J.Korean Asso. Radiat. Prot.
Vol.25 No.4 : 223-232(2000)

▣ 論 文 ▣

Assessment of DNA damage and Chromosome aberration in human lymphocyte exposed to low dose radiation detected by FISH(fluorescence *in situ* hybridization) and SCGE(single cell gel electrophoresis)

Hai Won Chung[1)], Su Young Kim, Byung Mo Kim, Sun Jin Kim, Tae Hwan Kim*, Chul Koo Cho* and Sung Whan Ha**
School of Public Health, Seoul National University
*Korea Cancer Center Hospital**
*College of Medicine, Seoul National University***

FISH기법 및 단세포전기영동기법을 이용한 저선량 방사선에 의한 DNA 상해 및 염색체이상 평가

정해원 · 김수영 · 김병모 · 김선진 · 김태환* · 조철구* · 하성환**
서울대학교 보건대학원, 원자력 병원*, 서울대학교 의과대학**

(2000년 9월28일 접수, 2000년 11월27일 채택)

Abstract - Comparative study was performed for the assessment of DNA damage and Chromosomal aberration in human lymphocyte exposed to low dose radiation using fluorescence *in situ* hybridization(FISH) and single cell gel electrophoresis(SCGE).
Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed to radiation at doses of 5, 10, 30 and 50cGy were analysed with whole chromosome-specific probes by human chromosome 1, 2 and 4 according to PAINT system. FISH with chromosome-specific probe has been used to be a valid and rapid method for detection of chromosome rearrangements induced by low dose radiation. The frequencies of stable translocation per cell equivalents were 0.0116, 0.0375, 0.0407, 0.0727 and 0.0814 for 0, 5, 10, 30 and 50cGy, respectively, and those of dicentric were 0.00, 0.0125, 0.174, 0.0291 and 0.0407 respectively. Radiation induced DNA damage in human lymphocyte in a dose-dependent manner at low doses from 5cGy to 50cGy, which were analysed by single cell gel electrophoresis(SCGE). From above results, FISH seemed to be useful for radiation biodosimetry by which the frequencies of stable aberrations in human lymphocyte can be observed more easily than by conventional method and SCGE also seemed to be sensitive method for detecting DNA damage by low dose radiation exposure, so that those methods will improve our technique to perform meaningful biodosimetry for radiation at low doses.
Key Words : Fluorescence *in situ* hybridization(FISH), low dose radiation, chromosome rearrangement, SCGE(single cell gel electrophoresis)

요약 - 단세포전기영동법은 저선량 방사선에 의한 DNA손상을 민감하게 측정할 수 있는 방법으로 그 활용성이 증대되고 있다. 또한 각 염색체에 특이한 DNA probe를 이용하는 FISH기법은 염색체의 구조적 변화를 측정하는 매우 효과적인 방법으로서 그 유용성이 증대되고 있는 추세이다. 본 연구에서는 저선량 방사선의 측정을 위한 생물학적 선량계로서 FISH 기법과 단세포전기영동법의 활용가능성을 조사하고자 하였다. 5, 10, 30, 및 50 cGy의 저선량 방사선 조사에 의한 염색체이상빈도는 상호전좌의 경우 1, 2, 4번 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 감안하여, 전체 세포수로 환산했을 때 cell equivalent당 0.0375, 0.0407, 0.0727 및 0.0814로 나타났으며, 이동원염색체의 경우 0.0125, 0.0174, 0.02291, 및 0.0407로 나타나 선량 증가에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 5~50cGy의 저선량 방사선 조사 후 단세포전기영동법을 통해 DNA 상해정도를 살펴본 결과 선량이 증가할수록

DNA 상해가 증가하는 결과를 얻었다. 따라서 FISH 기법은 저선량 방사선 피폭시 염색체이상을 보다 정확하고 쉽게 관찰할 수 있으며, 단세포전기영동법은 DNA 손상을 민감하게 감지할 수 있어 저선량 방사선 피폭 시 유용한 생물학적 선량계로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.
중심어 : Fluorescence *in situ* hybridization(FISH), 저선량 방사선, 염색체이상, 단세포전기영동법

서 론

방사선 작업 종사자들이 저선량의 방사선에 피폭되었을 경우 및 방사선 사고 시 고선량의 방사선에 피폭되었을 때 피폭선량을 측정하기 위해서는 염색체이상을 측정하는 것이 일반적인 생물학적 선량계로서 기본적으로 활용되어 왔다. 전통적인 염색체이상 측정 방법은 주로 교환형의 염색체 이상 중 이동원염색체를 측정하게 되지만 이를 지닌 세포는 유전적으로 불안정하여 세포분열을 거듭함에 따라 치사하게 되어 오랜 기간 경과 후에는 말초혈액이나 골수의 stem cell에서도 발견되지 않기 때문에 이동원 염색체와 생성기전이 동일한 염색체형 염색체이상인 상호전좌를 측정하는 것이 바람직하다.

일반적으로 고선량의 방사선 피폭에 의해서 생성된 상호전좌는 시간경과에 따라 *in vitro* 선량-반응곡선에서 얻어진 기대치보다 낮은 빈도로 관찰된다고 알려져 있지만 저선량 방사선의 경우 기대치와 비슷한 빈도로 나타난다고 알려져 있기 때문에 방사선 작업종사자들이 비교적 낮은 방사선에 피폭되는 점을 고려한다면 상호전좌는 생물학적 선량계로서 더욱 유리하다고 할 수 있다[1-3]. 특히 저선량의 방사선에 의해서는 생성되는 이동원염색체 빈도보다 상호전좌의 빈도가 상대적으로 크다는 것이 알려져 있으며 이러한 점은 저선량 방사선의 생물학적 선량계로 상호전좌의 활용이 크게 기대되는 부분이다.

상호전좌를 포함한 삽입 등의 안정한 형태의 염색체이상은 FISH(fluorescence *in situ* hybridization) 기법에 의해 함께 측정될 수 있지만, 그들의 분류방식에 따라 정확성이 차이가 나기 때문에 분류체계의 타당성에 대한 검토가 요망된다. 특히 FISH 기법에 있어서는 특정 염색체만 사용하여 이들 염색체가 전체 genome 상에서 차지하는 비율을 감안하여 전체 염색체이상으로 보정하기 때문에 [4-5], 실제 전체 염색체이상을 제대로 반영하여 주는가에 대해서는 논란의 여지가 있다. 즉 각 염색체가 방사선에 대한 감수성이 차이가 나기 때문에 사용된 염색체의 DNA probe에 따라 실제값을 반영하는가 하는 부분에 있어서는 차이가 나타날 수 있다.

저선량 방사선을 평가하기 위한 생물학적 선량계로서 단세포전기영동기법이 소개되고 있는데 이 방법은 암유발원이나 돌연변이 유발원에 의한 DNA 손상을 평가하기 위해 개발되었으며 일명 comet assay라고도 불리운다. 이 방법은 1984년 Östling과 Johanson에 의해 개발되었으며[6-7], Singh(1988)에 의해 DNA 손상을 민감하게 평가하는 방법으로 개량되었다[8]. 단세포전기영동법은 실험조건에 따라 DNA 양가닥절단 및 외가닥절단을 측정할 수 있는데 외가닥절단은 양가닥절단보다 훨씬 많이 생성되기 때문에 이온화 방사선을 포함하는 산화적 손상을 유발하는 낮은 양의 유해물질에 노출되었을 때 민감한 측정방법으로 이용될 수 있다. 특히 alkali 조건의 단세포전기영동법은 DNA 외가닥절단과 alkali에 민감한 부위(Apurimic & Apyrimidine site : AP site)를 민감하게 측정할 수 있기 때문에 AP site를 생성하는 많은 유전독성물질을 감지하기 위한 생물학적 표지자로서의 활용성이 증대되고 있다[9-11]. 그러나 전기영동법의 조건이나 시료채취 후의 결과시간 및 보관상태에 따라 선량측정시의 한계치가 다양하게 보고되고 있다[12]. 즉 비교적 고선량의 방사선 조사에 의한 결과는 잘 확립되어 있고 재현성도 좋지만 저선량의 방사선조사 시 효과에 대해서는 실험자간의 차이가 크다.

본 연구에서는 FISH 기법과 단세포전기영동법을 저선량 방사선의 측정을 위한 생물학적 선량계로서의 활용가능성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 방사선 조사

건강한 사람의 말초혈액을 선형 가속기(LINAC, Varian 6/100)로 에너지 6MV x선을 5 cGy, 10 cGy, 30 cGy, 50 cGy 조사(dose rate: 2.00 Gy/min)하였다.

2. FISH(fluorescence *in situ* hybridization)

본 실험에서는 Spectrum Orange가 표지된 1, 2, 4번 염색체의 WCP probe(Vysis)를 이용하여 직접법에 의해 FISH를 수행하였다.

2-1. 염색체 표본작성

방사선 조사된 말초혈액 1 ㎖을 PHA 및 1 % 우태아 혈청이 포함된 RPMI배지 9 ㎖에 넣고 5 % CO_2가 공급되는 배양기에서 48시간 배양한 후 염색체 표본을 작성하였다.

2-2. DNA probe 준비

1, 2, 4 염색체가 동시에 Spectrum Orange로 표지된 DNA probe (WCP 1, 2, 4, Vysis)를 73±1 ℃에서 5분간 변성시킨 후, hybridization시키기 전까지 45-50 ℃의 slide warmer에 놓아두었다.

2-3. Hybridization

준비된 슬라이드에 probe를 10 ㎕를 점적한 후 수분이 유지되는 상자(Humidity box)에 넣어 충분히 hybridization되도록 37 ℃의 배양기에서 16시간동안 방치하였다.

2-4. 세척

슬라이드를 꺼내 Rubber cement를 조심스럽게 제거하고 슬라이드를 72 ℃의 0.4 × SSC (AMRESCO)에 5분간 담궈둔 후 꺼내어, 2 × SSC(AMRESCO)에 50 ㎕ 0.5 % NP-40를 넣은 용액에 담가 2분간 세척하였다. 그 다음, slide를 말리고 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색(counterstain)한 후, -20 ℃에서 보관하였다.

2-5. 관찰

형광 현미경(NIKON, E600)을 이용하여 triple band filter인 D/F/TXRD(DAPI/FICT/Texase Red, Chroma Technology Corp. 61002)로는 Spectrum Orange 및 DAPI를 동시에 관찰하였으며, UV-2A filter(NIKON, DM400)로는 DAPI를 관찰하였다.

2-6. 염색체이상 측정방법

본 연구에서는 Tucker 등(1995a)에 의해 제안된 명명법인 PAINT(Protocol Aberration Identification and Nomenclature Terminology)system에 근거하여 염색체이상을 분류하였으며[13], 염색체이상 빈도는 painting된 특정 염색체에서만 나타나기 때문에 이 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 계산하여[1, 14], 보정하여 전체 genome에서의 염색체이상 빈도를 계산하였다[3-4]. 본 연구에서 사용한 염색체 1, 2, 4번의 경우 전체 genome상에서 차지하는 DNA의 비율이 22.4 %, 전체교환형중 34.4 %가 관찰되는 것으로 나타났다.

3. 단세포전기영동법

단세포전기영동법은 Singh 등(1994, 1995)의 방법에 준하여 시행하였다[15-16].

3-1. 림프구 분리

방사선이 조사된 림프구는 4 ℃에서 보관하면서 방사선 조사 즉시 ficoll을 이용하여 림프구를 분리하였다.

3-2. Slide 준비

frosted slide에 0.6 %의 agarose 130 ㎕를 처리 후 cover glass로 덮고 4 ℃에서 10분간 방치하여 agarose를 굳힌 후 cover glass를 제거하였다. 분리된 림프구를 0.5 %의 low melting agarose 75 ㎕와 혼합하고 이를 slide에 적정 후 cover glass로 덮고 4 ℃에서 10분간 굳힌 후 coverglass를 제거하였다. 이후 0.5 % low melting agarose 110 ㎕를 이 위에 처리하고 굳힌 다음 차가운 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris base 1 % N-Lauryl sarcosinate 1 %, Triton X-100, pH 10)에서 4 ℃에서 1시간 용해시켰다. 분리한 림프구는 미리 녹인 agarose gel(low melting)에 섞은 후 agarose gel(normal melting)로 첫 번째 층이 덮인 frosted slide에 두 번째 agarose gel층으로 만든 후 이 위에 다시 agarose gel(low melting)로 세 번째 층을 덮는다.

3-3. 전기영동

Electrophoretic buffer(300 mM NaOH, 0.1 % 8-hydroxyguinoline, 2 % dimethyl sulfoxide, 10

mM Na_4EDTA, pH>12.3)를 이용 22 V, 300 mA에서 25분간 전기영동을 시행하였다. 이후 Tris buffer(0.4 M Tris, pH 7.4)로 5분씩 3회 세척하여 슬라이드를 중화시키고, DNA가 슬라이드에 침착될 수 있도록 ethanol을 적어도 1시간 이상 처리하였다.

3-4. 염색 및 관찰

슬라이드를 건조시킨 후 75 ㎕의 ethidium bromide (20 ㎍/㎖)로 염색하였다. 형광현미경을 사용하여 이미지분석프로그램(Image Pro Plus 3.0)을 통해 60개의 세포를 선택하여 DNA 손상정도를 head를 포함한 tail의 길이로 분석하였다[8].

4. 통계분석

SPSS 9.0 통계패키지를 이용하여 상호전좌 및 이동원염색체 빈도의 선량-반응 곡선을 추정하였으며, DNA 손상정도를 살펴보기 위해 Kruskall-Wallis analysis를 실행하였다.

Table 1. Radiation-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2 and 4 ; Numbers and frequencies of color junctions, translocations and dicentric chromosomes

Dose (cGy)	No. of cells scored	No. of cell equivalents	No. of aberrant cells	No. of color junctions	No. of translocation	No. of cells with translocation	No. of dicentrics	No. of cells with dicentrics	t/dic
0	500	172	2	2 (0.0116)	2 (0.0116)	2	0 (0.0000)	0	.
5	465	159.96	9	7 (0.0438)	6 (0.0375)	5	2 (0.0125)	2	3.00
10	500	172	9	10 (0.0581)	7 (0.0407)	7	3 (0.0174)	3	2.33
30	400	137.6	14	15 (0.1090)	10 (0.0727)	8	4 (0.0291)	4	2.50
50	500	172	20	23 (0.1337)	14 (0.0814)	13	7 (0.0407)	7	2.00

* The Number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

결 과

림프구에 5, 10, 30, 및 50 cGy의 저선량의 방사선을 조사한 경우 염색체 이상빈도는 표1, 그림 1 및 그림 2와 같다. 본 실험에서는 1, 2, 4번 염색체의 probe를 동시에 이용한 FISH기법을 활용하였다. 5 cGy에서 50 cGy의 저선량 방사선에 의한 이동원염색체 및 상호전좌 등의 염색체이상빈도는 선량에 따라 직선적으로 증가하였다. 즉 관찰된 상호전좌의 빈도는 1, 2, 4번 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 감안하여, 전체 세포수로 환산했을 때 cell equivalent당 0.0375, 0.0407, 0.0727 및 0.0814로 나타나 직선적 관계 ($Y=0.0244+0.0013X$, $r^2=0.885$, X: 선량(Gy), Y: cell equivalent 당 상호전좌의 빈도)를 보여주고 0.02291, 및 0.0407로 나타나 같은 양상($Y=0.00613+0.000723X$, $r^2=0.933$, X: 선량(Gy), Y: cell equivalent 당 이동원염색체의 빈도)을 보여주었다. 또한 color junction의 빈도도 선량에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다. 상호전좌 빈도와 이동원염색체 빈도의 비(t/dic)는 5 cGy에서 3, 10 cGy에서 2.33, 30 cGy에서 2.50, 그리고 50 cGy에서는 2.00로서 상호전좌의 빈도가 이동원 염색체의 빈도보다 상대적으로 높게 나타났다. 즉 본 연구에서는 PAINT 분류체계를 따랐기 때문에 상호전좌가 나타난 각각의 염색체이상을 측정한 것을 고려하더

라도 상호전좌의 빈도가 이동원염색체의 빈도보다 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 또한 상호전좌와 이동원염색체중 t(Ab)와 t(Ba), dic(BA)와 dic(BB)가 주로 관찰되었으며, 삽입(ins), 무동원염색체(ace) 및 환상염색체(r)도 관찰되었다.

5 cGy - 50 cGy의 저선량 조사 후 단세포전기영동을 통해 DNA 상해정도를 살펴본 결과 선량이 증가함에 따라 DNA 상해가 증가하는 결과를 얻었다(Y=39.764+72.9X, r^2=0.1620, X: 선량(Gy), Y: tail length(μm))(표 2, 그림 3과 4).

즉 각 선량별로 60개의 세포를 대상으로 tail의 길이를 측정한 결과 선량이 증가할수록 tail 길이가 증가되어 DNA 상해를 보여주는 세포가 더 많이 존재함을 알 수 있다(표 2, 그림 3).

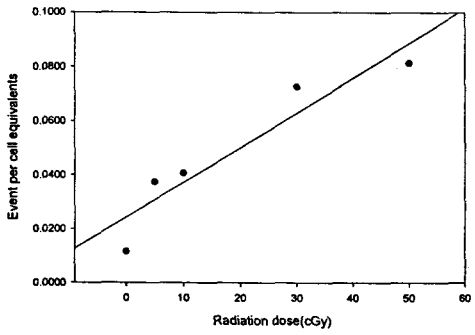

Fig. 1. Dose-response curve of translocations induced by low dose radiation (y=0.0244+0.0013x, r^2=0.885).

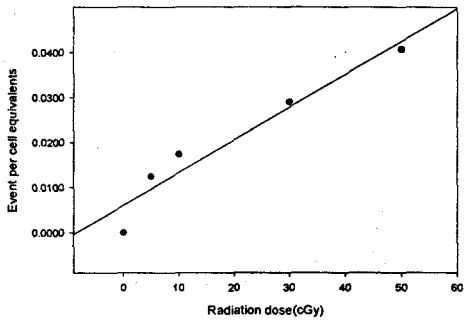

Fig. 2. Dose-response curve of dicentrics induced by low dose radiation (y=0.00613+0.000723x, r^2=0.9933).

Table 2. DNA damage induced by low radiation dose in human lymphocyte detected by single cell gel electrophoresis

Treatment	Tail length(μm)	
	M ± S.E.[a]	Median
Control	27.57 ± 0.455	26.70
5 cGy	33.54 ± 1.05	30.92
10 cGy	41.92 ± 1.53	40.99
20 cGy	50.03 ± 2.54	45.74
30 cGy	61.59 ± 3.21	54.43
50 cGy	79.20 ± 3.78	75.71
	Kruskall-Wallis, p< 0.001	

[a] represents mean ± standard error.

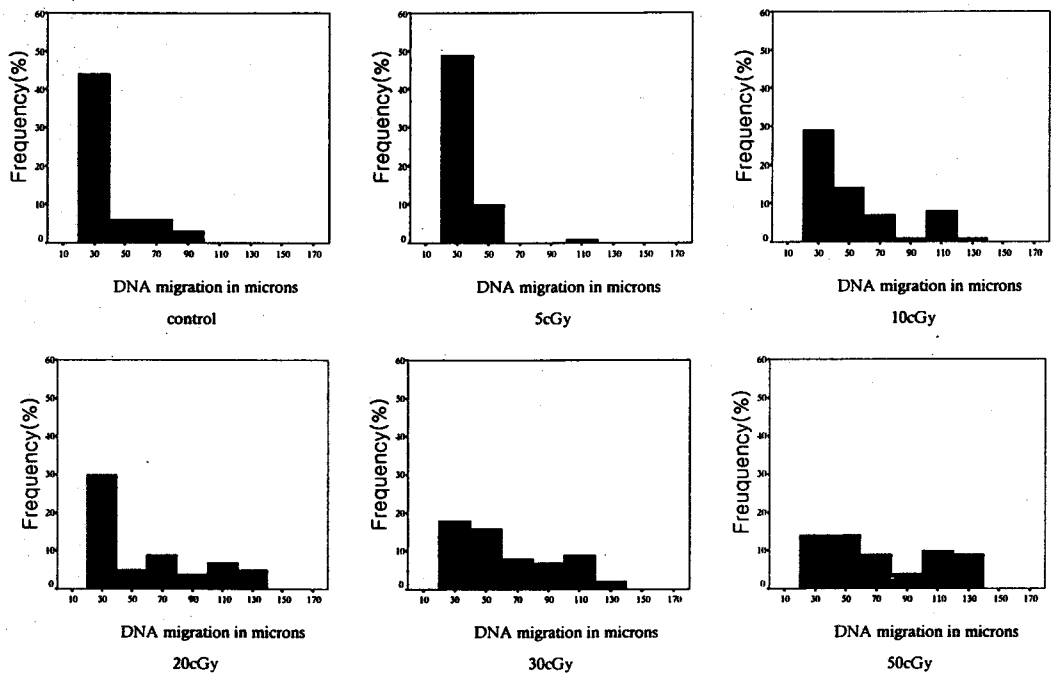

Fig. 3. The frequency distribution of extent of DNA migration in human lymphocytes after exposure to 0, 5, 10, 20, 30 and 50 cGy radiation.

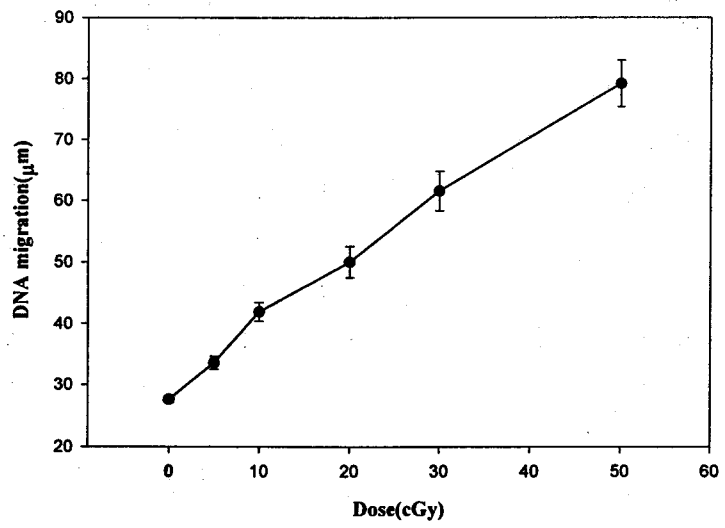

Fig. 4. The length of DNA migration after exposure to 5, 10, 20, 30 and 50cGy. Each point represents the mean length of DNA migration from 60 cells. Error bars represent standard errors.

고 찰

특정 염색체에 특이한 DNA probe를 이용하는 FISH 기법은 염색체 수준의 변화를 구체적으로 확인해 줄 수 있기 때문에 새로운 분자독성기법으로서의 활용성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

특히 이온화 방사선 노출에 의한 염색체형 염색체이상 중 이동원염색체와 상호전좌는 그 생성기전이 유사하기 때문에 이동원염색체가 유전적으로 불안정하여 세포분열을 계속함에 따라 치사하게 되지만 상호전좌는 유전적으로 안정되어 방사선에 노출 후 비교적 오랜 기간 생존하게 된다는 점을 감안할 때, 상호전자를 측정할 수 있는 FISH기법은 방사선 노출의 생물학적 선량계로서 그 유용성이 증대되고 있다[1, 4, 17-22].

본 연구결과 50 cGy이하의 저선량의 방사선조사에 의해 상호전좌 및 이동원염색체가 선량에 따라 직선적으로 증가되는 것을 확인하였다. 또한 상호전좌:이동원염색체의 비는 5 cGy의 저선량에서는 1:3 이었으나 선량이 증가될수록 그 비가 1:2에 근접되는데 본 실험에서 PAINT 분류체계를 따랐기 때문에 상호전좌된 염색체를 지닌 세포를 쌍으로 하여 하나로 측정한다면 상호전좌와 이동원염색체는 거의 같은 빈도로 나타난다는 것을 알 수 있었다.

1 Gy에서 7 Gy의 고선량 조사에 의한 염색체이상빈도를 조사한 본 연구진의 앞선 연구결과에서는 상호전좌 및 이동원 염색체는 1 Gy와 3 Gy사이에서는 직선적으로 증가하며 3 Gy이상의 선량에서는 선량의 제곱에 비례하여 증가하는 linear-quadratic 관계(상호전좌: $Y = 0.1416 - 0.0228X + 0.1125X^2$, $r^2=0.995$, P=0.0047, 이동원염색체: $Y = 0.0089 + 0.0102X + 0.0476X^2$, $r^2=0.998$, P=0.0018)를 보여주고 있으며 대부분의 연구에서도 동일한 결과를 보고하고 있다[1, 20].

많은 연구에서 FISH 기법의 가장 큰 장점은 상호전좌를 측정할 수 있다는 점을 강조하고 있으며, 이 상호전좌는 이동원염색체와 생성기전이 동일한 염색체형 염색체이상이기 때문에 오래 전에 방사선에 노출되어 이동원염색체는 관찰되지 않는다 하더라도 상호전좌를 측정하게 되면 피폭방사선량을 추정할 수 있다고 알려져 있다.

즉 사고로 tritium oxide를 흡입한 경우[2]와 전신조사가 된 사람을 대상으로 한 연구[22]에서 상호전좌가 오랜동안 안정하게 존재한다는 것을 확인하였고, 2.25 Gy까지의 높은 방사선에 피폭된 원숭이를 28년 후에 분석한 결과 이동원염색체는 말초혈액에서 관찰되지 않았지만 상호전좌는 관찰되었다고 보고하고 있다[23].

또한 Hiroshima 원폭 피해자의 경우, 피폭 후 45년 후에도 *in vitro* 선량 반응곡선에의 예측된 결과와 비교적 잘 들어맞는다는 보고도 있지만[2], 시간경과에 따라 예측된 결과보다는 낮은 빈도로 관찰된다는 보고가 일반적이다[24-26].

비교적 저선량의 방사선에 피폭되는 방사선 폐기물 근로자들을 대상으로 한 결과 대조군에 비해 폭로군에게서 상호전좌가 증가되었으며 film badge로 측정한 누적 선량 범주에 따라 증가되는 양상을 보여 주었지만 이동원염색체는 누적 방사선량과 연관되어 나타나지 않았다고 보고하였다[27].

또한 러시아의 Chelyabink 지역을 대상으로 조사한 결과를 살펴보면, 방사선시설에서 방사성 동위원소로 오염된 지역의 주민은 1956년부터 ^{90}Sr이 오염된 물에 의한 내부피폭, 그리고 ^{137}Cs이 포함된 퇴적물로부터의 외부피폭을 경험하였으며, 1994-96년 사이에 염색체 검사를 시행한 결과 폭로군의 이동원염색체는 대조군과 차이가 없었지만 상호전좌는 대조군에 비해 크게 증가되었음이 보고 되었다[28].

특히 0.6 Gy이상의 높은 선량에 피폭된 경우 상호전좌의 빈도는 기대치보다 적게 관찰되어 시간경과에 따라 감소되는 추세를 나타내고 있다.

방사선 피폭이 없는 일반인을 대상으로 한 연구에서 연령증가에 따라 상호전좌의 빈도가 증가되는 사실이 보고되었으며, 이는 상호전좌의 생성기전이 이동원염색체와 다를 수 있다는 것을 의미한다[29-30].

즉 이러한 사실은 DNA 손상회복 억제제인 3-Aminobenzamide(3AB)와 ara-C를 이용한 연구결과 방사선에 의해 생성된 상호전좌의 빈도는 이들 억제제의 처리에 의해서도 차이가 있었지만 이동원염색체의 빈도도 증가되었음을 보고하여 이들 염색체이상이 회복되는 기전이 상이함을 지적한 것을 고려한다면 생성기전이 차이가 날 수 있다는 가능성을 암시해 주고 있다[19].

본 연구결과 알카리 조건하에서 단세포전기영동법에 의해 저선량 방사선에 의해 DNA 상해가 선량에 따라 증가되는 결과를 얻었다.

단세포전기영동법 수행결과를 분석할 때 나타나는 문제 중 하나는 DNA의 이동거리를 측정하는 방법인데 head에 대한 tail의 형광되는 비(Östling & Johanson, 1984), tail길이(Singh et al., 1988)[6, 8], 전체의 comet 길이, head 직경과 tail 길이에 대한 비, tail moment, 그리고 Comet moment를

들 수 있는데 최근에는 현미경에서 관찰한 영상을 PC에 저장하여 특별히 제작된 program을 이용하여 분석하는 방법이 시도되고 있다. 본 연구에서는 head로부터 tail까지의 길이로서 DNA의 이동정도를 파악하였다. 최근의 연구에서 상기 기술한 측정 방법 어느 것이나 이용될 수 있다고 보고되고 있으며, 오히려 일부 연구자들이 이용하는 comet moment를 측정 시에는 다른 측정법에 의한 자료도 병기하도록 권고하고 있다[12].

많은 연구에서 단세포전기영동기법을 이용하여 x선이나 γ선 조사에 의한 DNA 상해를 분석하였지만 저선량 방사선에 의한 영향을 조사한 보고는 그리 많지 않다.

특히 Singh 등(1994)은 3.2 cGy부터 25.6 cGy의 저선량 x선 1 Gy/min의 선량율로 림프구에 조사하여 선량-반응관계를 얻었다고 보고하여 이 분석법의 민감도를 향상시킨바 있다[15].

본 연구에서는 Singh 등(1994)의 개량한 방법에 의해 단세포전기영동법을 수행하였는데, 즉 전기영동시 이용한 buffer에 8-hydroxyguanosine과 dimethylsulphxide를 첨가하여 free radical에 의한 DNA 상해를 방지하여 기저 상해수준을 낮추고자 하였으며, 전기영동 후 중화과정을 거치고 ethanol을 1시간 처리함으로서 각 세포의 DNA를 슬라이드에 침착시킴으로서 형광현미경으로 관찰 시 편리하게 하였다[15].

본 실험결과는 x선 조사를 통한 Singh 등(1994)의 연구와 일치되는 결과를 얻었다[15].

그러나 Singh 등(1995)은 1 cGy이하의 매우 낮은 방사선인 0.025 cGy부터 0.48 cGy까지의 γ선을 20 mCi의 T_c99m을 이용 4.32 mGy/h의 선량률로 림프구에 조사한 경우에도 양-반응 관계를 얻었다는 경이로운 결과를 보고하였다[16].

일반적으로 1 cGy의 방사선은 포유동물세포의 genome 당 단지 10-12개의 break만 일으킨다고 알려져 있었기 때문에 1 cGy의 방사선에 의해 얻어진 Singh 등의 결과는 설명하기 어렵다. 즉 Singh 등은 방사선 조사 및 그 이후의 모든 과정을 4 ℃이하에서 수행하였으며, 형광염료는 YoYo-1을 이용해서 측정효율을 증가시켰다. 또한 기저수준의 DNA 손상을 감소시키는 방법을 사용하였기 때문에 민감하게 측정할 수 있었다고 보고하고 있지만, 후속연구가 없어서 그 타당성 여부를 단정적으로 판단하기에는 논란이 있다. 그러나 1 cGy 이하 저선량의 영향을 측정하기 위한 생물학적 선량계가 현재까지는 개발되지 않았기 때문에 이 측정법에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

따라서 저선량 방사선에 생물학적 선량계로서 FISH기법 및 단세포전기영동법에 민감도 및 타당성 평가에 대한 연구가 더욱 필요하다고 판단된다.

결 론

본 연구는 FISH 기법과 단세포전기영동법을 저선량 방사선 측정을 위한 생물학적 선량계로서의 활용가능성을 조사하기 위해 시행되었다. 단세포전기영동법은 저선량 방사선에 의한 DNA손상을 민감하게 측정할 수 있는 방법으로. 그 활용성이 증대되고 있으며, 각 염색체에 특이한 DNA probe를 이용하는 FISH 기법은 염색체의 구조적 변화를 측정하는 매우 효과적인 방법으로서 그 유용성이 증대되고 있는 추세이다.

5, 10, 30, 및 50 cGy의 저선량 방사선 조사에 의한 염색체이상빈도는 상호전좌의 경우 1, 2, 4번 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 감안하여, 전체 세포수로 환산했을 때 cell equivalent 당 0.0375, 0.0407, 0.0727 및 0.0814로 나타났으며, 이동원염색체의 경우 0.0125, 0.0174, 0.02291, 및 0.0407로 나타나 선량 증가에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 5 ~ 50 cGy의 저선량 방사선 조사 후 단세포전기영동법을 통해 DNA 상해정도를 살펴본 결과 선량이 증가할수록 DNA 상해가 증가하는 결과를 얻었다. 따라서 FISH 기법은 저선량 방사선 피폭시 염색체이상을 보다 정확하고 쉽게 관찰할 수 있으며, 단세포전기영동법은 DNA 손상을 민감하게 감지할 수 있어 저선량 방사선 피폭 시 유용한 생물학적 선량계로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력연구개발사업 연구비 및 한국전력의 원전종사자 및 주변주민에 대한 역학조사사업 연구비의 일부지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. J.N. Lucas, A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H.U. Weirer, D. Pinkel, J. Gray and G. Little field, "Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation", Int. J. Radiat. Biol., 62. 53-63(1992a).

2. J.N. Lusas, M. Poggensee and T. Straume, "The persistence of Chromosome translocation in a radiation workers accidentally exposed to tritium", Cytogent. Cell Genet., 60, 255-256(1992b).
3. J.N. Lucas and R.K. Sachs, "Using three-color chromosome painting to test chromosome aberration models", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 1484-1487(1993).
4. J.D. Tucker, M.J. Ramsey, D.A. Lee, and J.L. Hinkler, "Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizing radiation *in vitro*", Int. J. Radiat. Biol., 64,27-37(1993).
5. J.D. Lucas, T. Tenjin, T. Straume, K. Pinkel, D. Moor, M. Litt, and J.W. Gray, "Rapid human chromosome aberration analysis using fluorescence *in situ* hybridization", Int. J. Radiat. Biol., 56, 35-44(1989).
6. O. Östling, K.J. Johanson, "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", Biochem Biophys Res Commun, 123(1), 291-8(1984).
7. O. Östling and K.J. Johanson, "Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell", Int. J. Radiat. Biol., 52, 683-691(1987).
8. N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice and E.L. Schneider, "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", Exp-Cell. Res., 175, 184-191(1988).
9. A.R. Collins, V.L. Dobson, M. Dusinska, G. Kermedy and R. Stetima, "The comet assay: What can it really tells us?", Mutat. Res, 375, 183-193(1997).
10. A.R. Collins, M. Ai-guo and S.J. Duthie, "The kinetics of repair of oxidative DNA damage(strand break and oxidised pyrimidines) in human cells", Mutat. Res., 336, 69-77(1995).
11. C. Andreoli and P. Leopardi and R. Crebelli, "Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites", Mutat. Res., 377, 95-104(1997).
12. R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu and Y. F. Sasaki, "Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing", Environ. Mol. Mutat., 35, 206-221 (2000).
13. J.K. Tucker, W.F. Morgan, A.A. Awa, M. Bauchinger, D. Blakey, M. N. Cornforth, L. G. Littlefield, A. T. Natarajan, and C. Shaserre, "A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting", Cytogenet. Cell Genet., 68, 211-221(1995a).
14. M.L. Mendelsohn, B.H. Mayall, E. Bogara, D.H. Moore II and B.H. Perry, "DNA content and DNA based centromere index of the 24 human chromosome", Science, 179, 1126-1129(1973).
15. N.P. Singh, R.E. Stephens and E.L. Schneider, "Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage", Int. J. Radiat. Biol., 66(1), 23-28(1994).
16. N.P. Singh, M.M. Graham, V. Singh and A. Khan, "Induction of DNA single-strand breaks in human lymphocytes by low doses of γ-rays", Int. J. Radiat. Biol., 68(5), 563-569(1995).
17. H.W. Chung, S.Y. Kim, S.W. Ha, "Analysis of chromosome aberrations by fluorescence *in situ* hybridization using triple chromosome-specific probes in human lymphocyte exposed to radiation", J. korean Asso. Radiat. Prot, 24(1), 5-53(1999).
18. A. Matsuoka, K. Yamada, M. Hayashi and T. Sofuni, "Chromosomal aberrations detected by chromosome painting in lympocytes from cancer patients given high doses of therapeutic x-rays", J. Radiat. Res(tokyo), 37(4), 257-65 (1996).
19. A.T. Natarajan, A.S. Balajee, J.J.W.A. Boei, S. Chatterjee, F. Darroudi, M. Grigorova, M. Noditi, H.J. Oh, P. Slijepcevic and S. vermeulen, "Recent developments in the assessment of chromosomal damage", Int. J. Radiat. Biol, 66(5), 615-623(1994).
20. E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, J.W. Gray and M. Bauchinger, "Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence *in situ* hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes", Int. J. Radiat. Biol, 62(6), 673-678(1992)

21. M. Bauchinger, E. Schmid, H. Zitselsberger, H. Braselmann and U. Nahrestedt, "Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe", Int. J. Radiat. Biol., 64, 179-184 (1993).
22. T. Straume, J.N. Lucas., J.D. Tucker, W.L. Bigbee and R.G. Langlois, "Biodosimetry for a radiation worker using multiple assays", Health Phys., 62, 122-130(1992).
23. J.N. Lucas, F.S. Hill, D.E. Burk, A.B. Cox and T. Straume, "Stability of the translocation frequency following whole-body irradiation measured is rhesus monkey", Int. J. Radiat. Biol., 70, 309-317(1996).
24. T. Straume, R.G. Langlois, J. Lucas, R.H. Jensen, W.L .Bigbee, A.T. Ramalho and C.E. Brandao-Mello, "Novel biodosimetry methods applied to victims of the Goiania accident", Health Physics, 60, 17-76(1991).
25. A.T. Nataragain, A.S. Balajee, T.W.A. Boei, F. Darroudri, I. Domingnez, M.P. Hande, M. Meijers, P. Slijepcevic, S. Vermeulen and Y. Xiao, "Mechanism of induction of Chromosomal aberrations and their detection by fluorescence *in situ* hybridization", Mutat. Res., 372, 247-258(1996).
26. A.T. Ramalho, A.C.H. Nascimento and A.T. Natarajan, "Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania radiation accident", Radiat. Prof. Dosimotry, 25, 97-100(1988).
27. J.D. Tucker, E.J. Tawn, D. Holdsworth, S. Morris, R. Langlois, M.J. Ramsey, P. Kato, J.D. Boice Jr., R.E. Tarome and R.H. Jensen, "Biological dosimetry of radiation workers at the sellafield nuclear facility", Radiat. Res., 148, 216-226(1997).
28. M. Bauchinger, K. Sallassidis, H. Braselmann, A. Vozilova, S. Pressl, G. Stephan, G. Snigizyova, V.P. Kozheurov and A. Akleyeu, "FISH-based analysis of stable translocations in a Techa river population", Int. J. Radiat. Biol. 73(6), 605-612(1998).
29. H.W. Chung, S.Y. Kim and E. H. Shin, "Frequency of chromosome aberrations detected by fluoresecence *in situ* hybridization using triple chromosome-specific probes in a healthy Korean population", 18(2), 109-115 (1998).
30. J.D. Tucker, A.L. Danise, J. R. Marelym, J. Briner, L. Olsen and D.H. Moore, "On the frequency of chromosome exchanges in a cohort population measured by chromosome painting", Mutat. Res. 3135, 193-202(1994).