

## Ag-NORs 염색법과 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation법에 의한 caffeine의 NIH3T3 세포증식 억제효과 비교측정

김 성 호 · 이 차 수\*

한국원자력연구소 원자력병원 · 경북대학교 수의과대학\*

(1990. 7. 16 접수)

### Comparison of Ag-NORs stain and [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in antiproliferative effect of caffeine on NIH3T3 cells

Sung-ho Kim, Cha-soo Lee\*

Korea Cancer Center Hospital, Korea Atomic Energy Research Institute  
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University\*

(Received July 16, 1990)

**Abstract:** Inhibitory effect of caffeine on NIH3T3 cell proliferation was studied by using [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation and a modified one-step silver staining technique. The latter technique shows argyrophilic nucleolar organizer region-associated proteins (Ag-NORs), which are seen in nuclei as black dots. The result was compared with the counts of [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation.

The results were summarized as follows;

1. The Ag-NORs numbers of NIH3T3 cells were  $6.81 \pm 1.38$  at 24 hrs,  $7.13 \pm 1.26$  at 48 hrs,  $8.50 \pm 2.04$  at 72 hrs after incubation.
2. The numbers of Ag-NORs were significantly decrease in caffeine treated groups ( $p < 0.01$ ).
3. The counts of [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation were similar to the result of using Ag-NORs staining technique.

It is concluded that Ag-NOR is a rapid, simple and compatible method to quantitate cell proliferation as compared with [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation.

**Key words:** Ag-NOR, caffeine, NIH3T3, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation, cell proliferation.

### 서 론

Nucleolar organizer region-associated protein (Ag-NOR) 반응은 오래동안 세포유전학 분야 연구에 사용되어 왔으나 조직병리 분야에 적용된 것은 최근의 일이며 점차적으로 방법이 개선되어 one-step 방법으로 간편해 졌다.<sup>1-6</sup> NORs는 세포내 핵소체에 존재하며 ribosomal RNA gene을 가지는 DNA의 고리이며 이 것은 RNA polymerase I에 의하여 전사되고 단백질

산생의 표시가 된다.<sup>1,7</sup> 따라서 NORs의 수 및 모양은 일반적으로 세포의 활성도를 나타내며,<sup>1,8</sup> NORs의 수는 상대적인 휴지세포에 비하여 증식세포에서 많이 나타나고,<sup>9,10</sup> 또한 종양세포, 특히 악성종양 세포에서 다수 관찰된다.<sup>2,11</sup> Ag-NOR 염색법은 사실상 NOR-associated protein들이 염색되나 이들에 대해서는 완전히 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고 Ag-NOR 염색법은 핵소체의 구조 및 활성도 변화의 지표로서 사용되고 있다.<sup>12</sup>

지금까지 Ag-NORs 염색에 대한 연구는 대부분 인체암의 진단과 예후판정 가능성을 확인하는 경우에 한정되어 있을 뿐 실험적 방법의 적용은 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 많은 실험에서 사용되는 정상증식세포인 NIH3T3에 대한 Ag-NORs 염색법의 활용 가능성을 확인하기 위하여 이들 세포성장제에 대한 caffeine의 효과를  $[^3\text{H}]$ thymidine 결합에 따른 radioactivity 측정의 결과와 비교하였다.

### 재료 및 방법

**세포배양 :** NIH3T3 마우스 섬유아세포주는 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin과 100 IU/ml의 penicillin 및 20mM HEPES buffer를 첨가한 RPMI1640(GIBCO) 배지에 배양하였다. 조직배양용 petri dish(녹십자)에 cover slip (Wheaton)을 바닥에 붙은 후 배양세포를  $5 \times 10^4$  cells/ml를 분주하였으며 caffeine은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 용량으로 첨가하여 각각 24, 48, 72 시간 배양하였다.

**$[^3\text{H}]$ thymidine incorporation:** NIH3T3 세포를 24 well culture plate (Folw Lab)에 well  $5 \times 10^4$ 개씩 분주한 후 동량의 caffeine을 가하고  $[^3\text{H}]$  thymidine [3.0TBq/mmol(81.9Ci/mmol) NEN]을 well당 20 $\mu\text{Ci}$ 씩 첨가하여 각각 24, 48, 72시간 배양한 후 trypsin-

EDTA (GIBCO)를 처리하여 세포를 부유시켰다. 세포 부유액에서 1ml씩을 취하여 10ml의 scintillation cocktail (Lumagel, Lumac, Netherland)을 혼합 후 radioactivity를 liquid scintillation counter (Packard Co)로 측정하였다.

**Ag-NORs염색 :** Petri dish에서 배양한 세포를 Derenzini등<sup>13</sup>의 보고에 따라 ethanol로 고정하여 cover slip을 분리한 후 permount로 slide glass에 부착하고 다음과 같은 방법으로 염색을 실시하였다.

One-step silver colloid method for Ag-NOR staining.

1. Rinse in distilled water.
2. Place in staining solution\* for 20 minutes at room temperature in the dark.

\*Staining solution:

- (A) 2% gelatin in 1% pure formic acid solution.
- (B) 50% silver nitrate solution.

The working solution: mixing (A) & (B) in a proportion of 1 : 2 just before use.

3. Wash in running deionized water.
4. Dehydrate in ascending ethanol concentrations.
5. Clear in xylene and mount.

각각의 표본에서 15개의 핵내 Ag-NORs의 수를

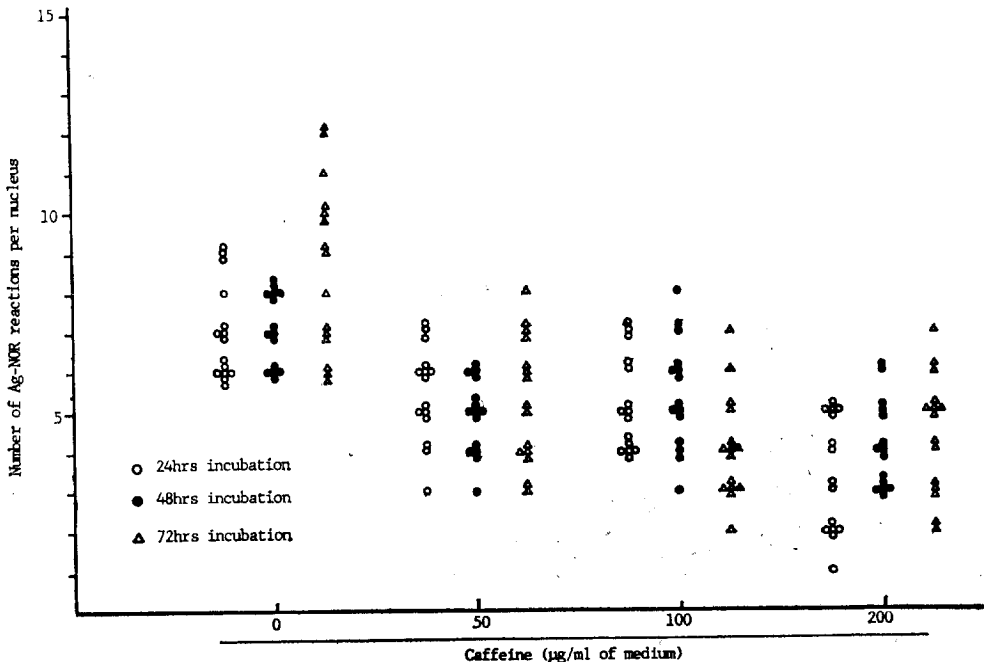


Fig 1. Distribution of Ag-NOR numbers per nucleus for specimens examined.

immersion 오일을 사용하여 대물렌즈 100배 상태에서 관찰하였다.

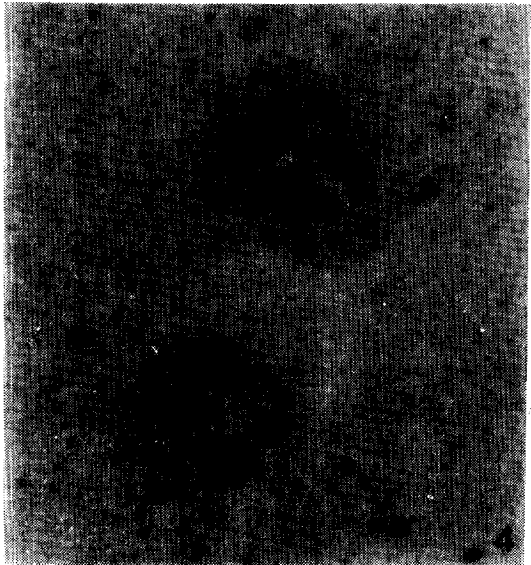
모든 결과의 통계처리는 Student's t-test로 실시하였다.

## 결 과

**Ag-NORs 염색 :** 모든표본에서 Ag-NORs는 다양한 크기의 흑색점으로 나타났으며 배양시간의 경과에 따라 과립의 수는 증가하였다(Table 1, Fig 1). Caffeine 처리 후 모든 용량에서 각각의 대조군에 비하여 급격한 감소를 나타냈고( $p < 0.005$ ) 각 처리용량의 변화에

따른 차이도 관찰할 수 있었다(Table 1, Fig 1-4). 일반적으로 Ag-NORs 양성 과립의 숫자와 크기는 세포 내 수가 많은 경우 소형이었으며, 몇개의 과립이 포도송이처럼 엉켜있는 경우도 있었다.

**[<sup>3</sup>H]thymidine incorporation:** NIH3T3 세포의 성장에 따른 [<sup>3</sup>H] thymidine 결합을 나타내는 disintegration per minutes(DPM) 값은 배양시간의 경과에 따라 급격히 증가하였으며 caffeine 투여군에서는 낮은 수치를 나타냈다. 또한 각 처리용량의 변화에 따라 처리군 간에도 유의성 있는 차이를 관찰할 수 있었다(Table 2).



### Legends for figures

- Fig 2.** Cultured NIH3T3 mouse fibroblast cells for 72 hours without caffeine. Silver staining for Ag-NOR proteins. The darkly stained dots are very numerous and scattered.  $\times 20$ .
- Fig 3.** High power view of Fig 2. The cells contain multiple black nuclear dots.  $\times 500$ .
- Fig 4.** Cultured NIH3T3 mouse fibroblast cells for 72 hours with  $200\mu\text{g/ml}$  of caffeine. The cells contain significantly less and larger Ag-NORs than the cell of Fig 3.  $\times 500$ .

**Table 1.** Numbers of Ag-NORs per nucleus in NIH3T3 after caffeine treatment

Incubation time (hrs)	Caffeine ( $\mu\text{g/ml}$ of medium)			
	None	50	100	200
24	6.81 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	5.56 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>	5.11 $\pm$ 1.13 <sup>c</sup>	3.38 $\pm$ 1.41 <sup>c,d</sup>
48	7.13 $\pm$ 1.26	4.88 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>	5.33 $\pm$ 1.28 <sup>c</sup>	4.0 $\pm$ 1.10 <sup>c,d</sup>
72	8.50 $\pm$ 2.04	5.31 $\pm$ 1.54 <sup>c</sup>	4.0 $\pm$ 1.27 <sup>c,d</sup>	4.39 $\pm$ 1.46 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mean $\pm$ SD.<sup>b</sup>p<0.025, compared with each untreated group.<sup>c</sup>p<0.005, compared with untreated group.<sup>d</sup>p<0.01, compared with 50 $\mu\text{g}$  treated group.**Table 2.** Effect of caffeine on proliferation of NIH3T3

Incubation time (hrs)	Caffeine ( $\mu\text{g/ml}$ of medium)			
	None	50	100	200
24	38178.4 $\pm$ 1143.3 <sup>a</sup>	34939.3 $\pm$ 2235.1	31368.2 $\pm$ 216.5 <sup>c</sup>	28208.3 $\pm$ 789.3 <sup>c,d</sup>
48	83260.4 $\pm$ 1634.7	71639.3 $\pm$ 4955.7 <sup>b</sup>	67056.3 $\pm$ 954.2 <sup>c</sup>	56665.4 $\pm$ 806.9 <sup>c,d,e</sup>
72	137185.8 $\pm$ 12606.0	102046.5 $\pm$ 2326.3 <sup>b</sup>	91111.1 $\pm$ 2937.0 <sup>c,d</sup>	79674.9 $\pm$ 8945.7 <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup>Mean $\pm$ SD, of the disintegration per minute of [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation.<sup>b</sup>p<0.01, compared with each untreated group.<sup>c</sup>p<0.005, compared with each untreated group.<sup>d</sup>p<0.01, compared with 50 $\mu\text{g/ml}$  treated group.<sup>e</sup>p<0.005, compared with 100 $\mu\text{g/ml}$  treated group.

## 고 찰

본 연구에서는 정상 증식세포인 NIH3T3 마우스 섬유아세포의 성장에 대한 caffeine의 효과를 scintillation count와 Ag-NORs 염색방법으로 관찰 비교하였다.

세포의 증식은 정상적인 세포에서도 일어날 수 있는 현상으로써 증식의 속도는 질병의 진단과 예후판정 등을 포함한 세포생리상태를 파악하는 지표가 될 수 있다. 지금까지 형태학적으로 세포의 증식성을 측정하는 데는 유사분열 세포의 수를 세거나<sup>14</sup> 최근 autoradiograph<sup>15</sup>, flow cytometry를 이용한 DNA의 측정<sup>16</sup>, bromodeoxyuridine 흡수정도 측정<sup>17</sup> 또는 항체를 이용한 면역효소 염색<sup>18</sup> 등이 이용되나 이들의 적용은 시간적 경제적 손실이 많은 단점이 있다. 이에 비하여 Ag-NORs 염색법은 방법이 간단하고 통상적인 파라핀포매 조직에 적용할 수 있는 점 등에서 많은 이용가치가 있다.

한편 caffeine은 화학적으로 식물 alkaloid이며 생체 내에서 중추신경계, 심장 및 골격근, 폐장의 혈액 및 산소공급, 위액분비, 배뇨를 자극하고 위 연동억제 등 다양한 생리학적, 생화학적 효과를 나타낸다.<sup>19,20</sup> 동

물세포에 대한 작용은 각종 물리적, 화학적 발암물질 및 돌연변이 유발물질의 투여에 따른 생존율을 감소시키고<sup>21-24</sup> 염색체 장애 빈도를 증가시키며<sup>25,26</sup> 항대사물질에 의한 성장억제효과를 촉진시키는데<sup>27</sup> 이러한 작용은 세포회복과정에 대한 방해에기인 하는 것으로 알려져 있다. 또한 caffeine은 자외선 또는 화학적 발암물질에 의한 세포변형 및 돌연변이 유발 촉진<sup>28</sup> 또는 억제<sup>29</sup>, DNA post-replication repair 억제<sup>30</sup> 등에 관여한다고 보고되었다.

이와 같이 대부분의 연구가 투여물질의 효과에 대한 caffeine의 작용에 대해 수행된 바 본 연구에서 NIH3T3 세포증식에 대한 caffeine의 단독효과를 관찰한 결과 비처리군에 비하여 통계적으로 유의성 있는 성장 억제 작용을 나타냈고 처리 용량간에도 어느정도 유의성 있는 차이를 나타냄으로써 caffeine이 정상세포증식을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

한편 [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation수치와 Ag-NORs 염색결과를 비교해 본 바 각 실험군간의 유의성이 비슷한 경향을 나타내므로써 Ag-NORs 염색방법의 유용성을 확인할 수 있었다. 이는 정상세포주를 이용한 각종 실험에서도 Ag-NORs 염색방법을 이용한 형태학적

관별이 가능하며 나아가 과립의 수, 크기 및 편심률 등<sup>31-33</sup>을 고려한다면 분자수준의 실험을 포함한 세포생리에 대한 시험물질의 작용 등에 대하여도 형태학적 방법으로 정량분석 할 수 있는 방법인 것으로 사료된다.

## 결 론

정상 증식세포인 NIH3T3 마우스섬유아세포의 성장에 대한 caffeine의 효과를 scintillation count와 argyrophilic nucleolar organizer region-associated proteins (Ag-NORs) 염색방법으로 관찰 비교하였다.

Ag-NORs는 핵내 흑색점으로 나타났으며 그 결과는 다음과 같다.

1. NIH3T3세포의 Ag-NORs수는 배양후 24시간에  $6.81 \pm 1.38$ , 48시간에  $7.13 \pm 1.26$ , 72시간에  $8.50 \pm 2.04$ 개였다.

2. Ag-NORs의 수는 caffeine 처리에 따라 유의성 있게 감소하였다. ( $p < 0.01$ )

3. 각 실험군에서 Ag-NORs 염색법을 사용한 결과는 [<sup>3</sup>H] thymidine 결합의 측정치와 비슷한 변화를 보였다.

따라서 caffeine의 NIH3T3에 대한 증식 억제효과는 Ag-NORs 염색법과 [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation법에 모두 일치된 결과를었다. 따라서 이 실험에서는 조직병리학분야 연구에 있어 Ag-NORs법의 정량분석적 적용 가능성을 제시하였다.

## 참 고 문 헌

1. Crocker J, Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J Pathol* 1987;151:111-118.
2. Eusebi V, Ceccarelli C, Cancellieri A, et al. Nucleolar organizer regions in normal skeletal muscle and benign and malignant rhabdomyoblastic tumors. *Tumori* 1989;75:4~7.
3. Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia* 1980;36:1014.
4. Crocker J, Skilbeck N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *I Clin Pathol* 1987;40:885~889.
5. Derenzini M, Romagnoli T, Mingazzi P, et al. Interphasic nucleolar organizer region distribut-

- ion as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Verchows Arch(Cell Pathol)* 1988;54:334~340.
6. Fallowfield ME, Dodson AR, Cook MG. Nucleolar organizer regions in melanocytic dysplasia and melanoma. *Histopathology* 1988;13:95~99.
7. Perry RP: Processing of RNA. *A Rev Biochem* 1976;45:605~629.
8. Ploton D, Menager M, Jeannesson P, et al. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986;18:5~14.
9. Bolognari A, Contini A. The role of the nucleolus in carcinogenesis. *Riv Biol Norm Pathol* 1981;7:43~68.
10. Bush H, Smetana K. Nucleoli of tumor cells. In: bush H, Smetana K, ed. *The nucleolus*. New York: Academic Press, 1981:448~471.
11. Derenzini M, Betts CM, Ceccarelli C, et al. Ultrastructural organization of nucleoli in benign and malignant melanomas. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1986;52:343~35.
12. Howell WM. Selective staining of nucleolus organizer regions (NORs). In: Bush H, Rothblum LI, ed. *The cell nucleus (Vol XI)*. New York, London: Academic Press, 1982:89~142.
13. Derenzini M, Romagnori T, Ceccarelli C, et al. Fixatives and silver stainability of NOR proteins at the light microscopic level. *J Histochem Cytochem* 1988;36:1453~1454.
14. Graem N, Helweg-Larsen K. Mitotic activity and delay in fixation of tumour tissue. The influence of delay in fixation on mitotic activity of a human osteogenic sarcoma grown in athymic nude mice. *Acta Pathol Microbiol Scand[A]* 1979;87:375~8.
15. Bolognesi C, Taningher M, Parodi S, et al. Quantitative predictivity of carcinogenicity of the autoradiographic repair test (primary hepatocyte cultures) for a group of 80 chemicals belonging to different chemical classes. *Environ Health Perspect* 1986;70:247~253.
16. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, et al. Flow

- cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 1983;43:3982~3997.
17. Napalkov NP, Anisinov VN, Likhachev AJ. 5-bromodeoxy uridine-induced carcinogenesis and its molification by persistent estrus syndrome, unilateral nephrectomy, and x-irradiated in rats. *Cancer Res* 1989;49:318~323.
  18. Gerdes J, Schwab J, Lemke H, et al. Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31:13~20.
  19. Stavric B. Methylxanthines: Toxicity to humans. 2. Caffeine. *Fd Chem Toxic* 1988;26:645~662.
  20. Weathersbee PS, Lodge JR. Caffeine: its direct and indirect influence on reproduction. *J reprod Med* 1977;19:55~63.
  21. Yagi T, Takebe H. Similitiy in the effect of caffeine on DNA synthesis after UV irradiation between xeroderma pigmentosum variant cells and mouse cells. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:754~758.
  22. Rauth AM, Barton B, Lee CPY. Effects of caffeine on L-cells exposed to mitomycin C. *Cancer Res* 1970;30:2724~2729.
  23. Waldren CA, Rasko I. Caffeine enhancement of X-ray killing in cultured human and rodent cells. *Radiat Res* 1978;73:95~110.
  24. Walker IG, Reid BD. Caffeine potentiation of the lethal action of alkylating agent on L-cells. *Mutat Res* 1971;12:1101~1104.
  25. Kato H. Induction of sister chromatid exchanges by UV light and its inhibition by caffeine. *Exp Cell Res* 1973;82:383~390.
  26. Roberts JJ, Sturrock JE. Enhancement by caffeine of N-methyl-N-nitroso-urea-induced mutations and chromosome aberrations in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1973;20:243~255.
  27. Lowe JA, Henderson JF. Enhancement by caffeine of the growth inhibitory effects of antimetabolites in lymphoma L5178Y cells. *Biochem Pharmacol* 1977;26:1533~1534.
  28. Donovan PJ, DiPaolo JA. Caffeine enhancement of chemical carcinogen-induced transformation of cultured syrian hamster cells. *Cancer Res* 1974;34:2730~2737.
  29. Kagunaga T. Caffeine inhibits cell transformation by 4-nitro-quinoline-1-oxide. *Nature(Lond)* 1975;258:248~250.
  30. Trosko JE, Frank P, Chu EHY, et al. Caffeine inhibition of postreplication repair of N-acetoxy-2-acetylaminofluorene-damaged DNA in Chinese hamster cells. *Cancer Res* 1973;33:2444~2449.
  31. Van der Valk, Mosch A, Kurver PJ, et al. Morphometric characterisation of 52 B cell nonHodgkin's lymphomas. *J Clin Pathol* 1983; 36:289-297.
  32. Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, et al. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. *J Ultrastru Res* 1983;84:161~172.
  33. Derenzini M, Betts CM, Eusebi V. Distribution of interphase nucleolar organizer regions and diagnosis of malignancy. *Lancet II* 1987;286.