

암면에 의한 세포독성 및 변이원성의 실험실적 평가

홍윤철, 이관희

인하대학교 의과대학 예방의학교실

= Abstract =

In Vitro Assessment of Cytotoxicity and Mutagenicity of Rock Wool Fibers

Yun Chul Hong and Kwan Hee Lee

Department of Preventive Medicine, Inha University Medical College

This study was carried out to evaluate the cytotoxicity of rock wool fibers(RWFs) such as cell division disturbance, chromosomal and DNA damage, and mutagenicity using cultured cells. RWFs were the man made mineral fibers. In order to find the correlation between the cytotoxicity of RWFs and the phagocytic capacity of cells, the phagocytic processes were observed using scanning electron microscope. Cell division disturbance by RWFs was evaluated by the formation of multinucleated giant cells. The chromosomal damage was evaluated by the micronucleus formation. For the evaluation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) formation was measured utilizing calf thymus DNA. Mutagenicity was determined by the point mutation of HGPRT and the effect of RWFs on cell transformation was also observed. 1. Compared with the results of chrysotile, RWFs were no or little effect on the cell growth according to the results done by the tests of cell proliferation inhibition and relative plating efficiency. 2. The frequency of multinucleated giant cell formation was increased by the treatment of RWFs and it was dose-dependent. However, the effect of RWFs was weaker than that of chrysotile. 3. The number of micronuclei formed in the RWFs treated cells was between those of cells treated with chrysotile and those of untreated cells. 4. The 2 fold increase in the formation of 8-OH-dG in calf thymus DNA was observed in the cells treated with RWFs in the presence of H₂O₂. On the other hand, chrysotile had no effect on the 8-OH-dG formation. 5. RWFs had no effect on the HGPRT point mutation and cell transformation. These results showed that RWFs could induce chromosomal damage, cell division disturbance and oxidative DNA damage in the RWFs treated cells.

Key words : cytotoxicity, mutagenicity, rock wool fibers, chrysotile

*이 연구는 1996년도 한국과학재단 핵심전문연구비의 지원으로 이루어졌음.

I. 서론

석면 섬유에 폭로되면 폐암 및 중피종이 발생할 수 있다는 것이 여러 연구를 통하여 밝혀진 후 산업장에서 석면을 대체할 수 있는 물질을 도입하기 시작하였는데 이러한 대체물질은 대부분 석면과 같이 섬유형태를 띠고 있으며 그중 대표적인 것들이 인조광물섬유이다. 우리나라에서도 이러한 광물성 섬유의 사용이 증가되고 있으나 지금까지 광물성 섬유에 의한 건강장애는 잘 알려져 있지 않고(Saracci 등, 1982) 특히 변이원성 또는 발암성 여부에 있어서는 논란이 많아 아직 결론을 내지 못하고 있는 상태이다.

우리나라의 인조광물섬유에 대한 독성 및 변이원성 연구를 살펴보면 유인재(1995)와 홍윤철(1995)에 의한 독성학적 연구 등이 있을 뿐으로 연구성과가 매우 미미한 상태이다. 국내의 석면대체물질의 종류 및 양에 있어서 매우 빠른 증가를 보이는 것을 감안하면 이러한 석면대체물질 즉 인조광물섬유에 대한 연구가 매우 시급하다 아니할 수 없다.

암면은 인조광물섬유의 하나로서 현재 IARC의 발암성 물질 분류상 group 2B로 분류되고 있는 물질로 독성 및 발암성에 대한 평가는 불분명한 상태이다. 이러한 독성학적 평가는 실험실적 연구, 동물실험 및 역학적 연구가 체계적으로 갖추어져야 이루어질 수 있으나 현재 암면에 대한 연구자체가 별로 이루어진 바가 없어 전반적인 유해성평가를 할 수 없는 상태이다.

본 연구는 암면에 대한 유해성평가를 위하여 세포 독성에 미치는 기전 및 염색체와 DNA에 대한 영향, 변이원성 등을 밝히고자한 연구이다. 배양된 세포를 이용하여 암면에 대한 세포의 탐식작용이 세포독성에 어떠한 영향을 미치는 지와 암면이 가지고 있는 구조적 특성에 따라서 이러한 탐식작용이 어떠한 영향을 받는 지를 전자현미경적 관찰을 통하여 살펴보았다. 또한 암면이 세포분열을 저해하고 있는 지를 다핵세포형성정도를 통하여 살펴보았으며 염색체 자체에 대한 영향을 보기 위하여 소핵형성도 관찰하였다. DNA에 대한 영향은 calf thymus DNA를 이용하여

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)의 형성으로 산소성 손상을 평가하였다. 암면이 변이원성이 있는 지를 밝히기 위하여 HGPRT 점변이검사를 시행하였고 또한 암면이 세포변환에 영향을 미치는지를 관찰하였다.

II. 연구방법

1. 실험재료 및 배양세포

1) 실험재료

현재 우리나라에서 시판되고 있는 암면중 레진을 붙이는 최종단계처리를 거치지 않은 제품을 구입하여 사용하였으며 비교를 위하여 독성학적 평가가 비교적 많이 이루어져 있는 석면을 이용하였고 실험에 사용한 석면재료는 UICC standard sample인 chrysotile이었다. 암면분석을 위하여 주사전자현미경(SEM)검사와 Energy Dispersive X-ray(EDX)분석을 시행하였다.

2) 세포배양

실험에 사용한 배양세포는 BALB/3T3 clone A31 세포(ATCC CCL-163, USA), V79 세포(ATCC CCL-93, USA), CHO-K1 세포(ATCC CCL-61, USA)와 MeT-5A 세포(ATCC CRL-9444, USA)이었다. 이중 MeT-5A 세포는 광물섬유가 암을 일으킬 수 있는 표적조직인 인체의 중피에서 유래된 세포이고 나머지 세포는 포유류의 섬유아세포주이다. BALB/3T3 세포를 배양하기 위한 배양액은 우혈청 10%와 Dulbecco's modified Eagle's medium을 섞어 만들고 V79 세포를 배양하기 위한 배양액은 우태아혈청 5%와 Dulbecco's modified Eagle's medium을 섞어 만들었으며 CHO-K1 세포를 배양하기 위한 배양액은 우태아혈청 10%와 Ham's F-12 medium을 섞어 만들었고 MeT-5A 세포를 배양하기 위한 배양액은 우태아혈청 5%와 0.4 μ M hydrocortisone, 0.87 μ M insulin, 3.3 μ M epidermal growth factor, 20mM HEPES를 포함한 Medium 199를 섞어 만들었다.

배양온도 37°C에서 BALB/3T3 세포와 V79 세포는 10% CO₂, CHO-K1 세포와 MeT-5A 세포는 5% CO₂ humidified incubator에서 각각 배양하였다.

2. 세포독성검사

1) 세포탐식

60mm Petri dish에 cover glass를 깔고 그위에 V79 세포를 배양시킨후 암면과 chrysolite를 투여한 후 위상차현미경 및 주사전자현미경으로 관찰하였다. 주사현미경 관찰의 전처리로 세포를 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 씻은 다음 0.1M phosphate buffer로 만든 4% paraformaldehyde-1% glutaraldehyde solution으로 고정한 후 1% osmium tetroxide로 30분간 처리하고 ethanol과 isoamylacetate로 단계적으로 건조시켰다.

2) 세포증식억제

각각 4개의 농도로 된 암면과 chrysolite을 V79 세포가 80% 정도의 융합도를 이루고 있는 각각 4개씩의 배양플라스크에 1 ml씩 처리하였다. 그후 24시간과 48시간후에 각각 trypsin 처리하여 hemocytometer로 세포수를 세었다. 세포증식억제는 대조군과 비교한 세포수 감소정도로 구하였고, cell viability는 trypan blue로 염색하여 구하였다.

3. 다핵세포형성검사

25cm² 플라스크에서 MeT-5A 세포에 암면과 chrysolite을 농도별로 2개씩 3일간 폭로시킨후 PBS로 2회 washing하고 세포배양액을 5 ml씩 첨가하였다. 3일후 methanol로 고정하고 Giemsa로 염색하여 하나의 플라스크당 400 배울 시야 6곳에서 한 세포에 2개 이상의 핵을 가진 다핵세포를 세었다.

4. 소핵형성검사

CHO-K1 세포를 25 cm² 플라스크에 배양한후 암면과 chrysolite을 농도별로 2개씩 투여하고, 16시간후 cytochalasin B를 PBS에 희석시켜 배양액에 3.0 µg/ml가 되게 첨가하였다. 배양 24시간에 PBS로 2회 washing한 후 carnoy solution(methanol:acetic acid = 3:1)으로 고정하고 slide를 준비하여 Giemsa로 염색하였다. 검경은 1000배의 광학현미경을 사용하였고, 2개의 핵을 가진 cytokinesis-blocked(CB) cells만을 판독하였으며 주핵의 1/3을 넘지 않는 것만을 소핵으로 판정하였다.

5. 변이원성검사

1) HGPRT 점변이 검사

HGPRT 점변이 검사에 사용된 CHO-K1 세포는 2주간 10⁻⁵ M hypoxanthine, 3.2 x 10⁻⁶ M methotrexate, 5 x 10⁻⁶ M thymidine이 포함된 back-selected medium에서 배양하여 사용하였다. 75 cm² 플라스크에서 back-selected CHO-K1 세포가 80% 정도의 융합도를 형성할 때 암면과 chrysolite을 농도별로 2개씩 24시간 폭로시키고 PBS로 3회 씻은 후 정상 세포배양액을 15ml 첨가하여 2일간 배양하였다. 플라스크당 2 x 10⁶ cells이 되게 plating하여 5일간 배양한 후 이를 다시 100 mm Petri dish에 각각 5 x 10⁵ 개씩 세포를 plating하고 15 ml의 selective medium(6-TG 10 µg/ml 첨가)에서 2주간 배양한 후에 methanol로 고정하고 Giemsa로 염색하여 변이세포집락수를 세었다. 이때 상대배양효율을 알기 위하여 back-selected CHO-K1 세포에 암면과 chrysolite을 24시간 동안 폭로시킨후 각 배양플라스크의 세포수를 세고 시험관에서 세포수가 각각 300 개/ml가 되도록 세포배양액을 희석하였다. 각각의 희석액 1 ml를 세포배양액이 4 ml씩 들어 있는 60 mm Petri dish에 넣고 6일간 배양시킨후 methanol로 고정하고 Giemsa 염색을 하여 집락의 수를 세었다. 집락은 육안으로 식별이 될 수 있는 크기의 집락만을 세어 상대배양효율을 백분율로 나타내었다.

2) 세포변환검사

25cm² 플라스크에서 배양된 BALB/3T3 세포에 암면과 chrysotile을 농도별로 2개씩 24시간동안 폭로시킨 후 PBS로 2회 씻고 세포배양액을 5 ml씩 넣었다. 이후 일주일에 2회 배양액을 갈아주면서 3주후에 methanol로 고정하고 Giemsa 염색을 하여 세포변환검사를 하였다. 세포들이 비교적 진하게 염색되고 방향이 제멋대로이며 증충을 이루는 모양을 하고 세포들이 십자형으로 엇갈려 있는 세포군을 변환세포군의 기준으로 정하였다.

6. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG) 형성 측정

Single stranded calf thymus DNA 250 μ g을 5 mM H₂O₂와 2 mg의 암면 또는 Chrysotile을 포함한 50mM Tris/Hcl buffer(pH 7.4) 2 ml에 넣고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 폭로 24시간에 fiber를 침전시켜 제거하고 24시간 동안 4°C에서 0.3 M NaCl에 부유액을 투석시킨후 ethanol precipitation에 의해 DNA를 회수하였다. DNA sample을 200 μ l의 20 mM sodium acetate buffer(pH 4.8)에 녹인후 nuclease P1을 첨가하여 37°C에서 30분간, E. coli alkaline phosphatase 첨

가후 37°C에서 1시간 동안 incubation하여 nucleoside 수준까지 digestion시켰다. 이 sample을 electrochemical detector(ECD)가 부착된 HPLC(Gilson; column, Waters symmetry C-18; eluent, 10% methanol)에 주입하여 deoxyguanosine(dG)은 ultraviolet detector (280 nm)로 8-OH-dG는 ECD(+600 mV)로 측정하여 10³ dG에 대한 8-OH-dG의 농도비로 계산하였다.

7. 자료처리

모든 측정치는 산술평균과 표준편차로 표시하였고 세포수의 차이를 보기 위하여 분산분석 및 multiple comparison test를 시행하였다. 이때 유의수준은 $\alpha=0.05$ 로 하였다.

Ⅲ. 결 과

암면을 주사전자현미경으로 관찰한 결과 직경 4.48 μ m 정도의 굵은 섬유상을 나타내었고 chrysotile의 경우 직경 0.22 μ m 정도를 나타내었다(Figure 1). 암면의 조성을 보기위하여 에너지분산X선분석을 시행한 결과 SiO₂가 47.5%, CaO 22.5% 등으로 이루어져 있었다 (Table 1).

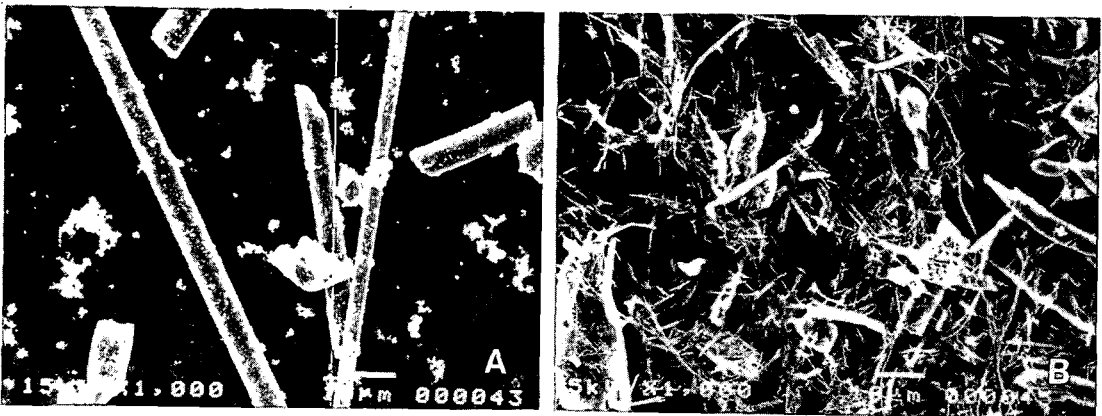


Figure 1. Scanning electron microscopic findings of rock wool fibers(A) and chrysotile fibers(B)

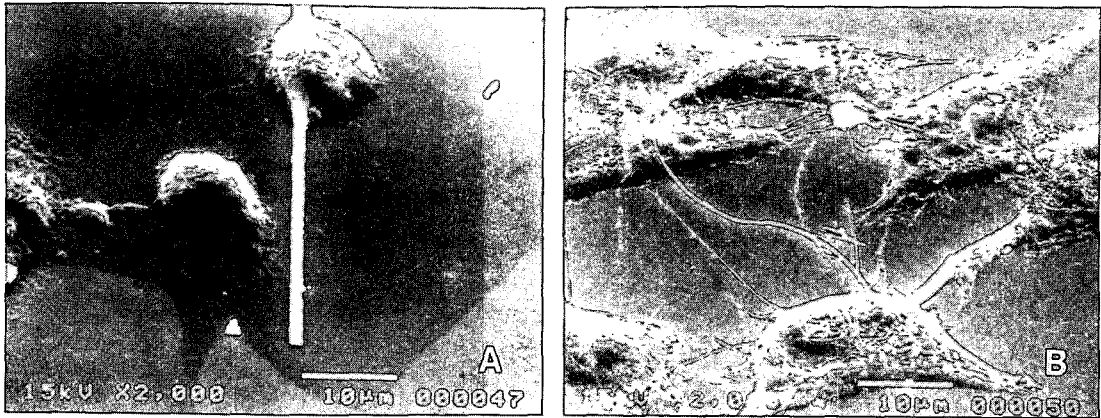


Figure 2. Scanning electron microscopic findings of phagocytosis of rock wool fiber(A) and chrysotile fibers(B) by V79 cells

배양된 V79 세포에 암면과 chrysotile을 투여한 후 주사전자현미경으로 관찰한 결과 chrysotile에 대한 탐식작용은 매우 활발하고 한 개의 chrysotile 섬유에 여러 세포들이 붙는 현상을 관찰할 수 있었으나 암면에 대해서는 탐식작용이 매우 드물게 관찰되었으며 또한 여러세포가 한 개의 섬유를 둘러싸는 현상은 관찰할 수 없었다(Figure 2).

Table 1. Elemental composition of rock wool fibers by SEM analysis

major components	content (%)
SiO ₂	47.5
CaO	22.5
Al ₂ O ₃	13.5
MgO	8
Fe ₂ O ₃	5.5
Na ₂ O	< 1
K ₂ O	< 1

세포가 5x10⁴ 개/ml로 들어있는 flask에 암면과 chrysotile을 폭로시킨후 24시간, 48시간후에 세포수를 관찰한 결과 암면의 경우 세포증식억제효과는 거

의 없거나 오히려 세포의 증식을 자극하는 것으로 나타났다. chrysotile의 경우는 세포수의 감소가 현저하게 나타났고 이러한 독성효과는 양-반응관계를 보였다(Table 2, 3).

세포분열장애의 정도를 평가하기 위하여 암면과 chrysotile을 투여한 후 MeT-5A 세포를 이용하여 다핵세포형성을 살펴본 결과 투여농도가 많아질수록 다핵세포가 많아지는 것을 알 수 있고 특히 chrysotile에서 현저한 것으로 나타났다. Chrysotile의 경우 투여농도가 많아질수록 세포내의 핵의 수도 뚜렷하게 증가

Table 2. Effect on cell growth in V79 cells after 24 hours of fiber application

treatment	concentration (µg/ml)	cell number (x10 ⁴ cells/ml)	viability (%)	viable cell (x10 ⁴ cells/ml)
control	0	30.6 ± 2.9	97.5	29.8
RWF	1.6	36.2 ± 5.8	92.5	33.5
	8	34.0 ± 6.4	92.9	31.6
	40	33.4 ± 4.3	96.8	32.3
	200	31.6 ± 4.4	94.6	29.9
chrysotile	1.6	28.4 ± 4.8	97.6	27.7
	8	31.8 ± 5.0	97.0	30.8
	40	28.2 ± 6.8	94.6	26.7
	200	15.4 ± 3.2	90.5	13.9

Table 3. Effect on cell growth in V79 cells after 48 hours of fiber application

treatment	concentration ($\mu\text{g/ml}$)	cell number ($\times 10^4$ cells/ml)	viability (%)	viable cell ($\times 10^4$ cells/ml)
control	0	124.8 \pm 15.7	97.7	121.9
RWF	1.6	133.2 \pm 10.4	98.8	131.6
	8	110.4 \pm 13.0	99.2	109.5
	40	121.0 \pm 8.6	97.8	118.3
	200	140.4 \pm 28.1	98.6	138.4
chrysotile	1.6	109.8 \pm 18.9	96.7	106.2
	8	105.2 \pm 7.5	97.8	102.9
	40	93.6 \pm 9.1	96.3	90.1
	200	41.2 \pm 4.8	91.8	37.8

하였으나 암면의 경우 이러한 효과가 분명하지 않았다. Chrysotile 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여한 경우는 세포가 대부분 사멸하여 평가할 수 없었다(Table 4).

CHO세포에서 cytochalasin B를 이용하여 인위적으로 binucleated cell을 만든후 소핵검사를 하였다. 암면과 chrysotile에서 모두 투여량이 증가하면서 소핵이 보다 많이 유도되는 것을 알수 있어 암면이 염색체손상을 유발할 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 효과는 chrysotile에 비하여 적게 나타났다(Table 5).

변이원성을 보기 위하여 HGPRT검사를 한 결과 배양효율에 미치는 영향에서 암면의 저농도에서는 오히

Table 4. Induction of multinucleate giant cells in MeT-5A cells following treatment with rock wool fiber or chrysotile

treatment	concentration ($\mu\text{g/ml}$)	number of multinucleate giant cells (mean \pm SD)						total
		no. of nuclei	2	3	4	5	6	
control	0	2.08 \pm 0.79	1.00 \pm 0.60	0.50 \pm 0.67	0.67 \pm 0.78	0.58 \pm 0.79	4.83 \pm 1.47	
RWF	1.6	3.33 \pm 0.78	1.58 \pm 1.08	0.50 \pm 0.67	0.33 \pm 0.49	0.08 \pm 0.29	5.83 \pm 1.47	
	8	3.08 \pm 1.44	1.50 \pm 1.00	1.08 \pm 0.79	0.50 \pm 0.52	0.67 \pm 0.78	6.83 \pm 1.11	
	40	2.75 \pm 1.60	2.00 \pm 0.85	1.17 \pm 1.11	0.33 \pm 0.65	0.33 \pm 0.49	6.58 \pm 1.68	
	200	2.92 \pm 1.00	1.33 \pm 1.23	1.67 \pm 1.23	0.67 \pm 0.65	0.67 \pm 0.65	7.25 \pm 1.86	
chrysotile	1.6	2.58 \pm 1.38	1.58 \pm 1.24	1.42 \pm 1.08	0.67 \pm 0.78	1.25 \pm 0.97	7.50 \pm 1.73	
	8	2.67 \pm 1.07	2.08 \pm 0.90	1.75 \pm 1.36	1.25 \pm 0.62	1.17 \pm 1.19	8.92 \pm 2.35	
	40	2.33 \pm 1.15	2.08 \pm 1.16	1.67 \pm 1.23	1.00 \pm 0.85	2.17 \pm 1.19	9.25 \pm 2.14	
	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Table 5. Induction of micronuclei in CHO cells following treatment with rock wool fiber or chrysotile

treatment	concentration ($\mu\text{g/ml}$)	number of cells carrying one or more micronuclei				micronuclei / 500 CB cells
		1	2	3	4	
control	0	10	2	0	0	14
RWF	1.6	13	0	0	0	13
	8	12	2	0	1	20
	40	13	2	2	0	23
	200	21	1	1	1	30
	chrysotile	1.6	18	2	0	0
chrysotile	8	15	4	1	0	26
	40	23	2	1	1	34
	200	19	9	3	0	46

려 배양효율이 증가되어 있는 것을 알 수 있으며 chrysotile의 경우 배양효율이 상당히 감소되어 있는 것을 알 수 있었고 이는 세포증식억제결과와 일치하는 소견이었다. HGPRT 변이는 암면 8 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ 투여군에서 각각 2×10^{-6} , 1×10^{-6} 으로 나타났으나 큰 의미는 없을 것으로 생각되며 chrysotile에서는 전혀 나타나지 않아 chrysotile 역시 변이원성은 없는 것으로 나타났다(Table 6).

3주후에 BALB/3T3 세포에서 변환세포군을 관찰하고자 하였으나 암면과 chrysotile 모두 뚜렷한 변환세포군을 형성하지 않았다. 그러나 chrysotile의 경우 세포의 monolayer가 깨지고 세포들이 쌓여 증식하고 있는 것이 관찰되었다. 세포수를 세어본 결과 암면에서는 대조군에 비하여 세포가 다소 증가되는데 그쳤고 통계적으로도 의미가 없었으나 chrysotile의 경우에는 분산분석결과 세포수의 유의한 증가가 있었고 특히 저농도인 1.6 $\mu\text{g/ml}$ 을 제외하고는 모두 대조군에 비하여 유의한 증가양상을 나타내어 세포의 표현형의 변화가 초래되었음을 알 수 있었다(Table 7).

Calf thymus DNA를 이용하여 8-OH-dG 형성을 살펴본 결과 암면을 넣은 경우는 H_2O_2 만을 첨가한 대조군보다 8-OH-dG의 형성이 증가되는 것을 알 수 있었으며 chrysotile을 투여한 경우는 H_2O_2 대조군과 거의 같은 수준을 나타내어 암면은 hydroxyl radical 형성을 증가시키나 chrysotile은 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다(Table 8, Figure 3).

Table 6. Plating efficiency and HGPRT mutation test in CHO cells treated with rock wool fiber or chrysotile

treatment	concentration ($\mu\text{g/ml}$)	plating efficiency (%)	mutation frequency ($\times 10^{-6}$)
control	0	65.0	0
RWF	1.6	86.2	0
	8	87.8	2
	40	79.3	0
	200	69.5	1
chrysotile	1.6	55.2	0
	8	25.8	0
	40	0.2	0
	200	0	ND

Table 7. Cell count of BALB/3T3 cells after 3 weeks treatment with rock wool fiber or chrysotile

treatment	concentration ($\mu\text{g/ml}$)	cell number ($\times 10^4$ cells/ml)
control	0	74.8 \pm 17.8
RWF	1.6	78.8 \pm 14.7
	8	90.0 \pm 13.2
	40	82.5 \pm 10.5
	200	79.5 \pm 5.5
chrysotile	1.6	68.5 \pm 16.4
	8	132.6 \pm 17.5*
	40	121.9 \pm 12.9*
	200	99.2 \pm 13.4*

*: significant difference by multiple comparison test (P < 0.05)

Table 8. 8-OH-dG formation of single stranded calf thymus DNA after 24h treatment with rock wool fiber or chrysotile in the presence of hydrogen peroxide

treatment	8-OH-dG/10 ³ dG
control(DNA)	0.41
5mM H_2O_2	5.94
1 mg/ml RWF + 5 mM H_2O_2	11.60
1 mg/ml chrysotile + 5 mM H_2O_2	5.84

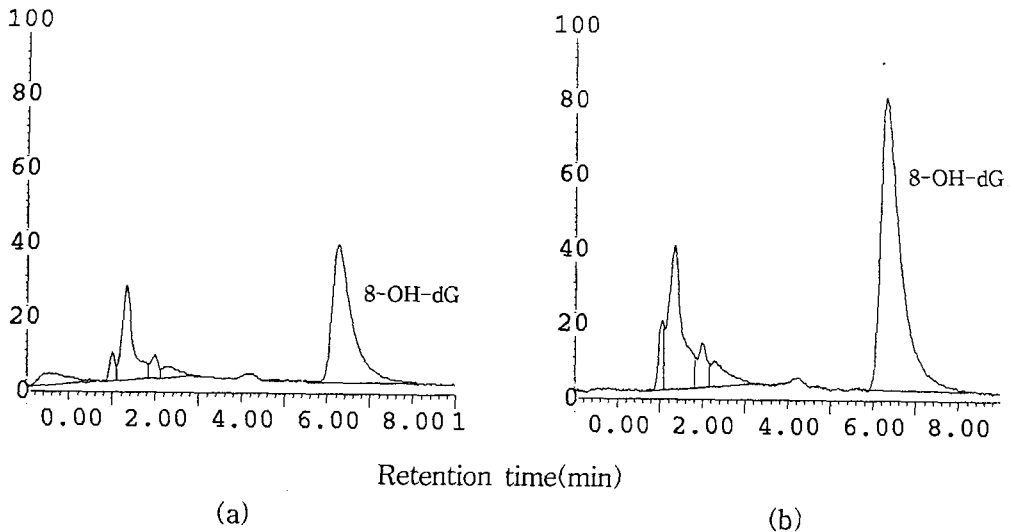


Figure 3. Detection of 8-OH-dG by HPLC-ECD. (a) DNA treated with 5mM H₂O₂, (b) DNA treated with 1mg/ml rock wool fiber in the presence of 5mM H₂O₂

IV. 고 찰

본 연구는 암면이 세포증식에 미치는 영향, 염색체와 DNA에 대한 영향 등의 세포독성과 변이원성을 밝히고자 한 연구이다. 이제까지 인조광물섬유들에 대한 독성학적 연구들이 충분히 이루어지지 않고 있었으며 그중에서도 암면에 대한 연구는 거의 없는 상태인데 본 연구를 통하여 암면은 세포증식에 대한 영향이 거의 없고 변이원성도 없는 것으로 나타났지만 소핵의 형성이나 거대세포의 형성을 초래할 수 있고 산소성 DNA 손상 유발 가능성이 있음을 알 수 있었다. 암면의 독성학적 특성을 평가하고자 본 연구에서는 여러 지표를 사용하였는데 각 지표마다 이를 잘 평가할 수 있는 세포들을 선택하여 사용하였다.

세포증식억제의 결과를 보면 암면은 chrysotile에 비하여 세포증식에 미치는 영향이 거의 없는 것으로 나타났으며 오히려 세포증식을 다소 초래할 수 있음을 알 수 있었다. Aragonite에 대한 연구(홍윤철 등, 1996)에서 섬유에 대한 탐식작용이 세포증식억제와 밀접한

관련을 가지고 있는 것으로 밝혀졌는데 암면은 V79세포에서 탐식작용이 거의 일어나지 않아 세포증식억제 효과가 나타나지 않은 주된 이유로 생각되었다. 더욱이 섬유의 구조적 특성이 세포독성에 관여하는 주된 요인인 것으로 알려져 있는데(Stanton 등, 1981) 암면은 직경이 4.48 μm 로서 세포가 탐식작용을 일으키기에 너무 굵기 때문에 세포증식억제효과가 나타나지 않은 것으로 생각되었다. 반면 대조군으로 사용한 chrysotile은 알려진 바대로 세포의 탐식작용이 활발하고 세포증식억제가 크게 나타나는 것을 알 수 있었다.

암면도 다른 광물섬유와 같이 세포분열에 영향을 미칠 것으로 생각되어(Dopp 등, 1995) 다핵거대세포형성으로 세포의 유사분열장애를 평가하였다(Kenne 등, 1986). 다핵거대세포의 형성은 그 자체가 광물섬유의 특이적인 반응양상은 아니지만(Prieditis 등, 1996) 유사분열장애를 평가하는 지표로서 활용될 수 있다(Hong 등, 1996). 특히 본 연구에서는 표적세포인 mesothelial cell을 이용하여 평가하였기 때문에 그 의미가 크다고 할 수 있다. 다핵세포형성결과를 보면 암

면은 chrysotile에 비하여 다핵거대세포를 적게 형성하기는 하였지만 다핵세포의 빈도가 양-반응관계를 보이며 높아지는 것을 알 수 있다. 이는 암면도 세포분열장애를 초래할 수 있다는 것을 의미한다. Cytokinesis-block method 를 이용하여 살펴본 소핵형성검사는 염색체손상을 보기 위한 것이다(Fenech 등, 1985; Krishna 등, 1989; Wataka 등, 1987). 소핵형성검사결과 암면투여군에서 대조군보다 소핵형성이 많이 생기고 또 이역시 양-반응관계를 보여 암면이 염색체손상을 일으킬 수 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 chrysotile에 비하여 볼 때 그 영향이 적게 나타났다. 반응성 산소기 형성과 이로 인한 DNA 손상가능성을 보기 위하여 8-OH-dG 형성을 살펴본 결과 암면은 hydroxyl radical 형성을 증가시키는데 비하여 chrysotile은 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이는 암면에 포함되어 있는 Fe 성분이 주된 역할을 한 것으로 생각되며 chrysotile에는 Fe가 없어 hydroxyl radical 형성을 촉진시키지 않는 것으로 생각되었다. CHO-K1 세포를 이용하여 HGPRT 점변이검사로 변이원성을 검사하는 방법은 포유동물세포에서의 forward mutation을 보는 방법으로 hprt 유전자의 변화를 관찰함으로써 폭로된 물질이 유전형의 변화를 초래하는지 여부를 보는 방법이다(Miyaki 등, 1979). 본 실험에서는 이미 존재하는 mutation을 없애기위하여 backward selection을 한 후에 HGPRT 점변이검사를 시행하였으므로 대조군의 mutation 수준을 낮출 수 있었고 보다 명확하게 forward mutation을 평가할 수 있었다. 검사결과를 보면 암면과 chrysotile 모두에서 의미있는 mutation을 확인할 수 없었다. 이는 chrysotile이 mutation을 일으키지 않거나 약하게 mutation을 일으킨다는 기존의 결과(Huang, 1979; Both 등, 1994) 들과 일치하는 소견이었으며 암면 역시 변이원성이 없다는 것을 알 수 있었다. 세포분열장애는 BALB/3T3 세포를 이용하였는데 이 세포는 밀집억제작용이 있고 자연변이가 거의 일어나지 않는다는 특성이 있다(Heidelberger 등, 1983). Chrysotile을 투여한 경우 밀집억제작용이 없어도 세포증식이 계속된 것을 확인할 수 있었으나 암

면의 경우 대조군보다 뚜렷한 증가를 보이지 않았다. 즉 암면은 세포의 표현형의 변화를 초래하지 않는 것으로 생각되었고 HGPRT 점변이검사결과를 같이 고려할 때 암면은 변이원성이 없는 것으로 평가되었다.

따라서 본 연구결과를 보면 암면은 세포분열장애와 염색체손상을 초래할 수 있으며 hydroxyl radical 형성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 세포분열장애나 염색체손상이 나타나려면 암면이 인체내에 들어와서 표적세포에 도달하여 탐식되어야 하는데 암면의 직경이 크기 때문에 생체내에서 표적세포에 이르는 암면의 양은 실험실적 조건과는 달리 매우 적을 것이다.

인조광물섭유에 대한 연구결과를 살펴보면 유리섬유에 폭로된 근로자에 있어서 폐의 X-선 소견, 호흡기 증상 및 폐기능 등에 대한 연구결과는 일반적으로 폐질환을 초래하지 않는 것으로 나타났다(Wright, 1968; Nasr 등, 1971). Weill 등(1983)의 연구결과를 살펴보면 흡연자에 있어서 폐사건의 small opacity 유병율이 섬유유 직경과 폭로기간과 관련이 있는 것으로 나타났는데 이 연구에서는 직경이 작은 섬유유에 폭로되면 조밀도는 낮지만 small opacity가 나타난다고 하였다.

동물실험의 결과를 살펴보면 유리섬유를 rat와 hamster에 intratracheal injection 한 결과 폐암이 발생하였고 섬유유길이가 10 μ m 보다 큰 경우 guinea pigs에서 섬유유화를 초래하였다(Pott 등, 1987; Wright 등, 1977). Stanton 등(1972)은 3종류의 석면과 6종의 유리섬유, 2종의 silica 및 2종의 금속분진을 rat의 늑막에 심는 연구를 하였는데 석면처럼 직경이 가는 유리섬유를 처리한 경우 12-18%의 중피종 발생율을 나타내었다. 이 연구자들은 석면과 유리섬유의 발암성은 물리화학적 성질보다는 이러한 구조적 형태와 주로 관련되어 있다고 하였다. 나중에 Stanton 등(1981)은 여러가지 화학적, 구조적 성상이 다른 물질로 연구를 한 결과 가늘고 긴 섬유구조가 이러한 물질의 발암성에 결정적인 역할을 하는 것으로 결론을 내었다. Pott 등(1976, 1984), Wagner 등(1984)과 Davis(1976)는 유리섬유를 실험동물의 늑막강 및 복강내 주입한 경우 암

을 일으킨다고 보고하면서 가늘고 긴 섬유가 발암성이 크다고 하였고 또한 생체내에서의 섬유의 durability가 발암성을 나타내는 데 중요한 요소라고 하였다. Harington(1981)과 Stanton등(1977; 1981)도 여러 가지 광물섬유로 연구한 결과 섬유의 길이가 $8\mu\text{m}$ 보다 길고 직경이 $0.25\mu\text{m}$ 보다 작은 경우 섬유의 수와 rat의 pleural mesothelioma의 발생간에 상관성이 높은 것으로 보고하였다.

세포배양을 이용한 실험실적 연구결과들을 살펴보면 Syrian hamster embryo cells을 이용한 실험결과 긴 유리섬유($15\mu\text{m}$)가 짧은 유리섬유보다 변이 빈도가 훨씬 크게 나타났다(Hesterberg 등, 1986). Hesterberg 등(1984)은 유리섬유를 milling한 결과 변이원성이 감소하는 것을 보고하였고 석면을 milling한 결과 실험실 연구에서 세포독성이 감소되는 연구결과도 있었다(Brown 등, 1978; Chamberlain 등, 1978). 또한 직경이 두꺼운 섬유보다 직경이 가는 섬유가 변이원성이 큰 것으로 나타났다. Chinese hamster ovary cells(Kelsey 등, 1986; Lavappa 등, 1975; Sincock 등, 1982), rat mesothelial cells(Jaurand 등, 1986), human mesothelial cells(Lechner 등, 1985) 및 rat tracheal cell(Hesterberg 등, 1987) 등을 사용하여 광물섬유에 의한 chromosome change를 관찰한 결과 chromosome에 대한 영향은 세포분열시에 chromosome의 이동이 세포내의 섬유물질에 의하여 물리적으로 방해를 받아서 생기는 것으로 생각되었다.

이러한 연구결과들을 보면 무엇보다 인조광물섬유가 미치는 독성은 섬유의 직경과 길이 등 구조적 특성과 관련이 많은 것을 알 수 있는데 본 연구에 사용된 암면은 현재 우리나라에서 시판되는 제품을 시료로 한 것으로 평균 $4.48\mu\text{m}$ 정도로 비교적 굵어 독성이 크지 않을 것을 기대할 수 있었으며 이는 암면이 세포증식억제를 거의 초래하지 않은 실험결과와 전자현미경적 관찰조건과 일치하였다. 그러나 또다른 독성학적 지표들인 세포분열장애, 염색체손상 및 DNA 손상 등이 초래되는 것을 확인할 수 있었는데 이러한 결과는 세포증식억제는 세포군 전체를 가지고 평가한 것이지

만 세포분열장애, 염색체 손상 등은 개개의 세포에서의 영향이 반영되기 때문이며 또한 DNA 손상평가는 암면을 DNA에 직접 노출시켜 관찰한 것이기 때문으로 생각된다. 즉, 암면은 직경이 굵은 구조적 특성에 의하여 모든 세포에 영향을 미치지 못하고 탐식되는 일부 세포에만 영향을 미치는 반면 암면을 탐식하지 않은 세포에는 오히려 증식을 자극하는 방향으로 영향을 미치는 것으로 생각된다.

결론적으로 암면은 세포증식억제에 대한 영향과 변이원성이 거의 없거나 크지 않은 것을 확인할 수 있었지만 세포분열장애와 염색체 손상 및 DNA 손상을 초래할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나 이는 실험실적 연구결과이기 때문에 생체에서의 반응으로 직접 연결하여 해석하는 데에는 다소 무리가 있으므로 향후 암면에 대한 동물실험 및 역학적 연구가 더욱 활발히 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구에서는 암면에 대한 유해성 평가를 위하여 배양된 세포 및 DNA로 세포증식억제, 세포분열장애, 염색체에 대한 영향, DNA 손상 및 변이원성 등을 평가하고자 하였다. 암면의 세포독성과 세포의 탐식작용과의 관련성을 보기 위하여 탐식작용을 주사전자현미경으로 관찰하였다. 암면에 의한 세포분열장애는 다핵거대세포의 형성으로 평가하였다. 염색체 손상은 소핵의 형성으로 평가하였고 산소성 DNA 손상은 calf thymus DNA를 이용하여 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) 형성으로 살펴보았다. 변이원성은 HGPRT 점변이검사로 평가하였고 더불어 암면이 세포변환에 미치는 영향을 관찰하였다.

연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 세포증식억제의 결과를 보면 암면은 chrysotile과 달리 영향이 없었다.
2. 암면의 투여후에 다핵거대세포의 형성빈도가 양-반응관계를 보이며 증가하였으나 그 영향은 chrysotile에 비하여 적게 나타났다.

3. 소핵형성검사결과 암면투여군에서 대조군보다 소핵형성이 많이 생기고 양-반응관계를 보여 암면이 염색체손상을 일으킬 수 있는 것을 알 수 있었으나 chrysotile에 비하여 그 영향이 적게 나타났다.

4. Calf thymus DNA에 암면을 투여한 결과 8-OH-dG의 형성은 H₂O₂ 존재하에 증가하였으나 chrysotile에서는 8-OH-dG의 증가가 나타나지 않았다.

5. 변이원성을 평가하기 위한 HGPRT 점변이검사와 세포변환검사에서 암면은 변이원성이 없는 것으로 평가되었다.

이상의 결과에서 암면은 세포분열장애, 염색체손상 및 DNA 손상을 초래할 수는 있지만 세포증식의 억제나 변이원성은 크지 않다는 것을 알 수 있다.

참고 문헌

유일재. 석면과 대체물질이 거식세포의 Fc 리셉터를 이용한 탐식작용에 미치는 영향. 산업보건연구원 연구자료 1995; 독성95-1-9: 21-41

홍윤철. 인천시 고잔동 주민의 유리섬유 건강피해에 관한 역학조사. 국립환경연구원 학술연구용역 최종보고서 1995; 3: 199-212

홍윤철, 이훈재. 일부 지하수에서 얻은 Aragonite의 특성과 BALB/3T3 세포에 대한 세포독성, 세포분열장애 및 형태학적 변이유발. 한국환경성독연변이, 발암원학회지 1996; 16(1): 35-42

Both K, Henderson DW, Turner DR. Asbestos and erionite fibers can induce mutations in human lymphocytes that result in loss of heterozygosity. *Int J Cancer* 1994; 59(4): 538-542

Brown RC, Chamberlain M, Griffiths DM, Timbell V. The effect of fiber size on the in vitro biological activity of three types of amphibole asbestos. *Int J Cancer* 1978; 22: 721-727

Chamberlain M, Brown RC. The cytotoxic effects of asbestos and other mineral dust in tissue culture cell lines. *Br J Exp Pathol* 1978; 59: 183-189

Davis JMG. Pathological aspects of the injection of glass fiber into the pleural and peritoneal cavities of rats and mice. In: LeVee, W. N., ed. Occupational Exposure to Fibrous Glass. NIOSH publication 76-151, 1976; DHEW: 141-149

Dopp E, Saedler J, Stopper H, Weiss DG, Schiffmann D. Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers. *Environ Health Perspect* 1975; 103: 268-271

Fenech M, Morley A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36

Harington JS. Fiber carcinogenesis; epidemiologic observations and the Stanton hypothesis. *J Natl Cancer Inst* 1981; 67: 977-987

Heidelberger C, Freeman AE, Pienta RJ, Sivak A, Bertram JS, Casto BC, Dunkel VC, Francis MW, Kakunaga T, Little JB, Schechtman LM. Cell transformation by chemical agents - a review and analysis of the literature. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program 1983; 283-385

Hesterberg TW, Barrett JC. Dependence of asbestos and mineral dust induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension. *Cancer Res* 1984; 44: 2170-2180

Hesterberg TW, Butterick CJ, Oshimura M. Role of phagocytosis in Syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers. *Cancer Res* 1986; 46: 5795-5801

Hesterberg TW, Ririe DG, Barrett JC. Mechanisms of cytotoxicity of asbestos in rat tracheal epithelial cells in culture. *Toxicol In Vitro* 1987; 1: 59-65

Hong YC, Choi SS. Cytotoxicity and multinucleate giant cell formation in Chinese hamster lung fibroblast caused by crocidolite and chrysotile. *JKMS* 1997; 12: 99-104

Huang SL. Amosite, chrysotile and crocidolite asbestos are mutagenic in Chinese hamster lung cells. *Mutat Res* 1979; 68(3): 265-274

Jaurand MC, Kheuang L, Magne L. Chromosomal changes induced by chrysotile fibers of benzo(3-4)pyrene in rat pleural mesothelial cells. *Mutat Res* 1986; 169: 141-145

Kelsey KT, Yano E, Liber HL. The in vitro genetic effects of fibrous erionite and crocidolite asbestos. *Br J Cancer* 1986; 54: 107-114

Kenne K, Ljungquist S, Ringertz NR. Effects of asbestos fibers on cell division, cell survival, and formation of thioguanine-resistant mutants in

- Chinese hamster ovary cells. *Environ Res* 1986; 39: 448-464
- Krishna G, Kropko ML, Theiss JC. Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat Res* 1989; 222: 63-69
- Lavappa KS, Fu MM, Epstein SS. Cytogenetic studies on chrysotile asbestos. *Environ Res* 1975; 10: 163-175
- Lechner JF, Tokiwa T, LaVeck M. Asbestos-associated chromosomal changes in human mesothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3884-3888
- Miyaki M, Akamatsu N, Ono T, Koyama H. Mutagenicity of metal cations in cultured cells from Chinese hamster. *Mutation Res* 1979; 68: 259-263
- Nasr ANM, Ditchek T, Scholtens PA. The prevalence of radiographic abnormalities in the chests of fiber glass workers. *J Occup Med* 1971; 13: 371-376
- Pott F, Ziem U, Reiffer FJ, Huth F, Ernst H, Mohr U. Carcinogenicity studies on fibers, metal compounds, and some other dusts in rats. *Exp Pathol* 1987; 32: 129-152
- Pott F, Huth F, Friedrichs KH. Results of animal carcinogenesis studies after application of fibrous glass and their implications regarding human exposure. In: LeVee, W. N., ed. *Occupational Exposure to Fibrous Glass*. NIOSH publication 76-151, 1976; DHEW: 183-191
- Pott F, Schlipkoter HW, Ziem U, Spurny K, Huth F. New results from implantation experiments with mineral fibers. In: Guthe, T., ed. *Biological Effects of Man-Made Mineral Fibers*. Copenhagen: World Health Organization 1984; 2: 286-302
- Prieditis H, Adamson IY. Alveolar macrophage kinetics and multinucleated giant cell formation after lung injury. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 534-538
- Saracci R, Simonato L. Man-made vitreous fibers and workers' health. *Scand J Work Environ Health* 1982; 8: 234-242
- Sincock AM, Delhanty JDA, Casey G. A comparison of cytogenetic response to asbestos and glass fiber in Chinese hamster and human cell lines. Demonstration of growth inhibition in primary human fibroblasts. *Mutat Res* 1982; 101: 257-268
- Stanton MF, Wrench C. Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 797-821
- Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M, Kent E. Carcinogenicity of fibrous glass; pleural response in the rat in relation to fiber dimension. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58: 587-597
- Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M, Morgan E, Smith A. Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestos and other fibrous minerals. *M Natl Cancer Inst* 1981; 57: 965-975
- Wagner HC, Berry GB, Hill RJ, Munday DE, Skidmore JW. Animal experiments with MMMF-effects of inhalation and intrapleural inoculation in rats. In: Guthe, T., ed. *Biological Effects of Man-Made Mineral Fibers*. Copenhagen; World Health Organization 1984; 2: 209-233
- Wataka A, Sasaki M. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: Comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat Res* 1987; 190: 51-57
- Weill H, Hughes JM, Hammad YY, Glindmeyer HW, Sharon G, Jones RN. Respiratory health in workers exposed to man-made vitreous fibers. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 104-112
- Wright GW. Airborne fibrous glass particles: Chest roentgenograms of persons with prolonged exposure. *Arch Environ Health* 1968; 16: 175-181
- Wright GW, Kuschner M. The influence of varying lengths of glass and asbestos fibers on tissue response in guinea pigs. In: Walton WH, ed. *Inhaled particles IV, Part 2*. New York 1977; 455-472