

연구자료

독성96-1-13

CHO 세포에서 중금속의 유전독성기전에 관한 연구

1996



한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 “CHO 세포에서 중금속의 유전독성기전에 관한 연구”의 연구보고서로 제출합니다.

1996년 12월 31일

제출자 : 산업보건연구원장 문 영 한

연구책임자 : 서울대학교 보건대학원 정 해 원

공동연구자 : 산업보건연구원 책임연구원 유 일 재

선임연구원 맹 승 희

서울대학교 보건대학원 기 혜 성

서울대학교 의과대학 박 영 철

목 차

I. ABSTRACT	1
II. 서 론.....	2
III. 재료 및 방법.....	5
1. 세포배양	5
2. 세포 생존률	5
3. HGPRT 점 돌연변이 유발	5
4. 염색체 분석	5
5. 배양추출물의 분리	6
6. 자매염색체 교환빈도	6
7. 지질과산화 측정	6
IV. 결 과.....	7
1. 세포 생존률	7
1) 비소에 의한 세포 생존률	7
2) 크롬에 의한 세포 생존률	8
2. HGPRT 점 돌연변이	8
3. 염색체 이상	9
1) 비소에 의한 염색체 이상	9
2) 크롬에 의한 염색체 이상	9

4. 배양추출물에 의한 자매염색체 교환	9
1) 비소의 배양추출물에 의한 자매염색체 교환	9
2) 크롬의 배양추출물에 의한 자매염색체 교환	15
5. 지질과산화	16
1) 비소에 의한 지질과산화	16
2) 크롬에 의한 지질과산화	16
6. 셀레늄의 중금속에 대한 보호효과	18
1) 염색체 이상	18
2) 자매염색체 교환	18
3) 지질과산화	20
 V. 고 찰	 24
 VI. 요약 및 결론	 31
 VII. 참고문헌	 32

CHO 세포에서 중금속의 세포독성기전

정해원, 기혜성, 박영철*, 맹승희**, 유일재**

서울대학교 보건대학원, *서울대학교 의과대학, **산업보건연구원

Mechanism of Metal-Induced Cytotoxicity in CHO Cells

ABSTRACT : This study was carried out to examine the mechanism of metal cytotoxicity through several *in vitro* test systems. Dose-dependent decrease of cell survival by Arsenic or Chromium was observed by colony forming assay. Arsenic was weak mutagenic in inducing HGPRT point mutation in CHO cells. The frequency of chromosomal aberrations increased in a dose-dependent manner and the most frequent type of chromosomal aberrations induced by Arsenic or Chromium were chromatid type deletions. Ultrafiltrates of culture media from CHO cells treated with Arsenic or Chromium induced sister chromatid exchanges(SCE) in CHO cells and they were also able to induce lipid peroxidation in CHO cells. Selenium decreased the frequency of chromosomal aberrations and lipid peroxidation induced by Arsenic. Selenium also decreased the frequency of SCE by ultrafiltrates of culture media from CHO cell treated with Arsenic or Chromium. The results suggested that the ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Arsenic or Chromium contain clastogenic factor(CF) and lipid peroxidation might be involved in the formation of CF. It was suggested that indirect effect through formation of CF as well as direct effect on DNA might contribute to the cytotoxicity of Chromium.

Keywords : Metal cytotoxicity, Cell survival, Arsenic, Chromium, HGPRT point mutation, Chromosomal aberrations, CF, Sister chromatid exchanges (SCE), Lipid peroxidation, Selenium

서론

많은 중금속들이 돌연변이 유발원 및 발암 유발원으로 작용한다는 사실이 미생물 및 포유동물세포를 이용한 방법이나 일부 역학적 연구에서 확인되고 있지만 이들 중금속들의 작용기전은 아직까지 확실히 밝혀진 바는 없다. 최근의 연구에서 대부분의 금속이온이 DNA와 adduct를 형성하지 않는다는 (Klein *et al.*, 1991; Krasprzak, 1991) 사실이 밝혀져서, 금속에 의한 돌연변이 유발과정에는 반응성이 큰 산소라디칼의 생성이 관여되리라는 것을 시사해 주고 있다. 산소라디칼은 노화 과정이나 암유발과정에서 중요한 역할을 한다는 것이 널리 알려져 있으며 (Ames, 1983; Joenje, 1989; Cerrutti, 1985), 많은 화학적 요인이나 물리적 요인에 의한 세포의 상해효과를 설명해 주고 있다. 반응성이 큰 산소 (Reactive oxygen species: ROS)가 DNA를 포함한 세포내 분자에 대한 상해효과는 잘 알려져 있는데, ROS는 DNA의 여러 위치에 상해를 주기 때문에 특정 부위의 상해와 특정 돌연변이와 연관을 짓는 것이 매우 어렵지만 화학적 발암물질은 DNA에 제한된 위치에 상해를 주기 때문에 종양과 돌연변이 된 유전자와 연관을 시키기가 용이하다. 중금속에 의한 돌연변이 유발과정에 ROS가 관여하는 것을 확인하기 위해 정제된 DNA에 철 (McBritge, 1991) 및 구리 (Tkeshelashvili, 1991)를 처리하였을 때 나타나는 유전자 돌연변이의 형태가 각 중금속이온에 따라 달리 나타났으며 산소라디칼 제거제를 처리하였을 때 돌연변이가 적게 나타나는 것으로 미루어, 금속에 의해 생성된 ROS가 돌연변이 유발과정에 관여되는 것을 알수 있었다. Huang 등(1994)은 CHO 세포에 Ni를 처리하게 되면 산화물(oxidants)의 양이 증가하고 H₂O₂ 및 지질과산화(lipid peroxidation)가 유발된다고 보고하여 ROS가 Ni의 발암과정에 관여되어 있으리라는 것을 시사하였다.

비소는 발암원으로 알려져 있지만 (IARC, 1987) 동물실험에서의 발암성은 명확히 확인되지 않았는데 이러한 차이는 세포의 산화적 손상 (oxidative damage)에 대하여 보호작용을 하는 glutathione peroxidase와 catalase의 활성이 동물세포가 사람 세포보다 각각 3배 및 8배나 더 크기 때문에 전반적인 비소에 의한 손상 가능성이 사람에서 10배나 크다는 것으로 설명될 수 있으며 (Lee & Ho, 1994) 또한 이 사실은 비소의 세포독성이 자유라디칼에 의한다는 것을 시사해 주고 있다.

크롬은 인간 및 동물 모두에게서 발암물질임이 알려져 있는데 3가크롬:Cr(III)은

IARC (1980,1987)에서 인간을 대상으로한 불충분한 발암성의 증거로 Group 3 으로 분류된 반면 6가크롬 Cr(VI)은 많은 역학적 연구들의 증거를 토대로 하여 Group 1 으로 분류되었다. Cr(III)은 세포막을 쉽게 통과 못하기 때문에 위장관, 호흡기계의 흡수가 거의 되지 못하는 반면, Cr(VI)은 구강, 호흡기, 피부를 통해 흡수가 가능하며 흡수된 Cr(VI)은 세포내에 함유된 크롬의 약 90% 정도를 차지하는 Cr(III)형태로 빠르게 환원된다고 알려져 있다. 그러므로 유전적 물질에 결합하는 궁극적인 돌연변이원은 Cr(VI)으로부터 세포내에서 생성되어진 Cr(III)으로 추측되어진다. Cr(VI)에 비해 Cr(III)이 돌연변이성 및 발암성의 자료가 부족한 이유로서 Cr(III)의 세포내 흡수(cellular uptake) 능력 부족을 들 수 있는데 이러한 크롬의 복잡한 세포내 대사과정 때문에 크롬의 유전적 독성의 기전은 아직도 완전히 이해되지 못한 실정이다 (Leonard & Lauwerys, 1980; De Flora *et al.*, 1990).

항산화제 (antioxidant)로서 작용하는 셀레늄 (Selenium)은 자유라디칼의 공격에 의해 세포막으로부터 생성된 유독한 과산화물들의 환원에 관여하는 효소인 3 glutathione peroxidase의 필수적인 촉매이다 (Ching K. Chow, 1979). Clement 등 (1990)은 셀레늄은 암억제의 기능을 나타내었다고 보고하였으며 Schrauzer와 Sacher (1994)는 바이러스나 세균에 의한 감염 및 염증 반응 이후에 식세포작용에 의해서도 많은 자유라디칼들이 생성된다는 사실이 알려진 이후 현재는 HIV에 감염된 환자들을 대상으로 한 연구에서 셀레늄의 식이요법으로 점차 AIDS 증상이 호전되었고 그 진행경과가 지연되었다는 결과를 보고하였다. 또 Mary 등 (1992)은 카드뮴, 수은, 구리, 비소 등의 금속으로 인한 세포독성을 셀레늄이 감소시킨다는 보고가 있으나 아직까지 그 정확한 기전은 밝혀져있지 않은 실정이라고 하였다. 따라서 셀레늄에 의하여 비소 및 크롬의 독성이 완화된다면 이 또한 비소 및 크롬으로 인한 세포의 산화적 손상기전을 증명할 수 있다. 비소 뿐만 아니라 중금속 전반에 관한 세포의 산화적 손상 기전에 관하여는 아직 구체적으로 알려져있지 않은 실정이라서 앞으로 이 분야와 관련된 많은 연구가 필요하다 (Lee & Ho, 1994).

중금속에 의한 염색체 이상유발이나 DNA절단 등이 직접 DNA에 작용함으로서 나타나지 않고, 산소라디칼이 관여된 간접적인 작용으로 나타나게 되면, Emerit 등이 제안한 clastogenic Factor (CF) 가 존재할 가능성이 있다. 외부이물질이 세포에 손상을 줄때 DNA 이외의 물질과 반응하여 2차적인 중간 매개물을 형성하고 이 매개물에 의한 손해가 염색체 이상으로 나타날때 이를 CF라 부른다 (Emerit, 1993).

즉 DNA 이외의 물질을 표적으로 하여 세포막에 의해 매개된 중간산물이 세포로부터 유리되는 이 물질은 핵으로 확산되어 DNA에 상해를 주거나 세포 밖으로 확산되어 주위의 세포나 조직에 상해를 주게 된다. 이 물질은 세포내 배양액으로부터 추출될 수 있으며 다른 세포에 처리하게 되면 염색체 이상을 일으키게 된다. DNA와 covalent adduct을 형성하진 않지만 DNA에 손상을 주는 것으로 알려진 PMA (phorbolmyristate-acetate) (Emerit, 1981)나 Aflatoxin B₁ (Amstad *et al.*, 1984), 그리고 이온화 방사선같이 DNA에 직접손상을 주는 경우에도 CF가 존재함이 확인되었다. 또한 Chung 과 Kim(1995)은 석면에 의한 염색체 이상유발이 세포막이 매개하는 간접작용에 의한 것임을 세포배양액으로 부터 CF를 분리하여 확인한바있다. CF는 아직 그 생화학적 특성이 밝혀지지는 않고 있지만 분자량이 1,000-10,000 dalton이라고 알려져 있다 (Emerit & Cerutti, 1983). 비소 및 크롬에 의한 세포독성에 산소자유라디칼이 관여하는 것을 확인하기 위해 CF를 분석한 연구는 확인된적이 없다. 이에 본 연구는 비소 및 크롬에 의한 세포독성기전을 구명하기위해서 시행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양

CHO K₁ 세포를 10% 우태아 혈청이 포함된 McCoy's 5A 배지에서 5% CO₂가 공급되는 상온기에 배양하면서 실험재료로 사용하였다.

2. 세포 생존률

CHO 세포에 비소(Sodium arsenite) 및 크롬(Potassium dichromate)을 10, 20, 30, 50, 및 100 μ M의 농도로 처리한 후 3시간 후에 PBS 용액으로 2번 세척하였다. 그리고 15시간을 추가배양한 후에 각 농도군마다 200개의 세포를 McCoy's 5A 배양액이 들어 있는 petri dish에 심어 7-9일 동안 배양하였다. 생존률은 농도별로 비소가 처리된 군에서의 colony 수와 대조군의 colony수에 대한 비로서 계산하였다.

3. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT) 결핍변이 유발

CHO 세포에 비소를 10, 30, 40, 50, 및 100 μ M의 농도로 처리한 후 배양한다음 세척한 후 돌연변이 형질발현기간인 7-9일 동안 2-3일 간격으로 계대배양하였다. 6-thioguanine과 dialysed serum이 포함된 배지에 각 농도당 6개의 petri dish에 1×10^5 개의 세포를 심은 후 8일간 배양하여 나타나는 colony수를 측정하였다. 이때 각 농도별로 처리된 세포 200개씩을 3개의 petri dish에 심어 plating efficiency를 구한 후 돌연변이 빈도를 구할때 이용하였다.

4. 염색체 분석

CHO 세포에 비소를 10, 20, 30, 40, 및 50 μ M의 농도로 그리고 크롬을 5, 10, 및 20 μ M의 농도로 처리하고 3시간 후에 PBS 용액으로 2번 세척하고 13시간 추가배

양후 colcemid를 처리하고 2시간 후에 저장액(0.075M KCl)을 거쳐 Methanol을 이용하여 5분간 전고정하고 다시 carnoy 고정액(Methanol:Acetic acid 3:1)으로 고정한다음 Giemsa로 염색하는 일반적인 방법에 의해 염색체 표본을 작성하였다. 또한 50 μ M 농도의 셀레늄(Sodium selenite)을 각각 비소와 동시에 처리한 경우, 비소 처리 3시간 후에 처리한 경우, colcemid 투여시에 같이 처리한 경우의 염색체 표본을 작성하여 셀레늄 처리시기에 따른 효과를 측정하였다.

5. 배양추출물의 분리

CHO 세포에 비소를 10 및 20 μ M의 농도로 그리고 크롬을 10 μ M의 농도로 처리하고 18시간 배양한 후 배양액을 수거하여 150g에서 6분간 원심분리를 하였다. 상층액을 취해 Diaflo Ultrafiltration을 시행하여 YM 10 filter 및 YM 2 filter를 이용하여 분자량 1,000-10,000 dalton사이의 물질을 40배 농도(500 μ l)로 농축추출하였다.

6. 자매염색체 교환빈도(Sister Chromatid Exchange : SCE)

CHO 세포에 비소 및 크롬을 처리하여 얻은 배양추출물을 새로운 CHO 세포에 처리하고 10 μ M의 5-Bromo-2-deoxyuridine에 36시간 노출시킨 후 perry and wolff(1974)의 방법에 준해 염색한 후 50개의 세포를 임의로 선택하여 관찰하였다. 또한 비소(20 μ M) 및 크롬(10 μ M)과 셀레늄(30 μ M, 50 μ M)을 동시에 처리하여 얻은 배양추출물에 의한 자매염색체 교환빈도를 조사하였다.

7. 지질과산화 측정

CHO 세포에 비소 및 크롬을 5, 10, 20, 및 30 μ M의 농도로 처리하여 배양한 후 세포를 수거하여 homogenizer로 분쇄한 후 Thiobarbituric acid(TBA)와 1:1로 섞은 후 100°C에서 15분 처리하고 800g에서 10분간 원심분리한다음 상층액을 취해 535nm 에서 흡광도를 구해 생성된 Malondialdehyde(MDA) 양으로서 지질과산화를 측정하였다. 또한 비소(20 μ M)와 셀레늄(50 μ M)을 같이 처리한 후의 지질과산화 정도를 측정하였다.

결 과

1. 세포 생존률

1) 비소에 의한 세포 생존률

CHO 세포에 비소를 농도별로 처리한 후 세포 생존률을 구하였다. 비소에 의한 세포생존률은 표 1과 같은데 30 μ M에서 50%가 생존하였으며 100 μ M에서는 6.2%만이 생존하였다 ($p < 0.01$).

Table 1. Cell Survival Rate by Arsenic in Colony Forming Assay

Dose of Arsenic Treated(μ M)	No. of cells (Mean $\pm$ S.D.)	Relative Survival Rate(%)
0	193.3 $\pm$ 3.8	100.0
10	173.0 $\pm$ 9.7	89.5
20	113.7 $\pm$ 10.5	58.8
30	97.0 $\pm$ 13.0	50.2
50	38.0 $\pm$ 3.5	19.7
100	12.0 $\pm$ 3.0	6.2

$$\text{Relative Survival Rate(\%)} = \frac{\text{No. of cells in treated plates}}{\text{No. of cells in control plates}}$$

2) 크롬에 의한 세포 생존률

CHO 세포에 크롬을 농도별로 처리한후 세포 생존률을 구하였는데(표 2) 크롬의 농도가 증가함에 따라 세포 생존률이 감소하였다 ($p<0.01$).

Table 2. Cell Survival Rate by Chromium in Colony Forming Assay

Dose of Chromium Treated(μ M)	No. of cells (Mean $\pm$ S.D.)	Relative Survival Rate(%)
0	195.3 $\pm$ 1.9	100.0
10	190.2 $\pm$ 2.4	97.4
20	167.8 $\pm$ 6.0	85.9
30	120.3 $\pm$ 0.7	61.6
50	78.5 $\pm$ 4.2	40.2
100	11.1 $\pm$ 0.7	5.7

$$\text{Relative Survival Rate(\%)} = \frac{\text{No. of cells in treated plates}}{\text{No. of cells in control plates}}$$

2. HGPRT 점돌연변이

CHO 세포에 비소를 농도별로 처리한 후 HGPRT 좌위에 대한 점 돌연변이 유 발을 관찰하였다 (표 3). 1×10^5 개 세포당 Mutant frequency(MF)는 대조군의 0.31 보다 30 μ M에서는 1.44, 40 μ M에서는 1.33, 50 μ M에서는 0.91로 약간 증가되었으나 100 μ M에서는 0.41로 다시 감소되어 양-반응 관계가 보이지 않았으며 비소에 의한 HGPRT 점 돌연변이는 약하게 유발되었다고 볼 수 있겠다.

3. 염색체 이상

1) 비소에 의한 염색체 이상

CHO 세포의 G₁시기에 비소를 농도별로 처리한 후 염색체 이상을 나타내는 세포 비율을 구하였다(표 4). 처리한 비소의 농도가 증가함에 따라 염색체 이상이 증가되는 경향이 나타났다 ($p < 0.01$). 비소에 의해 유발되는 염색체 이상은 농도별로 보았을 때 염색체형(Chromosome type)은 약간 증가된 반면 염색분체형(Chromatid type)의 이상이 크게 증가되었으며 주로 결실형(Deletion)이 많았으나 특이하게 교환형(Exchange)도 증가되었다.

2) 크롬에 의한 염색체 이상

CHO 세포의 G₁시기에 크롬을 농도별로 처리한후의 염색체 이상빈도는 표 5와 같다. 처리한 크롬의 농도가 증가함에 따라 염색체 이상이 증가되는 경향이 나타났다 ($p < 0.01$). 염색분체형의 이상이 더 많이 나타났으며 염색체형 이상 중 교환형 이상 빈도가 두드러지게 증가한 점이 특이하다.

4. 배양추출물에 의한 자매염색체 교환

1) 비소의 배양추출물에 의한 자매염색체 교환

CHO 세포에 비소를 10, 20 μ M의 농도로 처리하여 18시간을 배양시킨 후 분리해낸 배양추출물을 다시 새로운 CHO 세포에 처리하여 36시간 배양 후에 자매염색체 교환빈도를 비교하였다 (표 6, 그림 1). 배양액(Media)의 배양추출물은 대조군의 배양추출물의 세포당 자매염색체 교환빈도와 비슷한 수준을 나타냄으로써 배양액 자체에 의한 영향은 배제할 수 있었으며 세포에 비소를 10, 20 μ M의 농도로 처리하여 분리한 배양추출물에 의한 세포당 자매염색체 교환빈도는 대조군의 7.20에 비교하여 각각 10.24, 10.46으로 증가하였으며 모두 통계적으로 유의하였다($p < 0.01$). 그러나 비소 자체에 의한 영향 유무 여부를 보기 위하여 배양액과 비소 10, 20 μ M의 농도만을 처리하고 분리한 배양액에 의해서도 세포당 자매염색체 교환빈도는 대조

Table 3. Mutant Frequency(MF) at Different Doses of Arsenic

Treatment	Dose (μ M)	No. of cells plated (P_m)	No. of mutant colonies (m)	No. of cells plated (P_c)	No. of colonies (c)	Absolute cloning efficiency(CE)	Mutant frequency / 10^5 (MF / 10^5)
Control	0	10^5	0.22	200	143	0.715	0.31
Arsenic	10	10^5	0.22	200	129	0.645	0.34
	30	10^5	0.67	200	93	0.465	1.44
	40	10^5	0.50	200	75	0.375	1.33
	50	10^5	0.39	200	86	0.430	0.91
	100	10^5	0.17	200	83	0.415	0.41

* Absolute CE = c / P_c

* MF / 10^5 = m / $P_m \times$ Absolute CE

Table 4. The Frequency of Chromosome Aberration Induced by Arsenic

Dose of Arsenic Treated (μ M)	No. of Cells Counted	Percent of Aberration Cells	Structural Aberration / 100 cells				
			Chromatid Type		Chromosome Type		
			Exchange	Deletion	Total ^{a)}	Exchange	Deletion Total ^{a)}
0	300	2.3	0.0	0.7	0.7 $\pm$ 1.2	1.7	0.0 1.7 $\pm$ 1.5
10	300	5.7	0.7	2.7	3.3 $\pm$ 2.1	2.3	0.0 2.3 $\pm$ 0.6
20	300	11.0	1.3	6.0	7.3 $\pm$ 2.9	3.7	0.0 3.7 $\pm$ 1.5
30	300	17.0	1.7	11.7	13.3 $\pm$ 1.2	3.7	0.0 3.7 $\pm$ 0.6
40	300	23.3	4.3	16.3	20.7 $\pm$ 3.2	2.7	0.3 3.0 $\pm$ 1.7
50	300	34.0	8.0	23.3	31.3 $\pm$ 4.5	3.0	0.0 3.0 $\pm$ 1.0

^{a)} Each datum is the mean and standard deviation of independent experiments.

Table 5. The Frequency of Chromosome Aberration Induced by Chromium

Dose of Chromium Treated (μ M)	No. of Cells Counted	Percent of Aberration Cells	Structural Aberration / 100 cells					
			Chromatid Type			Chromosome Type		
			Exchange	Deletion	Total ^{a)}	Exchange	Deletion	Total ^{a)}
0	300	4.0	0.0	1.3	1.3 $\pm$ 1.2	2.7	0.0	2.7 $\pm$ 0.6
5	300	10.7	0.0	5.3	5.3 $\pm$ 0.6	5.3	0.0	5.3 $\pm$ 1.2
10	300	21.7	0.0	13.0	13.0 $\pm$ 1.7	7.3	1.3	8.6 $\pm$ 0.6
20	300	29.0	1.0	17.0	18.0 $\pm$ 1.7	8.0	3.0	11.0 $\pm$ 1.7

^{a)} Each datum is the mean and standard deviation of independent experiments.

Table 6. Effect of Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Arsenic on the SCE Frequency in CHO Cells

Type of Ultrafiltrate(μ M) ^{a)}	No. of Cells counted	Total Chromosome	Total SCE	SCE / Cell (M $\pm$ S.D.)	SCE/Chromosome (M $\pm$ S.D.)
Cell + Med (Control)	50	956	360	7.20 $\pm$ 2.27	0.348 $\pm$ 0.143
Med	50	950	362	7.24 $\pm$ 2.25	0.373 $\pm$ 0.132
Med + As 10	50	951	414	8.28 $\pm$ 2.70*	0.418 $\pm$ 0.170
Med + As 20	50	957	400	8.00 $\pm$ 2.68	0.385 $\pm$ 0.178
Cell + Med + As 10	50	947	512	10.24 $\pm$ 2.75**	0.533 $\pm$ 0.158
Cell + Med + As 20	50	954	523	10.46 $\pm$ 2.79**	0.551 $\pm$ 0.173

^{a)} Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Arsenic.

^{b)} Media

* Observed value is significantly higher than control value ($p < 0.05$).

** Observed value is significantly higher than control value ($p < 0.01$).

군의 7.20에 대하여 각각 8.28, 8.0으로 증가하였고 10 μ M에서는 통계적으로 유의하였나($p < 0.05$). 그러므로 filter에서 비소가 완전히 걸러지지 않아서, 분리한 배양 추출물 내에 비소가 잔존하여 독성을 유발하였다는 동일한 조건의 가정하에서 배양액에 비소 10 μ M농도 처리군에 대하여 배양액과 비소 10 μ M농도와 세포를 처리한 군에서의 세포당 자매염색체 교환빈도가 8.28에서 10.24로 유의하게 증가하였으며($p < 0.01$) 비소 20 μ M의 농도에서도 마찬가지로 8.0에서 10.46으로 유의하게($p < 0.01$) 증가한 점으로 비소 단독의 작용 이외에 세포와 비소의 작용으로 새로이 생성된 어떤 요소에 의한 작용이 존재함을 알 수 있었다. 또 비소 10 μ M과 20 μ M의 농도에서의 배양추출물에 의한 세포당 자매염색체 교환빈도는 각각 10.24, 10.46으로 유의한 차이가 없어서 비소의 처리농도에 따른 배양추출물의 세포당 자매염색체 교환빈도는 양-반응 관계가 나타나지 않았다.

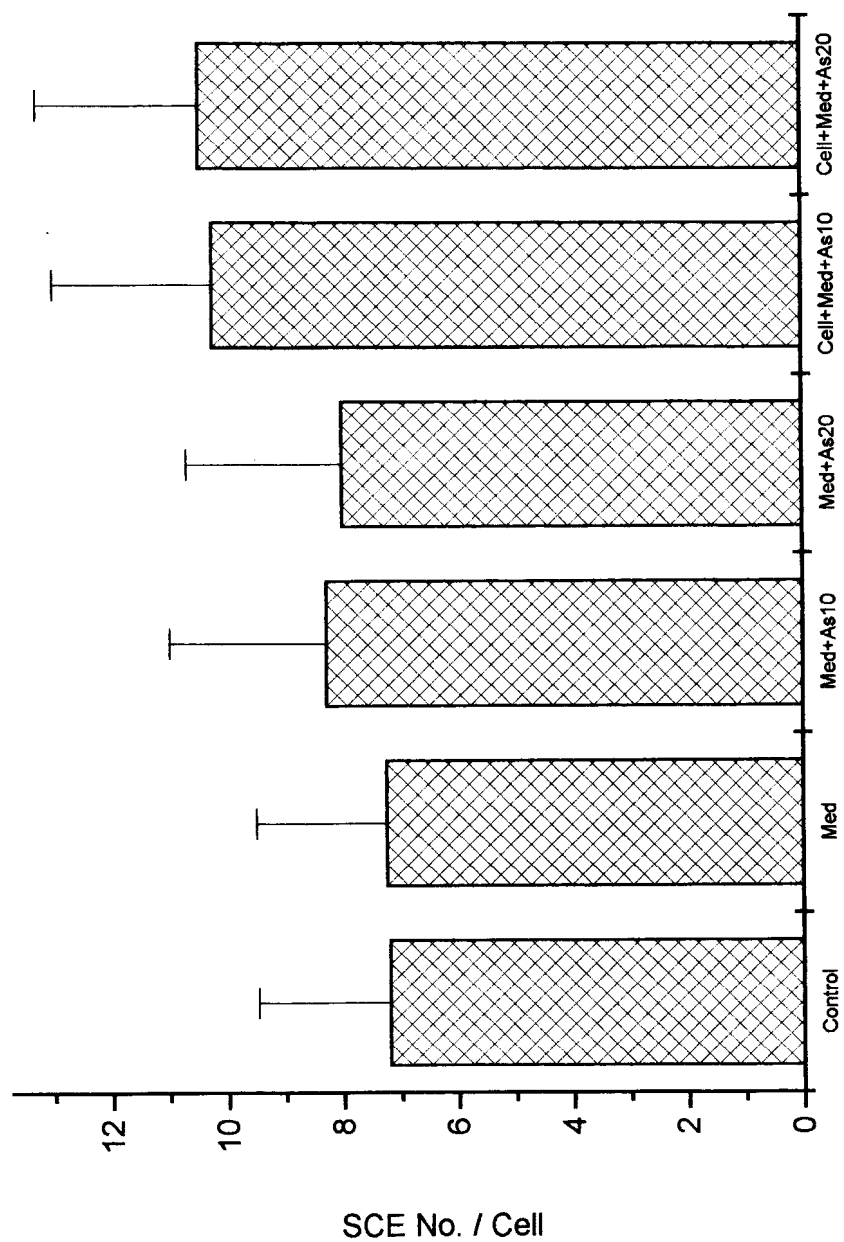


Figure 1. Effect of Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Arsenic on the SCE frequency in CHO Cells.

2) 크롬의 배양추출물에 의한 자대염색체 교환

CHO 세포에 크롬을 10 μ M의 농도로 처리하여 18시간을 배양시킨후 분리해낸 배양추출물을 다시 새로운 CHO 세포에 처리하여 36시간 배양후에 자대염색체 교환빈도를 비교하였다 (표 7, 그림 2). 크롬의 농도를 10 μ M로 정한 이유는 생존률이 97.4%로 꽤 높으나 100개 세포당 염색체 이상 세포비율이 10.7%로 비소 실험작인 20 μ M의 11.0%와 비슷하기 때문이었다. 표 7, 그림 2에서 보는바와 같이 세포당 자대염색체 교환빈도가 Med+Cr10군에 비하여 Med+Cell+Cr10군이 더 유의하게 높은 것으로 보아 ($P < 0.05$), 세포와의 작용으로 Med+Cell+Cr10군에서 CF라 추측되는 물질이 생성되었을 것으로 생각된다.

Table 7. Effect of Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Chromium on the SCE Frequency in CHO Cells

Type of ^{a)} Ultrafiltrates (μ M)	No. of Cells Counted	Total Chromo- some	Total SCE	SCE / Cell (M $\pm$ S.D.)	SCE / Chromosome (M $\pm$ S.D)
Med + Cell(Control)	50	962	386	7.72 $\pm$ 2.19	0.381 $\pm$ 0.139
Med + Cr10	50	974	482	9.64 $\pm$ 2.96	0.483 $\pm$ 0.167
Med + Cell + Cr10	50	968	575	11.50 $\pm$ 3.25*	0.595 $\pm$ 0.170

^{a)} Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Chromium(G_1 treatment).

* Observed value is significantly higher than Med + Cr 10 value ($p < 0.05$).

* Observed value is significantly higher than Control value ($p < 0.01$).

5. 지질과산화

1) 비소에 의한 지질과산화

CHO 세포에 비소를 농도별로 처리한 후 18시간후에 TBA 분석을 시행하여 지질과산화에 의해 생성된 MDA의 양을 측정하였다(표 8). 대조군에서 생성된 MDA의 양인 4.66에 대하여 농도가 증가할수록 각각 7.01, 7.67, 10.12, 17.01로 증가하는 경향을 나타냈다.

Table 8. Effect of Arsenic on Lipid Peroxidation in CHO Cells

Dose of Arsenic Treated(μ M)	nmole MDA / mg Protein ($M \pm S.D.$)
0	4.66 ± 1.73
5	7.01 ± 2.36
10	7.67 ± 2.44
20	10.12 ± 0.14
30	17.01 ± 1.82

(Kendal $\tau=0.7407$, $P=0.0003$)

2) 크롬에 의한 지질과산화

CHO 세포에 크롬을 농도별로 처리한후 18시간후에 TBA 분석을 시행하여 지질과산화에 의해 생성된 MDA의 양을 측정한 결과는 표 9와 같다. 크롬의 농도에 따라 증가하는 경향을 보여주고 있지만 최고 농도인 30μ M에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내는데 이는 크롬의 세포독성때문에 세포가 치사하였게 때문이라 추정된다.

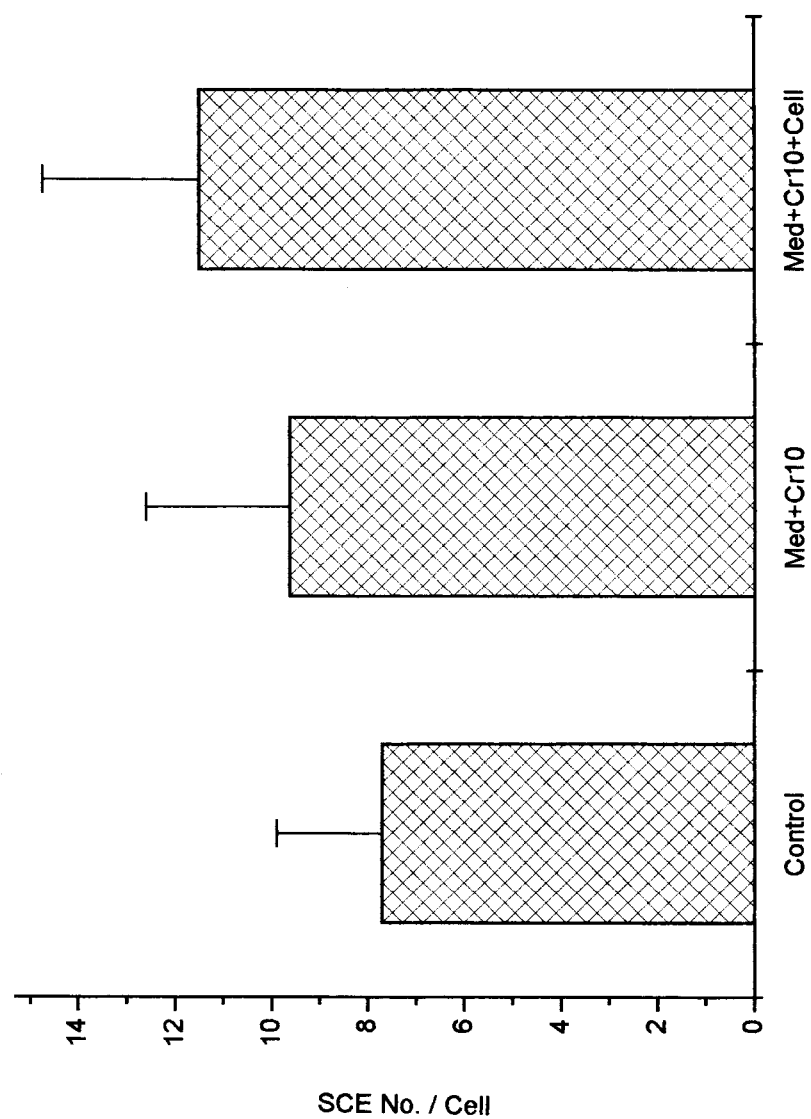


Figure 2. Effect of Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Chromium on the SCE Frequency in CHO Cells.

Table 9. Effect of Chromium on Lipid Peroxidation in CHO Cells

Dose of Chromium Treated (μ M)	nmole MDA / mg Protein (M $\pm$ S.D.)
0	2.17 $\pm$ 0.37
10	3.48 $\pm$ 1.75
20	6.22 $\pm$ 1.70
30	4.68 $\pm$ 0.36

6. 셀레늄의 중금속에 대한 보호효과

1) 염색체 이상

G₁ 시기에 셀레늄과 비소를 동시 처리한 경우의 염색체 이상을 나타내는 세포비율은 비소 단독 처리군의 12.5%에 대하여 8.5%로 유의하게 감소되었다(p<0.05). G₁ 시기에 비소 처리 후 3시간이 경과하고나서 PBS 용액으로 세척 후에 셀레늄을 처리한 경우도 마찬가지로 염색체 이상을 나타내는 세포비율이 비소 단독 처리군의 12.5%에 대하여 9.0%로 유의하게 감소하였다(p<0.05). 그러나 G₂ 시기에 셀레늄을 처리한 경우의 염색체 이상을 나타내는 세포비율은 비소 단독 처리군의 12.5%에 대하여 유의한 차이를 나타내지 않았다 (표 10). 따라서 비소에 의해 유발된 염색체 이상에 대하여 G₁ 시기에 셀레늄을 처리한 경우는 비소에 의한 염색체 이상 세포비율을 감소시켰으나 G₂ 시기에 셀레늄을 처리한 경우는 큰 영향을 미치지 않았다.

2) 지체염색체 교환

(1) 셀레늄이 비소에 의한 배양추출물에 미치는 영향

Table 10. Effect of Selenium on the Frequency of Chromosome Aberration Induced by Arsenic

Treatment (μ M)	No. of Cells Counted	Percent of Aberration Cells	Structural Aberration / 100 cells					
			Chromatid Type			Chromosome Type		
			Exchange	Deletion	Total ^{a)}	Exchange	Deletion	Total ^{a)}
Control	200	4.0	0.0	1.5	1.5 $\pm$ 0.7	2.0	0.5	2.5 $\pm$ 0.7
Se 50	200	5.0	0.0	1.5	1.5 $\pm$ 0.7	3.5	0.0	3.5 $\pm$ 2.1
As 20	200	12.5	1.5	7.5	9.0 $\pm$ 2.8	3.5	0.0	3.5 $\pm$ 0.7
As 20								
+ Se 50 (G ₁) ^{b)}	200	8.5	2.5	4.0	6.5 $\pm$ 2.1	2.0	0.0	2.0 $\pm$ 0.0
As 20								
+ Se 50 (G ₁) ^{c)}	200	9.0	1.5	4.5	6.0 $\pm$ 1.7	3.0	0.0	3.0 $\pm$ 0.0
As 20								
+ Se 50 (G ₂) ^{d)}	200	12.0	1.5	6.5	8.0 $\pm$ 1.4	3.5	0.5	4.0 $\pm$ 0.0

a) Each datum is the mean and standard deviation of independent experiments.

b) Treatment of the cells with Arsenic and Selenium simultaneously at G₁.

c) Treatment of the cells with Selenium after three hours treated with Arsenic at G₁.

d) Treatment of the cells with Selenium during G₂.

CHO 세포에 비소($20\ \mu\text{M}$)와 셀레늄($50\ \mu\text{M}$)을 처리한 후 18시간 동안 배양한 후 배양추출물을 분리하여 이를 다시 새로운 세포에 처리하여 36시간을 배양한 후 자매염색체 교환빈도를 알아보았다. 셀레늄과 비소를 동시에 처리하여 분리한 배양추출물에서의 세포당 자매염색체 교환빈도는 8.91로 비소 단독 처리군의 배양추출물의 빈도 10.62에 비교하여 유의하게 감소하였다($p<0.01$). 대조군의 세포당 자매염색체 교환빈도 7.83에 대하여 배양액과 셀레늄, 배양액과 셀레늄과 세포를 처리한 군에서는 각각 8.04, 8.06으로 통계적으로 유의한 차이가 없어 셀레늄의 배양추출물에 의한 독성효과는 없었다(표 11).

(b) 셀레늄이 크롬에 의한 배양추출물에 미치는 영향

셀레늄 처리 시 SCE 빈도 감소의 차이를 비교하였을때 오히려 $50\ \mu\text{M}$ 보다 $30\ \mu\text{M}$ 에서 세포와 크롬을 처리한 군에서의 CF 생성을 감소시키는 효과가 더 크게 나타났음을 관찰할 수 있었는데 이는 셀레늄이 고농도로 작용 시 돌연변이원으로도 작용할 수 있다는 사실에 근거한다면 크롬 독성에 관해서는 $30\ \mu\text{M}$ 의 셀레늄이 $50\ \mu\text{M}$ 의 농도보다 항산화제의 역할은 효과적이었다는 사실을 알 수 있었다(표 12).

3) 지질과산화

CHO 세포에 비소($20\ \mu\text{M}$)와 셀레늄($50\ \mu\text{M}$)을 동시에 처리하여 18시간을 배양한 후에 TBA 분석을 시행하여 지질과산화에 의해 생성된 MDA의 양을 측정하였다(표 13). 비소와 셀레늄을 동시에 처리한 군에서의 MDA 양은 6.00으로서 비소 단독 처리군의 9.90에 비교하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p<0.05$).

Table 11. Effect of Selenium Treated during G₁ on the SCE Frequency Induced by Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Arsenic

Type of Ultrafiltrate ^{a)} (µM)	No. of Cells counted	Total Chromosome	Total SCE	SCE / Cell (M ± S.D.)	SCE/Chromosome (M ± S.D.)
Cell + Mcd (Control)	100	1907	783	7.83 ± 2.55	0.385 ± 0.156
Mcd + Se 50	100	1895	804	8.04 ± 2.64	0.360 ± 0.184
Mcd + As 20	100	1922	899	8.99 ± 2.89**	0.447 ± 0.169
Cell + Mcd + Se 50	100	1884	806	8.06 ± 2.48	0.400 ± 0.163
Cell + Mcd + As 20	100	1682	1062	10.62 ± 2.92**	0.547 ± 0.163
Cell + Mcd + As 20 + Se 50	100	1891	891	8.91 ± 2.75***	0.411 ± 0.190

^{a)} Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Arsenic and Selenium.

** Observed value is significantly higher than control value (p < 0.01).

*** Observed value is significantly lower than Cell+Med+As 20 value (p < 0.01).

Table 12. Effect of Selenium Treated during G₁ on the SCE Frequency Induced by Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Chromium

Treatment ^{a)}	No. of Cells Counted	Total Chromosome	SCE / Cell (M ± S.D.)	SCE / Chromosome (M ± S.D.)
Med + Cell Control	50	962	7.72 ± 2.19	0.381 ± 0.139
Med + Cr10	50	974	9.64 ± 2.96	0.483 ± 0.167
Med + Cell + Cr10	50	968	11.50 ± 3.25*	0.595 ± 0.170
Med + Cell + Cr10 + Se 30	50	972	9.50 ± 2.50**	0.467 ± 0.177
Med + Cell + Cr10 + Se 50	50	968	10.34 ± 2.65***	0.546 ± 0.172

^{a)} Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Chromium(G₁).

* Observed value is significantly higher than Med + Cr 10 value (p < 0.05).

** Observed value is significantly higher than Control value (p < 0.01).

*** Observed value is significantly lower than Cell+Med+Cr 10 value (p < 0.01).

**** Observed value is significantly lower than Cell+Med+Cr 10 value (p < 0.05).

Table 13. Effect of Selenium Treated during G₁ on the
Malondialdehyde Formation Induced by Arsenic

Dose of Arsenic Treated(μ M)	nmole MDA / mg Protein (M $\pm$ S.D.)
Control	5.10 $\pm$ 1.40
Se 50	5.03 $\pm$ 0.76
As 20	9.90 $\pm$ 0.45
As 20 + Se 50	6.00 $\pm$ 0.67*

* Observed value is significantly lower than As 20 value(p<0.05).

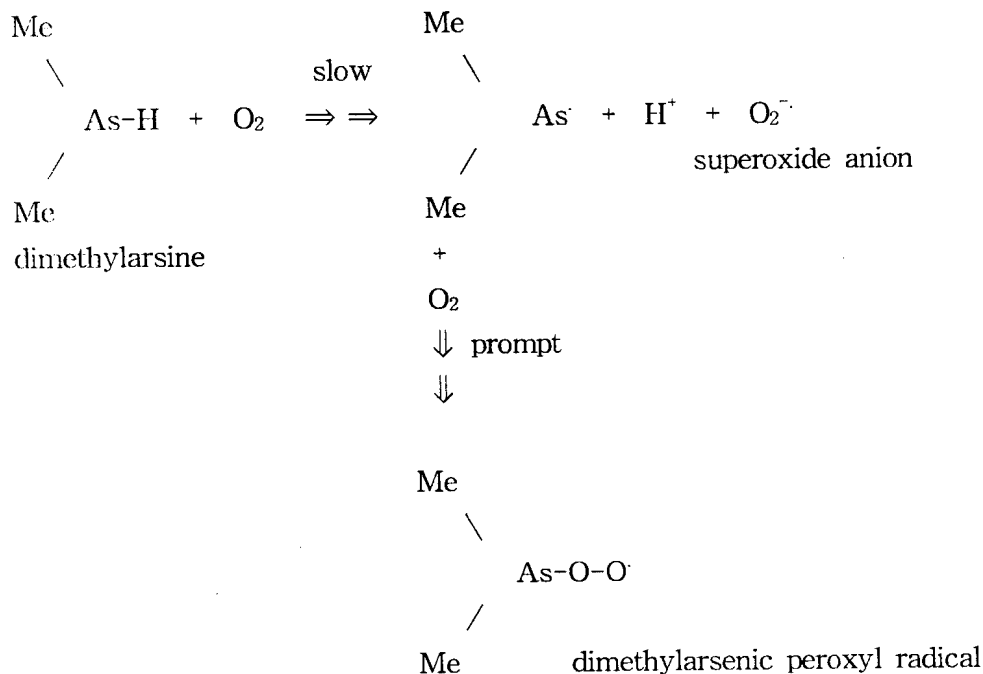
고 찰

중금속 전반에 관한 세포독성기전에 대해서는 지금까지도 구체적으로 알려져 있지 않은 실정이며 금속이온에서도 산소자유라디칼들이 생성된다는 사실이 밝혀진 이후 이를 매개로한 세포의 산화적 손상기전에 대한 연구들이 진행되어왔다. 최근 연구에서 대부분의 금속이온이 DNA와 covalent adduct을 형성하지 않는다는 사실 (Klein *et al.*, 1991)이 밝혀져서 금속에 의한 돌연변이 유발과정에는 반응성이 큰 산소자유라디칼의 생성이 관여되리라는 것을 시사하였다. 이러한 산소자유라디칼들은 노화와 암유발 과정에서도 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있으며 중금속에 의한 염색체 이상 유발이나 DNA 절단 등이 직접 DNA에 작용함으로써 나타나지 않고 산소자유라디칼이 관여된 간접적인 작용으로 나타나게 되면 Emerit 등(1993)이 제안한 염색체 이상 유발물질인 CF (clastogenic factor)가 존재할 가능성이 있다.

본 실험에서의 결과와 비교하여 Rossman 등(1980)은 비소는 대부분의 동물 발암성 실험과 단기 유전자 돌연변이 분석에서 음성결과를 보였다고 보고하였고 Lee 등(1985)은 어떤 세포에서도 비소가 점 돌연변이를 유발한다는 결정적인 증거는 없다고 보고하였다. 또한 본 실험에서는 비소의 최고 투여 농도인 50 μM 에서 염색체 이상을 나타내는 세포 비율이 34%를 보임으로써 사람림프구의 2.3 μM 의 농도에서 73%를 보이는 결과와는 차이가 있었다. 또, 사람림프구에서 비소 $8 \times 10^{-7} \text{M}$ 의 농도에서 염색체 이상을 나타내는 세포의 비율이 7.5%라는 보고와 비교하여도 본 실험에서는 12.5배나 더 높은 농도인 10 μM 에서 5.7%로 오히려 더 낮은 수치를 보였다. 이런 사실들은 사람세포가 동물세포와 비교하여 저농도에서 더 많은 염색체 이상을 유발하였다는 점을 증명해주고 있어 Lee와 Ho(1994)의 사람과 동물세포의 비소에 있어서의 산화적 손상의 감수성 차이에 의한 것이라는 연구결과와 일치하였다.

세포가 비소에 의한 산화적인 손상을 받는다는 의미는 비소나 비소의 대사물질들이 직접 DNA에 영향을 미친다기보다는 비소로부터 생성되어진 산소자유라디칼들의 세포막에 대한 공격으로 지질과산화가 발생하고 이렇게 이차적으로 생성된 중간매개물질들(CF)이 핵으로 확산되어서 DNA와 주변 세포와 조직에까지 간접적으로 손상을 일으킨다는 것이다. 지금까지 비소의 세포독성에 중요한 역할을 담당한다고 알려진 산소자유라디칼은 O_2^- (superoxide anion)과 As-O-O $\cdot$ (dimethylarsenic peroxy radical)이다. O_2^- 은 염색체 이상과 자매 염색체 교환을 유도할 수 있는데

어떻게 세포질에 풍부한 intracellular SOD에 의해 무력화되지 않고 세포막을 거쳐 핵까지 도달하여 독성을 유발할 수 있는지에 대하여 O_2^- 자체에 의한 효과가 아니라 효율적인 무력화 기전이 존재하지 않는 $OH^\cdot$ radical로의 전환에 의해서라는 가능성과 또 한 가지로 O_2^- 로부터의 다른 이차적인 radical들의 생성에 의해 CF류의 이차적인 손상 유발물질들이 생성되면 이들이 DNA에 작용한다고 보고하여서 O_2^- 이 세포의 산화적 손상 과정에 중요한 영향을 끼친다고 주장하였다(Emerit *et al.*, 1982). 무기 비소는 methylated form으로 대사되는데 dimethylarsinic acid(DMAA)를 거쳐서 생성된 dimethylarsine의 형태가 비소의 세포독성에 큰 영향을 끼침이 밝혀졌다. 즉, dimethylarsine이 활성산소에 대한 강력한 하나의 전자공여자로서 작용하여 O_2^- 을 생성할 가능성이 크기 때문이다. 그러나 DNA 외가닥 절단을 일으킨다고 알려진 dimethylarsine의 독성이 SOD를 처리하여도 크게 감소되지 않은 점으로 O_2^- 이외의 다른 radical들의 관련에 대한 가능성이 대두되기 시작하였으며 따라서 dimethylarsenic peroxy radical의 영향력이 제기되었다. dimethylarsine과 산소가 느리게 반응하면 O_2^- 이 생성되는데 이것은 조금 불안정한 상태인 반면 dimethylarsine과 산소의 신속한 반응이 발생하면 세포에서도 다소 안정적이라고 알려진 peroxy radical이 생성되어 DNA 외가닥 절단에 결정적인 역할을 할 것이라는 주장이다(Kenzo *et al.*, 1990). 이렇게 생성되어진 산소자유라디칼들에 의하여 세포막을 매개로 생성되어진 CF의 특징으로서는 CF에 의해서는 주로 염색분체형 염색체 이상이 관찰된다는 사실이다. 즉 직접적인 작용으로 초기에 DNA가 손상이 되면 염색체형 이상이 높게 나오며 세포주기 후기의 상해에 의해서는 염색분체형 이상이 높게 나오기 때문에 이는 세포의 산화적 손상기전에 의한 간접적인 염색체 이상 유발요소로서의 CF의 중요성을 시사해 준다. 비소에 의한 염색체 이상형태에 염색분체형이 대부분을 차지하는 실험결과는 비소에 의해서도 간접적인 CF가 생성될 수 있을 것이라는 추측이 가능케 한다.



CF에 대한 연구는 주로 암유발 촉진물질인 PMA에서 많은 연구가 수행되었는데 PMA는 DNA와 covalent adduct를 형성하지 않기 때문에 CF의 존재 여부가 의심이 되었다. Emerit과 Cerutti(1982)는 사람림프구에서 PMA로 유도된 CF를 분리하여 PMA의 CF자체에 의해서만도 염색체 이상이 유발됨을 관찰하였고 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 무력화 효소인 SOD에 의하여 이 CF의 독성은 효과적으로 감소되었음을 보임으로써 CF에는 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 이 관여함을 증명하였다. 또 Emerit(1989)은 chinese hamster fibroblasts에서도 PMA에 의한 CF만을 분리하여 새로운 세포배양에 CF를 처리시의 SCE 빈도 증가를 보고하였다. Emerit 등(1991)은 CF의 구성성분으로서 지질과 산화산물인 aldehyde-4-hydroxynonenal이 유력하다고 제시함으로써 CF 형성에는 산소자유라디칼과 함께 지질과산화가 관련되어 있음을 시사하였다. 그러나 CF의 구성성분은 단 한가지 요소만이 아니라 여러가지 산물들의 혼합물이라고 하였다. 실제로 Brambilla 등(1986)은 CHO 세포에서 aldehyde-4-hydroxynonenal을 포함하는

지질과산화산물들의 세포독성을 평가하였는데 모두 SCE 빈도의 뚜렷한 증가를 보여 주었다.

본 실험의 결과로서 제시하지는 않았지만 비소 처리후 분리한 배양추출물에서의 염색체 이상은 유발되지 않았으며 이러한 사실은 정 등(1995)의 석면에서 분리된 CF로 인한 염색체 이상 유발에 대한 결과와 일치하였다. 자매염색체 교환은 세포의 치사와 연관성이 적고 보통 염색체 이상을 현저하게 증가시키는데 필요한 농도보다 훨씬 낮은 농도에서도 물질에 의한 영향을 유의하게 감지할 수 있기 때문에 염색체 이상보다 더 강력한 돌연변이의 지표가 될 수 있다(Perry & Evans, 1975). 대부분의 CF에 대한 연구들이 염색체 이상보다는 SCE 빈도로 세포독성능력을 관찰한 점과 본 실험과정에 따라 분리한 CF를 포함하는 배양추출물은 염색체 이상을 유발하지는 않았으나 SCE 빈도의 증가를 보인 사실로서 분리한 CF의 독성능력이 염색체 이상을 유발할 정도는 아니었다는 점을 입증해주었다. CF의 구성성분이 될 지도 모르며 동시에 지질과산화산물이기도 한 MDA 양을 측정된 결과 비소의 농도가 증가함에 따라 생성되는 MDA 양도 유의하게 증가하였다. 이 사실로서 CF 형성과 세포막의 지질과산화와의 관련성이 확인되었다. Emerit 등(1991)은 생체막의 주요한 다중 불포화 지방산의 하나인 arachidonic acid는 효소적으로 cyclo-lipoxygenase 경로를 경유하거나 비효소적으로 배양액의 산소자유라디칼에 의하여 산화되는데 이렇게 산화된 지질과산화산물들은 염색체 이상 유발성을 가지며 이들이 CF의 구성성분일 가능성이 높다고 보고하였다. CF의 구성성분으로 거론되고 있는 H_2O_2 는 작은 분자이기 때문에 CF의 분리과정 중 YM 2 filter 밑으로 빠져서 검출되지 않았으며 100 nM의 농도까지도 사람 림프구 배양에서 염색체에 손상을 주지 않았다고 한다. aldehyde 계통의 지질과산화산물인 4-Hydroxynonenal(HNE)은 다른 동종 aldehyde류 보다 긴 생활사를 가지며 $0.1 \mu M$ 이하의 농도에서도 염색체 이상을 나타내는 비율이 13%나 관찰되었던 점, 주로 염색분체형 이상을 유발하였다는 사실 뿐만 아니라 본 실험에서 지질과산화산물로 측정된 MDA와 비교하여도 MDA $10 \mu M$ 농도에서 염색체 이상을 나타내는 세포 비율인 2.8%에 대하여 4-HNE $10 \mu M$ 농도에서는 17.8%를 차지해 4-HNE가 MDA보다 더 세포독성능력이 크다는 사실로서 강력한 CF 구성성분 중의 하나일 것이라고 추정하고 있다(Emerit *et al.*, 1991).

크롬은 지각에 풍부한 원소로서 주로 다른 원소와의 결합형(combined form)으

로 존재하며 Cr^{2+} - Cr^{6+} 산화형의 화합물을 구성한다. 크롬의 인체에 미치는 영향에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있으며 특히 많은 역학적 연구에서 이의 발암성이 입증되고있다. Cr(VI) 화합물인 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, Na_2CrO_4 , K_2CrO_4 , CaCrO_4 , 그리고 PbCrO_4 등은 *E. coli* 및 *Salmonella typhimurium*를 이용한 실험에서 돌연변이 유발원으로 나타났으나 Kanematsu 등(1980)은 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 은 음성으로 나타났다고 보고하였다. Cr(III) 화합물인 $\text{CrK(SO}_4)_2$, CrCl_3 , $\text{Cr(NO}_3)_3$ 은 돌연변이를 유발하지 않았으나 KMnO_4 를 첨가하여 6가로 전환하게 되면 돌연변이를 유발하였다. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, ZnCrO_4 은 Chinese hamster line V79/4에서 세포독성 및 돌연변이성을 보였으며 K_2CrO_4 은 CHO 세포의 HGPRT 유전좌위 점 돌연변이를 유발하였다. 반면 Cr(III) 인 $\text{Cr(CH}_3\text{COO)}_3$ 은 뚜렷한 돌연변이성을 보이지 않았다. 그 외 Cr(VI) 인 CrO_3 , K_2CrO_4 , PbCrO_4 등도 염색체 이상과 자매염색체 교환을 유발하였다. 그러나 CHO 세포 및 human fibroblast에서 $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, CrCl_3 , CrCl_2 등의 Cr(II) , Cr(III) 은 음성 결과를 보고하였다. 크롬의 독성은 원자가에 따라 차이가 나며 같은 원자의 크롬에서도 연구자에 따라 그 결과가 상이하다는 것을 알 수 있었다(Leonard & Lauwerys, 1980; De Flora *et al.*, 1990).

크롬의 돌연변이 및 세포독성기전이 크롬의 중간매개물질들이나 산소자유라디칼에 의한 DNA와의 직접적인 상해 결과인지 혹은 크롬의 환원과정동안 생성되는 산소자유라디칼에 의한 세포막의 상해 결과로 생성된 물질들에 의한 간접적인 DNA 손상에 의한 것인지는 아직 불명확하다. 즉, Cr(VI) 으로부터 Cr(III) 으로 환원되면 이 Cr(III) 이 직접 DNA에 작용하여 DNA에 손상을 줄 수 있으며 환원되는 과정에서 생성된 불안정한 Cr(V) 이 세포내 산화적 손상을 촉진하여 DNA-단백질 가교형성을 유발시킨다는 연구 보고가 있다(Show, 1991). 본 실험결과 크롬에 의해 나타나는 염색체 이상 중 염색분체형 염색체 이상이 염색체형 이상보다 많이 관찰되었으며 이는 CF에 의한 염색체 이상 형태의 특징이 되는 것으로 크롬에 의해서 CF가 형성되었다는 것을 간접적으로 나타내어 주고있다. 그러나 비소를 처리했을때는 염색분체형 이상이 대부분이며 염색체형 이상은 별로 나타나지 않았지만 크롬처리에 의해서는 이동원 염색체등 염색체형 이상이 많이 유발됨을 볼때 크롬에 의한 DNA 상해가 세포주기의 초기에 영향을 미치는 직접작용에 의한 결과로도 볼 수 있다. 이러한 결과는 크롬에 의한 지질과산화 정도가 비소에 의한 지질과산화 정도보다 약하게 나타나는 사실로도 연관지어 생각할 수 있다. 그러나 크롬의 경우 지

질과산화에 의해 생성되는 산물로서의 MDA양은 작았지만 그 외 다른 더 독성력이 강한 산물들의 관련 가능성을 추측해 볼 수 있다. 또한 그 성분이 바로 CF의 주요 구성성분일 것이라는 가정도 가능하다(Brambilla *et al.*, 1986; Emerit *et al.*, 1991; Johan *et al.*, 1993; Mukai *et al.*, 1976). 지금까지 Cr(VI)이 Cr(III)으로 환원되어 DNA에 직접결합에 의한 손상을 주어 유전독성을 나타내는 것으로 알려져 있지만(Show, 1991) 본 실험결과 산화적 손상에 의해 세포막이 관여하는 CF에 의한 간접작용에 의해서도 나타날 수 있다는 것을 추정해 볼 수 있었다.

항산화제인 셀레늄은 비소에 의해 생성되는 지질과산화산물들의 환원에 관여하는 효소인 glutathione peroxidase의 필수촉매로서 작용한다고 알려져있다. 본 실험에서의 셀레늄의 효과는 G₁ 시기에 비소와 동시에 처리된 경우에 비소 단독에 의한 염색체 이상을 유의하게 감소시켰는데 셀레늄과 비소가 동시에 처리된 경우에 두 요인이 결합됨으로써 셀레늄의 작용과는 상관없이 비소자체에 의한 효과만의 감소로 인한 현상이었을 가능성 때문에 비소 처리 3시간 후에 PBS용액으로 비소 성분을 세척하고나서 셀레늄을 처리하였더니 두 경우의 결과가 일치하여서 이 효과는 셀레늄이 단지 비소에 결합되어 비소의 작용을 방해하였기 때문이 아니라 비소의 세포독성을 감소시키는 보호효과(protective effect)를 나타냈음을 알 수 있었다. 이전 연구들에서도 사람림프구에서 셀레늄은 비소, 납, 이산화황과의 상호 작용으로 염색체 이상과 SCE 빈도가 감소되었음이 보고되었으며(Beckman & Nordenson, 1986) *in vitro*로 배양된 사람림프구에서의 셀레늄은 비소로 유도된 염색체 이상에 대하여 보호효과를 나타내었음이 관찰되었다(Sweins, 1983). 또한 본 실험에서의 결과에 의하면 비소와 함께 셀레늄을 처리하여 분리한 배양추출물의 SCE 빈도는 비소로부터 분리된 CF의 SCE 빈도와 비교하여 유의하게 감소되었으며 이는 크롬의 경우도 마찬가지였다. 현재 크롬에 대한 셀레늄의 보호효과에 대한 연구는 부족한 실정이다. 또 지질과산화산물인 MDA 양은 비소와 셀레늄을 함께 처리한 군이 비소 단독 처리군에 비교하여 유의하게 감소하였다. 크롬 자체가 지질과산화 유발 정도가 작았기 때문에 셀레늄 처리시의 크롬의 지질과산화 감소 여부는 관찰하지 않았다. 이와같이 세포막의 지질과산화산물들에 대한 환원에 관여한다고 알려진 항산화제로서의 셀레늄이 비소 및 크롬에 의해 생성된 CF와 지질과산화산물인 MDA 양을 감소시켰다는 사실은 비소 및 크롬의 세포독성이 산소자유라디칼의 공격으로 인한 세포막의 상해, 그리고 상해 결과 생성되는 지질과산화산물 등의 이차적인 상

해물질(CF)의 형성과 작용으로 간접적으로 유발된다는 기전에 대한 증거가 될 것이라고 추정된다.

이상의 결과들로서 비소에 의해 CF가 생성되고 지질과산화 발생하였다는 결과는 아직까지 중금속 분야에 있어서 논란중인 중금속의 세포독성기전과 중금속 대상으로는 입증되지 못한 CF의 형성 유무와 독성능력에 대한 증거 뿐만 아니라 중금속 전반에 관한 세포의 산화적 손상기전의 가능성에 대한 증거가 되리라 생각한다. 더 나아가 세포의 산화적 손상기전에 관한 확증을 위해서는 CF와 관련성이 있는 O_2^- 생성 유무의 확인으로서의 항산화제인 SOD(superoxide dismutase) 처리 효과 및 HPLC분석을 이용한 CF의 구성성분에 대한 확인 등의 연구들이 시행되어야 할 것이다.

결론 및 요약

CHO 세포에 대한 본 연구의 주요 결과는 다음과 같다.

1. 비소 및 크롬에 의한 세포 생존률은 용량에 따라 감소되었다.
2. 비소에 의한 HGPRT 점 돌연변이는 약하게 유발되었다.
3. 비소 및 크롬에 의해 유발되는 염색체 이상빈도는 용량에 따라 증가하였으며 염색분체형 결실형이 가장 많이 나타났으나 염색체형 교환형인 이동원 염색체의 증가도 관찰되었다.
4. 비소(10, 20 μ M) 및 크롬(10 μ M)을 처리하고 18시간 배양후 Ultrafiltration을 이용하여 분자량 1,000 - 10,000 dalton 사이의 물질을 분리하였으며 이 배양 추출물은 자매염색체 교환빈도를 증가시켰다.
5. 비소 및 크롬에 의한 지질과산화 정도는 용량에 따라 증가하였으나 크롬의 유발정도는 약하였다.
6. 셀레늄은 비소에 의해 유발되는 염색체 이상을 감소시켰으며 비소 및 크롬에 의한 배양추출물의 자매염색체 교환빈도와 비소에 의한 지질과산화를 감소시키는 보호효과를 보였다.

이상의 결과를 볼 때 비소 및 크롬의 세포독성기전은 DNA에 대한 직접작용 외에 CF(Clastogenic factor) 및 지질과산화에 의한 간접작용이 관여하리라는 것을 추정할 수 있다.

참고문헌

1. Ames, B.N., (1993) : Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative disease, *Science* 221:1256-1264.
2. Amstad, P., A.Levy, I.Emerit, and P.Cerrutti, (1984) : Evidence for membrane-mediated chromosomal damages by aflatoxin B₁ in human lymphocyte, *Carcinogenesis* 5:719.
3. Beckman, L. and I.Nordenson, (1986) : Interaction between some common genotoxic agents, *Hum. Hered.* 36:397-401.
4. Borenfreund, E. and J.A.Puerner, (1983) : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays, *J. Tissue Culture Methods* 9:7-9.
5. Brambilla, G., L.Sciaba, P.Faggin, A.Maura, V.M.Marinari, M.Ferro, and H.Esterbauer, (1986) : Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister chromatid exchange in chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes, *Mut. Res.* 171: 169-176.
6. Cerrutti, P.A., (1985) : Proxidant states and tumor promotion, *Science* 227:375-381.
7. Ching K. Chow, (1979) : Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems, *Am. J.Clin. Nutr.* 32:1066-1081.
8. Chung H.W. and H.J.Kim, (1995) : Mechanism of asbestos-induced chromosome aberration in CHO cells, *Korean J. Toxicol.* 11(1):117-125.
9. Clement, Ip. and H.E.Ganther, (1990) : Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention, *Cancer Res.* 50:1206-1211.
10. De Flora, S., M.Bagnasco, D.Serra, and P.Zanacchi, (1990) : Genotoxicity of chromium compounds : A review, *Mut. Res.* 238, 99-172.
11. Emerit, I., M.Keck, A.Levy, J.Feingold, and A.M.Michelson, (1982) : Activated oxygen species at the origin of chromosome breakage and sister chromatid exchanges, *Mut. Res.* 103:165-172.

12. Emerit, I. and A.Cerutti, (1982) : Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:7509-7513.
13. Emerit, I. and L.M.Madelaine, (1989) : Mutagenic effects of TPA-induced clastogenic factor in chinese hamster cells, *Mut. Res.* 214:97-104.
14. Emerit, I., S.H.Khan, and H.Esterbauer, (1991) : Hydroxynonenal, a component of clastogenic factors?, *Free Radical Biology and Medicine* 10:371-377.
15. Emerit, I., (1993) : Membrane-mediated chromosome damage and formation of clastogenic factors, *Membrane Lipid Oxidation Vol. 3*, CRC press, 33-43.
16. Fulvio V., M.Matilde, and S.Alex, (1991) : Membrane hydroperoxides, *Oxidative Stress*, 318-396.
17. Huang X,Z., Zhung K.Frendel, C.B.Klein, and M.Cost, (1994) : The role of nickel and nickel-mediated reaction oxygen species in the mechanism of nickel carcinogenesis, *Environ. Heal.Perspec.* 102(S3) : 281-284.
18. International Agency for Research on Cancer(IARC), (1987) : Overall evaluations of carcinogenicity, An updating of IARC monographs Vol. 1-42, *IARC Monogr. Eval. Carinog. Risk Chem. Man, Suppl.* 7:100-106.
19. Jacobson-Kram, D. and D.Montalbano, (1985) : The reproductive effects assessment group's report on the mutagenicity of inorganic arsenic, *Environ. Mutagen* 7:787-804.
20. Joenje,H., (1989) : Genetic toxicology of oxygen, *Mut.Res.* 219:193-208.
21. Johan, G., P.Gille, and H.Joenje, (1993) : Biological significance of oxygenotoxicity, An introduction, *Membrane Lipid Oxidation Vol. 3*, CRC press, 1-31.
22. Kasprzak, K.S., (1991) : The role oxidative damage in metal carcinogenesis, *Chem.Res.Toxicol.* 4:604-618.
23. Kenzo Y., M.Hoshino, M.Okamoto, R.Sawamura, A.Hasegawa, and S.Okada, (1990) : Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of

- inorganic arsenics, is for the major part likely due to its peroxy radical, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:58-64.
24. Klein, C. B., K.Frenkel, and M.Costa, (1991) : The role of oxidative process in metal carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* 4:592-604.
 25. Lee, T. C., M.Oshimura, and J.C.Barrett, (1985) : Comparison of arsenic-induced transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenic effects in syrian hamster embryo cells in culture, *Carcinogenesis(London)* 6:1421-1426.
 26. Lee, T. C. and I.C.Ho, (1994) : Differential cytotoxic effects of arsenic on human and animal cells, *Environ. Health Perspect.* 102(Suppl 3):101-105.
 27. Leonard, A. and R.R.Lauwerys, (1980) : Carcinogenicity and mutagenicity of chromium, *Mut. Res.* 76, 227-239.
 28. Li, A. P., J.H.Carver, W.N.Choy, A.W.Hsie, R.S.Gupta, K.S.Loveday, J. P. O 'Neill, J. C. Riddle, L.F.Stankowski Jr., and L.L.Yang, (1987) : A guide for the performance of the Chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine phospho ribosyl transferase gene mutation assay, *Mut. Res.* 189:135-141.
 29. Mary, O. Amdur, J.Doull, and C.D.Klaassen, (1992) : Casarrett and Doull's Toxicology 4th, 658-660.
 30. McBride,T.J., B.D.Preston, and L.A.Loeb, (1991) : Mutagenic spectrum resultary from DNA damage by oxygen radicals, *Biochemistry* 30:201-213.
 31. Mukai., F. H., D.Bernard, and Goldstain, (1976) : Mutagenicity of malon-dialdehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids, *Science* 191:868-869.
 32. Nordenson, I. and L.Beckman, (1991) : Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals ?, *Hum. Hered.* 41:71-73.
 33. Perry, P. and H.J.Evans, (1975) : Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature* 258(13):121-125.
 34. Perry, P. and S.Wolff, (1974) : New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature(London)* 251:156-158.
 35. Rossman, T.G., D.Stone, M.Molina, and W.Troll, (1980) : Absence of arsenite mutagenicity in *E. coli.* and Chinese hamster cells, *Environ. Mutagen*

- 2:371-379.
36. Schrauzer, G. N. and J.Sacher, (1994) : Selenium in the maintenance and therapy of HIV-infected patients, *J. Chem. Biol. Interact.* 91(2-3): 199-205.
 37. Show, E.T., (1991) : A possible role for chromium(III) in genotoxicity, *Environ. Health Perspect.* 92:75-81.
 38. Sweins, A. : Protective effect of selenium against arsenic induced chromosomal damage in cultured human lymphocytes, *Hereditas*, 98:249-252, 1983.
 39. Tkeshelashvili, L.K., T.J. McBride, K.Spence, and L.A. Loeb, (1991) : Mutation spectrum of copper-induced DNA damage, *J.Biol.Chem.* 266:6401-6406.
 40. Worton, R. G. and C.Duff, (1979) : Karyotyping, Cell Culture(Methods in Enzymology) Vol. LVIII, Academic Press, 322-343.