

인체 말초혈액 림프구에서 방사선유도 염색체 손상 및 세포고사에 대한 중기염색체 분석 및 유세포계측 연구

전남대학교병원 핵의학과, 임상병리과¹

범희승 · 이승연 · 이상구¹ · 민정준 · 정환정 · 송호천 · 김지열 · 신종희¹ · 서순팔¹ · 양동욱¹

A Comparison Study of Metaphase Analysis of Chromosomal Aberration and Flow Cytometric Assessment of Radiation-induced Apoptosis in Human Peripheral Lymphocytes

Hee-Seung Bom, M.D., Seung-Yeon Lee, CNMT, Sang-Ku Lee, M.D.,¹ Jung-Jun Min, M.D., Hwan-Jeong Jeong, M.D., Ho-Cheon Song, M.D., Ji-Yeul Kim, Ph.D., Jong-Hee Shin, M.D.,¹ Sun-Pal Suh, M.D.,¹ and Dong-Wook Rhang, M.D.¹

Departments of Nuclear Medicine and Clinical Pathology,¹ Chonnam University Hospital, Kwangju, Korea

Abstract

Purpose: Radiation-induced chromosomal damage and apoptosis were compared in human lymphocytes. **Materials and Methods:** Peripheral lymphocytes from 10 normal volunteers (6 males, 4 females, age range 23~41 years) were irradiated by gamma rays from a cell irradiator. Doses of irradiation were 0 (control), 0.18, 2, 5, 10, 20 and 25 Gy. Irradiated lymphocytes were examined by metaphase analysis for chromosomal aberrations and by flow cytometry for apoptosis. Results of both studies were compared according to dose. **Results:** Number of dicentric and ring chromosomes (D+R) was 0.5 ± 0.53 at baseline, which was significantly increased after radiation according to the dose. The fraction of cells showing annexin V-fluorescein isothiocyanate uptake was $0.55 \pm 0.39\%$, which increased to $3.58 \pm 1.85\%$ by 2 Gy irradiation, and then decreased. The fraction of cells showing propidium iodide (PI) uptake was $0.52 \pm 0.12\%$, which significantly increased according to dose (upto $15.64 \pm 5.99\%$ by 20 Gy irradiation). D+R and PI uptake were well correlated ($r=0.84$, $p<0.001$). **Conclusion:** Radiation-induced chromosomal aberration was correlated to nuclear uptake of PI, a marker of late apoptosis. (**Korean J Nucl Med 1999;33:94-9**)

Key Words: Metaphase, Chromosome aberrations, Flow cytometry, Apoptosis, Radiation injuries, Lymphocytes

Received Aug. 18, 1998; Revision accepted Dec. 9, 1998

Corresponding Author: Hee-Seung Bom, M.D., Department of Nuclear Medicine, Chonnam University Hospital, 8 Hakdong, Kwangju 501-757, Korea

Tel: (062) 220-5641, FAX: (062) 232-0232

E-mail: hsbom@chonnam.chonnam.ac.kr

※ 이 연구는 1997년도 학술진흥재단 자유공모과제의 결과임.

서 론

최근 발암 및 암 치료 효과의 기전으로서 세포고사에 대한 연구가 국내외에서 폭발적으로 늘어나고 있다. 세포고사에 의해 죽어 가는 세포는 대식세포에 잡아먹히게 되는데, 대식세포가 고사세포를 인식

하는 기전으로 세포막의 2중 지질구조 중 세포 안쪽에 위치하는 phosphatidyl serine이 세포 밖으로 뒤집어져 나오는 것을 대식세포가 인식하는 것이라는 보고가 있었다.¹⁾ 한편 annexin이라는 물질은 칼슘 존재 하에서 음이온을 띤 지질단백에 선택적으로 결합하는 단백질인데, 이 중 annexin V가 특히 phosphatidyl serine과 선택적으로 결합한다는 사실이 밝혀졌으며,²⁾ 약 50개의 phosphatidyl serine에 한 분자의 annexin V가 결합한다고 보고되었다.³⁾ Annexin V에 형광을 내는 물질인 fluorescein isothiocyanate (FITC)를 결합시키면 고사세포의 세포막에 붙어 형광을 내므로 유세포 계측기에 의해 정량적으로 측정할 수 있게 된다. 한편 세포핵의 손상은 propidium iodide (PI)를 이용한 유세포계측으로 알아볼 수 있으므로 이상의 두 가지 형광물질을 이용하여 세포막과 세포핵의 변화를 동시에 검사하여 세포고사를 연구하는 것이 가능해졌다.⁴⁾

인체세포 중 방사선에 가장 민감한 세포 중의 하나가 말초혈액 림프구이다.⁵⁾ 따라서, 방사선 피폭을 받은 경우 말초혈액 림프구의 염색체 이상으로 생물학적 조사선량을 측정하고 있다.^{6,7)} 그 동안 각 조사선량별로 말초혈액 림프구에 어느 정도 염색체 손상이 일어나는지에 대한 보고는 되어 있으나, 조사선량별로 세포고사가 어느 정도 일어나는지에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구에서는 조사선량별로 인체 말초혈액 림프구에서 염색체 손상은 중기염색체 분석법으로, 그리고 세포고사는 annexin V와 PI를 이용한 유세포계측법으로 정량화 하여 서로 비교해 봄으로써, 인체 말초혈액 림프구가 조사선량에 따라 세포사망에 이르는 과정을 밝혀보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

염색체 이상을 동반하는 질환이 없는 건강한 자원자 10명(남자 6명, 여자 4명, 연령범위 23~41세)을 대상으로 하였으며, 이들로부터 혈액을 채혈하여 실험에 이용하였다.

2. 채혈 및 림프구 분리

헤파린 처리된 주사기로 말초혈액 40 ml를 채혈하여 50 ml 원심관에 넣고 여기에 RPMI 1640 (0.05% L-glutamine, 20 mM HEPES, 50 µg/ml streptomycin, 10% fetal bovine serum) 배양액을 1:1의 비율로 첨가하였다. 15 ml 원심관에 Lymphoprep 3 ml를 넣고 그 위에 혈액을 조심스럽게 중첩시켰고 1,800 rpm으로 30분 동안 실온에서 원심분리를 하여 림프구 층을 모았으며, 이를 다시 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 다음 여기에 RPMI 1640 배양액을 첨가하여 약 $10^5 \sim 10^6$ /ml개의 세포수가 되도록 시판관에 분주하였다.

3. 방사선 조사

배양 24시간째에 Cs-137 감마선 조사기(Gamma Cell, Nordion, Canada)를 이용하여 저선량으로부터 고선량에 이르기까지(0.18, 2, 5, 10, 20, 25 Gy) 다양한 선량으로 조사하였으며, 조사하지 않은 세포를 대조군으로 삼았다. 조사 후 24시간 동안 계속 배양하였다.

4. 유세포계측검사(flow cytometry)

방사선조사 후 37°C, CO₂ 배양기에 24시간 동안 배양한 다음, 이를 꺼내어 1,200 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 제거한 다음, 다시 1,000 rpm으로 10분간 실온에서 원심 분리하여 약 $10^5 \sim 10^6$ 개의 세포를 모았다. 여기에 4°C PBS 500 µl로 세포를 풀어 다시 원심분리를 하였다. 미국 Trevigen사의 Annexin V-FITC kit를 사용하여 림프구를 형광염색하였는데 이를 요약하면, annexin V-FITC 배양액 10 µl, 결합완충액 10 µl, PI 1 µl, annexin V-FITC 79 µl을 혼합하여 실온, 차광상태에서 15분간 배양하였다. 배양이 끝나고 결합완충액 400 µl를 첨가하여 1시간 이내에 유세포계측기로 측정하였다. 대조군의 95%가 포함된 곳을 정상치로 하였으며, 실험군에서 정상치를 벗어난 수치를 기록하였다. 세포고사의 진행 정도를 다음과 같이 분류하였다(Fig. 1).

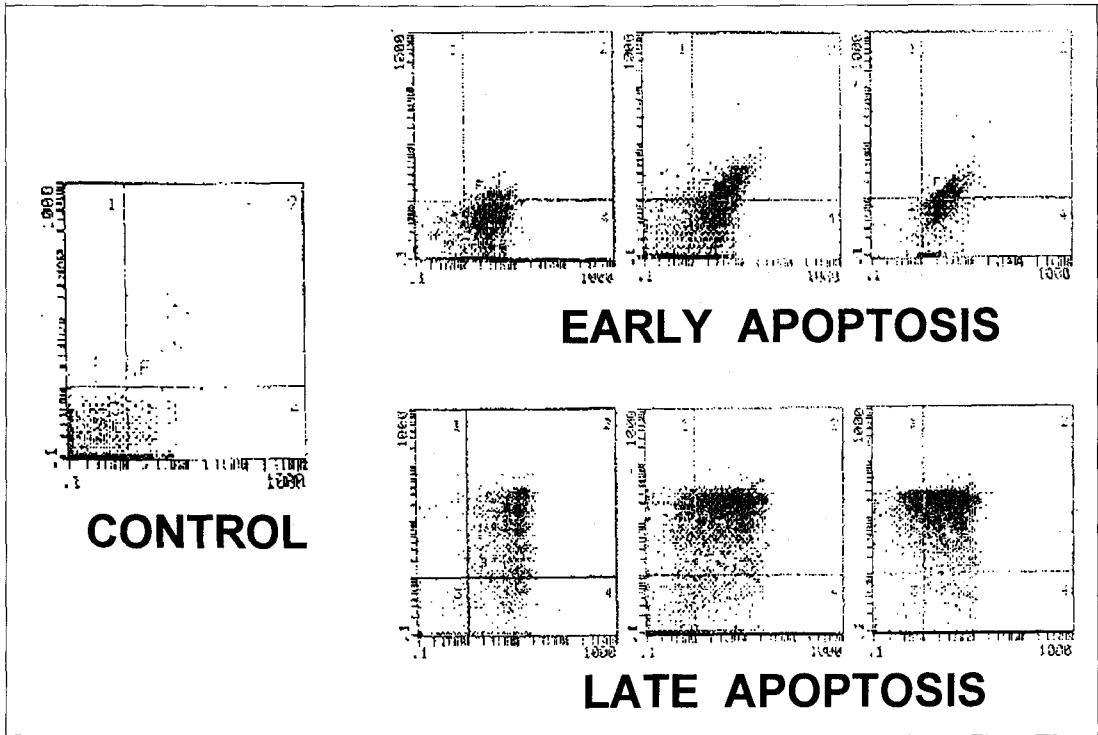


Fig. 1. Demonstration of flow cytometric assessment of early and late apoptoses of lymphocytes after irradiation. Abscissa indicates annexin V (AV) uptake and ordinate indicates propidium iodide (PI) uptake. Dots are aggregated in the left lower portion (low AV and PI uptakes) in control, right lower portion (high AV uptake and low PI uptake) in early apoptosis, and right upper portion (high AV and PI uptakes) in late apoptosis.

초기 세포고사(early apoptosis)=FITC 섭취 증가, PI 섭취 정상
 후기 세포고사(late apoptosis)=FITC 섭취 증가, PI 섭취 증가

실험군의 세포 중 초기세포고사와 후기세포고사를 보인 세포의 수를 전체에 대한 %로 산출하여 비교하였다.

5. 중기염색체 분석(metaphase analysis)

림프구를 분리한 다음 RPMI 1640 배양액에 5×10^6 /ml개의 세포를 넣고 여기에 phytohemagglutinin (PHA-M)을 첨가하여 배양하였으며, 배양 24시간째 유세포계측군과 같은 방법으로 방사선을 조사한 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 2시간 전에 colcemid를 처리하여 중기상태의 세포를 모아 저장액과 고정액

을 처리하여 슬라이드글라스에 도말한 다음 Giemsa 염색하여 염색된 표본은 현미경하에서 100배의 배율로 관찰하여 핵분열 중기세포를 찾아 1,000배로 확대 관찰하였다. 이때 세포당 염색체 수가 46개 전후인지 확인하고 그 숫자가 부족하거나 염색체 밀도가 염색체 이상의 빈도를 관정하기에 부적합한 것은 관찰에서 제외하였다. 세포 600개당 불안정 염색체인 반지모양 및 2중심체 염색체의 수를 계수하였다. 이 수로부터 다음의 공식에 따라 Ydr 값과 Qdr 값을 구하였다.

$$Ydr \text{ 값} = \frac{\text{반지모양 염색체와 2중심체 염색체의 수}}{\text{관찰된 림프구 총수}}$$

$$Qdr \text{ 값} = \frac{\text{반지모양 염색체와 2중심체 염색체의 수}}{\text{반지모양 염색체 또는 2중심체 염색체를 가진 림프구 수}}$$

Table 1. Results of Metaphase Analysis of Unstable Chromosomes and Flow Cytometric Assessment of Apoptosis in Lymphocytes of 10 Volunteers according to Irradiated Dose

DOSE (Gy)	D+R	Ydr	Qdr	EA(%)	LA (%)
0	0.50±0.53*	0.00±0.00	0.50±0.53	0.55±0.39	0.52±0.12
0.18	4.70±0.95	0.02±0.01	1.44±0.29	0.93±0.21	1.85±1.22
2	34.50±3.63	0.17±0.02	1.41±0.16	3.86±0.82	6.17±0.90
5	88.10±2.08	0.44±0.01	1.32±0.07	3.53±1.24	6.94±1.37
10	178.60±2.91	0.89±0.01	1.39±0.03	3.58±1.85	7.93±0.66
20	213.00±11.18	0.89±0.01	1.83±0.11	1.86±0.19	15.64±5.99
25	245.90±8.24	1.28±0.01	1.90±0.07	2.15±0.38	14.64±4.39

* mean±SD; Abbreviations: D+R; sum of dicentric and ring chromosomes, Ydr=(D+R)/600, Qdr=(D+R)/number of lymphocytes showing dicentric or ring chromosomes, EA; early apoptosis, LA; late apoptosis, SD; standard deviation.

Table 2. Correlations between Metaphase Analysis of Unstable Chromosomes and Flow Cytometric Assessment of Apoptosis in Lymphocytes of 10 Volunteers after Irradiation of Variable Doses

	Ydr	Qdr	EA	LA
D+R	0.99*	0.64*	0.21	0.84*
Ydr	-	0.63*	0.23	0.80*
Qdr			0.22	0.63*
EA			-	0.23

* p<0.01, Abbreviations: see Table 1.

6. 통계분석

PC용 SPSS 프로그램을 이용하여 관찰된 불안정 염색체의 수와 유세포계측에서 얻어진 결과를 Pearson 상관분석하였고, 조사선량에 따른 차이는 ANOVA 검사를 이용하여 검증하였으며, p 값 0.05 미만을 유의한 수준으로 인정하였다.

결 과

1. 조사선량별 염색체 손상에 대한 중기염색체 분석 결과(Table 1)

방사선을 조사하지 않은 세포군에서도 불안정 염색체가 0.5±0.53개 관찰되었으며, 실험군에서는 조사선량의 증가에 따라 불안정 염색체의 숫자가 유의

하게 증가되었다(p<0.001). Table 1에 대조군과 실험군에서의 불안정 염색체 수, Ydr 값 및 Qdr 값을 나타내었다.

2. 조사선량별 세포고사에 대한 유세포계측 결과(Table 1)

초기 세포고사와 후기 세포고사를 보이는 림프구의 %를 Table 1에 표시하였다. 조사선량의 증가에 따라 초기 세포고사는 증가하다가 다시 감소하는 양상을 보이나, 후기 세포고사는 조사선량에 따라 증가하는 양상을 보였다.

3. 중기염색체 분석 및 유세포계측 결과의 상관관계 분석(Table 2)

중기염색체 분석에서 보이는 불안정 염색체의 수와 Ydr, Qdr 값은 초기 세포고사와는 유의한 상관관계를 보이지 않고, 후기 세포고사와는 매우 유의한 상관관계를 보이고 있었다(각각 r=0.84, 0.80, 0.63; p<0.01).

고 찰

본 연구에서는 방사선에 조사된 림프구의 염색체 손상 정도가 세포고사의 병태생리 중 세포핵의 변화와 관계가 있고, 세포막의 변화와는 관계가 없다는 사실을 처음으로 밝혔다. 세포막의 변화가 초기 세

포고사이고, 세포핵의 변화까지 동반한 경우를 후기 세포고사라고 정의한 보고를 인용한다면,⁴⁾ 생물학적 선량평가법인 불안정 염색체의 계수법은 후기 세포고사를 반영한다고도 할 수 있겠다.

방사선에 피폭된 림프구가 세포사망에 이르는 기전은 두가닥 절단에 의한 염색체의 손상에 의한다고 알려져 있으며, 이를 반영하는 것이 불안정 염색체인데, 이 중 2중심 염색체와 반지모양 염색체는 그 생성기전이 동일하고 용량반응 관계가 명확하며 현미경 검경시 육안으로 쉽게 구별이 가능하여 측정하는 관찰자간의 편차가 적으므로 이 둘의 빈도가 생물학적 선량 측정에 많이 이용되고 있다.⁸⁾ 불안정 염색체의 빈도를 좀더 표준화한 값이 Ydr과 Qdr 값이다. Ydr 값은 불안정 염색체 수를 관찰한 림프구 총수로 나눈 값으로 전신피폭시 피폭자의 평균 흡수선량의 지표이며, Qdr 값은 불안정 염색체를 가진 림프구 중에 불안정 림프구의 숫자를 나타내는 값으로 부분피폭시 피폭 부위의 평균 흡수선량을 반영하는 것으로 알려져 있다.

한편, 방사선에 피폭된 림프구가 사망에 빠지는 기전이 세포고사라는 주장도 있다. 세포고사 역시 세포핵에 변화가 일어나지만, 최근 고사세포를 탐식하는 탐식세포가 고사세포를 알아내는 기전이 세포막의 변화, 즉, 세포막의 이중 지질구조 중 안쪽에 위치하는 phosphatidyl serine이 밖으로 뒤집어져 나오는 것을 인식한다고 보고되었다.¹⁾ 이를 이용하여 세포고사를 정량적으로 진단할 수 있는 방법이 고안되었는데, phosphatidyl serine에 annexin V가 결합하는 것을 이용하여 annexin V에 형광물질인 FITC를 붙이는 것이다. 이와 함께 세포핵에 결합하는 PI를 동시에 사용하면 세포막의 변화와 세포핵의 손상을 함께 정량적으로 측정할 수 있어 세포고사의 진행상황을 알아볼 수 있게 된다.⁴⁾

세포고사를 알아볼 수 있는 검사법으로는 현미경적으로 고사소체를 찾아보는 방법,⁹⁾ DNA가 특징적으로 잘라진 것을 전기영동하여 DNA 사다리 모양을 보는 방법,¹⁰⁾ 세포핵을 형광염색하여 유세포계측함으로써 고사분획을 보는 방법 등¹¹⁾ 여러 가지 방법이 개발되어 사용되고 있다. 본 연구에서 사용한 2중 형광염색 방법은 세포막의 변화와 세포핵의 변

화를 동시에 관찰할 수 있는 장점이 있으며, 두 가지 변화가 선량에 따라 다르다는 점을 알 수 있었다. 즉, 세포막의 변화는 2 Gy 조사군까지는 선량에 따라 증가하다가 그 이후에는 오히려 감소하는 양상을 보였으며, 세포핵의 변화는 선량이 증가함에 따라 계속적으로 증가하는 양상을 보였다. 다만, 본 연구에서는 방사선조사 후 시간에 따라 세포막의 변화와 세포핵의 변화를 관찰하지는 못하였으므로, 세포고사가 시간적으로 세포막의 변화부터 시작되는지 아니면 세포핵의 변화가 처음부터 동반하는지에 대해서는 추후 밝혀보아야 할 과제로 생각된다.

세포핵막에 손상이 오면 세포핵에 PI가 섭취되며, 이를 유세포계측하면 세포핵의 손상 여부를 알 수 있는데, 본 연구에서는 조사선량에 따라 세포핵의 PI 섭취가 계속적으로 증가하였으며, 증가하는 정도가 증기염색체 분석법에 의해 측정된 불안정 염색체의 수와 매우 상관관계가 있었다. 따라서, 림프구의 세포고사 단계 중 초기 단계인 세포막의 변화보다는 후기 단계인 세포핵의 변화가 불안정 염색체의 출현과 관련이 있는 소견이라고 할 수 있다. 현재 방사선조사 후 림프구의 손상을 가장 생물학적으로 반영해주는 지표로 불안정 염색체 계수법이 널리 사용되고 있으나, 본 연구의 결과로 유추해 본다면 저선량방사선에 조사되었거나 또는 방사선조사 초기에 세포고사가 시작되는 림프구의 측정에 annexin V-FITC 유세포계측법을 사용할 수 있으리라 사료된다. 따라서, 방사선 피폭을 받은 사람을 대상으로 annexin V-FITC 유세포계측법을 이용한 연구가 추후 이루어져야 할 필요가 있다고 판단된다.

본 연구의 제한점

본 연구에서는 조사선량을 임의적으로 0.18, 2, 5, 10, 20, 25 Gy로 나누어 조사하였는데, 선량 범위를 좀더 조밀하게 나누어 조사할 필요가 있을 것으로 보인다. 특히 방사선조사 후 세포막의 변화는 2 Gy 군에서 가장 높게 나타났으므로, 이보다 낮은 선량 범위를 좀더 세밀하게 조사할 필요가 있을 것으로 사료되며, 시간에 따른 차이도 추후 연구해 보아야 할 분야이다. 그러나, 본 연구에서 선량의 증가에 따

라 세포핵의 변화와 불안정 염색체의 출현이 유의한 상관관계를 가지고 증가하였으므로 조사선량 구분이 적절하였던 것으로 판단되었다.

요 약

목적: 조사선량별로 인체 말초혈액 림프구에서 염색체 손상은 중기염색체 분석법으로, 그리고 세포고사는 annexin V를 이용한 유세포계측법으로 정량화하여 서로 비교해 봄으로써, 인체 말초혈액 림프구가 조사선량에 따라 세포사망에 이르는 과정을 밝혀 보고자 하였다. **대상 및 방법:** 염색체 이상을 동반하는 질환이 없는 건강한 자원자 10명(남자 6명, 여자 4명, 연령범위 23~41세)을 대상으로 하였으며, 이들로부터 혈액을 채혈하여 실험에 이용하였다. 채혈한 혈액으로부터 림프구를 분리하여 0.18, 2, 5, 10, 20, 25 Gy를 조사하였으며, 방사선을 조사하지 않은 림프구를 대조군으로 하였다. 방사선에 조사된 실험군과 대조군을 각각 중기염색체 분석법과 유세포계측법으로 검사하였으며, 중기염색체 분석법에서는 600개의 림프구로부터 불안정 염색체인 2중심 염색체와 반지모양 염색체의 수를 계수하였고, 유세포계측법에서는 세포막의 변화는 annexin V에 결합된 FITC의 섭취로, 그리고 세포핵의 변화는 PI의 섭취로 보았다. 실험군 간의 차이는 ANOVA 검사로, 그리고 두 검사법간의 상관관계는 Pearson의 상관검사로 알아보았다. **결과:** 방사선을 조사하지 않은 세포군에서도 불안정 염색체가 0.5 ± 0.53 개 관찰되었으며, 실험군에서는 조사선량의 증가에 따라 불안정 염색체의 숫자가 유의하게 증가되었다($p < 0.001$). 조사선량의 증가에 따라 초기 세포고사는 증가하다가 다시 감소하는 양상을 보이나, 후기 세포고사는 조사선량에 따라 증가하는 양상을 보였다. 중기염색체 분석에서 보이는 불안정 염색체의 수와 Ydr, Qdr 값은 초기 세포고사와는 유의한 상관관계를 보이지 않고, 후기 세포고사와는 매우 유의한 상관관계를 보이고 있었다($p < 0.01$). **결론:** 조사선량에 따른 불안정 염색체의 증가는 유세포계측법으로 검사한 세포핵의 변화와 밀접한 상관관계를 가지고 있었다. 반면 세포막의 변화는 염색체 손상과 관계가 없었

며, 조사선량의 증가에 비례하여 증가하지도 않았다.

참 고 문 헌

- 1) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidyl serine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
- 2) Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidyl serine content. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:187-91.
- 3) Meers P, Mealy T. Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge. *Biochem* 1993;32:11711-21.
- 4) Stein L, Wang JM. Detecting apoptotic cells by flow cytometry using annexin V. *Hot Lines* 1997; 3:12-3.
- 5) 범희승. 방사선생물학. In: 고창순 편저. 핵의학. 제2판. 서울: 고려의학; 1996. p. 193-234.
- 6) Ahn YC, Ha SW. Chromosomal aberrations induced in human lymphocytes by in vitro irradiation with Co-60 gamma-rays. *J Korean Asso Radiat Protec* 1993;18:1-16.
- 7) Kim ES, Kim MS, Seo DS, Jeong NI, Rho SI, Lee JY, et al. Chromosomal aberrations induced by in vitro irradiation of I-131. *Korean J Nucl Med* 1994;28:133-40.
- 8) Bauchiger M, Kolin-Gerresheim J, Schmid E, Dresch J. Chromosome analyses of nuclear-power plant workers. *Int J Radiat Biol* 1980;38:577-81.
- 9) Mirkovic N, Meyn RE, Hunter NR, Milas L. Radiation-induced apoptosis in a murine lymphoma in vivo. *Radiother Oncol* 1994;33:11-6.
- 10) Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218:314-9.
- 11) Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JJ, Beach D, Jack T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiencies. *Nature* 1995;377:312-5.