

크롬 6가 투여 후 A549 세포에서의 Reactive Oxygen Species와 크롬 5가의 발생

박 형 숙

한서대학교 환경과학과

Formation of Reactive Oxygen Species and Cr(V)
Entities in Chromium(VI) Exposed A549 Cells

Hyoung-Sook Park

Hanseo University, Department of Environmental Science

ABSTRACT

The production of reactive oxygen species on addition of hexavalent chromium (potassium dichromate, $K_2Cr_2O_7$) to lung cells in culture was studied using flow cytometer analysis. A Coulter Epics Profile flow cytometer was used to detect the formation of reactive oxygen species after $K_2Cr_2O_7$ was added to A549 cells grown to confluence. The cells were loaded with the dye, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, after which cellular esterases removed the acetate groups and the dye was trapped intracellularly. Reactive oxygen species oxidized the dye, with resultant fluorescence.

Increased doses of Cr(VI) caused increasing fluorescence (10-fold higher than background at 200 μM). Addition of Cr(III) compounds, as the picolinate or chloride, caused no increased fluorescence. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic studies indicated that three (as yet unidentified) spectral "signals" of the free radical type were formed on addition of 20, 50, 100 and 200 μM Cr(VI) to the A549 cells in suspension. Two other EPR "signals" with the characteristics of Cr(V) entities were seen at field values lower than the standard free radical value.

서 론

크롬 6가 화합물은 그 작용 기전이 정확히 규명되지 는 않았으나, 사람과 동물에게 돌연변이성물질이나 발암성물질로 알려져 왔다¹⁾. 공장등의 작업환경 노출이 크롬 독성의 주요 요인이며, 이들 중 크롬으로 인한 폐암의 발병율이 높다는 많은 보고가 있었다^{2,3)}.

크롬 화합물은 여러 가지 산화상태로 존재하나, 가

장 일반적인 것이 3가와 6가 상태이다.

크롬 6가 화합물은 정사면체 구조 (tetrahedral structure)로서 oxides나 oxyanions로 존재하며 ^{4,5,6)}, 세포막을 빠르게 통과한 후 체내에서 크롬 5가와 4가를 거쳐 안정한 크롬 3가로 환원된다. 일반적으로 비발암성 물질로 알려진 크롬 3가는 팔면체 구조 (octahedral structure)로서 양이온으로 존재하며 6가 크롬보다 크기 때문에 세포막 통과가 어렵다. 세포

밖에서의 크롬 6가로부터 크롬 3가로의 환원은 현재 보호작용으로 인지되고 있다. 크롬 3가가 DNA에 결합된 상태로 발견되는 것으로 보아, 크롬 화합물이 핵으로 접근한 후 그곳에서 환원되며, 크롬 화합물의 발암성은 그 위치에서 생성된 크롬 3가가 DNA에 작용한 결과로 나타날 수 있다.

크롬 6가 화합물은 환원과정 없이는 돌연변이성 물질이 아니며⁷⁾, 중간 생성물인 크롬 5가나 4가가 크롬 6가의 잠재적 독성 물질로서 현재 연구되고 있다. 크롬 6가의 환원에 의해 생성된 크롬 5가가 여러 배양세포들을 사용한 *in vitro* 실험에서 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy에 의해 발견 되어지고 있다^{8, 9, 10, 11, 12)}. 그러나 이들 크롬 4가와 5가들은 크롬 6가로부터 환원에 의해 직선 경로로 생성된 것이 아니고 불균등화 (disproportionate) 되었으며, 크롬 6가의 환원 과정은 아직 명확히 밝혀지지 않고 있다.

크롬 6가로부터 5가, 4가로의 환원과정은 단순하지 않으며, 이 과정 중 발생하는 Reactive Oxygen Species (ROS)가 크롬의 독성작용, 발암작용에 영향을 미칠 것이다. 최근 크롬 6가의 환원 과정에서 hydroxyl radical이나 singlet oxygen 같은 ROS의 생성이 EPR spectroscopy에 의해 보고되었으며, 이러한 과정에서 생성된 ROS는 유전자에 변이를 일으킬 수 있다.

DNA에 끼치는 크롬 6가의 효과를 alkaline elution technique을¹³⁾ 이용하여 A549 세포와 L1210 세포에서 보고하였다¹⁴⁾. A549 세포는 사람 폐조직으로부터 얻어진 Type II alveolar epithelial cells이며, L1210 세포는 leukemic origin의 murine cell line이다. 이 연구에서 5 μM 크롬 6가 화합물은 A549 세포에서는 single-strand break와 DNA-protein crosslinks를 나타내었으나, L1210 세포에서는 단지 DNA-protein crosslinks 만을 생성하였다. 그러므로 이 결과에서 폐조직이나 폐세포는 크롬 6가로 인한 DNA damage가 다른 조직과는 다르다는 전제를 이끌어 낼 수 있었고, 이를 바탕으로하여 본 실험에서는 A549 폐세포를 크롬 6가의 효과를 보기 위한 system으로 사용하였다.

현 연구의 목적은 사람의 폐세포가 크롬 6가 화합물에 의해서 ROS와 크롬의 paramagnetic form (상자성 형태)을 포함한 free radical을 발생하는 가를 연구하기 위함이다. 이런 사실은 *in vitro*에서는 이미

규명되었다^{15, 16)}. 크롬 6가의 작용을 연구하기 위해서 flow cytometry와 EPR Spectroscopy를 사용하였다. Flow cytometry 는 ROS를 발견하는데 효과가 뛰어난 기계이다. EPR Spectroscopy는 적당한 조건에서 크롬 화합물이 A549 세포에 작용하여 생성하는 크롬 5가 species를 포함한 다양한 free radical entities는 물론 paramagnetic transition metal ion species를 찾기위해서 사용하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 실험에 사용된 세포는 A549 human tumor 세포로서 American type culture collection (Rockville, MD.)으로부터 구입하였다. 이 세포는 human type의 Type II alveolar epithelial lung cell로부터 유래되었다. 이 세포는 단층으로 증식되며, 10% heat-inactivated fetal calf serum이 첨가되고 페니실린 (90 μg/ml)과 streptomycin (90 U/ml)을 함유한 pH 7.2의 Dulbecco's minimal essential medium (DMEM)으로 배양 하였다. 배양관은 5% CO₂를 함유하고 95% 공기로 조절된 습도 상태를 유지하였다.

Reactive Oxygen Species (ROS)의 측정

크롬 6가가 유발시킨 hydrogen peroxide (과산화수소)와 hydroperoxides 같은 ROS의 발생을 연구하고자 Coulter Epics Profile II flow cytometer를 사용하였다. 이 기계는 산화형 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)의 형광성 (fluorescence)을 측정한다¹⁷⁾. 즉 환원형 염료인 DCFH 가 세포 속으로 들어간 후, 크롬 6가를 투여하여 발생하는 ROS에 의해서 산화되면 형광성을 나타내게 된다. 그러므로 염료 형광성의 강도는 발생되는 ROS에 정비례한다.

이 실험을 위해 많은 양의 A549 세포들을 배양한 후, 1000 g에서 10분간 원심분리하여 준비한 후 pH 7.4인 phosphate buffer (0.1 M, 0.15 KCl을 함유했음)에 세포를 부유시킨다.

마지막 결정농도 5 μM의 DCFH-DA를 세포에 가한 후, 혼합물을 30분간 37°C water bath에서 혼들어 준다. 환원상태인 비형광성 염료 DCFH는 diacetate형으로서 존재하며 (DCFH-DA), 비극성이기 때문에 세포 속으로 빠르게 들어 갈 수 있다. 세포내

에 존재하는 esterases는 즉시 DCFH-DA를 가수분해하고 극성화합물을 생성하기 때문에, 염료는 환원형-비형광성 DCFH 상태로 세포안에 남게 된다. 다양한 농도의 $K_2Cr_2O_7$ (phosphate buffer saline 용액으로 준비한 20, 100, 200 μM)을 20 μl 씩 2×10^6 cells/ml의 세포를 함유한 tube에 넣는다 (tube 속의 총 volume은 1.02 ml). 그 후 발생되는 ROS를 10 분 간격으로 약 60분간 측정한다. 염료의 excitation wavelength는 488 nm이고 emission wavelength는 525 nm이다^[18]. 산화형-형광성 염료를 함유한 세포의 수와 log fluorescence를 나타내는 데이터는 자동적으로 cytometer 내의 disc에 기록되며 Epics Cytologic을 사용하여 histogram으로 그려진다.

Control sample은 phosphate buffer 용액 (PBS), 3가 크롬으로 $CrCl_3$ (세포로 투과되지 않는 것)와 chromium picolinate (세포로 투과 되는 것, methanol에 용해된 것)을 사용한다. $CrCl_3$ 와 chromium picolinate는 마지막 결정농도 200 μM 을 사용했다. Positive control은 hydrogen peroxide나 phorbol myristate를 사용했다.

환원형 염료가 6가 크롬에 의해서 직접 산화되는 가를 확인하기 위해서, 6가 크롬인 $K_2Cr_2O_7$ 을 직접 환원형 염료에 넣은 후 Perkin-Elmer fluorimeter에서 525 nm bandpass filter로 측정 했으나 60분간 이 혼합물에서 형광성은 나타나지 않았다. 실험은 3번씩 반복 하였으며 같은 결과를 얻었다.

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy의 측정

크롬 6가 ($K_2Cr_2O_7$)를 A549 폐세포에 투여한 후 발생하는 free radical and/or paramagnetic 크롬 5가의 스펙트럼을 찾아내기 위해서 Varian E-109 spectrometer (Varian Instruments, Palo Alto, CA)를 이용해서 EPR 데이터를 그렸다. 충분히 많은 양의 A549 세포를 배양 한 후 EPR 실험 직전에 세포를 harvest 한다. 약 2×10^7 cells 가량을 생리식염 용액 (PBS)에 다시 부유 시킨 후에 (total volume 0.18 ml) 0.25 ml 크롬을 첨가하였다. 사용된 크롬의 정확한 농도는 실험마다 다르며 각각의 그림 아래에 정확한 농도를 표시하였다. 크롬을 세포들과 잘 섞은 후, 섞은 세포 용액을 flat cell type의 EPR tube에 옮긴다. 이 cell (작은방)을 미리 주파수를 맞추어 놓은 microwave cavity에 넣는다.

만약 기계를 다시 조절할 필요가 있을 시는 빨리 주파수를 조정한다. 여기까지 걸리는 총 시간은 1분 30 초가 넘지 않는다.

EPR spectra는 100 KHz field modulation 으로 측정된다. Ho magnetic field (자기장)는 3230 Oersted에 맞추었다. Maximal field scan range는 200 Oersted: 전형적인 scan rate는 50 Oe/min이다. 가장 좋은 최대의 signal을 얻기 위해서 EPR spectroscopy의 여러 가지 조건을 잘 조절한다. 모든 필수적인 실험 조건 즉 크롬 6가의 농도, 다른 성분의 첨가 여부, 시간 등은 각각의 그림 설명 아래에 명시하였다.

A549 세포는 각각의 실험 전과 실험 후에 주의깊게 검사되었다. EPR 실험 후에 Trypan Blue exclusion으로 검사한 cell count determination에서 세포의 생존률은 모두 80% 이상이었다.

결과 및 고찰

ROS의 발생

그림 1과 2는 Epics Cytologic Program에 의해

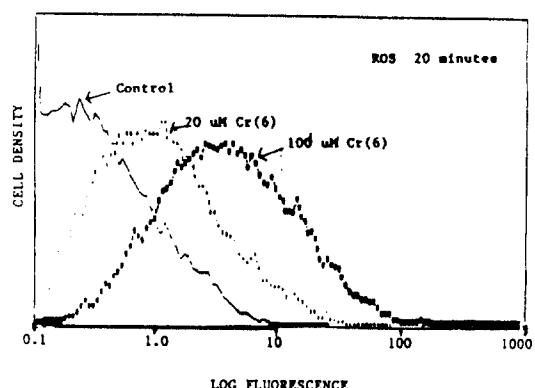


Fig. 1. Production of reactive oxygen species (ROS) after addition of Cr(VI) as potassium dichromate to A549 lung cells. The histograms, made using the program, EPICS Cytologic, represent the appearance of ROS after the addition of buffer, and 20 and 100 μM Cr(VI) to A549 cells. Measurements were made using the Coulter Epics Profile flow cytometer. Measurement were made 20 min after the addition of the compounds. Control was buffer vehicle.

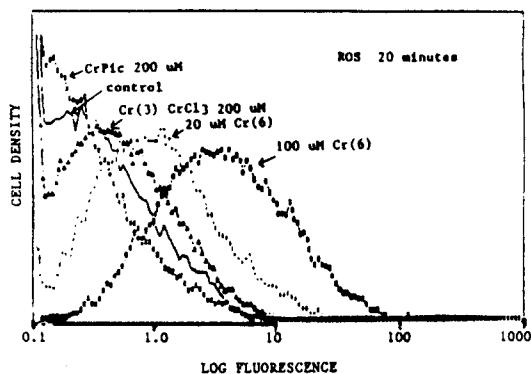


Fig. 2. Production of ROS after the addition of Cr(III) compounds (as CrCl_3 and Cr picolinate) and Cr(VI) as potassium dichromate. The histograms represent the appearance of ROS; measurements were made 20 min after the addition of each compound. Conditions were as for Fig. 1. Control was buffer vehicle.

서 그려진 대표적인 histogram이다. 그림 1 histogram은 A549 세포에 20과 100 μM 의 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 을 가한 후에 ROS가 발생하는 것을 나타내며, 크롬 6가의 농도가 증가함에 따라서 ROS의 발생량이 증가 하는 것을 보여준다. 그림 1, 2의 결과는 실험 20분에서의 반응을 나타낸다. 실험 30분에서 발생되는 ROS는 20분에서의 결과와 거의 동일 했으며, 이것은 반응이 20분에서 최대치에 이른다는 것을 의미한다. 발생되는 ROS는 약 40분 정도까지는 최대량으로 평형을 유지하다가 그후 감소하기 시작하는데, 산화형-염료 DCF는 대체로 안정 하다는 사실로 보아, 이 시점 이후에는 세포로부터 염료가 누출 된다는 것을 의미한다. 실험 결과에서와 같이, 크롬 6가를 A549 폐세포에 가했을 때 많은 ROS가 발생되는 사실은 6가 크롬의 환원 경로가 단순하지 않다는 것을 말한다. ROS는 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), singlet oxygen 그리고 H_2O_2 를 포함하며 이들은 해로운 독작용을 유도하는 복잡한 oxidative stress 과정에 참여한다. ROS는 효소의 불활성화, 돌연변이, apoptosis, 유전자의 재작성과 같은 해로운 작용을 한다. 이 oxidative stress 가 Cr(VI) 독성의 주요 원인인가에 관해서는 현재 연

구되고 있다. Shi와 Dalal은¹⁹⁾ 크롬 6가의 환원 후 생성된 Cr(V) 카탈리스가 H_2O_2 와 반응하여 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)을 발생한 것을 보고한 바 있다. 또한 6가 크롬에서 크롬 5가가 생성되고, 다시 5가는 3가의 카탈리스로 환원 된 후 DNA와 반응 할 것이다. 즉, 세포내에서 환원경로 중 발생되는 reactive species 와 세포내 성분들과의 반응이 일어날 가능성이 많이 있을 것이다.

크롬 3가인 CrCl_3 나 chromium picolinate를 세포에 가한 경우는 ROS가 발생되지 않았다(그림 2). Picolinate를 가해준 세포의 형광성은 오히려 control cells의 형광성 보다도 적게 나타났다. 이 실험이 행해지는 60분 동안 세포들은 균질성을 유지했으며, 세포에 손상은 없었다.

EPR Spectroscopy

크롬 6가를 A549 세포에 투여 한 후 일어나는 화학적, 생화학적인 변화를 연구하기 위해서 EPR spectroscopy를 사용하였다. EPR spectroscopy는 paramagnetic entities (상자성 물질)의 존재를 확인하고, 그들의 양을 측정하며, 그들의 생성과 소멸 반응 속도의 특징을 알아 낼 수 있다. 즉 일정한 원자가 상태와 특정한 배위 기하구조 (specific coordination geometries)를 지닌 전이금속 이온의 전자배열 상태나 free radical (자유 라디칼) 같은 분자의 홀전자 (unpaired electron)로부터 파생된 paramagnetism (상자기성)을 갖고 있는 화합물을 연구한다. 크롬과 같은 전이원소에서의 여러 산화상태와 카탈리스 정도에 관한 연구에 여러해 동안 성공적으로 이용되었다.

본 연구의 특별한 관심은 3d¹ 전자 배열을 함유한 paramagnetic entities인 원자가 5의 크롬 화합물에 있다. 이 배위 카탈리스는 크롬 6가 화합물이 열역학적으로 안정한 크롬 3가 카탈리스로 환원되는 중간물질로의 역할을 하는 것으로 인지되고 있다. 최근 크롬 6가의 환원 생성물로서 tetraperoxo-chromate 5가의 발견에 대해 언급한 연구들이 있으며^{20, 21)}, 여러 가지 화학적, 생화학적 크롬 5가의 특징들이 보고되었는데 g-values는 약 1.98이었다^{7, 20, 21)}. 대부분의 크롬 화합물은 g-value가 "free electron" 값에 가까우며 약간 높은 fields에서 (g-value는 약간 낮게) 발견되는데, 특히 크롬 5가의 경우 관측된 선의 폭넓이 (observed line width)는 흔히 좁아진다.

본 연구에서 EPR spectroscopy의 응용 목적은 가장 생리학적인 상태에 근접한 조건에서 A549 세포에서의 크롬 6가의 효과를 연구하는 것이다. 대부분의 EPR spectroscopy를 이용한 크롬의 연구에서는 frozen sample을 사용하였으나^{7,20,21}, 본 실험에서는 수용액 상태의 세포 부유액을 사용하였다. 액체 용액 상태에 있는 물질과(본 실험에서 사용) 일어 있는 “부동 상태”의 물질에서 얻어진 EPR spectra는 기하학적인 이유에서 완전히 다르다. 움직이지 않고 randomly oriented 된 sample에서의 g-value는 용액 상태에서 얻은 스펙트럼의 g-value와는 본질적으로 매우 다르다. 또한 수용액 상태의 세포 부유액을 사용한 경우, 실제 반응이 일어나는 시간에 생리적 조건에 아주 근접한 상태에서, 측정 과정이 교란되지 않으며 반응 속도학 적으로 반응하는 크롬 5가를 포함한 paramagnetic species를 관찰 할 수 있는 장점이 있다. 본 실험은 평형을 이동 시키거나 반응속도의 정보를 변화시키지 않기 위해서 spin-trapping agents

를 사용하지 않았다.

그림 3은 ‘재료 및 방법’에 명시한 조건 하에서 A549 세포에 크롬 6가를 가해주고 EPR technique 을 사용해서 얻어진 대표적인 스펙트럼이다. 이 스펙트럼은 5개의 signals을 나타내며 (peak 1에서 peak 5라고 부르기로 함), field strength는 왼쪽에서 오른쪽으로 증가된다. 실제의 H_0 값과 세포들이 크롬 6가와 혼합된 이후로부터 signals 들이 기록 될 때까지의 정확한 시간은 그림 아래 legend에 표시되었다. 이 스펙트럼은 resonance absorption의 1차 유도 함수를 나타낸다. 관찰된 모든 signals들의 강도는 (peak amplitude 최고 진폭 또는 integrated areas 적분면적) A549 세포의 밀도와 절대적인 상관관계를 나타낸다. 완충용액 만으로는 평평한 “base line”的 spectrum만이 그려진다. 또한, 모든 signals들은 가해지는 크롬 6가 농도에 따라 다르다. Free radical 표준인 DPPH도 측정되었다. 기계 사용 상태시 의 resonance (공명)는 3204.9 Oe에 맞

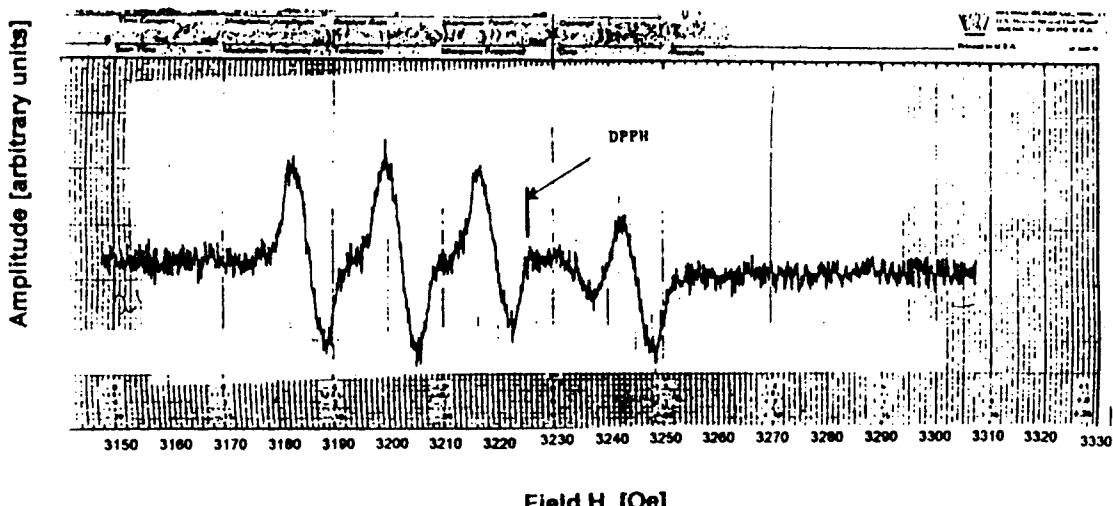


Fig. 3. EPR spectrum of A549 cells after exposure to Cr(VI). Signal amplitudes, in relative units (au), are plotted as a function of the H_0 field in [Oersted]. The reaction was started by adding Cr(VI) (as $K_2Cr_2O_7$ in buffered solution) to harvested and resuspended A549 cells at “zero time”. A total of 2.2×10^7 cells was used, in a volume of 0.43 ml. Final concentration at zero time were: Cr(VI) 116 μ M. Five peaks were recorded-actual times after mixing-as follows: Peak I(3184.7 Oe), at 2.98 min; Peak II(3201.9 Oe), at 3.3 min; Peak III(3218.4 Oe), at 3.7 min; Peak IV(3233.9 Oe), at 3.9 min; Peak V(3244.6 Oe), at 4.17 min. All these measurements were performed at 21°C. The inserted marker indicates the field position of an organic free radical standard (crystalline 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl, DPPH, with a g-value, $g=2.0036+0.0003$) under the conditions of this experiment. This narrow-line resonance signal of this marker was observed at 3204.9 Oe.

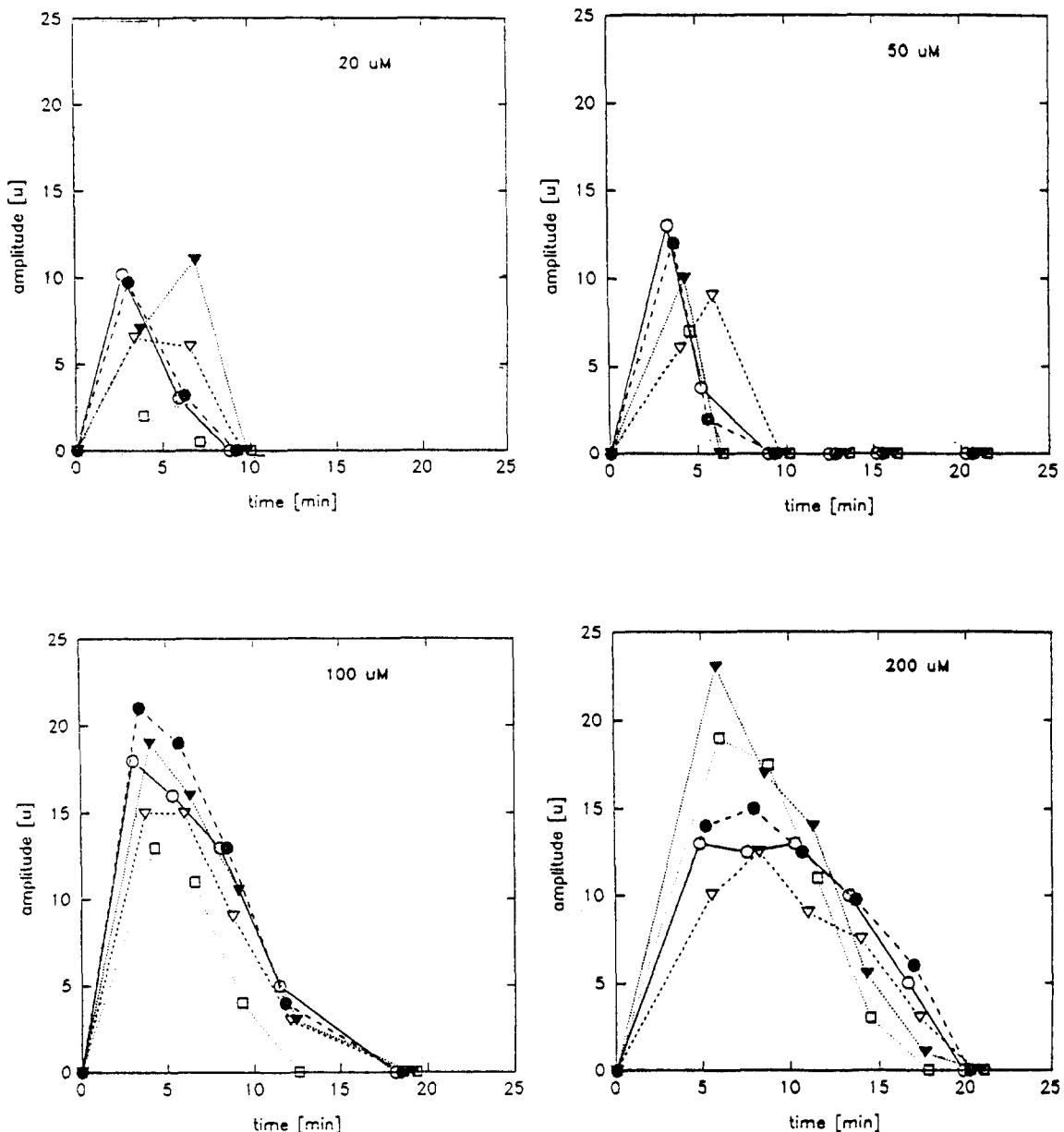


Fig. 4. EPR spectra of A549 cells after exposure to Cr(VI): time course. Peak amplitudes (arbitrary units, au), corresponding to the Peak I to V signals defined in Fig. 3, are plotted as a function of time after mixing, in min. Approximately 2×10^7 freshly harvested cells were resuspended in 0.18 ml phosphate-buffered saline. Cr(VI), as $K_2Cr_2O_7$, was added in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2) to obtain the final Cr(VI) concentrations specified below. Final phosphate concentration was about 58 mM. All four panels have identical X- and Y-axes. In each panel, the following codes are used: Peak I, open circles, solid line; Peak II, filled circles, long dashes; Peak III, open triangles, medium-length dashes; Peak IV, filled triangles, short dashes; Peak V, open squares, dotted line. Final Cr(VI) concentrations for exposure at "zero time" were (a) 23 μ M; (b) 58 μ M; (c) 116 μ M; (d) 233 μ M.

취겼다.

세 개의 EPR signals (peak 1에서 peak 3)들은 생성과 소멸의 속도가 상당히 다른 transient species이다. 이들은 marker 보다 낮은 자기장에서 관측되었고 (marker 위치 보다 원쪽), 즉 이것은 g-value가 free electron value 보다 큰 것을 나타낸다. 이 사실은 다른 정보들과 종합하여 볼 때, 이들 세 개의 EPR 스펙트럼은 free radical species의 특징을 나타낸다. 그러나 signals로부터 명확한 화학적 구조는 밝힐 수 없었다. 이들 species를 확실히 규명하기 위해서 더 많은 작업이 필요하다. 반면, marker 보다 높은 자기장 (marker 위치 보다 오른쪽)에서 관측된 EPR signals들은 (peaks 4와 5) paramagnetic 전이 이온의 쟈물과 일치 하므로 확실한 크롬 5가 species이다.

그림 4A에서 4D는 크롬 6가를 A549 세포에 투여했을 때에 발생한 5개 signals들의 생성과 소멸의 복잡한 운동역학을 보여준다. 이 그림은 앞에서 언급한 5개 주요 EPR peak의 최고 진폭 (peak ampli-

tude)을 시간의 함수로 나타내었다. 그림 4의 실험에서 A549 세포의 밀도는 일정했으며, 크롬 6가의 최종 농도는 23에서 233 μM 까지 10배의 차이가 나는 다양한 농도를 사용한 일련의 실험 결과이다. 세밀한 분석 결과, 각각의 주요 signals의 최대진폭 (maximal amplitude)는 크롬 6가 농도에 따라 상당히 다르며 복잡하다.

또한 진폭은 세포 혼합 후의 실험조건에 따라서 각각 다른 시간동안 지속된다. 가장 높은 크롬 6가 농도를 (233 μM) 사용 한 스펙트럼의 signal은 세포 혼합 후 약 20분간 지속된 반면, 낮은 농도를 사용한 경우의 signal은 10분을 겨우 지속하였다. 즉 이것은 붕괴의 속도가 다른 것을 나타낸다.

본 실험에서는 dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphate, sulfate 같은 화합물을 A549 세포의 세포외 용액에 첨가하였을 때의 효과를 살펴보았다. 그 결과 중 그림 5는 DMSO를 A549 세포의 세포부유액에 첨가한 경우 크롬 6가가 생성한 스펙트럼의 변화를 비교하였다. DMSO를 첨가 하였을 때 peak 5의

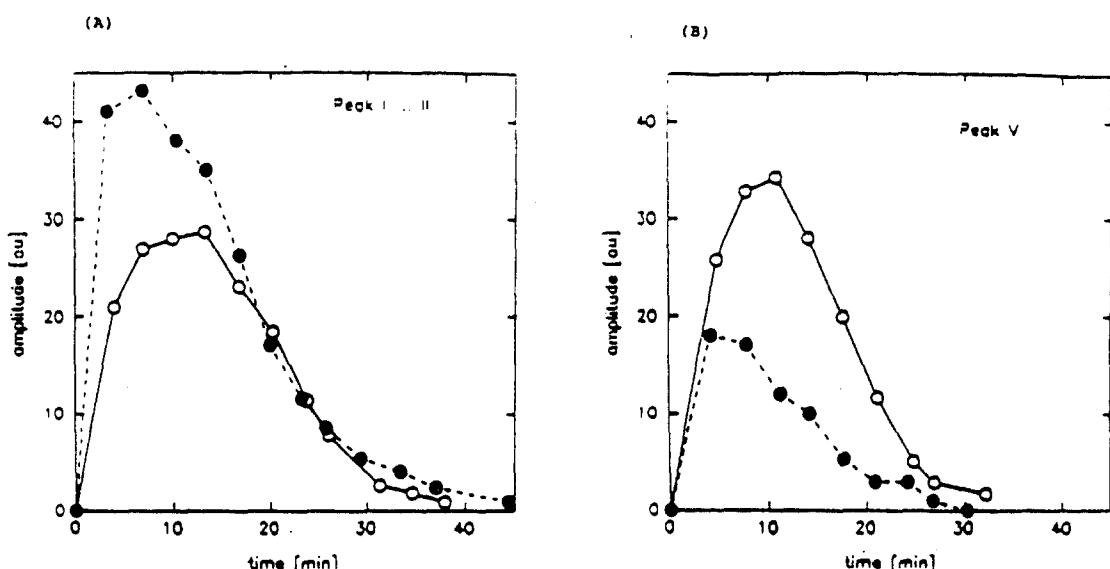


Fig. 5. EPR spectra of A549 cells after exposure to Cr(VI): effects of dimethylsulfoxide (DMSO) (a) Means of the observed amplitudes of Peak I and Peak II is plotted as a function time [min] after mixing. DMSO sample, open circles, solid line; control sample (no DMSO), filled circles, broken line. (b) The amplitude of Peak V is plotted in analogous fashion as a function of time after mixing. DMSO sample, open circles, solid line; control sample (no DMSO), filled circles, broken line. Experimental conditions used: 2.0×10^7 cells in 0.43 ml final volume, Cr(VI) 116 μM ; DMSO 320 mM.

진폭은 증가하였으나(그림 5B), peak 1과 2는 감소 하며(그림 5A) 반대효과를 나타내었다. 이 결과로부터 DMSO는 세포막의 크롬 6가의 투과성을 증가시키며 또한 radical trap으로 작용한다는 것을 추정 할수 있다. 또한 EPR 스펙트럼에 사용한 6가 크롬을 phosphate buffer 용액 대신에 phosphate가 제거된 증유수(H_2O)에 용해 시킨후에 세포와 혼합하여 스펙트럼을 돌린 경우, 모든 5개 signals의 진폭은 눈에 띠도록 크게 증가하였다. 또한 sulfate ($50 \mu M$)를 세포의 용액에 첨가 하였을 때 모든 5개 signals의 진폭은 감소하였다. 이 결과는 크롬 6가가 세포막에 있는 sulfate anion channel을 통해 투과 된다는 사실을 입증해 준다. 그러므로 phosphate와 sulfate와 같은 음이온들이 세포 외액에 존재하는 경우, 크롬 6가의 세포막 투과는 이들과의 경쟁으로 감소되며, 이에 따른 크롬 5가와 다른 radical의 생성을 감소시킨다.

결 론

크롬 6가 화합물을 A549 폐세포에 첨가 했을때 독성작용이 있는 것으로 알려진 ROS와 paramagnetic 크롬 5가가 발생되었다. ROS의 경우, 발생되는 ROS의 양은 크롬 6가의 농도에 비례하였다. 크롬 3가 화합물인 chromium chloride나 chromium picolinate를 첨가한 경우 ROS는 발생되지 않았다.

크롬 6가를 A549 세포에 섞은 후 측정한 EPR spectroscopy에서는 5개의 signals들이 발견 되었는데, 그 중 g-value가 free electron value 보다 큰 세 개의 EPR signals는 free radical species의 특징을 나타내며 이전에 어떤 실험에서도 보고된 적이 없다. 그러나 peak 4와 5는 그들의 resonance absorption이 free electron value 보다 더 높은 자기장에 있으므로 크롬 5가 entity에 의한 것을 알 수 있다. 특히 크롬 5가의 signals은 환원제의 첨가없이 상온에서 발생되었다. 그러므로 본 연구의 발견은 화학적 생화학적 system에서 크롬 6가가 환원 될 때, 어떤 형태의 크롬 5가가 발견 되었다는 다른 연구들과 일치된다. 이 크롬 6가의 환원 과정에서 생성된 크롬 5가와 ROS의 발생은 아마도 상호 긴밀하게 관련되어 있으며, 모두 크롬 6가가 폐세포에 독성작용을 일으키는데 상호작용을 할 것이다.

참 고 문 헌

- IARC. Chromium and chromium compounds. In: Monographs for the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some metals and metalic compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer, **23**, 205-323(1980).
- Lehmann, K.B. Ist grund zu einer besonderen Beunruhigung wegen des Auftretens von Lungenkrebs bei Chromatarbeitern vorhadern? *Zentralbl Gewerbehyg.*, **19**, 168-170. Cited in: Langard, S.(1990) "One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports" *Ame. J. Indus. Med.* **17**, 189-215(1992).
- US-Public Health Service. Health of workers in chromate producing industry, U.S. Department of Health, Education and Welfare Publ. US Government Printing Office, 192(1953).
- Jennette, K.W. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism, *Environ. Health Perspect.*, **40**, 233-252(1981).
- Ottenwalder, H., wiegand, H.J. and Bolt, H.M. Uptake of $^{54}\text{Cr}(\text{VI})$ by human erythrocytes: evidence for a carrier-mediated transport mechanism. *Sci. Total Environ.*, **71**, 561-566(1988).
- Standeven, A.M. and Wetterhahn, K.E. Chromium(VI) toxicity: Uptake, reduction, and DNA damage. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **8**, 1275-1283(1989).
- Petrilli, F.L., DeFlora, S. Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mut. Res.*, **54**, 139-147(1978).
- 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).
- Goodgame, D.M.L. and Joy, A.M. Relatively long-lived chromium(V) species are produced by the action of glutathione on carcinogenic chromium(VI). *J. Inorg. Biochem.*, **26**, 219-224(1986).
- Shi, X. and Dalal, N.S. The mechanisms of the chromate reduction by glutathione: ESR evidence for the glutathionyl radical and an isolable Cr(V) intermediate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **156**, 137-142(1988).

11. Aiyar, J., Borges, K.M., Floyd, R.A. and Wetterhahn, K.E. Role of chromium(V), glutathione thiyl radical and hydroxyl radical intermediates in chromium(VI)-induced DNA damage. *Toxicol. Environ. Chem.*, **22**, 135-148 (1989).
12. Sugiyama, M. Effects of vitamins on chromium (VI)-induced damage. *Environ. Health Perspect.*, **92**, 63-70(1991).
13. Kohn, K.W., Ewig, R.A.G., Erikson, R.C. and Zwelling, L.A. Measurement of strand breaks and crosslinks by alkaline elution. In: DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures, Vol 1, Part B.(Freidberg, E., Hanawalt, P.H. eds). New York: Marcel Dekker, 379-401(1981).
14. Park, H.S. and Witmer, C.M. Comparison of chromium-induced lesions in cultured human and mouse cell lines. *Toxicologist*, **8**, 158(1988).
15. Snyder, R.D. Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblasts. *Mutat. Res.*, **193**, 237-244 (1988).
16. Sugiyama, M. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic. Biol. Med.* **12**, 397-407(1992).
17. Bass, D.A., Parce, J.W., Dechatelet, L.R., Szejda, P., Seeds, M.S. and Thomas, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* **130**, 1910-1917(1983).
18. Brandt, R. and Keston, A.S. Synthesis of diacetyl dichlorofluorescein: A stable reagent for fluorometric analysis. *Anal. Biochem.* **11**, 6-9(1965).
19. Shi, X. and Dalal, N.S. Generation of hydroxyl radical by chromate in biologically relevant system: Role of Cr (V) complexes versus tetraperoxochromate (V). *Envi. Health Pers.*, **102** (Suppl 3), 231-236(1994).
20. Aiyar, J., Berkovits, H.J., Floyd, R.A. and Wetterhahn, K.E. 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 Perspect*, **92**, 53-62 (1991).
21. Kawanishi, S., Inoue, S. and Sano, S. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5952-5958(1986).