

말초혈액 내 림프구의 방사선에 의한 아포프토시스

조선대학교 의과대학 치료방사선과학교실*, 의학연구소†, 병리학교실‡, 약리학교실§

오윤경*† · 이태범† · 남택근*† · 기근홍†‡ · 최철희†§

목적 : 방사선에 의해 유도되는 림프구의 아포프토시스를 정상 성인의 말초 혈액에서 유세포계측검사로 측정할 때 소량의 혈액으로도 검사가 가능한가를 알아보고 선량 증가와 방사선조사 후 시간 경과에 따른 반응 정도를 알아 보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법 : 건강한 성인 남녀 11명을 연구 대상으로 하여 말초혈액 10 mL에서 림프구를 분리하고 이를 각각 15개로 나누어서 실험하였다. 선형가속기를 이용하여 0.5, 1, 2, 5 Gy의 방사선을 조사한 후 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 림프구의 아포프토시스를 정량적으로 측정하기 위해 유세포계측검사를 시행하였으며, 별도로 DNA fragmentation assay와 전자현미경검사를 이용하여 아포프토시스 소견을 추가로 관찰하였다.

결과 : 방사선을 조사하지 않았을 때의 자발성 아포프토시스율(%)은 배양 후 24, 48, 72시간이 경과함에 따라 증가하는 소견을 보였다(1.761±0.161, 3.563±0.564, 11.098±2.849). 또한 0.5, 1, 2, 5 Gy의 방사선을 조사하여 24, 48, 72 시간 동안 배양한 후 측정된 아포프토시스율(%)은 선량 증가와 방사선조사 후 시간 경과에 따라 점차 증가하였다. 방사선조사 후 24시간 후에 0.5~1, 1~2, 2~5 Gy구간의 아포프토시스율의 증가는 비교적 저 선량 영역인 0.5~1, 1~2 Gy에서 2~5 Gy 구간보다 더 큰 기울기를 보였고, 48, 72시간 후에도 0.5~1 Gy구간에서 가장 큰 기울기를 보였다.

결론 : 유세포계측검사는 10 mL의 혈액으로 15개의 검사 결과를 낼 수 있었으므로 한 검사당 1 mL 미만의 혈액으로도 충분히 검사할 수 있겠으며, 방사선량 증가에 따라 반응의 정도도 증가하였으며, 아포프토시스 관찰 시기는 혈액 채취 후 24시간이나 48시간 후가 적절하다고 사료된다.

핵심용어 : 림프구, 말초혈액, 방사선조사, 아포프토시스

서 론

방사선조사가 면역 기능에 미치는 효과는 복잡하며, 이는 면역 기능에 관련된 면역 세포들이 체내에서 이동하는 것과 어떤 미세환경에 찾아가서 위치하느냐에 따라 다르다고 한다.^{1~7)} 면역 세포들 중에서도 혈액내의 림프구들은 몸에서 가장 방사선에 민감한 세포이며 백혈구 중 가장 방사선에 민감하다.¹⁾ 방사선치료가 환자의 면역에 미치는 영향을 고려함에 있어서 주로 관심을 갖는 경우는 전신 방사선조사를 시행할 경우와 조사야의 크기가 매우 커서 골수의 많은 비율이 포함되는 경우이며, 임상에서 주로 시행하는 방사선치료는 국소적인 치료이기 때문에 부분 방사선조사라고 할 수

있기에 이는 면역반응에 대해 제한적인 효과 만을 가지고 있다고 알려져 있다.¹⁾

그러나 다른 부위에 비해 흉부에 방사선치료를 할 때는 부분 방사선조사라 하더라도 조사야 내에 심장과 큰 혈관들이 있어서 다른 부위에 비해 보다 더 많은 수의 혈액 내 림프구들이 방사선 치료 시마다 방사선을 조사 받을 수 있고,^{8,9)} 저 선량의 방사선으로 림프구의 아포프토시스가 유도될 수도 있기 때문에 림프구에 대한 방사선의 영향을 고려할 필요가 있다고 본다.^{10~14)} 이전 연구에서 폐암 환자의 종격동 방사선조사 후에 현저한 림프구 감소를 관찰하였는데,⁸⁾ 종격동 방사선조사시 방사선 치료 부위에 포함되는 골수는 극히 일부임에도, 백혈구 중 림프구 비율의 감소가 특징적이어서 이는 림프구들이 조사야 내에 흐르는 혈액 내에서 방사선을 조사 받기 때문에 림프구의 선택적인 감소가 초래되었을 가능성이 시사된 바 있다.

본 연구는 항 후 임상에서 1회 또는 2, 3회의 방사선치료 후 유도되는 림프구의 아포프토시스 정도를 측정하여 방사선치료로 인한 체내 전체 림프구들이 받는 방사선량을 알아 보는데 기초 자료로 활용코자, 방사선에 의해 유도되는 림프

이 논문은 2002년도 조선대학교병원 선택진료학술연구비에 의하여 연구되었음.

이 논문은 2002년 9월 13일 접수하여 2003년 2월 14일 채택되었음.

책임저자: 오윤경, 조선대학교병원 치료방사선과

Tel : 062)220-3245, Fax : 062)227-7757

E-mail : ykoh@chosun.ac.kr

구의 아포프토시스를 정상 성인의 말초 혈액에서 유세포계측검사로 측정할 때 소량의 혈액으로도 검사가 가능한가를 알아보고, 선량 증가와 방사선조사 후 시간 경과에 따른 반응의 정도를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

건강한 성인으로서 본 연구를 위해 자원한 남녀 11명(23~30세, 남자 8명, 여자 3명)을 선정하여 연구대상으로 적용하였다.

2. 림프구 분리 및 방사선조사

말초혈액 10 mL를 conical tube로 옮긴 다음 6% dextran를 1 mL 첨가한 후 실온에서 20~30분간 세워 두었다. 적혈구 및 혈소판은 중력과 dextran의 응집작용에 의하여 밑으로 가라앉고 혈청과 백혈구는 상층에 뜨게 되며 상층의 혈액을 채취하여 다른 conical tube로 옮긴 후 lymphoprep (Nycomed, Norway) 4 mL를 밑에서부터 채워지도록 투여하였다(underlay). 이것을 4000 rpm의 속도로 20분간 원심분리하면 백혈구와 혈청을 제외한 나머지 혈액성분은 밑으로 가라앉는다. Lymphoprep 상층의 백혈구만을 조심스럽게 채취하여 RPMI-1640 (Gibco-BRL) 배지로 옮기고 X선 조사장치인 선형가속기(Clinac 600C, 6 MV, Varian, USA)를 이용하여 0.5, 1, 2, 5 Gy의 X-선을 조사한 후 24, 48, 72시간 동안 배양하였다.

3. 유세포계측검사(Flow cytometric assay)

아포프토시스가 유발된 세포군을 정량적으로 분석하기 위하여 유세포계측기(flow cytometer: FACScan, Becton-Dickinson, Boston, MA)를 이용하였다. 방사선조사 후 일정기간 배양한 세포를 회수하여 원심 분리하여 얻은 침전물을 인산완충액(PBS; phosphate buffered saline)으로 세척한 후, 80% cold ethanol 을 넣고 30분간 얼음 위에 둔 후 원심 분리하여 ethanol을 완전히 제거한 후 0.1% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 0.05 mg/mL RNase A (50 units/mg), 50 μ g/mL PI (propidium iodide) 용액을 첨가하여 상온에서 18시간 동안 염색한 후 유세포 분석을 이용하여 sub-G1 DNA를 분석하였다.¹⁵⁾

4. DNA fragmentation assay

아포프토시스의 가장 특징적인 생화학적 변화인 DNA 단편화는 endonuclease에 의해 DNA가 180~200 bp 크기의 oligonucleosome으로 잘려지게 되어 전기영동에서 특징적인 사다리 모양을 보이는 현상을 이용해 아포프토시스 발생 여

부를 관찰하였다.¹⁶⁾ 방사선조사 후 24 시간 동안 배양한 세포를 회수하여 원심 분리하여 얻은 침전물을 PBS로 세척한 후, lysis buffer (5 M Guanidine thiocyanate, 25 mM Sodium citrate, 100 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.0)에 용해한 후 동량의 2-propanol을 잘 혼합하여 -20°C 에서 하룻밤동안 방치하여 DNA를 침전 시켰다. DNA pellet을 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 얻어진 DNA 침전물을 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA 침전체를 용해한 후 0.2 mg/mL의 DNase-free RNase를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켜 RNA를 제거하였다. 최종적인 DNA 함량은 260 nm와 280 nm의 spectrophotometer (Beckman, Du-650, Palo Alto, CA)하에서 optical density (OD) 값을 측정하여 DNA를 정량 하였다. DNA 5 μ g을 1.5% agarose gel에서 전기영동(35 V, 2 hr 30 min)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선등 아래에서 DNA ladder pattern을 관찰하였다.

5. 전자현미경 검사

투과전자현미경 관찰을 위해 방사선조사 후 일정기간 배양한 세포를 회수하여 원심 분리하여 얻은 침전물을 sodium cacodylate buffer로 세척한 후, 2.5% glutaraldehyde용액(0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M sodium cacodylate buffer로 세척한 다음 1% OSO₄용액에서 2시간 후 고정을 실시하고 같은 완충용액으로 세척한 뒤 계열 에탄올로 탈수과정을 거친 후 propylene oxide로 치환하였다. Luft 방법에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다.¹⁷⁾ 포매된 조직을 1 μ m 두께로 박절하여 toluidine blue로 염색하고 광학현미경상에서 관찰부위를 결정한 다음 Sorvall MT 5000형 초박절기에서 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 제작하여 nickel grid에 부착하고 Watson 및 Reynolds방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 실시하여 JEM-CX II (80 kV) 투과전자현미경으로 관찰하였다.^{18, 19)}

6. 통계분석

실험 결과는 평균 \pm 표준편차 형태로 나타내며 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student's t-test 또는 one-way ANOVA 방법을 이용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 방사선조사 후 시간 경과에 따른 아포토시스율의 변화

정상인의 혈액으로부터 말초 림프구를 분리한 후 방사선을 조사하지 않고 24, 48, 72시간 동안 배양한 다음 유세포계측기를 이용하여 측정한 아포토시스율(평균±표준오차)은 자발성 아포토시스율(%)로서 그 값이 각각 1.761±0.161, 3.563±0.564, 11.098±2.849이었으므로, 시간 경과에 따라 자발성 아포토시스율이 증가하는 소견을 보였다. 방사선조사 후 24시간 후에 0.5, 1, 2, 5 Gy 군에서의 아포토시스율(%)은 각각 3.163±0.504, 3.935±0.665, 5.446±0.766, 9.090±1.323이었으며, 48시간 후에는 각각 6.490±0.993, 9.678±1.527, 13.170±1.947, 19.472±3.180이었다. 그리고 72시간 후에는 각각 19.644±4.231, 23.208±3.632, 30.018±4.627, 38.061

Table 1. Mean Apoptotic Rate (%) according to Time Interval after Irradiation in Each Radiation Dose (One-way ANOVA)

Dose (Gy)	Mean apoptotic rate after irradiation (hr), n*=11		
	24	48	72
0	1.761	3.563	11.098
0.5	3.163	6.490	19.644
1	3.935	9.678	23.208
2	5.446	13.170	30.018
5	9.090	19.472	38.061

*n: number of sampled persons

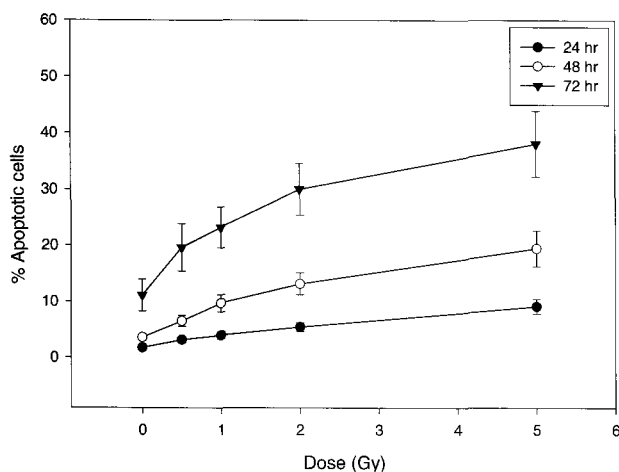


Fig. 1. The time and dose dependence of radiation-induced apoptosis in peripheral lymphocytes are shown. All means were significantly different from the control at the level of *p* value 0.05 when using the Student's *t*-test and one-way ANOVA.

±5.845이었다. 방사선조사 후 24, 48, 72 모든 시간에서 방사선량이 점차 증가함에 따라 아포토시스율은 통계학적으로 의미 있게(*p*<0.05) 증가하였다(Table 1, Fig. 1).

2. 방사선량 구간에 따른 방사선조사 후 아포토시스율의 변화

방사선 조사 후 24시간 후에 0.5~1, 1~2, 2~5 Gy 구간의 아포토시스율의 증가는 그 기울기가 각각 1.544, 1.511, 1.214로 큰 선량 영역인 2~5 Gy보다 비교적 저 선량 영역인 0.5~1, 1~2 Gy에서 더 큰 기울기를 보였으며, 48시간 후의 기울기는 각각 6.376, 3.492, 2.100로 24시간과 마찬가지로 0.5~1 Gy에서 가장 큰 기울기를 보였다. 그리고 72시간 후에는 각각 7.128, 6.810, 2.681로 24시간과 48시간 후에서와 같이 0.5~1 Gy에서 가장 큰 기울기를 보였다(Table 2).

3. DNA fragmentation assay

방사선조사에 의한 세포사멸의 기전이 세포 고사 기전에 의한 함을 확인하기 위하여 말초 림프구에 2, 5, 10 Gy의 방사

Table 2. Slope according to Time Interval after Irradiation in Radiation Dose Interval

Dose (Gy)	Slope according to time interval after irradiation, n*=11		
	24 hours	48 hours	72 hours
0.5~1	1.544	6.376	7.128
1~2	1.511	3.492	6.810
2~5	1.214	2.100	2.681

n: number of sampled persons

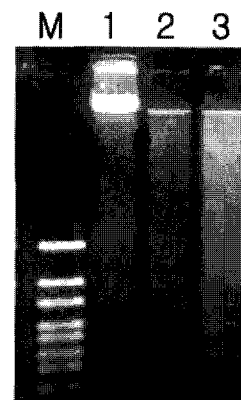


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis pattern of genomic DNA from peripheral lymphocytes. The cells were irradiated with different doses of radiation and incubated for 24 hours. Genomic DNA was isolated and separated on 1.5% agarose gel. DNA stained with ethium bromide and visualized under UV light. Lane 1~3; 0, 2, 5 Gy, M; 100 bp DNA ladder marker.

선량을 조사한 후 24시간 후에 genomic DNA를 추출한 후 전기영동 방법으로 DNA fragmentation을 확인하였다(Fig. 2).

4. 전자현미경 검사 소견

방사선조사 유무와 방사선량에 따른 림프구의 아포토시스의 형태학적 변화를 관찰하기 위한 전자현미경적 검사상 방사선조사를 하지 않는 경우에도 72시간이 지난 경우 일부 세포에서 핵 내 염색질의 농축이 나타나고 핵막 주변에 초승달 형태로 모여드는 소견이 관찰되었다. 일부 세포에서는 핵들이 분절되는 양상을 나타내기도 하였다. 방사선조사를 시행한 경우 선량 증가에 따라 아포토시스의 조직학적 특징에 해당하는 핵 변화를 보이는 세포의 수가 많이 관찰되

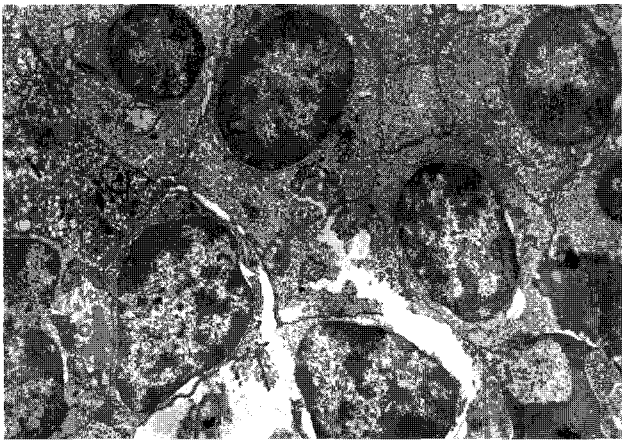


Fig. 3A. Electron microscopic finding of lymphocytes without irradiation at 72 hours after blood sampling. (Uranyl acetate and lead citrate, original magnification $\times 5,300$).

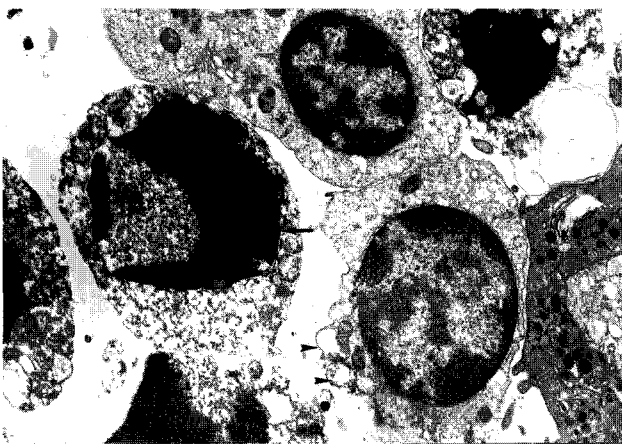


Fig. 3B. Electron microscopic finding of lymphocytes at 72 hours after 5 Gy radiation to the sampled blood. Many lymphocytes showed chromatin clumping with peripheral crescents and some nuclear fragmentation (arrow). Extensive cytoplasmic blebbing (arrowhead) was also noted (Uranyl acetate and lead citrate, original magnification $\times 5,300$).

었다(Fig. 3).

고안 및 결론

생물학적인 선량측정에 있어서 정확하게 생물학적인 손상을 측정하고 방사선피폭과 관계되는 위험률을 측정하는 것은 어려운 일이다. 염색체 이상의 빈도는 방사선피폭의 효과를 잘 알려주는 지표이지만 숙련된 기술을 요하며, Micronucleus assay는 DNA 손상의 간접적인 측정수단으로 좀더 빠르고 기술적인 전문성을 덜 요구하기는 하지만 임상에서 사용하기에 간단하지는 않다.^{13, 20, 21)}

방사선조사는 사람에서 림프구의 아포토시스를 유도시키는 것 중의 하나로 알려져 있다.^{22, 23)} 저 선량의 방사선조사 후에 림프구의 아포토시스를 보이는 증거들이 문헌에 보고되고 있다. Hallan 등의 연구에서는 증식하지 않은 B세포를 인간의 말초 혈액에서 분리시켜 6 Gy의 방사선을 조사 후 24시간동안 배양하여 TUNEL방법(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay)에 의해 측정하여 보았더니 $25 \pm 5.1\%$ 의 세포들이 아포토시스를 일으킨 것이 보고되어 있다.¹⁰⁾ 또한 아포토시스 유도를 건강한 사람의 혈액으로부터 림프구를 추출하여 방사선을 조사하고 24시간 동안 배양한 후 광학현미경으로 정량 분석한 연구도 있었다.¹²⁾ 선량-반응곡선은 1 Gy 이하의 처음 부분은 아포토시스 세포의 수가 급격히 증가하다가 더 높은 선량인 5 Gy 근처에서는 둔마되는 특징적인 소견을 보였다. 이 선량-반응 데이터는 림프구의 높은 방사선 감수성을 확인시켜 주었고 림프구는 아포토시스에 의해 조기에 간기 세포사를 당하는 경향을 증명하여 주었다. 아포토시스의 유도는 LET (linear energy transfer)나 선량율과 무관하게 관찰되어서 증식하지 않는 림프구에서 아포토시스가 유도되는 동안 DNA손상이 DNA복구보다 우세함을 시사한다.¹²⁾ Borcham 등에 의해 사람의 말초 혈액 림프구의 아포토시스를 단기 생물학적 방사선량계로 사용할 수 있는지의 가능성여부를 검사하였는데 림프구에서의 아포토시스 유도는 5 cGy 정도의 낮은 선량 범위에서도 관찰할 수 있었고 각 개인으로부터의 림프구는 재현성의 선량 반응을 보였다.¹³⁾

말초 혈액에서 분리한 림프구에서 방사선조사로 유도된 아포토시스를 측정하는 방법은 여러 가지가 있다. in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay와 fluorescence analysis of DNA unwinding (FADU) 방법도 있고 본 연구에 이용된 유세포계측검사도 있다.^{24~26)} 본 연구에서는 유세포계측검사를 이용하여 10 mL의 혈액으로 15개의 검사를 시행할

수 있었으므로 한 검사당 1 mL 미만의 혈액으로도 충분히 검사할 수 있었기 때문에 방사선치료를 받는 암 환자에서 일반 혈액 검사에 추가하여 시행할 수 있다고 생각된다.

아포프토시스가 일어나는 세포에서 DNA fragmentation이 일어나는데 필요한 시간은 생명체의 종류, 세포의 종류, 유도하는 신호의 종류에 따라 다르다고 한다.²⁷⁾ 시험관 내에서 방사선조사를 받은 사람의 림프구에서는 DNA fragmentation이 일어나는 시기가 6시간에서 72시간 사이이며,²⁴⁾ 세포 배양 상태에 따라 영향을 받을 수 있다고 한다.²⁸⁾ 시험관내에서 세포를 배양할 때 12시간 후가 아닌 24시간 후에 아포프토시스 과정이 현저함이 Hertveldt 등의 연구에서도 보고되었다.²⁹⁾ 일반적으로 아포프토시스는 대개 약 6시간 내에 끝나는, 즉 빨리 일어나는 과정으로 알려져 있다. 그러나 Hertveldt 등에 의하면 시험관내 방사선조사 후 12시간 후에는 사립체 막전위(mitochondria membrane potential)의 감소가 보이지 않았는데 이는 대부분의 세포들이 실험시 Go기에 방사선조사를 받았기 때문으로 설명될 수도 있다고 하였다.²⁹⁾ 이에 본 연구에서도 6시간과 12시간 후 대신에 24시간, 48시간, 72시간 후에 아포프토시스를 관찰하였다. 방사선조사 후 24, 48, 72시간 등 모든 시간에서 방사선량이 점차 증가됨에 따라 아포프토시스율은 의미 있게 증가하였지만 비교적 저선량인 1 Gy보다 낮은 0.5 Gy에서 더 많은 아포프토시스가 관찰되기도 하였다(hypersensitivity). 0.5~0.6 Gy 아래의 선량에서의 hypersensitivity가 일어난다는 보고가 있으며^{30~34)} 이러한 hypersensitivity는 방사선조사 후 24 시간 이후에 관찰된다고 하였다. 또한, 아포프토시스 관찰시기는 혈액 채취 후 24시간이나 48시간 후가 적절하리라고 보며, 72시간 후에는 아포프토시스가 너무 많이 나타나기 때문에 적절하지 않다고 본다.

결론적으로 유세포계측검사는 10 mL의 혈액으로 15개의 검사 결과를 낼 수 있었으므로 한 검사당 1 mL 미만의 혈액으로도 충분히 검사할 수 있었으며, 방사선량 증가에 따라 반응의 정도도 증가하였으며, 아포프토시스 관찰시기는 혈액 채취 후 24시간이나 48시간 후가 적절하다고 사료된다. 또한 본 연구의 결과는 항 후 임상에서 1회 또는 2, 3회의 흉부 방사선조사 후 유도되는 림프구의 아포프토시스 정도를 말초 혈액에서 측정하여 국소적인 방사선치료로 인해 체내 전체 림프구들이 받는 방사선량을 추정하는데 기초 자료로 활용될 수 있겠다.

참 고 문 헌

- Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. 5th ed. Philadelphia;
- Lippincott Williams & Wilkins, 2000:347-349
- Nakayama Y, Makino S, Fukuda Y, et al. Varied effects of thoracic irradiation on peripheral lymphocyte subsets in lung cancer patients. Intern Med 1995;34:959-965
- Nollert J, Rudat V, Daniel V, Maier H, Dietz A. Effect of primary radiochemotherapy on cellular and subcellular immunologic parameters. HNO 1999;47:1058-1062
- Maier H, Daniel V, Heimlich F, Frank C, Opelz G. Cellular immune defect caused by postoperative irradiation in patients with squamous epithelial carcinomas of the upper aerodigestive tract. HNO 1995;43:364-370
- Louagie H, Eijkeren M, Philippe J, Thierens H, Ridder L. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy. Int J Radiat Biol 1999;75:767-771
- Choi YM, Kim JK, Lee HS, Hur WJ, Kim JM. Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood after radiotherapy. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 1996;14:229-236
- Ahn SJ, Chung WK, Nah BS, Nam TK, Cho CK, Juhng SW. Study on the immunomodulatory effect of thymulin in the patients under radiotherapy. J Korean Cancer Assoc 1995;27:790-796
- Oh YK, Ha CS, Park HC, et al. Lymphopenia after mediastinal irradiation in lung cancer. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 2002;20:34-40
- Abrams RA, Lichter AS, Bromer RH, Minna JD, Cohen MH, Deisseroth AB. The hematopoietic toxicity of regional radiotherapy. Cancer 1985;55:1429-1435
- Hallan E, Blomhoff HK, Smeland EB, Lomo J. Involvement of ICE (Caspase) family in gamma-radiation-induced apoptosis of normal B lymphocytes. Scand J Immunol 1997;46:601-608
- Kern P, Keilholz L, Forster C, Seegenschmiedt MH, Sauer R, Herrmann M. In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. Int J Radiat Biol 1999;75:995-1003
- Vral A, Cornelissen M, Thierens H, et al. Apoptosis induced by fast neutrons versus ⁶⁰Co gamma-rays in human peripheral blood lymphocytes. Int J Radiat Biol 1998;73:289-295
- Boreham DR, Gale KL, Maves SR, Walker JA, Morrison DP. Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter. Health Phys 1996;71:685-691
- Seki H, Kanegane H, Iwai K, et al. Ionizing radiation induces apoptotic cell death in human TcR-gamma/delta+ T and natural killer cells without detectable p53 protein. Eur J Immunol 1994;24:2914-2917
- Telford WG, King LE, Fraker PJ. Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. Cell Prolif 1991;24:447-459
- Mogil RJ, Shi Y, Bissonnette RP, Bromley P, Yamaguchi I, Green DR. Role of DNA fragmentation in T cell

- activation-induced apoptosis in vitro and in vivo. *J Immunol* 1994;152:1674-1683
17. **Luft JH**. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 1961;9:409-414
18. **Watson ML**. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophysic Biochem Cytol* 1958; 226:475-479
19. **Reynolds ES**. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-212
20. **Lloyd DC**. Advances in cytogenetic dosimetry. In: Ricks RC, Fry SA, eds. The medical basis for radiation accident preparedness. New York: Elsevier Science. 1990:479-488
21. **Muller WU, Streffer C**. Biological indicators for radiation damage. *Int J Radiat Biol* 1991;59:863-873
22. **Sellins KS, Cohen JJ**. Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 1987; 139:3199-3206
23. **Delic J, Morange M, Magdelenat H**. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte gamma-irradiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1993;13:4875-4883
24. **Cregan SP, Boreham DR, Walker PR, Brown DL, Mitchel REJ**. Modification of radiation-induced apoptosis in radiation- or hyperthermia-adapted human lymphocytes. *Biochem Cell Biol* 1994;72:475-482
25. **Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z**. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993b;53:1945-1951
26. **Birnboim HC, Jevcak JJ**. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. *Cancer Res* 1981;41: 1889-1892
27. **Kerr JFR, Winteford CM, Harmon BV**. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73: 2013-2026
28. **Eidus LK, Korystov YN, Dobrovinskaja OR, Shaposhnikova VV**. The mechanism of radiation-induced interphase death of lymphoid cells: a new hypothesis. *Radiat Res* 1990;123:17-21
29. **Hertveldt K, Philippe J, Thierens H, Cornelissen M, Vral A, Ridder LD**. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1997;71:429-433
30. **Joiner MC, Denekamp J, Maughan RL**. The use of 'top-up' experiments to investigate the effect of very small doses per fraction in mouse skin. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1986;49:565-580.
31. **Parkins CS, Fowler JF**. The linear quadratic fit for lung function after irradiation with X-rays at smaller doses per fraction than 2 Gy. *Br J Cancer Suppl* 1986;7:320-323.
32. **Joiner MC, Johns H**. Renal damage in the mouse: the response to very small doses per fraction. *Radiat Res* 1988; 114:385-398
33. **Marples B, Joiner MC**. The elimination of low-dose hypersensitivity in Chinese hamster V79-379A cells by pretreatment with X rays or hydrogen peroxide. *Radiat Res* 1995;141: 160-169
34. **Joiner MC**. Induced radioresistance: an overview and historical perspective. *Int J Radiat Biol* 1994;65:79-84

Abstract

Radiation-Induced Apoptosis of Lymphocytes in Peripheral Blood

Yoon Kyeong Oh, M.D.^{*†}, Tae Bum Lee, M.S.[†], Taek Keun Nam, M.D.^{*†},
Keun Hong Kee, M.D.^{††} and Cheol Hee Choi, M.D.^{†§}

^{*}Department of Therapeutic Radiology, [†]Medical Research Institute, ^{††}Department of Pathology,
[§]Department of Pharmacology, Chosun University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: This study quantitatively evaluated the apoptosis in human peripheral blood lymphocytes using flow cytometry, and investigated the possibility of using this method, with a small amount of blood, and the time and dose dependence of radiation-induced apoptosis.

Materials and methods: Peripheral blood lymphocytes were isolated from the heparinized venous blood of 11 healthy volunteers, 8 men and 3 women, with each 10 ml of blood being divided into 15 samples. The blood lymphocytes were irradiated using a linear accelerator at a dose rate of 2.4 Gy/min, to deliver doses of 0.5, 1, 2 and 5 Gy. The control samples, and irradiated cells, were maintained in culture medium for 24, 48 and 72 hours following the irradiation. The number of apoptotic cells after the in vitro X-irradiation was measured by flow cytometry after incubation periods of 24, 48 and 72 hours. We also observed the apoptotic cells using a DNA fragmentation assay and electron microscopy.

Results: The rate of spontaneous apoptosis increased in relation to the time interval following irradiation (1.761 ± 0.161 , 3.563 ± 0.564 , 11.098 ± 2.849 , at 24, 48, and 72 hours). The apoptotic cells also increased in the samples irradiated with 0.5, 1, 2 and 5 Gy, in a radiation dose and time interval after irradiation manner, with the apoptosis being too great at 72 hours after irradiation. The dose-response curves were characterized by an initial steep increase in the number of apoptotic cells for irradiation doses below 2 Gy, with a flattening of the curves as the dose approached towards 5 Gy.

Conclusion: The flow cytometric assay technique yielded adequate data, and required less than 1 mL of blood. The time and dose dependence of the radiation-induced apoptosis, was also shown. It is suggested that the adequate time interval required for the evaluation of apoptosis would be 24 to 48 hours after blood sampling.

Key Words: Lymphocyte, Blood, Radiation, Apoptosis