

크롬에 의한 CHO 세포의 세포독성기전에 관한 연구

기혜성 · 손은희 · 유일재* · 맹승희* · 정해원
서울대학교 보건대학원, *산업보건연구원

Chromium-Induced Cytotoxicity in CHO Cells

Hye-Sung Kee, Eun-Hee Sohn, Il-Je Yu*, Seung-Hee Maeng* and Hai-Won Chung
School of Public Health, Seoul National University
*Industrial Health Research Institute

ABSTRACT

The present experiment was carried out to examine the mechanism of cytotoxicity of Chromium in CHO cells. Chromium induced chromosomal aberrations in a dose-dependent manner. The most frequent type of aberration was chromatid deletions and chromosome type exchanges were also observed. Ultrafiltrates of culture media from CHO cells treated with Chromium induced sister chromatid exchanges(SCE) in CHO cells and Chromium induced lipid peroxidation. It was suggested that indirect effect through formation of clastogenic factor(CF) as well as direct effect on DNA might contribute to the cytotoxicity of Chromium.

Keywords : Chromium, chromosomal aberrations, clastogenic factor(CF), sister chromatid exchanges (SCE), lipid peroxidation

I. 서 론

중금속에 관한 세포독성기전에 대해서는 지금까지도 구체적으로 알려져 있지 않은 실정이지만 금속이온에서도 산소자유라디칼(oxygen free radical)들이 생성된다는 사실이 밝혀진 이후 이를 매개로한 세포독성기전들에 대한 연구들이 진행되어왔다. 최근 연구에서 대부분의 금속이온이 DNA와 covalent adduct을 형성하지 않는다는 사실이 밝혀져서 금속에 의한 돌연변이 유발과정에는 반응성이 큰 산소자유라디칼의 생성이 관여되리라는 것을 시사하였다.¹⁾ 중금속에 의한 염색체 이상 유발이나 DNA 절단 등에서 금속의 중간매개물질이나 산소자유라디칼이 직접 DNA에 작용함으로써 나타나지 않고 산소자유라디칼이 관여된 간접적인 작용으로 나타나게 되면 염색체 이상 유발물질인 CF(clastogenic factor)가 존재할 가능성이 있다.²⁾ 또한 정 등(1996)³⁾은 비소에서

분리한 배양추출물이 독성을 유발한다는 사실을 확인함으로써 중금속에서의 CF 생성가능성을 제시하였다. 크롬(Chromium)은 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 알려져있다. 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 유전적 독성의 기전은 아직도 완전히 이해되지 못한 실정이다.

* 본 논문은 1996년도 산업보건연구원의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

Cr(VI)은 세포막을 가로질러 능동수송되고 반응성있는 Cr(IV), Cr(V) 중간매개물질을 거쳐서 세포내에서 생성된 안정성있는 Cr(III) 종으로 환원되어진다. 이런 과정동안 산화적인 DNA 손상 및 크롬으로 유도된 DNA-단백질 가교가 생성되며 수많은 target gene들에서 점 돌연변이(point mutation)가 유도된다.^{4,5)} 그러나 궁극적인 돌연변이원이 크롬매개물질들인지, 크롬의 환원과정동안 생성된 산소자유라디칼인지는 아직 분명치 않아서 크롬으로 유도되는 돌연변이과정의 기전은 여전히 불명확하다.⁶⁾ 본 연구는 크롬의 세포독성기전이 DNA에 대한 직접작용에 의한 것인지 또는 세포막이 매개하는 CF에 의한 간접작용에 의한 것인지를 확인하기 위해 시행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양

CHO-K₁ 세포를 10% 우태아 혈청이 포함된 McCoy's 5A 배지에서 5% CO₂가 공급되는 항온기에 배양하였다.

2. 세포생존률

6가크롬인 K₂Cr₂O₇을 10, 20, 30, 50, 및 100 μM의 농도로 CHO 세포에 처리하고 3시간 후 인산완충용액으로 2번 세척한다음 15시간 추가배양한후 각 농도군에서 200개의 세포를 취해 petri dish에서 7-9일동안 배양한후 나타나는 colony를 관찰하였다.

3. 염색체 이상 분석

CHO 세포에 크롬을 5, 10, 및 20 μM의 농도로 3시간 처리하고 인산완충용액으로 세척한후 15시간 추가배양한후 염색체 표본을 작성하였다.

4. 배양추출물의 분리과 자매염색체 교환분석

CHO 세포에 크롬을 10 μM의 농도로 처리하고 18시간 배양한후 배양액을 수거하여 150 g에서 6분간 원심분리한다음 상층액을 Diaflo Ultrafiltration을 시행하여 분자량 1,000-10,000 dalton사이의 물질을 40배 농도(500 μl)로 농축추출하였다. 이 배양추출물을 새로운 CHO 세포에 처리하고 5-Bromo-2-deoxyuridine에 36시간 노출시킨후 염색하여 50개의 세포를 임의로 선택하여 관찰하였다.^{7,8)}

5. 지질과산화

CHO 세포에 크롬을 10, 20, 및 30 μM의 농도로 처리하여 배양한후 세포를 수거하여 homogenizer로 분쇄한 후 Thiobarbituric acid(TBA)와의 반응으로 생성되는 Malondialdehyde(MDA) 양을 측정하였다.⁹⁾

III. 결 과

CHO 세포에 크롬을 농도별로 처리한후 세포생존률을 구하였는데(Table 1) 크롬의 농도가 증가함에 따라 세포생존률이 감소하였다(P<0.01).

CHO 세포의 G₁시기에 크롬을 농도별로 처리한후의 염색체 이상빈도는 Table 2와 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.

CHO 세포에 크롬을 10 μM의 농도로 처리하여 18시간을 배양시킨후 분리해낸 배양추출물을 다시 새로운 CHO 세포에 처리하여 36시간 배양후에 자매염색체 교환빈도를 비교하였다(Table 3, Figure 1). 크롬의 농도를 10 μM로 정한 이유는 생존률은 97.4%로 꽤 높으나 100개 세포당 염색체 이상 세포비율이 10.7%로 비소 실험시의 20 μM의 11.0%와 비슷하기 때문이었다. Table 3, Fig. 1에서 보논바와 같이 세포당 자매염색체 교환빈도가 Med+Cr10 군에 비하여 Med+Cell+Cr10군이 더 유의하게 높은 것으로보아(P<0.05), 세포와의 작용으로 Med+Cell+Cr10군에서 CF라 추측되는 물질이 생성되었을 것으로 생각된다.

CHO 세포에 크롬을 농도별로 처리한후 18시간후에 TBA 분석을 시행하여 지질과산화에 의해 생성된 MDA의 양을 측정할 결과는 Table 4와 같다. 크

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

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

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

Table 2. The Frequency of Chromosome Aberration Induced by Chromium

Dose of Chromium Treated(μM)	No. of Cells Counted	Percent of Aberrant 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 3. Effect of Concentrated Ultrafiltrates of Media from CHO Cells Treated with Chromium on the SCE Frequency in CHO Cells

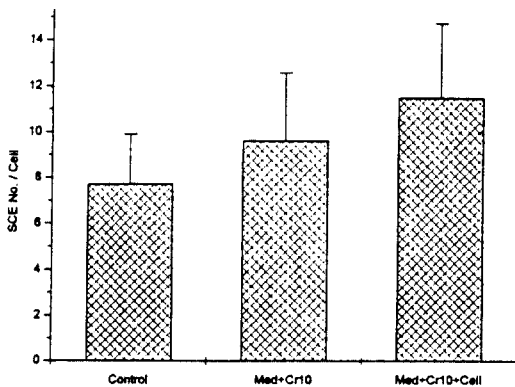
Type of ^{a)} Ultrafiltrates(μM)	No. of Cells Counted	Total Chromosome	Total SCE	SCE/Cell (M \pm S.D.)	SCE/Chromosome (M \pm S.D.)
Med ^{b)} +Cell(Control)	50	962	386	7.72 \pm 2.19	0.381 \pm 0.139
Med+Cr10	50	974	482	9.64 \pm 2.96	0.483 \pm 0.167
Med+Cell+Cr10	50	968	575	11.50 \pm 3.25*	0.595 \pm 0.170

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

^{b)} Media

* Observed value is significantly higher than Med+Cr10 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 Chromium on the SCE Frequency in CHO Cells.

롬의 농도에 따라 증가하는 경향을 보여주고 있지만 최고 농도인 30 μM 에서는 오히려 감소하였는데 이는 크롬의 세포독성때문에 세포가 치사하였기 때문이라 추정된다.

IV. 고 찰

크롬은 지각에 풍부한 원소로서 주로 다른 원소와

Table 4. Effect of Chromium on Lipid Peroxidation in CHO cells

Dose of Chromium Treated(μM)	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

의 결합형(combined form)으로 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 $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$, CrCl_3 , $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 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 HGP-

RT 유전좌위 점 돌연변이를 유발하였다. 반면 Cr(III)인 $\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COO})_3$ 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 원자가의 크롬에서도 연구자에 따라 그 결과가 상이하다는 것을 알 수 있었다.⁴⁵⁾

크롬의 돌연변이 및 세포독성기전이 크롬의 중간 매개물질들이나 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 가교 형성을 유발시킨다는 연구 보고가 있다.¹⁰⁾ 크롬에 의한 산화적 손상은 크롬에 의해 생성되어진 산소자유라디칼($\cdot\text{OH}$, O_2^-)이 세포막을 공격하여 지질과산화가 유발되어 이차적으로 생성된 중간매개물질이 핵으로 확산되어 DNA와 주변세포, 조직에까지 간접적으로 손상을 미치게 된다. 이 때 생성된 중간매개물질을 CF라 부르는데 이는 이온화방사선 및 PMA(phorbolmyristate acetate),^{11,12)} Aflatoxin¹³⁾ 등의 화학물질 그리고 석면¹⁴⁾과 비소³⁾ 등에 의해서도 생성됨이 보고된 바 있다.

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 염색체 등 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.³⁾ 그러나 크롬의 경우 지질과산화에 의해 생성되는 산물로서의 MDA양은 작았지만 그 외 다른 더 독성력이 강

한 산물들의 관련 가능성을 추측해 볼 수 있다. 또한 그 성분이 바로 CF의 주요 구성성분일 것이라는 가정도 가능하다.¹⁵⁻¹⁸⁾ 지금까지 Cr(VI)이 Cr(III)으로 환원되어 DNA에 직접결합에 의한 손상을 주어 유전독성을 나타내는 것으로 알려져 있지만¹⁰⁾ 본 실험 결과 산화적 손상에 의해 세포막이 관여하는 CF에 의한 간접작용에 의해서도 나타날 수 있다는 것을 추정해 볼 수 있었다. 더 나아가 세포의 산화적 손상 기전에 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 시행되어져야 할 것이다.

V. 요약 및 결론

크롬의 세포독성기전을 규명하기위해 CHO 세포에 크롬을 처리한 후 염색체 이상빈도 및 지질과산화 정도의 변화를 조사하였으며, CHO 세포에 크롬을 처리하고 배양후 분리한 배양추출물이 자매염색체 교환을 유발하는가를 조사하였다.

본 연구의 주요 결과는 다음과 같다.

1. 크롬처리에 의해 염색체 이상빈도가 용량에 따라 증가하였으며, 염색분체형 결실이 가장 많이 나타났다. 염색체형 교환형인 이동원염색체의 증가도 관찰되었다. 또한 크롬은 CHO 세포에서 지질과산화를 유발하였다.

2. CHO 세포에 크롬을 10 μM 의 농도로 처리하고 18시간 배양후 ultrafiltration을 이용 분자량 1,000-10,000 dalton 사이의 물질을 분리하였으며 이 배양추출물은 자매염색체 교환빈도를 증가시켰다.

이상의 결과를 볼 때 크롬의 세포독성기전은 DNA에 대한 직접작용외에 clastogenic factor(CF)에 의한 간접작용이 관여하리라는 것을 추정할 수 있었다.

참고문헌

- 1) Klein, C. B., Frenkel, K. and Costa, M. : The role of oxidative process in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 592-604, 1991.
- 2) Emerit, I. : Membrane-mediated chromosome damage and formation of clastogenic factors. *Membrane Lipid Oxidation Vol. 3*, CRC press, p. 33-43, 1993.

- 3) Chung, H.W., Kee, H. S., Park, Y. C., Han, J. H. and Yu, I. J. : Mechanism of Arsenic-induced cytotoxicity in CHO cells. *Environ. Mutagen & Carcinogen*, **16**(2), 117-123, 1996.
- 4) Leonard, A. and Lauwerys, R. R. : Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. *Mutat. Res.*, **76**, 227-239, 1980.
- 5) De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. and Zanacchi, P. : Genotoxicity of chromium compounds : A review. *Mutat. Res.*, **238**, 99-172, 1990.
- 6) Shi, X. and Dalal, N. S. : Generation of hydroxyl radical by chromate in biologically relevant systems. *Environ. Health Perspect.*, 102(Suppl 3), 231-236, 1994.
- 7) Perry, P. and Evans, H. J. : Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature(London)*, **258**, 121-125, 1975.
- 8) Perry, P. and Wolff, S. : New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature(London)*, **251**, 156-158, 1974.
- 9) Martha, S., Sandy, M., Peter R. and Martyn T. S. : Role of redox cycling and lipid peroxidation in bipyridyl herbicide cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 3095-3101, 1986.
- 10) Show, E.T. : A possible role for chromium(III) in genotoxicity. *Environ. Health Perspect.*, **92**, 75-81, 1991.
- 11) Emerit, I. and Cerutti, P. A. : Tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces a clastogenic factor in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 7509-7513, 1982.
- 12) Emerit, I. and Madelaine, L. M. : Mutagenic effects of TPA-induced clastogenic factor in chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, **214**, 97-104, 1989.
- 13) Amstad, P., Levy, A., Emerit, I. and Cerrutti, P. : Evidence for membrane-mediated chromosomal damages by aflatoxin B1 in human lymphocyte. *Carcinogenesis*, **5**, **719**, 1984.
- 14) H. J. Kim and H. W. Chung : Mechanism of asbestos induced chromosome aberration in CHO cells. *Korean J. Toxicol.*, **11**, 117-125, 1995.
- 15) Brambilla, G., Sciaba, L., Faggini, P., Maura, A., Marinari, V. M., Ferro, M. and Esterbauer, H. : Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister chromatid exchange in chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutat. Res.*, **171**, 169-176, 1986.
- 16) Emerit, I., Khan, S. H. and Esterbauer, H. : Hydroxynonenal, a component of clastogenic factors ?. *Free Radical Biology and Medicine*, **10**, 371-377, 1991.
- 17) Johan, G., Gille, P. and Joenje, H. : Biological significance of oxygenotoxicity. An introduction, Membrane Lipid Oxidation Vol. 3, CRC press, p. 1-31, 1993.
- 18) Mukai, F. H., Bernard, D. and Goldstein : Mutagenicity of malondialdehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science*, **191**, 868-869, 1976.