

항암제 Mitomycin C가 배양임파구의 자매염색분체 교환에 미치는 영향

전북대학교 의과대학 예방의학교실

황인담 · 기노석 · 이정상 · 김남송 · 문태일

= Abstract =

Effects of Mitomycin C on Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes

In-Dam Hwang, No-Suk Ki, Jeong-Sang Lee, Nam-Song Kim and Tae-Il Mun

Department of Preventive Medicine and Public Health, Chonbuk National University Medical College

Sister chromatid exchanges(SCEs) and cell cycle kinetics were proposed as a sensitive and quantitative assay for mutagenicity and cytotoxicity in short-term cultures of phytohemagglutinin(PHA)-stimulated human lymphocytes.

Therefore, this study was performed to investigate the relation between the cytotoxic effects and sister chromatid exchanges.

The results are summarized as follows:

1) The frequency of SCEs per cell are 13.1 ± 2.8 in the lower concentration of 6.25×10^{-9} M and 75.8 ± 8.2 in the highest concentration of 1.00×10^{-7} M. Mitotic index is decreased in the higher concentration of mitomycin C.

The result indicates that mitomycin C led to a dose dependent increase in SCE frequency, but decrease in mitotic index.

2) Chromosomal analysis was performed on metaphase cells that have divided one, two, and three or more times for cell cycle kinetics by fluorescence-plus-Giemsa(FPG) technique. According to the increased concentration of mitomycin C, the proportion of metaphase cells in the first are profoundly increased but the cells of third division are greatly decreased.

3) The frequency of SCEs per chromosome by chromosomal group are decreased gradually from A group to G group. But relationships between specific chromosomal group and SCE frequency are not found.

I. 서 론

자매염색분체교환(sister-chromatid-exchange; SCE)이 Taylor등(1957)에 의하여 autoradiography로 식물세포에서 최초로 기술된 이래 DNA의 복제와 구조, 손상과 수복에 관한 연구가 진행되었다. 그 후 Latt(1973)는 thymidine 유도체인 BrdU(5-bromo

-2-deoxy uridine)를 첨가하여 배양한 세포의 염색체를 형광염색하여 보다 높은 해상력을 얻었지만 시간이 경과함에 따라 염색상이 사라지는 단점이 있었다. Perry와 Wolff(1974)는 형광염색에 Giemsa를 가한 FPG(fluorescence-plus-Giemsa)법을 개발하여 보다 편리하고 신속하며 해상력이 높은 슬라이드를 제작하므로써 SCE연구에 크게 기여하였다. 따라서, 이방법을 이용하여 현재까지 많은 화학물질과 물리적요인이

SCE를 증가시킨다고 보고되었으며(Perry & Evans, 1975; Takehisa, 1982; Nish 등, 1984), 특히 mitomycin C가 가장 강력한 SCE유발제로 알려져 있다(Perry & Evans, 1975; Takehisa, 1982).

이러한 SCE는 아직 그 형성기전은 명확하게 밝혀져 있지 않지만 돌연변이원과 발암원 검사에 가장 예민한 지수로 알려져 있어((Perry & Evans, 1975; Carrano 등, 1979) 각종 화학물질에 대한 세포독성 검사에 널리 적용될 전망이다.

항생제인 mitomycin C는 *Streptomyces caespitosus*로부터 분리되었으며(Wakaki 등, 1958), 화학적으로는 alkylating agent로 작용하여 직접 DNA의 상보적 가닥을 cross linking하여 DNA에 손상을 가하는 것으로 알려져 있다(Tomasz 등, 1974). 따라서 mitomycin C에 의한 염색체이상 및 SCE유도에 관해서는 다수의 보고가 있었다(Perry & Evans, 1975; Carrano 등, 1979; Latt, 1974; Stetka 등, 1978; Littlefield 등, 1979; Littlefield 등, 1980; Kano & Fujiwara, 1982; Palitti 등, 1983). 그러나, 세포분열 주기 지연은 방사성 동위원소로 표지된 세포(Morimoto & Wolff, 1980; Morimoto 등, 1983), benzene(Morimoto 등, 1980) 및 bleomycin(Morimoto 등, 1984)을 처리한 세포 등 일부에서 알려져 있으며 mitomycin C에 의한 연구는 Miura 등(1983)의 연구에 국한되어 있다.

또한 암과 특정염색체와는 깊은 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으며(Novitski, 1982), SCE와 염색체와의 관계를 알아 보는 것은 흥미있는 일이라 사료된다. Latt(1974)는 SCE빈도가 염색체의 길이에 따라 비례한다고 보고 하였고, 이 등(1980)은 BrdU의 농도 증가에 따라 염색체 B군에서의 빈도가 다른 염색체군에 비해 유의하게 높음을 보고하였다.

이에 저자는 mitomycin C에 의한 세포분열지수, SCE빈도 및 세포분열주기 변동을 조사하고 염색체군별 SCE빈도를 알아보려고 본 연구를 시도하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포분열

배양을 위한 혈액은 성인남자의 전완정맥으로부터

heparin을 가한 멸균주사기로 채혈하였다.

세포배양은 Latt(1973)와 황 등(1986)의 방법을 참조하여 다음과 같이 하였다. 배지는 PRMI 1640(GIBCO)에 25 mM HEPES buffer(GIBCO) 15% fetal bovine serum(GIBCO), penicillin-streptomycin(100units-100 μ g/ml, GIBCO) 2% phytohemagglutinin-M(PHA-M, GIBCO)을 가하여 제조하였다. 세포배양은 상기 배지 5ml에 각각 0.2 ml의 혈액을 접종하고 암시야의 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다.

2. 항암제 처리

공시한 항암제 mitomycin C(Kyowa HAKKO Kogyo Co. Ltd., Japan)는 RPMI 1640 배지에 용해한 후 2배 계열희석하여 배지 5ml 당 50 μ l씩 첨가하여 원하는 농도가 되게 하였다(표 1).

항암제 mitomycin C는 혈액을 24시간 배양한 후 첨가하여 그 후 48시간 추가 배양하였다.

한편, 대조염색을 위하여 10 μ M의 BrdU(5-bromo-2-deoxy uridine, Sigma)를 항암제와 함께하였다.

3. 염색 및 계수와 자료분석

배양세포는 고정 3시간 전에 colchicine(0.5 μ g/ml, Sigma)으로 처리한 후 원심분리하여 얻었으며, 0.075 M KCl 저장액에 10분간 정치하여 다시 원심분리한 후 methanol과 acetic acid(3:1) 용액에 30분씩 3회 고정하였다. 고정된 세포들은 슬라이드글라스 위에 떨어뜨리고 공기 중에서 자연건조시켜 Perry와 Wolff(1974)의 방법에 따라 FPG 염색을 하였다. 즉 Hoechst-33258 을 탈이온수에 5 μ g/ml 농도로 희석한 용액에 15분간 염색한 후 탈이온수로 가볍게 세척하고 슬라이드글라스 위에 phosphate buffer(pH 7.0)을 떨어뜨린 뒤 커버글라스를 덮고 형광등(20 W, 10 cm) 하에서 6~10시간 정치한 다음 탈이온수에서 커버글라스를 제거하고 60°C의 2×SSC 용액(0.3 M Sodium chloride-0.03 M Sodium citrate)에 2시간 동안 정치한 후 soerensen's buffer(pH 6.8)에 희석한 3% Giemsa 용액(Gurr's R 66)에 30분간 염색하였다.

염색이 끝난 표본은 soerensen's buffer(pH 6.8)에 2~3회 가볍게 세척한 후 공기 중에서 건조시켜 balsam mounting하여 관찰하였다.

Table 1. The frequency of SCEs and mitotic indices in lymphocytes treated with various concentrations of mitomycin C.

Concentrations of Mitomycin C	Observed No. of metaphase	Counted SCEs	SCEs per cell	Mitotic index (%)
Control#	30	234	7.87±2.7 ^a	4.9
6.25×10 ⁻⁹ (M)	30	393	13.1±2.8 ^{**}	5.4
1.25×10 ⁻⁸	30	717	23.9±4.9 ^{**}	4.5
2.50×10 ⁻⁸	30	1,140	38.0±4.8 ^{**}	3.7
5.00×10 ⁻⁸	30	1,440	48.0±6.9 ^{**}	2.7
1.00×10 ⁻⁷	30	2,274	75.8±8.2 ^{**}	2.8

^a Mean±S.D.

^{**} Significant by Student's t-test at p<0.01

Only BrdU 10 μM added.

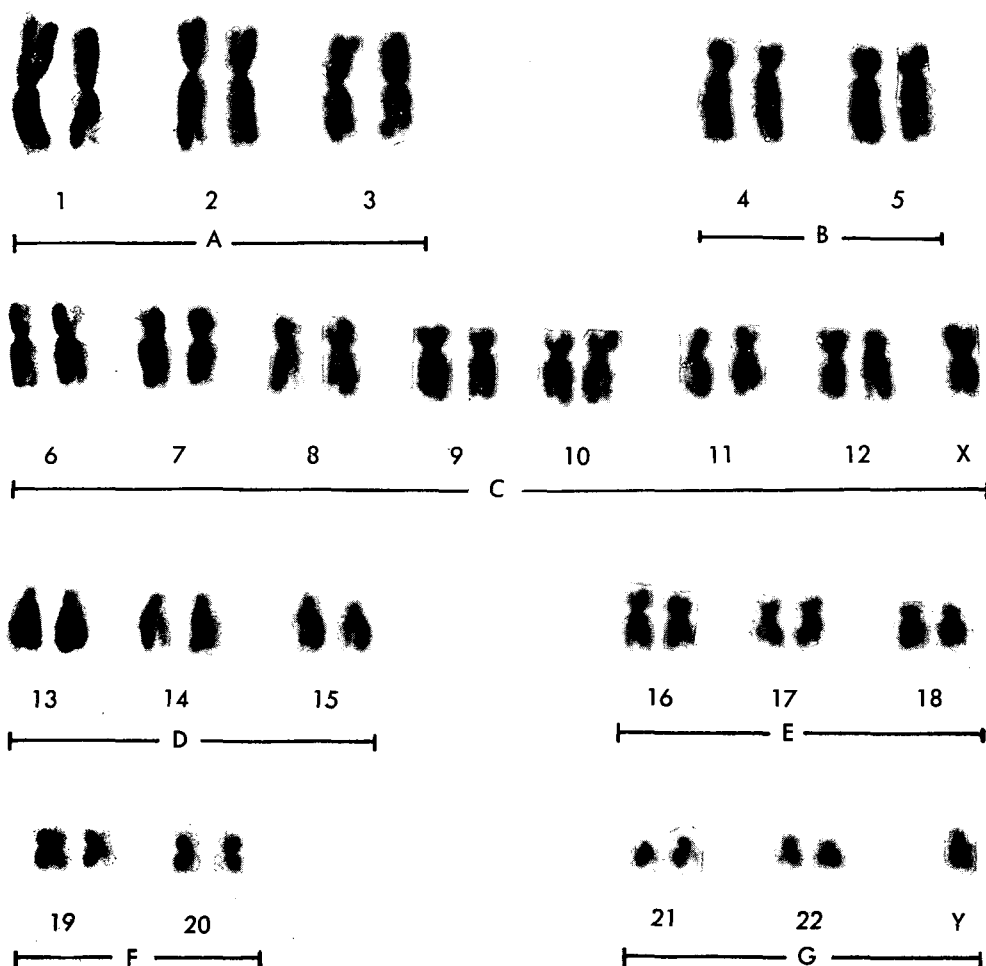


Plate 1. The karyotype of a normal male showing the chromosomes of a single lymphocyte in the second metaphase stage of cell division stained by fluorescenc-plus-Giemsa(FPG) technique. The chromosomal groups have been arranged according to descending length and varying arm ratio.

SCE빈도는 각 농도마다 2차분열 중기세포를 1000 배 시야에서 적어도 30개 이상 연속적으로 조사하여 그 평균치를 세포당 SCE빈도로 나타내었으며 세포분열지수는 100배 시야에서 적어도 1000개 이상의 세포를 계수하고 분열중인 세포수를 전체에 대한 100 분율로 표시하였다. 세포분열주기 변동은 500개의 분열중인 세포를 1차, 2차 및 3차 이상 분열세포의 100분율로 나타내었다. 염색체군별(Plate 1) SCE는 핵형분석이 가능한 세포를 30개씩 선택하여 분석한 후 단위 염색체당 SCE빈도로 나타내었다.

자료의 통계분석에서 SCE빈도 변화는 t검정, 그리고 세포분열주기 변동은 χ^2 검정을 하였다.

III. 성 적

SCE유발 및 세포분열지수 : 항암제 mitomycin C 처리가 배양임파구의 SCE유발 및 세포분열지수에 미치는 영향의 결과는 표 1에서와 같다. 즉 대조군에서의 SCE빈도는 7.8 ± 2.8 인데 비하여 mitomycin C 처리군에서는 최저농도인 6.25×10^{-9} M에서 13.1 ± 2.8 로 유의하게 증가 되었으며

10^{-7} M 에서는 75.8 ± 8.2 로써 대조군의 농도에 비해 10배 이상의 SCE 빈도 증가를 보였다.

세포분열지수는 대조군에서 4.9%인데 비하여 항암제 mitomycin C 처리군에서 농도증가에 따라 감소되어 최고농도에서는 2.9%이었다.

SCE 유발과 세포분열지수와의 관계는 그림 1과 같으며 SCE 빈도는 농도증가에 따라 대수증가를 보인 반면에 세포분열지수는 완만한 억제경향을 보여 주었다.

세포분열주기변동 : 항암제 mitomycin C 처리가 배양임파구에 세포분열주기에 미치는 효과는 표 2 및 그림 2에서와 같다. 즉 대조군에서는 1차, 2차 및 3차 이상의 세포의 비가 각각 34.8 ± 4.5 , 38.3 ± 3.9 및 $27.0 \pm 6.5\%$ 인데 비해 항암제 mitomycin C 처리군에서는 2.50×10^{-8} M의 농도에서 1차 및 2차가 각각 42.8 ± 2.3 과 $46.6 \pm 5.3\%$ 로 증가된 반면 3차 이상 분열중기 세포의 비는 $10.6 \pm 3.9\%$ 로 감소되어 대조군에 비해 유의한 세포분열지연 현상을 보였으며 ($p < 0.05$), 5×10^{-8} M 이상의 농도에서는 1차분열세포의 비는 현저하게 증가된 반면 3차이상 분열세포의 비는 현저한 감소를 보여 매우 유의한 세포분열지연 현상

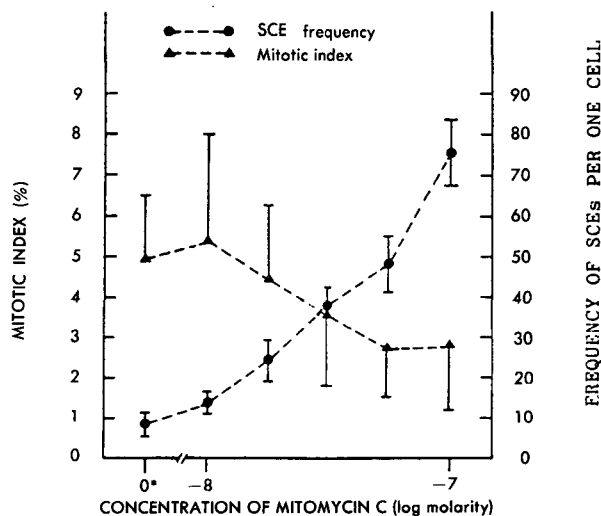


Fig. 1. Dose-response curves for SCE frequency and mitotic index in human lymphocytes in proportion to concentrations of Mitomycin C(0* control).

Table 2. The proportion of metaphase cells in human lymphocytes treated with various concentrations of mitomycin C.

Concentrations of Mitomycin C(M)	Percent of metaphase cells		
	X1	X2	X3
Control#	34.8±4.5 ^a	38.3±3.9	27.0±6.5
6.25×10 ⁻⁹	29.8±2.8	49.8±1.5	20.4±2.6
1.25×10 ⁻⁸	36.4±3.0	46.8±4.6	16.8±2.2
2.50×10 ⁻⁸	42.8±2.3	46.6±5.3	10.6±3.9*
5.50×10 ⁻⁸	51.6±8.2	39.0±8.1	9.8±2.4**
1.00×10 ⁻⁷	63.4±3.8	30.2±2.6	6.4±3.4**

a Mean±S.D.

Only BrdU 10 μM added.

* Significant by Chi-square test for trends. (p<0.05)

** p<0.01

X1, X2, and X3+ indicates the first, second, and third or more division cells which were determined by the fluorescence plus Giemsa(FPG)staining.

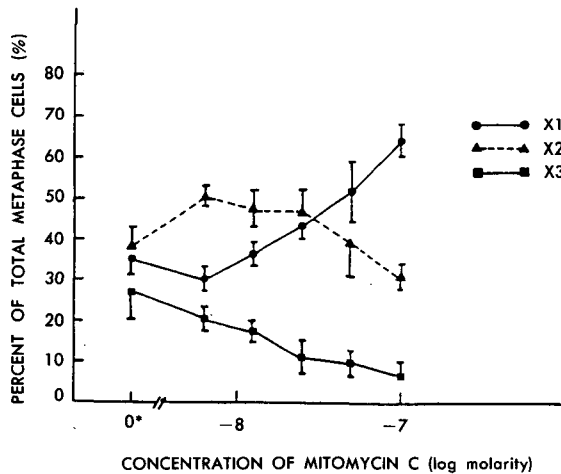


Fig. 2. The relative proportion of 1st (X1), 2nd (X2), and 3rd (X3) division metaphase cells in cultures exposed to various concentrations of Mitomycin C(0* control).

염색체군별 SCE빈도 : 항암제 mitomycin C 처리가 각각의 염색체군에 미치는 SCE 변화는 A군에서 G군으로 갈수록 감소하는 경향을 보였으며 염색체의 길이가 긴 균일수륙 절대빈도는 현저하게 증가되나 일반적으로 대조군과 유사한 경향을 보여주었다. 그러나 특정 염색체군과 SCE 빈도와의 상관관계는 보이지 않았다.

IV. 고 안

자매염색분체교환 현상이 Perry와 Wolff(1974)에 의해서 개발된 FPG법에 용이하게 관찰할 수 있게 된 이후 여러 가지 화학물질이 SCE를 일으킨다는 많은 보고가 되어왔다(Perry & Evans, 1975; Takehisa,

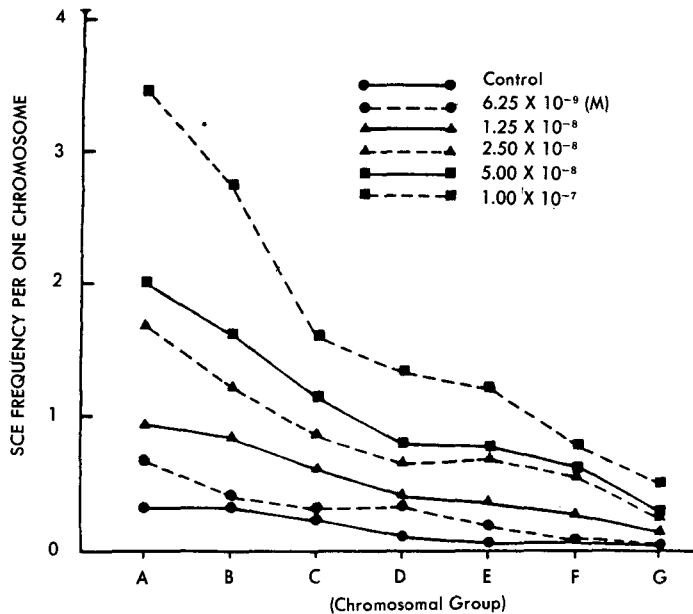


Fig. 3. Frequency of SCEs per each chromosomal group in lymphocytes treated with various concentrations of mitomycin C.

1982; Nishi 등, 1984).

본 실험결과 SCE 빈도는 항암제 mitomycin C의 농도 증가에 따라 세포분열을 억제시키지 않는 범위에서도 크게 상승되었으며 이전의 인혈배양 임파구(Latt, 1974; Littlefield 등, 1979; Littlefield 등, 1980; Mirua 등, 1983) chinese-hamster ovary (CHO) cell line (Perry & Evans, 1975; Carrano 등, 1979), 가토 (Stetka 등, 1978) 및 mouse(Nakanish 등, 1979) 등 in vivo 연구에서 잘 입증되어 있다.

임파구 배양시 나타나는 서로 다른 세대의 중기분열 세포비의 불균일성은 PHA에 자극되어 DNA합성을 시작한 시기의 차이에서 기인되어 화학물질의 처리에 의해서도 세포분열주기가 지연되어 1차 2차 및 3차 이상의 세포의 비율이 달라진다(Morimoto & Wolff, 1980; Wakaki 등, 1958) 이러한 세포분열주기 지연은 X-선 및 BrdU 농도, 방사성동위원소표지염기(Morimoto & Wolff, 1980; Morimoto 등, 1983), benzene(Morimoto & Wolff, 1980), bleomycin(Morimoto 등, 1984) 및 유전적 질환(Miura 등, 1983)

에 의해서도 일어나며 mitomycin C의 농도/증가에 따라 세포분열주기가 지연된 본 조사 결과와도 잘 일치되고 있다.

본 결과에서 나타난 것처럼 많은 SCE를 일으키는 돌연변이원이 더욱 더 긴 세포분열주기 지연을 일으킨다는 견해는 잘 알려져 있지만(Littlefield 등, 1979; Morimoto & Wolff, 1980a, 1980b; Morimoto 등, 1985), Miura 등(1983)은 mitomycin C 처리한 Fanconi's Anemia 환자의 배양 임파구에서 SCE빈도는 정상인과 비슷한 반면 세포분열 지연은 현저하게 나타남을 보고 하였고, Morimoto(1983)는 microsome으로 활성화된 benzene의 농도증가가 세포분열 지연과 SCE를 증가시키지만 최적 SCE유발과 세포분열 지연 농도가 서로 다르기 때문에 SCE형성과 세포분열 지연에 서로 다른 물질이 관여하는 것으로 추정하고 있어 SCE와 세포분열주기 지연은 서로 다른 기전으로 일어남을 강하게 시사해 주고 있다.

염색체군별 SCE빈도는 이와 김등(1983)이 BrdU처리한 정상인 배양 임파구에서 농도증가에 관계없이 염

색체 B군이 다른 염색체군에 비해 유의하게 높음을 보고 한 반면 Latt(1974)는 정상인 배양임파구에서, 그리고 Latt 등(1975)은 정상인과 Fanconi's Anemia 환자에서 공히 염색체의 길이와 SCE빈도 증가 사이에 높은 상관성이 있다는 상반된 보고를 하였다. 본 실험 결과는 후자의 결과와는 잘 일치되고 있으나 전자와는 서로 다른 결과를 보여 주고 있다. 따라서 SCE형성기전은 잘 알려져 있지 않다 할지라도 Alkylating agent인 mitomycin C가 DNA의 cross link(Tomasz 등, 1974; Iyer and Szybalski, 1984)에 관여하여 재조환되므로써 SCE형성에 관여한다고 생각할 때 염색체 길이가 길수록 mitomycin C가 DNA를 cross link 하는 기회가 상승되어 일어난 결과라고 사료된다.

그러나 이와 김등(1983)과의 차이가 처리한 화학물질의 차이에서 기인된 것인지 혹은 다른 요인에 의해서 비롯된 것인지는 추후 좀더 많은 화학물질을 추가하여 검토하므로써 진정한 결론에 접근할 수 있으리라 사료된다. 또한 Latt(1974)는 같은 염색체 일지라도 interband에서 빈발함을 보고하여 앞으로 염색체 banding technique을 병용한다면 SCE와 염색체와의 관계를 구명하는 데 진일보 할 수 있을 것이다.

V. 요 약

항암제 mitomycin C가 정상인 배양 임파구의 SCE에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포분열지수, 자매 염색분체빈도, 세포분열주기 변동 및 염색체군별 SCE빈도를 조사한 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

1) 세포당 SCE빈도는 항암제 mitomycin C의 최저 농도인 6.25×10^{-9} M에서는 13.1 ± 2.8 이었고, 최고 농도인 1.00×10^{-7} 에서는 75.8 ± 8.2 로써 농도 증가에 따라 대수증가를 보였다. 그리고 세포분열지수는 완만한 감소경향을 나타냈다.

2) 세포분열주기 변동은 항암제 mitomycin C의 농도 2.50×10^{-8} M에서 대조군에 비해 유의한 세포분열 지연 현상을 보였으며 ($p < 0.05$), 5×10^{-8} M 이상에서는 세포분열지연이 매우 유의하게 나타났다 ($p < 0.01$).

3) 염색체군별 단위염색체당 SCE빈도는 항암제의 농도 증가에 따라 절대빈도는 증가되었다 할지라도 A군에서 G군으로 갈수록 감소되어 특정염색체군과 SCE

와의 관계는 보이지 않았다.

참 고 문 헌

- 李金泳, 金聖周. Sister chromatid exchange, polyploidy and endoreduplication in normal human lymphocyte culture. 과학교육농촌 전북대학교 과학교육연구소 1980; 8:43
- 黃仁澹, 朴榮洙, 金有卓, 高大河, 李定相, 重金屬이 培養 淋巴球의 姉妹染色分體交換에 미치는 영향. 全北醫大 論文集 1986; 10(1):1-9
- Carrano AV, Thompson LH, Lindl PA and Minkler JL: Sister chromatid exchange and mutagenicity, toxicity and DNA damage. Nature 1979; 282:318-320
- Iyer VN, Szybalski W. Mitomycins and porfiromycin: Chemical mechanism of activation and crosslinking of DNA. Science 1964; 145:55-58
- Kano Y, Fujiwara Y. Higher induction of twin and single sister chromatid exchanges by cross-linking agents in Fanconi's anemia cells. Hum Genet 1982; 60:233-238
- Latt SA. Localization of sister chromatid exchange in human chromosomes. Science 1974; 185:74-76
- Latt SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosome. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1973; 70:3395-3399
- Latt SA. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: Detection by fluorescence and induction by mitomycin C. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1974; 71:3162-3166
- Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Buchanan GR, Gerald PS. Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. Proc Nat Acad Sci 1975; 72(10): 4066-4076
- Littlefield LG, Colyer SP, DuFrain RJ. Comparison of sister chromatid exchanges in human lymphocytes after G exposure to mitomycin C in vivo vs. in vitro Mutat Res 1980; 69:191-197
- Littlefield LG, Colyer SP, Sayer AM, DuFrain FJ. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed during G to four classes of DNA-damaging chemicals. Mutat Res 1979; 67:259-269
- Miura K, Morimoto K, Koizumi A. Proliferative kinetics and mitomycin C-induced chromosome damage in Fanconi's anemia lymphocytes. Hum Genet 1983; 63:19-23
- Morimoto K, Wolff S. Cell cycle kinetics in human

- lymphocyte cultures. *Nature* 1980a; 288:604-606
- Morimoto K, Wolff S. Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res* 1980b; 40:1189-1193
- Morimoto K. Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene. *Cancer Res* 1983; 43:1330-1334
- Morimoto K, Kaneko T, Iijima K, Koizumi A. Proliferative kinetics and chromosome damage in Trisomy 21 lymphocyte cultured exposed to r-rays and bleomycin. *Cancer Res* 1984; 44:1499-1504
- Morimoto K, Sato M, Koizumi A. Proliferative kinetics of human lymphocytes in culture measured by autoradiography and sister chromatid differential staining. *Exp Cell Res* 1983; 145:349-356
- Morimoto K, Kram D, Schneider EL. Aging and sister chromatid exchange. IV. Reduced frequencies of mutagen-induced sister chromatid exchanges in vivo in mouse bone marrow cells with aging. *Cytogenet Cell Genet* 1979; 24:61-67
- Nishi Y, Hasegawa MM, Taketomi M, Ohkawa Y, Inui N. Comparison of 6-thioguanine-resistant mutation and sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells with forty chemical and physical agents. *Cancer Res* 1984; 44:3270-3279
- Novitski E. *Human Genetics, 2nd ed.* Macmillan Publishing Co Inc New York 1982; pp 284-303
- Palitti F, Ranzarella C, Degrossi F, Salvia RD, Fiore M, Natarajan AT. Formation of chromatid type aberrations in G2 stage of the cell cycle. *Mutat Res* 1983; 110:343-350
- Perry P, Evans HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975; 258:121-125
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251:156-158
- Scott D, Lyons CY. Homogeneous sensitivity of human peripheral blood lymphocytes to radiation-induced chromosome damage. *Nature* 1979; 278:756-758
- Stetka DG, Minkler J, Carrano AV. Induction of long-lived chromosome damage, as manifested by sister chromatid exchange, in lymphocytes of animal exposed to mitomycin C. *Mutat Res* 1978; 51:383-396
- Takehisa S. Induction of sister chromatid exchanges by chemical agents. In: Wolff, S.(ed.), *Sister chromatid exchange*, Wiley, New York, 1982; pp 87-148
- Taylor JH, Woods PS, Hughes WL. The organization and duplication of chromosome as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Natl Sci U.S.A.* 1957; 43:122-128
- Tomasz M, Mercad CM, Olson J, Chatterjee N. The mode of interaction of mitomycin C with deoxyribonucleic acid and other polynucleotides in vitro. *Biochemistry* 1974; 13(24):4878-4887
- Wakaki S, Marumo H, Tomioka K, Shimizu Y, Kato E, Kamada H, Kudo S, Fujimoto Y. Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot Chemother* 1958; 8:228-240