

S-3 A549 인체 폐세포에서의 크롬 독성작용
Studies of Chromium Toxicity
with A549 Human Lung Cells
in Culture

박형숙

한서대학교 환경과학과, 356-820 충남 서산시 해미면 대곡리 360

Chromium은 현재 독성작용 기전이 정확히 규명되지는 않았지만, 크롬6가 화합물로서 사람과 동물에게 돌연변이를 일으키거나 발암성물질로 알려져왔다. 공장등에서의 작업환경 노출이 크롬독성의 주요 요인이며 암중에서도 폐암(lung cancer)의 발병율이 높다는 것이 보고된바 있다. 일찌기 1930년도에 독일의 크롬생산 공장의 노동자들 가운데 폐암의 발병율이 높다는 보고 이후에 (Lehmann, 1932), 많은 연구 결과에서 일반인구보다 크롬생산 근로자들에게 약 29배 높은 폐암 환자가 있다는 연구가 발표됨으로서(US Public Health Service, 1953), 크롬이 폐암 발암성 물질임이 강력히 뒷받침되었다. 미국 환경보호청 암(cancer)추정팀에 의해서 1984년 밝혀진바에 의하면 6가 크롬은 13번째로 강한 발암제이며 PCB나 DDT, Benzene 보다 더 강한 발암성을 갖고 있다.

원자번호 24, 주기율표의 6B족으로 3d 부껍질에 4개의 전자와 4s에 2개의 전자가 채워져있는 전이금속으로 분류되는 크롬화합물의 발암성은 크롬의 산화상태에 의존하는 것으로 알려졌다. 크롬화합물은 2, 3, 4, 5, 그리고 6가등의 여러 가지 산화상태로 존재하나, 가장 안정한 일반적인 산화상태는 3가와 6가 상태이며 이들이 생물학적으로 중요한 의의를 갖고있다. 주변환경에서 폭로될수 있는 가장 일반적인 형태인 6가 크롬은 정사면체 구조(tetrahedral structure)로서 oxide나 oxyanion으로 존재하며, 세포막에 존재하는 sulfate와 phosphate같은 음이온 수송계를 이용하여 세포막 통과가 용이하다. (Jennette, 1981; Standeven and Wetterhahn, 1989; Ottenwalder et al., 1988). 가장 안정한 이온상태의 크롬이며 비발암성물질로 알려진 크롬3가는 팔면체 구조로서 (octahedral structure) 6개의 ligand(배위자)를 가지며 양이온으로 존재한다. 크롬3가는 크롬6가보다 크고 비교적 지방성이 약하기 때문에 세포막 통과가 어렵다. 허나 크롬picolinate 같은 합성된 3가 크롬은 매우 지용성이기 때문에 세포막 통과가 가능하다. 일반적으로 생물학적 물질내에서 6가크롬이 3가로 환원되는 과정에 발생하는 크롬5가와 4가는 매우 불안정하며, 크롬 2가 또한 비교적 불안정하여 빠르게 3가로 산화되어진다. 세포막을 통과해 들어온 크롬6가는 세포내에있는 Ascorbate, GSH, Cyt-P450 그리고 Glucose를 포함한 여러 세포내 성분들에 의해 환원되며, 환원과정에서 크롬5가가 발생되어진다. (O'Brien et al., 1985; Witmer et al., 1994) 크롬5가metabolite 의 형태는 크롬6가를 환원시

키는 물질에 따라서 달라진다. 크롬 5가 복합체는 크롬 6가의 발암기전에 직접 참여 할 수도 있고, 혹은 세포내 hydrogen peroxide 와 반응하여 생성된 hydroxyl radical(.OH)이나 환원 과정에서 발생하는 reactive oxygen species (ROS)가 DNA를 포함한 생물학적인 목표를 공격 할수도 있다.

크롬화합물이 DNA에 미치는 damage를 alkaline elution technique(Kohn et al., 1981)을 이용하여 A549 인체 폐세포와 L1210 세포에서 비교하였다(Park,1989). A549 세포는 사람 폐조직 으로부터 얻어진 TypeII alveolar epithelial cells이며, L1210 세포는 leukemic origin 의 murine cell line 이다. 이 실험결과 크롬 6가는 A549 인체 폐세포에서 용량에 비례한 (5, 10, 20 uM Potassium dichromate) DNA single strand breaks (SSB)와 DNA-protein crosslink (DPC)를 유도했으나, L1210 cell에서는 단지 DNA-protein crosslink 만을 유도하고 single-strand breaks는 발견되지 않았다. 이 결과로부터 폐조직이나 폐세포는 크롬6가로 인한 DNA damage 가 다른 조직 과는 다르다는 전제를 이끌어 낼수 있었고, 이를 바탕으로하여 A549 인체 폐세포를 크롬 6가의 독성작용을 보기위한 system으로 사용하였다. A549 인체 폐세포는 크롬 노동자들에게서 발견된 bronchial epithelial cells 의 carcinoma 세포와 아주 유사하다. A549 인체 폐세포에 크롬6가로 생성된 DNA-damage 가 치명적인 역할을 하는가 규명키 위해 행해진 repair 실험에서, SSB는 크롬 6가 제거후 8시간 후에 완전히 repair된 반면, DPC는 더욱 증가하여 6시간 후까지 최대치로 증가하였고 그 이후는 평형상태(plateau)를 유지하였다.

크롬6가 화합물이 독성작용을 일으키기 위해서는 metabolic reduction이 전제되어야 하며, 이 과정 중에 발생하는 hydroxyl radical이나 singlet oxygen 같은 ROS 와 크롬의 paramagnetic form (상자성형태)을 포함한 free radical이 크롬 6가의 독성 작용, 발암작용의 원인으로 예견되어지고있다.

Oxidative stress 는 복잡한 과정이며, ROS는 DNA damage로 인한 mutation, differentiation, 유전자의 재프로그래밍과 lipid peroxidation을 일으킨다. Oxidative stress는 “response element”의 활동을 촉진시켜 이로인한 더 큰 독성에도 관여한다. 고농도 크롬이 발생하는 hydroxyl radicals(OH)이 deoxyguanine 에 직접 작용하여 8-hydroxy deoxyguanosine을 형성하고 DNA strand breakage (Aiyar et al., 1991)를 유도한다는 연구가있다. 또한, 크롬6가가 고농도 hydrogen peroxide와 작용하여 tetraperoxochromate(V)를 만들고, 이것이 분해되어 hydroxyl radical을 발생하며, 크롬6가와 hydrogen peroxide 의 작용에서 singlet oxygen 또한 발견되었다 (Kawanishi et al., 1986). 크롬6가는 Salmonella typhimurium strain TA 102에서 mutation을 일으켰는데, 이때 oxygen이 필요하며 크롬6가가 lipid peroxidation 을 일으키는것도 밝혀졌다.

본연구에서는 크롬6가가 유발시킨 hydrogen peroxide(과산화수소)와 hydroperoxides 같은 ROS의 발생을 연구하고자 Coulter Epics Profile II flow cytometer를 사용하

였다. 이 기제는 산화형 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)의 형광성(fluorescence)을 측정한다 (Bass et al., 1983). 즉 환원형 염료인 DCFH가 세포 속으로 들어간후, 크롬6가를 투여하여 발생하는 ROS에 의해서 산화되면 형광성을 나타내게된다. 그러므로 염료 형광성의 강도는 발생하는 ROS에 정비례한다.

본 연구에서는 크롬6가인 $K_2Cr_2O_7$ 20uM과 100uM을 549 세포에 투여한 후 농도에 비례해서 ROS가 발생하는 것을 밝혔다. ROS는 반응 최대시점인 실험 20분에서 측정되었다. 이같이 크롬6가를 A549 폐세포에 가했을 때 많은 ROS가 발생하는 사실은 6가 크롬의 환원경로가 단순하지 않다는 것을 말한다. 현재 이 oxidative stress가 Cr(VI)독성의 주요원인 인가에 관해서는 많이 연구되고 있는데, 세포내 환원경로중 발생하는 ROS와 세포내 성분들과의 반응이 일어날 가능성이 많이 있을 것이다. 크롬3가인 $CrCl_3$ 나 chromium picolinate를 세포에 가한 경우는 ROS가 발생되지 않았다.

크롬6가는 인체내에서 ascorbate, glutathione, DT-diaphorase, MFO system 같은 내인성 환원인자에 의해 환원되며, 중간 산화상태 즉 크롬5가, 크롬4가를 거쳐서 궁극적으로 크롬3가를 형성한다. 이 환원과정중 발생하는 크롬5가는 한 개의 비공유 전자를 함유한 불안정하고 활동성이 큰 중간생성체이다. Paramagnetic entities (상자성 존재물)의 측정에 EPR-Spectroscopy를 응용하기 시작한 이후, 크롬 6가의 환원과정에서 liver-microsomes, GSH, ascorbate에 의한 reactive intermediate로서 크롬5가의 생성이 입증되었다. Chick embryos의 간에 크롬6가 투여후, 크롬5가가 EPR Spectroscopy에 의해 확인되었다(Lieboss and Wetterhahn, 1992). Tetraperoxo복합체를 포함한 크롬5가 복합체는 크롬6가의 발암성에 직접 관여 할수 있으며, 혹은, 크롬5가 복합체는 세포내 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 작용하여 hydroxyl radical을 발생하며, hydroxyl radical 은 세포막의 지방같은 생물학적 목표를 공격 할 수있다 (Shi and Dalal, 1990). 최근 $[Cr(EHBA)_2O]$ 와 $[Cr(HMBA)_2O]$ 같은 안정한 크롬 5가의 중간생성물이 분리되었으며, 이들이 박테리아 세포조직에서 돌연변이를 잠재적으로 유발시킨다는 것이 알려졌다(Rodney et al., 1989). 이런 5가 이온들의 일부는 충분히 오래 지속함으로써(수명이 30분 까지도 된다) DNA 와 같은 고분자에 결합 될 수있고 해로운 생물학적 효과를 일으킨다 (Goodgame and Joy, 1986). EPR Spectroscopy를 사용해 크롬5가를 측정한 대부분의 in vitro 연구는 비생리적 고농도의 크롬을 사용한 반면, 본연구는 가능한한 인체와 비슷한 조건에서 A549 인체 폐세포를 사용하여, 크롬6가 투여시 발생한 크롬5가를 EPR Spectroscopy를 사용하여 측정하였으며, 생성과 소멸에 관한 kinetics 들이 관측되었다. 또한 대부분의 실험에서는 frozen sample을 사용하였으나 (Aiyar et al., 1991; Kawanishi et al., 1986), 본 실험에서는 수용액 상태의 세포 부유액을 사용하였다. 액체 용액 상태의 물질과 얼어 있는 “부동 상태”의 물질에서 얻어진 EPR spectra는 기하학적인 이유에서 완전히 다르다. 또한 수용액 상태의 세포 부유액을 사용한 경우, 실제반응이 일어나는 시간에 생리적 조건에 아주 근접한 상태에서, 측정 과정이 교란되지 않음

며 반응속도학적으로 반응하는 크롬 5가를 포함한 paramagnetic species를 관찰할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서 5개의 주요 signals 들이 관측되었다. 3개의 EPR signals들은 free electron standard 인 DPPH 보다 낮은 자기장에서 관측되었고 (marker 위치보다 왼쪽), 이것은 g-value가 free electron value 보다 큰 것을 나타낸다. 이 사실과 다른 정보들을 종합하여 볼 때, 이들 3개의 EPR spectrum 은 free radical species 의 특징을 나타낸다. 그러나 이 signals 로부터 명확한 화학적 구조는 밝힐 수 없었고 이 species를 확실히 규명하기 위해서 더 많은 작업이 필요하다. 반면, marker보다 높은 자기장 (marker 위치보다 오른쪽)에서 관측된 EPR signals 들은 paramagnetic 전이이온의 착물과 일치하므로 확실한 크롬5가 species이다.

본 연구에서는 dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphate, sulfate 같은 화합물들을 세포의 세포의 용액에 첨가 했을때의 효과를 살펴보았다. DMSO를 첨가하였을 때 크롬5가 signal(peak 5) 의 진폭은 증가하였으나, free radicals의 진폭(peak 1과 2)은 감소하며 반대효과를 나타내었다. 이 결과로부터 DMSO는 세포막의 크롬6가의 투과성을 증가시키며 또한 radical trap 으로 작용한다는 것을 추정할수있다. 크롬 6가를 phosphate를 제거시킨 증류수 에 용해시킨후 세포와 혼합하여 스펙트럼을 돌린 경우, 모든 5개의 진폭이 눈에 띠도록 증가했으며, sulfate (50uM)를 세포의 용액에 첨가 하였을 때 모든 5개 signals 의 진폭은 감소하였다. 이는 크롬 6가가 세포막에 있는 sulfate anion channel을 통해 투과되며, 크롬 6가의 세포막 투과는 이들과의 경쟁으로 감소되며, 이에 따른 크롬5가와 다른 radical 의 생성을 감소시킨다.

결론적으로, 크롬 6가 화합물을 A549 폐세포에 첨가 했을 때 독성작용이 있는 것으로 알려진 ROS와 paramagnetic 크롬 5가가 발생되었다. ROS의 경우, 발생하는 ROS의 양은 크롬6가의 농도에 비례하였다. 크롬 6가를 A549 세포에 섞은후 측정된 EPR spectroscopy 에서는 5개의 signals 들이 발견되었는데, 그중 g-value가 free electron value보다 큰 세 개의 EPR signals는 free radical species의 특징을 나타내며 이전에 어떤 실험에서도 보고된 적이 없는 것이었다. 그러나 resonance absorption 이 free electron value보다 큰 자기장에 있는 2개의 signals 은 크롬 5가 entity에 의한 것을 알 수있다. 그러므로 본 연구의 발견은 화학적 생화학적 system에서 크롬 6가가 환원 될 때, 어떤 형태의 크롬 5가가 발견되었으며, 이크롬 6가의 환원과 정에서 생성된 크롬5가와 ROS 의 발생은 아마도 상호 긴밀하게 관련되 있으며, 모두 크롬 6가가 폐세포에 독성작용을 일으키는데 상호작용을 할 것이다.

참 고 문 헌

- Aiyar, J., Berkovits, H.J., Floyd, R.A. and Wetterhahn, K.E.(1991). Reaction of chromium(VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: Identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ. Health. Perspec.* 92, 53-62.
- Goodgame, D.M.L., and Joy, A.M. (1986). Relatively long-lived chromium(V) species are produced by the action of glutathione on carcinogenic chromium(VI). *J. Inorg. Biochem.* 26: 219-224.
- Jennette, K.W. (1981). The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism, *Environ. Health perspect.*, 40, 233-252.
- Kawanishi, S., Inoue, S. and Sano, S.(1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 261, 5952-5958.
- Lehmann, K.B.(1932). "One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports" *Ame. J. Indus. Med.* 17, 189-215.
- Liebross, R.H. and Wetterhahn, K.E.(1992). In vivo formation of chromium(V) in chick embryo liver and red blood cells. *Carcinogenesis*, 13, 2113-2120.
- O'Brien, P., Barrett, J. and Swanson, F. (1985). Chromium(V) can be generated in the reduction of chromium(VI) by glutathione. *Inorg.chim. Acta.* 108, L19-L20.
- Ottenwalder, H., Wiegand, H.J., and Bolt, H.M.(1988). Uptake of $^{51}\text{Cr(VI)}$ by human erythrocytes: evidence for a carrier-mediated transport mechanism. *Sci.Total Environ.*, 71, 561-566.
- Shi, X. and Dalal, N.S.(1990). On the hydroxyl radical formation in the reduction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277, 342-350.
- Standeven, A.M. and Wetterhahn, K.E.(1989). Chromium(VI) toxicity: Uptake, reduction, and DNA damage, *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8, 1275-1283.

US-Public Health Service (1953). health of workers in chromate producing industry, U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. US Government Printing Office, 192.