

Comparison of Mutant Frequencies Induced by γ -radiation and Pentachlorophenol at *hprt* Locus in Human T-lymphocytes(I)

In Gyu Kim, Seon Young Park, Byung Su Yoon*,
Myung Haing Cho, Yong Soon Lee†

*Korea Atomic Energy Research Institute, Kyonggi University,

†Seoul National University

인체 T-림프구 *hprt* 유전자에서 방사선 및 pentachlorophenol에 의한 돌연변이 빈도의 비교(I)

김인규 · 박선영 · 윤병수* · 조명행 · 이영순†

한국원자력연구소, *경기대학교, †서울대학교

Abstract—*In vitro* somatic mutation induced by γ -radiation and pentachlorophenol(PCP) which is representative of chemical pollutant was measured at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(*hprt*) locus in human T-lymphocytes by a cell cloning assay. Mutant cells were selected by their ability to form a clone in the presence of purine analogue 6-thioguanine. The mutant frequencies by γ -irradiation to a dose of 1.0 Gy, 2.0 Gy and 3.0 Gy were 40%, 400% and 750% higher than those in controls. Significant changes were not observed in mutant frequencies in the 0.2 Gy and 0.5 Gy irradiated groups. When the doses of PCP were 15 ppm, 25 ppm and 50 ppm, the mutant frequencies increased by 30%, 90% and 520%, respectively. No changes were observed in the 10 ppm treated group. Similar types of dose-response relationship were shown in the two different mutagens. Reverse transcriptase/polymerase chain reaction technique(RT/PCR) was needed for the mutation spectrum to discriminate combined exposure to radiation and chemicals.

Key words : somatic mutation, γ -radiation, pentachlorophenol, *hprt*, T-lymphocyte, 6-thioguanine, mutant frequency, polymerase chain reaction

요약—인체 T-림프구에서 감마선과 대표적 화학 독성물질인 pentachlorophenol(PCP)의 돌연변이 효과를 hypoxanthine phosphoribosyl transferase(*hprt*) 유전자의 돌연변이 빈도로써 측정하였다. 감마선은 ¹³⁷Cs원을 사용하여 세포의 초기배양 시기에 0-3.0 Gy를 조사하였고, PCP는 세포의 초기배양시 최종농도 0-100 ppm으로 24시간 투여하였다. 돌연변이세포는 6-thioguanine을 처리 하에 세포가 성장하는 능력으로 분류하였다. 방사선에 의한 돌연변이빈도는 1.0 Gy, 2.0 Gy와 3.0 Gy 선량에서 대조군보다 약 40%, 400%와 750% 증가하였고 0.2 Gy와 0.5 Gy의 선량에서는 유의성 있는 변화가 없었다. PCP를 15 ppm, 25 ppm 그리고 50 ppm을 처리하였을 때 대조군보다 각각 30%, 90% 및 520% 정도 증가하였다.

본 실험에 사용된 상이한 두 돌연변이 원은 모두 비교적 비슷한 선량-반응형태를 보였으나, 환경독성 물질들의 혼합효과에서 돌연변이 원을 정성하기 위해서는 개선된 T-cell *hprt* clonal assay, 즉 reverse transcriptase/polymerase chain reaction(RT/PCR) 및 direct sequencing에 의한 mutational spectrum의 적용이 요구되었다.

중심어: 체세포 돌연변이, 감마선, pentachlorophenol, *hprt*, T-림프구세포, 6-thioguanine, 돌연변이 빈도, 유전자 증폭작용

서 론

생물학적 지표(bioindicator)란 방사선 및 환경독성물질에의 피폭에 따라 생물체내에서 발생하는 어떠한 생리 및 형태적 변화(physiological and morphological change)등을 지칭한다[1]. 이러한 방사선 피폭에 대한 생물학적 지표는 세포유전학(cytogenetics) 및 면역학(immunology)적인 측면등 생체 내 대상물질에 따라 다양한 방향에서 연구되어져 왔고 특성에 따라 독성효과와 감수성 등의 차이로 적용한계 및 범위 등이 각각 다르다[2]. 핵산(nucleic acid)을 합성하는 경로에는 *de novo* pathway를 제외하면 체내 pyrimidine 계열과 purine 계열을 재 생성하는 salvage pathway가 있는데 여기에 관여하는 효소가 thymidine kinase와 hypoxanthine phosphoribosyl transferase 등이다.

Hprt 유전자는 X-염색체에 위치하며 핵산의 합성을 위해 hypoxanthine(guanine)을 purine monophosphate 형태로 전환시키는 효소를 생산하며 이 유전자를 불활성시키면 purine 유사체 특히 6-thioguanine의 존재하에서도 세포가 성장할 수 있게 된다. 이러한 *hprt* 유전자를 대상으로 암발생요인등을 분석하기 위한 방법으로 개발된 T-cell *hprt* clonal assay[3, 4]는 돌연변이 세포의 분리가 쉽고 그 동안 지속적인 배양조건의 개발 및 개선으로 인하여 방사선 피폭뿐만 아니라 일반적으로 여러 가지 환경독성물질의 노출에 대한 독성효과의 지표로 적용을 모색하고 있으며 실제로 말초혈액 림프구세포를 사용하여 원폭생존자들[5]을 대상으로 방사선량을 감시하는데 널리 사용되었다. 각 환경독성물질 중, 특히 방사선의 피폭에 적절한 지표의 개발이 매우 중요하다는 것은

주지의 사실이다. 방사선에 의한 피폭을 선량 평가 하는데 가장 중요한 점은 첫째 저선량의 방사선 피폭도 감지할 수 있으며 둘째 방사선원과 다른 환경독성물질과의 생체영향을 구분할 수 있는 정성적 척도를 가지는 가장 이상적인 측정방법이 요구되고 있다. 근래의 PCR의 발달은 T-cell clonal assay를 한 단계 발전시키어, RT/PCR에 의한 또는 genomic DNA의 증폭에 의한 mutational spectrum의 작성으로 방사선을 비롯한 환경독성물질의 영향을 구분하는 정성적 분석이 가능하게 되었다.

본 연구는 방사선 조사에 대한 T-cell *hprt* clonal assay 및 mutational spectrum을 이용한 생물학적 지표 개발 목적 및 방사선과 다른 돌연변이원의 혼합효과 등의 연구를 위한 기초자료로서 우선 방사선과 원목의 보존제등에 다목적으로 사용되며, 현재 대표적인 환경물질로 대두되고, 비교적 약한 유전독성을 나타내는 것으로 알려진 화학적 환경독성물질인 PCP [6]에 의한 실험실 내에서의 각각의 돌연변이를 측정하여 비교한 것이다.

재료 및 방법

세포 및 세포배양배지

실험에 사용될 림프구세포의 분리를 위하여 36세의 남자에서 채혈하였다. T-cell 배양을 위하여 기본배지로서 RPMI-1640(Sigma R-5382; with L-Gln, USA)을 선택하였고, 그 외의 기본 시약으로 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS: Sigma), HEPES(Sigma), sodium bicarbonate (Sigma)등이 사용되었다. 2, 3차 계대배양을 위하여 RPMI 배지에 HL-1 medium (Ventrex, USA), calf bovine serum

(CBS: Gibco, USA), T-cell growth factor(TCGF: Collaborative Research, USA)를 첨가하였다. 세포 배양에 사용된 기구는 모두 일회용 플라스틱제품(Nunc, Denmark; Falcon, USA)을 사용하였다.

말초혈액 림프구의 분리

채혈된 25 ml의 혈액을 Histopaque(Sigma) 25 ml가 담긴 50 ml용 원심분리관의 상층에 넣고, 상온에서 400g로 원심 분리하여 중층의 혈액내 림프구 세포를 수거하였다. 이 세포들을 DPBS용액으로 두번 세척한 후(250g, 10분), 5 ml RPMI 1640 medium에 부유시키고, 0.1 ml를 0.4% trypan blue로 염색하여 haematocytometer로 생세포의 농도를 측정하였다.

1차 배양 (Prime culture): 분리된 혈액내 림프구 세포는 1차 배양액에 각 실험군당 $40 \times 10^6 (2 \times 10^6 \text{ cells/ml})$ 되게 나누고, 50 ml 용 culture flask 4개에 각각 10ml씩 나누었다. 1차 배양액은 RPMI 1640 기본배지에 1×nonessential amino acid(Sigma), 20 mM HEPES, 1 mM pyruvate, 1×antifungal-antibiotic solution(Sigma), 0.05 mM 2-mercaptoethanol(이상 모두 최종농도)을 넣어 RPMI 1640 완전 배지를 만들고, 여기에 다시 20% HL-1 medium, 5% CBS, 1 µg/ml phytohemagglutinin(Wellcome diagnostics, USA)를 첨가하여 1차 배양액(prime culture용)으로 하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂ 배양기(습도 100%)에서 36-40시간 배양하고 2차 배양(plating)에 들어갔다.

방사선 조사 및 PCP 처리에 의한 돌연변이

방사선 조사는 ¹³⁷Cs원(11Gy/min)을 사용하여 0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 및 3.0 Gy의 양으로 감마선에 노출시켰으며, 이는 세포계수가 완료된 직후, CBS가 포함되지 않은 RPMI 기본배지에서 수행하였다. 처리된 세포는 바로 1차 배양에 들어갔다. PCP는 이를 50 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 각 실험군당 최종농도가 0, 5, 10, 15, 25, 50 및 100 ppm(w/v)이 되게 하여, 1차 배양 시작 12시간 후부터 시작하여 24시간 동안 처리하였다.

2차 및 3차 배양 (계대배양): 36-40 시간의 1차

배양이 완료된 후, 세포를 원심분리로 수거하고, 그 일부를 염색, 검경하여 생존율을 측정하였다. 이들은 돌연변이 세포의 선택배양에 들어가기 전에 2회의 계대배양을 수행하였다. 이때 배양액은 RPMI 완전 배지에 20% HL-1 medium, 5% CBS, 10% TCGF를 포함시키고, 0.125 µg/ml phytohemagglutinin을 첨가시켰다. 배양시작시 세포의 농도는 $0.1 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 이고, 보통 20 ml 단위로 배양하였으며 배양기간은 각 3일 이었다.

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

CFU 판정, CE plate 및 돌연변이율의 계산

CFU (clone forming unit)는 보통 plating 6일 이후 분열하는 세포의 형태로써 관찰되었다. 이를 다시 10 일에 clone의 형태를 확인하여 positive well로써 기록하였다. CE plate (clonal efficiency, nonselective plate)는 well당 1, 2 또는 5개의 세포와 $1 \times 10^4 \text{ cells}$ 의 감마선으로 조사된 feeder cell을 넣어 배양한 것으로, 이때의 배양액은 6-thioguanine을 포함하지 아니한 것을 제외하고는 mutant plating배지와 동일하다. CE 및 mutation frequency(돌연변이율: MF)의 계산은 Poisson statistics를 적용하여 다음과 같이 계산하였다 (Albertini *et al.*, 1982).

Well 당 세포의 수 1×10^4 cells일 경우,

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

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

Mutant fraction (Mf) = $(-\ln P_0 \text{ in } 6\text{-thioguanine plates}) / (1 \times 10^4 \text{ cells/well})$

Mutant Frequency (MF) = Mf/CE

결과 및 고찰

생존율 계수

인체에 있어서 *hprt* 유전자의 심한 결핍은 Lesch-Nyhan 증후군의 정신질환을 유발하며 부분적 결핍은 통풍(gout)과 요산(uric acid)의 과다생성을 초래한다. 이러한 *hprt* 유전자의 이상은 말초혈액 T-림프구 세포에서 직접 돌연변이의 분석이 가능하기 때문에 방사선 치료요법[7, 8], 연령, 흡연[9, 10], 발암[11] 및 직업적 독성물질의 노출[12] 등 다양한 돌연변이원 등에 적용됨에 따라 방사선뿐만 아니라 여러 가지 돌연변이에 대한 정보를 쉽게 확보할 수 있다. 따라서 본 실험은 방사선 이외의 부가적 화합물에 의한 상승효과 및 부가효과 등의 연구에 기초자료를 제공하기 위하여 방사선 및 대표적 화학물질인 PCP 각각의 생존율계수 및 선량에 따른 돌연변이 빈도변화를 조사하고자 하였다.

감마선 피폭과 PCP 처리후의 T 세포의 생존율은 그림 1, 2에 정리하였다. 감마선 피폭의 경우 0-0.5 Gy에서는 생존율과 CE에서 모두 큰 차이를 보이지 않으나, 1.0-3.0 Gy의 선량에서는 생존율과 CE 모두에서 확실한 선량-반응관계를 보였다. 한편 PCP의 경우를 보면 0-25 ppm은 생존율에서 차이를 보이지 않으나, CE는 완만한 용량-반응관계를 나타내고 있다. 또한 50-100 ppm에서는 생존율 및 CE 모두 급격히 떨어지고 있는데, 이는 PCP의 세포독성을 나타내는 것으로 사료되며, 본 실험에서는 100 ppm에서의 돌연변이율에 대하여 만족할 결과를 얻지 못하였다.

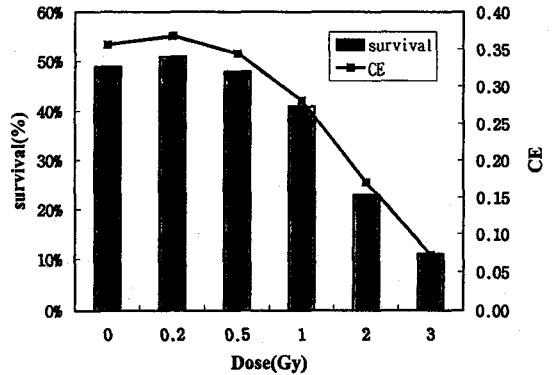


Fig. 1. Cell survival and clonal efficiencies following ^{137}Cs γ -irradiation in human T-lymphocytes.

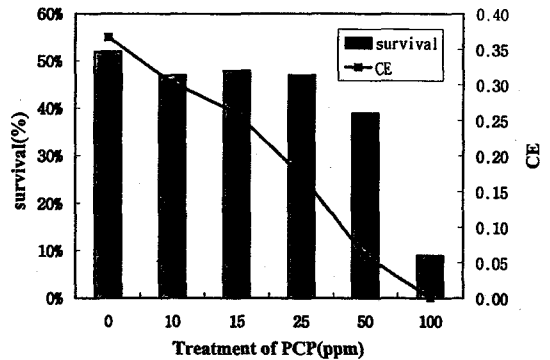


Fig. 2. Cell survival and clonal efficiencies by pentachlorophenol treatment in human T-lymphocytes.

돌연변이율의 변화 3, 4

전체 실험의 돌연변이율을 실험군에 따라 정리한 것이다. 감마선 조사의 경우 돌연변이율은 피폭선량이 0-0.5 Gy에서 큰 차이를 보이지 않으나 1.0-3.0 Gy에서는 선량-반응 관계를 잘 나타내고 있으며, PCP처리에 의한 돌연변이는 15 ppm부터 증가하기 시작하여 50 ppm에서의 돌연변이율의 급격한 변화가 주목된다. 측정된 최고 선량 또는 농도에서 양자의 돌연변이율의 변화는 각각 그 background 수준과 비교할 때 75%와 52% 증가를 보였으며, 이 두 가지 전혀 다른 기작의 돌연변이 원에서의 T-cell *hprt* clonal assay는 모두 비교적 정확한 선형의 선량-반응관계를 볼 수 있었다(그림 5).

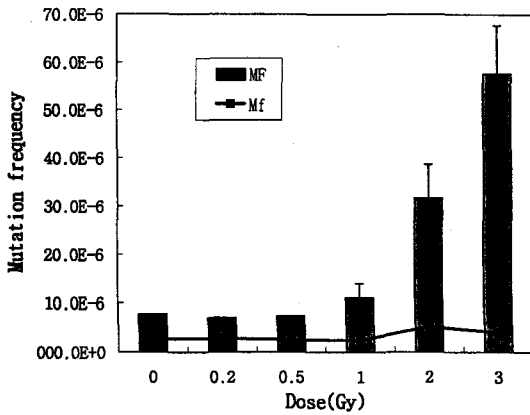


Fig. 3. Mutation fractions and mutation frequencies following ^{137}Cs γ -irradiation in human T-lymphocytes. The symbols represent mean(\pm SD) values for independent experiment($n=3$). * Mf, mutation fraction ; MF, mutation frequency.

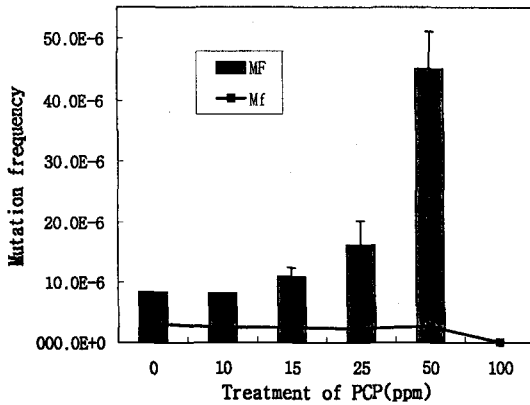


Fig. 4. Mutation fractions and mutation frequencies by pentachlorophenol treatment in human T-lymphocytes. The symbols represent mean(\pm SD) values for independent experiment ($n=3$). * Mf, mutation fraction ; MF, mutation frequency.

이는 실험동물에서의 결과[13]와 사람의 *in vivo* 및 *in vitro*의 다른 실험결과(O'Neill *et al.*, 1990)와 일치되나, 그 절대 값에서 많은 차이를 보여 실험결과의 상호비교를 통한 추정적용의 필요성이 제기된다.

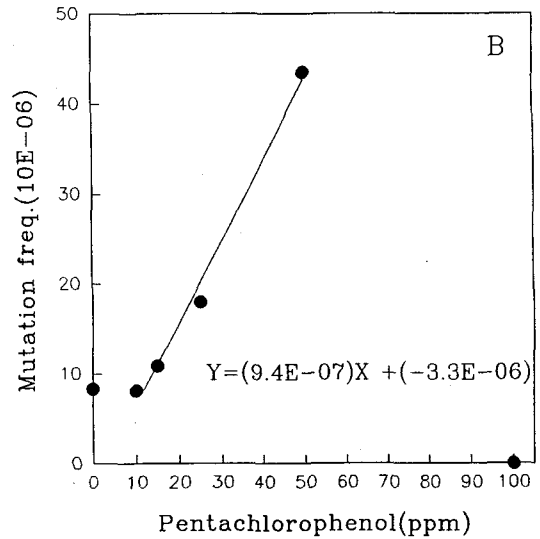
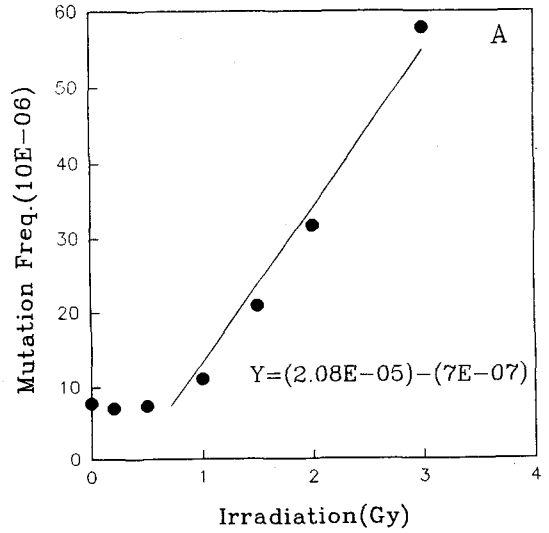


Fig. 5. Linear mutational dose-response curves following radiation(A) and pentachlorophenol (B) exposure.

또한 감마선 조사나 PCP처리에 의한 돌연변이의 실험에서 모두 저선량 및 저용량에서의 반응의 민감도는 한계가 있음을 볼 수 있었으며, 환경돌연변이원들의 혼합적인 효과를 분석할 때 이 *hprt* 돌연변이율만으로는 판단할 수 없다는 문제점이 제기되었다. 이는 T-cell *hprt* clonal assay의 개선된 방식인 mutational spectrum에 의하여 어느 돌연변이원의 효과인지 정

성될 수 있을 것이라 사료되며, 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 방사선을 포함한 혼합된 돌연변이원중 방사선 피폭에 의한 손상을 감지할 수 있는 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 말

이 논문은 과기처 국가 원자력 중장기 연구개발사업의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 본인들의 실험적 문제의 해결에 직접적인 도움을 준 미국 Vermont 대학교 R. J. Albertini 교수와 J. P. O'Neill 교수 그리고 실험조교인 L. M. Sullivan, T. Hunter씨에게 감사드립니다.

참고 문헌

1. National Research Council. "Biologic markers in pulmonary toxicology." National Academic Press, Washington D.C.(1989).
2. C. L. Greenstock and A. Trivedi. "Biological and biophysical technique to assess radiation exposure : A perspective." *Prog. Biophys. molec. Biol.* 61, 81-130(1994).
3. R. J. Albertini, K. L. Castle and W. R. Borchering. "T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine resistant lymphocytes present in human peripheral blood." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 6617-6621(1982).
4. R. J. Albertini, J. P. O'Neill, J. A. Nicklas and N. H. Heintz, P. C. Kelleher. "Alterations of the *hprt* gene in human *in vivo*-derived 6-thioguanine resistant T-lymphocytes." *Nature.* 316, 369-371(1985).
5. Y. Komada, M. Hakoda, M. Shimba, A. A. Awa and M. Akiyama. "A chromosome study of 6-thioguanine-resistant mutants in T-lymphocytes of Hiroshima atomic bomb survivors." *Mutation Research.* 227, 31-38(1989).
6. H. A. Hattenman-Frey and C. C. Travis. "Pentachlorophenol : Environmental partitioning and human exposure." *Arch. of Environ. Contam. Toxicol.* 18, 482-489(1989).
7. K. Messing, J. Ferraris, W. E. C. Bradley, J. Swarty and A. M. Seifert. "Mutant frequency of radiotherapy technicians appears to be associated with recent dose of ionizing radiation." *Health Physics.* 57, 537-544(1989).
8. J. A. Nicklas, M. T. Falta, T. C. Hunter, J. P. O'Neill, D. Jacobson-Kram, J. R. Williams and R. J. Albertini. "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(1990).
9. A. D. Tates, F. J. V., Dam, H. V. Mossel, H. Schoemaker, J. C. P. Thijssen, V. M. Woldring, A. H. Zwindermann and A. T. Natarajan. "Use of the clonal assay for the measurement of frequencies of *hprt* mutant in T-lymphocytes from five control populations." *Mutation Research.* 253, 199-213(1991).
10. J. P. O'Neill, L. M. Sullivan and R. J. Albertini. "*In vitro* induction, expression and selection of thioguanine-resistant mutants with human T-lymphocytes." *Mutation Research.* 240, 135-142(1990).
11. J. Cole, C. F. Arlett, P. G. Norris, G. Stephans, A. P. W. Waugh, D. M. Beare, and M. H. L. Green. "Elevated *hprt* mutant frequency in circulating T-lymphocytes of Xeroderma pigmentosum patients." *Mutation Research.* 273, 171-178(1992).
12. J. E. Cochrane and T. R. Skopek. 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*. (1993) (personal communication).

13. B. S. Yoon, I. G. Kim, S. Y. Park, M. H. Cho

and Y. S. Lee. "Mutational analysis at the *hprt* locus in splenic T-cells of rats exposed to pentachlorophenol." *Kor. J. Toxicol.* submitted (1996).