

흡연과 낮은 방사선 피폭량이 Lymphocyte DNA 손상에 미치는 영향

신현길*, 김윤주, 권은혜, 육진영, 최수용*

한동대학교 생명과학연구소, *한국원자력병원 임상의학연구소

The Influence of Smoking and Low Dose Radiation Exposure to the Damage of the Lymphocyte DNA

Heuyn-Kil Shin*, Yun-Joo Kim, Eun-Hye Kwon,
Jin-Young Yook and Soo-Yong Choi*

Institute for Biotechnology, Handong Global University, Pohang, Kyungbuk.
*Korea Cancer Center Hospital, Lab of Clinical Research.

ABSTRACT

Single cell gel electrophoresis (SCGE) was used to the experiment with the variation on the amount of smoking and low dose radiation exposure to find how much the Lymphocyte DNA was damaged, and especially for whom smoke a lot (about 20 or more than 20 cigarettes a day) it was found to be highly damaged. While, the damage of 'not more than 20 cigarettes a day' was found to be not so much significant as like for whom smoke about or more than 20 cigarettes a day. And, according to the different amount of the radiation exposure, the Lymphocyte DNA was found to be considerably damaged for 0~13 m Sv ($P < 0.01$), it was not able to prove the relationship between the DNA damage and the radiation exposure.

Key words : single cell gel electrophoresis, DNA damage, lymphocyte DNA, low dose radiation, smoking

서 론

흡연이 발암의 주요한 원인이 된다는 사실은 이미 잘 알려져 있으며 또한 담배는 DNA 손상을 유발한다고 보고되었다 (Betti *et al.*, 1995; Sardas *et al.*, 1995; Piperakis *et al.*, 1998). 흡연자들과 비흡연자들의 lymphocyte DNA를 분리하여 DNA 손상 정도를 조사하였던 바, 흡연자들의 손상 정도가(흡연자, 36.2 ± 8.45 microm; 비흡연자 21.6 ± 2.06

microm) 높은 것으로 나타났다 (Mohankumar *et al.*, 2002).

Betti *et al.* (1994, 1995)은 comet assay를 이용하여 실험한 결과 흡연자가 비흡연자에 비해 DNA 손상이 크게 나타난다고 보고하였다.

Nicotine에 의하여 생성된 free radical은 DNA 손상을 야기하고 담배는 많은 발암성 물질, 즉 tobacco-specific N-nitrosamines, tobacco alkaloids, nicotine 유도체를 생성시켜 이들의 DNA를 치환하여 DNA를 손상시키는 역할을 한다 (Au *et al.*, 1991). 또한 많은 학자들이 low dose radiation이 lymphocyte DNA에 손상을 어느 정도 야기하는지 single

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-54-260-1360, E-mail: hkshin@handong.edu

cell gel electrophoresis (SCGE)를 이용하여 조사하였다(Rothkamm *et al.*, 2003). 또한 Piperakis *et al.* (2000)은 도시와 농촌 지역에서 흡연자들의 DNA 손상 정도를 조사하였던 바, 모든 집단에서 마찬가지로 DNA 손상이 유의성 있게 나타났다고 보고하였다.

Endonuclease III와 Formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG)를 산화된 pyrimidine으로 DNA 손상을 유발시키고, purine이 산화되어 생성된 8-oxoguanine에 의하여 DNA 손상을 유발시켜 DNA 손상 정도를 조사하였다. 0.5 Gry에서 8 Gry까지 SMMC-7721 세포를 방사능을 조사하여 그 손상 정도를 측정하였던 바 2Gry에서 거의 모든 세포가 손상을 일으킨다고 보고하였다(Qiu *et al.*, 2003).

Vijayalaxmi *et al.* (1992)은 낮은 γ -방사선 조사(0.25 Gry)에서도 DNA 손상을 일으킨다고 보고하였다. 따라서 본 연구는 우리나라의 산업 현장에서 낮은 방사선 조사(0~13 m Sv)에 의하여 발생하는 DNA 손상 정도를 조사하고 또한 흡연량에 따른 DNA 손상 정도를 조사하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

흡연량

산업체에서 근무하는 남성들을 대상으로 하여 총 83명에 대하여 흡연량을 조사하였다. 담배의 흡연 정도는 비흡연자, 하루에 10개비 미만, 하루에 10~20개비 그리고 하루에 20개비 이상의 흡연자, 이상 4개의 그룹으로 나누어 흡연량에 따른 DNA 손상 정도를 측정하였다.

혈액 채취

우리나라 전국에서 0~13 m Sv 피폭된 22~56세의 산업 현장에 종사하는 남성들을 대상으로 하여 83명의 사람중 무작위로 선별하여 5 mL 정도의 혈액을 채취하여 본 lymphocyte DNA 손상 측정 실험을 실시하였다. 혈액이 응고되는 것을 방지하기 위하여 미리 0.1 M EDTA가 함유된 시험관을 준비하여 실험에 사용하였다(Andreoli *et al.*, 1999).

Lymphocyte의 추출 및 보존

본 실험은 먼저 tube와 heparin 또는 0.1 M EDTA 1 mL을 준비하여 혈액을 5 mL 정도 채취하고, Lymphocyte separation sol'n (Histopaque 1077, Sigma)에 채취한 혈액을 1:1로 조심스럽게 벽면을 따라 넣고, 원심분리(2,000 rpm, 15 min, 4°C)를 한 후 상층액은 따라 버리고 남은 pellet을 10 mM Phosphate Buffered Saline (PBS, Ca²⁺, Mg²⁺ free, Bio Whittaker) 10 mL에 희석한 후 Trypan Blue Exclusion assay를 이용하여 세포수를 측정하고 생존률을 조사하였다. Lymphocyte의 보관은 샘플 한 개당 Lymphocyte 희석액 10 mL에 Dimethylsulfoxide (DMSO, Fluka, Denmark) 100 μ L를 넣고 Iso-propanol이 들어있는 freezing container (Nalgene, U.S.A.)에 넣어 -70°C에서 2시간 보관 후 후 질소 탱크로 옮겨 샘플을 냉동보관 하여 실험에 사용하였다.

SCGE assay

본 실험의 방법은 Collins *et al.* (1999)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 먼저 0.5% normal meltingpoint agarose (NMA, Sigma) 35 μ L를 fully frosted microscope slide (Fisher Scientific)에 떨어뜨려 pre-coating하고 다시 NMA 75 μ L를 pre-coated slide 위에 떨어뜨리고 그 위에 coverslip (Superior)을 덮은 뒤 편평한 얼음통 위에 놓아 first layer를 만들어 humid box에 보관한다. 액체 질소에 냉동보관되어 있는 샘플을 선택하여 water bath (37°C)에서 해동시킨 다음 해동된 샘플 1 mL을 준비해 놓은 RPMI 1640 media (Life Tech. Co.) 10 mL로 희석한 후 원심분리(2000 rpm, 15 mins, 4°C)를 한다. 원심분리 후 상층액은 따라 버리고 PBS를 약 400 μ L 정도 넣어 희석한 다음 Trypan Blue Exclusion assay를 이용하여 세포수를 측정하고 생존률을 조사한다.

준비된 Lymphocyte를 10~15 μ L 정도 뽑아 0.6 mL eppendorf tube에 옮긴 다음 15 μ L의 Lymphocyte를 항은 수조에서 40°C로 유지되던 0.7% low meltingpoint agarose (LMA, Sigma) 용액 75 μ L에 현탁하고 준비된 slide의 coverslip을 제거한 후 그 위에 떨어뜨려 현탁액이 골고루 분산되게 coverslip로 덮어 얼음통 위에 올려두어 second layer를 만

든다. 약 5분 뒤 second layer의 coverslip 을 제거하고 다시 0.7% LMA 75 μ L 를 slide 에 떨어뜨리고 coverslip 으로 덮어 얼음통 위에 올려두어 third layer를 만든다. 약 10분 뒤 coverslip을 제거하고 2.5 M NaCl (Sigma), 100 mM disodium EDTA (Sigma), 10 mM Tris base (Gibco) 그리고 NaOH (Sigma) 로 pH 10.0으로 조정된 Alkali buffer 225 mL과 DMSO 22.5 mL 그리고 Triton X-100 (Sigma) 2.5 mL로 구성된 Alkali Lysis Buffer에 4°C 에서 1시간 동안 침수시켜 핵체를 제외한 세포내 모든 성분을 용해시킨다.

Lysis 시키는 동안 Endonuclease III (Karel, Praha) 는 40 mM HEPES (Sigma), 0.1 M KCl (Sigma), 0.2 mM Na₂EDTA 그리고 0.2 mg/mL bovine serum albumin (BSA, Sigma)로 구성된 enzyme buffer (pH 8.0, KOH) 200 μ L에 준비하고, Formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) (Karel, Praha)는 enzyme buffer 300 μ L 에 희석하여 준비한다. 1시간 동안 Lysis 용액에 침수가 끝나면 slide를 enzyme buffer 로 3번 정도 씻어준 다음 미리 희석해둔 enzyme buffer 50 μ L, Endonuclease III 50 μ L, FPG 50 μ L를 각각의 slide에 처리하고 각각의 buffer 가 골고루 분산되도록 coverslip을 썩워서 40분 동안 배양기 (5% CO₂, 37°C)에서 처리한다. 처리가 끝나면 slide 의 coverslip 을 조심스럽게 벗겨내고 평형이 되도록 설치한 전기영동판에 각각의 slide 를 밀착되게 깔고 electrophoresis buffer (0.3 mM NaOH and 1 mM Na₂EDTA) 로 slide 표면 위 0.7 cm 까지 가득 채운 후, DNA unwinding을 위해 20분간 평형 시간을 주어 핵에 남아 있는 단일 절편과 alkali labile site 를 표출시킨다. 20분 후, 전기영동은 25 V, 300 mA로 고정하여 20분간 실시하고, 전기영동 후 각각의 slide들은 Neutralization Buffer (0.4 M Tris base; pH 7.5, conc. HCl)에 3번 정도 세척하여 humid box에 넣고 냉장하여 현미경 관찰때까지 보관하였다.

DNA 손상도 측정

처리구별 lymphocyte DNA 손상 정도를 살펴보기 위하여 냉장보관중인 slide 들을 꺼내어 형광염색 시약 YOYO-1 Iodide (Molecular Probes) 75 μ L 로 염색한다. 염색된 slide는 200 W mercury lamp

가 장착된 형광 현미경에서 배율 250배로 관찰하였으며, CCD camera 를 통해서 보내진 영상을 computer 에서 분석한다. 각각의 세포핵에서 DNA 손상은 slide당 (0은 전혀 손상을 입지 않음, 4는 완전히 손상됨) 100개를 조사하여 점수를 주어 계산하였다.

결과 및 고찰

방사선 조사에 의한 DNA 손상

방사선은 물질을 통과할 때 물질의 원자나 분자들을 전리시켜 이온을 생성하게 되는데 이와 같은 성질을 지닌 방사선을 전리방사선 (ionizing radiation)이라 하며 γ 선 등이 이에 속한다.

조사된 γ 선에 의해 DNA의 phosphodiester 결합이 전리되어 음전하로 이온화되고, 조사량이 증가함에 따라 comet의 형성이 늘어나고 또한 DNA 손상이 증가하게 된다. Green *et al.*, 1994와 Fairbairn *et al.*, 1995는 comet assay를 이용하여 사람에게서 ionizing radiation 등에 의한 DNA 손상 정도를 유용하게 측정할 수 있다고 보고하였다.

우리나라의 산업 현장에서 흔히 이용되는 0~13 m Sv의 방사선이 조사된 사람들의 lymphocyte에서 DNA를 분리하여 방사선의 조사량에 따라 DNA 손상 정도를 조사하였는데 방사선 조사량과 DNA 손상의 correlation coefficient 지수는 $r=0.2750$ 로서 매우 높은 유의성을 나타내었다 (Student t-test, $P<0.01$). 방사선의 피폭 정도에 따라 DNA 손상이 유의성 있게 증가하고 있는 것을 뚜렷이 보여주고 있다.

또한 Endonuclease III는 산화된 pyrimidine으로 DNA 손상을 유발시키고 purine이 산화되어 생성된 8-oxoguanine에 의하여 DNA 손상을 유발시켜 DNA 손상 정도를 측정하고, Endonuclease III의 경우 $r=0.3736$ 으로서 FPG가 Endonuclease III에 비하여 더 높은 유의성을 지녔으며 둘 다 높은 유의성을 보여주고 있다 ($p<0.01$). 또한 Endonuclease III와 FPG로 산화시켜 DNA 의 손상 정도를 측정 한 경우에는 그렇지 않은 경우와 비교하여 DNA 손상이 더 큰 것으로 나타났다 (Fig. 1). 그러나 우리나라 산업 현장에서 흔히 이용되는 방사선 조사

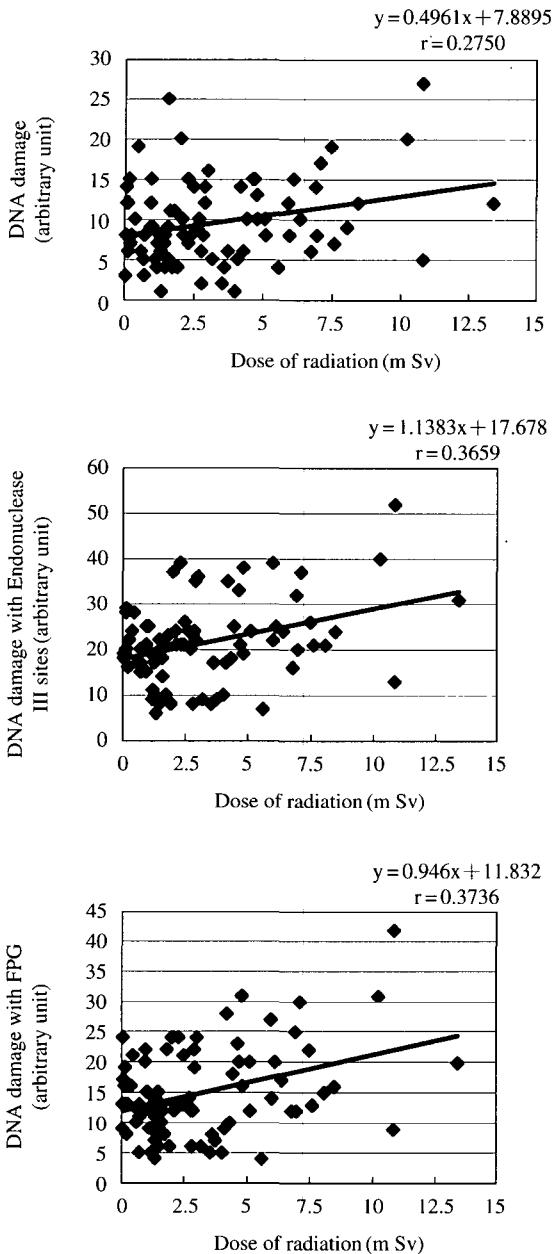


Fig. 1. DNA damage by low dose radiation.

량에 대한 DNA 손상치는 10 m Sv에서 DNA 손상이 30 unit으로서 아주 낮은 편이었다.

Vijayalaxmi *et al.* (1992) 등은 γ -radiation을 0.1 ~ 1.0 Gy를 조사하여 DNA 손상도를 조사하였던바 γ -radiation과 DNA 손상과는 높은 상관관계를 나

타내었으며 높은 유의차 ($p < 0.01$)를 나타내었다. 본 실험에서는 0 ~ 13 m Sv로 방사선이 피폭된 사람들의 혈액을 채취하고 원심분리에 의하여 DNA를 분리하여 Endonuclease III와 FPG를 첨가하여 37°C에서 40분 동안 배양을 시켜 electrophoresis에 의하여 DNA의 손상 정도를 측정하였다. 0 ~ 13 m Sv의 비교적 낮은 방사선 조사에도 불구하고 Endonuclease III, FPG 그리고 DNA 손상 등 모두가 높은 유의차 ($p < 0.01$)를 보였다.

흡연량에 의한 DNA 손상

흡연량에 따라 DNA 손상 정도를 측정하였으며, 특히 Nicotine에 의하여 생성된 free radical에 의하여 DNA 손상을 야기하고 연기속에 존재하고 있는 많은 발암성 물질, 즉 tobacco-specific N-nitrosamines, aromatic 그리고 heterocyclic hydrocarbons, acrolein, tobacco alkaloids, Nicotine 유도체를 생성시켜 이들이 DNA를 치환하고 reactive oxygen species의 함유량이 많아져 담배연기가 DNA를 손상시키는 역할을 한다고 알려져 있다 (Au *et al.*, 1991).

흡연량에 따른 DNA 손상은 하루 20개비 이상의 담배를 피우는 사람들에 대해 크게 나타났으나 유의성은 인정되지 않았다. 20개비 미만의 경우에는 흡연량과 DNA 손상과는 큰 차이를 보이지 않았다.

Endonuclease III와 FPG는 산화된 pyrimidine으로 DNA 손상을 유발시키고 purine이 산화되어 생성된 8-oxoguanine에 의하여 DNA 손상 정도를 측정하였는데, FPG에서 DNA 손상이 가장 크게 나타났다. 특히 담배를 피우지 않는 사람들과 담배를 하루에 20개비 미만의 담배를 피우는 사람들과는 DNA 손상 정도에 큰 차이가 나타나지 않았으나 20개비 이상의 흡연자는 20개비 미만의 흡연자와 큰 차이를 나타내었으나 유의성은 인정되지 않았다. 흡연자와 비흡연자의 lymphocyte를 이용하여 oxidative stress를 확인해 본 결과 흡연에 의하여 DNA 손상 정도가 유의하게 증가하였고, 여성보다는 남성에서 더욱 유의하게 DNA 손상 정도가 증가되었다는 보고가 있으며 (Betti *et al.*, 1994), 그러나 흡연 시 담배의 tar 양과는 관계가 없음이 보고되었다 (Betti *et al.*, 1995).

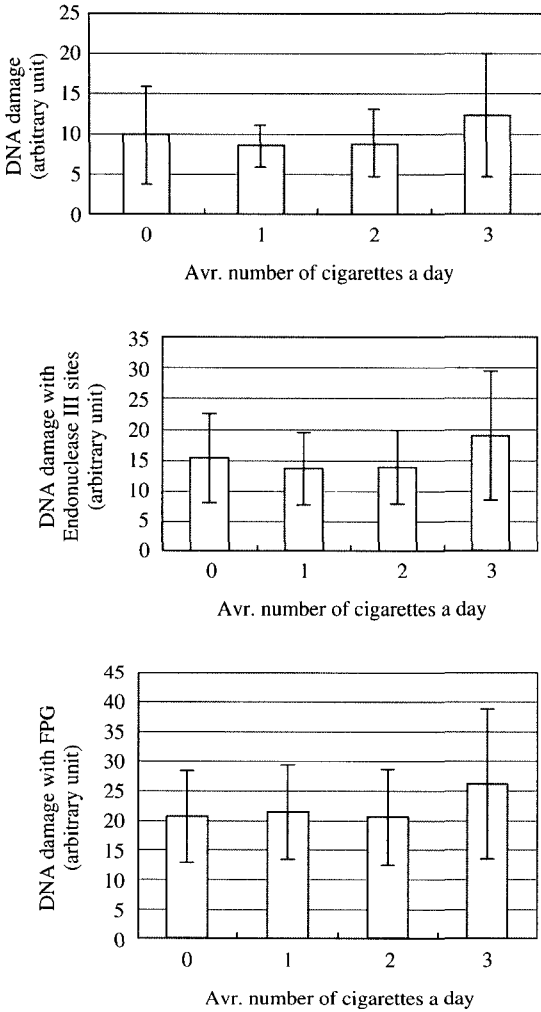


Fig. 2. DNA damage by smoking (0; non-smoker, 1; less than 10 cigarettes a day, 2; between 10 to 20 cigarettes a day, 3; more than 20 cigarettes a day).

DNA 손상 정도는 5개 그룹으로 나누어 조사되었으며 0은 전혀 DNA 손상되지 않은 그룹으로, 4는 완전히 DNA가 손상된 그룹으로 나누어서 DNA 손상 정도를 판별하여 표로 나타내었다(Collins *et al.*, 1999). 총 83명의 혈액을 채취하여 lymphocyte DNA의 손상 정도를 조사하였다. 담배의 흡연 정도는 비흡연자 하루 10개비 미만, 하루 10~20개비, 하루 20개비 이상의 흡연자, 이상 4개의 그룹으로 나누어 DNA 손상 정도를 조사하였으며 그 결과는 Fig. 2와 같았다. Mohankumar *et al.* (2002)

은 흡연자(36.25±8.46 microm)와 비흡연자(21.6±2.06 microm) 사이에 DNA 손상이 큰 차이가 난다고 보고하였으나, 본 실험에서는 흡연자와 비흡연자 사이에서 DNA 손상 정도에 대한 유의성이 인정되지 않았다.

결론

Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)의 방법을 이용하여 저선량 방사선 피폭이 lymphocyte DNA 손상에 미치는 영향을 총 83명의 피폭자들을 대상으로 실시하였다. 피폭자들의 최대 선량은 13 m Sv였으며 0~13 m Sv의 피폭에 따라 lymphocyte DNA를 분리하여 SCGE를 이용하여 조사하였다. Lymphocyte DNA의 손상 정도와 피폭조사량은 p<0.01 이내에서 유의성이 높게 나타났으며 FPG로 산화된 pyrimidine으로 DNA 손상을 유발시킬 경우 유의차가 Endonuclease III와 DNA 손상 그룹 중 가장 높게 나타났다. 그리고 흡연이 Lymphocyte DNA 손상 정도에 미치는 영향은 흡연자의 경우 10개비 미만, 10~20개비 그리고 20개비 이상과 비흡연자 그룹등 4개의 그룹으로 나누어 lymphocyte DNA를 분석하였던 바, 비흡연자, 10개비 미만 그리고 10~20개비 그룹은 서로 차이가 나타나지 않았으나 20개비 이상에서는 DNA 손상이 가법계 증가하였으나 유의차는 인정되지 않았다.

참고 문헌

Andreoli C, Rossi S, Leopardi P and Crebelli R. DNA damage by hydroquinone in human white blood cells; analysis by alkaline single0cell gel electrophoresis, *Mutat. Res.* 1999; 438: 37-45.

Au WD, Walker M, JB Ward Jr E Whorton, Legator MS and Singh V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers, *Mutat. Res.* 1991; 260: 137-144.

Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N and Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects, *Mutat. Res.* 1994; 307: 323-333.

Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N and Barale R. Comparative studies by comet assay and SCE analysis

- in human lymphocytes from 200 healthy subjects, *Mutat. Res.* 1995; 343: 201–207.
- Collins AR. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer, *Bioessays* 1999; 21: 238–246.
- Fairbairn DW, Olive PL, Kim and O'Neill L. The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 1995; 339: 37–59.
- Green MHL, Lowe JE, Harcourt SA, Akinaluyi P, Rowe T, Cole J, Anstey AV and Arlett CF. UV-c sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and Xeroderma Pigmentosum donors in the comet assay: A potential diagnostic technique, *Mutat. Res.* 1992; 273: 137–144.
- Mohankumar MN, Janani S, Prabhu BK, Vivekkumar PR and Jeevanram RK. DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay, *Mutat. Res.* 2002; 520: 179–187.
- Peperakis SM, Petrakou E and Tsilimigaki S. Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 36(3): 243–249.
- Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M and Tassiou AM. Effect of smoking and age on oxidative DNA damage of human lymphocytes, *Carcinogenesis* 1998; 19: 695–698.
- Qui LM, Li WJ, Pang XY, Gao QX, Feng Y, Zhou LB and Zhang GH. Observation of DNA damage of human hepatoma cells irradiated by heavy ions using comet assay, *World J. Gastroenterol* 2003; 9(7): 1450–1454.
- Rothkamm K and Lobrich M. Evidence for a lack of DNA double strand break repair in human cells exposed to very low X-ray dose, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 2003; 100(9): 5057–5062.
- Sardas S, Walker D, Akyol D and Karakaya AE. Assessment of smoking induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single cell gel electrophoresis technique, *Mutat. Res.* 1995; 335: 213–217.
- Vijayalaxmi Tice RR and Strauss GHS. Assessment of radiation induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique, *Mutat. Res.* 1992; 271: 243–252.