

## CHO 세포에서 비소의 세포독성기전

정해원<sup>1)</sup> · 기혜성 · 박영철\* · 한정호\* · 유일재\*\*

서울대학교 보건대학원, \*서울대학교 의과대학, \*\*산업보건연구원  
(1996. 8. 2 접수)

## Mechanism of Arsenic-Induced Cytotoxicity in CHO Cells

Hai Won Chung<sup>1)</sup>, Hye Sung Kee, Yeong Chul Park\*, Jung Ho Han\* and Il Je Yu\*\*

School of Public Health, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea.

\*College of Medicine, Seoul National University, Seoul, 110-460, Korea.

\*\*Industrial Health Research Institute, Incheon, 403-120, Korea.

**ABSTRACT :** This study was carried out to examine the mechanism of Arsenic cytotoxicity through several *in vitro* test systems. Dose-dependent decrease of cell survival by Arsenic 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 were chromatid type deletions. Ultrafiltrates of culture media from CHO cells treated with Arsenic induced sister chromatid exchanges(SCE) in CHO cells and Arsenic was able to induce lipid peroxidation in CHO cells. The results suggested that the ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Arsenic contain clastogenic factor(CF) and lipid peroxidation might be involved in the formation of CF.

**Keywords :** Arsenic, Cell survival, HGPRT point mutation, Chromosome aberrations, CF, Sister chromatid exchanges(SCE), Lipid peroxidation

### 서 론

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 adduct을 형성하지 않는다는(Klein *et al.*, 1991; Krasprzak, 1991) 사실이 밝혀져서, 금속에 의한 돌연변이 유발과정에는 반응성이 큰 산소라디칼의 생성이 관여된다는 것을 시사해 주고 있다. 산소라디칼은 노화 과정이나 암유발과정에서 중요한 역할을 한다는 것이 널리 알려져 있으며(Ames, 1993; Joenje, 1989; Cerrutti, 1985), 많은 화학적 요인이나 물리적 요인에 의한 세포의 상해효과를 설명해 주고 있다. 반응성이 큰 산소(Reactive oxygen species: ROS)의 DNA를 포함한 세포내분자에 대한 상해효과는 잘 알려져 있는데, ROS는 DNA의 여러 위치에 상해를 주기 때문

에 특정 부위의 상해와 특정 돌연변이와 연관을 짓는 것이 매우 어렵지만 화학적 발암물질은 DNA에 제한된 위치에 상해를 주기 때문에 종양과 돌연변이된 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 *et al.* (1994) 은 CHO 세포에 Ni을 처리하게 되면 산화물(oxidants)의 양이 증가하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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

<sup>1)</sup>To whom all correspondences should be addressed.

세포의 산화적 손상(oxidative damage)에 대하여 보호작용을 하는 glutathione peroxidase와 catalase의 활성이 동물세포가 사람세포보다 각각 3배 및 8배나 더 크기 때문에 전반적인 비소에 의한 손상 가능성이 사람에서 10배나 크다는 것으로 설명될 수 있으며(Lee and Ho, 1994) 또한 이 사실은 비소의 세포독성이 자유라디칼에 의한다는 것을 시사해 주고 있다. 중금속에 의한 염색체 이상유발이나 DNA 절단 등이 직접 DNA에 작용함으로써 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 상해가 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 adduct를 형성하진 않지만 DNA에 손상을 주는 것으로 알려진 PMA(phorbolmyristate-acetate) (Emerit, 1981)나 Aflatoxin B<sub>1</sub>(Amstad *et al.*, 1984), 그리고 이온화 방사선같이 DNA에 직접손상을 주는 경우에도 CF가 존재함이 확인되었다. 또한 Chung and Kim(1995)은 석면에 의한 염색체 이상유발이 세포막이 매개하는 간접 작용에 의한 것임을 세포배양액으로부터 CF를 분리하여 확인한 바 있다. CF는 아직 그 생화학적 특성이 밝혀지지는 않고 있지만 분자량이 1,000-10,000 dalton이라고 알려져 있다 (Emerit and Cerutti, 1983). 비소에 의한 세포독성에 산소자유라디칼이 관여하는 것을 확인하기 위해 CF를 분석한 연구는 확인된 적이 없다.

본 연구에서는 발암성이 있다고 알려졌지만 아직 그 발암성이 동물실험에서 확인되지 않은 비소에 의한 세포독성기전을 규명하기 위해 비소에 의한 염색체 이상 및 유전자 돌연변이 유발여부를 조사하였으며 또한 이 독성을 나타내는데 산소라디칼이 관여하는 것을 확인하기 위해 비소가 처리된 세포의 배양추출물에 CF가 존재 하는지 여부를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

CHO-K<sub>1</sub> 세포를 10% 우태아 혈청이 포함된 McCoy's 5A 배지에서 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 항온기에 배양하면서 실험재료로

사용하였다.

### 2. 세포 생존률

CHO 세포에 비소(Sodium arsenite : SIGMA)를 10, 20, 30, 50, 및 100  $\mu$ M의 농도로 처리한 후 3시간 후에 PBS 용액으로 2번 세척하였다. 그리고 15시간을 추가배양한 후에 각 농도군마다 200개의 세포를 McCoy's 5A 배양액이 들어있는 petri dish에 심어 7-9일 동안 배양하였다. 생존률은 농도별로 비소가 처리된 군에서의 colony수와 대조군의 colony수에 대한 비로서 계산하였다.

### 3. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT) 점 돌연변이 유발

CHO 세포에 비소를 10, 30, 40, 50, 및 100  $\mu$ 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  $1 \times 10^5$  개의 세포를 심은 후 8일간 배양하여 나타나는 colony 수를 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  $\mu$ M의 농도로 처리하고 3시간 후에 PBS 용액으로 2번 세척하고 13시간 추가 배양후 colcemid를 처리하고 2시간 후에 저장액(0.075M KCl)을 거쳐 Methanol을 이용 5분간 전고정하고 다시 carnoy 고정액(Methanol:Acetic acid=3:1)으로 고정한다음 Giemsa로 염색하는 일반적인 방법에 의해 염색체 표본을 작성하였다.

### 5. 배양추출물의 분리

CHO 세포에 비소를 10 및 20  $\mu$ M의 농도로 처리하고 18시간 배양한 후 배양액을 수거하여 150 g에서 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  $\mu$ l)로 농축추출하였다.

### 6. 자매염색체 교환빈도(Sister Chromatid Exchange: SCE)

CHO 세포에 비소를 처리하여 얻은 배양추출물을 새로운 CHO 세포에 처리하고 10 μM의 5-Bromo-2-deoxyuridine에 36시간 노출시킨 후 Perry and Wolff(1974)의 방법에 준해 염색한 후 50개의 세포를 임의로 선택하여 관찰하였다.

7. 지질과산화 측정

CHO 세포에 비소를 5, 10, 20, 및 30 μM의 농도로 처리하여 배양한 후 세포를 수거하여 homogenizer로 분쇄한 후 Thiobarbituric acid(TBA)와 1:1로 섞은 후 100 °C에서 15분 처리하고 800 g에서 10분간 원심분리한다음 상층액을 취해 535 nm 에서 흡광도를 구해 생성된 Malondialdehyde(MDA) 양으로서 지질과산화를 측정하였다.

결 과

1. 비소에 의한 세포 생존률

CHO 세포에 비소를 농도별로 처리한 후 세포 생존률을 구하였다(Table 1). 비소에 의한 세포 생존률은 표 1과 같은데 30 μM에서 50%가 생존하였으며 100 μM에서는 6.2%만이 생존

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

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

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

Table 2. Mutant Frequency(MF) at Different Doses of Arsenic

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

\* Absolute CE=c/P<sub>c</sub>

\* MF/10<sup>5</sup>=m/P<sub>m</sub> × Absolute CE

하였다.

2. 비소에 의한 HGPRT 점 돌연변이

CHO 세포에 비소를 농도별로 처리한 후 HGPRT 좌위에 대한 점 돌연변이 유발을 관찰하였다(Table 2). 1×10<sup>5</sup>개 세포당 Mutant frequency(MF)는 대조군의 0.31보다 30 μM에서는 1.44, 40 μM에서는 1.33, 50 μM에서는 0.91로 약간 증가되었으나 100 μM에서는 0.41로 다시 감소되어 양-반응 관계가 보이지 않았으며 비소에 의한 HGPRT 점 돌연변이는 약하게 유발되었다고 볼 수 있겠다.

3. 비소에 의한 염색체 이상

CHO 세포의 G<sub>1</sub> 시기에 비소를 농도별로 처리한 후 염색체 이상을 나타내는 세포 비율을 구하였다(Table 3). 처리한 비소의 농도가 증가함에 따라 염색체 이상이 증가되는 경향이 나타났다(P<0.01). 비소에 의해 유발되는 염색체 이상은 농도별로 보았을때 염색체형(Chromosome type)은 약간 증가된 반면 염색분체형(Chromatid type)의 이상이 크게 증가되었으며 주로 결실형(Deletion)이 많았으나 특이하게 교환형(Exchange)도 증가되었다.

4. 비소의 배양추출물에 의한 자매염색체 교환

CHO 세포에 비소를 10, 20 μM의 농도로 처리하여 18시간을 배양시킨 후 분리해낸 배양추출물을 다시 새로운 CHO 세포에 처리하여 36시간 배양 후에 자매염색체 교환 빈도를 비교하였다(Table 4, Figure 1). 배양액(Media)의 배양추출물은 대조군의 배양추출물의 세포당 자매염색체 교환 빈도와 비슷한 수준을 나타냄으로써 배양액 자체에 의한 영향은 배제할 수 있었으며 세포에 비소를 10, 20 μM의 농도로 처리하여 분

**Table 3.** The Frequency of Chromosome Aberration Induced by Arsenic

Dose of Arsenic Treated ( $\mu\text{M}$ )	No. of Cells Counted	Percent of Aberration Cells	Structural Aberration / 100 cells					
			Chromatid Type			Chromosome Type		
			Exchange	Deletion	Total <sup>a)</sup>	Exchange	Deletion	Total <sup>a)</sup>
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

<sup>a)</sup>Each datum is the mean and standard deviation of independent experiments.

**Table 4.** Effect of Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Arsenic on the SCE Frequency in CHO Cells

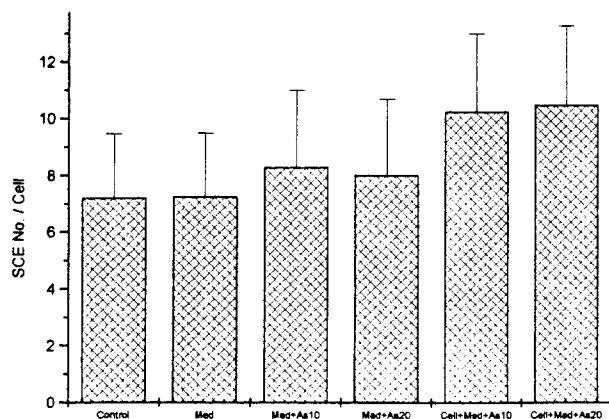
Type of Ultrafiltrates( $\mu\text{M}$ ) <sup>a)</sup>	No. of Cells counted	Total Chromosome	Total SCE	SCE/Cell (M $\pm$ S.D.)	SCE/Chromosome (M $\pm$ S.D.)
Cell+Med(Control)	50	956	360	7.20 $\pm$ 2.27	0.348 $\pm$ 0.143
Med <sup>b)</sup>	50	950	362	7.24 $\pm$ 2.25	0.373 $\pm$ 0.132
Med+AS 10	50	951	414	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

<sup>a)</sup> Concentrated ultrafiltrates of media from CHO cells treated with Arsenic.

<sup>b)</sup> Media

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

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



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

리한 배양추출물에 의한 세포당 자매염색체 교환 빈도는 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  $\mu\text{M}$ 의 농도만을 처리하고 분리한 배양액에 의해서도 세포당 자매염색

**Table 5.** Effect of Arsenic on Lipid Peroxidation in CHO Cells

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

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

체 교환 빈도는 대조군의 7.20에 대하여 각각 8.28, 8.0으로 증가하였고 10  $\mu\text{M}$ 에서는 통계적으로 유의하였다( $p < 0.05$ ). 그러므로 filter에서 비소가 완전히 걸리지 않아서, 분리한 배양추출물 내에 비소가 잔존하여 독성을 유발하였다는 동일한 조건의 가정 하에서 배양액과 비소 10  $\mu\text{M}$ 농도 처리군에 대하여 배양액과 비소 10  $\mu\text{M}$ 농도와 세포를 처리한 군에서의 세포당 자매염색체 교환 빈도가 8.28에서 10.24로 유의하게 증가하였으며( $p < 0.01$ ) 비소 20  $\mu\text{M}$ 의 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  $\mu\text{M}$ 과 20

$\mu\text{M}$ 의 농도에서의 배양추출물에 의한 세포당 자매염색체 교환 빈도는 각각 10.24, 10.46으로 유의한 차이가 없어서 비소의 처리농도에 따른 배양추출물의 세포당 자매염색체 교환 빈도는 양-반응 관계가 나타나지 않았다.

## 5. 비소에 의한 지질과산화

CHO 세포에 비소를 농도별로 처리한 후 18시간후에 TBA 분석을 시행하여 지질과산화에 의해 생성된 MDA의 양을 측정하였다(Table 5). 대조군에서 생성된 MDA의 양인 4.66에 대하여 농도가 증가할수록 각각 7.01, 7.67, 10.12, 17.01로 증가하는 경향을 나타냈다.

## 고 찰

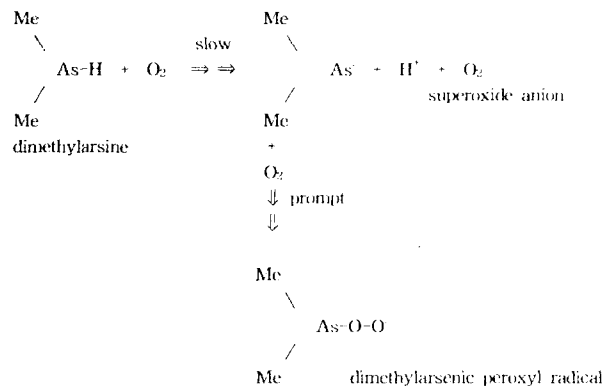
중금속 전반에 관한 세포독성기전에 대해서는 지금까지도 구체적으로 알려져 있지 않은 실정이며 금속이온에서도 산소자유라디칼들이 생성된다는 사실이 밝혀진 이후 이를 매개로 한 세포의 산화적 손상기전에 대한 연구들이 진행되어왔다. 최근 연구에서 대부분의 금속 이온이 DNA와 covalent adduct를 형성하지 않는다는 사실(Klein *et al.*, 1991)이 밝혀져서 금속에 의한 돌연변이 유발과정에는 반응성이 큰 산소자유라디칼의 생성이 관여된다는 것을 시사하였다. 이러한 산소자유라디칼들은 노화와 암유발 과정에서도 중요한 역할을 담당한다고 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 처리농도인  $50 \mu\text{M}$ 에서 염색체 이상을 나타내는 세포 비율이 34%를 보임으로써 사람립프구의  $2.3 \mu\text{M}$ 의 농도에서 73%를 보이는 결과와는 차이가 있었다. 또, 사람립프구에서 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  $10 \mu\text{M}$ 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 손상

의 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 중간대개물질들(CF)이 핵으로 확산되어서 DNA와 주변 세포와 조직에까지 간접적으로 손상을 일으킨다는 것이다. 지금까지 비소의 세포독성에 중요한 역할을 담당한다고 알려진 산소자유라디칼은  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (superoxide anion)과  $\text{As-O-O}^{\cdot}$  (dimethylarsenic peroxy radical)이다.  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 은 염색체 이상과 자매염색체 교환을 유도할 수 있는데 어떻게 세포질에 풍부한 intracellular SOD에 의해 무력화되지 않고 세포막을 거쳐 핵까지 도달하여 독성을 유발할 수 있는지에 대하여  $\text{O}_2^{\cdot-}$  자체에 의한 효과가 아니라 효율적인 무력화 기전이 존재하지 않는 OH $^{\cdot}$  radical로의 전환에 의해서라는 가능성과 또 한 가지로  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 로부터의 다른 이차적인 radical들의 생성에 의해 CF류의 이차적인 손상 유발물질들이 생성되면 이들이 DNA에 작용한다고 보고하여서  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 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  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 을 생성할 가능성이 크기 때문이다. 그러나 DNA 외가닥 절단을 일으킨다고 알려진 dimethylarsine의 독성이 SOD를 처리하여도 크게 감소되지 않은 점으로  $\text{O}_2^{\cdot-}$  이외의 다른 radical들의 관련에 대한 가능성이 대두되기 시작하였으며 따라서 dimethylarsenic peroxy radical의 영향력이 제기되었다. dimethylarsine과 산소가 느리게 반응하면  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 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 특징으로서 CF에 의해서는 주로 염색분체형 염색체 이상이 관찰된다는 사실이다. 즉 직접적인 작용으로 초기에 DNA가 손상이 되면 염색분체형 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 adduct을 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 지질과산화산물인 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 될지도 모르며 동시에 지질과산화산물이기도 한 MDA 양을 측정할 결과 비소의 농도가 증

가함에 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 작은 분자이기 때문에 CF의 분리과정 중 YM 2 filter 밑으로 빠져서 검출되지 않았으며 100 nM의 농도까지도 사람림프구 배양에서 염색체에 손상을 주지 않았다고 한다. aldehyde계통의 지질과산화산물인 4-Hydroxynonenal(HNE)은 다른 농종 aldehyde류 보다 긴 생활사를 가지며 0.1  $\mu\text{M}$  이하의 농도에서도 염색체 이상을 나타내는 비율이 13%나 관찰되었던 점, 주로 염색체형 이상을 유발하였다는 사실 뿐만 아니라 본 실험에서 지질과산화산물로 측정할 MDA와 비교하여도 MDA 10  $\mu\text{M}$  농도에서 염색체 이상을 나타내는 세포 비율인 2.8%에 대하여 4-HNE 10  $\mu\text{M}$  농도에서는 17.8%를 차지해 4-HNE가 MDA보다 더 세포독성능력이 크다는 사실로서 강력한 CF 구성성분 중의 하나일 것이라고 추정하고 있다(Emerit et al., 1991).

이상의 결과들으로써 비소에 의해 CF가 생성되고 지질과산화가 발생하였다는 결과는 아직까지 중금속 분야에 있어서 논란 중인 중금속의 세포독성기전과 중금속 대상으로는 입증되지 못한 CF의 형성 유무와 독성능력에 대한 증명 뿐만 아니라 중금속 전반에 관한 세포의 산화적 손상기전의 가능성에 대한 증거가 되리라 생각한다. 그러나 비소에 의한 세포의 산화적 손상기전에 관한 명확한 확증을 내리기 위해서는  $\text{O}_2^{\cdot -}$ 의 관련을 입증하기 위한 항산화제인 SOD 처리시의 효과, CF 성분이 상온에서 불안정하기 때문에 시행상에 문제가 있는 HPLC분석을 이용한 CF의 구성성분에 대한 확인 등의 연구들이 필요하다.

## 감사의 말씀

본 논문은 1996년도 산업보건연구원의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Ames, B.N., (1993) : Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative disease, *Science* **221**:1256-1264.
- Amstad, P., A.Levy, I.Emerit, and P.Cerutti, (1984) :

- Evidence for membrane-mediated chromosomal damages by aflatoxin B<sub>1</sub> in human lymphocyte, *Carcinogenesis* **5**: 719.
- Borenfreund, E. and J. A. Puerner, (1983) : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays, *J. Tissue Culture Methods* **9**:7-9.
- 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.
- Cerrutti, P.A., (1985) : Prooxidant states and tumor promotion, *Science* **227**:375-381.
- Chung, H.W. and H.J. Kim, (1995) : Mechanism of asbestos-induced chromosome aberration in CHO cells, *Korean J. Toxicol.* **11**(1):117-125.
- 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.
- Emerit, I. and Peter A. Cerutti, (1982) : Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**: 7509-7513.
- Emerit, I. and L. M. Madelaine, (1989) : Mutagenic effects of TPA-induced clastogenic factor in chinese hamster cells, *Mut. Res.* **214**:97-104.
- Emerit, I., S. H. Khan, and H. Esterbauer, (1991) : Hydroxynonenal, a component of clastogenic factors?, *Free Radical Biology and Medicine* **10**:371-377.
- Emerit, I., (1993) : Membrane-mediated chromosome damage and formation of clastogenic factors, Membrane Lipid Oxidation Vol. 3, CRC press, 33-43.
- Fulvio, V., M. Matilde, and S. Alex, (1991) : Membrane hydroperoxides, *Oxidative Stress*, 318-396.
- 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. Health. Perspec.* **102**(S3) : 281-284.
- 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.
- 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.
- Joenje, H., (1989) : Genetic toxicology of oxygen, *Mut.Res.* **219**:193-208.
- Johan, G., P. Gille, and H. Joenje, (1993) : Biological significance of oxygenotoxicity, An introduction, Membrane Lipid Oxidation Vol. 3, CRC press, 1-31.
- Kasprzak, K.S., (1991) : The role oxidative damage in metal carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* **4**:604-618.
- Kenzo Yamanaka, Mikio Hoshino, Mayumi Okamoto, Ryoji Sawamura, Akira Hasegawa, and Shoji 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. Communi.* **168**:58-64.
- Klein, C. B., K. Frenkel, and M. Costa, (1991) : The role of oxidative process in metal carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* **4**:592-604.
- 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.
- 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.
- 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 phosphoribosyl transferase gene mutation assay, *Mut. Res.* **189**:135-141.
- McBride, T.J., B. D. Preston, and L. A. Loeb, (1991) : Mutagenic spectrum resultary from DNA damage by oxygen radicals, *Biochemistry* **30**:201-213.
- Mukai, F. H., D. Bernard, and Goldstain, (1976) : Mutagenicity of malondialdehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids, *Science* **191**:868-869.
- Nordenson, I. and L. Beckman, (1991) : Is the genotoxic effect of arsenic mediated by oxygen free radicals ?, *Hum. Hered.* **41**:71-73.
- Perry, P. and H. J. Evans, (1975) : Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange, *Nature* **258**(13):121-125.
- Perry, P. and S. Wolff, (1974) : New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature(London)* **251**:156-158.
- 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.
- 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.
- Worton, R. G. and C. Duff, (1979) : Karyotyping, Cell Culture(Methods in Enzymology) Vol. LVIII, Academic Press, 322-343.