

## 크롬에 의해 유발된 백서 임파구 DNA-Protein Crosslinks의 복구

이훈재 · 이관희 · 홍윤철

인하대학교 의과대학 예방의학교실

= Abstract =

### Repair of Chromate induced DNA-Protein Crosslinks in Rat Lymphocyte

Hun Jae Lee, Kwan Hee Lee, Yun Chul Hong

*Inha University Medical College, Department of Preventive Medicine*

Genotoxic agents can induce various DNA lesions. DNA-Protein Crosslinks(DPCs) were known as the important DNA lesions which could impair gene expression because DPCs had a high probability of resisting repair and persisting through cell cycle. This repair resistance of DPCs could have biological significance but had not been evaluated clearly yet. Most of the studies that have evaluated the repair of DPCs only compared the extent of DPCs repair with other DNA lesions.

We injected  $K_2CrO_4$ , a genotoxic agent, into Sprague-Dawley rats intraperitoneally( $5mg/kg$ ) and isolated blood lymphocytes 12 hours later. These lymphocytes were cultured in the mitogen added growth media and mitogen free media separately. The degree of the repair of DPCs was monitored for 4 days by the K-SDS assay.

4 days later, the amount of DPCs decreased by 4.6% in the mitogen added media but increased by 10.9% in the mitogen free media. These results showed that DPCs induced by  $K_2CrO_4$  were not repaired easily and the DPCs were biologically significant DNA lesions. We thought the decrease of DPCs in the mitogen added media was not due to the repair of DPCs, but from the increase of normal cell proliferation. Therefore, it is very important to consider the proliferation of normal cells when estimating the repair of DPCs.

---

Key words: DNA-Protein Crosslinks, Repair,  $K_2CrO_4$ , Lymphocyte

## I. 서론

6가 크롬화합물은 많은 역학연구(Langard와 Norseth, 1975; Royle, 1975; Dalager 등, 1980)에서 발암성이 있음이 보고되었고 실험연구를 통해서 발암성(Hueper, 1958; Frust 등, 1976; Tsuda와 Kato, 1977)과 돌연변이 원성(Petrilli와 De Flora, 1978; Newbold 등, 1979; Tindall과 Hsie, 1980)이 증명된 유전독성 물질이다.

역학연구 및 실험연구를 종합해 보면 크롬화합물의 유전독성은 화합물의 수용성과 크롬의 원자가에 의해 결정된다고 할 수 있다(Leonard 등, 1980). 비수용성 화합물은 주로 세포의 탐식작용에 의해 섭취되므로(Patierno 등, 1988) 6가와 3가 크롬화합물간에 세포 내로 유입되는 정도가 큰 차이를 보이지 않으나 수용성 화합물의 경우는 6가 크롬만이 비특이적 음이온 통로를 통해 세포 내로 유입이 되어 수용성 6가와 3가 크롬 화합물간에는 세포독성 및 유전독성이 큰 차이가 나타난다(Standeven 등, 1989).

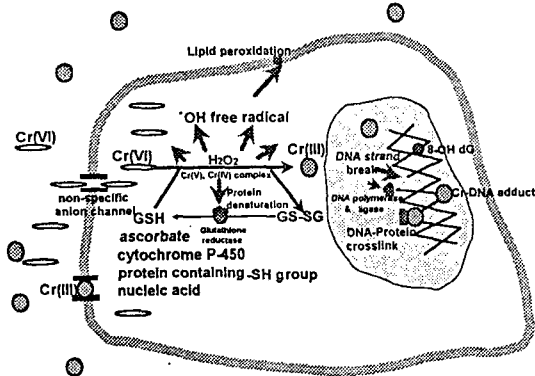


Figure 1. Uptake and reduction model about genotoxicity of the soluble chromium compounds.

수용성 크롬화합물의 독성학적 기전은 uptake and reduction model(Fig 1.)로 비교적 명확히 설명되고 있다(Paola 등, 1987). 음이온 통로를 통해 세포 내로 유입된

6가 크롬은 cytochrome P-450 reductase(Gruber 등, 1978; Cupo와 Wetterhahn, 1985), glutathione(Paola 등, 1987), ascorbate(Standeven 등, 1992) 등의 작용에 의해 3가 크롬으로 전환이 되고 이 과정 중에 hydroxyl free radical 이 방출된다. hydroxyl free radical은 DNA strand breaks 와 8-hydroxydeoxyguanosines 등의 DNA손상을 유발하게 되고(Aiyar 등, 1991), 3가 크롬은 DNA와 직접 결합을 하여 Cr-DNA adducts(Wolf 등, 1989)와 DNA-protein crosslinks(DPCs) 등을 형성하며(Salnikow 등, 1992; Hamilton과 Wetterhahn, 1985; Cupo와 Wetterhahn, 1985) DNA의 복제 및 복구에 관계되는 효소의 활성을 변화시켜 유전독성을 나타내게 된다(Snow, 1991).

크롬화합물에 의해 유발되는 다양한 DNA 손상이 갖는 개개의 생물학적 의의는 아직 명확하지 않다. 그러나 DPCs의 경우 다른 것에 비해 그 손상부위가 광범위하고 복구에 저항하는 특성이 있어 유전정보의 손실을 초래할 가능성이 높으며(Oleinick 등, 1987; Sugiyama 등, 1986a, b; Tsapakos 등, 1983) 유전독성 물질에 의해 유발되어 누적된 DNA 손상을 평가하기 위한 biomarker로 유용하게 활용될 수 있다는 점에서 의미가 있다고 할 수 있다(Popp 등, 1991).

DPCs와 관련된 지금까지의 연구는 주로 유전독성 물질에 의한 DPCs의 형성 정도와 기전, 발암성과 DPCs와의 관련성, biomarker로써 DPCs의 활용가능성을 규명하려는 차원에서 진행되었다. 최근까지의 연구에서 DPCs의 형성 정도는 대부분이 Kohn 등(1976)이 개발한 alkaline elution technique에 의해 정성으로 분석되어 왔다. 그러나 이 방법은 방사성 동위원소를 이용하여야 하고 단일 검체를 분석하는 데에도 긴 시간이 소요되며 DPCs의 형성 정도를 대조 세포와의 elution rate를 비교하여 간접평가할 수밖에 없다는 단점을 갖고 있다. 그리하여 DPCs가 biomarker로써 유용성이 있을 가능성이 있었음에도 불구하고 실제 유전독성 물질에 폭로되는 인구집단에 적용을 하는 데에는 방법상의 한계가 있었다. 그러나 Zhitkovich와 Costa (1992)에 의해 제시된 K-SDS assay는 기존의 alkaline

elution technique에서 나타나는 단점을 보완하여 세포 및 동물실험시 다양한 조건하에서 DPCs의 형성과 복구정도를 정량적으로 측정할 수 있게 하였으며 특정 인구집단에 대한 screening tool로 적용하여 DPCs의 monitoring이 가능하게 하였다(Toniolo 등, 1993).

DPCs의 의미와 관련하여 가장 중요하다고 할 수 있는 복구에 관련된 실험적 연구에서는 대부분 폭로 후 24시간 내외의 단시간에 걸친 DPCs의 복구정도만을 평가하는데 그쳤고(Sugiyama 등, 1986; Tsapakos 등, 1983), 표적세포로 선택한 세포가 관찰기간 동안 증식하므로 세포 회색효과(Hamilton과 Wetterhahn, 1985)가 나타나 복구에 의한 감소를 정확하게 파악하기는 어려웠다. Cupo와 Wetterhahn(1984)은 DPCs의 생물학적 의미를 명확하게 하기 위하여는 장시간에 걸쳐 DPCs의 복구양상을 파악해야 할 필요가 있음을 지적하였고, Hamilton과 Wetterhahn(1985)은 크롬화합물에 폭로된 혈액세포에 생긴 DNA손상이 시간경과에 따라 감소되는 정도는 세포의 증식으로 인한 회색효과와 일치한다고 보고하였다. 홍운철과 이훈재(1996)의 연구에서도 benzo[a]pyrene에 의해 BALB/3T3 섬유아세포에서 형성된 DPCs가 시간이 지나며 다소 감소되었지만 정상세포의 증식을 고려하면 복구가 거의 일어나지 않은 것으로 나타났다. 이는 여러 형태의 DNA 손상 중에서 DPCs가 유전독성의 발현과 관련성이 매우 높음을 의미하고 있다. DPCs의 복구양상을 명확히 규명하기 위해서는 비교적 장시간 동안의 복구를 관찰하여야 하고 이 과정에서 세포의 증식을 보정하여 복구정도를 평가해야 한다는 점에서 지금까지의 연구들은 많은 한계를 갖고 있다.

기존연구의 한계점을 보완하고 DPCs의 복구과정 및 정도를 명확하게 평가하기 위한 실험조건으로는 첫째, 대조군에 비해 DPCs의 형성정도가 크며 세포 내의 복구기전은 손상시키지 않는 폭로용량을 선택해야 하고 둘째, 이미 변이가 일어난 세포주보다는 실제 폭로 시 표적세포가 되며 생리적 상태를 유지하는 생체 내의 세포를 이용해야 하고 셋째, 증식이 잘되는 세포는 DPCs의 복구 정도를 관찰하는 기간중 세포증식으로

인한 DPCs의 회색효과가 나타나 복구된 양을 실제 복구된 정도보다 높게 평가할 수 있으므로 세포 내의 항상성은 유지되 관찰기간 동안 증식을 통제할 수 있어 복구 정도의 정확한 정량화가 가능하여야 한다.

본 연구에서는 유전독성물질인  $K_2CrO_4$ 를 Sprague-Dawley rats에 투여하여 혈액의 lymphocyte 내에 형성된 DPCs를 정량하고, 분리해 낸 lymphocyte를 mitogen이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지하에서 배양시켜 시간경과에 따른 DPCs의 변화를 K-SDS assay로 분석하여 DPCs의 복구양상을 규명하고자 하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 재료 및 실험동물

실험동물은 인하대학교 의과대학 동물사육실로부터 분양받은 암컷 Sprague-Dawley rat를 이용하였다. 실험당시의 주령은 생후 10주였고 무게는 평균 195g(185~210g)이었다. 기본배양액인 RPMI 1640과 우태아 혈청은 Gibco사로부터 구입하였고 배양 용기로는 Costar사의 24 well plate를 사용하였다.  $K_2CrO_4$ 는 Aldrich사에서, Histopaque<sup>®</sup> 1077, phytohemagglutinin (PHA-M), trypan blue dye, Hoechst 33258과 기타 시약은 모두 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. $K_2CrO_4$ 에 의한 세포독성 및 DPCs의 형성

#### 1) 생체투여 및 lymphocyte의 분리

$K_2CrO_4$ 는 투여 직전에 생리 식염수에 용해시킨 후 syringe filter(0.22 $\mu$ m, Corning사)를 이용해 멸균처리를 하였다. 5, 10, 20mg/kg의 용량을 0.5ml의 용액으로 만들어 각 처리군당 5마리씩 복강 내 주입을 하였다. 대조군에는 0.5ml의 생리 식염수만을 주입하였다. 12시간 후 헤파린처리를 한 10ml 주사기로 심천자를 하여 6ml 씩 채혈하였다. 원심분리관에 Histopaque<sup>®</sup> 1077용액 3ml를 넣은 후 채혈된 혈액 3ml를 조심스럽게 얹어 실

온에서 30분간 원심분리(300G)를 하여 buffy coat를 얻었다. 이 층을 인산염 완충액에 부유시킨 후 다시 10분간 원심분리(250G)하여 lymphocyte pellet을 얻었다.

## 2) 세포독성 검사 및 DPCs의 측정

lymphocyte부유액과 trypan blue dye를 1:1로 혼합하여 5분간 정치시킨 후 hemocytometer로 전체 세포수와 생존한 세포수를 계수하였다. DPCs의 형성 정도는 K-SDS assay에 의해 정량화하였다. 이 방법의 원리를 간단히 기술하면 다음과 같다.  $2 \times 10^6$ 개 썩의 세포를 2% SDS를 함유하는 세포용해 용액과 반응시킨다. 음이온 세정제인 SDS는 세포를 용해시키며 단백질과 이온결합을 형성하게 된다. 이 상태의 용해된 세포 용액을  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동시킨 후 다시 녹여 강하게 진탕시키면 DNA가 다양한 크기로 절단된다. 여기에  $\text{K}^+$  이온을 첨가하면  $\text{K}^+$  - SDS - 단백질 복합체가 형성이 되어 침전하게 된다. 이때 단백질과 비정상적으로 공유결합이 되어 있는 DNA fragment는 침전물에 포함되고 정상 DNA fragment는 상층액에 남게 된다. 상층액은 전체 DNA양을 측정하기 위해 따로 보관한다. 침전된 DPCs pellet은 부유시킨 상태에서 3ml 주사기로 5회씩 pipetting을 하여 ice chilling(5분)하고 다시  $65^\circ\text{C}$ 로 가온(10분)한다. 이 과정을 3회 반복하면 DPCs pellet 내의 DNA fragment는 일정한 크기로 mechanical shearing이 된다. DPCs pellet을 0.2mg/ml의 proteinase K가 포함된 용액에 부유시켜  $50^\circ\text{C}$ 하에서 3시간 반응을 시키면 단백질이 용해되며 DNA fragment가 상층액으로 떠오르게 된다. 이 상층액과 앞에서 전체 DNA양을 측정하기 위해 모아둔 용액을 Hoechst 33258(200ng/ml)과 반응시킨다. Hoechst 33258은 DNA와 특이적으로 결합을 하여 형광특성이 변화하게 된다. calf thymus DNA(Sigma사)를 형광기준치를 설정하는데 이용하였고, DNA fluorometer(Hoefer Scientific Instruments, Model TKO 100  $\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=450\text{nm}$ )로 형광을 측정함으로써 DNA양을 정량하였다.

## 3. DPCs의 복구

### 1) $\text{K}_2\text{CrO}_4$ 의 투여 및 lymphocyte의 분리

DPCs의 형성과 세포독성 실험결과를 근거로  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ 의 투여 농도를 결정하였다. 대조군보다는 높은 정도의 DPCs를 형성하며 trypan blue dye exclusion test상 세포의 생존율이 대조군에 비해 차이가 없는 농도인 5mg/kg를 선택하였다. 10마리의 암컷 Sprague-Dawley rat에 복강 내 주입을 하고 12시간 후에 혈액 내의 lymphocyte를 분리해 내었다.

### 2) 시간경과에 따른 DPCs의 복구정도 및 세포증식 양상

분리한 lymphocyte는 세포수를 계수한 후 mitogen의 첨가 유무에 따른 배양조건을 위해 이분하였다. mitogen 첨가군의 경우 배양액에 첨가한 PHA-M의 농도는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. lymphocyte의 분리직후에 DPCs의 양을 측정하여 기준으로 잡고 배양 1일, 2일, 3일 및 4일 후에 DPCs와 세포수의 변화를 측정하였다.

## 4. 통계처리

농도차와 시간경과에 따른 세포독성 및 DPCs의 차이는 ANOVA와 Scheffe's test로써 검정하였으며, 사용한 프로그램은 SAS(ver. 6.11)였다.

## III. 연구결과

### 1. lymphocyte에 대한 $\text{K}_2\text{CrO}_4$ 의 세포독성 효과

0, 5, 10, 20mg/kg의 용량으로 복강 내 투여를 하였으나 최고농도인 20mg/kg의 경우 12시간 이전에 rat가 모두 죽어 lymphocyte의 분리가 불가능하였다. trypan blue dye exclusion test에 의해 측정된 lymphocyte의 생존율은 대조군에서는 98.7%, 5mg/kg와 10mg/kg로 투여한 경우는 각각 97.8%와 96.2%로 나타나 용량-반응 관계를 보였다(Table 1.). 10mg/kg로 투여한 경우의 생존율은 대조군에 비해 현저하게 낮았다( $p < 0.05$ , Scheffe's test).

**Table 1.** Cytotoxicity and DPCs formation in lymphocytes of rats exposed to various concentrations of  $K_2CrO_4$

dose (mg/kg)	Cell viability <sup>a</sup> : % of viable cells	DPCs <sup>b</sup> : % of crosslinked DNA	DPCs coefficient
0	98.7±1.2	3.4±0.7	1.00
5	97.8±1.7	4.0±1.1	1.18
10	96.2±1.5 *	3.8±0.8	1.12
20	ND	ND	ND
F-value	4.42	0.73	-
p-value	0.03	0.50	-

a, b : The data were analyzed by ANOVA.

Values are mean±SD(N=6, each).

\* : p<0.05, compared with control by Scheffe's test. ND, can not be measured because all rats were expired.

## 2. $K_2CrO_4$ 에 의한 DPCs 형성

대조군에서는 lymphocyte 내의 전체 DNA 중 3.4%가 단백질과 공유결합이 된 것으로 나타났다. 5mg/kg과 10mg/kg으로 투여한 경우는 각각 4.0%와 3.8%로 대조군에 비해 증가되었으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 폭로군에서의 DPCs의 형성을 대조군에서의 형성 정도와 비교하여 나타내는 지표인 DPCs 형성계수를

다음의 공식에 의해 산출하였다.

$$\text{DPCs 형성계수} = \frac{\% \text{ of crosslinked DNA in exposed cells}}{\% \text{ of crosslinked DNA in control cells}}$$

5mg/kg 투여한 경우의 DPCs 형성계수는 1.18로 10mg/kg로 투여했을 때의 1.12보다 높게 나타났다 (Table 1.).

## 3. DPCs의 복구 및 세포수의 변화

DPCs의 형성이 가장 높고 세포독성이 대조군에 비해 큰 차가 없는 용량인 5mg/kg을 투여한 후 시간경과에 따른 DPCs의 변화를 측정하였다. 분리한 lymphocyte를 mitogen(PHA-M)이 첨가된 배지에서 배양을 한 지 1, 2일이 지난 후에는 폭로 직후와 비교하여 각각 3.1%와 2.1%가 증가되었으며, 3, 4일 후에는 5.1%와 3.6%가 감소되었다. mitogen을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 경우는 폭로 직후와 비교하여 모두 높게 나타났다. DPCs의 시간 경과에 따른 변화는 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 2).

시간경과에 따른 세포수의 변화를 보면, mitogen이 첨가되지 않은 배지에서 배양한 경우 배양 1일 후에 3.4%가 증가하였으나 그후 계속 감소하였다. 2, 3, 4일 후의 감소량은 각각 6.1, 14.5, 21.9%였고 이는 통계적으로 유

**Table 2.** Cell growth and repair of DPCs induced by  $K_2CrO_4$  (5mg/kg).

time after exposure (days)	cell growth <sup>a</sup> (% of time 0)		DPCs <sup>b</sup> (% of time 0)	
	mitogen(+)	mitogen(-)	mitogen(+)	mitogen(-)
0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	106.9±9.7	103.4± 7.0	103.1±17.7	104.3±14.5
2	103.4±8.0	93.9± 5.4 **	102.1±25.2	100.6±17.6
3	100.6±7.8	85.5±13.1 **	94.9±26.7	107.1±23.0
4	93.8±9.3	78.1±11.6 **	96.4±24.0	110.9±23.4
F-value	2.76	14.7	0.38	0.74
p-value	0.051	0.008	0.81	0.57

a, b : The data were analyzed by repeated measures ANOVA.

Values are mean±SD(N=10, each).

\*\* : Significant difference compared with time(0), p<0.01

의한 감소였다( $p < 0.01$ ). 한편 mitogen이 첨가된 배지하에서 배양한 경우는 배양 4일 후에만 다소 감소된 것으로 나타났으나 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 2). 예상과는 달리 mitogen이 첨가된 배지하에서도 세포수의 변화가 크지 않아 배양 4일 후에 trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존율을 확인한 결과 91.2%정도로 배양당시에 비해 감소되어 있었다.

#### 4. 배양조건에 따른 DPCs 변화 양상의 차이

$K_2CrO_4$ 에 폭로된 lymphocyte는 생존율이 감소되어 mitogen의 세포증식 효과가 크게 나타나지는 않았다. mitogen을 첨가하여 배양한 조건에서의 결과를 mitogen을 첨가하지 않고 배양한 조건과 비교하면 시간이 경과됨에 따라 상대적으로 세포수가 증가되고 DPCs는 다소 감소되는 양상을 보이고 있다(Figure 2). 그러나 mitogen이 첨가되지 않은 배지하에서 배양한 경우에는 시간이 경과하여도 DPCs의 감소가 전혀 나타나지 않았다.

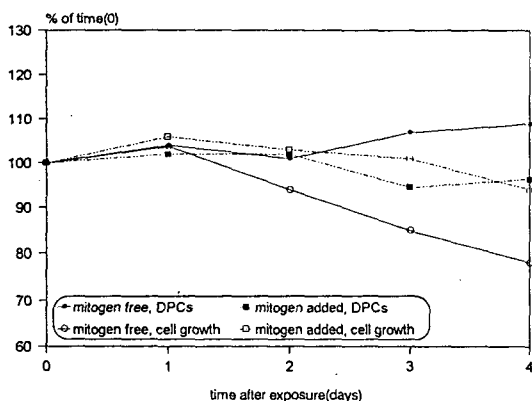


Figure 2. Comparison of DPCs repair and cell proliferation

## IV. 고찰

DNA 손상으로 인하여 발암억제유전자와 성장조절 유전자 등의 유전 정보가 소실 혹은 변형된다면 발암

현상의 초기 단계인 세포변이가 유발될 수 있다 (Zhitkovich 등, 1992). DPCs는 세포 내의 복구기전에 저항하며 장시간 지속되어 유전자의 복제 및 발현에 장애를 유발할 가능성이 높은 DNA 손상의 한 종류이므로 (Fornace 등, 1982; Taspakos 등, 1983; Sugiyama 등, 1986) 여러 유전독성 물질들은 DPCs의 형성능력에 따라 발암성을 나타낼 수 있을 것이다.

DPCs를 형성하는 유전독성 물질로 알려져 있는 것으로는 cyclophosphamide 등의 alkylating agent (Grunicke 등, 1973; Ewig 등, 1978; Erickson 등, 1980)와 formaldehyde (Cosma 등, 1988), 중금속 중 니켈 (Ciccarelli와 Wetterhahn 등, 1982; Costa 등, 1994)과 크롬 (Salnikow 등, 1992; Xu 등, 1994) 등이 있고 자외선과  $\gamma$ 선 (Chiu 등, 1984)과 같은 물리적 인자도 DPCs를 형성하는 것으로 확인되었다.

각각의 유전독성 물질의 DPCs 형성기전과 복구양상은 일정하지 않게 나타나고 있어 DPCs의 생물학적 의미도 유전독성 물질에 따라 차이가 있을 수 있다. 니켈은 세포 내에서 Ni(II)/Ni(III) redox cycling 과정을 통해 free radical을 방출하여 DPCs를 형성하는 것으로 추측되나 크롬의 경우는 3가 크롬이온이 DNA와 단백질간의 결합에 직접 참가하여 DNA-Cr<sup>3+</sup>-단백질 복합체를 형성하게 된다 (Lin 등, 1992). 크롬에 의한 DPCs를 정제하여 결합부위를 분석한 결과 단백질을 구성하는 아미노산 중 cysteine, tyrosine, histidine 등의 작용기 중 -SH, -OH기가 3가 크롬이온을 매개로 하여 nucleotide의 phosphate backbone에 결합되는 것으로 나타났다 (Salnikow 등, 1992).

DPCs의 복구는 그 중요성에 비해 아직 많은 연구가 이루어지지 않는 것이다. 연구방법상의 차이로 인하여 결과의 비교가 쉽지는 않으나 일반적으로 니켈과 크롬에 의해 형성된 DPCs는 복구가 거의 되지 않는 것으로 보고된 반면 (Ciccarelli와 Wetterhahn 등, 1982; Taspakos 등, 1983) formaldehyde가 유발한 DPCs는 비교적 쉽게 복구가 되는 것으로 나타났다 (Grafstrom 등, 1984). 발암물질인 크롬은 세포 내로의 유입과 대사과정, 이와 관련된 DNA 손상의 양상은 잘 알려져 있으나 어떤 종류의 DNA 손상이 발암성과 직접 관계

가 있는지는 확실치 않다. 저자 등은 크롬에 의해 유발된 DPCs가 크롬의 발암기전과 밀접한 관련이 있는 의미있는 DNA 손상일 것이라고 생각하고 있으며, 이는 DPCs가 시간경과에 따라 복구되지 않고 지속되어 유전자의 복제 및 발현에 이상을 초래함을 확인함으로써 증명될 수 있을 것이다. DPCs 복구양상을 기술한 기존의 연구들은 대부분 유전독성 물질의 DPCs형성 정도를 관찰하는 중 부수적으로 단시간에 걸친 DPCs의 변화 정도를 다른 DNA 손상의 변화와 비교하는데 그쳤으며 세포증식으로 인한 DPCs의 희석을 고려하지 않았다.

본 연구에서는 크롬에 의해 rat의 생체 내에서 형성된 DPCs가 비교적 장시간에 걸쳐 변화하는 양상을 세포증식을 조절하며 관찰하여 DPCs의 복구여부 및 정도를 규명하고자 하였다. 본 연구에서는 먼저 DPCs의 복구를 관찰하는데 적합한 투여용량을 선택하기 위해 서로 다른 세 용량(5, 10, 20mg/kg)을 투여한 후 세포독성과 DPCs의 형성 정도를 평가하였다. 생리 식염수를 동일한 양으로 주입한 대조군에서의 background DPCs 양(% of crosslinked DNA)은 전체 DNA의 3.4%로 나타나 Costa 등(1993)이 보고한 1.17%와는 다소 차이를 보이거나 K-SDS assay상에서 DNA를 mechanical shearing하는 정도에 따라 background 양은 달라질 수 있으므로 수치상의 비교는 큰 의미가 없다. DNA와 구조적, 화학적으로 밀접한 관계가 있는 nuclear protein(효소, histone 등)은 대부분 비공유결합을 통해 DNA에 작용하지만 topoisomerase와 nuclear matrix protein은 DNA와 공유결합을 형성함으로써 정상적으로 기능을 수행하며(Lin 등, 1983; Chen 등, 1991) 이러한 DNA와 단백질간의 정상적인 공유결합으로 인해 background DPCs가 검출된다. 유전독성 물질에 의해 유발되는 DPCs가 정상적인 background DPCs가 증가된 것인지 아니면 비정상적인 새로운 DPCs가 형성된 것인지를 밝히고자 여러 연구가 시도되었다. 크롬에 의해 형성된 DPCs를 면역학적 방법으로 분석한 결과 background DPCs에서는 검출이 안 되는 actin, lamin, P97 protein 등이 크롬의 표적 단백질로서 DNA에 결합된 것으로 나타났다(Wedrychowski

등, 1985, 1986a, b; Miller와 Costa, 1989, 1990).

본 연구에서 6가 크롬화합물인  $K_2CrO_4$ 를 투여한 후 측정된 DPCs 형성계수는 저용량인 5mg/kg에서 10mg/kg의 경우보다 다소 높게 나타났다. 이는 크롬화합물의 DPCs형성 능력을 평가한 다른 연구(Wedrychowski 등, 1986a; Cohen 등, 1990; Chen 등, 1991)에서 일정농도 이상에서는 DPCs형성이 증가하지 않거나 오히려 감소하게 나타난 것과 유사한 결과이다. 이와 같은 DPCs의 saturation현상에 대해 Wedrychowski (1986b)는 고농도의 크롬은 chromatin의 conformation을 변화시키고 그 결과 크롬이온이 결합부위로 접근하는 것이 방해됨으로써 DPCs 형성 효율이 저하된다고 설명하고 있다. DPCs는 세포독성이 나타나지 않는 저농도에서도 유발되기 시작하는 것으로 알려져 있고(Sugiyama, 1986a; Cosma 등, 1988) 이 연구에서는 장시간에 걸쳐 배양을 하며 DPCs의 변화를 관찰하고자 하였으므로 세포독성이 낮은 용량으로 DPCs를 유발하였다. trypan blue dye exclusion test로 평가한 세포독성은 용량-반응 효과를 보이며 증가하였으나 5mg/kg의 용량에서는 lymphocyte의 생존율이 97.8%로 대조군에 비해 유의한 차이를 보이지는 않았다. 이러한 결과에 근거하여 DPCs복구 관찰을 위한 투여용량으로 5mg/kg을 결정하였다.

기존에 DPCs의 복구양상을 보고한 연구에서는 대부분 사람과 설치류의 세포를 인위적으로 변이시킨 세포주를 이용하거나 동물에게 유전독성 물질을 주입한 후 일정한 시간 간격으로 분리해낸 조직세포를 이용하였다. 그러나 이와 같은 세포를 이용하는 것은 유전독성 물질에 의한 DNA 손상의 복구양상을 규명하는데 적합하지 않을 수 있다. Grafstrom 등(1984)은 human fibroblast strain인 CRL 1187 cell line을 이용한 실험에서 formaldehyde에 의해 유발된 DPCs가 24시간 이내에 거의 복구되었다고 보고하였다. 이는 formaldehyde에 의한 DPCs가 다른 물질에 의해 유발된 것과는 달리 복구기전에 매우 민감하게 제거되기 때문이었을 수도 있으나 이 세포 자체가 매우 빠르게 증식하는 특성이 있어 폭로 직후에 정상세포의 분율이

증가되어 나타나는 세포 회석효과가 DPCs의 복구에 상당히 반영되었을 가능성이 크다. Tsapakos 등(1983)은 크롬화합물을 rat에 투여한 후 약 40시간에 걸쳐서 신장세포 내에 생긴 DPCs의 변화를 관찰한 결과 다소 감소되기는 하나 다른 종류의 DNA 손상과는 달리 복구에 저항하며 지속되었다고 보고하였다. Hamilton과 Wetterhahn(1986)은 크롬화합물을 chick embryo에 투여한 다음 간세포에서의 DPCs 변화를 관찰한 결과 24시간 후에는 DPCs가 약 25% 정도 감소하였으나 이 기간중 정상세포가 약 20% 증식된 것을 고려하면 거의 복구되지 않았다고 해석을 한 바 있다.

본 연구에서 분리해낸 lymphocyte를 일반조건에서 배양하는 것 이외에 mitogen을 이용하여 인위적으로 증식을 시켜 DPCs의 변화를 관찰한 것은 세포의 증식이 DPCs의 복구 정도를 해석하는데 미치는 영향을 평가하기 위해서였다.

표 2와 그림 2에서 보듯이 mitogen을 첨가하지 않은 조건에서 배양한 경우에는 시간이 경과함에 따라 복구가 전혀 이루어지지 않았다. 반면에 mitogen을 첨가하여 배양한 경우에는 배양 3일 이후에 다소 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 이 경우에도 배양시작 당시와 비교해 DPCs의 유의한 감소를 보이지는 못했다. 배양 4일 후에 측정된 세포수를 배양시작 시점의 세포수와 비교했을 때 mitogen 첨가군의 경우는 전혀 차이가 없었으며, mitogen 비첨가군의 경우에도 불과 그 차는 13% 미만이었다. 이때 세포의 생존율은 91.2%로 배양 시작 당시에 비해서는 크게 감소되어 있었으며 mitogen을 첨가한 경우에도 모든 lymphocyte가 세포주처럼 활발히 증식되는 것은 아니므로 결과의 해석에는 별 무리가 없을 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 크롬에 의해 유발된 DPCs는 일반 배양조건하에서 거의 복구되지 못하는 것으로 나타났고 또 mitogen으로 인위적인 세포증식을 유발한 조건에서 다소 감소되는 경향을 보이고 있는 것은 실제 복구가 되었기 때문이 아니라 세포 회석효과가 반영되었기 때문인 것으로 해석된다.

대부분의 연구자가 궁극적으로 관심을 갖는 것은 유

전독성 물질이 인간에게 나타내는 현상이다. 대부분의 유전독성 물질은 세포 내에서 대사가 되며 독성을 나타내므로 실험 동물과 인간에게 나타나는 유전독성 물질의 돌연변이와 세포변이의 빈도와 양상은 크게 다를 수 있다(Biedermann과 Landolph, 1987). 그러므로 유전독성 물질의 작용기전과 DNA 손상 정도는 인간의 세포를 이용하여 평가한 후에야 그 결과를 유전독성 물질에 의한 인간의 건강장애를 예방하는데 의미있게 활용할 수 있을 것이다. 인간세포를 이용한 연구에는 많은 제약이 따르지만 lymphocyte는 수명이 비교적 긴 세포로서 체내에 유입되는 모든 유전독성 물질의 표적이 되어 누적폭로에 대한 생체의 반응을 평가하는데 유용하다는 점에서 활용도가 높다(Coogan 등, 1991a, b).

향후 인간의 lymphocyte를 이용해 여러 유전독성 물질에 의한 DPCs의 형성과 복구양상을 규명하기 위한 연구가 되어야 할 것이며 DPCs를 유전독성 물질에 폭로되는 특정 인구집단에 biomarker로 적용함으로써 유전독성 물질에 의한 DNA 손상을 monitoring할 수 있을 것이다.

## V. 결론

유전독성물질은 다양한 DNA 손상을 유발할 수 있다. 그 중 DPCs는 복구에 저항하며 지속되어 유전자의 발현에 장애를 초래할 가능성이 높은 DNA 손상으로 알려져 있다. 그러나 DPCs의 생물학적 의미와 관련하여 가장 중요한 복구정도를 평가한 대부분의 연구들에서는 DPCs와 다른 DNA 손상의 복구정도를 상대적으로 비교하는데 그치고 있어 DPCs의 복구양상은 아직 불분명하다. 본 연구에서는 DPCs를 형성하는 유전독성물질인  $K_2CrO_4$ 를 Sprague-Dawley rats에 복강 내 투여한 후(5mg/kg) lymphocyte를 분리하여 mitogen의 첨가유무로 구분하여 배양을 하며 DPCs의 복구정도를 K-SDS assay로 관찰하였다. 배양 4일 후 DPCs의 변화량을 살펴본 결과, mitogen을 첨가하여 배양을 한 경우에는 4.6% 정도가 감소하였으며, mitogen을 첨가하지 않은 군에서는 오히려 10.9% 정도가 증가하였다.



즉 K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>에 의해 유발된 DPCs는 거의 복구되지 않는 것으로 나타났으며 이는 DPCs가 생물학적으로 매우 중요한 DNA 손상임을 나타내고 있다. mitogen을 첨가하지 않은 군의 결과와 비교할 때 mitogen을 첨가하여 배양을 한 경우 다소 DPCs의 감소가 나타난 것은 DPCs의 복구에 의한 것이 아니라 정상세포가 증식이 되며 나타난 것으로 생각되며 따라서 DNA의 복구를 평가하는 과정에서는 반드시 정상세포의 증식을 고려하여야 함을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- 홍윤철, 이훈재. Benzo[a]pyrene 및 Benzo[a]pyrene metabolites에 의한 BALB/3T3 세포에서의 DNA-Protein Crosslinks 형성. *대한산업의학회지*. 1996;8(1):66-72
- Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. *Reaction of chromium(VI) with Glutathione or with hydrogen peroxide: Identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. Environ Health Perspec*. 1991;92:53-62
- Biedermann KA, Landolph JR. *Induction of anchorage independence in human diploid fibroblasts by carcinogenic metal salts. Cancer Research*. 1987;47:3815-3823
- Chen Y, Cohen MD, Snow ET, Costa M. *Alteration in restriction enzyme digestion patterns detects DNA-protein complexes induced by chromate. Carcinogenesis*. 1991;12:1575-1580
- Chiu SM, Sokany NM, Friedman LR, Oleinick NL. *Differential processing of ultraviolet or ionizing radiation-induced DNA-protein cross-links in chinese hamster cells. Int J Radiat Biol*. 1984;46:681-690
- Ciccarelli RB, Wetterhahn KE. *Nickel distribution and DNA lesions induced in rat tissues by the carcinogen nickel carbonate. Cancer Research*. 1982;42:3544-3549
- Cohen MD, Miller A, Xu LS, Snow ET, Costa M. *A blotting method for monitoring the formation of chemically induced DNA-protein complexes. Anal Biochem*. 1990;186:1-7
- Coogan TP, Squibb KS, Motz J, Kinney PL, Costa M. *Distribution of chromium within cells of the blood. Toxicol Appl Pharmacol*. 1991a;108:157-166
- Coogan TP, Motz J, Snyder CA, Squibb KS, Costa M. *Differential DNA-protein crosslinking in lymphocytes and liver following chronic drinking water exposure of rats to potassium chromate. Toxicol Appl Pharmacol*. 1991b;109:60-72
- Cosma GN, Jamasbi R, Marchok AC. *Growth inhibition and DNA damage induced by benzo[a]pyrene and formaldehyde in primary cultures of rat tracheal epithelial cells. Mutation Research*. 1988;161-168
- Costa M, Zhitkovich E, Taioli E, Toniolo P. *Preliminary report on a simple new assay for DNA-protein crosslinks as a biomarker of exposures experienced by welders. J Toxicol Environ Health*. 1993;40:217-222
- Costa M, Zhuang Z, Huang X, Cosentino S, Klein CB, Salnikow K. *Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. The Science of The Total Environment*. 1994;48:191-199
- Cupo DY, Wetterhahn KE. *Repair of chromate induced damage in chick embryo hepatocytes, Carcinogenesis*. 1984;5:1705-1708
- Cupo DY, Wetterhahn KE. *Modification of chromium(VI)-induced DNA damage by glutathione and cytochromes P-450 in chicken embryo hepatocytes. Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82:6755-6759
- Dalager NA, Mason TJ, Fraumeni JF, Hoover R, Payne WW. *Cancer mortality among workers exposed to zinc chromate paints. J Occup Med*. 1980;22:25-29
- Erickson LC, Ramonas LM, Zaharko DS, Kohn KW. *Cytotoxicity and DNA crosslinking activity of 4-sulfidocyclophosphamides in mouse leukemia cells in vitro. Cancer Research*. 1980;40:4216-4220
- Ewig RAG, Kohn KW. *DNA-protein crosslinking and DNA interstrand crosslinking by haloethylnitrosoureas in L1210 cells. Cancer Research*. 1978;38:3197-3203
- Fornace AJ. *Detection of DNA-strand breaks produced during the repair of damage by DNA-protein cross-linking agents. Cancer Research*. 1982;42:145-149
- Frust A, Schlauder M, Sasmore DP. *Tumorigenic activity of lead chromate. Cancer Res*. 1976; 36:1779-1783
- Grafstrom RC, Fornace A, Harris C C. *Repair of DNA damage caused by formaldehyde in human cells.*

- Cancer Research*. 1984;44:4323-4327
- Gruber JE, Jennette KW. *Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;82:700-706
- Grunicke H, Bock KW, Becher H, Gang V, Schnierda J, Puschendorf B. *Effect of alkylating antitumor agent on the binding of DNA to protein*. *Cancer Research*. 1973;33:1048-1053
- Hamilton JW, Wetterhahn KE. *Chromium(VI) induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells in vivo*. *Carcinogenesis*. 1985; 2085-2087
- Hueper WC. *Experimental studies in metal carcinogenesis; X. Carcinogenic effects of chromite ore roast deposited in muscle tissue and pleural cavity of rats* AMA. *Arch Industr Health*. 1958;284-291
- Kohn KW, Erickson LC, Ewig RAG, Friedman CA. *Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution*. *Biochemistry*. 1976;15:4629-4637
- Langard S, Norseth T. *A cohort study of bronchial carcinomas in workers producing chromate pigments*. *Br J Industr Med*. 1975;32:62-65
- Leonard A, Lauwerys RR. *Carcinogenicity and mutagenicity of chromium*. *Mutation Res*. 1980; 76:227-239
- Lin X, Zhuang Z, Costa M. *Analysis of residual amino acid-DNA crosslink induced in intact cells by nickel and chromium compounds*. *Carcinogenesis*. 1992;13: 1763-1768
- Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL. *Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II*. *J Biol Chem*. 1983;258:15365-15370
- Miller CA, Costa M. *Immunological detection of DNA-protein complexes induced by chromate*. *Carcinogenesis*. 1989;10:667-672
- Miller CA, Costa M. *Immunodetection of DNA-protein crosslinks by slot blotting*. *Mutation Research*. 1990; 234:97-106
- Newbold RF, Amos J, Connell JR. *The cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of chromium containing compounds on mammalian cells in culture*. *Mutation Res*. 1979;67:55-63
- Oleinick NL, Chiu S, Ramakrishnan N, Xue L. *The formation and significance of DNA-protein crosslinks in mammalian cells*. *Br J Cancer*. 1987;55:135-140
- Paola A, Mariano B, Aldo T. *Intracellular chromium reduction*. *Bioch Biophys Acta*. 1987; 931:10-15
- Patierno SR, Banh D, Landolph JR. *Transformation of C 3H/10T $\frac{1}{2}$  mouse embryo cells to focus formation and abchorage independence by insoluble lead chromate but not soluble calcium chromate: Relationship to mutagenesis internalization of lead chromate particles*. *Cancer Research*, 1988;48:5280-5288
- Petrilli FO, De Flora S. *Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity*. *Mutation Res*. 1978;54:139-147
- Popp W, Vahrenholz W, Schmieding E, Krewet E, Norpoth K. *Investigations of the frequency of DNA strand breakage and cross-linking and sister chromatid exchange in the lymphocytes of electric welders exposed to chromium- and nickel-containing fumes*. *Int Arch Occup Environ Health*. 1991;63:115-120
- Royle H. *Toxicity of chromic acid in the chromium plating industry*. *Environ Res*. 1975;10: 39-53, 141-163
- Salnikow K, Zhitkovich A, Costa M. *Analysis of the binding sites of chromium to DNA and protein in vitro and in intact cells*. *Carcinogenesis*. 1992;13: 2341-2346
- Snow ET. *A possible role for chromium(III) in genotoxicity*. *Environ Health Perspec*. 1991; 92:75-81
- Standeven AM, Wetterhahn KE. *Cr(VI) toxicity; uptake, reduction, and DNA damage*. *J Am Cell Toxicol*. 1989;8:1275-1283
- Standeven AM, Wetterhahn KE. *Ascorbate is the principal reductant of chromium(VI) in the rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium-DNA binding in vitro*. *Carcinogenesis*. 1992;13: 1319-1324
- Sugiyama M, Patierno SR, Cantoni O, Costa M. *Characterization of DNA induced by CaCrO<sub>4</sub> in synchronous and asynchronous cultured mammalian cells*. *Molecular Pharmacology*. 1986a;29:606-613
- Sugiyama M, Wang XW, Costa M. *Comparison of DNA lesions and cytotoxicity induced by calcium chromate in human, mouse and hamster*. *Cancer Research*. 1986b;46:4547-4551

- Tindall KR, Hsie AW. *Mutagenic and cytotoxic effects of hexavalent and trivalent chromium in the CHO/HGPRT system. 11th annual meeting. Environ Mutagen Soc. 1980;March:16-19*
- Toniolo P, Zhitkovich A, Costa M. *Development and utilization of a new simple assay for DNA-protein crosslinks as a biomarker of exposure to welding fumes. Int Arch Occup Environ Health. 1993;65:S87-S89*
- Tsapakos MJ, Hampton TH, Wetterhahn KE. *Chromium (VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver, and lung. Cancer Research. 1983;43:5662-5667*
- Tsuda H, Kato K. *Chromosomal aberrations and morphological transformation in hamster embryonic cells treated with potassium dichromate in vitro. Mutation Research. 1977;46:87-94*
- Wedrychowski A, StenvenWard W, Schmidt WN, Hnilica LS. *Chromium-induced crosslinking of nuclear proteins and DNA. J Biol Chem. 1985;260:7150-7155*
- Wedrychowski A, Schmidt WN, Hnilica LS. *The in vivo crosslinking of proteins and DNA by heavy metals. J Biol Chem. 1986a;261:3370-3376*
- Wedrychowski A, Schmidt WN, StenvenWard W, Hnilica LS. *Crosslinking of cytokeratins to DNA in vivo chromium salt and cis-diamminedichloroplatinum(II). Biochemistry. 1986b;25:1-9*
- Wolf TH, Kasemann R, Ottenwalder H. *Molecular interaction of different chromium species with nucleotides and nucleic acids. Carcinogenesis. 1989;10:655-659*
- Xu J, Manning FCR, Patierno SR. *Preferential formation and repair of chromium induced DNA adducts and DNA-protein crosslinks in nuclear matrix DNA. Carcinogenesis. 1994;15: 1443-1450*
- Zhitkovich A, Costa M. *Simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo. Carcinogenesis. 1992;13:1485-1489*