

'96 춘계학술발표회 논문집

한국원자력학회

사람 T-임파구의 *HPRT*유전자에서 방사선 및 환경독성물질에
노출에 의한 돌연변이 빈도의 변화

윤병수

경기대학교

조명행, 이영순

서울대학교

김인규, 이강석

한국원자력연구소

요약

사람 T-임파구에서 방사선 독성물질인 감마선과 화학적 독성물질인 PCP(pentachlorophenol)의 돌연변이 효과를 *hprt* (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 유전자의 돌연변이빈도로써 측정하였다. 감마선은 ¹³⁷Cs원을 사용하여, 0 - 300 rads의 양으로 세포의 초기배양 시기에 조사하였으며, PCP는 역시 세포의 초기배양시 최종농도 0-100 ppm으로 24시간 투여 하였다. 양 돌연변이원은 *hprt*유전자를 돌연변이 시키어, 300rads의 조사는 대조군에 비하여 약 7.5배의 돌연변이 빈도의 증가를 나타내었고, PCP 50 ppm의 처리는 대조군에 비하여 약 5배의 돌연변이빈도 증가를 나타내었다. 본 실험에 사용된 상이한 두 돌연변이원은 모두 비교적 정확한 용량-반응 관계를 보였으나, 환경독성물질들의 혼합효과에서 돌연변이원을 정성하기위하여 개선된 T-cell *hprt* clonal assay, 즉 reverse transcriptase /polymerase chain reaction 및 direct sequencing에 의한 mutational spectrum의 적용이 요구되었다.

1. 서론.

Biomarker란 환경독성물질에의 노출에 따라 생물체내에서 발생하는 그 어떠한 형태의 변화를 지칭한다(National Research Council, 1989). 이는 노출에 대한 biomarker, 독성효과에 대한 biomarker, 그리고 감수성의 차이에 대한 biomarker로 대별되며, 암발생요인등을 분석하기위한 방법으로 개발된 T-cell *hprt* clonal assay는 (Albertini et al., 1982; 1985), 그간 계속적인 개발과 개선으로, 일반적인 환경독성물질에 대하여, 그 노출에 대한 그리고 그 독성효과에 대한 biomarker로 다양한 환경독성물질에 대하여 적용을 추구하고 있다 (Messing et al., 1989; Nicklas et al., 1990; O'Neill et al., 1990; Cole et al., 1992; Cochrane et al., 1993). 각 환경독성물질 중, 특히 방사선의 방호에서 적절한 biomarker의 개발이 매우 중요하다는 것은 주지의 사실이다. 방사선에의 노출을 monitoring할수 있는 여러 방법에서 특히 요구되고 있는 바는 저선량의 방사선 노출도 감지할 수 있으며, 이를 biomarker로써 기억할 수 있고, 또한 다른 환경독성물질과의 구분을 할수 있는 정성적 척도를 가지고 있다면 하는 것이다. 근래의 PCR의 발달은 T-cell clonal assay를 한 단계 발전시키어, RT/PCR (reverse transcriptase/ polymerase chain reaction)에 의한, 또는 genomic DNA의 증폭에 의한 mutational spectrum의 작성으로 환경독성물질을 인식하는 정성적 척도의 추구를 가능케 하였다.

본 연구는 방사선 조사에 대한 T-cell *hprt* clonal assay 및 mutational spectrum을 이용한 biomarker의 개발을 목적으로 한 다년간 과제의 일환으로, 저선량 방사선조사와 화학적 환경독성물질인 pentachlorophenol의 in vitro mutagenicity 를 측정하여 비교한 것이다. Pentachlorophenol은 원목의 보존제등 다목적으로 사용되는 화합물로서 현재 대표적인 공해물질로 대두되고 있으며, 비교적 약한 유전독성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Hattenman-Frey et al., 1989).

2. 재료 및 방법.

세포 및 세포배양배지: 실험에 사용된 세포는 38세 남자와 22세의 남자 혈액에서 각각 채혈하여 lymphocyte를 분리하였다. T-cell 배양을 위하여 기본배지로서 RPMI-1640 (Sigma R-5382; with L-Gln)를 사용하였고, 그 외의 기본 시약, 즉, Dulbecco's PBS, HEPES, sodium bicarbonate 등도 주로 Sigma (cell culture grade) 제품을 사용하였다. HL-1 medium은 Ventrex사의 것을, Fetal bovine serum은 Gibco사의 제품을 사용하였고, T-cell growth factor (TCGF)는 Collaborative Research에서 공급받았다. 세포배양에 사용된 기구는 모두 일회용 플라스틱제품으로 Nunc 또는 Falcon제품을 사용하였다.

Blood Lymphocyte 의 분리: 채혈된 25ml의 혈액을 Histopaque (Sigma) 25ml가 담긴 50 ml용 원심분리관의 상층에 넣고, 상온에서 400g로 원심분리하여 중층의 blood lymphocyte 를 수거하였다. 이 세포들을 DPBS용액으로 두번 세척한 후(250g, 10분), 5 ml RPMI 1640 medium에 부유시

키고, 0.1 ml를 0.4% trypan blue로 염색하여 haematocytometer로 생세포의 농도를 측정하였다. 1차 배양 (prime culture) : 분리된 blood lymphocyte은 1차배양액에 각 실험군당 40×10^6 (1×10^6 cells/ml)되게 나누고, 각기 4 개 50ml 용 culture flask에 10ml 씩 나누었다. 1차 배양액은 RPMI 1640 기본배지에 1x Nonessential amino acid (Sigma), 20 mM HEPES, 1 mM pyruvate, 1x Antifungal-Antibiotic solution(Sigma), 0.05 mM 2-mercaptoethanol (이상 모두 최종농도)을 넣어 RPMI 1640 완전배지를 만들고, 여기에 다시 20% HL-1 medium, 5% fetal bovine serum, 1 $\mu\text{g/ml}$ phytohemagglutinin (PHA, Wellcome diagnostics)를 첨가하여 1차 배양액 (Prime culture 용)으로 하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ incubater (습도는 100%)에서 36-40시간 배양하고 2차배양 (plating)에 들어갔다.

방사선 조사 및 pentachlorophenol mutation: 방사선 조사는 ¹³⁷Cs원(1100 rads/min.)을 사용하여 0, 20, 50, 100, 200 300 rads의 양으로 감마선을 조사하였으며, 이는 cell counting이 완료된 직후, FBS가 포함되지 않은 RPMI 기본배지에서 수행하였다. 처리된 세포는 바로 1차배양에 들어갔다. PCP처리하는 이를 50 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 각 실험군당 최종농도가 0, 0.1, 1, 5, 10, 50 ppm (w/v) 이 되게 하여, 1차배양 시작 12시간 후 부터 시작하여 24시간 처리를 받게 하였다. 2차 및 3차 배양 (subculture): 36-40 시간의 일차배양이 완료된 후, cell을 원심분리로 수거하고, 그 일부를 염색, 검경하여 생존율을 측정하였다. 이들은 돌연변이세포의 선택배양에 들어가기에 앞서 2회의 subculture를 수행하였다. 이때 배양액은 RPMI완전배지에 20% HL-1 medium, 5% FBS, 10% TCGF를 포함시키고, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ phytohemagglutinin 을 첨가시켰다. 배양시작시 세포의 농도는 0.1×10^6 cells/ ml 이고, 보통 20 ml 단위로 배양하였다. 배양기간은 각 3일 이었다.

4차 배양 (Mutant plating): 3차배양이 완료된 후, 이 세포들 중 *hprt*유전자의 돌연변이 세포를 선별하기 위하여 6-thioguanine(6-TG)을 사용한 선택배양을 수행하였다. 세포의 농도는 5×10^4 cells/ml로 96well plate의 1 well에 1×10^4 cells/ 0.2 ml 가 되게 하였다. 이 배양액은 RPMI 완전 배지에 20% HL-1 medium, 5% FBS, 10% TCGF를 포함시키고, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ phytohemagglutinin 을 첨가시켰다. 또한 돌연변이 세포의 선택을 위하여 6-thioguanine을 1 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하였다. Feeder cell은 36x4 cell line을 이용하였으며, 이는 별도로 9krads의 감마선에 노출시켜 치사시킨 후, 1×10^4 cells/ well이 되게 하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ incubater (습도는 100%)의 조건에서 10일간 (경우에 따라서는 15일) 수행하였으며, *hprt*-negative 인 CFU (clone forming unit)의 발생을 관찰하였다.

CFU 판정, CE plate 및 Mutation frequency의 계산: CFU (clone forming unit)는 보통 plating 6일 이후 분열하는 세포의 형태로써 관찰되었다. 이를 다시 10일에 clone의 형태를 확인하여 positive well로써 기록하였다. CE plate (clonal efficiency, nonselective plate)는 well당 1,2 또는 5개의 세포와 1×10^4 cells의 γ -irradiated feeder cell을 넣어 배양한 것으로, 이때의 배양액은

6-TG포함하지 아니한 것을 제외하고는 Mutant plating배지와 동일하다. Clonal efficiency(CE), mutation frequency(MF)의 계산은 Poisson statistics를 적용하여 다음과 같이 계산하였다 (Albertini et al., 1985).

Well 당 세포의 수 1×10^4 cells일 경우,

$P(0) = P_0 = \text{Number of negative wells} / \text{total number of wells}$

$CE = (-\ln P_0 \text{ in nonselective plates}) / (1 \text{ or } 2 \text{ or } 5 \text{ cells/well})$

$\text{Mutant fraction (Mf)} = (-\ln P_0 \text{ in TG-plates}) / (1 \times 10^4 \text{ cells/well})$

$\text{Mutant Frequency (MF)} = \text{Mf}/\text{CE}$

3. 결과 및 고찰.

Survival counting: 감마선 조사 와 PCP처리의 생존율의 결과는 표 1 에 정리하였다. 감마선 조사의 경우 0-50 rads에서는 생존율과 CE에서 모두 큰 차이를 보이지 않으나, 100-300 rads 의 선량에서는 생존율과 CE 모두에서 확실한 용량-반응관계를 보였다. 한편 PCP의 경우를 보면 0-25 ppm 은 생존율에서 차이를 보이지 않으나, CE는 완만한 용량-반응관계를 나타내고 있다.

Table 1. Cell survival of γ -irradiation and PCP-mutation

γ -irradiation	γ -irradiation		PCP-mutation		
	%survival	CE	%survival	CE	treatm. of PCP
0 rads	49%	0.356	52%	0.367	0 ppm
20 rads	51%	0.368	47%	0.302	10 ppm
50 rads	48%	0.344	48%	0.260	15 ppm
100 rads	41%	0.281	47%	0.172	25 ppm
200 rads	23%	0.170	39%	0.060	50 ppm
300 rads	11%	0.072	9%	N.D.	100ppm

* CE, clonal efficiency; treatm, treatments

또한 50-100 ppm 에서는 생존율, CE 모두 급격히 떨어지고 있는데, 이는 pentachlorophenol의 세포독성을 나타내는 것으로 사료되며, 본 실험에서 100ppm에서의 mutation frequency에서는 만족할 결과를 얻지 못하게 하였다.

Mutation frequency: 표 2는 전체 실험의 mutation frequency를 실험군에 따라 정리한 것이다. γ -irradiation에서 mutation frequency는 조사량이 0-100 rads 까지는 큰차이를 보이지 않으나 200-300 rads에서는 용량-반응 관계를 잘 나타내고 있으며, PCP-mutation에서는 50ppm에서의

Mutation frequency의 급격한 변화가 주목된다. 측정된 최고 선량 또는 농도에서 양자의 돌연변이 빈도의 변화는 각각 그 background level과 비교할때 7.5배, 5배로 나타났으며, 이 두가지 전혀 다른 기작의 돌연변이원에서의 T-cell *hprt* clonal assay 는 모두 비교적 정확한 용량-반응관계를 볼수 있었다. 이는 실험동물에서의 결과(Yoon *et al.*, 1996)와 사람의 in vivo, in vitro의 다른 실험결과(O'Neill *et al.*, 1990)와 일치되는 것이나, 그 절대값에서 많은 차이를 보여 실험결과의 상호비교를 통한 추정적용의 필요성이 제기된다. 또한 γ -irradiation이나 PCP-mutation의 실험에서 모두 저선량, 저용량에서의 반응의 민감도는 한계가 있음을 볼수 있었으며, 환경독성물질들의 혼합적인 효과를 분석할 때 이 *hprt*돌연변이빈도 만으로는 판단할 수 없다는 문제점이 제기되었다. 이는 T-cell *hprt* clonal assay개선된 방식인 mutational spectrum에 의하여 어느 mutagen의 효과인지 정성될 수 있을 것이라 사료되며(Yoon *et al.*, 1996), 본 연구에서는 실험의 결과로써 300개 이상의 *hprt* mutant clone을 확보하여, RT/PCR방법과 direct sequencing으로 분석하고 있다. 이러한 실험결과가 쌓여 나아갈 때 T-cell *hprt* clonal assay는 좋은 biomarker로써 기능을 할 것이라 기대한다.

Table 2. Mutation frequency of γ -irradiation and PCP-mutation

γ -irradiation	γ -irradiation		PCP-mutation		treatm. of PCP
	Mf.	MF	Mf.	MF.	
0 rads	2.77×10^{-6}	7.78×10^{-6}	3.15×10^{-6}	8.59×10^{-6}	0 ppm
20 rads	2.99×10^{-6}	8.12×10^{-6}	2.46×10^{-6}	8.15×10^{-6}	10 ppm
50 rads	2.56×10^{-6}	7.44×10^{-6}	2.49×10^{-6}	9.58×10^{-6}	15 ppm
100 rads	2.49×10^{-6}	8.85×10^{-6}	1.98×10^{-6}	11.50×10^{-6}	25 ppm
200 rads	5.39×10^{-6}	31.7×10^{-6}	2.70×10^{-6}	45.08×10^{-6}	50 ppm
300 rads	4.15×10^{-6}	57.7×10^{-6}	N.D.	N.D.	100ppm

* Mf, mutation fraction; MF, Mutation frequency; treatm, treatments

4. 감사의 글.

본연구는 원자력 중장기 연구과제(방사선환경:생물학적선량평가기술개발)의 연구비로 수행되었으며 본인들의 실험적 문제의 해결에 직접적인 도움을 준 미국 Vermont 대학교 R.J. Albertini 교수와 J.P. O'Neill교수에게 감사드리는 바입니다.

5. 참고 문헌.

- Albertini, R.J., K.L.Castle, W.R. Borcharding. 1982. T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine resistant lymphocytes present in human peripheral blood. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 79:6617-6621.
- Albertini, R.J., J.P.O'Neill, J.A.Nicklas, N.H.Heintz, P.C. Kelleher. 1985. Alterations of the *hprt* gene in human *in vivo*-derived 6-thioguanine resistant T lymphocytes, Nature, 316:369-371.
- Cochrane, J.E., T.R.Skopek. 1993. Mutagenicity of butadiene and its epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1,2,-epoxybutene, 1,2,3,4,-diepoxybutane, and 3,4,-epoxy-1,2-butanediol in cultured human lymphoblasts. Carcinogenesis.(personal communication)
- Cole, J., C.F.Arlett, P.G.Norris, G.Stephans, A.P.W.Waugh, D.M.Beare, M.H.L.Green. 1992. Elevated *hprt* mutant frequency in circulating T-lymphocytes of Xeroderma pigmentosum patients. Mutation Research, 273:171-178.
- Hattenman-Frey, H.A., C.C.Travis. 1989. Pentachlorophenol: Environmental partitioning and human exposure. Arch.of Environ.Contam.Toxicol., 18:482-489.
- Messing, K., J.Ferraris, W.E.C.Bradley, J.Swarty, A.M.Seifert. 1989. Mutant frequency of radiotherapy technicians appears to be associated with recent dose of ionizing radiation., Health Phy. 57:537-544.
- National Research Council. 1989. Biological markers in pulmonary toxicology.
- Nicklas, J.A., M.T.Falta, T.C.Hunter, J.P.O'Neill, D.Jacobson-Kram, J.R.Williams, R.J.Albertini. 1990. Molecular analysis of *in vivo hprt* mutations in human T-lymphocytes. V. Effects of total body irradiation secondary to radioimmunoglobulin therapy(RIT). Mutagenesis, 5:461-468.
- O'Neill, J.P., L.M.Sullivan, R.J.Albertini. 1990. In vitro induction, expression and selection of thioguanine-resistant mutants with human T-lymphocytes. Mutation Research, 240:135-142.
- Yoon, B.S., M.H.Cho, Y.S.Lee. 1996. Mutational analysis at the *hprt* locus in splenic T-cells of rats exposed to pentachlorophenol. Kor.J.Toxicol.(submitted).