

실험실 내에서 배양된 편평상피암 세포주에 대한 염화불소의 효과*

계명대학교 의과대학 치과학교실

박 노 부

THE EFFECTS OF SODIUM FLUORIDE ON SQUAMOUS CELL CARCINOMA CELL LINE CULTURED IN VITRO

No Boo Park, D.D.S.

Department of Dentistry, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

The effects of Sodium Fluoride on squamous cell carcinoma cell line(SCC-cells) cultured in vitro have been studied with respect to cytotoxicity and induction of chromosome aberrations.

Cytotoxicity of NaF on SCC-cells, as determined by a decrease in colony-forming ability, linearly increased with dose of NaF(150-300 ug/ml) or exposure time (3-24h).

SCC-cells treated with 30-60ug/ml NaF for 24h were analyzed for chromosome aberrations. A significant increase in the frequency of chromosome aberration at the chromatid level was induced by NaF in a dose-dependent manner.

These results suggest that NaF is a toxic substance which inhibit cell proliferation and causes DNA damage in SCC-cells cultured in Vitro.

Key-words : Sodium Fluoride, Cytotoxicity, Chromosome aberration.

I. 서 론

불소는 지구상에 광범위하게 존재하는 원소로서, 1940년대에 불소의 치아우식예방효과가 처음으로 알려진 이후로 불소의 치아우식예방 효과는 비교적 명확히 규명되어, 상수도(음료수)불소화, 불소액양치, 불소치약, 불소보조제 복용, 불소국소도포등의 다양한 적용법의 개발과 함께 치아우식예방을 위한 효과적인 구

강보건 수단으로 그 사용이 현저히 증가하고 있다¹⁾. 일반적으로 치아우식예방을 위하여 상수도와 음료수에 첨가되는 염화불소는 안전한 것으로 알려져 있으며, 역학조사에서도 상수도불소화와 암사망률(cancer mortality)은 상관관계가 없는 것으로 보고되었다²⁾. 그러나 불소는 실험실 내에서 배양된 세포의 성장을 억제하는 독성작용이 있으며, 단백질 합성과 DNA 합성을 억제하는 세포유전학적 효과가

* 본 연구는 1995년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음.

있다고 알려져 있으며³⁻⁵⁾, in Vitro와 in Vivo에서 포유류세포(mammalian cell)에 대한 불소의 세포유전학적 효과(cytogenetic effect)는 아직까지 명확히 규명되지 않고 있다. Jachimczak와 Skotarczak⁶⁾는 배양된 인간의 백혈구에서 염화불소가 염색체이상을 유도한다고 하였으나, Obe와 Slacik-Erben⁷⁾은 염색체이상이 유도되지 않는다고 하는 서로 상반된 연구결과들이 보고되어져 왔다.

불소의 세포유전학적 효과에 대해서는 일반적으로 세가지의 서로 다른 견해들이 있는데 첫째, 불소는 유전물질에 대한 독성(genotoxic) 효과가 없다⁸⁻¹⁴⁾. 둘째, 불소는 변이유도물질(mutagen agent)이고 DNA 및 염색체(chromosome) 손상을 야기하는 세포유전학적 효과(cytogenetic effect)를 가지고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 셋째, 불소는 이미 알려진 변이유도물질(mutagens)과 함께 상승 혹은 길항효과를 가진다⁷⁾. 이와 같이 불소의 세포유전학적 효과에 대한 상반된 견해들은 불소의 사용증가와 함께 불소의 안정성과 부작용에 대한 객관적인 재평가의 필요성이 제기되었다.

이에 저자는 실험실에서 배양된 편평상피암 세포주에 염화불소를 처리하여 세포독성을 측정하고 염색체이상(chromosome aberration) 검사를 통하여 불소의 세포유전학적 효과를 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양 및 재료

92년 5월 20일 본원 피부과에서 생검으로 얻은 하순의 편평상피암조직을 이용하여 조직 배양법으로 본대학 해부학교실에서 확립한 편평상피암 세포주를 항생제(Gibco사, 미국)와 10% 우혈청이 함유된 F-10 배양액으로 10% 습도, 5% CO₂ 공기 혼합배양기에서 배양하여 각 실험에 사용하였다. 배양액은 F-10 배양액(Gibco사, 미국)을 사용하였고, 그외 fetal calf serum(Gibco사, 미국, 이하 FCS로 표기), trypsin등을 사용하였다. 염화불소(Chemical co. Tokyo)는 1 FCS를 함유한 배양액에 용해하여

사용직전에 막여과법으로 소독하였다.

2. 세포독성(Cytotoxicity)검사

NaF의 독성은 군집형성 능력(colony forming ability)으로 결정하였다. 200-500 세포를 60 mm 세포 배양접시에 접종하여, overnight 배양 후 0, 150, 300µg/ml NaF를 3, 6, 24 시간동안 처리한 후 새배양액으로 2회 세척하고 8일 동안 배양하여 군집형성을 유도하였다. 100% methanol로 고정하고 5% Giemsa 염색액에 5분간 염색하여 군집수를 계산하였다. NaF로 처리한 군집수를 처리하지 않은 수로 나누어 세포 생존율을 100분율로 나타내었다. 대조군 세포의 plating efficiency 는 27-36%였다.

3. 염색체이상(Chromosome aberrations) 검사

5×10⁵cell 을 75 sq cm 배양용기에 접종하고, overnight 배양후 0, 30, 60µg/ml의 NaF를 첨가하여 24시간동안 배양하였다. 마지막 3시간전에 colcemid(0.2µg/ml, Gibco사)를 첨가하여, 중기염색체(metaphase chromosome) 표본을 준비하였다. 0.25% trypsin용액으로 처리 후 세포를 모아 0.9% sodium citrate 저장액으로 370C에 30분간 둔 후, Carnoys용액(Methanol;acetic acid, 3:1)으로 고정하여 5% Gimsa 염색액으로 10분간 염색하여 30-35개의 중기염색체를 무작위로 관찰하여 분석하였다.

III. 결 과

1. 염화불소의 독성(cytotoxicity) 검사

실험실에서 배양된 편평상피암 세포주에 염화불소를 처리하면 세포성장을 억제하여 독성을 가진다는 결과를 얻었다(Table 1). 염화불소를 3시간 처리한 군에서는 염화불소의 세포성장 억제효과가 미약하였으나 6시간, 12시간 처리 군에서는 염화불소의 농도와 처리시간에 비례하여 상대적인 세포생존율이 현저히 감소하였고 300 ug/ml 농도의 염화불소를 24시간 처리한 군에서는 세포성장이 완전히 억제되어 거의

Table 1. Relative cell survival by treatment of cells with sodium fluoride

Dose of NaF (ug/ml)	Treatment period(h)	No. of colonies scored	% of survival*
0	3	98	100
150	3	88	89.8
300	3	77	78.6
0	6	108	100
150	6	79	73.1
300	6	55	50.9
0	24	114	100
150	24	66	57.9
300	24	8	7.0

* $\frac{\text{No. of colonies in the treated plates}}{\text{No. of colonies in the untreated plates}} \times 100$

Table 2. Chromosome aberrations of squamous carcinoma cell line induced by Sodium Fluoride

Dose of NaF (ug/ml)	Treatment period(h)	No. of colonies scored	Type of aberrations			aberrant metaphase(%)
			gap	break	Triradial	
0	24	35	0	0	0	0
30	24	35	4	6	2	31.4
60	24	30	5	8	3	53.3

모든 세포가 죽었다.

2. 염색체이상(chromosome aberration) 검사

염화불소에 의한 염색체이상을 연구하기 위하여 30, 60 µg/ml 농도의 염화불소를 24시간 처리하여 분석한 결과 대조군에서는 염색체 이상이 발견되지 않았으나 30µg/ml 농도에서는 4개의 gaps, 6개의 breaks, 2개의 triradials이 발견되어 31.4%의 염색체이상 빈도를 보였으며, 60µg/ml 농도에서는 5개의 gaps, 8개의 breaks, 3개의 triradials이 나타나 53.3%의 발현빈도를 보여 30µg/ml 농도에서보다 1.7배 정도의 현저한 증가를 보였다(Table 2).

염색체 이상은 염화불소의 농도가 증가할수록 발현빈도가 높게 나타났으며, 염색체이상의 형태는 chromatid break와 gap이 혼하게 나타났고 triradial도 다소 관찰되었다(Fig. 1, 2).

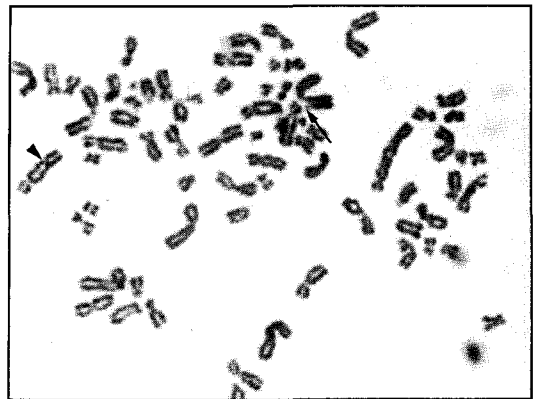


Fig. 1. One example of breaks and gap from SCC-cells induced by sodium fluoride in 60ug/ml dose.

Arrows indicate chromosome occurring gap(◄) and breaks(◄).



Fig. 2. One example of triradial from SCC-cells induced by sodium fluoride in 30 ug/ml dose. Arrows indicate chromosome occurring triradial.

IV. 고 찰

실험실 내에서 배양된 세포와 생체에 불소가 독성을 가지고 있으나, 세포의 종류(type)와 실험방법 및 유기체(organism)에 따라 감수성(sensitivity)의 차이를 보인다는 것은 잘 알려져 있다^{4, 18)}. 불소에 의한 세포의 성장억제작용은 확립된 여러 세포주(cell lines)에서 연구되어 실험실 내에서 배양된 세포의 성장을 억제하는 최소의 불소 농도가 0.1mM(4.2 μ g/ml)¹⁹⁾에서 1.3mM(54.6 μ g/ml)⁴⁾ 이라고 보고되고 있다. Carlson등³⁾은 불소에 의한 세포의 성장억제는 변형된 세포 크기나 세포부착(cell attachment)의 감소와 같은 물리적 결함(physical defect)보다는 대사작용의 결함(metabolic defect)과 관련이 있다고 하였으며, Holland⁵⁾은 실험실 내에서 배양된 LS 세포주에서 불소는 단백질 및 DNA 합성을 억제하는데 DNA합성 억제작용이 단백질합성 억제작용보다 다소 낮고 지연되었는데, 이는 DNA합성 억제는 감소된 단백질합성의 결과이고 불소의 세포독성작용에 대한 primary target은 단백질합성 억제작용이라고 제시하였다. 불소의 세포독성효과는 단백질 합성 억제효과와 밀접한 관련성이 있으며

단백질합성 억제작용이 가장 민감(sensitive)하고 가장 초기에 영향을 받는 매개변수로²⁰⁾ 불소의 세포독성효과의 작용기전일 것이라고 하였다^{5, 21, 22)}.

본 실험에서 편평상피암 세포주에 대한 염화불소의 세포독성은 농도와 처리시간에 비례하여 증가하였다. 300 μ g/ml 농도의 염화불소를 24시간 처리한 세포는 성장이 완전히 억제되어 SCC세포주에 매우 강한 독성을 나타내었다. 300 μ g/ml 농도의 염화불소를 6시간 처리한 실험군과 150 μ g/ml 농도를 24시간 처리한 실험군에서 세포의 생존율은 유사하였는데, 이는 세포독성 검사에서 농도와 불소에 노출되는 시간이 매우 중요한 요소임을 나타낸다. 상수도불소화가 시행되는 지역에 생활하는 사람은 매우 적은 농도이지만 일생동안 불소에 노출되므로 노출시간을 보다 중요한 요소로 고려하여야할 것으로 생각된다.

염색체상의 이상은 alkylating agent인 BudR이나 다른 변이유도물질(mutagen)등을 이용한 자매염색분체교환(SCE) 검사와 염색체 이상 검사등을 통해서 알 수 있다. Tsutsui등¹⁶⁾은 염화불소를 24시간 처리한 SHE세포주에서 염색체이상 빈도와 자매염색분체교환 빈도가 양(dose)에 비례하여 증가하였고 UDS(unscheduled DNA synthesis)가 일어나므로 DNA손상을 야기할 수 있다고 하였다. 또한 짧은 시간(4 혹은 8시간) 처리한 세포주에서는 UDS가 일어나지 않고 12시간 이상 처리한 세포주에서는 UDS가 일어나므로 짧은 시간 처리로는 DNA손상이 매우 미약하거나 또는 불소에 의한 단백질합성 억제가 DNA손상 후 DNA재생 과정을 지연시킨다는 2가지 가능성을 제시하였다. Emsley등²³⁾은 핵산(nucleic acid)과 불소의 상호작용 연구에서 불소이온은 DNA duplex에서 thymine-adenine link를 완전히 파괴할 수 있다는 것을 제시하여 불소가 DNA손상을 야기할 수 있다고 하였다. 그러나 Li등²⁴⁾은 CHO와 CHBM 세포주에서 불소가 세포의 주기진행(cell cycle progression)은 억제하나 자매염색분체교환 빈도에는 영향을 미치지 않는다고 하였다.

본 실험의 염색체이상 검사에서 염화불소의 농도가 증가할수록 염색체이상 발현빈도가 현저히 높게 나타나므로 편평상피암 세포주에서 염화불소는 DNA 손상을 야기할 수 있다고 생각된다. 선학들의 연구에서 세포성장을 억제하는 최소의 불소농도 범주인 30 μ g/ml(0.71 mM) 농도에서 31.4%의 염색체이상 빈도를 보이므로 편평상피암 세포주에서는 세포성장 억제와 염색체 이상이 거의 같은 농도에서 일어난다는 것을 보여준다. 그러나 염화불소가 염색체이상을 유도하는 작용기전은 아직까지 알려지지 않고 있으며, 급성 혹은 만성독성을 야기하는 불소의 양도 명확히 알려지지 않았다.

염화불소의 유전물질에 대한 독성이 in vitro 실험에서는 많은 연구에서 양성으로 밝혀졌으나 in vivo 실험에서는 음성으로 나타났다. HeLa 세포주와 L세포주에서 불소의 세포내농도는 세포의 농도의 30-40%였으나²⁵⁾, 다양한 농도의 불소를 투여한 동물의 혈액내에서는 불소의 농도가 일정하게 유지되었는데²⁶⁾, 이는 생체내에 소변을 통한 빠른 배설등의 농도를 조절하는 기능이 있으므로²⁷⁾ 이러한 화학물질의 독성을 감소시킬 수 있는 것으로 생각된다.

인간에서 어떤 화학물질의 세포유전학적 효과는 매우 복잡한 생물학적 작용(biological action)이 관여하므로 한 두가지의 분석으로 불소의 유전물질에 대한 독성효과를 규정하는 것은 적절하지 못하며 여러가지 다른 실험과 다양한 분석법을 통하여 불소의 세포유전학적 효과에 대한 연구가 계속 이루어져야할 것으로 생각되며 또한 인간은 불소에 대부분 만성적으로 노출되므로 실험실내에서의 연구결과를 바탕으로 만성적인 불소의 사용으로 인한 생체내에서의 불소의 독성 및 유전학적 효과를 규명하는 노력이 추구되어야할 것이다.

V. 요약

불소의 유전물질에 대한 독성효과는 현재까지 논란의 대상이되고 있으며, 서로 상반된 연구 결과들이 보고되고 있다. 저자는 불소의 세포유전학적 효과를 규명하고자 실험실 내에서

배양된 편평상피암 세포주에 염화불소를 처리하여 세포독성 검사와 염색체이상 검사를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 염화불소의 농도와 처리시간에 비례하여 세포성장이 현저히 감소하므로 염화불소는 편평상피암 세포주에 독성을 가진다.
2. 염화불소의 농도가 증가할수록 염색체이상 발현빈도가 현저히 높게 나타나므로 염화불소는 편평상피암 세포주에서 DNA 손상을 야기할 수 있다. 염색체이상의 형태는 chromatid break가 가장 많이 나타났다.

참고문헌

1. Horowitz, S.H. : A review of systemic and topical fluorides for the prevention of dental caries. Community Dent. Oral Epidemiol., 1 : 104-114, 1973.
2. Kinlen, L. and Doll, R. : Fluoridation of water supplies and cancer mortality III : A re-examination of mortality in cities in the USA. J.Epidemiol. Community Health, 35 : 239-244, 1981.
3. Carlson, J.R. and Suttie, J.W. : Effects of sodium fluoride on HeLa cells. I. Growth sensitivity and adaptation. Exp. cell Res., 45 : 415-422, 1967.
4. Hongslo, J.K., Holland, R.I. and Jonsen, J. : Effect of sodium fluoride on LS cells. J. Dent. Res., 53 : 410-413, 1974.
5. Holland, R.I. : Fluoride inhibition of protein and DNA synthesis in cells in vitro. Acta pharmacol. et toxicol., 45 : 96-101, 1979a.
6. Jachimczak, D. and Skotarczak, B. : The effect of fluoride and lead ions on the chromosome of human leukocytes in Vitro. Genet.Pol., 19 : 353-357, 1978.
7. Obe, G. and Slacik-Erben, R. : Suppressive activity by fluoride on the induction of chromosome aberrations in human cells

- with alkylating agents in vitro. *Mutation Res.*, 19 : 369–371, 1973.
8. Kram, D., Schneider, E.L., Singer, L. and Martin, G.R. : The effects of high and low fluoride diets on the frequencies of sister chromatid exchanges. *Mutation Res.*, 57 : 51–55, 1978.
 9. Martin, G.R., Brown, K.S., Matheson, D.W., Lebowitz, H., Singer, L. and Ophang, L. : Lack of cytogenetic effects in mice or mutations in *Salmonella* receiving sodium fluoride. *Mutation Res.*, 66 : 159–167, 1979.
 10. Thomson, E.J., Kilanowski, F.M. and Perry, P.E. : The effect of fluoride on chromosome aberration and sister chromatid exchange frequencies in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.*, 144 : 89–92, 1985.
 11. Li, Y., Dunipace, A. and Stookey, G.K. : Absence of mutagenic and antimutagenic activities of fluoride in Ames *Salmonella* assays. *Mutation Res.*, 190 : 229–236, 1987a.
 12. Li, Y., Dunipace, A. and Stookey, G.K. : Effects of fluoride on the mouse sperm morphology test. *J.Dent. Res.*, 66 : 1509–1511, 1987b.
 13. Li, Y., Dunipace, A. and Stookey, G.K. : Mutagenic and antimutagenic activities of fluoride in Ames *Salmonella* assays. *J. Dent. Res.*, 66 : 342(abstract No. 1882), 1987c.
 14. Li, Y., Dunipace, A. and Stookey, G.K. : Cytogenetic effects of fluoride in mouse sperm morphology test. *J. Dent. Res.*, 66 : 342(abstract No. 1883), 1987d.
 15. Mohammed, A.H. : Cytogenetic effects of hydrogen fluoride treatment in tomato plants. *J.Air Pollution Control Assoc.*, 18 : 395–398, 1968.
 16. Tsutsui, T., Suzuki, N. and Ohmori, M. : Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells. *Cancer Res.*, 44 : 938–941, 1984a.
 17. Tsutsui, T., Suzuki, N., Ohmori, M. and Maizumi, H. : Cytotoxicity, chromosome aberrations and unscheduled DNA synthesis in cultured human diploid fibroblasts induced by sodium fluoride. *Mutation Res.*, 139 : 193–198, 1984b.
 18. Shearer, T.R. : Comparative metabolic responses of rat kidney and liver to acute doses of fluoride. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146 : 209–212, 1974.
 19. Le Coulre-Mulder, G.W.A.E., Veldhuizen, C., Bouman, J. and Wise, M.E. : Influence of the fluorine ion on the growth in vitro of human amnion cells. T-(kidney) cells and HeLa cells. *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.*, 15 : 1–19, 1969.
 20. Hongslo, J.K. and Holland, R.I. : Effect of sodium fluoride on protein and DNA synthesis, ornithine decarboxylase activity and polyamine content in LS cells. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 44 : 350–353, 1979.
 21. Mankovitz, I.R., Kisilevsky, R. and Florian, M. : Chinese hamster cell lines resistant to the cytotoxic action of fluoride. *Can. J. Genet. Cytol.*, 20 : 71–84, 1978.
 22. Holland, R.I. : Fluoride inhibition of DNA synthesis in isolated nuclei from cultured cells. *Acta pharmacol. et toxicol.*, 45 : 302–305, 1979b.
 23. Emsley, J., Jone, D.J. and Overill, R.E. : The uracil-fluoride interaction : Ab initio calculations including solvation. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 476–478, 1982.
 24. Li, Y., Heerema, N., Dunipace, A. and Stookey, G.K. : Genotoxic effects of fluoride

- evaluated by sister-chromatid exchange. *Mutation Res.*, 192 : 191–201, 1987.
25. Drescher, M. and Suttie, J.W. : Intracellular fluoride in cultured mammalian cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139 : 228–230, 1972.
26. Singer, L. and Armstrong, W.D. : Regulation of plasma fluoride in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117 : 686–689, 1964.
27. Volker, J.F., Sognnaes, R.F. and Bibby, B.G. : Studies on the distribution of radioactive fluoride in the bones and teeth of experimental animals. *Am. J. Physiol.*, 132 : 707–712, 11 1941.