

진보된 세포, 분자 독성평가기법

류재천*

한국과학기술연구원 생체대사연구센터 독성연구실

요약 : 화학물질의 안전성확보를 위한 여러 노력들이 경주되고 있다. 최근에 들어 이러한 안전성평가기법은 고전적인 안전성평가기법으로부터 분자생물학 기술의 발전에 힘입어 세포, 분자 독성학(Cellular and Molecular Toxicology) 으로 발전되어오고 있다. 여기에서는 최근에 이루어지고 있는 이러한 발전에 따라 국제적으로 널리 사용되고 있는 진보된 안전성평가 기법들을 중심으로 소개하고자 한다. (2002년 8월 29일 접수, 2002년 9월 30일 수리)

Key Words : cellular and molecular toxicology, comet, transgenic, thymidine kinase gene forward

1. 서론

20세기에 들어 과학기술 및 산업의 눈부신 발달로, 인류는 경제 성장에 따른 풍요로움과 안락함, 편리함 등 많은 혜택을 누리오고 있으며, 이를 위해 수많은 화학물질들이 만들어지고 사용되고 있다. 그러나 최근에 문제가 되고 있는 환경호르몬에서 알 수 있듯이, 인간을 위해 만들어낸 화학물질들이 때로 인간의 의도와는 다르게 환경오염 등을 통해 일부는 생태계 순환과정에서 장기간 잔류되거나 생물체에 농축되어 인간과 모든 자연생물에 많은 해로움을 주고 있는 것도 사실이다. 따라서 화학물질들의 독성을 평가하여, 인간 및 자연 환경의 안전성을 확보하는 것은 환경뿐 아니라 인간 생존 차원 이상의 중요성을 갖는다고 할 수 있다. 이를 위해 여러 독성 평가기술이 개발되어 OECD guideline for the testing of chemicals 등에 등재되어 사용되어 왔으며, 최근에는 분자생물학 기술을 이용하여 과학 선진국들을 중심으로 고전적인 독성 평가 방법에서 벗어난 세포와 유전자를 활용한 신속하고 정확한 독성 평가 기법의 새로운 paradigm 이 형성되고 있다. 이러한 움직임은 최근에 표면화되어, 1999년 3월 24-26일, 미국 Washington DC에서 OECD와 ICH guideline의 International Harmoni-

zation을 위한 IWGTP workshop에서, 진보된 독성 평가기법들 즉, transgenic mutagenesis system, thymidine kinase gene mutation, single cell gel electrophoresis, DNA binding/adduct 등을 주제로 국제회의가 개최되었고, 필자도 전문가로 초청되어 참가한 바 있다.

본인이 자주 강조하여 왔듯이 OECD를 비롯한 여러 독성 guideline의 고전적인 독성평가기법들은 아주 빠르게, 많은 변화가 있으리라 믿고 있다. 특히 OECD Guideline도 현재 여러 실험법에 대해, 세포, 분자독성학의 진보에 따라 보완 또는 추가되고 있으며, 미국 돌연변이학회의 official journal인 Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 33, page 91 (1999) 에서도 "Classic" battery of genetic toxicology tests (e.g., Salmonella assay, cultured mammalian cell gene mutation and chromosomal aberration assays, in vivo bone marrow cytogenetic assays)에 대해서 "We now turn to the future", next generation battery of genetic toxicology tests를 언급하며, 고전적인 방법에서 나아가 진보된 차세대 연구기법으로의 변화를 강조하고 있다.

이와 같이 세포·분자독성학(Cellular and Molecular Toxicology)의 연구기법이 활성화되면서 새로운 독성평가 방법으로 눈부신 발전을 거듭하는 주요 topic으로서는, DNA 자체를 추출하지 않고도 DNA 손상을 cell level에서 손쉽게 정량적으로 계산이 가능

*Corresponding author (Fax : +82-2-958-5070,
E-mail : ryujc@kist.re.kr)

한 single cell gel electrophoresis (comet assay), 그리고 유전자를 활용하여 DNA 손상여부를 포유동물 세포에서 측정할 수 있는 thymidine kinase gene forward mutation assay나 *lac I* gene을 target으로 개발된 Stratagene의 Big Blue와 *lac Z* gene을 target으로 개발된 Hazelton의 MutaMouse 와 같은 Transgenic mutagenesis system 등의 활용은 앞으로 화학물질의 발암성 예측, 기전규명 및 유전적인 손상 여부를 용이하게 검출해 낼 수 있는 진보된 연구기법이라 하겠다. 또 혈액 한 방울로, 동물을 죽이지 않고 측정할 수 있는 supravital *in vivo* micronucleus assay법, 더 나아가 *in vitro* cytokinesis block micronucleus assay가 개발되어 international harmonization 되고 있다.

장기적으로 극미량 노출에 대한 유전적 손상 연구도 미국 NIEHS의 Dr. Burkhardt를 중심으로 transgenic fish가 개발되고 있고, 염색체이상시험과 병행이 가능한 FISH(fluorescence *in situ* hybridization), PCR을 이용한 PRINS(primed *in situ* hybridization), microarray 기술을 이용한 DNA chip 나아가 protein chip 등의 toxicogenomics 연구 등 우리도 고전적인 연구기법에서 하루 빨리 탈피하여 진보된 독성 평가 기술의 확립 및 보급에 주력해야 하리라 사료된다.

여기서는 고전적인 연구기법에서 탈피해 진보된 독성 평가 기법의 확산을 통하여 화학물질 사용에 따른 안전성 확보를 이룩하고자, 본 연구실에서 수행하고 있는 진보된 독성 평가 방법들의 원리와, Human Genome Project 완성 후에 전개될 microarray 기술을 이용한 Functional Genomics의 DNA chip, Protein chip, Toxicogenomics 등에 대한 소개를 하고자 한다

II. Mouse Lymphoma L5178Y $tk^{+/-}$ (thymidine kinase) gene forward mutation Assay

II-1) 서론

Mouse lymphoma *tk* gene assay(MOLY)는 mouse lymphoma L5178Y 세포주를 이용한 *in vitro* 시험법으로써 1972년 Clive등에 의해 처음으로 소개되었고, 그 후 세포주의 개발과 시험법의 보완 등을 거쳐 민감도가 뛰어난 독성시험법으로 대두되고 있다.

II-2) 원리

Mouse lymphoma L5178Y $tk^{+/-}$ -3.7.2C 세포주를 이용하여, 11번 염색체 내에 heterozygote로 존재하는 $tk^{+/-}$ 유전자의 $tk^{-/-}$ homozygote로의 변이를 인식하는 시험체계이다. Thymidine kinase는 DNA의 생합성시 전구체인 thymidine monophosphate(TMP)를 만드는 thymidine의 인산화에 관여하는 효소이며 세포 내에서 TMP의 합성은 *de novo* synthesis와 salvage pathways에 의한 두 경로로 합성될 수 있다. MOLY는 *de novo* synthesis에 의해서만 TMP를 합성하여 생존할 수 있는 $tk^{-/-}$ mutant 세포를, 정상적인 두 pathway를 통하여 TMP를 합성할 수 있는 $tk^{+/-}$ 세포로부터 검출하는 시험체계를 지닌다. 즉, *de novo* synthesis를 저해하도록 methotrexate를 처리하여 자연변이에 의해 형성될 수 있는 $tk^{-/-}$ 의 homozygote는 생존할 수 없도록 하여 $tk^{+/-}$ 의 heterozygote만을 선택한 후 본 실험을 실시한다.

시험물질을 처리함으로써 $tk^{-/-}$ homozygote로 돌연변이가 유도된 세포는 trifluorothymidine(TFT)을 배양액에 처리하여, 세포내에서 *tk*에 대한 기질로 사용되어 인산화되어 TFT-monophosphate를 생성하게 되고 이것은 세포를 치사하도록 유도한다. 따라서 돌연변이가 유도되지 않은 $tk^{+/-}$ heterozygote들은 생존하지 못하고, thymidine kinase를 합성할 수 없는 $tk^{-/-}$ homozygote는 *de novo* synthesis에 의해 TMP를 합성하며 생존하게 된다.

II-3) 장점

MOLY는 *tk* gene내의 또는 *tk* gene을 포함하는 11번 염색체내에서 발생하는 넓은 범위의 유전적 변화를 인식할 수 있는 장점을 지닌다. 즉, 기존의 박테리아 복귀돌연변이 시험법이 point mutation, frameshift mutation 등의 하나 또는 수개 염기의 작은 유전적변이를 인식할 수 있고, 포유동물세포를 이용한 염색체 이상시험은 염색체 수준에서의 large scale의 구조적, 숫적 이상을 인식하는 데 반해, MOLY는 두 가지 모두를 즉, *tk* gene내부의 point mutation, *tk* gene 전체의 deletion, 11번 염색체 전체의 deletion, 또한 *tk* gene을 포함하는 유전자 재조합 등에 의해 유도된 $tk^{-/-}$ 세포를 인식할 수 있는 훌륭한 방법이다.

II-4) 활용가능성

MOLY는 유전적변이의 양상에 의한 L5178Y tk⁺ 세포의 성장에 따라 두 가지 형태의 mutant type 즉, tk gene 내부의 small scale의 변화에 대해서는 정상적인 성장을 보이는 large colony를 형성하게 되고, tk gene과 함께 염색체 11번 내의 large scale의 손상의 경우에는 성장에도 영향을 미치게 되어 slow growth로 인한 small colony를 형성하게 된다. 따라서 colony type을 분석하면 mutation type도 예측가능하다. 과거에는 soft agar 배지상에서 mutant cell이 clone되는 agar assay가 이용되어왔으나, 최근에는 96-well을 이용한 microtiter assay가 개발되어 널리 활용되고 있고, UKEMS(United Kingdom Environmental Mutagen Society) Guideline을 바탕으로 한 통계처리 software package가 Mutant V2.34으로 제공되어 유용하게 이용되고 있다.

III. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay)

III-1) 서론

Single cell gel electrophoresis 일명 comet assay는 처음 Ostling and Johanson에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis방법으로, Singh(1988)에 의해 보다 민감하게 손상을 감지 해낼 수 있는 방법으로 발전되었고 눈으로도 쉽게 관찰 할 수 있어 세포질 유전에 관해 각각의 세포에서 결과를 얻을 수 있는 고유한 방법으로 최근에 널리 쓰이고 있으며 OECD guideline에 도입하기 위해 필자를 포함한 전문가들이 International workshop은 물론, Harmonization을 진행 중에 있다(Tice et al, 2000).

III-2) 원리

세포 핵 안에 supercoil되어 tight하게 존재하는 DNA에 high salt로 lysis 시키면 핵단백질이 빠져나가 핵 모양을 지니면서 내부에 DNA를 포함하는 nucleoid가 되며, 이때 핵은 supercoil상태가 완화된 open loop 구조들이 일련의 higher order 구조를 이루게 된다. 이때 nucleoid 내에 strand break이 있는 경우 alkali상태에서 DNA 염기쌍이 분리되면서 DNA가닥이 분리되어 양쪽 끝이 서로 풀리게 되면서 supercoil구조가 완화되면서 결과적으로 DNA의 구조

가 이완되고 음극이 노출되어 전기영동 시 양극 쪽으로 이동되어 원래구조로부터 확장된 tail의 형태를 보임으로써 gel electrophoresis에 의해 쉽게 감지될 수 있다. 상해를 입은 세포는 밝은 형광을 나타내는 head 부분과 tail로써 나타나게 되며, 처리물질에 의한 손상정도는 tail의 형광 강도 즉 DNA양과 관련이 있으며, 처리 물질과 세포의 종류에 따라 tail의 길이가 농도 증가에 따라 비례하는 것이 아니고 일정길이 까지 진행되면 더 이상 진행되지 않기 때문에 tail의 DNA 양을 측정하는 것이 보다 정확한 방법이라고 할 수 있다. 이에 따라 대부분 실험실에서는 image analyzer를 사용하여 tail 내의 DNA content를 포함하는 parameter로서 tail moment를 주로 사용하고 있다.

III-3) 장점

Comet assay는 nucleoid sedimentation 이나 alkaline elution만큼 민감한 방법으로, alkaline상태를 만들어 단일 가닥 DNA손상을 명확하게 하여 소수의 strand break도 측정할 수 있다. pH가 중성인 경우는 double strand break을, alkali인 경우는 single strand break을 감지 할 수 있으며, 대부분의 물질들이 5~2,000배정도 single strand break을 유발하기 때문에 DNA손상을 감지하는 데는 alkali의 경우가 더욱 민감한 방법이나, 실험 목적에 따라 적절한 방법을 선택하여야 한다. 실험과정이 간단하며, 단일세포에서 정량이 가능하고, 소량의 시료로도 실험이 가능하며, 형광염색에 의해 눈으로 직접 확인 할 수 있고, data 분석까지 하루에 끝낼 수 있다는 여러 장점이 있다.

III-4) 이용과 활용가능성

Comet assay는 빠른 시간 내에 간편하게 DNA손상 유발물질에 대해 subpopulation에서 저항성이나 민감도를 측정할 수 있고, 적은 수의 세포로도 실험 가능하고 민감하여 10⁹dalton 당 0.1 DNA break을 감지 할 수 있어 매우 유용하며, 세포 주기에 영향을 받지 않아 asynchronous로 배양된 세포나 primary 세포에서도 적용가능하며 특수장비가 필요하지 않는 등 여러 장점을 지녀, 최근 이에 관한 논문들이 급격하게 증가하고 있으며, 현재 in vivo comet assay가 시도되고 있다.

IV. *in vivo* Acridine Orange Supravital Staining Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Reticulocytes

IV-1) 서론

포유동물인 mouse를 이용한 설치류의 골수내 다염성적혈구를 이용한 소핵시험이 1975년 Schmid에 의해 개발된 이후, *in vivo*에서 변이원성을 평가하는 시험법으로 전세계적으로 활용되고 있다. 기존의 소핵 시험법은 골수세포를 이용한 Giemsa 염색에 의해 적혈구의 분화과정 중에 형성되는 비정상적인 염색체성분인 소핵(micronucleus)의 유도를 지표로 하는 cytogenetic 시험법으로서 유핵의 적혈구 모세포로부터 무염성적혈구를 지표로 하여 소핵을 함유한 다염성 적혈구의 출현빈도로 판정하였다. 그러나 실제 광학 현미경 하에서, Giemsa 염색에 의한 소핵의 구별, 골수세포 사용시의 번거러움, 또 골수 채취를 위해 실험동물의 도살, 숙련된 관찰을 위한 장기간의 훈련 등 많은 단점을 내포하고 있다. 최근 소핵시험에 있어서 골수세포 대신 말초혈액을 이용한 시험법이 1980년 MacGregor 등에 의해 소개되었으나, 미성숙적혈구의 수가 적고, Giemsa 염색으로는 미성숙과 성숙적혈구의 구분이 쉽지 않아 널리 사용되지 못하였다. 그러나 Hayashi등(1990)에 의해 여러 문제점을 보완하고 말초혈액 내의 망상적혈구를 acridine orange로 형광 염색하는 초생체염색법(Supravital Staining)이 소개되어, 말초 혈액세포의 유용성이 입증되었다.

IV-2) 원리

말초혈액내의 망상적혈구는 무핵의 미성숙 적혈구로서 성숙에 의한 세포내 RNA 함량에 따라 acridine orange 형광 염색시 Type I, II, III, IV의 4가지 형태로 구분하며, 분화과정에서 핵이 소실되기 때문에 핵은 지니지 않으나 변이원성 물질에 의해 형성된 소핵은 핵 소멸시에도 제거되지 않고 그대로 존재하게 되어 망상적혈구내에 연녹색으로 관찰된다. 소핵을 함유하는 Type I, II, III의 망상적혈구의 출현빈도를 계수하여 Cochran Armitage법에 의한 통계처리한다.

IV-3) 소핵시험법의 장점

기존의 골수내 다염성적혈구를 통한 Giemsa 염색

법의 문제점은 지방, RNA 과립, 비만세포의 파괴로 형성된 과립 등이 소핵과 유사하게 염색되어 구분이 어렵고, 관찰자의 주관적인 차이, 대퇴골로부터 골수 채취를 위한 동물의 도살, 이로 인해 동일개체 내에서의 시간에 따른 소핵 유도시간의 결정이 불가능하다는 것이다. 그러나, 말초혈액내의 망상적혈구의 acridine orange 형광염색 시에는, 소핵과의 구별이 분명하다는 큰 장점을 지닌다. DNA 성분인 소핵은 acridine orange와 결합하며 520nm 파장의 황록색의 형광을, RNA는 590nm의 적색형광을 발하게 된다. 또한 Giemsa 염색시 소핵과 유사하게 염색이 되는 지방과립이나 mucopolysaccharides는 적색의 형광을 띠어 소핵과의 식별이 용이하다. 나아가 cell population이 일정하고 규칙적이어서 관찰이 쉽고 빠르며, 또한 실험동물을 도살하지 않고 반복적으로 채혈할 수 있기 때문에, 별도의 실험없이 동일 개체 내에서 최적 소핵유도 시간을 결정할 수 있고 소량의 혈액만을 사용하기 때문에 다른 독성평가실험과 병행할 수 있다는 장점을 갖고 있어 transgenic mouse연구와의 병행이 가능하여, *in vivo* 실험법으로써 국제적으로 International Harmonization이 이루어지고 있다.

V. *In vitro* cytokinesis block micronucleus assay

V-1) 서론

최근에 염색체 이상을 검출하기 위한 새로운 시도인 *in vitro* 소핵 시험법도, 염색체 절단 및 spindle dysfunction의 평가를 위한 신속하고, 저렴하며 노동집약적 실험법으로 발전되고 있다. *In vivo* 소핵시험의 단점은 사용되는 agent 또는 대사산물이 항상 골수에 도달하는 것이 아닐 수 있으나 *in vitro*에서 배양된 세포의 사용은 시험물질이 세포에 직접적으로 더 고르게 적용시킬 수 있다. 분열 중간기에 있는 세포를 이용하여 *in vitro* 소핵시험 연구가 지금까지는 별로 없었으나, Fenech and Morley가 human lymphocyte로 cytokinesis block 방법을 확립하였다.

V-2) 원리

원리는 actin의 polymerization에서 작용하는 cytochalasin B (CYB)를 이용하여 cytokinesis를 block 하

여, 이때 나누어진 핵의 분화를 식별하는데 기초를 두고 있다. CYB 자체는 염색체 이상을 유발하지 않아, CYB를 이용하여 1차 분열 진행이 멈추어 있는 binucleated cell들로부터 소핵을 확인할 수 있다. 현재는 V79 Chinese hamster lung cell line을 이용한 시험법이 소개되어 특별한 locus mutation, sister-chromatid exchange 그리고 chromosomal aberration의 분석에까지 널리 사용되고 있고 동일한 cell line에서 분석되어지는 다양한 유전적 endpoint들을 비교하는 데도 도움을 주어, 염색체 이상과 spindle dysfunction을 유발하는 물질을 신속히 탐지하거나 염색체 이상의 기전을 연구하는데도 이용될 수 있다.

VI. Transgenic Mutagenesis Assay

VI-1) 서 론

Transgenic animal model은 자신의 genome내에 외부 유전자를 유입시켜 생체 내에서의 변이를 감지할 수 있도록 고안된 가장 진보된 독성평가방법으로 널리 이용되고 있으며, 현재 Big Blue™ mouse (Stratagene사)와 Mutamouse (Hazleton사)가 상용화되어 있다. 이 model은 감지하기 편리하고 분석하기 용이한 *lac I* gene과 *lac Z* gene을 target으로 하는 lambda shuttle vector를 가지고 있어 여러 생체 조직에서의 변이를 측정할 수 있고, 화학물질 고유의 mutation spectrum과 작용기전을 규명할 수 있다. 이처럼 표적유전 자에서의 변이에 따른 reporter gene 발현과 sequence analysis가 가능한 transgenic system은 질병에 관여하는 특정 유전자의 변화나 *in vivo*에서의 효과는 물론 돌연변이, 암 발생 기전등을 규명할 수 있다.

VI-2) 원 리

a. Transgenic animal & cell line의 제작 : Big Blue system은 lambda/*lacI* shuttle vector를 micro-injection으로 integration시키는 기술에 의해 Stratagene사에서 개발되었고, transgenic cell line으로는 Big Blue cell line이 있으며 동일한 vector가 삽입되어 있다. 또한 pSV2Neo plasmid를 lambda shuttle vector와 함께 calcium phosphate cotransfection시켜 세포 배양 시 항생제 G418(geneticin)을 이용하여 selection할 수 있도록 되어 있다.

b. lambda shuttle vector & *lac I* gene : lambda/*lacI* shuttle vector(λLIZ)는 size가 약 45.5kb이며 cos site가 있는 cosmid로서 target 유전자로 작용하는 *lacI* 유전자를 가지고 있다. *lacI* gene(약 1080bp)은 Lac repressor protein을 coding하는 gene으로서, β-galactosidase을 coding하는 *lac Z* gene의 transcription을 억제하는 역할을 하여 *lacI* gene에 변이가 일어나면, β-galactosidase가 발현되어 X-gal 존재 시 blue dye를 형성하게 된다.

c. Assay & Detection system : 시험물질 처리 후 DNA를 분리하고, 분리한 genomic DNA에 shuttle vector의 cos site를 인지하여 이 부위를 절단하고 packaging시키는 transpack extract를 첨가하면 infectious phage particle이 형성된다. lambda head로 package된 phage는 α-complementation되는 host *E. coli*에 infection시키고 X-gal이 포함된 indicator agar 배지에 plating하여 일정시간 배양 후 blue plaque인 mutant를 계수하여 Mutant frequency를 계산할 수 있으며, 분석하려는 *lac I* gene에 대한 primer와 잘 분리한 phage DNA를 template로 하여 PCR (polymerase chain reaction)을 실시하여, DNA를 정제하거나, phage로부터 직접 *lac I* gene을 excision, 분리하여 sequencing한다.

VI-3) 장점과 응용

Transgenic animal은 transgene의 존재가 생물학적으로 크게 영향을 주지 않으므로 nontransgenic mouse와 거의 동일한 반응을 나타낸다. 따라서 target gene의 mutation연구를 통해 endogenous gene에서의 변화 유추와 조직특이성을 알 수 있고, 다른 *in vivo* 실험과 병행하여 여러 endpoint를 평가할 수 있고 germ cell을 사용하여 heritable effect도 예측할 수 있다. *lac I* gene의 경우 white background 중에서 blue를 검출하므로 더욱 쉽고 다른 target gene에 비하여 크기가 작으므로 분석이 용이한 장점이 있다. 또한 화학물질의 mutation spectrum을 밝힐 수 있어 carcinogenesis에 관여하는 특정 gene의 역할을 규명할 수 있고, 양적인 평가와 질적인 평가가 동시에 이루어질 수 있다는 점에서 높이 평가되며 돌연변이연구는 물론, DNA repair등 다양한 독성연구에 응용될 수 있고, 실제 *in vivo* 발암성 시험시의 비용, 기간 등을 극복할 수 있는 유용한 tool로서 빠른시간내에 대체 발암성 시험

법의 일환으로 자리매김하리라 사료된다.

VII. DNA microarray and Toxicogenomics

VII-1) 서론

전세계적인 genome연구의 결실로 박테리아로부터 인간에 이르기까지 약 10만개 이상의 새로운 유전자 정보를 알게 되었다. 1995년에는 *Haemophilus influenzae*의 모든 염기서열이 밝혀졌고, 이후 *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mbp: 효모) 및 *Caenorhabditis elegans* (97 Mbp: 선충의 일종)등 약 19개의 원핵생물 유전자 배열이 밝혀졌으며, 유전자 암호 해독기술의 발달로 더욱 급속히 늘어 날 것으로 예상된다. 특히 미국립 인간게놈 연구소에 의해 인간 게놈 지도를 완성하기에 이르렀고, 이를 바탕으로 염기서열에 의해 발현되는 단백질의 기능을 밝히고, Functional genomics, Structural genomics 연구를 통해 게놈의 구조와 기능에 대한 정보를 얻어, 생명의 신비를 밝히는데 결정적인 도움을 주리라 사료된다. 지금까지의 유전공학 방법들이 동시에 많은 수의 유전자를 가지고 실험을 하는데 한계가 있었으나 post genome 시대에는 새로운 기술의 개발이 요구되고 왔고 그 중의 하나가 바로 DNA chip을 이용한 유전자 검색 방법이다.

최근 이 DNA chip을 이용한 functional genomics와 molecular toxicology 연구가 접목되어 Toxicogenomics라 부르는 새로운 독성학 분야의 장이 열리고 있고, 독성물질에 대한 독성반응과 이러한 독성물질에 노출된 사람에 대한 유전자 profile의 변화의 관계를 직접 연구할 수 있게 되었다. 즉, 지금까지 널리 화학물질의 독성평가에 주요소재로 사용되어 오고있는 동물시험에서 나아가 앞으로는 특정 독성물질에 의해서 영향을 받고 있는 수천종의 유전자 가운데서 어느 유전자가 발현이 증가되고 억제되는지를 알 수 있게 되었다. Toxicogenomics의 탄생은 신의약, 신농약 개발 및 화학물질독성 평가에서 고전적인 방법에 치중해 오던 toxicology와 environmental health의 연구에 새로운 Next Generation Battery로 등장하고 있고, 미국 NIEHS에 큰 영향을 주어 ToxChip을 개발하게 되었고 USFDA에서도 이의 적용을 적극적으로 권유하고 있는 실정이다. 현재는 인간의 많은 유전자를 slide glass에 심을 수 없기 때문에 부분적으로 행

하고 있으나, 앞으로 DNA chip은 chemical의 활성 및 독성등을 screening 하는데 보편화된 방법이 되리라 믿는다. 미 NIEHS의 ToxChip 개발에서 보듯이 우리도 새로운 변화에 도전 할 때가 온 것이다. 가까운 미래에 우리는 유전정보 청사진을 가지고 여러 질병을 정복하고, 독성 발현도 유전자에서 검색을 할 수 있게 될 것이다.

VII-2) DNA chip의 정의

DNA chip이란 수많은 DNA를 고밀도로 붙여 놓은 것으로, 발전된 분자 생물학적 지식과 기계 및 전자공학기술의 접목으로 만들어 졌고, DNA chip이 대체 할 수 있는 방법은 Southern과 Northern blot, 돌연변이 검색 그리고 DNA sequencing 등이 있으며, 큰 차이점은 동시에 최소한 수백개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있다는 것과 유전물질을 붙이는 매체가 Southern이나 Northern blot의 nitrocellulose 막 대신에 DNA chip에서는 유리와 같은 고형체를 사용한다. DNA chip은 두 종류로 나눌수 있으며, cDNA chip에는 최소한 500bp 이상의 유전자가, oligonucleotide chip에는 약 15-25개의 염기인 oligonucleotide가 붙여져 있다.

VII-3) DNA chip의 종류

(<http://www.genechip.co.kr/chipmaker.htm>).

(1) **Pin microarray chip** : Pin을 이용한 microarray dotting chip은 1995년 미국 Stanford 대학에서 처음 유전자 발현 측정을 목적으로 cDNA를 붙여 cDNA chip으로 개발되었으며, 약 2-3천개의 유전자를 약 1 cm² 안에 붙일 수 있고, 지금은 oligonucleotide를 붙인 chip도 개발되었다.

(2) **Inkjet microarray chip** : Inkjet 원리를 이용하여 pin 대신에 computer inkjet printer와 같은 원리의 cartridge를 사용한다는 것이 다르다. 장점은 유전자를 전기적으로 chip 표면에 닿지 않고 뿌릴 수 있기 때문에 정량의 유전자가 붙은 대량의 chip을 생산할 수 있다.

(3) **Photolithograph chip** : 미국의 Affymetrix사가 photolithography라는 기술로 수만개의 nucleotide들을 하나의 유리위에 직접 합성하여 지금은 400,000개의 oligonucleotide를 가진 chip을 만들 수 있으며, cDNA chip처럼 여러 유전자들을 동시에 검색할 수

있다. oligonucleotide chip은 하나의 염기서열만 틀려도 결합을 하지 않으므로 한 염기에 생긴 변이까지도 찾아낼 수 있다.

(4) **Electronic array DNA chip** : DNA가 (-) 전하를 띠는 성질을 이용하여 chip의 특정 위치에 (+) 전기를 넣어 원하는 위치에 유전자를 붙이는 방법이 미국 Nanogen에서 개발되었다. 장점은 target DNA를 원하는 특정 위치에 전기를 이용하여 결합 시간을 단축시켜, 보통 수주가 걸리던 DNA 감식 작업을 수초만에 도 끝낼 수 있다.

VII-4) DNA chip의 파급효과

모든 세포는 똑같은 유전정보를 가지고 있지만 발생단계에서 결정된 역할에 따라 특정 유전자들만 발현하게 된다. 그러므로 DNA chip을 이용하여 유전자 기능과 변화를 알아내는 것은 인류의 건강과 생명의 신비를 해석하는데 매우 중요하다. 20세기에 들어 가장 큰 발전을 한 유전자 조작 기술로 암이나 질병에 유전자가 관여한다는 것이 밝혀졌고 병원성 세균 및 항생제 내성 검사, 신약개발, 유전자의 기능, 동식물 검역, 범죄자 확인 등 많은 부분에 DNA와 유전자기술이 이용되고 왔고 DNA chip은 여러 문제점들을 해결해 줄 수 있다. DNA chip이 최근에는 환경 모니터링 분야에도 광범위하게 사용되고 있다. 이미 일부 연구 그룹에서는 박테리아의 동정과 종, 속간의 비교 연구에 유전자 칩을 적용하고 있으며, 다양한 환경 독성 물질이 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하고 있다. 또한 환경 모니터링용 바이오센서 개발에도 응용이 가능하다. 이는 DNA chip의 연구 응용분야가 비단 의학, 약학, 생물학 분야에만 국한되지 않음을 의미한다. 유전자 chip은 생명체의 다양한 유전정보를 분석하고 획득을 원하는 연구 분야에는 어디든 적용될 수 있는 확장성을 갖고 있다. 따라서 유전자 재조합체를 기반으로 개발되는 바이오센서는 DNA chip으로부터 얻어지는 발현 정보 해석을 통해 새로운 재조합체 개발에 획기적인 전기를 마련할 수 있다. 이와 같은 DNA chip 실험을 통해 나오는 유전 정보들을 분석하기 위해서는 많은 database와 연결하여 정보를 공유할 수 있는 효율적인 관리를 위해 bioinformatics (생물 정보학)의 발전도 중요하며, 최근에 소개된 laboratory on a chip 개념은 DNA chip과 결합하면 더욱 빠르고 정확한 정보들을 얻을 수

있을 것이다. 유전체연구를 시작할 때 인간의 모든 유전자가 밝혀지더라도 모든 성질을 밝히는 데는 100년 이상이 걸릴 것으로 추측했지만 DNA chip기술의 개발로 많은 시간이 단축될 것이고 가까운 미래에 우리는 유전정보 청사진을 가지고 여러 질병을 정복하고, 독성 발현도 유전자에서 검색을 할 수 있게 될 것이다.

VIII. 참고문헌

- Antocchia, A., Tanzarella, C., Modesti, D., and Degrassi, F. (1993) Cytokinesis-block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts. *Mutat. Res.* 287(1):93 ~ 99.
- Burns M.A., Johnson B.N., Brahmasandra S.N., Handique K., Webster J.R., Krishnan M., Sammarco T.S., Man P.M., Jones D., Heldsinger D., Mastrangelo C.H. and Burke D.T. (1998) An integrated nanoliter DNA analysis device, *Science* 282(5388):484 ~ 487.
- Cho, R.J., Fromont-Racine, M., Wodicka, L., Feierbach, B., Stearns, T., Legrain P., Lockhart, D.J., and Davis, R. (1998) Parallel Analysis of Genetic Selections Using Whole Genome Oligonucleotide Arrays. *PNAS* 95:3752 ~ 3757.
- Clive D., Caspary W., Kirkby P.E., Krehl R., Moore M., Mayo J., and Oberly T.J. (1987) Guide for performing the mouse lymphoma assay for mammalian cell mutagenicity, *Mutat. Res.* 189: 145 ~ 156.
- DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M., Chen Y., Su Y.A. and Trent J.M. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer, *Nature Genet.* 14(4):457 ~ 60.
- DeSaizieu, A. de, Certa, U., Warrington, J., Gray, C., Keck, W., and Mous, J. (1998) Bacterial Transcript Imaging by Hybridization of Total RNA to Oligonucleotide Arrays. *Nature Biotechnology* 16:45 ~ 48.
- Dycaico M.J., Provost G.S., Kretz P.L., Ransom S.L.,

- Moors J.C. and Short J.M. (1994) The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats, *Mutat. Res.* 307:461~478.
- Fairbairn D.W., Olive P.L., Kim L.O'neill (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339:37~59.
- Gershon, D. (2002) Toxicogenomics gains impetus, *Nature* 415(6869):4~5.
- Hamadeh, H.K., Bushel, P.R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J.C., Blanchard, K., Paules, R.S., Afshari, C.A. (2002) Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles, *Toxicol Sci.* 67(2):219~231.
- Hamadeh, H.K., Amin, R.P., Paules, R.S., Afshari, C.A. (2002) An overview of toxicogenomics, *Curr Issues Mol Biol.* 4(2):45~56.
- Hayashi M., Tice R. R., MacGregor J. T., Anderson D., Blakey D. H., Kirsh-Volders M., Oleson F. B. Jr, Pacchierotti F., Romagna F., Shimada H., Sutou S., and Vannier B. (1994) *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, *Mutat. Res.* 312: 293~304.
- Iannaccone, P.M. (2001) Toxicogenomics: "the call of the wild chip", *Environ Health Perspect.* 109(1): A8~11.
- Khan J., Saal L.H., Bittner M.L., Chen Y., Trent J.M. and Meltzer P.S. (1999) Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis* 20(2):223~229.
- Lipshutz R.J., Fodor S.P.A., Gingeras T.R., and Lockhart D.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays, *Nat. Genet. Supp.* 21:20~24.
- Lotti M. (1995) Mechanism of toxicity and risk assessment, *Transgenic models for detection of mutation in tumors and normal tissues of rodents*, *Toxicology letters* 82/83:131~134.
- Lovett, R.A. (2000) Toxicogenomics. Toxicologists brace for genomics revolution, *Science* 289(5479): 536~537.
- Lundberg K.S., Kretz P.L., Provost G.S. and Short J.M. (1993) The use of selection in recovery of transgenic targets for mutation analysis, *Mutat. Res.* 301:99~105.
- MacGregor J.T., Wehr C.M., and Gould D.H. (1980) Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen* 2:509~514.
- Marchant, G.E. (2002) Toxicogenomics and toxic torts, *Trends Biotechnol.* 20(8):329~32.
- Provost G.S., Kretz P.L., Hammer R.T., Matthews C.D., Rogers B.J., Lundberg K.S., Dyaico M.J. and Short J.M. (1993) Transgenic systems for *in vivo* mutation analysis. *Mutat. Res.* 288:133~149.
- Ryu, J.-C., Choi, Y.J., Kim, Y.J., Kim, H.T. and Bang, H.A. (1999) Recent advanced toxicological methods for environmental hazardous chemicals, *Kor. J. Environ. Toxicol.* pp.1~12, p.14.
- Ryu, J.-C., Kim, H.J., Seo, Y.R. and Kim, K.R. (1997) Single cell gel electrophoresis (comet assay) to detect DNA damage and apoptosis in cell level. *Environ. Mutagens & Carcinogens* 17:71~77.
- Ryu, J.-C., Kim, K.R. and Choi, Y.J. (1999) *in vitro* mouse lymphoma thymidine kinase (*tk+/-*) gene forward mutation assay in mammalian cells, *Environ. Mutagens & Carcinogens* 19(1):7~13.
- Ryu, J.-C., Youn, J.Y., Kim, Cho, K.H. and Chang, I.M. (1998) Transgenic Mutagenesis assay to elucidate the mechanism of mutation in gene level, *Environ. Mutagens & Carcinogens* 18:1~7.
- Ryu, J.-C., Youn, J.Y., Kim, Y.J., Kwon, O.S., Song, Y.S. Kim, H.T., Cho, K.H. and Chang, I.M. (1999) Mutation spectrum of 4-nitroquinoline N-oxide in the lac I transgenic Big Blue Rat2 cell line, *Mutation Research* 445:127~135.
- Ryu, J.-C., Seo, Y.-R., M.A. Smith and S.-S, Han (2001) The Effect of methyl methanesulfonate (MMS)- induced excision repair on p53-dependent apoptosis in human lymphoid cells, *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 109(1, 2):35~51.
- Ryu, J.-C., Y.-J. Kim and Y.-G. Chai (2002) Mutation of 1,2-dibromo-3-chloropropane, an endocrine

- disruptor, in the lac I transgenic Big Blue Rat2 fibroblast cell line, *Mutagenesis* 17(4):301~307.
- Ryu, J.-C. (2002) Recent Advanced Methods in Cellular and Molecular Toxicology, *Environmental Mutagens & Carcinogens* 22(1):1~11.
- Sapolsky, R.J. and Lipshutz, R.J. (1996) Mapping Genomic Library Clones Using Oligonucleotide Arrays. *Genomics* 33:445~456.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* 270(5235):467~70.
- Simmons, P.T., Portier, C.J. (2002) Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis, *Carcinogenesis*, Jun; 23(6):903~905.
- Singh N. P., McCoy T. Michael, Raymond R. T. and Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* p.175, pp.184~191.
- Singh. N.P., Stephens R.E. and Schneider E.L. (1994) Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *Int. J. Radiat. Biol.* 66(1):23~28
- Snodin, D.J. (2002) An EU perspective on the use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology, *Toxicol Lett.* 127(1~3):161~168.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C. and Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay : Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagenesis* 35(3):206~221.
- Waring, J.F., Halbert, D.N. (2002) The promise of toxicogenomics, *Curr Opin Mol Ther.* 4(3):229~235.

Introduction of recent advanced cellular and molecular toxicology

Jae-Chun Ryu* (*Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea*)

*Corresponding author (Tel : +82-2-958-5070, E-mail : ryujc@kist.re.kr)