

# 인체세포주에서 저선량 <sup>99m</sup>Tc에 의해 발현되는 방사선 적응반응에 관련된 유전자에 관한 연구

전남대학교 의과대학 핵의학교실<sup>1</sup>, 의과학연구소<sup>2</sup>, 병리학교실<sup>3</sup>, 전남대학교 자연과학대학 생명과학부<sup>4</sup>  
권안성<sup>1</sup> 범희승<sup>1,2</sup> · 최 찬<sup>2,3</sup> · 김지열<sup>1,2</sup> · 임옥빈<sup>4</sup>

## Genes Associated with Radiation Adaptive Response Induced by Low Level Radiation from <sup>99m</sup>Tc in Human Cell Lines

An-Sung Kwon, M.S.<sup>1</sup>, Hee-Seung Bom, M.D.<sup>1,2</sup>, Chan Choi, M.D.<sup>2,3</sup>,  
Ji-Yeul Kim, Ph.D.<sup>1,2</sup> and Wook-Bin Lim, Ph.D.<sup>4</sup>

*Department of Nuclear Medicine<sup>1</sup>, Research Institute of Medical Sciences<sup>2</sup>, Department of Pathology<sup>3</sup>,  
Chonnam National University Medical School and Department of Biological Science<sup>4</sup>,  
Chonnam National University, Gwangju, Korea*

### Abstract

**Purpose:** The purpose of this study was to search activated genes that could be related to radiation adaptive response (RAR) induced by low-level radiation from <sup>99m</sup>Tc in human cell lines. **Methods:** We used gene discovery array (GDA) and representational difference analysis (RDA) methods. <sup>99m</sup>Tc-pertechnetate was added to 2 × 10<sup>6</sup>/mL NC-37 cells (human lymphoblastic cells) to make concentrations ranging from 148 MBq/mL to 148 Bq/mL by serial 10 fold dilutions. After 44 hours, 2 Gy gamma irradiation was given to them using a Cs-137 cell irradiator. **Results:** As compared to the control (Con) group to which no <sup>99m</sup>Tc was added, those cells to which 148 and 14.8 KBq of <sup>99m</sup>Tc were added showed significantly lower damage to chromosomes, which was evaluated by metaphase analysis. Cells with 148 KBq <sup>99m</sup>Tc (T148 group) showed most significant protection. Activated genes in the T148 group as compared to Con group were evaluated by GDA and RDA methods. GDA revealed genes of casein kinase 2 (CK2) beta chain, immunoglobulins (Ig), human leukocyte antigen (HLA)-B, and two novel genes. Twenty RAR related clones were selected by RDA method. The size of those genes was from 234 to 603 base pairs. **Conclusions:** RAR was induced by low dose irradiation from <sup>99m</sup>Tc in NC-37 cell lines. Genes related to the response included CK2, Ig, HLA-B in human lymphoblastic cell lines. (Korean J Nucl Med 2001;35:313-323)

**Key Words :** radiation adaptive response, gene discovery analysis, representational difference analysis

Received Aug. 11, 2001; accepted Oct. 8, 2001

Corresponding Author: Hee-Seung Bom M.D., Ph.D.

Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Hospital, 8 Hakdong, Gwangju 501-757, Korea

Tel : 062-220-5641, FAX 062-223-1666, E-mail : hsbom@chonnam.ac.kr

※ 본 연구는 1999년도 원자력연구개발사업 연구비를 지원 받아 수행하였음.

## 서 론

방사능에 대한 막연한 공포심과 저항감으로 인해 저선량의 방사능마저도 위험한 것으로 인식되고 있으나, 저선량 방사선에 의해 그 이후의 고선량 방사선에 저항이 생기는 유익한 반응을 보인다는 방사선 적응반응이라는 현상이 알려지면서<sup>1,2)</sup> 저선량 방사선을 인체에 유익하게 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 그러나, 저선량 방사선이 어떤 기작에 의해 이런 반응을 일으키는지에 대해서는 아직 알려지지 않고 있다.

1984년 Olivieri 등<sup>1)</sup>이 인체 림프구를 방사성 thymidine에 노출시키고 이어 고선량의 X-선을 조사하였을 때 직접 고선량의 X-선만을 조사 받은 림프구보다 염색본체의 손상이 적게 일어나는 현상을 관찰하여 인체의 세포에서 방사선 적응반응이 일어남을 밝힌 이후 많은 연구자들에 의해 방사선 적응반응의 특성 및 그 기작에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근 본 연구자들은 인체 혈액 림프구와 마우스의 골수세포에서 중기염색체 분석법과 미소핵 검사법을 이용하여 적응반응의 현상을 입증한 바 있고,<sup>3)</sup> 핵의학 영상검사 중 가장 빈번히 시행하는 골 스캔시그라피를 시행할 때 사용하는 방사성의약품인 <sup>99m</sup>Tc methylene diphosphonate (<sup>99m</sup>Tc MDP)에 의한 내부 피폭에 의해서도 방사선 적응반응이 유도된다는 사실을 밝힌 바 있다.<sup>4-5)</sup>

적응반응의 기전에 관해서는 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만 손상 받은 DNA로부터 유전자가 발현되어 새로운 단백질이 합성될 것으로 추측되고 있다.<sup>6)</sup> 새로운 단백질의 합성에 관해서는 Cai 등<sup>7)</sup>이나 Youngblom 등<sup>8)</sup>의 연구에서 단백질합성 억제제인 cycloheximide에 의해 적응반응이 소실되는 현상을 봄으로써 가능성을 확인한 바 있다. Shadley와 Wolff<sup>9-10)</sup>는 poly (ADP-ribose) polymerase의 길항제인 3-aminobenzamide 처리를 하였을 때 방사선 적응반응이 소실되는 현상을 보고하였는바 이러한 poly (ADP-ribose) polymerase가 방사선 조사된 세포의 수선 기작으로 작용하는 효소일 것으로 추측할 수 있다. Kelsey 등<sup>11)</sup>은 돌연변이의 광범위한 스

펙트럼을 보여주는 hypoxanthine phosphoribosyl transferase 유전자를 Southern blot hybridization한 결과 저선량에 미리 노출된 경우 돌연변이 발생 빈도가 현저히 감소함을 밝혔는데 이 연구를 통하여 염색체 이상을 수선하는 특정 효소가 유도되어 이미 발생한 염색체 결실로부터 회복시킬 것으로 추정할 수 있었다. 1996년 Rigaud와 Moustacchi<sup>12)</sup>는 방사선 적응반응의 기작에 관한 연구에서 protein kinase C에 의해 매개되는 신호경로가 저선량에 의해 유도되는 신호변화에 중요한 단계일 것으로 보고하였고, 1997년 Sadekova 등<sup>13)</sup>은 mRNA를 이용한 differential display를 통해 저선량 조사한 세포에서 heat shock protein 70 family의 PBP74/mortalin/Grp75 유전자의 발현이 강화되는 것을 규명하였는데, 이 현상은 세포에 따라 나타나지 않는 경우도 있었다. 최근에는 저선량의 방사선이 여러 유전자의 발현에 변화를 주어 DNA 수선과 세포주기의 진행을 조절하는 것으로 생각되고 있으나 대부분의 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

최근 들어 분자생물학적인 실험방법의 비약적인 발전으로 인하여 특정 자극에 의해 유도되거나 억제되는 유전자를 찾아내는 것이 가능하게 되었다. 이런 분자생물학적인 방법에 의해 유전자를 찾아내는 방법들 중의 하나가 gene discovery array (GDA)와 representational difference analysis (RDA) 방법이다. GDA여과기에는 지금까지 알려진 사람유전자 약 18,000개가 서로 중복되지 않게 배열되어 있으며, RDA는 두 개의 고도로 연관된 복잡한 유전체를 비교하여 질병이나 형질변화와 관련된 차이를 찾아내는 방법이다.<sup>14)</sup>

본 연구에서는 GDA의 빠른 시간 내에 유전자를 비교할 수 있다는 장점과 RDA를이용 하면 새로운 유전자 뿐 아니라 이미 알려진 유전자까지도 찾을 수 있다는 2가지 방법의 장점을 이용하여 방사선 조사를 하지 않은 정상세포에 비해 저선량의 방사선 동위원소에 의해 피폭 받은 세포에서 새로 유전자가 유도 발현되거나 발현이 강화되는 클론들을 찾아내어 방사선 적응반응 관련 유전자를 찾아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 인체세포주 NC-37에서 <sup>99m</sup>Tc에 의한 방사선 적응반응의 유도

#### 가. 세포주

인체 림프구 세포주인 NC-37 세포주를 한국 세포주은행에서 분양 받아 사용하였다. 실험군은 각각  $2 \times 10^6$ /mL개의 세포를 가진 총 9개 군으로 방사선 조사를 전혀 하지 않은 세포주군(CL1), 2 Gy의 고선량만 조사한 군(CL2), 148 MBq/mL로부터 148 Bq/mL의 농도가 되도록 <sup>99m</sup>Tc을 희석하여 첨가한 후 44시간동안 배양하고 2 Gy의 고선량을 조사한 군(CL3~CL9)으로 나누었다.

#### 나. 세포배양과 방사성 핵종 첨가 및 방사선 조사

NC-37 세포주는 배양 후, 분주시에 T-25 플라스크(Nunclon™, Denmark)에 RPMI 1640 배지(GibcoBRL; with L-glutamine, U.S.A) 4.5 mL과 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 0.5 mL을 첨가하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였으며,  $2 \times 10^6$ /mL개의 세포에 <sup>99m</sup>Tc을 148 MBq/mL로부터 148 Bq/mL의 농도가 되도록 10배씩 희석하여 첨가하고 배양하였다. 고선량의 방사선 조사는 배양

44시간째에 Cs-137 조사기(central dose rate = 654 Gy/h, Gammacell 3000 Elan, Nordion, Canada)를 사용하여 2 Gy를 조사하였다.

#### 다. 중기 염색체 분석법

배양 46시간에 염색체의 중기분열을 억제하는 colcemid (GibcoBRL; 10 µg/mL, U.S.A) 0.2 mL을 첨가하여 분열을 억제시킨 후, 2시간 더 배양하였다. 배양이 끝난 후에는 민 등<sup>3)</sup>의 방법에 따라 중기 염색체 분석을 시행하였다.

#### 라. 통계분석

저선량의 전처리 없이 단일 고선량만을 조사한 군과 전처리를 한 군간에 불안정 염색체의 계수의 차이는 ANOVA 검정을 이용한 분산 분석으로 하였고, p값은 0.05 미만을 유의한 수준으로 인정하였다.

### 2. 방사선 적응반응 관련 유전자 탐색

#### 가. Gene Discovery Array (GDA)

1) 실험 세포군과 대조군에서 total RNA 분리 NC-37 세포주에 <sup>99m</sup>Tc을 첨가한 실험에서 <sup>99m</sup>Tc 148 KBq/mL을 첨가한 군(이하 T148군)에서 방사선적응반응이 가장 잘 유도되었으므로(Table 1) 이 군을 실험군으로 선정하였다. 대조군(이하 Con군)

Table 1. Chromosomal Aberrations in Human Lymphoblast Cell-Lines (NC-37) according to Different Schemes of irradiation

Groups	Conditioning dose	Challenge dose	Ydr*
CL 1	None	None	0.08±0.08
CL 2	None	2 Gy	0.26±0.02
CL 3	148 MBq	2 Gy	0.21±0.04
CL 4	$148 \times 10^{-1}$ MBq	2 Gy	0.20±0.04
CL 5	$148 \times 10^{-2}$ MBq	2 Gy	0.28±0.04
CL 6	$148 \times 10^{-3}$ MBq	2 Gy	0.15±0.02 <sup>†</sup>
CL 7	$148 \times 10^{-4}$ MBq	2 Gy	0.16±0.03 <sup>†</sup>
CL 8	$148 \times 10^{-5}$ MBq	2 Gy	0.23±0.03
CL 9	$148 \times 10^{-6}$ MBq	2 Gy	0.23±0.02

\* Ydr is defined as number of ring and dicentric chromosomes divided by total number of cells counted.

<sup>†</sup> p<0.05 comparing to CL2

과 T148군 세포를 수확한 후  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 냉동기에 얼려 놓은 후 total RNA를 추출하였다. 저온 냉동기에 얼려져 있는 세포들을 천천히 녹인 후 6 mL의 guanidine isothiocyanate 용액과 30  $\mu\text{L}$ 의 2-mercaptoethanol을 첨가하였다. 그 후, 10 mL 주사기를 이용하여 각각의 세포들을 분쇄하고, 분쇄된 세포들을 5.7 M cesium chloride 용액 5 mL에 overlay하여 23,000 rpm으로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 이상 초원심 분리하였다. 원심분리 후 튜브 밑바닥 부분을 절단하여 바닥에 붙어있는 RNA를 diethylpyrocarbonate (DEPC) 처리된 물로 용해한 다음 에탄올로 침전시켜 분광광도계로 260 nm에서 정량한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하였다.

## 2) mRNA 분리

mRNA는 Oligotex kit (Qiagen Inc, U.S.A)를 사용하여 분리하였다. mRNA 분리에 들어가기에 앞서 Oligotex를  $37^{\circ}\text{C}$ 에서, Oligotex elution buffer를  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 prewarming 시켰다. total RNA에 동량의 Oligotex binding buffer (OBB)를 첨가하고 Oligotex를 혼합한 후, Oligotex 혼합물을 spin column의 중앙에 주입하고 14,000 rpm에서 2분간 원심분리 했다. 튜브에 걸려진 용액은 제거하고 column의 중앙을 Oligotex wash buffer 2로 두 번 세척하였다. 세척 후 새로운 튜브를 넣고 OBB를 첨가하여 14,000 rpm에서 1분간 원심분리한 다음 에탄올로 침전시킨 후 분광광도계로 260 nm에서 정량한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에 보관하였다.

## 3) GDA 여과기

GDA 여과기는 가로와 세로의 길이가 각각 22 cm인 Gene Discovery Array Human Version 1.3 GDA 여과기(GenomeSystemsInc<sup>TM</sup>, U.S.A)로서 I.M.A.G.E collection (<http://www-bio.lnl.gov/bbrp/image/image.html>)으로부터 선택된 약 18,000여 개의 중복되지 않은 인체 cDNA clones이 찍혀져 있다. 이 GDA 여과기에 Northern Max Hybridization buffer를 이용하여 미리 hybridization 한 후,  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight incubation 시켰다. T148과 Con의 mRNA는 정량하여 2.5  $\mu\text{g}$ 의 mRNA와 50

$\mu\text{M}$ 의 Oligo dT가 되도록 농도를 맞춘 후 각각의 시료에 10 mM (dNTP-dCTP)를 첨가하고,  $^{32}\text{P}$ 로 방사성 표지를 시킨 후, spin column G-50 (Pharmacia ProbeQuant<sup>TM</sup>, U.S.A)을 사용하여 방사성 표지된 cDNA만을 얻었다. DNA Orientation Marker probe는 GDA Orientation Marker와 0.5 mM (dNTP-dCTP)를 첨가하고,  $^{32}\text{P}$ 로 방사성 표지를 시킨 후, 10X Klenow (TAKARA, Japan)를 첨가하고 50  $\mu\text{M}$  random primer를 넣어주고 spin column으로 방사성 표지된 GDA Orientation Marker를 얻었다. GDA 여과기에 hybridization할 경우에는 각각의 cDNA probe와 Orientation Marker를 잘 섞은 후, salmon sperm DNA를 첨가하여 24시간 이상 hybridization하였다.

## 나. Representational Difference Analysis (RDA)

### 1) ds cDNA 합성

GDA에서 사용한 방법과 동일한 방법으로 mRNA를 분리하였으며,  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고에서 침전된 mRNA를 꺼내어 얼음 위에서 자연스럽게 녹도록 놓아둔 후, 정량을 하였다. 정량 후 mRNA가 10  $\mu\text{L}$ 의 농도가 되도록 희석을 하였고, ds cDNA 합성과정은 Takara kit (TAKARA, Japan)을 이용하여 합성하였다. 5X 1st buffer 6  $\mu\text{L}$ , 10 mM dNTP 3  $\mu\text{L}$ , RNase 억제제 3  $\mu\text{L}$ , Oligo d(T)<sub>18</sub> 3  $\mu\text{L}$ , RAV-2 RTase 3.3  $\mu\text{L}$ , DEPC water 1.7  $\mu\text{L}$ 와 잘 혼합하여 실온에서 10분간 방치 후  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시키고 나서 얼음 위에 두었다. 얼음 위에 있던 첫 번째 혼합물을 5X 2nd buffer 30  $\mu\text{L}$ , E.coli DNA polymerase 19.5  $\mu\text{L}$ , E. coli RNase H/DNA ligase 3  $\mu\text{L}$ , DEPC-water 61.5  $\mu\text{L}$ 와 잘 섞어준 후, PCR 기체를 이용하여  $12^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간,  $22^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간,  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간을 차례대로 반응시켰다. 그 후, T<sub>4</sub> DNA polymerase를 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 더 반응시켰고 stop solution인 0.25M EDTA와 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 생성된 ds cDNA는 에탄올로 침전시킨 후 분광광도계로 260 nm에서 정량 하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 초저온 냉동고

에 보관하였다.

## 2) RDA

ds cDNA를 PCR purification kit (Qiagen Inc, U.S.A)을 이용하여 정제한 후 Sau3A1 제한효소(10 unit/ $\mu$ l)와 10X buffer를 첨가하여 37°C에서 overnight 반응시켜 digestion을 한 후 Bgl II R adaptor를 이용하여 ligation을 하였다. ligation 후 cDNA/R Bgl II adaptor와 PCR 용액인 10X PCR buffer, 15 mM MgCl<sub>2</sub> (2.4 mM/ $\mu$ l), 2.5 mM dNTP 혼합물, Taq polymerase를 이용하여 72°C에서 5분간 반응시켰고 95°C에서 1분 72°C에서 3분간을 35번 반응시킨 후 다시 72°C에서 10분간 반응시켜서 증폭을 시켰고, 다시 Sau3A1으로 digestion을 하였다. 한번은 T148을 tester로 하고, Con을 driver로 하여 tester인 T148 PCR 생성물에만 J adaptor를 ligation 하였고, 다른 한번은 Con을 tester로 하고 T148을 driver로 하여서 tester인 Con에만 J adaptor를 ligation 시켰다. tester에만 J adaptor를 ligation 시킨 후, tester와 driver의 cDNA 농도를 1 : 40의 비율로 혼합시킨 DNA는 phenol chloroform isoamylalcohol (PCI) 추출하였다. 이렇게 정제된 혼합물은 100 % 에탄올로 침전을 시켰고, 70% 에탄올로 세척을 한 후 완전히 말렸다. 생성된 DNA pellet은 3X EE buffer 4  $\mu$ l에 녹여 67°C에서 약 20시간 정도 반응시킨 후 1st hybridization을 하였다. hybridization 후, 생성물에 대한 선택적인 PCR을 실시하고 agarose gel 전기영동을 통해 밴드를 확인하였다. 확인 후 DNA 100 ng에 adaptor N과 J를 번갈아 ligation 시킨 후 위의 과정을 2회 반복하여 최종 생성물을 얻었다.

## 3) 클로닝과 증폭

RDA를 통해 선별된 각각의 최종 생성물들을 p-Bluescript SK(+) 플라스미드 DNA에 주입한 후 Sau3A1 제한효소로 digestion 하였다. digestion된 최종산물들은 정제시킨 후 primer에 ligation 시켜서, ampicillin이 첨가된 LB agar plate로 전환시켰다. 그 후 plate에서 생성된 각각의 콜로니에 대해 PCR을 실시하여 각각의 DNA insert들을 증폭 시

켰다. 증폭된 PCR 산물들은 3% agarose gel 전기영동을 하여 각각의 밴드들에 대해 크기를 확인한 후 isopropanol로 침전시키고 농축시켰다.

## 4) Differential screening (Dot blot)

T148을 tester로 하고 Con을 driver로 하여 서로 공통되는 유전자를 제거하고 tester에만 있는 유전자를 남기는 T148 positive subtracted cDNA clones (T148-Con)과, 반대로 Con을 tester로 하고 T148을 driver로 한 실험군인 T148 negative subtracted cDNA clones (Con-T148)의 산물들을 Nylon membrane에 각각 점을 찍은 후 공기 중에서 말려 -20°C의 냉동고에 보관하였다. 보관되어 있는 membrane에 pre-hybridization 용액인 20X SSC, 50X Denhardt's solution, 10% SDS, salmon sperm DNA를 첨가하여 65°C 수조에서 shaking 하면서 prewarming 하였다. probe는 3차 hybridization 시킨 각각의 최종 subtracted cDNA를 probe로 하였다. probe로 설정된 각각의 cDNA는 spin column (BM, U.S.A)을 이용하여 정제시킨 후, pre-hybridization 중인 membrane에 넣어주고 65°C에서 20시간 이상 반응시켰다. 2X SSC와 0.1% SDS로 이루어진 세척 용액으로 세척하여 공기 중에서 말린 후 하루 동안 -70°C 초저온 냉동기에 보관하고 나서 X-선 필름에 반응시켰다.

## 결 과

### 1. 인체세포주 NC-37에서 <sup>99m</sup>Tc에 의한 방사선 적응반응의 유도

NC-37 세포주에서는 <sup>99m</sup>Tc으로 전처치를 하지 않고, 2 Gy의 단일 선량만을 조사한 군(CL2)에서는 불안정 염색체의 비율인 Ydr 값이  $0.26 \pm 0.02$  인데 비해, 148 KBq로 희석한 군(CL6)과 14.8 KBq로 희석한 군(CL7)에서는 각각  $0.15 \pm 0.02$ 와  $0.16 \pm 0.03$ 으로 현저하게 감소된 값을 보여 CL6과 CL7에서 방사선 적응반응이 유도되었음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ , Table 1).

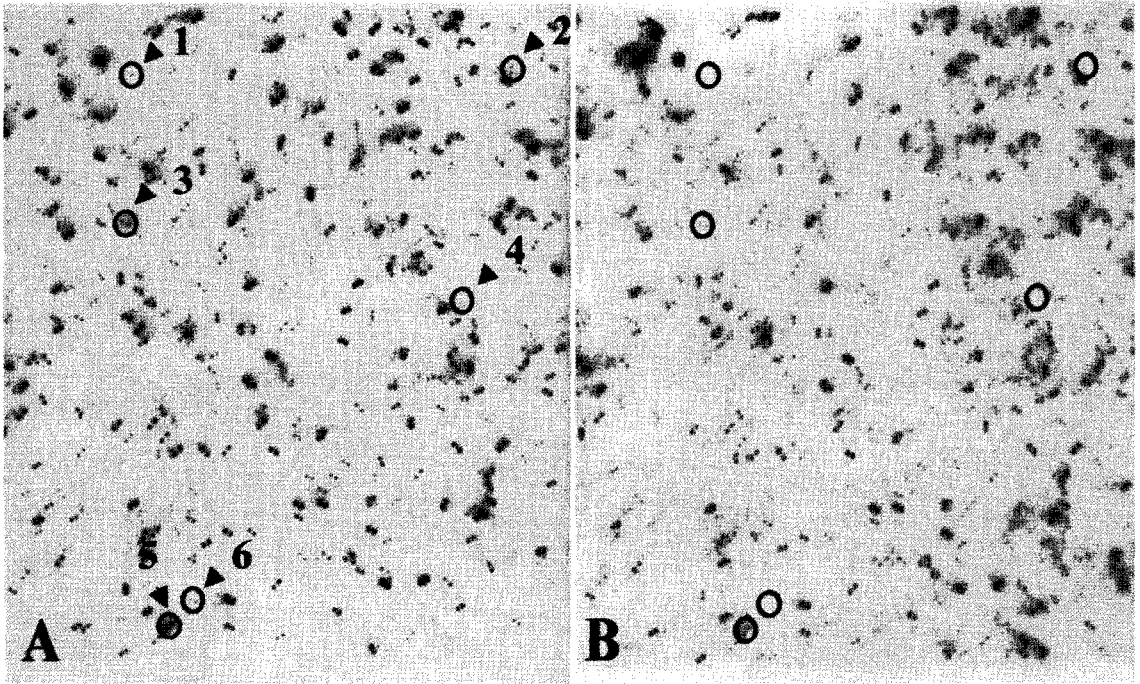


Fig. 1. Finding of gene discovery array (GDA) filtering in T148 (A) and control (B) groups. Six different spots were identified which are indicated by circles and numbers. T148 cells were irradiated by 148 KBq/mL <sup>99m</sup>Tc pertechnetate for 44 hours before irradiation by 2 Gy Cs-137 gamma ray. Control cells were irradiated by 2 Gy Cs-137 gamma ray without pre-irradiation by <sup>99m</sup>Tc pertechnetate.

## 2. 방사선 적응반응 관련 유전자 탐색

### 가. GDA 방법

GDA 여과기에 Con과 T148 cDNA를 probe로 하여 hybridization 시킨 후, 자가방사기록법을 이용하여 GDA 영상을 얻었다. 육안 판독을 통한 영상 판독의 결과 T148 cDNA에서 신호가 증가하는 6개의 spot을 발견하였다(Fig. 1). 각각의 spot에 대한 유전자 검색 결과, 각각의 유전자들은 2개의 알려지지 않은 새로운 유전자와, Casein Kinase 2 (CK2) beta-subunit, immunoglobulin, HLA-B 유전자임을 알 수 있었다.

### 나. RDA 방법

3차례 hybridization한 RDA 산물들을 p-Bluescript(+)에 sub-cloning하여 얻은 T148-Con은 총 126개의 콜로니 중에서 전기영동 결과 밴드가 명확하게 나타난 46개의 콜로니를 얻었고, Con-

T148은 총 130개의 콜로니 중에서 전기영동 결과 밴드가 명확하게 나타난 45개의 콜로니를 얻었다 (Fig. 2). Con-T148에서 얻은 45개의 콜로니와 T148-Con에서 얻은 46개의 콜로니를 Nylon membrane에 차례대로 점을 찍은 후, 3차례 hybridization한 product인 Con-T148과 Con-T148을 각각의 membrane에 hybridization하여 T148의 ds cDNA에 양성반응을 보이고 Con의 ds cDNA에 음성반응을 보이는 클론 20개를 얻었다 (Fig. 3). 20개의 clones를 3% agarose gel에 전기영동하여 size marker인  $\Phi$ x174/Hae III와 비교한 결과 크기가 약 234 ~ 603 base pair 정도임을 알 수 있었다 (Fig. 4).

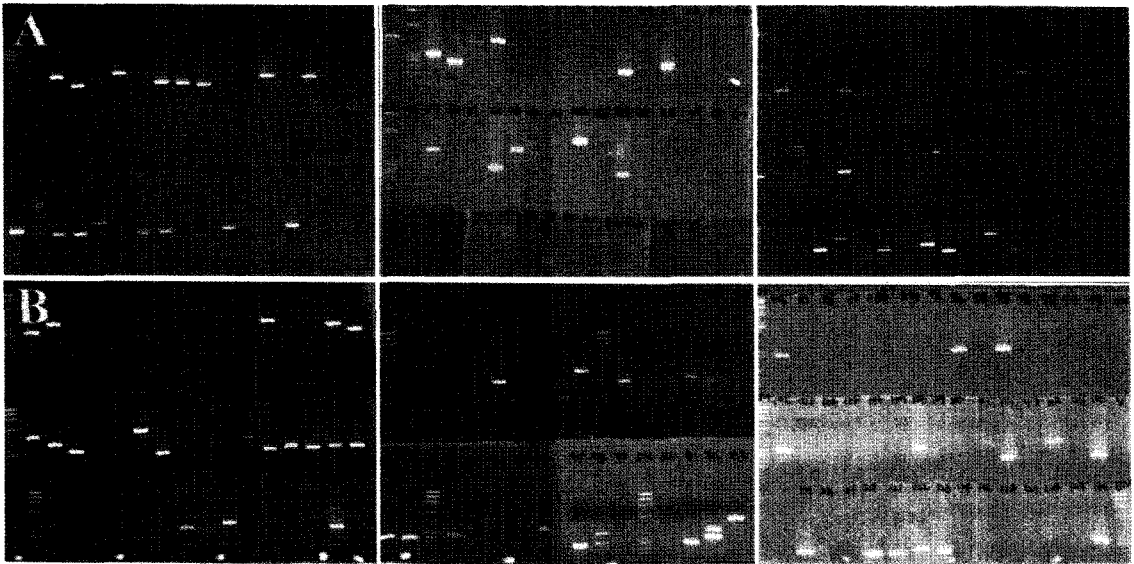


Fig. 2. Representational difference analysis (RDA) between control and T148 cDNA (A) Subtraction of control cDNA from T148 cDNA revealed 46 sharp bands (B) Subtraction of T148 cDNA from control cDNA revealed 45 sharp bands. Definitions of control and T148 : see Fig. 1.

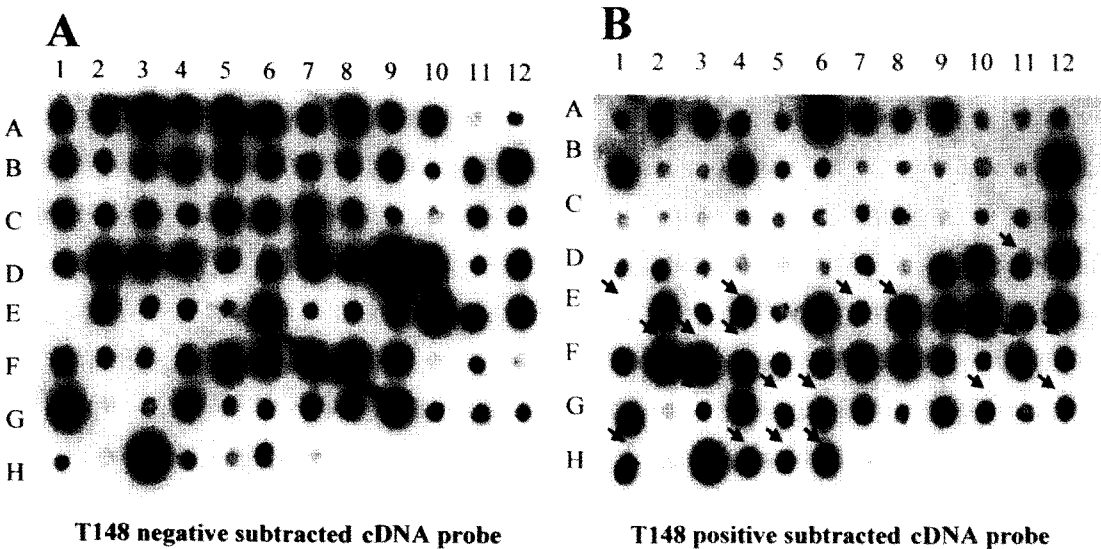


Fig. 3. Differential screening approach. Dot blots hybridized with cDNA probes made from T148 negative subtracted cDNA (A) and T148 positive subtracted cDNA (B) A1~D9 : T148 negative subtracted clones, D10~H7 : T148 positive subtracted clones, Arrows : The concentration of the clones cDNA fragment in T148 positive subtracted cDNA were much higher than T148 negative subtracted cDNA.

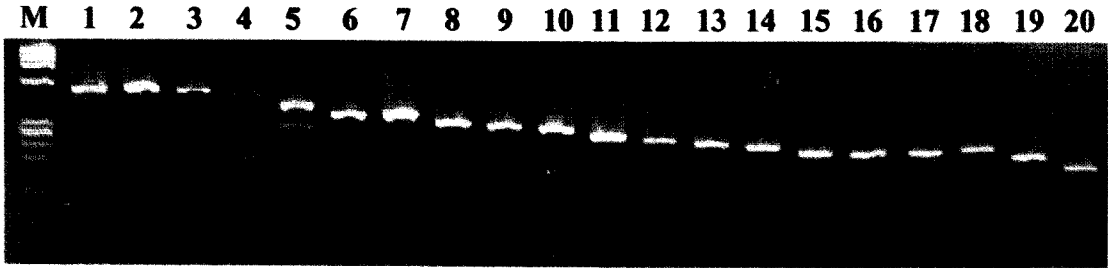


Fig. 4. Comparison of cDNA size of 20 selected which are indicated by arrows in Fig. 3. The size ranged from 234 to 603 base pairs. The difference of sizes indicates that 20 genes are all different.

## 고 찰

본 저자들은 이번 연구를 통하여 인체 정상 림프구 세포주를 농도별로 희석한  $^{99m}\text{Tc}$ 과 시험관내에 섞어 배양한 결과 148 MBq의  $^{99m}\text{Tc}$ 을 148 KBq로 희석한 농도에서 방사선 적응반응이 유도됨을 알 수 있었다. 분자 생물학적인 방법을 이용한 GDA와 RDA 방법을 통해 저선량의 방사성 동위원소에 의해 피폭 받은 세포에서 새로 유도 발현되거나 발현이 강화되는 유전자들을 GDA를 통해 새로운 2개의 유전자를 포함, 전체적으로 6개의 유전자를 확인할 수 있었고, RDA를 통해서 20개의 발현이 강화된 클론들을 확인할 수 있었다. 따라서  $^{99m}\text{Tc}$ 과 같은 매우 낮은 선량의 방사성 의약품의 지속적인 내부조사에 의해서 방사선 적응반응이 유도됨을 확인하였고, 저선량 방사선에 의해 유도 발현되는 유전자를 검색할 수 있었다.

방사선 적응반응을 유도할 수 있는 저선량의 범위는 X-선의 경우 0.5~20 cGy,<sup>10)</sup>  $^3\text{H}$ -thymidine의 경우 1~10 cGy,<sup>15)</sup>  $\gamma$ -선의 경우 1~20 cGy<sup>16)</sup> 로 알려져 있다. Bai 등<sup>16)</sup>은  $\gamma$ -선 1 cGy의 외부 단일 조사에 의해 방사선 적응반응이 유도되었으나, 0.5 cGy 단일조사에 의해서는 방사선 적응반응이 유도되지 않음을 보고하여  $\gamma$ -선의 경우 방사선 적응반응을 유도하는 최소한의 방사선량은 1 cGy로 보고하였다. 이들의 연구에서 흥미로운 점은 0.5 cGy를 일정 간격으로 두 차례 조사하면 적응반응이 유도

된다는 점인데, 0.5 cGy의  $\gamma$ -선을 배양 후 6시간과 12시간 또는 6시간과 42시간째에 각각 조사하면 적응반응이 유도되는 것으로 보아 두 번째 0.5 cGy 조사가 첫 번째 0.5 cGy에 상가작용을 일으켜 DNA 수선기전을 활성화시키는 것으로 생각된다. 즉, 적응반응을 유도할 수 있는 저선량의 범위 이하의 선량이더라도 분할 조사에 의한 누적효과가 적응반응을 일으킨다는 것이다. Bai 등<sup>16)</sup>과 Fan 등<sup>17)</sup>의 연구에 의하면 1 cGy를 분할 조사한 경우에는 방사선 적응반응은 유도되었으나 1 cGy 단일 조사에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다. 결국 적응반응을 유도하는 선량 범위 이내의 저선량에서는 분할조사의 누적효과가 나타나지 않고, 범위 이하의 매우 낮은 선량의 분할 조사가 누적효과를 나타내어 적응반응을 유도함을 알 수 있다. 따라서 매우 낮은 선량의 방사성 의약품에 의한 연속적인 내부 조사가 방사선 적응반응을 유도하는 현상은 매우 낮은 선량이더라도 연속조사로 인한 누적효과에 의해 적응반응 기전을 활성화시키는 것으로 이해될 수 있다.

Elkind 등<sup>18)</sup>은 중국 햄스터 V-79세포를 사용하여 회복과 시간과의 관계를 보인 바 있는데, 방사선의 양이 둘로 나뉘고, 분할 조사가 방사선유도 손상이 복귀되는데 충분한 시간 간격을 두고 이루어질 때에는 비치사손상이 일어나 정상세포는 손상에서 회복되어 보존된다고 보고하였다. 즉, X-선이나  $\gamma$ -선과 같이 저 linear energy transfer 방사선을 분할 조사할 경우 정상세포는 분할 조사간에 수선기전이 일어나 보존되고, 종양세포와 같이 수선기전에 장



에가 있는 세포는 사망하게 되는데, 이 방사선 분할 조사는 방사선 치료의 영역에서 매우 중요한 개념이 되었다. 일정시간 간격을 두고 이루어지는 분할 조사가 정상 세포의 수선기전을 활성화시킨다는 점에서 극히 낮은 선량의 방사선을 분할 조사 할 경우 세포 수선기전의 활성화도에 상승작용을 일으켜 방사선 적응반응을 일으킬 것으로 가정할 수 있다.

골 스캔시나그라피를 시행하는 환자에서 740 MBq의  $^{99m}\text{Tc}$  MDP를 주사하였을 때 혈액 0.5 mL에 대해 주어진  $^{99m}\text{Tc}$  MDP의 양은 74 KBq 정도로 추정되는데 이 농도에서 방사선 적응반응이 유도되었다.<sup>4)</sup> 이번 연구에서 적응반응이 유도된 CL6과 CL7군에는 14.8 KBq~148 KBq의  $^{99m}\text{Tc}$ 를 섞어주었다. 결국 세포주에서 방사선 적응반응이 유도된  $^{99m}\text{Tc}$ 의 농도는 14.8~148 KBq/0.5 mL로 추정할 수 있고 골 스캔시나그라피 환자에서의  $^{99m}\text{Tc}$  MDP 농도도 이 범위 안에 있다는 것을 알 수 있다. 따라서 이번 연구를 통하여 혈액에 대한 방사성 의약품의 상대적인 농도만으로 볼 때, 이전 연구인 골 스캔시나그라피를 시행하는 환자에서 관찰된 방사선 적응반응을 시험관내의 연구를 통하여 입증하였다. 방사성 의약품에 의한 지속적인 내부조사가 비록 그 선량이 매우 낮더라도 적응반응의 기전을 활성화시키는 것으로 해석된다. Shadley 등<sup>10)</sup>에 의하면 적응반응의 효과는 3회의 세포주기 동안 지속된다고 보고하였고,  $^{99m}\text{Tc}$  pertechnetate 처리 후 44시간째에는 적응반응이 유도되기에 충분한 시간이 경과하였을 것으로 사료되어  $^{99m}\text{Tc}$  pertechnetate 처리 후 44시간째에 2 Gy를 조사하였다. 이번 연구에서 방사선 조사방식이 일정 시간간격이 없는 연속적인 내부조사라는 점이 분할조사와는 다른 점인데, 방사선 분할조사가 세포의 수선기전을 활성화시키기 위해서는 일정한 시간간격을 가지고 이루어져야 한다는 점을 감안할 때, 시간 간격이 없이 연속적으로 이루어지는 방사성 의약품의 내부조사에 의한 방사선 적응반응은 분할조사에 의한 효과로 충분히 설명되지 않는 점이 있다. 따라서 방사성 의약품에 의한 적응반응의 유도기전이 방사선 외부조사와는 다른 경로를 통하여 이루어질 가능성을 배제할 수는 없다. 따라서 추후의 연구를 통하여 방사성 동위원소의 내부

조사에 의한 방사선 적응반응의 기전에 관한 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

Ernst 등<sup>6)</sup>에 의하면 적응반응의 기전에 관한 가설은 아직 정확하게 밝혀지지 않았지만 그 가설 중 하나는 손상 받은 DNA로부터 유전자가 발현되어 새로운 단백질이 합성이 유도될 것이라고 보고하였다. 그러므로 적응반응의 기전을 밝히기 위한 첫 번째의 과정은 방사성 의약품을 선처치하였을 경우 유도되는 유전자의 발현을 밝혀내는 것으로서, 적응반응의 기전을 이해할 수 있는 매우 중요한 자료가 될 것이라고 생각된다. GDA를 이용해서 찾아낸 유전자들 중 하나인 CK2는 세포의 성장과 분화에 관여하는 중요한 단백질로서 촉매작용을 하는 2개의 alpha subunit과 조절을 담당하는 2개의 beta subunit으로 구성되어 있다.<sup>19,20)</sup> 특히 CK2는 성장인자 수용체로서 intracellular cascade로 작용하고, 세포분화와 생존에 영향을 끼친다고도 알려져 있다. 최근의 보고에 의하면 CK2가 허혈 등의 스트레스에 의해 활성화된다고 보고되고 있으며,<sup>21)</sup> 암세포에서 약물에 의한 세포자멸사(apoptosis)를 억제한다고도 보고되었다.<sup>22)</sup> 따라서, CK2 beta chain gene이 방사선과 같은 스트레스에 의해 활성화되어 발현이 증가하고, 이로 인해 방사선적응반응이 유도되었을 것이라고 해석할 수 있다. 한편 본 실험에 사용한 인체세포주인 NC-37세포주는 B 림프구아세포 계열로서 항체를 생산하는 면역세포이므로 자극을 받았을 때 immunoglobulin과 HLA-B항원과 관련된 유전자가 활성화될 가능성이 높다고 생각된다.

본 저자는 이번 연구를 통하여 기존의 적응반응 유도범위보다 매우 낮은 선량의 방사성 의약품의 내부조사에 의해서 정상 인체 림프구 세포주에서 방사선 적응반응이 유도됨을 알 수 있었고, 이와 함께 적응반응에 관련된 유전자들을 확인하였다.

본 연구의 제한점으로 GDA에서 얻은 6개의 유전자에 대해서 Northern blot 등을 사용하여 확인하지 않았다는 점을 들 수 있겠다. 흔히 대조군과 실험군 사이의 RNA양을 비교 분석하기 위해서 기본적으로 아주 정확한 실험방법이 수행되어야 하는데, 이 실험방법 중의 하나가 RNA hybridization,

또는 Northern blot이다. 이 실험법은 만들어진 RNA blot에 실제 연구자가 알고자 하는 단백질 등의 변화정도를 추적하고자 할 때, 인위적으로 이 단백질을 암호화하고 있는 유전자로부터 probe를 합성하여, RNA blot에 포함 결합시킨다. 따라서 이런 검증과정을 거쳐야만 실험에서 생길 수 있는 오차나 결과 판독의 오류가 최소화 될 수 있을 것이다. 또한 GDA에서 새로운 유전자로 밝혀진 유전자에 대한 분석이 되지 않았으며, RDA에서 얻은 20개의 클론에 대해서 염기서열 등을 밝히지 않은 점을 들 수 있다. 따라서, 이들은 향후 추구해야 할 과제로 생각된다. 즉, GDA에서 얻은 아직 알려지지 않은 새로운 2개의 유전자에 대해서는 2개의 염기서열을 바탕으로 하여 primer를 제작한 후, Northern blot을 통해 T148의 RNA에서 발현이 강화되는 것을 추후 확인해야 할 것이고, RDA에 의해 얻은 20개의 클론들은 각각의 염기서열을 분석하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI)을 통해 각각의 유전자를 찾아내야 할 것이다.

## 요 약

**목적:** 저선량 방사선에 의해 그 이후의 고선량 방사선에 저항이 생기는 유익한 반응을 보인다는 방사선적응반응이라는 현상이 알려져 있지만, 저선량 방사선이 어떤 기작에 의해 이런 반응을 일으키는지에 대해서는 아직 알려지지 않고 있다. 본 연구에서는 정상 인체세포주에서 저선량  $^{99m}\text{Tc}$ 에 의해 방사선적응반응이 유도되는지를 확인하고, 이 때 활성화되는 유전자를 찾아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 인체 정상 림프구 세포주인 NC-37 세포주  $2 \times 10^6/\text{mL}$ 개의 세포에  $^{99m}\text{Tc}$ 을 148 MBq/mL로부터 148 Bq/mL의 농도가 되도록 10배씩 희석하여 첨가하고 44시간동안 배양하였다. **결과:** 각각의 군에 대해 이상 염색체를 계수하여 148 KBq/mL의  $^{99m}\text{Tc}$ 을 첨가한 군에서 방사선적응반응이 가장 현저하게 유도되었음을 확인하였다. 이 세포주에서 mRNA를 추출하고 여기에서 cDNA를 만든 후 gene discovery array (GDA) 여과기를 이용하여 대조군에 비해 발현이 증가된 casein kinase II beta chain,

immunoglobulin, HLA-B 그리고 아직 알려지지 않은 2개의 유전자 등 6개의 유전자를 찾아내었다. Representational difference analysis (RDA)법을 통해서는 대조군에 비해 발현이 증가된 유전자 클론을 20개 찾아내었다. **결론:** 인체세포주 NC-37에서 저선량의  $^{99m}\text{Tc}$ 에 의해 방사선적응반응이 유도된다는 사실을 밝혔으며, 이때 다수의 유전자가 발현된다는 사실을 알 수 있었다.

## 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. Sankaranarayanan K, Duyn AV, Loos MJ, Natarajan AT. Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res* 1989;211:7-12.
3. Min JJ, Bom HS, Lee SY, Choi KH, Jeong HJ, Song HC, Kim JY. Cytogenetic radiation adaptive response assessed by metaphase analysis and micronuclei test in human lymphocytes and mouse bone marrow cells. *Korean J Nucl Med* 1998;32:525-33.
4. Bom HS, Song HC, Lee SY, Min JJ, Jeong HJ, Kim JY. Radiation induced cytogenetic adaptive response in lymphocytes of patients undergoing bone scintigraphy. *J Nucl Med* 1998;39:184-5 (abstract).
5. Min JJ, Bom HS. Induction of radiation adaptive response in lymphocyte of patients undergoing bone scintigraphy. *Korean J Nucl Med* 1999;33:172-7.
6. Ernst M, Freed ME, Zametkin AJ. Health hazard of radiation exposure in the son text of brain imaging research: special consideration for children. *J Nucl Med* 1998;39:689-98.
7. Cai L, Liu SZ. Study on the mechanism of cytogenetic adaptive response induced by low dose radiation. *Chin Med J* 1992;105:277-83.
8. 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.
9. 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.
  10. 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.
  11. Kelsey K, Memisoglu A, Frenkel D, Liber H. Human lymphocytes exposed to low doses of X-rays are less susceptible to radiation-induced mutagenesis. *Mutat Res* 1991; 263:197-201.
  12. Rigaud O, Moustacchi E. Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms for the adaptive response. *Mutat Res* 1996;358:127-34.
  13. Sadekova S, Lehnert S, Chow TY. Induction of PBP74/mortalin/Grp75, a member of the hsp70 family, by low doses of ionizing radiation: a possible role in induced radioresistance. *Int J Radiat Biol* 1997;72:653-60.
  14. Nikolai A Lisitsyn. RDA (Representational Difference Analysis). In *Genome analysis: A laboratory manual*. vol.4 *Mapping Genomes*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. p. 217-56.
  15. Ikushima T. Radio-adaptive response: Characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1989;227:241-6.
  16. Bai Y, Chen D. Accumulative effect of two low doses of irradiation in inducing an adaptive response in human lymphocytes. *Mutat Res* 1993;302:191-6.
  17. Fan S, Mijayalaxmi, Mindek G, Burkart W. Adaptive response to 2 low doses of X-rays in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1990;243:53-6.
  18. Elkind MM, Sutton H. Radiation response of mammalian cells grown in culture: I. Repair of x-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiat Res* 1990;13:556-93.
  19. Guerra B and Issinger OG. Protein kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis* 1999;20:391-408.
  20. Guerra B, Boldyreff B, Sarno S, Cesaro L, Issinger OG, Pinna LA. CK2: a protein kinase in need of control. *Pharmacol Ther* 1999;82:303-13.
  21. Kim SO, Baines CP, Critz SD, Pelech SL, Katz S, Downey JM, Cohen MV. Ischemia induced casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart. *Biochem Cell Biol* 1999;77: 559-67.
  22. Chuanhai Guo, Shihui Yu, Alan T. Davis, Huamin Wang, Jeffrey E, Green, Khalil Ahmed. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:5992-9.