

Recombinant fluorescent mammalian cells As Toxicity Biosensors

김은진, 이영, 구만복*

광주과학기술원 환경공학과

전화 (062) 970-2469, Fax (062) 970-2434, *mbgu@kjist.ac.kr

Abstract

The recombinant fluorescent chinese hamster ovary (CHO) cell line was developed and optimized through this study for biomonitoring system. This cell line, called KFC-A10, contains recombinant plasmid(pKCFG) constructed in this study for detecting toxic conditions (Mitomycin C, EDCs, γ -ray, etc.). It is known that c-Fos is involved in proliferation and differentiation of the signal transduction and overexpression of this gene can lead cell to death under the toxic conditions including apoptosis status. Therefore, pKCFG which has the *c-fosSRE::GFP* is induced by toxic chemicals, especially DNA damage agents and apoptotic chemicals, and produces green fluorescence protein(GFP) under these toxic conditions. Through the characterization of KFC-A10 using fluorescent assays of GFP, it was shown that KFC-A10 cell line had a manifest GFP expression pattern due to various toxicants especially mitomycin C, γ -ray and bisphenol A. Therefore this study proved the possibility of using GFP as a reporter for detecting various toxicants

서론

문명의 발달은 인간에게 많은 이익과 함께 환경오염이라는 심각한 문제를 안겨왔다. 현재 환경오염문제를 해결하기 위한 주된 연구방법은 청정 기술이다. 물론 오염된 환경을 복구하는 것도 시급하지만 이보다 더욱 중요한 것은 미리 예방하는 방법이며 환경오염 물질을 빠르게 탐지하고 오염도 및 정확도를 측정하는 환경모니터링 방법 연구는 이 분야의 새로운 접근 방법이며 적용 분야 또한 다양하다. 특히 동물세포를 이용한 바이오 모니터링 시스템은 인간과 유연관계가 멀어 직접적인 결과 적용에 한계가 있는 미생물이 아닌 인간에게 더 가까운 포유동물 세포를 이용함으로써 인해 환경 유해성에 반응하는 민감도를 높일 수 있다. 이러한 목적 하에 본 연구에서는 환경 오염물질에 반응하는 재조합 동물세포를 이용해 여러 환경오염 물질들의 반응 특이성을 확인했다. 이에 이용된 원리는 Apoptosis라는 현상이다. 이

는 동물세포가 유해한 환경에 처했을 때 주변으로부터 개체를 보호하기 위해 자신의 일부 세포를 스스로 죽이는 세포자동사멸현상을 의미한다. 본 연구에서는 이에 관여하는 유전자인 c-fos를 이용했는데 이는 과다 발현시 세포 자동 사멸현상 즉 apoptosis를 일으키는 것으로 알려지고 있다.⁽¹⁻²⁾ 따라서 c-fosSRE를 promoter를 형광 단백질 발현 유전자인 green fluorescence protein (GFP)와 융합시킨 재조합 유전자를 제조한 후 동물세포에 삽입시켜 환경 유해성 모니터링을 위한 재조합 동물 세포를 만들었으며 (KFC-A10) 이를 이용해 apoptosis 등을 일으키며 유해한 물질인 mitomycin C(MMC), γ -ray, bisphenol A(BPA) 등을⁽²⁻⁸⁾ 테스트해 보았다.

재료 및 방법

본 실험에서는 독성 모니터링을 위한 동물세포는 인간의 유전자인 c-fosSRE의 promoter와 형광 유전자(GFP)를 융합시킨 재조합 유전자 pKCFG를 삽입시킨 KFC-A10을 이용했고 세포성장 배지는 4% FBS(Fetal Bovine Serum)의 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)를 사용했으며 hemacytometer와 trypan blue를 이용해 세포 성장률과 생존율을 측정했고 microplate fluorescence reader를 이용해 ex485/em530에서 형광도를 측정했다. 독성측정 방법은 1×10^5 cells/ml의 세포농도로 분주 후 18-24시간 후에 2×10^5 cells/ml의 세포 농도에서 각각의 독성유도물질인 MMC, BPA, γ -ray를 노출시킨 후 12-16시간 간격으로 세포의 성장률과 형광도의 증가를 측정했다.

결과 및 고찰

KFC-A10의 각 독성 물질에 대한 반응은 예상대로 독성물질의 증가에 따라 그 빛의 증가 경향도 뚜렷하게 나타났다. MMC의 경우 1ppb 정도에서도 세포 성장저해와 함께 빛의 증가를 관찰할 수 있었으며 50ppb를 경계로 현저한 성장저해와 빛의 증가를 볼 수 있었다. 이것은 최저 탐지 농도가 5ppb인 미생물과 비교해 볼 때 그 민감도 면에서 향상됨을 알 수 있었다. (Fig. 1) BPA의 경우도 낮은 농도에서는 성장촉진과 함께 빛의 증가도 관찰되었지만 이 역시 50ppb를 경계로 높은 농도에서는 높은 빛의 강도와 성장저해를 관찰 할 수 있었다.(Fig. 2) 이 결과 또한 2ppm이 최저 탐지농도인 미생물에 비해 더욱 민감한 것을 알 수 있었다. 낮은 농도에서의 세포 성장 촉진현상은 BPA가 환경호르몬으로 알려진 것을 생각할 때 호르몬 교란 현상을 일으키는 것으로 사료된다. 이는 농도에 비례해 세포 독성으로 인한 개체수 감소만을 볼 수 있는 미생물에 비해 고등동물에서 나타나는 호르몬 교란 현상까지 탐지할 수 있다는 것을 시사한다. γ -ray도 그 강도가 증가할수록 그 성장

저해와 빛의 증가를 관찰할 수 있었다.(data not shown)

KFC-A10 response in attachment culture with 4% serum concentration media

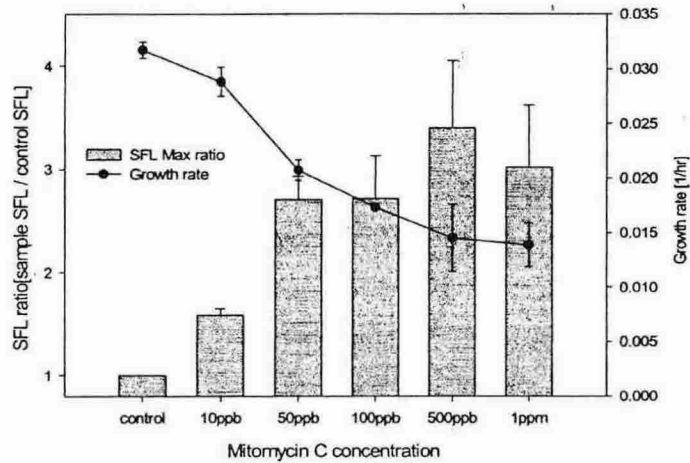


Fig. 1 Mitomycin C 에 대한 KFC-A10의 반응성

KFC-A10 response comparison for Bisphenol A by growth rate and SFL ratio

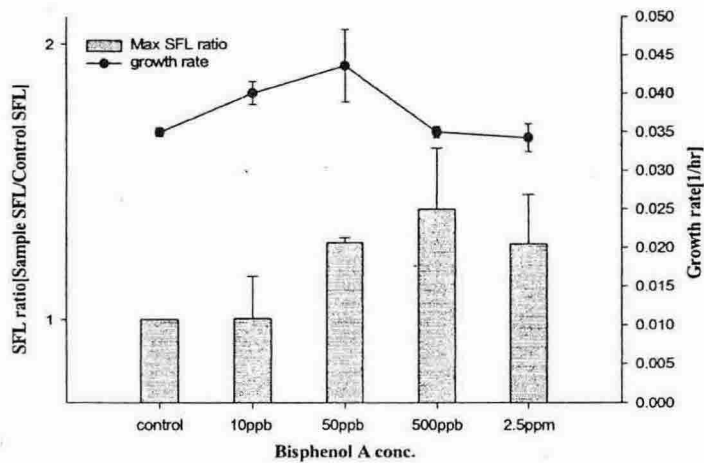


Fig. 2 Bisphenol A에 대한 KFC-A10의 반응성

요약

본 연구를 통해 환경 유해성을 평가하기 위한 동물세포를 개발했고 이를 이용한 모니터링 방법 연구와 다양한 독성 물질에 대한 반응성을 확인했다. 개발된 독성 모니터링 동물세포(KFC-A10)는 각 독성 물질에 따라 빛의 발현 양이 증가하는 성향을 가지므로 이번 실험에서 사용된 MMC, BPA, γ -ray에 농도 의존적으로 빛의 양이 증가함을 관찰할 수 있었다. 특히 BPA의 경우는 환경호르몬으로 알려진 바그 estrogenic 효과를 관찰할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 환경모니터링 신기술 센터(ADEMRC)의 지원과 함께 99년도 원자력 기초연구사업의 부분지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. Kong, A. T., S. Mandlekar, R. Yu, W. Lei, and A. Fasanmande. Pharmacodynamics and toxicodynamics of drug action: signaling in cell survival and cell death.(1999) Pharm. Res.16:790-798.
2. Preston, G. A., T. T. Lyon, Y. Yin, J. E. Lang, G. Solomon, L. Annab, D. G. Srinivasan, D. A. Alcorta, and J. C. Barrett. Induction of apoptosis by c-Fos protein.(1996) Mol. Cell. Biol. 16:211-218.
3. Choi, H. S., and D. D. Moore. Induction of *c-fos* and *c-jun* gene expression by phenolic antioxidants.(1993) Mol. Endo. 7:1596-1602.
4. Inada, K., S. Okada, J. Phuchareon, M. Hatano, T. Sugimoto, H. Moriya, and T. Tokuhisa. c-Fos induces apoptosis in germinal center B cells.(1998) J. Immunol. 161:3853-3861.
5. Satoh, K., Y. Ida, M. Tomioka, K. Shiohara, H. Sakagami, and S. Fujisawa. Interaction between antioxidants and hydroquinone/bisphenol.1(1999) Anticancer Res. 19:5457-5462.
6. Ballester, A., C. Perez, P. Aller, and F. Mata. Differentiation of U-937 promonocytic cells with mitomycin C of cis-diamminedichloroplatinumII.(1996) Int. J. Cancer. 65:791-795.
7. Treisman, R. Journey to the surface of the cell: Fos regulated transcriptional activators.(1995) Curr. Opin. Genet. Dev. 4:96-101.
8. Holt, J. T., T. V. Gopal, A.D. Moulton, and A. W. Nienhuis. Inducible production of *c-fos* antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation.(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:4794-4798.