

[報 文]

산화성 크롬의 배양세포에서의 독성작용

박 형 숙

한서대학교 환경공학과

Toxic Activities of the Oxidant Chromate in Culture Cells

Hyoung-Sook Park

Hansoo University, Department of Environmental Engineering

ABSTRACT

The ROS-producing potency of chromium compounds of several oxidation states were determined in the H4 cells. $K_2Cr_2O_7$ as Cr(VI), synthetic Cr(V) compounds and Cr(III) as TPP produced high level of ROS. However, ROS values of Cr-picolinate as Cr(III), $CrCl_3$, $CrCl_2$ were almost equal to the control.

The effects of physiological antioxidants compounds which react with free radicals were examined for their effects on chromate-induced production of reactive oxygen species (ROS) in A549 cells after the addition of $K_2Cr_2O_7$. The compounds used were vitamin C (ascorbate), vitamin E (α -tocopherol), superoxide dismutase (SOD) and catalase. The preincubation of ascorbate (200 μ M) with A549 cells for 20 hr resulted in a significant reduction of hexavalent chromate (100 μ M) induced ROS.

However, there is no effects of preincubation of the cells with vitamin E succinate (10 and 20 μ M, 20 hr) on the ROS production.

Also, the effects of Cr(VI) on the cell cycle of A549 cells was measured by adding the DNA intercalating agent, propidium iodide. S phase of the cell cycle was increased by the chromium (VI) compounds up to 20 μ M indicating toxicity or possible mitogenic action of the cell. The shoulder in G₀/G₁ phase at 20 μ M Cr(VI) with 24 hr treatment indicates apoptosis.

서 론

여러 산화형태의 화합물로 존재하는 크롬은 일반적으로는 크롬 6가와 크롬 3가로 존재하며, 그 중 크롬 6가 화합물은 작용 기전이 밝혀지지 않았지만 돌연변이나 발암성 물질로 알려져 왔다.¹⁾ 비발암성의 크롬 3가는 팔면체 (octahedral form with

six ligands)의 양이온으로 존재하며 매우 안정된 형태로서 세포막을 빨리 통과하지 못한다. 반면, 크롬 6가 화합물은 oxides나 oxyanions로 존재하며, 세포막을 쉽게 통과한후 인체내에서 크롬 4가와 5가를 거쳐 안정한 크롬 3가로 환원된다. 합성된 크롬 3가 복합체인 크롬-picolinate는 지용성 유기 음이온 (lipid soluble organic anions)으로 비교적 세포막 통과가 용이하다. 섭취된 크롬이 크롬

3가 상태로 DNA에 결합된 상태로 발견되는 것으로 보아, 크롬 3가 복합체는 핵(nucleus)으로 접근한 후 그곳에서 형성되며, DNA에서 형성된 크롬 3가만이 독성작용이 있다. 크롬 6가 화합물은 환원성 대사작용(metabolic reduction) 없이는 돌연변이성 물질(mutagen)이 아니다.²⁾ 중간 생성물인 크롬 5가나 크롬 4가가 크롬 6가의 잠재적 독성 물질/발암성 물질로서 현재 연구되고 있다. 크롬 6가의 환원에 의해 생성된 크롬 5가가 배양세포와 in vitro 실험에서 EPR에 의해서 발견되어지고 있다.³⁻⁸⁾ 크롬 4가와 크롬 5가가 불균형적으로 생성되는 것으로 보아, 크롬 6가의 환원 과정은 직선적인 단순한 과정이 아니다. DT-diaphorase에 의한 크롬 6가의 2-전자 환원 과정은 in vitro에서 크롬 6가의 돌연 변이성을 저하시킨다.

먼저 발표된 연구에서 A549 폐세포에 $K_2Cr_2O_7$ 을 가한후 발생되는 ROS를 flow cytometer를 사용하여 증명하였으며, EPR spectroscopy를 사용하여 크롬 5가와 동시에 발생된 3개의 밝혀지지않은 free-radical의 발생을 보고한 바 있다.⁸⁾ ROS는 $\cdot OH$ 기, $O_2^{\cdot -}$ 기와 H_2O_2 를 포함하며, 이들은 모두 독성이 있으며 oxidative stress에 기여한다. Oxidative stress는 ROS 발생 후, 결과적으로 조직에 따라 영향받는 피해가 다른 복잡한 상황이다. ROS는 효소의 불활성화, 변이(mutation), 유전자의 재작성,⁹⁾ apoptosis 같은 다양한 종류의 피해를 일으키며 허혈성 조직(ischemic tissue)에 reperfusion injury를 가하는 추정상의 독소이다.¹⁰⁾ Oxidative stress가 크롬 6가 독성작용의 주요 요인 인가는 연구되어지고 있다. 최근 Shi and Dalal¹¹⁾는 크롬 6가의 환원과정 중 발생하는 크롬 5가 복합체를 증명했으며, Fenton-like 반응에서 H_2O_2 와 작용하여 $\cdot OH$ 기를 발생하였고, 그 크롬 6가 복합체는 또한 redox-cycle을 한다. 그러므로 생체내에서 이들 종류 중의 어느 하나의 효과를 분리 한다는 것은 어렵다.

이번 연구의 목적은 A549 폐세포와 H4 간세포에서 크롬이 유발한 ROS 생성과 비타민 C 및 비타민 E를 포함한 산화방지제의 효과를 연구하며, 또한 크롬 6가가 A549 세포 cell-cycle에 미치는 영향을 연구하였다. A549 세포는 사람의 폐포 상피 조직 암세포이며 H4 세포는 쥐 hepatoma 세포이다. 크롬이 유발하는 발암과정은 주로 폐에서 일어

나며 간은 생체이물질 대사의 주요 기관이다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 시약

실험에 사용된 A549 세포와 H4 세포 모두 American Type Culture Collection (Rockville, MD)으로 부터 구입하였다. A549 세포는 human type II alveolar epithelial 폐세포로 부터 유래된 tumor 세포로서 단층으로 증식되며, H4 세포는 쥐의 hepatoma 세포이다. 이들 세포들은 95% 공기와 5% CO_2 가 공급되는 배양관에서 적당한 습도에 10% heat-inactivated fetal calf serum이 첨가되고 페니실린 (90 ug/ml)과 streptomycin (90 U/ml)을 함유한 pH 7.2의 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)으로 A549 세포를, Swims medium으로 H4 세포를 배양하였다. 환원형 2',7' dichlorofluorescein (DCFH), diacetate (DCFH-DA), chromium picolinate (순도 98%), 무기물 형태의 Cr(II)와 Cr(III) chloride, 비타민 등 실험에 사용된 화합물들은 최고의 품질을 사용하였다. 합성된 크롬 화합물은 Krumpole *et al.*에 의한 방법으로¹²⁾ Dr. Saul Shupak에 의해서 합성된 것이다. 특히 비타민 E는 에탄올(혹은 메탄올)에 용해하여 stock solution을 만든 후, DMEM media에 적당히 희석하여 사용하므로써 알콜 농도가 무시할 정도가 되도록한다.

2. 크롬화합물들의 ROS 발생능력의 비교 (H4 세포)

몇가지 산화 형태의 크롬화합물들에 의해 발생된 H_2O_2 (hydrogen peroxide)와 다른 peroxide를 포함한 ROS는 omnichrome 25 mW argon laser가 장비된 Coulter Epics profile II flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeach)를 사용하여 Bass *et al.*¹²⁾에 의한 방법으로 검출하였다. H4 세포 2×10^6 개를 함유한 시험관에 마지막 농도 5 uM의 염료 DCFH-DA를 가해 2.2 ml로 한 후 37°C에서 20분간 흔들어 염료가 세포내로 흡수되면 세포내 esterases에 의해 acetate기가 제거된다. 크롬화합물들을 가해준 후 혼합물들을 37°C에서 20분간 배양시킨 후 발생하는 ROS는 산화형 2, '7' - dichlorofluorescein (DCF)의 형광성을 flow cyto-

meter로 측정한다. DCF는 488 nm에서 활성화되며 형광성은 525 nm low band pass filter를 사용하여 검출되었다. 크롬 화합물들을 가한 후 발생하는 ROS는 10분 간격으로 약 60분간 측정하였으며 실험 20~30분에서 최대치를 나타내었다. 다음과 같은 크롬화합물들이 10, 30, 100, 300 uM (크롬 양으로 계산된 마지막 농도) 농도로 H4세포에 가해졌다: (1) CrCl₂; (2) 3가 크롬으로 a. 무기형 CrCl₂ [Cr(III)] b. Cr(III) picolinate [pic], c. 합성된 화합물, Cr(III) tetraphenylporphyrin chloride complex [TPP]; (3) 합성된 sodium bis(2-hydroxy-2-methyl butyrate)oxo chromate V [Cr(V)], (4) potassium dichromate, K₂Cr₂O₇, [Cr(VI)]. Pic는 크롬 3가의 6개 ligand 위치 중 3개를 picolinate 음이온이 결합된 복합체이다. 무기형 chromium chloride에 비하여 Pic와 TPP는 증가된 세포막 투과성을 가지고 있다. ROS치의 계산은 Coulter software, EPICS CYTOLOGIC을 사용하여 분석하였다. Positive control ROS는 H₂O₂와 phorbol myristic acetate를 사용해서 측정하였다.

3. 크롬 6가 투여후 발생된 ROS에 미치는 항산화성 비타민 및 Catalase, SOD의 영향 (A549 세포)

비독성농도의 vitamin C (ascorbate)와 vitamin E (α-tocopherol as succinate)가 ROS 발생 실험에 사용되었다. 먼저 퍼센트 cell growth를 측정할 cell cytotoxicity 실험을 하였다. 즉, 여러농도의 vitamin C (10~500 uM)와 vitamin E (5-100 uM)를 A549 세포와 20시간 배양시킨 후에 coulter counter에 살아있는 세포의 수를 세어 control 세포와 비교함으로써 vitamin의 비독성 농도의 범위를 결정하였다. Viability (생존능력)는 trypan blue exclusion test에 의해서 결정되었다. 비타민 C (ascorbate)농도 300 uM까지는 A549 세포에 독성효과가 없었으나, 반면 비타민 E는 20 uM 농도 이상에서 독성작용을 보였다 (20 uM에서 84% 생존, Table 2 볼 것). 그러므로 20 uM의 비타민 E 농도와 200 uM 이상의 비타민 C 농도가 이 실험에 사용되었다. 첫 번째 group의 실험에서, A549 세포에 비타민 C는 final conc. 200 uM로 하고 비타민 E는 10과 20 uM을 가해서 20시간 배양하였다.

다음 세포들을 harvest 한 후 phosphate 완충용액에 준비한다. Potassium dichromate를 가한 후 (100 uM과 200 uM) 20분에 발생하는 ROS를 측정하였다. Control sample은 phosphate-buffer 혹은 적당한 비타민 함유한 것을 사용하였다. 두번째 group의 실험에서는 성장단계의 세포들을 준비한

Table 1. Effects of Chromium Species on ROS Production of H4 Cells.

Sample conc:				
μM	Mean fluorescence	Log conversion	Percent positive	
Pic				
10	114.01	6.19	-	
30	106.33	4.64	-	
100	92.71	2.91	-	
300	86.60	2.34	-	
CrVI				
10	116.97	6.90	1.65	
30	125.39	9.19	16.95	
100	129.77	11.00	25.90	
300	142.84	17.57	47.63	
CrCl₂				
10	119.78	7.69	9.79	
30	112.74	5.99	-	
100	113.52	6.19	-	
300	112.84	5.99	-	
CrCl₂				
10	112.90	5.99	-	
30	110.90	5.56	-	
100	104.20	4.32	-	
300	97.40	3.36	-	
TPP				
10	178.73	64.15	83.82	
30	193.42	106.20	91.62	
100	172.35	49.87	79.86	
300	156.12	28.04	64.23	
CrV				
10	148.95	21.80	58.82	
30	154.59	27.05	58.94	
100	174.68	55.55	78.46	
300	190.78	98.78	85.19	
Control				
1	116.27	6.65	-	
2	137.65	14.67	-	

Values were obtained using EPICS CYTOLOGIC. Readings were taken 20 min after addition of chromium compounds. See Text for details.

Pic-Cr picolinate (Cr III)
 TPP-tetraphenylporphyrin, Cr(III).
 Cr V-sodium bis(2-hydroxy-2-methyl butyrate) oxo-chromate V.
 Cr VI-potassium dichromate.
 Concentrations are for Cr content.

후 dichromate를 가하기 1시간 전에 비타민 C (200 μ M)와/혹은 비타민 E (20 μ M)을 가한다. 세포에 가해진 비타민을 extracellular 용액에서 제거하지 않은 상태에서 dichromate 를 가한 후 20분 후 발생하는 ROS를 측정하였다.

한편, 항산화제 Catalase (1000 units)와/혹은 SOD (100 units)가 크롬 6가의 ROS발생에 영향을 주는가를 알기 위하여 90분간 A549 세포와 37°C에서 배양 시킨 후 dichromate (100 μ M)를 가하였다. PBS 완충용액, 각각의 효소로 처리한 세포를 control로 사용하였다. 크롬 6가 혹은 항산화제만을 염료에 가했을 경우, Perkins-Elmer fluorimeter에서 측정한 결과 (data는 첨부하지 않음) 염료의 산화 상태에는 효과를 주지 않았다.

4. Cell Cycle에 미치는 크롬 6가의 효과 (A549 세포)

$K_2Cr_2O_7$ 이 A549 세포 cell cycle의 특정단계에 작용하는 가를 알아보기 위하여 630 nm에서 형광하는 DNA-intercalating agent인 propidium iodide를 사용하였다. 성장단계의 A549 세포(약 2×10^6 세포)를 $K_2Cr_2O_7$ (1, 5, 10, 20 μ M)에 3, 24, 48시간 폭로시켰다. 크롬폭로 후 Ca^{2+} , Mg^{2+} 없는 PBS로 2번 씻은 후, trypsinized하고 1.5ml의 Ca^{2+} , Mg^{2+} 없는 PBS에 resuspend 하였다. 세포 부유액을 3ml의 ice-cold EtOH에 가해서 마지막 EtOH의 농도가 70% 되도록 한 후 세포를 고정시킨다. 세포를 centrifuge (1000 rpm)시킨 후 상층액은 버린다. Fixed-cell은 같은 PBS로 두 번 씻어내고, propidium iodide와 sodium citrate 혼합용액 1.0 ml에 resuspend 한다 (50 μ g PI/ml and 0.1% sodiumcitrate solution). RNase (10 μ l, 180 units)를 가한 후 혼합액은 4°C에서 18시간 배양시킨다. 세포들은 세척 후, 1.0 ml-PBS에 resuspend하고 flow-cytometer에서 propidium iodide의 형광성을 630 nm에서 측정한다. DNA양은 Coulter software, Epics Cytologic을 사용하여 분석하였다.

결 과

1. H4 세포에서 크롬화합물들의 ROS 발생능력

Table 1은 몇가지 크롬 화합물들을 H4 세포에

Table 2. Effect of vitamin C and vitamin E on the growth of A549 cells.

Treatment	Concentration	% surviving cells
	μ M	20 hr
Control	-	100
Vitamin C	10	132.0
	20	107.7
	100	95.8
	200	92.2
	300	104.3
Vitamin E	500	13.5
	5	98.4
	10	105.0
	20	84.0
	50	14.1
	100	0

Experiments were carried out in duplicate.

The vitamin was incubated with the A549 cells for 20 hours, cells were then washed and treated as described in the text.

가했을 때 발생한 ROS의 평균치, log transformation, % positive value들을 나타낸다. 결과는 같은 연구를 3번 반복한 것이다. H4 세포에서의 크롬화합물들의 ROS 발생정도는 Table 1에서 보는 바와 같다. 30 μ M과 100 μ M 농도에서): TPP의 크롬 3가 > 크롬 5가 (bis hydroxy carboxylic acid complex) > 크롬 6가 > 크롬 3가 ($CrCl_3$) = 크롬 2가 = picolinate = control의 순서이다. 300 μ M 농도에서는 조금 달라서 크롬 5가 > TPP, 크롬 3가 ($CrCl_3$)이다. 10 μ M에서는 단지 크롬 5가와 TPP만이 background를 약간 웃돌았다. 고농도에서의 크롬 5가와 TPP의 발생능력의 반전현상에도 불구하고 무기형 크롬 2가와 3가 chloride가 background 정도의 ROS치를 보여주고, 같은 3가인 picolinate가 ROS 발생이 없는 반면, 크롬 3가인 TPP 복합체는 ROS를 발생하고 있다. Picolinate와 $CrCl_3$ 는 ROS수치가 완충용액과 같거나 적으므로 많은 실험에서 negative control로 사용된다. 이들 실험 결과는 20분에 최고치를 나타내었다.

2. 크롬 6가 투여 후 발생한 ROS에 미치는 항산화성 비타민 및 Catalase, SOD의 영향 (A549 세포)

먼저 산화방지제인 비타민 C와 비타민 E의 실험은 크게 두 group으로 나누어 수행하였다. 첫번째

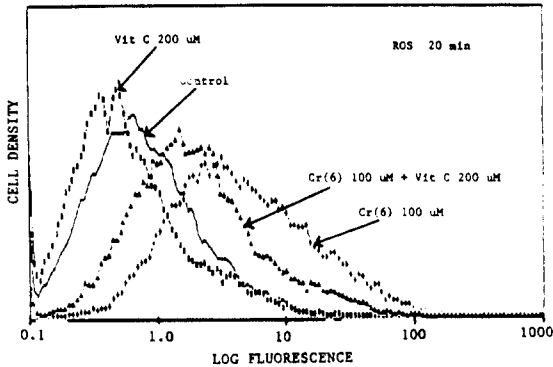


Fig. 1. Effect of Vitamin C on chromate-induced ROS in A549 cells.

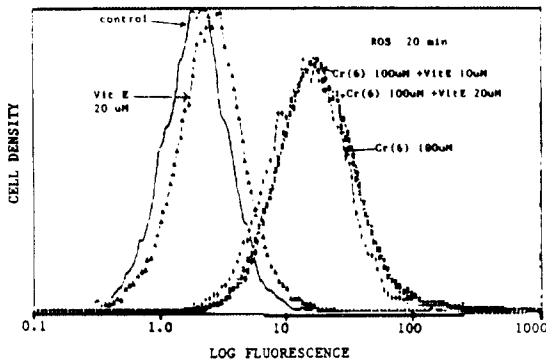


Fig. 2. Effect of Vitamin E succinate on chromate-induced ROS in A549 cells.

group은 A549 세포에 ascorbate (200 μ M)를 20 시간 동안 preincubation 시킨 후에 dichromate를 가해 준 경우인데, 6가 크롬이 (100 μ M) 유발시킨 ROS가 20시간 ascorbate와 preincubation시킨 경우 control 세포보다 상당히 감소되었다 (Fig. 1). 이런결과는 다른 연구에서도 발표된 바와 같이, A549 세포에 의해서 흡수된 ascorbic acid가 생물학적 산화방지제 (biological antioxidant)로 작용한 것을 보여준다. 반면, vitamin E (10 μ M, 20 μ M)를 20 시간 동안 preincubation시킨 A549 세포에서는 크롬이 유발시킨 ROS양에 significant한 효과를 주지 못했다 (Fig. 2). 두 번째 group의 실험은 20시간 preincubation시킨 첫 번째 실험과는 다른 조건에서 행하였다. 즉 정상배양시킨 A549 세포에 vitamin C (200 μ M) 혹은 vitamin C와 vitamin E (10 μ M)를 DCFH 염료를 가하기 60분 전에 가한

후 extracellular medium에 가해진 비타민을 제거 하지 않은채로 크롬 6가를 가해서 발생된 ROS를 측정하였다 (Table 3). 두 번째 group 실험 결과는 크롬만을 세포에 가한 경우보다 비타민 C 혹은 비타민 C와 비타민 E를 가해준 경우 더 많은 ROS 발생이 있었다. 이들 두 group의 실험 결과가 다른 것으로부터, 비타민 C의 효과는 반응시의 조건에 따라 달라진 것을 알 수 있었다.

다음 실험으로 ROS발생에 미치는 catalase와 superoxide dismutase (SOD)의 효과를 알아보았다. Catalase (1000 units)와/혹은 SOD (100 units)가 ROS 발생에 미치는 영향에 대한 결과가 Fig. 3에 나타나 있다. Control 세포에서는 Catalase와/혹은 SOD를 90분간 preincubation 시켰을 때 ROS 발생을 감소시켰다. 그러나, 크롬 6가를 투여한 세포에서는 Catalase와/혹은 SOD를 preincubation시킨 경우 (90분간) 효과가 없었다.

3. Cell-Cycle에 미치는 크롬 6가의 효과

Table 4와 Fig. 4는 potassium dichromate (1, 5, 10, 20 μ M)을 24시간 A549 세포에 투여한 후 flow cytometer에 의해 DNA를 분석한 결과이다.

Table 3. Effect of vitamins C and E on Cr-induced ROS in lung A549 cells. 60 min preincubation.

sample	ROS(Mean)		
	10 min	20 min	39 min
Control	1.86	2.18	2.32
Chromate(200 μ M)	6.19	8.95	10.52
Vitamin C(200 μ M)	1.98	2.27	2.46
Vitamin C+Chromate	3.24	4.47	4.96
Vitamin E(20 μ M)	1.42	1.74	1.93
Vitamin E+Chromate	4.63	6.72	7.86
Vitamin C+Vitamin E	1.39	1.49	1.48
Vitamin C+Vitamin E+ Chromate	2.57	3.49	3.67

Chromate-potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$. Concentrations are for Cr content (200 μ M in all samples). Values are mean fluorescence, using CYTOLOGIC software. Vitamin were added 60 min prior to addition of the dye. Cells were equilibrated with the dye for 20 min, chromate was then added (zero time) and readings were made at the times indicated. Vitamin concentrations were constant.

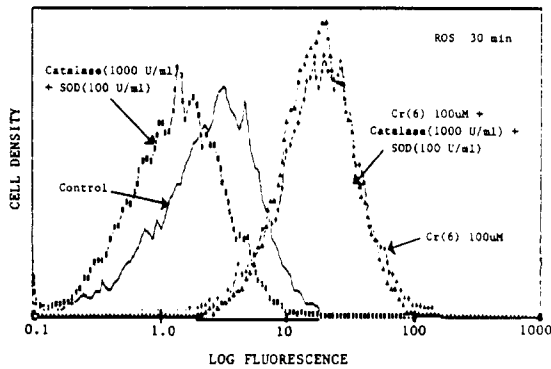


Fig. 3. Effect of Catalase/SOD on ROS in A549 cells.

Table 4. Effects of Potassium Dichromate on Cell Cycle Progression in A549 Cells.

K-Cr ₂ O ₇	Percentage of cells in cell cycle		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ +M
untreated	61.9	27.0	10.7
1 μ M	54.7	31.0	14.4
5 μ M	48.9	30.5	20.4
10 μ M	45.6	43.5	11.1
20 μ M	75.3	22.5	negligible

Logarithmically growing cells were treated with 1, 5, 10 and 20 μ M potassium dichromate for 24 hr. Values were obtained using CYTOLOGIC software. See text for details.

현 실험 조건하에서 A549 세포 cell cycle의 S phase의 양은 크롬 6가 투여 후 증가했으며, 크롬 농도 20 μ M에 까지 증가하였다. 크롬 농도 10 μ M에서 G₂+M 부분이 증가된 것은 독성작용을 나타내며 이는 dichromate가 10 μ M에서 독성작용이 있다는 이전 발표와도 일치된다. 20 μ M 크롬 6가를 24시간 처치시 왼쪽 G₀/G₁ phase에 눈에 띄게 돌출된 shoulder는 apoptosis를 나타낸다 (Fig. 4). 결과를 나타내지는 않았으나 농도 20 μ M dichromate에서 48시간 투여시, untreated 세포 11.5%에서 31%로 S phase가 증가하였다.

토 론

이 연구는 다양한 종류의 크롬화합물을 배양세포에 처치한 후 ROS 발생에 미치는 조건을 결정하

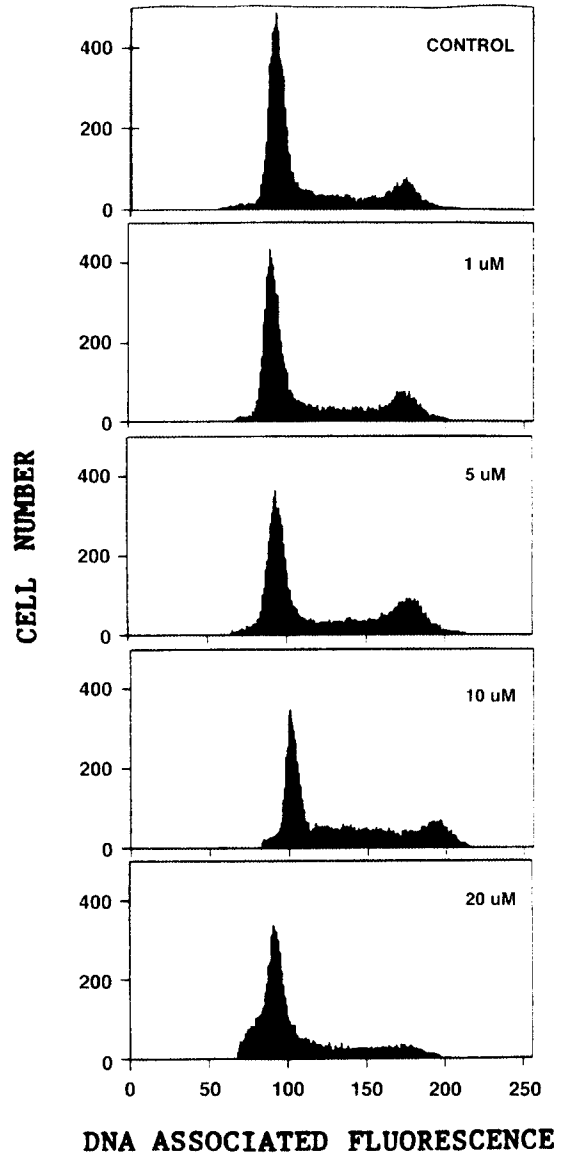


Fig. 4. DNA patterns after dichromate exposure. Exposure of the cells to dichromate was for 24 hr.

고, cell cycle에 대한 크롬 6가의 효과를 연구하기 위해서 수행되었다. 합성된 Cr(III)-porphyrin화합물인 TPP를 H4 세포에 가했을 때 ROS가 발생된 것은 기대 밖의 결과였다. TPP는 비교적 막통과가 가능하지만, 이것의 redox potential은 알지 못한다. 이것은 Fe(III) porphyrins와 비슷한

potential을 갖고 있으며, 산화제로 작용한다. 크롬 3가의 독성 물질 형태인 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ 는 일반적으로 호흡을 통해 흡입되며 macrophages에서 기능적인 변화를 일으킨다. 그러나 macrophages는 관련된 효소인 NADPH-oxidase가 부족한 면역계의 일부가 아닌 조직의 정상 기능으로서, 생체이물질 흡입 후 O_2^- 기를 발생한다. Cr-picolinate와 같은 다른 크롬 3가 화합물은 ROS 발생을 일으키지 않으며, 이 실험에서는 완충용액 control보다도 낮은 level을 보여주었다. Cr-picolinate는 식사 보충물로서 사용되는데, 실험결과에서 ROS 발생이 거의 없는 것은 뚜렷한 독성작용이 없다는 것을 뒷받침한다. 산화제로서 크롬 5가의 작용이 기대되며, 크롬 6가 화합물로부터 생성된 크롬 5가 복합체가 redox-cycle을 하며 free radical을 형성한다는 Shi와 Dalal¹¹⁾의 발견을 뒷받침한다. 그러므로 크롬 5가 복합체는 크롬 6가 독성작용에 기여 할 수 있다. 크롬 5가와 크롬 6가 species 로부터 가능한 다양한 불균형은 본 실험 data의 해석을 복잡하게 한다. 이 실험에서 검출된 ROS는 실제로 생성된 것 보다는 적으며, 비록 O_2^- 가 potential 산화제이긴 해도 DCDF염료에 의해 검출되지 않는다. 또한, 만약 크롬 5가가 H_2O_2 와 빠르게 반응하면, 일부 H_2O_2 는 이것이 염료를 산화 시키기 전에 제거 될 것이다. ROS검출을 위해 사용된 DCDF 염료는 peroxides에 대해 specific한 것으로 생각된다.

본 실험 결과에서 일관된 결과를 얻지는 못했지만, Catalase투여시 ROS 발생이 감소한 것은 다른 group에 의해서도 보고된 바 있다. 이와 같이 Catalase에 의해서 ROS가 감소된 것은 ROS 내에 H_2O_2 의 존재를 확인하는 일반적 반응이다. Catalase는 세포로 들어 갈 수 없으나, H_2O_2 는 자유로히 확산되며, peroxide의 평형은 세포외-catalase에 의해 medium속으로 더많은 H_2O_2 를 존재시키면서 명백히 변화된다. 크롬 6가 투여시 Catalase의 효과가 크지 않다는 것은 기대바이었으나 아마도 다른 peroxides들이 형성되는 것으로 생각된다.

비타민 C를 세포에 투여시, 충분한 시간 배양 후 생체내로 흡수된 ascorbic acid는 생물학적 산화 방지제로서의 작용을 나타내어 ROS의 발생을 감소시킨 반면, 세포외에 존재할 경우 control보다 더 많은 ROS가 발생한 것은 반응시의 비타민 C의 조건 상태가 영향을 미친다는 것과 항상 보호제로서만 작

용하지는 않는다는 것을 보여준다. 즉 투여한 비타민 C가 생체에 생리화적인 상태로 존재해 있는가가 주요한 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 비타민 E가 A549 세포에서 ROS형성에 영향을 주지 않는다는 것은 이들 ROS가 lipid peroxidation으로부터 형성된 것이 아니라는 것을 뒷받침한다. 비타민 E는 세포막에 결합되어 있으며, 비타민 C가 존재할 때 더 효과적으로 작용한다. 즉, 비타민 C와 비타민 E는 생체내에서 같이 작용하여 in vivo lipid peroxidation을 방해하거나 감소 시키는 것으로 알려졌다. 비타민 C는 비타민 E가 불포화 지방산의 radical 작용에 관여하여 생성된 비타민 E radical로부터 비타민 E를 재생 시켜주는 역할을 한다. 일부 다른 실험들에서 비타민 E 존재시 ROS의 양이 증가하는 것은 아마도 GSH나 ascorbate에 의해서 환원 되지 않은 alpha-tocopherol radical이 형성된 결과이다.

이 실험의 결과를 해석하는 데에 혼란을 주는 요인은 배양세포의 GSH양이 크롬으로부터 발생된 ROS양에 중요한 효과를 갖는다는 것이다. Dr. Yurkow의 미발표된 연구결과에 의하면 GSH양을 고갈시키면 ROS 검출이 증가되었다. GSH는 산화 형태로부터 ascorbate를 재생 시키는 것으로 알려졌다. 크롬 3가와 같은 미량원소(trace-element)를 복합시키므로서, 일정한 조건하에서 dihydroxy ascorbate와 직접 반응한다. 본 실험에서 세포의 GSH양은 측정되지 않았고 아마도 매우 다양할 것이다. 더욱이 비타민 C와 비타민 E에 대한 세포내 반응에서 GSH의 조절효과는 알려지지 않았다. 크롬을 가해주기 60분 전에 preincubate시킨 세포에서 높은 비율의 ascorbate 잔여기가 나타난 것은 크롬 6가 환원에서 ascorbate기의 생성을 선호하는 것으로 본다. 이 부분에 대해서는 계속된 연구가 필요하다.

Cell-cycle의 S-phase에 미치는 크롬의 효과는 Bakke *et al.*¹⁴⁾의 결과와 다소 다르다. Bakke의 연구에서 크롬 6가의 낮은 농도(1~2 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)로 NHIK 3025 세포에 투여시 cell cycle연장이 저지되었고 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 농도가 2 μM 이상인 경우, 세포들은 S-phase에 저지되었다. NHIK 3025 세포는 hyperplastic human cervical(경부)조직으로부터 얻은 세포이다. 본 실험에서 A549 세포에 크롬 처리 후 apoptosis의 징후가 보인 것 또한 Manning

et al.¹⁵⁾의 발견과 상당히 다르다. 그는 CHO 세포에서 단지 150 μ M 농도의 Na_2CrO_4 에서 apoptosis가 있었음을 보고하였다. Costa's group¹⁶⁾은 몇가지 2가 독성금속들은 S-phase에서 cycle을 block한다고 결론지었다. Cr(III)은 연구되어지지 않았다. Cr(III)은 DNA에 결합할 수 있으며 DNA와 RNA 합성을 방해하는 것으로 나타났다. 최근 보여준 다른 연구 결과에 의하면 크롬 6가는 H4 세포에서 mitogen activated kinase (MAP kinase)의 계속된 활성을 일으키는 간접적 효과가 있다. 대체로 다른 조직들에서는 다른 반응들이 기대되며, 이 차이들은 더 연구되어야 할 것이다. 현재로는 크롬 6가로 인한 cell death의 기전이 우선적으로 apoptosis로부터인지 아닌지는 명확히 알려지지 않았다.

크롬 6가를 세포에 투여 후의 H_2O_2 생성기전은 알려지지 않았으나, 크롬 6가가 환원된 후 일어나는 많은 반응들이 세포로부터 H_2O_2 를 제거한다 (eg. 크롬 5가와 크롬 6가 간의 redox cycling). 미토콘드리아에서 크롬 6가의 투여가 측정된 ROS를 설명하는 H_2O_2 의 충분한 유출을 일으키는가는 좀더 연구를 필요로 한다. 포유동물에서 ROS가 SOD를 활성화한다는 최근 발견은, 이러한 발견들과 관련이 있다. 얼마만큼의 H_2O_2 가 이들 세포에서 이 활성작용에 의해 발생하는 가는 알려지지 않았다. 그러나, 크롬 6가가 oxidative stress를 일으키며 이것이 크롬 6가의 독성작용에 단계적 계기가 되는지는 중요한 사실로 남아있으며, 또한 크롬 6가의 후생적 효과(epigenetic effects)가 6가 크롬의 발암효과에 매우 중요하다는 것을 암시한다.

결 론

현재 기전이 명확히 밝혀지지 않았지만 크롬 6가의 독성작용 및 발암작용은 널리 알려져 있다. 먼저 발표되었던 논문과 많은 연구들에서 크롬 6가 화합물의 ROS 발생이 증명되었다.

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 기, $\cdot\text{OH}$ 기, H_2O_2 기 등을 포함하는 ROS는 변이, 유전자 재작성, apoptosis, 노화 등 등의 다양한 독성작용을 일으킨다. 발생하는 ROS로 인한 oxidative stress가 크롬 6가 독성과 발암의 주요 인자 인가는 중요한 과제이다. 본 연구에서 크게 세가지의 결론을 보여주었다.

1. H4 세포에 다양한 산화형태의 크롬화합물을 투여했을 때, ROS의 발생을 비교하였다 (Table 1). 식사 보충물로 사용되는 Cr-picolinate는 ROS 발생이 거의 없었으나, 합성 크롬 3가인 TPP는 기대 이상의 높은 ROS발생치를 나타내었다. 크롬 5가와 크롬 6가 화합물은 높은 ROS 발생을 나타내었다.

2. A549 세포에서, 생물학적 항산화제인 비타민 C를 20시간 preincubation 후에 크롬 6가를 투여한 경우 ROS 발생은 감소되었다. 반면, 비타민 C를 크롬 6가 투여 60분 전에 가해 준 경우에는 ROS가 증가되었다. 그러므로 반응시의 비타민 C의 조건상태 즉, 생체에 생리학적인 상태로 존재하는가가 보호제로서의 주요한 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 비타민 E로 preincubation한 경우 ROS 발생에 뚜렷한 변화가 없는 것은 이들 ROS의 근원이 세포막보다는 cytosolic이라는 것이다.

3. A549 세포에서, cell cycle의 S-phase는 크롬 6가에 의해서 증가 되었으며 이것은 독성작용 혹은 가능한 mitogenic 작용을 의미한다. 20 μ M 크롬 6가로 24시간 투여시 Go/G1 phase에 보여진 shoulder는 apoptosis를 나타낸다.

참 고 문 헌

1. IARC. Chromium and chromium compounds. In: IARC monographs for carcinogenic risk of chemicals to humans: Some metals and metallic compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer, **23**, 205-323 (1980).
2. Petrilli, F.L. and DeFlora, S. Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.* **54**, 139-147 (1978).
3. O'Brien, P., Barrett, J. and Swanson, F. Chromium(V) can be generated in the reduction of chromium(VI) by glutathione. *Inorg. Chim. Acta* **108**, L19-L20 (1985).
4. Goodgame, D.M.L. and Joy, A.M. Relatively long lived chromium(V) species are produced by action of glutathione on carcinogenic chromium(VI). *J. Inorganic Biochem.* **26**, 219-224 (1986).
5. Shi, X. and Dalal, N.L. The mechanism of chromate reduction by glutathione: ESR evidence for the glutathionyl radical and an isolable Cr(V) intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 137-142 (1988).

6. Aiyar, J., Borges, K.M., Floyd, R.A., and Wetterhahn, K.E. Role of chromium(V), glutathione thiol radical and hydroxyl radical intermediates in chromium(VI)-induced DNA damage. *Toxicol. Environ. Chem.* **22**, 135-148 (1988).
7. Sugiyama, M. Effects of vitamins on Cr(VI)-induced damage. *Environ. Health Perspect.* **92**, 63-71 (1991).
8. 박형숙, 크롬 6가 투여 후 A549 세포에서의 Reactive Oxygen Species와 크롬 5가의 발생. *환경독성학회지*. 11권 1-2호, 49-57.
9. O'Halloran, T.V. Transition metals in control of gene expression. *Science* **261**, 715-725 (1993).
10. Granger, D.N., Hollwarth, M.A., and Parks, D.A. Ischemia reperfusion injury: Role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand.* 126, Suppl. 548, 47-63 (1982).
11. Shi, X., and Dalal, N.S. Generation of hydroxyl radical by chromate in biologically relevant systems: Role of Cr(V) complexes versus tetraperoxochromate(V). *Environ. Health Perspect.* **102**, 231-236 (1994).
12. Krumpole, M., DeBoer, B.G. and Rocek, J. A stable chromium(V) compound. Synthesis, properties, and crystal structure of potassium bis(2-hydroxy-2-methylbutyrate)-oxochromate(V) monohydrate. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 145-153 (1978).
13. Bass, D.A., Parce, J.W., DeChatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.C. and Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* 130, 1910-1917 (1983).
14. Bakke, O., Jakobsen, K. and Eik-Nes, K.B. Concentration-dependent effects of potassium dichromate on the cell cycle. *Cytometry.* **5**, 482-486 (1984).
15. Manning, F.C.R., Blankenship, L.J., Wise, J.P., Xu, J., Bridgewater, L.C., and Patierno, S.P. *Environ. Health. perspect* **102**(Suppl. 3), 159-167 (1994).
16. Costa, M., Cantoni, O., de Mars, M. and Swartzendruber, D.E. Toxic metals produce an S-phase specific cell cycle block. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **38**, 405-414 (1982).