

Chinese Hamster Ovary 세포에서 2-aminoanthracene의 유전독성 측정을 위한 Single Cell Gel Electrophoresis 조건

한양대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학연구소
¹한양대학교 의과대학 마취과학교실

박 장 환 · 김 동 원¹

Conditions of Single Cell Gel Electrophoresis of Chinese Hamster Ovary Cell for Detect the Genetic Toxicity of 2-aminoanthracene

Chang-Hwan Park and Dong-Won Kim¹

Department of Microbiology and ¹Department of Anesthesiology,
College of Medicine and Institute of Biomedical Sciences,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

The single cell gel electrophoresis (SCGE, comet assay) is becoming established as a genotoxicity test with manifold applications *in vitro* and *in vivo*. While the underlying principles are identical, various modifications of the method are in use which clearly affect the sensitivity and resolving power of the assay. We therefore performed SCGE experiments with CHO.1A2BRN2E cells, which express human cytochrome p450 1A2, cytochrome p450 reductase and *N*-acetyltransferase 2 genes, using different unwinding time, voltage/ampere, electrophoresis time and pH of electrophoresis buffer. DNA damage was induced by 2-aminoanthracene (2-AA) during 24 hours. On the basis of results obtained in this study, best SCGE conditions for detect DNA damage induced 2-AA to CHO.1A2BRN2E cells are 30 minutes unwinding, 25 volt/300 mA, 20 minutes electrophoresis with alkali electrophoresis buffer (pH 13.5).

Key Words: Single cell gel electrophoresis (SCGE), CHO cell, Metabolic activation

서 론

유전독성시험(genetic toxicity test)은 신물질 개발에서 가장 먼저 실시되는 독성시험의 하나로 세균, 초파리, 마우스, 배양세포 등을 이용하며 전세계적으로 1970년대 초기부터 시행되어 왔다. 유전독성시험은 현재 손상의 지표가 되는 유전

물질에 따라 크게 유전자 돌연변이, 염색체 이상, DNA 손상 등으로 구분되며 알려진 시험방법은 대표적인 것만으로도 30여 가지에 이르고 있다.¹⁾ 한편 '의약품등록의 국제적합의를 위한 협의체'(ICH; International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use)에서는 대표적

인 유전독성시험인 *Salmonella*를 이용한 복귀돌연변이시험, 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상 시험, 마우스를 이용한 소핵시험을 규정하고 있으며, 1970년대에 개발되었으나 최근까지 많이 고려되지 않았던 포유류 배양세포를 이용한 유전자돌연변이 시험을 추가하였다.²⁾

Single cell gel electrophoresis (SCGE)는 분자독성학을 비롯한 유전자 손상에 관련된 연구에 광범위하게 응용되는 연구기법으로서, 염색된 DNA의 전기영동상이 형성의 모습을 닮아 통상 Comet assay라고 불린다.³⁾ SCGE는 1984년 Ostling과 Johanson에 의해 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis 방법을 근원으로 하여,⁴⁾ Singh에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지해낼 수 있는 방법으로 발전되었다.⁵⁾ 본 SCGE는 세포의 분열주기에 영향을 받지 않으며, 처리 시간이 짧아 빠른 시간 내에 간편하게 세포수준에서 실험결과를 얻을 수 있고, 다양한 종류의 세포에 응용이 가능하며, 또한 적은 수의 세포에서 DNA 손상을 감지할 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만 시험물질 처리 후 SCGE를 시행하는 여러 단계의 미세한 변화에 민감하게 반응하는 단점을 갖고 있어 실험상황에 따라 조건을 확립해야만 한다. 이 연구에서는 cytochrome p450 유전자전 이 세포에 2-aminoanthracene (2-AA)이 미치는 유전독성을 SCGE로 검출하기 위한 최적조건을 수립하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 시약 및 재료

실험에 사용한 세포주는 Chinese hamster ovary (CHO) 세포(KCBB 10061)에 사람 cytochrome p450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase 및 *N*-acetyltransferase 2 유전자가 lipofectamine으로 유전자 전이된 CHO.1A2BRN2E 세포주를 이용하였다. CHO.1A2BRN2E 세포는 10% 우태아혈청 (SH30088.04, Hyclone, USA), 100 unit/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin (B-3001, Hyclone, USA), 1 mg/ml G418 (geneticin HCl, 345810, Calbiochem, USA), 10 µg/ml blasticidine (bsd, R210-01, Invi-

trogen, USA) 함유 DMEM (23700-040, GibcoBRL, USA) 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다. 2-aminoanthracene (2-AA)을 비롯한 일반적인 화학물질은 Sigma (Germany) 제품을 사용하였으며, 그 외 시약들은 모두 특급시약을 사용하였다.

2) 단세포 전기영동법(SCGE, Comet assay)

유전자전이 세포주에 미치는 2-AA의 DNA 손상도를 측정하기 위하여 Singh의 방법을 변형하여 Comet assay를 시행하였다.⁵⁾ CHO.1A2BRN2E 세포를 24well plate에 1.5×10⁴/well로 접종하여 2-AA 10 nM을 24시간 동안 처리한 후 1.5 ml tube에 세포를 수거한 다음, 0.5% low melting agarose (A-0701, Sigma, Germany) 75µl로 잘 혼합하였다. 미리 1% agarose (A-0169, Sigma, Germany)를 깔아 놓은 슬라이드(fully frosted, 125485 M, Fisher, USA) 위에 세포와 혼합된 low melting agarose를 깔고 덮개유리를 덮어 응고시켰다. 덮개유리를 벗긴 후 그 위에 0.5% low melting agarose 75µl를 깔고 덮개유리를 덮어 건조시켰다. 세포를 용해하기 위하여 2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Sodium lauroyl sarcosinate (L-9150, Sigma, Germany), 1% Triton X-100 함유 용액(pH 10)에 슬라이드를 넣어 4°C에서 처리하였다. 슬라이드를 세척한 후 1 mM EDTA, 0.3 M NaOH (pH 13.5) 용액으로 unwinding하고, 전기영동 chamber에 넣어 전기영동 하였다. 알칼리 상태에서 전기영동 한 경우는 0.4M Tris (pH 7.5)로 10분간씩 3회 중화하였다. 세포용해 단계부터 중화단계까지는 자외선에 의한 DNA 손상을 방지하기 위하여 빛을 차단하며 실시하였다. 건조된 슬라이드를 20µg/ml ethidium bromide 용액으로 염색하고 515~560 nm 파장의 형광현미경으로 DNA 손상을 관찰하였다. 양성 대조군으로 H₂O₂ 5×10⁻⁶ M을 사용하였으며 음성대조군으로 DMSO 0.5%를 사용하였다. DNA 손상은 comet 형성 여부를 Komet 4TM (Hamington, USA) 프로그램을 이용하여 50개의 세포를 계수하여 측정하였다. 용매대조군에 대한 유의성은 Student's T-test로 판정하였다.

3) SCGE 조건 변화

2-AA에 의한 유전독성을 측정하기 위한 최적의 SCGE 조건을 수립하기 위하여 다음과 같은 SCGE 단계를 설정하였다.

(1) **Unwinding 시간:** DNA unwinding 시간을 10분, 20분, 30분, 40분으로 설정하였다.

(2) **전압과 전류:** 전기영동시 전압을 15 V, 20 V, 25 V로 설정했으며, 전류를 300 mA로 고정시킨 조건과 전압에 따라 변동되는 조건을 시행하였다.

(3) **전기영동 시간:** 전기영동 시간은 20분, 30분, 40분의 조건으로 설정했다.

(4) **전기영동용액 pH:** 전기영동은 300 mM sodium acetate, 0.1 M Tris (pH 8.5)의 중성용액과 1 mM EDTA, 0.3 M NaOH (pH 13.5)의 알칼리용액에서의 시행하였다.⁶⁾

결 과

1) Unwinding 시간

DNA unwinding 시간을 10분에서 40분까지 변화시킨 결과 30분 이상에서 Olive tail moment가 가장 높았으며, DMSO 처리군과 2-AA 처리군의 유의성 차이는 30분 처리에서 가장 높았다(Fig. 1).

2) 전압과 전류

전류와 전압을 함께 변화시킨 경우 전류가 낮아짐에 따라 DMSO 처리군과 2-AA 처리군의 유의성 차이가 감소하였으며, 전류를 300 mA로 고정시키고 전압만 감소시킨 경우에는 tail 형성은 감소하였으나 유의성은 나타내었다. 전압은 25 volt, 전류 300 mA 조건에서 유의성 차이가 가장 높았다(Fig. 2).

3) 전기영동 시간

전기영동 시간이 길어질수록 DMSO 처리군과 2-AA 처리군 모두 tail의 형성이 증가하였다. 전

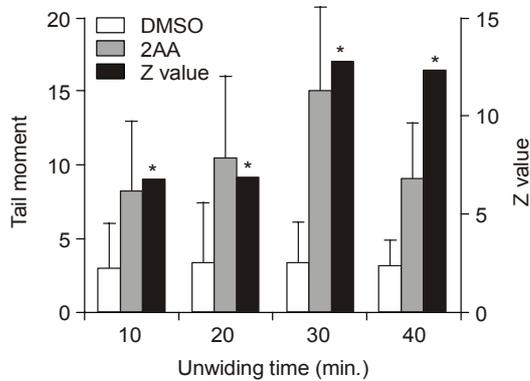


Fig. 1. Comparison of unwinding time of olive tail moment in single cell gel electrophoresis. CHO.1A2BRN-2E cells were treated with 2-aminoanthracene (2AA) during 24 hours. *: $p < 0.01$, $n = 50$

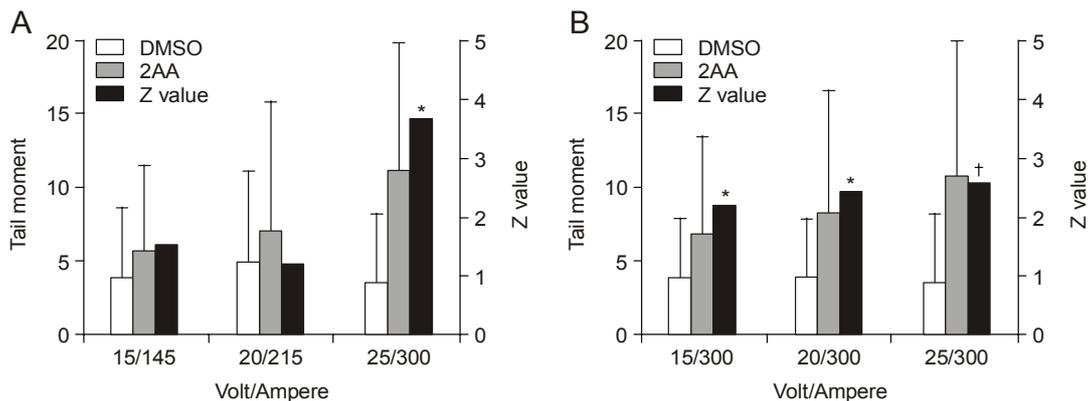


Fig. 2. Comparison of electrophoresis voltage and ampere of Olive tail moment in single cell gel electrophoresis. CHO.1A2BRN2E cells were treated with 2-aminoanthracene (2AA) during 24 hours. (A) Voltage and ampere are depend on amount of electrophoresis buffer. (B) Ampere was set at 300 mA. *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$, $n = 50$

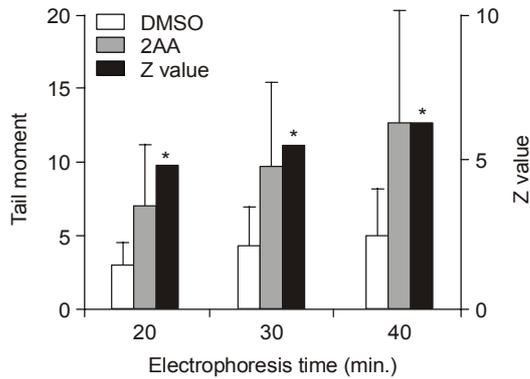


Fig. 3. Comparison of electrophoresis time of Olive tail moment in single cell gel electrophoresis. CHO.1A2-BRN2E cells were treated with 2-aminoanthracene (2AA) during 24 hours. *: $p < 0.01$, $n = 50$

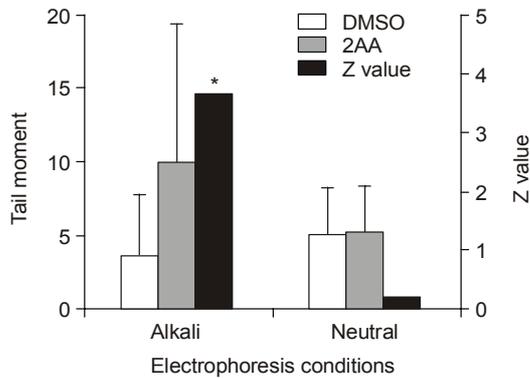


Fig. 4. Comparison of pH of electrophoresis buffer of Olive tail moment in single cell gel electrophoresis. CHO.1A2BRN2E cells were treated with 2-aminoanthracene (2AA) during 24 hours. *: $p < 0.01$, $n = 50$

기영동 시간에 따른 유의성 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3).

4) 전기영동용액 pH

300 mM sodium acetate, 0.1 M Tris (pH 8.5)의 중성용액에서는 DMSO 처리군과 2-AA 처리군의 tail 형성이 유사하게 나타났으나, 1 mM EDTA, 0.3 M NaOH (pH 13.5)의 알카리용액에서는 유의성을 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

Single cell gel electrophoresis (SCGE, Comet assay)는 짧은 시간에 적은 양의 시료를 이용하여 DNA 손상을 측정할 수 있는 방법으로 최근 그 응용이 매우 다양해지고 있다. 하지만 SCGE는 전기영동 조건에 따라 측정치의 변화가 심한 방법이다. 그럼에도 불구하고 SCGE의 실험적용 범위는 매우 다양하여, 산화작용에 의한 독성, 자외선에 의한 독성, 그리고 방사성 물질에 의한 손상 등을 대량으로 screening하는데 적용할 수 있으며,^{7,8)} 최근 중요성이 부각되고 있는 환경오염에 대한 screening으로서 동물을 채취하여 SCGE를 시행하면 환경오염물질에 대한 유전독성 유무를 판단하는 좋은 방법이 될 수도 있다.⁹⁾ 또한 유전독성분야와 관련하여 대사활성화와 *in vivo*에서 물질투여경로에 따른 dose-response relationship 등의 연구에도 적용 가능하여, 동물에 실험 물질을 다양한 경로를 통해 투여하고 짧은 시간 동안 노출시킨 후 세포를 분리하여 SCGE를 실시하면 *in vivo*에서 투여물질의 organ targeting에 대한 연구에도 응용이 가능한 방법이다.³⁾

CHO.1A2BRN2E 세포는 cytochrome p450 1A2, cytochrome p450 reductase 그리고 N-acetyltransferase 2 유전자를 lipofectamine을 이용해 Chinese hamster ovary 세포에 유전자전이 시킨 세포주이다.^{10~12)} CHO.1A2BRN2E 세포는 카페인 산화, heterocyclic amine, carcinogenic aryl amine 등의 hydroxylation 기능을 갖춘 대사활성능 세포주로서 독성물질의 대사활성화에 따른 독성을 측정하기 위하여 제조된 세포이다.¹³⁾ CHO.1A2BRN2E 세포를 이용하여 염색체이상시험, 소핵시험 등의 유전독성시험을 실시할 수 있는데 그 중에서도 SCGE가 가장 민감한 방법으로 나타나고 있다. 그런데 SCGE의 DNA tail 형성이 많을수록 손상도 측정은 용이해지지만, 용매대조군과 시료처리군 모두에서 DNA tail 형성이 증가하게 되면 데이터로서의 의미가 떨어지게 된다. 그러므로 용매대조군의 tail 형성을 억제하면서 시료처리군의 tail 형성을 증가시키기 위한 안정적인 전기영동 조건을 적용해야만 SCGE의 민감도를 높일 수

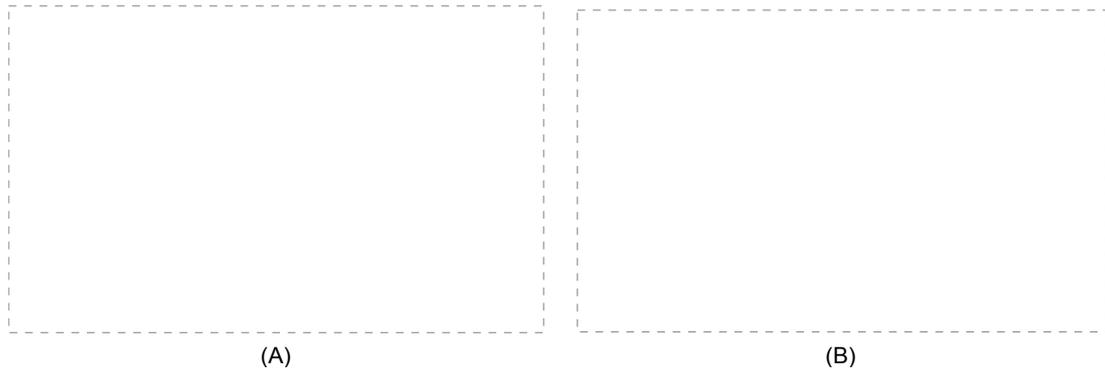


Fig. 5. Fluorescent microscopic image after staining of ethidium bromide in single cell gel electrophoresis captured with Komet 4™ software. (A) CHO.1A2BRN2E cells treated with 0.5% dimethyl sulfoxide during 24 hours. (B) CHO.1-A2BRN2E cells treated with 10 nM of 2-aminoanthracene during 24 hours.

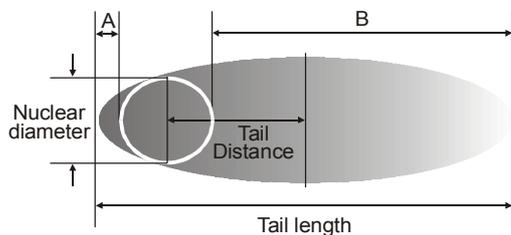


Fig. 6. The definition of parameter of single cell gel electrophoresis in Komet 4™ image analyzer. $A+B$ =DNA migration. Olive tail moment=Tail Distance X% DNA in Tail. Tail distance=Center position of tail-Center position of head.

있다. 이에 본 연구에서는 CHO.1A2BRN2E 세포에 DMSO와 2-AA를 투여한 후 SCGE 조건 중 DNA unwinding 시간, 전압과 전류, 전기영동 시간 그리고 전기영동 용액의 pH를 조절하여 CHO.1A2BRN2E 세포가 2-AA에 의한 DNA 손상도를 가장 잘 나타내도록 하는 조건을 설정하고자 하였다.

이 연구에서 유전자전이 세포주의 대사활성능을 측정하기 위하여 처리한 발암물질인 2-aminoanthracene (2-AA)은 염료를 합성하는데 쓰이는 산업용 물질로, 사람에게 원발성 간세포암과 피부암을 일으키는 물질이다.¹⁴⁾ 2-AA는 대사활성화 후 돌연변이성과 발암성을 나타내며 사람 adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 유전자좌에 frame-shift mutation을 일으키는 물질로 알려져 있다.¹⁵⁾

SCGE의 실험 결과에 대한 분석으로는 미국

Hamington 사의 Komet 4™을 이용하여 분석하였다. Komet 4™에서 측정하는 DNA 손상도는 ethidium bromide로 염색된 핵의 head 부위와 DNA 손상으로 파괴되어 전기영동에 따라 이동된 tail 부분의 길이 및 DNA 양에 따라 결정되며, 한 표본에서 50개의 DNA를 측정하여 tail moment로 나타내고 있다(Fig. 5, 6).¹⁶⁾ 이때 tail의 길이는 처리 물질의 농도에 비례하여 길이가 길어지지 않고 일정길이 이상에서는 더 이상 진행되지 않으므로, tail에 존재하는 DNA 양을 측정하는 것이 필수적인데 이것을 Olive tail moment라고 일컫는다.⁸⁾

DNA unwinding을 시간별로 변화시킨 경우 시간에 관계없이 대조군에 비해 Olive tail moment의 유의한 증가를 관찰할 수 있었으나, DMSO 처리군과 2-AA 처리군의 유의성 차이는 30분 처리에서 가장 높은 것으로 나타나 이어지는 실험에서는 DNA unwinding을 30분간 시행하였다. 전기영동시 전압과 전류는 전기영동용액의 양에 따라 변화되는데 전기영동용액이 많아질수록 전압과 전류는 낮아지게 된다. 전기영동 용액을 증가시켜 전압과 전류를 20 volt/215 mA, 15 volt/145 mA로 떨어뜨린 경우 처리군의 Olive tail moment 형성이 감소하였으나 전류를 300 mA로 고정시킨 경우 전압의 변화에 크게 영향받지 않았다. 전기영동시간을 길게 할수록 DNA tail의 길이는 길어지게 된다. 하지만 대조군의 DNA tail도 같이 길어지게 되므로 적절한 전기영동시간을 결

정해야 한다. 본 연구에서는 전기영동시간을 20분에서 40분까지 시행하였으나 전기영동시간에 따른 유의성의 변화는 관찰되지 않았다. SCGE 시행시 전기영동을 중성용액에서 시행하는 경우와 알칼리용액에서 시행하는 방법이 있다. 일반적으로 알칼리 방법이 단일가닥 DNA 손상을 반영하여, 두 가닥 DNA 손상을 감지할 수 있는 중성 pH 방법보다 더 민감한 결과를 얻을 수 있다고 알려져 있다. 본 연구에서도 2-AA가 CHO.1-A2BRN2E 세포에 미치는 DNA 손상은 중성용액에서는 측정하지 못하였고 알칼리용액에서 민감하게 측정되었다.

이상의 연구결과 2-AA가 CHO.1A2BRN2E 세포에 미치는 DNA 손상을 측정하기 위한 SCGE 조건은 unwinding 시간 30분, 25 volt/300 mA, 1 mM EDTA, 0.3M NaOH (pH 13.5)의 알칼리용액으로 20분 전기영동하는 것이 가장 민감한 것으로 나타났다.

참고 문헌

- 1) Schwets BA, Casciano DA. Genetic Toxicology: Impact on the Next Generation of Toxicology. *Environ Mol Mutagen* 1998; 31: 1-3.
- 2) ICH Expert Working Group. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals), 1995.
- 3) Ryu JC, Kim HJ, Seo YR, Kim KR. Single cell gel electrophoresis (comet assay) to detect DNA damage and apoptosis in cell level. *Environ Mutagen & Carcinogens* 1997; 17: 71-77.
- 4) Ostling O, Johanson KJ. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 345-356.
- 5) Singh PN, Michael TM, Raymond RT, Edward LS. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
- 6) Singh PN. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells In Pfeifer PG (eds) Technologies for detection of DNA damage and mutations, pp 3-24, New York and London, Plenum Press, 1996.
- 7) Mckelvey-Martin VJ, Green MHL, Schemerzer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collons A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993; 288: 47-63.
- 8) Olive PL, Garnet F, Judit PB. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphocyte cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993; 136: 130-136.
- 9) Ralph SM, Peters M, Pandrang R, Vrzoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ & Mol Mutagen* 1996; 28: 112-120.
- 10) Josephy PD, Evans DH, Parikh A, Guengerich FP. Metabolic activation of aromatic amine mutagens by simultaneous expression of human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and N-acetyltransferase in *Escherichia coli*. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 70-74.
- 11) Kranendonk M, Carreira F, Theisen P, Laires A, Fisher CW, Rueff J, Estabrook RW, Vermeulen NP. *Escherichia coli* MTC, a human NADPH P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 2A6, 3A4, or 3A5: catalytic activities and mutagenicity studies. *Mutat Res* 1999; 441: 73-83.
- 12) Shiota N, Kodama S, Inui H, Ohkawa H. Expression of human cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 as fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in transgenic tobacco plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 2025-2033.
- 13) Josephy PD, Evans DH, Williamson V, Henry T, Guengerich FP. Plasmid-mediated expression of the UmuDC mutagenesis proteins in an *Escherichia coli* strain engineered for human cytochrome P450 1A2-catalyzed activation of aromatic amines. *Mutat Res* 1999; 429: 199-208.
- 14) Mitchell CE, Henderson RF, McClellan RO. Distribution, retention, and fate of 2-aminoanthracene in rats after inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 75(1): 52-59.
- 15) Zhu Y, Bye S, Stambrook PJ, Tischfield JA. Aflatoxin B1, 2-aminoanthracene, and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced frameshift mutations in human APRT. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26(3): 234-239.
- 16) Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 1995; 336: 123-131.