

골 신틸그라피를 시행한 환자의 림프구에서 방사선 적응반응의 유도에 관한 연구

전남대학교병원 핵의학과
민정준 · 범희승

Induction of Radiation Adaptive Response in Lymphocytes of patients Undergoing Bone Scintigraphy

Jung Jun Min, M.D. and Hee Seung Bom, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Chonnam University Hospital, Kwangju, Korea

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to ascertain whether radiation adaptive response could be induced by Tc-99m-methylene diphosphonate (Tc-99m-MDP) in peripheral lymphocytes of patients undergoing bone scintigraphy. **Materials and Methods:** Lymphocytes from 22 patients (6 males, 16 females, mean age 50 ± 14 years) were collected before and after bone scintigraphy using 740 MBq Tc-99m-MDP. Lymphocytes from 10 controls (6 males, 4 females, mean age 43 ± 7 years) were also collected. They were exposed to challenge dose of 2 Gy gamma rays using a cell irradiator. Number of ring-form and dicentric chromosomes per 600 cells (chromosomal aberrations) was counted under the light microscope. **Results:** Chromosomal aberrations in patients before bone scintigraphy (385.1 ± 30.5) was not different from that of controls (367.8 ± 36.6). However, chromosomal aberrations in patients after bone scintigraphy was significantly decreased to 192.6 ± 22.1 ($p=0.0001$). **Conclusion:** Low dose gamma-irradiation by Tc-99m-MDP used for bone scintigraphy induces a cytogenetic adaptive response in peripheral lymphocytes. (Korean J Nucl Med 1999;33:172-7)

Key Words: Tc-99m methylene diphosphonate, Bone scintigraphy, Chromosomal aberration, Radiation adaptive response

서 론

저선량의 방사선에 노출된 인체 림프구는 그 후

에 고선량의 방사선에 노출되어도 염색체 손상을 잘 입지않는, 소위 방사선 적응반응이 유도되는데,¹⁻¹³⁾ 이 현상은 극소량의 알킬화제에 노출된 대장균에서 DNA 회복반응이 유도되어 이후의 급성 알킬화의 손상 효과에 내성을 갖게 된다는 이전의 연구 결과¹⁴⁾와 유사하다. 저선량 방사선 유도 적응반응은 주로 H-3-thymidine,^{1,2,4)} X선^{3,5-11,13)} 및 γ 선¹²⁾을 이용하여 연구되었고, 연구자들은 저선량의 방사선으로 전처치된 림프구들이 고선량에 노출되었을 때 전처치되지 않은 림프구들에 비해 불안정 염색체의 출현

Received Sep. 14th, 1998; revision accepted Mar. 9th, 1999
Corresponding Aauthor: 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

빈도가 현저히 감소하였음을 보고하였다.

Tc-99m methylene diphosphonate(이하 Tc-99m-MDP)는 최근에 가장 흔히 사용되는 골영상용 방사성의약품으로 전신의 흡수선량은 0.13 cGy/740 MBq인 것으로 알려져 있는데,¹⁵⁾ 핵의학검사를 통해 피폭받은 이 정도의 저선량이 인체에서 방사선 적응반응을 일으키는 지 여부에 대해서는 아직 국내 외적으로 알려진 바 없다. 본 연구에서는 골 스inti그라피를 시행하는 환자의 말초혈액을 Tc-99m-MDP 주사 전후에 채혈한 다음 고선량의 방사선을 조사하고 중기염색체 분석법으로 불안정 염색체 수를 계수하여 골 스inti그라피를 시행하는 환자에서 방사선적 적응반응이 유도되는지 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

골 스inti그라피를 시행한 22명의 환자(남자 6명, 여자 16명, 평균 연령 50±14세)를 대상으로 Tc-99m-MDP 주사 전과 주사 후 4시간에 각각 5 ml씩 채혈하여 배양하였다. 이 연구는 채혈에 동의한 환자들만을 대상으로 하였고 Tc-99m-MDP는 740 MBq을 주사하였다. 대조군으로는 염색체 이상을

동반하는 유전병의 병력이 없는 건강한 사람 10명(남자 6명, 여자 4명, 평균 연령 43±7세)을 선정하여 채혈하였다.

대조군, 환자군 중 Tc-99m-MDP 주사 전에 채혈한 군과 Tc-99m-MDP 주사 후에 채혈한 군은 각각 2 Gy를 조사하지 않은 군과 조사한 군으로 나누어 불안정 염색체를 계수하여 서로 비교하였다.

골 스inti그라피를 시행한 환자군 중 유방암 환자가 10명, 외상 환자 6명, 폐암 2명, 소화기 암 2명, 림프종 1명, 후두암 1명으로 암 환자가 총 16명이었다. 이 중 화학요법을 받은 과거력이 있는 환자는 10명, 방사선 치료를 받은 과거력이 있는 환자는 3명이었다. 이번 연구는 화학요법을 시행한 지 12개월에서 80개월(평균 31±24개월), 방사선 치료를 시행한 지 30개월에서 69개월(평균 48±20개월)이 경과된 후에 시행되었다. 1년 이내에 화학요법이나 방사선 치료를 받고 있는 환자는 대상 환자에 포함시키지 않았다.

2. 배양 및 방사선 조사

전체적인 실험의 순서는 Fig. 1에 나타내었다. RPMI 1640 media 6 ml에 15% 우태아혈청(fetal bovine serum) 1 ml, 세포분열 촉진제인 3% phy

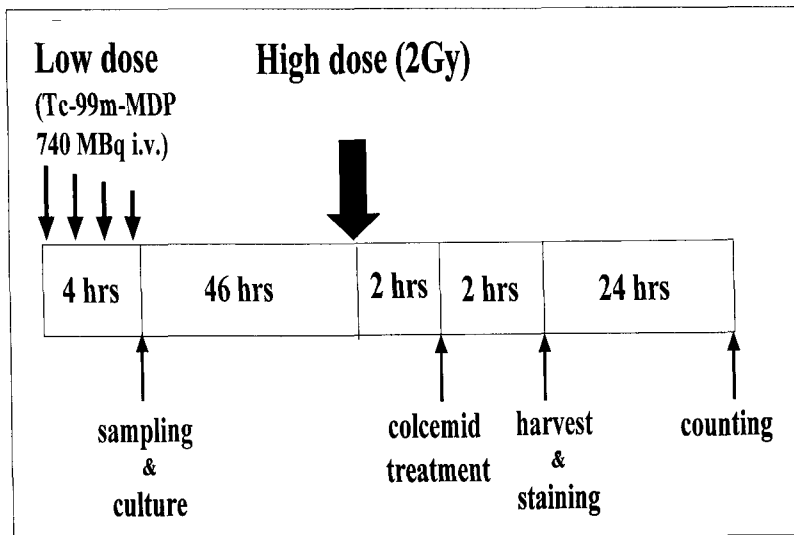


Fig. 1. Protocol of Metaphase Analysis: High dose of γ -rays were irradiated at 46 hours after culture and colcemid was added 2 hours before harvesting.

tohemagglutinin (PHA) 100 µg, penicillin 100 unit/ml, streptomycin 100 µg/ml를 첨가한 멸균튜브에 채취한 말초혈액을 10방울 섞은 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

고선량의 방사선 조사는 배양 46시간째에 Cs-137조사기(central dose rate=654 Gy/h, Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 사용하여 2 Gy를 조사하였다.

3. 수 확

배양 48시간 후에 colcemid 0.1 ml를 첨가하여 중기 상태에서 분열을 억제시킨 후 2시간 더 배양하였다. 배양이 끝난 시험관은 1,200 rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 저장액(0.075M KCl)을 6 ml씩 각각 분주하고 잘 섞은 후 37°C 수조에서 10분간 방치하였다. 여기에 고정액 5 ml를 섞고 15분간 냉장 보관한 다음 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하고 상층액을 버리고 다시 고정하였는데, 이 과정을 두차례 더 반복하여 여분의 상층액을 버리고 침전된 세포를 잘 섞은 다음 슬라이드 글라스 위 30 cm 높이에서 한두 방울 떨어뜨려 고루 퍼지게 하고 공기 중에서 질 건조시킨 뒤 Giemsa 용액으로 염색하였다.

4. 현미경 검경 및 계수

염색된 표본은 현미경하에서 100배의 배율로 관찰하여 핵분열 중기의 세포를 찾아 1,000배로 확대 관찰하였다. 이 때 세포 당 염색체 수가 46개 전후인지 확인하고 그 숫자가 부족하거나 염색체 밀도가

염색체 이상의 빈도를 판정하기에 부적합한 것은 관찰에서 제외시켰다. 세포 600개당 불안정 염색체인 반지형과 이 중 중심체형 염색체의 숫자를 계수하였고 하나의 염색체 중에서 3개 이상의 중심체가 보일 때에는 그 중심체의 수효에서 1을 뺀 횟수만큼을 이 중 중심체형 염색체로 간주하였다.

5. 통계 분석

대조군과 Tc-99m-MDP 주사 전에 채혈한 군, Tc-99m-MDP 주사 전과 주사 4시간 후에 채혈한 군간에 불안정 염색체의 계수의 차이는 분산 분석으로 하였고, 각 군간의 다중 검정을 위한 사후검정은 Bonferroni correction을 이용하였으며, p값 0.05 미만을 유의한 차이로 간주하였다.

결 과

대조군과 환자군의 림프구에서 방사선 조사를 하지 않은 경우에는 불안정 염색체가 각각 3.1±1.1개와 2.8±0.4개로 유의한 차이가 없었다. Tc-99m-MDP 주사 후 4시간 째에 채혈한 림프구에서 계수한 불안정 염색체 수는 6.6±8.9개로 방사선을 조사하지 않은 군에 비해 유의한 증가를 보이지 않았다 (Table 1).

대조군과 환자군의 림프구에서 2 Gy만 조사한 경우 불안정 염색체 수는 대조군에서 367.8±36.6개, 환자군에서는 385.1±30.5개로 양 군 간에 유의한 차이가 없었다.

Tc-99m-MDP 주사 후 2 Gy를 조사한 환자군의

Table 1. Chromosomal Aberrations in Peripheral Lymphocytes before and after Bone Scintigraphy

	Number of donors	Total number of cells scored	Total number of chromosomal aberrations	Average number of chromosomal aberrations in each subjects	p value
Control	10	6,000	31	3.1±1.1	n.s.
Before bone scintigraphy	22	13,200	62	2.8±0.4	n.s.
After bone scintigraphy	22	13,200	144	6.6±8.9	n.s.

n.s., not significant.

림프구에서 불안정 염색체 수는 192.6 ± 22.1 개였는데 이는 Tc-99m-MDP 주사 전 2 Gy만 조사한 경우 385.1 ± 30.5 개에 비하여 불안정 염색체의 발생이 유의하게 감소하였다($p=0.0001$, Table 2).

고 찰

골 스inti그라피는 핵의학과에서 가장 흔하게 시행하는 검사법으로 뼈의 생리적인 변화를 영상기전으로 이용하기 때문에 골병변을 발견하는 데 있어 단순방사선 검사보다 예민하게 조기 병변을 발견할 수 있고 골병변의 전신분포와 섭취 형태, 추적검사의 변화 등은 임상사에게 중요한 정보를 제공한다. 따라서, 골 스inti그라피가 인체에 방사선 장애를 일으키는지 아니면 오히려 적응반응 등을 통해 유리한 작용을 하는지 여부는 관심을 가질 가치가 있는 주제라고 할 수 있다. 저자는 이 연구에서 골 스inti그라피를 시행하기 위해 주사한 Tc-99m-MDP에서 방출되는 저선량 방사선이 인체 림프구에 어느 정도의 장애를 가져오는지 또는 적응반응을 유도하는지 알아보았다. 골 스inti그라피는 암의 골전이를 평가하는데 임상적으로 많이 사용되는 검사이므로 본 연구에서도 대상 환자 22명 중 암 환자가 16명을 차지하였고 이들 중 화학요법 또는 방사선 치료를 시행한 환자도 11명이었다. 이들의 불안정염색체의 수는 정상인과 차이가 없었고 Tc-99m-MDP 주사 후에도 불안정염색체의 수가 유의한 증가를 보이지 않았다. Tc-99m-MDP 주사 후에는 주사 전에 비하여 고선량의 방사선 조사에 의해 형성되는 불안정 염색체의

수가 감소함을 관찰함으로써 방사선 적응반응이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 즉, 골 스inti그라피를 시행한 환자는 방사성 의약품에 의한 방사선 장애의 위험이 없으며 오히려 말초혈액 림프구가 방사선 적응반응을 나타내어 다음에 이어지는 방사선 장애에 저항성을 갖는다는 사실을 밝혔다.

인체의 림프구에서 저선량의 방사선에 의하여 적응반응이 유도된다는 최초의 연구는 1984년 Oliveri 등¹⁾에 의해 이루어졌는데, 인체의 림프구를 H-3-thymidine으로 처리한 후 150 cGy의 X선을 조사한 군에서 X선만 단일 조사한 군에 비해 염색분체 이상이 감소함을 입증했다. Shadley와 Wolff 등¹¹⁾도 150 cGy의 X선을 조사한 군에 비하여 0.5~1 cGy를 조사한 다음 150 cGy를 조사한 림프구에서 염색분체 이상이 감소함을 보고하였다.

저선량의 방사선에 의하여 인체 림프구가 다음에 이어지는 고선량의 방사선에 적응하여 염색체 손상을 덜 입는 능력, 즉 방사선 적응반응은 저선량의 방사선에 의하여 수선 단백질 혹은 방어 단백질이 유도되어 나타나는 것으로 알려져 있다. Youngblom 등⁶⁾은 1 cGy의 X-선을 조사한 후 150 cGy를 조사한 경우에서 방사선 적응반응이 유도되는 것을 확인하고 10 µg/ml의 cycloheximide 처리를 1 cGy 조사 후에 2시간 간격으로 하여 방사선 적응반응이 억제되는지 여부를 실험한 결과 저선량 조사 4시간에서 6시간 이후에 cycloheximide 처리를 한 경우에 방사선 적응반응이 억제됨을 밝혔다. 즉, 방사선 적응반응이 유도되는 과정에 단백질이 관여하고 이러한 소위 '적응 단백질'은 저선량의 방사선에 피조사된 후

Table 2. Induction of Chromosomal Aberrations by High Dose Irradiation (2 Gy) before and after Bone Scintigraphy

	Number of donors	Total number of cells scored	Total number of chromosomal aberrations	Average number of chromosomal aberrations per 600 cells	p value*
Control	10	6,000	3,678	367.8 ± 36.6	
Before bone scintigraphy	22	13,200	8,472	385.1 ± 30.5	0.455
After bone scintigraphy	22	13,200	4,236	192.6 ± 22.1	0.0001

* control vs before and after bone scintigraphy.

일정시간 간격을 두고 유도된다고 보고하였다. Cai 등⁹⁾도 저선량의 X-선 조사 6시간 후에 cycloheximide를 처리한 결과 고선량의 조사에 대한 적응반응이 사라진다고 보고하였다. Shadley 등³⁾은 저선량 조사 후 4~6시간 사이에 DNA 수선기전이 일어나기 때문에 적응반응을 유도하기 위해서는 저선량 조사 후 적어도 4시간이 필요하다고 보고하였고, Iku-shima 등¹⁶⁾도 저선량 조사 후 4시간 전에는 방사선 적응반응이 일어나지 않음을 보고하고 있다. 본 연구자들의 이전 연구¹⁷⁾에서도 저선량 조사 4시간 이후부터 적응반응이 유도되어 7시간째에 가장 유익한 효과를 나타내었다. 저자의 연구에서는 Tc-99m-MDP 주사 후 46시간째에 2 Gy를 조사하였는데, 적응반응이 유도되기에 충분한 시간이 경과하였을 뿐 아니라 적응 반응의 효과가 3회의 세포 주기 동안 지속된다는 이전의 보고¹¹⁾와도 부합된다.

본 연구의 제한점으로는 Tc-99m-MDP 주사에 의해 말초혈액 림프구에 조사된 방사선량을 정확하게 알 수 없다는 점이다. Subramanian 등¹⁸⁾의 연구에 의하면 Tc-99m-MDP 주사 4시간 후에는 주사한 양의 29.7%가 혈액 내에 누적되어 있고 740 MBq을 주사하였을 경우 4시간 후에 혈액 내의 흡수선량은 0.0717 cGy 정도이다. Shadley 등³⁾은 적어도 0.005 Gy이상의 X선이 적응반응을 유도하고 적응반응을 유도하는 저선량 범위는 0.005~0.2 Gy인 것으로 보고하였는데 본 연구에서의 저선량의 범위는 적응반응을 유도하는 최소한의 저선량범위보다 더 낮은 선량임을 알 수 있다. 그러나 본 연구에서 저선량 조사의 방법이 내부조사라는 점에서 적응반응을 유도하는 X선 외부조사의 저선량 범위를 그대로 적용할 수는 없을 것으로 생각된다. Bai 등¹⁹⁾은 ⁶⁰Co 감마선 0.005 Gy를 단일 조사하였을 때에는 적응반응이 유도되지 않았으나, 같은 세포주기에 0.005 Gy를 두 차례 조사하였을 때 적응반응이 유도되어 저선량의 방사선이 여러 차례 축적되면 방사선 적응반응이 유도될 수 있음을 밝혔는데, 내부 조사의 경우에 본 연구에서와 같이 매우 낮은 선량의 방사선의 축적에 의해 적응반응이 유도되는지는 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

저선량의 방사선에 의해 유도되는 적응반응에 관

한 연구는 매우 많이 이루어져 왔으나 핵의학 영상 검사시에 노출되는 저선량의 방사선에 의해 적응반응이 유도되는지의 여부에 대해서는 거의 연구가 이루어지지 않았다. 이번 연구를 통하여 골 스캔그라피를 시행하는 환자들은 방사성 의약품에 의한 방사선 장애의 위험성이 거의 없으며 오히려 방사선 적응반응이 유도됨을 알 수 있었다.

요 약

목적: 핵의학과에서 가장 흔하게 이용되는 골 스캔그라피가 인체에 방사선 장애를 일으키는지 아니면 오히려 적응반응을 통하여 유리한 작용을 하는지 여부를 알기 위하여 이 연구를 시행하였다. **대상 및 방법:** 골 스캔그라피를 시행한 22명의 환자(남자 6명, 여자 16명, 평균 연령 50 ± 14 세)를 대상으로 Tc-99m-methylene diphosphonate (Tc-99m-MDP) 주사 전과 주사 후 4시간에 각각 5 ml씩 채혈하여 배양하고 배양 46시간 후에 Cs-137조사기(central dose rate = 654 Gy/h, Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 이용하여 2 Gy의 감마 방사선을 조사하였다. 대조군 10명의 혈액을 채혈하여 Tc-99m-MDP 주사 전에 채혈한 군과 같은 방법으로 조사하고 배양하였다. Colcemid 처리 2시간 후에 수확하여 세포 600 개당 불안정 염색체인 반지형과 이 중 중심체형 염색체의 숫자를 계수하여 각 군 간의 불안정염색체 계수를 분산 분석으로 비교하였다. **결과:** Tc-99m-MDP를 주사하기 전에 채혈하고 2 Gy를 조사한 군과 대조군에서 2 Gy를 조사한 군의 불안정염색체의 수는 유의한 차이가 없었다(각각 385.1 ± 30.5 , 367.8 ± 36.6 , $p > 0.05$). 하지만 Tc-99m-MDP를 주사한 후에 채혈하고 2 Gy를 조사한 군에서 불안정 염색체의 수가 유의하게 감소하였다(192.6 ± 22.1 , $p = 0.0001$). **결론:** 골 스캔그라피에 의한 저선량의 방사선 조사에 의해서 말초혈액 림프구가 적응반응을 나타내어 다음에 이어지는 방사선 장애에 대해 저항성을 갖는다는 사실을 알 수 있었다.

감사의 글

Tc-99m-MDP의 혈액 내 흡수선량을 계산하여 주신 원자력병원의 김은희 박사님께 감사드리고, 이 실험을 도와준 전남대학교병원 핵의학과 이승연 연구원에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 1984;223: 594-7.
- 2) Wiencke JK, Afzal V, Olivieri G, Wolff S. Evidence of the [³H] thymidine-induced adaptive response of human lymphocytes to subsequent doses of X-rays involves the induction of a chromosomal repair mechanism. *Mutagenesis* 1986;1: 375-80.
- 3) Shadley JD, Afzal V, Wolff S. Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X rays to human lymphocytes. *Radiat Res* 1987;111:511-7.
- 4) Wolff S, Afzal V, Wiencke JK, Olivieri G, Michael A. Human lymphocytes exposed to low doses of ionizing radiations become refractory to high doses of radiation as well as chemical mutagens that induce double-strand breaks in DNA. *Int J Radiat Biol* 1988;3:39-48.
- 5) Shadley JD, Wiencke JK. Induction of the adaptive response by X-ray is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol* 1989;56:107-18.
- 6) Youngblom JH, Wiencke JK, Wolff S. Inhibition of the adaptive response of human lymphocytes to very low doses of ionizing radiation by the protein synthesis inhibitor cycloheximide. *Mutat Res* 1989;227:257-61.
- 7) Khandogina EK, Mutovin GR, Zvereva SV, Antipov AV, Zverev DO, Akifyev AP. Adaptive response in irradiated human lymphocytes: radiobiological and genetical aspects. *Mutat Res* 1991; 251:181-6.
- 8) Wojcik A, Bonk K, Muller WU, Streffer C, Weissenborn U, Obe G. Absence of adaptive response to low doses of X-rays in preimplantation embryos and spleen lymphocytes of an inbred mouse strain as compared to human peripheral lymphocytes: a cytogenetic study. *Int J Radiat Biol* 1992;62:177-86.
- 9) Cai L, Liu SZ. Study on the mechanisms of cytogenetic adaptive response induced by low dose radiation. *Chin Med J* 1992;105:277-83.
- 10) Makedonov GP, Alekhina NI, Tskhovrebova LV, Zasukhina GD. A comparison of the efficacy of the anticlastogenic action of interferon and of the radiation-adaptive response. *Radiobiologiya* 1993; 33:259-64.
- 11) Shadley JD, Wolff S. Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 1987;2:95-6.
- 12) Kim JH, Lee KJ, Cho CK, Yoo SY, Kim TH, Kim SH. Adaptive response induced by low dose ionizing radiation in human lymphocytes. *J Korean Asso Radiat Prot* 1995;20:97-102.
- 13) Cai L, Lui SZ. Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 1990;58:187-94.
- 14) Samson L, Cairns J. A new pathway for DNA repair in Escherichia coli. *Nature* 1977;267:281-3.
- 15) Wilson MA. Musculoskeletal system. In: Wilson MA. *Textbook of Nuclear Medicine*. 1st ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 3-32.
- 16) Ikushima T. Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1987; 189:215-21.
- 17) 민정준, 범희승, 최근희, 이승연, 김지열, 김병근. 인체 말초혈액 림프구와 마우스 골수세포에서 중기염색체 분석법과 미소핵 검사법을 이용한 방사선유도 염색체손상 평가의 비교 연구. *대한핵의학회지* 1997; 31:549(초록).
- 18) Subramanian G, McAfee JG, Blair RJ, Kallfelz FA, Thomas FD. Technetium-99m-methylene diphosphonate-A superior agent for skeletal imaging: comparison with other technetium complexes. *J Nucl Med* 1975;16:744-55.
- 19) Bai Y, Chen D. Accumulation effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes. *Mutat Res* 1993; 302:191-6.