

자주달개비 수술털에서 방사선에 의해 유발되는 세포손상에 대한 살충제의 방어효과

김진규 · 김원록 · 이창주 · 장화형 · 이영근

(한국원자력연구소)

적 요 - 살충제와 방사선이 자주달개비 수술털 돌연변이에 미치는 복합적 영향을 평가하였다. 포트에서 생육된 *Tradescantia* 4430 식물체에 코발트 선원으로부터 0.3, 0.5, 1.0 및 2.0 Gy의 감마선을 조사하였다. 살충제는 감마선 조사 24시간 전에 농업용으로 사용되는 파라치온 유제를 살포하였다. CT 실험군과 Pa+ γ 실험군에 있어서의 돌연변이 빈도가 증가한 고조기간은 방사선 조사 후 7~11일로 돌연변이 빈도는 방사선량 증가에 따라 선형적으로 증가하는 반응관계를 보였다. CT 실험군에서의 선량반응식 기울기(증가계수)는 5.99 ($r^2=0.988$)이었으나, Pa+ γ 실험군의 증가계수는 3.43 ($r^2=0.981$)으로 CT 실험군의 값에 비해 현저히 낮았다. 즉 Pa+ γ 실험군이 CT 조사군에 비하여 방사선에 의한 돌연변이 유발 증가율이 43% 억제됨을 확인할 수 있었으며 이는 살충제 전처리가 방사선에 의한 세포유전물질 손상을 오히려 저감시키는 효과를 나타낸 것이기 때문이다. 이같은 실험결과는 두가지 불리한 자극이 복합적으로 작용할 때 일반적으로 나타나는 공조작용과는 상반되는 결과이며 오히려 파라치온 전처리에 의해 식물체가 보다 강한 자극에 대비할 수 있도록 유도되는 적응반응이 유발되었거나 방사선효과에 대한 변화작용이 나타난 것으로 해석 가능하다.

서 론

생물체가 방사선을 조사 받았을 때 방사선에너지가 생체에 부여되고 이 에너지를 흡수한 생체는 일련의 물리, 화학적 변화를 거쳐 생물학적 변화를 일으키게 되어 결과적으로 방사선 장애가 나타나게 된다. 이같은 장애는 절대적인 것이 못되며 여러 가지 요인에 의하여 변화될 수 있다는 사실이 밝혀져 방사선 장애기작을 이해하고 방사선 장애로부터 생체를 보호하고자 하는 실용성 때문에 커다란 관심의 대상이 되어 왔다(남 1992).

생물체에 미치는 방사선의 영향을 변화시키는 요인은 방사선의 종류, 조사방법, 조사환경 등의 물리적 요인과 생물종, 개체, 연령, 대사기능, 영양상태 등의 생물학적 요인이 크게 관여하고 있다(서 등 1995). 또한 방사선 장애를 변화시키는 여러 가지 화학물질이 발견되어 보호제 또는 증감제로 방사선 치료분야에서 이들 물질의 활용이 기대되고 있다(강 등 1996).

방사선을 조사하기 전이나 후에 생물체에 적당한 처리를 하여 방사선 장애를 경감 또는 수식시키는 경우를 보호라고 하며, 여러 가지의 불리한 자극이 복합적으로

생물체에 가해지면 각각의 자극에 의한 손상의 합보다 더욱 큰 손상이 나타나는데 이를 공조작용(synergism)이라고 한다(Cebulska-Wasilewska *et al.* 1981). 방사선 효과의 화학적 변화란 화학물질에 의한 방사선 장애 정도의 변경을 의미하며, 이같은 방사선 장애를 감소시키는 화학물질을 화학보호제(chemical protector) 또는 방어물질이라고 한다.

농약은 균, 선충, 곤충, 쥐, 기타 동식물 및 바이러스 등에 의한 농작물의 피해를 방지할 목적으로 사용되고 있다. 농약은 광범위하게 사용하기 때문에 표적생물에는 독성이 강하고 사람을 비롯한 기타 생물에는 무해한 선택독성(selective toxicity)이 높을수록 좋으며 선택독성이 높은 농약으로는 유기인계 살충제(organophosphorus insecticides)가 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. 현재 시판되고 있는 살충제인 파라치온을 비롯한 말라치온은 대사생성물과 분해생성물, 그리고 그와 섞인 혼합불순물이 살충제 원래 형태보다 더 독성이 있는 것으로 알려졌다(Nomeir & Dauterman 1979; Tallcott *et al.*

1979).

Tradescantia 4430 클론은 화색이 다른 두 가지 종을 인위적으로 교잡시켜 만든 종간잡종(interspecific hybrid)으로 꽃색에 있어서 유전적 이형성을 가지며 정상적으로 우성인 남색꽃을 피운다. 특히 자주달개비는 화서의 발생 또는 수술털 세포의 분열과정 중에 방사선을 포함한 돌연변이원이나 promutagen 및 화학적 발암원에 노출될 경우 쉽사리 체세포 돌연변이를 일으키는 생물학적 특이성으로 인하여 각국에서 자주달개비 수술털을 이용한 폭 넓은 연구가 진행되고 있다(Sparrow et al. 1974; Gichner et al. 1980; Ichikawa et al. 1990). 국내에서는 자주달개비 *Tradescantia* 4430 클론을 이용하여 수술털 체세포 돌연변이에 있어서 증성자의 선량반응과 생물학적 효과비 검증(김과 김 1998), 방사선과 환경인자에 의한 체세포 돌연변이 빈도(김 등 1998) 및 환경방사선 감시(김 등 1998) 등의 연구가 활발하게 진행되고 있다.

본 연구는 물리·화학적 성격이 확연히 다른 자극물질에 의해 나타나는 생물체의 반응을 알아보기 위하여 살충제와 감마선의 복합작용이 자주달개비 수술털의 분홍돌연변이 빈도에 미치는 영향을 실험적으로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

실험용 식물체는 방사선에 민감하게 반응하면서도 자발돌연변이율(intrinsic mutation rate)이 비교적 낮은 종간잡종인 *Tradescantia* 4430 클론을 사용하였다. 포트에서 건전하게 생육된 식물체를 24시간 동안 실험실의 조건에 순치시킨 다음 평균 15개씩의 화서를 하나의 처리군으로 하여 실험하였다.

2. 파라치온의 처리

살충제의 처리는 상용중인 파라치온유제(제일화학, 1997년 1월 제조)를 구입하여 제품에 기재된 일반적인 살포농도(1 mg/L)를 조제하였으며 분무기를 이용하여 화서의 포엽부분을 중심으로 균일한 양을 분무하였다. 분무한 후 24시간을 순치한 다음 방사선을 조사하였다.

3. 방사선 조사

한국원자력연구소의 Cobalt-60 감마선원(약 400 Ci 용량, Panoramic irradiator, Atomic Energy of Canada Ltd.)를 이용하여 상온, 공기 중에서 시료를 0.3, 0.5, 1.0, 및 2.0 Gy의 선량으로 방사선을 조사하였다.

4. 식물체 배양

방사선을 조사한 식물체는 포트채로 성장상 내에서 배양하였으며 Hoagland No. 2 용액을 6배 희석하여(Conger 1964) 3일에 한번씩 공급하여 주었다. 방사선만 조사한 실험군(CT)과 파라치온 처리후 방사선 조사한 실험군(Pa+ γ) 모두 배양조건은 명기 14시간, 20°C, 습도 80%, 조도는 293 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ 로 조광은 대형메탈램프로 하였으며 형광등을 보조광원으로 사용하였다. 암기 10시간, 18°C, 상대습도 85%로 동일한 조건을 유지하였다.

5. 검정분석

실체현미경을 이용하여 배울 25배 하에서 돌연변이를 계수하였다. 만개상태의 화기를 실험군별로 채화한 다음 6개의 수술을 모두 떼어내 파라핀유가 도말된 슬라이드에 퍼서 검경용 프레파라트를 제작하였다. 돌연변이는 한 개 또는 다수의 연속된 분홍세포군 각각을 하나의 돌연변이 건(event)수로 계수 하였다. 돌연변이 세포의 계수는 방사선 조사 후 4주 이상 지속적으로 실시되었으며 특히 방사선 조사 후 분홍돌연변이율 증가가 두드러진 고조기간(peak interval)의 검정결과를 통합한 자료(pooled data)로부터 분홍돌연변이빈도(pink mutations/100 hairs)를 산정하였다.

결과 및 고찰

파라치온 만을 산포한 실험군에 있어서 처리 후 날짜 경과에 따른 분홍돌연변이의 상승은 뚜렷하게 나타나지 않았다(Fig. 1). 이같은 결과는 농업용으로 권장되고 있는 살포농도인 1 mg/L 수준의 파라치온 처리가 식물체 또는 세포의 성장발육에 지장을 초래하고 있지 않을 뿐 아니라 결정적인 돌연변이 유발의 원인이 되고 있지 않음을 확인할 수 있었다.

CT 실험군에 있어서 중간 조사선량인 1.0 Gy 조사군을 기준으로 했을 때 방사선에 의한 분홍돌연변이율의 증가는 조사 후 7일 경부터 급격히 증가하여 조사 11일에는 10.07 ± 1.04 로 최대값을 보였으며(Fig. 2A), Pa+ γ 실험군의 분홍돌연변이율의 증가는 조사 후 7일 경부터 나타나기 시작하여 조사 9일 후에 4.52 ± 0.96 으로 최대값을 나타내었다(Fig. 2B). 따라서 CT 실험군과 Pa+ γ 실험군에 있어서 분홍돌연변이가 증가하는 시기는 커다란 차이를 나타내지는 않았지만 최대값에 있어서는 CT 실험군이 Pa+ γ 실험군에 비하여 2배 이상 높게 나타났다.

분홍돌연변이가 확연하게 증가한 고조기간은 CT 실험

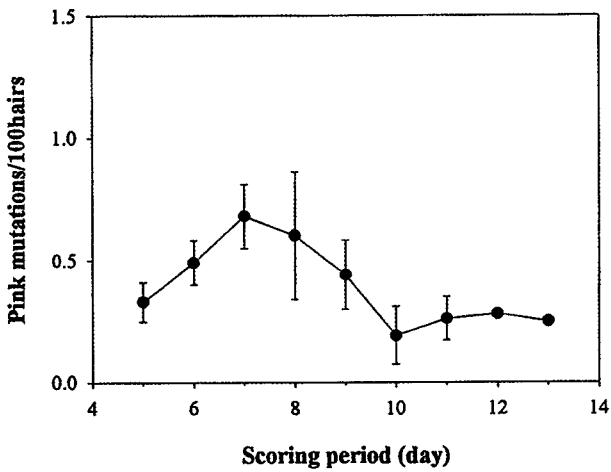


Fig. 1. The pink mutation frequencies during the scoring period after parathion treatment. Bar represents standard error of mean (n=12).

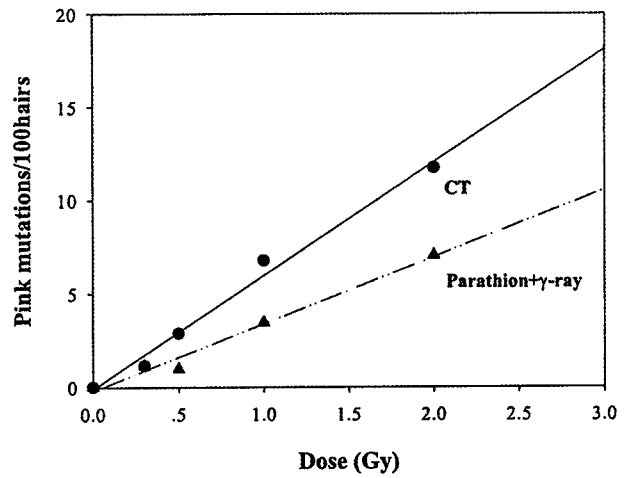


Fig. 3. Dose-response relationships of pink mutation frequencies induced in stamen hairs of the *Tradescantia*.

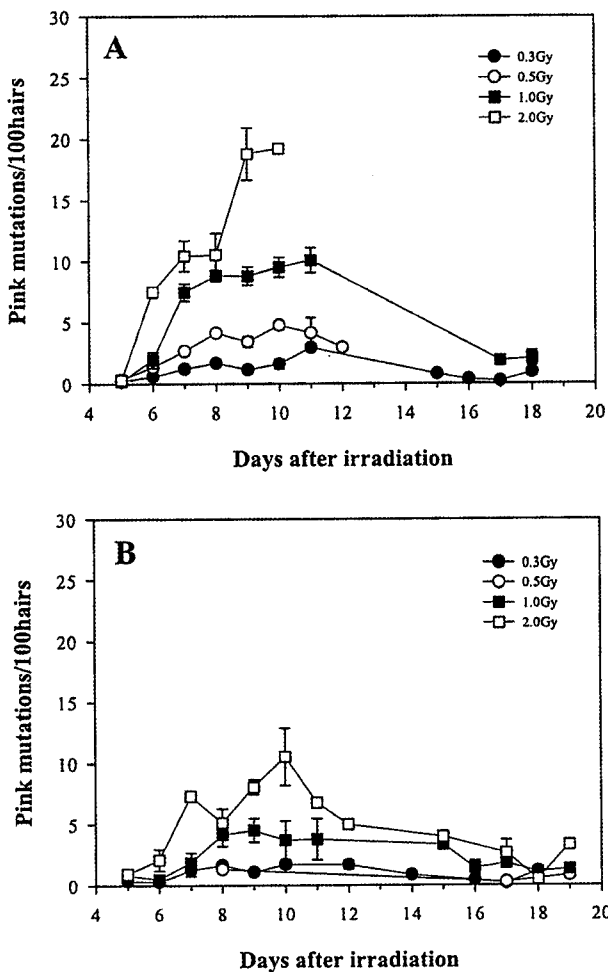


Fig. 2. Pink mutation frequencies in irradiated *Tradescantia* 4430. A: CT, B: Pa+ γ . Bar represents standard error of mean (n=12).

군에 있어서는 조사 후 7일째부터 11일까지, Pa+ γ 실험군 역시 조사 7일 후부터 11일까지로 차이가 없었다. 일반적으로 돌연변이율 고조기간은 통상 방사선 조사 후 6일에서 20일 사이에 나타나지만 공시식물체의 생육상태 및 실험처리시의 손상정도에 따라 약간 다르게 나타날 수도 있으나 본 실험에서는 두 실험군 모두 통상적인 고조기간내에 돌연변이율이 증가하고 있음을 알 수 있다. 설정된 고조기간(7~11일)중의 검경 결과를 통합하여 선량별로 수술털 100모당 평균 돌연변이율을 산정하였으며 방사선을 조사하지 않은 대조시료의 분홍돌연변이율을 보정자료로 사용하였다. 고조기간중의 검경결과를 통합한 자료로부터 얻어진 분홍돌연변이 빈도는 일차함수적 선량-반응 관계를 나타내고 있다(Fig. 3). 이 같은 선형적 관계식의 회귀계수는 CT 실험군과 Pa+ γ 실험군에 있어서 각각 0.987 및 0.981로서 높은 통계적 유의성이 인정된다. CT 실험군에 있어서 감마선에 의하여 유발되는 돌연변이 빈도의 증가계수 $\alpha=5.99$ 에 비해 파라치온 전처리후 방사선 조사한 경우의 돌연변이 빈도 증가계수는 $\alpha=3.43$ 으로서 현저히 낮아짐을 알 수 있었다. 즉 파라치온 전처리에 의해 방사선에 의한 돌연변이 유발효과가 약 43% 정도 억제되는 결과를 얻었다.

방사선에 의한 생물학적 효과 중 특히 유전자에 유발되는 돌연변이에 관해서 획득된 데이터의 양이 풍부할 경우 Chadwick와 Leenhouts(1980)의 방사선 작용에 관한 분자이론에 의하여 자주달개비의 체세포 돌연변이 유발에 대한 선량반응 관계를 설명할 수 있다.

일반적으로 방사선에 의한 돌연변이, 염색체 이상 또는 종양유발 등의 생물학적 효과는 다음식과 같이 간단

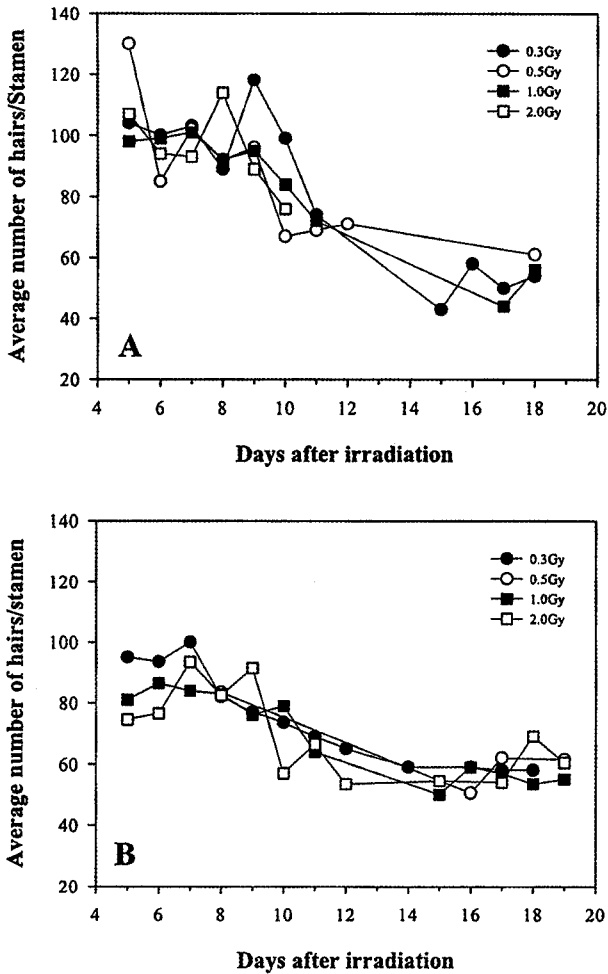


Fig. 4. Average number of hairs per stamen in irradiated *Tradescantia* 4430. A: CT, B: Pa+γ.

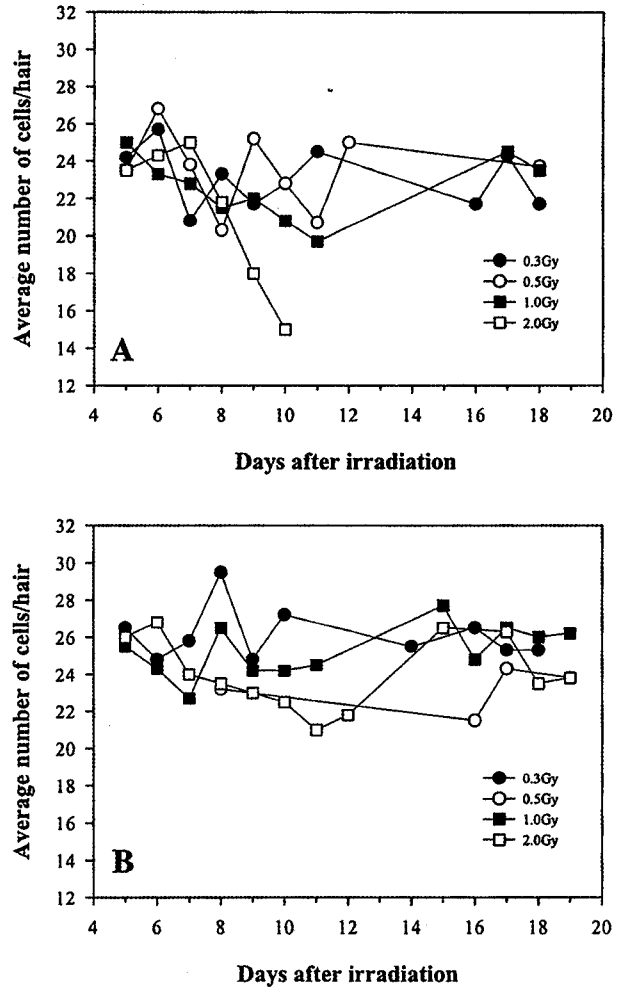


Fig. 5. Average number of cells per hair in irradiated *Tradescantia* 4430. A: CT, B: Pa+γ.

한 선형적-이차함수적 선량반응 관계로 표현할 수 있다 (Tubiana *et al.* 1990).

$$M = \alpha D + \beta D^2 \quad (1)$$

여기서,
 M = 돌연변이빈도
 D = 방사선량 (Gy)
 α = 단위선량당 나타나는 돌연변이 빈도
 β = 단위선량 제공당 나타나는 돌연변이 빈도

(1)식에 제시된 linear-quadratic dose-response의 경우도 선량포화가 나타나지 않는 저선량 영역에서는 βD^2 로 표현되는 이차함수항의 기여분이 무시할 수 있는 수준이므로 다음과 같이 단순한 일차함수를 이용하여 저선량 영역에 있어서의 반응 관계를 표현할 수 있다.

$$M = \alpha D + b_0 \quad (2)$$

여기서,
 M = 돌연변이빈도
 α = 단위선량당 나타나는 돌연변이 빈도
 D = 방사선량 (Gy)
 b_0 = 자발돌연변이 빈도

위 (2)식은 단순화된 선량반응관계식에 실험결과를 적용하는 경우 데이터의 양이 풍부하지 않을 경우 자료의 자유도 (degree of freedom) 감소 등 통계처리에 따른 문제점을 배제시킬 수 있다. 또한 본 연구가 저선량 영역의 방사선에 국한되었다는 점을 감안할 때 일차함수를 이용한 선량반응 관계식의 정립이 정당화될 수 있을 것이다 (김과 김 1998).

CT 실험군에 있어서의 꽃당 평균 수술털 수의 변화양상은 조사 후 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을

보였으며 (Fig. 4A), Pa+ γ 실험군에 있어서도 꽃당 평균 수술털 수의 변화양상 역시 조사 후 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 4B).

CT 실험군에 있어서 방사선 조사 후 수술털당 수술털 세포수의 변화에 있어서는 2.0 Gy 조사군을 제외한 나머지 조사군에 있어서는 뚜렷한 감소를 보이지 않았다 (Fig. 5A). Pa+ γ 실험군에서의 방사선 조사 후 수술털당 수술털 세포수의 변화는 CT 실험군과는 달리 모든 조사군에 있어서 뚜렷한 감소를 보이지 않고 거의 일정하게 유지되었다 (Fig. 5B). 이와 같은 결과로 볼 때 파라치온 처리후의 감마선의 조사는 자주달개비 수술털과 수술털 세포에 있어서 성장발육에는 커다란 영향을 주지 않으며 단지 방사선에 의한 분홍돌연변이율에 있어서 돌연변이 유발효과가 상당히 억제되고 있음을 보여준다.

여러 가지의 불리한 자극이 복합적으로 생물체에 가해지면 각각의 자극에 의한 손상의 합보다 더욱 큰 손상이 나타나는 공조효과 (synergistic effect)에 대하여 보고된 사례는 많다 (Cebulka-Wasilewska *et al.* 1981; Leenhouts *et al.* 1986; Cebulka-Wasilewska 1988; Ichikawa 1992; Shima & Ichikawa 1995, 1997). Titenko-Holland 등 (1997)은 사람 림프구의 미세핵 분석을 이용한 유기인계 살충제인 malathion의 유전독성 연구를 통하여 낮은 농도에서 손상보다는 보호의 가능성에 대하여 보고하였으며, Sobti 등 (1982)과 Kaur와 Grover (1983)은 메칠 파라치온에 관한 연구에서 돌연변이 유발성이 없거나 약한 돌연변이 유발성을 가진다고 하였다. Kas'yanenko와 Koroleva (1979)는 화학돌연변이원 (ethylenimine)과 살충제 (granosan, sevin, captan, morotsin 등)에 있어서 적은 양을 처리한 이후에 급성 노출시 세포의 민감성을 증가시킬 수 있는 능력이 있다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서와 같이 두 가지 복합적 처리에 의한 영향이 한가지 처리만의 영향보다 적게 나타났음을 보고한 사례는 매우 드물다. 방사선을 조사할 때 처음 아주 낮은 선량을 조사하고 난 후 높은 선량을 다시 조사할 때 바로 높은 선량을 조사하는 것보다 생물체 또는 세포가 받는 영향이 적게 나타난다는 적응반응 (adaptive response)은 잘 알려져 있는 사실이나 물리화학적 성격이 확연히 다른 두 가지 자극에 의해 나타나는 복합적 반응을 연구한 보고는 많지 않다. 따라서 파라치온 전처리가 방사선에 의해서 유발되는 유전자 손상을 저감시킨 것은 파라치온에 의해 적응반응이 유발되었거나 또는 파라치온이 *Tradescantia* 4430 식물체에 대해서는 일종의 방사선방어효과를 나타낸 것으로도 해석될 수 있기 때문에 매우 흥미로운 실험결과라 할 수 있다. 따라서 본 연구결과는 불리한 자극에 대

한 생물체 반응을 규명함에 있어 중요한 단서를 제공하는 동시에 자주달개비 수술털 세포계의 다양한 실험적 응용성을 암시하고 있다. 향후 파라치온이 식물체에 대하여 나타내는 유전독성의 정도를 파악하고 여러 가지 복합적 요인이 작용할 때 나타나는 영향을 조건별로 세분화하여 구명하는데 자주달개비 수술털 시스템이 응용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

강만식, 김종봉, 민봉희, 정규희, 정해원 (1996) 방사선생물학. 교학연구사. 서울.
 고석태, 김학성, 유항목, 성연희, 오기완, 임동구, 장성재, 허근, 홍연탁 (1995) 독물학. 정문각. 서울.
 김진규, 김원록 (1998) 자주달개비 수술털 분홍돌연변이의 중성자 선량 반응과 RBE. 대한방사선방어학회지 **23** : 17-23.
 김진규, 김원록, 이영근, 김재성, 송희섭, 정철영, 김기남, 서원선, 홍광표 (1998) 방사선지표생물 자주달개비를 이용한 환경방사선 감시. 환경생물학회지 **16** : 85-91.
 김진규, 김원록, 김재성, 신해식, 이정주 (1998) 기온일교차와 감마선의 영향에 의한 자주달개비 수술털의 체세포 돌연변이 빈도. 환경생물학회지 **16** : 253-262.
 남상열 (1992) 방사선생물학. 민음사. 서울.
 서두환, 김재록, 김진규 (1995) 원자력기초이론. 한국원자력연구소, 대전.
 Cebulka-Wasilewska A (1988) Interaction between radiation and chemical mutagens in the induction of somatic mutations. *Nukleonika*. **33** : 137-148.
 Cebulka-Wasilewska A, HP Leenhouts & KH Chadwick (1981) Synergism between EMS and X-rays for the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. *Int. J. Radiat. Biol.* **40** : 163-173.
 Chadwick KH & HP Leenhouts (1980) The Molecular Theory of Radiation Action. pp. 91-117. Springer-Verlag, Heidelberg.
 Conger A (1964) A simple liquid-culture method of growing plants. *Proc. Florida State Horticultural Society*. **77** : 3-6.
 Gichner T, J Veleminsky & AG Underbrink (1980) Induction of somatic mutations by the promutagen dimethylnitrosoamine in hairs of *Tradescantia* stamen. *Mutat. Res.* **78** : 381-384.

- Ichikawa S (1992) *Tradescantia* stamen hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiation and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutat. Res.* **270** : 3-22.
- Ichikawa S, H Kanai & H Harada (1990) Somatic mutation frequencies in *Tradescantia* stamen hairs treated with aqueous solutions of ethyl methanesulfonate and methanesulfonate and methyl methanesulfonate. *Jpn. J. Genet.* **65** : 309-321.
- Kas'yanenko AG & NS Koroleva (1979) An evaluation of the genetic danger of pesticides. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR.* **6** : 332-338.
- Kaur P & IS Grover (1983) Induction of chlorophyll deficient mutants by some organophosphorus pesticides. *J. Cytol. Genet.* **18** : 64.
- Leenhouts HP, MJ Sijsma, A Cebulska-Wasilewska & KH Chadwick (1986) The combined effect of DBE and X-rays on the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. *Int. J. Radiat. Biol.* **49** : 109-119.
- Nomeir AA & WC Dauterman (1979) In vitro degradation of malathion by mouse liver. *Biochem. Pharmacol.* **27** : 2975-2976.
- Shima N & S Ichikawa (1995) Mutagenic synergism detected between dimethyl sulfate and X-rays but not found between N-methyl-N-nitrosourea and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. *Mutat. Res.* **331** : 79-87.
- Shima N & S Ichikawa (1997) Synergistic effects of N-ethyl-N-nitrosourea (an alkylating agent with a low Swain-Scott substrate constant) and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. *Environ. Mol. Mutagen* **29** : 323-329.
- Sobti RC, A Krishnan & CF Pfaffenberger (1982) Cytogenetic and cytokinetic effects of some agricultural chemical on lymphoid cells in vitro : organophosphates. *Mutat. Res.* **102** : 89-102.
- Sparrow AH, LA Schairer & R Villalobos-Pietrini (1974) Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. *Mutat. Res.* **26** : 265-276.
- Tallcott RE, NM Mallipudi, N Umetsu & TR Fukuto (1979) Inactivation of esterase by impurities isolated from technical Malathion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **49** : 107-112.
- Titenko-Holland T, G Windham, P Kolach, F Reinisch, S Parvatham, AM Osorio & MT Smith (1997) Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo : A study of malathion-exposed workers. *Mutat. Res.* **388** : 85-95.
- Tubiana M, J Dutreix & A Wambersie (1990) Introduction to Radiobiology. Taylor & Francis, London.

Protective Effect of Pesticide on Radiation-Induced Cell Damage in *Tradescantia* 4430 Stamen Hairs

Jin Kyu Kim, Won-Rok Kim, Chang Joo Lee,
Hwa-Hyoung Chang and Young-Keun Lee

(Korea Atomic Energy Research Institute, 150 Duckjin-dong, Yusong-gu, Taejon 305-353, Korea)

Abstract - To investigate the combined effect of radiation and pesticide on *Tradescantia* somatic cell mutations, potted plants of *Tradescantia* 4430 on which parathion had been sprayed evenly 24 hours before irradiation. Radiation doses were 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 Gy of gamma-ray. The plants irradiated only with the gamma-ray radiation were used as control groups (CT). Pink mutation frequency increased linearly proportional to the radiation dose and the peak interval of elevated mutation frequencies appeared during 7~11 days after irradiation in both CT and Pa+ γ groups. The slope of dose-response curve in CT was 5.99 ($r^2=0.988$), while it was 3.43 ($r^2=0.981$) in Pa+ γ . It seemed that parathion pretreatment had a protective effect against radiation-induced cell damages since it decreased the slope value by 43%. It is suggested that an adaptive response or radiomodification could be induced in irradiated stamen hair cells by parathion pretreatment. [pesticide, pink mutation, radiation, *Tradescantia*].