Korean J. Environ. Biol. 29 (3) : 236~240 (2011)

이온화 방사선에 의해 손상된 *Eisenia fetida* 체강세포의 DNA 수복에 수은이 미치는 영향

류태호[1,3] · 모하마드닐리[2] · 안광국[3] · 김진규[1,*]

[1]한국원자력연구원 방사선과학연구소, [2]스페인 도네쉬방사선연구소,
[3]충남대학교 생명시스템과학대학

Influence of Mercury on the Repair of Ionizing Radiation-induced DNA Damage in Coelomocytes of *Eisenia fetida*

Tae Ho Ryu[1,3], Mohammad Nili[2], Kwang-Guk An[3] and Jin Kyu Kim[1,*]

[1]*Korea Atomic Energy Research Institute, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup 580-185, Korea*
[2]*Dawnesh Radiation Research Institute, Barcelona 08007, Spain*
[3]*College of Bioscience and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

Abstract − **Mercury known as quicksilver, is the most common cause of heavy metal toxicity. Toxicity caused by excessive mercury exposure is now being recognized as a widespread environmental problem and is continuing to attract a great deal of public concerns. The mercury genotoxicity could be its effect on DNA repair mechanisms, which constitute the defense system designated to protect genome integrity. The objective of this study is to confirm that mercuric chloride inhibits the repair of gamma ray-induced DNA damage. The earthworm of *Eisenia fetida* was chosen for this study because it is an internationally accepted model species for toxicity testing with a cosmopolitan distribution. Experiments were done to identify the levels of DNA damage and the repair kinetics in the coelomocytes of *E. fetida* irradiated with 20 Gy gamma rays alone or with gamma rays after 40 mg kg^{-1} $HgCl_2$ treatment by means of the single cell gel electrophoresis assay. The Olive tail moments were measured during 0～96 hours after irradiation. The repair time in the animals treated with the combination of $HgCl_2$ and ionizing radiation was nearly five times longer than that in the animals treated with ionizing radiation alone. Also, *E. fetida* exposed to mercury showed a statistically lower repair efficiency of gamma ray-induced DNA damage. The results suggest that the mercury could even have deleterious effects on the DNA repair system. Influence of mercury on the DNA repair mechanisms has been confirmed by this study.**

Key words : mercury, DNA repair competence, radiation, SCGE assay, coelomocytes, *Eisenia fetida*

* Corresponding author: Jin Kyu Kim, Tel. 063-570-3130,
Fax. 063-570-3139, E-mail. jkkim@kaeri.re.kr

서 론

수은은 상온에서 액체인 은백색의 금속 원소로서, 자연 상태에서 주로 원소 수은(Hg^0), 무기 수은(Hg^{2+}), 유기 수은($R{\cdot}Hg^+$ 또는 $R{\cdot}Hg{\cdot}X$)의 세 가지 형태로 존재한다. 원소 수은은 체온계, 치과용 아말감 등에서 발견되고 쉽게 증발되는 특성이 있으며, 호흡작용으로 체내 흡수된 수은 증기의 80%는 혈액-뇌관문을 관통해 중추신경계의 장애를 일으키거나 임산부의 태반을 통과하여 태아에게 치명적인 영향을 미칠 수 있다(Oauah 2000). 수은 증기는 위장관계에서 수은 설파이드로 전환되어 배설되지만, 신장에 도달한 수은은 지용성 가스에 실려 모든 중추신경계에 전달된다. 원소 수은은 토양이나 수생 미생물에 의해 메틸화되어 유기 메틸수은으로 전환될 수 있다. 원소 수은과 메틸수은의 대사산물은 단백질의 변성, 효소 활성의 저해, 막수송운반을 방해하고, 그 외 신경전달물질을 흡수하거나 방출하는 등의 독성작용을 일으킨다(Clarkson 2002). 무기 수은(수은염)은 원소 수은 증기나 메틸수은의 대사과정을 통해 생성되며, 화장품, 완하제, 이뇨제, 소독약 등에 첨가되어 있다. 무기 수은은 간에서 글루타치온과 결합한 후, 시스테인-수은 또는 글루타치온-수은의 복합체를 형성하여 담즙으로 분비된다. 가장 독성이 강하고 흔하게 존재하는 형태의 수은인 유기 수은은 메틸수은의 형태로 어류의 체내에 축적되어 먹이사슬의 과정을 거쳐 사람에게까지 흡수된다.

수은이 다양한 기작을 통해 조직과 유전자에 미칠 수 있는 생화학적 손상에는 중추신경계 세포내 칼슘 항상성 방해, 막 전위 방해, 흥분성 아미노산 경로 방해 및 단백질 합성 오류 등이 있다(Yee *et al.* 1996). 특히 메틸수은은 미토콘드리아 손상, 지질 과산화, 미소관 파괴를 유도하며, 세로토닌, 아스파르트산염, 글루타민산염의 축적을 발생시켜 체내에서 신경독성학적인 작용을 한다. 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아의 손상은 메틸수은에 의한 신경독성 중 가장 먼저 나타나는데(Goyer 1991), 인간을 비롯한 다양한 동물이 수은에 노출되면 이러한 독성 작용으로 인해 신경, 신장 및 위장관계에 궤양과 출혈을 동반하는 조직손상이 발생하게 된다. 게다가 수은으로 인한 활성 산소종의 발생과 체내 항산화 기작의 변화는 세포막을 손상시키는 결과를 초래한다(Stohs and Bagchi 1995).

한편, 수은과 그 화합물은 다양한 기작을 통해 생물에 유전독성을 발생시킨다. 수은과 DNA 분자 사이의 상호작용을 살펴보면, 한 개의 유기 또는 무기 수은 화합물은 DNA 나선의 염기쌍과 각각 결합하여 DNA의 2차 구조를 직접적으로 변화시킨다. 수은 화합물은 다양한 발암의 원인 중 하나인 활성산소종을 증가시켜 세포의 직접적인 손상을 가져오며, 핵산에서 자유라디칼을 발생시켜 다양한 유전적 변이와 단백질의 형태 변화를 유도한다. 또한 유사분열시 방추사 형성을 방해하는 등의 기작을 통해 생물에 유전독성을 일으키기도 하며(Crespo-López *et al.* 2009), 수은의 유전독성은 유전자 방어시스템과 관련된 DNA의 수복 기작에 영향을 미친다.

지금까지 금속과 생체 내 DNA의 손상 및 수복에 관련된 연구는 니켈, 크롬 등을 중심으로 수행되어 왔으며, 이러한 중금속들은 공통적으로 DNA 수복에 관여하는 효소에 작용하여 손상을 가중시킨다(Chen *et al.* 2009; Sellappa *et al.* 2010). 따라서 본 연구는 환형동물인 *Eisenia fetida*를 대상으로 수은이 생체 내 DNA 수복에 미치는 영향을 알아보고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 처리

본 실험에 사용된 공시 동물은 토양 지표에 서식하는 *Eisenia fetida*(줄지렁이)로서 앞서 기보고된 논문을 바탕으로 실험실 내에서 사육하였으며(류 등 2011), 평균 중량이 350 mg으로 환대가 잘 발달된 성체만을 실험에 이용하였다.

*E. fetida*를 40 mg kg^{-1} 농도의 수은에 직접 노출시키기 위해 증류수에 염화수은(II)을 용해시키고 건조된 배양토와 잘 섞어 준 후 배양 용기(105×82×68 mm)에 0.12 kg씩 넣었다. 배양 용기는 수분 증발 억제와 지렁이의 탈출 방지를 위해 플라스틱 뚜껑을 덮어 주었으며, 원활한 호흡을 위해 용기의 바닥과 뚜껑에 직경 1 mm의 구멍을 약 20개씩 뚫었다. 줄지렁이는 염화수은(II)의 유무에 따른 수은 처리군과 대조군으로 나누어 각각의 용기당 15마리씩 넣어 사육 시와 동일한 조건으로 48시간 동안 배양하였다.

2. 이온화 방사선 조사

생물의 DNA 수복기작에 수은이 미치는 영향을 알아보기 위해 *E. fetida*에 방사선을 조사함으로써 산화적 스트레스에 의한 유전자 손상을 인위적으로 발생시켰다. 이온화 방사선은 한국원자력연구원 방사선과학연구소의 ^{60}Co 감마선원(선원강도, 7.4 PBq)을 이용하여 20 Gy의 선량을 줄지렁이에 조사하였다. 방사선 조사는 Petri dish의 내부에 증류수로 적신 여과지를 깔아 수분공급을 유

지시킨 상태로, 한 개의 Petri dish 당 3～10마리씩의 지렁이를 넣어 수행하였다. 조사가 끝난 시료는 빛이나 온도에 의한 영향을 최소화하기 위해 검은 천으로 덮고 얼음이 담긴 아이스박스 안에 넣어 이동시켰다.

3. 체강세포 수집

*E. fetida*의 체강세포 수집을 위해 Eyambe *et al.* (1991)과 Diogène *et al.* (1997)이 제안한 비침습성 기술을 약간 변형하여 체액을 배출시켰다. 지렁이를 증류수로 헹궈 배양토를 제거하고 1 mL의 차가운 extrusion 용액 (5% ethanol, 95% saline, 2.5 mg mL^{-1} EDTA, 10 mg mL^{-1} guaiacol glycerol ether)에 넣어 얼음 위에서 3분간 방치했다. 체강세포가 함유된 체액이 방출되면 Eppendorf tube에 용액을 옮기고 4°C에서 380 ×g로 5분간 원심분리하여 조심스럽게 상층액만 버렸다. 튜브의 바닥에 남은 세포 침전물은 380 ×g에서 PBS (Phosphate-buffered saline)로 두 번 헹궈낸 후 100 μL의 PBS를 넣어 재부유시켰다.

4. 단일세포 겔 전기영동 시험

본 시험은 각각의 단일세포에서 DNA 가닥의 절단을 측정하는 분석 기법 (Rydberg and Johanson 1978)으로서 Singh (1988)에 의해 서술된 절차를 토대로 진행하였다. 실험진행 과정 중 외적인 환경요인으로 발생할 수 있는 DNA 손상을 최소화하기 위하여 모든 과정은 냉암소의 조건하에서 수행하였다. 실험에 앞서 1% NMA (normal melting point agarose)로 미리 코팅해둔 슬라이드 글라스에 PBS로 부유시킨 체강세포 20 μL와 0.5% LMA (low melting point agarose) 200 μL를 혼합하여 떨어뜨린 후 커버 글라스를 덮어 전체적으로 퍼지게 했다. 슬라이드 글라스를 4°C에서 20분간 굳히고 커버 글라스를 벗겨낸 뒤, 200 μL의 0.5% LMA로 한 층을 덧입혀 한 번 더 굳혔다. 이렇게 주조된 슬라이드는 4°C lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 10% dimethylsulfoxide, 1% Triton X-100, pH 10)에 2시간 이상 담가 세포를 용해시켰다. 증류수로 슬라이드를 헹궈 남은 용액을 제거하고, 4°C 전기영동 버퍼 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, ＞pH 13)에서 20분간 나선풀림을 유도한 후, 25 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 실시했다. 전기영동이 끝난 슬라이드는 neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5)로 5분간 두 차례 중성화과정을 거치고, absolute alcohol에 10분간 담가 탈수과정을 거친 뒤 실온에서 건조시켰다. 건조된 슬라이드 글라스는 80 μL의 EtBr (Ethidium Bromide) 용액 (20 μg mL^{-1})으로 염색하여 형광현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan)에서 200배 율로 검경하고, Komet ver. 4.0 image analysis (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK)를 이용하여 각 시료 당 총 100개의 핵을 관찰하여 나온 데이터를 통해 Olive tail moment값으로 계산했다.

5. 통계학적 분석

대조군과 실험군의 유의성 검정은 Student's *t*-test를 통해 비교하였으며, *p*값이 0.005 이하인 경우만을 유의하다고 판정하였다.

결과 및 고찰

방사선 조사에 의해 손상된 생물의 DNA 수복 속도가 수은 처리의 유무에 따라 어떤 차이를 나타내는지 알아보기 위하여, 방사선 조사 직후 각각의 실험군에서 측정된 OTM 값을 DNA의 손상률 100%로 환산하였다 (Fig. 1). 그 결과, 20 Gy의 감마선에 노출시킨 *E. fetida*는 방사선 조사 후 약 2.35시간이 지난 시점에서 손상된 DNA의 대부분이 수복되는 것을 볼 수 있었다. 한편, 40 mg kg^{-1}의 염화수은 (II)에 48시간 동안 노출시킨 처리군에서는 20 Gy의 감마선을 조사한 후 약 37시간이 경과했을 때 손상된 DNA의 수복 작용이 거의 완료되었다.

X선에 의해 손상된 사람의 혈구세포 DNA는 손상의 절반이 수복되는 데 약 5분 정도가 소요된다는 연구 결과가 있으며 (Cebulska-Wasilewska 2003), 식물종의 하나인 *Vica faba*의 뿌리를 X선에 노출시키면 절단된 DNA 가닥의 50%가 20분 내에 거의 수복된다는 보고가 있다

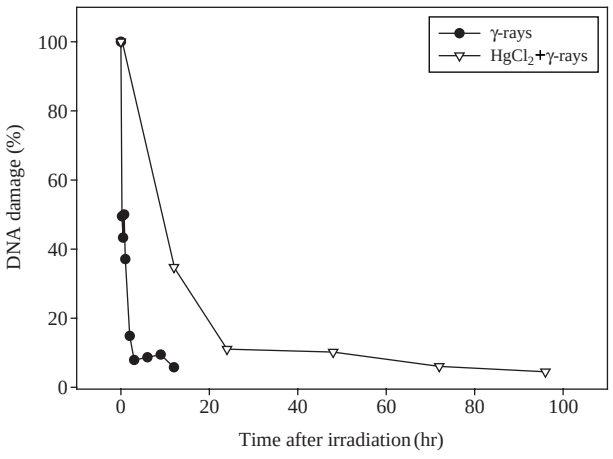

Fig. 1. Time-dependent DNA repair kinetics in coelomocytes of *E. fetida* after irradiationof 20 Gy γ-rays. Each data point was expressed as a percentage of OTM values immediately after irradiation. OTM means Olive tail moment. OTM=(tail mean−head mean) × tail%DNA/100.

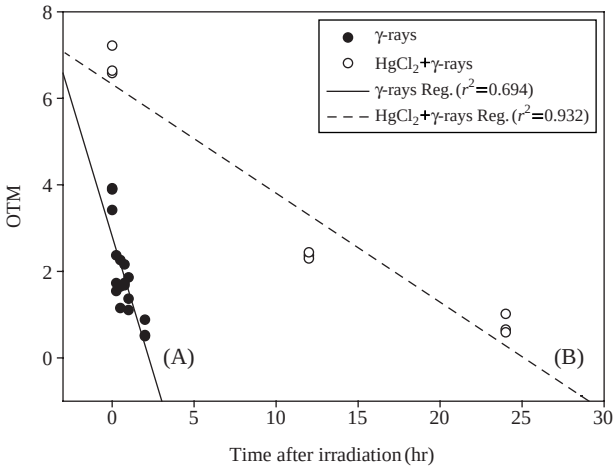

Fig. 2. Changes in the Olive tail moment (OTM) with time in the coelomocytes of *E. fetida* exposed to 20 Gy γ-rays (A) or to combination of radiation with $HgCl_2$ (B) (n=3). OTM=(tail mean−head mean) × tail%DNA/100.

(Koppen *et al*. 1999). 반면에 본 실험에서는 *E. fetida*에 20 Gy의 감마선을 조사했을 때 약 45분, 수은 처리 후 방사선을 조사했을 때 약 1시간 12분 정도가 경과한 시점에서 손상되었던 DNA의 절반이 수복되는 것을 확인할 수 있었다.

DNA 수복 양상을 크게 두 가지 형태로 구분지어 보면 시간-OTMs 값의 그래프 상에서 수복이 빠르게 진행되는 구간(fast repair component)과 서서히 진행되는 구간(slow repair component)으로 나눌 수 있다. 여기서 수복 속도가 빠른 구간을 도식화하여 그 기울기를 산출하면 두 실험군의 DNA 수복 속도 차이를 정확히 비교해볼 수 있다(Fig. 2). 수식을 통해 그 차이를 계산한 결과, 수은에 노출된 실험군의 DNA 수복률은 수은에 노출되지 않은 실험군보다 약 5배 정도 수복 속도가 느리다는 사실이 확인되었다.

흡수선량 20 Gy의 감마선에 조사된 실험군의 DNA 수복은 이온화 방사선 조사 후 약 2시간 내에 빠른 속도로 발생한 뒤 서서히 감소되어 수복이 진행되는데 그 양상은 다음과 같은 수식을 통해 표현될 수 있다.

$$y=0.4910-0.0212x \ (r^2=0.694)$$

여기서, *y*: OTM values, *x*: time after irradiation.

한편, 염화수은(II)과 이온화 방사선에 순차적으로 노출시킨 실험군은 방사선 조사를 마친 후 약 24시간이 경과된 시점에서부터 손상된 DNA의 수복이 서서히 진행되어 다음과 같은 수식으로 그 양상을 나타낼 수 있다.

$$y=0.9470-0.0068x \ (r^2=0.938)$$

여기서, *y*: OTM values, *x*: time after irradiation.

이때 수식의 *x*절편은 DNA의 '미수복분율'로서, 방사선 단독처리군과 수은 및 방사선의 복합처리군의 미수복분율은 각각 0.4910과 0.9470이라는 수치로 확인된다. 여기서 발생하는 두 값의 차는 수은에 의해 DNA의 정상적인 수복이 방해되었음을 의미한다.

본 연구는 수은이 DNA 수복에 미치는 영향을 알아본 이전의 연구 결과들과 유사한 상관성을 보여준다. Cebulska-Wasilewska *et al*. (2005)은 작업환경에 존재하는 수은 증기에 장기간 노출된 근로자를 대상으로 하여 연구를 수행하였는데, UV-C와 X선을 이용하여 림프구의 DNA를 인위적으로 손상시키고 수은에 전혀 노출되지 않은 건강한 사람과 비교했을 때 실험군의 DNA 수복률이 유의적으로 낮게 나타난다는 사실을 확인하였다. Chinese hamster ovary (CHO) 세포를 이용한 실험에서도 역시 염화수은(II) 처리 후 X선에 의해 손상된 DNA의 수복이 저해되었음을 밝히고 있다(Cantoni and Costa 1983). 기존의 연구 결과들은 다양한 형태로 존재하는 수은화합물이 정상적인 세포의 DNA 수복 작용에 직간접적인 영향을 끼친다는 사실을 증명해준다(Stohs and Bagchi 1995; Asmuss *et al*. 2000). 본 연구에서 도출한 결과 역시 수은이 DNA의 수복에 부정적으로 관여하고 있음을 입증해준다. 또한 염화수은(II)과 방사선을 실험 생물에 복합적으로 노출시켰을 때, 두 인자의 독성 작용이 상승했다는 종전의 연구가 있다(한 등 2009; 류 등 2010). 본 실험을 통해 그 원인을 추정해 본다면 수은이 DNA의 수복을 방해하여, 방사선에 의해 유도된 세포 내 산화적 손상을 정상적으로 복구시키지 못하고, 결국에는 생물에 방사선만을 조사했을 때보다 세포 및 유전독성이 상승했다고 사료된다.

적 요

수은이 DNA 수복에 미치는 영향을 알아보기 위해 *E. fetida*를 염화수은(II)과 이온화 방사선에 순차적으로 노출시킨 후, 단세포 겔 전기영동 기법을 이용하여 DNA의 손상 수준과 방사선 조사 후 시간 경과에 따른 수복 양상을 관찰하였다. 염화수은(II)의 농도를 40 mg kg^{-1}으로 하여 48시간 동안 *in vivo* 노출 시험을 수행한 뒤 20 Gy의 감마선을 조사한 결과, 시간이 지날수록 대체로 DNA 손상의 수준이 감소했다. 이온화 방사선에 의해 손상된 DNA가 완전히 수복되기 위해 요구되는 시간을 비교해 보면, 수은과 감마선에 함께 노출된 *E. fetida*는 방사선 조사 후 약 37시간, 감마선만 조사한 실험군은 약

2.35시간이 지나고 난 뒤 손상된 DNA의 대부분이 수복되는 것을 볼 수 있었다. 한편 *E. fetida*에 20 Gy의 감마선을 조사하면 방사선 조사가 끝나고 약 45분, 수은 처리 후 방사선을 조사하면 약 1시간 12분 정도가 경과한 시점에서 손상되었던 DNA의 절반이 수복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 DNA 수복 속도가 빠른 구간을 도식화하여 그 기울기를 계산한 결과, 수은에 노출된 실험군의 DNA 수복률은 수은에 노출되지 않은 실험군보다 약 5배 정도 수복 속도가 느리다고 판단할 수 있었다. 손상된 DNA가 천천히 수복되는 구간을 수식으로 표현해 DNA의 미수복분율을 산출하면 방사선 단독처리군과 수은 및 방사선의 복합처리군의 미수복분율은 각각 0.4910과 0.9470로 나타난다. 미수복분율 값의 차는 수은에 의해 DNA의 정상적인 수복이 방해되었음을 의미한다.

사 사

본 연구는 교육과학기술부에서 시행하는 기관고유사업의 지원과 한국원자력연구원-스페인 도네쉬방사선연구소 협력으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

류태호, 모하마드닐리, 안광국, 김진규. 2010. 염화수은(II)과 이온화 방사선 처리에 따른 토양 내 환형동물의 DNA 손상 측정. 환경생물. 28:212-217.

류태호, 모하마드닐리, 안광국, 김진규. 2011. 방사선과 수은에 의해 유도된 *Eisenia fetida* 체강세포의 DNA 손상 및 수복 평가. 환경생물. 29:68-73.

한 민, 현경만, 모하마드닐리, 황인영, 김진규. 2009. 이온화 방사선 및 염화수은 처리에 따른 어류 간암세포의 생존능 평가. 환경생물. 27:140-145.

Asmuss M, LHF Mullenders and A Hartwig. 2000. Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. Toxicol. Lett. 112-113:227-231.

Cantoni O and M Costa. 1983. Correlations of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury (II) and X-rays. Mol. Pharmacol. 24: 84-89.

Cebulska-Wasilewska A. 2003. Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. Mutat. Res. 544:289-297.

Cebulska-Wasilewska A, A Panek, Z Zabiński and P Moszczyński. 2005. Influence of mercury vapors on lymphocytes *in vivo* and on their susceptibility to UV-C and X-rays, and repair efficiency *in vitro*. Med. Pr. 56:303-310.

Chen H, NC Giri, R Zhang, K Yamane, Y Zhang, M Maroney and M Costa. 2009. Nickel ions inhibit histione demethylase JMJD1A and DNA repair enzyme ABH2 by replacing the ferrous iron in the catalytic centers. J. Biol. Chem. 285:7374-7383.

Clarkson TW. 2002. The three modern faces of mercury. Environ. Health Perspect. 110:11-23.

Crespo-López ME, GL Macêdo, SID Pereira, GPF Arrifano, DLW Picanco-Diniz, JLM do nascimento and AM Herculano. 2009. Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. Pharmacol. Res. 60:212-220.

Diogène J, M Dufour, GG Poirier and D Nadeau. 1997. Extrusion of earthworm coelomocytes: comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* and *Octolasion tyrtaeum*. Lab. Animal. 31: 326-336.

Eyambe GS, AJ Goven, LC Fitzpatrick, BJ Venables and EL Cooper. 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. Lab. Animal. 25: 61-67.

Goyer RA. 1991. Toxic effects of metals. pp.623-680. In Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 4th ed. (Amdur MO, J Doull and CD Klaassen, eds.). Pergamon Press, New York.

Koppen G, LM Toncelli, L Triest and L Vershaeve. 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA intergrity in developing plant leaves. Mech. Aging Dev. 110:13-24.

Oauah PO. 2000. Mercury poisoning. Curr. Probl. Pediatr. 30: 91-99.

Rydberg B and KJ Johansom. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. pp.465-468. In DNA Repair Mechanisms. (Hanawalt PC, EC Friedberg and CF Fox eds.). Academic Press, New York.

Sellappa S, S Prathyumnan, KS Keyan, S Joseph, BSG Vasudevan and K Sasikala. 2010. Evaluation of DNA damage induction and repair inhibition in welders exposed to hexavalent chromium. Asian Pac. J. Cancer Prev. 11:95-100.

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.

Stohs SJ and D Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free Radical Bio. Med. 18:321-336.

Yee S and BH Choi. 1996. Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. Neurotoxicology 17:17-26.

Manuscript Received: August 5, 2011
Revision Accepted: August 15, 2011
Responsible Editor: Hak Young Lee