

생약재 소목의 방사선에 의한 DNA 손상 경감효과

Reductive Effects of *Caesalpinia sappan* L. against DNA Damage Induced by Gamma-ray

오현, 정우희, 정일윤, 조성기*
한국원자력연구소
대전광역시 유성구 덕진동 150

김성호
전남대학교 수의과대학
광주광역시 북구 용봉동 300

요 약

방사선 생체 손상에 대한 방호 효과를 나타내는 천연물을 검색하기 위한 일환으로 한의학에서 보혈양혈 당제에 널리 사용되는 소목 (*Caesalpinia sappan* L.)의 열수추출물이 방사선에 의한 산화적 손상 경감 효과를 검정하였다. HL-60 세포에서 소핵형성시험 (micronuclei formation test)과 단세포전기영동 (single cell gel electrophoresis; comet assay)을 수행하여 DNA 손상 경감정도를 관찰하였으며, 소목의 라디칼 소거효과를 살펴 보았다. 소목 추출물은 미소핵 형성과 단세포전기영동에서 DNA 외가닥 절단의 지표인 tail moment(TM) 값을 유의성있게 억제하여 DNA 상해를 효과적으로 방호하였다 ($p < 0.01$). 또한 라디칼 소거 효과도 가지는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 소목은 방사선에 의한 세포 DNA 손상을 효과적으로 억제하였으며, 이는 소목 추출물의 라디칼 소거가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. 특히, 독성이 거의 없는 천연물이라는 관점에서 방사선 방호제로 적용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract

We investigated the effect of *Caesalpinia sappan* L. (CS) against radiation-induced oxidative damage to macromolecules *in vitro*. The CS reduced the frequency of micronuclei (MN) and the tail moment (TM), which was a marker of DNA strand break in single-cell gel electrophoresis (SCGE; comet assay), in the HL-60 cells. Also, Its activities to scavenge DPPH radicals and hydroxyl radicals were observed *in vitro*, and it might be a good scavenger of active oxygen species. It is plausible that scavenging of free radicals by CS extract may have played an important role in

providing the protection against the radiation-induced DNA damage. These results indicated that *Caesalpinia sappan* might be a useful radioprotector, especially since it is a relatively nontoxic natural product.

(Key words : *Caesalpinia sappan*, radioprotector, Micronuclei, single-cell gel electrophoresis (SCGE; comet assay), radical)

* Corresponding author

1. 서 론

방사선 및 방사성 동위원소의 의학적 이용 및 원자력 시설의 이용이 증가되고 있다. 이에 따라 방사선 이용에 수반되는 부작용 또는 방사선 피폭 사고에 의해 발생하는 생체 장해에 대한 관심도가 높아지고 있으며, 방사선 피폭에 의한 생체 손상의 예방 및 경감을 위한 방호제의 개발이 중요한 문제로 대두되고 있다.

방사선 방호제에 대한 연구는 1949년 Patt *et al* [1] 에 의해 cystein의 방호효과가 최초로 보고된 이래 주로 thiol 복합체를 중심으로 한 합성물질들이 연구의 대상이 되었으며, 그외 interleukin-1, tumor necrosis factor와 같은 면역조절물질, granulocyte colony-stimulating factor 등의 조혈 인자에 대한 연구가 진행되고 있다 [2-6]. 이러한 물질들은 유효용량에서 수반되는 강한 독성 또는 실제 적용에서의 미미한 효과에도 불구하고 암의 방사선치료 분야 등에 적용할 목적으로 연구되고 있다 [7, 8].

한편, 최근에는 급·만성 질병의 치료 및 예방을 위하여 독성이 거의 없으면서 효과가 입증된 천연물을 이용하는 대체요법과 건강식품에 대한 관심이 고조되고 있다. 이와 같은 관점에서 생약재 등 천연물의 방사선 방호효과 연구도 부분적으로 진행되고 있다.

이에 본 연구에서 소목 추출물의 방사선장해 경감효과와 작용특성을 살펴보고자 DNA 손상 경감효과를 알아보기 위해 HL-60 세포주에서 미소핵 형성시험 (micronuclei formation test)과 단세포전기영동법(SCGE; comet assay)을 시행하였으며, 시료의 자유라디칼 (free radical) 소거효과를 확인하기 위하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 라디칼 소거 활성법을 이용하여 전자공여능과 2-deoxyribose oxidation method를 이용하여 hydroxyl 라디칼 (OH[·]) 소거활성을 측정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 세포배양

Meyeloid leukemia cell인 HL-60 세포를 10% fetal bovine serum이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에 배양하였다.

2.2 시료제조

시중에서 구입한 생약재 소목을 세절하여, 10 배량의 증류수를 가하고 2시간씩 3회 열탕 추출한 뒤 고형분을 제거한 현탁액을 200g에서 10분간 원심분리시키고 상층액을 여과하여 감압농축하고 동결 건조시켰다.

2.3 방사선조사 및 시료처리

HL-60 세포는 ^{60}Co - γ 선을 50 cGy/min의 선량율로 1회 조사하였다. 시료는 최종농도가 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 하였고 조사 전 4시간동안 세포배양기에서 처리한 후 방사선을 조사하였다. 단세포전기영동법에서는 방사선 조사 후 DNA 수복을 차단하기 위하여 전기영동을 시행하기 전까지 4°C 를 유지하였다.

2.4 소핵 측정

(가)Cytokinesis-block method [9]

Cytochalasin B (Cyt-B, Aldrich Chemical Co.)는 dimethylsulphoxide에 ml당 2 mg의 양으로 원액을 만들어 -70°C 에 보관하였다. 방사선 조사 직후 ml당 $3\mu\text{g}$ 의 양으로 Cyt-B를 첨가하였다. Cyt-B 처리 24시간 후에 세포를 수확하였으며 cytocentrifuge (Hanil Science Industry Co., Ltd., Korea)를 이용하여 검경용 표본을 만들고 건조 후 Giemsa 염색을 하였다.

(나) 소핵의 검경

소핵은 유침하에서 1000배 배율의 현미경으로 기존의 검경기준 [10]을 적용하여 binucleated cell 1000개당 소핵 형성 세포를 계수하였다. 간단히 기술하면, 소핵은 주핵에서 분리된 구형으로 지름이 주핵의 50% 이하이며 세포질내에 존재하여야 하고 빛의 반사와 같은 형상이 없고 염색성이 주핵에 비하여 진하지 않은 것을 소핵으로 판정하였다.

2.5 단세포 전기영동

방사선 조사에 의한 혈액 림프구의 DNA 손상정도를 측정하기 위하여 Singh 등 [11]의 방법에 준해 시행하였다.

(가) 슬라이드 준비

Frosted slide에 0.6% agarose $130\mu\text{l}$ 를 처리 후 cover glass로 덮고 4°C 에서 10분간 방치하여 agarose를 굳힌 후 cover glass를 제거하였다. 세포를 0.5% low melting agarose $75\mu\text{l}$ 와 혼합하고 이를 slide에 점적 후 coverglass로 덮고 4°C 에서 10분간 굳힌 다음 lysis buffer(2.5M NaCl, 100mM Na_2EDTA , 10mM Tris base, 1% N-Lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100, pH 10)에서 4°C 로 1시간동안 용해시켰다.

(나) 전기영동

Electrophoretic buffer(300mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% dimethyl sulfoxide, 10mM Na_4EDTA , pH>12.3)를 이용 22V, 300mA에서 25분간 전기영동을 시행하였다. 이후 Tris buffer(0.4M Tris, pH7.4)로 10분씩 3회 세척하여 슬라이드를 중화시키고 DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 ethanol에 1시간 이상 침적하였다.

(다) 염색 및 관찰

슬라이드를 건조시킨 후 $60\mu\text{l}$ 의 ethidium bromide($20\mu\text{g}/\text{ml}$)로 염색하였다. 형광현미경을 사용하여 이미지분석 프로그램(Komet 4.0, Kinetic imaging, Ltd., Great Britain)을 통해 60개의 세포를 선택하여 분석하였다. DNA 손상정도는 $[\text{tail moment} = (\text{tail mean} - \text{head mean}) \times \text{tail \%DNA} / 100]$ 으로 정의되는 tail moment로 나타내었다.

2.6 DPPH 라디칼 소거활성 측정

전자공여작용은 각기 다른 농도의 시료 0.2 ml에 $4 \times 10^{-4}\text{M}$ DPPH

(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액 (99.9% methanol에 용해) 1.8 ml씩을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하여 30분 후 분광광도계 (Shimadzu UV-1201, Japan)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여작용 (Electron donating abilities, EDA)은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소차이를 백분율로 나타내었다 [12].

$$\text{EDA (Electron donating abilities, \%)} = (\text{Ac}-\text{As})/\text{Ac} \times 100$$

Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도

As : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도

2.7 Hydroxyl 라디칼 소거활성 측정

시료의 hydroxyl 라디칼 ($\cdot\text{OH}$) 소거활성은 2-deoxyribose oxidation method [13]로 측정하였다. 시험관에서 0.1mM $\text{FeSO}_4/\text{EDTA}$ 용액 0.2ml, 10mM 2-deoxyribose 0.2ml, 각기 다른 농도 시료액 0.2ml과 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) 1.2ml을 가하고, 10mM H_2O_2 0.2ml을 가하여 반응을 개시시켰다. 37°C 수욕조에서 4시간 반응시킨 후 2.8% TCA (trichloroacetic acid)용액 1ml을 가하여 반응을 중지시키고, 1% TBA (2-thiobarbituric acid)용액 1ml를 가하여 95°C에서 10분간 중탕한 후 냉각하고 UV-분광광도계 (Shimadzu UV-1201, Japan)를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소차이를 백분율로 나타내었다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity(\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{As}-\text{Ao}}{\text{Ac}-\text{Ao}} \right\} \times 100$$

Ao : 시료와 H_2O_2 를 첨가하지 않은 정상대조구의 흡광도

Ac : 시료를 첨가하지 않은 H_2O_2 처리대조구의 흡광도

As : 시료를 첨가한 H_2O_2 처리구의 흡광도

3.결과

3.1 소핵형성 억제 효과

방사선 조사 후 선량별 소핵 형성은 조사선량에 비례하여 증가됨을 관찰할 수 있었다 (data not shown). 방사선 조사 전 소목추출물 처리군은 101 ± 9.02 개로 방사선 조사대조군 160 ± 14.53 개에 비하여 유의성있는 소핵 형성 억제효과를 나타내었다 (Table 1)($p < 0.005$).

3.2 단세포전기영동분석에서 DNA 외가닥절단(single strand break) 억제효과

방사선에 의해 절단된 DNA 가닥은 전기영동 상에서 양극 (+)방향으로 이동하여 head와 tail로 구성된 혜성 (comet) 모양으로 관찰되며 손상을 받지 않은 정상적인 세포는 핵체로 생각되는 원형의 양상을 나타낸다.

소목 추출물을 처리 후 1, 2, 4 Gy의 방사선을 조사한 후 DNA 외가닥절단 방호효과 정도를 살펴보았다. 모든 선량에서 소목추출물은 방사선에 대한 유의성있는 장해경감효과를 나타내었으며, 4 Gy의 높은 선량에서 특히 좋은 효과를 나타내었다 (Fig. 1)($p < 0.01$).

3.3 DPPH 라디칼 소거활성

시료가 라디칼 분자에 전자를 공여함으로써 라디칼 활성을 소거하는 효과를 DPPH 라

디칼 분자에 대한 전자공여능으로 측정하였다.

소목의 DPPH 라디칼 소거활성을 살펴본바 라디칼 소거활성능은 농도의존성을 나타내었으며, 20 μ g/ml 에서 85% 이상의 소거효과를 나타내었다 (Fig. 2).

3.4 Hydroxyl 라디칼 소거활성

활성산소종 중에서 반응성이 매우 강하여 생체의 산화적 손상에 중요한 역할을 하는 hydroxyl 라디칼에 대한 소거효과를 시험관 내에서 2-deoxyribose oxidation method로 확인하였다. 농도에 비례하여 소거활성이 증가하였으며 400 μ g/ml 이상의 농도에서 65% 이상의 소거효과를 나타내었다 (Fig. 3).

4. 고찰

방사선 증감제 및 방호제는 암치료를 위한 방사선 및 화학요법시 함께 적용될 경우 큰 효과를 얻을 수 있을 것이라는 관점에서 주요 연구대상이 되어왔다. Washburn *et al* [7] 과 Cairnie [8] 는 thiol 기가 포함된 WR2721 같은 화합물이 가장 강력한 방호효과가 있다고 보고하였으나 이러한 합성물질들의 대부분은 방사선 조사 후나 경구 투여시 효과가 경미하거나 거의 없기 때문에 조사직전에 주사하여야 하며 또한 정상세포에도 심한 독성을 나타내는 단점을 가지고 있어 실제 적용에는 많은 한계가 있다.

생약과 같은 천연물들은 각종 질병이나 상해회복에 효과적이며, 독성이 적어서 특별한 부작용을 나타내지 않는다. 따라서 방사선장해를 예방 또는 경감시키는 효과를 가진 천연물에 대한 연구도 관심의 대상이 되고 있다. 단일생약재에 의한 방사선 방호 연구에서는 인삼을 비롯하여 당귀, 천궁, 영지, 가시오가피, 만삼, 자리공 및 황기 등의 효과가 보고되었으며 당제를 비롯한 한방제에 대한 연구는 사물탕 및 사군자탕, 소시호탕, 십전대보탕, 인삼영양탕, 귀비탕 및 육미지황 등의 효과유무가 단편적으로 보고되고 있다 [14~26]. 생약제제에 의한 방사선방호 효과는 조혈조직의 보호 및 회복, 면역증강 등의 관점에서 연구가 진행되고 있으며, 조혈기능의 장애극복효과에 관한 연구가 주를 이룬다.

본 실험의 결과 소목은 방사선에 의해 유도된 DNA 손상을 경감시켰다. 대부분의 방사선 방호제가 자유라디칼 소거제로 작용하여 산화적 손상을 억제한다는 보고 [27, 28]와 본 실험의 라디칼 소거효과의 결과, 자유라디칼 소거 작용이 소목의 방사선 장해 경감효과에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼때, 소목 추출물은 DNA 상해를 효과적으로 방호하였으며, 자유라디칼 소거효과도 뛰어나 방사선 방호제로써 적용 가능함을 시사하였다. 특히, 독성이 거의 없는 천연물이라는 관점에서 방사선 방호제로 적용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었음.

5. 참고문헌

1. Patt, H., Tyree, M. and Straube, R.L. : Cystein protects against x-irradiation. *Science*, 110, 213-214 (1949).
2. Milas, L., Hunter, N. Reid, B.O. and Thames, Jr. H.D. : Protective effects of S-2-(3-aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid against radiation damage of normal tissues and a fibrosarcoma in mice. *Cancer Res.*, 42, 1888-1987 (1982).
3. Milas, L., Murray, D., Brock, W.A. and Meyn, R.E. : Radioprotectors in tumor radiotherapy: Factors and settings determining therapeutic ratio. *Pharmacol. Ther.*, 39, 179-189 (1988).
4. Neta, R., Douches, S. and Oppenheim, J.J. : Interleukin 1 is a radioprotector. *J. Immunol.*, 136, 2483-2485 (1986).
5. Neta, R. : Role of cytokines in radioprotection. *Pharmacol. Ther.*, 39, 261-266 (1988).
6. MacVittie, T.J., Monroy, R.L., Patchen, M.L. and Souza, L.M. : Therapeutic use of recombinant human G-CSF (rhG-CSF) in a canine model of sublethal and lethal whole body irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 57, 723-736 (1990).
7. Washburn L.C., Carlton J.E., Hayes R.L. : Distribution of WR-2721 in normal and malignant tissue of mice and rats bearing solid tumors: dependence on tumor type, drug dose and species. *Radiat. Res.*, 59, 483-575 (1974).
8. Cairnie A.B. : Adverse effect of radioprotector WR2721. *Radiat. Res.*, 94, 221-226, 1983.
9. French M. and Morley A.A. : Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.*, 147, 29-36 (1985)
10. Almasy, Z., Krepinsky, A.B., Bianci A. and Koteles G.J. : The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl. Radiat. Isot.* 38, 241-249 (1987).
11. Singh N.P., Stephens R.E. and Schneider E.L. : Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ -ray. *Int. J. Radiat Biol.*, 66, 563-569 (1995).
12. Blois M.S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1200 (1958).
13. Gutteridge J.M. : Reactivity of hydroxyl and hydroxyl-like radicals discriminated by release of thiobarbituric acid-reactive material from deoxy sugars, nucleosides and benzoate. *Biochem. J.*, 224, 761-767 (1984).
14. Kim, S. H., Cho, C. K., Yoo, S. Y., Koh, K. H., Yun, H. G. and Kim, T. H. : *In vivo* radioprotective activity of Panax ginseng and diethyldithiocarbamate. *IN VIVO*, 7, 467-470 (1993).
15. Mei, Q. B., Tao, J. Y. and Cui, B. : Advances in the pharmacological studies of *Radix Angelica sinensis(oliv.) Diels*(Chanese Danggui). *Chin. Med. J.*, 104, 776-781 (1991).

16. Ohta, S., Sakurai, N., Sato, Y., Inoue, T. and Shinoda, M. : Studies on chemical protectors against radiation. XXX. Radioprotective substances of *cnidii rhizoma*. *Yakugaku Zasshi*, 110, 746-754 (1990).
17. Hsu, H. Y., Lian, S. L. and Lin, C. C. : Radioprotective effect of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex. Fr.) Karst after X-ray irradiation in mice. *Am. J. Chin. Med.*, 18, 61-69 (1990).
18. Miyanomae, T. and Frindel, E. : Radioprotection of hemopoiesis conferred by *Acanthopanax senticosus* Harms (Shigoka) administered before or after irradiation. *Exp. Hematol.*, 16, 801-806 (1988).
19. Zneg, X. L., Li, X. A. and Zhang, B. Y. : Immunological and hematopoietic effect of *Codonopsis pilosula* on cancer patients during radiotherapy. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih*, 12, 607-608 (1992).
20. Wang, H. B., Zheng, Q. Y., Ju, D. W. and Fang, J. : Effects of *Phytolacca acinosa* polysaccharides II on lymphocyte proliferation and colony stimulating factor production from mice splenocytes *in vitro*. *Yao Hsueh Hsueh Pao*, 28, 490-493 (1993).
21. Quan, H. X. and Li, H. S. : Effects of *radix Astragali* on hemopoiesis in irradiated mice. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 19, 741-743 (1994).
22. Fujii, Y., Imamura, M., Han, M., Hashino, S., Zhu, X., Kobayashi, H., Imai, K., Kasai, M., Sakurada, K and Miyazaki, T. : Recipient-mediated effect of a traditional Chinese herbal medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: nunjin-youei-to), on hematopoietic recovery following lethal irradiation and syngeneic bone marrow transplantation. *Int. J. Immunopharmacol.*, 16, 615-622 (1994).
23. Hsu, H. Y., Ho, Y. H., Lian, S. L. and Lin, C. C. : Preliminary study on antiradiation effect of kuei-pi-tang. *Am. J. Chin. Med.*, 19, 275-284 (1991).
24. Ohnishi, Y., Yasumizu, R., Fan, H. X., Liu, J., Takao, Liu F., Komatsu, Y. Hosoya, E., Good, R. A. and Ikehara, S. : Effects of juzen-taiho-toh (TJ-48), a traditional Oriental medicine, on hematopoietic recovery from radiation injury in mice. *Exp. Hematol.*, 18, 18-22 (1990).
25. Hsu, H. Y., Ho, Y. H. and Lin, C. C. : Protection of mouse bone marrow by Si-Wu-Tang against whole body irradiation. *J. Ethnopharmacol.*, 52, 113-117 (1996).
26. Lu, G., Yang, M., Shen, Y. and Meng, J. : The absorption of Fe, Zn, Cu in siwu, sijnunzi, and Liuwei dihuang decoction by small intestine in rats. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 16, 297-298 (1991).
27. Hanson W.R. : Radiation protection of murine intestine by WR-2721, 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ and the combination of both agents. *Radiat. Res.*, 111, 361-373 (1987).
28. Booth V.K., Roberts J.C, Warters R.L., Wilmore B.H. and Lepock J.R. "Radioprotective thiolamines WR-1065 and WR-33278 selectively denature nonhistone nuclear proteins" *Radiat. Res.*, 153, 813-822 (2000).

Table 1. Effect of *C. sappan* on the induction of micronuclei in HL-60 cells exposed to 200 cGy of γ -rays

Sample	Micronuclei distribution per 1000 binucleate cells (Mean \pm SD)			
	One micronucleus	Two micronuclei	Three micronuclei	Total micronuclei
Irradiation Control	131 \pm 23	14 \pm 3.61	0.33 \pm 0.58	160 \pm 14.53
<i>C. sappan</i>	82 \pm 6	9.67 \pm 1.53	0 \pm 0	101 \pm 9.02*

*Significantly different from irradiated control group ($p < 0.005$).

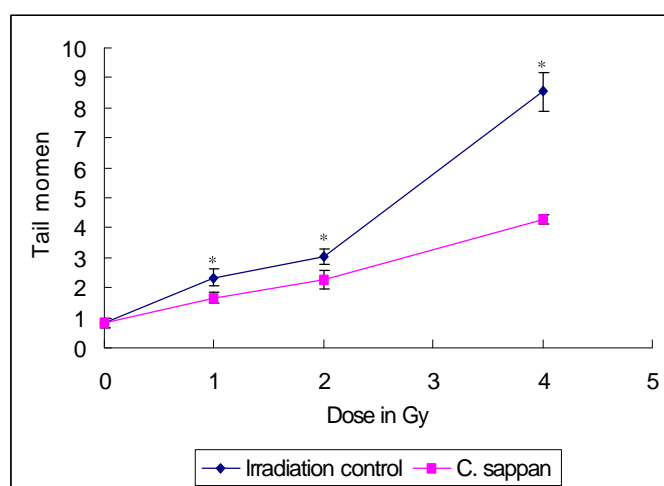


Fig. 1. The inhibitory effects of *C. sappan* against DNA damage induced by gamma irradiation. Error bars represent standard error.

*Significantly different from irradiated control group ($p < 0.01$).

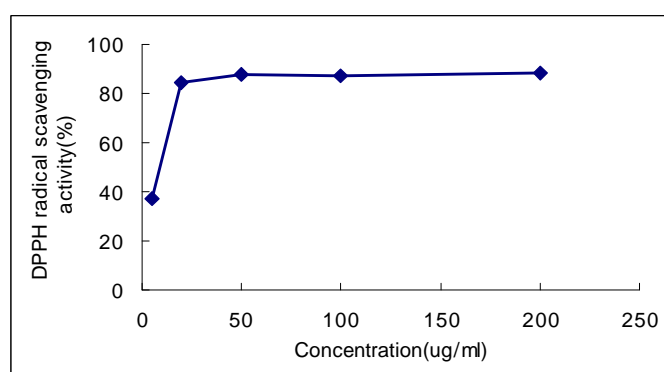


Fig. 2. Electron donating abilities (EDA) of extract of *C. sappan*.

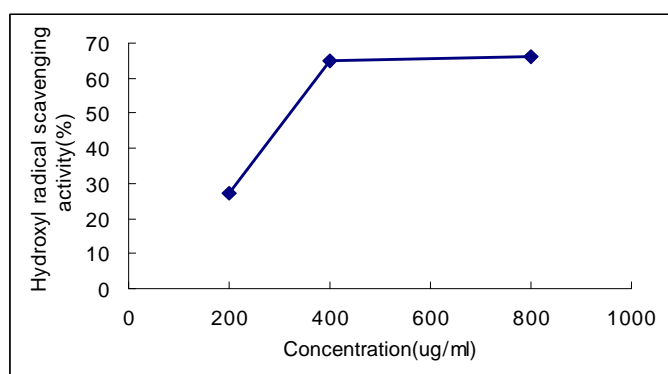


Fig. 3. Hydroxyl radical scavenging activities of extract of *C. sappan*.