

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)를 이용하여 분석한 Bleomycin에 의한 사람 림프구의 염색체 재배열

손은희 · 정경인 · 정해원¹⁾

서울대학교 보건대학원

(1997. 3. 3 접수)

Chromosome Rearrangements Detected by Fluorescence *in situ* Hybridization in Human Lymphocyte Exposed to Bleomycin

Eun Hee Sohn, Kyung In Joung and Hai Won Chung¹⁾

School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

ABSTRACT : Chromosome rearrangement induced by bleomycin were identified by fluorescence *in situ* hybridization with probe for chromosome 4. The frequency of color junctions, translocations, dicentric and acentric fragments increased with bleomycin dose. Different types of balanced translocation and dicentric were scored and compared. The frequency of cells exhibiting multiple aberration was higher compared to that of cells exposed to Gamma radiation suggesting that effect of bleomycin might be similar to that of high LET radiation.

Key words : Bleomycin, Fluorescence *in situ* hybridization(FISH), Chromosome rearrangement

서 론

특정 염색체에 특이한 DNA probe를 사용하여 염색체의 구조적 이상을 찾아내는 fluorescence *in situ* hybridization(FISH) 기법은 현재까지 일반적인 염색법으로 사용되어 온 염색체 이상 분석으로는 찾아내기가 어려운 상호전좌 등 염색체 재배열을 정확하고 간편하게 찾아낼 수 있기 때문에, 염색체의 손상을 평가하는 새로운 분자독성학적 방법으로서의 활용성이 증가되고 있다(Pinkel 등, 1986; Cremer 등, 1990; Natarajan 등, 1992; Bauchinger 등, 1993; Nakano 등, 1993; Schmid 등, 1995).

현재까지 생물학적 선량계로서 널리 이용해 왔던 이동원염색체는 불안정한 염색체 교환으로 세포분열을 거듭함에 따라 치사하게 되어 오래전에 외부물질에 폭로되어 생성된 염색체

이상 정도를 제대로 반영해 주지 못하기 때문에, 폭로 후 오랜 기간 유지될 수 있는 안정한 염색체 교환인 상호전좌를 측정하는 것이 정확한 선량계로서 바람직하다(Au, 1991).

상호전좌를 측정하기 위해서는 과거에는 염색분염법을 이용하였지만 이를 위해서는 훈련된 전문가에 의해 많은 시간이 소요되기 때문에, 실제 활용에는 많은 어려움이 따른다. Pinkel 등 (1986)에 의해 개발된 FISH 기법은 특정 염색체만이 형광을 띄게 하는 현상을 이용하여 상호전좌 뿐 아니라 염색체 구조의 재배열을 쉽게 확인할 수 있어 독성물질을 평가하는 새로운 기법으로 그 방법의 타당성에 관한 연구가 증가되고 있다.

FISH 기법을 통해 관찰되는 염색체 재배열은 기존의 염색체 이상 분류법으로는 구분할 수 없이 새롭고 매우 복잡한 양상을 띄기 때문에 모든 연구자들이 각기 독자적인 분류체계를 사용하여 왔으나 1995년에 관련학자들에 의해 Protocol for A-

¹⁾To whom correspondence should be addressed.

본 연구는 보건복지부 보건의료연구 개발사업 연구비로 수행되었음.

berration Identification and Nomenclature Terminology(PAINT)라는 명명체계를 도입하였다(Tucker 등, 1995a). 이 체계에서는 기존 염색체이상 분석방법으로는 분류되지 않는 color junction, 삽입 등도 관찰되며, 이동원염색체 및 상호전좌의 경우도 다양한 형태로 분류가 가능하다.

Bleomycin은 1962년 발견된 이래 각종 암에 대한 화학요법제로 사용되어 왔으며, 이는 각종 세포에서 염색체이상을 유발한다. BLM의 작용기전은 이온화방사선과 같이 세포주기에 독립적으로 DNA에 작용하여 낮은 용량에서는 외가닥절단을, 높은 용량에서는 양가닥절단을 일으킨다고 보고되고 있다.

일반적으로 X선 및 γ 선과 같은 낮은 LET의 이온화방사선에 의한 염색체이상은 Poisson 분포를 따르는 경향이 있다고 알려져 있으나, α 선 및 중성자 등과 같은 높은 LET의 이온화방사선에 의한 염색체이상은 Poisson 분포를 따르지 않고 한 세포에 여러 개의 염색체이상이 나타나거나, 손상을 받지 않는 세포의 비율이 매우 높게 overspread된 분포를 나타낸다고 알려져 있다(Griffin 등, 1995). Bleomycin에 의한 염색체이상도 높은 LET의 이온화방사선과 비슷한 양상을 띄는 것으로 보고(Dresp 등, 1978)되어 있기 때문에, X선이나 γ 선과는 달리 한 세포에서 나타나는 염색체이상, 즉 염색체 재배열은 매우 복잡한 양상을 나타낼 것으로 추정된다.

현재까지는 주로 X선이나 γ 선에 의한 염색체이상을 측정하여 FISH 기법의 타당성을 입증하고자 하였으나, 에너지가 각기 다른 방사선의 종류에 따른 경우나, 방사선과 비슷한 성질을 가진 물질, 즉 세포주기 비의존성이며 DNA에 D.S.B.를 유발하는 제한효소나 bleomycin 등에 의한 염색체이상을 보고한 연구는 극소수에 지나지 않는다.

본 연구는 FISH 기법을 bleomycin에 의한 염색체 재배열의 양상을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

Bleomycin 처리 및 세포배양

건강한 사람의 말초혈액에 Bleomycin sulfate를 30, 150, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하고 3시간 후 인산완충용액으로 2번 세척한 후 10% 우태아혈청과 PHA가 포함된 RPMI 배지에 넣고 5% CO_2 가 공급되는 배양기에서 37°C 48시간 배양하였다.

FISH

염색체 표본 작성 3시간 전에 colcemid를 처리하고 저장액(0.075 M KCl) 및 고정액(Methanol : Acetic acid=3 : 1)을 처리하는 일반적인 방법에 따라 염색체 표본을 작성하였다. 염색체 slide는 공기건조 후 -20°C에서 보관하였다. FISH 과정은

정 등(1996)의 방법에 의해 수행하였다. 즉 염색체 slide를 2X SSC(pH 7)에서 15분씩 두 번 담근 후 70%, 85%, 100% ethanol에 각 2분씩 처리하는 탈수과정을 거친 후 70% formamide/2X SSC 용액에 70°C에서 5분간 denaturation시킨 다음 70%, 85%, 100% ethanol을 거친 후 slide를 건조시켰다. 또한 4번 염색체의 PBS library의 plasmid DNA를 biotin으로 표지시킨 후 이를 72°C에서 5분간 denaturation시키고 37°C에서 20분간 preannealing시킨 다음 slide에 30 μL 씩 점적하고 37°C에서 72시간 배양하였다. Slide를 1X SSC(pH 7)에서 72°C에서 5분간 처리하고 1X PBD로 세척 후 FITC-avidin 및 antiavidin을 거쳐 Propidium iodide(PI)로 counterstaining하여 형광현미경으로 관찰하였다.

현미경관찰 및 사진촬영

형광현미경(NIKON · OPTIPHOT)을 이용하여 dual band filter인 B-2A filter로는 FITC 및 PI를 동시에 관찰하였으며 G-2A filter로는 PI를 관찰하였다. KODAK Ektachrome 400 slide film을 이용하여 사진을 촬영하였다.

염색체 이상 측정 방법

본 연구에서는 Tucker 등(1995a)이 제안한 PAINT system (Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology)에 근거하여 염색체이상을 분류하였다. PAINT 분류 체계는 염색체형 이상만을 대상으로 하는데, translocation(t), dicentric(dic), insertion(ins), acentric fragment(ace), 그리고 ring(r)으로 구분하였다. 염색체이상 빈도는 paint된 4번 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 계산하여 보정하였다(Tucker 등, 1995b).

결 과

그림 1은 4번 염색체에 특이한 biotin이 표지된 probe로 hybridization시킨 염색체 슬라이드를 Fluorescin(FITC)이 표지된 avidin으로 반응시켜 관찰한 것인데 probe와 결합된 4번 염색체만이 연노란색(yellow-green)을 띠고 있으며, 같은 슬라이드를 Propidium Iodide로 counterstaining되면 모두 오렌지색을 띠고 있음을 알 수 있다. 또한 상호전좌, 이동원염색체 그리고, 매우 복잡한 양상으로 나타난 삽입을 관찰할 수 있다.

Bleomycin에 의해 유발되는 염색체이상 빈도는 표 1 및 2와 같다. 상호전좌, 이동원염색체, color junction, 무동원염색체 그리고 삽입 모두 용량에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다. 염색체 이상의 복잡성을 나타내어 주는 color junction의 빈도가 가장 높았으며, 상호전좌의 빈도는 이동원염색체의 빈도보

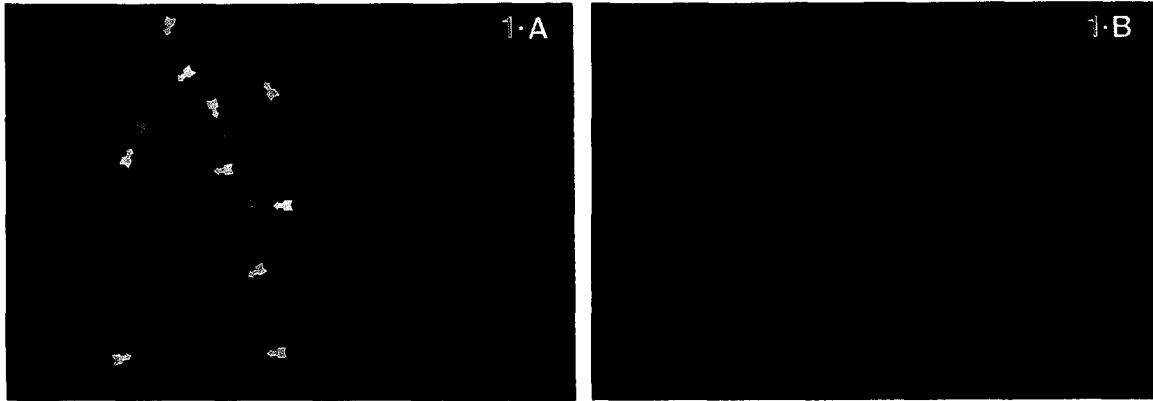


Fig. 1. Metaphase spread with insertions involving chromosome 4 (A). The same metaphase spread as (A) painted with PI (B).

Table 1. Bleomycin-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 4: Numbers and frequencies of color junctions, translocations and dicentric chromosomes

Dose ($\mu\text{g}/\text{m}^l$)	No. of cells scored	No. of cell equivalents scored	No. of aberrant cells	No. of color junctions	No. of translocations	No. of cells with translocation	No. of dicentrics	No. of cells with dicentric	t/dic
0	1885	221	4	7(0.0317)	6(0.0271)	3	1(0.0045)	1	6.02
30	1315	154	48	134(0.8701)	87(0.5649)	51	27(0.1753)	27	3.22
150	1029	110	134	232(1.9333)	144(1.2000)	79	45(0.3750)	40	3.20
300	1072	125	169	323(2.5840)	174(1.3920)	102	80(0.6400)	72	2.18

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

Table 2. Bleomycin-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 4: Numbers and frequencies of insertions, acentric fragments and ring chromosomes

Dose ($\mu\text{g}/\text{m}^l$)	No. of cells scored	No. of cell equivalents scored	No. of acentric fragments	No. of cells with acentric fragments	No. of insertions	No. of cells with insertion	No. of rings	No. of cells with ring
0	1885	221	0(0.0000)	0	0(0.0000)	0	0(0.0000)	0
30	1315	154	65(0.4221)	41	1(0.0065)	1	3(0.0195)	3
150	1029	110	106(0.8833)	74	11(0.0917)	10	4(0.0333)	4
300	1072	125	146(1.1680)	92	18(0.1440)	15	3(0.0240)	3

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

Table 3. Numbers and frequencies of translocations induced by bleomycin using FISH with the DNA probe for chromosome 4

Dose ($\mu\text{g}/\text{m}^l$)	No. of translocations											
	Total	t(Ab)	t(Ba)	t(bAA)	t-t(aBa)	t-t(AbA)	dic-t (ABa)	dic-t (BAb)	dic-t-t (BAbA)	t-dic-ins (aBAba)	tri-t (AABa)	t-ins (bAba)
0	6 (0.0271)	3 (0.0136)	3 (0.0136)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)
30	87 (0.5649)	34 (0.2208)	45 (0.2922)	2 (0.0130)	0 (0.0000)	2 (0.0130)	2 (0.0130)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)
150	144 (1.2000)	71 (0.5917)	62 (0.5167)	4 (0.0333)	1 (0.0065)	0 (0.0000)	3 (0.0250)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	1 (0.0083)	1 (0.0083)
300	174 (1.3920)	79 (0.6320)	67 (0.5360)	4 (0.0320)	6 (0.0480)	1 (0.0080)	4 (0.0320)	3 (0.0240)	1 (0.0080)	1 (0.0080)	0 (0.0000)	0 (0.0000)

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

Table 4. Numbers and frequencies of dicentrics induced by bleomycin using FISH with the DNA probe for chromosome 4

Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of dicentrics												
	Total	dic (BA)	dic (BB)	dic-t (ABa)	dic-t (BAb)	dic-t-t (BAbA)	dic-ins (BABA)	t-dic-ins (aBAbA)	tri (BAA)	tri (ABA)	tri-t (AABa)	tri-ins (AAAbA)	tet (ABAA)
0	1 (0.0045)	1 (0.0045)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)
30	27 (0.1753)	25 (0.1623)	0 (0.0000)	2 (0.0130)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)
150	45 (0.3750)	33 (0.3000)	2 (0.0182)	3 (0.0273)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	0 (0.0000)	1 (0.0091)	0 (0.0000)	1 (0.0091)	0 (0.0000)	1 (0.0091)
300	80 (0.6400)	59 (0.4720)	1 (0.0080)	4 (0.0320)	3 (0.0240)	1 (0.0080)	1 (0.0080)	1 (0.0080)	2 (0.0160)	2 (0.0160)	0 (0.0000)	1 (0.0080)	0 (0.0000)

*The number in parenthesis indicate No. per cell equivalent.

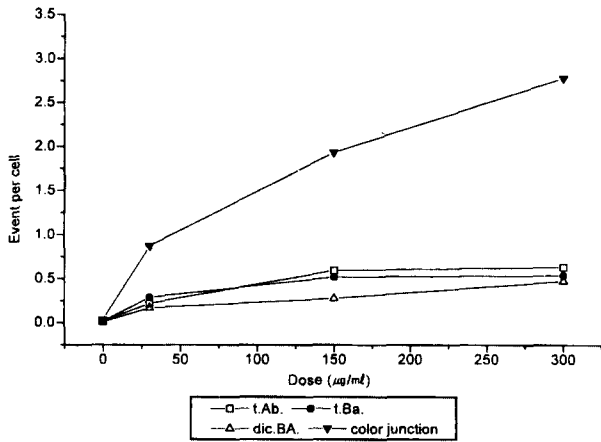


Fig. 2. A dose-reponse curve of different types of translocations, dicentric chromosomes and color junctions induced by bleomycin.

다 높게 나타났다.

Bleomycin에 의해 나타난 상호전좌는 매우 복잡한 양상을 띄고 나타났는데 표 3에서 보는 바와 같이 한 염색체상에 2회 이상의 상호전좌가 나타난 t(bAA) 및 t-t(aBa), 이동원염색체와 상호전좌의 형태인 dic-t-t(BAbA), 또한 삽입이 포함된 경우인 t-dic-ins(aBAbA)도 관찰되었다.

이동원염색체의 형태도 매우 다양하게 나타나 표 4에서 보는 바와 같은 여러 양상을 보여주고 있었다.

Color junction, 이동원염색체 그리고 상호전좌의 빈도만을 비교한 결과는 그림 2와 같은데 color junction의 빈도가 가장 높게 나타났다.

고찰

본 연구결과 bleomycin에 의해 나타나는 염색체이상의 형태

는 방사선 조사에 의한 경우보다 매우 다양하게 나타났으며 특히 1995년에 제안된 PAINT 분류체계를 따른 경우는 한 염색체내에 2회 이상의 교환 및 삽입 등이 포함된 t(bAA), t-dic-ins(aBAbA) 등도 관찰되었다. 4번 염색체의 probe를 이용하여 γ 선 조사에 의한 염색체이상을 분석한 결과에서는 2 Gy의 방사선 조사시에도 나타나는 염색체이상 형태는 t(Ab) 등 염색체에 하나의 이상이 나타나는 경우가 대부분이며, 손상된 세포당 생성되는 염색체이상의 비(ratio)도 color junction이 1.49, 상호전좌는 0.79, 그리고 이동원염색체는 0.40으로 나타난 것에 비교하여 비슷한 수의 염색체이상을 유발하는 bleomycin 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 본 실험에서는 매우 다양한 형태의 염색체이상이 관찰되었으며 손상된 세포당 생성되는 염색체이상도 color junction은 2.07, 상호전좌는 1.03, 그리고 이동원염색체는 0.47로 모두 높게 나타났다. 즉 한 세포에 여러 개의 손상이 동시에 나타나는 것으로, 이러한 결과는 bleomycin에 의한 염색체이상 유발 양상이 X선이나 γ 선 같은 낮은 LET의 방사선 보다는 높은 선에너지 분배(LET)를 가지는 α 선과 비슷한 양상을 나타내기 때문이라는 보고(Dresp, 1978)를 감안한다면 설명이 가능하다. Hoffman 등(1994)과 Ellard(1995)도 bleomycin에 의한 염색체이상의 빈도는 overdispose되어 있어 poisson 분포를 따르지 않는다고 보고한 바 있다.

또한 본 실험결과 상호전좌가 이동원염색체보다 높은 빈도로 나타났는데, 이는 사람의 림프구를 방사선 조사 후 FISH를 이용한 연구결과에서 공통적으로 보고되고 있는데(Lucas 등, 1992; Natarajan 등, 1992; Nakano 등, 1993; Tucker 등, 1993; Matsuoka 등, 1994; Chung 등, 1996) bleomycin에 의해서도 t:dic가 높게 나타났다는 보고가 있다(Ellard, 1995). Ellard는 이러한 이유로서 이동원염색체가 상호전좌로 잘못 분류되어 측정되었을 가능성을 제시하고 있지만, 단정적으로 말할 수 없다. 오히려 Tucker 등(1995b)이 설명한 가능한 이유로서 들고 있는 관찰자간의 편견 및 배양시간에 따라 두번째 분열하는

세포가 존재한다는 점 또는, 실제로 사람 림프구에서 상호전좌가 더 많이 나타날 수 있다는 사실도 고려되어야 될 것이다.

150 $\mu\text{g/ml}$ 및 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 처리했을 때 나타나는 상호전좌의 형태 중 t(Ab)의 빈도가 t(Ba)보다 더 높게 나타나는 경향을 보였지만, 30 $\mu\text{g/ml}$ 처리시에는 오히려 낮게 나타나 일률적으로 나타나지는 않았지만 Tucker 등(1995b), Finnon 등(1995), 그리고 정 등(1996)의 이온화방사선을 이용한 연구의 결과와도 일치하고 있다.

염색체이상의 복잡성을 나타내주는 color junction은 기존의 염색체이상 측정시에는 관찰할 수 없는 것으로, 본 실험결과 color junction의 수가 염색체이상 전체 중 가장 높게 나타났으며 용량에 따라 증가하는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 볼 때 bleomycin에 의한 염색체이상의 유발은 저 LET의 방사선이 γ 선이나 X선과는 달리 한 세포에 여러 가지의 염색체이상을 유발하는 고 LET 방사선의 성격을 띄고 있다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었으며, FISH 기법을 통해 다양한 형태의 염색체 재배열을 구체적으로 설명할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Au, W.W., (1991): Monitoring human population for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. *Occupational Med.*, **6**(4), 597-611.
- Bauchinger, M., E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann and U. Nahrstedt, (1993): Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two-colour fluorescence *in situ* hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**(2), 179-184.
- Chung, H.W., E.H. Sohn, H.S. Kee and S.W. Ha, (1996): Radiation induced chromosome aberration in human lymphocyte detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Environ mutagen & Carcinogen*, **16-2**, 88-96.
- Cremer, T., S. Popp, P. Emmerich, P. Lichter and C. Cremer, (1990): Rapid metaphase and interphase deletion of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression *in site* hybridization. *Cytometry*, **11**, 110-118.
- Dresp, J., E. Schmid and M. Bauchinger, (1978): The cytogenetic effects of bleomycin on human peripheral lymphocyte *in vitro* and *in vivo*. *Mutat. Res.*, **56**, 341-353.
- Ellard, S., E.M. Parry and J.M. Parry, (1995): Use of multicolour chromosome painting to identify chromosomal rearrangements in human lymphocytes exposed to bleomycin: A comparison with conventional cytogenetic analysis of giemsa-stained chromosomes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **26**, 44-54.
- Finnon, P., D.C. Lloyd and A.A. Edwards, (1995): Fluorescence *in situ* hybridization detection of chromosomal aberrations in human lymphocytes: applicability to biological dosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.*, **68**(4), 429-435.
- Griffin, C.S., S.J. Marsden, D.L. Stevens, P. Simpson and J. R.K. Savage, (1995): Frequencies of complex chromosome exchange aberrations induced by 238Pu α -particles and detected by fluorescence *in situ* hybridization using single chromosome-specific probes. *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**, 431-439.
- Hoffmann, G.R., A.M. Sayer and L.G. Littlefield, (1994): Potentiation of bleomycin by the aminothiols WR-1065 in assays for chromosomal damage in G₀ human lymphocytes. *Mut. Res.*, **307**, 273-283.
- Lucas, J.N., A. Awa, T. Strauma, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, H-U. Weier, D. Pinkel, J. Gray and G. Littlefield, (1992): Rapid translocation frequency analysis in human decades after exposure to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 53-63.
- Matsuoka, A., J.D. Tucker, M. Hayashi, N. Yamazaki and T. Sofni, (1994): Chromosome painting analysis of X-ray-induced aberrations in human lymphocytes *in vitro*. *Mutagenesis*, **9**(2), 151-155.
- Nakano, M., E. Nakashima, D.J. Pawell, Y. Kodama and A. Awa, (1993): Frequency of reciprocal translocation and dicentric induced in human blood lymphocyte by X-irradiation as determined by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**(5), 565-569.
- Natarajan, A.T., R.C. Vyas, F. Darroudi and S. Vermeuler, (1992): Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocyte as detected *in situ* hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int. J. Radiat. Biol.*, **61**, 199-203.
- Pinkel, D., T. Strauma and J.W. Gray, (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2934-2938.
- Schmid, E., H. Braselmann and U. Nahrstedt, (1995): Comparison of γ -ray induced dicentric yields in human lymphocytes measured by conventional analysis and FISH. *Mut. Res.*, **348**, 125-130.
- Tucker, J.D., W.F. Morgan, A. Awa, M. Bauchinger, D. Blakey, M.N. Cornforth, L.G. Littlefield, A.T. Natarajan and C. Shasserre, (1995a): A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet*, **68**, 211-221.
- Tucker, J.D., D.A. Lee and D.H. Moore II, (1995b) Validation of chromosome painting. II: A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.*, **67**, 19-28.