

6가 크롬 폭로가 흰쥐 폐조직의 8-Hydroxydeoxyguanosine 농도 및 Superoxide Dismutase와 8-Hydroxyguanine Endonuclease의 활성에 미치는 영향

김 현, 김현식¹⁾, 김로사, 김현영²⁾, 정재황²⁾

충북대학교 의과대학 예방의학교실 및 약리학교실¹⁾, 산업보건연구원 산업화학물질연구센터²⁾

Effects of Exposure to Hexavalent Chromium on the Level of 8-Hydroxydeoxyguanosine and the Activities of Superoxide Dismutase and 8-Hydroxyguanine Endonuclease in Rat Lung

Heon Kim, Hun-Sik Kim¹⁾, Rosa Kim, Hyeon-Yeong Kim²⁾, Jae-Hwang Jeong²⁾

Department of Preventive Medicine and Department of Pharmacology¹⁾, College of Medicine, Chungbuk National University, Industrial Chemical Research Center, Industrial Health Research Institute²⁾

Objectives. To determine the effects of exposure to hexavalent chromium, 93 male Sprague-Dawley rats were exposed to hexavalent chromium solution.

Methods. Rats were divided into 4 groups and exposed to 0.1 ml of 0 mM, 0.4 mM, 2.0 mM, and 10.0 mM potassium chromate in the first experiment, and to 0.1 ml of 0 mM, 20 mM, 40 mM, and 80 mM in the second for consecutive 3 days by tracheal instillation. Three and 10 rats were the controls for the first and the second experiments, respectively. Lung tissues were then removed to measure the 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) level using the HPLC-ECD method, superoxide dismutase (SOD) activity using the cytochrome C method, and 8-hydroxyguanine endonuclease activity using the oligonucleotide nicking assay.

Results. The results showed no significant linear relationship between chromium exposure level and 8-OH-dG level or 8-hydroxyguanine endonuclease activity. In the first experiment, 8-

OH-dG level and 8-hydroxyguanine endonuclease activity increased in 0.4 mM group, and then decreased in 2.0 mM and 10.0 mM groups. The correlation coefficients between 8-OH-dG level and 8-hydroxyguanine endonuclease activity was statistically significant ($P < 0.01$), and total SOD activity was elevated by chromium exposure in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). In contrast, there was no significant dose-response pattern or correlation in the second experiment.

Conclusions. Based on the fact that there was no linear relationship between chromium dose and 8-OH-dG level or activity of the repair enzyme, it seems unlikely that 8-OH-dG formation is the major mechanism of chromium carcinogenesis.

Korean J Prev Med 1999;32(1):101-107

Key Words: chromium, 8-hydroxydeoxyguanosine, 8-hydroxyguanine endonuclease, superoxide dismutase

서 론

여러가지 역학적 연구와 변이원성 실험을 통해서 6가 크롬이 폐암 등의 암을 유발한다는 것이 확인되었으나 그 기전에 대해서는 아직 확실하게 알려져 있지 않다. 지금까지의 연구에 의하면, 6가 크롬(Cr^{6+})은 세포 내에서 과산화수소(이하 H_2O_2)와 반응하여 tetraperochromium(V)을 만들며, tetraperochromium(V)은 superoxide에 의하여 유도되는

Fenton-type의 반응을 거쳐서 hydroxyl radical을 생성한다(Kawanishi 등, 1986). H_2O_2 가 존재하는 상황에서는 6가 크롬이 DNA single strand break을 유발하며 8-hydroxydeoxyguanosine(이하 8-OH-dG)을 생성하지만 glutathione이 존재하는 상황에서는 다량의 chromium-DNA adduct를 생성한다(Aiyar 등, 1989). 따라서 6가 크롬에 의한 발암성은, 6가 크롬이 환원되면서 생성되는 반응성이 강한 중간 대사 물질인 5가 크롬이나, hydroxyl

radical에 의한 것으로 생각되었다(Aiyar 등, 1991). 그러나 6가 크롬이 hydroxyl radical을 생성하기 위해서는 H_2O_2 가 세포 내에 고농도로 존재하여야만 하는데, 그러한 가능성은 매우 낮을 뿐 아니라, 지금까지의 연구가 모두 *in vitro*에서 이루어진 것이어서 생체 세포 내에서도 이러한 반응이 일어나는지에 대해서 의문의 여지가 있었다.

본 연구자 등은 이러한 반응이 인체 내에서도 일어나는가를 확인하기 위하여, 6가 크롬에 고농도로 폭로되는 안료공장 근로자들의 크롬 폭로수준과, 객담과 혈

액 중의 8-OH-dG 농도를 측정하였는데, 이들 사이에 유의한 상관관계를 발견할 수 없었다(Kim 등, 1999). 이 결과는, 생체 내에서 6가 크롬이 oxygen free radical을 만든다는 지금까지의 실험실적 연구의 결과와는 완전히 다른 것이다. 인체 내에 과량으로 만들어진 oxygen free radical이 superoxide dismutase (SOD) 등의 oxygen free radical scavenger system에 의하여 제거되며(Kasai와 Nishimura, 1986), 8-OH-dG은 endonuclease와 8-hydroxyguanine glycosylase에 의하여 수복된다(Chung 등, 1991; Bessho 등, 1993; 김현식, 1996). 그러므로 본 연구자 등의 연구결과는 인체 내에서 6가 크롬이 oxygen free radical을 생성하지 않거나, 혹은 6가 크롬에 의하여 인체 내에서 oxygen free radical과 8-OH-dG가 생성되지만 oxygen free radical scavenger나 8-OH-dG 수복효소에 의하여 제거되는 것으로 해석될 수 있다. 그 이전은, 6가 크롬이 생체 내에서 8-OH-dG 농도 및 oxygen free radical scavenger와 8-OH-dG 수복효소의 활성에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구가 수행되어야만, 명확하게 밝혀질 것이다.

본 연구의 목표는 실험동물에게 6가 크롬을 흡입시킨 다음 폐조직의 8-OH-dG 농도, oxygen free radical scavenger 활성, 그리고 8-OH-dG 수복 효소 활성을 측정함으로써, 1) 흡입된 6가 크롬에 의하여 생체 내에서 oxygen free radical이 생성되는지, 그리고 2) 6가 크롬에 의하여 생체내의 oxygen free radical scavenger와 8-OH-dG 수복효소의 활성이 증가되는지를 검정하는 것이다.

실험재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구는 2단계로 나누어 진행하였다. 제 1 단계에서는 10mM이하의 저농도 크롬용액을 폭로에 사용하였으며, 제 2 단계에서는 20mM이상의 고농도 크롬용액을 폭로에 사용하였다.

1) 제 1 단계

첫 번째 단계에서는 주령이 10주에 이르는 Sprague-Dawley종 웅성 랫트 40마리를 체중에 따라서 골고루 10마리씩 모두 4개군으로 다음과 같이 나누었으며, 이와는 별도로 3마리는 아무런 처치를 하지 않고 이들과 동시에 사육하였다.

- ① 비폭로군 3 마리
- ② 크롬 비폭로군 10 마리
- ③ 저농도크롬 폭로군 10 마리
- ④ 중농도크롬 폭로군 10 마리
- ⑤ 고농도크롬 폭로군 10 마리

2) 제 2 단계

두 번째 단계에서는 주령이 10주에 이르는 Sprague-Dawley종 웅성 랫트 50마리를 체중에 따라서 골고루 10마리씩 모두 5개군으로 다음과 같이 나누었다.

- ① 비폭로군 10 마리
- ② 크롬 비폭로군 10 마리
- ③ 저농도크롬 폭로군 10 마리
- ④ 중농도크롬 폭로군 10 마리
- ⑤ 고농도크롬 폭로군 10 마리

2. 6가 크롬의 기관지내 투여

1) 제 1 단계

Sodium chromate를 멸균된 생리식염수에 녹여서 각 군에 정해진 농도의 용액을 기관지 내에 점적투여하였다. 폭로는 ketamine을 복강 내에 주사하여 마취시킨 후에 매일 0.1cc씩 3일 동안 계속하였다. 군별 투여농도와 용량은 아래와 같다. 비폭로군은 아무런 폭로도 하지 않았다.

- ① 비폭로군 방치
- ② 크롬 비폭로군 0.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일
- ③ 저농도 크롬 폭로군 0.4 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일
- ④ 중농도 크롬 폭로군 2.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일
- ⑤ 고농도 크롬 폭로군 10.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일

2) 제 2 단계

제 1 단계와 폭로 조건은 같으나 단지 투여하는 6가 크롬 용액의 농도만 증가하였다. 군별 투여농도와 용량은 아래와 같다.

- ① 비폭로군 방치

② 크롬 비폭로군

0.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일

③ 저농도 크롬 폭로군

20.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일

④ 중농도 크롬 폭로군

40.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일

⑤ 고농도 크롬 폭로군

80.0 mM sodium chromate 0.1cc/일 X 3일

3. 폐조직의 적출 및 보관

3일 연속 폭로가 끝난 다음날 랫트를 경추이탈로 치사케 하고 빠른 시간 내에 해부하였다. 생리 식염수를 관류시켜 폐조직의 혈액을 제거한 다음, 폐조직을 적출하여 즉시 액체 질소에 담갔다. 충분히 동결이 이루어진 후에 -70℃의 냉동고에 옮겨 다음 실험 전까지 보관하였다.

4. 폐조직 중 8-OH-dG 농도의 측정

1) DNA 추출

폐조직 중에서 육안으로 가장 조직손상이 심한 것으로 확인된 좌하엽의 일부를 떼어내서 DNA를 추출하였다. 조직 100mg을 균질화하고 여기에서 Promega의 Wizard DNA purification kit를 이용하여 DNA를 추출하였다.

2) DNA의 소화

상기 방법으로 얻어진 DNA를 acetate buffer, pH 5에 녹인 후 nuclease P1으로 처리하고 이어 Tris-HCl buffer, pH 8.0에서 alkaline phosphatase로 처리하여 DNA를 nucleoside level까지 소화시켰다.

3) 8-OH-dG의 정량

소화시킨 DNA시료를 Gilson사의 길이 250 X 4.6 mm SynChropak RP-P 역상 column과 ECD 및 UVD가 부착된 HPLC에 주입하여 8-OH-dG와 정상 dG를 정량하였다. HPLC는 Gilson사의 Model 305 pump와, ESA사의 Coulochem II Model 5200A ECD, 그리고 Gilson사의 Model 115 UVD, AQUA Formula사의 Chromatocorder 21, Water사의 741 Data-module 등으로 구성되었다. 이동상 용액으로는 10% methanol, 50mM phosphate buffer 용액을 사용하였다. 8-OH-dG는

ECD로 정량하였는데, guard cell의 전압은 800mV, 1번 채널의 전압은 150mV, 그리고 2번 채널의 전압은 400mV로 하였으며, 2번 채널의 신호를 10초간 여과하고 증폭하여 수신하였다.

5. 폐조직 추출액의 8-hydroxyguanine endonuclease 활성도 측정

폐조직 추출액의 8-hydroxyguanine endonuclease 활성도 측정은 김현식(1996)의 방법을 이용하였다.

1) 폐조직 추출액의 준비

폐조직 적당량을 얼음 위에서 균질화(homogenize)하였다. 이 균질액을 0.25 M sucrose가 첨가된 30ml의 buffer A (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1mM EDTA, 0.1mM -mercaptoethanol, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 부유시킨 후 얼음물로 냉각시킨 상태에서 폐조직을 초음파 분쇄기(Heatsystems-Ultrasonic)로 분쇄하여 20,000X g에서 30분간 원침하였다. 여기서 얻은 상청액에 최종 농도가 1%가 되도록 5% streptomycin(Sigma Co.) 용액을 첨가한 후 30분간 잘 섞어서 핵산이 침전되도록 하고, 18,000X g에서 20분간 원침하여 침전물을 가라앉혔다. 이 때 얻은 상청액을 잘 섞고 ammonium sulfate를 조금씩 가하면서 녹여 단백질을 단계적으로 침전시키며, 이 과정에서 ammonium sulfate 농도 60-80% 구간에서 얻어진 단백질을 침전물에 8-hydroxyguanine endonuclease의 대부분이 포함되어 있으므로 이 부분을 분리 회수하여 5 ml의 buffer A에 다시 녹여 buffer A로 투석함으로써 ammonium sulfate를 제거하였다.

2) 단백질의 정량

세포 추출물의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 bicinchoninic acid(BCA)법(Smith 등, 1985)으로 측정하였다.

3) 8-Hydroxyguanine endonuclease의 부분 정제

상기의 ammonium sulfate 분획을 centricon 농축기(Amicon)에 옮겨 단백

질을 농축시킨 후 동일한 양의 glycerol을 가해 영하 20℃에 보관하며 필요한 경우에 이용하였다.

4) Endonuclease 활성의 측정 및 정량

(1) 기질 oligonucleotide의 합성

8-Hydroxyguanine endonuclease의 활성도를 검사하기 위하여 8-hydroxyguanine을 함유하는 46mer의 oligodeoxynucleotide와 이와 상보적인 46mer를 합성하여 annealing시켜 double strand 46mer를 합성하였다. 이 oligonucleotide의 구조는 다음과 같다.

OH

↓
CAGCCAATCAGTGCACCATCCCGGTCTGTTTTAGAACGTCTGTGACT
GTCTGGTTAGTCACTGGTAGGGCCAGCAAAATCTTGCAGCACTGA

(2) Oligonucleotide의 5'-end labeling

8-Hydroxyguanine endonuclease의 활성도 검사의 기질로 사용되는 oligonucleotide의 5'-말단을 ³²P로 표지하였다. Oligonucleotide 100 pmole을 [γ -³²P]ATP(5,000 Ci/mmol)와 20 unit의 T4 polynucleotide kinase와 함께 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM MgCl₂, 7mM dithiothreitol로 이루어진 완충액 20 μ l에 섞어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 10분간 70℃로 가열하여 반응을 정지시켰다. 말단 표지된 single strand oligonucleotide는 효소 활성 측정의 기질로 사용하기 위하여 double strand로 만들기 전까지 -20℃에 보관하였다.

(3) Double strand oligonucleotide의 제조

5'-말단이 ³²P로 표지된 oligonucleotide를 상보적인 염기배열을 지닌 다른 oligonucleotide와 1:1로 혼합하여 70℃로 10분간 가열한 다음, 37℃에서 30분간 서서히 식혀서 double strand oligonucleotide를 만들었다.

(4) 효소 반응

기질로 사용되는 oligonucleotide 0.4 pmole을 50 μ l의 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 50mM KCl이 포함된 완충액에 60/80분액 5 μ l와 섞어서 37℃에서 10분간 반응시켰다. 효소반응 종료 후 반응 산

물을 7 M urea가 함유된 20% denaturing polyacrylamide gel에서 2,000 Volt로 전기영동하였다.

(5) 자가 감광

전기영동 후 polyacrylamide gel을 말려서 X-ray film과 함께 cassette에 넣고 -70℃에서 12-18 시간 동안 자가감광(autoradiography)을 시행하였다. Film에 나타난 DNA 절단 산물 band의 강도를 video densitometer를 이용하여 측정하였다. 1 Unit의 endonuclease 활성은 기질로 사용된 oligonucleotide를 5분간에 1.0 pmole 절단하는 것으로 정의하였다.

6. SOD 활성의 측정 및 정량

세포 추출물의 SOD 활성은 ferricytochrome C 환원법(McCord와 Fridovich, 1969)을 이용하여 정량하였다. Xanthine과 xanthine oxidase(X/XO)의 상호작용에 의하여 superoxide anion(O₂⁻)이 생성되는데 이것이 cytochrome C를 환원시켜서 나타내는 550 nm에서의 흡광도 변화율이 분당 0.025가 되도록 X/XO 양을 조정하여 사용하였다. 일정한 단백질 량에 해당되는 세포 추출물을 가하여 변화하는 흡광도의 억제정도를 측정하였는데, 1 unit의 효소 활성은 OD₅₆₀의 변화율을 50% 억제하는 SOD의 양으로 정하였다.

7. 통계 분석

크롬 폭로군과 비폭로군의 8-OH-dG 농도와, 8-hydroxyguanine endonuclease와 SOD의 활성은 ANOVA test를 이용하여 평균에 유의한 차이가 있는가를 비교하였다. 크롬 폭로농도 변화에 따른 8-OH-dG 농도와, 8-hydroxyguanine endonuclease와 SOD의 활성도 변화의 유의성은 회귀분석을 이용하여 검정하였으며, 위 세 가지 효소의 활성도 사이의 관련성에 대해서는 상관분석을 시행하였다.

결 과

이동상의 속도를 1ml/min로 하였을 때, 8-OH-dG는 18분 내외에서 검출되었다(Figure 1). 실험동물 가운데 제 1 단계

의 고농도 크롬폭로군과 제 2 단계의 고농도 크롬폭로군 가운데 각각 한 마리씩이 마취하는 도중 사망하였다.

1. 제 1 단계

1) 폐조직의 8-OH-dG 농도 및 8-hydroxyguanine endonuclease의 활성화도

비폭로군의 8-OH-dG 농도는 평균±표준편차가 2.98±1.36 8-OH-dG/10⁴dG였

으며, 크롬 비폭로군은 3.77±1.42 8-OH-dG/10⁴dG. 저농도 크롬 폭로군은 4.85±2.08 8-OH-dG/10⁴dG로 약간 증가하였다가, 중농도 크롬 폭로군에서는 3.25±0.54 8-OH-dG/10⁴dG, 그리고 고농도 크롬 폭로군에서는 3.19±1.24 8-OH-dG/10⁴dG로 감소하였다. 그러나 비폭로군을 제외한 네 군에서 투여농도와 8-OH-dG 농도 사이에 유의한 관련성은 존재하지 않았다. 군별 8-hydroxyguanine

endonuclease의 활성화도는 그 평균치가 비폭로군에서 가장 낮고, 크롬 비폭로군에서 약간 증가하였다가, 저농도 크롬 폭로군에서 최고조에 이르렀으며, 투여하는 용액의 크롬농도가 증가한 경우 그 활성화도가 감소하였다. 그러나 비폭로군을 제외한 네 군의 변화양상은 통계적으로 유의한 것은 아니었다(Table 1).

2) 폐조직의 SOD 농도

총 SOD 활성화도는 투여농도가 증가하면 직선적으로 증가하는 경향을 보였으며, 고농도 크롬 폭로군에서 가장 높은 활성화도를 나타냈다. 이러한 경향은 통계적으로도 유의하였다. 특히 비폭로군의 총 SOD 활성화도는 크롬 비폭로군에 비해서도 유의하게 낮았다. 총 SOD의 활성화도를 MnSOD와 CuZnSOD로 나누어 분석한 결과 MnSOD 활성화도는 투여한 6가 크롬 용액의 농도와 유의한 직선적 관계를 보이지 않았지만, CuZnSOD는 통계적으로 유의하게 증가하는 경향을 보였다(Table 2).

3) 8-OH-dG 농도와, 8-hydroxyguanine endonuclease와 총 SOD, 그리고 MnSOD, CuZnSOD의 활성화도 사이의 상관관계

총 SOD 활성화도는 MnSOD와 CuZnSOD 활성화도, 그리고 8-hydroxyguanine endonuclease 활성화도와 유의한 상관관계를 보였으나, 8-OH-dG와의 관계는 유의하지 않았다. 반면, 8-hydroxyguanine endonuclease 활성화도는 8-OH-dG 농도와 유의한 상관관계를 나타냈다(Table 3).

2. 제 2 단계

1) 폐조직의 8-OH-dG 농도 및 8-hydroxyguanine endonuclease의 활성화도

비폭로군의 8-OH-dG 농도는 평균±표준편차가 2.40±0.75 8-OH-dG/10⁴dG로 낮았으나, 크롬 비폭로군에서 4.49±1.41 8-OH-dG/10⁴dG로 최고조에 달한 후, 저농도 크롬 폭로군은 3.96±2.28 8-OH-dG/10⁴dG로 약간 증가하였다가, 중농도 크롬 폭로군에서는 3.96±1.18 8-OH-dG/10⁴dG, 그리고 고농도 크롬 폭로군에서는 2.60±0.76 8-OH-dG/10⁴dG로, 용

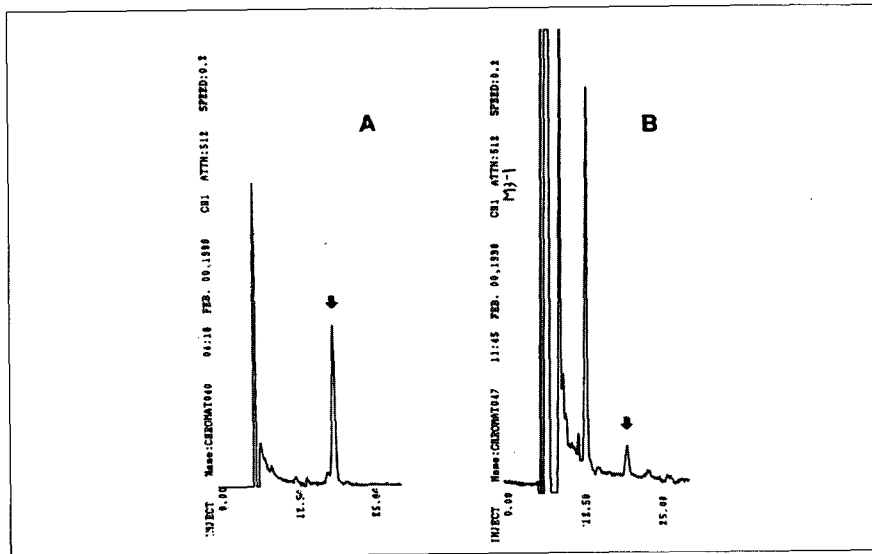


Figure 1. The chromatograms of the 8-hydroxydeoxyguanosine standard solution (A) and a sample of the first experiment (B).

Table 1. Level of 8-hydroxydeoxyguanosine and activity of 8-hydroxyguanine endonuclease in the rat lung tissue of the first experiment

Group	No. of rats	8-Hydroxydeoxyguanosine level (/10 ⁴ dG) (Mean±S.D.)	8-Hydroxyguanine endonuclease activity (unit) (Mean±S.D.)
No exposure	3	2.98 ± 1.36	7.66 ± 2.50
Saline exposure	10	3.77 ± 1.42	9.77 ± 4.74
0.4 mM chromium exposure	10	4.85 ± 2.08	13.55 ± 6.14
2.0 mM chromium exposure	10	3.25 ± 0.54	9.60 ± 3.84
10.0 mM chromium exposure	9	3.19 ± 1.24	10.82 ± 2.91
Statistical test		F=0.721, P>0.05	F=0.247, P>0.05

Table 2. Activities of total SOD, MnSOD, and CuZnSOD in the rat lung tissue of the first experiment

Group	No. of rats	Total SOD activity (Mean±S.D.)	MnSOD activity (Mean±S.D.)	CuZnSOD activity (Mean±S.D.)
No exposure	3	88.1 ± 34.1	15.7 ± 3.3	72.3 ± 30.8
Saline exposure	10	116.2 ± 40.2	18.2 ± 4.6	98.0 ± 37.7
0.4 mM chromium exposure	10	112.5 ± 31.0	18.1 ± 4.9	94.4 ± 29.4
2.0 mM chromium exposure	10	131.7 ± 48.6	20.9 ± 4.6	110.8 ± 48.3
10.0 mM chromium exposure	9	154.0 ± 46.8	21.8 ± 5.0	132.2 ± 45.0
Statistical test		F=7.530, P<0.01	F=1.640, P>0.05	F=6.545, P<0.05

액의 크롬농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 그러나 회귀분석 결과는 유의하지 않았다. 군별 8-hydroxyguanine endonuclease의 그 평균치가 비폭로군에서 가장 낮고, 크롬 폭로 농도가 증가할수록 서서히 증가하는 양상을 보였다. 그러나 비폭로군을 제외한 네 군의 변화 양상은 통계적으로 유의한 것은 아니었다(Table 4).

2) 폐조직의 SOD 농도

총 SOD 활성도는 투여농도가 증가함에 따라 유의한 증가양상을 보이지 않았으며, 고농도 크롬 폭로군에서 평균치가 가장 낮았다. 비폭로군의 총 SOD 활성도의 평균과 크롬 비폭로군의 평균 사이에는 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 한편 총 SOD의 활성도를 MnSOD와 CuZn-SOD로 나누어 분석하였을 때, 두 동종효소의 활성도 변이폭이 너무 커서 신뢰할 수 있는 결과를 제시하지 못하였으므로 통계 분석에서 제외하였다(Table 5).

3) 8-OH-dG 농도와, 8-hydroxyguanine endonuclease와 총 SOD 활성도 사이의 상관관계

제 2 단계에서 8-OH-dG 농도와, 8-hydroxyguanine endonuclease와 총 SOD 활성도는, 서로 유의한 상관관계를 보이는 경우는 없었다(Table 6).

고 찰

크롬 취급 근로자들의 폐암 사망률은 유의하게 증가하는데, 이러한 사실은 크롬 안료공장 근로자(Sheffet 등, 1982; Davies, 1984; Frentzyl-Beyme, 1983), 도금공(Sorahan 등, 1987; Takahashi와 Okubo, 1990), 그리고 용접공(Sinomato 등, 1991) 등을 대상으로 한 코호트 연구에서 확인된 바 있다. 또, 폐암 환자 폐조직의 크롬 농도가 정상폐조직 농도에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났다(Kishi 등, 1987; Anttila 등, 1989). 그러나, 크롬의 암 발생 기전에 대해서는 아직 확실치 않게 알려져 있지 않다.

사람 표피의 섬유아세포를 대상으로 한 연구에서 크롬에 의한 유전적 독성은

Table 3. Correlation coefficients between level of 8-hydroxydeoxyguanosine, and activities of 8-hydroxyguanine endonuclease, total SOD, Mn SOD, and CuZnSOD in the rat lung of the first experiment

	CuZnSOD	MnSOD	Total SOD	8-OH-dG	8-Hydroxyguanine endonuclease
CuZnSOD	1.000	0.382*	0.995**	0.255	0.375*
MnSOD		1.000	0.474**	0.081	0.190
Total SOD			1.000	0.252	0.378*
8-OH-dG				1.000	0.598**
8-Hydroxyguanine endonuclease					1.000

* P<0.05, ** P<0.01

Table 4. Level of 8-hydroxydeoxyguanosine and activity of 8-hydroxyguanine endonuclease in the rat lung tissue of the second experiment

Group	No. of rats	8-Hydroxydeoxyguanosine level (/10 ⁴ dG) (Mean±S.D.)	8-Hydroxyguanine endonuclease activity (unit) (Mean±S.D.)
No exposure	10	2.40 ± 0.75	6.70 ± 1.96
Saline exposure	10	4.49 ± 1.41	6.89 ± 2.38
20 mM chromium exposure	10	3.96 ± 2.28	7.84 ± 3.65
40 mM chromium exposure	10	3.96 ± 1.18	7.68 ± 3.66
80 mM chromium exposure	9	2.60 ± 0.76	9.25 ± 3.12
Statistical test		F=0.016, P>0.05	F=3.345, P>0.0

Table 5. Activity of total SOD in the rat lung tissue of the second experiment

Group	No. of rats	Activity of total SOD (Mean±S.D.)
No exposure	10	78.1 ± 20.3
Saline exposure	10	75.7 ± 31.7
20 mM chromium exposure	10	78.7 ± 26.2
40 mM chromium exposure	10	70.7 ± 11.6
80 mM chromium exposure	9	59.2 ± 14.7
Statistical test		F=2.247, P>0.05

Table 6. Correlation coefficients between level of 8-hydroxydeoxyguanosine, and activities of 8-hydroxyguanine endonuclease, total SOD in the rat lung of the second experiment

	Total SOD	8-OH-dG	8-hydroxyguanine
Total SOD	1.000	0.027	0.197
8-OH-dG		1.000	-0.124
8-hydroxyguanine endonuclease			1.000

glutathione에 의하여 증가되는 반면 superoxide dismutase나 catalase등의 oxygen free radical scavenger에 의하여 감소되는 경향을 보였으며(Snyder, 1988), 6가 크롬에 의하여 유발된 DNA의 single-strand breaks 정도와 5가 크롬 중간 산물의 농도는 유의한 상관관계가 있었다(Sugiyama 등, 1989). 배양 세포에 크롬산을 가하기 전에 hydroxyl radical

scavenger인 vitamin E를 투여한 경우에는 DNA single strand breaks 정도가 감소하는 경향을 보였다(Sugiyama 등, 1987).

본 연구의 제 1 단계에서는 6가 크롬 투여농도가 증가할수록 oxygen free radical scavenger인 SOD의 활성이 유의하게 증가하는 양상을 보였는데, 이는 6가 크롬이 superoxide anion을 생성한다

는 것을 시사하는 것이다. 그러나 이러한 현상은 고농도 크롬 용액을 투여한 제 2 단계 실험에서는 관찰할 수 없었다. 이는 첫째, 제 1 단계에서 유의한 증가 양상을 보인 SOD 활성도 변화는 random error에 의하여 나타난 우연한 결과이거나, 둘째 6가 크롬이 superoxide anion을 생성하므로, 비교적 낮은 농도에서는 SOD의 활성도가 증가되지만, 일정 수준 이상 고농도로 6가 크롬에 폭로되면 SOD 합성의 장애가 유발되어, 6가 크롬 폭로에 대해서도 더 이상 SOD 활성이 증가하지 않는 것으로 해석할 수 있다. 고농도 6가 크롬을 사용한, 제 2 단계 실험에서 최고 농도인 80mM의 용액을 사용한 경우에 SOD 활성도가 가장 낮았다는 사실이 이러한 해석을 지지하는 소견이라 할 수 있다. 그러나 이를 입증하기 위해서는 superoxide anion의 농도를 동시에 측정하는 새로운 연구를 수행하여야 할 것이다.

한편, 제 1 단계에서 6가 크롬 투여농도가 증가할수록 CuZnSOD의 활성은 유의하게 증가하였으나, MnSOD는 그렇지 않았다. MnSOD가 oxidative stress나 cytokine 등의 세포내 신호에 의하여 그 발현이 증가되며, CuZnSOD에 비하여 발현정도의 변화폭이 더 큰 것으로 알려져 있는데, 만약 6가 크롬이 oxygen free radical을 다량 생성한다면, MnSOD의 발현이 유의하게 증가되어야 하지만 본 연구의 결과는 이와 달랐다.

6가 크롬은 H_2O_2 와 반응하여 일종의 tetraperoxochromium(V)과 hydroxyl radical을 생성하며, DNA single strand break을 유발한다고 보고된 바 있다 (Kawanishi 등, 1986; Aiyar 등, 1989; Aiyar 등, 1991; Molyneux와 Davies, 1995). 또, 체내에 생성된 oxygen free radical은 핵산의 guanine을 C-8 위치에서 수산화(hydroxylation)하여 8-OH-dG를 생성하므로 (Kasai와 Nishimura, 1986), 조직 내의 8-OH-dG 농도는 조직에서 생성된 oxygen free radical의 양을 반영한다 (Kasai 등, 1991).

본 연구에서 크롬 폭로 농도가 증가하여도 8-OH-dG의 농도는 증가하지 않았

으며, 유의한 상관관계를 발견할 수 없었다. 이는 크롬취급 근로자를 대상으로 한 Gao 등(1994)과 Kim 등(1998)의 연구 결과와 일치하는 것으로, 그 이전의 가설에는 부합되지 않는다. 제 1 단계 연구에서 투여 농도가 증가함에 따라 SOD의 활성이 증가하였으므로, superoxide anion이 발생된다고 추측할 수 있으며, 8-OH-dG의 농도가 증가하지 않은 것으로 미루어, 이렇게 생성된 superoxide anion이 hydroxyl radical로 변화되지는 않는다고 설명할 수 있다. 그러나 제 2 단계 연구에서는 6가 크롬의 농도가 증가할수록 SOD 활성도와 8-OH-dG 농도가, 유의하지는 않지만, 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 고농도 크롬 폭로시에는 hydroxyl radical 뿐 아니라 superoxide anion도 생성되지 않음을 시사하는 것이다.

생체 내에는 8-OH-dG에 대한 방어기전이 존재한다 (Kasai와 Nishimura, 1986; Chung 등, 1991). *E.coli*에 존재하는 8-hydroxyguanine endonuclease는 Fapy-DNA glycosylase라고도 불리는데, endonuclease activity 뿐 아니라 glycosylase activity도 갖고 있다 (Tchou 등, 1991). 인체 세포 내에도 8-hydroxyguanine 만을 제거하는 endonuclease가 존재한다는 것이 입증되었으며 (Chung 등, 1991; Tchou 등, 1991), 포유동물 세포에서는 endonuclease와는 별도의 8-hydroxyguanine glycosylase가 있어서, DNA 서열 내에 끼워져 있던 8-hydroxyguanine이 단독 염기 상태로 잘려 나오게 된다 (Bessho 등, 1993). 이와 같은 8-OH-dG 수복 효소에 의하여 체내에 생성된 8-OH-dG가 제거되므로, 6가 크롬에 의하여 8-OH-dG가 생성되었다고 해도, 이러한 수복효소의 작용에 의하여 체내에서 제거될 것이다. 본 연구의 제 1 단계에서는 8-OH-dG 농도와 8-hydroxyguanine endonuclease 활성도 사이에 유의한 상관관계를 관찰할 수 있었는데, 이는 8-OH-dG의 생성이 증가하면, 이에 대한 방어작용으로서 그 수복효소의 활성도도 증가함을 입증하는 것이다. 또한, 이 결과는 본 연구 방법의 신뢰성이 높다는 것을 입

증하는 것이다. 그러나, 제 1 단계의 연구에서 비폭로군과 크롬 비폭로군 사이에 상당히 큰 차이가 있었던 사실은 기관지 내 점적 투여라는 조작자체가 크롬 폭로에 의한 것과는 별개의 oxidative stress를 가하였을 가능성이 있다. 제 2 단계 연구에서는 비폭로군과 크롬 비폭로군의 8-OH-dG 농도, 8-hydroxyguanine endonuclease와 SOD 활성도의 차이가 거의 없었는데, 제 1 단계 시험을 진행하면서 폭로조작 방법을 충분히 습득하여 제 2 단계에서는 비특이적 자극을 주는 일이 적어졌기 때문이라는 해석도 고려해 볼 수 있다. 그러나, 본 연구에서 비특이적 자극의 정도를 비교하기 위한 실험을 시행하지 않았으므로 이를 확실히 밝힐 수는 없었다.

제 1 단계와 제 2 단계의 결과를 합치지 않고 나누어 분석한 것은, 8-hydroxyguanine endonuclease 활성도 측정 과정에서 자가감광 단계에서 나타나는 신호가, 따로따로 분석한 시료에서는 그 절대적 강도가 일치하지 않기 때문이다. 그러므로, 모든 시료에 대하여 일관된 상대적 기준을 적용하기 위해서는 모든 시료를 동시에 처리하여 분석하여야 한다. 본 연구에서는 2 단계로 나누어 분석을 시행하였으므로, 통계적 분석도 나누어 시행하였다.

이상의 결과를 종합하면, 6가 크롬을 랫트의 호흡기에 저농도로 투여하는 경우에는 그 폐조직에서 SOD의 발현을 증가시키지만, 8-OH-dG나 8-hydroxyguanine endonuclease의 활성은 증가시키지 않는 것으로 나타났으며, 고농도로 투여하는 경우에는 8-OH-dG와 8-hydroxyguanine endonuclease, 그리고 SOD를 증가시키지 않았다. 이러한 현상은, 6가 크롬이 oxygen free radical을 생성하기 때문이기보다는, 그 투여 과정 중의 비특이적 자극에 의하여 나타났다고 해석하는 것이 더 개연성이 있을 것으로 사료된다.

결론

6가 크롬이 생체내에서 8-OH-dG 농도 및 oxygen free radical scavenger와 8-OH-dG 수복효소의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 랫트의 기관내에 6가 크롬을 투여한 후 폐조직의 8-OH-dG 농도, SOD와 8-hydroxyguanine endonuclease의 활성을 측정하였다. 그 결과 6가 크롬을 10 mM 이하의 저농도로 폭로한 랫트에서 총 SOD 활성도가 유의하게 증가하였다. 이것으로 미루어, 체내에서 6가 크롬이 superoxide anion을 생성할 수 있다고 할 수 있다. 그러나, 이 조건에서, 8-OH-dG 농도나 8-hydroxyguanine endonuclease의 활성은 증가하지 않는 것으로 나타났다. 한편, 20 mM 이상의 고농도로 투여하는 경우에는 8-OH-dG와 8-hydroxyguanine endonuclease, 그리고 SOD 중 어느 것도 증가하지 않았다. 이러한 연구 결과는, 6가 크롬이 hydroxyl radical을 생성함으로써 암을 유발한다는 지금까지의 연구 결과들과는 일치하지 않는 것이다. 그러므로, 6가 크롬은 hydroxyl radical을 생성하지 않거나, 생성량이 적으므로 그에 의한 유전적 손상의 정도가 크지 않을 것으로 생각된다.

참고문헌

- 김현식. 8-Hydroxyguanine endonuclease; 인체 백혈구에서의 증명 및 대장균에서의 활성 조절에 관한 연구. 서울대학교대학원 의학박사 학위논문. 1996.
- Aiyar J, Borges KM, Floyd RA, Wetterhahn KE. Role of chromium(V), glutathione thiy radical and hydroxyl radical intermediates in chromium(VI)-induced DNA damage. *Toxicol Environ Chem.* 1989;22:135-148
- Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. Reaction of chromium(VI) with glutathione or hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ Health Perspect.* 1991;92:53-62
- Antilla S, Kokkonen P, Paakko P, Rainio P, Kalliomaki PL, et al. High concentrations of chromium in lung tissue from lung cancer patients. *Cancer* 1989;63(3):467-473
- Bessho T, Roy R, Yamamoto K, Kasai H, Nishimura S, et al. Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Pro Natl Acad Sci USA* 1993;90:8901-8904
- Chung MH, Kasai H, Jones DS, Inoue H, Ishikawa H, et al. An endogenous activity of Escherichia coli that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Mut Res* 1991;254:1-12
- Davies JM. Lung cancer mortality among workers making lead chromate and zinc chromate pigments at three English factories. *Br J Ind Med* 1984;41:158-169
- Frentzel-Beyme R. Lung cancer mortality of workers employed in chromate pigment factories. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 105:183-188
- Gao M, Levy LS, Faux SP, Aw TC, Braithwaite RA, et al. Use of molecular epidemiological techniques in a pilot study on workers exposed to chromium. *Occup Environ Med* 1994;51:663-338
- Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, et al. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 1986;7:1849-1851
- Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical-forming agents. *Environ Health Perspect* 1986;67(5):111-116
- Kasai H. DNA damage by oxygen radicals and carcinogenesis. *Gan To Kagaku Ryoho* 1989 ;16(3):459-465
- Kawanishi S, Inoue S, Sano S. Mechanism of DNA cleavage induce by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1986;261:5952-5958
- Kim H, Cho S-H, Chung M-H. Exposure to chromium does not increase 8-hydroxydeoxyguanosine level in chromium pigment workers. *In preparation.*
- Kishi R, Tarumi T, Uchino E, Miyake H. Chromium content of organs of chromate workers with lung cancer. *Am J Ind Med* 1987;11(1):67-74
- Kiyosawa H, Suko M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto T, et al. Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free Rad Res Comms* 1990;11(1-3):23-27
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase; an enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-6055
- Molyneux MJ, Davies MJ. Direct evidence for hydroxyl radical-induced damage to nucleic acids by chromium(VI)-derived species: implications for chromium carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1995;16(4):875-82
- Sheffet A, Thind I, Miller AM, Louria DB. Cancer mortality in a pigment plant utilizing lead and zinc chromate. *Arch Environ Health* 1982;37(1):44-52
- Sinamoto L, Fletcher AC, Andersen A, Andersen K, Becker N, et al. A historical prospective study of European stainless steel, mild steel, and shipyard welders. *Br J Ind Med* 1991;48:145-154
- Smith PK, Krohr R, Hermanson GT, Mallia AK, Goeke nM, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal biochem* 1985;150:76-85
- Snyder RD. Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblast. *Mutat Res* 1988; 193:237-246
- Sorahan T, Burges DCL, Waterhouse JAH. A mortality study of nickel/chromium platers. *Br J Ind Med* 1987;44:250-258
- Sugiyama M, Ando A, Nakao K, Ueta H, Hidaka T, et al. Influence of vitamin B2 on formation of chromium(V), alkali-labile sites and lethality of sodium chromate(VI) in Chinese hamster V-79 cells. *Cancer Res* 1989;49:6180-6184
- Sugiyama M, Ando A, Furuno A, Burr Furlong N, Hidaka T, et al. Effect of vitamin E, vitamin B2 and selenite on DNA single strand breaks induced by sodium chromate (VI). *Cancer Lett* 1987;38:1-7
- Takahashi K, Okubo T. A prospective cohort study of chromium plating workers in Japan. *Arch Environ Health* 1990;45(2):107-111
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, et al. 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88 :4690-4694