J. Exp. Biomed. Sci. 12 (2006) 261-265

Cytotoxic Effect of Hexavalent Chromium on C6 Glioma Cells

Seung-Han Suk†

Department of Neurology, Wonkwang University Sanbon Medical Center, Gyeonggi-do 435-040, Korea

Toxic effect of Hexavalent chromium (CrO_3) on various cells and organs has been well recognized. However, the mechanism and degree of cytotoxicity of CrO_3 remain unclear. This study was performed to examine the cytotoxicity of CrO_3 on C_6 glioma cells by measuring cell viability. The XTT assay, one of the sensitive methods to determine the cell viability, was taken to examine the viability of glioma cells treated with CrO_3. In this study, not only decreased the number of glioma cells but morphologic changes of them were noted and cell viability decreased in a time and dose-dependent manner after treated with various concentrations of CrO_3 for 48 hours. IC_{90} and IC_{50} values in XTT assay were determined at 25 μM and 55 μM CrO_3, respectively. These results suggest that Hexavalent chromium has a highly cytotoxic effect and has a time and dose-dependent cytotoxicity on C_6 glioma cells.

Key Words: C_6 glioma cell, Hexavalent chromium (CrO_3), Cytotoxicty

서 론

중금속은 각종 산업분야에서 제품생산의 원료로 사용되어지는 중요한 자원의 하나이다 (Greener and Kochen, 1983). 그러나 공장폐수나 차량배기 등에 포함되어 수자원이나 공기에 노출된 경우 인체가 이를 흡수할 경우 각종 장기에 손상을 주어 질환을 일으키게 됨은 이미 잘 알려져 있다 (Norseth, 1981; Park et al., 1996). 특히, 중금속 중 크롬은 독성이 강하기 때문에 이의 노출시 중독은 물론 치료 후에도 심각한 부작용이 따름으로서 취급시 각별한 주의가 요구된다 (Gale, 1978; Coogan et al., 1992). 크롬은 지표면에 풍부하게 존재하고 있는 물질 중 하나로 3가와 6가크롬이 있다. 자연 중에는 주로 3가로 존재하고 있으며 6가 형태의 크롬은 적다 (Gilani and Marano, 1979). 산업장에서 주로 사용되어지고 있는 것은 3가와 6가를 포함하고 있는 화합물이며 6가를 포함하고 있는 경우는 중크롬산으로서 독성은 이의 부식과 산화작용에 의한다 (Levis and Majone, 1979). 3가크롬과 6가크롬이 인체에 작용하는 기전을 살펴보면 3가크롬은 피부흡수가 어렵지만 6가크롬은 쉽게 피부를 통과한다 (Giliani and Marano, 1979). 또한 3가크롬은 세포막을 통과하기가 어렵지만 6가크롬은 세포막을 용이하게 통과함으로서 폭로의 측면에서 볼 때 6가크롬이 매우 위험하며 이의 통과시 수분에서 수시간 동안에 발암성을 가진 3가 형태로 환원된다 (Peterson et al. 1981). 특히, 6가크롬이 3가크롬으로의 환원이 세포질에서 일어나면 독성이 적으나 DNA의 근위부에서 일어날 경우 강한 변이성을 나타낸다 (Coogan et al., 1992). 크롬화합물은 산화제로서 anthraguinone이나 감미료의 제조를 비롯하여 안료, 가죽제조, 염색, 도금 및 합금 등 매우 다양하게 이용되고 있다 (Levis and Majone, 1979). 우리나라의 경우 1970년도 산업장에서 매년 10명 정도의 크롬중독이 보고되어 미온적인 대처를 하였으나 1980년경에 크롬도금사업장이나 크롬을 이용한 영세사업장에서 일하는 근로자들이 비중격천공과 같은 직업병이 증가되자 사회적인 문제로 부각하게 되었다 (Norseth, 1981). 크롬을 비롯한 수은, 납, 카드뮴, 구리 등과 같은 중금속류의 독성은 일단 인체내에 축적이 되면 체외로의 배출이 어렵고 분해속도가 느리기 때문에 각종 질환의 병인으로 알려져 있다 (Greener and Kochen, 1983). 이들은 인체 세포내의 DNA를 손상시키거나 효소활성의 저해 및 세포생존율의 감소와 같은 다양한 세포독성을 나타냄으로서 신경계나, 피부, 호흡계, 생식계, 골격계 등 여러 system에 장애를 초래한다 (Ferm and Hanlon, 1974). 특히, 삼산화크롬을 임신한 햄스터에 투여하였을 경우 골격계에 이상을 초래함으로서 기형유발원이라는 보고도 있다 (Ferm and Hanlon, 1974; Gale, 1978). 그러나 아직까지 크롬의 독성기전에 대해서는 자세히 알려져 있지 않을 뿐만 아니라 이의 효과적인 치료방법에 대해서도 매우 미흡한 상태이다 (Gilani and Marano, 1979). 근래에 수은이나 철, 카드뮴, 크롬과 같은 맹독성류의 중금속에 대한 중독에 활성산소가 관여한다는 보고가 제시된 바 있다 (Ganther, 1980; Park et al., 1997). 활성

*논 문 접 수: 2006년 6월 13일
수정재접수: 2006년 7월 19일
†교신저자: 석승한, (우) 435-040 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 의과대학 산본병원 신경학교실
Tel: 031-390-2231, e-mail: suksh@wonkwang.ac.kr

산소는 인체내에 소량 생성되지만 활성산소제거효소에 의하여 물로 치환됨으로서 인체에는 전혀 영향을 미치지 못한다 (Hayase et al., 1989). 특히, 과량의 활성산소는 세포내 지질과산화반응을 비롯하여 세포내 다량의 칼슘유입을 유도함으로서 세포를 고사시킨다 (Coogen et al., 1992; Park et al., 1996). 본 연구에서는 6가크롬이 C_6 신경교종세포에 미치는 세포독성을 조사하기 위하여 세포를 시간별로 배양한 후 여러 농도의 6가크롬인 CrO_3가 포함된 배양액에서 처리한 후 세포생존율을 XTT cytotoxicity assay에 의하여 정량적으로 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험약제

세포배양에 사용된 시약으로서 Fetal bovine serum (FBS)을 비롯한 Dulbecco's minimum essential medium (MEM) 배지, penicillin 및 fungizone은 Gibco 사에서 구입하였으며, 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide (XTT)를 비롯한 phosphate buffered saline (PBS) 및 6가크롬 (CrO_3)은 Sigma Chemical 사에서 각각 구입하였다.

2. 실험기구

C_6 신경교종세포의 배양은 CO_2 항온기 (Shellab Co., Cornelius, OR, USA)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기 (Marienfeld Co., Mergentheim, Germany)를 사용하였다. XTT의 정량분석은 ELISA reader (Spectra max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였다.

3. 세포배양

C_6 신경교종세포의 배양은 MEM 배지에 10% FBS를 비롯하여 penicillin (25 unit/ml), fungizone을 첨가하여 사용하였다. 세포연속배양은 일차배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin-EDTA로 처리한 후 Turk형 혈구계산기로 세포를 5×10^5 cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

4. XTT 정량분석

PBS에 녹인 1 mg laminin의 저장액을 냉장고에 보관한 후 실험당일 필요한 양을 희석한 다음 24 well plate에 200 μl씩 분주하여 하루 밤 동안 건조시켰다. 건조 완료 후 PBS로 두 세 번 세척한 다음 3% BSA (Bovine serum albumin, Sigma Co.)를 각 well당 200 μl씩 첨가하여 잘 진탕한 후 다시 이를 PBS로 두 세 번 세척하였다. 배양된 C_6 신경교종세포를 5×10^5 cells/ml 밀도로 배양용기에 넣고 24시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 CrO_3를 각각의 농도를 처리한 다음 48시간 동안 배양한 다음 PBS로 두 세 번 세척하였다.

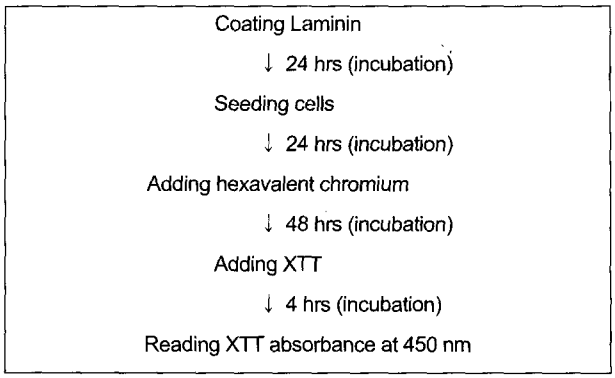

Fig. 1. Flow Scheme of XTT assay.

세척 완료 후 XTT와 혼합 후 각 배양용기에 200 ml씩을 주입하여 4시간 동안 배양한 다음 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 분석방법의 개요는 Fig. 1과 같다.

5. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 students' t-test에 준하였고 *P*-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. CrO3의 농도에 의한 세포독성

1, 25, 40, 55 μM CrO_3가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 C_6 신경교종세포를 48시간 동안 배양한 다음 세포생존율을 XTT assay에 의하여 정량분석하였다. 그 결과 1 μM의 농도에서는 세포생존율은 대조군 100% (5.44±0.24) 비하여 99.6% (5.42±0.31)로 나타났으며, 25 μM에서의 세포생존율은 95.6% (5.20±0.29)로 나타나 대조군에 비하여 다소 감소하였다. 또한, 40 μM의 CrO_3 처리에서는 82.0% (4.46±0.52)로 나타나 이 역시 대조군에 비하여 다소 감소한 것으로 나타났다. 그러나 55 μM CrO_3의 처리에서는 Fig. 2에서처럼 세포수가 감소되어, 그 생존율이 58.5% (3.18±0.13)로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($P<0.05$) (Table 1).

2. 시간에 의한 CrO_3의 세포독성

C_6 신경교종세포를 55 μM CrO_3가 포함된 배양액에서 12, 24, 48, 72시간 동안 배양한 다음 세포생존율을 XTT assay에 의하여 정량분석하였다. 그 결과 12시간 동안 배양에서는 세포생존율은 대조군 100% (3.42±0.26) 비하여 74.5% (2.57±0.13)로 나타나 다소 감소하였다. 한편, 24시간 동안 처리한 실험군에서의 세포생존율은 60.6% (2.09±0.34)로 나타나 대조군에 비하여 약간 감소하였다. 또한, 48시간과 72시간의 CrO_3 처리에서는 각각 47.5% (1.64±0.21)와 44.6% (1.54±0.15)

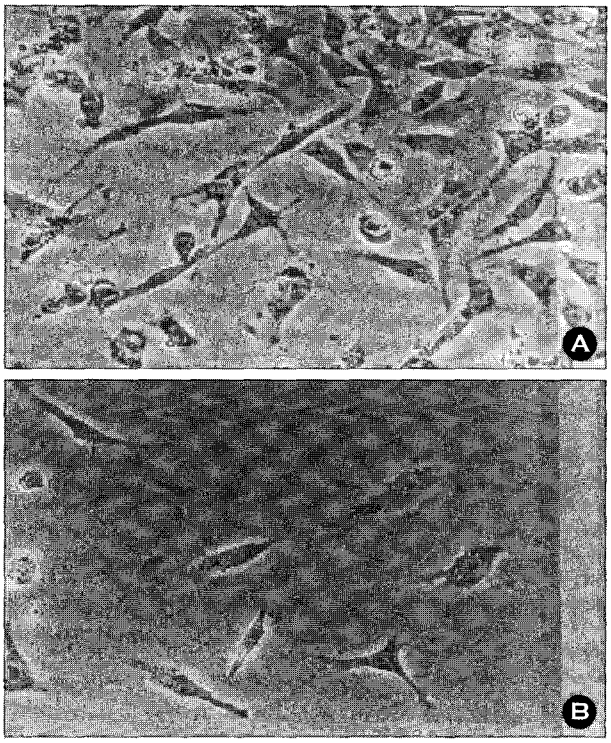

Fig. 2. The photographs showing cultured C_6 glioma cells. **A,** Many C_6 glioma cells in control group. **B,** C_6 glioma cells treated with 55 μM hexavalent chromium (CrO_3) for 72 hours. Decrease of cell number and loss of cell process are noted. × 250

Table 1. The cell viability of hexavalent chromium (CrO_3) on C_6 glioma cells in concentration by XTT assay

Group		
Concentration of CrO_5 (μM)	Mean ± S.D.	(% of control)
control	5.44±0.24	100
1	5.42±0.31	99.6
25	5.20±0.29	95.6
40	4.46±0.52	82.0
55	3.18±0.13	58.5*

C_6 glioma cells were incubated with or without 1~55 μM CrO_3 for 48 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. *P<0.05 (Student's t-test)

로 나타나 대조군에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 (P<0.05) (Table 2).

3. XTT IC_{90}과 IC_{50}

XTT IC_{90}과 IC_{50}을 측정하기 위하여 C_6 신경교종세포에 CrO_3가 1~55 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 다음 XTT 흡광도를 측정하였다 그 결과 CrO_3의 IC_{90}과 XTT_{50}은 각각 25 μM과 55 μM에서 나타났다 (Table 3).

Table 2. The cell viability of hexavalent chromium (CrO_3) on C_6 glioma cells in incubation time by XTT assay

Group		
Incubation time of CrO_5 (hour)	Mean ± S.D.	(% of control)
control	3.45±0.26	100
12	2.57±0.13	74.5
24	2.09±0.34	60.6
48	1.64±0.21	47.5*
72	1.54±0.15	44.6*

C_6 glioma cells were incubated with or without 55 μM CrO_3 for 12~72 hours. The value represent the mean ± SD for triplicate experiments. *P<0.05 (Student's t-test)

Table 3. The values of IC_{90} and IC_{50} of hexavalent chromium (CrO_3) on C_6 glioma cells by XTT assay

Cell line	XTT assay	
	IC_{90}	IC_{50}
C_6 glioma	25 μM	55 μM

C_6 glioma cells were incubated with 1~55 μM CrO_3, respectively. The values were determined by XTT assay in C_6 glioma cells.

고 찰

크롬에 의한 급성중독은 관절염을 비롯하여 정신장애, 소화장애, 시력저하 및 신장장애와 같은 여러 질환을 초래할 수 있다. 특히 신장장애의 병발에서는 과뇨증 및 무뇨증을 유발하게 되는데 이 경우 요독증으로 이삼일 내로 사망에 이르게 까지 된다 (Gale, 1979). 크롬의 만성중독은 코, 폐, 위장의 점막에 병변을 일으키는 것이 특징이며 장기간 폭로시 기침을 비롯하여 호흡곤란, 발열, 체중감소, 식욕감퇴 및 구토를 동반한다 (Gilini and Marano, 1979). 특히, 6가크롬은 인체내에서 3가의 형태로 빠르게 환원되면서 인체세포에 대하여 발암작용을 나타내기 때문에 carcinogen 또는 mutagen으로 알려져 있다 (Bianchi et al., 1980; Norseth, 1981). 본 연구에서는 6가크롬인 CrO_3를 C_6 신경교종세포에 일정시간 배양한 후 1~55 μM의 각각의 농도로 포함된 각각의 배양액에서 48시간 동안 배양한 다음 세포생존율을 XTT assay에 의하여 조사하였다. 그 결과 C_6 신경교종세포는 CrO_3의 처리농도에 비례하여 세포생존율의 감소를 나타냈다. 특히, 25 μM과 55 μM CrO_3의 처리농도에서는 각각 XTT_{90}과 XTT_{50} 값의 세포생존율을 나타냈다. Borenfreund와 Puener (1984)는 MTT 정량이나 NR 정량, XTT 정량과 같은 colorimetric assay에 있어서 이의 중앙값인 MTT_{50}이나 NR_{50}, XTT_{50} 값이 100 μM 이하면 고독성 (high-toxic)이라고 하였으며 100~1,000 μM이면 중간독성 (mid-toxic), 1,000~2,000 μM이면 저독성 (low-toxic), 2,000 μM 이상이면 무독성 (non-toxic)이라고 판정하

였다. 본 연구에서는 XTT_{50} 값이 100 μM 이하로 나타나 위의 독성판정기준에 의하여 고독성인 것으로 나타났다. 이러한 크롬의 세포독성은 아마도 C_6 신경교종세포에 처리한 6가크롬이 세포내 DNA나 RNA와 같은 핵산합성의 손상이나 또는 세포의 단백질합성계에 영향을 줄었을 가능성도 배제할 수 없지만 (Coogan et al., 1992), 본 실험에서 적용한 XTT 정량분석이 세포내 소기관인 사립체와 밀접한 관련이 있는 것으로 미루어 볼 때 아마도 6가크롬이 세포소기관의 효소활성능을 저하시킴으로서 세포생존율을 감소한 것으로 생각된다 (Mosmann, 1983). 본 실험에서 CrO_3의 처리농도에 따른 세포생존율의 정량분석에 있어 6가크롬의 시간이 증가함에 따라 세포생존율이 점차 감소하는 현상을 나타냈는데 이 같은 감소현상은 CrO_3의 농도별 처리가 세포막을 통과한 후 세포내에 축적되어 지는 양이 증가함에 따라 세포질내의 소기관의 활성억제에 다소 다른 영향을 주었음을 알 수 있다 (Norseth, 1981). 한편, 크롬의 세포독성 기전에 대한 가능성의 하나로 활성산소종을 고려할 수 있다. 근래에 크롬을 비롯한 구리 또는 메틸수은 등과 같은 몇몇 중금속류들은 이들이 산화나 또는 붕괴될 때 활성산소종을 발생시킨다고 제시된 바 있다 (Peterson et al., 1981). 이와 같은 가설은 CrO_3의 세포독성이 활성산소종과 관련이 있음을 제시해 주고 있다 (Kasuya, 1975; Park et al., 1996). 이러한 가설을 뒷받침 해줄 수 있는 정립된 활성산소종의 세포독성에 관한 기전을 살펴보면 활성산소는 세포내 phospholipase A_2와 같은 이차전달자를 과활성 시킴으로서 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 (Michikawa et al., 1994), glutamate와 같은 흥분성 아미노산을 분비케 하여 그 결과 세포막에 위치하고 있는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과자극하여 세포내 칼슘의 유입을 유도함으로서 세포를 사멸케 만드는 요인으로 알려져 있다 (Levis and Majone, 1979; Mattson et al., 1993; Hayase et al., 1989). 그러나 6가크롬의 세포독성에 대해 더욱 자세한 세포독성에 대한 기전규명을 위하여서는 활성산소종의 산화적 손상측면뿐만 아니라 NMDA 수용체계는 물론 protein kinase C (PKC)와 같은 신호전달체계, 항산화방어계, 항지질과산화계 및 칼슘체널 등과 같은 다양한 인자들에 대하여서 앞으로 체계적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

6가크롬 (CrO_3)의 세포독성을 알아보기 위하여 CrO_3가 1, 25, 40, 55 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 C_6 신경교종세포를 48시간 동안 배양한 후 세포생존율을 XTT assay에 의하여 정량하였다. 그 결과 CrO_3는 C_6 신경교종세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 대조군에 비하여 현저하게 감소시켰으며 XTT_{90}과 XTT_{50} 값은 각각 25 μM, 55 μM의 CrO_3 처리에서 나타났다. 이상의 결과는 Borenfreund와 Puerner (1984)의 독성판정기준에 의하여 고독성인 것으로 나타났으며 세포배양은 크롬과 같은 중금속류의 세포독성을 판정하는데 매우 유용한 분석수단의 하나라고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

REFERENCES

Bianch V, Toso RD, Debetto P, Levis AG, Luciani S, Majone F, Tamino G. Mechanism of chromium toxicity in mammalian cell cultures. Toxicology 1980. 219-224.

Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J Tiss Cult Meth. 1984. 9: 7-9.

Coogan TP, Bare RM, Waalkes MP. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. Toxicol Appl Pharmacol. 1992. 113: 227-233.

Ferm VH, Hanlon DP. Toxicity of copper salts in hamster embryonic development. Biol Reprod. 1974. 11: 97-101.

Gale TF. Embryonic effects of chromium trioxide in hamser. Environ Res. 1978. 16: 101-106.

Gale TF, Bunch JD. The effect of time of administration of chromium trioxide on the embryotoxic response in hamsters. Teratology 1979. 19: 81-86.

Ganther HE. Interaction of vitamin E and selenium with mercury and silver. Ann NY Acard Sci. 1980. 355: 212-225.

Gilani SH, Marano M. Chromium poisoning and chick embryogenesis. Environ Res. 1979. 19: 427-432.

Greener Y, Kochen JA. Methylmercuric toxicity in the chick embryo. Teratology 1983. 28: 23-28.

Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H. Scavenger of active oxygens by melanoidin. Agric Biol Chem. 1989. 53: 3383-3389.

Kasuya M. The effect of vitamin E on the toxicity of alkyl mercurials on nervous tissue in culture. Toxicol Appl Pharmacol. 1975. 32: 374-379.

Levis AG, Majone F. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compoun on mammalian cell cultures. Br J Cancer 1979. 40: 523-528.

Mattson MP, Zhang Y, Bose S. Growth factors prevent mito-

chondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. Exp Neurol. 1993. 121: 1-13.

Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res. 1994. 37: 62-70.

Momann T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliperation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1984. 65: 55-63.

Norseth T. The carcinogenicity of chromium. Environ Health Perspect. 1981. 40: 121-125.

Park OK, Oh JM, Choi MK, Park ST, Chung YT. Effect of antioxidants on $FeSO_4$ toxicity in cultured myocardial cells. Korean J Phys Anthrop. 1997. 10: 161-168.

Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. Neurotoxicol. 1996 17: 37-46.

Peterson A, Lewne M, Walum E. Acute toxicity of organic solvents, heavy metals, and DDT tested in cultures of mouse neuroblastoma cells. Toxicol Lett. 1981. 9: 101-108.