

배양 심근세포에서 저농도 삼산화비소에 의한 산화적 스트레스 발생

박은정, 박광식*

동덕여자대학교 약학대학

Oxidative Stress by Arsenic Trioxide in Cultured Rat Cardiomyocytes, H₉C₂ Cells

Eun-Jung Park and Kwangsik Park*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University #23-1 Wolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea

ABSTRACT

Epidemiologic studies have showed a close correlation between arsenic exposure and heart disease such as, cardiovascular problem, ischemic heart disease, infarction, atherosclerosis and hypertension in human. It may increase the mortality of high risk group with heart disease. Regarding the mechanism studies of heart failure, blood vessel, vascular smooth muscle cells and endothelial cells have long been focused as the primary targets in arsenic exposure but there are only a few studies on the cardiomyocytes. In this study, the generation of oxidative stress by low dose of arsenic trioxide was investigated in rat cardiomyocytes. By direct measurement of reactive oxygen species and fluorescent microscopic observation using fluorescent dye 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, reactive oxygen species were found to be generated without cell death, where cells are treated with 0.1 ppm arsenic for 24 hours. With the induction of reactive oxygen species, GSH level was decreased by the same treatment. However, DNA damage did not seem to be serious by DAPI staining, while high dose of arsenic (2 ppm for 24 hrs) caused fragmentation of DNA. To identify the molecular biomarkers of low-dose arsenic exposure, gene expression was also investigated with whole genome microarray. As results, 9,022 genes were up-regulated including heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase, which are well-known biomarkers of oxidative stress. 9,404 genes were down-regulated including endothelial type gp 91-phox gene by the treatment of 0.1 ppm arsenic for 24 hours. This means that biological responses of cardiomyocytes may be altered by ROS induced by low level arsenic without cell death, and this alteration may be detected clearly by molecular biomarkers such as heme oxygenase-1.

Key words : arsenic, cardiomyocytes, oxidative stress, gene profiles

서 론

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-940-4522, Fax: +82-2-940-4195,
E-mail: kspark@dongduk.ac.kr

비소는 금속과 유사한 성질을 갖는 준금속원소로서 인간을 둘러싼 환경 중에 널리 존재하는 물

질이다(Lawson *et al.*, 2001; Mandal *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2003). 인간은 대기, 음용수, 토양, 식품 등의 경로를 통해 비소에 지속적으로 노출되며, 역학연구 결과 비소가 피부암, 방광암, 간암 및 폐암 뿐만 아니라 type II 당뇨병의 발생과 높은 연관성이 있음을 알려줬다(Hughes *et al.*, 1995; Mandal *et al.*, 2002; Ari *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2004). 또한, 대만, 파키스탄, 인도 등 아시아 지역을 대상으로 수행된 역학조사 결과 비소 노출에 의해 blackfoot disease가 초래되며 이는 비소의 말초혈관 혈액순환장애에 의해 유발되는 것으로 보고되고 있다. 비소의 혈액순환장애현상과 관련하여 최근에는 비소와 심혈관계 질환과의 상관성에 대한 메카니즘 연구도 다양하게 이루어지고 있다. 그러나 비소가 심혈관질환을 유발하는 발병기전에 대해서는 다양한 연구노력에도(Lee *et al.*, 2001) 불구하고 아직까지 완전히 규명되지 않은 상태이며 더구나 심부전, 심장마비 등의 심장질환에 직접적인 영향을 주는 심근세포에 대한 연구는 상대적으로 미진한 실정이다.

최근 비소와 심장질환에 대한 상관성 연구의 일환으로 산화적 스트레스에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있는데 일반적으로 비소에 의해 생성되는 프리라디칼이 유해작용의 주요 매개체라는 결과들이 다수 보고되고 있다(Banu *et al.*, 2001; Ari *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006). 저농도의 Reactive Oxygen Species (ROS, 활성산소종)는 병원균과 같은 외부물질의 침입에 대한 체내의 정상적인 방어반응을 담당하며 세포성 면역반응에서 중요한 역할을 하기도 하지만 중금속 등 환경중에 존재하는 다양한 오염물질에 의해 발생하는 고농도의 ROS는 세포에 손상을 주는 세포독성의 원인물질로 작용하며(Valko *et al.*, 2006) 이 가운데 특히 hydroxyl radical은 DNA를 직접 공격하여 세포사멸을 초래하는 것으로 알려져 있다(Kitchin *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006). 또한, 비소는 생체분자의 -SH기와 결합하는 것으로 알려져 있는데 글루타치온의 -SH기와 결합하여 항산화 활성을 감소시킴으로써 결과적으로 세포내 ROS의 농도를 상승시키는 것으로 생각되고 있다(Pulido *et al.*, 2003; Jason *et al.*, 2006). 일반적으로 산화적 스트레스를 유발하는 독성물질은 세포내에서 ROS를 생성하여 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있

으나 아직 세포내 ROS의 수준과 세포사멸의 농도 의존적 상관관계를 명확히 제시하는 연구결과는 보고된 바 없다. 더구나 세포사멸(또는 세포괴사)가 일어나지 않는 저농도의 ROS 수준이 세포내의 정상적인 생리반응에 미치는 영향에 대한 연구는 더욱 미진한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 세포사멸이 일어나지 않는 저농도 수준의 비소를 심근세포에 처리하였을 때 발생하는 산화적 스트레스를 평가하고 아울러, 저농도 비소에서 영향을 받는 유전자의 변화를 마이크로어레이 기법을 통해 조사함으로써 저농도 비소노출에 의한 심장질환의 발생을 예측할 수 있는 적절한 생체지표를 발굴하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포독성

H₉C₂ cell line은 한국세포주은행으로부터 분양받아 10% FBS (Fetal Bovine Serum, 혈청)함유하는 DMEM배지를 이용하여 CO₂ 배양기에서 계대 배양하였다. 비소(As₂O₃)는 1 mM NaOH에 용해시키고 이것을 멸균처리한 PBS로 희석하여 처리하였다. 처리농도는 As₂O₃의 As양으로 계산하였다(Turner *et al.*, 1998). 계대 배양한 H₉C₂ cell을 트립신으로 처리하여 회수한 후 FBS-free media로 2회 세척하고, 96 well plates에 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 부착시켰다. As₂O₃를 각 농도별로 처리하고 각각 24, 48, 72, 96시간씩 노출시킨 후, 2 mg/mL의 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)용액을 well 당 40 µL씩 넣어 배양기내에서 4시간 정도 반응시켰다. plate에 있는 상등액을 제거하고 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 well당 150 µL씩 넣어 준 후 30분 정도 가볍게 흔들어 주고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도당 4 well씩 3회 이상 시험하였으며 각각의 O.D값을 대조군의 O.D값과 비교하여 백분율로 표시하였다(Zhang *et al.*, 2003).

2. ROS 측정

세포내 ROS 측정을 위해 세포를 12 well plate에 2×10^5 cells/mL로 분주한 후 24시간 동안 안정시

키고 0.1 ppm 비소를 4, 8, 12, 24시간 동안 처리하였다. 이후 PBS (Phosphate Buffered Saline)로 세척하고 DCF-DA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)를 가한 후 30분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 세척한 후 1 M NaOH를 well당 400 µL씩 넣어 세포를 분해시키고 일정량을 96 well black plate으로 옮겨 480 nm (Ex.) 및 530 nm (Em.)에서 형광을 측정 한 후 단백질 (µg)당 흡광도를 대조군의 백분율로 나타내었다. ROS의 생성 세포에 대한 형광이미지 제작을 위해서는 8 chamber slide에 H₉C₂ cell을 2 × 10³ cells로 분주하고 비소를 처리한 후 일정시간 배양한 후 DCF-DA를 30분 동안 반응시켰다. 이후 PBS로 세척한 후 형광현미경으로 관찰하였다 (Yang *et al.*, 2004; Elbekai *et al.*, 2005; Fotakis *et al.*, 2005).

3. GSH 측정

심근세포를 6 well plate에 1 × 10⁶ cells/mL 농도로 분주한 후 24시간 동안 안정화시켰다. 0.1 ppm 비소 4, 8, 12, 24시간 동안 처리한 후 트립신으로 처리하여 세포침전을 얻은 후 PBS로 1회 세척하고 1% perchloric acid로 세포를 용해시켰다. 얼음 위에서 10분간 방치한 후, KH₂PO₄/EDTA로 희석한 1 mg/mL의 orthophthaldehyde를 넣고, 20분간 실온에서 반응시켰다. 350 nm (Ex)과 420 nm (Em)에서 형광을 측정 한 후 대조군에 대한 백분율로 나타내었다 (Fotakis *et al.*, 2005).

4. DAPI staining

심근세포를 8 chamber slide에 2 × 10³ cells로 분주한 후 24시간 동안 안정화 시키고 0.1 ppm의 비

소를 각각 12시간 및 24시간동안 배양하였다. PBS로 세척해주고, 4% paraformaldehyde를 넣고 5분간 고정시킨 후 다시 PBS로 세척하였다. 0.1% Triton X-100을 처리하고, PBS로 한 번 더 세척해 준 후 DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) solution (0.4 µg/mL)으로 염색하여 세포핵의 모양을 형광현미경으로 확인하였다 (Ceschini *et al.*, 2006).

5. Microarray

비소에 의한 심근세포에서의 유전자 발현변화를 분석을 위해 우선 대조군과 0.1 ppm 비소를 24시간 노출시킨 처리군으로부터 RNA를 추출하였다. DNA chip은 Applied Biosystems Rat Genome Survey Arrays (35K)를 사용하였다. 추출한 RNA에 대해 Applied Biosystems Chemiluminescent RT-IVT Labeling Kit을 이용하여 Digoxigenin-11-UTP labeled cRNA를 합성한 후 Chemiluminescent Detection Kit와 Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer을 이용하여 hybridization, chemiluminescence detection, image acquisition 및 데이터분석을 수행하였다.

6. 유전자 발현

대조군과 비소처리군으로부터 추출한 RNA를 RT-PCR를 실행하여 개별 유전자의 발현을 확인하였다. RNA 1 µg에 oligo dT, reverse transcriptase 및 nucleotide가 혼합된 반응액 20 µL를 42°C에서 60분간 반응시켜 cDNA를 얻은 후 Taq polymerase 및 nucleotide 등이 혼합된 (주)바이오니아 (대전, 한국)의 PCR premix tube에 각각의 합성된 primer와 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 1 µL를 넣고 95°C

Table 1. Primer sequences for RT-PCR of oxidative stress related-genes

Gene name	GB No.	Primer sequences
Heme oxygenase-1	J02722.1	F: 5'-GGTCTGAAGAAGATTGCGCA-3' R: 5'-TCTGTGAGGGACTCTGGTCTT-3'
Glutathione S transferase	AF111160.1	F: 5'-CTGCAGCTGGAGTAGAGTTT-3' R: 5'-TTGTATTTGGTGGCAATGTA-3'
Thioredoxin reductase	AF 108213.1	F: 5'-GTAGATTAGCCAAGTCACCG-3' R: 5'-GTCAGATGGCTTAGTAGAGC-3'
NADPH dehydrogenase 1	J02679.1	F: 5'-GGACATGAACGTCATTCTCT-3' R: 5'-TTGGAGCAAAGTAGAGTGGT-3'

에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초씩 30회 반응시켰다. 마지막 반응 이후에 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 증폭을 통해 생성된 반응물을 ethidium bromide (10 mg/mL)를 함유하는 1.5% 아가로스겔 상에서 TAE완충용액을 사용하여 전기영동하였다. 유전자 증폭에 사용된 합성 primer의 염기서열은 Table 1에 제시하였다.

결과 및 고찰

1. 저농도 비소노출에 의한 심근 세포독성

랫트 심근세포로부터 유래된 H₉C₂ cell에 As₂O₃를 비소(As)로서 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 ppm 농도로 각각 24, 48, 72, 96시간 처리하였을 때 세포의 독성을 MTT법으로 평가하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 0.2 및 0.4 ppm에서는 48시간 이후부터 미약하지만 통계적으로 의미있는 세포독성이 나타났다. 그러나 24시간 이내의 처리 기간중에는 사용한 모든 농도에서 비소의 세포독성은 나타나지 않았다. 위상차 현미경을 통한 세포의 관찰결과에서도 세포의 형태학적 변화나 괴사의 흔적이 나

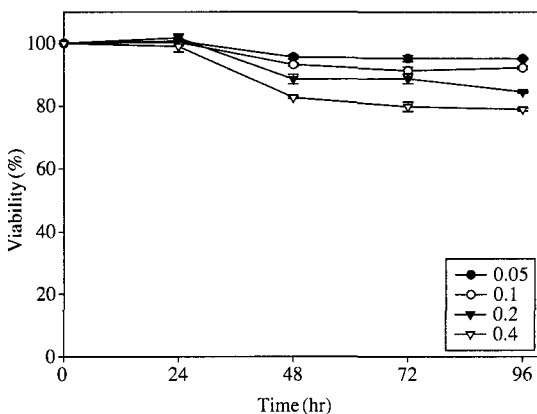


Fig. 1. Effect of arsenic on viability of H₉C₂ cell lines in vitro. Cells were treated with the indicated concentration of arsenic for 24, 48, 72, 96 hr. Cell viability was assessed by MTT assays. Data is presented as percent control. Results represent means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean. Arsenic caused cytotoxicity after 48 hr-exposure (0.05 ppm; $p < 0.05$, and 0.1, 0.2, 0.4 ppm; $p < 0.01$).

타나지 않았다 (데이타미제시). 기존의 연구결과를 보면 일반적으로 세포의 종류에 따라 그 독성의 크기가 매우 다르며, 대체로 0.1~500 μ M 수준에서 독성이 관찰되었다 (Pulido *et al.*, 2003). 심근세포에 대한 비소의 영향을 관찰하기 위해 본 연구에서 사용한 비소의 농도는 기존의 연구에서 사용한 농도와 비교해 보았을 때 비교적 낮은 수준이었으며, 이번 연구에 사용한 최대농도인 0.4 ppm에서 최소 24시간 동안에는 심근세포의 괴사나 사멸현상이 나타나지 않았다. 본 연구에서는 이와 같은 세포독성 결과와 기존에 발표된 연구에서 사용한 농도를 고려하여 비소에 의한 심근세포에서의 산화적 스트레스 발현정도를 평가하기 위한 추가연구의 농도를 0.1 ppm으로 결정하였다.

2. ROS 및 GSH농도에 미치는 저농도 비소의 영향

심근세포에 세포독성을 나타내지 않은 비소의 노출 수준에서 ROS 및 GSH에 미치는 영향을 평가하였다. DCF-DA를 기질로 하여 ROS 생성을 평가한 결과, 0.1 ppm 비소를 4, 8, 12, 24시간동안 처리하였을 때 노출시간의 증가에 따라 ROS 생성이

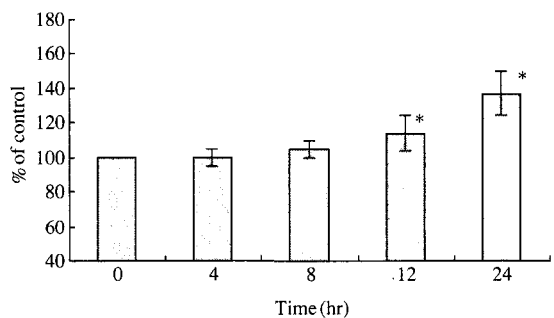


Fig. 2. Effect of arsenic on ROS production in cardiomyocytes. Cells grown in confluent were pretreated with arsenic (0.1 ppm for 4, 8, 12 and 24 hr, respectively), washed with phosphate buffered saline, and then incubated with 40 μ M DCF-DA. At the end of DCF-DA incubation, the cells were lysed with NaOH and fluorescence of aliquot was measured. Results represent means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean. Asterisks indicate a statistically significant difference (*: $p < 0.05$) from control group.

증가되는 것이 확인되었다. 통계처리결과 0.1 ppm 비소를 4시간 또는 8시간 동안 처리하였을 때는 ROS 생성이 통계적으로 의미있게 증가한다고는 볼 수 없었으나 12시간 이후부터 ROS 생성이 증가되기 시작하여 24시간 후에 최대로 증가하였다 (Fig. 2). 위상차 현미경으로 세포의 형태학적 변화

를 관찰한 결과대조군에 비해 0.1 ppm의 비소를 12 및 24시간 처리한 경우 세포손상을 의미하는 유의적인 흔적을 발견할 수 없었으며 세포의 증식이나 세포질의 윤곽 또는 부착기능을 상실한 세포 수의 변화에도 영향이 나타나지 않았다 (Fig. 3 left panel). 그러나 DCF-DA를 처리하여 형광현미경으

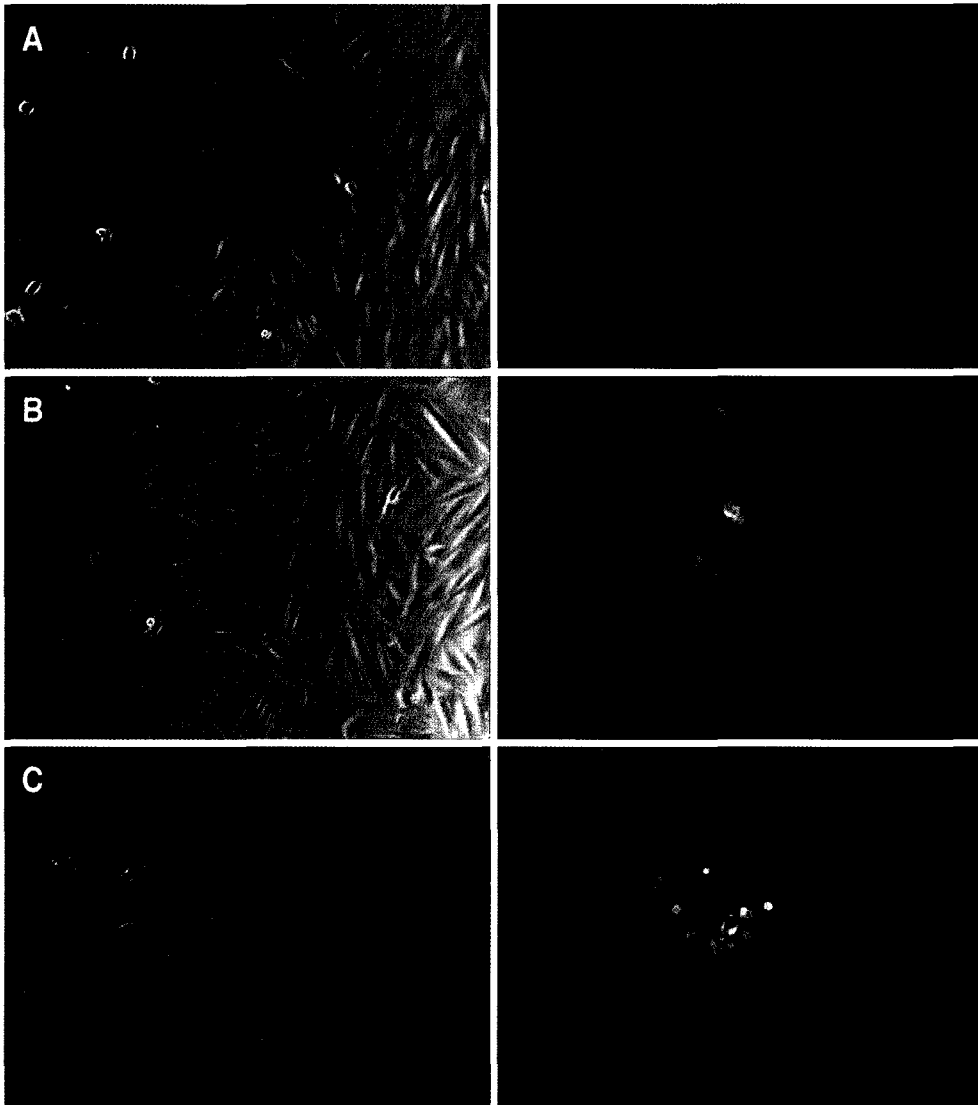


Fig. 3. Qualitative characterization of ROS generation by DCF-DA staining using fluorescence microscopy. Cells were cultured in the absence or presence of arsenic, washed with PBS, and then loaded with 40 μ M DCF-DA in HBSS. After washing with PBS, cells were visualized by fluorescent microscopy ($\times 40$, in right panel). Images of phase contrast microscope ($\times 100$) are shown in left panel. (A): control, (B): 0.1 ppm for 12 hr, (C): 0.1 ppm arsenic for 24 hr.

로 관찰하였을 때는 대조군에 비해 0.1 ppm의 비소를 각각 12시간 또는 24시간 처리한 경우 형광이 증가함을 볼 수 있는데 이는 비소에 의해 ROS 생성이 증가하였음을 보여주는 것이다(Fig. 3 right panel). ROS는 일반적으로 생체내 강력한 항산화 물질인 GSH 등에 의해 감소되는데 만약 체내 GSH가 고갈될 경우 세포의 라디칼 소거작용은 급격히 떨어지게 된다. Fig. 4는 세포내 GSH가 비소에 의해 감소되는 것을 보여주는데 GSH의 감소와 ROS의 증가는 서로 매우 연관되어 있는 것을 알

수 있다. GSH는 세포의 redox state를 유지하는 매우 중요한 물질로서 GSH의 감소는 궁극적으로 산화적 스트레스를 초래하게 되는 것은 잘 알려진 사실이다. 비소에 의해 산화적 스트레스가 증가하게 되면 지질과산화, 단백질 변성 및 미토콘드리아 손상에 의해 세포사멸 또는 발암이 유발될 수 있으며 산화적 손상은 세포사멸 및 세포의 암화과정에 관여하는 다양한 전사인자 AP-1, NF- κ B, p53 등을 유도하는 것으로 알려져 있다(Chen *et al.*, 2002).

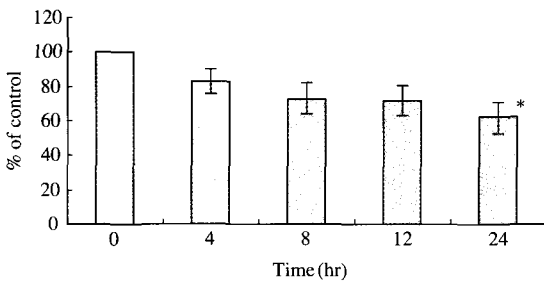


Fig. 4. Determination of intracellular GSH in arsenic treated-cardiomyocytes. Cells were exposed to 0.1 ppm arsenic for 4, 8, 12 and 24 hr, respectively. Cellular GSH level was assessed using orthoph-thaldehyde and expressed as percent of control value. Results represent means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean. Asterisks indicate a statistically significant difference (*: $p < 0.05$) from control group.

3. DNA 손상에 대한 저농도 비소노출의 영향

일반적으로 세포내 ROS 증가는 세포내 단백질, 핵산 등의 고분자와 결합하여 이들의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다. 특히, 세포사멸과 관련하여 ROS는 DNA에 반응하여 직접 손상을 주거나 여러 단계의 생체내 신호를 거쳐 사멸반응을 나타낸다. (Kitchin *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2006). 본 연구에서 DAPI 염색에 의해 핵의 모형을 관찰한 결과 0.1 ppm으로 24시간 노출시킨 경우 통계학적으로 의미 있는 정량적인 결과를 얻을 수는 없었으나 정상 세포에 비해 핵의 응축이 일어나는 세포가 미약하게나마 발견되었다. 그러나 고농도인 2 ppm으로 24시간 처리한 경우 핵의 응축과 분열이 일어나며 DNA가 단편으로 분해되는 것을 명확히 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이는 궁극적으로 비소의 세포독성 작용이 세포사멸기전에

Table 2. Partial list of up-regulated genes by arsenic treatment in cultured cardiomyocytes

Gene ID	GB No.	Gene name	Fold
rCG34806	AF369384.1	mitogen-activated protein kinase 6	33.9
rCG39158	J02722.1	Heme oxygenase 1	4.1
rCG43530	AF111160.1	glutathione S-transferase, alpha 1	3.6
rCG62860	-	nucleophosmin/nucleoplamin 2	3.6
rCG55954	U46118.1	cytochrome P450 3A9	2.2
rCG31886	AF115249.1	sphingosine 1-phosphate receptor	3.4
rCG57835	AJ001713.1	myosin IXA	3.3
rCG35904	AF345445.1	potassium channel interacting protein 4	3.1
rCG38427	AY034073.1	calcium-responsive transcription coactivator	2.9
rCG59338	D38492.1	contactin 1	2.9
rCG59292	AB181297.1	adrenomedullin 2	2.9
rCG60498	AB028862.1	betacellulin	2.9
rCG38572	M62752.1	statin-like	2.8
rCG27994	AJ277957.1	aldose reductase-like protein	2.2
rCG40798	X56600.1	superoxide dismutase 2	2.1

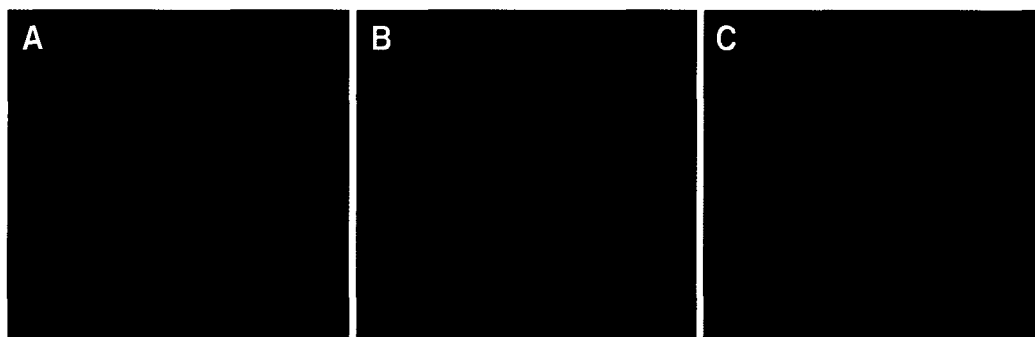


Fig. 5. Effect of arsenic on apoptosis using DAPI staining in cultured cardiomyocytes. Cells were exposed to arsenic and fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% triton X-100, then incubated with DAPI for the observation by fluorescent microscope. (A): control, (B) 0.1 ppm arsenic for 24 hr, (C) 2 ppm arsenic for 24 hr as positive control where nuclear condensation and DNA fragmentations are shown.

Table 3. Partial list of down-regulated genes by arsenic treatment in cultured cardiomyocytes

Gene ID	GB No.	Gene name	Fold
rCG30398	J05509.1	cytochrome P450, family 7, subfamily a	-10.4
rCG42239	AF298656.3	endothelial type gp91-phox gene	-6.5
rCG21136	D31873.1	LIM motif-containing protein kinase 1	-5.2
rCG62174	AY574276.1	neuron-glia-CAM-related cell adhesion molecule	-5.1
rCG20330	Z83868.1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	-4.2
rCG54748	AF058795.1	G protein-coupled receptor 51	-4.0
rCG30182	BC070902.1	sodium channel, nonvoltage-gated, type 1	-3.6
rCG36417	AF102853.1	membrane-associated guanylate kinase-interactin protein	-3.3
rCG56400	AF205193.1	glutamate receptor interacting protein 2	-3.2
rCG57012	U12336.1	acetylcholine receptor alpha 9 subunit (nAChR)	-3.2
rCG50571	U78167.1	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor 1	-3.1
rCG25019	L00088.1	fast myosin alkali light chain	-3.0
rCG24049	AF105329.1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B	-3.0
rCG44089	-	prolactin-like protein H	-3.0
rCG54356	AF368269.1	cytochrome P450 monooxygenase CYP2T1	-2.9
rCG32102	BC061977.1	seminal vesicle protein, secretion 2	-2.9
rCG33241	J05210.1	ATP citrate lyase	-2.8
rCG29344	U39206.1	cytochrome P450 4F4	-2.8
rCG37899	D64085.1	fibroblast growth factor FGF-5	-2.8
rCG50311	X57999.1	deiodinase, iodothyronine, type 1	-2.8
rCG45324	M94454.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	-2.7
rCG46964	J02942.1	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	-2.5
rCG35426	U08259.1	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C	-2.4
rCG29398	L34542.1	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	-2.4
rCG28418	U10303.1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor	-2.3
rCG47979	AF308611.1	mammary cancer associated protein RMT-1	-2.3
rCG25653	-	laminin receptor 1	-2.3
rCG21241	J03170.1	transcription factor 1	-2.3
rCG46294	L14284.1	N-acetylglucosaminyltransferase V	-2.2
rCG27378	AJ245642.1	interleukin 1 alpha	-2.2
rCG22182	AB023133.1	activation-inducible lymphocyte immunomodulatory molecule	-2.2

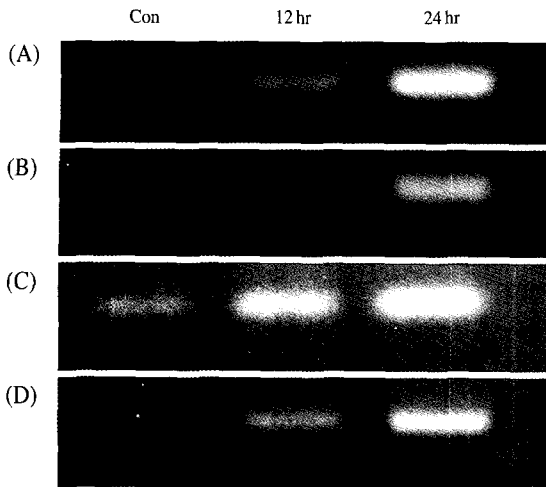


Fig. 6. Effect of arsenic on the induction of oxidative stress-related genes. Cells were treated with the 0.1 ppm arsenic for 12, 24 hr. mRNA transcription was detected by RT-PCR analysis using respective primers described in Table 1. (A): heme oxygenase-1, (B): glutathione S transferase, (C): thioredoxin reductase, (D): NADPH dehydrogenase 1.

의한 것이지만 본 연구에서 사용한 0.1 ppm의 저농도에서는 세포사멸을 유발할 정도의 반응이 나타나지는 않았음을 의미하며 세포사멸을 유발하는 데는 충분한 양의 ROS가 세포내에 축적되어야만 가능하다는 것을 의미한다. 본 연구실의 실험결과 1 ppm 이상의 비소를 최소 24시간 정도 처리할 경우 ROS의 현저한 증가와 함께 염색체의 단편이 생성되는 것을 확인하였다(메이타 미제시).

4. 저농도 비소노출에 의한 유전자 발현변화

ROS는 생성되지만 세포사멸이 일어나지는 않는 저농도의 비소가 노출된 세포에서의 유전자 발현 변화를 평가하고자 심근세포에 0.1 ppm의 비소를 24시간동안 처리하여 RNA를 분리하고 ABI chip을 이용하여 microarray를 실시하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 heme oxygenase-1, glutathione S transferase 등 ROS관련 유전자의 변화가 관찰되었다. 이외에도 Thioredoxin, catalase, SOD 등 산화적 스트레스와 관련된 유전자의 발현이 증가하는 것으로 확인되었다. 또한 cytochrome P450, endothelial type gp91-phox gene, MAP/microtubule affi-

nity-regulatin kinase 1, G protein-coupled receptor 51 등 다수 유전자의 발현이 억제되는 것이 확인되었다(Table 3). 이들 유전자의 발현이 저농도의 비소에 의해 증가 또는 억제되었을 때 나타나는 결과가 세포에 어떠한 독성반응으로 표현될지에 대해서는 아직 종합적인 결론을 얻지는 못하였다. 마이크로어레이 기법을 통해 증가된 유전자 중 heme oxygenase-1 등 산화적 인산화와 관련된 일부 유전자의 PCR 증폭결과는 Fig. 6에 나타내었다.

비소는 세포내에서 산화적 스트레스를 유발하며 이에 따라 지질과산화, 단백질변성 및 DNA 손상(수식 또는 단편화) 등을 초래한다. 또한 스트레스와 관련된 다양한 전사인자를 유도하는데 그 결과 세포는 사멸되거나 또는 암화과정을 겪게 된다. 본 연구에서는 비소에 의한 심장질환과 관련하여 세포사멸 또는 괴사가 일어나지 않는 저농도 수준에서의 심근세포에 나타나는 산화적 스트레스를 평가하고자 하였다. 그 결과 0.1 ppm 이하의 농도로 24시간 노출시킬 경우 세포독성이 나타나지 않는 것이 확인되었다. 그러나 동일 노출수준에서 통계적으로 유의적인 ROS 증가와 아울러 GSH 감소가 나타나는 것이 확인되었으며 DAPI 염색으로 확인한 DNA 손상은 매우 미약한 것으로 판단되었다. 분자생물학적 지표연구의 일환으로서 수행된 마이크로어레이 시험결과 저농도 비소노출의 경우 산화적 스트레스와 관련된 다수의 유전자 발현이 증가되었으나 전체적으로는 그 발현이 감소된 유전자의 수가 우세하였으며 향후 이들 개별 유전자에 대한 보다 상세한 연구가 수행될 경우 이들은 비소노출에 관한 분자생물학적 지표로 활용될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업으로 지원받은 과제입니다.

참고 문헌

- Ari S, Barbara B, Raj S and Eric D. Arsenic toxicity at low doses: epidemiological and mode of action considerations, *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 253-267.

- Banu BS, Danadevi K, Jamil K, Ahuja YR, Rao KV and Ishaq M. In vivo genotoxic effect of arsenic trioxide in mice using comet assay, *Toxicology* 2001; 162: 171-177.
- Ceschini L and Campos EG. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger aqueous root extract on mammalian cells, *J of Ethnopharmacol* 2006; 103: 302-305.
- Chen F and Shi X. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals, *Oncol Hematol* 2002; 42: 105-121.
- Elbekai RH and El-Kadi AOS. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺, *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1499-1511.
- Fotakis G, Cemeli E, Anderson D and Timbrell JA. Cadmium chlorid-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line, *Toxicol In Vitro* 2005; 19: 481-489.
- Hughes K, Meek ME, Newhook R and Chan PKS. Speciation in health risk assessments of metals: Evaluation of effects associated with forms present in the environment, *Regul Toxicol Pharmacol* 1995; 22: 213-220.
- Jason MH, Hong Z and Dean PJ. Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions, *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 138-145.
- Kitchin KT and Ahmad S. Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis, *Toxicology Lett.* 2003; 137: 3-13.
- Lawson NM and Mason RP. Concentration of Mercury, Methylmercury, Cadmium, Lead, Arsenic, and Selenium in the Rain and Stream Water of Two Contrasting Watersheds in Western Maryland, *Water Research* 2001; 35(17): 4039-4052.
- Lee MY, Bae OK, Chung CM, Kang KT, Lee JY and Chung JH. Enhancement of platelet aggregation and thrombus formation by arsenic in drinking water: A contributing factor to cardiovascular disease, *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 179: 83-88.
- Mandal BK and Suzuki KT. Arsenic round the world: a review, *Talanta* 2002; 58: 201-235.
- Pulido MD and Parrish AR. Metal-induced apoptosis: mechanisms, *Mutat Res* 2003; 533: 227-241.
- Shi H, Hudson LG and Liu KJ. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis, *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 582-593.
- Tsai YI, Kuo SC and Lin YH. Temporal characteristics of inhalable mercury and arsenic aerosols in the urban atmosphere in southern Taiwan, *Atmos Environ* 2003; 37(24): 3401-3411.
- Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L and Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway in H₉C₂ cardiac muscle cells, *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1789-1801.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
- Xia Y and LiuAn J. overview on chronic arsenism via drinking water in PR China, *Toxicology* 2004; 198(1-3): 25-29.
- Yang J, Li H, Chen YY, Wang XJ, Shi GY, Hu QS, Kang XL, Lu Y, Tang XM, Guo QS and Yi J. Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity in vitro and *in vivo* via reactive oxygen species-mediated dual regulation of apoptosis, *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 2027-2041.
- Zhang Y, Cao EH, Liang XQ and Qin JF. Increasing sensitivity to arsenic trioxide-induced apoptosis by altered telomere state, *Eur J Pharmacol* 2003; 474: 141-147.