

## 서식지에 따른 사철나무 잎의 이온화 방사선 조사 후 항산화 활성 변화 차이

김진규\* · 차민경 · 나디아빌헬모바<sup>1</sup> · 아니타무크헤르지<sup>2</sup>

한국원자력연구원 첨단방사선연구소  
<sup>1</sup>실험식물학연구소 스트레스생리학연구실, 체코공화국  
<sup>2</sup>캘커타대학교 식물학과, 인디아

## Post-irradiation Changes in Antioxidant Activity of Spindle Tree Leaves from Different Areas

Jin Kyu Kim\*, Minkyung Cha, Nad'a Wilhelmova<sup>1</sup> and Anita Mukherjee<sup>2</sup>

Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea  
<sup>1</sup>Stress Physiol. Lab., Institute of Experimental Botany, Prague 16000, Czech Republic  
<sup>2</sup>Department of Botany, University of Calcuta, Kolkata-700 073, India

**Abstract** – As the plants grow in a fixed place, they can be a good indicator which reflects the level of environmental pollution. It is necessary for them to develop a strategy to cope with stress under unfavorable environmental conditions. In this study, spindle trees (*Euonymus japonica*) were collected from a clean area (Kijang) as well as a heavily polluted area (Onsan) to check applicability of irradiation combined with plant bioassay to environmental monitoring. The leaves were irradiated with 0, 50 and 100 Gy of gamma rays, and then evaluated for antioxidative capacity with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and superoxide dismutase (SOD) analysis. The result shows that there was no significant changes in SOD and EDA (Electron Donating Ability) in the samples collected from a polluted area. In the meanwhile, SOD increased in the samples from a clean area until 6 to 10 hours after irradiation, then it decreased gradually until 24 hours after irradiation. In conclusion, the plants in the polluted area have developed higher resistance to oxidative stress induced by ionizing radiation than those in the relatively clean area. Irradiation combined with plant bioassay on enzymatic activities and free radical scavenging capacity has proven to be a possible tool for biomonitoring the environmental pollution.

**Key words** : spindle tree, pollution, ionizing radiation, oxidative stress, SOD, EDA

### 서 론

모든 생물은 생물적, 무생물적 환경요인과 상호작용을

하며 살아가는데 정상적 생존이 가능한 환경조건으로부터 내성한계를 벗어나는 경우 생물체는 손상을 받고 결국 사멸한다. 서식환경의 특정한 요인에 대해 민감한 반응을 나타내거나 특이한 생물학적 변화를 보인다면 이와 같은 지표생물로서의 특성을 이용하여 환경의 질을 판단할 수 있다(Hellawell 1986; Muller and Streffer 1991).

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

지난 수세기 동안 생물체를 이용하여 대기오염 물질과 생물 간의 복잡한 상호작용을 이해하기 위한 연구가 꾸준히 이뤄져 왔다. 이러한 목적으로 선별된 생물체는 오염물질이나 환경요인과의 생리학적, 생화학적 상호작용에 대한 정보를 제공할 수 있는 생물지표로서의 특징을 갖추고 있어야 한다. 건조에 대응하여 수분 발산을 최소화하는 조직을 발전시킨 것 등이 형태적 전략에 속한다면 세포내 특정 성분을 변화시켜 환경으로부터의 스트레스에 대응하는 것은 생화학적 대응 전략이라 할 수 있다.

오염물질에 대한 생물반응 및 이에 따른 독성효과는 개체 수준에서 나타나기 이전에 생체분자 및 세포 수준 이하에서의 반응으로 먼저 표출된다 (Fatima and Ahmad 2005). 고정된 장소에 서식하는 고등식물의 경우 환경오염으로 인한 비생물적 스트레스에 끊임없이 노출되며 살지만 이동성이 없기 때문에 주변 환경의 불리한 영향을 회피할 수 없다. 이러한 경우 생물체는 비생물적 스트레스와 생물적 스트레스에 적절히 대처하고 자신의 생존을 위해서 여러 가지 대응전략을 발전시키게 된다. 이러한 점에 비추어 볼 때 환경오염에 기인하는 산화스트레스 요인으로서의 자유라디칼과 활성산소를 제거하는 능력은 식물의 생존에 있어 매우 중요하다 (Ali and Alqurainy 2006). 토양오염 또는 대기오염이 심한 지역에 서식하는 식물의 경우 청정지역에 서식하는 동종의 식물체에 비해 발달된 생화학적 대응 전략이 있을 것이라는 추정이 가능하다.

식물이 각종 환경 스트레스를 받으면 식물 생체 내의 산소는 반응성이 높고 독성을 가진 활성산소종 (reactive oxygen species)으로 변하게 된다. 식물체 광계 I의 일가 산소가 환원되거나 엽록소로부터의 들뜸 에너지가 산소에 직접 전달되어 생성된다 (Asada 1999). 식물체는 이러한 산화스트레스를 극복하고 정상적으로 생장을 유지하기 위해 효소적 또는 비효소적인 방어기작을 발달시켜서 활성산소의 형성을 억제하거나 생성된 활성산소를 제거하여 산화스트레스에 대한 손상을 극복한다 (Edwards *et al.* 2002; Esnault *et al.* 2010).

오염의 정도를 평가하거나 오염 원인을 추적하는 방법의 하나로 어떤 특정 생물체를 이용하려면, 선택된 생물체는 오염물질의 노출에 대해 물리적 또는 생화학적인 특이적 반응 또는 특성을 가지고 있어야 한다. 광합성을 하며 고착되어 서식하는 식물은 무생물적인 환경 스트레스에 지속적으로 노출이 된다. 특히 여러 가지 복합적 물질이 끊임없이 배출되고 있는 공업단지에 장기적으로 서식하며 오염된 환경에 적응된 가로수의 경우, 공단의 산업시설에서 방출된 대기 속의 유해성 중금속

이나, 높은 농도의 황산화물, 질소산화물, 오존, 미세먼지 등에 오랫동안 노출되어 서식하고 있다. 이러한 각종 오염물질은 식물에 산화스트레스를 주는 주요한 원인이 된다.

온산공단은 울산 산업단지에 포함된 곳으로 대기오염이 심각한 지역으로서 “대기보전 특별대책 지역”으로 지정 관리되고 있다 (Ministry of Environment 2008). 국내 연구진이 울산 지역에 식재된 가로수 수종을 비교·분석한 결과 사철나무의 항산화 능력이 타 수종에 비해 높다는 것을 보고한 바 있다 (Han *et al.* 2006).

식물의 지속적인 대기오염물질에 대한 노출은 지속적인 이온화 방사선 노출과 유사한 스트레스 자극제 역할을 하므로 이온화 방사선에 노출되었을 때 차별화된 항산화 능력을 보여 줄 것으로 생각된다. 본 연구는 대기오염이 심한 온산과 청정지역인 기장에 서식하고 있는 사철나무를 연구의 공시재료로 사용하여 이온화 방사선 조사에 따른 항산화 활성 변화의 차이를 규명하고자 수행되었다. 식물체의 항산화 능력은 SOD 활성 변화를 이용하여 분석하였으며 무생물적 스트레스에 대한 대응 능력은 자유라디칼 제거효율 분석을 통해 진단하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료 채취 및 이온화 방사선 조사

1986년 이래로 환경정책기본법에 의해 대기보전 특별대책지역으로 지정된 온산 국가산업단지의 가로수 중에서, 상록수인 사철나무 (*Euonymus japonica* Thunb.)를 채취하였으며 대기 청정지역인 기장군에서도 동일종을 채취하여 공시재료로 사용하였다 (Fig. 1). 공시재료 채취는 기장과 온산 각각의 세 지점에서 채취하였으며, 채취 후의 생화학적 변화를 최소화하기 위하여 냉암 조건으로 운송하였다. 이온화 방사선 조사는 한국원자력연구원 방사선과학연구소의 고준위 방사선 조사시설의  $^{60}\text{Co}$  감마선원 (선원강도 150 TBq)을 이용하여 0, 50, 100 Gy (선량을  $50 \text{ Gy h}^{-1}$ )를 조사하였다. 이온화 방사선 조사선량은 식물 잎 세포의 생존을 저해하지 않는 것으로 밝혀진 범위에서 결정하였다 (Baek *et al.* 2005). 이온화 방사선 조사 전 6 및 3시간, 조사 직후 및 조사 후 3, 6, 10, 24 시간 (-6 ~ +24 hr)에 잎 조직을 채취하여 액체 질소에 얼려 보관하며 분석용 시료로 이용하였다.

### 2. 여과 추출물 제조

공시재료 건조분말 1g을 80% 메틸알콜 10mL와 혼합

하고 실온에서 24시간 진탕 배양한 다음 여과지(Whatman No.2)로 걸렸다. 여과 추출물은 분석에 사용할 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 로 보관하였다.

### 3. 자유라디칼 소거능 측정

여과 추출물 0.05 mL에 0.1 mM 메틸알콜 DPPH(Sigma Co.) 용액 2.95 mL를 첨가하여 강하게 흔들어서 혼합시키고, 암소 실온에서 30분간 배양한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 여과 추출물에 의한 DPPH 소거율은 다음과 같은 식을 이용하여 전자공여능은 EDA %로 환산·표기하였다.

$$\text{EDA (\%)} = \left[ \frac{1 - \text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of the control}} \right] \times 100$$

### 4. 초산소제거효소 분석

SOD 활성은 SOD Assay Kit-WST (Dojindo, Japan)의 표준방식을 따라 분석하였으며 450 nm에서 측정된 흡광도를 측정하여 다음 식에 따라서 inhibition rate로 표시하였다.

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}} \times 100$$

## 결 과

사철나무 잎이 가지고 있는 자유라디칼 소거효율을 DPPH 분석법을 이용하여 EDA 값으로 환산하여 비교하였다. 청정지역인 기장에서 채취하여 50 Gy 및 100 Gy 감마선을 조사한 사철나무 잎의 EDA 값은 이온화 방사선 조사 전의 실험조건에서는 거의 변화를 보이지 않다가 조사 후 6시간 이내에 급격한 감소추세를 보였다. 그 후 24시간까지의 전 분석기간에 걸쳐 점진적으로 증가하여 초기 값과 비슷한 수준에 이르렀다. 반면 이온화 방사선을 조사하지 않은 시료의 EDA 값은 시간 경과에 따라 지속적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 청정지역 사철나무 잎이 보유하고 있는 자유라디칼 소거효율은 보관, 처리 및 이온화 방사선 조사에 소요되는 시간에는 크게 영향을 받지 않으나 이온화 방사선 조사 이후 유발되는 산화스트레스에 의한 영향을 크게 받는 것으로 나타났다.

대기오염 지역인 온산에서 채취한 시료의 경우 EDA 초기 값은 30% 수준이었으나 분석 개시 후 시간경과에 따라 점차 증가하였다. 이온화 방사선 50 Gy 조사 후 3

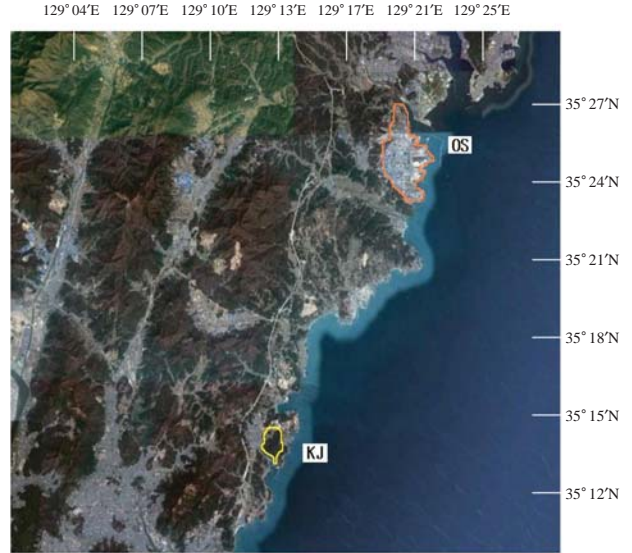


Fig. 1. Sampling sites of the *Euonymus japonica* (KJ: Kijang-Clean Area, OS: Onsan-Industrial Area).

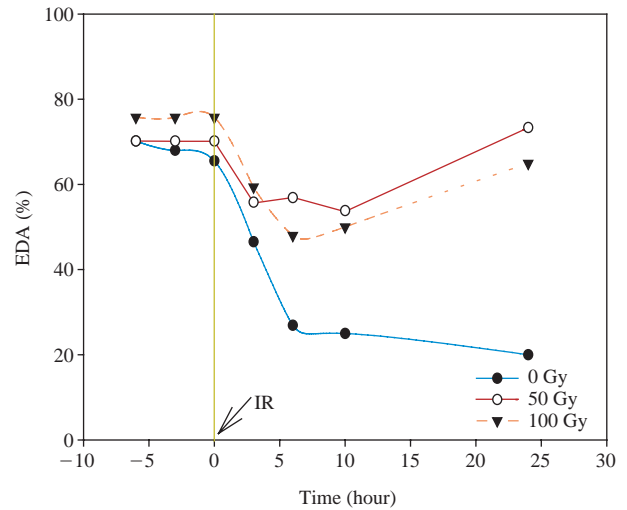
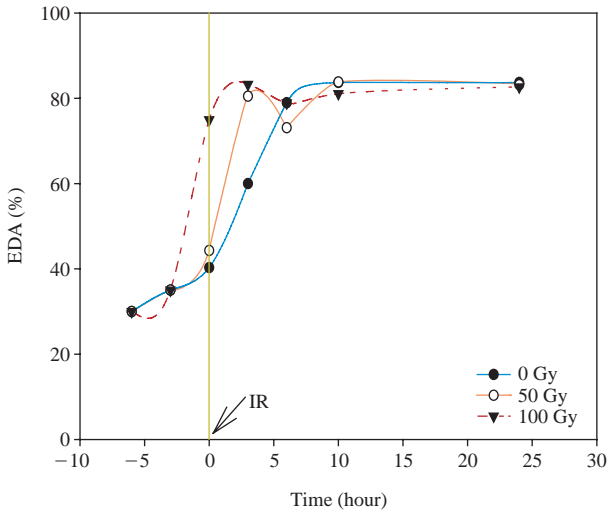


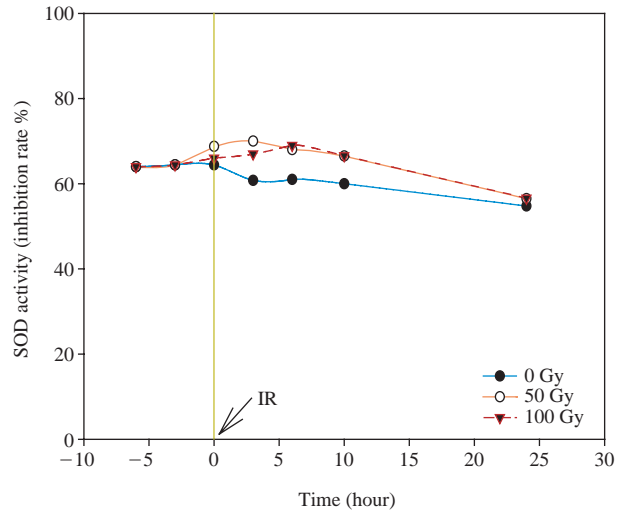
Fig. 2. Changes in EDA (%) corresponding to DPPH scavenging ability against time after irradiation with 0, 50 and 100 Gy in the spindle tree leaves from Kijang.

시간에 EDA 값이 80%, 100 Gy 조사 후 3시간에 83%까지 급상승하여 24시간까지 높은 값이 유지되었다(Fig. 3). 특히 이온화 방사선을 조사하지 않은 시료의 EDA 값도 시간 경과에 따라 크게 증가되었다. 이는 오염대기에 노출되어 살아 온 식물체가 이온화 방사선 조사와 같은 부가적 산화스트레스는 물론 실험실 조건에서 나타나는 스트레스에까지 능동적으로 대응하는 내재능력이 있다는 것으로 풀이된다.

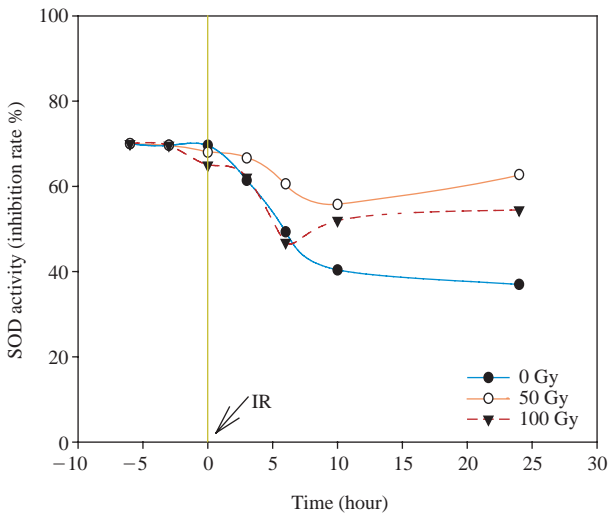
오염지역에 서식하고 있는 사철나무는 청정지역의 식



**Fig. 3.** Changes in EDA (%) corresponding to DPPH scavange ability against time after irradiation with 0, 50 and 100 Gy in the spindle tree leaves from Onsan.



**Fig. 5.** Changes in SOD activity against time after irradiation with 0, 50 and 100 Gy in the samples from Onsan.



**Fig. 4.** Changes in SOD activity against time after irradiation with 0, 50 and 100 Gy in the samples from Kijang.

물체와는 달리 실험실에서의 보관, 분석 전처리 및 이온화 방사선 조사에 소요되는 경과시간 등 다양한 요인이 자유라디칼 소거효율에 큰 영향을 미쳤다. 특히 이온화 방사선에 조사 후 5시간이 경과하면 자유라디칼 제거능이 포화 활성화에 이르는 것이 확인되었다.

대기 청정지역인 기장과 대기보전 특별대책 지역으로 지정 관리되고 있는 오염지역인 온산 두 지역에서 채취하여 감마선을 조사를 하지 않은 사철나무는 실험실에서의 시간 경과에 따라 SOD가 점진적으로 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 4 및 Fig. 5의 0 Gy 곡선). 그러나

평균적으로 온산 지역 식물체의 SOD 활성이 높았다. 이처럼 온산 지역 식물체의 높은 SOD 활성은 공해 환경에 적응함으로써 산화스트레스에 대응하는 능력이 증대되어 있음을 의미한다.

기장에서 채취한 시료에 있어 50 Gy 및 100 Gy 감마선 조사 후 6시간이 경과할 때까지는 SOD의 농도가 급격히 증가하였다가 10시간 경과 시점까지는 감소하는 양상을 나타내었다. 청정지역의 식물은 두 번째 산화스트레스로 가해진 이온화 방사선 조사에 대응하여 급격한 SOD 활성 변화를 보인 (Fig. 4) 반면, 온산 지역 식물체에서는 이온화 방사선 조사 식물과 비조사 식물 간의 활성도 차이가 청정지역 식물체만큼 큰 차이를 보이지 않고 완만한 변화 곡선을 보였다 (Fig. 5).

이온화 방사선을 조사하지 않은 청정지역 사철나무 잎의 SOD 활성은 시간 경과에 따라 뚜렷하게 감소하여 약 30시간 경과 시 초기 값의 절반에 이르렀다. 감마선 50 Gy 조사 시료의 SOD 활성을 나타내는 inhibition rate는 초기 값 70%에서 이온화 방사선 조사 후 10시간 경과 시 63%, 100 Gy 조사 시료의 경우 54%를 나타내었다. 이는 오염지역에 서식하는 식물체가 이온화 방사선 조사에 대한 대응이 3시간 이내에 일어나는 것과는 크게 다른 결과로서 청정지역의 식물체가 산화스트레스에 대응하기 위한 효소 생성 준비에 소요되는 시간이 상대적으로 더 길다는 것이다.

오염지역 사철나무의 경우 실험실 조건 노출이나 이온화 방사선 조사 등의 환경변화에 SOD 활성이 크게 영향을 받지 않는다는 것이 확인되었다. 이온화 방사선 조사된 잎이나 조사하지 않은 잎 모두에서 SOD 값이

초기 활성에서 크게 증감하지 않았다 (Fig. 4).

청정지역과 오염지역 모두의 식물체에서 실험실조건에서의 보관, 전처리 및 경과시간 그리고 이온화 방사선 조사에 소요되는 시간(-6~+0 hr)이 SOD 활성에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 나타났다.

## 고 찰

극심한 대기오염 환경 스트레스에 적응하며 살아온 식물의 경우 이온화 방사선을 조사하였을 때 유발되는 2차 스트레스에 더 높은 적응력을 보여준다. Fig. 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 오염지역 식물체는 이온화 방사선 조사 후 3시간 이내에 자유라디칼 소거를 위한 준비가 완료되는 데 반해 청정지역의 식물체는 이온화 방사선 조사 후 10시간이 경과하여야 자유라디칼 소거를 위한 준비가 완료되는 것을 알 수 있다. 또한 Fig. 3 및 Fig. 4에 나타난 바와 같이 청정지역에서 채취한 식물 잎은 이온화 방사선 조사 후 SOD 활성이 감소하였다가 이온화 방사선 조사 후 10시간이 지난 다음 완만한 회복세를 보이긴 하지만 활성이 여전히 초기 값에 미치지 못하여서 이차적 산화스트레스에 대한 대응이 취약하다는 것을 알 수 있었다. 반면, 오염된 도시에 가로수로 식재된 사철나무 잎에 이온화 방사선을 조사하면 SOD 활성이 크게 변화하지 않는 점이 주목할 만하다. 오염지역에 서식하는 식물은 50~100 Gy 이온화 방사선의 산화 스트레스를 수용할 수 있는 항산화 능력을 가지고 있어 청정지역의 식물과 같이 항산화 능력의 변화폭이 크지 않다.

두 지역에서 채취한 공시재료를 실험실로 냉장 운반한 다음 시료 전처리 과정 및 이온화 방사선 조사에 소요되는 시간이 이들 SOD 활성과 자유라디칼 소거활성에 영향을 미치는지를 판단하기 위하여 이온화 방사선 조사 6시간 전과 3시간 전에도 분석을 수행하였다. 오염지역에 서식하는 사철나무 잎의 자유라디칼 소거활성의 경우를 제외하고는 실험조건에서 이온화 방사선 조사 이전에 소요되는 시간의 영향은 없는 것으로 확인되었다. 그러나 오염지역에서 채취한 잎의 자유라디칼 소거활성은 이온화 방사선 조사가 완료된 직후 분석 값과 초기 값 간 큰 차이가 있었다. 선량률이 50 Gy h<sup>-1</sup>인 점을 고려할 때, 100 Gy 선량을 조사하는데 두 시간이 소요되며 이온화 방사선 조사가 이뤄지는 동안에도 자유라디칼 소거활성이 증가된다는 것이다. 이와 같은 증가 추세가 유지되어 이온화 방사선 조사 후 6시간에 활성의 최고값에 이르렀다. 이러한 결과는 이온화 방사선 조

사기간 중에도 활성변화가 일어날 수 있다는 점을 염두에 두어야 함을 의미한다.

식물체가 스트레스를 받지 않는 조건에서는 생성되는 ROS의 양과 제거되는 양이 균형을 이루지만 이 산화스트레스에 의해 ROS 생성이 증가할 경우 제거되지 못한 잉여 ROS에 의해 지질, 단백질, 핵산 등 세포물질이 손상을 입어 대사과정이 저해된다 (Gill *et al.* 2010). 본 연구의 결과는 식물이 감마선과 같은 이온화 방사선에 노출되어도 비슷한 생화학적인 변화로 인해 효소적인 방어기작을 발달시키게 되며 이온화 방사선에 지속적으로 노출되어온 식물의 경우, 후속적인 이온화 방사선 노출 시 더 높은 항산화 작용을 일으킨다고 보고 (Baek *et al.* 2005)와도 맥락을 같이 한다.

산화스트레스에 대응하기 위한 생화학적 전략의 하나가 SOD나 카탈라아제 (catalase), 글루타치온 환원효소 (glutathione reductase) 등 항산화 효소의 활성을 증가시키는 것이다. 두 지역 식물의 방사선조사 효과에 대해서로 다른 반응성은 산화스트레스에 얼마나 적응하여왔는가를 보여준다. 초기 산화스트레스로서의 환경오염에 적응하며 살아온 식물체는 이차적 산화스트레스에 덜 민감할 뿐 아니라 빠른 항산화 대응 능력에 힘입어 이온화 방사선 조사에 대해 저항성을 나타내는 것이다. 항산화 효소가 이온화 방사선에 의하여 유발된 활성산소의 독성효과를 제거 또는 상쇄하는 능력은 환경오염의 주요한 생물 마커로 이용될 수 있고, 이러한 생화학적 특징이 환경모니터링을 위한 식물검정법 (plant bioassay) 개발의 핵심기술로 이용될 수 있다고 사료된다.

## 적 요

고등식물은 고정된 장소에 서식하기 때문에 주변 환경의 오염에 따른 부정적 영향을 회피할 수 없다. 대기오염 지역과 청정지역에 서식하는 가로수의 이온화 방사선에 대한 효소활성 변화를 이용하여 대기오염 정도를 진단하는 방법을 개발하고자 본 연구를 수행하였다. 오염된 대기 속에 서식하며 대기에 포함된 오염물질로부터 지속적으로 산화스트레스를 받아온 식물체의 경우 이를 극복하기 위한 수단으로 생화학적 저항성을 발달시키게 된다. 항산화 효소와 자유라디칼 제거능, 세포막 안정도 등은 산화스트레스에 대한 저항성을 분별하는데 이용되는 좋은 생체지표로 이용되어 왔다. 비교를 위하여 대기오염이 심한 온산 지역과 비교적 청정한 곳인 기장 지역에 서식하는 사철나무의 가지와 잎을 채취하여 공시재료로 사용하였다. 공시재료에 0, 50, 100 Gy의

감마선을 조사하고 시간 경과에 따른 SOD 활성 변화와 자유라디칼 제거 능력(EDA)을 측정하였다. 그 결과, 대기오염 지역의 식물은 이온화 방사선의 조사가 SOD나 EDA에 큰 변화를 일으키지 않았다. 그러나 청정지역 식물인 경우 이온화 방사선 조사 후 6~10시간까지는 SOD 효소 활성이 증가 추세를 보이다가 그 이후 점진적 활성 저하 현상이 나타났다. 이는 오염이 심한 대기에 적응한 식물의 경우 이온화 방사선에 의하여 유발된 산화 스트레스를 극복할 수 있는 수용력이 높다는 것을 의미한다. 각기 다른 서식지의 식물체에 이온화 방사선을 조사한 후 나타나는 생화학적 변화의 차이를 이용하여 그들의 서식환경에 관한 통합 오염도를 진단하는 것이 가능할 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 교육과학기술부에서 시행하는 주요사업의 지원과 다자간 국제협력의 일환으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Ali A and F Alqurainy. 2006. Activities of antioxidants in plants under environmental stress. - Transworld Research Network, pp. 187-256, India.
- Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. - Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 50:601-639.
- Baek MH, BY Chung, JS Kim and IS Lee. 2005. Alleviation of salt stress by low dose gamma-irradiation in rice. Biol. Plant. 49:273-276.
- Edwards AM, M Ruiz, E Silva and E Lissi. 2002. Lysozyme modification by the Fenton reaction and gamma radiation. Free Radic. Res. 36:277-284.
- Esnault MA, F Legue and C Chenal. 2010. Ionizing radiation. Advances in plant response. - Environ. Exp. Bot. 68:231-237.
- Fatima RA and M Ahmad. 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. Sci. Total Environ. 346:256-273.
- Gill SS and N Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48:909-930.
- Han SH, JC Lee, CY Oh and PG Kim. 2006. Antioxidant characteristics and phytoremediation potential of 27 taxa of roadside trees at industrial complex area. Korean J. Agr. Forest Meteorol. 8:159-168.
- Hellawell JM. 1986. Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management. pp. 52-53. Elsevier, New York.
- Ministry of Environment. 2008. Annual Report of Air quality in Korea, 21th Environmental Statistics Year Book.
- Müller WU and C Streffer. 1991. Biological indicators for radiation damage. Int. J. Radiat. Biol. 59:863-873.

Manuscript Received: October 17, 2011

Revision Accepted: November 5, 2011

Responsible Editor: Hak Young Lee