ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
*Journal of Life Science* **2013** Vol. 23. No. 8. 963~969 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2013.23.8.963

# Protective Effects of Vitamin C against Genomic DNA Damage Caused by Genotoxicants

Gyeong Jin Yu and Chun Bok Lee*

*Department of Biology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea*

Received April 10, 2013 / Revised July 9, 2013 / Accepted July 14, 2013

Although it is popularly believed that vitamin C protects cells from various genotoxicants, the degrees and mechanisms of itsprotective actions are not fully understood. In this study, vitamin C's protective effects against various genotoxicants were quantified, together with subsequent analyses on the mechanisms of these protective effects. Comet assay was employed to measure the degree of DNA damage in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) exposed to five genotoxicants, $H_2O_2$, $HgCl_2$, *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO), and UV-irradiation. In cases cells were treated with $H_2O_2$, $HgCl_2$, and 4NQO together with vitamin C, the damage to DNA decreased to the level of the control group. In cases of UV-irradiation, the protective effect of vitamin C appeared, but did not reach the control levels. Interestingly, vitamin C did not have protective effects against the genotoxicity of MNNG. The degrees of DNA damage of cells treated with vitamin C prior to exposure togenotoxicants were 28~49% lower than those of cells treated with vitamin C after being exposed to genotoxicants. In conclusion, vitamin C had strong antioxidanteffects against genotoxicants by being a primary antioxidant blocking genotoxicity reaching the cells, rather than being a secondary antioxidant acting on post-exposure DNA repair processes. However, vitamin C's protective effects appearto be limited, as there are genotoxicants, such as MNNG, whosegenotoxicityis not affected by vitamin C. Therefore, the results of this study warrant furtherstudies on toxic mechanisms of genotoxicants and their interactions with protective mechanisms of vitamin C.

**Key words** : Comet assay, DNA damage, genotoxicants, protective effect, vitamin C

## 서 론

유전독성에 대한 방호기작에는 유전독성물질과 직접적으로 작용하는 항산화물질(antioxidant)에 의한 1차적인 방호기작과 유전독성물질에 의해 일어난 DNA 손상을 정상상태로 되돌리는 DNA 복구(DNA repair)에 의한 2차적인 방호기작으로 크게 분류 할 수 있다.

이러한 항산화제 중에서 우리에게 잘 알려진 비타민 C는 체내 거의 모든 세포외액(혈액과 림프액 등)과 세포 내의 세포질에 존재하면서 유전독성물질로부터 생성되어지는 산화적 스트레스와 알킬화 등에 의한 다양한 DNA 손상과 세포막 지질의 산화를 막아내며, 효소의 술프히드릴기(-SH)를 환원상태로 유지시켜 줌으로써, 항산화효소와 함께 산화적 스트레스에 대한 강력한 제거제로서의 역할을 담당한다고 알려져 있다[2, 24]. 또한, 유전독성물질과 직접적으로 작용하여 유전독성 발현기작을 막음으로써, 항발암성, 항염색체파괴성 및 항돌연변이적인 효과가 있는 것으로 알려져 있다[1, 8, 9, 10, 17, 19, 25]. 그러나 다른 한편으로는 비타민 C가 염색체 이상 및 여러 종류의 돌연변이 유발시험에서 양성으로 나타난 것으로 보아 비타민 C가 돌연변이 유발원으로 작용할 수 있고 따라서 비타민 C가 돌연변이 전구물질로 작용할 수 있다는 연구들도 많이 보고[3, 4, 11]되고 있는 등 비타민 C의 항산화작용에 대한 많은 논란이 있었으며, 현재까지도 그 논란은 사라지지 않고 있어 다양한 시험을 이용한 연구들이 진행 중이다.

그 중에서 Comet assay는 세포 수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위해 도입된 microgel electrophoresis 방법으로 지난 20년 동안 사용되어져 왔으며, 최근에 폭넓은 관심을 얻은 시험법이다(Fig. 1). Comet assay의 장점은 다른 유전독성시험과 비교해 볼 때 상대적으로 다루기 쉬우며, 다양한 생물과 조직세포에 적용될 수 있다는 것이 가장 큰 장점이다. Alkaline Comet assay를 사용할 경우에는 DNA의 이중가닥 뿐만 아니라 단일가닥 손상도 민감하게 측정할 수 있다[23].

따라서 본 연구에서는 아직까지 많은 논란이 제기 되고 있는 다양한 유전독성에 대한 비타민 C의 방호효과를 확인하기 위하여, 실제 생활에서 쉽게 노출될 수 있는 세포독성물질인 $H_2O_2$, $HgCl_2$ 그리고 자외선과 강력한 발암성을 가진 것으로 알려진 MNNG와 4NQO 등의 유전독성물질에 의해 나타

*Corresponding author
Tel : +82-51-663-4640, Fax : +82-51-627-4645
E-mail : cblee@ks.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

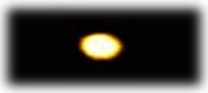
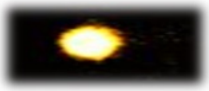
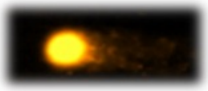
| DNA damage | Comet assay image |
|---|---|
| none, < 5% |  |
| low, < 5~20% |  |
| medium, < 20~40% |  |

Fig. 1. Comet assay images according to the different DNA damage. CHO-K1 cells were used as a sample.

나는 유전독성을 효과적으로 방호하는지를, DNA 수준에서 직접적으로 확인 할 수 있는 유전독성시험인 Comet assay를 이용하여 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

실험에 사용한 CHO-K1 세포는 서울의대 삼성암연구소 부설 한국세포주은행에서 구입하였으며, $CO_2$ incubator (37℃, 5% $CO_2$)에서 10% BS (Bovine Serum, Gibco, USA), Penicillin G (한독약품, KOR), Streptomycin (Sigma, USA)이 포함된 RPMI-1640 (Sigma, USA)을 사용하여 2~3일 간격으로 계대 배양하며 실험에 사용하였다.

### 시험물질의 처리

$H_2O_2$ (Dae jung KOR), $HgCl_2$ (Sigma, USA)와 비타민 C (Sigma, USA)는 PBS에, MNNG (Sigma, USA)와 4NQO (Sigma, USA)는 Absolute ethanol (Fisher, USA)에 녹인 후 PBS로 희석하여 냉동 보관하였다. 시험물질은 처리하기 직전에 혈청이 들어 있지 않은 배양액으로 원하는 농도로 희석하였으며, 60 mm petri dish 또는 12-well plate에 1 ml당 $1\times10^5$개의 비율로 넣고 24 시간 동안 단층배양한 CHO-K1 세포에 2 시간 동안 처리하였다. 비타민 C와 시험물질을 병용처리할 때에는 3 시간을 넘지 않도록 처리하였다.

### Trypan blue exclusion assay

$H_2O_2$, $HgCl_2$, 자외선, MNNG, 4NQO 및 비타민 C의 세포독성을 확인하고, 독성물질의 유전독성 및 비타민 C의 방호효과를 측정하기 위한 Comet assay의 처리 농도를 결정하기 위하여 Trypan blue exclusion assay로 CHO-K1 세포의 생존율을 측정하였다. 배양기에서 24 시간 동안 단층배양한 후 세포에 10, 100 nM, 1, 10, 100 μM 및 1 mM의 농도로 $H_2O_2$, $HgCl_2$, MNNG, 4NQO 그리고 비타민 C를 원하는 시간 동안 처리하였으며, 자외선은 자외선등(파장 254 nm, Philips TUV, 6 W)을 사용하여 1.25 J/$m^2$/sec의 비율로 2.5, 5, 7.5 그리고 10 J만큼 조사하였다. 독성물질의 처리와 염색이 끝난 세포를 혈구계수기를 이용하여 총 500개의 세포 중에서 푸르게 염색되어 있는 죽은 세포의 수를 세어 생존율(살아있는 세포수 / 총세포수)을 계산하였으며, Sigma stat 3.5 program을 이용하여 통계적 유의성을 조사하였다($p<0.05$). PBS 또는 배양액만 처리한 대조군의 생존율을 100%로 하여 이의 80%에 해당하는 생존율을 보이는 농도를 독성물질 처리 최고 농도로 설정하여 1/2, 1/4로 희석하여 처리하였다.

### Single cell gel electrophoresis (SCGE/Comet assay)

본 연구에서는 Singh의 방법을 일부 변경하여 실험하였다[23]. 12 well plate에 단층배양한 세포에 $H_2O_2$는 25, 50, 100 μM, $HgCl_2$는 1.25, 2.5, 5 μM, MNNG는 25, 50 100 nM, 4NQO는 250, 500 nM, 1 μM, 비타민 C는 2.5, 5, 10 μM 그리고 자외선은 1.25, 2.5, 5 J이 되도록 처리 또는 조사하여 2 시간 동안 배양한 뒤, 세포를 분리하여 microcentrifuge tube에 $1\times10^5$ cells이 되도록 넣고 0.65% low melting point agarose 50 μl를 넣고 잘 섞었다. 이 중 35 μl를 채취하여, Fully frosted slides를 1% normal melting point agarose에 2/3가량 담궜다 꺼내어 50℃에서 완전히 굳혀 1st layer가 입혀진 slides에 떨어뜨리고, cover slip을 덮어 agarose가 얇게 입히도록 한 후, slides를 ice tray에서 5 분간 굳혔다(2st layer). 이 위에 다시 0.65% low melting point agarose 50 μl를 떨어뜨린 후 ice tray에서 5 분간 굳힌 후(3st layer) 미리 만들어 둔 4℃ lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X100, pH 10)에 2 시간 동안 담가 lysis시켰다. 이 후 4℃ 증류수에 각각 5 분씩 3회 세척하여 lysis buffer를 제거하고 unwinding buffer (0.01 M EDTA, 0.3 M NaOH, pH 13)로 4℃에서 15 분간 unwinding시킨 후 electrophoresis buffer가 담긴 chamber에 옮겨 25 V, 300 mA에서 20 분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 slides를 4℃, 0.4 M Tris buffer로 중화시킨 후, 70% ethanol로 탈수 시켜 실온에서 완전히 건조한 뒤 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 형광현미경으로 40배율로 관찰하였다. 각각의 slide 별로 50개 세포를 임의로 선택하여 Olive tail moment (OTM)의 평균 및 표준편차를 Kinetic Komet 5.5 analysis program을 이용하여 구하였고, Sigma stat 3.5 program을 이용하여 통계적 유의성을 조사하였다($p<0.05$).

## 결과 및 고찰

### 유전독성물질과 비타민 C의 농도가 세포사멸에 미치는 영향

세포독성물질로 알려져 있는 $H_2O_2$, $HgCl_2$, 자외선, MNNG

그리고 4NQO의 세포독성 및 유전독성을 확인하기 위해 실시한 Trypan blue exclusion assay와 Comet assay의 결과로 미루어 볼 때, $H_2O_2$, $HgCl_2$, 자외선, MNNG 그리고 4NQO의 세포독성과 유전독성은 농도 의존적으로 DNA 손상과 세포사멸에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었으며(Table 1, Table 2), 이러한 결과는 기존의 보고들과 같은 결과를 보였다[1, 7, 9, 24].

뿐만 아니라 비타민 C에서도 농도 의존적으로 세포독성이 나타나는 것을 확인 할 수 있었다(Table 1). 이러한 결과는 비타민 C가 염색체 이상 및 여러 종류의 돌연변이 유발시험에서 양성으로 나타난 기존의 보고[3, 4, 11, 15]와 일치하며,

Table 1. Cytotoxicity of genotoxicants on CHO-K1 cells prepared for comet assay

| Treatment | Concentration | Relative survival (%) |
|---|---|---|
| $H_2O_2$ | Control | 100±0.04[a] |
| | 1 μM | 92.9±0.60[b] |
| | 10 μM | 81.2±1.77[c] |
| | 100 μM | 68.6±1.80[d] |
| | 1 mM | 60.7±1.58[e] |
| $HgCl_2$ | Control | 99.9±0.08[a] |
| | 1 μM | 90.2±0.71[b] |
| | 10 μM | 70.4±1.08[c] |
| | 100 μM | 59.6±1.15[d] |
| | 1 mM | 40.6±2.34[e] |
| UV | Control | 99.9±0.05[a] |
| | 2.5 J | 94.0±0.63[b] |
| | 5 J | 81.4±0.89[c] |
| | 7.5 J | 68.7±1.73[d] |
| | 10 J | 52.2±1.74[e] |
| MNNG | Control | 99.6±0.29[a] |
| | 10 nM | 93.2±0.86[b] |
| | 100 nM | 82.5±1.53[c] |
| | 1 μM | 73.0±1.44[d] |
| | 10 μM | 54.6±1.85[e] |
| 4NQO | Control | 99.4±0.29[a] |
| | 100 nM | 96.4±0.45[a] |
| | 1 μM | 80.4±0.97[b] |
| | 10 μM | 67.4±1.15[c] |
| | 100 μM | 53.6±1.65[d] |
| Vitamin C | Control | 99.9±0.04[a] |
| | 1 μM | 99.9±0.04[a] |
| | 10 μM | 98.2±0.34[a] |
| | 100 μM | 95.5±0.49[b] |
| | 1 mM | 87.1±1.15[c] |

CHO-K1 cells were plated in a 12-well plate at $1\times10^6$ cells per well and treated with the indicated concentrations of genotoxicants and vitamin C, they are also treated with PBS as negative control. And then cells were incubated for 24 hr. Each value indicates relative survival ±S.E.M. Different letters indicate the statistical difference among samples. ($p<0.05$)

Table 2. Dose effect of genotoxicants in comet assay with CHO-K1 cells

| Treatment | Concentration | Olive tail moment (%) |
|---|---|---|
| $H_2O_2$ | Control | 2.04±0.054[a] |
| | 2.5 μM | 8.45±0.053[b] |
| | 5 μM | 12.52±0.061[c] |
| | 10 μM | 16.78±0.060[d] |
| $HgCl_2$ | Control | 2.00±0.052[a] |
| | 1.25 μM | 6.14±0.058[b] |
| | 2.5 μM | 8.36±0.055[c] |
| | 5 μM | 10.54±0.059[d] |
| UV | Control | 1.75±0.046[a] |
| | 1.25 J | 8.70±0.062[b] |
| | 2.5 J | 17.61±0.062[c] |
| | 5 J | 21.43±0.068[d] |
| MNNG | Control | 1.58±0.076[a] |
| | 10 nM | 8.87±0.118[b] |
| | 100 nM | 16.94±0.113[c] |
| | 1 μM | 19.87±0.104[d] |
| 4NQO | Control | 2.60±0.106[a] |
| | 100 nM | 5.55±0.094[b] |
| | 1 μM | 11.26±0.111[c] |
| | 10 μM | 15.44±0.125[d] |

CHO-K1 cells were plated in a 12-well plate at $1\times10^6$ cells per well and treated with the indicated concentrations of genotoxicants and they are also treated with PBS as negative control. After 2 hr of incubation, Comet assay was measured as the Olive tail moment. Each value indicates the amount of DNA damage ±S.E.M. Different letters indicate the statistical difference among samples. ($p<0.05$)

비타민 C 자체가 돌연변이 유발원이 될 수 있다는 것을 확인시켜주는 것으로 생각된다. 비타민 C의 세포독성 및 유전독성 기전은 Fe나 Cu와 같은 전이금속이온이 수용상에 비결합상태로 존재할 때 펜톤 반응을 촉진시키고, 이로 인해 수산기가 많이 발생하여 오히려 비타민 C 자체가 전구산화제(pro-oxidant)로 작용함으로써 염색체 이상 및 여러 종류의 돌연변이를 유발하는 것으로 보고되고 있다[11, 15]. 그리고 과산화지질(lipid hydroperoxies)이 비타민 C와 반응을 일으켜 DNA를 손상시킬 잠재력을 지닌 유전독성물질을 만들어 낼 수 있다는 보고[3]가 있는 것으로 미루어 볼 때 세포의 환경 또는 상황에 따라서 비타민 C도 농도 의존적으로 DNA 손상과 세포사멸에 관여하는 것으로 생각된다.

### Comet assay를 이용한 유전체 손상 측정 결과

Trypan blue exclusion assay에서 $H_2O_2$, $HgCl_2$, 자외선, MNNG 그리고 4NQO가 세포독성을 가지고 있다는 것을 확인하였다. 이들이 유전독성을 가지고 있는 지를 확인하기 위하여 Comet assay를 이용하여 시험한 결과, 시험에 사용한

모든 시험물질에서 DNA에 손상을 주는 유전독성을 확인 할 수 있었으며, 이들의 유전독성은 농도 의존적으로 DNA 손상을 일으킨다는 것을 확인하였다(Table 2). 이러한 결과는 시험에 사용한 시험물질이 DNA 단일 또는 이중 가닥의 손상 그리고 염색체 돌연변이를 일으킨다는 기존의 보고[1, 24]와 일치하였다.

한편 Comet assay를 이용하여 유전독성물질의 처리 시간에 따른 DNA 손상을 측정한 결과, 유전독성물질이 존재하는 상태에서는 DNA 손상이 일시적인 것이 아니라 지속적으로 이루어진다는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 2), 유전독성물질이 제거된 상태에서는 DNA 복구 기작을 통해서 DNA 손상이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 즉, 유전독성물질의 처리 시간이 증가함에 따라 약 2 시간을 전·후하여 DNA 손상이 일정해짐을 알 수 있었으며, 유전독성물질을 제거한 경우에는 $H_2O_2$, $HgCl_2$, MNNG 및 4NQO에서 약 3 시간을 전·후하여 DNA의 손상이 점차 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 DNA 복구 시험 및 이와 관련된 보고에서 확인할 수 있다[12, 16, 18]. 이러한 결과는 유전독성물질이 존재 할 경우에는 유전독성이 유지되지만, 유전독성물질이 제거되면 세포에서는 DNA 손상에 대한 다양한 방어 기작으로 병변(lesions)을 인식하고 제거하는 DNA 복구 기작(nucleotide excision repair, mismatch repair 등)을 통해서 DNA 손상을 점점 줄어들게 만든 것으로 생각된다. 하지만 유전독성물질과 유전독성 기작은 매우 다양하기 때문에 세포

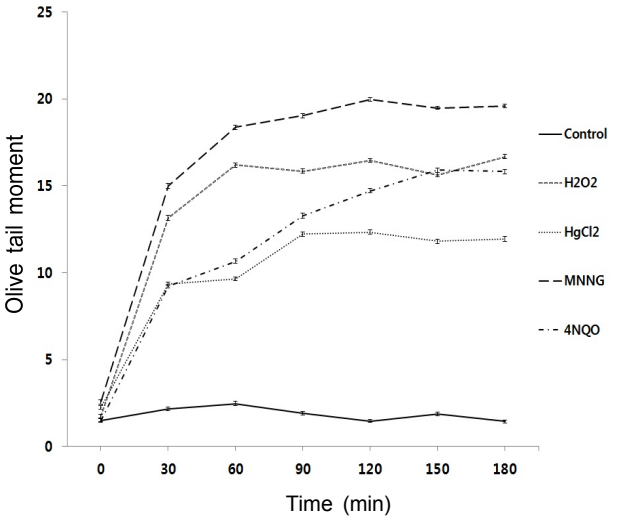



Fig. 2. Olive tail moment of genomic DNA of CHO-K1 cells after treatment withgenotoxicants. CHO-K1 cells were plated in 12-well plate at $1\times10^6$cells per well and treated with genotoxicants and they are also treated with PBS as negative control. After 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min of incubation, Comet assay was measured as the Olive tail moment. Lines indicate mean±S.E.M. per 30 min.

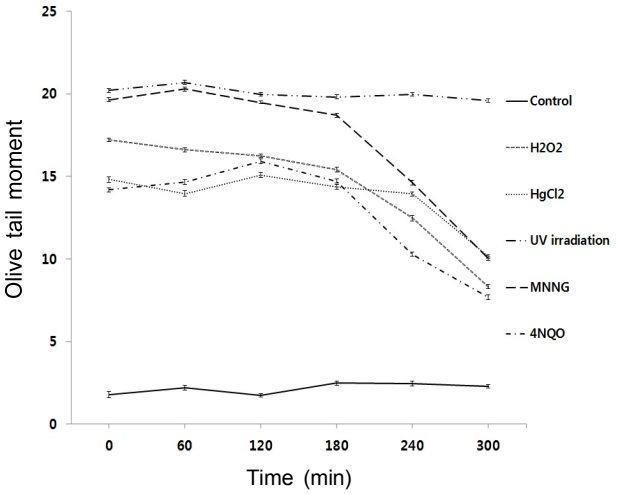



Fig. 3. Olive tail moment of genomic DNA of CHO-K1 cells after removal of genotoxicants. CHO-K1 cells were plated in 12-well plate at $1\times10^6$cells per well and treated with genotoxicantsand they are also treated with PBS as negative control. After 0, 60, 120, 180, 240 and 300 min of incubation, Comet assay was measured as the Olive tail moment. Lines indicate mean±S.E.M. per 60 min.

의 DNA 복구 기작 또한 다양하다. 이러한 DNA 복구 기작의 차이가 Fig. 2에서 나타난 것과 같이 시간 경과에 따라 DNA 손상이 줄어드는 시간에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 즉, $H_2O_2$, $HgCl_2$, MNNG 및 4NQO는 약 3 시간 이후에 DNA 손상이 감소하는 것을 확인 할 수 있었지만, 자외선의 경우에는 3 시간 이후에도 뚜렷한 DNA 손상의 감소가 확인 되지 않았다. Piperakis 등의 보고에 의하면 과산화수소에 의해 생성된 산화적 스트레스와 γ-irradiation에 의한 DNA 손상에 대하여 DNA 복구 기작이 다르게 작용 한다는 점에서 자외선에 의한 발생한 DNA 손상에 대한 DNA 복구 기작과 $H_2O_2$, $HgCl_2$, MNNG 및 4NQO에 의해 발생한 DNA 손상에 대한 DNA 복구 기작은 서로 다를 것으로 생각되며, 세포의 종류와 특징 또는 유전독성 기작에 따라서 DNA 복구 기작은 차이가 생길 수 있을 것으로 생각된다.

### 유전독성물질의 유전체 손상에 대한 비타민 C의 방호효과

비타민 C는 환원제 역할을 비롯해 콜라겐 합성, 항산화제 작용, 소장에서 철분의 흡수, 카르니틴의 생합성 그리고 면역기능에 관여하는 등 신체에서 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 더 나아가 암, 신경변성, 염증, 세포사멸 및 알츠하이머병의 치료에 관여한다는 보고[5, 6]가 있다. 따라서 유전독성에 대한 비타민 C의 방호효과를 확인하고자 Comet assay를 이용하여 시험하였다. 시험 결과, 비타민 C를 10 μM 이하로 병용 처리하였을 경우에는 유전독성물질을 단독 투여했을 때에 비해서 DNA 손상이 감소되었으며, 방호효과는

Table 3. Effects of vitamin C on genotoxicity induced by genotoxicants in CHO-K1 cells

| Treatment | Combination | Olive tail moment (%) |
|---|---|---|
| | Control | 2.28±0.073[a] |
| | - | 18.55±0.066[b] |
| $H_2O_2$ (10 μM) | Vit. C 2.5 μM | 11.41±0.070[c] |
| | Vit. C 5 μM | 6.42±0.070[d] |
| | Vit. C 10 μM | 1.83±0.060[e] |
| | Control | 1.52±0.062[a] |
| | - | 10.25±0.080[b] |
| $HgCl_2$ (5 μM) | Vit. C 2.5 μM | 5.51±0.078[c] |
| | Vit. C 5 μM | 1.66±0.064[d] |
| | Vit. C 10 μM | 1.74±0.069[d] |
| | Control | 1.42±0.061[a] |
| | - | 25.54±0.075[b] |
| UV (5 J) | Vit. C 2.5 μM | 20.13±0.064[c] |
| | Vit. C 5 μM | 18.27±0.070[d] |
| | Vit. C 10 μM | 13.87±0.069[e] |
| | Control | 1.73±0.063[a] |
| | - | 17.64±0.080[b] |
| MNNG (100 nM) | Vit. C 2.5 μM | 18.60±0.077[c] |
| | Vit. C 5 μM | 20.10±0.077[d] |
| | Vit. C 10 μM | 17.47±0.077[e] |
| | Control | 2.61±0.110[a] |
| | - | 15.50±0.168[b] |
| 4NQO (1 μM) | Vit. C 2.5 μM | 10.49±0.141[c] |
| | Vit. C 5 μM | 4.77±0.103[d] |
| | Vit. C 10 μM | 1.71±0.088[e] |

CHO-K1 cells were plated in a 12-well plate at $1\times10^6$cells per well and treated with genotoxicantsand the indicated concentrations of Vitamin C. After 2 hr of incubation, Comet assay was measured as the Olive tail moment. Each value indicates the amount of DNA damage ±S.E.M. Different letters indicate the statistical difference among samples. ($p<0.05$)

비타민 C의 농도 의존적임이 밝혀졌다. 이 같은 결과로 보아 비타민 C가 $H_2O_2$, $HgCl_2$ 그리고 4NQO에 의해 유발된 DNA 손상을 방호하는데 효과가 있음을 알 수 있었다(Table 3). 즉, 위의 결과는 비타민 C가 강력한 항산화물질이라는 것을 확인시켜주는 것으로 생각되며, 친핵성을 갖는 비타민 C가 친전자성을 갖는 유전독성물질에 의해 유발된 DNA 손상을 감소시켰다는 이전의 연구와 일치한다[21, 22].

하지만 자외선 경우에는 비타민 C의 방호효과가 다른 유전독성물질과 비교하였을 때 비교적 낮은 수준으로 나타났다. 이러한 결과는 비타민 C가 직접적으로 자외선(UV-B와 C)과 결합하지 못하기 때문으로 생각된다. 즉, 비타민 C에 의해 방호되지 못한 자외선이 DNA에 직접 흡수되었고 이로 인해 DNA에 피리미딘 이량체가 생성되어 유전독성이 나타난 반면에 DNA에 흡수되지 않는 자외선(UV-A)에 의하여 생성되어진 산화적 스트레스는 비타민 C가 방호함으로써 다소나마 자외선에 방호효과가 있는 것으로 나타난 것으로 생각된다. 한편 MNNG와 NMOR에 의하여 유발된 DNA 손상의 회복에 미치는 비타민 C의 방호효과에 대한 Sona의 연구에서는 MNNG와 NMOR은 *N*-nitroso compounds (NNC)의 같은 그룹의 물질로 두 물질 모두 DNA 메틸화를 유발하지만 'MNNG는 신진대사 활성화를 필요로 하지 않는 직접-행동 알킬화제이지만, *N*-nitrosomorpholine (NMOR)은 Nitroreductase에 의한 신진대사 활성화를 필요로 하는 간접-행동 알킬화제로 DNA 손상을 유발하는 기작이 서로 달라, 비타민 C가 MNNG의 유전독성은 방호하지 못하지만 NMOR의 유전독성은 방호하는 것으로 보고하고 있으나 이에 대한 구체적인 기작에 대해서는 설명하고 있지 않다[24]. 이외에도 MNNG에 의한 DNA 손상에 있어 비타민 C의 구체적인 방호기작에 대해서는 밝혀진 바 없다. 따라서 본 연구에서 비타민 C가 MNNG에 의해 유도된 DNA 손상을 방호하지 못한 것 역시 MNNG의 DNA 손상 기작에 대해 비타민 C가 대응하지 못한 것으로 판단될 뿐, 그 구체적인 기작에 대해서는 더 많은 연구가 이루어 져야 할 것으로 생각된다. 이상의 결과에서 비타민 C의 항돌연변이 효과는 돌연변이 유발원의 종류에 따라 상이하게 나타난다고 알려진 연구들의 결과[17, 19, 24]와 일치하는 것으로 생각된다. 그리고 같은 성질의 유전독성물질이라도 유전독성이 발현되는 기작은 서로 차이가 날 수 있으며, 세포의 종류와 특성이 다를 경우에도 유전독성이 발현되는 기작에 차이가 생길 수 있다.

비타민 C의 방호효과가 나타난 $H_2O_2$, $HgCl_2$, 자외선 그리고 4NQO를 시험물질로 하여 비타민 C를 전처리 한 다음, 시험물질들을 후처리 한 시험군에서는 유전독성에 의한 DNA 손상이 다소 감소하는 것으로 나타났다(Table 4). 또한, 시험물질을 전처리 한 다음 비타민 C를 후처리 한 시험군에서는 $H_2O_2$, $HgCl_2$, 그리고 4NQO에서 유전독성에 의한 DNA 손상이 감소하지 않은 반면에(Table 4) 자외선을 전처리하고 비타민 C를 후처리 한 시험군에서는 비타민 C를 전처리하고 자외선을 후처리 한 시험군과 비슷한 수준의 방호효과가 나타났다. 이와 같은 결과는 비타민 C가 강력한 항산화제로써, 1차적인 항산화작용을 담당하는 것으로 세포외액과 세포내의 세포질에 존재하며 유전독성물질과 직접적으로 작용하거나 항산화효소를 활성화하여 다양한 방식의 유전독성에 효과적으로 방호한다는 것을 보여 주는 것으로 생각된다. 그러나 이와는 달리 비타민 C 후처리에서의 결과는 일단 유전독성물질에 의해서 DNA 손상이 유발된 경우에는 효과적으로 방호를 하지 못한다는 것을 보여주는 것으로 생각된다. 4NQO의 경우 *in vivo* 실험에서 암의 발생, 증식, 전이를 억제한다는 실험결과[13, 14]가 있을 뿐, 어떤 기작에 의하여 DNA 손상이 이루어지는지 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 이러한 연구결과 등을 종합해 볼 때, 본 연구에서 비타민 C가 4NQO에 의해 유발된 DNA 손상을 감소시키는 기작을 밝히기 위해서는 보

Table 4. Effects of pre-treatment and post-treatment of vitamin C on genotoxicityinduced in CHO-K1 cells by genotoxicants

| Treatment | Combination | Olive tail moment (%) |
|---|---|---|
| $H_2O_2$ (10 μM) | Vit. C 10 μM | 1.68±0.156[a] |
| | - | 18.70±0.205[b] |
| | Pre-treatment Vit. C | 13.33±0.328[c] |
| | Post-treatment Vit. C | 19.16±0.095[b] |
| $HgCl_2$ (5 μM) | Vit. C 10 μM | 2.23±0.167[a] |
| | - | 11.41±0.275[b] |
| | Pre-treatment Vit. C | 7.58±0.203[c] |
| | Post-treatment Vit. C | 12.04±0.514[b] |
| UV (5 J) | Vit. C 10 μM | 13.88±0.214[a] |
| | - | 19.65±0.247[b] |
| | Pre-treatment Vit. C | 14.11±0.236[a] |
| | Post-treatment Vit. C | 14.55±0.534[a] |
| 4NQO (1 μM) | Vit. C 10 μM | 1.30±0.181[a] |
| | - | 16.27±0.300[b] |
| | Pre-treatment Vit. C | 8.34±0.240[c] |
| | Post-treatment Vit. C | 14.66±0.381[d] |

CHO-K1 cells were plated in a 12-well plate at $1\times10^6$ cells per well and treated with pre and post-treatment with genotoxicants and they are also treated with PBS as negative control. After 2 hr of incubation, Comet assay was measured as the Olive tail moment. Each value indicates the amount of DNA damage±S.E.M.Different letters indicate the statistical difference among samples. ($p$<0.05)

다 많은 연구가 이루어 져야 할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구 결과, 비타민 C는 1차적인 항산화작용을 담당하는 강력한 항산화제로써, 유전독성물질에 의해서 유발되는 DNA 손상 방호에 긍정적인 영향을 주는 것으로 생각되어지나, 여러 유전독성물질에 의해서 일어나는 다양한 방식의 DNA 손상 기작을 모두 방호하지 못한다고 생각된다.

한편, 최근에 비타민 C와 비타민C를 환원시켜주는 효소인 Glutathione을 병용 처리 하였을 때 DNA 손상이 매우 감소한다는 보고가 있으며, 과산화수소에 의한 산화적 스트레스와 γ-irradiation에 의한 DNA 손상을 복구하는 체계가 다르게 작용한다는 보고가 있다[20]. 이러한 연구처럼 앞으로 DNA 복구 체계에 대한 연구, 여러 항산화물질과 항산화효소를 병용 처리 하였을 경우에 이들 간의 시너지 효과 및 방호 기작에 대한 연구 및 DNA 복구 체계의 연관성에 대해서 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다. 비록 비타민 C가 다른 항산화물질에 비해 많이 연구된 항산화물질이기는 하지만 아직 다양한 항산화작용 기작에 대해 정확하게 밝혀진 것이 많지 않다. 이러한 이유 때문에 현재까지도 비타민 C가 학자들 사이에 많은 논란이 되고 있다. 따라서 이러한 논란을 해결하기 위해서는 비타민 C의 분자생물학적 항산화 방호 기작(antioxidant defense mechanism)에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2013년 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사 드립니다.

## References

1. Antunes, L. M. and Takahashi, C. S. 1999. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocyte cultures. *Teratog Carcinog Mutagen* **19,** 53-59.
2. Berger, T. M., Polidori, M. C., Dabbagh, A., Evans, P. J., Halliwell, B., Morrow, J. D., Roberts, L. J. and Frei, B. 1997. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem* **272,** 15656-15660.
3. Blair, A., Lee, S. H. and Oe, T. 2001. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* **292,** 2083-2086.
4. Blair, A., Lee, S. H., Williams, M. V. and Dubois, R. N. 2005. Cycloloxygenase- 2-mediated DNA damage. *J Biol Chem* **280,** 28337-28346.
5. Bowman, G. L., Frei, B., Dodge, H., Calabrese, C., Oken, B. S., Kaye, J. A. and Quinn, J. F. 2009. Ascorbic acid and rates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **16,** 93-98.
6. Bsoul, S. A. and Terezhalmy, G. T. 2004. Vitamin C in health and disease. *J Contemp Dent Pract* **5,** 1-14.
7. Castillo, J., Benavente-Garcia, O., Lonente, J., Alcaraz, M., Redondo, A., Ortuno, A. and Del Rio, J. A. 2000. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (Vitis vinifera): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J Agric Food Chem* **48,** 1738-1745.
8. Chen, K., Suh, J., Carr, A. C., Morrow, J. D., Zind, J. and Frei, B. 2000. Vitamin C suppresses osidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. Am. *J Physiol Endocrinol Metab* **279,** 1406-1412.
9. Eylar, E., Baez, I., Navas, J. and Mercado, C. 1996. Sustained levels of ascorbic acid are toxic and immunosuppressive for human T cells. *P R Health Sci J* **15,** 21-26.
10. Glascott, P. A. Jr., Tsyganskaya, M., Gilfor, E., Zerm, M. A. and Farber, J. L. 1996. The antioxidant function of the physiological content of vitamin C. *Mol Pharmacol* **50,** 994-999.
11. Halliwell, B. 1996. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *in vivo*? *Free Radic Res* **25,** 439-454.
12. Hara, R., Mo, J. and Sancar, A. 2000. DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease. *Mol Cell Biol* **20**, 9173-9181.
13. Kandarkar, S. V. and Sawant, S. S. 1996. The effect of vitamin C on the hamster cheek pouch treated with the water soluble carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). *Eur J*

*Cancer B Oral Oncol* **32B,** 230-237.
14. Kandarkar, S. V. and Reade, P. C. 1991. The effect of topical vitamin C on palatal oral mucosal carcinogenesis using 4-nitroquinoline-1-oxide. *J Biol Buccale* **19**, 199-204.
15. Kang, S. A., Jang, Y. J. and Park, H. 1998. *In vivo* dual effects of vitamin C on parauat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radical Res* **28**, 93-107.
16. Kosmoski, J. V. and Smerdon, M. J. 1999. Synthesis and nucleosome structure of DNA containing a UV photoproduct at a specific site. *Biochemistry* **38**, 9485-9494.
17. Nefic, H. 2001. Anticlastogenic effeft of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **498**, 89-98.
18. Ogrunc, M., Becker, D. F., Ragsdale, S. W. and Sancar, A. 1998. Nucleotide excision repair in the third kingdom. *J Bacteriol* **180**, 5796-5798.
19. Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K. and Levine, M. 2003. Vitamin C as an Antioxidate: Evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* **22**, 18-35.
20. Piperakis, S. M., Tassiou, A. M. and Visvardis, E. E. 1997. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to $H_2O_2$ and ɣ-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res* **383,** 71-80.
21. Rao, M. V. 1997. Mercury and its effects on mammalian systems-a critical review. *Ind J Environ Toxicol* **7**, 3-11.
22. Sato, K., Kusaka, y., Zhang, Q., Deguchi, Y., Li, B., Okada, K., Nakakuki, K. and Muraoka, R. 1997. Direct effect of inorganic mercury on citrate uptake by isolated rat renal brush border membrane vesicles. *Ind Health* **35**, 456-460.
23. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184-191.
24. Sona, R. and Darina, S. 2002. Effects of vitamins C and E on cytotoxicity induced by N-nitroso compounds, N-nitrosomorpholine and N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine in Caco-2 and V79 cell lines. *Cancer Lett* **182**, 11-18.
25. Zhou, D. F., Ke, W. Z., Chen, N. F. and Ji, K. 2005. Effects of different levels of vitamin C on UV radiation-induced DNA damage. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* **25**, 2012-2015.

## 초록 : 유전독성물질의 유전체 손상 작용에 대한 Vitamin C의 방호효과

유경진 · 이천복*
(경성대학교 이과대학 생물학과)

비타민 C는 다양한 유전독성에 대하여 방호작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있지만, 구체적 방호기작과 방호작용의 정도는 충분히 이해되어 있지 않다. 본 연구는 독성물질 및 환경의 조작에 의해 세포의 유전체가 손상되는 조건에서 비타민 C가 발휘하는 유전독성 방호효과를 정량하고, 그 방호기작을 분석하였다. Chinese hamster ovary 세포(CHO-K1)를 사용한 Comet assay를 수행하여, $H_2O_2$, $HgCl_2$, *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG), 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)와 자외선에 노출된 세포의 DNA 손상 정도를 측정하였다. 비타민 C 방호효과를 측정한 결과, $H_2O_2$, $HgCl_2$, 4NQO를 비타민 C와 함께 처리한 경우, DNA 손상이 대조군 수준으로 감소하였다. 자외선의 경우 비타민 C의 방호효과가 나타났으나 대조군 수준까지 미치지 못하였으며, MNNG의 경우 비타민 C가 전혀 방호하지 못하는 것으로 나타났다. 또한, 비타민 C를 유전독성노출 이전에 처리한 세포들의 DNA 손상 정도가 독성노출 이후에 처리된 경우보다 28~49% 낮은 것으로 측정되었다. 이는 독성노출 이전 시점에 도입된 비타민 C가 세포외액과 세포질에 존재하여, 이후에 도입되는 유전독성물질과 직접적으로 작용하며, 강력한 항산화제로써 1차적인 항산화작용을 담당함을 시사한다. 그러나 MNNG의 경우처럼 비타민 C가 방호효과를 보이지 않는 유전독성물질이 존재하므로, 유전독성물질의 독성기작에 따라 비타민 C의 방호효과는 제한되는 것으로 나타났다. 따라서, 각 유전독성물질의 독성기작과 비타민 C의 방호기작과의 상호작용에 대한 연구가 필요하며, 비타민 C의 항산화 방어 기작(antioxidant defense mechanism)의 다양성에 대한 규명이 이루어져야 할 것으로 사료된다.