

Effect of Cytosine Arabinoside, 3-Aminobenzamide and Hydroxyurea on the frequencies of radiation-induced micronuclei and aneuploidy in human lymphocytes

Yoon Hee Cho¹ · Yang Jee Kim¹ · Chang Mo Kang² ·
Sung Whan Ha³ · Hai Won Chung^{1*}

¹School of Public Health and institute of Health and Environment, Seoul National University,

²Korea Institute of Radiological and Medical Sciences

³College of Medicine, Seoul National University

DNA 회복 저해제 Cytosine Arabinoside, 3-Aminobenzamide 및 Hydroxyurea가 방사선에 의해 유도된 소핵과 이수성에 미치는 영향

조윤희¹ · 김양지¹ · 강창모² · 하성환³ · 정해원^{1*}

¹서울대학교 보건대학원, ²원자력의학원, ³서울대학교 의과대학

* Correspondence : Prof. Hai Won Chung, School of Public Health,
Seoul National University, 28 Yunkeun-dong, Chongno-ku, Seoul, 110-460, Korea
Tel : (02)740-8885 Fax : (02)745-9104 E-mail : chunghw@snu.ac.kr

(2005년 10월 17일 접수, 2005년 11월 24일 채택)

Abstract - This study was carried out to examine the effect of the DNA repair inhibitors, Cytosine Arabinoside(Ara C), 3-Aminobenzamide(3AB) and Hydroxyurea(HU) on the frequencies of radiation-induced micronuclei(MNi) and aneuploidy.

Irradiated lymphocytes(1-3Gy) were treated with DNA repair inhibitors, Ara C, 3AB and HU for 3 hours and CBMN assay - FISH technique with DNA probe for chromosome 1 and 4 was performed. The frequencies of x-ray induced MNi and aneuploidy of chromosome 1 and 4 were increased in a dose-dependent manner. Ara C, 3AB and HU enhanced the frequencies of radiation-induced MNi and the frequencies of radiation-induced aneuploidy of chromosome 1 and 4 were enhanced by HU and Ara C while no effect was observed by 3AB. The frequency of radiation-induced aneuploidy of chromosome 1 was higher than that of chromosome 4. These results suggest that there are different mechanisms involved in the formation of MNi and aneuploidy by radiation.

Key words : radiation, micronuclei, aneuploidy, Ara C, 3AB, HU

요약 - 소핵분석은 방사선의 생물학적 선량계로서 활용되고 있으나 이의 생성 기전은 아직까지 확실치 않다. 본 연구에서는 사람 림프구에 방사선을 조사한 후 DNA 손상회복 저해물질, Cytosine Arabinoside(Ara C)와 3-Aminobenzamide(3-AB) 그리고 Hydroxyurea(HU)를 특정 세포주기에 처리하고 소핵분석과 FISH기법을 이용하여 방사선에 의한 소핵 및 이수성의 정도를 구명하고자 하였다. 방사선 선량에 따라 소핵과 이수성의 빈도는 양반응 관계를 보이며 증가하였고 DNA 손상회복 저해물질 처리 후 소핵의 빈도는 모든 DNA 손상 회복 저해물질에 의해 증가하였으며 Ara C, 3AB, HU 순으로 나타났다. 이수성의 빈도는 HU와 Ara C에 의해서 크게 증가하였으나, 3AB는 아무런 영향을 주지 않았다. 또한 1번 염색체가 4번 염색체보다 방사선에 의한 소핵형성 및 이수성에 더 많이 관여되었다. 본 연구 결과, 방사선에 의한 소핵 및 이수성의 형성 과정은 여러 다른 기전이 관여하고 있음을 알 수 있었다.

중심어 : 방사선, 소핵, 이수성, Ara C, 3AB, HU

서 론

방사선에 의한 상해는 염색체 절단(breakage)이 특징적이며 그로 인하여 염색체배열, 자매염색분체교환 및 소핵을 유발하는 것으로 알려져 있다. 염색체 이상 분석에 비해 분석이 쉽고 시간이 절약될 수 있어서 유전독성을 평가하는데 널리 이용되는 소핵은 세포분열의 후기나 말기 시 방추사나 kinetochore 단백질의 결합으로 인한 염색체의 불분리 현상 또는 절단된 염색체에 의해 형성되어지는 것으로 알려져 있지만 소핵 형성에 대한 기전은 아직까지 확실치 않다[1]. 그러나 방사선에 의해 형성된 소핵은 방사선량에 따라 그 결과가 뚜렷이 구분되기 때문에 소핵분석을 방사선 감시를 위한 생물학적 선량계로서 활용할 수 있음이 보고되고 있다[2].

염색체의 수적 이상인 이수성(aneuploidy)과 절단(breakage)을 관찰할 수 있는 특정염색체의 probe를 이용한 간기 FISH기법을 수행하면 소핵 내 포함된 염색체를 확인할 수 있기 때문에 소핵 형성과정에서 어떠한 기전이 포함되어 있는가를 쉽게 확인할 수 있다[3,4]. Vral 등[2] 과 Kryscio 등[5]은 소핵과 pancentromeric probe를 이용한 FISH 기법을 병행하여 방사선 선량에 따라 centromeric signal을 포함하지 않은 소핵의 빈도는 크게 증가한 반면, signal이 포함되어 있는 소핵의 빈도는 대조군에 비해 거의 차이가 없었음을 보고하여 방사선에 의해 유발되는 소핵은 대부분 염색체의 불분리 현상으로 인한 경우보다 염색체 절단에 의해 생성된다고 보고하였다.

많은 연구에서 DNA상의 double strand break (DSB)가 염색체 이상으로 나타나는 주요 상해라고 보고하였고[6,7] DNA 상의 DSB가 어떻게 염색체 이상으로 나타나는지 그 기전을 조사하기 위해 DNA 손상 회복 저해제를 적절한 세포주기에 따라 처리하게 되는데 Natarajan 등[8]은 전리방사선의 의해 유도된 염색체 이상이 DNA 손상 회복 저해제에 의해 증가되었다고 보고한바 있다. Rudat 등[9]은 DNA 손상 회복 저해제인 3-Aminobenzamide(3-AB)를 처리했을 때 방사선에 의한 염색체 절단이 회복되는 과정이 늦어져 손상을 증가시킨다고 보고하였고 Catena 등[10]도 DNA 손상 회복 저해제로 인해 방사선에 의한 소핵의 빈도가 증가하였다고 보고하였다. 또한 Heartlein과 Preston[11]는 Cytosine Arabinoside (Ara C)를 처리했을 때 x-선과 fission neutrons에 의해 생성되는 염색체 이상이 다른 양상으로

나타나 방사선질에 따라 염색체 이상 생성기전이 다름을 보고하였다. 즉 각기 다른 특성을 가진 DNA 회복 저해제를 세포주기에 따라 처리하게 되면 방사선에 의해 야기되는 DNA 손상이 회복되는데 관계하는 기전을 파악할 수 있으며 더 나아가 염색체 절단이나 염색체 불분리 현상으로 인해 생성되는 소핵생성의 기전까지도 파악할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 사람 림프구에 방사선을 조사한 후 CBMN 분석과 FISH기법을 통해 소핵 빈도의 변화 및 1번과 4번 염색체의 이수성을 조사하고 DNA 손상회복 저해물질, 즉 세포 주기 중 G₁기에 DNA 복제 및 회복 과정에서 Chromatin의 integrity를 유지하는데 필요한 효소인 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 작용을 억제하는 3-AB와 DNA polymerase α의 작용을 억제하는 Ara C 그리고 G₂기에 DNA 복제 및 회복 과정에서 ribonucleotide reductase의 작용을 억제하는 Hydroxyurea(HU)를 특정 세포주기에 처리하여 방사선에 의한 소핵 및 이수성의 기전을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 방사선 조사 및 소핵 슬라이드 표본작성

건강한 여성의 말초혈액을 채취하여 1Gy, 2Gy 및 3Gy의 방사선을 조사(dose rate: 2.00Gy/min, LINAC, Vnrian 6/100)한 후 G₁기 DNA 손상회복 억제제인 3-AB 및 Ara C를 각각 2×10^{-3} M 및 5×10^{-5} M의 농도로 3시간 처리하고 인산완충용액으로 세 번 세척하였다. 이후 Phytohemagglutinin(PHA) 및 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 배지 9ml과 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 44시간 배양한 후 cytochalasin B를 처리한 다음 28시간 추가 배양한 후 소핵 분석 슬라이드를 작성하였다. 또한 G₂기 DNA 손상회복 억제제인 HU는 배양 44시간 후에 5×10^{-3} M의 농도로 3시간 처리한 뒤 인산완충용액으로 세 번 세척하고 cytochalasin B와 PHA를 처리한 뒤 37°C 항온기에서 24시간 추가 배양한 다음 소핵 분석 슬라이드를 작성하였다.

2. FISH(fluorescence in situ hybridization)

본 실험에서는 Spectrum Orange가 표지된 1번 염색체의 CEP probe와 Spectrum Green으로 표지된 4번 염색체의 CEP probe(Vysis)를 이용하

여 interphase FISH를 수행하였다.

2.1 염색체 Slide 준비

준비된 슬라이드를 37°C의 2 × SSC(Sodium chloride, Sodium citrate)용액에 15분씩 2번 방치한 후 상온의 70%, 85%, 100% ethanol series에서 각각 2분씩 탈수과정을 거치도록 했다. 탈수된 슬라이드는 73±1°C의 70% formamide / 2 × SSC 용액에서 5분간 변성(Denaturation)시킨 후 -20°C의 70%, 85%, 100% ethanol series에서 각 2분씩 거친 후 상온에서 건조하였다

2.2 DNA probe 준비

Spectrum Orange로 표지된 1번과 Spectrum Green으로 표지된 4번 DNA probe mix를 73±1°C에서 5분간 변성시킨 후, hybridization시키기 전까지 45-50°C의 slide warmer에 배치하였다.

2.3 Hybridization

준비된 소핵 슬라이드에 probe를 점적한 후 습윤 상자에 넣어 충분히 hybridization되도록 42°C의 배양기에서 16시간동안 방치하였다.

2.4 세척

슬라이드를 72°C의 0.4 × SSC에 2분간 담근 후 꺼내어, 0.5% NP-40를 넣은 2 × SSC 용액에 담가 2분간 세척한 뒤 DAPI II (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색(counterstain)한 후 관찰하였다.

3. 관찰 및 사진 촬영

형광 현미경(NIKON, Biophot)을 이용하여 triple

band filter인 D/F/TXRD (DAPI/FICT/Texas Red, Chroma Technology Corp. 61002)로 Spectrum Orange, Green 및 DAPI를 동시에 관찰하였으며, UV-2A filter(NIKON, DM400)로는 DAPI를 관찰하였다.

4. 측정 기준

본 연구에서는 Fenech [12] 의해 제안된 분류 기준에 따라 소핵을 분석하였으며 이수성은 Sgura [13]에 의해 제시된 기준에 의거하여 분석하였다.

- 1) Binucleated cell 중 딸세포 안에 정상적인 수배치(하나의 염색체에 대한 기준)
 - 하나의 딸세포 안에 2개의 signal과 또 다른 딸세포안에 2개의 signal : 2+2
- 2) Binucleated cell 중 딸세포 안에 비정상적인 수배치
 - 하나의 딸세포 안에 3개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 1개의 signal : 3+1
 - 하나의 딸세포 안에 4개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 0개의 signal : 4+0
 - 하나의 딸세포 안에 2개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 1개의 signal과 소핵 내 1개의 signal : (2+1)+1
 - 하나의 딸세포 안에 3개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 0개의 signal과 소핵 내 1개의 signal : (3+0)+1
 - 하나의 딸세포 안에 1개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 1개의 signal과 소핵 내 2개의 signals : (1+1)+2
 - 하나의 딸세포 안에 2개의 signal과 또 다른 딸세포 안에 0개의 signal과 소핵 내 2개의 signals : (2+0)+2

Table 1. Frequency of micronuclei in human lymphocytes induced by x-radiation.

Dose (Gy)	No. of BN ^a cells	No. of MNCB	No. of MNi ^b						Total No. of MNi
			+1	+2	+3	+4	+5	+6	
control	1,000	6	6	0	0	0	0	0	6
1	1,000	98	90	7	1	0	0	0	107
2	1,000	265	211	48	4	2	0	0	327
3	1,000	509	337	134	28	7	2	1	733
	Kendall's τ^c		0.309	0.213	0.098	0.050	0.019	0.027	0.538
	p		0.000	0.000	0.000	0.004	0.317	0.157	0.000

a: binucleated

b: Micronuclei

c: Kendall's τ was calculated on cell bases.

Table 2. The frequencies of different types of aneuploid binucleated cells and micronuclei with signals of chromosome 1 induced by x-radiation in human lymphocytes.

Dose (Gy)	No. of BN ^a cells	Normal cells		Aneuploid BN cells					Total aneuploidy
		2+2	3+1	4+0	(2+1)+1	(1+1)+2	(2+0)+2	MN ^{+b}	
control	1,000	996	4	0	0	0	0	0	4
1	1,000	991	8	0	1	0	0	1	9
2	1,000	982	16	0	1	1	0	2	18
3	1,000	969	23	2	1	5	0	6	31
Kendall's τ^c			0.059	0.027	0.011	0.042	ND	0.046	0.074
p			0.000	0.157	0.366	0.018	ND	0.007	0.000

a: binucleated

b: Micronucleus with signals of chromosome 1

c: Kendall's τ was calculated on cell bases

ND : not detected

2+2: 2 signals in each daughter nucleus(normal)

3+1: 3 signals in one daughter nucleus and 1 signal in another daughter nucleus

4+0; 4 signals in one daughter nucleus only

(2+1)+1: 2 signals in one daughter nucleus and 1 signal in another daughter nucleus plus micronucleus with 1 signal of chromosome 1

(1+1)+2: 1 signal in each daughter nucleus plus micronucleus with 2 signals of chromosome 1

(2+0)+2: 2 signals in one daughter nucleus plus micronucleus with 2 signals of chromosome 1

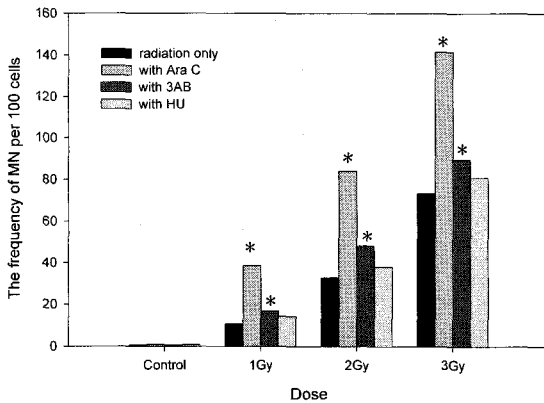


Fig. 1. Effect of Ara C, 3AB and HU on the frequencies of x-ray induced micronuclei in human lymphocytes.

5. 통계분석

SPSS 10.0 통계패키지를 이용하여 소핵, 이수성빈도의 양-반응 분석은 켄달 τ 값을 가지고 분석했으며 방사선만 처리된 그룹과 저해제가 처리된 그룹과의 비교는 X^2 를 이용하여 분석하였다.

결 과

표 1에서 보는 바와 같이 방사선량이 증가함에 따라 하나의 binucleated(BN) 세포내에 소핵의 수가 1개 이상 6개까지 관찰되었다. 대조군에서 소핵이 형성된 세포(MNCB)의 빈도는 100개의 BN 당 0.60 개로 관찰되었고 방사선에 의한 소핵의 빈도는 1Gy에서 100개의 BN당 10.7개, 2Gy에서 32.7개 그리고 3Gy에서 73.3개로 관찰되어 통계적으로 유의한 양-반응 관계가 관찰되었다 ($p < 0.001$). 또한 DNA 손상회복 저해제인 Ara C 와 3AB를 처리했을 때 방사선만 노출된 경우보다 소핵 형성이 유의 하게 증가하였고($p < 0.001$), HU에 의해서도 소핵이 증가하는 양상이었으나 통계적으로 유의하지 않았으며 Ara C, 3AB, 그리고 HU 순으로 증가하였다(그림 1).

1번 및 4번 염색체를 대상으로 간기상태의 FISH와 소핵분석을 동시에 시행한 결과는 표 2 와 3에서 보는바와 같이 1번 염색체의 경우 대조

Table 3. The frequencies of different types of aneuploid binucleated cells and micronuclei with positive signals of chromosome 4 induced by x-radiation in human lymphocytes.

Dose (Gy)	No. of BN ^a cells	Normal cells	Aneuploid BN cells						Total aneuploidy
		2+2	3+1	4+0	(2+1)+1	(1+1)+2	(2+0)+2	MN ^b	
control	1,000	999	1	0	0	0	0	0	1
1	1,000	994	6	0	0	0	0	0	6
2	1,000	987	11	0	1	1	0	2	13
3	1,000	978	18	1	3	0	0	3	22
	Kendall's τ^c		0.061	0.019	0.032	0.006	ND	0.032	0.070
	p		0.000	0.317	0.058	0.318	ND	0.041	0.000

a: binucleated

b: Micronucleus with signals of chromosome 4

c: Kendall's τ was calculated on cell bases

ND : not detected

2+2: 2 signals in each daughter nucleus(normal)

3+1: 3 signals in one daughter nucleus and 1 signal in another daughter nucleus

4+0; 4 signals in one daughter nucleus only

(2+1)+1: 2 signals in one daughter nucleus and 1 signal in another daughter nucleus plus micronucleus with 1 signal of chromosome 4

(1+1)+2: 1 signal in each daughter nucleus plus micronucleus with 2 signals of chromosome 4

(2+0)+2: 2 signals in one daughter nucleus plus micronucleus with 2 signals of chromosome 4

Table 4. The frequency of micronuclei and aneuploid BN cells with signals of chromosome 1 and 4 induced by x-radiation in human lymphocytes.

Dose (Gy)	No. of BN ^a cells	No. of MN ^b	No. of MN with chromosome 1	No. of MN with chromosome 4	No. of MN with chromosome 1 or 4	No. of aneuploidy with chromosome 1	No. of aneuploidy with chromosome 4	No. of aneuploidy with chromosome 1 or 4
			control	1,000	6	0	0	0
1	1,000	107	1	0	1	9	6	15
2	1,000	327	2	2	4	18	13	31
3	1,000	733	6	3	9	31	22	53
	Kendall's τ^c		0.046	0.032	0.052	0.074	0.070	0.103
	p		0.007	0.041	0.001	0.000	0.000	0.000

a: binucleated

b: micronuclei

c: Kendall's τ was calculated on cell bases.

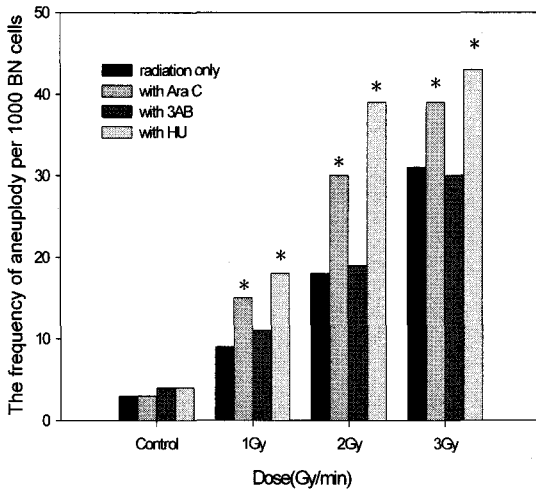


Fig. 2. Effect of Ara C, 3AB and HU on the frequencies of x-ray induced aneuploidy with signals of chromosome 1 in human lymphocytes.

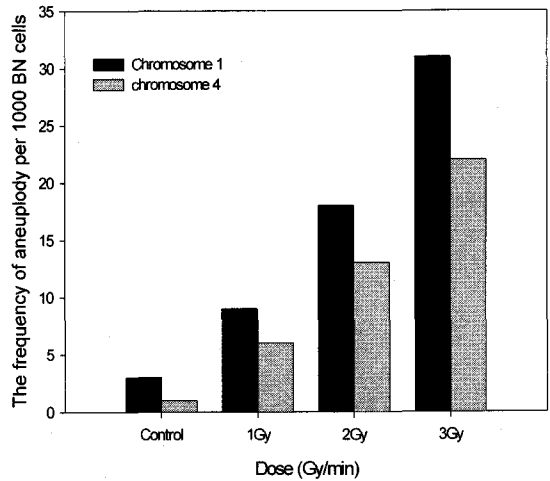


Fig. 4. The frequencies of x-ray induced aneuploidy including micronuclei with signals of chromosome 1 and 4.

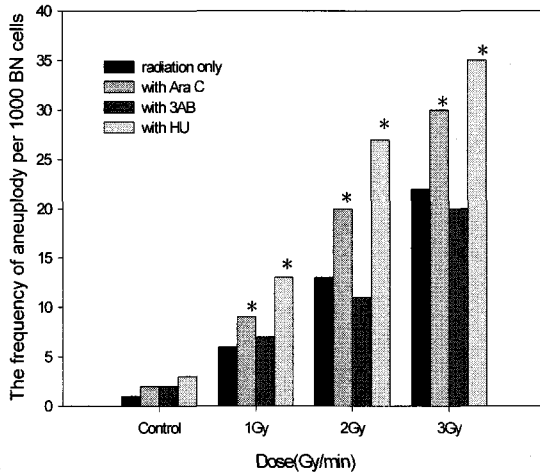


Fig. 3. Effect of Ara C, 3AB and HU on the frequencies of x-ray induced aneuploidy with signals of chromosome 4 in human lymphocytes.

군, 1Gy, 2Gy 및 3Gy의 방사선에 의해 각각 0.40%, 0.90%, 1.80% 및 3.10%의 이수성을 나타냈으며 선량에 따라 유의하게 증가하는 양-반응 관계를 보이고 있다($p < 0.001$). 4번 염색체의 이수성은 대조군, 1Gy, 2Gy 및 3Gy에서 각각 0.10%, 0.60%, 1.30% 및 2.20%의 이수성을 나타냈으며 선량에 따라 통계적으로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.0001$)

또한 하나의 딸핵에 3개의 signal이 나타나는 trisomy와 다른 딸핵에 1개의 signal이 나타나는

monosomy 경우인 3+1 빈도는 1번 및 4번 염색체 모두 방사선량에 따라 빈도가 유의하게 증가하였으나 한쪽 딸핵에 4개의 signal이 모두 나타나는 경우인 4+0은 두 염색체 모두 유의한 결과를 보이지 않았다. 소핵내에 염색체의 signal이 포함되어 있는 경우에는 (2+1)+1, (2+0)+2 및 (1+1)+2이 관찰되었으며 소핵 내 signal의 빈도는 1번과 4번 염색체 모두에서 방사선량에 따라 유의하게 증가하였다($p \leq 0.05$). 표 4에서 보는 바와 같이 전체 소핵 중 1번 또는 4번 염색체의 signal을 지닌 소핵(MN+)의 비율은 대조군, 1Gy, 2Gy 및 3Gy에서 각각 0%와 0.10%, 0.20%, 0.60%와 0%, 0%, 0.2% 및 0.3%로 나타나 1번 염색체가 소핵 형성에 더 많이 관여되어 있음을 알 수 있었다(그림4). 1번 또는 4번 염색체를 모두 포함한 소핵의 빈도는 0%, 0.10%, 0.40%, 0.90%로 양-반응 관계를 보여 주었으나($p < 0.0001$) 이는 총 소핵 빈도와 비교해 보았을 때 매우 낮은 빈도이기 때문에 방사선에 의해 유도되는 소핵은 대부분이 염색체 절단에 기인하는 것으로 볼 수 있다.

DNA repair 억제제인 3-AB와 Ara C 및 HU를 처리하여 두 염색체의 이수성을 비교 평가한 결과는 그림 2와 3에서 보는 바와 같이 AraC와 HU를 처리한 경우에만 1번과 4번 염색체의 이수성의 빈도가 각 방사선 선량에 따라 방사선만 조사된 그룹에 비해 높았으며 특히 HU를 처리했을 때 이수성의 빈도가 증가되었다. 그리고 3AB를 처리했을 경우에는 대조군과 차이가 유의하지 않았다. 또한 signal을 포함한 소핵(MN+)의 빈도도

Ara C와 HU에 의해 증가하였지만 양반응 관계는 보이지 않았으며 3-AB에 의해서는 영향이 없었다.

고 찰

독성물질에 손상 받은 세포는 염색체의 절단이 일어나거나 세포 분열 후기 또는 말기에서 방추사나 kinetochore 단백질의 결합으로 염색체의 불분리에 의해 두 딸핵 내에 동일한 수의 염색체를 가지지 못하게 되는 이수성을 일으키게 되며 그 결과 생성된 소핵 내에는 염색체의 절편 또는 염색체 전체가 포함된다. 특정염색체의 probe를 이용하는 FISH기법과 소핵분석을 병행하면 소핵 내 포함된 염색체를 확인함으로써 특정오염물질에 노출되어 나타난 특정염색체의 손상을 파악할 수 있다[14].

본 연구에서는 방사선에 의한 소핵형성 과정의 기전 및 이수성의 정도를 구명하고자 1, 2 및 3Gy의 방사선 조사 후 각종 DNA 손상회복저해물질, 3-AB와 Ara C 그리고 HU를 특정 세포주기에 처리한 다음 1번과 4번 염색체의 centromere probe를 이용한 FISH기법과 소핵분석을 실시하였다. 방사선량의 증가에 따라 소핵의 빈도가 유의하게 증가하였고 방사선 조사 후 DNA 손상회복 저해물질을 처리했을 때 소핵이 Ara c, 3-AB, HU 순으로 유의하게 증가하였다. Catena 등[10]은 사람 림프구에서 1에서 4Gy까지의 방사선에 의해 유도된 소핵은 3-AB에 의해 증가 되었다고 보고하였으며 Benova등[15]은 크롬에 노출된 작업자와 대조군에게 Ara C를 처리했을 때 모든 대상자의 소핵의 빈도가 증가하였다고 보고하여서 본 연구 결과와 비슷한 결과를 보여주었다.

방사선의 의해 유도되는 염색체 불분리 현상을 관찰하기 위해 다른 염색체에 비해 방사선에 민감하게 상해를 받는 것으로 알려진 염색체 1번과 4번 centromeric probe를 선정하였으며[16,17] 관찰된 이수성은 불분리 현상에 의해 딸세포 내 염색체가 한 쪽으로 치우쳐 비정상적인 수로 배치되는 경우(3+1, 4+0)와 소핵 내에 signal이 있는 경우((2+1)+1, (1+1)+2, (2+0)+2)였다. 총 이수성의 빈도 및 1번 염색체 또는 4번 염색체의 signal을 포함하는 소핵의 빈도를 관찰하여 이들 염색체가 소핵형성에 관여하는 정도를 평가하였다. 본 연구 결과 총 소핵 빈도에 비해 매우 낮은 빈도의 MN+가 관찰되어 방사선에 의해 유도되는 소핵은

대부분 절단에 의한 것임을 파악할 수 있었다.

또한 각 DNA 손상회복저해제, Ara C, 3AB 그리고 HU를 처리했을 때 딸핵 내 또는 소핵 내 포함되어 나타난 이수성의 영향은 HU와 Ara C에 의해 증가하였으나 3AB에 의해서는 증가하지 않았다. Ara C는 DNA 손상물질에 의해 생긴 DNA adduct을 제거하고 생기는 DNA상의 gap을 채우게 되는 DNA polymerase α 및 δ 의 작용을 억제하는데 이러한 결과로 DNA의 회복 및 복제 과정을 저해하는 것으로 알려져 있다[18,19]. 3AB는 DNA가 복제되고 회복되는 동안 chromatin integrity를 유지하는데 필요한 효소인 PARP 작용을 억제하여 DNA 가닥 절단의 재결합을 지연 시킴으로서 DNA 손상회복을 방해하는 것으로 알려져 있으며[20-22] HU는 ribonucleotide reductase의 작용을 억제하고 DNA 합성에 필요한 전구물질의 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다[23].

Ara C에 의해 작용이 억제되는 DNA polymerase α 와 δ 는 mismatch 회복과정에서 DNA 재합성에 관여한다고 보고되었으며[24-26] 절단된 DNA gap을 채움으로써 염기 절단 회복과정(Base excision repair)에도 관여한다고 알려져 있다[27].

최근 여러 연구에서 genomic integrity를 유지하는 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)가 염기 절단 회복과정에 연관되어 있다고 보고하였고[28-32] PARP가 XRCC1이나 ligaseIII과 같은 효소들을 회복과정으로 관여하도록 하는 nick sensor로써 작용한다고[33] 보고되어 3AB를 처리하면 염기절단 회복이 저해됨을 알 수 있다. 따라서 이 DNA의 단일가닥 손상(single strand breakage)의 회복이 저해되면 이중 가닥 손상으로 전환된다고 볼 때 Ara C와 3AB에 의한 소핵의 증가는 mismatch회복과정 및 염기절단 회복과정이 관련 있음을 추정 할 수 있다.

한편 방사선과 같은 세포독성을 일으키는 물질에 의해 유도된 DSB는 크게 3가지 기전; homologous recombination(HRR), single strand annealing(SSA)그리고 nonhomologous DNA end joining(NHEJ)에 의해 회복된다고 알려져 있다. 일반적으로 NHEJ가 척추동물에서 주요 DSB 회복경로로 알려져 있으나 최근의 연구에서 HRR도 회복기전에 중요하게 관여한다고 알려져 있다[34]. Takata 등[35]은 chicken B cell line DT 40을 이용해서 DSB에 대한 회복과정을 살펴본 결과, NHEJ는 세포주기 G₁기에 작용하고 HRR는 늦은 S기나 G₂기에 관여한다고 보고하였다. 방사선에 의한 소핵형성은 주로 염색체 절단에 기인

하는데 절단된 DNA가 재결합하여 손상이 회복되는 NHEJ가 소핵의 빈도에 영향을 준다고 가정할 수 있다. Rudat 등[9]은 3AB와 같은 PARP의 저해제는 DNA의 이중가닥 절단(DSB)된 부위의 재조합을 감소시켜 결국 DNA 손상 회복 속도를 늦어지게 하며 이러한 결과를 통해 PARP가 절단된 DNA의 rejoining에 영향을 줄 수 있다고 보고하여 NHEJ가 관여함을 시사한 바 있다. 또한 Simbulan 등[30]은 PARP가 DNA Polymerase α 를 자극하여 DNA 손상회복에 관여하는 것으로 보고해 Ara C 역시 NHEJ 회복과정에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한 HRR은 주로 S기와 G₂기에서 절단된 DNA사슬의 homologous한 부분에 작용해 회복과정을 거치는데[36] DNA 손상회복 저해제가 처리되면 HRR 회복과정이 저해되어 염색체 절단이 증가되고 또한 세포주기가 delay 되어 염색체 loss 및 non-disjunction을 유도할 수 있는 방추사 또는 kinetochore 단백질 등에 영향을 줄 수 있어 이수성의 빈도에 영향을 미칠 수 있다고 추정할 수 있다. 즉 NHEJ는 염색체 절편을 포함하는 소핵의 빈도에 주로 영향을 주고 HRR은 염색체의 불분리 현상에 영향을 줄 수 있다고 추정한다면 Ara C와 3AB는 NHEJ 회복기전과 그리고 HU는 HRR 회복기전에 관련 된다고 볼 수 있다. 또한 Allio 등[37]은 p53 wild type cell line인 TK6와 p53 mutant cell line인 WTK1에 bleomycin과 Ara C를 처리하고 chromatid 이상을 보았을 때 p53 mutant cells에서만 Ara C가 염색분체형 이상을 증가시킴으로써 p53-dependent 회복 과정과 Ara C와의 연관성을 보여주었다. 즉 p53과 HRR 회복기전의 관련성을 고려해 볼 때 Ara C가 NHEJ 회복기전과 더불어 HRR 회복기전에도 관여함을 보여주며 이는 Ara C가 HRR 뿐만 아니라 NHEJ 회복에도 영향을 주기 때문에 방사선에 의해 유도된 상호전좌와 이동된 염색체의 빈도를 증가시킨다는 Chung 등[14]의 결과로 뒷받침된다. 또한 Chung과 Maeng[38]은 CHO 세포에 자외선을 조사하고 G₂기에 HU를 처리하면 염색체 이상 외 절단 등이 많이 관찰되었음을 보고하여 HU가 이수성의 빈도 외 소핵의 빈도에도 관여한다는 본 연구 결과를 뒷받침해준다. 따라서 Ara C는 NHEJ 뿐만 아니라 HRR 회복기전에 영향을 주어 소핵의 빈도를 가장 많이 증가시키고 이수성의 빈도 역시 증가시키는 반면, 3AB는 NHEJ 회복기전에 영향을 미치므로 이수성의 빈도에는 영향의 없으나 소핵의 빈도를 증가시키고 또한 HU는 HRR 회복

기전에 관여함으로써 이수성의 빈도를 크게 증가시킬 수 있다고 추정할 수 있으나 정확한 기전을 확인하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다.

염색체의 방사선 감수성은 염색체 내의 DNA 함량에 따라 그리고 염색체의 모양에 의해서 비례적으로 차이가 있다고 알려졌다[39]. 각 염색체마다 방사선 감수성은 연구자마다 차이를 보이고 있는데 Natrajan 등[16]은 x선 및 중성자에 의한 염색체 이상의 빈도가 1번 염색체의 경우가 더 많이 나타났다고 보고하고 있으며, Johnson 등[39]은 상염색체 중 14개(1, 4-8, 10-13, 17-20번) 염색체는 DNA 양에 비례하여 절단점(break point)이 분포하지만 나머지 8개의 상염색체 및 성 염색체에서는 기대치와 차이가 난다고 보고하였다. 반면에 Knehr 등[17]은 실제 염색체이상 빈도와 기대치 간에 차이가 발생하였으며 4번 염색체의 경우 염색체 이상의 빈도 관찰치가 기대치보다 더 높게 관찰되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 pancentromeric probe대신에 1번과 4번 염색체의 probe를 이용하여 방사선에 의한 불분리 현상과 이들이 소핵형성에 어떻게 기여하는가를 확인하고자 하였다. 본 연구결과에서 방사선 조사에 의해 유발된 이수성 빈도는 1번 염색체가 4번 염색체보다 더 많이 관찰되어 1번 염색체가 4번 염색체보다 방사선에 대해 감수성이 있는 것으로 나타났다. Puerto 등[19]은 방사선과 유사한 기전으로 염색체 이상을 유발하는 Bleomycin을 사람림프구에 처리하여 1번과 4번 염색체 probe를 이용해 FISH를 수행한 결과 1번 염색체에서 4번 염색체보다 더 많은 염색체 절단을 관찰하였다고 보고하여 1번 염색체가 4번 염색체보다 방사선에 대해 감수성이 있다는 본 연구결과를 뒷받침한다. 또한 이러한 현상에 대한 가능한 설명으로는 다음과 같이 제시할 수 있다. 즉 동원체의 일부인 kinetochore 단백질의 구성 및 구조가 1번 염색체가 더 많은 손상을 받았거나 염색체의 크기가 4번 보다 크기 때문에 방추사의 결합이 더 용이하지 못할 가능성[2] 그리고 DNA 손상을 염색체 손상으로 전환하는 것을 조절하는 염색질의 구성(chromatin organization), 염색체 상의 상해의 지속성의 차이, 특정 세포독성물질에 대한 각 염색체의 민감성 차이 및 염색체의 DNA 회복양상의 차이 또는 각 염색체상의 유전자 밀도 등을 들 수 있으나[39-41] 확실치는 않다.

본 연구결과에서는 제시하지 않았으나 핵 내 3개 이상의 염색체를 포함하는 고배수성(hyperdiploidy)을 분석한 결과 하나의 핵에서 3 또는 4개의 염

색체 signal을 보이는 경우가 대조군, 실험군 모두에서 관찰되었다. 이는 실험상의 오류 즉, spot이나 염색체 probe의 비특이적 결합이거나 염색체 절단의 가능성이 있다[42]. 방사선의 경우 염색체 손상은 거의가 절단에 해당하기 때문에 염색체의 일부, 즉 염색체 절편일 가능성도 있으나 본 연구에서 사용한 염색체 probe는 절단을 확인할 수 없다는 제한점이 있다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 원자력 중장기 연구개발 사업 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. M. Fenech, "The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.*, 285(1), 35-44(1993)
2. V. Vral, H. Thierens and D. Ridder, "In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes", *Int. J. Radiat. Biol.*, 71(1), 61-68(1997)
3. A. Zijno, F. Marcon, P. Leopardi and R. Crebelli, "Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridization with a centromeric DNA probe: implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin B", *Mutagenesis*, 9, 225-232 (1994)
4. H. Norppa, L. Renzi and C. Lindholm, "Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization", *Mutagenesis*, 8, 519-525(1993)
5. A. Kryscio, W.U. Ulrich Muller, A. Wojdik, N. Kotschy, S. Grobelny and C. Strefer, "A cytogenetic analysis of the long-term effect of uranium mining on peripheral lymphocytes using the micronucleus-centromere assay", *Int. J. Radiat. Biol.*, 77(11), 1087-1093(2001)
6. P. Bryant, "Use of restriction endonucleases to study relationships between DNA double strand breaks, chromosomal aberrations and end-points in mammalian cells", *Int. J. Radiat. Biol.*, 54(6), 869-890(1988)
7. A.T. Natarajan and G. Obe, "Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberration III. restriction endonucleases", *Chromosome(Berl)*, 90, 120-127(1984)
8. A.T. Natarajan, I. Csukas, F. Degrassi and A.A. Van Zealand, "Influence of inhibition of repair enzymes on the induction chromosomal aberrations by physical and chemical agents". *Progress in Mutation Research*, 4, 47-59(1982)
9. V. Rudat, N. Bachmann, J.H. Kupper and K.J. Weber, "Overexpression of the DNA-binding domain of Poly(ADP-ribose)polymerase inhibits rejoining of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks", *Int. J. Radiat. Biol.*, 77(3), 303-307(2001)
10. C. Catena, D. Conti, A. Del Nero and E. Righi, "Inter-individual differences in radiation response shown by an in vitro micronucleus assay: effects of 3-aminobenzamide on X-ray treatment", *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 697-694(1992)
11. M.W. Heartlein and R.J. Preston, "The effect of 3-aminobenzamide on the frequency of x-ray or neutron-induced chromosome aberrations in cycling or noncycling human lymphocytes", *Mutat. Res.*, 148, 91-97(1985)
12. M. Fenech "The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations", *Mutat. Res.*, 285(1), 35-44(1993)
13. A. Sgura, A. Antoccia, M.J. Ramirez, R. Marcos, C. Tanzarella and F. Degrassi, "Micronuclei, centromere-positive micronuclei and chromosome nondisjunction in cytokinesis blocked human lymphocytes following mitomycin C or vincristine treatment", *Mutat. Res.*, 392 (1-2), 97-107 (1997)
14. H.W. Chung, S.J. Kang and S.Y. Kim, "A combination of the micronucleus assay and a

- FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzotriol", *Mutat. Res.* 516, 49-56(2002)
15. D. Benova, V. Hadjidekova, R. Hristova, T. Nikolova, M. Boulanova, I. Georgieva, M. Grigorova, T. Popov, T. Panev, R. Georgieva, A.T. Natarajan, F. Darroudi and R. Nilsson, "Cytogenetic effects of hexavalent chromium in Bulgarian chromium platers", *Mutat. Res.*, 514, 29-38(2002)
 16. A.T. Natarajan, 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)
 17. S. Knehr, H. Zitzelsberger, H. Braselmann, U. Nahrstedt and M. Bauchinger, "Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization: further indications for a non-DNA-proportional involvement of single chromosome in radiation-induced structural aberrations", *Int. J. Radiat. Biol.*, 70(4), 385-392(1996)
 18. J. Surralles, S. Sebastian and A.T. Natarajan, "Chromosomes with high gene density are preferentially repaired in human cells", *Mutagenesis*, 12, 437-442(1997)
 19. S. Puerto, J. Surralles, M.J. Ramirez, E. Carbonell, A. Creus and R. Marcos, "Analysis of bleomycin- and cytosin arabinoside-induced chromosome aberrations involving chromosome 1 and 4 by painting FISH", *Mutat. Res.*, 439, 3-11(1999)
 20. M.S. Satoh, G.G. Poirler and T. Linahl, "Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis is response to DNA strand breakage", *Biochemistry*, 33, 7099-7106(1994)
 21. B.J. Carleton, J. Mcintosh, H. Huang, A. Graytock and D.G. Hoyt, "Regulation of bleomycin-induced DNA breakage and chromatin structure in lung endothelial cells by integrins and poly(ADP-ribose) polymerase", *Molecular Pharmacology*, 59(1), 69-75(2001)
 22. I. Dominguez, S. Mateos and F. Cortes, "Yield of SCEs and translocations produced by 3 aminobenzamide in cultured chinese hamster cells", *Mutat. Res.*, 448, 29-37 (2000)
 23. B.A., Kihlman, K. Hanson, F. Palitti, H.G. Andersson and B. Hartloyasp, "Poentiation of induced chromatid-type aberrations by hydroxyurea and caffen in G2". *Mutat. Res.*, 4, 11-24(1982)
 24. TS Wang, BE Pearson, HA Suomalainen, T. Mohandas, LJ Shapiro, J. Schroder and D. Korn, "Assignment of the gene for human DNA polymorphism alpha to the X chromosome", *Proc Natl Acad Sci USA*, 82, 5270-5275(1985)
 25. SW. Wong, AF. Wahl, PM. Yuan, N. Arai, BE. Pearson, K. Arai, D. Korn, MW. Hunkapiller and TS Wang, "Human DNA polymorphism alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases", *EMBO J*, 7, 37-47 (1988)
 26. JJ. Holmes, S. Clark and P. Modrich, "Strand-Specific mismatch correction in nuclease extracts of human and Drosophila melanogaster cell lines", *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 5837-5841(1990)
 27. E. Cappelli, R. Taylor, M. Cevasco, A. Abbondandolo, K. Caldecott and G. Grosina, "Involvement of XRCC1 and DNA ligaseIII gene products in DNA base excision repair", *J. Biol Chem*, 272, 23970-23975(1997)
 28. Z.Q. Wang, B. Auer, L. Stingl, H. Berghammer, D. Haidacher, M. Schweiger and E.W. Wagner, "Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribose)ylation develop normally but are susceptible to skin disease", *Genes Dev*, 9, 509-520(1995)
 29. Z.Q. Wang, L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsh, M. Los, K. Schulze-Osthoff and E.W. Wagner, "PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis", *Genes Dev.*, 11, 2347-2358(1997)
 30. C.M.G. Simbulan, M. Suzuki, S. Izuta, T.Sakurai, E. Savoysky, K. Kojima, Y. Miyahara and S. Yoshida, "Poly(ADP ribose) polymerase stimulates DNA polymerase alpha by

- physical association", *J. Biol. Chem.* 268, 93-99(1993)
31. C.M.G. Simbulan, D.S. Rosenthal, H. Hiltz, R. Hickey, L. Malkas, N. Applegren, Y. Wu, G. Bers and M. Smulson, "The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex", *Biochemistry*, 35, 11622-11633(1996)
 32. M. Masson, C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia, "XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage", *Mol. Cell. Biol.* 18, 3563-3571 (1998)
 33. K.W. Caldecott, C.K. McKeown, J.D. Tucker, S.L. Ljunquist and L.H. Thompson, "An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III", *Mol. Cell. Biol.* 14, 68-74(1994)
 34. G. Obe, P. Pfeiffer, J. R. K. Savage, C. Johannes, W. Geodecke, P. Jeppeson, A.T. Natarajan, W. Mortinez-Lopez, G.A. Folle and M.E. Drets, "Chromosome aberrations' formation, identification and distribution", *Mutat. Res.*, 504, 19-36(2002)
 35. Z. Yu, J. Chen, B.N. Ford, M.E. Brackley and B.W. Glickman, "Human DNA repair systems: an overview", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33, 3-20(1999)
 36. M. Takata, M.S. Sasaki, E. Sonada, C. Morrison, M. Hashimoto and S. Takeda, "Homologous recombination and non-homologous end-rejoining pathways of DNA double strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells", *EMBO J.* 17, 5497-5508(1998)
 37. T. Allio, E.M. Donner and R.J. Preston, "A combination of the roles of p53 mutation and Ara C inhibition in the enhancement of bleomycin-induced chromatid aberrations in mouse and human cells", *Mutat. Res.*, 447, 227-237(2000)
 38. H.W. Chung and S.H. Maeng, "DNA 회복합성 저해제가 카드뮴에 의한 염색체 이상 유발빈도에 미치는 영향", *Environ. Muta. & Carcinogen*, 11(1), 29-42(1991)
 39. K.L. Johnson, D.J. Brenner, J. Nath, J.D. Tucker and C.R. Greard, "Review Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random?", *Int. J. Radiat. Biol.*, 75(2), 131-141(1999)
 40. J. Surralles, S. Puerto, M.J. Ramirez, A. Creus, R. Marcos, L.H. F. Mullenders and A.T. Natarajan, "Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility", *Mutat. Res.*, 44, 39-44(1998)
 41. M. Kirsch-Volders, A. Vanhauwaert, M.D. Boeck and I. Decordier, "Importance of detecting numerical versus structural chromosomal aberration", *Mutat. Res.*, 504, 137-148(2002)
 42. D.A. Eastmond, M. Schuler and D.S. Rupa, "Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells", *Mutat. Res.*, 348 (4), 153-162(1995)