					Ⅳ-B-5
제목	국문	2-D 전기 영동 법을 이용한 벤젠에 노출된 쥐 혈장의 프로테오믹 분석			
	영문	Proteomic analysis of plasma in rats exposed to benzene by two-dimensional gel electrophoresis.			
저 자 및 소 속	국문	이숙[1], 이종은[1], 오상남[1], 홍현호[1], 설동근[1], 이은일[1] 고려대학교 의과대학 예방의학교실 및 의과학연구원 환경의학연구소 [1]			
	영문	Suk Lee[1], Jongeun Lee[1], Sangnam Oh [1], Hyunho Hong [1], Donggeun Sul[1], Eunil Lee[1] *Department of Preventive Medicine, School of Medicine and Institute for Environmental Health, Medical Science Research Center, Korea University[1]*			
분야	환경및산업보건 [독성-유기용제]	발표자	이숙 [일반회원]	발표형식	구연
진행상황	연구완료				

1. 목적

방향족 탄화수소인 벤젠은 휘발성 용매로서 여러 화학물질의 합성을 위한 개시물질로서 또는 용매로서 사용되어졌으며 페인트와 플라스틱 제조업에 많이 사용이 되어져왔다. 특히 오늘날 벤젠의 노킹방지 특성 때문에 알킬족의 납 화합물 대신하여 가솔린에 첨가되어진다.

이러한 벤젠 및 그의 대사물질들은 유전적, 혈액학적, 면역학적 독성을 보여왔으며 발암물질의 대표적 유기용매로서 알려져왔다. 또한 벤젠과 벤젠의 물질대사 물질들은 생체내 분자들인 단백질들과 DNA 와의 공유결합으로 인하여 벤젠독성기전과 발암현상을 일으키는 것으로 알려져 왔으며 hydrogen peroxide 를 통한 산화적인 DNA 손상을 야기 시킨다.

이러한 벤젠 대사물질의 DNA 손상은 유전자의 발현을 변화시켜 결국은 생체내 단백질 생성을 억제시키거나 과잉 발현 시키는 결과를 도출하여 낼 수가 있을 것이다.

그리하여 이 연구에서 우리는 여러 다른 기간과 다른 농도의 벤젠에 노출되어진 쥐로부터 혈장을 채취하여 혈장내 단백질의 변화를 2 차 전기영동법을 이용하여 벤젠 노출에의하여 형성되어진 DNA 손상이 어떠한 단백질 발현의 변화를 야기 시키는지를 밝혀 보는데 그 목표를 두고 있다.

2. 방법

이 연구는 barrier system 의 동물실에서 1 주일간 순화시킨 후 건강하고 발육상태가 양호한 4 주령의 수컷 Sprague-Dawley rats(100±20g)들을 실험대상으로 사용할 것이며 이들 rat 들은 벤젠 노출 농도(0ppm;control, 1ppm, 10ppm, 100ppm, 200ppm, 400ppm, 600ppm) 에따라 7 개 그룹으로 나누어 실험되어졌다. 7 개 그룹으로 나누어진 rat 들은 각각의 벤젠농도로 흡입 챔버내에서 1 일 6 시간 주 5 일 6 주간 동안 노출이 되어진후 2 주 동안의 회복기를 갖었다. 각 기간동안 노출되어진 흰쥐를 halothane 으로 마취후 혈액 및 골수 그리고 각 장기조직(심장, 간, 뇌, 폐, 고환)들을 적출하였다. 적출되어진 조직들은 다른실험을위하여 저장되어졌고 혈액은 원심분리하여 혈장을 분리하여 본 실험에 사용되어졌다.

우선 SDS-PAGE 는 12.5%의 seperating gel 과 5%의 stacking gel 을 사용하였고 45 ㎍/㎖의 혈장 시료들을 (180V 에 3 시간) standard marker(10-250 Kda)들과함께 전기영동한 후 silver staining reagent 을 이용하여 염색하였다. 2 차 전기 영동법은 CHAPS 와 10%SDS 그리고 boiling 방법을이용하여 sample 을 준비한후 45 ㎍/60 ㎕을 취하여 pH 3-10

의 strip 을 가지고 protein 이 가진 pI 값에 의해 분리하였다. 이렇게 protein 이 포함되어 pI 값에 의해 분리된 strip 은 12.5%의 homogeneous gel 을 이용하여 200W 의 전압을 이용하여 4 시간 동안 전기영동하여 각각의 protein 이 갖는 분자량에 의하여 2 차적으로 분리하였다. 2 차 전기 영동이 끝난 후에는 silver staining 을 통하여 gel 을 염색하고 image analyzer 을 이용하여 분석하였다.

3. 결과

일차적으로 벤젠에 노출되어진 쥐들중 가장 높은 벤젠 농도인 400ppm 과 600ppm 에 노출되어진 쥐의 혈장을 분석하였다. 1 차적 SDS PAGE 분석을 통하여서는 정확한 단백질들의 변화를 알아 낼 수가 없었으며 2-D 전기영동의 결과 control 상에 존재하는 단백질 spot 중 pH 6-7 의 성질을 갖으며 30 kDa 지역의 단백질이 400ppm 과 600ppm 4 주와 6 주 노출되어진 혈장에서는 매우 뚜렷한 감소를 보여주었다. 또한 pH 5-6 지역에서 20-25 kDa MW 을 갖는 새로운 spot 이 대조군과 400ppm 4 주 노출기간에는 발현이 되지 않았으나 600ppm 4 주 노출시 뚜렷하게 나타났으며 pH 6-7 지역과 pH8-9 지역에도 약 23 kDa 정도의 MW 을 갖는 두 개의 spot 들이 새로이 600ppm 에서 발현이 되어졌다.

4. 고찰

벤젠은 생체내 간 조직에서 대사 되어져서 hydroquinone 과 catechol 등으로 전환이되어지는데 hydroquinone 과 benzoquinone 은 핵의 mRNA 생성을 억제시킨다는 사실이 Post(1984)등에 의하여 발표가 되어졌고 벤젠 대사물질들이 미토콘드리아에서는 DNA 와 공유결합을 형성함으로써 DNA 생성을 억제한다고 밝혀졌다. 이러한 벤젠 대사물질과 의 생체내 거대분자의 공유결합은 세포 복제의 억제 및 또는 백혈병 초기의 가능한 기전을 제공 하기도 한다. 또한 벤젠 과 그의 대사 물질들은 hydrogen peroxide 를 통한 산화적인 DNA 손상을 야기 시키기도 한다. 본 연구에서의 한 단백질에서의 감소와 과잉 발현은 이러한 벤젠의 생체내의 기작에 잘 부합이 되어져 있으며 무엇보다도 벤젠에 특이적으로 반응하여 발현현상의 변화를 보여줌으로써 이 특이 단백질들이 벤젠 노출에 대한 가장 중요한 생체 거대분자인 단백질 생체 지표들로서 사용 되어질 수있으리라 보며 앞으로 이 단백질 및 gene 에 대한 연구를 통하여 인간에 적용 할 수 있는 기반이 이루어져야 할 것으로 본다.