

Adaptive Response Induced by Low Dose Ionizing Radiation in Human Lymphocytes

Jeong-Hee Kim, Kyung-Jong Lee, Chul-Koo Cho, Seong-Yul Yoo,
 and Tae-Hwan Kim, Sung-Ho Kim

Korea Atomic Energy Research Institute

Laboratory of Radiation Effect, Korea Cancer Center Hospital.

(Received 20 July 1995; Accepted 30 August 1995)

인체 말초 혈액 림프구에서 저선량 방사선 조사에 의해 유도되는 적응 반응

김정희 · 이경종 · 조철구 · 류성렬 · 김태환 · 김성호
 한국원자력연구소 부설 원자력병원 방사선영향연구실

Abstract - Adaptive response induced by low dose γ -ray irradiation in human peripheral lymphocytes was examined. Human lymphocytes were exposed to low dose of γ -ray (priming dose, 0.01 Gy) followed by high dose (challenging dose, 1.5 Gy) after various time intervals (4, 7, 20 hours). Frequencies of micronuclei were enumerated in both primed and unprimed groups. Maximum reduction in frequency of micronuclei was observed when challenging dose irradiation was followed by priming dose after 4 hr incubation period. When challenging doses were irradiated 7 or 20 hr after priming dose, frequencies of micronuclei were reduced slightly. However, these reduction were not statistically significant. In this study, human peripheral lymphocytes were irradiated at G_0 phase and they showed adaptive response induced by low dose radiation.

Since micronucleus assay is relatively simpler and faster than other methods, it may be a good tool for evaluating radiation-induced adaptive responses.

Key words: Radiation-induced adaptive response, Micronucleus assay, Human lymphocyte, Gamma-ray.

요약 - 인체 말초 혈액 림프구에서 저선량의 감마선에 의해 유도되는 적응 반응을 관찰하였다. 인체 림프구를 저선량의 감마선(priming dose 0.01 Gy)을 조사한 후 여러 시간 간격 후 고선량(challenging dose, 1.5 Gy)을 조사하였다. 저선량을 미리 조사한 림프구와 조사하지 않은 림프구에서 발생된 미세핵의 빈도를 계수하였다. 미세핵 발생 빈도는 저선량 조사 4시간 후 고선량을 조사하였을 때 최대 감소치를 보였다. 저선량과 고선량 조사 시간차가 7시간 또는 20 시간이었을 때 미세핵 발생 빈도는 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. 본 연구에서는 G_0 상태의 세포주기에서 저선량을 조사하였을 경우 적응 반응이 나타나는 것이 관찰되었다. 미세핵 분석법은 실험 방법이 비교적 간단하고, 기타 염색체 분석법에 비하여 빠른 시간내 결과를 도출할 수 있어 추후 방사선에 대한 적응 반응의 연구에 유용한 지표가 될 수 있을 것이다.

중심어 : 방사선 적응 반응, 미세핵 분석법, 인체 림프구, 감마선.

Table 1. Adaptive responses induced by 0.01 Gy priming dose of gamma - ray to the subsequent challenging dose of 1.5 Gy gamma - ray in G₀ phase human lymphocytes.

Donor	Treatment (Gy)	Micronuclei in 1,000 cells	Micronucleus distribution				Expected
			1	2	3	4	
A	0	16	14	1			
	0.01	26	22	2			
	1.5	131	84	12	5	2	
	0.01 + 1.5 (4 hr)	102*	70	13	2		141
	0.01 + 1.5 (7 hr)	120	82	16	2		141
	0.01 + 1.5 (20 hr)	114	77	14	3		141
B	0	10	10				
	0.01	12	12				
	1.5	125	68	21	5		
	0.01 + 1.5 (4 hr)	78*	56	8	2		127
	0.01 + 1.5 (7 hr)	107	70	12	3	1	127
	0.01 + 1.5 (20 hr)	96*	63	12	3		127
C	0	21	15	3			
	0.01	39	28	4	1		
	1.5	160	126	14	2		
	0.01 + 1.5 (4 hr)	121*	94	12	1		178
	0.01 + 1.5 (7 hr)	162	136	7	4		178
	0.01 + 1.5 (20 hr)	161	128	12	3		178

*Significantly lower than the 1.5 Gy treatment alone; $P < 0.05$; X^2 test.

미세핵 분석

Cytochalasin B (Cyt-B, Aldrich chemical Co.) 는 dimethylsulfoxide에 2 mg/ml의 농도로 희석하여 stock 용액으로 -70°C에 보관하였다. PHA-P를 첨가한 후 배양 44시간에 Cyt-B를 3.0 µg/ml의 농도로 배지내 첨가하고 배양 72시간에 세포를 수확한후 고정액 (methanol : glacial acetic acid = 3:1)으로 처리하여 도말표본을 제작하였다. 고정된 세포를 10% Giemsa staining solution 으로 10분간 염색한 후 각 실험군당 1,000개의 binucleated cell에서 미세핵을 계수하였으며 미세핵의 구조 및 크기 등의 판정 기준은 Almasy 등 [19]의 방법을 적용하였다. 방사선 조사 및 실험 진행은 그림 1과 같다.

결 과

방사선 조사후 인체 림프구에서 미세핵의 발생 빈도는 표 1과 같다. A 공여자에서는 1,000개의 binucleated cells 중 1.5 Gy 단독 조사군에서는 131개의 미세핵이 관찰되었고 0.01 Gy 조사군은 26개의 미세핵이 나타나, A 공여자에서 저선량 및 고선량, 2회의 방사선 조사에 의한 미세핵 발생 빈도 예상치는 각각의 발생 빈도에서 정상 대조군의 빈도, 즉 16개를 제외한 141개였다. 이에 비하여 0.01 Gy 조사 후 4시간에 1.5 Gy 를 조사한 군에서는 예상치에 비하여 29.8% ($p < 0.01$, X^2 test), 1.5Gy 단독조사군에 비하여 24.4% ($p < 0.05$, X^2 test), 발생 빈도의 감소를 나타내어 유의성 있는 적응 반응을 관찰할 수 있었다. 0.01 Gy 조사 후 7 또는 20시간에 1.5 Gy 를 조사한 군에서도 미세핵 발생 빈도는 감소하였으나 유의성은 없었다. B 및 C 공여자에서도 비슷한 결과가 관찰되었다. 각각의 공여

자에서 수행된 3회원 실험을 평균하면 고선량 단독 조사군에서 139개의 미세핵이 관찰된 반면 저선량 조사 후 4, 7, 20시간에 고선량조사시 각각 99, 130, 124개의 미세핵이 관찰되었다. 이는 예상치에 비하여 33.6% ($p < 0.01$, X^2 test), 12.8%, 16.8%의 감소를 보인 것이고, 1.5 Gy 단독조사군에 비하여 1% ($p < 0.01$, X^2 test), 6.5%, 10.8%의 감소 효과를 나타냈다(그림2).

방사선 조사의 간격은 저선량의 방사선을 고선량 방사선 조사 4시간전에 조사 하였을때 가장 현저한 적응 반응을 나타내었다. 본 연구에서는 저선량 및 고선량 2회의 방사선을 모두 G_0 세포 상태에 조사하여 저선량 방사선 조사에 의해 유도된 세포의 적응 반응을 확인하였다.

고 찰

본 연구에는 G_0 상태의 인체 말초 혈액 림프구에 저선량 (0.01 Gy)과 고선량 (1.5 Gy)의 방사선을 일정 시간 간격으로 각각 조사한 후 미세핵 발생 빈도를 지표로 하여 림프구의 방사선에 대한 적응 반응의 발현 정도를 관찰 하였다.

Olivieri 등 [5]에 의해 방사선에 대한 세포의 적응 반응이 최초로 보고된 후 식물세포 [20], 몇가지 세포주 [6], 마우스, 토끼 [10] 및 사람의 림프구 [8-13]에서, 생체의 생존율 [15] 등을 이용하여 유사한 연구가 수행되었다. 그러나 림프구를 이용

한 대부분의 실험이 염색체 이상 중 chromatid break의 정도를 지표로 연구를 수행하였다. 방사선에 의한 chromatid break의 확인은 G_0 상태에서 저선량과 고선량을 잇달아 조사하여 방사선에 의한 적응 반응 유도를 관찰하는 것은 불가능한 실험 수행의 한계가 있으며 연구자에 따라 G_0 상태에 1차 조사를 하고 세포분열 유도물질을 첨가한 후 2차 방사선을 조사하여 그 결과를 G_0 상태에서의 세포 반응으로 보고하고 있다. Shadley 등 [9]은 G_0 상태의 1차 조사는 적응 반응이 유도되지 않았다고 하였고, Cai와 Liu [10]는 G_1 , S, G_2 상태의 세포에서와 같이 G_0 세포에서도 적응 반응이 관찰되었다는 상반된 결과를 보고하였다. 그러나 방사선 피폭에 의한 생체내 반응의 관점에서, 림프구는 생체 내에서 G_0 상태이며 따라서 G_0 상태에서의 저선량 및 고선량 방사선 조사를 공히 실시하고 그 반응의 정도를 관찰 할 수 있는 실험 방법이 가장 이상적이라 할것이다.

본 연구에서 최근 DNA 손상의 지표로 사용되는 미세핵 분석법 [16, 17]을 적용한 결과 G_0 상태의 세포에 저선량 및 고선량의 방사선을 모두 조사한 경우에 적응 반응이 확인되었으며 따라서 이는 생체 내에서의 적응 반응 가능성이 간접적으로 확인된 것이라 사료된다.

방사선에 대한 세포의 적응 반응의 지속 시간은 저선량 방사선 조사와 고선량 방사선 조사 사이의 간격이 4시간일 때가 가장 현저하였으며 이는 기타 연구자들의 최소 반응 유도 간격에 해당된다. 방사선 조사를 7시간 이상의 간격을 둔 실험군에서 방사선 조사시간 간격이 4시간인 실험군에 비하여 반응정도가 낮게 관찰된 것은 20시간의 간격에서도 계속 반응을 나타낸, 기타 연구자의 결과 [9-11]와 비교 할 때 반응 확인 지표의 차이에 따른 결과 또는 방사선 조사 시 세포주기의 차이에 의한 것으로 사료되나 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다. 3명의 공여자의 미세핵 발생 빈도 차이는 개체간의 감수성 차이와 연속 실험에 의한 배양 조건 등의 차이에 기인 한 것으로 사료된다.

미세핵 분석법은 염색체 분석법과 비교하여 방법이 비교적 간단하며 빠른 시간내 결과를 관찰할 수 있는 경제적 방법이다 [18]. G_0 상태의 세포에 방사선을 조사하고 변화를 관찰할 수 있는 지표의 발생빈도를 비교하여도 염색체 분석법의 dicentric과 centric ring 비하여 acentric fragment에서 유래 [18] 한것으로 알려진 미세핵의 발생 빈도가 높아 [20, 21] 실험 수행상 정확한 성적을 도출할 수 있

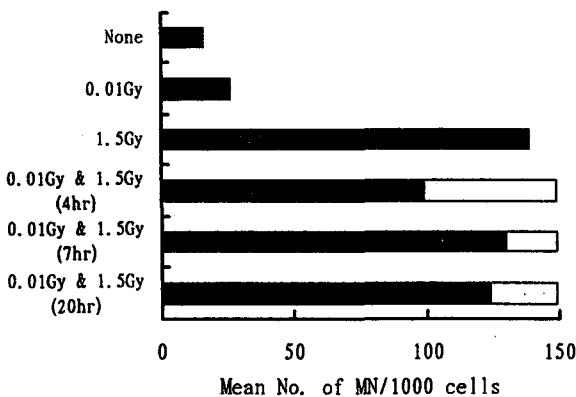


Fig. 2. Effect of low dose irradiation on the induction of micronuclei (MN) in human lymphocytes. Filled boxes show frequencies of micronuclei in 1,000 cytokinesis blocked cells and empty boxes show the expected yields.

다. 그러므로, 본 연구의 방법을 적용하여 추후 조사선량을, 선질, 적응 반응 수식인자등에 대한 연구가 계속 수행될 수 있을 것이다.

결 론

G₀ 상태의 인체 말초 혈액 림프구에 저선량 1차, 0.01 Gy 와 고선량 2차 1.5 Gy 의 방사선을 일정 시간 간격으로 조사한 후 미세핵 발생 빈도를 지표로 하여 림프구의 방사선에 대한 적응 반응의 발현 정도를 관찰하였다. 저선량 및 고선량 방사선 조사를 공히 G₀ 상태의 세포에 조사하여 적응 반응을 확인할 수 있었으며 이는 생체 내의 림프구가 G₀ 상태라는 관점에서 생체 내에서 림프구의 방사선에 대한 적응 반응을 간접적으로 확인하였다고 할 것이며 4 시간의 방사선 조사 간격에서 가장 높은 반응을 나타냈다. 생체내 실험, 적응 반응의 지속 정도, 선량을, 선질 및 적응 반응 수식 인자 등에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 말

이 논문은 과학기술처 “국가 원자력 연구개발 사업”의 연구비 지원에 의하여 수행 되었습니다.

참고문헌

1. B. S. Strauss, "Molecular biology of the response of cells to radiation and to radiomimetic chemicals." *Cancer* 40, 471-480 (1979).
2. L. Samson and J. Cairns, "A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*." *Nature* 267, 281-283 (1977).
3. L. Samson and J. L. Schwarcz, "Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines." *Nature* 287, 861-863 (1980).
4. B. Kaina, "Enhanced survival and reduced mutation and aberration frequencies induced in V79 Chinese hamster cells pre-exposed to low levels of methylating agents." *Mutat. Res.* 93, 195-211 (1982).
5. G. Olivieri, J. Bodycote and S. Wolff, "Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine." *Science* 223, 125-138 (1982).
6. T. Ikushima, "Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells." *Mutat. Res.* 180, 215-221 (1987).
7. S. Wolff, V. Afzal, J. K. Wiencke, G. Olivieri and A. Michael, "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. Rad. Biol.* 3, 39-48 (1988).
8. J. D. Shadley and S. Wolff, "Very low doses of X-rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation." *Mutagenesis* 2, 95-96 (1987).
9. J. D. Shadley, V. Afzal and S. Wolff, "Characterization of the adaptive response to ionizing radiation induced by low doses of X-rays to human lymphocytes." *Radiat. Res.* 111, 511-517 (1987).
10. L. Cai and S.-Z. Liu, "Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells *in vivo* and *in vitro* by low-dose X-irradiation." *Int. J. Rad. Biol.* 58, 187-194 (1990).
11. J. D. Shadley and J. K. Wiencke, "Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity." *Int. J. Rad. Biol.* 56, 107-118 (1989).
12. A. Bosi and G. Olivieri, "Variability of the adaptive response to ionizing radiations in humans." *Mutat. Res.* 211, 13-17 (1989).
13. K. Sankaranarayanan, A. V. Duyn, M. J. Loos A. T. Natarajan, "Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-ray". *Mutat. Res.* 211, 7-12 (1989).
14. N. Yoshida, H. Imada, N. Kunukita and T. Norimura, "Low dose radiation-induced adaptive survival response in mouse spleen T- lymphocytes *in vivo*." *Radiat. Res.* 34, 269-276 (1993).
15. M. Yonezawa, A. Takeda and J. Misonoh, "Acquired radioresistance after low dose X-irradiation in mice." *J. Radiat. Res.* 31,

- 256-262 (1990).
16. M. F. Fenech and A. A. Morley, "Measurement of micronuclei in lymphocytes." *Mutat. Res.* 147, 29-36 (1985).
 17. M. F. Fenech, V. Dunaiski, Y. Osborne and A. A. Morley, "The cytokinesis-block micronucleus assay as a biological dosimeter in spleen and peripheral blood lymphocytes of the mouse following acute whole-body irradiation." *Mutat. Res.* 262, 119-126 (1991).
 18. W. U. Muller and C. Streffer, "Biological indicators for radiation damage." *Int. J. Radiat. Biol.* 59, 863-873 (1991).
 19. Z. Almassy, A. B. Kropinsky, A. Bianci and G. J. Kotles. "The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review." *Appl. Radiat. Isot.* 38, 241-249 (1987).
 20. S. H. Kim, T. H. Kim, I. Y. Chung, C. K. Cho, K. H. Koh, S. Y. Yoo, "Radiation-induced chromosome aberration in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*: RBE study with neutrons and ^{60}Co γ -rays." *J. Kor. Assoc. Radiat. Protect.* 17, 21-30 (1992).
 21. S. H. Kim, C. K. Cho, T. H. Kim, S. Y. Yoo, K. H. Koh and H. G. Yun. "Frequency of micronuclei in lymphocytes following gamma and fast-neutron irradiations." *Anticancer Res.* 13, 1587-1592 (1993).