연 구 자 료
독성95-4-12

산업유해물질에 의한 8-hydroxyguanine의 생성에 관한 연구

1995

한국산업안전공단
산업보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장귀하

본 연구결과를 1995년도 산업보건연구원의 연구사업중 "산업유해물질에 의한 8-hydroxyguanine의 생성에 관한 연구"에 대한 최종 결과 보고서로 제출합니다.

이 연구보고서에 수록된 내용은 연구자 개인의 의견이며 본 연구원의 공식견해가 아님을 밝혀 드립니다.

1995년 12월 31일

제 출 자:산업보건연구원장 문 영 한

연구책임자: 서울대학교 의과대학
교수 정 명희

공동연구자: 산 업 보 건 연 구 원
책임연구원 유 일재
선임연구원 맹 승희

목 차

Abstract.....1

I. 서론.....3

1. 연구 배경

2. 연구 목표 및 기대 효과

II. 재료 및 방법.....6

1. 재료

1) 동물

2) 화합물

3) 8-OH-Gua antibody의 제조

4) Immunoaffinty column 제조

5) Internal Standard ^{14}C-8-OH-Gua 제조

2. 방법

1) 흰쥐의 화학물질 처리및 혈장 분리

2) 혈장 8-OH-Gua 측정

III. 연구결과.....10

1. 정상 흰쥐의 혈장 8-OH-Gua함량

2. Carbon tetrachloride에의한 혈장 8-OH-Gua함량의 시간적 변화.

3. Group I 화합물에 의한 8-OH-Gua의 함량 변화

4. Group II 화합물에 의한 8-OH-Gua의 함량 변화

5. Group III 화합물에 의한 8-Oh-Gua의 함량 변화

IV. 고찰.....12

1. 화학물질에 대한 8-OH-Gua assay와 변이원성 시험과 비교

2. 화학물질에 대한 8-OH-Gua assay와 발암성 시험과 비교

3. 8-OH-Gua의 발암 지표로써의 가능성

V. 요약 및 결론.....14

VI. 참고 문헌.....15

Plasma level of 8-Hydroxyguanine as an Index for the Genotoxicity of Industrial Chemicals

Myung Hee Chung[a], Min Kyung Park[a], Il Je Yu[b], and Seung Hee Maeng[b]

[a]Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea
[b]Department of Industrial Toxicology, Industrial Health Research Institute, KISCO, Inchon, Korea

-Abstract-

Industrial workers are in danger of being exposed to many chemicals which are mutagenic and/or carcinogenic, and we need a method that can be used to evaluate the genotoxicity of these chemicals in the workers. In the present study, attempts were made to test whether plasma level of 8-hydroxyguanine(8-OH-Gua) can be an index for the genotoxicity of these chemicals. This assumption was made from the following three facts: 1) many of these chemicals can produce active oxygens during biotransformation in liver, 2) active oxygens hydroxylate guanine bases at C8 position in DNA to form 8-OH-Gua and, 3) the 8-OH-Gua residues are removed by the repair enzyme and are released into blood. For this purpose, 14 chemicals were selected and each chemical was administered into rats intraperitoneally with dose of 1/3 of its LD_{50}. Rats were sacrified at 1 h after administration and blood taken from hearts was assayed for 8-OH-Gua. Each of chemicals selected belongs to one of the 3 categories or groups: 1) mutagenic as well as carcinogenic, 2) carcinogenic but with weak or no mutagenecity and 3) mutagenic but with suspected or carcinogenicity.

The results are as follows.

1. Plasma level of 8-OH-Gua in rats with no treatment was 4.43 ± 0.37 pmol/ml plasma(n=7).

2. The chemicals of the Group I (mutagenic and carcinogenic) were 1,3

dichloropropene, acrylonitrile, dimethyl sulfate, benzo(a)pyrene, formaldehyde and acrylamide. The plasma level of 8-OH-Gua by these chemicals were 13.50±3.62, 10.58±2.24, 10.07±2.25, 7.01±0.38, 6.66±1.66 and 5.54±0.60 pmol/ml plasma, respectively. All the chemicals except acrylamide increased the plasma level over the control significantly.

3. The chemicals of Group II (carcinogenic but weak or not mutagenic) were benzene, carbontetrachloride, dinitrotoluene, toluene-2,4-diisocyanate, methylene chloride and DDT. The plasma level of 8-OH-Gua after these chemicals were 14.82±3.11, 13.34±0.96, 10.73±1.79, 8.92±1.17, 8.00±1.32 and 7.02±0.38 pmol/ml plasma, respectively. The plasma levels of 8-OH-Gua observed were significantly higher than the control.
4. The chemicals of Group III (mutagenic but with suspected carcinogenicity) were styrene and aniline. The plasma levels of 8-OH-Gua by these chemicals were 19.16±2.01 and 10.80±3.61, respectively which were also significantly higher than the control.

These results indicate that the plasma level of 8-OH-Gua is increased by the chemicals occurring in industries regardless of their carcinogenicity and mutagenicity and thus, suggest that the changes of plasma level of 8-OH-Gua by any chemicals can be an index for the detection of potential genotoxicity of these chemicals.

산업유해물질에 의한 8-Hyroxyguanine의 생성에 관한 연구

정 명희[a], 박 민경[a], 유 일재[b], 맹 승희[b]

[a]서울대학교 의과대학 약리학교실
[b]한국산업안전공단 산업보건연구원 산업독성연구실

I. 서 론

1.연구배경

환경에 존재하는 여러 가지 외인성 물질 (xenobiotics)들은 생체로 유입되면 간에서 대사(biotransformation)를 받아 활성이 손실되어 체외로 배설된다.그러나 때로 대사에 의하여 활성화되어 세포내의 DNA,RNA 또는 단백질과 공유결합을 하게되어 인체에 해로운 영향을 나타내게 된다.

특히 석탄, 석유, 타르 및 cutting oil을 다루는 작업 환경에서는 다환상 탄화수소(policyclic 또는 heterocylic aromatic hydrocarbon)인 3-methyl- cholanthrene, benzo(a)pyrene, aromatic amine류, vinyl chloride 및 ethylene oxide등이 발생하는데 이들은 간의 cytochrome P450효소군에 의해 대사될때 반응성이 강한 물질로 전환되거나 또는 반응성이 강한 물질을 생성한다. 발암물질로 알려진 많은 물질들은 이러한 대사 활성화에 의해 free radicals로 전환되어 DNA에 직접 결합하거나(Nagata et al.,1982)또는 활성산소를 생성하여 발암을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Floyd,1990). 따라서 이들 유해 화합물에 의한 발암 유발은 free radical과 활성산소에 의한 DNA병변에 기인한다고 생각할수 있다.

활성산소에 의한 DNA 손상의 대표적인 예로는 Fig.1에서 보는 바와같이

8-hydroxyguanine(8-OH-Gua)가 보고되었는데 (Kasai와 Nishimura, 1984), 8-OH-Gua는 다음과 같은 이유로 생체에서 돌연변이 및 발암 유발인자로 주목을 받고 있다.

1. 8-OH-Gua는 실험관에서는 물론 방사선 및 활성산소 유발 화합물에 의해서 인체에서도 생성이 된다 (Kasai et al., 1986, 1987; Kyosawa,1990).
2. 8-OH-Gua는 DNA polynerase반응에서 misread를 초래하는데 구체적으로 8-OH-Gua는 C대신 A와 mismatch하여 GC-TA transversion을 유발시킨다 (Shibutani et al., 1991). GC-TA transversion은 ras gene의 codon 12 즉 glycine을 code하는 GGT를 GG(OH)T로 변형시켰을때 valine을 code하는 GTT로 변화되고 이로인하여 세포가 malignant transformation되는 것이 보고되었다 (Kamiya et al., 1992).
3. DNA의 8-OH-Gua를 제거하는 효소가 사람 및 대장균에서 발견됨으로써 (Chung et al.,1991a;1991b),8-OH-Gua가 비생리적인 염기라는 사실이 입증되었다.

이런 관점에서 볼때 어떤 물질이 DNA에 8-OH-Gua를 생성시킨다면 이 물질이 발암원으로 작용할 가능성이 높다고 할 수 있으며 따라서 8-OH-Gua생성 여부를 이용하여 여러 화합물의 발암성 평가의 지표로 사용 할수 있는 가능성이 있다고 할 수 있다.

산업현장에서 흔히 발생하며 발암물질로 알려진 다환상 탄화수소에 속하는 여러 화합물은 free radical로 전환되거나 또는 활성산소를 생성한다고 알려져 있고,이들의 free radical 및 활성산소 형성 능력과 발암유발 능력간에는 유의한 상관성이 있음이 보고되어(Nakayama et al.,1983)상기의 가설을 더욱 뒷받침해 주고 있다.

2. 연구 목표 및 기대 효과

본 연구에서는 산업 현장에서 8-OH-Gua가 산업유해물질에 노출 정도를 예측할

수 있는 지표로써 유용한 지를 알아보고자 하였다.

1) 연구목표; 발암성(carcinogenicity) 또는 변이원성과의 관계파악

활성산소에 의한 산화적 DNA 손상(oxidative DNA damage)으로 8-OH-Gua의 생성은 발암이나 변이원성과 밀접한 관련이 있다는 가정하에 산업유해물질 중 발암성 및 변이원성이 확인된 화학물질을 선택하여 흰쥐에 노출시킨 후 8-OH-Gua의 생성정도를 이들 물질의 기존의 발암성 및 변이원성과 비교하고자 하였다. 이를 위하여 화합물질의 제조 및 폐기를 다루는 산업 현장에서 흔히 생성되는 14가지의 화합물을 선택하였으며 이들 물질은 다시 다음과 같이 세 groups으로 분류하였다.

첫째, 변이원성과 발암성을 모두 가지고 있는 group.

둘째, 변이원성은 없으나 약하지만 발암성이 확인된 group.

셋째, 변이원성은 강하나 발암성이 확실히 확인되지 않은 group.

2) 기대효과; 발암 가능성을 예측할수 있는 bioassay방법 개발가능성

각종 유해물질의 발암성과 8-OH-Gua의 상관관계가 밝혀지면 산업현장의 근로자들의 혈액이나 뇨에서 8-OH-Gua의 증가 정도를 조사함으로써 각종 유해물질에 의한 피폭 정도를 조기에 발견할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 DNA손상물질의 하나인 8-OH-Gua양의 변화 관찰은 각종 산업유해물질의 발암성을 예측할수 있는 방법으로 기대가 되며,이를 근거로 근로자들을 발암의 위험성으로 부터 보호할 수 있는 보건안정성의 지표로써 매우 중요한 역할을 하게 될 것으로 시사된다.

II. 재료 및 방법

1.재료

1)동물

본실험에 사용된 흰쥐는 Sprague Dawley로써 표준배합먹이(삼양사료사)를 공급하여 7-8주간 성장시키여 약180-200g 무게에 해당되는 수컷를 사용하였다.

2)화합물

앞에서 언급한 바와 같이 본 실험에서는 변이원성과 발암성을 모두 가지고 있는 것, 변이원성은 없거나 약하지만 발암성이 확인된 것 그리고 변이원성은 강하나 발암성이 확실히 검증되지 않은 세가지 유형으로 구분하여 총 14종을 선택하였다. Table.1은 각 group에 속하는 화합물과 이들 화합물의 LD_{50} 및 본 실험에서 사용한 용량을 보여주고 있다. 변이원성은 주로 Ames test와 chromosomal aberration test에 근거하였으며 그외 sister chromatid exchange test 및 micronucleus test도 참조하였다.

화합물의 유형분리에서 발암성의 기준은 Rapid Guide to Harzadous Chemicals in The Workplace (3rd ed,R,J Lewis,Van Nostrand Reinhold,1994)에서 제시되어 있는 미국ACGIH(The American Conference of Govermental Industrial Hygiensts) 및 OSHA(Occipational Health and Safety Administration)과 Safety Profile (R,J. Lewis) 등의 확인 결과를 따랐다. 또한 변이원성은 Ishidate's databook과 IPCS에 의해 제시된 결과에 근거하여 분류하였다.

3) 8-OH-Gua antibody의 제조

Bal/c 마우스(6-8주)에 Degan등(1991)의 방법에 의한 항원을 마우스의 동맥에 10 μg/ml항원용액 50μl을 RIBI adjuvant와 함께 주사하였다.첫 주사후 7일이내 다시 주사하고 27일에 꼬리의 정맥에서 채혈하여 혈청을 얻은후 ELISA방법으로 항체결합특이성과 결합력(結合力)을 조사하였다.이후 마우스를 해부하여 비장세포를 얻은 후 형질

세포종 세포인 P3X63 AG8.653과 hybridoma를 만들어 배양하여 ELISA 방법으로 antibody생성여부를 확인하여 clone을 선정하였다. Colne은 8-OH-Gua와 8-OH-dG에 대한 친화력과 특이성을 기준으로 하여 선정하고 Clone이 결정되면 각 Clone의 hybridoma세포를 면역기능이 억제된 Swiss Webster mice의 복강에 주입하여 배양한 후, 복강액에 존재하는 antibody를 분리하여 사용하였다.

4) Immunoaffinity column 제조

immunoaffinity gel의 준비를 위해서 CNBr-actived Sepharose4B(Pharmacia 사)를 0.3g/1ml gel 단위로 사용하였다.이들 gel은 1mM HCl 용액를 사용 glass filter (porosity G3)를 통해 세척및 reswell과정을 거친후 antibody를 24°C에서 24hr혼합시키여 coupling시키였다. 이는 다시 500rpm에서 2min동안 원심분리시키여 세척시킨 후, ethanolamine buffer로 active group를 차단시키고, D.W로 여분의 blocking reagent를 세척하였다. 완성된 gel은 Econo-Column(Biorad사) 에 각 2ml씩 분배 사용하였다.

5) Internal Standard U-^{14}C-8-OH-Gua 제조

혈액내의 8-OH-Gua농도는 미량이므로 실험과정중의 상실된 양을 보정하기 위하여 internal standard로 U-^{14}C-8-OH-Gua를 사용하였다. 통상 plasma 1ml에 1000cpm의 U-^{14}C-8-OH-Gua를 첨가하였으며 그 제조과정은 다음과 같다.

^{14}C-Guanosine(473mCi/mmol,50uCi/ml,Moravek Biochemical,Inc)을 250μl 취하여 건조시키고 30ul의 H_2O에 다시 녹인후 수산화 반응에 사용하였다.수산화 반응은 7μl의 1.7M ascorbic acid, 2μl의 0.2M $CuSO_4$, 145μl의 31% H_2O_2용액을 첨가하여 20초간 반응시켰다. 반응이 끝나면 affinity column과 HPLC을 이용하여 ^{14}C-8-OH-guanosine을 순수 분리하였다. 분리된 분획을 건조시키고 100μl에 다시 녹인 후 여기에 500μl의 metaperiodate (1.28mg/ml, 상온에서 20분 반응시킴), 200μl의 syndimethylhydrazine(350mg/ml,상온에서 30분 반응시킴), 600μl의 conc HCl(100°C에서 30분간 반응시킴)의 순으로 처리하여 ribose를 제거하고 다시 affinity column과

HPLC를 이용하여 U-^{14}C-8-OH-Gua를 순수분리하였다.

2. 방법

1) 흰쥐의 화학 물질 처리 및 혈장 분리

실험에 사용한 흰쥐는 약물 투여 24시간 전부터 물만 공급하였다. 각 화합물은 Table.1에 표시된 용량을 i.p로 투여하였다.투여 용량은 LD_{50}의 1/3양을 기준으로 하였으며 LD_{50}을 명확히 알수 없는 경우에는 TDLo(Lowest Published Toxic Dose)의 1/3양을 사용하였다. 화합물 투여후 1시간 후에 흰쥐를 pentobarbital(30mg/kg),i.p로 마취시킨후 가슴을 절개하여 심장으로 부터 직접 혈액을 채취하여 heparin sodium을 10 μl/1ml으로 처리한후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액의 plasma를 분리하였다.이들은 -24℃에 냉동보관후 실험에 사용하였다.

2) 혈장 8-OH-Gua측정

우선 plasma에 ^{14}C-8-OH-Gua를 1000cpm/ml이 되게 첨가하여 혼합한 후 동량의 acetonitrile를 첨가하여 단백질을 침전을 시킨후 3000rpm에서 15분간 원심분리시키어 상층액을 15ml튜브에 옮겼였다. 이들 상층액에 8배의 증류수를 첨가하여 희석시킨 후 immunoaffinity column에 loading시켰였다. 그후 증류수 5ml, 1M NaCl 5ml, 증류수 5ml의 순서로 washing한 후, acetonitrile 3ml로 수분을 제거시켰다. 8-OH-Gua의 elution은 3ml methanol로 시행하였으며 methanol은 speed vac으로 약 4시간동안 완전 건조시킨 후 증류수 100μl를 첨가하여 5분간 vortex하여 용해시키 후, 50μl은 radioactivity를 측정하였고 나머지 양에서 20μl을 ECD 가 부착된 HPLC에 주입하였고 이때 8-OH-Gua의 peak는 retention time이 8.5min에서 나타났다. Plasma내의 8-OH-Gua함량들은 여러농도의 8-OH-Gua 표준물질을 주입하여 얻은 용량에 대한 standard curve로 sample내의 함량을 계산한후 sample내의 ^{14}C-8-OH-Gua의 양을 빼주어 실제 8-OH-Gua만의 양을 계산하였는데,여기에 실험과정중 손실된 8-OH-Gua의 양을 환산하기 위하여 위의 50μl에서 측정된 cpm값을 손실되지 않은 8-OH-Gua양

으로 하여 (최종 측정된 ^{14}C-8-OH-Gua의 cpm값 첨가한 ^{14}C-8-OH-Gua의 cpm값) x 100 = 회수율(%)을 구하여 보정 계산하였다. 이때 running buffer는 8% MeOH/10mM NaH_2PO_4를 사용하였으며, HPLC (Model303, Gilson)의 조건은 flow rate 50ml/min, column은 25cmx4.6mm column(Beckman), ECD는 ESA model 5100 Coulochem이며, recorder 2210(LKB) 를 사용하였다.

III. 연구결과

1. 정상 흰쥐의 혈장 8-OH-Gua의 함량

혈액에 존재하는 8-OH-Gua는 HPLC-ECD를 이용하여 retention time이 8.5min에 나타나는 peak로 검출할수 있었다(Fig.2).

정상 흰쥐의 혈장 8-OH-Gua의 함량을 측정하기 위하여 혈액 채취 24시간전에 먹이를 주지 않고 물만 투여하였다.그 이유는 먹이를 주면서 측정하였을 경우 개체에 따르는 함량의 변화가 매우 심하였기 때문이다. 그러나 먹이를 주지 않았을 경우 Fig.3에서 보는 바와 같이 비교적 고른 값을 보여 주었으며 7마리를 대상으로 하였을 때 정상 혈장함량은 4.43±0.37pmol/ml이였다. 따라서 이후의 모든 실험에서 혈장 8-OH-Gua측정도 24시간전에 먹이를 주지 않은 상태에서 각종 화합물을 투여한 후 시행하였다.

2. Carbon tetrachloride에 의한 혈장 8-OH-Gua함량의 시간적 변화.

각 화합물 처리후 혈장 8-OH-Gua함량 측정시간을 결정하기위하여 우선 carbon tetrachloride의 효과를 시간에 따라 관찰하였다. Fig.3에서 보는 바와같이 carbon tetrachloride 투여 후 혈장 8-OH-Gua의 함량은 1시간에 최고치에 도달한 후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 물론 본 연구에서 사용한 모든 약물이 carbon tetrachloride와 같다고 할수는 없지만 각 화합물에 의한 함량변화의 관찰시간을 carbon tetrachloride을 기준으로 공히 1시간으로 정하였다.

3. Group I 화합물에 의한 혈장 8-OH-Gua의 함량 변화.

Group I 에 속하는 화합물은 변이원성과 발암성을 모두 가지고 있는 물질들이다.

여기에 속하는 물질로써는 1,3-dichloropropene을 포함하여 6종을 선택하였다(Table 1,2). Table.2 에서 보는 바와 같이 acrylamide를 제외하고는 모든 화합물이 8-OH-Gua함량을 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰다. 가장 많이 8-OH-Gua의 함량을 증가시킨 물질은 1,3-dichloropropene으로써 13.50±3.62pmol/ml이였으며 그 다음은 acrylonitrile과 dimethyl sulfate로써 각각 10.58±2.24 및 10.07±2.25pmol/ml이었다. 그러나 발암물질로 확인된 benzo(a)pyrene과 유기물질의 불완전한 연소에 의하여 생성되는 formaldehyde 경우 대조군에 비하여 유의한 증가를 관찰하였으나 그 증가폭은 각각 7.01±0.38 및 6.66±1.66pmol/ml로써 상기 두물질에 비하여 현저히 낮았다. Acrylamide 역시 5.54±0.60pmol/ml으로써 대조군에 비하여 높은 함량을 보여주고 있으나 통계적으로 유의성은 없었다.

4. Group II 화합물에 의한 혈장 8-OH-Gua 함량 변화

Group II에 속하는 화합물은 변이원성은 없거나 약하지만 발암성이 확인된 물질로써 benzene을 포함하여 6종을 선택하였다(Table 3). Table.3 에서 보는 바와 같이 이 group에 속하는 물질은 모두 대조군에 비하여 혈장 8-OH-Gua의 함량을 유의하게 증가시켰다. 이중 benzene과 carbon tetrachloride는 각각 4.82±3.11 및 13.34±0.96pmol/ml 로써 현저한 상승을 나타냈으며 다음은 dinitrotoluene으로써 10.73±1.79pmol/ml,그리고 toluene-2,4-diisocynate,methylene chloride 및 D.D.T는 각각 8.92 ± 1.17, 8.00±1.32 및 7.02±0.38pmol/ml로써 비교적 약한 상승을 나타내었다.

5. Group III 화합물에 의한 혈장 8-OH-Gua 함량 변화.

Group III 에 속하는 화합물은 변이원성은 강하나 발암성이 확실히 검증되지 않은 물질로써 styrene과 aniline 2종을 선택하였다(Table 4). 이들은 각각 19.16±2.01 및 10.80±3.61pmol/ml의 함량을 나타내어 모두 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰다(Table 4).

IV. 고 찰

본 실험에서 검증되어야 할 것은 크게 두가지로써 화학물질의 발암성과 변이원성 여부와 8-OH-Gua의 생성과의 상호관련성이다. 본 실험에 사용된 화학물질은 발암성이나 변이원성이 명확히 확인되고 있지 않은 group II와 groupIII에 대한 8-OH-Gua의 생성여부를 조사하였다.위의 결과, 본 연구의 대상화학물질에서 8-OH-Gua의 형성은 기존의 발암성 스크린닝 방법인 Ames시험등보다 훌륭하게 발암성을 예측할 수 있게 해 주었다.

1. 화학물질에 대한 8-OH-Gua assay와 기존의 변이원성시험과 비교

환경중의 변이원성 물질을 스크리닝할 수 있는 방법으로는 Ames등에 의해 개발된 미생물를 이용한 *in vitro* 시험이 있으며,염색체이상시험 그리고 소핵시험등이 잘 적용되었다. Ames 시험은 미생물을 이용한 시험방법으로 점돌연변이(frame shift, base-substitution)등으로 인한 His+ 의 발현을 지표로 한 방법이다. group II에 속하는 화학물질은 본 실험에서 돌연변이 지표인 Ames 시험과 염색체 이상 시험에서 음성이되는 것으로 분류되었으나, 이들 변이원성시험 결과와는 다르게 8-OH-Gua의 상승을 나타내었다. 따라서 본 실험에서 화학물질은 *in vivo*상태에서의 산화적DNA손상을 유발하는 것을 확인 할수 있었는데 이는 화학물질의 직접적인 영향보다도 다른 대사과정에서 활성화(bioactivation)을 통한 활성산소의 생성으로 비롯된 산화적 DNA손상(損傷)임을 추론할수 있다. 활성 산소인 · O_2H,0_2-등은 DNA구조중 인산에스테르 결합의 절단,염기의 유리(遊離)와 변형,(디옥시)리보오스 부위의 산화분해등을 일으키는 것으로 알려지고 있다.*in vitro*시험에서는 대사활성을 위한 S9 mix가 사용되고 있지만, 8-OH-Gua assay는 *in vitro*시험에서 확인되기 어려운 활성산소에 의한 산화적 DNA손상의 여부로 인한 각 화학물질의 위험성을 예측할 수 있다.

2. 화학물질에 대한 8-OH-Gua assay와 발암성 시험과 비교.

세포는 oxidative stress에 대해 SOD, catalase, GSH등의 방어 기구를 가지고 있으나,생체내에서 산소의 항상성이 유지되지 못하는 경우, 세포내에 활성산소가 증가되어 노화, 발암, 염증, 심장질환등 많은 질병에 관계하는 것으로 알려져 있다. 특히 활성산소의 tumor promotion에 대한 많은 보고가 있다. 발암의 과정중에 작용하는 종양 프로모터(promoter)는 그 자신이 라디칼 반응에 의해서 활성산소를 생성하거나, 세포의 NADPH 산화탄소를 활성화하여 활성산소를 생성하는것으로 보고되고 있다. group III의 화학물질은 발암성이 확인 되지 못한 물질이지만 흰쥐에 처리시 8-OH-Gua의 상승을 나타내었다.이는 라디칼과 DNA손상과의 관계를 직접적으로 나타내는 결과라고 생각된다.따라서 8-OH-Gua assay는 라디칼로 인한 손상 지수를 8-OH-Gua를 통해 확인하여 종양 유발가능성을 확인할수 있다고 생각된다.

3. 8-OH-Gua의 발암 지표(指標)로써의 가능성.

따라서 위 실험의 결과로써 판단한다면 8-OH-Gua의 변화는 free radical에 의한 DNA의 산화적 손상의 지표로써 사용될수 있다는 가능성을 훌륭히 시사하고 있다. 그 이유로써 첫째, 기존의 변이원성 시험에서 탐지되지 못한 DNA 손상의 측정이 가능할 뿐아니라, 둘째, 발암성이 뚜렷이 확인되고 있지 못하는 화학물질에 대해서도 8-OH-Gua는 free radial에 의한 DNA손상을 확인할수 있으며 free radical은 이미 발암과의 관계가 많은 보고를 통해서 확인되고 있기 때문에 이들의 발암의 가능성의 지표로 충분히 사용될수 있다라고 시사되었다.

V. 요약 및 결론

다수의 산업 유해물이 DNA에 손상을 일으켜 발암 유도의 위험성을 가지고 있으나 이들에 노출된 정도를 평가할 수 있는 지표는 아직 개발되어 있지 않고 있다. 본 연구에서는 대부분의 산업 유해 물질이 생체로 유입된 후 대사 될 때 산소라디칼을 생성한다는 사실과 산소라디칼은 DNA를 공격하여 guanine염기는 8-OH-guanine(8-OH-Gua)로 변형시키고 이 8-OH-Gua는 수복효소에 의하여 DNA로 부터 제거되어 혈액으로 유출된다는 사실에 근거하여 혈액 내의 8-OH-Gua의 함량 변화가 산업유해물질에 대한 노출 정도의 지표로 이용될 수 있는지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 산업유해물질을 크게 세 가지 유형 즉 변이원성(mutagenesity)과 발암성(carcinogenecity)을 모두 가지고 있는 것, 변이원성은 약하거나 없으나 발암성은 확인된 것 그리고 변이원성은 확인되었으나 발암성이 확인되지 않은 것으로 구분하여 총 14종의 화합물에 대하여 흰쥐에 복강 내 투여 후 1시간 동안에 혈장 8-OH-Gua의 함량 변화를 관찰하였다. 투여 용량은 각 화합물의 LD50의 1/3용량으로 결정하였다. 그 결과 benzene을 포함한 14종의 화합물 중 acrylamide를 제외하고는 각 화합물의 유형에 관계없이 혈장 8-OH-Gua의 함량을 유의하게 증가 시켰다. acrylamide 역시 대조군보다는 증가시켰으나 통계적으로 유의성은 없었다. 이 같은 결과는 혈장 8-OH-Gua의 함량은 각종 화합물에 의한 DNA 손상 정도를 잘 반영하고 있음을 보여 주고 있다고 해석되며 따라서 산업유해물질의 유전자 독성지표로 사용될 수 있음을 시사한다고 할 수 있다.

결론적으로 혈장 8-OH-Gua의 함량 변화는 산업유해물질의 발암성 및 변이원성을 평가하는 또 다른 지표가 될 수 있으며 따라서 산업 근로자의 유해물질에 대한 노출정도의 판정 지표로써 응용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

VI. 참고 문헌

Degan,P.,Shigenaga,M.K.Park,E.M.Alperin,P.E. and Ames,B.N.(1991) Immnoaffinty isolation of urinary 8-OH-deoxyguanosine and quantitation of 8-OH-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies. *Carcinogenesis*,12,865-871.

Faila,E.S. Conaway,C.C. and Mathis,J.E.(1989) Oxidative DNA and RNA damage in the livers of Sprague-Dawley rats treated with the hepatocarcinogen 2-nitropropan. *Cancer Res.*,49,5518-5522.

Floyd RA.(1990) The role of 8-hydroguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*,11,1447-1450.

Guyton,K.Z. and Kensel,T.W.(1993) Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 49,3,523-544.

Kasai,H. and Nishimura,S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents.*Nucleic Acid Research* 12,2137-45.

Kasai,H.,Crain,P.F.,kuchino,Y.,Nishimura,S.,Ootsuyama,A. and Tanooka,H.(1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radical and evidence for its repair. *Carcinogenesis*,7,1849-1851.

Kasai,H.,Nishimura,S.,kurokawa,Y. and Hayashi,Y.(1987) Oral administration of the renal carcinogen,potassium bromate,specifically produces 8-hydroxydeoxyguaanosine in rat target organ DNA.*Carcinogenesis*,8,1959-1961.

Kohda,K.,M.Tada,kasai,H.Nishimura,S.and Kawazoe,Y.(1986) Formation of 8-hydroxyguanine residues in celluar DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*,139,626-632.

Kushino,Y.,Mori,F.,Inoue,H.,Iwai,S.,Miura,K.,Ohtsuka,E. and Nishimura,S. (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and adjacent residues. *Nature*,327,77-9.

Lesko,S.A., Lorentzen,R.J. and Ts'o.,P.O.P.(1978) Benzopyrene metabolism. One-electron pathways and the role of nuclear enzymes.In "polycyclic Hydrocarbons and Cancer:ed. H.v.Gelboin and P.O.P.TS'o,1,261-269,Academic Press,New York.

Mamur,J.(1961) A procedure for the isolation of DNA from microorganism. *J.Mol.Biol.*3,208-218.

Nagata,C.,Kodama,M.,Ioki,Y.Kimura,T.(1982) Free radicals produced fdrom chemical carcinogens and their significance in carcinogenesis In;free radicals and cancer(Floyd,R.A.ed),Marcel Decker,New York and Besel:1-62.

Nakayama,T.,Kimura,T.,Kodama,M.,Nagata,C.(1983) Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of napthylamines and aminoazo dyes.*Carcinogenesis*,4,765-767.

Shibutani,S.,Takeshita,M., and Grollan,A.P.(1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxo dG. *Nature* 349,431-434.

Smith,P.J.(1991) Molecular defences against carcinogens. *Carcinogenesis*,47,1,3-20.

Table 1 . Summary of the compounds used and their properties.

Groups	Compounds	Fomula	LD_{50}	Dose[1] (/200g body WT)
I mutagenesity : (+) carcinogenecity : (+)	1,3-Dichloropropene	$C_3H_4Cl_2$	713.470mg/kg	47.6mg
	Dimethyl Sulfate	$(CH_3)_2SO_4$	440mg/kg	27.5mg
	Benzo(a)pyrene	$C_{20}H_{12}$	50mg/kg	3.3mg
	Acrylonitrile	C_3H_3N	0.093g/kg	5.5mg
	Formaldehyde	CH_2O	0.80g/kg	53mg
	Acrylamide	C_3H_5NO	170mg/kg	11.3mg
II mutagenesity : (-)[2] carcinogenecity : (+)	Benzene	C_6H_6	3.8ml/kg	0.25ml
	Methylene Chloride	CH_2Cl_2	1.6ml/kg	0.12ml
	D.D.T	$C_{14}H_9Cl_5$	113.118mg/kg	7.54mg
	2,3-Dinitrotoluene	$CH_3C_6H_3(NO_2)_2$	1400mg/kg[3]	93.0mg
	Toluene-2,4-diisocynate	$C_9H_6N_2O_2$	5800mg/kg[3]	386.0mg
	Carbon tetrachloride	CCl_4	9528ppm	635ppm
III mutagenesity : (-) carcinogenecity : suspected	Styrene	C_8H_8	660mg/kg	44mg
	Aniline	C_6H_7N	0.44g/kg	29.3mg

[1] Dose of each compound/200g body WT administered i.p.
[2] Negative in either Ames test or chromosome aberration test.
[3] These doses were calculated from TDLo(Lowest published toxic dose) since the information of LD_{50} of these compounds is not available.

Table 2 . Effect of Group I Compounds on plasma level of 8-OH-Gua in rats.

Compounds	8-Oh-Gua (pmol/ml plasma)	n	Mutagenecity Ames test	Mutagenecity C.A test[1]	Carcinogenecity
Control	4.43 ± 0.37	7			
1.3-Dichloropropene	13.50 ± 3.62**	6	+	+	confirmed
Dimethyl Sulfate	10.07 ± 2.25*	6	+	+	confirmed
Benzo(a)pyrene	7.01 ± 0.38**	6	+	+	confirmed
Acrylonitrile[2]	10.58 ± 2.24*	5	+	+	confirmed
Formaldehyde[3]	6.66 ± 1.66*	6	+	+	confirmed
Acrylamide[4]	5.54 ± 0.60	6	+	+	confirmed

Data in the table are means ±S.E.M

[1] C.A test : chromosome aberration test.

[2] Acrylonitirle is negative for sister chromatid exchange test.

[3] Formaldehyde is negative for micronucleus test.

[4] Acrylamide is negative for micronucleus test and sister chromatid exchange test.

*P< 0.05, ** P < 0.01 compared with control(Student's t-test).

Table 3. Effect of Group II Compounds on plasma level of 8-OH-Gua in rats.

Compounds	8-Oh-Gua (pmol/ml plasma)	n	Mutagenecity Ames test	Mutagenecity C.A test[1]	Carcinogenecity
Control	4.43 ± 0.37	7			
Benzene[3]	14.82 ± 3.11*	6	-	+	confirmed
Methylene Chloride	8.00 ± 1.32*	6	+	-	confirmed
D.D.T	7.02 ± 0.38*	6	-	+	confirmed
Dinitrotoluene	10.73 ± 1.79*	6	-	-	confirmed
Toluene-2,4-diisocynate	8.92 ± 1.17*	6	+	N.A[2]	confirmed
Carbon tetrachloride	13.34 ± 0.96**	5	-	-	confirmed

Data in the table are means ±S.E.M

[1] C.A test : Chromosome aberration test.

[2] N.A : Not Available

[3] Benzene is positive for micronucleus test.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control(Student's t-test).

Table 4. Effect of Group III Compounds on plasma level of 8-OH-Gua

Compounds	8-Oh-Gua (pmol/ml plasma)	n	Mutagenecity Ames test	Mutagenecity C.A test[1]	Carcinogenecity
Control	4.43 ± 0.37	7			
Styrene[2]	19.16 ± 2.01**	6	+	+	suspected
Aniline	10.80 ± 3.61	6	+	+	suspected

Data in the table are means ±S.E.M

[1] C.A test : chromosome aberration test.

[2] Styrene is positive for micronucleus test and sister chromatid exchange test.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control(Student's t-test).

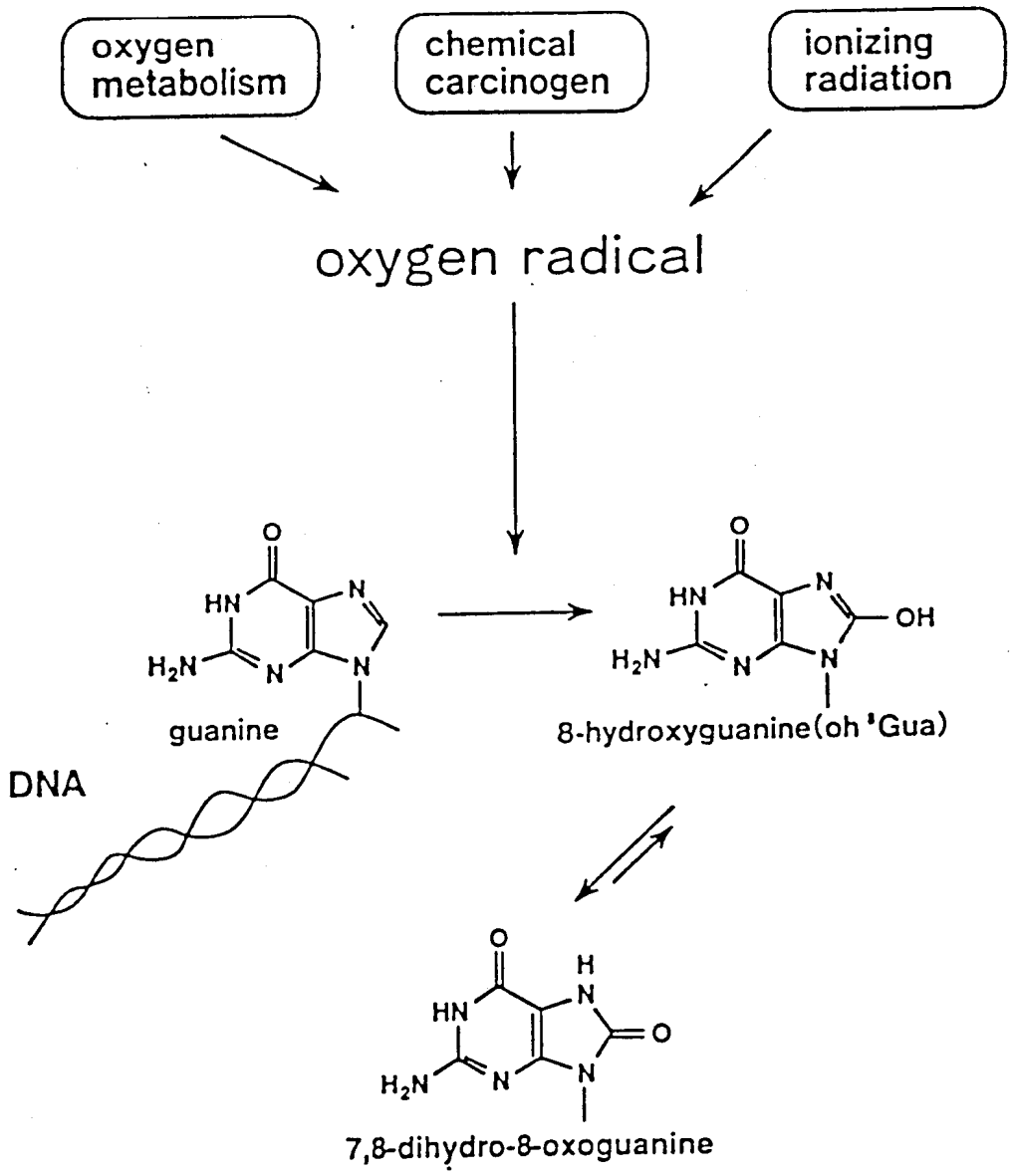

Fig.1. Formation of 8-hydroxyguanine(8-OH-Gua,oh^{8}Gua) in DNA by Oxygen Radicals.

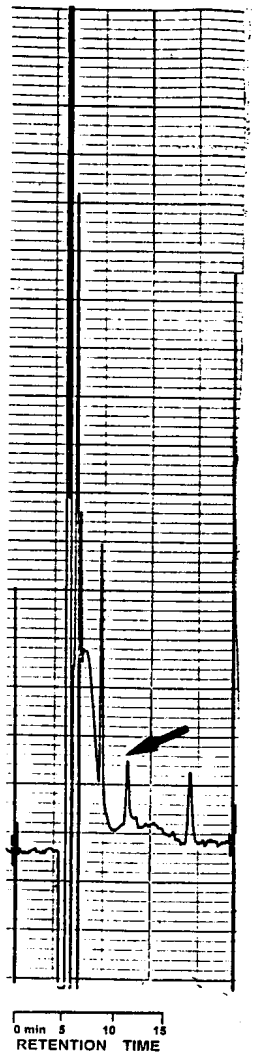

Fig . 2. Chromatogram of 8-OH-Gua in plasma of rat by HPLC-ECD.

Fig.3. Variation of plasma 8-OH-Gua level in normal rats.

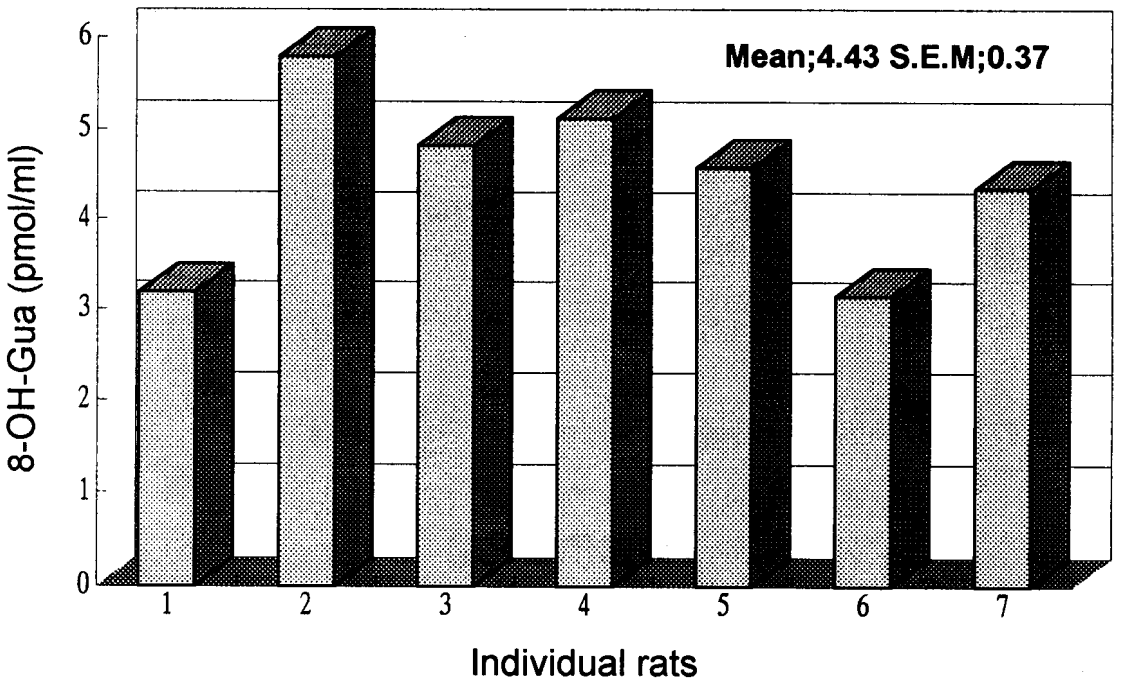
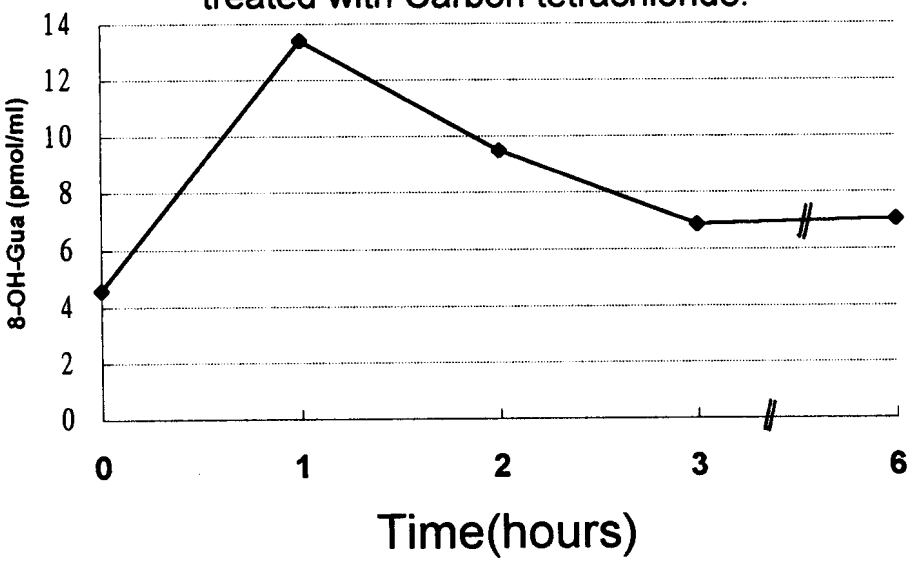
Fig. 4. Change of plasma 8-OH-Gua level with time in rats treated with Carbon tetrachloride.