보건분야-연구자료
연 구 원 99-56-126
H-RD-I-99-56-126

FISH를 이용한 산업화학물질에 의한 염색체이상 분석

- FISH(fluorescence *in situ* hybridization)를 이용하여 분석한 크롬에 의해 유발된 염색체 이상 -

Detection of chromosomal rearrangements by chromium in human lymphocyte using fluorescence in situ hybridization(FISH) with triple combination of composite whole chromosome specific probe

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

提 出 文

韓國産業安全公團 理事長 貴下

본 報告書를 産業災害豫防 技術硏究 開發 및 普及事業의 일환으로 遂行한 "FISH(fluorescence *in situ* hybridization)를 이용한 산업화학물질에 의한 염색체이상 분석" 事業의 最終報告書로 提出합니다.

1998年 12月 31日

주관연구부서 : 산업안전보건연구원
산업화학물질연구센터

연구책임자 : 서울대 보건대학원 교수 정해원

공동연구자 : 수석연구원 이용묵
책임연구원 유일재
선임연구원 맹승희

목　　차

I. 연구배경 및 필요성 1

II. 연구내용 및 방법 6
가. 연구내용 6
나. 연구방법 6
1. 세포배양 및 Chromium 처리 6
2. FISH(fluorescence in situ hybridization) 6
2-1. Chromosome Slide 준비 6
2-2. DNA probe 준비 7
2-3. Hybridization 7
2-4. 세척 7
3. 관찰 및 사진 촬영 7
4. 염색체이상 측정방법 8

III. 결과 10

IV. 고찰 17

V. 참고문헌 20

표 차 례

Table 1. Chromium-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2 and 4 : Numbers and frequencies of color junctions, translocations, dicentric chromosomes and insertions 11

Table 2. Chromium-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2 and 4 : Numbers and frequencies of insertions 12

Table 3. Numbers and frequencies of different types of translocations induced by chromium using FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2, and 4 13

그림차례

fig. 1. Human metaphase spread hybridized with triple chromosome-specific composite DNA for chromosome 1, 2 and 4. Detection of bound probe was spectrum orange(A). The same metaphase spread as (A) shown with DAPI excitation and emission (B). 14

fig. 2. Translocation [t(Ba): thick arrow, t(Ab): thin arrow between chromosome 1, 2 and 4 another non-target chromosome(A)] . The same metaphase spread as(A) shown with DAPI excitation and emission(B). 15

fig. 3. A dose-response curve of translocations, dicentric chromosomes and color junctions induced by chromium. 16

FISH(fluorescence *in situ* hybridization)를 이용하여 분석한 크롬에 의해 유발된 염색체 이상

정해원 · 김수영 · 맹승희* · 이용묵* · 유일재*
서울대학교보건대학원, 산업안전보건연구원*

Detection of chromosomal rearrangements by chromium in human lymphocyte using fluorescence in situ hybridization(FISH) with triple combination of composite whole chromosome specific probe

Hai Won Chung, Su Young Kim, Sung Hee Maeng*,
Yong Mook Lee*, and Il Je Yu*

School of Public Health, Seoul National University
*Industrial health Research Institute

Abstract

Chromosome rearrangements induced in human lymphocyte after in vitro exposure to chromium were analysed by the use of fluorescence in situ hybridization(FISH) with triple combination of composite whole chromosome-specific probe for chromosome 1, 2 and 4. Chromosome aberrations was scored by the Protocol for Aberration Identification and Nomenclature Terminology(PAINT).

Stable translocation was the most frequent type of aberrations and dicentrics and insertions were also observed. Chromium treatment enhanced the frequencies of stable translocations and color junctions in a

dose-dependent manners, but no distinct increase of dicentrics and insertions was seen.

The ratio of the yields of translocation to the yields of dicentric varied between 13 to 27.

The presents results demonstrate fluorescence in situ hybridization(FISH) are useful for detecting chromosomal rearrangements induced by chromium.

key words : chromium, fluorescence *in situ* hybridizaton(FISH),
chromosome rearrangements

I. 연구배경 및 필요성

Chromosome painting이라고도 불리우는 FISH(fluorescence in situ hybridization) 기법은 독성물질 폭로로 인한 염색체이상을 평가하는 새로운 방법으로서 [1)2)3)4)] 일반환경은 물론 산업장에서 유해물질에 폭로된 근로자를 대상으로 그 활용성이 증가되고 있다. 특히 현재까지 일반적인 염색법으로 사용되어 온 염색체이상분석법으로는 찾아내기 어려운 상호전좌(translocation)등과 같은 염색체재배열을 정확하고 간편하게 찾아낼 수 있기 때문에 낮은 수준의 만성적 폭로시 생물학적 선량계로서의 가치가 매우 크다[2)5)].

이는 현재까지 생물학적 선량계로서 널리 이용되어 왔던 이동원염색체(dicentric chromosome)가 불안정한 염색체교환으로서 세포분열을 거듭함에 따라 이를 포함하는 세포가 치사하게 되어 오래전에 폭로되어 생성된 염색체이상 정도를 제대로 반영해 주지 못하기 때문에 유해물질 폭로후에도 오랜기간 생존하여 유지될 수 있는 안정한 염색체 교환인 상호전좌를 측정하는 것이 정확한 선량계로서 바람직하다[6)].

피폭에 의한 유전물질의 재배열 즉, 염색체 재배열이 나타나는 현상 중에서 상호전좌는 염색분염법을 시행하면 구별이 되지만 이 방법은 많은 경험이 필요하고 시간이 소요되기 때문에 일반적인 측정방법으로 이용하기에는 한계가 있다.

Pinkel 등(1986)1)은 사람의 염색체로부터 추출한 DNA probe를 이용하는 fluorescence in situ hybridization(FISH)기법을 개발하여 특정 염색체만이 형광을 띠게하는 현상을 이용, 상호전좌 등 염색체 구조의 재배열을 정확하고 간편하게 확인할 수 있게 되었다.

FISH기법은 특정 염색체에 대한 특정 DNA부위를 염색체 전 길이에 결쳐 결합할 수 있는 probe를 사용하여 목적에 따라 여러 종류의 probe를 동시에 이용 할 수도 있기 때문에 최근에 그 사용의 타당성에 대한 연구가 증가하고 있다[10)16)18)-25)].

일반적으로 FISH 기법을 이용하게 되면 ①체세포 hybrid로부터 사람에게 특이한(human-specific) 염색체를 빠르게 찾아낼 수 있으며, ②염색체와 연관된 질병의 확인이나 특정암세포의 표지염색체를 확인하거나, ③genome 연구에서 유전자 지도를 작성하는데 이용되며, ④돌연변이 및 발암과정에서 염색체의 변화를 찾아 낼 수 있으며, ⑤또한 방사선이나 유해화학물질에 대한 생물학적 선량계로서 염색체 이상을 확인하는데 응용할 수 있다.

과거에는 방사성동위원소를 DNA probe에 표지하여 자기방사법으로 hybridized sequence를 확인하였으나[26)27)] 자기방사법은 시간이 오래 걸리고, 방사성동위원소의 사용으로 인한 제반문제점들 때문에 그 사용이 제한적이었으나 안정된 형광물질을 이용하게 되면서, 이의 활용이 강조되고 있다.

일반적으로 FISH는 간접적 방법과 직접적인 방법으로 구분된다.

간접적 방법에 있어 사용되는 probe는 화학적 또는 효소적으로 주입된 biotin이나 digoxigenin 등의 reporter molecule을 포함하고 있는데 염색체 슬라이드를 denaturation시킨 후, probe를 hybridizing한 다음 reporter molecular과 결합할 수 있는 항체를 처리하여 확인한다. 이때 항체는 형광물질로 표지되어 있으며 biotin의 경우 Fluorescein-labeled avidin이나 Texas Red-labeled avidin을, digoxigenin의 경우는 Fluorescein-labeled anti-digoxigenin이나 Rhodamine-labeled anti-digoxigenin을 주로 이용하게 되는데 각 형광에 맞는 특정파장의 filter를 사용하면 형광현미경에서 관찰이 가능하다.

직접적 방법은 probe에 직접 형광이 표지된 reporter molecule를 결합시켜서 간접방법에서처럼 hybridization후의 항체를 처리하는 과정이 없이 즉시 관찰이 가능하다. Spectrum orange fluorophore 또는 spectrum green fluorophore 등의 fluoreoscein을 이용하게 되면 세포면역학적인 처리가 불필요하므로 간편하고 background가 깨끗한 장점이 있으나 간접적 방법에 비해 sensitivity가 크게 떨어져 signal의 강도가 10~15%에 지나지 않는다.

Chromosome painting에서 사용되는 probe는 특정염색체에 특이한 unique sequence probe를 이용하는데 이때 반복서열과의 hybridization을 방지하기 위해 과량의 total human DNA를 같이 가하게 된다. Propidium iodide(PI)나

4,6-diamini-2-phe-nylindole(DAPI)로 적당한 counterstain을 하게 되면 paint가 안된 염색체를 각기 다른 색깔로 구분할 수 있다. 그래서, 교환형의 염색체 이상은 두가지 색깔로 나타나기 때문에 구분이 용이하다. 즉, 염색체 이상은 색깔의 변화로서 측정되기 때문에 기존의 염색분염법보다 염색체분석이 빠르고 객관적이다. 그러나 FISH에서는 특정한 하나 또는 몇 개의 염색체만을 대상으로 이루어지기 때문에 전체의 염색체 이상을 다 반영할 수 없다는 점이 단점으로 지적되고 있으나, 큰 염색체를 대상으로 할 때 DNA양을 감안하게 되면 전체염색체 이상으로 보정하여 추정할 수 있다.

일반적으로 FISH를 이용하여 세포유전학적 손상을 평가할 때 모든 염색체의 probe를 이용하여 painting하는 것이 힘들기 때문에 단일 염색체 probe를 이용하거나 2-3개의 염색체의 조합 probe를 이용하는 것이 일반적이다[4)7)]. 즉 가장 많이 이용되고 있는 4번 염색체의 DNA는 전체 genome중 6.23%이 불과하지만 1, 2, 4번 조합 염색체의 DNA는 22.4%가되어 전체 genome상의 DNA 상해를 더욱 잘 반영해 줄 수 있다.

Tucker 등(1993)[2)]은 사람의 말초림프구에 방사선조사한 후, FISH와 기존의 염색분염법 그리고 일반적인 이동원염색체로 염색체이상을 비교 분석하였는데 200 cGy이하의 선량에서는 세 방법에서 차이가 없다고 보고하여 방사선에 대한 생물학적 선량계로서 FISH의 유용성을 보고하고 있다. 교환형 염색체 이상 중 상호전좌를 측정하는데 염색분염법보다 FISH가 30배 빠르다고 보고하고 있다. 즉, 염색분염법에서는 모든 세포에 대해 핵형분석을 하게 되는데 이때 사진작성이 필요하게 되고 훈련된 전문가만이 분석할 수 있으므로 생물학적 선량계로서 이용하는데는 매우 한정적으로 활용되고 있다. 또한 일반적으로 염색체 이상 분석에 이용되고 있는 이동원염색체의 빈도는 오래 전에 방사선에 피폭되었거나 만성적으로 피폭된 경우에는 양반응관계를 증명하기가 힘들기 때문에 상호전좌같은 안정한 염색체 이상을 측정하기 위해서는 FISH의 활용성이 더욱 강조되고 있다. 즉, 상호전좌는 이동원염색체보다 방사선에 피폭후 시간이 경과하더라도 훨씬 안정하게 존재하기 때문에 만성적인 피폭을 평가하는데 유용하다.

FISH기법을 이용하여 생물학적 선량계로서 활용하기 위해서는 먼저 선량반응 곡선이 필요하지만 선량반응곡선의 형태는 연구자마다 차이가 나는데 이러한 이유로서는 연구자마다 분류기준이 상이한[8] 것과 사용된 염색체 probe가 연구자마다 다른 것 때문이다.

크롬은 지각에 풍부한 원소로서 크롬도금, 크롬대상 공장이나 스테인레스용접공정 등 여러 작업장에서 흡입이나 섭취에 의해 폭로된다.

크롬은 여러 화학물질의 존재하는데 일반적으로는 주로 3가와 6가 크롬의 형태로 존재한다.

IARC(International Agency for Research on Cancer)는 3가 크롬은 인간을 대상으로 했을 때 발암성에 대한 증거가 불충분하기 때문에 group 3으로 분류하고 있지만 6가 크롬은 많은 역학적 연구에서 발암성을 확인하여 group 1로 분류하고 있다[11].

6가 크롬은 구강, 호흡기, 피부를 통해 흡수가 가능하며 흡수된 6가 크롬은 3가 크롬상태로 빠르게 환원되기 때문에 궁극적으로 유전물질에 영향을 주는 것은 3가 크롬으로 환원되는 과정에서 산화적 DNA손상 및 크롬으로부터 유도된 DNA · 단백질 가교가 생성됨으로서 돌연변이원으로 작용된다고 추정된다[12][13].

크롬은 그의 산화상태에 따라 돌연변이를 유발하는데 6가 크롬 화합물인 $K_2Cr_2O_7$, Na_2CrO_4, 그리고 $PbCrO_{4s}$등은 E.Coli 및 Ames 시험에서 돌연변이 유발원으로 나타났다는 보고도 있지만 음성 결과를 보고한 연구도 있다.

CrO_3와 K_2CrO_4, $PbCrO_4$ 등은 염색체이상과 자매염색체 교환을 유발하였다는 보고가 있으며[12][13] 최근의 정 등[11]의 연구에서는 6가 크롬인 $K_2Cr_2O_7$을 CHO(Chinese hamster Ovary)세포에 처리했을 때 염색체이상을 유발하였으며 유발된 염색체 이상의 형태도 염색분체형의 빈도는 낮고 이동원염색체를 포함한 염색체형 이상도 유발한다고 보고하였다.

염색체형 이상중 이동원염색체는 비대칭형 이상이고 상호전좌는 대칭형 이상으로서 이론적으로는 생성되는 확률은 같다고 알려져 있지만[14] 방사선을 이용한 많은 연구에서 언제나 상호전좌가 이동원염색체의 빈도보다 많이 나타난

다고 보고하고 있다[2)3)5)15)]. 이러한 이유로서는 관찰자 오류의 가능성, 배양시간에 따라 두 번째 세포분열을 하는 세포가 존재할 수 있다는 점 그리고 실제 사람 림프구에서 상호전좌가 더 많이 나타날 가능성[5)]을 제시하고 있지만 확실하지는 않다.

현재까지 FISH기법으로 수행된 연구는 대부분 방사선 및 Bleomycin을 대상으로 한 것이었으며 이들 이외의 물질을 대상으로 이루어진 연구는 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 염색분체형 이상은 물론 이동원염색체를 포함하는 염색체형 이상을 유발하는 것으로 확인된 크롬을 대상으로 FISH기법의 활용성을 찾아보고자 한다.

Ⅱ.연구내용 및 방법

가. 연구내용

FISH기법이 중금속 폭로로 인한 염색체 이상을 측정하는 방법으로서의 타당성을 검토하기 위해 사람 림프구에 크롬을 투여한 후 나타나는 염색체 재배열을 기존의 염색체 이상 분석 방법과 비교하여 생물학적 표시자로서 이용가능성을 검토하고자 한다.

나. 연구방법

1. 세포배양 및 Chromium 처리

건강한 사람의 말초혈액에 6가 크롬인 $K_2Cr_2O_7$을 1, 5, 10, 15, 20μM의 농도로 처리하고 3시간 후 인산용액으로 2번 세척한 후 10% 우태아 혈청과 phytohemagglutinin(PHA)가 첨가된 RPMI 배지에 넣고 5% CO_2가 공급되는 37℃배양기에서 48시간 배양한다.

2. FISH(fluorescence in situ hybridization)

본 실험에서는 Spectrum Orange가 표지된 1, 2, 4번 염색체의 WCP probe(Vysis)를 이용하여 직접법에 의해 FISH를 수행하였다.

2-1. Chromosome Slide 준비

준비된 슬라이드를 2×SSC(Sodium chloride, Sodium citrate)용액에 37℃에서 15분씩 2번 방치한 후 상온의 70%, 85%, 100% Ethanol series에서 각각 2분씩 탈수과정을 거치도록 했다. 탈수된 슬라이드는 73±1℃에서 5분간 70%

formamide/2×SSC 용액에서 변성(Denaturation)시킨 후 -20℃의 70%, 85%, 100% ethanol에서 각 2분씩 거친 후 상온에서 건조하였다.

2-2. DNA probe 준비

1, 2, 4 염색체가 동시에 Spectrum Orange로 표지된 DNA probe(WCP 1, 2, 4, Vysis) 2㎕를 WCP hybridization buffer 7㎕와 1㎕ 증류수에 섞어 만든 hybridization mix를 어두운 상태에서 73±1℃에서 5분간 변성시킨 후, hybridization시키기 전까지 45-50℃의 slide warmer에 놓아둔다.

2-3. Hybridization

준비된 슬라이드에 probe를 10㎕를 점적한 후 22mm×50mm cover glass의 가장자리에 rubber cement(BORDEN)를 적용하여 수분증발을 막도록 한 다음 수분이 유지되는 상자(Humidity box)에 넣어 충분히 hybridization되도록 37℃의 배양기에서 16시간동안 방치하였다.

2-4. 세척

슬라이드를 꺼내 Rubber cement를 조심스럽게 제거하고 슬라이드를 72℃의 0.4×SSC(AMRESCO)에 5분간 담궈둔 후 꺼내어, 2×SSC(AMRESCO)에 50㎕ 0.5% NP-40를 넣은 용액에 담가 2분간 세척하였다.

그 다음, slide를 말리고 DAPI(4, 6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색(counterstain)한 후, -20℃에서 보관하였다.

3. 관찰 및 사진 촬영

형광 현미경(NIKON, Optiphot)을 이용하여 triple band filter인 D/F/TXRD (DAPI/FITC/Texase Red, Chroma Technology Corp. 61002)로는 Spectrum Orange 및 DAPI를 동시에 관찰하였으며, UV-2A filter(NIKON, DM400)로는 DAPI를 관찰하였다. 사진촬영을 위해서는 KODAK Ektachrome 400 slide film

을 사용하였다.

4. 염색체이상 측정방법

본 연구에서는 Tucker 등(1995)8)에 의해 제안된 명명법인 PAINT system (Protocol Aberration Identification and Nomenclature Terminology)에 근거하여 염색체 이상을 분류하고자 하였다. 이 분류체계는 염색체형 염색체 이상만을 대상으로 하는데 염색체 이상의 종류를 translocation(t), dicentric(dic), insertion(ins), acentric fragment(ace), 그리고 ring(r)으로 구분하는데, 일반적인 염색체 이상 분류방법과는 차이가 난다. 즉, dicentric이나 ring에 수반되는 acentric fragment도 별도로 분류하게 되며 acentric ring은 ring에 포함하여 분류하게 된다. 특히, insertion은 PAINT system에서만 분류가 가능하다.

본 분류체계에서는 염색체 이상형을 먼저 기입한 후 그 다음 괄호안에 A, a, B, b등의 글자를 이용하여 이상의 형태를 구체적으로 나타낸다. 즉, A 및 a는 염색이 안된 염색체 부위를 나타내며, B 및 b는 염색된 염색체 부위를 나타내는데 대문자 A 및 B는 centromere를 포함했을 때를 나타낸다. 예를 들어, t(A.b)는 상호전좌된 염색체이며 centromere를 포함하는 염색안된 염색체 부위와 centromere가 포함안된 염색된 염색체 부위로 구성된 염색체 이상임을 의미한다.

염색체 이상빈도는 painting된 특정염색체에서만 나타나기 때문에, 이 염색체가 전체 genome상에서 차지하는 비율을 계산하여 보정하게 되면 전체 genome에서의 염색체 이상빈도를 계산할 수 있다. G-banding에서 관찰될 수 있는 특정염색체의 translocation, insertion, dicentrric, ring의 비율(F_b) 및 염색된 특정염색체의 전체 genome상에서의 비율(F_s)을 알게되면 FISH에 의해 측정될 수 있는 translocation의 fraction(F_h)는 다음의 공식을 통해 계산될 수 있다.

$$F_h=2F_s(1-f_s)F_b$$

단 몇 가지 중요한 가정이 전제되는데 ①염색체의 이상은 전체 genome상 무작위적으로 분포해야한다. ②일반적인 염색분염법은 모든 trnslocation과 inversion, dicentric 및 ring을 찾아낸다. 즉, Fb = 1, ③break 중 염색체 부위가 하나는 paint되고 다른 하나는 paint되지 않으며, 이들이 교환된 경우에만 관찰이 가능한 것으로 간주된다. ④두개의 break를 초과하는 복잡한 염색체 재배열은 매우 드물게 나타난다. 본 연구에서 사용한 염색체 1, 2, 4번의 경우 전체 genome 상에서 처리하는 DNA의 비율이 22.4%로 전체 교환형 중 34.4%가 관찰되는 것으로 나타났다[28].

Ⅲ. 결 과

크롬 처리에 의한 림프구에서의 림프구에서의 염색체배열의 양상은 그림 1, 그림 2와 같다. Spectrum orange가 표지된 1, 2, 4번 염색체는 orange 색깔을 볼 수 있으며 이를 DAPI로 대조염색한 경우 푸른색을 띤다. 그림 2에서 상호전좌된 상호전좌된 염색체를 확인할 수 있다. 크롬처리에 의한 각종형태의 염색체이상은 [표 1], [표 2], [그림 3]과 같은데 [표 1]에서 보는 바와 같이 크롬의 양이 증가됨에 따라 상호전좌가 증가되는 양상을 보여주고 있으며 이동원염색체의 경우 워낙 낮은 빈도로 관찰되어 증가양상을 말하기는 어렵지만 모든 처리용량에서 상호전좌의 빈도가 이동원염색체보다 훨씬 많이 관찰되었다.

FISH기법에서만 관찰이 가능한 color junction의 수도 크롬용량에 따라 증가하였으며 삽입도 관찰되었지만 뚜렷한 양반응관계를 보여주지는 않았다.

[표 3]에서 보는 바와 같이 상호전좌의 형태도 매우 다양하게 나타났는데 t(Ab)가 가장 많이 관찰되었으며 t(Ba)는 물론 한 염색체상에 2회 이상의 상호전좌가 나타나는 t-t(abA), t-t(aBa)도 관찰되었다.

Table 1. Chromium-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2 and 4 : Numbers and frequencies of color junctions, translocations, dicentric chromosomes and insertions

Dose (μM)	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	500	172	1	1 (0.00581)	1 (0.00581)	1	0 (0.00000)	0	·
1	500	172	15	29 (0.16861)	15 (0.08721)	12	0 (0.00000)	0	·
5	461	158.58	21	28 (0.17657)	18 (0.11351)	17	0 (0.00000)	0	·
10	498	169.32	24	31 (0.18309)	27 (0.15946)	20	1 (0.00591)	1	27
15	455	156.5	26	36 (0.23003)	26 (0.16613)	21	2 (0.01278)	2	13
20	275	95	30	58 (0.61052)	43 (0.45263)	26	2 (0.021053)	2	21.5

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

Table 2. Chromium-induced chromosome rearrangement identified by FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2 and 4 : Numbers and frequencies of insertions

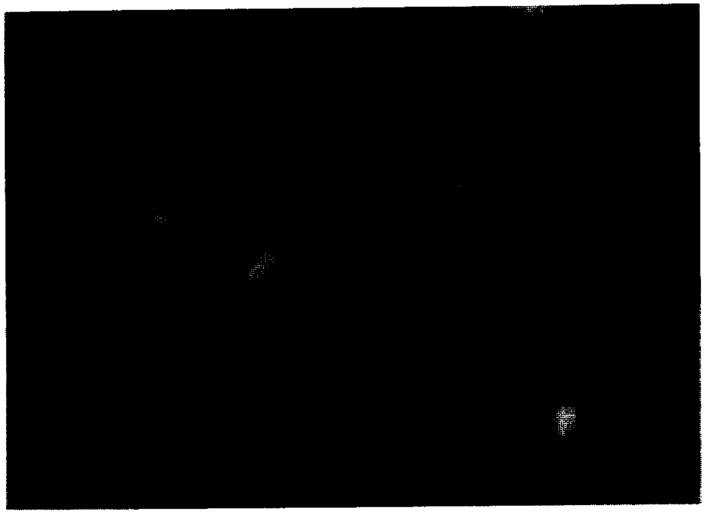
Dose (μM)	No. of Cells Scored	No. of Cell Equivalents Scored	No. of Aberrant Cells	No. of insertions	No. of Cells with insertion
0	500	172	1	0 (0.00000)	0
1	500	172	15	7 (0.04070)	6
5	461	158.58	24	5 (0.03153)	5
10	498	169.32	24	3 (0.01772)	3
15	455	156.5	26	4 (0.02556)	4
20	275	95	30	6 (0.06316)	5

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

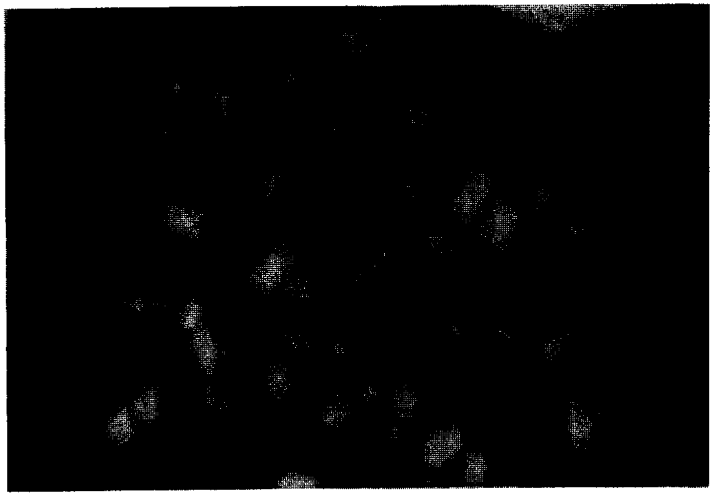
Table 3. Numbers and frequencies of different types of translocations induced by chromium using FISH with the DNA probe for chromosome 1, 2, and 4

Dose (μM)	No. of Translocations				
	Total	t(Ab)	t(Ba)	t-t(abA)	t-t(aBa)
0	1 (0.00581)	1 (0.00581)	0 (0.00000)	0 (0.00000)	0 (0.00000)
1	15 (0.08720)	6 (0.03488)	9 (0.05233)	0 (0.00000)	0 (0.00000)
5	18 (0.11351)	10 (0.06310)	8 (0.05045)	0 (0.00000)	0 (0.00000)
10	27 (0.15946)	13 (0.07678)	8 (0.04725)	2 (0.01181)	1 (0.00591)
15	26 (0.16613)	12 (0.07668)	10 (0.06390)	1 (0.00639)	1 (0.00639)
20	43 (0.45263)	27 (0.28421)	12 (0.12632)	1 (0.01053)	1 (0.01053)

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

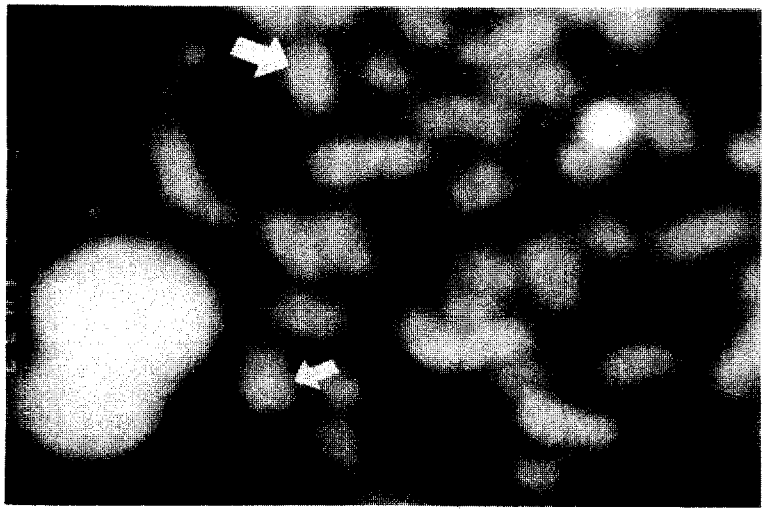


(A)

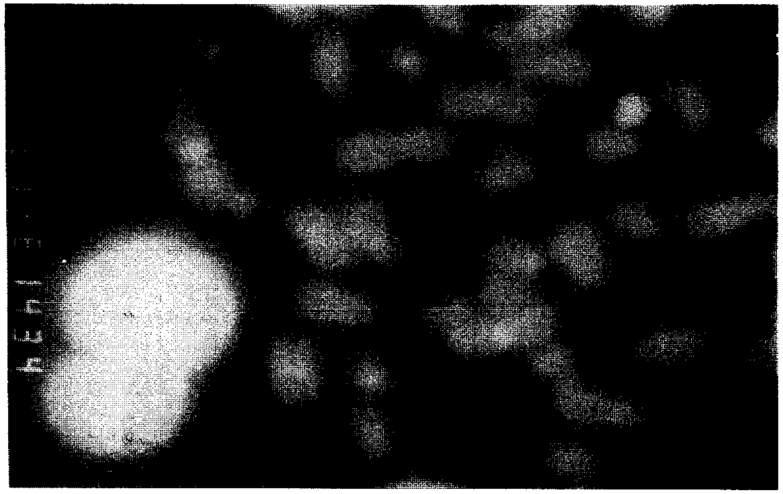


(B)

fig. 1. Human metaphase spread hybridized with triple chromosome-specific composite DNA for chromosome 1, 2 and 4. Detection of bound probe was spectrum orange(A). The same metaphase spread as (A) shown with DAPI excitation and emission (B).



(A)



(B)

fig. 2. Translocation [t(Ba) : thick arrow, t(Ab) : thin arrow between chromosome 1, 2 and 4 another non-target chromosome(A)]. The same metaphase spread as(A) shown with DAPI excitation and emission(B).

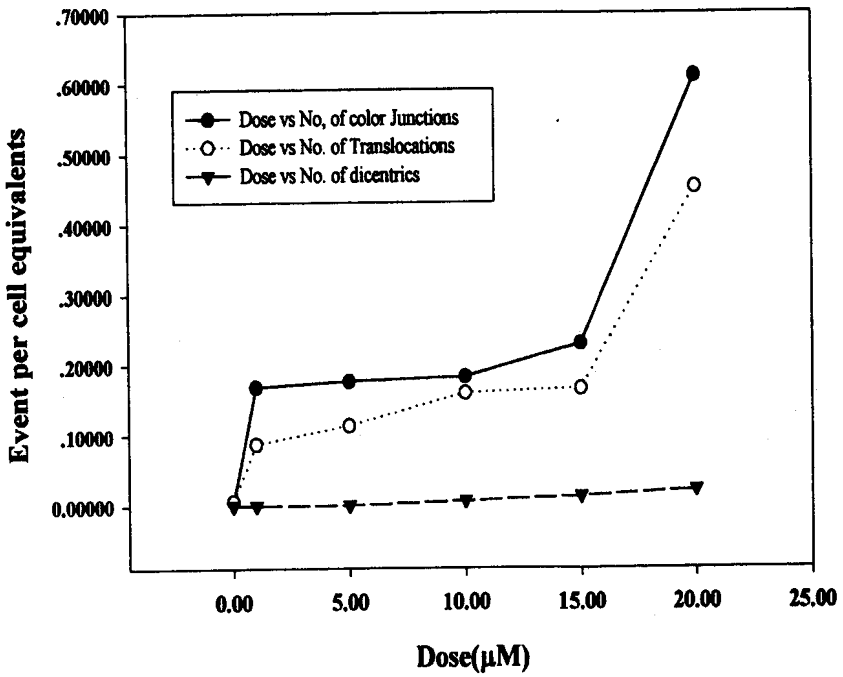


Fig. 3. A dose-response curve of translocations, dicentric chromosomes and color junctions induced by chromium(IV).

Ⅳ. 고 찰

본 연구결과 크롬은 사람의 림프구에서 이동원염색체를 유발하는 빈도가 CHO(Chinese Hemster Ovarian cell)에서 경우보다 현저하게 낮게 나타났다. 즉 20μM의 크롬농도에서 100개의 세포당 2% 정도로 CHO세포의 8%보다 낮았으며 10μM의 농도에서도 1%로 CHO세포의 7.3%보다 낮게 나타났다. 이러한 결과는 림프구는 G0시기에 크롬을 처리하였으며 CHO세포의 경우 G1기에 처리한 결과이기 때문에 그 양상이 상이하게 나타날 수도 있지만 각 세포마다 크롬에 대한 감수성이 차이가 나타날 수 있을 가능성도 배제할 수 없다.

본 실험에서는 상호전좌의 빈도가 이동원염색체보다 훨씬 높게 나타나 20μM의 농도에서는 상호전좌 : 이동원염색체의 비가 21.5로 나타났다. 본 연구시 측정에 사용된 PAINT분류체계에서는 centromere를 포함하는 염색안된 염색체 부위와 centromere가 포함안된 염색체 부위로 구성된 상호전좌의 형태인 t(Ab)와 그와 상응하는 t(Ba)를 각기 독립된 상호전좌의 수로 측정하기 때문에 이 두가지 상응하는 상호전좌가 관찰되는 완전한 상호전좌만을 대상으로 추정한다고 간주하더라도 10:1 이상으로 높게 나타났다.

본 실험에서 나타난 상호전좌의 형태는 t(Ab)가 상응되는 t(Ba)보다 많이 관찰되었으며 이는 방사선을 이용한 여러 연구결과와도 같은 양상을 보여주고 있었다[3)16)].

실제로 t(Ba)의 염색안된 부위는 현미경 관찰시 누락되는 경우가 나타날 수 있지만 t(Ab)의 염색체부위의 관찰이 용이하기 때문에 실제 같은 빈도로 나타나더라도 t(Ab)가 현미경하에서 더 많이 측정될 수 있다[16)].

이론적으로는14) 이동원염색체 및 상호전좌는 염색체형 염색체이상으로서 그의 나타나는 확율은 1:1이지만 방사선 및 Bleomycin을 이용한 많은 연구에서 상호전좌의 빈도가 더 높게 나타났다[2)3)5)15)].

그러나 Bleomycin을 처리한 경우도 t:dic의 비는 최고 2.6 정도이며 방사선 조사의 경우도 4를 넘지 않은 경우와 비교할 때 크롬에 의해 유발되는 상호전

좌 : 이동원염색체는 무척 높은 수치이다.

현재까지 이루어진 연구는 대부분의 염색체형 염색체이상을 유발하는 것으로 알려진 이온화 방사선이나 Bleomycin을 대상으로 이루어 졌으며 크롬 등 중금속을 대상으로 이루어진 경우는 별로 없다.

이러한 이유로서는 대부분의 화학물질이나 중금속은 염색분체형 염색체이상을 일으키는 것으로 알려졌기 때문이지만 경우에 따라 염색분체형은 물론 이동원염색체를 포함한 염색체형이상을 일으킬 수 있기 때문에 연구대상물질에 따라서는 FISH기법을 생물학적 감시자로서 활용할 가능성을 고려해야 한다. 실제로 현재까지 이루어진 연구에서는 giemsa 염색에 의한 염색체 분석법을 이용하여 대부분 관찰되었기 때문에 염색체형 염색체이상인 상호전좌가 발생하였더라도 관찰에서 누락될 수 있는 가능성 또한 고려해야 할 것이다.

본 연구의 결과 상호전좌가 이동원염색체보다 훨씬 많이 관찰되는 현상은 이론적으로 설명이 쉽지 않다. 형광염색된 염색체를 관찰하는 과정에서의 오류를 고려할 때 이동원염색체는 DAPI로 대조염색된 경우를 먼저 확인하기 때문에 측정에서 누락될 확율은 상호전좌의 경우보다 오히려 적게 나타나기 때문에 생각하기 힘들다. 따라서 상호전좌의 형성과정이 이동원염색체의 형성과정과 차이가 날 수 있다[15]는 점을 고려해야 되는데 실제로 똑같이 DNA상에 상해를 주더라도 이들이 손상회복되는 과정에서의 차이가 이동원염색체 또는 상호전좌로 나타나기 때문에 크롬에 의한 상해가 회복되는 기전이 방사선이나 Bleomycin과는 서로 다른 양상으로 나타나기 때문일 것이라고 가정해 볼 수 있다.

Natarajan 등[15]은 방사선이 조사된 림프구에 DNA회복합성저해제인 3-AB를 처리하였을 때 이동원염색체의 빈도는 크게 증가하였지만 상호전좌의 빈도는 변하지 않았다고 보고하여 이동원염색체 및 상호전좌의 형성과정 및 DNA 손상회복과정에서의 차이점이 있음을 시사한 바 있지만 방사선이외의 물질을 이용한 연구결과는 보고되지 않았다. 따라서 처리물질에 따라 나타나는 염색체 재배열 형태의 차이를 비교할 수 없고, 그 형성과정 및 DNA 손상회복과정에서의 차이의 가능성은 배재할 수 없기 때문에 본 실험에서 이용한 크롬의

경우도 이러한 관점에서 생각한다면 그 설명이 가능하다.

한편 크롬의 돌연변이 및 세포독성기전이 크롬의 중간 매개물질들이나 산소자유라디칼에 의한 DNA와의 직접적인 상해 결과인지 혹은 크롬의 환원과정동안 생성되는 산소자유라디칼에 의한 세포막의 상해 결과로 생성된 물질들에 의한 간접적인 DNA손상에 의한 것인지는 불명확하지만 정 등[11]의 연구결과에 따르면 크롬의 세포독성기전은 DNA에 대한 직접작용외에 Clastogenic factor(CF)에 의한 간접작용이 관여하리라고 제시되어지고 있다. 이러한 결과에서 추측할 수 있는 것은 크롬의 중간 매개물질들과 산소자유라디칼 및 그에 상응하는 물질들이 DNA 회복에 관여하는 유전자부위에 상해를 입히거나 변형시킴으로써 이동원염색체 및 상호전좌의 DNA 손상회복과정에 관여하였음을 가정해 볼 수 있으나 이 부분에 대해서는 보다 더 깊은 연구가 시행되어져야 할 것이다.

V. 참고문헌

1) Pinkel, D., T. Strauma and J.W. Gray, Cytogenetic analysis using quantitatie, hjgh-sensitivity, fluorescence hybridization, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 83, 2934-2938, 1986.

2) Tucker, J.D., M.J. ramsey, D.A. Lee and J.L. Minkler, Validation of chromosome painting as a biodosimeter in human peripheral lymphocytes following acute exposure to ionizingradiation in vitro, Int. J. Radiat. Biol. 72, 2, 139-145, 1993.

3) Chung, H.W., E.H. Sohn, H.S. Kee and S.W. Ha, Radiation induced chromosome aberration in human lymphocyte detected by fluorescence in situ hybridization, Environ. Mutagen & Carcinogens, 16, 2, 88-96, 1996.

4) Sohn, E.H., K.I. Joung and H.W. Chung, Chromosome rearrangements detected by fluorescence in situ hybridization in human lymphocyte exposed to bleomycin, Environ. Mutagen & Carcinogen, 17, 1, 12-16, 1997.

5) Tucker, J.D., D.A. Lee and D.H. Moore, Validations of chromosome painting II: A detailed analysis of aberrations following high dose of ionizing radiation in vitro, Int. J. Radiat. Biol, 67, 19-28, 1995.

6) Au, W.W., Monitoring human population for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques, Occupational med., 6, 4, 597-611, 1991.

7) Ellard, S., E.M. Parry and J.M. Parry, 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, 1995.

8) Tucker, J.D., W.F. morgan, A. Awa, M. Baucdhingers, D. Blakey, M.N. Comforth, L.G. Littlefield, A.T. Natarajan and C. Shassene, A proposed system for scoring structural aberrations detected by chromosome painting, Cytogent. Cell. Genet., 68, 211-221, 1995.

9) Matsuoka, A., J.D. Tucker, M. Hayashi, N. Yamazaki and T. Sofni, Chromosome painting analysis of X-ray induced aberrations in human lymphocytes in vitro, Mutagenesis, 9, 2, 151-155, 1994.

10) Nakano, M., E. Nakashima, D.J. Pawell, Y. Kodama and A. Awa, Frequency of reciprocal translocation and dicentrics induced in human blood lymphocyte by X-irradiation as determined by fluorescence hybridization, Int. J. Radiat. Biol., 64, 5, 565-569, 1993.

11) Kee, H.S., E.H. Sohn, I.J. Yu, S.H. Maeng and H.W. Chung, Chromium-induced cytotoxicity in CHO cell, Kor. J. Env. Hlth. Soci., 22, 4, 77-81, 1996.

12) Leonard, A. and Lauwerys, R. R., Carcinogenicity and mutagenicity of chromium, Mutat. Res., 76, 227-239, 1980.

13) De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. and Zanacchi, P., Genotoxicity of chromium compounds, A review. Mutat. Res., 238, 99-172, 1990.

14) Finnon, P., D.C. Lloyd and A.A. Edwards, Fluorescence in situ hybridization detcetion of chromosomal aberrations in human lymphocytes: Applicability to biological dosimetry, Int. J. Radiat. Biol, 68, 4, 429-435, 1995.

15) Natarajan, A.T., A.S. Balajee, J.J.W.A. Boei, S. Chalterjee, F. Darroudi, M. Grigorova, M. Noditi, H.J. Oh, P. Slijepcevic and S. Vermeulen, Recent developments in the assessment of chromosomal damage, Int. J. Radiat. Biol., 66, 5, 615-623, 1994.

16) Lucas. J.N., A. Awa, T. Straume, M. Pogensee, Y. Kodama, M. Nakako, K. Ohtaki, H.-U. Weir, D. Pinkels, J. Gray, and G. Littlefield,

Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation, Int. H. Radiat. Biol., 62, 1, 55-63, 1992.

17) Tucker, J.D. and J.R. Senft, Analysis of naturally occuring and radiation-induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4, Radiata Res., 140, 31-36, 1994

18) Awa, A.A., M. Nakano, K. Ohtaki, Y. Kodama, J. Lucas, and J. Gray, Factors that determine the in vitro dose response relationship for stable chromosome aberrations in A-bomb survivors, J. Radiat. Res(Tokyo)., 33(suppl), 206-214, 1994.

19) Bauchinger, M., E. Schmid, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, and U. Nahrstedt, 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, 1993.

20) Cremer, T., S. Popp, P. Emmerich, P. Lichter, and C. Cremer, Rapid metaphase and interphase deletion of radiation-induced chromosome aberrations in human lymphocytes by chromosomal suppression in situ hybridization, Cytometry, 11, 110-118, 1990.

21) Lucas, J.N., T. Tenjin, T. Straume, D. Pinkel, D. Moor, M. Litt, and J.W. Gray, Rapid human chromosome aberration analysis using fluoroscence in situ hybridization, Int. J. Radiat. Biol., 56, 35-44, 1989.

22) Natarajan, A.T., R.C. Vyas, F. Darroudi, and S. vermeuler, 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, 1992.

23) Pinkel, D., J. Lamdegent, C. Collons, J. Fuscoe, R. Segraves, J. Lucas, and J. Gray, Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocation

of chromosome 4., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 9138-9142, 1988.

24) Schmid, E., H. Zitgelsberger, H. Braselmann, J.W. Gray, and M. Bauchinger, Radiation-imduced chromosome aberrations analysis by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes, Int. J. Radiat. Biol., 62, 6, 675-678, 1992.

25) Weiler, H-Ul, J.N. Lucas, M. Poggensee, R. Segraves, D. Pinkel, and J.W. Gray, Two-color hybridization with high complexing chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations, Chromosoma, 100, 371-376, 1991.

26) Harper, H.E., L.M Marselle, R.C. Gallo, F. Wong-Stahl, Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type Ⅲ in lymph node and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 772-776, 1986.

27) Jhanwag, S.C., B.G. Neel, W.S. Hayward, R.S.K. Chaganti, Localization of the cellular oncogenes ABL, SIS and FES on human germ-line chromosome, Cytogenet. Cell Genet., 38, 73-75, 1984.

28) Mendelsohn, M.L., B.H. Mayall, E. Bogart, D.H. Moore Ⅱ, and B.H. Perry, DNA content and DNA based centromere index of the 24 human chromosome, Science, 179, 1126-1129, 1973.

FISH(fluorescence in situ hybridization)를 이용한 산업화학물질에 의한 염색체이상분석

(화학분야-연구자료 연구원 99-56-126)

발 행 일 : 1999. 5.

발 행 인 : 원장 정 호 근

연구수행자 : 서울대 보건대학원 정 해 원

발 행 처 : 한 국 산 업 안 전 공 단

산 업 안 전 보 건 연 구 원

주 소 : 대전광역시 유성구 문지동 104-8

전 화 : (042) 863-8181, 8363

F A X : (042) 863-8361