

제 51차 KIST-KITA 협동공개강좌

진보된 안전성 평가와 환경호르몬 검출기법

2000. 5.

주최 한국과학기술연구원
 한국산업기술진흥협회

Cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei

류 재천, 김형태

한국과학기술연구원
독성연구팀

Tel: 958-5070, 5080

Fax: 958-5059

E-mail : 류 재천 ryujc@kist.re.kr

김 형태 hyungtae@kist.re.kr

1. 서론

In vitro mutagen/carcinogen-screening 실험방법은 잘 확립되어 있어 일반적으로 신속한 결과를 얻을 수 있다.

동물을 사용한 안전성과 비교하여 보다 짧은 기간이 소요되는 이런 시험법들은 비교적 신속한 결과를 제공하며 경제적으로 저렴하다고 할 수 있다. 짧은 기간이 소요되는 *in vitro* mammalian cytogenetic assay들 가운데, 염색체이상 시험법이 널리 이용되어지고 있다(Preston et al., 1981; Thompson, 1986; Ishidate et al., 1988). 최근 몇 년간, 염색체 이상을 탐지하는 포유동물 세포 배양에서 새로운 시험 기법을 확립하고 발전시키기 위한 노력을 기울여 왔다. 이들 중 Mutagens와 carcinogens에 의해 야기되어지는 염색체 이상을 탐지하기 위한 *in vitro* 소핵 시험법은 이런 과정 중의 하나이다. 소핵 시험법은 환경물질에 의해 야기되는 염색체 절단 및 spindle dysfunction의 평가를 위한 신속하고, 저렴하며 노동집약적 실험법이라고 할 수 있다.

2. 연구배경

Mutagenic carcinogens에 의한 염색체 이상을 측정하기 위한 소핵의 유효도는 *in vivo* bone marrow assay에서 광범위하게 발전되고 연구되어져 왔다 (Heddle et al., 1983; Ashby, 1986). *In vivo* bone marrow micronucleus assay의 단점은 실험에 사용되는 agent 또는 대사산물이 항상 bone marrow에 도달하는 것은 아닐 수 있다 (Heddle et al., 1983). 배양된 세포를 사용하는 실험은 세포가 시험물질에 직접적으로 더 고르게 노출되기 때문에 이러한 문제들을 피할 수 있다. 그러나 분열 중간기에 있는 세포(interphase cell)에서는 *in vitro* mammalian micronucleus assay를 이용하는 연구는 지금까지는 별로 없었다 (Heddle et al., 1983; Lasne et al., 1984; Dunn et al., 1987). Fenech and Morley (1985)는 *in vitro* 소핵 시험법으로써 human lymphocyte에서 cytokinesis-block 방법을 확립하였다.

3. 원리

이 방법은 actin의 polymerization에서 작용하는 cytochalasin B (CYB)를 이용하여 cytokinesis를 block 함으로서 나누어진 핵의 분화를 식별하는데 기초를 두고 있다. Cytochalasin B는 그 자체가 염색체 이상을 유발하지 않으며, 이 약물을 이용한 소

핵의 분석은 1차 분열 진행이 멈추어 있는 binucleated cell들로부터 확인할 수 있다 (Wakata and Sasaki, 1987). 현재까지 V79 Chinese hamster lung cell line을 이용한 시험법이 발전되어 왔다. 이 cell line을 배양함으로써 특별한 locus mutation, sister-chromatid exchange 그리고 chromosomal aberration의 분석에까지 널리 사용되어지고 있다 (Bradley et al., 1981; Hsie and Schenley, 1983; Kaina, 1985; Lake et al., 1982; Latt et al., 1981; Lasne et al., 1984; Nishi et al., 1984). V79 Chinese hamster cell line에서 in vitro 소핵 시험법에 대한 cytokinesis-block method의 확립은 동일한 cell line에서 분석되어지는 다양한 유전적 최종산물 (genetic endpoint) 들을 비교하는 데에 도움을 줄 것이며, 염색체 이상과 spindle dysfunction을 야기하는 물질을 신속히 탐지하는 일반적인 선별법과 염색체이상에 대한 메카니즘을 연구하는데 이용되어질 것이다.

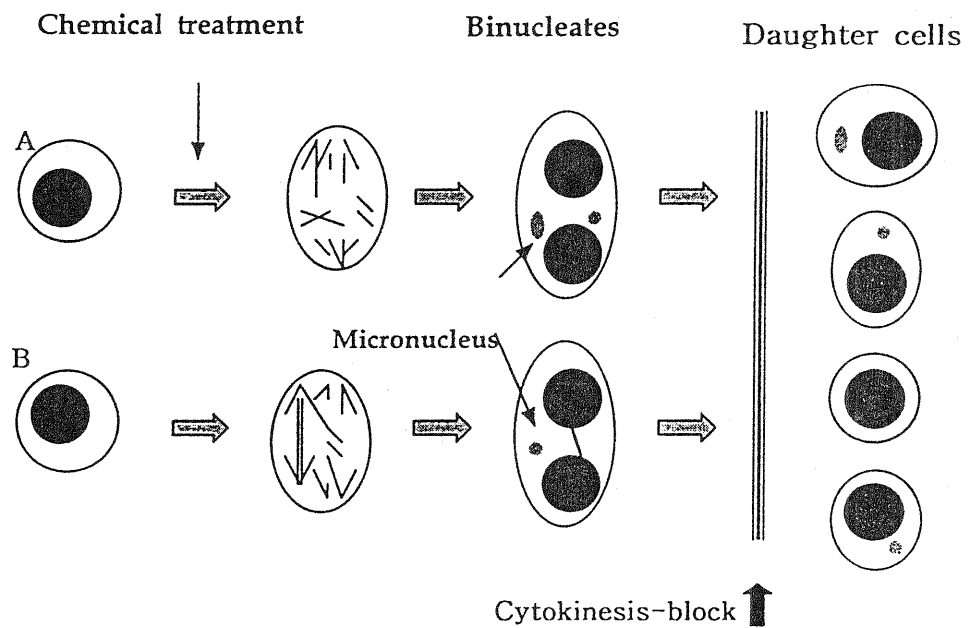


Fig 1. Schematic diagram illustrating the origin of micronuclei from acentric fragment and lagging whole chromosome in a dividing cell (A) and the origin of nucleoplasmic bridges from dicentric bridges in a binucleated cell (B).

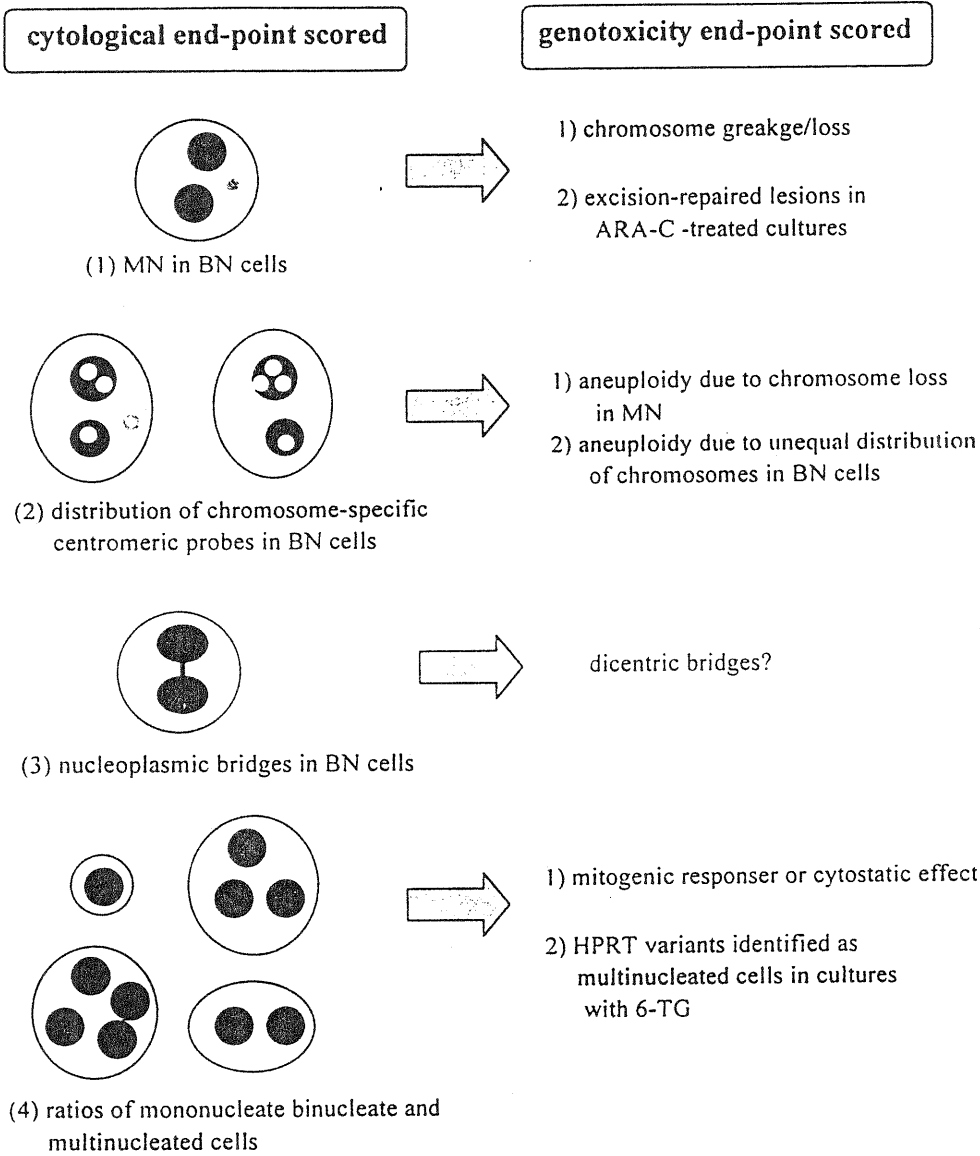
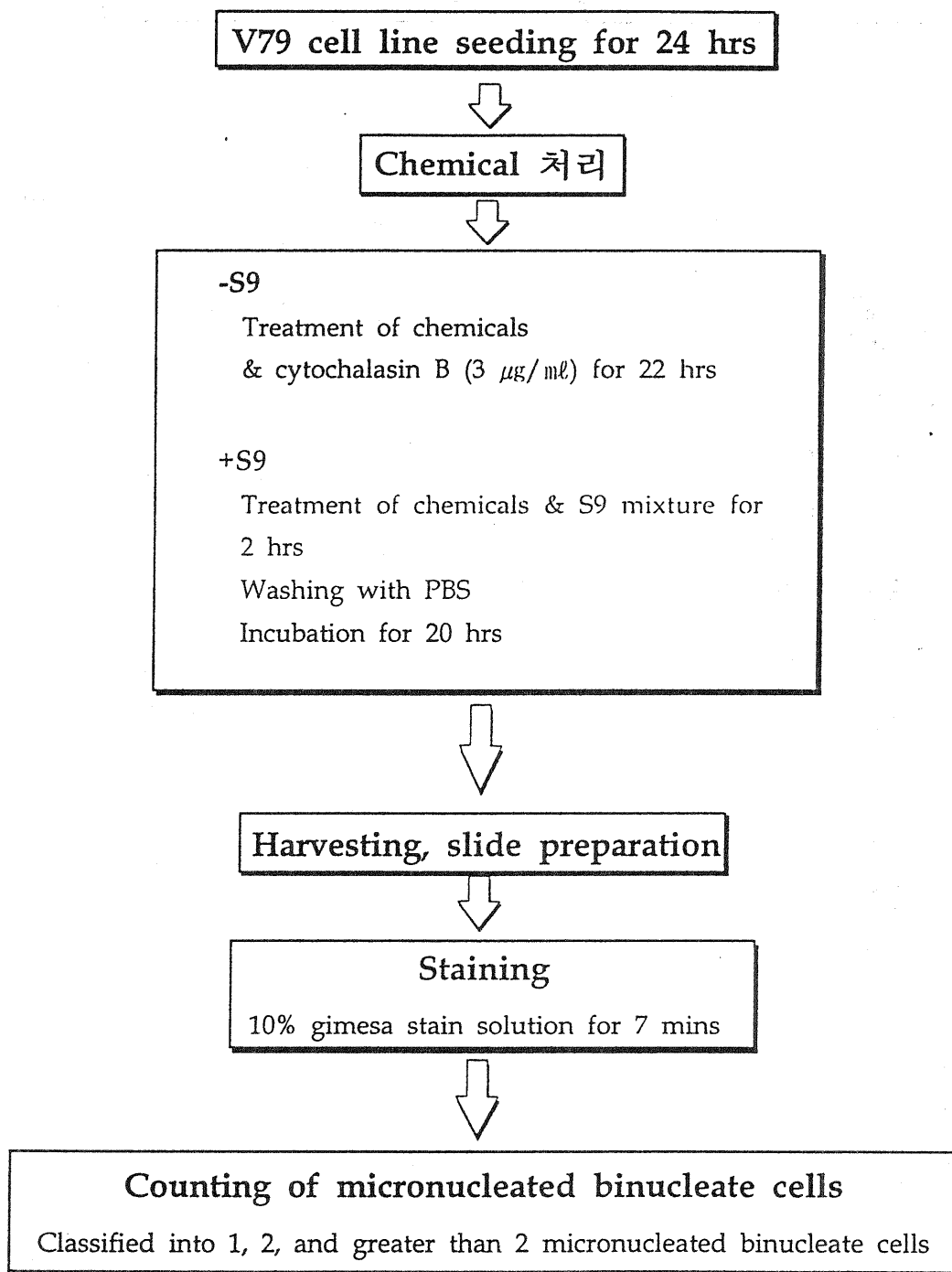


Fig 2. A schematic diagram illustrating the various end-points that can be scored using the cytokinesis-block technique.

4. 실험 방법



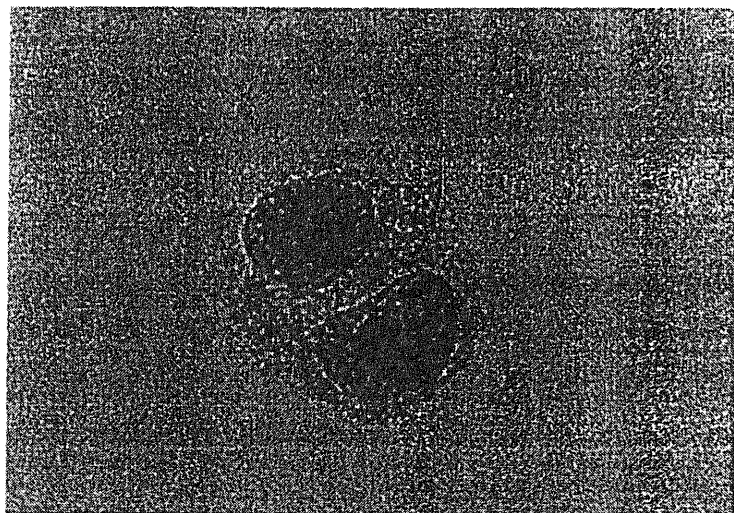


Fig. 3. Normal binucleate cells

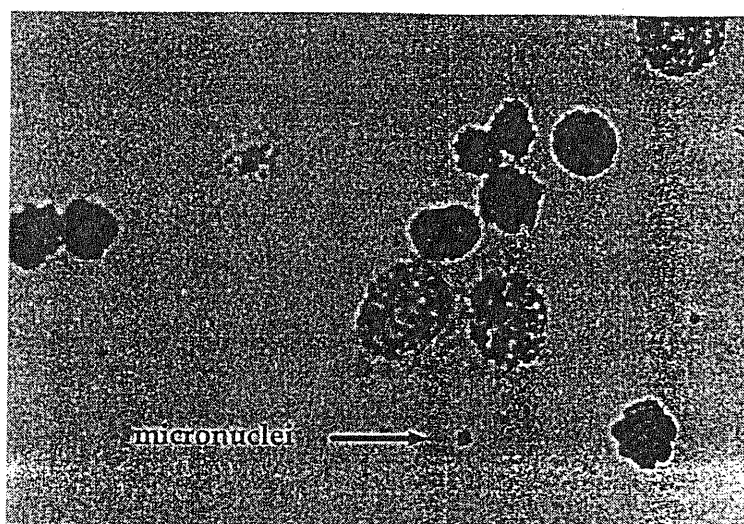


Fig. 4. Micronucleated binucleate cells

5. 참고문헌

1. Antoccia, A., Tanzarella, C., Modesti, D., and Degrassi, F. Cytokinesis-block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts. *Mutat. Res.* 287(1), 93-99. 1993
2. Benning, V., Depasse, F., Melcion, C., and Cordier, A. Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the in vivo micronucleus test in mouse splenocytes. *Mutat. Res.* 280(2), 137-142. 1992
3. Ellard, S. and Parry, J. M. A comparative study of the use of primary Chinese hamster liver cultures and genetically engineered immortal V79 Chinese hamster cell lines expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. *Toxicology* 82(1-3), 131-149. 1993
4. Jamali, M. and Trott, K. R. Increased micronucleus frequency in the progeny of irradiated Chinese hamster cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 69(3), 301-307. 1996
5. Jeremic, B., Sibamoto, J., and Abe, M. Significance of formation of micronuclei in SCC VII murine cells treated with various chemotherapeutic agents. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 124(7-8), 169-174. 1996
6. Jeremic, B., Shibamoto, Y., and Abe, M. Assessment of micronucleus induction in murine SCCVII cells treated with various anticancer agents. *Chemotherapy* 42(4), 266-272. 1996
7. Kalweit, S., Utesch, D., von der Hude W., and Madle, S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat. Res.* 439(2), 183-190. 1999
8. Kalweit, S., Utesch, D., von der, Hude W., and Madle, S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutat. Res.* 439(2), 183-190. 1999
9. Krishna, G., Kropko, M. L., and Theiss, J. C. Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 222(1), 63-69. 1989
10. Nesti, C., Trippi, F., Scarpato, R., Migliore, L., and Turchi, G. Cytokinesis-block micronucleus assay in primary human liver fibroblasts

- exposed to griseofulvin and mitomycin C. *Mutagenesis* 15(2), 143-147. 2000
11. Ren, L., Yang, J. P., and Zhang, H. X. Use of the cytokinesis-block micronucleus method in mouse splenocytes. *Mutat. Res.* 262(2), 119-124. 1991
 12. Surralles, J., Antoccia, A., Creus, A., Degrassi, F., Peris, F., Tanzarella, C., Xamena, N., and Marcos, R. The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. Results from two laboratories. *Mutagenesis* 9(4), 347-353. 1994
 13. Wakata, A. and Sasaki, M. S. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat. Res.* 190(1), 51-57. 1987
 14. Whong, W. Z., Stewart, J. D., and Ong, T. Use of rat primary lung cells for studying genotoxicity with the sister-chromatid exchange and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 241(1), 7-13. 1990