

중금속 카드뮴(Cd)의 세포독성에 관한 연구*

정연태 · 박승택 · 최민규 · 김정중 · 문연자 · 우원홍 · 한두석 · 최봉규 · 소진탁
원광대학교 환경과학연구소

A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF CADMIUM IN VITRO*

Yeun Tai Chung, Seung Taek Park, Min Kyu Choi, Jeong Joong Kim, Yeun Ja Mun,
Won Hong Woo, Du Seok Han, Bong Kyu Choi, and Jin Tack Soh
Institute for Environmental Science, Wonkwang University, Iri, 570-749, Korea

(Received May 8, 1993)

(Accepted May 24, 1994)

ABSTRACT: The present study was carried out to evaluate the cytotoxicity of cadmium on cultured rat fibroblasts. The colorimetric assays of neutral red and tetrazolium MTT, the lactate dehydrogenase activity, the amounts of total protein, the rate of DNA synthesis, the amounts of unscheduled DNA synthesis, the frequency of sister chromatid exchange, the releasing rate of intracellular calcium, and light and electron microscopic studies were performed on cultured rat fibroblasts maintained in the media containing various concentrations of cadmium.

The results were as follows:

The neutral red(NR) and MTT values were decreased dose-dependently by cadmium, and the NR_{90} , NR_{50} , MTT_{90} and MTT_{50} values of cadmium were $0.2 \mu\text{M}$, $21.5 \mu\text{M}$, $1.0 \mu\text{M}$ and $60.0 \mu\text{M}$, respectively.

Lactate dehydrogenase activity at $10 \mu\text{M}$ and $50 \mu\text{M}$ concentrations of cadmium were increased to 139% and 282%, respectively, compared with control(100%), and the total amounts of protein were decreased dose-dependently by cadmium.

The rate of DNA synthesis was decreased dose-dependently by cadmium, and the rates of DNA synthesis at concentrations of cadmium, $7.0 \mu\text{M}$ and $60.0 \mu\text{M}$ were 90% and 50% of the control, respectively.

Amounts of unscheduled DNA synthesis and the frequency of sister chromatid exchange were not increased by cadmium, however releasing rate of intracellular calcium was markedly

*이 논문은 1991년도 교육부 지원 학술진흥재단의 대학부설연구소 지원 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

decreased by cadmium, compared to the control.

In light microscopy, cadmium induced the reduction of cells in number and the decrease in cell size dose-dependently, and electron microscopy of cultured fibroblasts at NR_{50} value showed cisternal dilatation of rough endoplasmic reticulum, dense body and numerous vacuoles.

The results indicate that the cytotoxic target of cadmium may be cell organelles rather than genetic materials, since a lower concentration of cadmium induces more cytotoxic effect on lysosome and mitochondria than DNA.

Key world: Cadmium, Colorimetric assay, Lactate dehydrogenase, Total protein, DNA synthesis, Sister chromatid exchange, Anchoring cell analysis system, Electron microscopy

서 론

중금속이온은 인체에 흡수되면 잘 배설되지 않고 축적되어 중추신경마비, 근의 무력화, 발암 등 급성 또는 만성중독을 야기시켜 중독자 자신뿐만 아니라, 돌연변이성 기형유발과 같이 후세대에까지 그 영향이 나타남으로써 심각한 독성을 미치는 것으로 알려져 있다(Gale과 Bunch, 1979; Greener와 Kochen, 1983).

이들 중금속중 특히 카드뮴은 1960년대 일본에서 Itai-Itai병의 원인 물질로 밝혀진 이래(Hagino와 Yoshioka, 1961) 이의 독성기작에 관한 연구는 계속되어 왔으나 아직 미흡한 실정이며, 다만 이 물질이 발암성 환경독성물질이라는 것은 잘 알려진 사실이다(Nomiyama, 1987). 실제로 카드뮴에 노출된 동물과 카드뮴을 취급한 공장의 근로자는 빈혈 발생율이 높으며(Friberg 등, 1974; Samarowic-krama, 1979), 호흡기계통의 질환을 유발하여 급성폐렴과 호흡기 부종뿐만 아니라(Nordberg, 1972), 심장혈관계, 골격계 및 신장질환을 유발한다(Nomiyama, 1980; Friberg와 Kjellstrom, 1981). 발생계에 미치는 영향으로는 golden hamster에서 안면부와 상악의 기형(Ferm과 Carpenter, 1967)이나 생쥐의 사지와 안면부 기형의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다(Layton과 Layton, 1979). 한편 카드뮴의 독성에 관한 연구는 *in vitro*에서도 활발히 이루어져 왔는데, 특히 Yamane(1981)는 중금속류의 독성기작에 관한 연구에서 중금속은 생체에 축적되어 그 독성이 나타나므로 중금속이 축적되는 장소와 그 농도를 결정하는 것은 독성기작을 밝히는데 중요한 문제라고 제시한 바 있으며, 실제로 신장세포(Jin과 Nordberg, 1983), 혈액세포(Kunimoto와 Miura, 1988), 고환간질 세포(Koizumi와 Waalkes, 1989, 1990), 간세포(Beattie 등, 1987) 등과 같이 주로 카드뮴에 영향을 많이 받는 것으로 알려진 기관의 세포에 대하여 *in vitro*에서 많은 연구가 진행되어 왔다

본 연구는 카드뮴이 사람의 정상세포에 미칠 수 있는 세포독성을 밝히기 위하여, 백서의 섬유모세포를 배양하여 neutral red(NR), tetrazolium MTT분석 및 lactate dehydrogenase (LDH)활성, 단백질 정량, DNA합성률과 비주기성 DNA 합성량의 측정, 그리고 자매염색분체 교환의 발생빈도와 세포내 유리칼슘측정등을 실시하여 카드뮴이 배양섬유모세포에 미치는 세포독성 및 유전독성의 영향을 조사하였으며 또한 형태적인 변화관찰을 위하여 광학 및 전자현미경적 관찰을 병행하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

생후 2~3일된 Sprague-Dawley계통 백서의 피부에서 분리한 섬유모세포를 사용하였다.

세포배양

백서의 피부에서 분리한 섬유모세포를 배양용기(25 cm² flask, Nunc)에서 stock culture한 후 3~4회 계대배양하여 사용하였다. 세포배양액은 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 ug/ml) 및 fungizone(0.25 μ g/ml)을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂로 조정된 항온기내에서 배양하였으며, 배양액은 3일마다 교환하였다. 세포수는 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 후 0.2% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 산정하였다.

카드뮴 처리

카드뮴(CdCl₂, Sigma)은 증류수에 녹여 EMEM으로 희석한 후 10 mM의 저장액으로 만들어 냉암소에 보관하고 사용당일 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

NR(neutral red) 정량

Borenfreund와 Puerner(1984) 방법에 의하여 세포를 well당 5×10⁴ cells/ml이 되도록 24 well plate에 분주하여 24시간 배양 후 여러 농도의 카드뮴이 포함된 배양액으로 교환하여, 다시 24시간 동안 배양하고, 50 μ g/ml의 neutral red (Sigma)가 포함된 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight시킨 후 well 당 1 ml씩 넣어 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척하여 1% formaldehyde-1% CaCl₂를 well당 0.5 ml씩 넣어 세포를 고정하고 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2 ml씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 3시간 동안 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR의 흡광도를 분광광도계 (540 nm)로 측정하여 대조군과 비교하였다.

MTT정량

Mosmann(1983)의 방법에 의하여, 세포를 카드뮴이 첨가된 배양액에서 24시간 배양한 후 분석당일 조제한 MTT(Sigma) 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치하여 MTT formazan을 용해한 후, 분광광도계 (550 nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

Lactate dehydrogenase활성 측정

세포를 카드뮴이 첨가된 배양액에서 24시간 배양한 후, 배양액으로 유출된 LDH의 활성측정은 변형된 Takahashi 등(1987)의 방법에 따랐다. 즉 LDH측정 kit(Atron lab., Japan)의 효소기질액 1.0 ml를 직경 10 mm인 tube(Palco)에 넣은 후 여기에 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 10분 후에 희석반응 정지액을 3.0 ml 넣어 잘 혼합한 후, 570 nm에서 대조군과 비교 조사하였다. 이때 효소활성은 reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH)의 산화량으로 표시하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따랐다. 섬유모세포를 여러 농도의 카드뮴에서 24

시간 배양한 후, 배양액을 버리고 PBS로 3회 세척하여 0.1 M NaOH를 well당 1 ml씩 넣고 다시 1시간 동안 37°C에 방치한 후, 세포를 용해시켜 분광광도계(540 nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다. 표준단백질로는 일정농도의 bovine serum albumin(BSA, Sigma)을 사용하였다.

DNA합성을 측정

직경 25 mm petri dish에 1×10^5 cells/ml을 분주하여 24시간 배양한 후 여러농도의 카드뮴을 처리하였다. 24시간 배양 후 [^3H]thymidine이 $10 \mu\text{Ci/ml}$ 포함된 배양액으로 교환하여 [^3H]thymidine을 1시간 동안 표식하였다. $100 \mu\text{g/ml}$ 의 sodium azide로 DNA합성을 억제시켜 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 없는 PBS로 3회 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시켰다. 부유된 세포의 수확은 Whatman GF/C glass filter paper를 사용하였으며, 수확한 여과지를 실온에서 건조시킨 후, scintillation cocktail(PPO 4g, POPOP 0.1g/Toluene 1l)을 8 ml씩 넣은 vial에 넣고 액체 섬광계수기로 방사능을 측정하였다.

비주기성 DNA합성의 조사

세포를 25 mm petri dish에 분주하여 confluent한 상태가 되도록 배양한 후 10^{-2} M의 hydroxyurea를 처리하였다. 1시간 후 hydroxyurea와 여러농도의 카드뮴, 그리고 [^3H]thymidine이 $5 \mu\text{Ci/ml}$ 포함된 배양액으로 교환하여 3시간 배양하고 세포를 부유시켜 수확한 후 액체섬광계수기로 방사능을 측정하였다.

자매염색분체 교환 빈도 조사

세포배양 24시간 후 여러 농도의 카드뮴과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 5-bromodeoxyuridine(BrdU)을 넣어 24시간 배양하여 염색체 표본을 제작하였다. 작성된 염색체 표본을 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 의 Hoechst 33258 (Sigma)에 15분간 반응시켜 자외선을 30분간 조사하고 60°C 2×SSC에 15분간 처리한 후, 4% Giemsa로 염색하여 분열중기에 있는 50개의 세포에서 자매염색분체 교환의 발생빈도를 조사하였다.

Anchoring cell analysis system(ACAS)에 의한 세포내 유리 칼슘의 측정

세포내 유리 칼슘의 측정은 ACAS 570(Meridian, USA)을 사용하여 Wade(1990)의 방법에 따라 수행하였다.

1) fluo-3 AM염색

배양중인 세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS로 2회 수세한 후 DMSO에 녹여진 Fluo-3 AM(Molecular probe 제품)을 최종 $5 \mu\text{M}$ 의 농도로 첨가한 다음 배양기(5% CO_2 , 95% air, 37°C)에서 1시간 동안 염색한 후 Ca^{2+} , Mg^{2+} free PBS로 다시 수세하여 남아있는 형광물질을 완전히 제거하고 세포내 유리 칼슘을 측정하는데 사용하였다. 세포자극물질로는 phorbol ester 유도체인 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)를 최종농도 50 nM이 되게하여 사용하였다.

부착식 세포분석을 위하여 배양세포를 ACAS 570 위상차 현미경으로 관찰하고 초점을 맞춘다음 488 nm의 세기로 발광된 argon-ion laser beam 200 mW 출력으로 scan을 3~4번 정도하여 기저선을 정한 후 세포자극물질을 처리하여 세포내 유리 칼슘의 변화를 측정하였다. Scan은 30~40회를 시행하였고 1회 Scan의 시간은 60초로 하였다.

세포의 형태학적 관찰

광학현미경적 관찰을 위하여 직경 60 mm petri dish에 1×10^5 cells/ml을 분주하여 24시간 배양한 후 여러농도의 카드뮴이 포함된 배양액으로 교환 하였다. 카드뮴 처리 24시간 후 도

립위상차 현미경으로 세포형태를 관찰하였다.

배양세포의 전자현미경적 관찰을 위한 시료의 제작은 Moses와 Claycomb(1982)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 직경 60 mm petri dish에 세포를 분주하여 24시간 배양하였으며 카드뮴이 NR₉₀과 NR₅₀의 농도로 포함된 배양액에 24시간 노출시킨 후 PBS로 3회 세척하여 1% glutaraldehyde(0.1 M phosphate 완충액, pH 7.2)로 후고정하였다. 고정된 시료는 ethanol(50~100%)로 탈수시켰다. 100% ethanol에 의한 최종탈수는 2회 반복하였으며, 100% ethanol과 epoxy수지(Epon 812, polysciences)혼합액을 1:1로 섞은 혼합액으로 1시간 동안 침투시켰다. 그 후 순수한 epoxy혼합액만으로 교환하고 35°C, 45°C 그리고 60°C 오븐내에서 각각 12, 12 그리고 24시간씩 유지시켜 중합을 완료하였다. 수지중합 후 액체질소(-196°C)에 5분간 보존시킨 다음 꺼내서 세포배양용기와 세포가 매몰되어 있는 epoxy블럭을 분리시켰다. Ultramicrotome을 이용하여 80 nm 두께로 절편을 만들고, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하였다. 세포의 미세구조는 Hitachi H-600 전자현미경을 이용하여 75 KV 가속전압하에서 관찰하였다.

통계처리

실험결과와 통계처리는 ANOVA test에 준하였고, P-value가 0.05미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

NR정량

섬유모세포에 여러농도의 카드뮴을 처리하여 NR의 흡광도를 측정하고 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, 흡광도는 카드뮴의 농도에 비례하여 감소하였으며, 세포가 영향을 받기 시작하는 농도, NR₉₀(initial point cytotoxicity value: ICV)과 50%의 영향을 받는 농도, NR₅(midpoint cytotoxicity value: MCV)은 각각 0.2 μ M과

Table 1. The effect of cadmium on the neutral red uptake in cultured rat fibroblasts.

Concentration of cadmium (μ M)	Absorbance(% of the control) Mean \pm SD
0.2	90.5 \pm 5.1**
5.0	68.2 \pm 4.4**
10.0	57.6 \pm 3.3*
20.0	53.3 \pm 4.1*
30.0	39.2 \pm 3.8**

*P<0.05, **<0.01

Table 2. The effect of cadmium on the production of MTT formazan in rat fibroblasts.

Concentration of cadmium (μ M)	Absorbance(% of the control) Mean \pm SD
1.0	90.1 \pm 4.1**
5.0	88.5 \pm 3.8*
20.0	80.2 \pm 3.2*
50.0	57.6 \pm 4.5**
100.0	20.3 \pm 3.2*

*P<0.05, **<0.01

21.5 μM 이었다(Table 1).

MTT정량

섬유모세포를 여러 농도의 카드뮴으로 처리하여 MTT의 흡광도를 측정하고, 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출하였다. 흡광도는 카드뮴의 농도에 비례하여 감소하였으며, MTT₉₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 1.0 μM 과 60.0 μM 이었다(Table 2).

LDH 활성

백서의 섬유모세포를 카드뮴 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 와 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 농도에서 24시간 배양한 후 흡광도를 측정한 결과 각각 200.0 w.u, 401.7 w.u.로 나타나서 대조군 142.2 w.u.에 비하여 각각 139%와 282%로 증가되어 세포내의 LDH가 배양액내로 많이 유출된 것으로 나타났다(Table 3).

총단백질 량

대조군의 총단백질량을 100%로 하여 각 농도에 따른 총단백질량을 비례적으로 산출하여 백분율로 나타낸 결과, NR₉₀농도(0.2 μM)에서 총단백질량은 대조군의 89%, NR₅₀농도(21.5 μM)에서는 55%로 나타났다. 총단백질량이 대조군의 90%와 50%로 감소를 보인 농도는 각각 0.1 μM , 25 μM 로 나타나서 총단백질량의 감소양상은 NR의 농도에 따른 감소양상과 일치하였다(Table 4).

DNA합성률

대조군에서 측정된 방사능 값을 100%로 하여 각 실험군의 방사능 값을 백분율로 나타내었다. DNA합성률이 90%와 50%를 보인 농도는 각각, 7.0 μM 과 60.0 μM 로 나타났다. 특히 DNA합성률이 감소되는 농도는 세포소기관(NR, MTT흡광도)에 영향을 주는 농도와 일치하였는데, NR₉₀

Table 3. The effect of cadmium on LDH activity in cultured rat fibroblasts.

oncentration of cadmium (μM)	LDH activity Mean
control	142.2
0.1	145.0
1.0	156.0
10.0	200.0
50.0	401.7
100.0	500.9

Table 4. Total protein contents of rat fibroblasts treated with various concentrations of cadmium.

Concentration of cadmium (μM)	Total protein contents (% of the control) Mean \pm SD
0.1	90.5 \pm 5.5**
5.0	75.8 \pm 5.3**
10.0	67.2 \pm 4.6**
20.0	54.0 \pm 4.8**
30.0	43.5 \pm 4.0*

*P<0.05, **<0.01

과 MTT_{90} 농도에서 DNA합성률은 대조군 수준 혹은 그 이상으로, NR_{50} 과 MTT_{50} 농도에서는 대조군의 65%와 60%로 각각 나타났다(Figure 1).

비주기성 DNA합성량

대조군에서 측정된 방사능 값을 100%로 하여 각 실험군의 방사능 값을 백분율로 나타내었다. 본 실험에 있어서 가장 고농도인 $50 \mu M$ 의 카드뮴으로 처리된 실험군에서 74%의 감소를 보인것을 제외하고는 그 이하의 농도에서 나타난 실지 비주기성 DNA의 합성량에 있어서는 처리된 카드뮴의 농도 증가시에도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 5).

자매염색분체 교환 발생빈도

여러농도의 카드뮴으로 처리한 후 자매염색분체 교환의 분석을 시행하였다. 자매염색분체 교환 빈도는 대조군에서 세포당 7.3의 자매염색분체 교환이 관찰되었으며 가장 고농도인 $10 \mu M$ 처리시에도 7.9로 나타나서 처리된 카드뮴의 농도증가시에도 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다(Figure 2).

세포자극 물질에 의한 세포내 칼슘의 변화

세포내 칼슘의 변화를 관찰하기 위하여 유리 칼슘에 특이하게 반응하는 염색액인 Fluo-3 AM으로 염색한 후 세포자극물질인 PMA로 자극하였던 바, 카드뮴 MTT_{90} 처리군에서는 대조군에 비하여 유리되는 칼슘의 양이 현저하게 감소하였다(Figure 3).

세포의 형태학적 관찰조건

1) 광학현미경적 관찰조건

각 농도에 따른 세포의 형태학적 변화를 관찰한 결과 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 대조군에 비하여 $10 \mu M$ 에서는 사멸하여 부유되는 세포수가 점차 증가하고 세포형태가 위축되는 등 다

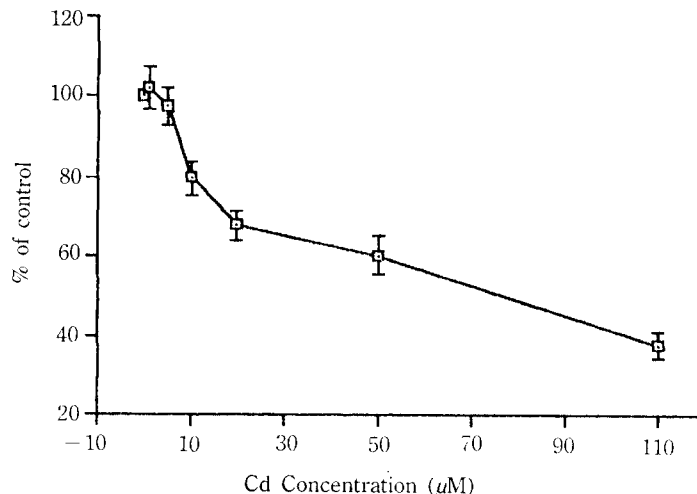


Figure 1. Rates of DNA synthesis in rat fibroblasts labelled with $[^3H]TdR$ for an hour at 24 hr after exposure to various concentrations of cadmium. Results were expressed as a percentage of rates in unexposed controls and each point represents the mean of three parallel dishes from one representative experiment.

소의 변화양상을 보였다. 50 μM 에서는 더욱 세포수가 감소하고 세포의 돌기도 감소하였으며, 100 μM 에서는 거의 대부분의 세포가 사멸하였다(Figure 4).

2) 전자현미경적 관찰소견

전자현미경적 관찰결과 대조군의 섬유모세포는 대체로 방추형이었고, 핵은 중앙부에 위치하였으며, 이 염색질이 핵막주위에 풍부하게 분포되어 있었다. 세포질내에는 타원형이거나 간상형의 사립체가 관찰되었고 약간의 조면내형질망과 상당량의 유리 리보솜 그리고 당원과 립들도 관찰되었다(Figure 5a). 카드뮴을 10 μM 농도로 처리한 세포에서는 유리 리보솜, myofibril 등은 특징적인 형태변화를 보이지 않았으며, 그들의 숫자도 대조군과 비슷하게 관찰되었으나, 조면내형질망은 조가 약간 확장되었고 간혹 농소체와 공포도 관찰되었다. 또한 사립체의 팽창과 용해소체로 보이는 농과립들이 관찰되었다(Fig. 5b). 50 μM 농도로 처리한 세포에서는 조면내형질망의 조가 더욱 확장되고 다수의 공포가 관찰되었으며 농소체도 약간 증가하였다(Figure 5c).

Table 5. Amounts of Unscheduled DNA synthesis(UDS) in rat fibroblasts treated with cadmium

Concentration of cadmium (μM)	UDS Mean (% of control)
0.1	105.6 \pm 7.1
1.0	105.1 \pm 6.8
5.0	104.3 \pm 5.2
10.0	103.3 \pm 7.6
50.0	74.5 \pm 6.0

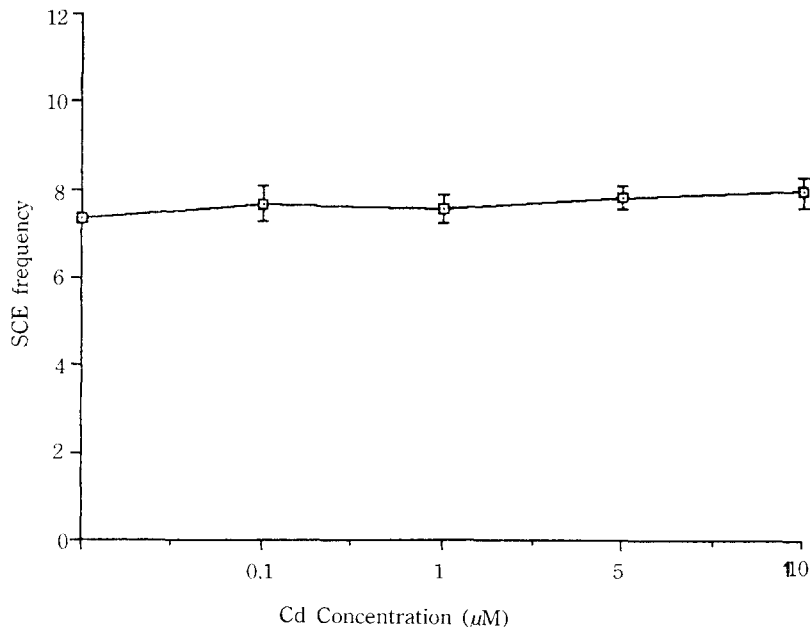


Figure 2. Frequencies of sister chromatid exchanges(SCEs) after treated with cadmium at various concentrations for 24 hours .

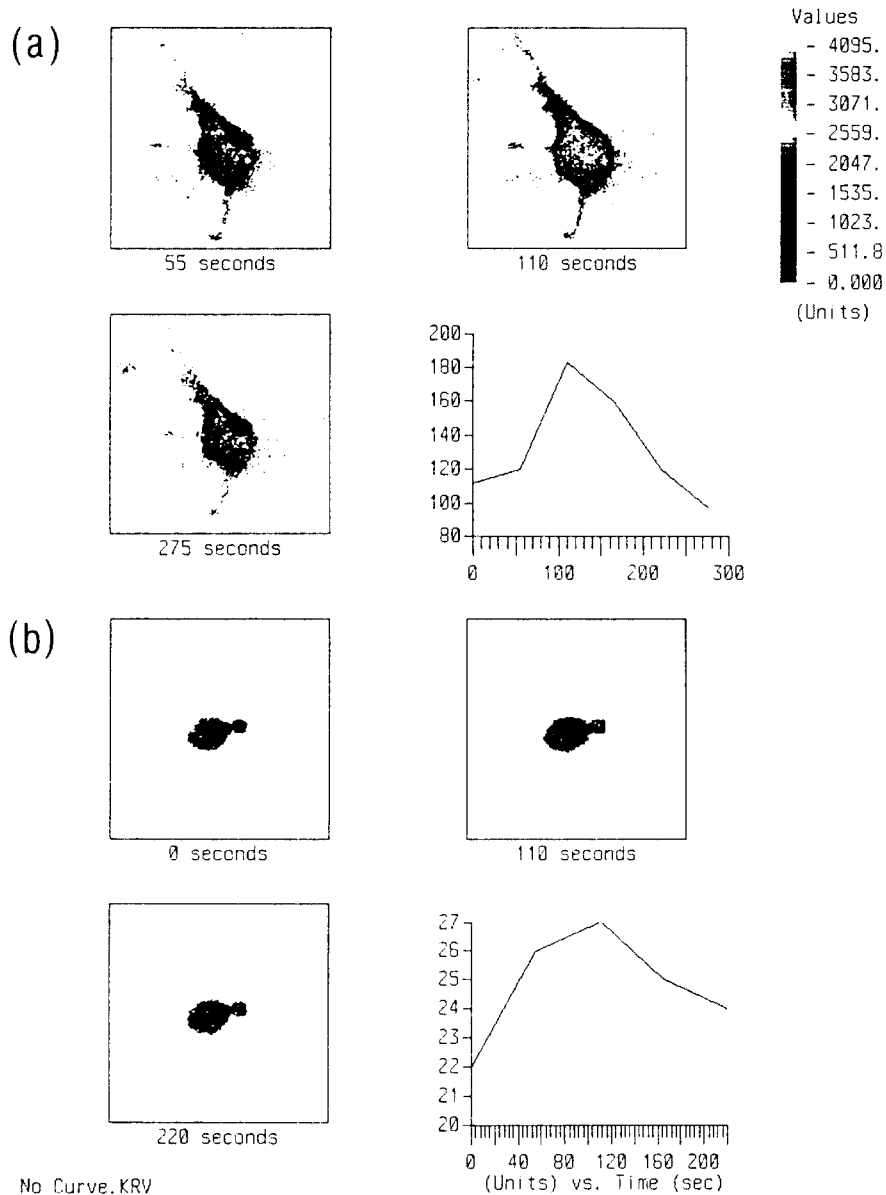


Figure 3. The PMA-induced changes in the releasing rate of intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in fibroblasts untreated(a) and treated(b) with cadmium. Cell attached to the 35 mm dish were incubated with Ca^{2+} , Mg^{2+} free-PBS(CMF-PBS) containing fluo-3 for 1 hr., and washed with fresh CMF-PBS at 0 time, and then the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured with ACAS-570. At 20 sec., 100 nM of PMA was added and continued to scanning.

고 찰

본 연구는 카드뮴이 세포소기관에 미치는 독성을 조사하기 위하여 세포독성 검정법으로 널리 사용되고 있는 용해소체의 NR uptake 능력과, MTT 분석법에 의한 사립체의 succinic dehydro-

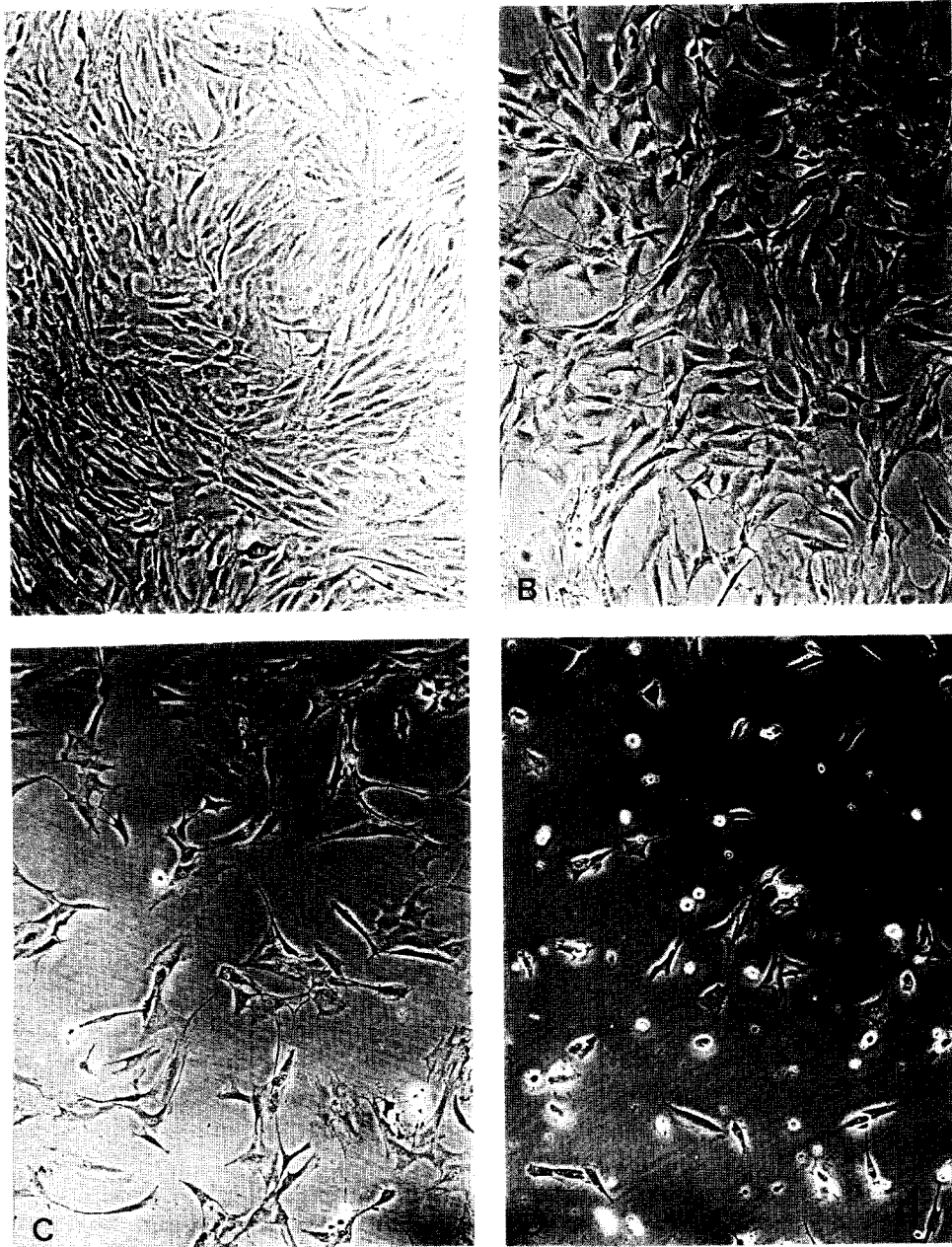


Figure 4. An inverted photomicrograph of rat fibroblast in control medium(A), cultured for 24 hour in the medium containing 10 μM (B), 50 μM (C), and 100 μM (D) of cadmium. These show the dose-dependent decrease in cell number and in cell size. X 400

genase활성도를 측정하였다. Colorimetric assay인 NR, MTT분석법은 각종 화학물질의 세포 독성을 일차적으로 검정하는데 이용되는 방법으로 형태적인 변화를 위상차현미경으로 관찰할 수 있고, 분광광도계를 이용하여 정량적으로 세포독성을 비교할 수 있는 편리한 방법이며, 최근 미국 국립 암연구소(National Cancer Institute)에서도 항암제 등 독성물질의 검정을 위한 방법

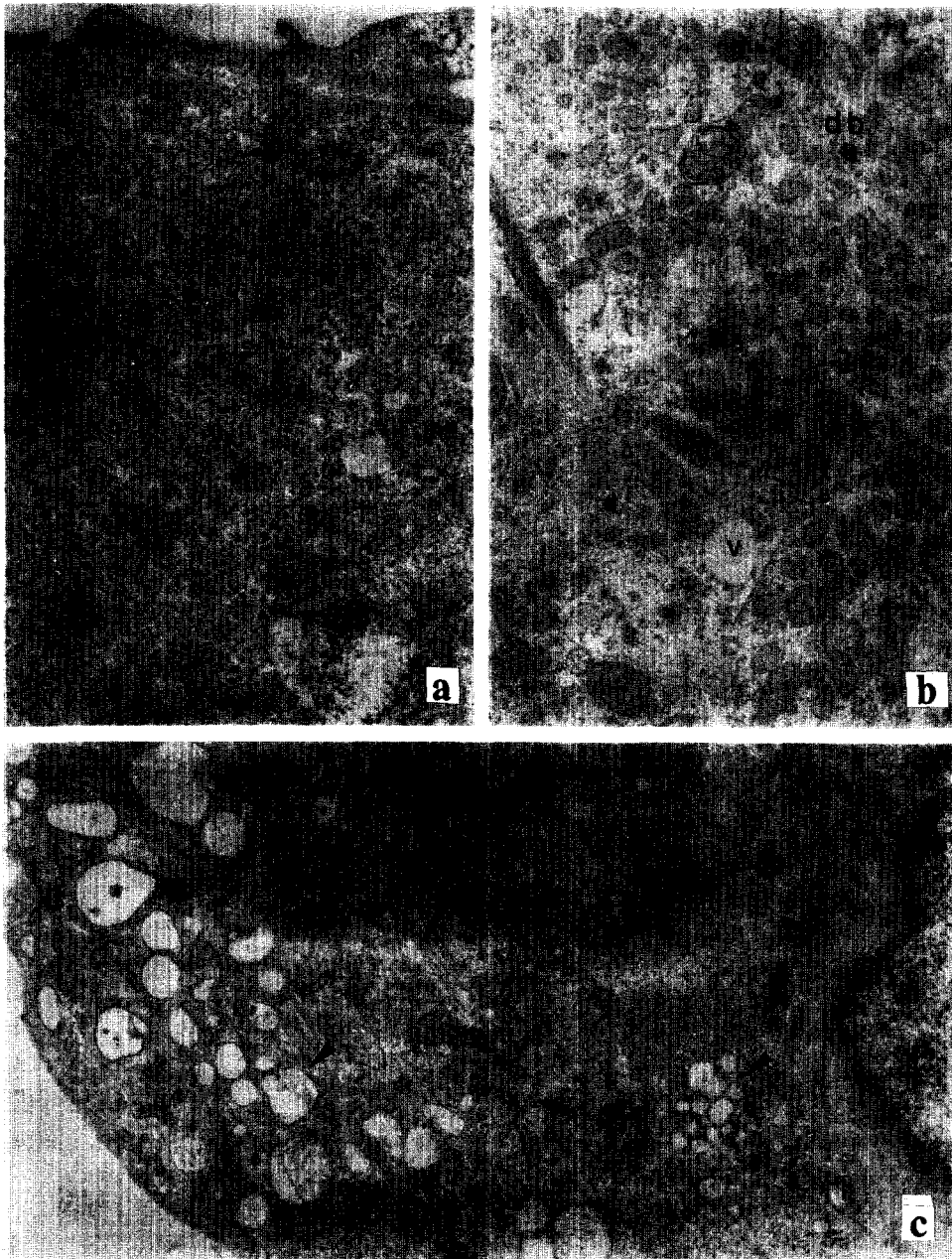


Figure 5a. An electron micrograph of rat fibroblasts cultured in the control medium for 24 hour. It shows mitochondria(m),rough endoplasmic reticulum(rER) and free ribosomes(r). X 10.000

Figure 5b. An electron micrograph of cultured rat fibroblasts in the medium containing 10 μ M of cadmium. It shows dilated endoplasmic reticulum(arrow head), few vacuoles(v) and dense bodies(db). X 10.000

Figure 5c. An electron micrograph of cultured rat fibroblasts in the medium containing 50 μ M of cadmium. It shows many vacuoles(arrow heads) in cytoplasm. X 10,000

으로 제안한 바 있다(Carmichael 등, 1987). Borenfreund 등(1988)은 NR과 MTT의 흡광도를 대조군과 비교하여 ICV(세포가 경미하게 영향을 받기 시작하는 농도; NR₉₀, MTT₉₀)와, MCV(심한독성을 받는 농도; NR₅₀, MTT₅₀)를 결정한 후, NR₅₀, MTT₅₀농도로 고독성(NR₅₀, MTT₅₀ < 100 μ M), 중간독성(100 μ M < NR₅₀, MTT₅₀ < 1000 μ M) 저독성(1000 μ M < NR₅₀, MTT₅₀ < 2000 μ M), 무독성(NR₅₀, MTT₅₀ > 2500 μ M) 등 독성물질의 독성 판정기준을 제시하였다. 본 실험에서 NR₉₀과 MTT₉₀의 농도는 각각 0.2 μ M과 1.0 μ M로, NR₅₀과 MTT₅₀의 농도는 각각 21.5 μ M과 60.0 μ M로 나타났으며 특히 NR₅₀농도범위는 최민규와 김정중(1990)이 생쥐의 섬유모세포를 이용한 실험에서 상대증식도 50%의 수준과 Borenfreund와 Babichi(1987)가 BALB/c 3T3 cell에서 제시한 NR₅₀의 농도와 일치하였다. 그러나 이것은 몇 가지 알코올이 mouse, hamster, human cell line에 미치는 영향에 관한 연구에서 HTD(Highest tolerated dose)는 cell line에 따라 현저한 차이를 보인다는 Babich와 Borenfreund(1987)의 보고와 실험실내에서 배양조건에 적응이 된 cell line과 primary culture한 세포들은 외적 환경변화에 대한 반응이나 세포간 상호작용에 많은 차이가 있을 수 있다는 Taub(1990)의 보고와는 차이가 있었는데 이는 카드뮴과 같은 중금속은 세포내에 역치 이상의 농도가 축적되었을 때 그 효과가 나타나는 등 중금속의 특성때문으로 사료된다. 한편 카드뮴은 NR₅₀과 MTT₅₀의 값은 100 μ M이하이므로 Borenfreund와 Babich(1987)의 독성판정기준에 따르면 매우 고독성인 것으로 사료된다.

배양액내로 유출된 LDH의 양은 카드뮴을 처리한 섬유모세포에서 대조군에 비하여 증가하였는데 이는 Takahashi 등(1987)이 심근세포에서 adriamycin을 처리한 결과와 일치하였다. 이것은 Shell(1973)에 의하면 세포막의 손상시 세포내 LDH가 막을 통하여 세포밖으로 유출된다고 하였다. 그러므로 배양액내의 LDH의 활성도 측정은 세포의 손상정도를 판정하는 기준이 된다고 하였으며 이는 손상을 받은 골격근이나 간세포를 비롯하여 백서의 심근 및 내피세포에서도 LDH의 활성이 매우 증가되는 것으로 보고되어 있는데 본 실험에서도 LDH활성이 높게 나타난 것은 카드뮴이 세포막에 손상을 줌으로써 그 결과 세포내 LDH가 배양액내로 유출되었을 것으로 생각된다.

총단백질량은 Takahashi 등(1987)과 김재민 등(1990)이 심근세포와 섬유모세포에 항암제를 처리한 실험결과와 동일하게 나타나서 세포소기관에 미치는 약제의 농도와 일치하게 감소하였으며, NR₉₀농도에서 89%, NR₅₀농도에서 55%로 나타나서 NR정량에 의한 세포독성검정 결과와 일치하였다.

Chemical carcinogen process는 DNA molecule과 carcinogen사이의 상호작용에 의해 carcinogen으로 활성화 되거나 혹은 정상유전자가 변형되어 시작되는 것으로 알려지고 있으며(Diaz-Barriga 등, 1989; Koizumi와 Waalkes, 1990), 그 중 카드뮴이 human carcinogen으로 취급되는 이유도 DNA분자에 카드뮴이 붙기 때문이다(Waalkes와 Poirier, 1984). 그러나 최근 Koizumi와 Waalkes(1989)는 세포의 각 기관에 카드뮴이 축적되는 양상을 조사한 연구에서, 카드뮴은 세포질에 48%, 그리고 핵에는 52%가 축적되는데 핵내의 52%중 85%이상이 chromatin에 축적되며 DNA에 부착되는 카드뮴은 4%에 불과한 것으로 보고하여, carcinogen으로서 카드뮴의 작용은 미약한 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 카드뮴이 DNA합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 DNA복제나 회복기전을 연구하는데 많이 활용되어지고 있는 DNA 합성률을 측정(Friedberg, 1985; 김종숙 등, 1989)한 결과, NR₉₀과 MTT₉₀농도 수준에서 DNA합성률은 대조군 수준 혹은 그 이상으로, NR₅₀과 MTT₅₀농도에서 각각 65%와 60%로 카드뮴이 DNA합성률에 미치는 효과가 NR과 MTT의 흡광도에 미치는 효과보다 적은 것으로 나타났다. 이 결과는 지금까지 연구되어진 5-Fluorouracil(5-FU), mitomycin C(MMC) 등의 항암제와 6가 크롬 등의 중금속이 DNA나 RNA같은 유전물질에 강한 독성효과를 미치는 결과와 대조적인 양상을 보이고 있다. 즉 5-FU, mitomycin C와 6가 크롬 등이 DNA합성률에 미치는 농도는 NR과 MTT흡광도에 미치는 농도보다 10³배와 10배이상 낮은 반면, 카드뮴은 DNA합성률 90%와 50%에 미치는 농도가 용

해소체나 사립체에 영향을 미치지 않는 NR_{90} 과 MTT_{90} 의 농도뿐만 아니라, NR_{50} 과, MTT_{50} 농도보다도 모두 높게 나타났다. 이는 세포소기관에 미치는 영향보다 DNA합성률에 미치는 영향이 더 적은 것을 의미한다. DNA에 대한 손상은 DNA의 절제회복률을 조사함으로써 알아볼 수 있는데 그 조사방법으로는 비주기성 DNA 합성량의 측정법이 널리 사용되고 있다(Regan 등, 1971). 본 연구에 있어서 $0.1 \mu M$ 부터 $10 \mu M$ 까지 다양한 농도의 카드뮴을 처리한 실험군에서는 비주기성 DNA의 합성량은 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았으나 가장 고농도인 $50 \mu M$ 의 처리군에 있어서 74%로 감소되었다. 이는 카드뮴의 농도가 NR_{25} 정도의 수준이었고, 이로 인해 세포의 수에 있어서 감소가 있었기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 결과는 약제의 종류에 따라 세포소기관에 미치는 독성표적에 차이가 있기때문으로 사료되는데, 5-FU, Mitomycin C 그리고 6가 크롬 등은 세포소기관에 영향을 주는 농도보다 현저하게 낮은 농도에서 이미 DNA, RNA 등에 영향을 미치는 등 세포소기관에 영향을 주기 이전의 농도에서 유전물질에 강한 독성을 미치는 반면, 카드뮴은 세포소기관과 유전물질에 동시에 영향을 미치거나 오히려, 세포소기관에 더 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

염색체에 대한 영향을 분석할 수 있는 방법으로는 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange, SCE)분석법이 널리 채택되고 있는데 자매염색분체 교환은 복제하는 DNA가 염색분체의 같은 좌위에서 교환이 일어나는 것으로 염색체의 형태적인 변화를 초래하지는 않지만 많은 돌연변이원과 발암원들에 의해 유발되므로(Mazirimas와 Stetka, 1978; Ishii와 Bender, 1980) 그 발생빈도의 증가는 돌연변이 또는 암의 발생가능성을 시사할 수 있다. 자매염색분체 교환 발생의 생물학적 중요성이나 정확한 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 DNA에 손상을 주는 약제의 거의 대부분은 자매염색분체 교환의 발생을 유의하게 증가시키는 것으로 알려지고 있다(Lambert 등, 1986). 본 연구에서도 배양섬유모세포에 NR분석결과 얻어진 NR_{90} 부터 NR_{50} 의 농도수준인 $0.1 \mu M$ 부터 $10 \mu M$ 까지 다양한 농도의 카드뮴을 처리하여 자매염색분체 교환의 발생빈도를 조사하였으나 카드뮴의 농도 증가시에도 자매염색분체 교환의 발생이 유의하게 증가하지 않는 것으로 보아 카드뮴은 배양세포의 자매염색분체 교환에는 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

카드뮴은 itai-itai질환을 일으키는 맹독성물질로써 카드뮴에 심하게 노출된 사람에서 신장 독성을 나타낼 뿐만 아니라 이 경우, 뇨중에 많은 칼슘을 분비케 한다고 한다(Nomiyama, 1980). 칼슘은 정상세포에서 세포의 분열이나 분화에 관여하고 있는데 세포내 유리 칼슘량의 변화는 세포간 연결이나 성장에 영향을 줌은 물론이고 protein kinase C(PKC)와 phosphokinase 등과 같은 여러 효소활성에도 변화를 초래한다고 한다. 이처럼 세포내의 조절인자으로써 중요한 칼슘은 카드뮴을 비롯하여 독성이 강한 중금속들에 의하여 세포내 농도변화가 초래되는데 이중 Ca-binding protein인 calmodulin의 활성을 높여 세포내 칼슘농도에 변화를 일으킴으로써 세포대사에 막대한 영향을 준다고 보고된 바 있다(Cheung, 1984). 본 실험에서 카드뮴을 처리한 군에서 PMA로 자극한 후 세포내 유리되는 칼슘반응이 대조군에 비하여 현저하게 감소 되었는데 이는 아마도 카드뮴의 독성이 세포내의 칼슘변화와 연관된 효소들에 영향을 주어 이들의 활성이 변화되었을 가능성이 큰 것으로 생각된다. 그러나 이의 자세한 규명을 위하여서는 이에 수반된 생화학적 측면에서의 분석이 함께 병행되어야 할 것으로 생각된다.

광학현미경적 관찰에서 처리된 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 세포의 형태는 섬유모세포의 특징인 방추형의 모양이 점차 소실되면서 타원형 또는 원형으로 위축되는 양상을 보였으나 이는 카드뮴의 영향에 의한 세포의 특이적 형태변화인지는 알 수 없었고 또한 농도에 비례하여 세포수가 감소하여 세포를 사멸시키는 것으로 생각된다. 전자현미경적 관찰결과 $10 \mu M$ 농도에서 조면내형질망의 조가 확장되기 시작하여, $50 \mu M$ 농도에서는 조가 더욱 확장되고 다수의 공포와 소수의 농소체 출현, 세포질의 전자밀도 감소 등 심한 변화양상을 보였으나, 유리리보솜, myofibril 등 다른 세포소기관들에서는 $10 \mu M$ 농도와 $50 \mu M$ 농도에서 모두 특징적인 변화가 관

찰되지 않았는데, 이러한 형태학적인 변화들은 최민규와 김정중(1990) 및 정연태 등(1992)의 보고와 일치하는 소견이었다. 이와같은 결과는 카드뮴이 조면내형질망의 형태적인 변화를 초래하여 기능적인 변화가 오고, 이로인하여 세포가 사멸되는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 카드뮴이 섬유모세포에 미치는 영향은 DNA 등 유전물질보다 세포소기관에 더욱 심한 독성효과를 미치며, 특히 조면내형질망의 변성으로 인하여 단백질 합성이 억제되어 세포대사활성에 치명적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

결 론

카드뮴이 백서의 섬유모세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 colorimetric assay인 neutral red(NR)와 tetrazolium MTT분석, lactate dehydrogenase(LDH)활성 및 총단백질량 측정, DNA합성률과 비주기성 DNA합성(unscheduled DNA synthesis, UDS)량의 측정, 자매염색분체 교환빈도(the frequency of sister chromatid exchange, SCE)조사 및 세포내 유리되는 칼슘량 측정 그리고 광학및 전자현미경에 의한 형태학적 관찰을 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

NR 및 MTT의 흡수능은 처리된 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 감소를 보였으며 NR₉₀과 NR₅₀ 및 MTT₉₀과 MTT₅₀의 값은 각각 0.2 μ M과 21.5 μ M 및 1.0 μ M과 60.0 μ M이었다.

LDH의 활성은 카드뮴 농도 10 μ M과 50 μ M에서 대조군(100%)에 비하여 139%와 282%로 모두 증가하였고, 총단백질량은 카드뮴의 농도에 비례하여 감소하였다.

DNA합성률은 처리된 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 감소를 보였으며, 7.0 μ M과 60.0 μ M에서 각각 대조군의 90%와 50%로 나타났다. 카드뮴이 DNA합성률에 미치는 농도는 용해소체나 사립체에 미치는 NR₅₀과 MTT₅₀농도보다 높은 농도로 나타났다.

UDS와 SCE는 카드뮴의 처리농도 증가시에도 유의한 증가를 보이지 않았으며 세포내 유리되는 칼슘량은 MTT₉₀에서 대조군에 비하여 매우 감소 하였다.

광학현미경적 관찰에서 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 세포의 수가 감소하였고 세포의 모양이 원형으로 변화하였다.

전자현미경적 관찰결과 50 μ M 농도에서 세포내의 조면내형질망의 조가 확장되고, 농소체가 출현하였으며, 다수의 공포가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 카드뮴은 DNA합성률에 영향을 미치는 농도보다 더 낮은 농도에서 용해소체와 사립체에 세포 독성효과를 나타냄으로써 카드뮴의 세포독성효과는 유전 물질보다 세포소기관에 더 민감한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Babichi, H. and Borenfreund, E. (1987): Structure activity relationship (SAR) models established *in vitro* with the neutral red cytotoxicity assay. *Toxicol. In Vitro*, **1**, 3-9.
- Beattie, J.H., Marion, M. and Denizau, F. (1987): The modulation by metallothionein of cadmium-induced cytotoxicity in primary hepatocyte cultures. *Toxicology*, **44**, 329-339.
- Borenfreund, E. and Babichi, H. (1987): *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neural cells and fibroblasts. *Cell Biol. Toxicol.*, **3**, 63-73.
- Borenfreund, E., Babichi, H. and Matin-Alcuacil, N. (1988): Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and Tetrazolium MTT tests. *Toxicol. In Vitro*, **2**, 1-6.

- Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1984): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Meth.*, **9**, 7-9.
- Carmichael J.W., Degraff W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B. (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-942.
- Cheung W.Y. (1984): Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity. *Federation Proceedings*, **43**, 2995-2999.
- Diaz-Barriga, F., Carrizales, L., Yanez, L., Hernandez, J.M., Dominguez, M.C., Palmer, E. and Saborio, J.L. (1989): Interaction of cadmium with actin microfilaments *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, **3**, 277-284.
- Ferm, V.H. and Carpenter, S. (1967): Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature*, **1116**, 11-23.
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F. and Kjellstrom, T. (1974): Cadmium in the Environment. *CAC Press, Cleveland*
- Friberg, L. and Kjellstrom, T. (1981): Cadmium: In Disorder of Mineral Metabolism. *Academic Press, New York*, 318-334.
- Friedberg, E.C. (1985): DNA damage: In DNA repair. *Freemann, New York*, 1-78.
- Gale, T.F. and Bunch, J.D. (1979): The effect of the time of administration of chromium trioxide on the embryotoxic response in hamsters. *Teratology*, **19**, 81-86.
- Greener, Y. and Kochen J.A. (1983): Methylmercury toxicity in the chick embryo. *Teratology*, **28**, 23-28.
- Hagino, N. and Yoshioka, K. (1961): A study on the etiology of so called "Itai-Itai" disease. *J. Japan Orthop. Assoc.*, **20**, 812-814.
- Ishii, Y. and Bender, M.A. (1980): Effect of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in chinese hamster cells. *Mut. Res.*, **79**, 19-32.
- Jin, T. and Nordberg, G.F. (1983): Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, **58**, 137-143.
- Koizumi, T. and Waalkes, M.P. (1989): Interaction of cadmium with rat testicular interstitial cell nuclei: Alterations induced by zinc pretreatment and cadmium binding proteins. *Toxicol. In Vitro*, **3**, 215-220.
- Koizumi, T. and Waalkes, M.P. (1990): Effects of zinc on the binding cadmium to DNA: Assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNA. *Toxicol. In Vitro*, **4**, 51-55.
- Kunimoto, M. and Miura, T. (1988): Translocation of cadmium from cytosol to membrane fraction in cadmium loaded red blood cells of rats. *Toxicol. In Vitro*, **2**.
- Lambert, B., Chu, E.H.Y., Carli, L.D., Erling, U.H., Evans, H.J., Hayaski, M., Thilly, W.G. and Vainio, H. (1986): Assays for genetic changes in mammalian cells. In long-term and short-term assays for carcinogens: A critical appraisal. IARC Scient, Lyon, 167-243.
- Layton, W.M. Jr. and Layton M.W. (1979): Cadmium induced limb defects in mice: Strain associated differences in sensitivity. *Teratology*, **19**, 229-236.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-375.

- Mazirimas, J.A. and Stetka, D.G. (1978): Direct evidence for the role of incorporated BUdR in the induction of sister chromatid exchanges. *Exp. Cell Res.*, **117**, 23-30.
- Moses, R.L. and Claycomb, W.C. (1982): Ultrastructure of terminally differentiated adult rat cardiac muscle cells in culture. *Am. J. Anat.*, **164**, 113-131.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- Nomiyama, K. (1980): Recent progress and perspectives in cadmium health effects studies. *Sci. Total Environ.*, **14**, 199-232.
- Nomiyama, K. (1987): The chronic toxicity of cadmium; influence of environment and other variables. In *handbook of Experimental Pharmacology*. (Springer-Verlag, Berlin) 101-103.
- Nordberg, G.F. (1972): Cadmium metabolism and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, **2**, 121-130.
- Regan, J.D., Setlow, R.B. and Ley, R.D. (1971): Normal defective repair of damaged DNA in human cells : a sensitive assay utilizing the photolysis of bromodeoxyuridine. *Pro. Natl. Aca. Sci., U.S.A.*, **68**, 708-712.
- Samarowickrama, G.P. (1979): Biological effects of cadmium in mammals. In *Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*. Webb, M(Ed.) 341-421.
- Shell, W.E. (1973): Early estimation of myocardial damage in conscious dogs and patients with evolving acute myocardial infarction. *Clin. Invest.*, **52**, 2579-2584.
- Takahashi, K., Fujita, Y., Mayumi, T., Hama, T. and Kishi, T. (1987): Effect of adriamycin cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 326-334.
- Taub, M. (1990): The use of defined media in cell and tissue culture. *Toxicol. In Vitro*, **3**, 213-225.
- Waalkes, M.P. and Poirier, L.A. (1984): *In vitro* cadmium-DNA interactions: Cooperativity of binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **75**, 539-546.
- Wade, M.H. (1990): Detecting calcium response in cultured cells using the visible wavelength calcium probe, Fluo-3. *Application Note Number E-2*.
- Yamane, Y. (1981): Toxicology aspects of environmental pollutants. *Faculty of Pharmaceutical Sciences. Chiba University*, 1-7.
- 김재민, 김기원, 정연태 (1990): Cytosine arabinoside와 Vinblastine이 백서의 배양 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구. *한국독성학회지*, **6**, 29-40.
- 김종숙, 이천복, 이형호, 박상대 (1989): Chinese hamster ovary 세포에 있어서 N-methyl-N-nitrosoguanidine에 의한 DNA 복제억제와 이의 회복경로. *Environ. Mut. Carcinogens*, **2**, 63-72.
- 정연태, 박승택, 최민규, 김정중, 김재민, 최봉규, 한두석, 우원홍, 위인선 (1992): 몇 가지 중금속(Cr, Hg 및 Cd)이 배양섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구. *한국독성학회지*, **8**, 119-129.
- 최민규, 김정중(1990): 카드뮴, 구리, 수은 및 크롬이 생쥐 섬유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구. *원광의과학*, **6**, 77-91.