Radiation with Pesticide on DNA Damage in Human Lymphocytes as Biological Information for Prevention of Environmental Disaster

Jin Kyu Kim

Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353, Korea

Abstract - Agricultural pesticides may cause certain biological risks since they are widely used to eradicate pests. Agricultural disasters may arise even from the possibility of their synergistic interaction with other harmful enviromnetal factors. 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 0~2.0 Gy of ^{60}Co 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 shows the synergistic interaction with radiation on DNA damage as well. The results may have a role of providing biological information necessary for the prevention of environmental disaster.

Key words : lymphocytes, pesticide, radiation, synergism, disaster-prevention

서 론

살충제, 살균제, 제초제 등 다양한 농약이 균, 선충, 곤충, 쥐, 기타 동식물 및 바이러스 등에 의한 농작물의 피해를 방지하고 농업 생산성을 증대시키기 위하여 광범위하게 사용되고 있다. 표적생물에는 독성이 강하고 사람을 비롯한 기타 생물에는 무해한 선택독성(selective toxicity)이 높을수록 좋으며 선택독성이 높은 농약으로는 유기인계 살충제가 있다(고 등 1995). 특히 유기인계 살충제는 강한 살충력을 나타내지만 선택성이 약하기 때문에 포유동물과 사람에 대해서도 강한 독작용을 나타내는데 대표적인 종류로는 파라치온(parathion)이 이에 속한다. 현재까지 널리 사용되고 있는 살충제인 파라치온을 비롯한 말라치온은 대사생성물과 분해생성물, 그리고 그와 섞인 혼합불순물이 살충제 원래 형태보다 더 독성이 있는 것으로 알려 졌다(Nomeir and Dauterman 1979; Tallcott *et al.* 1979). 사용량이 지속적으로 증가하고 있는 농약의 경우 인체에 대한 위해 요소로서의 위험성이 따라 증가되고 있을 뿐 아니라 환경 재해로 이어질 가능성을 안고 있다.

한편, 생물체가 이온화 방사선에 노출되었을 때 나타

* Corresponding author: Jin Kyu Kim, Tel. 042-868-2057, Fax. 042-868-2091, E-mail. jkkim@kaeri.re.kr

나는 생물학적 손상은 DNA나 세포의 거대분자들의 손상과 관련된 자유 라디칼에 기인하며 (Holliwell and Aruome 1991) 방사선에 의하여 유발되는 DNA의 손상 정도는 방사선 이외의 물리화학적 요인에 의하여 달라지게 된다 (Cebulska-Wasilewska *et al.* 1988; Cebulska-Wasilewska *et al.* 1998). 특히 여러 가지의 불리한 자극이 복합적으로 생물체에 가해지면 상승작용 (synergistic interaction)을 일으켜 각각의 자극에 의한 손상의 합보다 더욱 큰 손상을 나타내는 경우가 많다 (Petin *et al.* 2000; Kim *et al.* 2001). 한편, 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 나타나기도 했다 (김 등 1999a).

환경내 재해요소의 강도와 생물체의 특성을 연계한 생물 방재적 연구 사례가 활발히 보고되기 시작하였다. 방사선 지표생물을 이용한 환경방사선의 방재적 감시연구에서와 같이 특정 식물체의 세포계에 나타나는 변화 또는 손상을 근거로 하여 환경 내에서 일어나는 재해의 생물학적 영향을 평가하기 위한 시도가 이뤄지고 있으며 (김 등 2000) 또한 고등동물에 있어서 외부 자극에 매우 민감한 생물말단점 (biological end-point)인 원시난포의 퇴화율을 이용하여 생물체 외부 방사선에 의한 생물학적 위해도를 평가하는 연구 (이 등 1999)도 이뤄지고 있다.

지난 수년 동안에 단세포 겔 전기영동법 (일명, 혜성분석)에 대해 많은 관심이 증대되어 왔고 많은 보고들이 이 방법을 사용하여 수행된 연구결과일 뿐 만 아니라 새로운 분야에 대한 응용결과도 점차 팽창되고 있다 (Östling and Johanson 1984; Singe *et al.* 1988; Anderson *et al.* 1994; 김 등 1999b). 혜성분석의 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.

본 연구는 단세포 겔 전기영동법을 이용하여 살충제 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

림프구 시료

건강한 실험실 자원자 (남, 28세)로부터 말초혈액을 채취하였다. Ficoll-Histopaque 1077 (Pharmacia Co.) 200 μl 위에 헤파린이 처리된 혈액 100 μl와 10% FBS (fetal bovine serum)을 함유한 RPMI 1640 배지 (Sigma Co.) 200 μl혼합액을 넣고 4°C 하에서 4분간 원심분리 (400 × g)하여 림프구를 분리하였으며 분리된 ficoll 층을 차거운 PBS 1 ml로 세척하였다. 분리된 림프구는 trypan blue exclusion에서 생존률 (95% 이상)을 확인한 다음 tube당 약 20,000개의 세포로 분주하였다.

파라치온의 처리

살충제의 처리는 상용중인 파라치온 유제 (제일화학, 1997년 1월 제조)를 구입하여 제품에 기재된 일반적인 살포농도인 1 mgl^{-1}를 기준으로 5 및 10 mgl^{-1} (ppm)로 조제하여 4°C에서 10분간씩 처리하였다.

방사선 조사

한국원자력연구소의 코발트 감마선원 (^{60}Co, 선원강도 150 TBq, Panoramic Irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)을 이용하여 4°C에서 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.

슬라이드제작 및 전기영동

방사선 조사가 끝난 다음 손상된 DNA 분자의 수복을 방지하기 위하여 모든 절차는 4°C 하에서 이뤄졌다. 슬라이드 상에 200 μl의 1% agarose (Sigma Co.)로 첫 번째 층을 입힌 다음 고체화시키고 그 위에 림프구들을 37°C에서 low melting point (LMP) agarose (Sigma Co.)의 최종 농도가 0.5%가 되도록 현탁시키고 100 μl로 두 번째 층을 덮는다. 림프구가 포함된 두 번째 층을 간단히 고체화시킨 다음 100 μl의 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 Na_2EDTA)에서 20분 동안 전기영동에 방해가 될 detergent를 제거하면서 평형을 유지시켰고 동시에 DNA를 unwinding시켜 supercoiling을 풀어주었다. 그 후 전기영동은 0.75 Vcm^{-1}, 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 μl의 ethidium bromide (20 μgml^{-1}, Sigma Co.)로 염색하였으며 염색결과 생성된 comet을 CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 광학현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan) 하에서 exitation 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)을 통하여 분석하였다.

결과 및 고찰

림프구의 DNA 손상 정도를 측정하는 것은 일반적으로 체내의 세포 손상을 측정하는 대표적 방법으로 간주되고 있다 (김 등 1999b). 단세포 겔 전기영동 분석에서 림프구의 DNA strand breaks 정도는 정상 세포와 손상받은 세포에서 형태학적으로 현격한 차이를 보인다. 정상적인 세포는 핵체로 생각되는 원형의 양상을 나타내고 손상 받은 세포는 head와 tail로 구성된 혜성 (comet)의 양상을 나타낸다 (McKelvey-Martin *et al.* 1993; Darley *et al.* 1995). 실험에 앞서 실시된 분석에서 림프구의 생존률이 95% 이상을 보였다는 점은 혜성분석에서 방사선을 조사하지 않은 림프구의 모양 (intact cell)으로도 간접확인이 가능하였다. 혜성분석 실험을 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. 전기영동후 얻어진 혜성모양의 DNA 상으로부터 측정한 head, tail 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 tail moment 값을 사용하여 전술한 단점을 보완할 수 있기 때문에 실험결과를 다음의 (1)식으로 정의되는 tail moment 값으로 표현하였다.

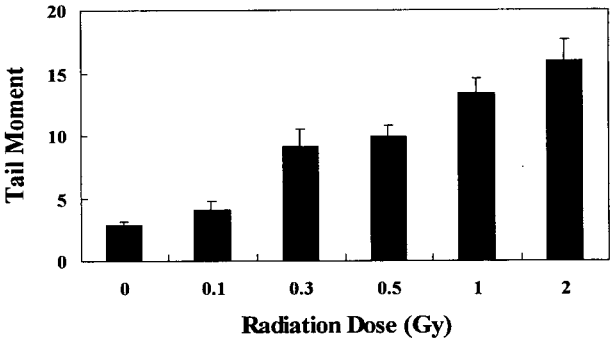

Fig. 1. Dose-response relationship of DNA damage in human lymphocytes exposed to γ-ray doses from 0 to 2.0 Gy. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide).

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

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±1.73의 값을 보여 방사선량의 증가에 림프구 DNA의 손상도가 뚜렷하게 증가하는 것을 보여주었다. 인체에 있어서 림프구는 방사선에 가장 민감한 세포군의 하나 (서 등 1995)일 뿐 아니라 방사선 이외의 물리화학적 자극에 의해서도 쉽게 손상 받기 때문에 림프구 DNA는 환경재해의 생물학적 영향을 파악하는데 매우 유용한 생물말단점인 것이다.

살충제 파라치온이 나타내는 인체독성을 확인하기 위해서 파라치온을 10분간 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 mgl^{-1}인 경우 DNA 손상도는 별로 높지 않았으나 5 mgl^{-1} 이상의 고농도에서는

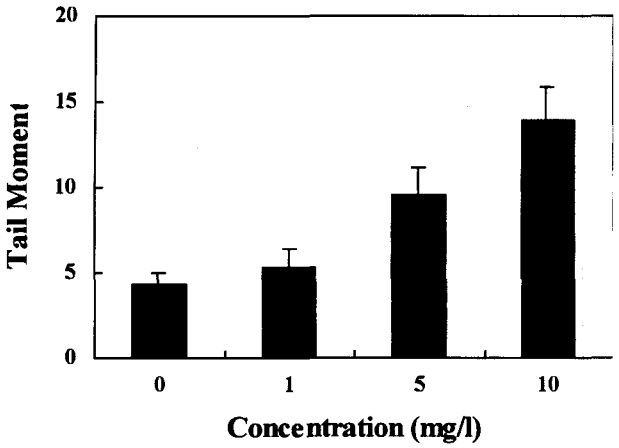

Fig. 2. DNA damage in human lymphocytes treated with various concentrations of parathion. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide).

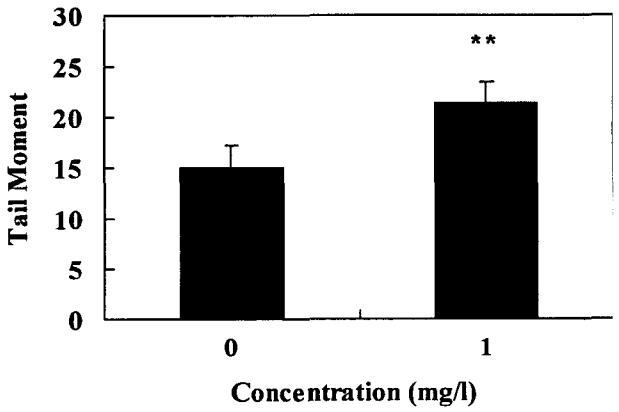

Fig. 3. DNA damage in human lymphocytes exposed to 2 Gy of γ-ray after pretreatment with 1 mgl^{-1} of parathion. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide) (**, $p<0.01$).

아주 높은 tail moment 값을 보여 파라치온이 강한 유전독성을 가지고 있음을 나타내었다.

파라치온의 농업 권장 사용농도인 1 mgl^{-1}에서 나타나는 DNA 손상은 대조군에 비해 약간 상승된 값을 보였으나 그 차이가 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 파라치온 1 mgl^{-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 mgl^{-1}만을 처리했을 때 5.3±1.13였으나 두가지 요인이 복합적으로 작용하였을 때는 21.3±2.17로 유의한 증가를 보였다 ($p<0.01$). 권장 사용농도인 이하에서도 파라치온이 방사선과 함께 작용할 경우 synergistic interaction을 통해 뚜렷한 DNA 손상을 초래하게 된다는 것이 실험적으로 입증되었다. Fig. 4는 권장 사용농도의 파라치온과 2.0 Gy의 방사선이 림프구 DNA 손상에 대해 나타내는 상승작용을 비교하기 쉽게 보여주고 있다. 이와 같은 실험 결과는 환경재해에 따른 생물학적 위해(risk)를 평가할 때 두 가지 이상의 불리한 요인에 의해 나타나는 상승작용을 반드시 고려해야 함을 의미한다.

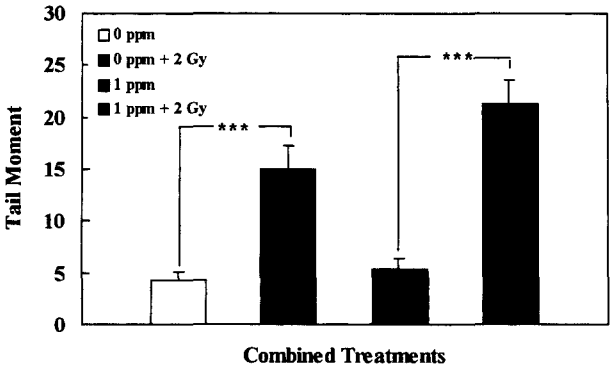

Fig. 4. Synergistic interaction of parathion with radiation on DNA damage in human lymphocytes. Error bars represent the standard error of the mean among 50 cells (25 cells per each slide) (***, $p<0.001$).

한편, 파라치온의 생물학적 위해도는 평가에 사용된 생물체에 따라 각기 다르게 나타날 수 있다. 김 등 (1999a)은 자주달개비 수술털세포의 분홍돌연변이율을 통하여 방사선과 파라치온의 복합작용을 분석하였다. 자주달개비 *Tradescantia* BNL 4430 식물체의 화서에 1 mgl^{-1} 농도의 파라치온 만을 살포한 경우 수술털세포에 나타난 유전자돌연변이는 자발돌연변이율(spontaneous mutation rate)의 범위에 머무른다. 그러나 1 mgl^{-1}의 파라치온을 24시간 전에 살포한 자주달개비 화서에 방사선을 조사한 경우 방사선 만을 조사한 경우보다 유전자돌연변이율이 낮게 나타났다. 이 같은 일종의 길항작용으로서의 방사선 방어효과(radioprotective effect)는 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 손상유

발 선량의 감지 하한은 연구자에 따라 서로 다르다. Singh *et al.* (1995)은 감마선의 검출하한을 0.001 Gy로 보고하였으며, Plappert (1995)은 X선에 대해서 0.01 Gy의 검출하한 선량을 보고한 바 있다. 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.

본 연구의 핵심기법으로 사용된 단세포 겔 전기영동법은 고등동물 세포에 대한 화학적, 생물학적 손상을 평가하는 새로운 방법으로서 다른 기존의 DNA 손상평가 방법보다 민감하고 신속하며 쉬운 방법이다. 특히 인체에 대한 방사선 및 기타 유해 환경요인의 영향을 신속하고 정량적으로 평가할 수 있기 때문에 특정요인의 생물학적 위해도 평가는 물론 농약 및 기타 유해 요인에 의한 복합적 생물영향을 파악함으로써 농업재해 예방과 대책 마련에 필수적인 생물학적 정보를 제공할 수 있는 수단이다.

적 요

병해충을 막기 위해 농업용 살충제가 광범위하게 사용되고 있다. 농약사용에 따른 생물학적 위해가 우려되며 농약이 또 다른 환경유해요인과 인체에 상승적으로 작용할 경우 농업재해로 이어질 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 0~2.0 Gy의 방사선으로 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. 이와 같은 결과는 환경재해의 방재 및 예방 조치에 필요한 생물정보를 사전에 제공하는 의미를 가진다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구사업의 일환으로 수행되었습니다.

인 용 문 헌

고석태, 김학성, 유항목, 성연희, 오기완, 임동구, 장성재, 허근, 홍연탁. 1995. 독물학. 정문각. 서울.

김진규, 김원록, 이창주, 장화형, 이영근. 1999a. 자주달개비 수술털에서 방사선에 의해 유발되는 세포손상에 대한 살충제의 방어효과. 환경생물학회지, 17:21-26.

김진규, 박태원, 이창주, 채영규. 1999b. 단세포 겔 전기영동법을 이용한 사람 림프구 DNA 손상에 대한 복숭아씨 추출물의 방사선 방어효과 평가. 방사선방어학회지, 24:93-99.

김진규, 천기정, 이동우. 2000. 지표생물을 이용한 방사선의 방재적 감시 연구. 방재연구, 3:33-45.

서두환, 김재록, 김진규. 1995. 원자력기초이론. 한국원자력연구소, 대전.

이창주, 박호현, 윤용달, 김연구, 김진규. 1999. 전신조사된 생쥐 난소내 원시난포의 급성퇴화. 방사선방어학회지, 24:87-92.

Anderson D, TW Yu, BJ 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.

Cebulska-Wasilewska A. 1988. Interaction between radiation and chemical mutagens in the induction of somatic mutations. Nukleonika. 33:137-148.

Cebulska-Wasilewska A, D Nowak, W Niedzwiedz and D Anderson. 1998. Correlations between DNA and Cytogenetic Damage Induced after Chemical Treatment and Radiation. Mutat. Res. 421, 83-91.

Darly WF, LO Peggy and LO Kim. 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mut. Res., 339:37-59.

Holliwell B and OI Aruome. 1991. DNA-damage by oxygen -derived species. FEBS Lett., 281:9-19.

Kim JK, VG Petin and GP Zhurakovskaya. 2001. The importance of synergistic interaction at low intensity of harmful environmental agents. Journal of Radiation Research (in press)

McKelvey-Martin VJ, MHL Green, P Schmezer, BL Pool-

Zobel, MP De Meo and A Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mut. Res., 288:47-63.

Nomeir AA and WC Dauterman. 1979. *In vitro* degradation of malathion by mouse liver. Biochem. Pharmacol. 27: 2975-2976.

Östling O and KJ Johanson. 1994. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 123:291-298.

Petin VG, JK Kim, GP Zhurakovskaya and AV Rassokhina. 2000. Mathematical description of synergistic interaction of UV-light and hyperthermia for yeast cells. J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 55:74-79.

Plappert U, K Raddatz, S Roth and TM Fliedner. 1995. DNA-damage detection in man after radiation exposure-the comet assay-its possible application for human biomonitoring. Stem Cells, 13:215-222.

Singh NP, MT McCoy, RR Tice and EL Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res., 175:184-191.

Singh NP, MM 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.

Tallcott RE, NM Mallipudi, N Umetsu and TR Fukuto. 1979. Inactivation of esterase by impurities isolated from technical Malathion. Toxicol. Appl. Phamacol. 49:107-112.

(Received 29 January 2001, accepted 14 February 2001)