

## 이온화 방사선 및 염화수은(II)에 의한 자궁경부암 세포의 DNA 손상 평가

우현정 · 김지향 · 안토니나 체불스카바실레프스카<sup>1</sup> · 김진규\*

한국원자력연구소 정읍분소 방사선연구원,  
<sup>1</sup>폴란드핵물리연구소

## Evaluation of DNA Damage by Mercury Chloride (II) and Ionizing Radiation in HeLa Cells

Hyun Jung Woo, Ji Hyang Kim, Antonina Cebulska-Wasilewska<sup>1</sup> and Jin Kyu Kim\*

Korea Atomic Energy Research Institute ARTIJ, Jeongeup 580-185, Korea  
<sup>1</sup>The Henryk Niewodniczański Institute of Nuclear Physics, Kraków, Poland

**Abstract** – The mercury is among the most highly bioconcentrated toxic trace metals. Many national and international agencies and organisations have targeted mercury for the possible emission control. The mercury toxicity depends on its chemical form, among which alkylmercury compounds are the most toxic. A human cervix uterus cancer cell line HeLa cells was employed to investigate the effect of the toxic heavy metal mercury (Hg) and ionizing radiation. In the *in vitro* comet assays for the genotoxicity in the HeLa cells, the group of Hg treatment after irradiation showed higher DNA breakage than the other groups. The tail extent moment and olive tail moment of the control group were  $4.88 \pm 1.00$  and  $3.50 \pm 0.52$  while the values of the only Hg treatment group were  $26.90 \pm 2.67$  and  $13.16 \pm 1.82$ , respectively. The tail extent moment and olive tail moment of the only 0.001, 0.005, 0.01 Hg group were  $12.24 \pm 1.82$ ,  $8.20 \pm 2.15$ ,  $20.30 \pm 1.30$ ,  $12.26 \pm 0.52$ ,  $40.65 \pm 2.94$  and  $20.38 \pm 1.49$ , respectively. In the case of Hg treatment after irradiation, the tail extent moment and olive tail moment of the 0.001, 0.005, 0.01 Hg group were  $56.50 \pm 3.93$ ,  $32.69 \pm 2.48$ ,  $62.03 \pm 5.14$ ,  $31.56 \pm 1.97$ ,  $72.72 \pm 3.70$  and  $39.44 \pm 3.23$ , respectively. The results showed that Hg induced DNA single-strand breaks or alkali labile sites as assessed by the Comet assay. It is in good agreement with the reported results. The mercury inhibits the repair of DNA. The bacterial formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg protein) recognizes and removes some oxidative DNA base modifications. Enzyme inactivation by Hg (II) may therefore be due either to interactions with cysteine residues outside the metal binding domain or to very high-affinity binding of Hg (II) which readily removes Zn (II) from the zinc finger.

**Key words** : mercury chloride (II), ionizing radiation, HeLa cell, comet assay

### 서 론

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

생체 내에 외인성 유기화합물 (xenobiotics)이 섭취되

면 생체는 이 물질들이 체내에 쌓이지 않도록 각종 방어기구를 가동시켜 체외로 방출할 수 있도록 대사 한다. 이것이 생체의 이물질에 대한 방어 반응이며 흡수, 대사 및 배설을 포함한 해독 작용이라고도 할 수 있다. 이때 그대로는 체외배출이 곤란한 친유성 물질에 대하여 생체는 여러 가지 다양한 효소를 이용하여 그 물질을 산화, 환원, 가수분해 등의 양식에 의해 무독화하기도 하고 더욱 수용성으로 변화시켜 체외로 배출시킨다. 금속은 강한 생리활성을 가지고 있기 때문에 미량으로 인체에 필수 불가결한 것(Fe, Zn, Cu, Co 등)도 있지만 생물체 본래의 구성성분이 아니고 동식물의 생육 과정이나 식품의 가공, 제조 중에 외부에서 오염되어 혼입되는 환경오염성 중금속(environmental heavy metals)도 있다. 인체에 비교적 독성이 강한 As, Cd, Hg, Pb 등은 대표적인 환경오염금속으로 알려져 있다(Sauve *et al.* 2002). 이 중 수은(Hg)은 가장 오래된 중금속 중독의 하나로서 대부분의 경우 중기 상태로 호흡기를 통하여 체내에 노출되지만 피부나 경구를 통해서도 노출될 수 있다(Zalups *et al.* 2000).

수은 중독에 의한 대표적인 사고로는 1950년대 초 일본의 Kyushu의 Minamata만에서 발생한 사건과 1965년의 Niigata 지역에서의 사건, 그리고 1960년대와 1970년대의 이라크에서 발생한 수은중독 곡물사건을 들 수 있는데, 이들 모두 원인물질은 메틸수은(methylmercury)이었다. 일본에서 발생한 미나마타 사건의 원인은 미나마타만 상류의 화학공장에서 축매로 사용했던 염화 제2수은(HgCl<sub>2</sub>)이 폐수 중에 방출되어 이토의 혐기적 조건하에서 유기수은인 메틸수은으로 전환되었고 메틸수은은 무기수은보다 생체막을 더 쉽게 투과하여 어패류에 축적, 사람이 이들 어패류를 섭취함으로써 발생하였다. 메틸수은은 인체의 장막, 세포막을 투과하여 표적장기(target organ)인 뇌에 도달하고 여기에서 메틸수은은 탈메틸화(demethylation)되어 효소의 SH기와 결합함으로써 독성을 나타내게 된다. FAO/WHO에서 결정하는 총 수은 섭취 허용량은 43 µg day<sup>-1</sup>, 메틸수은은 20 µg day<sup>-1</sup>로 되어있다. 수은중독은 일시에 다량이 흡입되어 발생하는 급성중독과 비교적 적은 양이 장기간에 걸쳐 흡입되므로 발생하는 만성중독으로 구별된다. 그 증상은 유사하며 주로 지각이상, 운동실조, 언어장애, 청력장애, 구심성 시야 협착 등의 Hunter-Russel 증후군으로 불리는 중추신경 증상을 나타낸다. 무기수은염은 장의 작열감, 동통, 구토, 침흘림, 신장기능장애의 원인이 되며 저급알킬수은은 입술 주변 및 팔다리 끝의 감각 이상, 운동의 어려움, 발음 장애, 청력 장애, 시야 협착, 정신장애 등의 신경계장애, 신장, 뇌의 장애를 유발한다. 모체가 메틸수은

을 섭취하면 태아에 메틸수은이 이행 축적되기 때문에 태아의 메틸수은 중독의 위험성은 성인보다 높으며 출생아에게 현저한 중추신경증상을 일으킨다(윤 1984a, b). 세포 수준에서의 유기 수은은 세포막 물질 수송계에서 active transport system을 통해서 유입이 되는 것으로 알려져 있으며, 수은에 의한 신장 독성은 항산화에 관련된 세포(GSH 세포크기와 Gpx 활성)를 변화시켜 산화적 손상을 준다는 것이 MDCK (Madin.Darby canine kidney) cell을 이용한 실험에서 밝혀졌다(Youm *et al.* 2000; Aleo *et al.* 2002).

이온화 방사선 또한 산화적 손상을 일으키는 물리적 요인으로, 특히 DNA에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Şener *et al.* 2003). 이온화 방사선에 의한 세포내 DNA 손상의 60~70%는 물의 방사선에 의한 분해로 생성된 OH에 의한 것으로 밝혀졌으며, 과도한 자유라디칼이나 낮은 항산화기능에 의한 산화적 스트레스는 생체 분자의 구조적, 기능적 변화를 초래한다. 이러한 변화는 DNA의 치명적인 손상으로 이어질 뿐 아니라 지질과 단백질의 손상과도 관련이 있다(Vijayalaxmi *et al.* 1998).

국내·외 대부분의 실험은 세포 수준에서의 수은 단독 처리에 의한 독성과 그 기작을 알아보거나 이온화 방사선의 단독 처리에 의한 DNA의 손상을 알아보는 데 그 초점이 맞춰져 있다. 복합처리에 관한 연구사례로는 사람 림프구에 수은과 이온화 방사선 동시 처리하였을 때 나타나는 DNA 손상 및 수복을 연구한 보고가 있을 뿐이다(Panek *et al.* 2001). 따라서 본 연구에서는 산화적 손상을 일으키는 두 가지 요인, 수은과 이온화 방사선이 수은 처리 전·후에 함께 가해졌을 경우, 그 손상의 상호 작용을 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 처리

본 연구에서 사용된 자궁경부암 세포인 HeLa는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1%의 항생균 및 항진균 항생제가 포함된 RPMI-1640 배지에서 37°C의 항온기내에서 배양하였다. 유전 독성 실험을 위해 well 당 1 mL의 배지가 들어 있는 12 well plate에 약 12 × 10<sup>4</sup> cells well<sup>-1</sup> 세포 농도로 접종하였고 접종 24시간 후에 수은 및 방사선 처리를 실시하였다. 실험은 수은 및 방사선 단독 처리군, 수은 처리 후 방사선 처리군, 방사선 처리 후 수은 처리군으로 나누어 실시하여 수은과 방사선의 단독 처리 시 유전독성과 병행 처리 시 유전독성의 시너지효

과를 알아보았다. 수은 처리군은 생리 식염수에 0.001, 0.005, 0.01  $\mu\text{M}$ 의 농도로 염화수은(II)을 녹여 5분간 처리하였다. 조사선량은 선량-반응식을 기준으로 단기간 내에 손상이 확인된 선량을 조사하였으며, 방사선 처리군은 기존 보문을 토대로 선량-반응식을 기준으로 단기간 내에 손상이 확인된 선량을 조사하였다 (Kim *et al.* 1999). 한국원자력연구소의  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -ray를 이용하여 5분간 총 선량이 6.5 Gy가 되게 조절하였으며, 얼음 위에서 행하였다. 수은 처리군은 처리 후에, 방사선 처리군은 조사 전에 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 모아준 후 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) 500  $\mu\text{L}$ 에 세포를 분산시켜 수은과 방사선으로 인한 유전적 독성 평가를 수행하였다.

## 2. 수은 처리 시 세포 생존율

세포의 생존율은 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide; Sigma) reduction method를 변용하여 측정하였다 (Mossman 1983). 이 방법은 세포 내 미토콘드리아의 호흡기능을 측정하는 방법으로 trypan blue dye-exclusion의 방법보다 정확히 세포의 생존율을 측정할 수 있다고 알려져 있다. 자궁경부암세포를  $2 \times 10^4$  cell  $\text{mL}^{-1}$ 의 밀도로 6 well-plate에 접종 후 RPMI-1640 배양액에 24시간 배양하였다. 생리식염수로 녹인 수은을 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{M}$ 의 농도로 2시간 동안 배양액에 처리하였다. 수은 처리 후 배양액을 제거하고 MTT 용액 (0.05% in medium)을 30  $\mu\text{L}$  첨가하여, 배양기 내에서 2시간 동안 반응시키고 반응시킨 MTT용액은 제거하였다. 배양접시 바닥에 형성된 formazan crystals를 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma) 1 mL에 녹인 후 ELISA reader (Thermo Labsystems)를 사용하여 580 nm의 파장으로 흡광도를 측정하여 세포의 생존율을 계측하였다.

## 3. 세포 내 유전적 독성 실험

수은과 방사선의 유전적 독성을 알아보기 위하여 comet assay (single cell gel electrophoresis assay)를 실시하였다. 본 연구에서는 P. Grover *et al.*의 방법을 변형하여 실시하였다 (Grover *et al.* 2001). 처리 물질이 아닌 시험 과정에서의 DNA 손상을 최소화하기 위해 모든 과정은 어두운 조명 하에서 이루어 졌다. DPBS에 분산시켜 놓은 자궁경부암세포 100  $\mu\text{L}$ 와 1% LMP (low melting point agarose) 100  $\mu\text{L}$ 를 혼합하여 전날 pre-coating해 놓은 slide glass에 떨어뜨린 후 cover glass를 덮어 전체적으로 퍼지게 하였다. 4°C에서 20분간 굳힌 후 다시 200

$\mu\text{L}$ 의 0.5% LMP로 한 층을 덧입혀 4°C에서 굳힌다. 만들어진 slide는 cover glass를 제거한 후, 4°C lysing solution [2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 10), 1% sodium sarcosinate, 사용 직전에 1% Triton X-100과 10% DMSO를 혼합]에 담가 1시간 동안 cell lysis를 시킨다. 4°C의 물로 slide에 남은 용액을 제거하고 4°C Electrophoresis buffer (300 mM NaOH and 1 mM, EDTA pH 13)에서 5분간 unwinding 시킨 후 26 V, 300 mA에서 30분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 slide는 4°C의 물로 씻어 준 후 400 mM Tris buffer (pH 7.5)에서 15분간 중성화과정을 시행하며 이 과정을 3회 반복하였다. 50  $\mu\text{L}$  EtBr (20  $\mu\text{L mL}^{-1}$ )로 염색하여 CCD camera (Hitachi Denshi, Ltd., Japan)가 부착된 형광현미경 (Olympus fluorescence microscope, Japan)에서 200배율로 검경하고, Komet ver. 4.0 image analysis (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK)를 이용하여 이미지를 분석하였다. 한 slide 당 50개의 핵을 관찰하여 통계분석 하였다.

## 4. 통계학적 분석

통계학적 유의적 검정은 일원분산분석 (one-way ANOVA test)을 사용하였고,  $p$ 값이 0.001보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다. 반복 실험의 결과는 평균  $\pm$  표준편차평균 (SEM)으로 나타내었다.

## 결 과

### 1. 수은 처리 시 세포의 생존율

세포 생존율에 미치는 수은의 농도를 알아보기 위하여 MTT cell viability assay를 실시하였다. 염화수은(II)을 처리 2시간 경과 후 무처리군의 생존율을 100%로 환산했을 때, 1  $\mu\text{M}$ 의 수은 농도에서는 16.9  $\pm$  5.61%, 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 23.1  $\pm$  17.71, 0.01  $\mu\text{M}$ 에서 63.9  $\pm$  57.46%의 생존율을 보였다 (Table 1). 이는 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소되는 것으로 확인되었다 ( $p < 0.001$ ). 1  $\mu\text{M}$ 의 경우 약 87%, 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 약 73%, 0.01  $\mu\text{M}$ 에서 36%의 생존율 감소를 나타낸다. 0.01  $\mu\text{M}$ 과 0.1  $\mu\text{M}$ 의 염

**Table 1.** Effects of the Hg on the HeLa cells cultured for 2 hours *in vitro*

Group	Optical density	Cell viability (%)
Control	1.8 $\pm$ 0.15	100 $\pm$ 8.45
1 $\mu\text{M}$ Hg	0.3 $\pm$ 0.10	16.9 $\pm$ 5.61
0.1 $\mu\text{M}$ Hg	0.4 $\pm$ 0.32	23.1 $\pm$ 17.71
0.01 $\mu\text{M}$ Hg	1.2 $\pm$ 1.03	63.9 $\pm$ 57.46

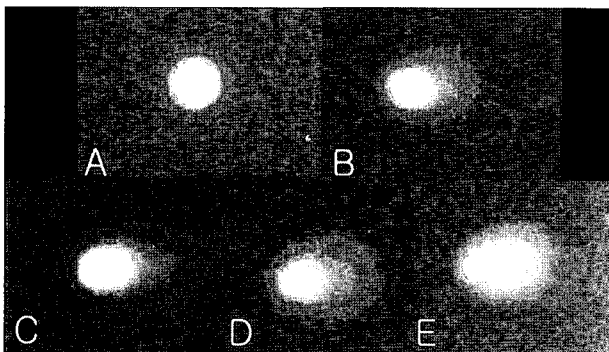
화수은 농도에서는 약 2배 정도의 급격한 감소율을 보였으며 0.1 μM과 1 μM에서는 완만한 감소율이 나타났다.

## 2. 수은과 방사선의 세포 내 유전 독성

수은과 방사선의 상호 영향을 알아보기 위해 수은 단독 처리, 방사선 조사 후 수은 처리, 수은처리 후 방사선 조사 시 세포 내 독성 실험을 각각 실시하였다. 육안으로 확인한 결과, 방사선 단독 처리군 보다 수은 단독 처리 시 손상된 DNA의 꼬림 현상이 더 많이 관찰되었다. 수은과 방사선을 복합 처리한 실험군에서 DNA 손상이 단독 처리군과 비교하여 확연히 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

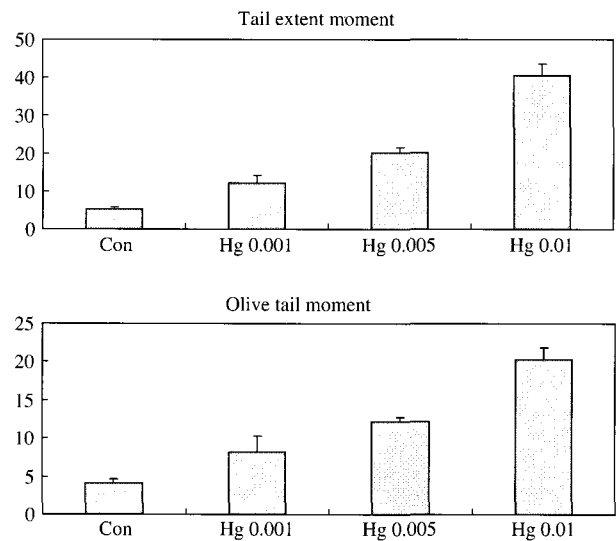
수은 단독 처리 시 수은의 처리농도가 높아짐에 따라 손상된 DNA의 꼬림 정도가 심화되는 것을 관찰할 수 있었다. 대조군, 0.001, 0.005, 0.01 μM 수은 처리군의 tail extent moment 값은 각각 4.88±1.00, 12.24±1.82, 20.30±1.30, 40.65±2.94로 수은 처리 농도가 높아짐에 따라 유의적으로 증가되며 대조군에 비해 대략 3, 4, 9배의 손상을 가져오는 것으로 나타났다 ( $p < 0.001$ ). Olive tail moment 값은 각각 3.50±0.52, 8.20±2.15, 12.26±0.52, 20.38±1.49로 대조군의 2, 4, 6배 정도의 손상을 나타내었다(Fig. 2).

방사선 조사 후 수은 처리 시 수은 단독 처리나 방사선 단독 처리보다 DNA의 손상 정도가 유의적으로 크게 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 대조군, 방사선 단독 처리군, 방사선 처리 후 0.001, 0.005, 0.01 μM 수은 처리군의 tail extent moment 값은 4.88±1.00, 26.90±2.67, 56.50±3.93, 62.03±5.14, 72.72±3.70으로 모든 수은 처리 농도에서 수은 단독 처리의 손상치와 방사선 단독 처리의

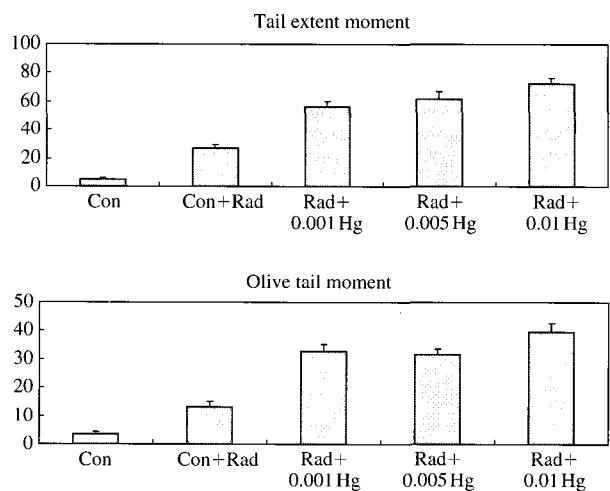


**Fig. 1.** Comet images of intact and DNA-damaged cells. A: intact cell, B: DNA damaged cell by 0.001 μM Hg, C: DNA damaged cell by irradiation, D: DNA damaged cell by the irradiation after 0.001 μM Hg, E: DNA damaged cell by 0.001 μM Hg after the irradiation.

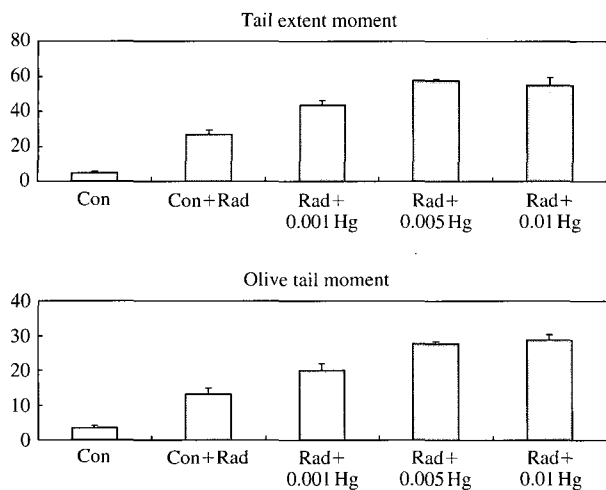
손상치를 더한 값보다 20 정도의 손상이 더해졌음을 확인할 수 있었다. Olive tail moment의 경우, 대조군, 방사선 단독 처리군, 방사선 처리 후 0.001, 0.005, 0.01 μM 수은 처리군의 값은 3.50±0.52, 13.16±1.82, 32.69±2.48, 31.56±1.97, 39.44±3.23으로 모든 처리 농도에서 단독 처리 시의 손상치의 합보다 높은 손상치를 보여줬으며 단 0.001과 0.005 μM 수은 처리군에서는 수은의



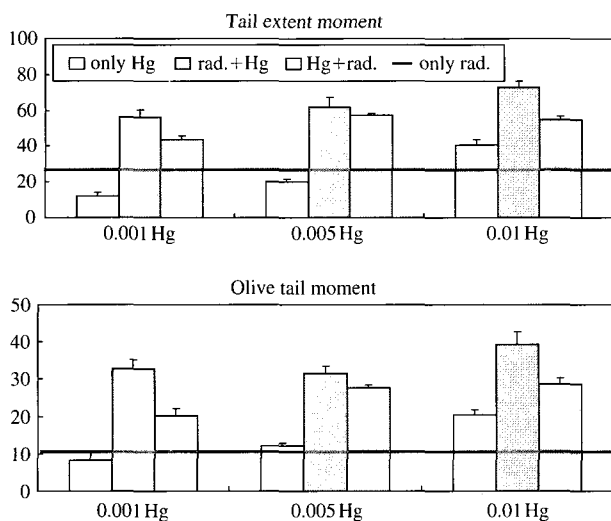
**Fig. 2.** The *in vitro* genotoxicity assays of only Hg treatment using comet assay of HeLa cell. extent tail moment=tail length × tail% DNA/100, olive tail moment=(tail mean-head mean) × tail% DNA/100; tail extent moment=tail length \* tail% DNA/100.



**Fig. 3.** The *in vitro* genotoxicity assays of Hg treatment after the irradiation using comet assay of HeLa cell. extent tail moment=tail length × tail% DNA/100, olive tail moment=(tail mean-head mean) × tail% DNA/100; tail extent moment=tail length \* tail% DNA/100.



**Fig. 4.** The *in vitro* genotoxicity assays of the irradiation after Hg treatment using comet assay of HeLa cell. extent tail moment = tail length  $\times$  tail% DNA/100, olive tail moment = (tail mean-head mean)  $\times$  tail% DNA/100; tail extent moment = tail length  $\times$  tail% DNA/100.



**Fig. 5.** The *in vitro* genotoxicity assays of the irradiation and Hg treatment using comet assay of HeLa cell. extent tail moment = tail length  $\times$  tail% DNA/100, olive tail moment = (tail mean-head mean)  $\times$  tail% DNA/100; tail extent moment = tail length  $\times$  tail% DNA/100.

농도가 5배 높아졌으나 급격한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 3).

수은 처리 후 방사선 조사 그룹에서는 조사 후 수은 처리군보다 DNA의 손상 정도가 작은 것으로 나타났다. 대조군, 방사선 단독 처리군, 0.001, 0.005, 0.01  $\mu$ M 수은 처리 후 방사선 조사군의 tail extent moment 값은  $4.88 \pm 1.00$ ,  $26.90 \pm 2.67$ ,  $43.69 \pm 2.60$ ,  $57.42 \pm 1.19$ ,  $54.90 \pm 4.46$

으로 방사선 조사 후 수은 처리군보다 낮은 손상 정도를 보였으며 0.01  $\mu$ M 수은 농도에서는 0.005  $\mu$ M 수은 농도와 비슷한 손상 정도를 보였다. 이는 olive tail moment의 값에서도 나타나는데 대조군, 방사선 단독 처리군, 0.001, 0.005, 0.01  $\mu$ M 수은처리 후 방사선 조사군의 olive tail moment의 값은  $3.50 \pm 0.52$ ,  $13.16 \pm 1.82$ ,  $20.05 \pm 2.01$ ,  $27.66 \pm 0.67$ ,  $28.72 \pm 1.69$ 로 0.001  $\mu$ M과 0.005  $\mu$ M 사이에서는 약 1.5배 정도의 수치가 증가하였으나 0.005  $\mu$ M과 0.01  $\mu$ M 수은 농도 비교 시 손상 정도의 급격한 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 4).

## 고찰

가장 오래된 중금속 중에 하나인 수은은 그 화학적 형태의 다양성과 산업상의 유용성으로 인하여 대기, 토양 오염을 비롯하여 다방면의 오염을 유발하고 있다. 특히 생화학적 측면에서의 유기 수은은 체내의 대사과정에 참여하는 여러 효소의 활성을 억제함으로써 독성을 유발하는 것으로 알려져 있고 또 수은이 일차적으로 세포막을 구성하는 단백질 중, 특히 수은과 친화력이 높은 sulfhydryl (SH)기를 포함하는 단백질과 결합함으로써 독성을 유발하는 것으로 보고되고 있다 (Goyer 1991). 특히 SH기는 세포막의 투과성 및 물질이동에 필수적이기 때문에 이와 관련된 세포독성을 일으킨다. 또한 +2가의 수은이 실험동물의 세포막에서 지질과산화반응을 유발함으로써 세포손상을 초래할 뿐 아니라 손상된 세포로부터 유리된 것으로 추측되는 젖산탈수소효소 (lactate dehydrogenase, LDH)의 활성이 증가된다고 보고되고 있는데, 효소의 불활성화나 지질과산화반응의 초기에  $O_2$ , OH,  $H_2O_2$  등이 관여하여, 반응 후 생성된 malondialdehyde와 같은 물질이 강한 세포독성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다 (Stacey and Klaassen 1980). 이는 결과적으로 DNA 나선구조의 손상, 단백질 thiol 기의 산화 및 항산화 효소의 활성변화 등과 관련된다.

이온화 방사선 또한 산화적 손상을 일으키는 물리적 요인으로, 특히 DNA에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이온화 방사선에 의해 생성된 과도한 자유라디칼이나 낮은 항산화기능에 의한 산화적 스트레스는 생체 분자의 구조적, 기능적 변화를 일으키게 되며 그 결과 DNA뿐 아니라 지질과 단백질에도 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다 (Vijayalaxmi *et al.* 1998).

따라서 본 연구에서는 *in vitro* 내에서 염화수은(II)의 독성과 세포독성을 일으키는 두 가지 요인, 염화수은과 이온화 방사선을 동시처리 시, 그 손상의 상호 작용을

비교하였다. 염화수은(II)의 독성정도를 알아보고 사람의 자궁암 세포에 농도별로 염화수은(II)을 처리하였다. 세포의 생존율은 3가지 농도(1, 0.1, 0.01  $\mu$ M) 모두에서 유의하게 감소하였으며 이미 0.1  $\mu$ M에서 약 73%의 생존율이 감소하는 것으로 나타나 기존 보문의 사람의 간 세포에서 25  $\mu$ M에서 60%의 생존율보다 월등히 낮은 생존율을 나타냈다(Vakharia *et al.* 2001).

염화수은(II)과 방사선의 단독 처리와 복합 처리 시 세포 내의 유전 독성 차이를 알아보기 위하여 comet assay를 실시하였다. Comet assay는 각각의 세포에서 DNA 손상을 직접 가시화하는 전기영동 방법으로 1984년에 Östling과 Johanson에 의해서 처음으로 소개되었다(Östling *et al.* 1984). 전류가 하전을 띠고 있는 DNA를 핵으로부터 잡아당김으로써 완화된 DNA와 깨진 DNA 절편들을 이동시켜 '혜성' 같은 모양을 나타내는데 이 이미지가 DNA 손상정도를 결정하는 척도로 이용된다. 여러 파라메타 중 tail moment 값을 이용하여 DNA의 손상 정도를 비교하였는데, tail moment는 얻어진 혜성모양의 DNA상으로부터 측정된 head, tail 그리고 절단된 DNA 조각의 형광염색 밀도 등을 감안한 값으로 단순 측정된 tail length만을 사용할 경우 실제 DNA 분자 상에 유발된 손상이 지나치게 확대 해석 될 수 있는 단점을 보완할 수 있다고 알려져 있다(Anderson *et al.* 1994). 방사선 전·후 수은 처리를 비교 하였을 경우, 전처리에 비해 후처리의 손상 정도가 더욱 심한 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 결과로 수은 처리 후 방사선을 조사할 경우 수은 단독처리군과 비교하여 손상정도가 심해지기는 했으나 수은과 방사선이 DNA 손상에 각각 다른 독성원으로 작용한 것으로 두 물질간의 상호작용은 일어나지 않은 것으로 사료된다(Fig. 4). 이온화 방사선에 의해 사람세포 DNA에 유발된 손상은 짧은 시간 안에 회복이 진행되는 데 손상의 절반이 회복되는데 걸리는 시간은 약 15분 정도로 보고되어 있다(Cebulska-Wasilewska 2003). 그러나 본 실험의 결과에서 볼 수 있듯이 방사선 조사 후 수은을 처리한 경우 DNA 손상 정도가 유의하게 증가됨을 보였다. 이로써 기존 보문(Panek *et al.* 2001)의 수은이 손상된 DNA의 수복 작용을 방해한다는 것을 확인할 수 있었다. 수은은 Fpg protein (the bacterial formamidopyrimidine-DNA glycosylase)에 영향을 미치는 데 이 효소는 손상되어 깨어진 DNA base를 전환하여 DNA를 수복시켜 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이 수복 작용에는 4가지의 시스테인(cystein)과 아연이 결합하여 이루어지는 데 수은은 이 작용에 중요한 역할을 하는 아연을 제거하는 것으로 알려져 있다(Hartwig *et al.* 2002). 따라서 방사선으로 산화

적 손상을 입은 DNA가 수복을 하는 과정 중 수은을 처리하여 아연을 제거함으로써 그 손상의 정도가 심해지는 것으로 판단된다.

본 실험 결과들을 통하여 염화수은(II) 처리와 이온화 방사선의 조사에 따른 손상의 차이 및 방사선 전·후 수은 처리 시 그 DNA 손상 정도의 차를 확인 할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 수은 뿐만 아니라 DNA 수복 기작에 영향을 주는 다른 환경오염성 중금속인 Cd(II), Cu(II), Pb(II) 등과 방사선의 상호 작용에 대한 연구도 이루어 질 수 있을 것을 판단된다.

## 적 요

세포에 미치는 염화수은(II)과 이온화 방사선의 영향과 수은 처리 전·후 방사선 조사 시 그 상호 작용에 관해 알아보려고 본 연구를 수행하였다. 염화수은(II)의 독성정도를 알아보기 위하여 사람의 자궁암 세포에 농도별로 염화수은(II)을 처리하였다. 세포의 생존율은 3가지 농도(1, 0.1, 0.01  $\mu$ M) 모두에서 유의하게 감소하였으며 이미 0.1  $\mu$ M에서 약 73%의 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 염화수은(II)과 방사선의 단독처리 시 DNA의 손상 정도에 비해 복합처리 시의 DNA 손상 정도가 2~4배 정도 확연히 높아짐을 볼 수 있었다. 특히 방사선 후 수은 처리군은 DNA 손상의 정도가 다른 처리군에 비하여 높게 나타났는데 이는 이미 기존의 보문에서 밝혀진 바와 같이 수은의 DNA 수복에 관련되어 있는 Fpg protein에 미치는 영향 때문으로 사료된다. 이미 방사선에 의해 산화적 손상을 입은 DNA의 수복 기작을 수은이 방해하여 좀 더 높은 손상을 가져오는 것을 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구개발사업의 지원으로 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- 윤임중. 1984a. 수은 중독(상), 대한 산업 보건 협회 산업 보건. 6:7-9.
- 윤임중. 1984b. 수은 중독(하), 대한 산업 보건 협회 산업 보건. 7:5-7.
- Aleo MF, F Morandini, F Bettoni, S Tanganelli, A Vezzola, R

- Giuliani, N Steimberg, P Apostoli and G Mazzoleni. 2002. Antioxidant potential and gap junction-mediated inter-cellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line. *Toxicol. in Vitro* 16:457-465.
- Anderson D, TW Yu, BJ Philips and P Schmezer. 1994. The effect of various-antioxidants and other modifying agents on oxygenradical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mut. Res.* 307:261-271.
- Cebulska-Wasilewska A. 2003. Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology. *Mut. Res.* 544:289-297.
- Hartwig A, M Asmuss, H Blessing, S Hoffmann, G Jahnke, S Khandelwal, A Pelzer and A Bürkle. 2002. Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1179-1184.
- Kim JK, CJ Lee, KW Song, HH Park and YD Yoon. 1999. Morphological anomaly of primordial follicle in  $\gamma$ -irradiated mice. *J Korean Nuc. Soc.* 31:385-390.
- Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Method.* 65:55-63.
- Goyer RA. 1991. Toxic effects of metal. *Casarett Doll's Toxicol.* 4:646-651.
- Grover P, BS Banu, KD Devi and S Begum. 2001. In vivo genotoxic effects of mercuric chloride in rat peripheral blood leucocytes using comet assay. *Toxicology* 167:191-197.
- Östling O and KJ Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 291-298.
- Panek A, JK Kim and A. Cebulska-Wasilewska, 2001. *In vitro* studies of repair efficiency of DNA damage induced by X-rays in lymphocytes exposed to mercury. 12nd Symposium of Polish Radiation Research Society, Sept. 10-12, 2001, Krakow, Poland.
- Sauve S, P Brousseau, J Pellerin, Y Morin, L Senecal, P Goudreau and M Fournier. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: in vitro exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquat. Toxicol.* 58:189-200.
- Şener G, N Jahovic, OB Tosun, M Atasoy and BÇ Yeen. 2003. Melatonin ameliorates ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rat. *Life Sci.* 74:563-572.
- Stacey NH and CD Klaassen. 1980. Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocyte. *J. Toxicol. Environ Health.* 7:139.
- Vakharia DD, N Liu, R Pause, M Fasco, E Bessett, QY Zhang and LS Kaminsky. 2001. Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170:93-103.
- Vijayalaxmi, RJ Reiter, TS Herman and ML Meltz. 1998. Melatonin reduces gamma radiation-induced primary DNA damage in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 397: 203-208.
- Youm JH, DH Koh, JY Kim and NS Kim. 2000. Changes on the methylmercury-induced cytotoxicity by control of cell membrane transport system. *Korean J. Environ. Health Soc.* 26:88-96.
- Zalups RK. 2000. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol. Rev.* 52:113-144.

Manuscript Received: July 22, 2005

Revision Accepted: September 5, 2005

Responsible Editorial Member: Myung Chan Gye  
(Hanyang Univ.)