

DNA 回復合成阻害劑 및 鐵이 Bleomycin과 過酸化水素에 의해 誘發된 CHO 細胞의 染色体 異常頻度에 미치는 影響

정해원 · 유은경
서울대학교 보건대학원

Effect of DNA Repair Inhibitors and Iron on the Chromosome Aberration Induced by Bleomycin and Hydrogen Peroxide in CHO Cells

Hai Won Chung and Eun Kyoung Ryu
School of Public Health, Seoul National University

ABSTRACT

The cellular toxicity and antitumor effects of bleomycin are thought to be occurred by formation of $O_2\text{-Fe}^{2+}$ -bleomycin complexes that degrade DNA and release O_2^- and $\cdot OH$ radicals. Hydroxyl radicals derived from hydrogen peroxide seem most likely to be involved in the various stages of carcinogenesis, and transition metals such as iron play a central role in activation of bleomycin and in formation of hydroxyl radicals. This study was performed to investigate whether treatment with ferrous sulfate increase chromosome aberration induced by bleomycin and hydrogen peroxide, and whether there is different repair mechanism for DNA damage induced by those chemicals. Treatment with 3AB, Ara C, during G_1 and post-treatment with caffeine, and Hu during G_2 increased the frequency of chromosome aberration induced by bleomycin but post-treatment with caffeine only did function that way when hydrogen peroxide was treated. When $6.6 \times 10^{-7} M$ of bleomycin or $5.0 \times 10^{-5} M$ of hydrogen peroxide were treated simultaneously with iron, the frequency of chromosome aberration was reduced, if compared with the results by bleomycin or hydrogen peroxide alone.

Keywords : CHO cells, bleomycin, hydrogen peroxide, iron, DNA repair inhibitors.

I. 서 론

Bleomycin(BLM)은 자유라디칼을 생성하여 DNA에 손상을 주게 되는데 이 과정에 산소와 여러 금속이온이 관여하게 되며 특히 철과의 결합이 중요하다.¹⁾ 즉 Fe^{2+} -BLM 복합체에 산소가 결합되어 있을 때 이를 활성화된 BLM이라 하며, 이것이 실제적으로 DNA를 공격하는 것으로 알려져 있다.^{2,3)} BLM에 철을 처리하면 DNA상의 상해가 더욱 커지게 되며,⁴⁾ Fe^{3+} 를 Fe^{2+} 로 환원시켜 주는 적당한 환원제를 첨가하여도 같은 효과를 볼 수 있었다고 보고되고 있다.

또한 철에 특이적으로 결합하는 chelator인 des-

ferroxamine을 처리하면 BLM에 의한 세포의 손상을 감소시킬 수 있었다는 보고⁵⁾로 보아 BLM의 작용에 철이 중요하게 관여함을 알 수 있다. BLM이 활성화되는 데에는 superoxide(O_2^-)와 과산화수소(H_2O_2)가 중요한데, 활성화된 BLM은 superoxide(O_2^-)와 수산화라디칼($\cdot OH$)을 생성하여 이것이 DNA에 손상을 주게 된다.

과산화수소는 대사과정에서 부산물로 생성되는 superoxide(O_2^-)와 더불어 내생적인 산소라디칼의 주된 원천이 된다. 과산화수소로부터 생성되는 수산화라디칼($\cdot OH$)은 DNA에 염기손상 및 나선절단을 일으킬 수 있다. Fe^{2+} 존재 하에서는 Fenton반응에 의해 수산화라디칼이 과산화수소로부터 유리되어

DNA가 빠른 속도로 절단된다.⁵⁾

DNA 회복합성저해제는 세포주기와 관련해 DNA의 손상이 회복되는 데 필요한 기전을 밝히기 위해 활용되었으며, 3-aminobenzamide(3AB)는 DNA가 복제되거나 회복복제되는 과정에서 chromatin의 안정성을 유지하도록 하는 ADP-ribosyl transferase의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있으며,⁶⁾ X선⁷⁾ 및 제한효소⁸⁾ 등 DNA상에 양가닥 절단(double strand breakage)을 유발하는 물질들을 대상으로 한 연구에서 G₁시기에 3AB을 처리하면 염색체형 이상빈도가 증가됨이 보고되었다.

또한 DNA상의 양가닥 절단을 회복하는 데 필요한 DNA polymerase α , δ 는 cytosine arabinoside(Ara C)에 의해 기능이 억제되어 G₁ 시기에 X선 및 제한효소 등을 처리했을 때 나타나는 염색체형 이상빈도가 Ara C에 의해 증가됨이 보고되었다.⁸⁾ Hydroxyurea(Hu)는 ribonucleotide reductase의 작용을 억제하여 DNA 합성에 필요한 전구물질을 억제하는 것으로 알려졌는데,⁶⁾ G₂기에 Hu를 처리하게 되면 염색체형 이상이 증가되었다고 보고되었다.⁹⁾ 손상받은 세포가 세포분열할 때 G₂기가 지연됨으로써 postreplication repair될 수 있는 시간을 증가시킬 수 있는데 caffeine은 이 지연을 저해하여 회복되지 못하게 되어 염색체 이상빈도를 증가시킨다고 알려져 있다.^{8,10)}

BLM은 X선과 같은 이온화방사선이나 제한효소처럼 DNA상에 양가닥 절단을 일으킬 수 있으며, 세포주기에 관계없이 S시기에 비의존적으로 DNA에 손상을 주는 물질로 알려졌다. 본 연구에서는 BLM 및 과산화수소에 의한 상해 양상과 그 회복되는 기전을 밝히기 위해 CHO 세포에 BLM 및 과산화수소를 세포주기를 감안하여 처리하고, DNA 회복합성저해제 및 상기 과정에서 중요하게 작용하는 것으로 알려진 철을 처리한 후 나타나는 염색체 이상빈도의 변화로써 조사하고자 하였다.

II. 실험방법

1. 재 료

(1) 세포 및 배양액

본 실험에 사용된 세포는 CHO-k₁ 세포로서 10% 우태아 혈청과 100 unit/ml의 penicillin, 100 mg/ml의 streptomycin을 포함한 McCoy's 5A 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다.

2. 방 법

(1) Bleomycin 및 과산화수소에 대한 DNA 회복합성저해제의 영향

CHO 세포에 Bleomycin(BLM)을 6.6×10^{-7} M 및 3.3×10^{-6} M, 과산화수소는 2.5×10^{-5} M 및 5×10^{-5} M을 처리한 후 3AB(2×10^{-7} M), Ara C(5×10^{-5} M)를 각각 처리하고 2시간 후 인산완충용액으로 두 차례 세척한 다음 신선한 배양액을 넣어 14시간 추가배양하여 염색체 표본을 작성하였다. Hu(5×10^{-3} M) 및 caffeine(1×10^{-3} M)은 표본작성 2시간 전에 처리하였다.

(2) Bleomycin과 과산화수소에 대한 철의 영향

BLM 및 과산화수소를 처리한 후 FeSO₄를 처리하고 (1)의 방법에 따라 시행하였다.

(3) 염색체 표본작성

염색체 표본작성은 세포수집 2시간 전에 colcemid (2×10^{-7} M)을 첨가한 후 세포를 수집하여 저장액(0.075 M KCl)을 처리하고, methanol로 전고정한 후 다시 canoy 고정액(methanol : acetic acid = 3 : 1)으로 고정하여 슬라이드에 세포를 떨어뜨린 후 공기 건조하여 Giemsa로 염색하였다.

III. 결 과

1. DNA 회복합성저해제의 영향

(1) BLM에 대한 영향

G₁기의 CHO 세포에 BLM 6.6×10^{-7} M 및 3.3×10^{-6} M을 처리하고 3AB 및 Ara C를 동시에 처리하였으며, Hu와 caffeine은 BLM을 처리하고 14시간 후(G₂기)에 처리하였다.

Table 1과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 3AB를 처리한 경우 BLM 두 농도에 대한 염색체형 이상빈도가 세포 100개당 각각 21.5, 55.0개로 나타나 기대치인 10.0, 29.5보다 훨씬 높게 나타났다. Ara C의 경우에는 6.6×10^{-7} M의 BLM을 처리한 경우 15.0으로 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았고, 3.3×10^{-6} M을 처리했을 때에는 45.0으로 기대치 31.5보다 높게 나타났다.

G₂기에 caffeine을 처리했을 때도 염색체형 이상이 두 가지 농도의 BLM에 대해 세포 100개당 31.5 및 75.5로 나타나 기대치 12.5, 31.5에 비해 크게 증가하였다. Hu의 경우에도 BLM 6.6×10^{-7} M에 대해 19.0으로 통계적으로 유의하지 않았으나 높게 나타났으며, 3.3×10^{-6} M의 농도에 대해 68.0으로 기대치 29.5보다 훨씬 높게 나타났다.

(2) 과산화수소에 대한 영향

과산화수소를 처리했을 때 Table 2, Fig. 2에서

Table 1. Effect of treatment with 3AB, Ara C during G₁ and posttreatment with caffeine, Hu during G₂ on the frequency of chromosome aberration induced by BLM

Treatment	No. of cells counted	Percent of aberrant cells	Structural aberrations/100 cells					
			Chromatid type			Chromosomal type		
			Exchange	Deletion	Total ^a	Exchange	Deletion	Total ^a
Control	200	3.3	0.0	5.0	5.0± 1.4	0.0	0.0	0.0± 0.0
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M	200	11.5	0.0	8.0	8.0± 1.4	6.5	4.0	10.5± 6.3
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M	200	22.5	1.0	5.5	6.5± 0.7	18.5	11.5	29.0± 21.0
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ 3AB	200	4.5	0.0	6.0	6.0± 1.4	0.5	0.0	0.5± 0.7
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ 3AB	200	13.0	0.0	4.5	4.5± 2.1	11.5	10.0	21.5± 14.7
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M+ 3AB	200	33.0	0.0	5.5	5.5± 3.5	36.5*	18.5	55.0± 7.0 (29.5)
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ Ara C	200	2.5	0.0	2.0	2.0± 1.4	0.5	1.5	2.0± 1.4
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ Ara C	200	13.0	1.0	2.5	3.5± 3.5	9.5	5.5	15.0± 8.4
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M+ Ara C	200	21.5	1.5	5.0	6.5± 2.8	26.5	18.5	45.0± 15.5 (31.5)
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ Caf.	200	8.0	7.0	0.5	7.5± 1.4	1.5	0.5	2.0± 2.8
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ Caf.	200	16.0	7.0	1.5	8.5± 9.9	15.0	16.5*	31.5± 7.7* (4.5) (12.5)
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M+ Caf.	200	35.0	14.0	1.5	15.5± 2.1	40.0*	35.5*	75.5± 6.3* (20.0) (12.0) (31.5)
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ Hu	200	3.0	2.0	0.5	2.5± 0.7	0.5	0.0	0.5± 0.7
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+ Hu	200	19.0	8.5	1.0	9.5± 6.4	12.0	7.0	19.0± 8.4
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M+ Hu	200	30.5	3.5	1.0	4.5± 0.7	35.5*	32.5*	68.0± 12.7* (19.0) (11.5) (29.5)

^aEach data is the mean and standard deviation of independent experiments.

*Observed frequency is significantly higher than expected (p<0.05). The number of parentheses indicate expected value. The expected values are the sum of the yield induced by BLM alone, plus the yield induced by each inhibitor alone, minus the control value.

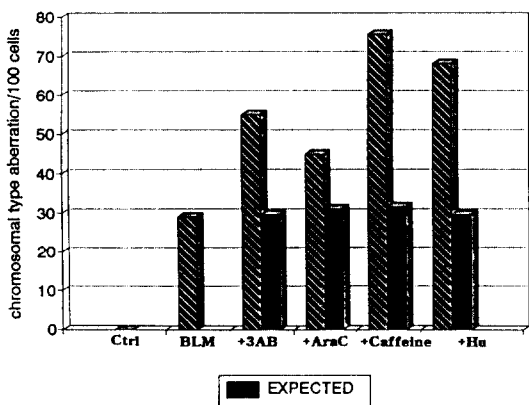


Fig. 1. Effect of DNA repair inhibitors on the frequency of chromosome aberration induced by 3.3×10⁻⁶ M of BLM during G₁ (The expected values are the sum of the yield induced by BLM alone, plus the yield induced by each inhibitor alone, minus the control value).

보는 바와 같이 3AB 및 Ara C, Hu 모두에서 염색체 이상을 가진 세포의 수 및 염색체 이상빈도가 증가하였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 caffeine의 경우 5.0×10⁻⁵ M의 과산화수소를 처리했을 때 염색체형 염색체 이상빈도가 40.8로 기대치 15.5보다 현저하게 증가하였다.

2. 철(FeSO₄)의 영향

(1) BLM에 대한 영향

BLM을 처리하고 동시에 FeSO₄를 농도별로 처리한 후 나타나는 염색체 이상빈도는 Table 3, 4, Fig.3과 같다.

철 1.1×10⁻⁶M~1.1×10⁻³ M 모든 농도에서 BLM에 의한 염색체 이상빈도가 30~70% 정도 낮게 나타났으며 특히 철의 농도가 1.1×10⁻⁶ M, 5.5×10⁻⁴ M 그리고 1.1×10⁻³ M의 경우 염색체형 염색체 이상빈도가 세포 100개당 각각 9.0, 17.5, 그리고 12.5로 기대치인 32.0, 31.0, 그리고 30.5에 비해 감소되는

Table 2. Effect of treatment with 3AB, Ara C during G₁ and posttreatment with caffeine, Hu during G₂ on the frequency of chromosome aberration induced by hydrogen peroxide

Treatment	No. of cells counted	Percent of aberrant cells	Structural aberrations/100 cells					
			Chromatid type			Chromosomal type		
			Exchange	Deletion	Total ^a	Exchange	Deletion	Total ^a
Control	200	5.0	0.0	4.5	4.5± 0.7	0.0	0.5	0.5± 0.7
H ₂ O ₂ 2.5×10 ⁻⁵ M	200	13.5	2.5	9.0	11.5± 10.5	2.5	6.0	8.5± 6.3
H ₂ O ₂ 5.0×10 ⁻⁵ M	200	23.5	7.5	16.5	24.0± 7.0	8.5	6.0	14.5± 9.1
3AB	200	4.5	0.0	3.0	3.0± 0.0	0.5	1.0	1.5± 2.1
H ₂ O ₂ 2.5×10 ⁻⁵ M+ 3AB	200	15.0	3.0	8.5	11.5± 2.1	5.5	4.5	10.5± 3.5
H ₂ O ₂ 5.0×10 ⁻⁵ M+ 3AB	200	26.5	9.0	19.0	28.0± 1.4	8.5	9.5	18.0± 12.6
Ara C	200	9.0	2.0	10.0	12.0± 8.4	0.0	0.7	0.5± 0.7
H ₂ O ₂ 2.5×10 ⁻⁵ M+ Ara C	200	20.0	3.5	11.0	14.5± 7.7	5.5	4.5	10.5± 8.4
H ₂ O ₂ 5.0×10 ⁻⁵ M+ Ara C	200	30.5	6.0	21.0	27.0± 1.4	9.0	10.5	19.5± 17.5
Caf.	200	9.5	0.0	8.0	8.0± 2.8	0.5	1.0	1.5± 0.7
H ₂ O ₂ 2.5×10 ⁻⁵ M+ Caf.	200	19.5	5.0	16.5	21.5± 11.9	5.0	1.0	6.0± 7.0
H ₂ O ₂ 5.0×10 ⁻⁵ M+ Caf.	130	39.2	9.2	26.9	36.1± 10.7	22.3* (9.0)	18.5* (6.5)	40.8± 13.0* (15.5)
Hu	200	9.0	0.0	8.0	8.0± 0.0	1.5	1.5	3.0± 2.8
H ₂ O ₂ 2.5×10 ⁻⁵ M+ Hu	200	10.5	2.5	7.5	10.0± 1.4	2.0	1.0	3.0± 1.4
H ₂ O ₂ 5.0×10 ⁻⁵ M+ Hu	170	28.2	5.3	20.6	25.9± 6.6	10.6	8.2	18.8± 2.0

^aEach data is the mean and standard deviation of independent experiments.

*Observed frequency is significantly higher than expected ($p < 0.05$). The number of parentheses indicate expected value. The expected values are the sum of the yield induced by hydrogen peroxide alone, plus the yield induced by each inhibitor alone, minus the control value.

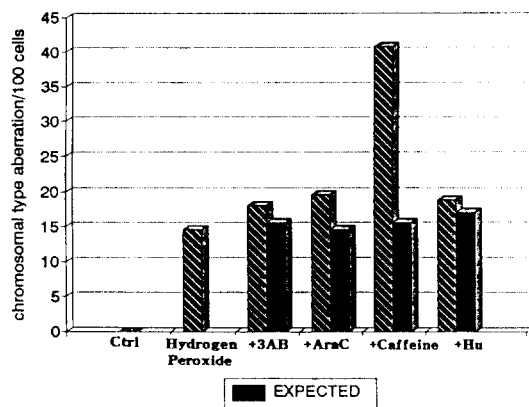


Fig. 2. Effect of DNA repair inhibitors on the frequency of chromosome aberration induced by 5×10^{-5} M of hydrogen peroxide during G₁ (The expected values are the sum of the yield induced by hydrogen peroxide alone, plus the yield induced by each inhibitor alone, minus the control value).

것을 알 수 있었다.

이 중 철 농도 5.5×10^{-4} M을 택해 BLM 6.6×10^{-7}

M 및 3.3×10^{-6} M에 대해 반복실험한 결과는 Table 4와 같다. 두 농도에서 모두 염색체형 염색체 이상 빈도가 23.0 및 70.0으로 기대치 49.5 및 99.0에 비해 감소된 것을 알 수 있었다.

(2) 과산화수소에 대한 영향

과산화수소를 G₁기에 처리하고 동시에 철을 처리한 결과는 Table 5와 같다.

과산화수소의 농도가 2.5×10^{-5} M일 때와 5.0×10^{-5} M일 때 모두 염색체 이상을 가진 세포의 빈도가 각각 16%에서 10.5%, 그리고 25.5%에서 9%로 감소하였으며 특히 5.0×10^{-5} M일 때 염색체형 염색체 이상빈도는 세포 100개당 4.5로 기대치 18.0에 비해 크게 감소하였다.

IV. 고 찰

돌연변이 유발원은 그들의 특성에 따라 DNA상에 각기 다른 형태의 손상을 유발할 수 있는데, BLM은 X선 등의 전리방사선과 마찬가지로 DNA상에 양가닥 절단(D.S.B.)을 유발하고 또한 모든 세포주기에 염색체 이상을 유발할 수 있다.

Table 3. The effect of iron on the frequency of chromosome aberration induced by BLM during G₁

Treatment	No. of cells counted	Percent of aberrant cells	Structural aberrations/100 cells					
			Chromatid type			Chromosomal type		
			Exchange	Deletion	Total ^a	Exchange	Deletion	Total ^a
Control	200	2.0	0.0	0.5	0.5±0.7	0.5	1.5	2.0±2.8
Fe 1.1×10 ⁻⁵ M	200	6.5	0.0	3.5	3.5±0.7	3.0	0.0	3.0±0.0
Fe 1.1×10 ⁻⁵ M	200	3.5	0.0	1.5	1.5±0.7	1.0	1.0	2.0±2.8
Fe 1.1×10 ⁻⁴ M	200	4.6	0.0	2.5	2.5±3.5	1.0	0.5	1.5±0.7
Fe 5.5×10 ⁻⁴ M	200	7.0	1.5	1.5	3.0±2.1	1.5	2.5	4.0±5.6
Fe 1.1×10 ⁻³ M	200	8.0	1.5	3.5	5.0±0.7	2.0	1.5	3.5±3.5
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M	200	18.5	4.5	4.0	8.5±6.4	18.5	10.5	29.0±7.0
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+Fe 1.1×10 ⁻⁵ M	100	10.0	2.0	2.0	4.0	6.0	3.0	9.0
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+Fe 1.1×10 ⁻⁵ M	200	16.0	1.5	2.0	3.5±0.7	10.0*	8.0	18.5±3.5
						(19.0)		
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+Fe 1.1×10 ⁻⁴ M	200	15.0	0.0	3.0	3.0±1.4	8.5*	10.5	19.0±2.8
						(19.0)		
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+Fe 5.5×10 ⁻⁴ M	200	14.5	2.5	3.0	5.5±4.9	9.0*	8.5	17.5±4.9*
						(19.5)		(31.0)
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+Fe 1.1×10 ⁻³ M	200	14.0	0.5	4.5	5.0±0.0	9.5*	3.0	12.5±2.0*
						(20.0)		(30.5)

Each data is the mean and standard deviation of independent experiments.

^aObserved frequency is significantly lower than expected (p<0.05). The number of parentheses indicate expected value. The expected values are the sum of the yield induced by BLM alone, plus the yield induced by ferrous sulfate alone, minus the control value.

Table 4. Effect of iron on the frequency of chromosome aberration induced by BLM during G₁

Treatment	No. of cells counted	Percent of aberrant cells	Structural aberrations/100 cells					
			Chromatid type			Chromosomal type		
			Exchange	Deletion	Total ^a	Exchange	Deletion	Total ^a
Control	200	5.0	0.0	2.5	2.5±0.7	1.5	1.5	3.0±0.0
Fe 5.5×10 ⁻⁴ M	200	6.5	0.0	4.0	4.0±1.4	2.5	1.5	4.0±2.8
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M	200	22.5	0.5	5.0	5.5±0.7	17.0	31.5	48.5±23.1
BLM 6.6×10 ⁻⁷ M+Fe	200	15.0	1.5	5.5	7.0±5.6	5.5*	17.5*	23.0±19.6*
						(18.0)	(31.5)	(49.5)
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M	200	31.0	4.0	6.0	10.0±4.2	36.0	62.0	98.0±33.6
BLM 3.3×10 ⁻⁶ M+Fe	200	28.0	1.5	6.5	8.0±4.2	29.5	40.5	70.0±2.8
						(62.0)	(99.0)	

Each data is the mean and standard deviation of independent experiments.

^aObserved frequency is significantly lower than expected (p<0.05). The number of parentheses indicate expected value. The expected values are the sum of the yield induced by BLM alone, plus the yield induced by ferrous sulfate alone, minus the control value.

BLM은 금속에 대해 chelating agent로 작용하는 데, BLM과 결합된 Fe³⁺ 이온이 O₂ 에 의해 환원되어 반응성이 큰 Fe²⁺ 이온으로 되며 fenton반응에 의해 수산화라디칼(·OH)을 생성하여 이것이 DNA에 손상을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다.^{1, 3)}

BLM은 세포주기 G₁기에 처리하게 되면 염색체형 염색체 이상이 나타나게 되는데, 본 실험에 사용한 4가지의 DNA 회복합성저해제 중 3-aminobenzamide(3AB) 및 cytosine arabinoside(Ara C)은 G₁기에, 그리고 caffeine 및 hydroxyurea(Hu)는 G₂기에

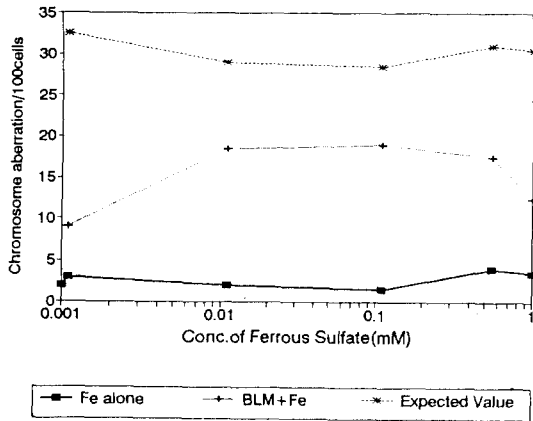


Fig. 3. Effect of iron on frequency of chromosome aberration induced by bleomycin (BLM) during G_1 (The expected values are the sum of the yield induced by BLM alone plus the yield induced by ferrous sulfate alone, minus the control value).

처리하였을 때 BLM에 의한 염색체 이상빈도를 크게 증가시켰다. 이러한 결과는 DNA상에 양가닥 절단을 유발하는 전리방사선 및 제한효소를 이용한 실험에서와 같은 결과를 보여주어 DNA상에 같은 형태의 상해를 유발하는 경우 그 상해의 회복양상이 유사하다는 것을 시사해 주고 있다.

CHO 세포에 과산화수소를 처리했을 때에는 caffeine을 처리한 경우를 제외하고는 통계적으로 유

의하지는 않았지만 염색체 이상빈도가 대체로 증가되는 경향을 볼 수 있었다.

본 실험에서는 $FeSO_4$ 의 처리에 의해 BLM 및 과산화수소에 의한 염색체 이상빈도가 감소되었다. 즉 $6.6 \times 10^{-7} M$ 의 BLM을 처리하고 여러 농도의 $FeSO_4$ ($1.1 \times 10^{-6} M \sim 1.1 \times 10^{-3} M$)를 처리한 경우, 그리고 $6.6 \times 10^{-7} M$ 및 $3.3 \times 10^{-6} M$ 의 BLM을 처리하고 $5.5 \times 10^{-4} M$ 의 $FeSO_4$ 를 처리한 경우 모두에서 염색체 이상빈도가 감소되었다.

일반적으로 BLM의 세포독성은 철이 매개하는 Harver-Weiss반응에 의해 생성된 $\cdot OH$ 라디칼 DNA에 손상을 주는 것으로 알려져 있다. BLM의 일부는 DNA 중 intercalating하는 끝부분의 bithiazol group을 포함하고 있는 퀴타이드와 결합하고, 일부는 Fe^{2+} 나 Fe^{3+} 와 안정된 1:1 복합체를 형성한다. Fe^{2+} -BLM 복합체는 산소에 의해 빠르게 산화되어 Fe^{3+} -BLM 복합체로 되는데, Fe^{2+} -BLM이 산화되는 과정에서 라디칼이 생성되는 것으로 보고되고 있다.¹¹⁾

Moseley(1989)¹¹⁾는 원숭이 신장세포인 CV-1에 SV-40을 감염시킨 후 BLM 및 $FeSO_4$ 를 처리하였을 때 SV-40의 DNA의 외가닥 절단(single strand breakage) 빈도가 증가하였으나, $FeCl_3$ 을 처리했을 경우에는 BLM에 의한 절단빈도에 영향을 주지 않았다고 보고하고 있다. 특히, BLM과 $FeSO_4$ 농도가 같을 경우나 또는 BLM보다 $FeSO_4$ 가 높은 농도일 때, 즉 BLM의 농도는 $10^{-4} M$ 으로 고정시키고 $FeSO_4$ 의 농도를 $10^{-4} M$ 에서 $10^{-2} M$ 로 증가시킬수록 절

Table 5. Effect of iron on the frequency of chromosome aberration induced by hydrogen peroxide during G_1

Treatment	No. of cells counted	Percent of aberrant cells	Structural aberrations/100 cells					
			Chromatid type			Chromosomal type		
			Exchange	Deletion	Total ^a	Exchange	Deletion	Total ^a
Control	200	5.5	0.0	5.0	5.0 ± 1.4	1.0	0.5	0.5 ± 0.7
Fe $5.5 \times 10^{-4} M$	200	8.5	0.0	6.5	6.5 ± 0.7	0.5	1.5	2.0 ± 0.0
H_2O_2 $2.5 \times 10^{-5} M$	200	16.0	2.5	11.5	14.0 ± 3.5	2.5	4.5	9.0 ± 11.2
H_2O_2 $2.5 \times 10^{-5} M$ + Fe	200	10.5	0.5	6.5	7.0 ± 1.4 (15.5)	3.5	1.0	4.5 ± 2.1
H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} M$	200	25.5	4.5	13.5	18.0 ± 7.0	8.5	8.0	16.5 ± 4.9
H_2O_2 $5.0 \times 10^{-5} M$ + Fe	200	9.0	0.0	6.0	6.0 ± 2.8 (19.5)	1.0* (9.0)	2.5	4.5 ± 2.1 (18.0)

^aEach data is the mean and standard deviation of independent experiments.

*Observed frequency is significantly lower than expected ($p < 0.05$). The number of parentheses indicate expected value. The expected values are the sum of the yield induced by hydrogen peroxide alone, plus the yield induced by ferrous sulfate alone, minus the control value.

단의 빈도가 증가되었다고 보고하였다. DNA의 외가닥 절단은 회복되지 않으면 양가닥 절단으로 전환될 수 있으며 이는 염색체 이상으로 나타날 수 있기 때문에 이 결과는 본 실험의 결과와 상치된다.

본 실험에서 FeSO₄의 처리가 BLM에 의한 염색체 이상빈도를 감소시킨 사실은 확실히 설명할 수는 없으나 다음과 같은 몇 가지 해석이 가능하다.

첫째로, Fe²⁺를 처리할 때 사용되는 용액의 종류에 따라 Fe²⁺-BLM 복합체 및 Fe³⁺-BLM 복합체의 형성이 차이가 나타날 수 있다. 즉 Løvstad¹¹⁾는 BLM에 Fe²⁺와 Fe³⁺를 첨가하였을 때 Fe³⁺-BLM 복합체의 생성물을 조사하였는데, Fe²⁺가 Fe³⁺보다 복합체의 생성이 매우 효과적이지만 사용되는 buffer의 종류에 따라서도 복합체의 생성이 차이가 있음을 보고하였는데, Fe²⁺를 BLM에 첨가할 때 인산완충용액을 사용한 경우 tris buffer나 hepes buffer를 사용했을 때보다 복합체의 형성이 감소된다고 보고하여, 본 실험에서와 같이 세포배양액에 직접 BLM 및 Fe를 처리한 경우에 세포배양액 내에 포함된 여러 가지 요소들때문에 생성되는 복합체의 양이 차이가 나서 결국 세포독성에 차이가 날 수 있다.

둘째로, 철 : BLM : 산소 복합체는 DNA가 존재하지 않는 세포질 내에서는 안정되지 못하고 BLM을 분해시키기 때문에,³⁾ Fe²⁺의 첨가가 오히려 BLM을 분해시켜 그 독성을 감소시킬 수 있을 가능성도 존재한다.

셋째로는 BLM의 농도 및 Fe²⁺ 농도의 차이가 Fe²⁺ 및 Fe³⁺의 redox potential을 변화시킬 수 있다. 즉 Løvstad¹¹⁾의 실험에서는 BLM의 농도가 2.7×10^{-4} M로 철의 농도(2.5×10^{-5} M ~ 2.5×10^{-4} M)보다 높은 조건에서의 결과이고, 또 Moseley⁴⁾의 실험은 BLM의 농도가 10^{-6} M 및 10^{-5} M에서 같은 농도의 FeSO₄를 가했을 때 DNA의 절단빈도가 증가하였으며, BLM의 농도가 10^{-4} M이고 FeSO₄를 가했을 때 DNA의 절단빈도가 증가하였으며, BLM의 농도가 10^{-4} M이고 FeSO₄의 농도가 10^{-5} M일 때는 별 차이가 없다가 10^{-4} ~ 10^{-2} M로 증가시킬 때는 절단빈도가 증가되었다고 보고하였다.

본 실험에서 6.6×10^{-7} M의 BLM 농도에 대해 FeSO₄의 농도가 1.1×10^{-6} M, 1.1×10^{-5} M, 1.1×10^{-4} M, 5.5×10^{-4} M, 그리고 1.1×10^{-3} M을 처리할 때 모두 염색체 이상빈도가 감소하였으며, 6.6×10^{-7} M 및 3.3×10^{-6} M의 BLM에 대해 5.5×10^{-4} M의 FeSO₄를 처리했으므로 본 연구에서 사용한 BLM의 농도가 타 연구자에 비해 낮기 때문에 농도의 차이에 의한 가능성도 생각해 볼 수도 있다.

과산화수소에 의한 염색체 이상빈도가 FeSO₄의 처리에 의해 감소한 사실은 Fe²⁺가 과산화수소에 의해 Fe³⁺로 산화되어 자유라디칼의 감소로 나타난 결과로서 설명이 가능하다.

V. 결 론

DNA에 결합하여 산소자유라디칼을 생성시킴으로써 DNA strand의 절단을 일으키는 항암물질인 bleomycin과 활성산소의 한 종류인 과산화수소를 CHO 세포에 처리하고, 전이금속의 하나인 철이 이들 물질에 미치는 영향과 시기별로 DNA 회복합성 저해제에 의한 효과를 알아보았다. 그 결과는 다음과 같이 요약된다.

- ① G₁기에 BLM 및 과산화수소를 처리하고 3AB와 Ara C는 이들과 동시에, caffeine과 Hu는 G₂기에 처리하였을 때, 저해제를 처리한 군에서의 염색체 이상빈도가 증가하여 DNA상에 같은 형태의 상해를 유발하는 경우 그 상해의 회복양상이 유사하다는 것을 시사해 주고 있다.
- ② G₁기에 1.1×10^{-6} ~ 1.1×10^{-3} M의 농도별로 철과 BLM을 동시에 처리했을 경우 모든 농도에서 BLM에 의한 염색체 이상빈도가 30~70% 정도 낮게 나타났는데, 이같은 결과는 이전의 연구들과는 반대되는 것으로서, 철의 용매로써 사용한 용액의 종류가 다르고, DNA가 존재하지 않을 때에는 세포질 내의 철-BLM 복합체가 오히려 불활성화되었을 가능성이 있고, 또한 BLM과 철의 농도 차이가 Fe²⁺와 Fe³⁺의 redox potential을 변화시켰기 때문으로 해석할 수 있다.
- ③ 철과 과산화수소를 G₁기에 동시에 처리했을 때에도 염색체 이상빈도가 감소하였으며, 이는 Fe²⁺가 과산화수소에 의해 Fe³⁺로 산화되어 자유라디칼의 감소로 나타난 결과로서 설명이 가능하다.

참고문헌

- 1) Hay, J., Shahzeidi, S. and Laurent, G. : Mechanisms of Bleomycin-Induced Lung Damage. *Archives of Toxicology*, **65**, 81-94, 1991.
- 2) Hecht, S. M. : DNA Strand Scission by Activated Bleomycin Group Antibiotics. *Federation Proc.*, **45**, 2784-2791, 1986.
- 3) Burger, R. M., Peisach, J. and Horwitz, S. B. : Activated Bleomycin—a Transient Complex of Drug, Iron, and Oxygen that Degrades DNA. *J. Biol.*

- Chem.*, **256**, 11636-11644, 1981.
- 4) Moseley, P. L. : Augmentation of Bleomycin-Induced DNA Damage in Intact Cells. *Am. J. Physiol.*, **257**, C882-C887, 1989.
 - 5) Wong, K., Morgan, A. R. and Paranchych, W. : Controlled Cleavage of Phage R17 RNA Within the Virion by Treatment with Ascorbic Acid and Copper²⁺. *Can J. Biochem.*, **52**, 950-958, 1974.
 - 6) Kihlman, B. A. and T. Natarajan, A. T. : Potentiation of Chromosomal Alterations by Inhibitors of DNA Repair *In* : DNA Repair and Its Inhibition, Nucleic Acid Symposium Series No.13, IRL Press, 319-339, 1984.
 - 7) Natarajan, A. T., Obe, G., Van Zeland, A. A. *et al.* : Molecular Mechanisms Involved in the Production of Chromosomal Aberrations—II. Utilization of Neurospora Endonuclease for the Study of Aberration Production by X-ray in G₁ and G₂ Stages on the Cell Cycle. *Mutat. Res.*, **69**, 293-305, 1980.
 - 8) Chung, H. W., Phillips, J. W., Winegar, R. A., Preston, R. J. and W. F. Morgan : Modulation of Restriction Enzyme-Induced Damage by Chemicals that Interfere with Cellular Responses to DNA Damage—a Cytogenetic and Pulsed-Field Gel Analysis. *Radiation Res.*, **125**, 107-113, 1991.
 - 9) Andersson, H. C. and Kihlman, B. A. : High Frequencies of Chromatid Aberration Produced During G₂ in Human Lymphocytes by Very Low Doses (0.025~0.4 Gy) of X-rays in Combinations with Inhibitions of DNA Synthesis. *Mutat. Res.*, **141**, 45-48, 1984.
 - 10) Pincheira, J. and Lopez-Saez, J. F. : Effects of Caffeine and Cycloheximide During G₂ Prophase in Control and X-ray Irradiated Human Lymphocytes. *Mutat. Res.*, **251**, 71-77, 1991.
 - 11) Løvstad, R. A. : The Reaction of Ferric- and Ferrous Salts with Bleomycin. *Int. J. Biochem.*, **23**, 235-238, 1991.