

## 돼지 림프구의 미소핵 형성을 지표로 방사선 생물학적 선량측정법 확립

김세라 · 이해준 · 이진희 · 강창모<sup>1</sup> · 김태환<sup>2</sup> · 조성기<sup>3</sup> · 김종춘 · 김성호\*

전남대학교 수의과대학

<sup>1</sup>원자력의학원

<sup>2</sup>경북대학교 수의과대학

<sup>3</sup>한국원자력연구소

(게재승인: 2004년 8월 16일)

## Establishment of micronucleus assay as biological dosimetry in pig lymphocytes after gamma-irradiation

Se-ra Kim, Hae-june Lee, Jin-hee Lee, Chang-mo Kang<sup>1</sup>, Tae-hwan Kim<sup>2</sup>,  
Sung-kee Jo<sup>3</sup>, Jong-choon Kim and Sung-ho Kim\*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>1</sup>Korea Institute of Radiological & Medical Science, Seoul 139-240, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

<sup>3</sup>Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea

(Accepted: August 16, 2004)

**Abstract :** The purpose of the present experiment was to investigate the micronuclei(MN) frequency in cytokinesis-blocked(CB) cells after various doses of gamma-rays in pig (Landrace, male, 3-month-old) and so to contribute to the clarification of the question whether these species are suitable as a target organism in the test system. The frequencies of binucleated cells, and gamma-ray-induced MN in CB cells at several doses were measured in three donors. The peaks of binucleated lymphocyte formation(22%) were found at a concentration of 2% phytohaemagglutinin(PHA) and 4 µg/ml Cytochalasin B(Cyt-B) in pig at 72 hours after incubation. 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  $y = 0.0183D + 0.0124D^2 + 0.0133$  ( $y =$  number of MN/CB cells and  $D =$  irradiation dose in Gy). In conclusion, the results demonstrate that it appears feasible to use pig as target organisms in the micronucleus test to estimate the cytogenetic damage caused by ionizing radiations or, potentially, chemical compounds.

**Key words :** micronuclei, pig, lymphocyte, radiation

### 서 론

방사선의 생물학적 선량측정은 동물체에서 방사선에 의해 유도되는 변화를 측정하여 방사선의 피폭량을 파악하는 것이다. 방사선 피폭의 선량측정은 직업적, 질병 치료시 또는 불의의 사고에 의한 방사선 피폭의 경우가

장 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, 선량

본 연구는 과학기술부 원자력연구개발사업의 지원으로 수행되었음.

\*Corresponding author: Sung-ho Kim

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
[Tel: +82-62-530-2837, Fax: +82-62-530-2841, E-mail: shokim@chonnam.ac.kr]

측정에 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 [16, 21].

방사선 오염 유무판단에 가장 많이 적용되는 생물학적 선량측정은 혈액내 림프구의 수적 변동이며 [8] 이외에도 이동원체(dicentric)과 동원체륜(centric ring)의 계측을 중심으로 한 염색체 분석법이 몇몇 방사선 사고시 적용 측정되었다 [5, 7, 11, 12, 20]. 그러나 혈액세포의 수적 변화는 줄기세포(stem cell) 및 세포성숙계로 부티의 이용 가능 정도, 시간 경과 후의 세포사멸에 의한 수적 소실의 비율, 비장과 같은 혈액보유장기 상태 등의 변화에 따른 혈구수치의 차이로 인한 해석상의 문제점이 있으며 [8] 염색체분석법은 재료의 제작 및 분석에 많은 시간과 노력 있어야 하고, 또한 상당한 수준의 숙련된 기술이 있어야 할 수 있다는 단점이 있다 [11, 18]. 골수 세포를 이용하는 전통적인 미소핵 검사에 비하여 세포질분열 차단 림프구를 이용한 미소핵 검사는 일회 분열의 확인 및 미분열세포의 배제가 가능하기 때문에 현재 방사선생물학 분야에서 선량측정 및 반응조절물질의 효과 검증 시험에 많이 적용되고 있다 [2, 10, 14, 18, 19, 23].

지금까지 림프구의 미소핵 형성을 지표로 한 연구는 주로 인체를 대상으로 적용되어 왔으나 가축을 비롯한 동물에서의 연구는 미미하다. 본 연구에서는 인체와 많은 유사점을 가지고 있는 돼지에서 방사선 조사 후 순환 림프구에서 이핵세포의 유도조건 및 미소핵의 측정 가능성 등을 파악하여, 돼지를 방사선 생물학적 지표 적용 동물로서 평가하기 위한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험세포 및 배양

건강한 3두의 돼지(Landrace, 수컷, 3개월령)의 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 ml 당  $5 \times 10^5$ 개의 농도로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배지 ml 당 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.

### 방사선 조사

분리된 림프구는 멸균된 polystyrene tube(Falcon, Becton Dickinson)에 분주하여 PHA 첨가 직전에 0, 1, 2, 4 Gy의 <sup>60</sup>Co 감마선을 1000 cGy/min의 선량율로 1회 조사(Gammacell 3000 Elan, Nordion International Co., Canada)하였다.

### Cytokinesis-blocked method

Cyt-B는 dimethylsulphoxide(Sigma)에 ml 당 2 mg의 양으로 원액을 만들어 -70°C에 보관하였으며 실험을 통하여 얻어진 최적용량을 적용하여 배양 44시간에 첨가하였다. 배양개시 후 72시간에 세포를 수확하였으며 cyto centrifuge를 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 판정하였다 [2]. 모든 성적의 분석은 Graph PAD In Plot program을 사용하였다.

## 결 과

CB 림프구, 즉 2개의 핵을 가진 림프구의 유도정도는 PHA 2% 투여군에서 높게 유도되었고, Cyt-B의 첨가량이 증가할수록 전체림프구에 대한 CB 림프구의 유도율은 증가하였으나 4핵세포의 유도율과 Cyt-B 자체의 세포독성을 고려하여 최적농도는 4 µg/ml가 최적 조건으로 선택되었다. 위의 조건에서 배양된 림프구에서 CB 림프구는 22% 였다(Table 1).

미소핵의 발생 양상은 Fig. 1 및 Table 2, 3과 같다. 방사선을 조사하지 않은 림프구에서 자연발생 미소핵은 500개의 이핵림프구 당 평균 5.67개였다. 방사선 조사

**Table 1.** The frequency of binucleated cells in lymphocyte of pig

Number of nucleus	Concentration of PHA (%) and Cyt-B (µg/ml of medium)							
	1%				2%			
	2	4	6	12	2	4	6	12
1	94	83	85	82	94	77	75	78
2	6	17	14	16	6	22	21	18
4	0	0	1	2	0	1	4	4

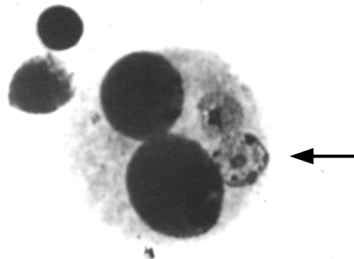


Fig. 1. Photomicrograph of cytokinesis-blocked lymphocyte containing two micronuclei(arrow). Diff Quik stain, X1000.

Table 2. Micronuclei (MN) per 500 cytokinesis-blocked lymphocyte following irradiation of pig

Experimental group	No. of cells without MN	Number of MN per cell				Total number of MN
		1	2	3	4	
donor 1						
0 cGy	495	5				5
100 cGy	474	22	4			30
200 cGy	462	32	6			44
400 cGy	393	80	22	4	1	140
donor 2						
0 cGy	493	7				7
100 cGy	479	19	2			23
200 cGy	459	34	6	1		49
400 cGy	392	79	23	6		143
donor 3						
0 cGy	495	5				5
100 cGy	476	21	3			27
200 cGy	461	32	7			46
400 cGy	390	79	25	6		147

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

Dose(cGy)	Micronuclei per CB cell (M±SD)
0	0.013±0.002
100	0.053±0.007
200	0.093±0.005
400	0.287±0.007

림프구에서는 방사선 조사 용량에 따라 미소핵의 발생은 용량에 비례하여 증가하였으며 Table 3의 림프구 당 미소핵의 발생을 기준으로 linear-quadratic model을 적용

하여 얻은 곡선식은  $y=0.0183D+0.0124D^2+0.0133(y=CB \text{ 세포당 MN의 수, } D=\text{방사선 조사량 Gy})$ 였다.

### 고 찰

동물은 주위 환경에 존재하는 여러 가지 유해물질에 영향을 받는다. 방사선을 비롯한 물리적 유전장해 유발물질 및 농약 등의 화학적 유전장해 유발물질에 의해 돌연변이, 대사장애, 생식이상, 면역저하 등의 증상을 일으킬 수 있다. 특히 애완동물을 비롯한 가축은 인간의 생활환경을 공유한다는 관점에서 대상 자체의 장애뿐만 아니라 인간에 대한 유해인자의 작용을 대변할 수 있어 주위 환경의 유해성 평가 분야에서 매우 중요하다 [3].

방사선 피폭에 대한 생물학적 선량측정 방법으로 세포유전학적 분석법인 미소핵검사시 림프구를 주로 사용하는데, 이는 비교적 수명이 길고, 정상상태에서는 분열하지 않으며 표본의 채취가 용이하기 때문이다 [5, 11, 12, 20]. 또한 기존의 염색체 분석법에 비하여 미소핵검사는 염색체 검사에 관한 특별한 숙련이나 기술 없이도 분석이 비교적 쉬우며 단기간에 수행될 수 있다. 특히 세포질분열 차단 림프구의 사용에 따라 방사선생물학 분야의 연구가 더욱 용이하게 되었다 [2, 10, 19, 23]. 미소핵은 전리방사선의 직접효과 또는 free radicals에 의한 염색체의 무중심절분열(acentric fragment), 두개 이상의 centromere 존재, kinetochore의 결손 또는 방추사의 손상 등에 의해 세포분열 시 주핵(main nucleus)에 포함되지 못해 형성되는 것으로 알려져 있다 [2, 10, 19, 24].

돼지는 중부동원체(metacentric)형의 염색체를 가진 동물로서 핵 및 DNA의 양이 인체와 유사한 것으로 알려져 있다 [13]. 돼지 유래 세포에서 미소핵의 측정에는 모두 미성숙적혈구에서 형성된 미소핵을 관찰하는 방법을 적용한 연구 [17, 25, 26]로서 세포질 분열차단 림프구에서의 관찰은 전무하다. 사람 및 기타 동물 유래 림프구에서 방사선에 대한 감수성의 비교는 염색체이상 관찰 연구가 보고되어있으며 동물 종간의 감수성 차이는 림프구 동태(lymphocyte kinetics), 핵의 용량, DNA의 양, 염색체 수 또는 염색체팔 수(arm number) 등이 관계된다는 가설 [4, 9, 15, 22]이 제시되었으나 확실한 결론적 근거는 밝혀지지 않았으며, 염색체 이상 또는 미소핵 형성 시험에 있어서 장애의 판별은 DNA 손상의 지표와 함께 세포의 생존율을 동시에 관찰하는 것이 필요하다는 주장이 제시되었다 [6]. 따라서 각 동물에 대한 직접적인 연구의 결과 도출이 필요한 실정이다.

변이 유발물질 검색의 최종 목표가 인체에 대한 직접적 효과 검사 또는 결국 인체에 대한 외삽 가능성의 파악이라는 관점에서 대상 동물의 결과와 사람에서의 성

적에 대한 직접적인 비교분석이 요구된다. 본 연구의 결과를 사람에서의 성적 [1]과 비교할 때 돼지의 림프구 이핵세포 유도는 PHA 2%, Cyt-B 4  $\mu$ g 상태에서 사람 (31%)에 비하여 다소 낮은 22%의 유도율을 보였고 이는 세포 분열의 시간과 반응의 차이에 기인되는 것으로 생각되나 미소핵 형성 시험의 수행에는 충분한 유도율을 보였다. 이핵세포의 유도율은 동물의 종 및 시험상태에 따라 달라질 수 있으며 이핵세포 유도율과 무관하게 세포손상에 의한 미소핵 발생시 미소핵을 포함한 상태의 이핵세포 유도율은 다른 양상을 나타낼 가능성이 있으나 [6], 본 연구의 결과 돼지의 경우 미소핵을 포함한 이핵세포 유도율도 높게 유지되었으며, 미소핵 형성은 200 cGy의 방사선 용량을 기준으로 사람에 비하여 낮게 나타나 0.28의 감수성을 보였다. 이는 기존의 염색체분석에서 이동원체(dicentric) 형성을 기준으로 한 비교에서의 수치인 0.33과 유사하였다 [13].

돼지에서의 결과를 사람에서의 결과 추론을 위한 비교 대상으로 적용하기 위하여 돼지를 대상으로 한 이핵세포 배양조건과 미소핵 관찰 시기를 사람유래 림프구와 동일한 조건에서 수행한 본 연구의 결과는 방사선 피폭의 정도를 파악하고자 하는 일련의 생물학적 선량 측정 연구에서 대상 동물 종의 확대 및 다양화 등의 관점에서 기초 자료로 적용될 수 있을 것으로 생각되며, 또한 방사선을 포함한 다양한 환경오염물질에 의한 세포유전학적 손상정도를 측정하기 위한 동물 종 및 실험법으로 이용 가능할 것으로 생각된다.

## 결 론

변이 유발물질 검색의 최종 목표가 인체에 대한 직접적 효과 검사 또는 결국 인체에 대한 외삽 가능성이라는 관점에서 돼지 림프구를 사용하여 세포질 분열 차단 세포의 유도 정도와 방사선에 의한 미소핵 발생 양상을 관찰하고 방사선 피폭의 생물학적 선량측정 연구에 적용 가능한 실험동물로의 선택 가능성 등을 파악하고자 하였다. 세포질 분열 차단법을 적용한 이핵림프구의 유도는 2%의 PHA와 배지 ml 당 4  $\mu$ g의 Cyt-B를 적용한 배양조건에서 22%로 최고치를 나타냈다. 방사선 조사에 따라 유도되는 미소핵을 linear-quadratic model에 적용하여 얻은 곡선식은  $y=0.0183D+0.0124D^2+0.0133$  ( $y=CB$  세포당 MN의 수,  $D=$ 방사선 조사량 Gy)였다. 본 연구의 결과는 다양한 동물 종을 대상으로 방사선 피폭의 정도를 파악하고자 하는 일련의 생물학적 선량 측정 연구에 이용할 수 있을 것으로 생각되며, 또한 방사선을 포함한 기타 환경오염물질에 의한 세포유전학적 손상정도를 측정하기 위해서도 적용 가능할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 류시윤, 강빛나, 김호준, 김태환, 정규식, 김세라, 이해준, 김성호, 안미영. 사람, 토끼 및 개 유래 말초혈액 림프구의 미소핵을 이용한 방사선 피폭의 생물학적 선량측정. 대한수의학회지. 2002, 42, 1-6.
2. Almasy, Z., Krepinsky, A. B., Bianci, A. and Koteles, G. J. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection. A review. Appl. Radiat. Isot. 1987, 38, 241-249.
3. Backer, L. C., Grindem, C. B., Corbett, W. T., Cullins, L. and Hunter, J. L. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. Sci. Total Environ. 2001, 274, 161-169.
4. Brewen, J. G., Preston, R. J., Jones, K. P. and Gosslee, D. G. Genetic hazards of ionizing radiations: cytogenetic extrapolations from mouse to man. Mutat. Res. 1973, 17, 245-254.
5. Brewen, J. G., Preston, R. J. and Littlefield, L. G. Radiation-induced human chromosome aberration yields following an accidental whole-body exposure to  $^{60}\text{Co}$  gamma-rays. Radiat. Res. 1972, 49, 647-656.
6. Catena, C., Asprea, L., Carta, S., Tortora, G., Conti, D., Parasacchi, P. and Righi, E. Dose-response of X-irradiated human and equine lymphocytes. Mutat. Res. 1997, 373, 9-16.
7. Chung, H. W., Kim, S. Y., Sohn, E. H. and Ha, S. W. Analysis of chromosome aberrations in nuclear-power-plant workers considering the lifetime of lymphocytes. Int. J. Radiat. Biol. 2000, 76, 923-927.
8. Fieldner, T. M., Nothdurft, W. and Steinbach, K. H. Blood cell changes after radiation exposure as an indicator for hemopoietic stem cell function. Bone Marrow Trans. 1988, 3, 77-84.
9. Griffin, C. S., Scott, D. and Papworth, D. G. The influence of DNA content and nuclear volume on the frequency of radiation-induced chromosome aberrations in Bufo species. Chromosoma. 1970, 30, 228-230.
10. He, J. L., Jin, H. Y., Jin, L. F. and Gao, S. Y. Monitoring of human exposure to radiation with the binucleated lymphocyte micronucleus assay. Biomed. Environ. Sci. 2000, 13, 32-36.
11. IAEA. Biological dosimetry : chromosomal aberration analysis for dose assessment, Technical report 260. IAEA publications, Vienna, 1986.
12. IAEA. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A review of methods. Vienna: IAEA-SM-199/4, IAEA publications,

- Vienna, 1969.
13. **Ishihara, T. and Sasaki, M.** Radiation-induced chromosome damage in man, pp. 561-583, Alan R. Liss, Inc, New York, 1983.
  14. **Kim, S. H., Han, D. U., Lim, J. T., Jo, S. K. and Kim, T. H.** Induction of micronuclei in human, goat, rabbit peripheral blood lymphocytes and mouse splenic lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiation. *Mutat. Res.* 1997, **393**, 207-214.
  15. **Leonard, A., Gerber, G. B., Papworth, D. G., Decat, G., Leonard, E. D. and Deknudt, G.** The radiosensitivities of lymphocytes from pig, sheep, goat and cow. *Mutat. Res.* 1976, **36**, 319-332.
  16. **Lloyd, D. C.** An overview of radiation dosimetry by conventional cytogenetic method, pp. 3-13, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
  17. **Ludewig, E., Koch, F., Kamprad, F. and Melzer, R.** The micronucleus test in pigs: induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes by various doses of X-rays. *Mutat. Res.* 1991, **249**, 1-6.
  18. **Müller, W.-U. and Streffer, C.** Biological indicators for radiation damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 1991, **59**, 863-873.
  19. **Ramalho, A., Sunjevaric, I. and Natarajan, A. T.** 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.
  20. **Ramalho, A. J., Nascimento, A. C. H. and Natarajan, A. T.** Dose assessments by cytogenetic analysis in the Goiania(Brasil) radiation accident. *Radiat. Protect. Dosimetry.* 1988, **25**, 97-100.
  21. **Stenphan, G., Hadnagy, W., Hammermaier, C. and Imhof, U.** Biologically and physiologically recorded doses after an accidental exposure to <sup>60</sup>Co gamma-rays. *Health Phys.* 1983, **44**, 409-411.
  22. **Tamura, H., Sakurai, M. and Sugahara, T.** Chromosome aberrations of the peripheral lymphocytes in rabbits exposed to single and fractionated whole-body X-irradiations. *J. Radiat. Res.* 1978, **19**, 108-114.
  23. **Thierens, H., Vral, A., Morthier, R., Aousalah, B. and De Ridder, L.** Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay. *Mutagenesis.* 2000, **15**, 245-249.
  24. **Thomson, E. J. and Perry, P. E.** The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploid. *Mutagenesis.* 1988, **3**, 415-418.
  25. **Zuniga, G., Torres-Bugarin, O., Ramirez-Munoz, M. P., Ramos, A., Fanti-Rodriguez, E., Portilla, E., Garcia-Martinez, D., Cantu, J. M., Gallegos-Arreola, M. P. and Sanchez-Corona, J.** Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 35 mammalian species. *Mutat. Res.* 1996, **369**, 123-127.
  26. **Zuniga-Gonzalez, G., Torres-Bugarin, O., Zamora-Perez, A., Gomez-Meda, B. C., Ramos-Ibarra, M. L., Martinez-Gonzalez, S., Gonzalez-Rodriguez, A., Luna-Aguirre, J., Ramos-Mora, A., Ontiveros-Lira, D. and Gallegos-Arreola, M. P.** Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat. Res.* 2001, **494**, 161-167.