

한우 및 한국재래산양 유래 말초혈액 림프구의 미소핵을 이용한 방사선 피폭의 생물학적 선량측정

류시윤¹ · 김민주 · 김호준 · 조성환 · 김태환* · 정규식** · 김세라*** · 이해준*** · 김성호*** · 안미영****
충남대학교 수의과대학, *한국원자력병원, **경북대학교 수의과대학,
전남대학교 수의과대학, *Texas A&M University 수의과대학

Use of Frequencies of Micronuclei as Biological Dosimetry in Korean Native Cattle and Goat Lymphocytes after Irradiation *in vitro*

Si-yun Ryu¹, Min-Ju Kim, Ho-jun Kim, Tae-hwan Kim*, Kyu-sik Jeong**, Se-ra Kim***, Hae-june Lee****, Sung-ho Kim*** and Mi-Young An****

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, *Korea Cancer Center Hospital,
**College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University,
***College of Veterinary Medicine, Chonnam National University,
****College of Veterinary Medicine, Texas A&M University

Abstract : The frequencies of gamma-ray-induced micronuclei (MN) in cytokinesis-blocked (CB) lymphocytes at several doses were measured in three donors of Korean native cattle and Korean native goat. Measurements performed after irradiation showed a dose-related increases in MN frequency in each of the donors studied. When analysed by linear-quadratic model the line of best fit was : cattle : $y = 0.1016D + 0.0118D^2 + 0.0147$, goat : $y = 0.1353D + 0.0043D^2 + 0.0087$ ($y =$ number of MN/CB cells and $D =$ irradiation dose in Gy). The relative sensitivity of goat lymphocytes compared with cattle lymphocytes was estimated by best fitting linear-quadratic model based on the radiation-induced MN data over the range from 0 Gy to 4 Gy. In the case of MN frequency with 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8, the relative sensitivities of goat lymphocytes were 1.106, 1.166, 1.140, 1.069 and 0.976 respectively. Our *in vitro* radiobiological study confirmed that the cytogenetic response obtained in blood from cattle and goat can be utilized for application in environmental studies.

Key words : gamma-radiation, micronuclei, cattle, goat, lymphocyte.

서 론

방사선 피폭의 선량측정은 직업적, 질병치료시 또는 불의의 사고에 의한 방사선 피폭의 경우 가장 기본적으로 요구되는 사항이다. 대부분의 경우 방사선의 선량측정은 film, quartz fibril electrometer, glass rod dosimeter 등의 개인용 계측기를 사용한 물리적 측정이 주로 이루어진다. 그러나 이와 같은 측정방법은 계측기 자체에 대한 방사선 조사량의 측정일 뿐 작업종사자 또는 피폭자가 받은 방사선량의 표시는 아니며 특히, 선량측정에 많은 한계가 있다. 따라서 이와 같은 단점을 극복할 수 있는 방법은 피폭된 개체 자체에 대한 생물학적 선량측정이며, 피폭시 물리적 계측기가 없는 경우, 또는 부분피폭의 상태에서는 생물학적 선량측정의 중요성은 한층 더 강조된다^{18,27}.

방사선 피폭의 생물학적 선량측정은 각종 단백질 및 핵산

의 변화를 중심으로 한 효소변화측정 즉, 생화학적 방법^{12,30}과 미성숙염색체응축(premature chromosome condensation) 검사법을 비롯한 세포유전학적 방법²¹, 조혈세포⁵, 정자산생²⁰, 체모의 변화²²를 이용한 세포조직학적 방법, 기타 면역학적 변화 등을 관찰하는 방법들이 제시되고 있다. 생물학적 선량 측정의 조건으로, 피폭량에 따른 반응의 일치(dose-dependence)와 전리 방사선에 대해 특징적인 반응을 보여 선량측정이 용이해야 하며 피폭 후 빠른 결과의 산출, 부분피폭의 검출과 피폭 후 피폭선량의 지속성, 만성피폭과 분할피폭의 적용성 및 다양한 선질에 대하여 모두 측정 가능하여야 한다. 그러나 현재 위의 조건을 모두 만족시킬 수 있는 지표는 없으나 개인용 계측기를 이용한 물리적 측정방법의 문제점을 보완하기 위하여 생물학적 선량 측정법이 중요시되고 있다¹⁹.

현 시점에서 가장 많이 적용되는 생물학적 선량측정은 혈액 내 림프구의 수적 변동이며⁵ 이외 dicentric과 centric ring의 계측을 중심으로 한 염색체 분석법이 몇몇 방사선 사고시 적용 측정되었다^{3,8,10,11,23}. 그러나 혈액세포의 수적 변화는 원줄기세포(stem cell) 및 세포성숙계로부터 어느 정도 이용 가능한지의 정도, 시간경과 후의 세포사멸에 의한 수적 소실

¹Corresponding author.
E-mail : syryu@cuvic.cnu.ac.kr

본 연구는 2002년 과학기술부 원자력연구개발사업의 지원으로 수행되었다.

의 비율, 비장과 같은 혈액보유장기 상태 등의 변화에 따른 혈구수치의 차이로 인한 해석상의 문제점이 있고⁵ 염색체분석법은 재료의 제작 및 분석에 많은 시간과 노력 있어야 하고, 또한 상당한 수준의 숙련된 기술이 있어야 할 수 있다는 단점이 있다^{11,19}.

골수세포를 이용하는 전통적인 미소핵 검사에 비하여 세포질분열 차단 림프구를 이용한 미소핵 검사는 일회 분열의 확인 및 미분열세포의 배제가 가능하기 때문에 현재 방사선 생물학분야에서 선량측정 및 반응조절물질의 효과 검정 시험에 많이 적용되고 있다^{1,4,9,13,19,24,28}. 지금까지 많은 연구자들이 사람유래 림프구를 사용하였는데 그 이유는 세포질분열 차단세포(cytokinesis-blocked cell, CB세포)의 유도가 용이하기 때문이다²⁴. 그러나 이와 같은 연구의 결과는 시험관내 시험을 통해서만 이루어져 있고 아직 피폭사고 발생에 따른 미소핵검사의 결과는 보고된 바 없다. 따라서 염색체 분석법을 적용한 실험들과 같이, 생체시험을 위한 방법의 모색 및 동물별 감수성의 차이 등이 미소핵 검사에서도 연구되어야 할 분야라고 생각된다. 사람과 비슷한 환경에 접해있고 주위에서 흔히 볼 수 있는 소를 대상으로 한 미소핵 분석에 대한 사항은 자연발생에 대한 보고²⁵가 소수 있을 뿐 방사선 조사

의 경우는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 국내 환경오염과 오염물질에 의한 세포유전학적 검사에 사용될 수 있으며 염색체의 수, 핵의 상대용적(relative nuclear volume), DNA의 상대용량(relative DNA content)이 유사한¹⁶ 소 및 산양 유래의 림프구를 대상으로 CB세포의 형성 빈도 및 방사선 조사 후 발생하는 미소핵의 상황을 분석해서 상호 반응의 차이 및 감수성 등을 조사하여, 방사선 피폭의 생물학적 선량측정 연구 및 환경오염 측정의 연구에 이용 가능성 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

실험세포 및 배양

건강한 3두의 한우 및 한국재래산양의 말초혈액에서 Histopaque-1077 kit(Sigma)를 이용하여 림프구를 분리하여 HBSS(Sigma)에 수세한 후 15% heat inactivated fetal bovine serum(Hyclone), L-glutamine(Sigma), 2-mercaptoethanol(Sigma)과 항생제가 첨가된 RPMI1640(Gibco BRL) 배지에 부유시켰다. 림프구는 multi-well tissue culture plate(Falcon, Becton Dickinson)를 사용하여 배지 ml당 5×10^5 개의 농도로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지 ml당 1% 및 2%의 phytohaemagglutinin (PHA, Sigma)을 첨가하고 2, 4, 6 또는 12 µg의 Cytochalasin B(Cyt-B, Aldrich Chemical Co.)를 첨가한 후 이핵세포를 얻기 위한 최적농도를 파악하였다.

방사선조사

분리된 림프구는 멸균된 polystyrene tube(Falcon, Becton Dickinson)에 분주하여 PHA첨가 직전에 1, 2, 4 Gy의 ⁶⁰Co 감마선을 1000 cGy/min의 선량율로 1회 조사(Gammacell

3000 Elan, Nordion International Co., Canada)하였다.

Cytokinesis-blocked method

Cyt-B는 dimethylsulphoxide(Sigma)에 ml당 2 mg의 양으로 원액을 만들어 -70°C에 보관하였으며 실험을 통하여 얻어진 최적용량을 적용하여 배양 44시간에 첨가하였다. 배양 개시 후 72시간에 세포를 수확하였으며 cytocentrifuge를 이용하여 검경용 표본을 만들고 건조 후 Diff Quik kit(International Reagents Corp.)를 이용하여 염색하였다.

미소핵의 검경

미소핵은 유침하에서 1000배 배율의 현미경으로 관찰하였으며 주핵에서 분리된 구형으로 지름이 주핵의 50% 이하이며 이핵세포의 세포질내에 존재하여야 하고 빛의 반사와 같은 형상이 없고 염색성이 주핵에 비하여 진하지 않은 것을 미소핵으로 판정하였다¹. 모든 성적의 분석은 Graph PAD In Plot program을 사용하였다.

결 과

CB 림프구, 즉 2개의 핵을 가진 림프구의 유도정도는 동물에 따라 차이가 있었으며 PHA는 2% 투여군에서 높게 유도되었고, Cyt-B의 첨가량이 증가할수록 전체림프구에 대한 CB 림프구의 유도율은 증가하였으나 4핵세포의 유도율과 Cyt-B 자체의 세포독성을 고려하여 최적농도는 4 µg/ml로 통일하였다. 위의 조건에서 배양된 림프구에서 동물별 CB 림프구는 소에서 약 16%, 산양은 12%였다.

미소핵의 발생 양상은 Fig 1 및 Table 1-3과 같으며 방사선 조사에 따라 linear-quadratic model을 적용하여 얻은 곡선식은

$$\text{소 림프구} : y = 0.1016D + 0.0118D^2 + 0.0147$$

$$\text{산양 림프구} : y = 0.1353D + 0.0043D^2 + 0.0087$$

(y = CB 세포당 MN의 수, D = 방사선 조사량 Gy)였다. 소에 대한 염소의 상대감수성을 구하기 위하여 $y = aD +$

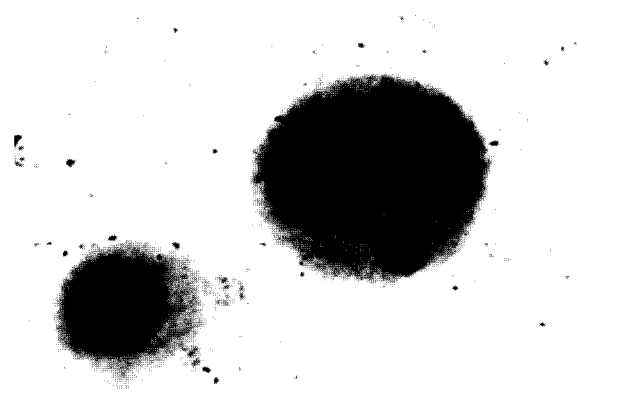


Fig 1. Photomicrograph of cytokinesis-blocked lymphocyte containing a micronucleus (arrow). Diff Quik stain, $\times 1000$.

Table 1. Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocytes following irradiation of cattle

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	493	7				7
100 cGy	451	43	6			55
200 cGy	392	80	24	4		140
400 cGy	279	173	36	11	1	282
donor 2						
0 cGy	492	8				8
100 cGy	452	44	4			52
200 cGy	401	75	19	5		128
400 cGy	282	167	47	12	2	305
donor 3						
0 cGy	493	7				7
100 cGy	441	53	6			65
200 cGy	384	89	25	2	145	
400 cGy	252	189	41	17	1326	

Table 2. Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocytes following irradiation of goat

Experimental group	No. of cells without MN	Number of micronuclei per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	496	4				4
100 cGy	437	52	11			74
200 cGy	375	100	21	4		154
400 cGy	274	151	59	15	1	318
donor 2						
0 cGy	495	5				5
100 cGy	432	61	7			75
200 cGy	380	92	26	2		150
400 cGy	281	143	61	15	310	
donor 3						
0 cGy	496	4				4
100 cGy	439	50	11			72
200 cGy	389	85	20	6		143
400 cGy	281	155	50	10	4	301

$bD^2 + C$ 를 $D = [-a \pm \sqrt{(a^2 - 4b(C-y))}] \div 2b$ 로 전환하여 위의 식을 근거로 세포당 미소핵의 수를 측정하였고 세포당 0.05개, 0.1개, 0.2개, 0.4개 및 0.8개의 미소핵이 발생하는 방사

선량의 상대비를 기준으로 산출하면 소 림프구에 비하여 산양은 각각 1.106, 1.166, 1.140, 1.069 및 0.976배의 방사선 감수성을 나타내었다(Table 4).

Table 3. Frequency of micronuclei in cytokinesis-blocked (CB) cells following treatment with gamma-rays

Dose (cGy)	micronuclei per CB cell (M ± SD)
Cattle	
0	0.015 ± 0.001
100	0.115 ± 0.014
200	0.275 ± 0.017
400	0.609 ± 0.044
Goat	
0	0.009 ± 0.001
100	0.147 ± 0.003
200	0.298 ± 0.011
400	0.619 ± 0.017

고 찰

생체에서 시행할 수 있는 생물학적 선량측정의 방법으로 는 분자수준, 세포 유전학적 수준 그리고 세포수준의 변화 등 3가지로 크게 나눌 수 있다. 그러나 분자수준에서의 변화 는 계측기 설비에 대한 비용문제 등과 함께 보편적으로 이 용하기 위해선 더 많은 연구가 필요한 실정이다. 세포 유전 학적 수준에서의 선량측정은 염색체 분석법^{15,22,26,31}, 미소핵 분석법^{1,13}, 털을 이용하는 방법^{7,14} 등이 있는데 염색체분석법 은 고선량 조사로 임계량을 초과하는 경우 측정이 불가능해 지고 노출 후 시간 경과에 따른 급격한 측정량의 변화 및 사람의 경우 털의 변화를 지표로 적용을 할 수 없는 등의 단점이 있다. 또한 조혈이나 정자발생을 이용한 세포수준에 서 변화는 방사선에 민감도가 낮다⁹.

방사선 피폭에 대한 생물학적 선량측정 방법으로 세포유 전학적 분석법인 미소핵검사시 림프구를 주로 사용하는데, 이는 비교적 수명이 길고, 정상상태에서는 분열하지 않으며 표본의 채취가 용이하기 때문이다^{3,8,11,23}. 또한 기존의 염색체 분석법에 비하여 미소핵검사는 염색체 검사에 관한 특별한 숙련이나 기술 없이도 분석이 비교적 쉬우며 단기간에 수행 될 수 있다. 특히 CB 림프구의 사용에 따라 방사선생물학 분야의 연구가 더욱 용이하게 되었다^{1,9,13,24,28}.

미소핵은 전리방사선의 직접효과 또는 free radical에 의한

염색체의 centromere의 부재(acentric fragment), 두개 이상 의 centromere 존재, kinetochore의 결손 또는 방추사의 손 상 등에 의해 세포분열 시 주핵(main nucleus)에 포함되지 못해 형성되는 것으로 알려져 있다^{4,17,24,29}. 본 연구의 결과를 기존의 염색체이상에 관한 보고¹⁶와 비교하면 미소핵유도를 통한 방사선에 대한 감수성은 차이가 있다. 소의 경우 염색 체이상분석에서는 2 Gy의 방사선조사 용량에서 100개의 세 포당 dicentric chromosome이 약 16개, 산양은 26.5개로 보 고되었으나 본 연구에서 미소핵의 발생은 소에서 약 27.5개, 산양에서 29.8개의 발생률을 나타냈다. 이는 미소핵의 형성 이 dicentric chromosome외에 acentric fragment와 같은 다 른 형태의 염색체 이상이 관계되기 때문으로 사료된다. 자연 발생 미소핵에 대해 본 연구에서는 100개의 이핵림프구 당 1.47개로 Scarfi 등²⁵이 Italian Friesian breed에서 관찰한 2.46개 보다는 적었지만, Flores 등⁶이 보고한 1.35개와 유사 하였다. 이와같은 차이는 동물계통 및 환경의 차이 그리고 사용된 Cyt-B 양의 차이 때문인 것 등으로 생각된다.

본 연구에서는 소 및 산양의 림프구를 이용하여 방사선에 의해 유도된 미소핵의 발생정도를 파악하였다. 본 연구의 결 과로 미루어 볼 때 한우 및 재래산양은 방사선 피폭의 정도 를 파악하고자 하는 일련의 생물학적 선량 측정 연구에 이 용할 수 있을 것으로 생각되며, 또한 방사선을 포함한 다양 한 환경오염물질에 의한 세포유전학적 손상정도를 측정하기 위해서도 이용 가능할 것으로 생각된다.

결 론

한우 및 한국재래산양 유래의 림프구에서 CB세포의 형성 빈도 및 방사선 조사 후 발생하는 미소핵의 상황을 분석하 여 상호 반응의 차이 및 감수성 등을 조사하고 방사선 피폭 의 생물학적 선량측정 연구에 적용 가능한 실험동물의 선택 가능성 등을 파악하고자 하였다. 2%의 PHA와 배지 ml당 4 µg의 Cyt-B를 적용한 배양조건에서 동물별 CB 림프구는 소 에서 약 16%, 산양에서는 12% 였다. 방사선조사에 따라 유 도되는 미소핵을 linear-quadratic model에 적용하여 얻은 곡 선식은 소 림프구 : $y = 0.1016D + 0.0118D^2 + 0.0147$, 산양 림프구 : $y = 0.1353D + 0.0043D^2 + 0.0087$ ($y = \text{CB 세포당 MN의 수, } D = \text{방사선 조사량 Gy}$)였다. 세포당 0.05개, 0.1 개, 0.2개, 0.4개 및 0.8개의 미소핵이 발생하는 방사선량의

Table 4. Relative sensitivity of micronuclei (MN) induction of lymphocyte from goat to cattle lymphocyte following treatment with gamma-rays

MN per cell	Cattle dose (Dc)required(cGy)*	Goat dose (Dg) required(cGy)*	Relative sensitivity (Dc/Dg)
0.05	33.46	30.25	1.106
0.1	77.05	66.10	1.166
0.2	154.56	135.54	1.140
0.4	284.79	266.53	1.069
0.8	491.61	503.79	0.976

*Calculated from fitting linear-quadratic model.

상대비를 기준으로 산출하면 소 림프구에 비하여 산양은 각각 1.106, 1.166, 1.140, 1.069 및 0.976배의 방사선 감수성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Almasy Z, Krepinsky AB, Bianci A, et al. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. *Appl Radiat Isot* 1987; 38: 241-249.
- Bonassi S, Fenech M, Lando C, et al. Human micronucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37: 31-45.
- Brewen JG, Preston RJ, Littlefield LG. Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to ^{60}Co gamma-rays. *Radiat Res* 1972; 49: 647-656.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455: 81-95.
- Fieldner TM, Nothdurft W, Steinbach KH. Blood cell changes after radiation exposure as an indicator for hemopoietic stem cell function. *Bone Marrow Trans* 1988; 3: 77-84.
- Flores MJ, Pinero J, Ortiz T, et al. Both bovine and rabbit lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide show an adaptive response to radiation damage. *Mutat Res* 1996; 372: 9-15.
- Geng L, Potten CS. Changes after irradiation in the number of mitotic cells and apoptotic fragments in growing mouse hair follicles and in the width of their hairs. *Radiat Res* 1990; 123: 75-81.
- Guskova AK, Barabanova AV, Baranov AY, et al. Acute radiation effects in victims of the Chernobyl nuclear power plant accident. *UNSCEAR Report* 1988; 613-631.
- He JL, Jin HY, Jin LF, et al. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. *Biomed Environ Sci* 2000; 13: 32-36.
- IAEA. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Vienna:IAEA-SM-199/4, 1969.
- IAEA, Biological dosimetry : chromosomal aberration analysis for dose assessment, Technical report 260. IAEA publications, Vienna: 1986.
- Kim SH, Cho CK, Kim TH, et al. Relationships between radiation-induced prostaglandin E2 and natural killer cell activity in mice. *Korean J Vet Res* 1987; 27: 185-189.
- Kim SH, Cho CK, Kim TH, et al. Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-neutron irradiations. *Anticancer Res* 1993; 13: 1587-1592.
- Kim TH, Kim SH, Kim JH, et al. Measurement of apoptotic fragments in growing hair follicles following r-ray irradiation in mice. *Anticancer Res* 1996; 16: 189-192.
- Klingermem AD, Halperin EC, Erexson GL, et al. The persistence of lymphocytes with dicentric chromosomes following whole-body X irradiation of mice. *Radiat Res* 1990; 124: 22-27.
- Leonard A. Cytogenetic effects of ionizing radiations in somatic cells from experimental mammals and extrapolation to man, In Ishihara T, Sasaki M, ed, *Radiation-induced chromosome damage in man*, Alan R Liss Inc, New York: 561-583, 1983.
- Littlefield LG, Joiner EE, Colyer SP, et al. Modulation of radiation-induced chromosome aberrations by DMSO, an OH radical scavenger, 1. Dose-response studies in human lymphocytes exposed to 220 kV X-rays. *Int J Radiat Biol* 1988; 53: 875-890.
- Lloyd DC. An overview of radiation dosimetry by conventional cytogenetic method, In Eisert WG, Mendelsohn ML, ed *Biological Dosimetry*, Sprinr-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: 3-13, 1984.
- M ller W-U, Streffer C. Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol* 1991; 59: 863-873.
- Neel JV, Schull WJ, Awa AA, et al. The genetic effects of the atomic bombs: problems in extrapolating from somatic cell findings to risk for children. In Baverstock KF, Stather JW, ed *Low dose radiation : Biological bases of risk assessment*, Taylor & Francis, London: 42-53, 1989.
- Pantelias GE, Maillie HD. The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat Res* 1984; 99: 140-150.
- Potten CS, Geng L, Taylor P. Hair medullary cell counts : a simple and sensitive indicator of radiation exposure. *Int J radiat Biol* 1990; 57: 13-21.
- Ramalho AJ, Nascimento ACH, Natarajan AT. Dose assesments by cytogenetic analysis in the Goiania(Brasil) radiation accident. *Radiat Protect Dosimetry* 1988; 25: 97-100.
- Ramalho A, Sunjevaric I, Natarajan AT. Use of frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes: comparison of two methods. *Mutat Res* 1988; 207: 141-146.
- Scarf MR, Lioi MB, Di Berardino D, et al. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in bovine lymphocytes. *Mutat Res* 1993; 289: 291-295.
- Scott D, Lyons CY. Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage. *Nature* 1979; 278: 756-758.
- Stenphan G, Hadnagy W, Hammermaier C, et al. Biologically and physiologically recorded doses after an accidental exposure to ^{60}Co gamma-rays. *Health Phys* 1983; 44: 409-411.
- Thierens H, Vral A, Morthier R, et al. Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis* 2000; 15: 245-249.
- Thomson EJ, Perry PE. The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploid. *Mutagenesis* 1988; 3: 415-418.
- UNSCEAR, Report : Sources and effects of ionizing radiation, Annex G, Early effects in man of high doses of radiation, chapter III : prognostic indicators and biological dosimetry (United Nations, New York), 583-612, 1988.
- 김성호, 김태환, 정인용, 등. KCCH cyclotron neutron 및 ^{60}Co γ -ray에 의한 인체 말초혈액 임파구의 염색체 이상 측정. *방사선방어학회지* 1992; 17: 21-30.