

산화적스트레스에 대한 노출척도로서 뇨중 8-Hydroxyguanine adduct의 측정

유아선¹ · 김윤신² · 모인필³ · 마응천⁴ · 조명행^{1*}

¹서울대학교 수의과대학 독성학교실, ²한양대 의과대학,
³농림부 수의과학연구소, ⁴서울대학교 천연물과학연구소

Detection of Urinary 8-Hydroxyguanine Adduct as Exposure Biomarker for Oxidative Stress

Ah-Sun You¹, Yoon-Shin Kim², In-Pil Mo³, Woongchon Mar⁴ and Myung-Haing Cho^{1*}

¹Lab. of Toxicol., Coll. of Vet. Med., Seoul National University, Korea

²Coll. of Med., Hanyang University, Korea

³Vet. Res. Inst., Department of Agriculture and Forestry, Korea

⁴Natural Products Research Institute, Seoul National University, Korea

(Received June 27, 1998)

(Accepted September 15, 1998)

ABSTRACT : Oxidative stress by reactive oxygen species (ROS) damages cellular DNA, RNA, proteins, lipids and others causing various diseases such as cancer, arthritis, and heart diseases. 8-Hydroxyguanine (8-OHG) is one of the products formed from DNA or RNA damaged by ROS. Since high amounts of 8-OHG can be excreted in urine, it may serve as a potential biomarker indicating the level of oxidative damage to nucleic acids. Residents in industrial area with severe air pollution are expected to be affected by higher level of oxidative stress from pollutants like polyaromatic hydrocarbons (PAHs), etc. Smokers are also expected to be damaged by higher level of oxidative stress from cigarette smoke components like PAHs than non-smokers. To examine if the determination of the urinary concentration of 8-OHG could be used as exposure biomarker for the oxidative stress caused by air-pollutants, this study was performed to determine and compare the urinary concentrations of 8-OHG in smokers and non-smokers, or non-polluted area residents and polluted area residents. Urine samples were collected and purified by a strong cation exchange and cellulose partition column, then analyzed by HPLC with electrochemical detector at 600 mV potential. Concentrations of urinary 8-OHG in non-smokers and smokers of Seoul area college male students were determined as 15.12 ± 9.68 (ng/mg creatinine) and 34.72 ± 11.72 (ng/mg creatinine), respectively, showing significantly higher level of 8-OHG in smokers than in non-smokers. Urine samples of elementary school students were collected from Sokcho area, which is known to be non-polluted, and 3 representative polluted areas; Yocheon industrial area, Ulsan urban and Ulsan industrial area. The concentrations of 8-OHG in these samples were 12.42 ± 8.27 (ng/mg creatinine, Sokcho), 22.55 ± 9.12 (ng/mg creatinine, Yocheon), 17.41 ± 2.30 (ng/mg creatinine, Ulsan urban), 55.04 ± 39.73 (ng/mg creatinine, Ulsan industrial). Thus, samples from polluted area tend to have higher level of 8-OHG and the levels of Yocheon and Ulsan industrial area were significantly higher than that of Sokcho area. The results indicate that the residents of polluted industrial area or smokers are more severely exposed to oxidative stress probably caused by air pollutants like PAHs. Thus, the determination of urinary 8-OHG concentration could be used as biomarker for the extent of body exposure to oxidative stress caused by various pollutants.

Key Word : 8-hydroxyguanine, Oxidative stress, Biomarker

I. 서 론

지구의 환경 오염은 날로 심각해지고 있으며 그로

인한 생태계 파괴 또한 큰 문제로 대두되고 있다. 오존층의 파괴로 자외선에 노출될 위험이 더욱 커지고 있으며 농약사용과 공장의 폐수 등에 의한 토양과 물의 오염과 매연으로 인한 공해가 인간의 생명을 위협할 상황에 이르렀다.

*To whom correspondence should be addressed

8-Hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)와 8-hydroxyguanine(8-OHG)은 oxygen radical에 의하여 야기되는 DNA의 산화적 손상시 형성되는 adduct 중의 하나이다 (Cesar 등, 1990). $O_2^{\cdot-}$ (singlet oxygen), H_2O_2 (hydrogen peroxide), $\cdot OH$ (hydroxyl radical) 등은 주로 세포내 산소 호흡과정에 의하여 생성되어 강한 반응성을 가지기 때문에 reactive oxygen species(ROS)라 불린다. 이러한 ROS 물질들을 처리하는 여러 가지 방어기구(catalase, peroxidase, superoxide dismutase 등)가 세포내에 존재하지만, 이 방어기구에 의하여 완전히 처리되지 못하는 ROS는 여러 가지 세포내 구성물질과 반응하여 세포손상을 일으킬 수 있다. ROS에 의한 이러한 손상은 암, 심장질환, 백내장 등의 여러 가지 질병을 일으키는 주요한 요인 중 하나이며 세포와 신체의 노쇠화를 일으킨다(Janieson, 1989; Fridovich, 1978; Shigenaga 등, 1989). ROS 물질들은 특히 세포 내의 DNA에 영향을 줄 수 있는데, 주로 이중 나선구조의 바깥쪽에 노출되어 있는 DNA의 염기와 free radical이 반응하면서 손상을 준다. 손상된 DNA는 DNA repair system에 의해 일정부분 복구된다(Helbock 등, 1998). 공장이나 자동차 등의 매연, 환경공해 물질 중 많은 polyaromatic compound(PAHs)들은 대사과정을 거치면서 free radical을 형성하며, 특히 guanine 염기와 반응하기 쉽다. 그 과정을 간략히 고찰하면 guanine의 8번 탄소 위치가 수산화 되면서 DNA adduct가 형성되고(Kasai 등, 1986; Kasai 등, 1984), 손상된 DNA는 endonuclease 중의 염기 특이적인 glycosylase에 의해 손상된 염기가 제거되고 새로운 염기가 삽입됨으로서 복구될 수 있다(Rold n-Arjona 등, 1997). 이 때 제거되어 나오는 산물이 8-OHdG와 8-OHG이며 이들은 혈액을 통하여 운반되고 궁극적으로 뇨중으로 배설된다. 따라서 조직에서 DNA를 직접 추출하거나 혈액을 채혈하여 8-OHdG와 8-OHG를 측정할 수 있으며 뇨중의 농도와 비교하여 볼 수 있다(Park 등, 1992). 그러므로 ROS를 형성하는 물질에 대한 신체의 노출정도를 평가하기 위한 하나의 biomarker로서 뇨중의 8-OHdG와 8-OHG를 사용할 수 있다.

Oxygen radical들은 DNA 뿐만 아니라 RNA도 손상시키며 DNA에 비해 세포 안에 다량 존재하는 RNA의 guanine base에 hydroxylation이 일어나고 복구되는 과정에서는 8-OHG만이 생성된다. 따라서 뇨중의 8-OHdG와 8-OHG양을 비교하면 8-OHG의 수치가 훨씬 높고 8-OHdG와는 달리 8-OHG는 strong cation exchange resin에 결합되므로 두 화합물을 쉽게 분리할 수 있다(Suzuki 등, 1995). 또한 동위원소를 이용하여 internal

standard를 잡아야 하는 번거로움과 renal system에서의 뇨 회석률에 의한 차이를 제거하기 위하여 뇨중의 크레아티닌을 측정함으로써 8-OHG의 수치를 비교할 수 있다. 크레아티닌은 크레아틴에서부터 유도되며 아미노산 질소의 배설형으로 중요하다. 근육에 주로 존재하는 크레아틴과 크레아틴인산은 매일 일정비율이 비효소적으로 탈수화되어 크레아티닌을 형성한다(Stryer, 1995). 탈수화 반응은 비가역적으로 일어나며 따라서 크레아티닌은 크레아틴과 크레아틴인산의 최종대사물로 혈액에 의하여 운반되어 뇨중에 배설되며 생성량이 거의 일정하고 그 배설량은 체내 크레아틴인산과 비례한다(성과 김, 1996). 따라서 뇨 배설량의 지표가 되는 크레아티닌의 양에 대한 8-OHG의 양의 비율을 비교함으로써 개체간의 8-OHG 배설량을 비교할 수 있다.

Xanthine oxidase에 의한 purine의 유도체인 uric acid는 8-OHG와 유사한 구조를 가지고 있으며 뇨중으로 배설된다. 8-OHG의 잔류시간과 비교하여 두 물질을 구분하기 위해 표준 uric acid peak을 관찰하였다. 본 연구에서는 흡연과 산화적 스트레스의 관계와 공단의 대기오염 지표를 인체의 뇨중에서 탐지할 목적으로 뇨중의 8-OHG의 양을 측정하였다. 성인 비흡연자와 흡연자의 8-OHG 수치를 비교하여 흡연시 산화적 스트레스에 노출되는 정도를 관찰하고 산화적 손상과 뇨중의 8-OHG 양과의 관계를 밝혀 본다. 또 비공단지역과 공단지역, 청정지역의 어린이 뇨를 비교하여 산화적 스트레스 물질에 노출되었는지 여부를 알아보고 이를 바탕으로 효율적인 biomonitoring 체계를 정착하여 위해성평가에 사용할 기초자료를 생성하고자 본 연구를 실시하였다.

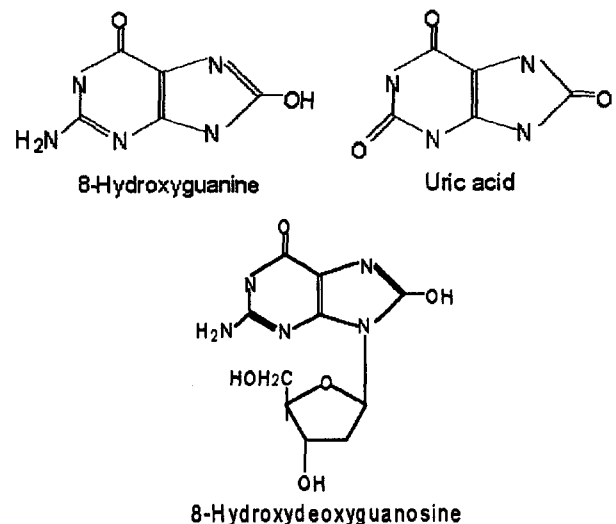


Fig. 1. Structure of 8-hydroxydeoxyguanosine, 8-hydroxyguanine, and uric acid.

II. 재료 및 방법

1. 재료

비흡연자, 흡연자의 뇨로는 21~25세의 성인 남자로서 서울지역의 대학생을 대상으로 특별한 질병이 없음을 확인한 후 채취하였다. 지역별로는 속초, 여천공단, 울산도시, 울산공단지역의 초등학생의 뇨를 사용하였으며 이 샘플은 한양대학교 산업의학 연구소에서 넘겨 받은 것으로 각 지역 초등학생들을 문진후 역시 건강하다고 판단되는 초등학생의 뇨를 채취한 것이다. 모든 샘플은 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다. Uric acid는 Sigma(USA)에서 구입하였으며 8-OHG는 미국 콜럼비아 대학(Dr. Perera 연구실에서 기증)에서, 그리고 크레아티닌 정량 kit는 영연화학(Japan)에서 구입하였다. 흡광도 측정용 1회용 cuvette는 Aldrich(USA)에서 구입하였다.

26φ×400 mm glass column과 10φ×240 mm glass column는 Pharmacia(USA)에서, AG 50W-12 resin은 BioRad(USA)에서, Whatman CF-11 resin은 Whatman(USA)에서 구입하였고 acetonitrile과 acetone, acetic acid는 HPLC grade로 Fisher Scientific(USA)에서 구입하였다. Sodium phosphate, sodium hydroxide, citric acid, sodium acetate는 reagent grade 등급 이상으로 Sigma(USA)에서, SPERISORB ODS2 column(4.6φ×250 mm)은 Phase Separations(USA)에서 구입하였다. HPLC pump와 autosampler는 Kontron(Italy)의 제품을, electrochemical detector는 ANTEC-Leyden(Netherlands)의 제품을 사용하였다.

2. 분석 방법

1) 크레아티닌 분석

뇨 샘플을 37°C water bath를 이용하여 신속히 해동시키고 부패를 막기 위하여 4°C에 보관하며 본 실험에 사용하였다. 뇨 샘플을 흔들어 준 후 15 ml conical tube를 사용하여 0.475 ml 증류수에 25 μl씩 넣어 20 배 희석하였다.

크레아티닌 정량은 Jaff reaction(Lipitskaia 등, 1989)을 이용하여 측정하였다. 간략히 기술하면 희석한 뇨 0.5 ml에 영연화학의 크레아티닌 kit 중의 제단백 정색 시약 4 ml과 kit 중의 완충용액 1.5 ml를 첨가한 후 30분간 실온에서 방치한다. 이 시간 동안 크레아티닌은 picrate solution과 반응하여 농도에 따라 노란색이 점차 붉은 노란색으로 변한다. 표준 시약과 맹검시약

을 항상 같이 측정한다. 표준시약은 kit의 크레아티닌 표준 시약을, 맹검시약은 증류수 0.5 ml을 사용한다. 30분 후 spectrophotometer(Jasco, Japan)를 이용하여 흡광도 530 nm에서 측정하였다. 크레아티닌의 표준 시약의 흡광도는 0.18~0.20의 수치를 나타냈다. 측정된 흡광도에서 맹검의 흡광도 수치를 제한 후 환산법에 의하여 계산한다. 크레아티닌의 농도 계산은 다음과 같다.

Creatinine(mg/dl)

$$= \frac{\text{Absorbance of Sample}}{\text{Absorbance of standard}} \times 5[\text{standard 농도 (mg/dl)}] \times 20(\text{노희석배수})$$

2) 8-OHG 분석

가. pH 적정

사람 뇨 시료를 phosphoric acid를 사용하여 pH 3.0으로 적정한 후 0.45 μm filter membrane(Gelman Science, USA)으로 250 ml filterware(Nalgen, USA)를 사용하여 여과하였다.

나. Strong cation column에 의한 뇨의 정제

뇨 샘플을 정제하기 위하여 strong cation exchange column을 이용하였다. 26 400 mm glass column에 10 mM sodium phosphate(pH 3.0)에 3시간 담가둔 AG 50W-12 resin을 충전시킨 후 peristaltic pump로 pressure를 가하였다. 10 mM sodium phosphate(pH 3.0) solution을 관류하여 안정시킨 후 시료를 적용하였다. Column의 충전제는 사용 후 20% EtOH에 보존하였다. Column을 사용하는 동안 얼음으로 샘플과 용액을 4°C로 유지하도록 하였다. pH 3.0으로 적정한 뇨를 column에 적용하고 10 mM sodium phosphate(pH 3.0) solution, 500 ml을 관류하여 washing하고 다시 20 mM sodium phosphate(pH 5.0) solution, 200 ml을 관류하여 재차 washing 한다. 충전제에 흡착되어 있는 8-OHG를 분리하기 위하여 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) solution, 500 ml을 관류한 후 fraction을 모두 모아서 동결 건조하였다.

다. Cellulose partition column에 의한 뇨의 재정제

동결 건조로 완전히 건조시킨 후 잔여물을 acetonitrile/water(9/1, v/v) 5 ml에 녹여 0.45 μm filter(Gelman, USA)로 여과하였다. Cellulose partition column(10φ×240 mm glass column)을 사용하기 위하여 Whatman CF-11 resin을 acetone에 3~4시간 담가 둔다. 충전제를 충전시킬 때는 acetonitrile을 사용하였다. Acetonitrile/water(9/1, v/v)로 1시간 관류시킨 후 샘플을 적용하고 acetonitrile/

water(9/1, v/v), 100 ml을 다시 관류시킨 다음 acetonitrile/water(7/3, v/v), 150 ml을 관류하면서 그 fraction을 모았다. Fraction을 speed vacuum(Uniequip, Germany)으로 건조하여 증류수 5 ml에 녹여 0.45 μ m filter로 여과하였다. 여과한 샘플은 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

라. HPLC/ECD를 이용한 분석방법

8-OHG를 분석하기 위하여 SPERISORB ODS2 column(4.6 ϕ × 250 mm)을 사용하였다. 25 μ l sample을 injection하여 12.5 mM citric acid, 25 mM sodium acetate, 10 mM acetic acid, 30 mM sodium hydroxide, pH 5.1을 이동상 용매로 하여 1 ml/min의 속도로 관류하였다. 뇨 중 8-OHG는 ECD를 이용하여 측정하였으며 electrode의 potential은 600 mV로 하였다.

마. 농도 계산

뇨 중 8-OHG의 농도는 HPLC 머무름 시간을 바탕으로 하여 다음 공식을 이용하여 표시한다.

$$\begin{aligned} & 8\text{-OHG}(\text{ng/mgCreatinine}) \\ &= \frac{[8\text{-OHG}(\text{ng/ml}) \times 5 \text{ ml}]}{[\text{creatinine}(\text{mg/dl}) \times \text{volume of urine}(\text{ml})/100 \text{ ml}]} \end{aligned}$$

바. 통계 처리

모든 자료는 평균치와 표준편차를 바탕으로 한 Student's *t*-test를 이용하여 각 군간의 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 8-OHG 분석

8-OHG standard peak의 머무름 시간은 9분대였으며 uric acid peak의 머무름 시간은 5분대에서 관찰하였다(Figs. 2 and 3). 그리고 사람 뇨중에서의 8-OHG peak은 Fig. 4와 5에 나타나 있으며, 8-OHG의 뇨중 배설량은 Fig. 6의 표준곡선을 바탕으로 농도를 구하였다. 21~25세 성인 남성으로서 흡연자와 비흡연자의 뇨에서 8-OHG를 측정하여 산화적 스트레스에 대한 노출 정도를 비교하였다. 성인 비흡연자의 뇨 중 8-OHG의 수치는 15.12 ± 9.68 ng/mg creatinine), 흡연자의 수치는 34.72 ± 11.72 (ng/mg creatinine)로 흡연자에서 현저하게 높은 수치를 나타냈다(Fig. 7). 속초지역의 어린이 뇨 중 8-OHG 수치는 12.42 ± 8.27 (ng/mg creatinine, Fig. 8), 여천공단지역은 22.55 ± 9.12 (ng/mg creatinine, Fig. 8), 울산도시지역은 17.41 ± 2.30 (ng/mg creatinine, Fig. 8), 울산공단지역은 55.04 ± 39.73 (ng/mg creatinine, Fig. 8)

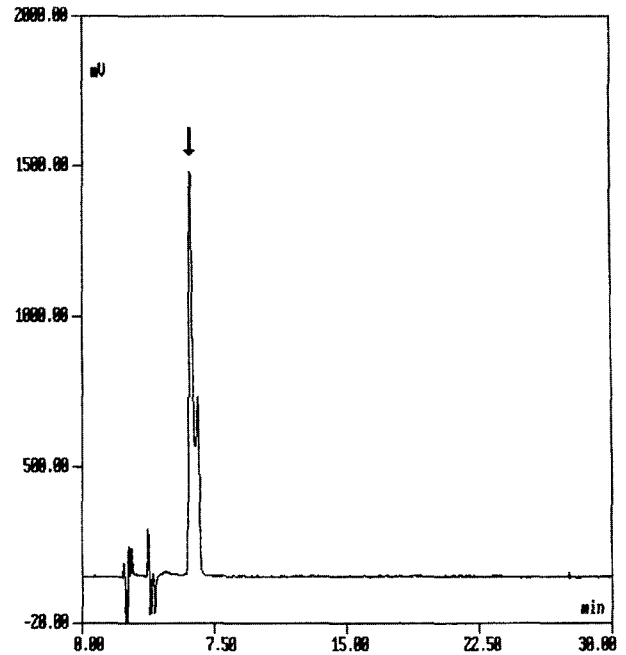


Fig. 2. HPLC chromatogram of uric acid. Peak of uric acid is indicated by an arrow at the retention time of 5 min. Twenty-five μ l sample was injected and eluted with 12.5 mM citric acid, 25 mM sodium acetate, 10 mM acetic acid, and 30 mM sodium hydroxide at a flow rate of 1 ml/min. The applied potential for the electrode in ECD was normally adjusted at 600 mV.

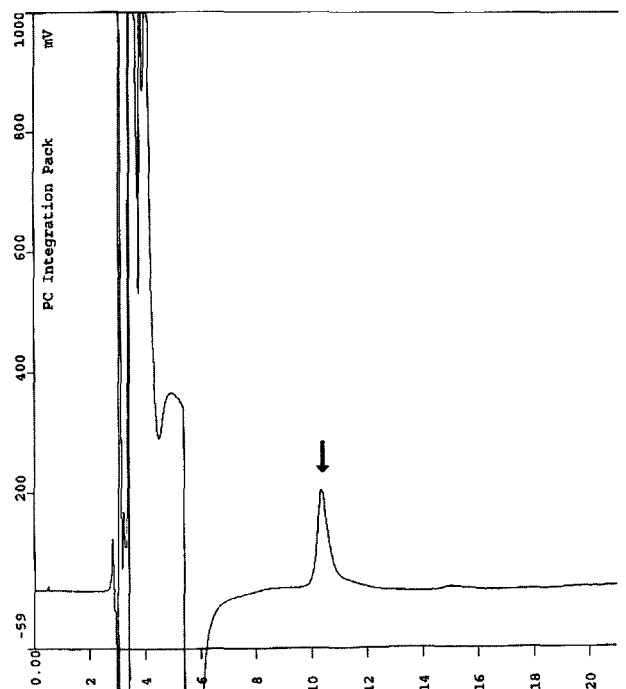


Fig. 3. HPLC chromatogram of 8-OHG standard. Peak of 8-OHG standard is indicated by an arrow at the retention time of 9 min. Twenty-five μ l sample was injected and eluted with 12.5 mM citric acid, 25 mM sodium acetate, 10 mM acetic acid, and 30 mM sodium hydroxide at a flow rate of 1 ml/min. The applied potential for the electrode in the ECD was normally adjusted at 600 mV.

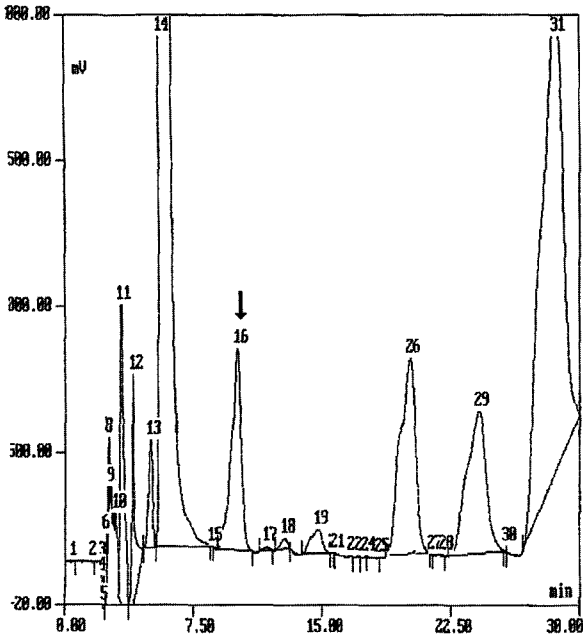


Fig. 4. HPLC chromatogram of smoker's urine. Peak of urinary 8-OHG is indicated by an arrow at the retention time of 9 min. Twenty-five μ l sample was injected and eluted with 12.5 mM citric acid, 25 mM sodium acetate, 10 mM acetic acid, and 30 mM sodium hydroxide at a flow rate of 1 ml/min. The applied potential for the electrode in the ECD was normally adjusted at 600 mV.

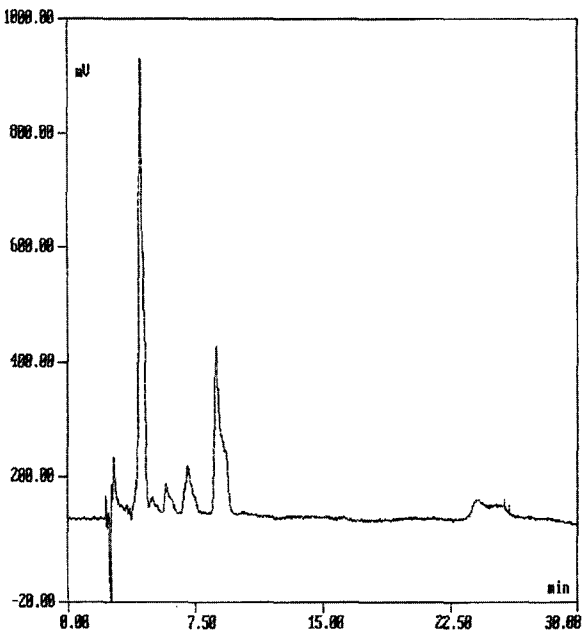


Fig. 5. HPLC chromatogram of children's urine in Yocheon area. Peak of urinary 8-OHG is indicated by an arrow at the retention time of 9 min. Twenty-five μ l sample was injected and eluted with 12.5 mM citric acid, 25 mM sodium acetate, 10 mM acetic acid, and 30 mM sodium hydroxide at a flow rate of 1 ml/min. The applied potential for the electrode in the ECD was normally adjusted at 600 mV.

으로 나타났다. 속초지역을 대조군으로 하여 비교하여 보면 여천공단지역의 수치가 유의적($p < 0.05$)으로 높았

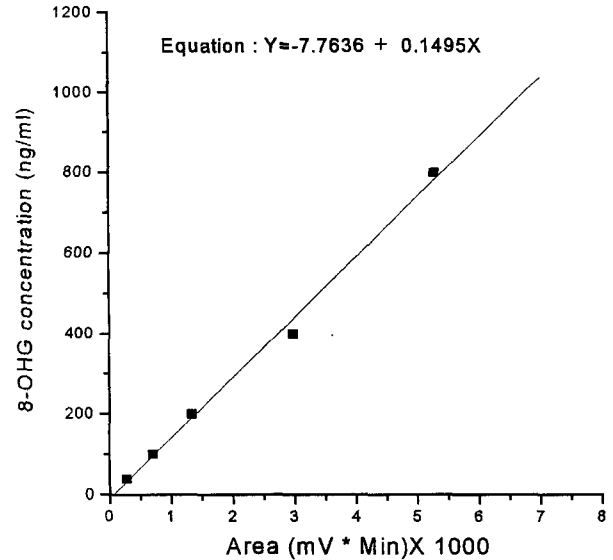


Fig. 6. 8-OHG standard curve in HPLC/ECD. Standard solution was diluted from 10 ng/ml to 800 ng/ml. Graph was fitted linear method. r^2 is 0.998. Equation is 'Y=-7.7636+0.1495X'.

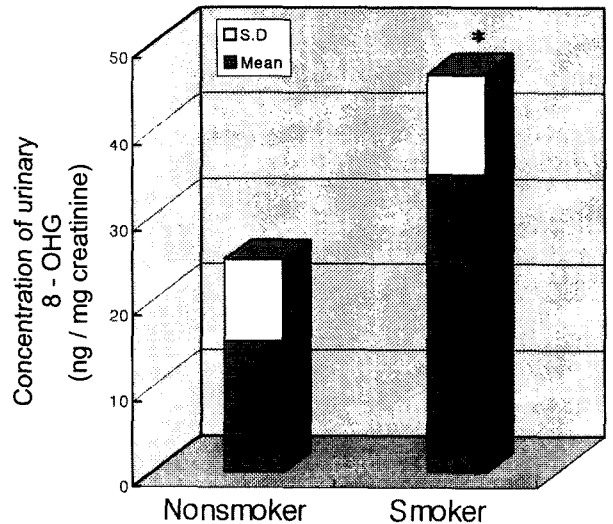


Fig. 7. Concentrations of urinary 8-OHG adducts of nonsmokers and smokers. Values represent mean \pm S.D. for detection of urinary 8-OHG in each group (n=6). Please see materials & methods for detailed information. '*' indicates a significant difference from two groups only ($p < 0.05$), Student's *t*-test.

으며 울산도시지역은 높은 수치를 나타냈으나 유의성은 없었고 울산공단지역은 유의적($p < 0.05$)으로 높았다. 울산도시지역과 공단지역을 비교하였을 때 울산공단지역이 높은 수치를 나타냈으나 유의성은 없었다. 청정지역으로 속초지역 어린이가 노를 전체에 대한 음성대조군으로 하여 각 지역을 비교한 결과 공단과 울산 도시, 울산 공단지역은 비교적 높은 수치를 보였으며 울산지역의 도시와 공단을 비교하였을 때 공단지역의 초등학교 노에서 높은 수치를 보였다(Figs. 7 and 8).

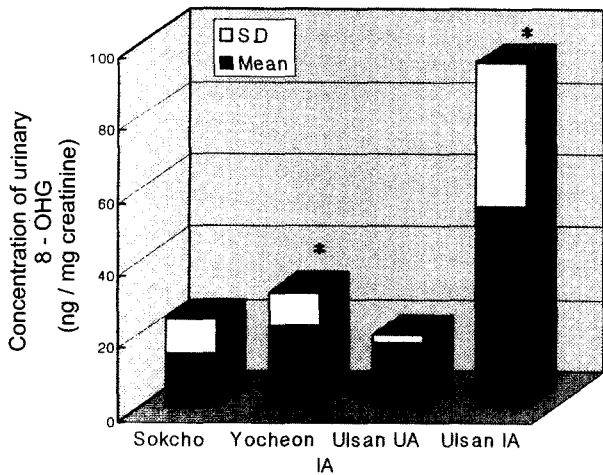


Fig. 8. Concentrations of urinary 8-OHG adducts of Children in different areas. Values represent mean±S.D. for the urinary 8-OHG in Sokcho (n=7), Yocheon IA (n=11), Ulsan UA (n=5), Ulsan IA (n=5). Please see materials & methods for detailed information. * indicates a significant difference from Sokcho only ($p < 0.05$), Student's *t*-test. IA : Industrial area, UA : Urban area.

IV. 고 찰

Hydroxyl radical이나 singlet oxygen, superoxide anion radical, hydrogen peroxide 등과 같은 ROS (Pryor, 1986)는 reactive oxygen agents에 노출되었을 때 체내 대사과정 (Nunes 등, 1995)을 거쳐 형성되며 세포 내에서는 이러한 ROS를 반응성이 없는 형태로 전환시키는 효소적 또는 비효소적 방어 작용이 있다. 그러나 이러한 방어기전에 의하여 처리되지 않은 ROS는 세포 내 여러 물질, 특히 DNA와 반응하여 산화적 손상을 일으킬 수 있다 (Richter 등, 1988). 생체 내에서는 DNA endonuclease와 같은 enzyme이 repair system의 하나로 손상된 DNA를 복구하는데, 예를 들면 산화된 염기에 특이적으로 작용하는 DNA glycosylase가 있다 (Bessho 등, 1993). 핵산은 reactive oxygen radical과 반응하여 산화적 손상을 받게되어 adduct를 형성하며 8-hydroxyguanine DNA glycosylase와 N-methylpurine-DNA glycosylase는 DNA adducts에서 8번 위치가 수산화된 guanine 부위를 제거하여 8-OHG를 형성한다 (Engelward 등, 1997; Hang 등, 1997; Charkreavarti 등, 1991; Fig. 9).

Guanine의 8번 탄소위치가 수산화된 8-OHG는 DNA 복제시 cytosine이 아닌 adenine과 결합할 수 있어 template에 존재하는 경우 G→T mutation을 일으킬 수 있고, 세포 내 존재하는 손상된 8-OHGdGTP는 A : T 결합에서 thymine 대신 adenine과 결합하여 A→C mutation을 일으킬 수 있으며 (Bessho 등, 1992; Cheng 등, 1992), 암이나 심맥관계 질병, 면역결핍질환, 뇌기능 부전, 백

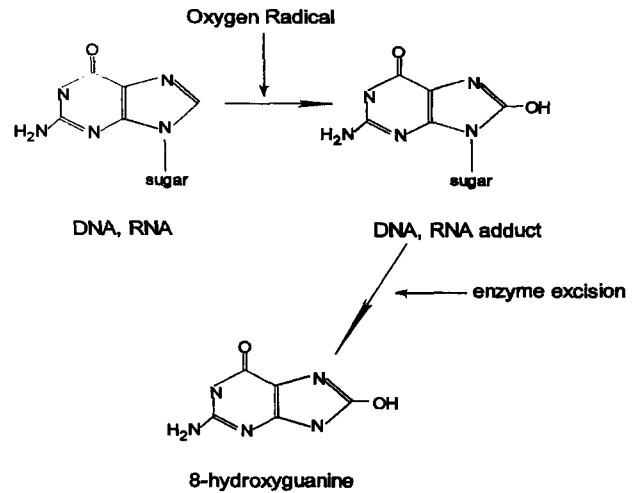


Fig. 9. Formation of 8-hydroxyguanine.

내장, 관절염 등, 그 밖의 노화와 관련된 질병에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (Ames 등, 1993).

산화적스트레스에 노출된 정도를 측정하는 여러 가지 방법 중에서 DNA 손상 측면에서 8-OHG를 측정하여 노출정도를 보았다. 8-OHG는 DNA에서만 형성되는 8-OHdG와는 달리 DNA와 RNA에서 모두 형성되어 뇨중으로 배설되는 양이 많아 측정이 용이하다 (Suzuki 등, 1995). 그리고 처리 과정에서 immunoaffinity column과 비교하여 보면 immunoaffinity column은 8-OHG에 대한 antibody가 필요하며 affinity의 기준을 잡기 위하여 동위원소를 사용하여야 하는 번거로움이 있는데 비하여 (Yin 등, 1995), 본 실험에 사용한 방법은 strong cation resin을 이용하여 8-OHG가 산성 조건에서 흡착되는 반면 8-OHdG는 전혀 흡착되지 않고 빠져나가는 것을 이용하여 쉽게 분리할 수 있다. 8-OHG는 8-OHdG에 비하여 식이에 영향을 많이 받는 단점이 있으나 위에서 언급한 장점이 있기 때문에 ECD를 이용하여 미량의 8-OHG를 측정할 수 있었다.

흡연과 산화적 스트레스의 관계를 보여 주는 것으로 흡연자와 비흡연자의 뇨에서 8-OHG를 측정한 결과 흡연자가 더 많은 산화적 스트레스를 받는 것으로 나타났다. Suzuki 등 (1995)의 흡연자와 비흡연자에 대한 뇨중 8-OHG를 측정된 결과에 의하면 흡연자는 3.81 ± 1.93 (ng/mg creatinine), 비흡연자는 7.41 ± 1.47 (ng/mg creatinine)로 역시 흡연자가 비흡연자에 비하여 높은 수치를 나타냄을 볼 수 있었다. 본 실험의 결과와 비교하여 보면 비흡연자와 흡연자에서 약 5배정도 낮은 수치를 나타내는데 이러한 차이는 지역적인 차이, 전반적인 대기 오염의 차이, 음식문화의 차이, 흡연정도에 따른 것으로 생각된다.

흡연시 담배가 연소할 때 발생하는 연기에는 benzo(a)pyrene, nitrosamine, naphthylamine 등의 체내에서 O₂을 형성하는 물질과 hydroquinone, catechol 등과 그리고 *in vitro* 실험에서 H₂O₂를 형성하는 것으로 알려진 물질이 함유되어 있다. 흡연에 의하여 O₂와 H₂O₂가 세포 내에 축적되는 경우 Fenton reaction이나 Fenton type Haber-Weiss reaction 에 의하여 활성이 강한 OH로 전환되어 세포내 산화적 손상을 일으킬 수 있다 (Leanderson과 Tagesson, 1992; Nakayama 등, 1984).

공단지역의 환경 오염에 관심이 집중되면서 여천공단의 집단이주가 실시되기도 하였는데 여천공단의 90여개 업체가 석유화학 관련 계열 공장들을 가동 중이므로 휘발성 유기화합물에 의한 오염정도가 심각할 것으로 예상되며 따라서 이곳의 주민들은 산화적스트레스에 많이 노출될 것으로 예상된다. 또한 울산지역은 석유화학 업체가 약 150여개, 자동차 공장 등의 1차 금속기계장비 업체가 약 600개, 비금속 광물업체가 약 50개이며 연간 연료 사용량이 3,456,141 (kl/year)로 reactive oxygen agents에 노출될 확률이 높다 (Fig. 10 참조). 여천과 울산의 사망률과 원인을 보면 여천지역은 백혈병과 고혈압성 질환에 의한 사망이 많고 울산지역은 허혈성 심질환과 만성 및 상세불명 기관지염에 의한 사망이 높게 나타났다. 또한 초등학교 학생을 대상으로 한 폐기능 조사 결과 울산공단지역이 속초지역보다 대기오염의 영향이 큰 것을 나타내었다. 울산지역의 대기 중의 PAHs의 농도를 측정된 결과 chrysene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene 등이 높게 나타났다 (김, 1997). 울산지역 석유화학계열 특성에 따른 산화적스트레스에 대한 노출

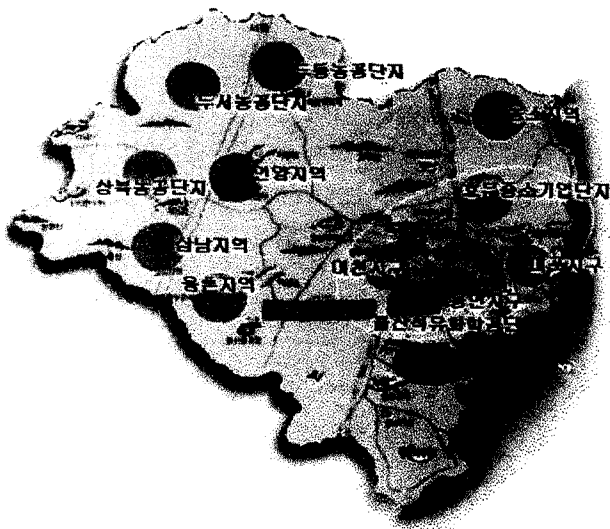


Fig. 10. Map of industrial area in Ulsan.

정도를 알아보기 위하여 청정지역으로 대조군으로 선정한 속초지역, 휘발성 유기화합물의 오염이 예상되는 여천공단지역, 인접해 있는 공단과 주거지역인 도시에서의 어린이 뇨를 분석하였다.

8-OHG의 수치에 영향을 줄 수 있는 다른 인자들인 흡연, 간접흡연, 나이에 따른 노화 등을 최대한 제거하기 위하여 초등학교 학생의 뇨를 채취하였다. 간접흡연시에도 DNA가 산화적 손상을 받으며 이는 담배 끝에서 생성되는 연기 (side stream smoke)에도 저온에서 연소되어 불완전 연소된 물질들, semivolatle phenols, quinones, aldehydes, ketones, PAHs 등의 reactive oxygen agents가 포함되어 있기 때문이다 (Howard 등, 1998). 식이에 따른 영향도 볼 수 있는데 탄 음식, 불완전 연소된 물질이 함유되어 있는 음식을 섭취하는 경우 산화적 스트레스를 받을 수 있으며 이와 반대로 과일이나 야채에 함유되어 있는 항산화제로 ascorbate, tocopherol, carotenoid 등을 섭취하는 경우 산화적 손상을 줄일 수 있기 때문이다 (Ames 등, 1993; Rehman 등, 1998).

속초지역을 음성대조군으로 하여 관찰하면, 여천공단과 울산공단은 속초지역과 비교하여 유의적으로 높은 수치를 가졌다. 울산도시지역과 공단지역을 비교하여 보았을 때 공단지역이 높은 수치를 보였으나 유의성은 없었다 (Fig. 8). 그러므로 대규모 공장 단지가 없는 속초지역 어린이들은 산화적 손상을 일으킬 수 있는 여러 인자들, 식이나 UV같은 ionizing radiation 등의 영향에 의한 차이를 고려하더라도 도시나 공단지역에 비하여 산화적스트레스에 덜 노출되었음을 볼 수 있었다 (Fig. 8). 비흡연자인 성인 20대 남자보다도 여천공단, 울산도시, 울산공단지역의 어린이 뇨에서 8-OHG의 농도가 높은 수치를 보이는 것으로 미루어 이 지역 어린이들이 산화적 스트레스에 더 많이 노출되었음을 추측할 수 있다. 따라서 산화적 스트레스를 일으키는 물질들이 이 지역에 더 많다는 것을 추론할 수 있다 (Figs. 7 and 8).

본 실험에서는 8-OHG를 공해에 의한 산화적 스트레스 물질에의 노출정도를 평가하는 biomarker로 사용할 수 있는지 그 가능성을 보기 위해 적은 수의 샘플로 측정하였다. 그러므로 울산공단지역의 수치는 표준편차가 크게 나는 경향이 있는 등 확정적인 결론을 내리기 힘들지만 대체로 오염 정도가 심한 지역의 샘플에서 8-OHG의 수치가 높게 나오는 경향을 보여 8-OHG가 우리 나라의 환경 공해에 의한 위해성평가에 이용될 가능성을 보였다. 따라서 앞으로 더 많은 샘플을 측정하는 대규모의 실험에 의하여 본 실험의 결론을 확인하는 작업이 필요하다고 본다.

Repair system에 의하여 8-OHG이 제거되지 않는 경우 돌연변이가 쉽게 일어날 수 있으며 DNA 뿐만 아니라 지방, 단백질도 산화적 스트레스를 받으므로 (Salaris와 Babbs, 1989) 계속하여 산화적스트레스에 노출될 경우 세포에 여러 가지 손상을 일으켜 질병을 유발할 수 있을 것이다. 이러한 산화적 손상정도를 간단히 알아 볼 수 있다면 질병예방에 도움이 될 것이며 질환의 원인 또한 발견하기 쉬울 것이라고 생각된다. 본 실험에서는 사람의 산화적스트레스에 대한 biomarker로서 8-OHG의 유용성을 확인할 수 있었다. 동물실험에서는 산화적 손상에 대한 biomarker로서 조직에서 DNA를 분리하여 8-OHG를 측정하거나 혈액에서 측정하고 있으나 (Park 등, 1992), 이 실험을 사람에게 적용하는 경우 조직을 구하기 쉽지 않고 혈액을 채취하는 것도 번거로운 일이므로 본 실험에서 사용한 뇨에서의 8-OHG 측정이 인체에 대한 산화적 스트레스의 biomarker로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 환경부 G-7 project에 의하여 지원받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7915-7922.
- Bessho, T., Roy, R., Yamamoto, K., Kasai, K., Nishimura, S., Tano, K. and Mitra, S. (1993): Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8901-8904.
- Bessho, T., Tano, K., Kasai, K. and Nishimura, S. (1992): Deficiency of 8-hydroxyguanine DNA endonuclease activity and accumulation of the 8-hydroxyguanine in mutator mutant (mutM) of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **188**(1), 372-378.
- Cesar, G.F., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Degan, P. and Ames, B.N. (1990): Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4533-4537.
- Charkravarti, D., Ibeanu, G.C., Tano, K. and Mitra, S. (1991): Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **266**(24), 15710-15715.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. (1992): 8-Hydroxyguanine, an Abundant form of oxidative DNA damage, Cause G→T and A→C Substitution., *The J. of Biol. Chem.* **267**, 166-172.
- Engelward, B.P., Weeda, G., Wyatt, M.D., Broekhof, J.L., de Wit, J., Donker, I., Allan, J.M., Gold, B., Hoeijmakers, J.H. and Samson, L.D. (1997): Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(24), 13087-13092.
- Fridovich, I. (1978): The biology of oxygen radicals. *Science.* **201**, 875-880.
- Hang, B., Singer, B., Margison, G.P. and Elder, R.H. (1997): Targeted deletion of alkylpurine-DNA-N-Glycosylase in mice eliminates repair of 1, N6-ethenoadenine and hypoxanthine but not of 3, N4-ethenocytosine or 8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12869-12874.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B, Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B.N. (1998): DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 288-293.
- Howard, D.J., Briggs, L.A. and Pritsos, C.A. (1998): Oxidative DNA damage in mouse heart, liver, and lung tissue due to acute side-stream tobacco smoke exposure. *Arch. Biochem. & Biophys.*, **352**(2), 293-297.
- Janieson, D. (1989): Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Radic. Biol. & Med.* **7**, 87-108.
- 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 radicals and evidence for its repair. *Carcinogen.* **7**(11), 1849-1851.
- Kasai, H. and Nishimura, S. (1984): Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents *Nucleic Acids Res.* **12**, 2137-2145.
- Leanderson, P., Tagesson, C. (1992): Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: Role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem. Biol. Interact.* **81**, 197-208.
- Lipitskaia, Ila, Kotkina, T.I., Tarasov, A.V. and Titov, V.N. (1989): A kinetic method of determining creatinine using the Jaffe reaction. *Lab Delo* **2**, 37-42.
- Nakayama, T., Kodama, M. and Nagata, C. (1984):

- Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion radical from cigarette smoke. *Gann* **75**, 95-98.
- Nunes, F.A., Kumar, C., Chance, B. and Brass, C.A. (1995): Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. Mechanisms of free radical formation in the liver. *Dig. Dis. Sci.* **40(5)**, 1045-1053.
- Park, E.M., Shigenaga, M.K., Degan, P., Korn, T.S., Kitzler, J.W., Wehr, C.M., Kolachana, P. and Ames, B.N. (1992): Assay of excised oxidative DNA lesion: Isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89(8)**, 3375-3379.
- Pryor, W.A. (1986): Oxy-radical and related species: their formation, lifetimes, and reaction *Annu. Rev. Physiol.* **48**, 657-667.
- Rehman, A., Collis, C.S., Yang, M., Kelly, M., Diplock, A.T., Halliwell, B. and Rice-Evans, C. (1998): The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 293-298.
- Richter, C, Park, J.W. and Ames, B.N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(17)**, 6465-6467.
- Roldán-Arjona, T., Wei, Y.F., Darter, K.C., Klungland, A., Anselmino, D., Wang, R.P., Augustus, M. and Lindahl, T. (1997): Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8901-8020.
- Salaris, S.C. and Babbs, C.F. (1989): Effect of oxygen concentration on the formation of malonaldehyde-like material in a model of tissue ischemia and reoxygenation. *Free Radic. Biol. & Med.* **7**, 603-610.
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J. and Ames, B.N. (1989): Urinary 8-hydroxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9697-9701.
- Stryer, L. (1995): Biochemistry 4th ed., W. H. Freeman and Company, New York, 446-448.
- Suzuki, J., Inoue, Y. and Suzuki, S. (1995): Change in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generation substances. *Free Radic. Biol. & Med.* **18(3)**, 431-436.
- Yin, B, Whyatt, R.M, Perera, F.P., Randall, M.C., Cooper, T.B. and Santella, R.M. (1995): Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radic. Biol. & Med.* **18(6)**, 1023-1032.
- 김윤신 (1997): 공단지역 대기오염물질의 위해성 평가 및 관리기술. 미 발표.
- 성호경, 김기환 (1996): 생리학, 제 6판, 의학문화사, 307-308.