2000춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

붕소화합물이 처리된 자주달개비 체세포 돌연변이 유발에 있어서 중성자의 상대생물효과비 변화

Relative Biological Effectiveness of Neutrons for Inducing Somatic Cell Mutations in *Tradescantia* Pretreated With Boron Compound

김진규, 이영일
한국원자력연구소, 대전시 유성구 덕진동 150, 305-353

A. Cebulska-Wasilewska
Institute of Nuclear Physics, Kraków, Poland

요 약

자주달개비 (*Tradescantia* 4430) **수술털 세포에서 중성자에 의해 유발되는 각종 변이를 통하여 붕소화합물에 의한 방사선생물효과 증감 여부를 분석하였다. 정상화서 및 붕소화합물이 전처리 화서를 공기중에서** ^{252}Cf **중성자를** 0 0.2 Gy **조사한 다음 유전자돌연변이와 치사돌연변이를 분석하였다. 중성자의 상대생물효과비** (RBE) **산정을 위한 기준자료는 정상화서에** X**선** 0 0.5 Gy **조사한 실험군의 분석값을 사용하였다. 정상세포의 유전자돌연변이 유발에 있어서 중성자의 최대** RBE**는** 7.2**로 나타났다. 붕소화합물을 전처리에 의해 중성자에 의한 치사돌연변이 유발의** RBE **최대값은** 6.2**에서** 34.3**로 증가되었으며 자사세포 유발의** RBE **최대값은** 1.6**에서** 5.6**으로 각각 증가하였다. 본 결과를 통하여 세포에 붕소화합물을 전처리할 경우 치사돌연변이 유발에 대한 중성자의 방사선생물효율을 크게 증대시킬 수 있음이 실험적으로 입증되었다.**

Abstract

The biological effectiveness of neutrons in the induction of somatic cell mutations was studied in Tradescantia 4430. Inflorescences, normal or pretreated with chemicals containing boron, were irradiated in the air with neutrons (0-0.2 Gy) from a ^{252}Cf source. A group of normal inflorescences were also irrdiated with 0-0.5 Gy of X-ray as a standard beam. The maximal RBE value was 7.2 for inducing gene mutations in the normal inflorescence. For the induction of lethal mutations, the maximal value of RBE changed from 6.2 to 34.3 with pretreatment of boron compound. RBE for the induction of apoptotic cells increased from 1.6 to 5.6 due to the boron pretreatment. The present study provides an experimental proof that boron compound causes the modification of radio-response in cells.

1. 서 론

이온화방사선이 생물체에 미치는 영향을 연구함에 있어 방사선의 생체내 이온화 밀도는 매우 중요한 인자의 하나이다. 선에너지전달 (LET; linear energy transfer)이 큰 중성자의 경우 에너지에 따라서 생체내 에너지 소실 기작이 다를 수 있다는 점이 연구의 어려움을 가중시킨다. 단일에너지 중성자 빔은 대부분의 에너지를 수소핵과의 탄성충돌로 반조양자를 생성함으로써 대부분의 에너지를 잃게되지만 핵반응을 통해 생성되는 다양한 에너지 스펙트럼의 속중성자 그리고 다양한 원소들과의 포획반응을 통해 에너지를 소실하게 되는 열중성자의 경우는 그들의 생물학적 영향을 평가하는 것이 쉽지 않다 [1,2]. 최근 중성자포획반응을 기반으로 낮은 에너지의 중성자를 암치료에 이용하기 위한 노력이 증가되고 있다 [3,4]. ^{10}B의 원자는 열중성자와 반응하여 알파 입자와 리튬 원자핵을 만들어 낸다. 이같은 반응과정을 이용한 치료가 붕소중성자포획치료 (BNCT)이다. 핵분열 중성자에 대한 붕소-중성자 포획반응에 관해서는 많은 것이 밝혀져 있을 뿐 아니라 핵분열 중성자와 유사한 에너지 스펙트럼 특성을 지닌 ^{252}Cf 중성자 또한 의료용으로 많이 활용되고 있기 때문에 본 연구에서는 ^{252}Cf를 선원으로 사용하였다.

자주달개비 수술털세포의 돌연변이에 기초를 두고 있는 TSH assay는 이온화방사선의 생물학적 영향연구는 물론 환경 감시기구로 매우 잘 알려져 있는 실험계이다 [5-12]. 자주달개비는 달개비과에 속하는 초본식물로서 방사선생물학적 연구에 이용하기에 적합한 여러 특성을 지니고 있다 [13]. 화색에 있어 유전적 이형성을 가지고 있는 자주달개비 중에서 클론 02 및 4430가 가장 방사선에 민감하게 반응하는 것으로 밝혀졌다 [13,14]. 수술털 세포는 정상적으로 남색이지만 방사선에 의해 쉽사리 분홍 또는 무색으로 변이되는 유전자 돌연변이를 일으킬 수 있다 [5,15]. 하나의 꽃은 300개 이상의 수술털을 가지고 있고 각 수술털은 약 25개의 세포로 구성되어 있으므로 통계적으로 유의성을 획득하기에 충분한 수의 세포를 분석하는 것이 가능하다 [16].

자주달개비를 이용한 중성자의 생물학적 영향 연구는 잘 알려진 여러 보고에 나타나 있는 바와 같다 [14,16,17]. 본 연구는 기존의 연구에서 시행된 바 없는 방사선과 붕소화합물의 복합적 작용에 의한 영향을 평가하기 위해 실시되었다. 특히 자주달개비 수술털 세포에서 유전자돌연변이 및 치사돌연변이를 유발함에 있어서의 중성자의 상대생물효과비를 결정하고 이를 통하여 붕소화합물이 나타내는 방사선생물학적 영향을 규명하고자 실시되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 자주달개비 식물체

연구에 사용된 식물체는 종간잡종 개체(2n=12) T-4430클론이며 온실조건하에서 증식하였다. 일반 관리는 Underbrink 등[14]에 의해 제시된 절차에 따라 이뤄졌다. 건전하게 생육된 식물체로부터 10개 정도의 화아를 가지고 있는 화서를 절취하여 공시재료로 사용하였으며 storage effect를 배제시키기 위하여 방사선 조사전 24시간 동안 실험실 조건에 순치시켰다[9]. 화서의 절취작업은 이른 아침에 실시하였으며 절취직후 이미 개화한 꽃봉오리를 포함하여 2 4개의 늙은 화아를 제거하고 실험군내의 화서 길이도 균일하도록 재정리하였다.

재정리된 화서는 10 13개씩 묶어 두 조씩 동일 실험군으로 삼았다.

2.2 붕소화합물 전처리

공시재료 화서의 체적은 약 0.15 ml 였으며 $Na_2B_4O_7.10H_2O$ (Borax; Hayashi Pure Chemical Co.) 1% 용액 (^{10}B 240 ppm)을 화서당 20 μℓ씩 방사선 조사 24시간 전에 주입하였다. 화서내에서 균일 분포를 가정할 경우 수술털 세포내 최종농도는 40 ppm이다.

2.3 방사선 조사

중성자 조사를 위해서 한국원자력연구소 검교정용 표준선장 ^{252}Cf 중성자 선원을 사용하였으며 X-선 조사는 한국원자력연구소 표준선장의 X-선 발생장치 (150 kV, 10mA)를 사용하였다. 중성자선원 (약 3.5 GBq)으로부터 1미터 거리에서의 선량률은 0.5 mGy/h로서 시료를 공기중에서 0 20 cGy 선량으로 조사하였고 X-선의 경우는 0 50 cGy를 실험군별로 각각 조사하였다.

2.4 화서 배양

방사선을 조사한 화서군은 Hougland No. 2 solution 6배 희석액 [18]에 침지하여 생장상 내에서 배양하였다. 배양액은 매일 일정량을 보충하였으며 3일에 한번씩 새 배양액으로 교체하였으며 전 배양기간 동안 기포발생기를 이용하여 폭기를 실시하였다. 배양조건은 명기 14시간 동안은 20℃, 습도 80%, 조도 290 μE/m^2/sec를 암기는 10시간, 18℃, 상대습도 85%를 유지하였다.

2.5. 돌연변이분석

실체현미경을 이용하여 배율 25배 하에서 돌연변이를 계수하였다. 채화된 만개상태의 꽃으로부터 6개의 수술 모두를 떼어내 파라핀유가 도말된 슬라이드상에 펴서 검경용 프레파라트를 제작하였다. 돌연변이는 분홍도연변이, 치사돌연변이 (분열중지) 그리고 잠재자사세포로 구분하여 계수하였다. 또한 단일분홍돌연이율을 총분홍돌연변이율로 나누어 방사선 조사에 따른 세포분열주기의 교란을 지표하는 세포주기 인자를 산정하엿다. 돌연변이 세포의 계수는 방사선 조사후 4주 이상 지속적으로 실시되었으며 특히 방사선 조사후 돌연변이율 증가가 두드러진 고조기간의 검경 결과를 통합한 자료로부터 100모당 돌연변이 건수로서의 돌연변이빈도를 표시하였다.

3. 결과 및 토의

일반적으로 방사선 조사후 7 19일 사이의 돌연변이율을 분석하고 그 기간중 돌연변이율의 상승이 두드러진 고조기간을 설정한다. 통상적 표준 고조기간인 방사선 조사후 11일 19일 사이에 분석한 수술털 수는 2,640 8,670이었다. 이 값은 방사선에 조사된 세포와 그들이 분열을 통하여 만들어진 후손 세포들의 총 숫자를 의미하는 것으로 TSH 분석결과의 통계적 유의성을 고려하기에 충분한 대상을 분석하였음을 의미한다 [16]. 본 실험의 결과를 통하여 볼 때 유전자돌연변이율의 고조기간은 방사선 조사후 11 15일에 해당하였으며 반면에

치사돌연변이율의 고조기간은 15 19**일에 해당하는 것으로 구분할 수 있었으나 분석과 상대생물효과비를 산정하기 위하여 사용된 데이터는 표준 고조기간인 방사선조사후** 11**일** 19**일 기간의 통합자료로부터 평균값을 계산하여 사용함으로써 기존의 연구결과와의 비교를 용이하게 하였다. 이러한 분석기간에 걸친 방사선 유발 돌연변이율의 변화를 중성자와** X-**선으로 나누어 표** 1**과 표** 2**에 각각 수록하였다**.

표 1. **중성자 조사에 의해 유발된 전분석기간 평균 돌연변이율**

선량 (cGy)	**치사돌연변이율** (x10)		**분홍돌연변이율** (x10)		**단독분홍돌연변이율** (x10)		**잠재자사세포빈도** (x10)	
	n	B+n	n	B+n	n	B+n	n	B+n
0	0.3±0.1	-	0.3±0.1	0.3±0.1	0.03±0.02	0.06±0.04	-	-
1	1.2±0.4	4.8±1.4	0.8±0.1	1.7±0.2	0.5±0.1	0.7±0.1	0.1	0.3
3	1.1±0.3	8.2±2.3	2.4±0.3	2.8±0.4	1.1±0.2	1.7±0.3	0.7	0.4
5	2.7±0.5	7.8±1.7	4.7±0.4	4.3±0.6	2.2±0.2	2.1±0.3	0.4	0.6
10	3.9±0.8	30.6±7.5	5.5±0.4	4.6±0.5	2.6±0.5	2.6±0.3	0.6	2.7
20	8.8±1.1	21.2±6.7	10.2±0.5	7.1±0.6	5.1±0.5	3.3±0.5	1.5	3.6

표 2. X-**선 조사에 의해 유발된 전분석기간 평균 돌연변이율**

선량 (cGy)	**치사돌연변이율** (x10)	**분홍돌연변이율** (x10)	**단독분홍돌연변이율** (x10)	**잠재자사세포빈도** (x10)
0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.03±0.02	0.0
10	0.7±0.3	1.4±0.3	0.6±0.2	0.1
30	0.8±0.4	3.9±0.5	1.9±0.4	0.3
50	3.0±0.7	7.0±0.4	3.0±0.2	0.3

전체 분석기간에 대한 평균 치사돌연변이율의 중성자 및 X-선에 대한 선량-반응 관계를 그림 1에 나타내다. 방사선의 선질에 따라서 그리고 붕소화합물의 전처리 유무에 따라서 자주달개비 체세포에 유발된 치사돌연변이 빈도에 큰 차이를 보여주고 있다. 자주달개비 체세포에서 일어나는 유전자돌연변이의 범주에는 분홍돌연변이와 무색돌연변이가 포함된다. 무색돌연변이는 발생빈도가 비교적 낮고 때로는 명확한 구분이 곤란할 경우가 있기 때문에 본 연구에서는 분홍돌연변이만을 분석하였다. 중성자와 X-선에 의하여 유발된 분홍돌연변이율의 선량-반응 관계를 그림 2에 나타내었다.

치사돌연변이 및 분홍돌연변이 경우 모두에 있어서 중성자에 의한 돌연변이 유발은 선형-이항식 (linear-quadratic) 선량-반응 관계를 보였으며 특히 20 cGy의 선량영역에서는 포화에 근접하는 양상을 나타내었다. 그림에 표시된 α값은 선형부분의 기울기로 선량증가에 따른 돌연변이율의 증가계수를 의미한다. 한편 X-선에 의한 돌연변이 유발의 경우는 실험선량 전체 영역에 대하여 선형 반응-관계를 나타내었다. 잠재자사세포 유발의 경우는 중성자 및 X-선 모두에 대하여 거의 선형 반응 관계를 나타내었다 (그림 3).

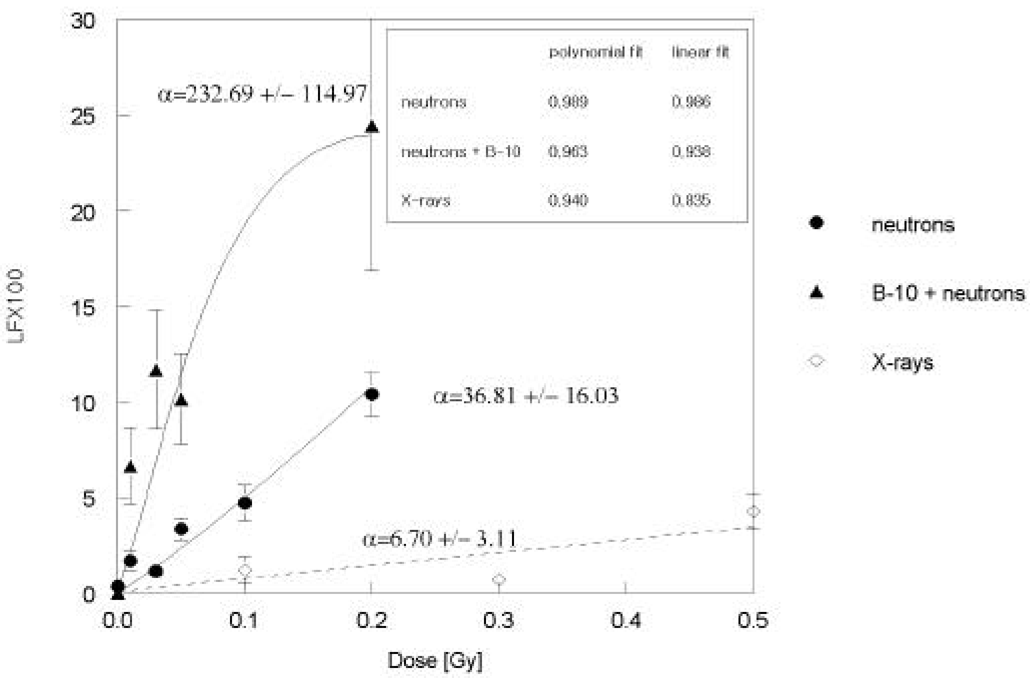

그림 1. 치사돌연변이율의 중성자 및 X-선 선량-반응 관계

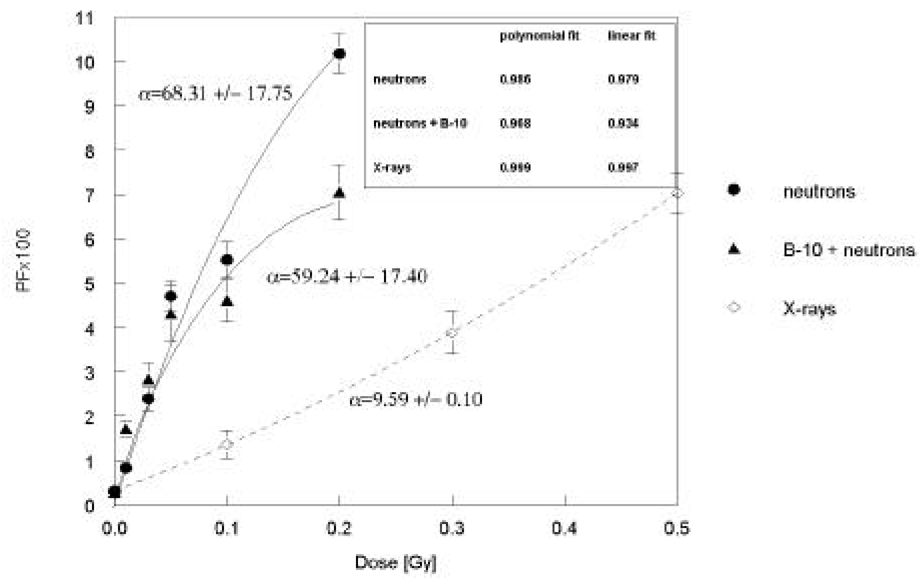

그림 2. **분홍돌연변이율의 중성자 및 X-선에 대한 선량-반응 관계**

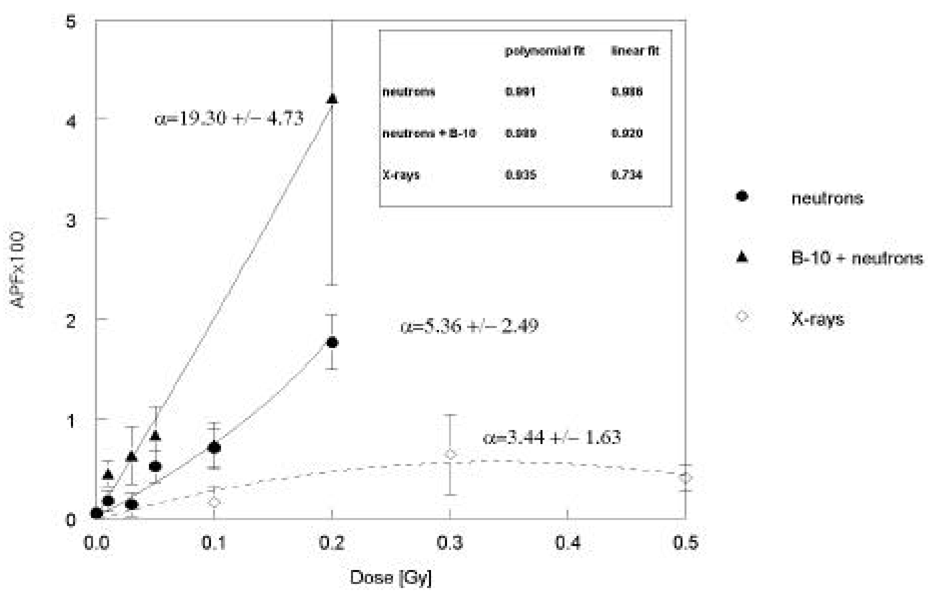

그림 3. **잠재자사세포 빈도의 선량반응 관계**

방사선에 대한 생물학적 반응에 관한 수학모델에 관해서는 J.Kiefer [19]에 잘 기술되어 있다. 이 문헌에 서술된 바와 같이 수학모델을 이용하여 입자방사선의 분포에 따른 돌연변이 유발, 방사선의 상대생물효과비 등에 관해 표현하는 것이 가능하다. 특히 Chadwick과 Leenhouts에 의하여 제시된 '방사선 작용에 관한 분자이론'은 방사선의 생물학적 작용을 설명하는 데 매우 유용하다.

$$M = [1-\exp[-q(\alpha D+\beta D^2)]\}\exp[-(s+p)(\alpha D+\beta D^2)] \quad \text{-------------------} \quad (1)$$

여기서,

M = 돌연변이 빈도

D = 방사선량 (Gy)

α = 단위선량당 에너지 축적에 의해 DNA 두가닥절단 (dsb)이 일어날 확률

β = 단위선량 제곱당 에너지 축적에 의해 DNA dsb가 일어날 확률

q = 유발된 DNA dsb에 의해 특정한 돌연변이가 나타날 확률

s = 유발된 DNA dsb에 의해 특정한 돌연변이 출현이 억제될 확률

p = 유발된 DNA dsb에 의해 세포분열능력 상실이 나타날 확률

(1)식에 따르면 특정한 돌연변이 유발의 억제나 세포분열능력 상실에 의해 돌연변이가 억제되는 확률을 나타내는 상수항 [s+p] 값이 일정할 경우 선량반응을 나타내는 곡선의 높이 (돌연변이율 최대값)는 [q] 값에 의해서 결정된다. 이때 나타나는 선량반응을 보면 일정한 선량까지는 돌연변이율이 상승하다가 선량이 더욱 증가되면 오히려 돌연변이율이 감소하기 시작하여 어느 선량에 이르러서는 사망에 의해서 돌연변이가 더 이상 나타나지 않는 점에 이른다. [q] 값에 의해 peak의 높이가 다르게 나타날 뿐 세포사멸에 의해 돌연변이율이 더 이상 나타나지 않는 사멸선량의 값이 거의 같은 특징을 갖는다. 반면에 [q] 값이 일정할 경우는 [s+p] 값이 적어짐에 따라 반응곡선상의 최대값이 상승하고 동시에 전체 곡선의 편향성(skewness)이 증가하기 때문에 세포사멸에 이르는 선량값은 증가한다.

저선량 영역에서는 s, p, β값이 영(zero)에 가깝고 상대적 생물학적 효과비(RBE)가 최대값에 이르는 구간이므로 RBE $=\alpha_n/\alpha_x$이 된다 [20]. 특히 고 LET 방사선인 중성자의 경우 저선량 영역에서는 방사선량의 증가에 따른 생물학적 반응이 거의 선형적으로 증가할 뿐 아니라 (1)식으로 표현되는 증가양상 또한 일반적 일차함수와 거의 같은 양상으로 나타난다. 본 연구에서도 (1)식에 실험결과를 적용하고 RBE $=\alpha_n/\alpha_x$에 따라 중성자의 최대 상대생물효과비를 구하였다 (표 3).

표 3. 자주달개비 세포의 돌연변이 유발에 있어서의 ^{252}Cf 중성자의 최대 상대생물효과비

처리구분\생물말단점	치사돌연변이	분홍돌연변이	잠재자사세포
중성자조사	6.2	7.2	1.6
붕소처리+중성자조사	34.3	6.18	5.6

방사선의 상대생물효과비는 평가대상이 되는 생물말단점 (biological end-point)에 따라서 달리 나타날 수 있을 뿐 아니라 평가기준 시점은 물론 심지어는 방사선량의 높고 낮음에 따라서도 변할 수 있다. Kim & Kim [17]에 의하여 보고된 중성자의 자주달개비 분홍돌연변이 유발에 있어서의 상대생물효과비는 3.1 6.8의 범위였다. Cebulska- Wasilewska et al. [8]는 두 번의 독립적인 실험을 통하여 자주달개비 화서의 분홍돌연변이 유발시의 ^{252}Cf 중성자 RBE가 각각 5.6과 5.8임을 밝힌 점을 감안할 때 본 실험결과가 기존의 연구보고들과 잘 일치함을 알 수 있었다. 본 연구에서 나타난 중성자의 RBE는 7.2로서 기존의 연구보고에서 나타난 값을 약간 상회하였다.

붕소화합물이 전처리된 실험군에 있어서 분홍돌연변이 유발의 중성자 상대생물효과비는 6.2로 산정되어 붕소화합물의 전처리가 분홍돌연변이율의 상승에 기여하지 않은 것으로 밝혀졌다. 반면에 세포의 분열능력 상실로 정의되는 치사돌연변이의 경우는 붕소화합물의 전처리에 따라 상당한 증가를 나타내었다. 중성자만을 조사하였을 때의 상대생물효과비는 6.2였으나 붕소화합물이 전처리되었을 때의 중성자의 상대생물효과비는 34.3으로 크게 증가되었다. 일반적으로 속중성자의 경우 붕소-중성자 포획반응이 나타나지 않지만 생물체가 ^{252}Cf 중성자로 조사될 때는 조직이나 세포질 속을 통과할 때 일정량의 중성자가 열중성자화될 가능성이 있으며 본 연구의 결과는 이와 같은 가능성을 뒷받침하는 실험적 증거가 될 수 있다. 이러한 이유로 자주달개비 수술털 세포 치사돌연변이에 있어서의 ^{252}Cf 중성자의 RBE 값 증대는 붕소-중성자 포획반응에 의한 것으로 평가될 수 있다는 점에서 방사선생물학적 또는 핵의학적 의미를 가진다. 각종 종양에 대한 붕소-중성자 포획치료법의 적용이 증가되고 있으며 californium 선원의 의학적 이용 빈도 또한 증가되는 추세에 있기 때문에 이러한 선원 특성의 방사선생물학적 분석은 무엇보다도 중요한 의미를 가진다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부에서 시행하는 특정연구과제의 일환으로서 KAERI-INP 공동으로 수행되었습니다.

References

1. M. A. Bender, "Neutron Induced Genetic Effects: A Review", Radiat. Bot 10, 225-247 (1970).
2. D. K. Bewley, The Physics and Radiobiology of Fast Neutron Beams. Ed ; Adam Hilger, Bristol and New York, pp. 96-128 (1989).
3. R. F. Barth, A. H. Soloway, and R. M. Brugger, "Boron Neutron Capture Therapy of Brain Tumors: Past History, Current Status and Future Potential", Cancer Investigation, 14(6), 534-550 (1996).
4. Boron Neutron Capture Therapy, Toward Clinical Trials of Glioma Treatment, Edited by Detlef Gabel and Ray Moss, Plenum Press, New York and London (1992).

5. A. Cebulska-Wasilewska, Mutation in somatic cells of as a model assay for studies environmental genotoxicity. Ed: IFJ Kraków, Raport No. 1335B, 7-96 (1986).
6. J. K. Kim, H. S. Shin, Y. K. Kim, B. H. Lee, and Y. I. Lee, "Effects of natural extracts on the radiation-induced pink mutations in *Tradescantia* stamen hair", J. Kor. Nuc. Soc. 31(5), 522-528 (1999).
7. J. K. Kim, W. R. Kim, J. S. Kim, H. S. Shin, and J. J. Lee, "Effects of diurnal temperature difference and gamma radiation on the frequency of somatic cell mutations in the stamen hairs of *Tradescantia* 4430", Kor. J. Environ. Biol., 16(3), 253-262 (1998).
8. A. Cebulska-Wasilewska, K. Rękas, and J. K. Kim, "Application of TSH Bioindicator for Studying the Biological Efficiency of Radiation", Nukleonika. 44(1), 15-30 (1999).
9. A. Cebulska-Wasilewska, M. Sijsma, K. H. Chadwick, and H. P. Leenhouts, "The influence of time between cutting and irradiation on the sensitivity of *Tradescantia* stamen hairs to mutation induction", Int. J. Radiat. Biol., 41(5), 569-574 (1982).
10. A. Cebulska-Wasilewska, "Interaction of chemical mutagens with radiation in the induction of somatic mutations in *Tradescantia*", Nukleonika, 33(4-6), 137-149 (1988).
11. A. Cebulska-Wasilewska, (1992) "*Tradescantia* stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later". Mutat. Res., 270, 23-29 (1992).
12. A. Cebulska-Wasilewska, M. Litwiniszyn, and B. Pałka, "RBE of 5.6 MeV neutrons assessed for the various biological endpoints in two mutable clones of *Tradescantia* ", Nukleonika, 40(2), 21-32 (1995).
13. T. H. Ma, G. L. Cabrera, A. Cebulska-Wasilewska, R. Chen, F. Loarca, A. L. Vandenberg, and M. F. Salamone, (1994) "*Tradescantia* stamen hair mutation mioassay, Mutat. Res., 310, 211-220 (1994).
14. A. G. Underbrink, and A. H. Sparrow, (1971) "Power relations as an expression of relative biological effectiveness (RBE) in *Tradescantia* stamen hairs", Radiat. Res., 46, 580-587 (1971).
15. W. R. Kim, J. K. Kim, and A. Cebulska-Wasilewska, "Effect of photoperiod on radiation-induced pink mutations in *Tradescantia* stamen hairs", Kor. J. Environ. Biol., 17(3), 331-335 (1999).
16. A. G. Underbrink, A. H. Sparrow, (1974) The influence of experimental end points, dose, dose rate, neutron energy, nitrogen ions, hypoxia, chromosome volume and ploidy level on RBE in Tradescantia stamen hairs and pollen, in: Biological Effects of Neutron Irradiation, International Atomic Energy Agency, Vienna, IAEA-SM-179/31, 185-214 (1974).
17. J. K. Kim, and W. R. Kim, "Neutron dose response of Tradescantia stamen hair pink mutations and RBE", J. Kor. Assoc. Radiat. Prot., 23(1), 17-23 (1998).
18. A. Conger, "A simple liquid-culture method of growing plants." Proc. Florida State Horticultural Society, 77, 3-6 (1964).

19. K. J. Weber, “Models of cellular radiation action: an overview”. in: Quantitative Mathematical models in Radiation Biology. J. Kiefer (Ed). Springer-Verlag, Berlin, pp. 32-45 (1988).
20. K. H. Chadwick, H. P. Leenhouts, The Molecular Theory of Radiation Biology, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 107 (1981).