

카드뮴의 *Salmonella typhimurium* 변이균주 및 랫드 간장 상피세포에서의 유전독성

정상희 · 조명행* · 조준형

국립수의과학검역원
서울대학교 수의과대학*
(1998년 8월 25일 접수)

Genotoxicity of cadmium chloride in *Salmonella typhimurium* and rat liver epithelial cells

Sang-hee Jeong, Myung-haing Cho*, Joon-hyoung Cho

National Veterinary Research and Quarantine Services, MAF
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Aug 25, 1998)

Abstract : Cadmium is one of the well-known environmental toxicants and induces cancer in rodents and human, but its carcinogenic mechanism has not been well demonstrated until now. Genotoxic effects of cadmium in *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 and TA1535/pSK1002 or in WB-F344 rat liver epithelial cells were investigated to elucidate the tumor initiating effects of cadmium. TA98, TA100 and TA1535/pSK1002 tester strains were used to detect frameshift mutation, base-pair mutation and SOS repair response, respectively, in *Salmonella* mutation test. Reverse mutations from histidine⁻ to histidine⁺ of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 by CdCl₂ were not significantly different from control up to the maximum doses (100μM and 200μM in TA98 and TA100, respectively) at which non-cytotoxicity was observed. DNA SOS repair responses(β-galactosidase activity) generally did not show significant increases compared to control in both of the conditions with or without metabolic activation in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 by CdCl₂. But the activities of β-galactosidase by 400μM of CdCl₂ in metabolic activation condition and by 130 and 400μM of CdCl₂ in non-metabolic activation condition were more decreased than those of control. DNA single strand breaks for 4hrs were observed only in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with 200μM of CdCl₂. As a conclusion, CdCl₂ did not induce gene mutation in microbials but induce DNA single strand breaks in rat liver epithelial cells.

Key words : CdCl₂, genotoxicity, *Salmonella typhimurium*, rat liver epithelial cell.

서 론

유전독성물질들은 직접 또는 간접적인 작용에 의해 암, 기형, 생식독성 및 노화 등을 유발한다고 알려져 있다¹. 그리고 DNA 등 유전인자의 비가역적 손상은 암 발생의 첫단계 과정이기 때문에 화학물질의 발암성 및 발암기전을 확인·설명하기 위해 생체내 및 시험관내 유전독성시험이 다양하게 수행되고 있다. 이 중 생체내 유전독성시험은 동물, 시간, 인력 및 경비 등 여러가지 면에서 문제점을 갖고 있어 이러한 문제점을 해결·보완하기 위하여 여러가지 시험관내 유전독성 시험기법이 개발·응용되고 있다. 이 중 Dr. Ames에 의해 소개된 *Salmonella* 변이균주를 이용하는 복귀돌연변이 시험법이 가장 널리 이용되고 있으며, 이 시험에서 변이원성이 인정된 화학물질중 85% 이상이 생체내 시험에서 발암물질로 확인되어 발암성과 변이원성간에 높은 일치율을 보였다². 이외에 화학물질에 의한 세균의 DNA 손상시 일어나는 SOS 반응의 유도(SOS gene의 발현)를 조사하여 유전독성을 검사하는 SOS chromotest도 소개되어 있으며, 이 시험법은 세포독성이 높은 물질에 대해서도 유전독성을 검색할 수 있는 장점도 갖고 있다^{3,4}. 그리고 포유류 배양세포를 이용하여 화학물질에 의한 DNA의 구조적 변화를 조사하여 유전독성을 검색하는 시험법으로 DNA strand의 절단여부를 직접 관찰하는 방법, 비주기성 DNA 합성시험법 및 DNA adduct 형성시험법 등이 널리 이용되고 있다^{5,6}. 카드뮴은 강한 전자친화성 물질로서 DNA 등 세포내 분자와 쉽게 반응하여 대사적 및 기능적 장애를 유발하여 사람과 설치류 모두에서 폐장, 전립선, 조혈기계 등 여러 장기에 암을 유발하는 것으로 보고되어 있으나 그 실질적인 발암기전은 아직까지 잘 밝혀져 있지 않고 다만 DNA에 대한 직접 또는 간접적인 작용에 의한 DNA 손상으로 인하여 암이 유발될 것이라는 가능성이 제시되어 있을 뿐이다⁷⁻⁹. Denizeau와 Marion¹⁰은 세포의 핵이 카드뮴의 target organelle로서 세포를 5.5µg/ml의 카드뮴에 20시간동안 노출시킨 바 DNA g당 0.98±0.23ng의 카드뮴이 결합되어 있음을 보고한 바 있으며, 카드뮴은 Chinese hamster 폐세포 등 포유류의 세포들의 DNA 합성 및 수복을 억제하는데¹¹ 이는 카드뮴에 의해 세포내에서 생성되는 free radical 때문인 것으로 보고되어 있다¹². 그런데 세균을 이용한 시험에서는 카드뮴의

변이원성은 시험균주 및 시험조건에 따라 서로 상반된 결과가 보고되어 있는데 즉, De Flora *et al*¹³ 및 Marzin과 Phi¹⁴는 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA1538 및 *Escherichia coli* 등의 균주에서 카드뮴의 변이원성이 거의 인정되지 않는다고 하였으며, Pagano와 Zeiger¹⁵는 *Salmonella typhimurium* TA97 균주에서 frame shift 변이가 인정되었다고 하였다.

본 실험에서는 카드뮴의 발암기전을 구명하기 위한 일련의 시험으로서 카드뮴의 유전독성을 알아보기 위하여 유전독성 시험법중 가장 보편화 되어 있으며 유전자 수준에서의 DNA 손상을 쉽게 알아볼 수 있는 복귀돌연변이 시험법을 이용하여 frameshift 변이를 검색할 수 있는 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98과 base pair 변이를 검색할 수 있는 균주인 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용하여 카드뮴의 변이원성을 조사하였으며 아울러 변이원에 의한 돌연변이의 생성과정을 가장 간명하게 설명할 수 있는 SOS 수복모형을 이용한 SOS chromotest로서 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 균주에서 카드뮴에 의한 SOS 수복유발을 조사하였고 또한 화학물질에 의한 DNA 손상여부를 가장 직접적으로 알 수 있는 DNA strand damage 시험법을 이용하여 WB-F344 랫드 간장 상피세포에서 카드뮴에 의한 DNA single strand breaks를 조사하여 카드뮴의 유전독성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

Salmonella typhimurium 변이균주를 이용한 복귀변이시험 : 카드뮴 등 2가 금속이온들은 세균을 이용하는 복귀변이시험의 표준법인 Ames test¹⁶에 의하여 시험을 수행할 경우 사용되는 배지의 citrate, phosphate염 등과 반응하여 착화합물을 형성하여 세균에 대해 적절히 작용하지 못하므로 Ames test를 기본으로 하여 2가 이온들의 변이원성을 검색하기에 적당한 조건으로 아래와 같이 변형하여 수행하였다¹⁵.

공시균주, 배지 및 시약 : 공시균주로는 Bruce Ames 교수(미국 캘리포니아 대학교)로부터 직접 분양받은 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 균주를 사용하였다. Cadmium chloride(CdCl₂)는 Sigma사에서 구입한 순도 100%인 것을 사용하였으며 시험당일 증류수(18MΩ 저항치)에 녹여 여과멸균후 균 반응액중의 최종농도가 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200µM이 되도록 하였다. 시험

에 사용한 배지는 기층배지와 종층배지 2가지로서 기층 배지로서는 Bacto-Difco agar를 1.5%, glucose를 0.5% 그리고 D-biotin을 12.5 μ M 함유한 VB medium(Vogel and Bonner salts, MgSO₄ · 7H₂O, 0.02%; citric acid monohydrate 0.2%; K₂HPO₄, 1%; NaNH₄HPO₄ · 4H₂O, 0.35%)을 30ml 씩 페트리디쉬에 분주하였으며, 종층배지로서는 0.6% agar액 100ml에 50배 농축된 VB salts 2.0ml, 20% glucose 액 2.5ml 및 0.5mM L-histidine-0.5mM D-biotin액 10ml를 첨가하여 페트리디쉬당 2ml씩 분주하였다.

시험방법 : *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100을 Oxoid broth No. 2 배지(2.5%)에 접종하여 37℃의 항온수 조에서 120rpm으로 하룻밤(14시간) 진탕배양하여 세균 배양액을 제조한 후 시험관에 증류수 550 μ l, CdCl₂ 용액 50 μ l 및 세균 배양액 100 μ l을 넣어 균 반응액으로 하여 37℃에서 30분간 진탕하지 않은 상태로 전배양한 후 2ml의 종층배지를 첨가하여 혼합한 후 기층배지가 들어 있는 페트리디쉬에 부어 평평하게 펴서 굳게 한 후 37℃에서 48시간 배양한 후 형성된 복귀변이(His⁺→His^{*}) 집락수를 세었다. 이 때에 background lawn을 관찰하여 세포독성 여부를 판정하였다.

Salmonella typhimurium 균주를 이용한 SOS Chromotest : 본 실험에서는 Miller¹⁷ 및 Oda *et al*¹⁸의 방법에 준하여 다음과 같이 수행하였다.

공시균주, 시약 및 배지 : 공시균주로는 Oda 박사(일본 Prefectural Institute of Public Health)로부터 직접 분양 받은 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 균주를 사용하였다. CdCl₂는 앞의 복귀변이시험과 동일한 것을 사용하였으며 시험당일 증류수에 녹여 여과멸균후 균반응액중의 최종농도가 2, 5, 15, 40, 130 및 400 μ M이 되도록 하였다. 시험에 사용한 배지는 균주를 증식시키기 위한 하룻밤 전배양용 배지인 Luria-Bertani(L-B) broth와 접종용 균액 제조를 위한 TGA 배지인데 이들 배지의 제조는 다음과 같이 하였다. 즉, LB broth는 bactotrypton 10g, 분말효모 5g 및 NaCl 5g을 증류수에 녹여 1N NaOH로 pH를 7.0으로 조정하여 1,000ml로 한 후 고압증기멸균한 다음 배지 ml당 20 μ g의 ampicillin을 첨가하여 사용하였으며, TGA 배지는 Bactotrypton 10g과 NaCl 5g을 증류수 1,000ml에 녹여 고압증기멸균한 후 멸균된 20% glucose 용액 10ml를 가하고 다시 배지 ml당 20 μ g의 ampicillin을 첨가하여 사용하였다. β -galactosidase 활성도 측정용 시약인 Z-완충액은 Na₂HPO₄ · 12H₂O 21.49g, Na₂H₂PO₄ · H₂O 5.5g,

KCl 0.75g 및 MgSO₄ · 7H₂O 0.246g을 증류수에 녹여 1,000 ml로 하여 냉장보관하면서 시험직전에 2- β -mercaptoethanol 2.7ml를 첨가하여 사용하였다. 그리고 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside(ONPG)를 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 ml당 4mg 되게 녹여 효소기질 용액으로 하였다. 대사비활성화시의 양성대조물질로는 배지 ml당 10 μ g의 2-methoxy-6-chloro-9-(3-(2-chlorethyl) aminopropylamino) acridine · 2HCl (ICR)을 사용하였고 대사활성화시에는 배지 ml당 3 μ g의 2-aminoanthracene(2-AA)을 사용하였다.

S9 제조 : 카드뮴의 대사활성화에 따른 DNA에의 영향을 검색하기 위해 Maron 및 Ames¹⁶법에 의해 S9 분획을 제조하여 시험에 사용하였다. 즉, 정상적으로 성장한 랫드(수컷, 체중 약 200g)에 대사효소 유도물질로서 Aroclor 1254를 체중 kg당 500mg으로 1회 복강내 주사한 후 5일후 간장을 채취하여 균질화한 후 9,000g에서 10분간 원심분리하여 상청액을 채취하여 S9 분획으로 사용하였으며 이 분획 1ml를 증류수 10ml에 녹인 Cofactor(일본동양효모사, MgCl₂ · 6H₂O, 8 μ M; KCl, 33 μ M; D-glucose 6-phosphate, 5 μ M; NADPH, 4 μ M; NADH, 4 μ M; Na₂HPO₄, 100 μ M; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 100 μ M)를 첨가하여 S9 mix를 제조하였다.

시험방법 : *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002를 L-B broth(20 μ g/ml ampicillin 함유)에서 37℃, 120rpm으로 하룻밤 전배양한 시험균액(1 × 10⁹ 생균수/ml)을 TGA 배지에 1/50 용량으로 가하여 37℃에서 대수증식기(A600 = 0.25~0.3)까지 진탕배양하였다. 카드뮴 용액 0.1ml를 분주한 시험관에 이 균액을 2.9ml 가하여 37℃에서 2시간 진탕배양하였다. S9 mix에 의한 대사활성화 시험시에는 균액 2.4ml에 S9 mix 0.5ml 또는 이의 대조로서 0.1M 인산염 완충액(pH 7.4) 0.5ml를 가하여 2.9ml로 하고 여기에 카드뮴 용액 0.1ml를 넣어 잘 혼합하고 2시간 배양하였다. 배양액은 5,000rpm으로 10분간 냉장원심분리하여 상청액을 제거한 후 잔류물을 0.85% NaCl 3ml로 부유시켜 균 반응액으로 하였다. 균 반응액 0.2ml를 β -galactosidase 활성도 측정에 사용하고, 나머지는 균 반응액의 세균농도(A600) 측정에 사용하였다. β -galactosidase 활성도 측정은 균 반응액 0.2ml를 1.8ml의 Z-완충액이 들어 있는 시험관에 넣고 여기에 0.1% sodium dodecyl sulfate 50 μ l와 chloroform 50 μ l을 첨가하여 10초간 강하게 교반하여 세포막의 일부를 파괴한 후 28℃ 부란기내에서 5~10분간 정치하여 온도를 안정시키고 나서 β -galactosidase

의 기질인 ONPG 용액 0.2ml를 가하여 수초간 교반하여 효소반응을 개시하였다. 반응이 눈으로 보아 충분히 황색을 띠 때 1M의 Na₂CO₃ 1ml를 가하여 반응을 정지시키고 분광광도계를 이용하여 반응액의 파장 420 및 550nm에서의 흡광도를 측정하였다. 여기서 A550으로 균의 탁도에 의한 A420의 수치를 보정하였다. β-galactosidase 활성도는 Miller의 계산식에 의해 산출하였다. 즉,

$$\beta\text{-galactosidase activity(U/l)} = \frac{1000(A_{420} - 1.75 \times A_{550})}{t \times v \times A_{600}}$$

t: 반응시간(25분)

v: 반응액 ml당 사용된 균 반응액량(0.1ml)

DNA single strand break 시험 :

공시세포 : WB-F344 랫드 간장 상피세포(미국 미시간 주립대학교 Trosko 교수로부터 분양받음)를 사용하였으며, 사용된 세포의 계대수는 15대 및 16대이었다. 세포는 fetal bovine serum이 10% 그리고 getamicin sulfate가 50μg/ml 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(Gibco, USA)을 사용하여 37℃의 5% 탄산 부란기에서 배양되었다.

CdCl₂ 용액제조 : CdCl₂는 앞에서와 같은 것을 사용하였으며 시험당일 0.05% HNO₃에 녹여 여과멸균하여 배양액중 농도가 7.4, 22.2, 66.6 및 200μM이 되도록 하였다.

시험방법 : CdCl₂에 의한 DNA single strand break를 측정하기 위하여 Kohn *et al*¹⁹ 및 Brambilla *et al*⁵이 기술한 알칼리 유출법을 약간 변형하여 수행하였다. 즉, 간세포를 페트리디쉬(35mm ∅)에 1×10⁵개/ml로 분주하여 24시간 배양후 배양액 ml당 0.1μCi의 [methyl-³H] thymidine을 48시간동안 표지하였다. CdCl₂를 처리하기 2시간전에 배양세포에 2nM의 표지안된 thymidine을 1시간동안 처리한 후 CdCl₂(7.4μM~200μM)에 4시간동안 세포를 노출시켰다. 이후 PBS로 3회 세척한 후 0.05% trypsin 용액을 처리하여 세포를 1ml의 배양액에 부유시킨 후 원심분리하여 차가운 Merchant 용액(0.14M NaCl, 2.7mM KCl, 1.47mM KH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄, 0.53mM Na₂EDTA, pH 7.6)으로 세포를 수거하여 ml당 생존세포가 5×10⁵개가 되도록 맞춘 후 직경 25mm, poresize 5μm의 mixed esters of cellulose filter(Millipore, USA)위에 세포를 올린 후 차가운 Merchant 용액으로 3회 세척하였다. 이후 pH 10.0인 용해용액(0.2% sodium lauroyl sarcosinate, 2.0M NaCl, 20mM Na₂EDTA)으로 세척한 후 60mM tetra ethylammonium hydroxide와 20mM Na₂EDTA가 함유된 유출용액(pH 12.3)을 넣고 암상자에서 연동펌프(Manostat, USA)를 사용하

여 분당 0.132ml의 속도로 유출시키면서 10분 간격으로 90분까지 분획을 채취하였다. 각 분획 및 최종 filter 중의 방사능은 3.3배의 cocktail solution(NEN, USA)과 acetic acid(최종농도, 0.3%)를 첨가하여 혼합한 후 liquid scintillation counter(Packard, USA)로 측정하였다. DNA single strand break의 정도는 유출전의 filter중의 총 DNA양에서 각 유출시간에 채취한 분획중의 DNA양을 빼서 각 시간에 filter에 남아있는 DNA양을 구한 뒤 이 손상받지 않은 DNA양을 총 DNA양에 대한 백분율로 환산하였다.

결 과

CdCl₂에 의한 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100에서의 복귀 변이집락수 변화 : CdCl₂를 3.12μM~200μM까지 용량별로 투여하여 TA98에서 복귀변이 집락수를 조사한 결과 모든 용량군에서 대조군(중류수 처리)에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 그리고 CdCl₂ 200μM 투여군에서는 복귀변이 집락수에는 차이가 없었으나 background lawn이 얇아지는 것으로 보아 세포독성이 인정되었다. TA100에서도 TA98과 같이 CdCl₂를 투여한 모든 용량군에서 대조군과 차이가 없었다(Table 1).

Table 1. Mutagenicity of CdCl₂ in *Salmonella* tester strains TA98 and TA100

Treatment (μM)	No. of revertants ^b	
	TA 98	TA 100
Control(DW)	29.3±7.2	174.3±10.6
Cd 3.12	42.3±6.8	164.7±5.9
Cd 6.25	31.7±8.1	164.7±12.7
Cd 12.5	43.7±12.7	156.0±15.6
Cd 25	39.3±14.2	155.7±9.6
Cd 50	41.7±9.9	181.7±15.3
Cd 100	40.3±7.8	171.7±12.9
Cd 200	26.3±6.5(CT)	159.0±12.8
Positive control ^a	661.3±27.8	1,084.3±12.2

^a 2-nitrofluorene 1μg/50μl of DMSO/plate and sodium azide 1.5μg/50μl of DW/plate were used as positive control in TA98 and TA100, respectively.

CT, cytotoxicity; background lawns were seen thinner than those of control.

^b Mean±SD of revertants/plate from 3 replica. Spontaneous revertants were not subtracted.

CdCl₂에 의한 SOS 반응 유도 : CdCl₂를 2~400μM까지 용량별로 투여하여 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 균주에서 CdCl₂에 의한 SOS 반응 유도를 β-galactosidase의 활성도를 지표로 하여 조사한 결과, 대사 비활성화시 CdCl₂ 5μM 투여군에서는 대조군에 비해 유의하게 β-galactosidase가 증가하였으나(p<0.05), CdCl₂ 130 및 400μM 투여군에서는 오히려 대조군에 비해 감소하였다(p < 0.05; p < 0.01). 대사 활성화시 β-galactosidase 활성도(SOS 반응유도)는 CdCl₂ 2μM에서 130μM 까지의 용량군에서는 대조군과 큰 차이가 없었으나 400μM 용량군에서는 대조군에 비해 감소하였다(p < 0.05 ; Table 2).

Table 2. Effect of CdCl₂ on the expression of SOS gene (*umuC'*-*lacZ* gene) in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002

Treatment (μM)	Activity of β-galactosidase(unit)	
	S9 ⁻	S9 ⁺
Control	101.28±3.70	136.78±0.88
Cd 2	104.42±3.84	133.33±13.21
Cd 5	114.00±10.08*	130.34±6.95
Cd 15	106.74±2.81	145.54±15.18
Cd 40	90.86±12.55	127.25±8.86
Cd 130	88.97±2.21*	129.30±11.13
Cd 400	82.72±0.28**	114.09±14.76*
Positive control ^a	519.97±37.17	526.06±30.81

^a ICR 10μg/ml of medium and 2-aminoanthracene 3μg/ml of medium were used as positive control in without S9 mix(S9⁻) and with S9 mix(S9⁺), respectively. The results are represented as mean±SD(n=3) and basal level was not subtracted.

*, ** : significantly different from control at p < 0.05 and p < 0.01,

CdCl₂에 의한 DNA single strand break : WB-F344 랫트 간장 상피세포에 CdCl₂ 7.4~200μM을 용량별로 4시간 동안 처리한 후 알칼리 유출법에 의해 절단된 DNA 단사를 10분 간격으로 유출하여 각 유출시간별로 filter에 남아있는 DNA를 총 DNA에 대한 백분율로 환산한 결과 CdCl₂ 200μM을 투여한 군에서만 모든 유출시간에서 대조군에 비해 유의하게 감소한 것으로 보아 단사절단이 증가함을 알 수 있었으나 다른 용량군에서는 대조군과 큰 차이가 없었다(Fig 1).

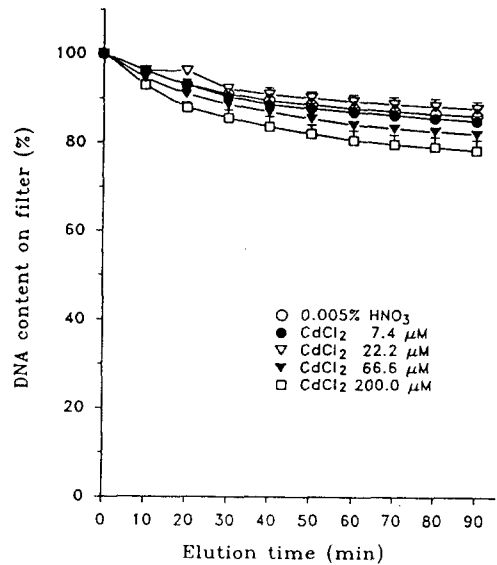


Fig 1. DNA single strand damage in WB-F344 rat liver epithelial cells treated with CdCl₂ for 4 hrs. Results presented are mean±SD of DNA retained on filter to total DNA content at 0 time(n=5). 0.005% HNO₃ is vehicle control for CdCl₂.

고찰

DNA는 대부분의 발암물질의 표적으로서 DNA의 비가역적인 손상은 암의 유발단계에서 발생하는 현상인데²⁰ 카드뮴은 설치류 및 사람에서 강력한 발암물질로 알려진 물질로서 그 발암기전은 세포내에서 카드뮴에 의해 생성된 free radical이 DNA에 작용하여 비가역적 손상을 유발함으로써 암을 유발시키는 것으로 추정되고 있다⁷.

지금까지 화학물질에 의한 DNA 손상을 검색하기 위하여 시험관내 및 생체내 시험법이 다양하게 개발되어 있는데²¹ 이중 화학물질에 의한 gene mutation 시험에는 흔히 유전자 조작이 용이한 세균이 이용되고 있는데 이중 histidine 요구성 균주가 비요구성으로 변이되는 것을 봄으로써 point mutation을 검색할 수 있는 복귀변이 시험이 가장 널리 이용되고 있다. Ames에 의하여 개발된 *Salmonella typhimurium* 변이균주들은 *uvr B* gene이 결손되어 있어 변이원 물질에 의해 손상된 DNA를 제거, 수복하는 기능이 상실되어 있고 세포막에 lipopolysaccharide가 없어 변이원 물질에 대한 감수성이 높으며 또한 plasmid PKM101이 조합되어 있어 DNA 손상에 의한

SOS 수복이 일어나기 쉬운 균주들이다¹⁶. 본 실험에서 사용한 균주중 *Salmonella typhimurium* TA98은 frame shift 변이를 검색해낼 수 있는 균주이며, TA100은 gene의 transition 또는 transversion 등 base-pair 변이를 검색할 수 있는 균주이다. 본 실험에서 CdCl₂에 의해 TA98 및 TA100 모두에서 복귀변이 집락수가 증가하지 않아 변이원성이 인정되지 않은 결과는 Mortelmans *et al*²²이 CdO(cadmium oxide)는 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주에서 대사 활성화 및 비활성화시 변이원성이 인정되지 않았다는 보고와 일치한다. 그러나 세균을 이용하는 복귀변이시험에서 카드뮴은 변이원성이 인정되었다는 보고가 있는가 하면¹⁵ 인정되지 않았다^{14,22,23}는 상충된 보고들을 볼 때 카드뮴의 변이원성은 시험균주와 시험조건에 따라 서로 다른 것을 알 수 있다. 즉, 이렇게 상반된 결과는 Arlauskas *et al*²³, Marzin과 Phil⁴ 및 Mortelmans *et al*²²은 세균을 이용한 복귀변이 표준시험법으로 Cd의 변이원성을 검색한 결과이었고 Pagano와 Zeiger¹⁵는 표준시험법이 2가 금속의 변이원성 검색에는 부적합함을 인식하고 표준시험법을 2가 금속의 변이원성을 검색하기에 적합하게 변형하여 CdCl₂의 변이원성을 검색한 결과였기 때문이다.

돌연변이 생성과정에 대한 설명중 SOS 수복모델은 가장 유력하게 받아들여지는 이론인데 SOS 수복은 DNA의 수복요류를 수반하는 과정으로서 Oda *et al*¹⁸은 *umu C* 유전자를 가진 균주의 β -galactosidase의 유도를 조사함으로써 SOS 유전자의 발현을 검출할 수 있는 새로운 시험계를 개발하였고 이 시험법에 의한 변이원성 결과와 Ames 시험법 및 생체내 발암성 시험에서의 결과와 일치율이 높음을 보여주었다. 이 시험법의 원리는 변이원성 물질에 의해 SOS 반응이 유도되면 *umu C* 유전자의 promoter에 의해 조절되는 *umu C'-lac Z* 융합유전자가 발생하고 이 유전자에 의해 생성되는 *Umu C'-Lac Z* 잡종단백질은 β -galactosidase 활성을 가지므로 그 활성을 측정함으로써 *umu C* 유전자 발현의 유도력(SOS 반응의 강도)을 조사하는 것이다. 아울러 이 시험법은 세포독성이 높은 물질에 대해서도 유전독성을 검색할 수 있는 장점을 갖고 있다³. 본 실험에서는 CdCl₂ 투여후 β -galactosidase 활성도를 지표로 하여 SOS 반응유도를 조사하여 변이원성을 검색한 결과 대사 비활성화시 Cd 5 μ M 용량에서 대조군에 비해 β -galactosidase의 활성도가 약간 증가하였으나 400 μ M 투여군에서는 오히려 감소한 것을 제외하고는 대사활성화 및 비활성화 모든 조건에서 대조군과 차

이가 없었는데 이 결과로 보아 카드뮴의 변이원성은 인정할 수 없었으며 또한 이 결과는 CdSO₄에 대한 SOS chromotest 결과 변이원성이 인정되지 않았다는 Olivier와 Marzin²⁴의 보고와 거의 일치한다. 그리고 본 실험에서 CdCl₂ 고용량 투여군(130 및 400 μ M)에서 β -galactosidase의 활성도가 낮은 것은 배지성분과 CdCl₂와의 작용 때문일 것으로 의심된다. 즉, 본 실험결과에는 밝히지 않았으나 CdCl₂ 500 μ M 이상의 농도에서는 TGA 배지에 2시간 배양한 후에 흰색 침전물이 관찰되어 본 실험에서는 흰색 침전물의 형성이 육안적으로 관찰되지 않는 최대용량인 CdCl₂ 400 μ M을 최고용량으로 사용하였으나 이 용량에서도 육안적으로는 관찰되지 않으나 배지와 침전물을 형성하고 그리하여 세균에 작용한 카드뮴 양이 감소하였기 때문일 것으로 추정된다. 따라서 CdCl₂의 SOS 반응유도능 검색시에는 배지성분과 Cd²⁺와의 작용에 대한 면밀한 검토가 요구되리라 생각된다. 또한 Cerutti²⁵는 발암물질에 의해 생성되는 활성산소종 또는 발암물질의 free radical 들은 세균을 이용한 유전독성 시험에서는 변이원성이 매우 미약하거나 인정되지 않는다고 보고하였는 바, 본 실험에서는 세포내에서 free radical을 형성하는 CdCl₂도 역시 세균에 대한 유전독성은 미약한 것으로 사료된다. DNA에 대한 1차적 손상을 보기 위하여 개발된 여러 시험법 중 DNA strand breakage는 DNA adducts, 비주기성 DNA 합성(unscheduled DNA synthesis, UDS) 및 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange, SCE) 등과 같은 DNA 손상에 대한 간접적인 가능성을 제시하는 방법과는 달리 매우 직접적이고 강력한 정보를 제공한다고 알려져 있다^{21,26}. 카드뮴은 랫드 간장세포주(TRL-1215)⁷ 또는 사람 및 원숭이의 신장세포주¹¹에서 DNA polymerase의 활성도를 저하시켜 DNA strand breakage를 유발하고 결과적으로 DNA 합성이 저하된다고 알려져 있다. 본 실험에서도 CdCl₂ 200 μ M을 4시간동안 랫드 간장 상피세포에 투여하여 세포내의 DNA single strand breakage를 조사한 결과 세포 생존율에는 변화가 없었으나 손상받지 않은 DNA 함량이 대조군에 비해 현저히 감소한 것으로 보아 카드뮴에 의해 DNA single strand breakage가 증가한 것을 알 수 있었으며 이 결과는 위의 보고와도 거의 일치하였다.

결론

카드뮴의 발암기전을 구명하기 위한 일련의 실험으로서 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 균주를 이용한 유전자 변이시험 및 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 균주를 이용한 SOS chromotest와 랫드 간장 상피세포를 이용한 DNA single strand breaks 시험 등을 실시하여 카드뮴이 암 유발단계에서 유전자 손상 등에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻게 되었다.

1. 카드뮴을 *Salmonella typhimurium* TA98 및 TA100 균주에 3.12 μ M에서부터 세포독성이 나타나지 않는 최대용량(TA98; 100 μ M, TA100; 200 μ M)까지를 투여한 후 각 균주별로 histidine 요구성 균들이 histidine 비요구성 균으로 복귀변이되는 균의 집락수를 조사한 바 두가지 균주 모두에서 복귀변이 집락수가 대조군과 비교하여 유의하게 변화하지 않았다.

2. 카드뮴을 *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 균주에 2~400 μ M의 농도로 투여한 후 β -galactosidase 활성도를 지표로 하여 SOS 반응유도를 조사한 결과 대사활성화 및 비활성화 조건 모두에서 고용량군에서는 대조군에 비하여 β -galactosidase 활성이 다소 감소하였으나 변이원성 또는 항변이원성 효과는 미약하였다.

3. 랫드 간장 상피세포를 카드뮴 7.4~200 μ M 농도에 4시간동안 노출시킨 후 세포를 수거하여 카드뮴에 의해 손상된 DNA의 single strand breaks를 10분 간격으로 90분까지 측정된 결과 카드뮴 200 μ M 투여군에서 10분째 분획부터 DNA single strand breaks가 대조군에 비해 증가하여 90분째 분획까지 계속적으로 증가하였다($p < 0.05$; $p < 0.01$).

이상의 결과로 카드뮴은 *Salmonella* 변이균주에서는 유전자의 손상을 유발시키지 않으나 랫드 간장 상피세포에서는 유전자의 손상을 일으킴을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Ames BN. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science*, 204:587-593, 1979.
2. McCann J, Choi Edmund, Yamasaki E, et al. Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test : assay of 300 chemicals. *Proc Nat Acad Sci USA*, 72:5135-5139, 1975.
3. Oda Y, Nakamura S, Oki I, et al. Evaluation of the new system(umu-test) for the detection of environ-

- mental mutagens and carcinogens. *Mutat Res*, 147: 219-229, 1985.
4. Quillardet P, Huisman O, D'ari R, et al. SOS chromotest, a direct assay of an SOS function in Escherichia K-12 to measure genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79:5971-5975, 1982.
5. Brambilla G, Robbiano L, Martelli A, et al. Genotoxicity of N-Nitrosochlordiazepoxide in cultured mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 97:480-488, 1989.
6. Deaven LL, Campbell EW. Factors affecting the induction of chromosomal aberrations by cadmium in chinese hamster cells. *Cytogenet Cell Genet*, 26:251-260, 1980.
7. 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*, 113:227-233, 1992.
8. Shiraishi N, Hochadel JF, Coogan TP, et al. Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of the metallothionein gene. *Toxicol Appl Pharmacol*, 130:229-236, 1995.
9. Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit Rev Toxicol*, 22:175-201, 1992.
10. Denizeau F, Marion M. Genotoxic effects of heavy metals in rat hepatocytes. *Cell Biol Toxicol*, 5:15-25, 1989.
11. Nocentini S. Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acids Res*, 15:4211-4225, 1987.
12. Ochi T, Ishiguro T, Ohsawa M. Participation of active oxygen species in the Induction of DNA single-strand scission by cadmium chloride in cultured chinese hamster cells. *Mutation Res*, 122:169-175, 1983.
13. De Flora S, Zanacchi P, Camoirano A, et al. Genotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. *Mutat Res*, 133:161-198, 1984.
14. Marzin DR, Phi HV. Study of mutagenicity of metal

- derivatives with *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* , 155:49-51, 1985.
15. Pagano DA, Zeiger E. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium* . *Environ Molecul Mutagen* , 19:139-146, 1992.
 16. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* , 113:173-215, 1983.
 17. Miller JH. Assay of β -galactosidase. *Exp Mol Genetics* , 48:352-355, 1972.
 18. Oda Y, Yamazaki H, Watanabe M, *et al.* Development of high sensitive umu test system : rapid detection of genotoxicity of promutagenic aromatic amines by *Salmonella typhimurium* strain NM2009 processing high *o*-acetyl transferase activity. *Mutat Res* , 334:145-156, 1995.
 19. Kohn KW, Erickson LC, Ewig RAG, *et al.* Fractionation of DNA mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* , 15:4629-4637, 1976.
 20. McQueen CA, Way BM, Queener SM. Mutagenicity of hydralazine in mammalian cells and bacteria. *Toxicol Appl Pharmacol* , 118:135-138, 1993
 21. Brusick D. Principles of genetic toxicology. 2nd ed, Plenum press, New York and London, 193-225, 1987.
 22. Mortelmans K, Haworth S, Lawlor T, *et al.* *Salmonella* mutagenicity tests : II . Results from the testing of 270 chemicals. *Environ Mutagen* , 8:1-119, 1986.
 23. Arlauskas A, Baker RSU, Bonin AM, *et al.* Mutagenicity of metal ions in bacteria. *Environ Res* , 36: 379-388, 1985.
 24. Olivier Ph, Marzin D. Study on the genotoxic potential of 48 inorganic derivatives with the SOS chromotest. *Mutat Res* , 189:263-269, 1987.
 25. Cerutti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* , 227:375-381, 1985.
 26. Lee EW, Garner CD. Effects of benzene on DNA Strand breaks *in vivo* versus benzene metabolite-induced DNA Strand breaks *in vitro* in mouse bone marrow cells. *Toxicol Appl pharmacol* , 108:497-508, 1991.