

## 석면에 의한 CHO 세포의 염색체 이상 유발 기전에 관한 연구

정해원 · 김현주

서울대학교 보건대학원

### Mechanism of Asbestos Induced Chromosome Aberration in CHO Cells

Hai-Won Chung and Hyun-Joo Kim

School of Public Health, Seoul National University, Korea.

(Received May 30, 1995)

(Accepted June 5, 1995)

**ABSTRACT :** In order to examine the mechanism of asbestos clastogenicity, CHO cells were treated with chrysotile and crocidolite. Crocidolite and chrysotile were able to induce lipid peroxidation in a dose dependent manner. Ultrafiltrate of culture media from CHO cells treated with chrysotile/crocidolite induced sister chromatid exchange in CHO cells. Ultrafiltrate of culture media from CHO cells treated with chrysotile induced chromosome aberration but it was not statistically significant. Simultaneous treatment of 3-Aminobenzamide (3-AB) or cytosine arabinoside (Ara C) with crocidolite had no effect on the frequency of chromosome aberration by crocidolite whereas posttreatment of caffeine significantly increased the chromosomal aberration by crocidolite. This indicated that DNA damage by asbestos took place at late stage of cell cycle. The results suggested that the ultrafiltrate of media contained clastogenic factor (CF) and lipid peroxidation might be involved in the formation of CF.

**Key Words :** Chromosome aberration, Chrysotile, Crocidolite, Clastogenic factor, Lipid peroxidation, Sister chromatid exchange.

#### I. 서 론

석면은 발암물질로서 사람에게 중피종, 폐암, 그리고 노출경로에 따라 신체의 각 부위에서 암을 유발할 수 있다(U.S. Department of Health & Human services, 1990). 석면은 발암과정에서 개시제(Initiator)로 작용하기도 하고(Peto, J. *et al.*, 1992) 증진제(Promotor)로도 작용한다고 보고 되어 있지만(Mossman, B.T. and Marsh, J.P., 1989) 증진제로 작용한다는 것이 일반적으로 받아들여지고 있으며(Barrett, J.C., 1993) 이의 명확한 기전은 확실치 않다. 석면의 발암과정에서는 철이 촉매하는 Haber-Weiss 반응에 의해 생성된 자유라디칼에 의한 DNA 손상이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Mossman, B.T. *et al.*, 1990). 즉 석면의 세포에 대한 독성은 석면의 종류에 따른 크기, 모양, 직경 등 물리적인 요인 외에 자유라디칼이 관여한다고 알려져 있으며 이

이 연구는 서울대학교 발전기금 대우학술 연구비의 지원에 의해 수행되었음.

러한 반응은 세포막이 매개하는 간접작용(Emerit, I., 1993)에 의한 것으로 보고되고 있다.

석면 폭로에 의해 염색체 이상이 유발되는 현상은 배양세포를 대상으로 한 연구(Kelsey, K.T. *et al.*, 1986, Casey G., 1983, Seabright, M., 1975)나 석면작업자의 림프구를 대상으로 한 연구(Fatma, N. *et al.*, 1991, Rom, W.N. *et al.*, 1993)에서 다수 보고되고 있는데 석면의 종류에 따라 염색체 이상을 유발하는 정도가 차이가 난다.

Emerit(1993)는 염색체 이상을 유발하는 물질들의 작용기전을 두 가지로 구분하였는데, 어떤 물질이나 그 대사산물이 직접 DNA에 상해를 주는 경우와 DNA 이외의 물질을 표적으로 작용하여 생성된 2차적 중간산물에 의해 간접적으로 상해를 주는 경우로 설명하였다. 세포막은 이러한 표적이 될 수 있으며 세포막에 의해 매개된 중간산물이 세포로부터 유리되어 간접적으로 염색체 이상을 유발하게 된다. 이 물질은 핵으로 확산(diffuse)되어 DNA에 상해를 주거나 세포 밖으로 확산되어 주위의 세포나 조직에 상해를 줄 수 있다. 세포막의 매개에 의

해 생성된 물질은 세포 배양액으로부터 분리될 수 있는데 이 물질을 다른 세포에 처리했을 때에도 염색체 이상을 유발할 수 있기 때문에 이를 clstogenic factor(CF)라고 부르지만 아직 자세한 생화학적 특성은 밝혀지지 않고 있다.

다만 DNA에 covalent DNA를 형성하지는 않지만 DNA에 손상을 줄 수 있는 것으로 알려진 암촉진물질인 phorbol-myristate-acetate(PMA)를 사람의 림프구나 생쥐의 피부세포에 처리했을 때 일정시간 경과 후에는 분자량이 1,000-10,000정도인 CF가 존재함을 확인할 수 있었다(Emerit, I. and Cerutti, P., 1982). 또한 Aflatoxin B<sub>1</sub>은 DNA와 adduct를 형성하여 DNA에 직접적으로 작용하지만 세포막이 매개하는 간접작용으로도 염색체 이상을 유발하는데 이 경우에도 CF가 존재함을 확인하였으며 (Amstad P. *et al.*, 1984), 특히 이온화 방사선을 조사하였을 경우에도 CF가 존재함이 보고(Faguat, G.B. *et al.*, 1984)되었는데 이들 각기 종류가 다른 물질의 처리로 인해 생성된 CF는 모두 비슷한 성질을 나타낼 것으로 추측되지만 이 또한 정확하지 않다. CF의 형성은 SOD의 처리에 의해 저지될 수 있다는 연구(Emerit, I., 1983) 결과로 볼 때 이 과정에 자유라디칼이 관여함을 알 수 있다.

석면이 세포막이 매개하는 간접작용에 의해 염색체 이상을 유발한다면 석면 처리에 의해서도 CF의 형성이 가능할 것이고 이의 형성은 vitamin C, E, 또는 다른 종류의 항산화제의 처리에 의해서 저지될 수 있으며 이는 염색체 이상빈도의 감소로서 나타날 수 있을 것이다.

또한 세포막이 매개하는 간접작용에 의해 생성된 CF의 작용은 염색체 이상 유발물질을 세포에 처리했을 때 즉시 나타나지 않고 어느 정도 축적될 수 있는 기간이 필요하게 되어 비교적 늦은 시기에 나타나기 때문에 이 경우 관찰되는 염색체 이상 형태는 염색분체형이라고 보고(Emerit, I., 1993)되고 있다. 손상된 DNA 상의 상해가 회복되는 세포주기의 각 단계 별로 특징적으로 작용되는 기전이 존재하므로, 각각의 작용시기 및 작용기전이 다른 DNA 회복합성 저해제를 이용하게 되면 특정물질에 의한 DNA 상해가 염색체 이상으로 나타나는 데 관여하는 기전을 확인할 수 있을 것이다. DNA상에 각기 다른 형태의 상해를 유발하는 X선(Wienke, J.K. and Morgan, W.F., 1987), bleomycin(Chung, H.W. and Ryu, E.K., 1993), 제한효소(Chung, H.W. *et al.*, 1981), 그리고 카드뮴(Chung, H.W. and Maeng, S.H., 1991)을 처리하고 각기 다른 특성을 가진 DNA 회복합성 저해제인 3-aminobenzamide(3AB), cytosine arabinoside(AraC), hydroxyurea(Hu), caffeine 등을 시기 별로 처리했을 때

나타나는 염색체 이상 빈도의 변화가 각기 상이하다고 보고되어 있어서 물질에 따라 염색체 이상을 유발하는 기전이 다를 수 있다.

본 연구의 목적은 석면에 의한 염색체 이상유발이 세포막이 매개하는 간접작용에 의한다는 가설을 증명하고 그것이 세포주기의 어떤 단계에서 작용을 하여 염색체 이상을 유발하는가를 구명하는 데 있다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

Chinese Hamster Ovary(CHO) 세포를 10% 우태아혈청 및 100 unit/ml의 Penicilin, 100 µg/ml의 Streptomycin이 포함된 McCoy's 5A (Gibco)배지에서 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다.

### 2. 석면 투여

UICC(unit internationalis contra carcinogen) 표준 석면 중 청석면(Crocidolite)과 백석면(Chrysotile)을 인산완충 용액에 2.5 µg/ml로 만든 후 초음파분쇄기로 분쇄한 후 고압증기멸균하여 세포에 투여 하였다. 이때 석면의 길이는 현미경상에서 그 범위가 다양하였으나 10 µg/ml 이상이 다수를 차지하는 것을 확인하였다.

### 3. 석면처리후 배양 추출물의 분리

백석면 5, 10, 20 µg/ml, 청석면 5, 10, 20, 30 µg/ml을 처리한 세포배양액을 농도별로 3 cultures를 합하여 배양액을 수집한후 150 g로 6분간 원심분리한 후 0.45 µm filter로 석면을 걸러내었다. 이후 분자량 10,000 dalton을 분리할수 있는 Diaflo ultrafiltration filter(YM10) 및 1,000 dalton을 분리하는 filter(YM2)로 분자량 1,000-10,000 dalton인 물질을 500 µl로 농축, 분리하였다. 이때 모든 실험과정은 4°C 이하에서 실시하였다.

### 4. 염색체 이상 분석

분리된 분자량 1,000-10,000 dalton 사이의 물질을 CHO세포에 투여한 후 18시간 배양하여 표본을 작성하였다. 세포를 100개씩 임의로 선택하여 광학 현미경으로 관찰, 분석하였다.

### 5. 자매염색체 교환 분석

분리된 물질을 세포에 투여할때 10 μM의 5-Bromo-2-deoxyuridine(BrdU)를 동시처리하여 36시간 배양한 후 염색체 표본을 작성한 다음 Fluorescent plus Giemsa (FPG)방법에 의해 염색한 후 50개씩의 세포를 임의로 선택하여 광학 현미경으로 관찰, 분석하였다.

**6. Vitamin C의 영향**

CHO 세포에 Vitamin C(5.7×10<sup>-4</sup> M)를 석면과 같이 처리하거나, Vitamin C가 포함된 배지에 7-9일간 배양한 후 석면을 처리하고 자매염색체 교환빈도를 조사하였다.

**7. DNA 회복합성저해제의 영향**

CHO세포에 석면과 함께 3-aminobenzamide(3-AB)의 경우 2×10<sup>-3</sup> M의 농도로, cytosin arabinoside(Ara C)의 경우 5×10<sup>-5</sup> M의 농도로 각각 투여하고 2시간 배양한 후 인산완충용액으로 세척한 다음 새로운 배양액을 넣고 16시간 배양후 염색체를 관찰하였다. 또한 CHO 세포를 석면 투여후 16시간 배양한 다음 Hydroxyurea(Hu)의 경우 5×10<sup>-3</sup> M의 농도로 catteine의 경우 1×10<sup>-3</sup> M의 농도로 처리한 후 2시간 더 배양한 다음 염색체를 관찰하였다.

**8. 막지질과산화 분석**

Martha *et al.*, (1986)의 방법에 따라 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 malondialdehyde(MDA)의 양으로 측정하였다. 즉 CHO세포에 청석면과 백석면을 각각 5, 10, 20, 30, 50 μg/ml로 처리하여 18시간 배양한 다음 0.9% 생리식염수를 넣고 조직분쇄기로 세포를 갈았다. 이중 일부세포는 Bradford방법에 의해 단백질 분석을 하고 일부는 TBA와 1:1로 혼합하여 100°C에서 15분간

끓인후 800 g로 원심분리한다음 상층액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**III. 결 과**

**1. 석면처리후 배양추출물에 의한 염색체 이상유발**

CHO세포에 백석면 5, 10 및 20 μg/ml 또는 청석면 5, 10, 20, 30 μg/ml을 동시 처리하여 18 h 배양시킨후 filter를 이용 분리해낸 물질을 다시 CHO세포에 처리하였다. 여러 차례의 반복 실험결과 백석면과 청석면 처리후 배양추출물은 일정하게 염색체이상을 나타내지는 않았다.

백석면의 경우 5 μg/ml을 처리한 후의 배양추출물은 CHO 세포에 처리한 후 염색체 이상을 지니는 세포의 빈도가 12%로 대조군 6%에 비해 증가하는 경향을 보였다. 또한 염색분체형이상은 12개로 대조군의 5개에 비해 증가하였다(Table 1). Table에서 제시되지는 않았으나 10과 20 μg/ml의 경우 대조군과 유사한 수준으로 염색체이상이 나타나는 것으로 보아 오히려 세포독성을 나타내는 농도에서는 염색체이상유발 물질이 형성되지 않는 것을 알 수 있었다.

청석면의 경우 5 μg/ml 이외에 표에서 제시되지는 않았으나 20 μg/ml의 경우는 일정하지 않았으나 약간 증가하는 경향을 볼 수 있었다.

결과가 일관성있게 나타나지는 않았으나 배양추출물에 의해 유발되는 염색체이상은 염색분체형중 결실형을 주로 관찰할 수 있었다.

**2. 석면처리후 배양추출물에 의한 자매염색체교환**

1) 석면의 투여 농도에 따라 형성된 배양추출물에 의한 자매 염색체교환 빈도

CHO 세포에 염색체이상을 유발하는 농도를 기준으로 백석면은 5 μg/ml, 10 μg/ml 및 20 μg/ml 그리고 청석면

**Table 1.** Chromosomal aberration in CHO cells induced by concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with asbestos.

@Treatment	No. of cells counted	Percent of Aberrant cells	Structural Aberration/100 cells					
			Chromatid Type			Chromosomal Type		
			Exchange	Deletion	Total	Exchange	Deletion	Total
control	100	6	0	5	5	0	1	1
med+CR 5	100	7	0	4	4	3	0	3
med+CH 5	100	7	0	5	5	2	0	2
med+cell	100	6	0	5	5	1	0	1
cell+med+CH 5	100	12	0	12	12	0	0	0
cell+med+CR 5	100	6	1	3	4	2	0	2

med: medium, CR:crocicidolite

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with different type of asbestos

**Table 2.** Effect of concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with crocidolite on the SCE frequency in CHO cells.

@Treatment	No. of cells counted	Total No. of chromosome	Total No. of SCE	SCE/chromosome(Mean + S.D.)
control	100	1909	767	0.403 ± 0.53
medium	100	1902	752	0.395 ± 0.049
CR 10	100	1917	760	0.397 ± 0.12
CR 20	100	1905	842	0.442 ± 0.059
CR 30	100	1919	875	0.457 ± 0.052*

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

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Crocidolite

**Table 3.** Effect of concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with chrysotile on the SCE frequency in CHO cells.

@Treatment	No. of cells counted	Total No. of chromosome	Total No. of SCE	SCE/chromosome(Mean ± S.D.)
control	100	1894	816	0.432 ± 0.45
medium	100	1886	880	0.467 ± 0.54
CH 5	100	1886	1063	0.564 ± 0.37 **
CH 10	100	1889	977	0.518 ± 0.028*
CH 20	100	1886	951	0.504 ± 0.025*

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

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

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Crocidolite

**Table 4.** Effect of crocidolite on lipid peroxidation in CHO cells (unit; nmoles MDA/mg protein).

Dose(µg/ml)	MDA(Mean ± S.D.)
control	4.91 ± 0.36
CR 5	5.76 ± 1.06
CR 10	4.62 ± 1.86
CR 20	8.21 ± 4.00
CR 30	7.29 ± 4.93
CR 50	13.33 ± 7.52

Kendall  $\tau=0.3581$   $p=0.0203$

은 10 µg/ml, 20 µg/ml 및, 30 µg/ml을 처리하여 18시간 배양시킨 후 분리한 배양추출물을 다시 CHO세포에 처리하여 36시간 배양하였다.

청석면의 경우 20 µg/ml과 30 µg/ml의 농도에서 대조군의 염색체당 자매염색체교환빈도수 0.403에 비해 각각 0.442, 0.457로 증가했으며 특히 30 µg/ml 농도에서는 통계적으로 유의하였다(p<0.05)(Table 2).

백석면의 경우 5 µg/ml, 10 µg/ml 및 20 µg/ml의 농도에서 대조군의 0.432에 비해 0.564, 0.518, 0.504로 증가하였으며 모두 통계적으로 유의하였다(p<0.01)(Table 3). 배양액만 처리한 경우는 대조군과 비슷한 수준을 나타냄으로써 배양액 자체에 의한 영향을 배제할 수 있었다.

### 3. 석면에 의한 지질 과산화

CHO세포의 G<sub>1</sub> 시기에 백석면, 청석면 각각 5, 10, 20,

**Table 5.** Effect of chrysotile on lipid peroxidation in CHO cells(unit; nmoles MDA/mg protein).

Dose(µg/ml)	MDA(Mean ± S.D.)
control	5.13 ± 0.47
CH 5	8.24 ± 5.92
CH 10	8.05 ± 4.57
CH 20	20.60 ± 8.96
CH 30	27.61 ± 14.79
CH 50	32.03 ± 17.86

Kendall  $\tau=0.63405$   $p=0.0001$

30 및 50 µg/ml을 처리한 후 생성된 MDA양을 측정하여 지질과산화 정도를 비교하였다.

Table 4에서 보는 바와 같이 청석면의 경우 10과 30 µg/ml 농도에서 약간 감소하지만 전체적으로 볼 때 농도가 증가할수록 5.76, 4.62, 8.21, 7.29, 13.33으로 대조군 4.91에 비해 증가하는 경향을 나타냈다(kendall  $\tau=0.3581$ ,  $p=0.0203$ ).

Table 5에서와 같이 백석면의 경우도 농도가 증가함에 따라 대조군 5.13에 비해 8.24, 8.05, 20.06, 27.61, 32.03으로 증가하는 경향을 보였다(kendall  $\tau=0.63405$ ,  $p=0.0001$ ).

### 4. Vitamin C의 영향

석면과 Vitamin C를 세포에 동시처리한 경우와 Vitamin C가 포함된 배지에 7-9일간 미리 배양시킨 세포에 석면을 처리한 후의 배양추출물을 세포에 처리하여

**Table 6.** Effect of Vitamin C treatment during G<sub>1</sub> on the SCE frequency induced by concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with crocidolite.

@Treatment	No. of cells	Total No. of chromosome	Total No. of SCE	SCE/chromosome(mean ± S.D.)
control	50	996	482	0.484±0.130
medium	50	989	477	0.482±0.132
med+ CR 30	50	997	462	0.463±0.175
med+cell	50	989	457	0.462±0.162
med+cell+CR 30	50	991	534	0.539±0.170
med+cell+CR 30+Vit C	50	985	491	0.498±0.162

med: medium, CR; Crocidolite, Vit C; Vitamin C

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with each dose

**Table 7.** Effect of Vitamin C treatment during G<sub>1</sub> on the SCE frequency induced by concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with chrysotile.

@Treatment	No. of cells	Total No. of chromosome	Total No. of SCE	SCE/chromosome(mean ± S.D.)
control	50	985	475	0.482±1.62
medium	50	974	461	0.473±0.137
med+ CH 5	50	985	438	0.445±0.153
med+cell+CH 5	50	979	529	0.540±0.196
med+cell+CH 5+Vit C	50	977	500	0.512±0.155

med: medium, CH; Chrysotile, Vit C; Vitamin C

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with each dose

**Table 8.** Effect of concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with crocidolite on the SCE frequency in CHO cells which were cultured with Vitamin C for 7-9 days.

@Treatment	No. of cells	Total No. of chromosome	Total No. of SCE	SCE/chromosome(mean ± S.D.)
control	50	988	410	0.415±0.150
medium	50	986	436	0.442±0.150
med+ CR 30	50	989	419	0.424±0.142
med+cell	50	984	421	0.428±0.152
med+cell+CR 30	50	1001	452	0.452±0.132
med+cell+CR 30+Vit C	50	982	429	0.437±0.163

med: medium, CR; Crocidolite, Vit C; Vitamin C

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with each dose

**Table 9.** Effect of concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with crocidolite on the SCE frequency in CHO cells which were cultured with Vitamin C for 7-9 days.

@Treatment	No. of cells	Total No. of chromosome	Total No. of SCE	SCE/chromosome(mean ± S.D.)
control	50	992	432	0.435±0.155
medium	50	987	431	0.437±0.150
medium+CH 5	50	990	426	0.430±0.162
medium+cell	50	968	423	0.437±0.164
med+cell+CH 5	50	983	508	0.517±0.194*
med+cell+CH 5+Vic C	50	987	446	0.452±0.159

med: medium, CH; Chrysotile, Vit C; Vitamin C

@Treatment: Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Chrysotile

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

자매염색체 교환빈도를 비교하였다.

#### 1) 석면과 동시처리한 경우

Table 6에서 보는 것처럼 청석면을 처리한 경우 염색체당 자매염색체 교환빈도가 염색체당 0.539로 대조군 0.484, 0.482, 0.63 및 0.462보다 증가한 경향을 볼 수 있

었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. Vitamin C를 동시 처리한 경우 염색체당 0.498로서 석면 단독처리시와 차이가 없었다.

백석면인 경우 석면 단독처리시에는 0.540으로 대조군 0.482, 0.473, 및 0.445보다 증가한 경향을 볼 수 있었으나 통계적 연관성은 없었다. Vitamin C를 동시처리한 경우에

**Table 10.** Effect of 3-Aminobenzamide(3AB) on the frequency of chromosomal aberration induced by crocidolite in CHO cells during G<sub>1</sub>.

Treatment	No. of cells counted	Percent of Aberrant cells	Structural Aberration/100 cells					
			Chromatid Type			Chromosomal Type		
			Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)	Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)
Control	300	4.0	0	2.5	2.5±2.1	1.5	0	1.5±0.7
3AB	300	6.0	0	4.7	4.7±3.1	1.3	0	1.3±1.5
CR 5	300	7.3	0	5.7	5.7±3.7	1.7	0.3	2.0±2.0
CR 5+3AB	300	10.7 (9.3)	0	8.3	8.3±2.9	2.3	0	2.3±1.5
CR 30	300	9.3	0	6.7	6.7±3.2	2.3	0.3	2.7±1.2
CR 30+3AB	300	7.3 (11.3)	0	5.3	5.3±2.9	2.0	0	2.0±1.0

The value in parentheses indicate expected values.

The expected values are the sum of the yield by asbestos alone, plus the yield induced by 3-aminobenzamide(3AB) alone, minus the control value.

**Table 11.** Effect of Cytosin Arabinoside(AraC) on the frequency of chromosomal aberration induced by crocidolite in CHO cells during G<sub>1</sub>.

Treatment	No. of cells counted	Percent of Aberrant cells	Structural Aberration/100 cells					
			Chromatid Type			Chromosomal Type		
			Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)	Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)
Control	300	4.7	0	3.0	3.0±2.6	1.7	0	1.7±1.5
Ara C	300	10.0	1	6.0	7.0±1.7	3.0	0.3	3.3±1.5
CR 5	300	9.0	0	7.6	6.7±2.1	2.0	0.3	2.3±0.6
CR 5+Ara C	300	10.7 (14.3)	0.3	9.3	9.7±3.1	1.3	0	1.3±1.5
CR 30	300	8.7	0.3	5.7	6.0±2.0	2.3	0.3	2.7±1.2
CR 30+Ara C	300	13.0 (14.0)	1.7	9.3	11.0±5.6	2.0	0	2.0±1.0

The value in parentheses indicate expected values.

The expected values are the sum of the yield by asbestos alone, plus the yield induced by Cytosine Arabinoside(Ara C) alone, minus the control value.

**Table 12.** Effect of posttreatment Hydroxyurea during G<sub>2</sub> on the frequency of chromosomal aberration induced by crocidolite in CHO cells during G<sub>1</sub>.

Treatment	No. of cells counted	Percent of Aberrant cells	Structural Aberration/100 cells					
			Chromatid Type			Chromosomal Type		
			Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)	Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)
Control	300	3.0	0	1.7	1.7±2.1	1.3	0	1.3±1.2
Hu	300	3.7	0	3.0	3.0±1.0	0.7	0	0.7±0.6
CR 5	300	5.3	0.3	3.7	4.0±3.0	1.3	0	1.3±1.5
CR 5+Hu	300	7.3 (6.0)	0	6.3	6.3±1.2	1.0	0	1.0±1.0
CR 30	300	8.3	0	6.0	6.0±2.0	2.0	0.3	2.3±1.5
CR 30+Hu	300	8.7 (9.00)	0.3	7.0	7.3±6.7	0.7	0.7	1.3±0.6

The value in parentheses indicate expected values.

The expected values are the sum of the yield by asbestos alone, plus the yield induced by Hydroxyurea(Hu) alone, minus the control value.

도 0.512로 석면 단독처리시와 차이가 없었다(Table 7).

## 2) 세포에 Vitamin C를 처리하여 배양시킨 경우

Table 8에서 보는 바와 같이 청석면만 처리한 경우 염색체당 0.452로 대조군 0.415, 0.442, 0.424, 0.428과 차이

가 없었다. Vitamin C에 미리 배양한후 석면을 처리한 경우에도 0.437로 역시 석면 단독처리시와 차이가 없었다.

백석면의 경우는 Table 9에서 보는 바와 같은데 석면만 처리한 경우 0.517로 대조군 0.425, 0.437, 0.430, 0.437보다 유의하게 증가하였으며(p<0.05), Vitamin C를

**Table 13.** Effect of posttreatment caffeine during G<sub>2</sub> on the frequency of chromosomal aberration induced by crocidolite in CHO cells during G<sub>1</sub>.

Treatment	No. of cells counted	Percent of Aberrant cells	Structural Aberration/100 cells					
			Chromatid Type			Chromosomal Type		
			Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)	Exchange	Deletion	Total(M±S.D.)
Control	300	3.7	0	1.7	1.7±2.1	2.0	0	2.0±0.0
caffeine	300	4.0	0	3.3	3.3±1.2	0.7	0	0.7±0.6
CR 5	300	7.0	0	5.0	5.0±2.6	2.0	0	2.0±1.0
CR 5+caffeine	300	8.0 (7.3)	0.3	6.3	6.7±1.5	1.3	0	1.3±1.5
CR 30	300	7.0	0.3	5.7	6.0±2.0	1.0	0	1.0±1.0
CR 30+caffeine	300	11.7* (7.3)	0	9.3	9.3±1.5	2.3	0	2.3±1.5

The value in parentheses indicate expected values.

The expected values are the sum of the yield by asbestos alone, plus the yield induced by caffeine alone, minus the control value.

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

함께 배양한 경우 0.452로 통계적으로 유의하지는 않았으나( $p=0.07$ ) 석면 단독처리시 0.517보다 감소하는 경향을 볼 수 있었다.

### 5. DNA 회복합성 저해제의 영향

Table 10에서 보는 것처럼 석면과 3AB를 동시 처리한 경우 석면의 농도가 5 µg/ml일 때 염색체이상을 지닌 세포의 비율이 10.7%로 기대치 9.3% 보다 약간 증가했으나 통계적으로 유의하지 않았다. 30 µg/ml에서는 7.3%로 기대치 11.3%보다 낮은 염색체이상을 나타냈다.

Ara C의 경우 Table 11에서 보는 것처럼 석면과 동시 처리한 경우 5, 30 µg/ml에서 각각 10.7%과 13.0%으로 기대치 14.3%, 14.0%보다 낮은 것으로 나타났다.

Hu의 경우 Table 12에서 보면 5 µg/ml의 농도에서 7.3%으로 기대치 6.0%보다 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 30 µg/ml 농도에서는 8.7%로 기대치 9%보다 낮은 것으로 관찰되었다.

caffeine의 경우 Table 13에서 보는 것처럼 5 µg/ml인 경우 기대치 7.3%보다 8.0%으로 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 30 µg/ml인 경우 11.7%로 기대치 7.3%보다 증가한 것으로 볼 수 있는데 이는 통계적으로 유의한 것( $p<0.05$ )으로 나타났다. 염색분체형 이상의 경우도 비슷한 경향을 나타내었다.

## IV. 토 의

본 연구는 석면에 의한 세포 독성이 산소자유라디칼에 의한 지질과산화와 이로 인해 세포막으로부터 형성되는 CF에 의한 것인가를 규명하고자 시행하였다.

CF에 의한 염색체 이상의 유발은 염색분체형이 주로

나타나며 자매염색체교환에 대해서는 약하게 유발하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 청석면과 백석면을 처리한 세포배양액 추출물을 다시 세포에 처리한 경우에 일정하게 염색체이상을 일으키는 것을 관찰하지 못했으나 백석면의 경우 농도 5 µg/ml와 청석면에서는 20 µg/ml에서 염색체이상이 나타남을 알 수 있었다. 염색체이상은 주로 염색분체형이었고 석면의 농도가 증가할수록 염색체이상이 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 자매염색체교환의 경우 백석면의 일부농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다.

일반적으로 석면은 다양한 세포에서 유전적독성 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이수성의 유발, 염색체이상의 증가(Palekar L.D. *et al.*, 1987; Chung H.W and J. Kim; 1995)가 보고되고 있으며 자매염색체 교환의 경우는 일정하지는 않지만 증가 된다고 보고하고 있다(Casey G., 1983). Ames test에서는 돌연변이원성은 아니나 chinese hamster lung cell에서는 약한 돌연변이원으로 나타난 것으로 보고되었다(Huang S.L., 1979). 그러나 석면이 완전한 암유발원으로 작용하는지, tumor promoter로 작용하는지 등에 관한 세포나 분자수준의 기전에 대해서는 아직 명확하지 않다.

사람의 림프구에서 CF의 영향을 조사한 결과 염색체 이상은 주로 염색분체형이 나타나며 72시간 배양시에만 관찰할 수 있었음을 보고 하였다(Emerit, I., 1993). RPMC(rat pleural mesothelial cell)에서 백석면을 처리후 분리해낸 CF를 whole blood에 처리했을 때 염색분체형이 주로 나타났고 10 µg/ml의 농도에서는 세포독성이 일어나 CF의 염색체이상유발 사이에는 어떤 관계도 관찰되지 않은 것은 본연구에서와 일치하는 결과임을 알 수 있다(Emerit, I. and Cerutti, P. A., 1982).

자매염색체 교환은 세포의 치사와 연관성이 적고 보

통 염색체 이상을 현저하게 증가시키는데 필요한 농도보다 훨씬 낮은 농도에서 물질에 의한 영향을 유의하게 감지할 수 있기 때문에 염색체 이상보다 더 강력한 돌연변이의 지표가 될 수 있다(Perry, P. and Evans H. J., 1975). 본 연구의 경우 염색체 이상이 일정하지는 않았지만 자매염색체교환에서 백색면의 경우 농도 5, 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$  모두 통계적으로 유의하게 증가하였다. 청색면에서는 전반적으로 증가되는 경향을 보였고, 30  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 통계적으로 유의하였으나 농도에 따른 증가가 명확하게 나타나지는 않았다.

CF형성과정을 매개하는 것으로 알려진 지질과산화물을 확인하기 위해 CHO세포를 대상으로 thiobarbituric acid assay를 실시한 결과 청색면과 백색면에서 각각 농도가 증가함에 따라 지질과산화물이 증가하였고, 고농도에서는 통계적 연관성이 나타났다. 본 실험에서는 청색면보다는 백색면에서 그 증가 경향이 더욱 큰 것으로 나타났다.

Weitzman과 Weitberg(1985)는 청색면, 갈색면과 백색면을 증류수에 희석시켜 인지질을 처리하여 지질과산화물을 측정된 결과 15분만에 지질과산화가 발생하였으며 그 중 백색면에 의해 지질과산화가 가장 많이 일어난 것으로 보고하였고, 철의 chelator로 desferrioxamine을 처리한 경우에는 갈색면, 청색면, 백색면 순서로 감소하는 것으로 나타났다. 여기서는 세포에 의해서가 아니라 인지질을 직접 첨가한 것이라 본연구와 과정상 다른 점이 있으나 백색면에서 지질과산화가 많이 형성된 것은 일치하였다. 반면 Iguchi(1993) 등에 따르면 rat lung fibroblast에서 청색면의 경우 250  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 24, 48시간 배양시 세포내에 TBA 반응 물질이 유의하게 많이 생성되나 백색면에서는 생성되지 않으며 갈색면의 경우 48시간 배양시 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서만 생성된다는 상이한 결과를 보고하였다.

Vitamin C는 과산화라디칼( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )이나 수산화 라디칼(OH)과 반응할 수 있고  $\text{O}_2$ 를 소멸시켜주는 능력이 있다(Nishikimi, M., 1975). 또한 Vitamin C는 항산화제 이외에도 전산화제로 작용함으로써 유전독성을 나타내는 특성을 가지고 있다. Vitamin C가 0.1 mM 이상일 때는  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 에 의해 유전독성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

항산화제로 Vitamin C를 사용하여 세포에 석면과 동시에 처리한 후 분리한 물질은 석면단독처리시와 차이가 없어 보호효과를 나타내지 못했으며 세포를 Vitamin C와 함께 7-9일간 배양시킨 후 석면을 처리한 경우에 있어서는 백색면의 경우 통계적으로 유의하게 감소한 것은 아니지만 보호효과를 관찰할 수 있었다.

각종 DNA 회복합성저해제는 돌연변이 유발원에 의

한 염색체 이상기전을 밝히는데 유용하게 사용되어져 왔다. DNA 회복합성 저해제로 DNA가 복제되거나 회복되는 과정에서 nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase의 작용을 억제하는 3-Aminobenzamide(3AB)와 DNA상의 양가닥 절단을 회복하는데 필요한 DNA polymerase  $\alpha$ ,  $\delta$ 의 활동을 저해하는 Cytosine arabinoside (AraC)를 G<sub>1</sub> 시기에 석면과 동시에 처리한 결과 각각의 물질을 처리했을 때와 ribonucleotide reductase의 작용을 억제하여 DNA합성에 필요한 세포내 deoxynucleotide pool을 고갈시킴으로써 DNA회복합성을 저해하는 Hydroxyurea(Hu)를 처리한 경우 염색체 이상의 증가는 나타나지 않았으나 세포의 G<sub>2</sub>기로의 이행을 억제하여 postreplication repair를 저해함으로써 회복합성 능력을 감소시켜 DNA 손상물질에 의한 세포독성을 증가시켜 주는 Caffeine을 처리하였을 때 염색체 이상빈도가 증가되었다. 이상의 결과를 볼 때 석면이 G<sub>1</sub>시기에 처리되었을 때 바로 DNA에 상해를 나타내기 보다는 세포막 등의 DNA 이외의 물질과 반응하여 산소라디칼을 형성하고 그로 인해 유도되는 2차적인 물질이 G<sub>2</sub>기에 형성되어 상해를 일으킨다고 간접적으로 추정할 수 있다. 즉 석면에 의한 상해에 염색분체형이 주로 나타나고 석면으로부터 유발된 CF에 의한 염색체 이상도 대부분이 염색분체형이었으며 caffeine의 영향으로 미루어 볼 때 석면에 의한 DNA상의 영향은 간접적으로 나타난다고 추정될 수 있다.

각기 다른 막활성물질들에 의해 형성된 CF는 분자량이 비슷하고 ultrafiltration이나 chromatographic 과정동양의 behavior가 유사함에도 불구하고 각기 다른 구성성분을 갖는다. PMA에서 발견된 4-hydroxynonenal 이외에도 scleroderma 환자들의 혈청에서 분리한 CF에서는 inosine nucleotide(ITP, IDP)가 확인되었다. 그러나 석면에 의해 형성된 CF에서는 4-hydroxynonenal의 존재를 확인하지 못하였으며(Emerit, I. et al., 1991a), 그 성분에 있어서도 연구가 미비한 상태이다. 석면에 폭로된 세포에서 CF의 형성은 석면과 관련된 암유발에 중요역할을 할 수 있다는 것을 고려해 볼 때 석면에 의해 형성되는 CF의 화학적 특성을 밝히기 위해 더욱 많은 연구가 있어야 하겠다.

## 참고문헌

- Amstad, P., Levy, A., Emerit, I. and Cerutti, P. (1984): Evidence for membrane-mediated chromosomal damage by aflatoxin B1 in human lymphocyte. *Carcinogenesis*, **5**: 719.
- Barrett, J.C. (1993): Mechanism of multistep car-



- cinogenesis and carcinogen risk assessment, *Environ. Health Perspec.*, **100**: 9-20.
- Casey, G. (1983): Sister-chromatid exchange and cell kinetics in CHO-K<sub>1</sub> cells human fibroblasts and lymphoblastoid cells exposed in vitro to asbestos and glass fibre. *Mutat. Res.*, **116**: 369-377.
- Chung, H.W., Phillips J.W., Wineger R.A., Preston R.J. and Morgen W.F., (1991): Modulation of restriction enzyme-induced damage by chemicals that interfere with cellular responses to DNA damage: a cytogenetic and pulsed field gel analysis, *Radiation Res.*, **125**: 107-113.
- Chung, H.W. and Maeng, S.H. (1991): Effect of DNA repair inhibitors on Cadmium-induced chromosome aberration in CHO cells, *Environ. Mutagens and Carcinogens*, **11-1**: 29-42.
- Chung, H.W. and Ryu, E.K. (1993): Effect of DNA repair inhibitors and iron on the chromosome aberration induced by bleomycin and hydrogen peroxide in CHO cells, *Kor. J. Environ. Health. Society*, **19-4**: 59-66.
- Chung, H.W. and J. Kim. (1995): Effects of vitamin C and desferrioxamine on the frequency of chromosome aberration and sister chromatid exchange induced by asbestos in CHO cells, *Environmental Mutagens and Carcinogens*, **15-1**: 9-19.
- Emerit, I. and Cerutti, P. (1981a): Clastogenic activity from bloom syndrome fibroblast cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 1868-1872.
- Emerit, I. and Cerutti, P. (1981b): Tumor promoter phorbol-12-myristate 13-acetate induces chromosomal damage via indirect action. *Nature*, **293**: 144-146.
- Emerit, I. (1993): Membrane-mediated chromosome damage and formation of clastogenic factors: Membrane Lipid Oxidation, CRC press, Vol 3: 33-43.
- Faguet, G.B., Reichard, S.M. and Welter, D.A. (1984): Radiation-induced clastogenic plasma factor, *Cancer Genet. Cytogen.*, **12**: 73.
- Fatma, N., Jam, A.K. and Rchamn, Q. (1991): Frequency of sister chromatid exchange and chromosomal aberrations in asbestos cement workers, *Br. J. Indust. Medicine*, **48**: 103-105.
- Huang, S.L. (1979): Amosite, chrysotile and crocidolite asbestos an mutagenic in chinese hamster lung cells, *Mutat. Res.*, **68**: 2675-275.
- Iguchi, H., Kojo, s and Ikeda, M. (1993): Lipid peroxidation and disintegration of the cell membrane structure in cultures of rat lung fibroblasts treated with asbestos, *J. Appl. Toxicol.*, **13-4**: 269-275.
- Kelsey, K.T., Yano, E., Liber, H.L. and Little, J.B. (1986): The in vitro genetic effects of fibrous erionite and crocidolite asbestos, *Br. J. Cancer*, **54**: 110-114.
- Martha, S.S., Peter, M., David, R. and Martyn, T.S. (1986): Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity, *Biochem. Pharmacol.*, **35**(18): 3095-3101.
- Mossman, B.T. and Marsh, J.P. (1989): Evidence supporting a role for active oxygen species in asbestos-induced toxicity and lung diseases, *Environ. Health Perspec.*, **81**: 91-94.
- Mossman, B.T., Bignon, J., Seaton, A. and Lee, J.B.L. (1990): Asbestos: Scientific developments and implications for public health policy, *Science*, **247**: 294-301.
- Nishikimi, M. (1975): Oxydation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the Xanthin-xanthine oxidase system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**: 463.
- Paleker, L.D., Erre, F., Bernard, J.F., Most, M. and Cottin, D.L. (1987): Metaphase and anaphase analysis of V79 cells exposed to erionite, UICC chrysotile and UICC crocidolite, *Carcinogenesis*, **8-4**: 553-560.
- Perry, P. and Evans, H.J. (1975): Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature*, **258-13**: 121-125.
- Peto, J., Seidman, H. and Selikoff, I.J. (1992): Mesothelioma mortality in asbestos workers: Implications for model of carcinogenesis and risk assessment. *Br. J. Cancer*, **45**: 124-135.
- Rom, W.N., Livingston, G.K., Casey, K.R., Wood, S.D., Egger, M.J., Chin, G.L. and Jelominski, L. (1983): Sister chromatid exchange frequency in asbestos workers, *J. National Cancer Institute*, **70**: 45-48.
- U.S. Department of Health & Human Services (1990): Toxicological Profile for Asbestos, TP-90-04.
- Weitzman, S.A. and Weitberg, A.B. (1985): Asbestos-catalysed lipid peroxidation and its inhibition by desferrioxamine, *Biochem. J.*, **225**: 259-262.
- Wienke, J.K. and Morgan, W.F. (1987): Cell cycle-dependent potentiation of X-ray-induced chromosomal aberrations by 3-aminobenzamide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**: 372-376.