

생쥐 골수세포 미소핵 검사에 의한 ³²P-colloid의 유전독성에 관한 연구

전남대학교 의과대학 핵의학실

김 지 열 · 범 희 승 · 최 근 희

전남대학교 자연대학 생물학과

김 희 경 · 위 인 선

= Abstract =

Genotoxicity of Colloidal ³²P Chromic Phosphate in the Mouse Bone Marrow Analyzed by Micronuclei Test

Ji-Yeul Kim, Ph.D., Hee-Seung Bom, M.D. and Keun-Hee Choi, M.S.,

Division of Nuclear-Medicine, Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

Hee-Kyung Kim, M.S. and In-Sun Wui, Ph.D.

Department of Biology, College of Natural Science, Chonnam University, Kwangju, Korea

Colloidal ³²P chromic phosphate is used to prevent hepatic metastasis from colorectal cancer. It is speculated that the intravenous injection of colloidal ³²P chromic phosphate can cause genotoxicity. To evaluate the genotoxicity of intravenously injected colloidal ³²P chromic phosphate, authors performed a micronuclei test in mice bone marrow.

Mice (ICR strain, 25~30 g) were divided to 4 groups: control, group 1 (19.166 KBq/g, usual therapeutic dose in human), group 2 (191.66 KBq/g), and group 3 (1916.6 KBq/g). Five mice of each group were sacrificed at days 1, 2, 3, 5, 7 and 14. Bone marrow were smeared and stained with Wright-Giemsa method. One thousand polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) were counted under the light microscope, and the number of micronucleated PCEs and NCEs were recorded.

The frequency of micronuclei in PCE and NCE in the control group was 0.3±0.06% and 0.45±0.10%, respectively. At group 1, frequency of micronuclei is not different from the control. However, frequencies of micronuclei in PCE at groups 2 and 3 were significantly increased from day 1 and persisted to day 14. The frequency of micronuclei in NCE was increased only at group 3.

In conclusion, the frequency of micronuclei increases as the dose of colloidal ³²P chromic phosphate increases, while micronuclei was not induced at the usual therapeutic dose. And the frequency of micronuclei persistently elevated for 14 days in the cases of higher doses.

서 론

교질성 방사성 인(³²P-colloid)은 직장대장암의 肝전이를 예방하기 위하여 간문맥을 통하여¹⁾, 상장간막동

맥을 통하여 주입되는²⁾ 방사성의약품이다. 간문맥이나 상장간막동맥을 통하여 주입되는 경우 간을 통과하여 전신에 퍼지는 양은 3% 이내라고 보고되어 있고, 김 등¹⁾은 대상 환자중 일부에서 백혈구 수가 감소하였음을 보고하였다. 방사성 인(³²P)은 β-입자만을 방출하기 때문에 생

체내에 주입되었을 경우 주위 조직에 대한 파괴력이 강하므로, 정맥혈을 통하여 주입된다면 골수세포에 대한 염색체 손상, 즉 유전적인 영향을 미칠 가능성이 있다. 따라서 최근 소화기암의 肝전이를 예방하는데 사용하는 제제로 주목받고 있는 교질성 방사성 인이 일으킬 수 있는 골수에 대한 유전적인 영향을 알아보는 것은 중요한 일일 것이다.

각종 약제 또는 독성물질의 세포유전적독성을 판정하는데는 metaphase analysis, sister chromatid exchange (SCE) 등이 많이 쓰여왔으나, 최근에는 간편하면서도 보다 정확한 결과를 내출수 있는 방법으로 미소핵 검사(micronuclei test)의 적용이 보편화 되어가는 경향이다³⁾. 미소핵이란 세포가 분열하는 동안 낭핵으로 흡수되지 못한 중심체가 없는 염색체 조각이나 염색체 전부를 말하며⁴⁾ 어떤 약제나 물질에 의하여 염색체가 손상되었을 경우 Wright-Giemsa 염색시에 보라빛 또는 검정빛의 원형의 작은 점으로 나타나는데 핵이 없는 적혈구 세포에서 더욱 관찰이 용이하다.

본 연구에서는 교질성 방사성 인(³²P-colloid)을 정맥투여 하였을때 생쥐 골수 세포에 어느정도의 세포유전적독성을 일으키는지 알아보기 위하여 생쥐골수 적혈구에서 미소핵 검사를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험군의 설정

실험에 사용된 생쥐는 생후 6주(25~30 g)전후의 수컷 ICR생쥐로 모두 120마리가 사용되었다. 교질성 방사성 인(³²P-colloid)의 용량은 임의로 일반적인 치료선량, 그 10배의 선량 및 100배의 선량으로 정하였다. 그러므로 실험은 위장수술(sham operation)만을 시행하고, 방사성 인을 투여하지 않은 대조군과 방사성 인의 양을 각각 19.166 KBq/g, 191.66 KBq/g 및 1916.6 KBq/g 투여군의 4군으로 나누어 시행하였다.

2. 교질성 방사성 인(³²P-Colloid)의 주입

생쥐를 마취하지 않은 상태에서 해부판에 묶고, 경부를 절개하여 외경정맥을 노출시켰다. 노출된 외경정맥에 대조군에는 생리식염수를 0.3 ml 주사하였고, 실험군에는 각각 해당하는 교질성 방사성 인(³²P-colloid, 미국 Mallinkrodt사 제품)을 주사하였다. 교질성 방사성

인은 각 실험군 모두 0.3 ml로 만들어 주사하였고, 주사 후 바로 피부를 봉합하고 사육장에 넣어 정상시와 같이 사육하였다.

3. 미소핵 검사(Micronuclei Test)

교질성 방사성 인(³²P-colloid)을 주사한 1, 2, 3, 5, 7, 14일 후 대조군 및 실험군을 각각 5마리씩 무작위로 골라 희생시켰으며, 미소핵 검사는 다음에 기술한 바와 같이 시행하였다.

1) 골수 채취 (Bone marrow Sampling)

생쥐를 해부판 위에 고정시킨 후에 양쪽 대퇴골 부위를 절단하여 한쪽 끝에 25 G 주사기바늘을 넣고 밀어내어 슬라이드글라스 위에 골수를 채취하였다.

2) 표본 제작 (Slide Preparation)

골수세포가 놓인 슬라이드글라스 위에 다른 슬라이드글라스를 45° 각도로 세운 다음 적당한 힘으로 도말하여 공기건조시켰다.

3) 염색 (Staining)

표본염색은 Wright-Giemsa 염색용액에 3분간 염색한 후 동량의 완충액을 더하여 섞이게 한 후 3~6분간 두었다. 그런 다음 증류수로 색깔이 분홍색이 될때까지 세척하여 거즈로 뒷면을 깨끗이 닦은 후 공기건조시켰다.

4) 현미경 분석 (Microscopic analysis) 및 통계처리

미소핵의 빈도수는 미소핵의 관찰이 쉬운 생쥐 골수세포중 적혈구를 이용하였으며, 각 슬라이드당 주홍색인 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, 이하 PCE)와 노랑색인 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, 이하 NCE)를 각각 1,000개씩 세어서 그 중 세포질에 미소핵이 나타난 세포수를 백분율(%)로 표시하였으며, Student t-test로 통계처리 하였다(Fig. 1. A-D).

결 과

1. 다염성적혈구(PCE)내의 미소핵 빈도수

각 슬라이드당 세포질이 잘 보존된 1,000개의 다염성적혈구를 관찰하여 미소핵을 가지고 있는 다염성적혈구를 계수한 결과, 대조군의 경우 1일부터 14일까지 0.17±0.06%~0.45±0.01% 범위였으며, 교질성 방사성 인을 일반적인 치료선량인 19.166 KBq/g투여군에서는 1일에 0.39±0.15%, 2일에는 0.53±0.11%, 14

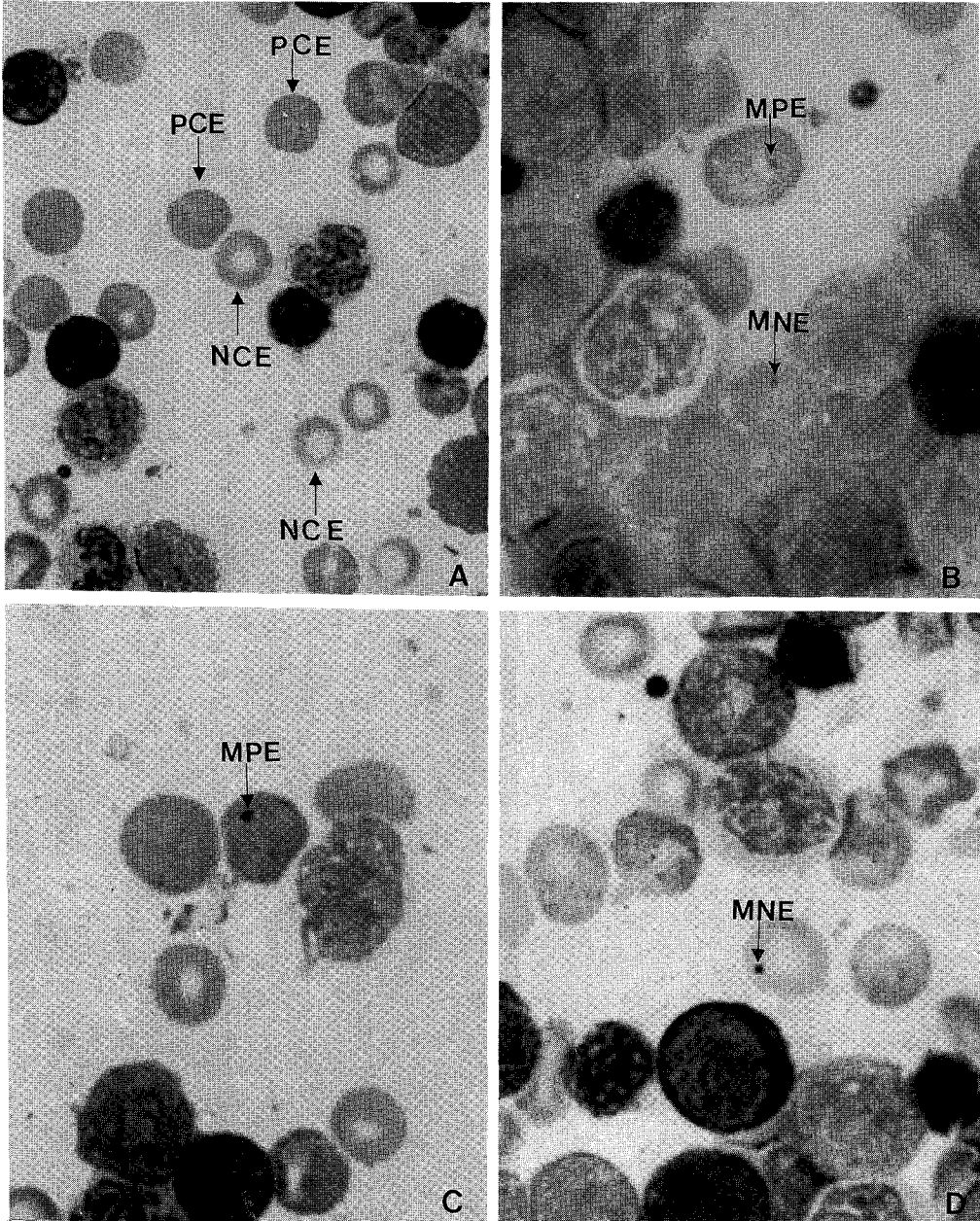


Fig. 1. A. Photomicrograph of mouse bone marrow cells stained with Wright-Giemsa method. polychromatic erythrocyte (PCE) and normochromatic erythrocyte (NCE) are indicated with arrows. $\times 100$
 B. Photomicrograph of micronucleated polychromatic erythrocyte (MPE) and normochromatic erythrocyte (MNE). $\times 2000$
 C. Photomicrograph of micronucleated polychromatic erythrocyte (MPE). $\times 2000$
 D. Photomicrograph of micromucleated normochromatic erythrocyte (MNE). $\times 2000$

일째에도 1일과 거의 비슷한 빈도로, 대조군과 비교하여 볼때 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$). 일반 치료선량의

10배인 191.66 KBq/g 투여군에서는 미소핵 빈도는 1일에 $1.2 \pm 0.21\%$, 2일에는 $1.34 \pm 0.12\%$, 7일에 $1.21 \pm$

0.20%로 큰 변화는 없었으나, 14일째에는 1.59±0.16%로 대조군에 비하여 증가하는 경향이 있었으며, 그 100배인 1916.6 KBq/g 투여군에서는 1일에 2.39±0.19%, 2일에 8.01±0.21%이었고, 3일에서는 11.44±1.52%로 가장 높은 빈도를 나타내었고(p<0.01), 그 후 점점 감소하여 14일째에는 2.59±0.31%로 나타났다(Table 1).

2. 정염성적혈구(NCE)내의 미소핵 빈도수

정염성적혈구의 경우 대조군에 있어서 미소핵의 빈도수가 0.14±0.05%~0.35±0.09%범위였으며, 교질성 방사성 인을 치료선량인 19.166 KBq/g 투여군에서는 1일에 0.4±0.13%, 7일에 0.55±0.15%로 거의 비슷한 빈도를 나타내다가 14일째에는 0.75±0.10%로 다소 증가하였다. 치료선량의 10배인 191.66 KBq/g 투여군에서는 1일부터 14일까지 큰 변화를 보이지 않았으나, 100배인 1916.6 KBq/g 투여군에서는 3일째에 1.95±0.14%로 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다(p<0.01, Table 2).

고 찰

미소핵 검사(micronuclei test)는 Ledebur와 Schmid⁵⁾에 의하여 1973년에 처음 시도되었는데 이들은 마우스 골수를 채취하여 도말한 후 다염성적혈구에서 미소핵을 측정하였다. Countryman과 Heddle⁶⁾은 말초혈액을 이용하여 세포질이 보존된 상태로 미소핵을 관찰하였으며, 그 후 세포의 종류, 각종 약제의 농도 그리고 처리 시간을 각기 달리하는 방법들이 개발되고 있다⁷⁻¹¹⁾.

본 실험에서 행한 골수도말법은 세포유전적독성이 의심되는 물질을 생체내에 투입했을때 자주 사용되는 방법으로, 생체의 염색체 배양법에 비하여 보다 간편하고 빠른 시일내에 각종 독성물질의 mutagenicity 여부를 관찰할 수 있으며 특별히 자동화된 시스템이 없어도 실험이 가능하다는 장점이 있다¹²⁻¹⁴⁾.

골수세포를 사용하여 미소핵 검사를 시행하는 동물로는 흰쥐, 생쥐 등 몇몇 동물이 시도되었고, 성별에 관해서도 논란이 많았으나 수컷 생쥐를 사용하는 것이 바람직하다고 알려져 있다^{15,16)}.

Table 1. Frequency (%) of Micronuclei in Mice Polychromatic Erythrocytes

Group \ Day	Frequency (Mean ± SD)					
	1	2	3	5	7	14
Control	0.31±0.07	0.45±0.10	0.3 ±0.06	0.34±0.11	0.17±0.06	0.31±0.09
Group 1	0.39±0.15	0.53±0.11	0.44±0.10	0.44±0.08	0.59±0.18	0.38±0.12
Group 2*	1.2 ±0.21	1.34±0.12	1.11±0.07	1.1 ±0.21	1.21±0.20	1.59±0.16
Group 3*	2.39±0.19	8.01±0.21	11.44±1.52	5.89±1.74	7.11±1.05	2.59±0.31

* : P < 0.01 as compared with control
 Group 1 : 19.166 KBq/g, Group 2 : 191.66 KBq/g, Group 3 : 1916.6 KBq/g

Table 2. Frequency (%) of Micronuclei in Mice Normochromatic Erythrocytes

Group \ Day	Frequency (Mean ± SD)					
	1	2	3	5	7	14
Control	0.14±0.05	0.35±0.09	0.24±0.09	0.24±0.09	0.33±0.14	0.31±0.11
Group 1	0.4 ±0.13	0.52±0.16	0.4 ±0.09	0.28±0.13	0.55±0.15	0.75±0.1
Group 2*	0.29±0.13	0.43±0.11	0.54±0.15	0.6 ±0.14	0.75±0.12	0.45±0.08
Group 3*	0.86±0.11	1.06±0.09	1.95±0.14	1.8 ±0.18	1.8 ±0.2	1.29±0.2

* : P < 0.01 as compared with control
 Group 1 : 19.166 KBq/g, Group 2 : 191.66 KBq/g, Group 3 : 1916.6 KBq/g

미소핵은 골수, 말초혈액 그리고 체세포 조직등 분화하는 세포면 어느 세포에서나 관찰할 수 있지만, 그 중 적혈구가 핵이 없으므로 관찰이 용이하여 많이 사용되고 있다. 적혈구는 Giemsa염색에 의하여 미성숙적혈구 즉 다염성적혈구와 성숙한 적혈구 즉 정염성적혈구로 구분할 수 있는데, 다염성적혈구는 세포질안에 RNA가 많은 양으로 존재하기 때문에 주홍빛으로 염색이 되며, 정염성적혈구는 다염성적혈구 보다는 소량의 RNA가 있으므로 노랑빛으로 염색이 된다. 생쥐 골수내에서 핵이 있는 적아구는 10시간씩 6~7회의 세포주기를 거친 후 핵이 배제(expulsion)되어 적혈구로 성숙되는데, 마지막 유사분열이 끝나고 약 10시간 후 다염성적혈구가 되고 다시 약 10시간 후에는 정염성적혈구로 성숙된다.

Countryman과 Heddle⁶⁾은 미소핵의 판정기준을 첫째, 직경이 원래 핵(mian nucleus)의 1/3이하이고, 둘째, 염색상이 원래의 핵과 동일해야하며 셋째, 세포질내에 위치해야 한다고 하였고, 골수내 다염성적혈구내 미소핵을 관찰함이 약 24~48시간전에 투여한 물질에 대한 세포유전적독성을 판정하는데 의의가 있다고 하였다. 본 실험에서는 이를 기준으로하여 다염성적혈구와 정염성적혈구 둘다 그 직경이 원래 핵의 1/3 이하이며 염색상이 동일하게 세포질내에 위치한 것을 선정하여 계수하였다.

Adler³⁾는 정상 대조군에 있어서 다염성적혈구내의 미소핵의 빈도수(micronucleated polychromatic erythrocytes; MPE)가 0.2% 즉 0~2 MPE/1,000 PCE의 범위라고 보고하였는데, 본 실험에서 대조군의 경우 다염성적혈구 내 미소핵의 빈도수가 $0.17 \pm 0.06\% \sim 0.45 \pm 0.1\%$ 로서 이들의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

교질성 방사성 인(^{32}P -colloid)은 직장대장암의 간 전이를 예방하기 위하여 간문맥이나 상장간막동맥을 통하여 주입되는데, 교질의 입자가 크기 때문에 간 Kupper 세포의 탐식작용으로 간에 주로 분포된다. 그러나 정맥 주사할 경우에는 비장과 골수내의 탐식세포에도 분포하게 된다. Mantravadi등²⁾은 상장간동맥에 주사를 하더라도 교질성 방사성 인의 약 3%가 전신순환으로 빠져나간다고 보고하였다. 교질성 방사성 인이 전신순환계에 주입되었을 경우 에너지가 큰 β -입자로 인하여 주위조직에 대한 파괴력이 강해 골수세포에 영향을 줄 가능성을 배제할 수 없다. 본 실험에서는 일반적으로 문맥에 투여하는 양인 19.166 KBq/g이 정맥투여되었을 경우를

기준으로 정하고, 그 10배 및 100배의 선량을 투여한 군을 추가로 임의선정하였다.

Heddle⁴⁾는 생쥐에 X선을 조사시켜 다염성적혈구에서의 미소핵 빈도수를 연구한 결과, 조사 12시간 후에 3%의 미소핵이 관찰되었고, 24시간 후에는 6%로 관찰 빈도가 높아졌으나, 48시간 이후부터는 점점 감소하였다고 보고하였으며, Timothy등¹⁷⁾은 흰쥐의 신장세포에 γ 선을 조사시킨 후 미소핵의 유발을 시간별 그리고 선량에 따라 관찰한 결과, 48시간부터 72시간 사이에 12~20%로 가장 많은 미소핵 빈도수를 나타냈고, 조사 선량을 증가시켰을 때 미소핵 빈도수도 높게 나타났다고 보고하였다. 그러나 이들의 각 연구는 방사선을 외부로부터 조사했을 때의 세포독성을 연구한 반면, 본 실험은 교질성 방사성 인을 직접 생체내에 주입하여 장기간 생체 내부방사선에 노출시켜 골수세포에서의 유전독성을 연구한 것이므로 그 방법에 근본적인 차이가 있다.

본 실험의 결과, 교질성 방사성인의 농도가 19.166 KBq/g일 때는 대조군과 차이가 없었으며 농도를 191.66 KBq/g으로 증가시켰을 때 미소핵의 빈도수가 증가하는 것으로 보아 교질성 방사성 인을 치료선량의 10배, 100배로 증가시켰을 때 그 농도에 비례하여 세포유전적독성을 일으킬 가능성이 커짐을 알 수가 있었다. 한편, 상기된 대부분의 연구들은 1~3일을 기준으로 행하여 졌으나, 본 실험에서는 교질성 방사성 인(P-32 colloid, 반감기 : 14.28일)이 체내에서 지속적인 방사선을 방출하여 연속적으로 세포독성을 일으킬 것이라고 예측하여 14일까지 미소핵 빈도수를 관찰하여 본 결과 다염성적혈구와 정염성적혈구에서 미소핵 출현율이 2주까지 지속됨을 알 수 있었으며, 일반적인 치료선량(19.166 KBq/g)을 투여하였을 경우 미소핵 빈도수는 $0.38 \pm 0.12\% \sim 0.59 \pm 0.18\%$ 로 대조군에 비교하여 볼 때 유의한 차이가 없어 인체에는 세포유전적독성을 일으키지 않는 것으로 사료된다.

또한, 정염성적혈구에서 교질성 방사성 인의 양이 1916.6 KBq/g일 때 $0.86 \pm 0.11\%$ 에서 $1.95 \pm 0.14\%$ 로 대조군에 비하여 다소 증가되었는데, 이는 대부분의 다른 보고서의 실험들은 한번의 일시적인 물질주입에 의한 미소핵 빈도수를 관찰한 반면, 본 실험은 지속적인 방사선을 방출하는 동위원소를 주입함에 따라 다염성적혈구가 정염성적혈구로 성숙되고 이것이 골수에 축적되어 나타난 결과라고 해석된다.

최근, Fenech와 Morley¹⁸⁾는 cytokinesis 저해제인 cytochalasin B를 이용하여 cytokinesis-blocked cells을 얻어 유전독성을 측정하였는데, 교질성 방사성 인을 투여한 실험에서도 골수세포 도말에 의한 미소핵 출현율과 말초 임파구 배양 후 cytochalasin B를 처리하여서 얻은 미소핵 출현율을 비교해보면 더욱 흥미있는 결과를 얻을 수 있으리라 사료된다.

결 론

전신순환계에 투여된 교질성 방사성 인(³²P-cholodi)이 생쥐 골수세포에 유전독성을 일으키는지 알아보기 위하여 교질성 방사성 인을 일반적인 치료선량인 19.166 KBq/g과, 그 10배, 100배의 선량인 191.66 KBq/g 및 1916.6 KBq/g으로 나누어 정맥투여 후 1, 2, 3, 5, 7, 14일에 희생시켜 골수세포를 채취하여 다염성적혈구 및 정염성적혈구에서의 미소핵 빈도수를 관찰한 결과는 다음과 같다.

1) 교질성 방사성 인을 생쥐 골수세포에 19.166 KBq/g, 191.66 KBq/g 및 1916.6 KBq/g로 투여 하였을 때, 임상에서 일반적으로 치료를 목적으로 투여한 (19.166 KBq/g) 양으로는 미소핵 출현율이 대조군에 비하여 유의한 차이를 나타내지 않았으나, 투여량이 10배, 100배로 증가됨에 따라 다염성적혈구와 정염성적혈구에서의 미소핵 빈도수도 증가하였다.

2) 골수세포에 나타난 미소핵 출현율은 교질성 방사성 인을 주입한 후 2주까지도 지속되었다.

REFERENCES

- 1) 김지열, 범희승, 김영진, 최원 : 각종 소화기 암에서 교질성 방사성 인을 이용한 전이성 간암의 방사선 내부치료, 대한핵의학회지 24:274-278, 1990
- 2) Mantravadi RVP, Spigos DG, Karesh S and Capek V: Intra-arterial P-32 chromic phosphate for prevention of postoperative liver metastases in high risk colorectal cancer patients. Radiology 48:555-559, 1983
- 3) Adler ID: Cytogenetic tests in mammals In: (Venitt S, Parry JM (Ed.) Mutagenicity testing, IRL Press, Oxford, 1984, pp 187-306
- 4) Heddle JA: A rapid in vivo test for chromosome damage. Mut Res 18:187-190, 1973
- 5) Ledebur MV, Schmid W: The micronucleus test methodological aspects. Mut Res 19:109-117, 1973
- 6) Countryman PI, Heddle JA: The production of micronuclei from chromosome aberrations irradiated cultures of human lymphocytes. Mut Res 41:321-332, 1976
- 7) Albanese R, Middleton BJ: The assessment of micronucleated polychromatic erythrocytes in rat bone marrow. Mut Res 182:323-332, 1987
- 8) Henning U G G, Rudd N L, Hoar D I: Kinetochore immunofluorescence in micronuclei. Mut Res 203:405-414, 1988
- 9) Fenech M, Morley A A: Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mut Res 147:29-36, 1985
- 10) Degraffi F, Tanzarella C: Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. Mut Res 203:339-345, 1988
- 11) Pascoe S A, Stemp G: A modified method and staining technique for the in vitro micronucleus test in human lymphocytes using cytochalasin B. Mut Res 234:253-255, 1990
- 12) Wakata A, Sasaki M S: Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured chinese hamster cells: Comparison with types and rates of chromosome aberrations. Mut Res 190:51-57, 1987
- 13) Nito S, Ariyuki F, Okaniwa A: Spontaneous expulsion of micronuclei by enucleation in the micronucleus assay. Mut Res 207:185-192, 1988
- 14) Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan A T: Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocytes: Comparison of two method. Mut Res 207:141-146, 1988
- 15) Henry M S, Lupo S, Szab K T: Sex difference in sensitivity to cytogenetic effects of ethyl methanesulfonate in mice demonstrated by the micronucleus test. Mut Res 69:385-387, 1980
- 16) Meyne J, Legator M S: Sex-related differences in cytogenetic effects of benzene in the bone marrow of swiss mice. Environmental Mutagen 2:43-50, 1980
- 17) Timothy L, Robert D, Garardiner A, Lavin F: Genotoxicity of analgesis compounds assessed by an in vitro micronucleus assay. Mut Res 189:299-306, 1987
- 18) Fenech M, Jarvis L R, Morley A A: Preliminary studies on scoring micronuclei by computerised image analysis. Mut Res 203:33-38, 1988