

마우스 골수 소핵 시험에 의한 디젤분진, HgCl₂ 및 Pb(Ac)₂의 유전독성효과

Genotoxic Effects of Diesel Emission Particle Extract, HgCl₂
and Pb(Ac)₂ by the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test

허 문 영*, 최 성 규*, 유 기 선*, 손 동 헌**
Moon-Young Heo, Seong-Kyu Choi, Ki-Seon Yu, Dong-Hun Sohn

ABSTRACT

The clastogenic effects of the diesel emission particle extract (DEPE), mercuric chloride and lead acetate were examined by the mouse bone marrow micronucleus test. DEPE had a potent clastogenic effect by intraperitoneal injection with dose-response between 100 and 300mg/kg b.w.. Mercuric chloride and lead acetate also gave a clastogenic effects but mercuric chloride only had a dose-response between 1 and 3mg/kg b.w.. When DEPE was administrated with mercuric chloride or lead acetate, the frequency of micronucleated cells was slight but not significant increase in comparison to a single treatment with DEPE alone.

1. 서 론

최근 급격한 폐암 사망율의 증가와 관련하여 환경공기의 오염에 의한 생체 영향에 대하여 매우 관심이 높아지고 있다. 특히 각종 배출원에서 방출되는 입자상 물질중 디젤 분진이 미생물이나 배양세포를 이용한 실험에서 변이원성이 높다고 알려져 있어서 주목되고 있다.^{1,2)}

여러 연구자들에 의하면 디젤 분진중에는 강력한 발암성 및 변이원성을 나타내는 다환방향족탄

화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon : PAH)와 이들의 nitro체인 nitro-PAH가 들어있다고 알려져 있다.^{3~5)} 이같은 nitro-PAH는 PAH 화합물이 대기중 이산화 질소와 반응할 때 쉽게 생성되며 이중 1-nitropyrene과 1,6-dinitropyrene 등이 비교적 많이 함유되어 있는 nitro-PAH로 밝혀져 있다.⁶⁾

최근까지 디젤 분진을 비롯한 각종 분진들의 유기용매 추출물이 개개로는 미생물 및 포유류 세포

* 강원대학교 약학대학(College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200~701, Korea)

** 중앙대학교 약학대학(College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156~756, Korea)

를 통하여 높은 변이원성이 있다고 알려져 있으나, ⁷⁻¹⁰⁾ 실제 환경 조건하에는 여러 가지 물질들이 함께 존재하여 복합 오염의 양상을 나타나게 되므로 가능한한 *in vivo*에서 combination effects에 의한 유전 독성을 평가하는 것이 필요하다.

이에 본 연구에서는 디젤 분진의 유기용매 추출물, 도시대기중 혼재가 예상되는 수은, 납등의 중금속과 강력한 발암물질인 benzo(a)pyrene[B(a)P]등을 병용투여하여 나타나는 유전 독성을 조사하고자 한다. 최근 *in vivo*에서 환경 오염 물질의 변이원성 시험에 많이 이용되고 있는 마우스 골수 소핵시험 (mouse bone marrow micronucleus test)로 디젤 분진 유기 용매 추출물과 HgCl₂, Pb(Ac)₂ 및 B(a)P의 복합 투여에 의한 소핵 생성빈도를 조사하여 세포 유전학적 영향을 평가하고자 한다.

2. 실험 방법

2.1 디젤 분진 채취 및 시료 조제

디젤을 사용하는 대형 버스의 배기관에서 디젤분진을 채취하여 benzene : ethanol(3 : 1, v/v) 혼합용액으로 soxhlet 장치를 사용하여 24시간 추출 후 감압 농축하여 디젤분진 추출물 (diesel emission particle extract : DEPE)을 얻었다. 디젤분진에서 추출한 tar는 약 1% 정도였으며, dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여서 시료로 사용 하였다.

2.2 시약 및 실험동물

Mercuric chrolide(E.P)는 Junsei Chemical Co., Lead Acetate(G.R)는 Hayashi Pure chemical 사제를 사용하였으며, B(a)P는 Sigma 사제를 사용하였다. 실험 동물은 강원 대학교 약학과 동물 사육실에서 사육된 6주 정도의 ddY 마우스중 체중이 25~30g에 해당하는 것을 사용하였다. 각각의 실험군당 3마리를 사용 하였으며, 사료는 삼양 유지 사료(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 사용하였

고, 물과 사료는 자유롭게 먹게 하였다.

2.3 투여방법

DEPE, HgCl₂, Pb(Ac)₂ 및 B(a)P 등은 모두 복강 주사로 투여하였다. DEPE의 시간에 따른 소핵 유발 빈도 및 성별 차이를 관찰하기 위하여 마우스 kg 당 300mg을 투여하여, 24, 30, 36 시간후에 cervical dislocation 하였으며, 또한 DEPE, Hg(Cl)₂, Pb(Ac)₂의 용량 반응 관계 (dose-response relationship)를 조사하기 위해서 DEPE의 경우 100, 200, 300mg/kg을 1회 투여후 30시간 후에 소핵시험을 실시하였다. HgCl₂의 경우는 1, 2, 3mg/kg을, Pb(Ac)₂의 경우는 25, 50, 75mg/kg을 1일 1회, 5일간 투여후 30시간 후에 소핵 시험을 실시 하였다.

DMSO, HgCl₂, Pb(Ac)₂를 단독 투여시 유전 독성을 관찰하기 위해서는 각각 0.1ml, 2mg/kg, 50mg/kg을 1일 1회, 5일간 투여하였으며, 병용 효과를 보기 위해서는 HgCl₂, Pb(Ac)₂를 각각 5일간 투여후 6일째 DEPE(200mg/kg)를 투여 하였으며, 또한 HgCl₂, Pb(Ac)₂를 각각 5일간 투여후 6일째 B(a)P와 DEPE를 함께 투여 하였다.

2.4 소핵 시험

각각의 검체 투여 후 일정시간 후에 마우스를 cervical dislocation 한후 Schmid의 원법¹¹⁾에 준하여 골수 도말 표본을 만든다. 그 개략은 각각의 동물에서 적출한 대퇴골의 양단을 절단하여 fetal calf serum(GIBCO) 0.2ml로 골수 세포를 microcentrifuge tube에 채취하여 원심 분리후 (1,000rpm, 5min.) 상등액을 제거한 후, 잔사를 소량의 fetal calf serum으로 현탁시킨 다음 슬라이드 상에 도말한다. 도말 표본을 24시간 풍건 후 methanol 원액으로 5분간 고정시킨 다음, 2.5% Giemsa액(Sørensen buffer, PH6.8)으로 20분간 염색한다. 관찰은 마우스 한 마리당 1,000개의 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte : PCE) 중 소핵을 가진 소핵 다염성 적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte : MNPCE)의 생성 빈도를 %로 구한다. 한편 각 실험군의 유의성 검정은 Student's t-test를 행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 디젤 분진 추출물(diesel emission particle extract : DEPE)의 투여 시간 및 마우스 성별에 따른 소핵 생성 빈도.

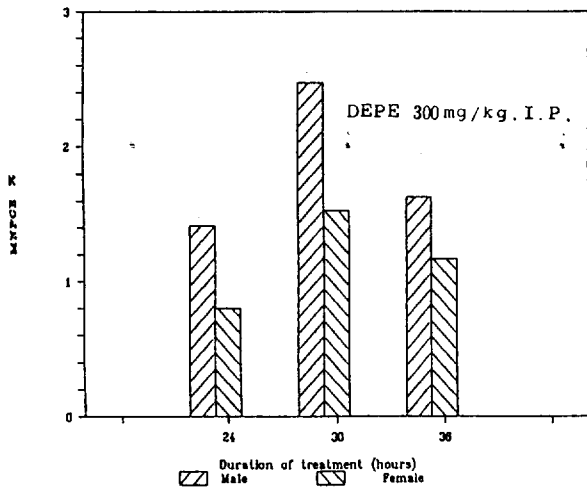


Fig. 1 Time-response and sex difference of the frequency of DEPE-induced micronuclei.

DEPE at 300mg/kg was intraperitoneally administered, and the bone marrow cells were sampled at 24, 30 and 36h after administration of DEPE.

DEPE(300mg/kg)의 투여시간 및 성별에 따른 소핵 생성 빈도를 그림 1에 나타내었다. ddY마우스에서 DEPE 투여 후 24, 30, 36 시간에 따른 각각의 소핵 생성 빈도는 male인 경우 각각 $1.42 \pm 0.06\%$, $2.47 \pm 0.31\%$ 및 $1.63 \pm 0.23\%$ 이었다. female인 경우 각각 $0.80 \pm 0.15\%$, $1.53 \pm 0.17\%$ 및 $1.17 \pm 0.14\%$ 로서 male과 female 모두 투여후 30시간에서 가장 높은 소핵 생성빈도를 나타내었다. 이에 따라 본 연구에서는 DEPE 투여 시간을 30시간으로 정하여 소핵 시험을 실시하였다. 한편 Nayak¹²⁾의 보고와 마찬가지로 female 보다 male 쪽이 다소 소핵 생성 빈도가 높은 경향을 나타내었으므로 (χ^2 test에서 유의성은 없었음) 보다 감수성이 높은 male 마우스를 소핵 시험에 사용하였다.

3.2 DEPE, HgCl₂ 및 Pb(Ac)₂의 dose-response relationship

DEPE, HgCl₂ 및 Pb(Ac)₂의 dose-response curve를 그림 2에 나타내었다. DEPE의 경우 용량 100, 200, 300mg/kg 복강 투여에서의 소핵 생성 빈도는 $0.64 \pm 0.09\%$, $1.36 \pm 0.09\%$ ($P < 0.01$), $2.47 \pm 0.31\%$ ($P < 0.01$)로서 조추출물(crude extract) 임에도 불구하고 용매로 사용한 DMSO에 비해 높은 염색체 손상 효과(clastogen-

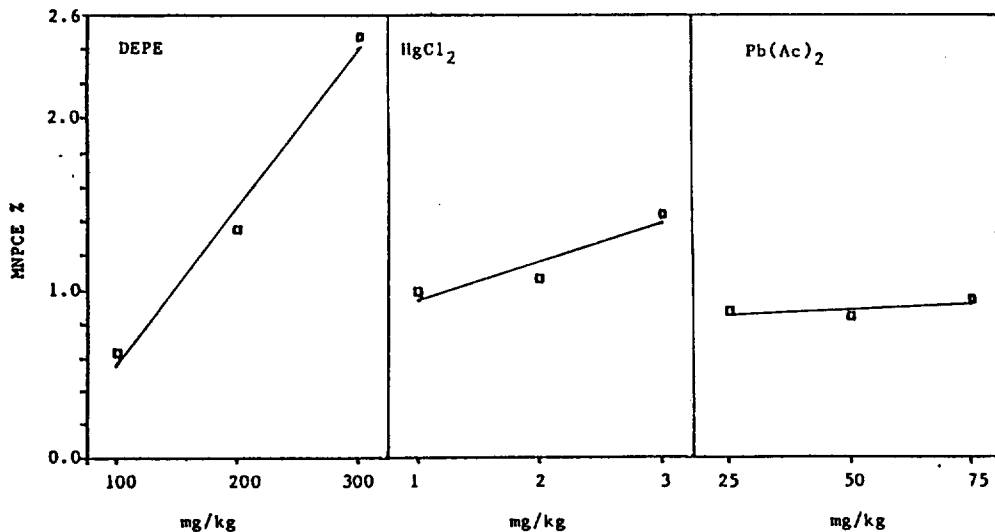


Fig. 2 Dose-response curves in the frequency of DEPE, HgCl₂ and Pb(Ac)₂-induced micronuclei.

ic effect)를 나타내었으며, dose-response curve는 $Y = -0.34 + 0.00915X$ ($r = 0.993$)으로서 용량에 따른 높은 상관계수를 갖고 있었다. DEPE의 변이원성에 대해서는 Ames test결과 S-9 mix에 의한 대사 활성화를 요구하지 않는 직접 변이원성 물질(direct mutagen)이 존재하고 있으며, nitro-PAH와 강한 상관성을 갖고 있다는 것이 밝혀졌다.¹³⁾ 포유류 동물세포를 이용한 시험인 CHO세포¹⁴⁾, human lymphocyte¹⁵⁾등을 이용한 자매 염색 분체 교환(sister chromatid exchanges)에서도 양성 결과가 보고되고 있다. 또한 Odagiri는¹⁶⁾ 디젤 배기가스의 만성 폭로에 의해 마우스 골수 소핵 유발작용이 나타났다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 DEPE가 *in vivo*에서 소핵 생성빈도가 높게 나타났으며 dose-dependent 한 경향을 나타내므로서 생활 환경중 디젤 배기가스 방출에 의한 유전 독성에 유의해야 한다고 판단되었다. $HgCl_2$ (LD_{50} 5mg/kg, I.P. mouse)¹⁷⁾를 5일간 용량 1, 2, 3mg/kg/day 복강 투여시 소핵 생성 빈도는 각각 $0.99 \pm 0.14\%$ ($P < 0.01$), $1.06 \pm 0.17\%$ ($P < 0.01$) 및 $1.43 \pm 0.06\%$ ($P < 0.01$)로서 대조군(tap water)에 비해 높은 clastogenic effect를 나타내었다. 또한 dose-response curve는 $Y = 0.72 + 0.22 X$ ($r = 0.931$)로서 용량에 따른 높은 상관성을 나타내었다.

Verschaeve등은¹⁸⁾ *in vitro* human lymphocyte chromosome aberration test에서 $HgCl_2$ 와 CH_3HgCl 은 모두 염색체 이상을 나타내었다고 보고 하였으며, Khera¹⁹⁾ Leonard²⁰⁾ 등도 수은 화합물의 clastogenic effect를 보고한 바 있다. 수은 화합물은 세포 분열시 spindle tubulin과의 상호작용에 의해 염색체의 정상적 분리에 영향을 미친다고 알려져 있다.²¹⁾ micronucleus test에 의해 관찰되는 micronucleated polychromatic erythrocyte(MNPCE)는 유사 분열시 염색체 손상에 의하여 탈핵에도 불구하고 erythrocyte중에 남게 되는 핵잔류물로서 clastogenic effect에 기인하기 때문에 유전 독성효과가 용량 의존적으로 나타나게 된 것으로 보인다.¹¹⁾

$Pb(Ac)_2$ (LD_{50} 120mg/kg, I.P. mouse)¹⁷⁾는 5일간 용량 25, 50, 75mg/kg/day 투여시 소핵 생성 빈도가 각각 $0.86 \pm 0.17\%$ ($P < 0.05$), $0.83 \pm 0.09\%$ ($P < 0.01$) 및 $0.92 \pm 0.12\%$ ($P < 0.01$)로서 대조군(tap water)에 비해 다소 높은 clastogenic effect를 나타내었지만 dose-dependent 한 경향을 보여주지 않았다. 알려진 바에 의하면 $Pb(Ac)_2$ 1% 함유 diet를 먹인 마우스로부터 얻은 leucocyte culture에서 gap-break type의 chromosome aberration이 증가하였다고 보고되어 있다.²²⁾ 또한 실험동물에서도 납화합물은 kidney와 testis에 암을 유발한다고 보고되어 있다.²³⁾ 본 실험에서도 $Pb(Ac)_2$ 는 비교적 높은 용량에서 clastogenic effect를 갖는 화합물로 판단되었다.

생활 환경중에는 본 실험의 대상 중금속인 수은과 납 화합물이 다양한 농도와 형태로 존재하기 때문에 앞으로 보다 넓은 농도범위에서의 *in vivo* 유전 독성연구가 필요하다고 보여진다.

3.3 $HgCl_2$, $Pb(Ac)_2$, B(a)P 및 DEPE 등의 병용효과

DEPE가 $HgCl_2$, $Pb(Ac)_2$ 또는 B(a)P등과의 병용 투여에 의한 소핵 생성빈도를 표 1에 나타내었다. DEPE 단독 투여에 있어서 소핵 생성 빈도는 $1.36 \pm 0.09\%$ 이었으나, $HgCl_2$ 를 5일간 투여 후 DEPE 투여시 소핵 생성빈도는 $1.56 \pm 0.25\%$ 로 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았으며, $Pb(Ac)_2$ 5일간 투여 후 DEPE 투여시에서는 $1.39 \pm 0.01\%$ 로서 DEPE 단독 투여시 보다 다소 증가하였다. 본 시험에 사용한 DEPE는 조추출물(crude extract)로서 용매 200mg/kg에서 1.36% 의 소핵 생성 빈도를 나타내고 있는 것으로 보아 DEPE 중에서 nitro-PAH 등의 강한 변이원성 물질이 함유되어 있는 것으로 판단된다. 한편 $HgCl_2$ 및 $Pb(Ac)_2$ 를 각각 5일간 투여 후 B(a)P 및 DEPE 병용 투여한 군에 있어서는 각각 $1.80 \pm 0.10\%$ 및 $1.89 \pm 0.15\%$ 로 나타내었으며 병용 투여시 상승작용은 나타나지 않았지만 유전 독성 효과는 점차 증가하는 경향을 나타내는 것으로 보인다.

Table 1. The combined effects of DEPE, HgCl₂, Pb(Ac)₂ and B(a)P in the micronucleus test.

Compound	Dose (mg/kg)	Number of mice tested	MNPCE (%) ^d				
			Individual	Value	Mean	S.D.	
Tap water		3	0.00	0.29	0.38	0.22	0.16
DMSO ^a	0.1ml	3	0.49	0.60	0.50	0.53	0.05
DEPE ^b	200	3	1.48	1.32	1.27	1.36	0.09
B(a)P ^c	150	3	1.45	1.39	1.45	1.43	0.03
HgCl ₂ 5 days + DEPE	50 + 200	3	1.51	1.29	1.89	1.56	0.25
Pb(Ac) ₂ 5 days + DEPE	50 + 200	3	1.39	1.39	1.39	1.39	0.00
B(a)p + DEPE	150 + 200	2	1.68	1.71		1.70	0.01
HgCl ₂ 5 days + B(a)P + DEPE	2 + 150 + 200	2	1.70	1.89		1.80	0.10
Pb(Ac) ₂ 5 days + B(a)P + DEPE	50 + 150 + 200	3	1.99	2.00	1.67	1.89	0.15

a. Dimethyl sulfoxide

c. Benzo(a)pyrene

b. Diesel emission particle extract

d. Micronucleated polychromatic erythrocyte (%)

4. 결 론

디젤분진 추출물, HgCl₂ 및 Pb(Ac)₂의 단독 투여 및 병용 투여에 있어서 유전 독성을 조사하기 위하여 mouse bone marrow micronucleus test를 실시하였다. 디젤분진 추출물은 용량 100, 200, 300mg/kg(I.P.)에서 dose-dependent한 높은 염색체 손상효과를 나타내었다. HgCl₂만이 용량 1, 2, 3mg/kg(I.P.)에서 dose-dependent relationship을 보여 주었다. 한편 HgCl₂ 또는 Pb(Ac)₂를 5일간 연속 복강 투여후 디젤분진 추출물 병용 투여시에는 디젤분진 추출물 투여시보다 염색체 손상 효과가 다소 증가하였으나 유의성은 없었다. (본 논문의 일부는 제7회 대기보전학회에서 발표하였음) (原稿接受 '89.3.13)

(1985), A human cell line sensitive to mutation by particle-borne chemicals, *Mutation Res.*, 157, 71-75.

- Manabe, Y., Kinouchi, T. and Ohnishi, Y., (1985), Identification and quantification of highly mutagenic nitroacetoxypyrenes and nitrohydroxypyrenes in diesel-exhaust particles, *Mutation Res.*, 158, 3-18.
- Bechtold, W.E., Henderson, T.R. and Brooks, A.L., (1986), Isolation, identification and bacterial mutagenicity of 2-nitro-9-fluorenone from diesel-exhaust particle extracts, *Mutation Res.*, 173, 105-109.
- McCoy, E.C., Rosenkranz, E.J., Rosenkranz, H.S. and Mermelstein, R., (1981), Nitrated fluorene derivatives are potent frameshift mutagens, *Mutation Res.*, 90, 11-20.
- Hisamatsu, Y., Tetsuji, T., Tanabe, K. and Matsushita, H., (1986), Mutagenicity of the photochemical reaction products of pyrene with nitrogen dioxide, *Mutation Res.*, 172, 19-27.
- Krishna, G., Nath, J., Soler, L. and

참 고 문 헌

- Rosenkranz, H.S., (1987), Diesel emissions revisited: Is the carcinogenicity due to a genotoxic mechanism?, *Mutation Res.*, 182, 1-4.
- Crespi, C.L., Liber, H.L., Behymer, T.D., Hites, R.A. and Thilly, W.G.,

- Ong, T., (1986), Comparative *in vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of airborne particle extract in mice, *Mutation Res.*, 171, 157~163.
8. Moller, M., Hagen, I. and Ramdahl, T., (1985), Mutagenicity of polycyclic aromatic compounds(PAC) identified in source emissions and ambient air, *Mutation Res.*, 157, 149~156.
 9. Hadnagy, H., Seemayer, N.H. and Tomingas, R., (1986), Cytogenetic effects of airborne particulate matter in human lymphocytes *in vitro*, *Mutation Res.*, 175, 97~101.
 10. Tokiwa, H., Nakagawa, R. and Horikawa, K., (1985), Mutagenic/carcinogenic agents in indoor pollutants; the dinitropyrenes generated by kerosene heaters and fuel gas and liquefied petroleum gas burners, *Mutation Res.*, 157, 39~47.
 11. Schmid, W., (1975), The micronucleus test, *Mutation Res.*, 31, 9~15.
 12. Nayak, B.N., (1985), Fluorodeoxyuridine-induced sex differences in baseline sister-chromatid exchanges in C57BL/6 mice and Chinese hamsters, *Mutation Res.*, 143, 45~19.
 13. Rosenkrana, H.S., (1982), Direct-acting mutagens in diesel exhausts: magnitude of the problem, *Mutation Res.*, 10, 1~10.
 14. Li, A.P. and Royer, R.E., (1982), Diesel exhaust particle extract enhancement of chemical-induced mutagenesis in cultured Chinese hamster ovary cells: Possible interaction of diesel exhaust with environmental carcinogens, *Mutation Res.* 103, 349~355.
 15. Liber, H.L., Andon, B.M., Hites, R.A. and Thilly, W.G., (1981), Diesel shoot: Mutation measurements in bacterial and human cells, *Environ. Int.*, 5, 281~284.
 16. Odagiri, Y., (1988), Detection of the cytogenetic effect of air pollutants by the micronucleus test: Micronucleus induction by diesel exhaust and cigarette smoke, *J. Japan Soc. Air Pollut.*, 23(2), 92~102.
 17. The International Technical Information Institute, (1979), Toxic and hazardous, Industrial Chemical safety manual, Tokyo
 18. Verschaeve, L., Kirsch-Volders, M., Hens, L. and Susanne, C., (1985), Comparative *in vitro* cytogenetic studies in mercury-exposed human lymphocytes, *Mutation Res.*, 157, 221~226.
 19. Khera, K.S., (1979), Teratogenic and genetic effects of mercury toxicity, in: Nriagu, N. (Ed.), *The biogeochemistry of mercury of the Environment*, 503~518, Elsevier, Amsterdam.
 20. Leonard, A., Jacquet, P. and Lauwerys R.R., (1983), Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds, *Mutation Res.*, 114, 1~18.
 21. Verschaeve, L., Kirsch-Volders, M. and Susanne, C., (1984), Mercury induced segregation and in indian muntjac cells, *Toxicol. Lett.*, 21, 247~253.
 22. Clayton, G.D. and Clayton, F.E., (1980), *Patty's industrial hygiene and toxicology*, 1704~1705, John Wiley & Sons, New York.
 23. 石館守三編, (1979), *生活環境と發がん*, 朝倉書店, pp.172.