

6가 크롬의 환원과 발암

박 형 숙

한서대학교 환경공학과

Reduction of Chromium (VI) and Carcinogenesis

Hyoung-Sook Park

*Department of Environmental Engineering, Hanseo University
Chungnam Seosanshi Haemimyun Daegokyi 360*

ABSTRACT

Cr (VI)-containing compounds are well-established carcinogens, although the mechanism for chromium-induced carcinogenesis is still not well understood. The reduction of Cr (VI) to its lower oxidation states, particularly Cr (V) and Cr (IV), is an important step for the production of chromium-mediated reactive oxygen species (ROS). The persistent oxidative stress during the reduction process may play a key role in the mechanism of Cr (VI)-induced carcinogenesis.

This paper summarizes recent studies on (1) the reduction of Cr (VI) to Cr (III) occur by a multiplicity of mechanisms depending on the nature of reducing agents including ascorbate, diol- and thiol- containing molecules, certain flavoenzymes, cell organelles, intact cells, and whole animals; (2) free-radical production with emphasis on hydroxy radical generation via Fenton or Haber-Weiss type reactions; and (3) free radical-induced cellular damage, such as DNA strand breaks, hydroxylation of 2'-deoxyguanosine, and activation of nuclear transcription factor κ B.

Key words : Cr (VI), reduction, carcinogenesis, reactive oxygen species, oxidative stress

서 론

크롬의 발암성은 1930년대 처음으로 독일의 크롬광산 광부들의 역학조사에서 보고되었으며 (Lehmann, 1990), 이후 크롬생산 근로자들에게서 일반인보다 약 29배의 높은 발암 사례가 발표되었다 (US Public Health Service, 1953). 미국 EPA (Environmental Protection Agency)에 의한 53종의 유독 화합물의 평가 결과, 6가크롬은 13번째로 유독한

발암물질로 발표되었다. 이후 연구결과 강력한 돌연변이원성 물질로서 DNA 및 염색체를 변형시키고, 세포 이상증식과, 사람들에게 호흡계 암을 일으키는 발암성 물질로 분류되고 있다 (IARC, 1990; Hayes, 1988).

6가크롬 화합물은 산업장 근로자들에게 심각한 독성작용과 발암효과를 나타내며, 사용이 확대되면서 환경오염 (environmental contamination)을 통한 일반인들의 폭로도 증가하고 있다. 스테인레스 용접공, 크롬 도금공, 크롬 염료 생산 및 가죽제혁공들에게 높은 수준의 폭로가 있으며, 일반인들도 수질, 대기는 물론 유해물질 폐기 장소로부터 폭로될

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-41-660-1367, E-mail: hspark@hanseo.ac.kr

수 있다. 대기 중 크롬오염은 기름과 석탄 연소, steel 생산, 1차 금속 생산, 크롬도금과 냉각탑의 사용 때문이며, 크롬을 사용하는 공장 폐수는 수질을 오염시키고 크롬함유 광재 및 폐기물들은 토양을 오염시키는 원인으로 부적절하게 쓰레기 매립지에 버려진 후에 상용 건축지 및 주거지로 사용되어지는 일도 있다.

6가크롬은 폐암을 비롯하여 비강암, 식도암, 위암 등을 일으키는 확인된 발암물질이다(Langardt, 1990). 또한 생물체에서 염색체이상, 돌연변이, 포유동물 배양세포의 변형과 DNA-나선파괴, DNA-단백질 교차연결, DNA-염기 변형 등과 같은 다양한 DNA 손상들을 유도한다(DeFlora *et al.*, 1990; Snow, 1992). 크롬의 발암기전이 명확히 밝혀지지는 않았으나 6가크롬의 환원과정은 중요하다. 6가크롬으로부터 5가, 4가로의 환원 과정은 단순한 직선 경로가 아닌 불균등화된 과정이며, Fenton 혹은 Haber-Weiss 형태의 반응을 거치면서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 들을 발생시킨다. 배양세포 및 시험관(in vitro) 실험에서 6가크롬의 환원에 의해 생성된 5가크롬 및 수산화기(hydroxyl radical), singlet oxygen 등과 같은 활성산소종들이 Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy에 의해 발견되어지고 있으며 (O'Brien *et al.*, 1985; Shi *et al.*, 1988; Sugiyama, 1991), 발생하는 활성적 크롬 중간대사물(reactive chromium intermediates) 및 크롬이 중계한 활성산소종(Cr-mediated ROS) 발생이 지속적인 산화성 스트레스를 일으키게 되면서, 세포손상을 유도한다는 것이 현재까지의 사실이다(Granger *et al.*, 1982).

본 논문은 생물계에서의 6가크롬 환원 과정 중의 자유라디칼(free radical) 발생과 이들로 인해 가능한 암 발생 기전에 대해 토론하였다.

크롬의 화학적 특성

크롬은 원자번호 24, 주기율표에서 VIB구rup에 속하며, 흰색의 광택을 지닌 부서지기 쉬운 금속으로 상당히 높은 용점(약 2000°C)을 지녔다. 다양한 산화상태로 존재하며, 그중 0, +2, +3과 +6 형태를 일반적으로 접하게된다. 2가크롬은 강한 환원제로 불안정하여 활동성이 없는 3가크롬으로 산화된다.

다. 수용액에서 안정한 산화상태는 3가와 6가 상태인데, 사람들이 노출되는 환경에서 흔히 발견되는 생물학적으로 중요한 형태이다. 3가크롬, d^3 은 가장 안정한 크롬 형태이며 염화크롬(chromic chloride)과 같은 수용성 화합물로 존재하거나, 크롬산화물(chromic oxide)같은 불용성 화합물로 존재하거나, 유기 리간드(organic ligand)와 복합체를 형성하는데 리간드로는 H_2O , 산소, 질소, 유황을 포함한다. 일반적으로 3가크롬은 팔면체의 복합체를 형성하며 크고, 지방용해성이 부족하여 막을 천천히 통과한다. 그러나 picolinate와의 합성복합체들은 지용성이므로 섭취가 가능하다. 생물학적으로 강한 포도당 내성인자로서 효모에 존재하며, 생물체에서 발견되는 형태이다.

4가와 5가크롬 화합물은 모든 크롬 화학종 중 가장 적게 존재하며 불안정하다. 대부분의 4가, 5가 크롬이온들은 6가크롬에서 3가로 환원되는 과정에 일시적인 중간 산물로 형성된다. 4가크롬보다 좀더 안정한 5가크롬 화합물의 반감기는 단지 몇 분에 이른다. 쉽게 형성된 5가크롬은 3가크롬과 4가크롬을 함유한 성분으로 분해되며, 아주 긴 수명을 가진 소수의 5가크롬 화합물들은 oxochromenium(V) 이온(CrO^{+3})을 형성한다. 구조적으로 다른 화학종들과는 달리 대부분의 4가와 5가 크롬의 복합체들은 치밀한 팔면체형 보다는 사면체 배열로 추정된다.

6가크롬은 잠재적 독성물질로서 많은 연구들이 진행되고 있는 물질이다. 6가크롬은 강력한 산화제로서 대부분의 경우 산화물이나 할로겐산화물로서 존재한다.

6가크롬의 산화 형태는 pH에 따라 영향을 받게 되는데 $pH > 6$ 인 경우 chromate 이온(CrO_4^{2-})이 우세하며, $2 < pH < 6$ 에서는 dichromate 이온($Cr_2O_7^{2-}$)과 $HCrO_4^-$ 이온으로, $pH < 1$ 인 조건에서는 H_2CrO_4 형태로 주로 존재하며 산화력은 차이가 있다.

크롬의 흡수와 분포

크롬의 흡수는 피부, 소화기 및 호흡을 통해 일어나며 흡수속도는 이 금속의 산화가와 물리적특성에 의해 결정된다. 피부로의 흡수는 용해성 6가 크롬 화합물이 3가보다 막을 빠르게 통과하며, pH

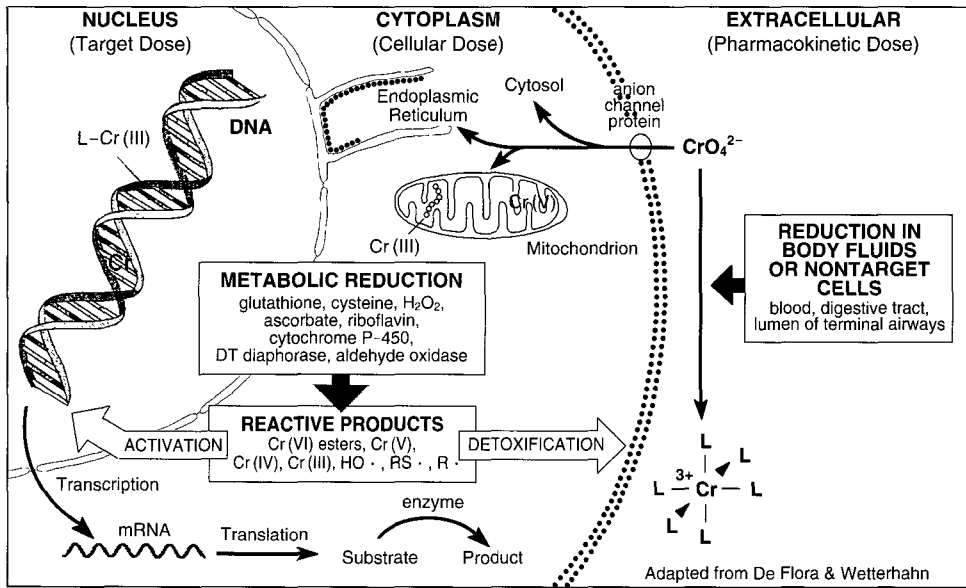


Fig. 1. Model of chromatic uptake and reduction by cells (De Flora and Wetterhahn).

상승에 따라 흡수가 증가된다(Costa, 1997). 호흡의 경우 용해성 6가크롬 화합물이 3가크롬 화합물보다 흡수가 잘 되며, 불용성 3가화합물은 호흡세포에 의해 침투는 가능하나 피부로 흡수는 되지 못하였다. 소화관 흡수의 경우, 3가크롬은 1%정도 흡수되었으나 6가크롬은 흡수 정도가 다양하여 3%에서 많게는 25%까지 흡수된 사람도 확인되었다(Costa, 1997).

생체내 분포에 크롬의 산화상태는 중요한 요인이 된다. 대체로 무독성, 비발암성, 비변이원성인 3가크롬은 팔면체 구조의 양이온으로 크기 때문에 단순확산이나 식작용(phagocytosis)을 이용하여 매우 천천히 세포막을 투과한다. 막의 통과가 어려운 경우, 혈액내의 transferrin과 microglobulin 혹은 혈청 알부민 등에 결합한다(Freund *et al.*, 1979; Hansen *et al.*, 1985). 6가크롬의 “흡수-환원 모델”이 발암성을 설명하는데 기틀이 되고 있다(그림 1). 이 모델에 따르면, 6가크롬은 정사면체 구조로서 oxides나 oxyanions로 존재하며 생체막에 존재하는 인산염이나 황산염 등의 음이온과 같은 구조로서 쉽게 비특정 음이온 채널을 통하여 생체로 흡수된다(DeFlora and Wetterhahn, 1989; Buttner and Beyersmann, 1985; Ottenwalder *et al.*, 1988). 빠르게 세포내로 흡수된 6가크롬은 복합체를 형성하지 않

며, ascorbate, GSH 등의 세포내 환원제에 의해서 5가, 4가, 그리고 가장 안정한 산화상태인 3가크롬으로 환원된 후 DNA와 결합하게 된다(그림 1).

생체내에서 6가크롬은 신장, 고환, 뼈에 다량 축적되며 심장, 췌장, 폐, 뇌에 적은량 축적된다(Costa, 1997; Saner, 1980). 간과 신장이 인체내 50% 정도에 달하는 크롬량을 책임지며, 사람에서 크롬의 반감기는 50~60일 정도로 추정된다. 비경구 투여한 크롬의 약 80% 정도는 소변으로, 2~20%는 대변으로 배출되며 일부는 피부를 통해 땀으로 배출된다(Saner, 1980).

6가크롬의 환원반응들

1. 시험관 (in vitro)에서 저분자량물질에 의한 환원

시험관의 생리적 pH에서 저분자량 세포내 구성 물질들이 6가크롬을 환원하는 것이 밝혀졌으며, glutathione (GSH), cysteine, lipoic acid, 그리고 NAD(P)H, 리보스, 과당, arabinose와 같은 diol-함유분자들이 포함된다. 이 중 포유동물 세포에 존재하는 ascorbate와 GSH는 대표적 비효소 환원물질이다.

1) GSH

6가크롬이 GSH에 의해 환원될때 glutathionyl기, Cr(V)-복합체, Cr(IV)-복합체들을 발생한다. Cr(V)와 Cr(IV)-복합체들은 고체로 분리될 수 있고 안정하므로 6가크롬으로 인한 발암기전 연구에서 세포내 4가 및 5가크롬의 역할을 연구하는데 사용된다. GSH가 6가크롬 대사에 관여한다는 관찰은 chick embryo의 배양간세포를 사용한 실험에서 GSH와 6가크롬으로 인한 DNA 손상의 상관관계에서 잘 나타나며(Cupo and Wetterhahn, 1985), 특히 buthionine sulfoximine으로 GSH를 고갈시킨 후에 6가크롬에 의한 DNA 손상이 감소하였으며, N-acetylcysteine 처리후 GSH가 증가된 후에 6가크롬에 의한 DNA 손상이 증가되었다.

2) 아스코르빈산염 (Ascorbate)

Ascorbate는 중요한 6가크롬의 환원제로 환원속도는 GSH보다 우수하여 쥐의 허파내 기도로 6가크롬 투여시, GSH는 고갈되지 않은 반면 ascorbate는 고갈되었다(Suzuki and Fukuda, 1990). 6가크롬의 환원력은 쥐의 폐에서 ascorbate가 GSH보다 더 활발하였음이 밝혀졌으며 쥐의 폐, 신장, 간에서 ascorbate는 주요 환원제임이 밝혀졌다(Standeven and Wetterhahn, 1992). 6가크롬과 DNA를 쥐의 폐 초여과액 존재 하에 반응시켰을 때의 Cr-DNA 결합은 ascorbate에 의존한 6가크롬 대사량에 비례하였다. 반응속도를 기초로 할때, GSH와 ascorbate는 6가크롬을 협동적으로 환원시키는 것을 알수 있었다. 비생체계에서도 ascorbate에 의한 6가크롬의 환원이 5가크롬과 4가크롬 등의 래디칼을 발생하는 것으로 보고되었고, 이들의 생성량은 6가크롬과 ascorbate의 상대적인 농도에 의존하였다. Ascorbate 환원작용에 의해 발생하는 5가크롬과 4가크롬은 H_2O_2 와 작용하여 hydroxyl기($\cdot OH$)를 발생하며, 이것이 DNA 나선파괴를 일으킨다(Shi *et al.*, 1994).

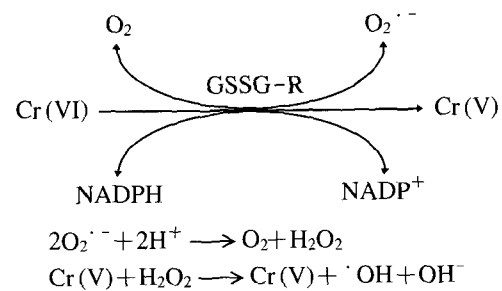
2. 세포내 환원제에 의한 환원

세포내의 다양한 효소인자, 비효소인자들이 6가크롬의 환원제로 작용한다. 이들은 마이크로솜, 미토콘드리아, 싸이토크롬 P-450, 싸이토크롬 b^5 , 미토콘드리아막 내의 전자전달 복합체와 몇가지 flavoenzymes-glutathione reductase (GSSG-R), lipoyl dehydrogenase, ferredoxin-NADP⁺ oxidore-

ductase-들이다.

1) Glutathione reductase (GSSG-R)

대표적 예로 GSSG-R의 환원작용이 아래 식에서 설명되어진다(Shi and Dalal, 1991). 즉, NADPH 존재하에서 GSSG-R는 Cr(VI)을 환원시켜 Cr(V)를 발생시키며 Cr(V)-NADPH 복합체로 확인된다. 반응 중에 산소 분자는 $O_2^{\cdot -}$ 로 환원되면서 H_2O_2 가 dismutation에 의해 발생된다. 이후 Cr(V)-NADPH 복합체는 H_2O_2 와 반응하여 $\cdot OH$ 기를 발생한다.



3. 세포 (intact cell)에서의 환원

$K_2Cr_2O_7$ 과 *Escherichia coli*를 배양시켰을 때, Cr(V)-NADPH 복합체를 발생했으며(Shi *et al.*, 1991), NADPH를 첨가시 발생량이 증가한 것으로 미루어 NADPH-의존성 reductase가 Cr(V) 생성에 관여하는 것 같다. 배양된 Chinese hamster V-79 세포와 $K_2Cr_2O_7$ 를 배양시킨 경우는 Cr(V)와 Cr(III) 모두가 생성되었다(Sugiyama, 1994). 이들 배양세포에서 발생한 paramagnetic(상자성) 크롬 화학종들은 electron spin resonance (ESR) spectroscopy에 의해 측정되었으며, 수치를 검토했을 때 세포내 성분과 복합체를 형성한 것으로 생각된다.

세포내 환원제는 paramagnetic(상자성) 크롬 양을 변형시키며, 크롬에 의해 야기되는 DNA 손상에 영향을준다. V-79 세포에 세포내 성분인 α -tocopherol, riboflavin, ascorbic acid를 투여하여 점차 이들 양을 증가시켰을 때, paramagnetic 크롬 화학종의 양이 변화하였다(Sugiyama, 1994). 즉, 세포내에서 α -tocopherol 혹은 ascorbic acid 증가에 따라 Cr(V) 복합체량은 감소하였으며 반면, riboflavin이 증가할수록, Cr(V) 복합체가 증가하였다. Cr(III)의 경우, ascorbic acid의 양이 증가할수록, Cr(III)는 증가하였다. Cr(V) 생성량은 6가크롬에 의한 DNA 나

선과피와/혹은 '알칼리-불안정 위치'와 밀접한 관계를 나타내었다. Ascorbic acid 와 α -tocopherol 모두 Cr(V) 생성과 DNA 손상을 감소시킨 반면, riboflavin의 경우 정반대의 효과가 관찰되었다. V-79 세포에 6가크롬 투여시, α -tocopherol 과 riboflavin의 양을 증가 시켰을 때 염색체이상과 돌연변이가 보고되었다(Sugiyama *et al.*, 1991a; Sugiyama *et al.*, 1992). 크롬화합물의 염색체 이상유발/돌연변이성 작용은 α -tocopherol 증가시 억제된 반면, riboflavin을 증가시에는 증강된 것은 Cr(V)가 이들 작용에 관련된 것을 의미한다. O-phenanthroline 과 같은 금속 킬레이터는 Cr(V) 생성을 억제 시켰으며(Sugiyama *et al.*, 1993), Cr(V) 양이 감소될 때 크롬이 유도한 DNA 나선 파괴와/혹은 '알칼리-불안정 위치'의 감소를 가져왔다.

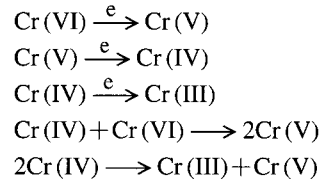
4. 생체내 (in vivo)에서의 환원

Chick embryo 간과 적혈구에서 6가크롬의 전자 한개(one electron)의 환원이 관찰되었다(Liebross and Wetterhahn, 1990). 6가크롬 환원의 직접적인 증거는 6가크롬을 처치한 동물에서 Cr(V)의 발생에 의해 증명되었다(Liu *et al.*, 1994). 동물실험에서 6가크롬의 전자 한개 환원에 의해서 Cr(V) 중간생성체가 발생하는 것이 ESR를 사용시에 간에서 대량, 혈액에서 소량 발견되었다. 6가크롬을 처치한 동물의 간-균등액에서도 직접 동물로부터 얻은 것과 같은 Cr(V) 화학종이 발생되었다. 이들 Cr(V) 화학종들은 Cr(V)에 산소결합을 한 Cr(V)-NADPH 복합체로 판명되었다(Lefebvre and Pezerat, 1992). Ascorbate와 GSH로 전처치한 동물의 경우, Cr(V) 생성이 감소되었으며, 반면, NADPH로 전처치한 경우 증가되었다. Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA)와 1, 10-phenanthroline 같은 금속 킬레이터는 Cr(V)-NADPH 복합체의 생성을 억제하였다. 이런 결과들은 GSH 혹은 ascorbate가 아닌 NADPH/ flavoenzymes들이 생체 내에서 주요한 6가크롬의 전자 한개 환원제임을 제시해준다.

5. 환원반응의 요약

6가크롬의 환원은 환원제의 특성에 따라서 다양한 기전들에 의해 일어나며, 환원제들은 세포내 작은 분자들(ascorbate와 GSH), 특정 flavoenzymes

(glutathione reductase), 세포내 소기관(마이크로솜과 미토콘드리아)들과 더 나아가서 세포와 생물체들을 포함한다. 환원반응식은 아래와 같이 요약할 수 있다.

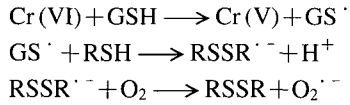


자유라디칼의 발생

세포내의 환원제에 따라서 6가크롬 환원과정중 발생하는 활성적 크롬중간대사물의 종류들이 약간 달라질수 있으나, 주로 5가와 4가크롬이 중간생성물로서 발생되며, 잠재적 독성물질로서의 연구들이 진행되고 있다. 이들은 매우 불안정하여 반감기는 단 몇분에 이르며, 이들의 불안정성이 세포내에서 지속적인 산화성 스트레스를 일으키게 되면서 hydroxyl기(수산기)를 포함한 자유라디칼들을 발생시키는 원인이된다. Hydroxyl기와 관련하여 "크롬의 발암성에 있어서 중간생성물인 tetraperoxo-chromate (V)의 중요성"을 주장하는 학설이 발표되기도 하였다(Lefebvre and Pezerat, 1992). 그러나 현재로는 반드시 tetraperoxo-chromate (V) 형태가 아니더라도, 6가크롬의 환원으로 생성되는 5가크롬이 세포내에서 환원물질과 복합체로서 결합된후, Fenton 유사반응을 통해 H₂O₂로부터 \cdot OH기를 발생한다는 이론에 근접해있다. 아래 설명은 모든 산화기의 크롬들이 H₂O₂로부터 \cdot OH기를 포함한 자유라디칼들의 발생에 관하여 설명하고 있다.

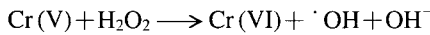
1. Thiyl기(GS \cdot)의 발생

ESR spin trapping을 사용해서 6가크롬과 GSH를 반응시켰을때, glutathione 으로부터 유래된 thiyl기와 Cr(V)이 검출되었으며, GSH 농도 증가에 따라 GS \cdot 기 발생은 증가되었다(Shi and Dalal, 1988). 발생된 thiyl기(GS \cdot)들은 직접 세포 손상을 일으켰으며, 다른 thiol 분자들과 작용하여 O₂ \cdot^- 기들을 발생하였다. O₂ \cdot^- 기는 계속된 반응에서 H₂O₂를 발생했으며 부가적인 다른 활성산소종들을 생성하였다.

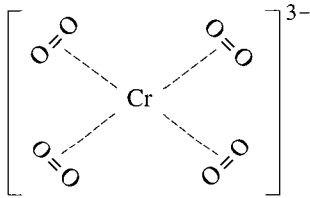


2. Cr(V) 반응에 의한 Hydroxyl기(수산기) 발생

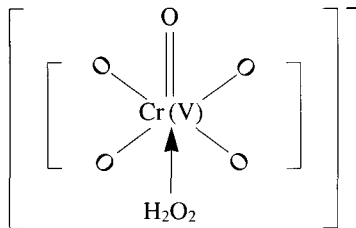
실험관 실험에 의하면, GSH와 6가크롬 혼합물에 H₂O₂를 첨가시, Cr(V)기의 ESR 반응신호가 감소했으며, ·OH기가 발생하였다. ·OH의 발생은 Cr(V)와 H₂O₂의 Fenton 유사 반응의 결과이다.



발생되는 Cr(V)의 구조에 따라 활동성이 달라지는데, 예를 들어, tetraperoxo-chromate의 경우는 사면체 구조로서 O₂²⁻ 부분이 완전히 공유결합으로 구성되어있다.



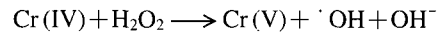
그러나 Cr(V)-NADPH 같은 복합체로서, 팔면체 구조의 불안정한 형태를 취한 경우에는 H₂O₂가 빈 공간에 결합되면서 ·OH기를 발생한다. 이 반응은 Fe(II)가 H₂O₂와 산화작용시에 Fenton 반응에 의해 ·OH기를 발생하는 반응과 유사하다.



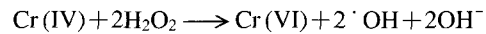
3. Cr(IV) 반응에 의한 Hydroxyl기(수산기)의 발생

6가크롬이 ascorbate, GSH 같은 세포내 환원제에 의해서 발생되는 Cr(IV)는 또다른 중요한 활성적 크롬중간대사물이다. Cr(IV)는 H₂O₂와 함께 Fenton 유사 반응을 일으켜 ·OH기를 발생할 수 있다(Shi

et al., 1994). 6가크롬과 아스코르빈산염을 반응시에 Cr(V)와 Cr(IV) 중간생성물들이 발생되며, 여기에 H₂O₂를 첨가하면 Cr(V)의 발생이 증가하면서 ·OH기가 발생된다.



일단 Cr(V)가 발생되면, 이들은 2의 'Cr(V) 반응에 의한 수산기 발생' 반응식과 같이 H₂O₂와 작용하면서 더 많은 ·OH기를 발생한다. 앞의 2의 반응식과 위의 식을 합치면 아래와 같은 식이 유도된다.



4. 그 외의 Hydroxyl기(수산기)를 발생하는 반응들

1) Cr(III) 반응에 의한 Hydroxyl기(수산기)의 발생
3가크롬이 세포 자체에서 독성과 발암성이 없는 것은 불투과성 때문으로 설명된다. 불투과로 인해서 세포 그 자체에 심각한 독성을 나타내진 않았지만, 세포 밖의 계에서 유전자 독성이 발견되었다. 6가크롬은 세포내로 투과한 후 결국 3가크롬으로 환원되며, 3가크롬도 H₂O₂로부터 ·OH기를 발생할 수 있다(Shi *et al.*, 1993). ·OH기의 발생정도는 pH에 의존하며, pH 10일 때 가장 높은 수치에 이른다. 즉, 높은 pH는 H₂O₂와 3가크롬의 산화를 촉진하는 것을 의미한다.

2) Cr(VI)과 Cr(III)이 관련된 Haber-Weiss 반응에 의한 Hydroxyl기의 발생

Xanthine과 xanthine oxidase를 O₂^{·-}기의 공급원으로 사용한 Haber-Weiss 반응에서 6가크롬은 5가로 환원된 후 H₂O₂와 반응하여 ·OH기를 발생하였으며(Shi and Dalal, 1992) 유사하게 3가크롬 또한 Haber-Weiss cycle을 통해 ·OH기를 발생할 수 있었다(Shi *et al.*, 1998).

3) 세포(intact cells)에서 Hydroxyl기의 발생

세포에 6가크롬 투여시에 ·OH기와 Cr(V)가 발생되었다. 발생되는 5가크롬은 Cr(V)-NADPH 복합체로 검출되었으며 NADPH나 GSH-reductase 첨가시에 Cr(V)의 발생은 증가되었다. 또한 H₂O₂ 첨가시에 ·OH기의 발생이 증가되고 ESR에서 Cr(V)의 피크 강도가 증가하였다.

5. Lipid Hydroperoxide로부터 유도된 자유라디칼의 발생

생리학적 pH에서, Cr(III), Cr(IV), Cr(V)는 lipid hydroperoxide (지방 히드رو과산화물)로부터 유도된 자유라디칼을 발생할 수 있다(Shi *et al.*, 1993). 이들 자유라디칼들은 탄소-중심의 cumene alkyl기 (R*)와 산소-중심의 cumene alkoxy기 (RO*)이다.

발생된 자유라디칼의 독성작용들

6가크롬의 환원과정 중 발생하는 자유라디칼들이 아래와 같은 다양한 세포손상을 일으키면서 크롬의 독성작용, 발암작용에 영향을 미칠것이다. 그림 2는 6가크롬으로 인한 발암과정에서 자유라디칼 반응을 요약한 것이다.

1. DNA 나선 파괴 (DNA strand break)

DNA를 6가크롬 및 ascorbate와 배양할때 상당한 DNA 나선 파괴가 발생했는데, 발생량은 6가크롬과 ascorbate의 상대적 농도에 의존하였으며, 발생하는 자유라디칼의 양과 관련이 있었다(Shi *et al.*, 1994). Chick embryo 적혈구 세포를 사용한 생체 실험에서 6가크롬은 지속적인 DNA 나선파괴를 생성하였으며(Hamilton and Wetterhahn, 1986), 발생된 DNA 나선파괴는 세포내 GSH 농도 증가시향상되었으며 GSH 고갈시에는 감소되었다. Chinese hamster V79 세포에서 비타민 E와 ascorbate는 6가크롬에 의해 발생된 DNA 나선파괴와 Cr(V)생성량을 감소시킨 반면 비타민 B₂ (diol-함유 분자)는 증가시켰다(Sugiyama *et al.*, 1991b). 여러 실험 결과를 종합할때 6가크롬으로 인한 DNA 나선파괴는 발생하는 Cr(V)의 양과 관련이 있었다.

2. 8-hydroxylation-deoxyguanosine 생성

·OH기는 여러위치의 guanine 잔기와 작용하는데, 가장 많은 연구가 된 곳이 dG-잔기로서 수산화 치환반응의 결과 8-hydroxylation-deoxyguanosine (8-OHdG)이 생성된(Dizadaroglu, 1991). 이 adduct의 형성은 많은 화학물질들의 독성과 발암성의 기전에서 활성산소종과 연관시키는 표적으로 간주된다. HPLC를 사용한 전기화학적 검출시, ·OH

기는 Cr(V) 및 Cr(IV)가 중계된 반응에서 2'-deoxyguanosine (dG)을 수산화반응 시키면서 8-OHdG를 생성하는 것으로 밝혀졌다(Shi *et al.*, 1994).

3. 지질과산화반응 (Lipid peroxidation)

지질과산화 반응은 막의 구성 지방인 polyunsaturated fatty acid (다불포화지방산, PUFA)의 산화부패 과정으로 정의되며, 암을 포함하여 많은 질병의 원인으로 알려져있다(Sunderman, 1986). 지질과산화 반응은 활성산소종에 의해서 PUFA로부터 수소 원자가 추출되면서 발생된다. 크롬은 지질과산화반응을 유도하며 이 과정 중 지방 히드رو과산화물 (lipid hydroperoxide)로 부터 유도된 자유라디칼의 발생은 발암에 중요한 영향을 미친다(Brambilla and Marinari, 1989). 즉, 발생하는 자유라디칼은 세포막을 손상하여 세포내에서 촉매작용이 활발한 철의 양을 증가시키고 활성산소종의 발생을 증가시킨다. 활성산소종은 염색질(chromatin)과 작용하여 종양 개시인과/혹은 조촉매로 작용한다. 또한 자유라디칼은 특정한 위치의 이중나선-DNA를 절단시킨다. 세포내에서 6가크롬 환원에 의해 마지막 생성물로 모여진 3가크롬은 지방 히드رو과산화물과 작용하여 더 많은 자유라디칼을 발생한다(Mao *et al.*, 1995). 3가크롬은 분리된 핵(nuclei)에 결합하고, 뉴클레오티드 및 핵산(nucleic acids)들과 작용한다(Tsapakos and Wetterhahn, 1983). 즉, 크롬에 의해 발생된 ·OH기와 지방 히드رو과산화물로부터 유도된 자유라디칼 들은 DNA 손상을 일으키게 된다.

4. NF-κB 활성화

핵 전사인자(NF-κB)는 다양한 유전자들의 전사(transcription)를 촉진시키는 기능을 가진 중요한 산화성 스트레스 전사인자이다(Baldwin, 1996). 여러 세포에서 활동적인 활성산소종이 NF-κB를 활성화 시키는 것이 발견되었으며(Sun and Oberley, 1996), 6가크롬이 Jurkat 세포에서 NF-κB의 활성화를 유도하였다(Ye *et al.*, 1995). 6가크롬에 의한 NF-κB 활성화에는 6가크롬의 낮은 산화가로의 환원과정이 필수적이다. 특히 크롬(V)와 크롬(IV)에 의한 Fenton 유사 반응에 의해 발생하는 수산화

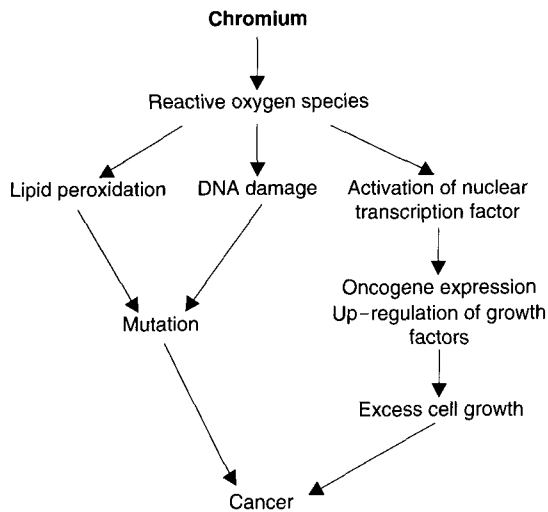


Fig. 2. A schematic representation of the role of free-radical reactions in Cr(VI)-induced carcinogenesis.

(hydroxyl기)는 Cr(VI)에 의한 NF- κ B의 활성화에 주요한 역할을 한다. NF- κ B 결합 위치는 *c-myc* 종양유전자의 증진요소로 작용하며 이 유전자는 Burkitt's lymphoma의 형성과 관련이 있다(Ji *et al.*, 1994). 6가크롬은 NF- κ B를 활성화함으로써 *c-myc* 원종양유전자(proto-oncogene)의 단백질 합성을 유도할 수 있다. NF- κ B 활성화와 *c-myc*같은 원종양유전자의 표현이 6가크롬이 종양의 변형을 유도하는데 역할을 할 것이다.

결론

6가크롬 화합물은 산업장에서 폭로되기 쉽고, 환경오염이 가능한 발암물질로 널리 확인 되어있다. 비록 6가크롬에 의한 발암기전이 명확히 밝혀지지 않았으나, 6가크롬으로부터 5가, 4가와 같은 낮은 산화상태로의 환원과정은 중요한 단계로 믿어진다. 6가크롬의 환원은 환원제의 특성에 따라서 다양한 기전들에 의해 일어나며 환원제들은 세포 내 작은 분자들(ascorbate와 GSH), 특정 flavoenzymes (glutathione reductase), 세포내 기관들(마이크로솜과 미토콘드리아)과 크기는 세포 자체와 생물체들을 포함한다. 실험에 사용된 모든 산화제의 크롬들은 H_2O_2 로부터 $\cdot OH$ radicals을 발생하였으

며 특히 4가와 5가크롬의 경우 높은 발생 강도를 나타내었다. 반응기전은 Haber-Weiss 혹은 Fenton 유사 반응이 포함되었다. 크롬이 중계된 반응에 의해 발생된 자유라디칼은 DNA 손상, 지질과산화반응 그리고 NF- κ B의 활성을 야기시켰다. 생물체에는 자유라디칼 반응에 의해 야기되는 산화성 상해(oxidative injury)를 효소 및 비효소적 산화방지제에 의하여 보호한다. 산화촉진제와 산화방지제 간의 균형이 산화촉진제 쪽으로 치우칠 경우, 크롬에 의한 산화성 상해가 발생된다. 세포 내·외의 항산화제의 수준을 촉진시키는 치료제의 발달과, 크롬으로 인한 활성산소종의 발생을 차단할 때, 6가 크롬으로 인한 발암(carcinogenesis)을 방지할 수 있거나 약화시킬 수 있을 것이다.

참고 문헌

- Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights, *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 640-681.
- Brambilla G, Martelli A and Marinari UM. Is lipid peroxidation associated with DNA damage?, *Mutat. Res.* 1989; 214: 123-127.
- Buttner B and Beyersmann D. Modification of the erythrocyte anion carrier by chromate, *Xenobiotica* 1985; 15: 735-741.
- Costa M. Toxicity and carcinogenicity of Cr(VI) in animal models and humans, *CRC Critical Reviews in Toxicology* 1997; 27: 431-442.
- Cupo DY and Wetterhahn KE. Modification of chromium(VI)-induced DNA damage by glutathione and cytochromes P-450 in chick embryo hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 82: 6755-6759.
- DeFlora S and Wetterhahn KE. Mechanism of chromium metabolism and genotoxicity, *Life Chem. Rep.* 1989; 7: 169-244.
- DeFlora S, Bagnasco M, Serra D and Zancacchi P. Genotoxicity of chromium compounds: A review, *Mutat. Res.* 1990; 238: 99-172.
- Dizadaroglu M. Chemical determination of free radical-induced damage to DNA, *Free Radical Biol. Med.* 1991; 10: 225-242.
- Freund H, Altamian S and Fischer JE. Chromium deficiency during total parenteral nutrition, *J. American Med. Asso.* 1979; 241: 496-498.
- Granger DN, Hollwarth MA and Parks DA. Ischemia reper-

- fusion injury: Role of oxygen-derived free radicals, *Acta Physiol. Scand.* 1982; 126: Suppl. 548: 47-63.
- Hamilton JW and Wetterhahn KE. Chromium(VI)-induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells in vivo, *Carcinogenesis* 1986; 7: 2085-2088.
- Hansen K and Stern RM. Welding fumes and chromium compounds in cell transformation assays, *J. Appl. Toxicol.* 1985; 5: 306-314.
- Hayes RB. Review of occupational epidemiology of chromium chemicals and respiratory cancer, *Sci. Total Environ.* 1988; 71: 331-339.
- IARC. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Chromium, Nickel and Welding. Lyon, International Agency for Research on Cancer 1990; 49.
- Ji L, Arcinas M and Boxer LM. NF- κ B sites function as positive regulators of expression of the translocated *c-myc* allele in Burkitt's lymphoma, *Mol. Cell Biol.* 1994; 14: 141-179.
- Langardt S. One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports, *Am. J. Ind. Med.* 1990; 17: 189-215.
- Lefebvre Y and Pezerat H. Production of activated species of oxygen during the chromate(VI)-ascorbate reaction: Implication in carcinogenesis, *Chem. Res. Toxicol.* 1992; 5: 461-463.
- Lehmann KB. Ist grund zu einer besonderen Beunruhigung wegen des Auftretens von Lungenkrebs bei Chromatarbeitern vorhanden?, *Zentralbl. Gewerbehyg.* 1932; 19: 168-170. Cited in: Langardt S. One hundred years of chromium and cancer: A review of epidemiological evidence and selected case reports, *Am. J. Indus. Med.* 1990; 17: 189-215.
- Liebross RH and Wetterhahn KE. In vivo formation of chromium(V) in chick embryo red blood cells, *Chem. Res. Toxicol.* 1990; 3: 401-403.
- Liu K, Jiang J, Swartz HM and Shi X. Low frequency ESR detection of chromium(V) formation by one-electron reduction of chromium(VI) in whole live mice, *Arch. Biochem. Biophys.* 1994; 313: 248-252.
- Liu KJ, Shi X, Jiang JJ, Goda F, Dalal NS and Swartz HM. Low frequency electron paramagnetic resonance investigation on metabolism of chromium(VI) by whole mice, *Annu. Clin. Lab. Sci.* 1996; 26: 176-184.
- Mao Y, Zang L and Shi X. Generation of free radicals by Cr(IV) from lipid hydroperoxides and its inhibition by chelators, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995; 36: 327-337.
- O'Brien P, Barrett J and Swanson F. Chromium(V) can be generated in the reduction of chromium(VI) by glutathione, *Inorg. Chim. Acta.* 1985; 108: L19-L20.
- Ottenwalder H, Wiegand HJ and Bolt HM. Uptake of ^{51}Cr (VI) by human erythrocytes: Evidence for a carrier-mediated transport mechanism, *Sci. Total Environ.* 1988; 71: 561-566.
- Saner G. Chromium in nutrition and Disease-Current Topics in Nutrition and Disease. Alan R. Liss, New York 1980; 2: 26-29.
- Shi X and Dalal NS. The mechanism of the chromate reduction by glutathione: ESR evidence for the glutathionyl radical and an isolable Cr(V) intermediate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 156: 137-142.
- Shi X and Dalal NS. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species, *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 277: 342-350.
- Shi X and Dalal NS. Free radical generation by mineral ions adsorbed on mineral dust: A mechanism for chronic lung injury, *Respirable dust in the mineral industries*, Franz RL and Ramani RV (Eds.). Littleton, Co. 1991; 307-311.
- Shi X and Dalal NS. The role of superoxide radical in chromium(VI) generated hydroxyl radical: The Cr(VI) Haber-Weiss cycle, *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 292: 323-327.
- Shi X, Dalal NS and Kasprzak KS. Generation of free radicals from hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr(III), *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 302: 294-299.
- Shi X, Mao Y, Knapton AD, Ding M, Rojanasakul Y, Gannett PM, Dalal NS and Liu K. Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: Role of Cr(IV)-mediated Fenton-like reaction, *Carcinogenesis* 1994; 15: 2475-2478.
- Shi X, Leonard S, Zang L, Gannett P, Rojanasakul Y, Castanova V and Vallyathan V. Cr(III)-mediated hydroxyl radical generation via Haber-Weiss cycle, *J. Inorg. Biochem.* 1998; 69: 263-268.
- Snow E. Metal carcinogenesis: Mechanistic implications, *Pharmacol. Ther.* 1992; 53: 31-65.
- Standeven AM and Wetterhahn KE. Ascorbate is the principal reductant of chromium(VI) in rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium-DNA binding in vitro, *Carcinogenesis* 1992; 13: 1319-1324.
- Sugiyama M. Effects of vitamins on chromium(VI)-induced damage, *Environ. Health Perspect.* 1991; 92: 63-70.
- Sugiyama M, Tsuzuki K, Hidaka T, Yamamoto M and Ogura

- R. Reduction of chromium-(VI) in Chinese hamster V-79 cells, *Biol. Trace Elem. Res.* 1991a; 30: 1-9.
- Sugiyama M, Tsuzuki K and Ogura R. Effects of ascorbic acid on DNA damage, cytotoxicity, glutathione reductase, and formation of paramagnetic chromate in Chinese hamster V-79 cells treated with sodium (VI), *J. Biol. Chem.* 1991b; 266: 3383-3386.
- Sugiyama M, Tsuzuki K, Lin X and Costa M. Potentiation of sodium chromate (VI)-induced chromosomal aberrations and mutations in Chinese hamster V-79 cells, *Mutat. Res.* 1992; 283: 211-214.
- Sugiyama M, Tsuzuki K and Haramaki N. Influence of o-phenanthroline on DNA single-strand breaks, alkali-labile sites, glutathione reductase, and formation of chromium (V) in Chinese hamster V-79 cells treated with sodium chromate (VI), *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 305: 261-266.
- Sugiyama M. Role of paramagnetic chromium in chromium (VI)-induced damage in cultured mammalian cells, *Environ. Health perspect.* 1994; 102(suppl.): 31-33.
- Sun Y and Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators, *Free Radical Biol. Med.* 1996; 21: 335-348.
- Sunderman FW Jr. Metals and lipid peroxidation, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1986; 59: 248-255.
- Suzuki Y and Fukuda K. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung, *Arch. Toxicol.* 1990; 64: 169-176.
- Tsapakos MJ and Wetterhahn KE. Interaction of chromium with nucleic acids, *Chem. Biol. Interact.* 1983; 46: 265-277.
- US Public Health Service. Health of workers in chromate producing industry, US Department of Health, Education and Welfare Publ, US Government Printing Office, 1953: 192.
- Ye J, Zhang X, Young HA, Mao Y and Shi X. Chromium (VI)-induced nuclear factor- κ B activation in intact cells via free radical reactions, *Carcinogenesis* 1995; 16: 2401-2405.