

## 단세포전기영동법으로 평가한 흡연자의 백혈구 DNA 손상

선수진 · 정해원<sup>1</sup> · 한정호\*

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소, <sup>1</sup>서울대학교 보건대학원

### Smoking Related DNA Damage in Human Lymphocytes Assessed by the Comet Assay

Soo Jin Sun, Hai Won Chung<sup>1</sup> and Jung Ho Han\*

Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center,  
Seoul National University, Seoul 110-799 Korea

<sup>1</sup>Graduate School of public Health, Seoul National University, Seoul 110-799 Korea

(Received April 15, 2002 / Accepted June 10, 2002)

**ABSTRACT :** The single cell gel electrophoresis (comet) assay is one of the useful tools for the study of genetic damage in humans exposed to environmental mutagens and carcinogens. This study was undertaken to evaluate the status of DNA damage in peripheral lymphocytes depending on their sex, age, smoking habits, and other factors in normal healthy Korean population. The 99 volunteers included in the study and out of these, 36 volunteers were smoker and 63 volunteers were non-smoker aged between 20-59 years. All individual answered a questionnaire that assessed their general information including smoking habits and the extent of the environmental tobacco smoke (ETS) exposure, and blood samples were obtained. There was a statistically significant difference in the extent of DNA damage between smoker and non-smoker ( $p < 0.001$ ). A significant difference was also observed between male and female ( $p < 0.001$ ) and amongst the different group of age ( $p < 0.005$ ), however, correlation analysis showed that only smoking habit was a significant factor for DNA damage. No significant effect of smoking duration, number of cigarettes smoking a day, SPY (smoke pack years) in smokers and environmental tobacco smoke exposure in non-smokers on the status of DNA damage was observed.

**Keywords :** smoking, environmental tobacco smoke, DNA damage, single cell gel electrophoresis, comet assay

## 서 론

담배연기에는 약 40여종의 발암물질과 많은 세포독성물질이 함유되어 있어서 폐암과 여러 질병의 원인이 된다(Venis 등, 1993; McLaughlin 등, 1995). 직접흡연 뿐만 아니라 비흡연자가 생활환경 중의 담배연기(environmental tobacco smoke, ETS)에 노출되는 간접흡연의 폐해에 대해서도 지난 10여 년 간에 걸쳐 호흡기질환, 생식세포 유전자 손상, 조산 및 사산 위험도 증가 등 많은 역학조사 결과가 보고되었다(Seidman 등, 1990; Fortier 등, 1994; Jenkins 등, 1996; Zenzes 등, 1999). 이와 같이 여러 역학 조사가 흡연의 위해를 보여주었으나 보다 직접적인 근거가 될 DNA 손상 등 분자 수준에서의 연구는 그 예가 많지 않으며, 또한 흡연자

의 DNA 손상에 대해서도 비흡연자와 유의한 차이가 있다거나(Betti 등, 1994 & 1995; Dhawan 등, 2001) 또는 없다는(Wojewodzka 등, 1999; Andreoli 등, 1997) 등 서로 일치하지 않은 결과를 보고하고 있어서 아직 실험적으로 명확히 밝히지는 못하고 있다.

염색체 수준에서 유전독성은 염색체이상분석(chromosome aberration), 자매염색체교환분석(sister chromatid exchange) 등의 방법으로 평가하여 왔으며(Wojewodzka 등, 1999), 최근에는 단세포전기영동법(single cell gel electrophoresis, comet assay)의 이용이 증가하고 있다(Hellman 등, 1997; Tice 등, 2000; 김과 정, 2001; 이 등, 2001). 단세포전기영동법은 유해화학물질 노출, 환경오염, 식이습관, 생활양식과 질병 등 다양한 원인(Dhawan 등, 2001)에 의해 일어나는 DNA 손상정도를 개개의 세포 수준에서 감지할 수 있는 방법으로, 흡연의 유전독성을 평가하는데 자매염색체교환분

\*To whom correspondence should be addressed

석보다 더 민감한 방법으로 평가되고 있다(Betti 등, 1994, 1995). 본 연구에서는 단세포전기영동법을 이용하여 건강한 한국인에서 흡연력, 연령 및 성별 등에 따른 DNA 손상 정도를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 연구대상

직업적으로 환경유독물질에 노출되지 않은 건강한 20-50대의 일반인 총 99명(34.0±10.0(mean±SD)세, 20~59세)이 자의로 연구에 참여하였다. 대상자는 자기기입식 설문 조사를 통하여 개인의 일반적 특성, 커피음용량 및 음주량, 흡연자의 경우 흡연기간(년), 하루 흡연량(개피) 등의 흡연력, 비흡연자의 경우 과거흡연여부, 금연연수 및 직장과 가정에서의 일상적인 간접흡연 노출 정도를 조사하였다. 간접흡연 노출의 조사는 '없다', '조금', '보통', '많다'의 4점척도를 활용하였으나, 척도간의 계량화가 어렵고 답변에 주관적 요소가 크게 작용되었을 것으로 생각되어 통계분석은 '없다', '있다'의 2점척도로 하였다.

성별 분포를 보면 남성이 59명, 여성이 40명이었으며, 연령별로는 20대가 38명, 30대가 33명, 40대가 13명, 50대가 15명이었다. 흡연자가 36명으로 평균 흡연기간은 15.0±10.3년(0.8~40년)이었고, 하루흡연량은 평균 13.9±6.1개피(1~20개피) 이었다. 비흡연자는 63명으로 이중에 금연자가 10명 있었고, 금연자의 최소 금연연수는 9개월이었으나 대부분(8명)은 금연한지 2년이 지난 것으로 나타났다. 주당 음주량(병) 조사에서는 300 ml 소주를 기준으로 하였으며, 맥주(500 ml) 3병은 소주(300 ml) 1병으로 환산하였다.

### 혈액 시료

본 실험에는 전혈 시료를 활용하였으며(Wojewodzka 등, 1998), 손가락 끝 부위에서 말초혈액 15 µl 정도를 heparinized capillary tube에 채취하여 500 µl의 ice-cold serum-free RPMI 1640 배양액(GIBCO)에 섞어 준 후, 즉시 시료 당 2개의 슬라이드를 준비하고 단세포전기영동을 시행하였다.

### 단세포전기영동

본 실험은 Singh 등(1988)의 방법에 준해 시행하였고, 전 과정은 암실에서 시행하여 실험 과정 중의 추가적인 DNA 손상을 방지하였다. Normal melting point agarose(NMA, A0576), low melting point agarose(LMA, A4018) 등 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma사 제품을 사용하였으며, Triton X-100, N-lauroyl sarcosine-Na, Trizima base, NaCl은 molecular biology용 시약을 사용하였다.

### 슬라이드의 준비 및 세포용해

RPMI 배양액에 섞은 cell suspension을 37~42°C의 1% LMA와 동량으로 섞은 후, 80 µl(6,000~10,000 cells)를 취하여 1% NMA-precoated slide위에 떨구고 coverslip(25×50 mm)을 덮었다. 슬라이드를 얼음 위에 올려놓은 편편한 알루미늄 트레이에서 agarose가 굳도록 10분간 방치하였다. Coverslip을 제거한 후 80 µl의 0.55% LMA를 떨구고, coverslip을 덮어 역시 알루미늄 트레이에서 10분간 굳혔다. 슬라이드를 30분 이상 냉장시킨 cold lysis buffer(2.5M NaCl, 100 mM EDTA-2Na, 10 mM Tris base, 1% N-lauroyl sarcosinate, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10)에 담가 차광을 하고 0~4°C에서 1시간 동안 세포용해를 유도하였다.

### 전기영동

Lysis 후에 슬라이드를 3차 증류수로 가볍게 세척하고 10분간 cold 1 mM EDTA용액에 담가 lysis 용액 및 salt를 제거시킨 후, 전기영동 완충액(300 mM NaOH, 1 mM EDTA-2Na, pH>13)에 20분간 담구어 DNA unwinding과 alkali-labile site의 노출을 유도하였다. 슬라이드를 전기영동 장치로 옮긴 후, 차가운 전기영동 완충액을 채우고, 차광 조건 하에서 28 V(0.8 V×35 cm), 300 mA에서 20분간 전기영동하였다. 전기영동 과정 중에는 완충액의 수위를 조절하여 전류를 300 mA로 유지하였고 또한 완충액은 순환시켜서 salt gradient를 최소화시켰다. 전기영동 완료 후 중화 완충액(0.4 M Tris-HCl, pH 7.5)으로 8분씩 3회 중화시킨 후, 슬라이드를 100% 메탄올에 1시간 동안 담가둔 후 공기 중에서 건조시켰다.

### 염색 및 관찰

슬라이드를 건조시킨 후 50 µl의 ethidium bromide (20 µg/ml)로 염색하고 형광현미경(Zeiss Axiolab)이 부착된 image processing system(ChIPS-FISH ver 3.0, GenDix, Korea)으로 관찰하였다(515-560 nm excitation, 590 nm barrier filter, 400배). 슬라이드 당 50개(시료당 100개)의 세포를 무작위로 선택하여 이미지를 캡처하고, 이미지 분석 프로그램(Scion Image, Scion Corporation, MD)으로 head를 포함해 tail까지의 total comet length를 µm단위로 측정하였다. 손상된 세포의 빈도는 현미경 하에서 DNA 손상이 가시화되는, total comet length가 22.8 µm 이상인 세포의 백분율로 계산하였다.

### 정도관리

정도관리로서 비흡연자이며 직장과 가정에서의 담배연기에 노출이 거의 없는 26세의 여성 1명(control-1)과 50세의 남성 1명(control-2)의 말초혈액 시료를 control cell로서 매 실험 batch마다 분석하였다. 그 결과 한번의 실험 batch

에서 1회 100개 comet length 평균치를 8회 반복 측정된 within-batch CV(coefficient of variation)는 control-1이 1.84%(22.6±0.42(mean±SD)μm), control-2는 2.94%(24.6±0.72 μm)이었다. 한편 매 실험 batch마다 control 시료를 1회 측정된 between-batch CV는 control-1이 5.04%(n=15, 22.4±1.13 μm), control-2는 4.50%(n=7, 25.5±1.15 μm)이었다.

**통계처리 및 분석**

SPSS 통계프로그램을 이용하여 t-test, ANOVA test 및 상관분석을 시행하였다. 상관분석시 성별, 흡연여부 등의 변수는 0과 1로 가변수(dummy variable)화 하여 분석하였다.

**결 과**

**흡연과 성별, 연령에 따른 DNA 손상 비교**

흡연자와 비흡연자의 comet length(μm)와 손상된 세포의 빈도는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되어서, 흡연자의 평균 comet length는 비흡연자에 비하여 8% 정도, 그리고 손상된 세포의 빈도는 29% 정도 높은 것으로 조사되었다(표 1). 하루 커피음용량이나 음주량에 따른 comet length와 손상된 세포의 빈도는 유의한 차이가 없었으나, 단지 주당 음

주량이 소주 2병 이상인 군과 음주를 하지 않는 군 사이에는 유의한(p<0.05) 차이가 관찰되었다. 한편 성별과 연령에 따라서는 comet length나 손상된 세포의 빈도에 유의한 차이가 있는 것으로 관찰되었다.

그러나 흡연 여부를 보정한 상관관계(표 2) 분석 결과에서는 성별, 연령, 음주량 등이 comet length나 손상된 세포의 빈도와 아무런 상관관계가 없음을 보여서 앞의 몇 가지 variable에서 관찰된 차이가 흡연력의 혼란작용으로 인한 것이었음을 보여주었다. 흡연력을 보정한 comet length와 손상된 세포의 빈도 사이에는 r=0.824의 높은 상관관계를 보였다.

흡연 여부와 연령에 따라 대상자를 4군으로 나누어 comet length나 손상된 세포의 빈도를 비교한 결과는 그림 1과 같았다. 비흡연자에서 40세 미만과 40세 이상 군 사이의 comet length나 손상된 세포의 빈도의 차이는 통계적으로 유의하지 않았으며, 흡연군에서도 연령에 따른 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 40세 이상 및 미만 군 모두에서 흡연자는 40세 미만의 비흡연자보다 comet length나 손상된 세포의 빈도가 유의하게(p< 0.005) 높은 것으로 관찰되었다.

**흡연량과 간접흡연에 따른 DNA 손상 분석**

흡연자에서 흡연량에 따라 DNA 손상차이를 분석한 결과, 총흡연기간, 하루흡연개피수, SPY(smoke pack years, 20

**Table 1.** Comparisons of DNA damage by sex, age, coffee intake, drinking and smoking in total subjects

Groups (N)	Comet length (μm)			Frequency of damaged cells (%)		
	Mean±SE	95% CI <sup>a</sup> for mean	p Value <sup>b</sup>	Mean±SE	95% CI <sup>a</sup> for mean	p Value <sup>b</sup>
<b>Sex</b>						
Male (59)	25.3±0.27	24.8~25.8	0.000	49.2±1.69	45.8~52.6	0.000
Female (40)	23.6±0.30	23.0~24.3		39.1±1.81	35.5~42.8	
<b>Age (year)</b>						
20-29 (38)	24.9±0.37	24.1~25.6	0.041	46.6±2.20	42.1~51.1	0.210
30-39 (33)	23.9±0.33 <sup>d</sup>	23.3~24.6		41.2±2.43	36.3~46.2	
40-49 (13)	24.4±0.53	23.3~25.6		46.3±2.82	40.2~52.5	
50-59 (15)	25.8±0.52 <sup>d</sup>	24.7~26.9		48.8±3.26	41.8~55.8	
<b>Coffee (cup/day)</b>						
None (19)	24.8±0.55	23.6~25.9	0.889	43.5±2.75	37.8~49.3	0.732
1 (25)	24.5±0.39	23.7~25.3		44.3±2.63	38.9~49.7	
≥ 2 (55)	24.7±0.33	24.1~25.3		46.0±1.88	42.3~49.8	
<b>Drinking (bottle<sup>c</sup>/week)</b>						
None (52)	24.4±0.30 <sup>e</sup>	23.8~25.0	0.073	43.5±1.66 <sup>f</sup>	40.1~46.8	0.110
1 (33)	24.5±0.35	23.8~25.2		44.8±2.54	39.7~50.0	
≥ 2 (14)	25.8±0.57 <sup>e</sup>	24.6~27.1		51.9±3.64 <sup>f</sup>	44.0~59.7	
<b>Smoking</b>						
Non-smoker (63)	24.0±0.25	23.5~24.5	0.000	40.8±1.50	37.8~43.8	0.000
Smoker (36)	25.8±0.32	25.1~26.4		52.6±2.06	48.5~56.8	

a: confidence interval.  
 b: t-test or one-way ANOVA test, 2-tailed significance.  
 c: as a bottle of Soju (300 ml).  
 d, e, f: p<0.05, 2-tailed significance between two groups.

**Table 2.** Simple and partial correlation coefficients of comet length and frequency of damaged cells with variables in total subjects

Variables	Comet length ( $\mu\text{m}$ )		Frequency of damaged cells (%)	
	Unadjusted	Adjusted for Smoking	Unadjusted	Adjusted for Smoking
Comet length ( $\mu\text{m}$ )	1.000	1.000	0.853*	0.824*
Frequency of damaged cells (%)	0.853*	0.824*	1.000	1.000
Sex <sup>a</sup>	-0.386*	-0.195	-0.373*	-0.148
Age (year)	0.153	0.115	0.074	0.024
Coffee (cup/day)	-0.001	-0.160	0.079	-0.008
Drinking (bottle/week)	0.197	0.018	0.190	-0.010
Smoking <sup>b</sup>	0.395*	-	0.430*	-

a: Dummy variable; male = 0, female = 1.

b: Dummy variable; nonsmoker = 0, smoker = 1.

\* $p < 0.001$ , 2-tailed significance.**Table 3.** Comparisons of DNA damage by smoking amounts in smokers

Groups (N)	Comet length ( $\mu\text{m}$ )			Frequency of damaged cells (%)		
	Mean $\pm$ SE	95% CI <sup>a</sup> for means	p Value <sup>b</sup>	Mean $\pm$ SE	95% CI <sup>a</sup> for means	p Value <sup>b</sup>
Smoking duration (year)						
$\leq 5$ (5)	25.6 $\pm$ 0.88	23.2~28.0	0.982	52.6 $\pm$ 5.96	36.0~69.2	0.960
6-14 (17)	25.8 $\pm$ 0.54	24.6~26.9		53.2 $\pm$ 3.59	45.6~60.9	
>15 (14)	25.8 $\pm$ 0.45	24.8~26.7		51.9 $\pm$ 2.48	46.6~57.3	
No. of cigarettes smoking/day						
$\leq 5$ (5)	26.2 $\pm$ 1.00	23.4~29.0	0.666	53.0 $\pm$ 6.68	34.5~71.5	0.383
5-10 (7)	26.4 $\pm$ 0.81	24.4~28.4		59.4 $\pm$ 3.29	51.4~67.5	
10-15 (10)	25.6 $\pm$ 0.55	24.4~26.9		52.4 $\pm$ 3.26	45.0~59.8	
15 < (14)	25.4 $\pm$ 0.52	24.2~26.9		49.3 $\pm$ 3.76	41.2~57.4	
SPY <sup>c</sup>						
$\leq 5$ (12)	26.1 $\pm$ 0.66	24.6~27.5	0.795	54.4 $\pm$ 3.82	46.0~62.8	0.724
6-10 (9)	25.7 $\pm$ 0.53	24.5~26.9		53.6 $\pm$ 4.39	43.4~63.6	
>11 (15)	25.6 $\pm$ 0.50	24.5~26.6		50.7 $\pm$ 3.04	44.2~57.2	

a: confidence interval.

b: one-way ANOVA test, 2-tailed significance.

c: smoke pack years, SPY=20 cigarettes per day per year

cigarettes per day per year)에 따라서 comet length와 손상된 세포의 빈도의 유의한 차이는 나타나지 않았다(표 3).

직장과 가정에서 간접흡연(ETS) 노출 여부에 따른 DNA 손상의 차이를 비흡연자에서 비교하였다(표 4). 남성은 직장에서 간접흡연 노출 집단과 비노출 집단 사이에 DNA 손상은 유의한 차이가 없었고, 여성에서도 직장 또는 가정에서 간접흡연에의 노출여부에 따라서는 DNA 손상에 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 남성 비흡연자 중 가정에서 간접흡연 노출이 있다고 응답한 사람은 1명으로 통계분석에서 제외하였다.

## 고 찰

본 연구는 성별과 연령에 따라 서로 상이한 결과가 보고되어 있는 흡연과 백혈구 내 DNA의 손상정도와의 관계를

평가하여, DNA 수준에서 흡연의 위해를 명확히 하기 위하여 실시되었다. 구강, 폐, 인두, 식도, 신장, 방광, 췌장, 자궁경부암 발생은 흡연과 명백한 연관성이 있다고 알려져 있으며 이러한 암 발생에 관여하는 주 요인으로 고려되고 있는 것이 흡연의 세포독성에 의한 DNA의 손상이다(Rojas 등, 1996). 흡연이 DNA 손상을 유도하는 기전은 명확히 밝혀져 있지 않지만(Zhu 등, 1999), 담배연기에 포함된 가스 혹은 압축 particle 상태의 alkenes, nitrosamines, aromatic and heterocyclic hydrocarbons, amines 등의 활성산소종(reactive oxygen species)에서 유래된 자유라디칼의 작용으로 단일가닥절단이나 염기손상 같은 DNA 손상이 일어나며, 이러한 DNA 손상이 신속히 복구되지 않는다면 암 발생에 결정적으로 기여할 것으로 생각되고 있다(Ferger 등, 1998; Piperakis 등, 1998).

흡연의 유전독성을 평가한 Betti 등(1994)은 자매염색체교

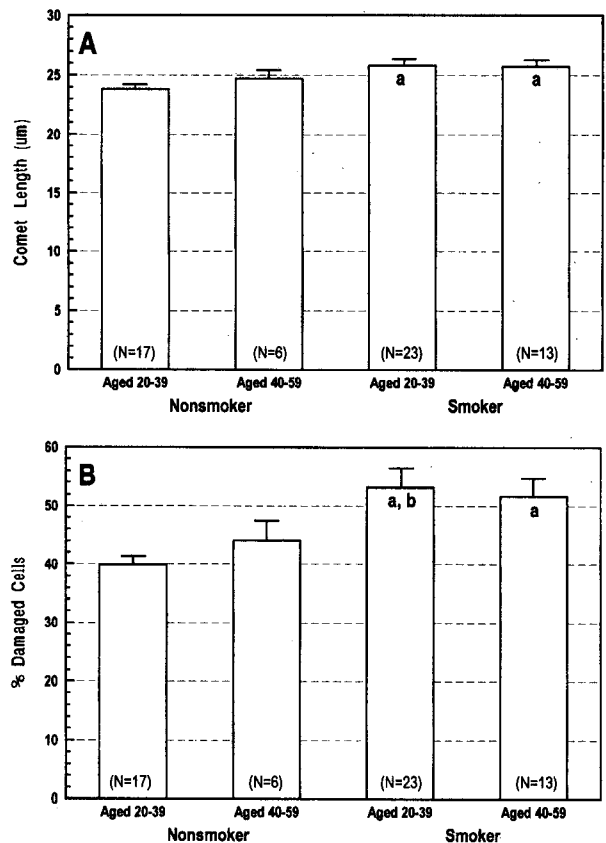
**Table 4.** Comparisons of DNA damage by environmental tobacco smoke (ETS) exposure in nonsmokers

Groups (N)	Comet length (μm)			Frequency of damaged cells (%)		
	Mean±SE	95% CI <sup>a</sup> for mean	p Value <sup>b</sup>	Mean±SE	95% CI <sup>a</sup> for mean	p Value <sup>b</sup>
<b>male</b>						
work place ETS exposure						
no exposure(16)	24.7±0.53	23.6~25.8	0.814	45.3±3.31	38.2~52.3	0.387
exposure(7)	24.5±0.74	22.7~26.3		40.3±3.76	31.1~49.5	
<b>female</b>						
work place ETS exposure						
no exposure (36)	23.3±0.25	22.8~23.8	0.153	38.5±1.93	34.6~42.4	0.306
exposure (4)	26.4±1.61	21.3~31.5		44.8±4.54	30.3~59.2	
home ETS exposure						
no exposure (21)	23.4±0.34	22.7~24.1	0.375	38.2±2.43	33.2~43.3	0.613
exposure (19)	23.9±0.52	22.8~25.0		40.1±2.75	34.3~45.9	

a: confidence interval.  
b: t-test, 2-tailed significance.

환분석 결과는 비흡연자와 흡연자간에 유의한 차이가 나타나지 않은 반면 단세포전기영동분석은 유의한 차이를 보여주어서 단세포전기영동분석이 자매염색체교환분석보다 민감한 방법이라고 평가하였고, 그 이유를 단세포전기영동분석은 휴지기의 세포를 대상으로 DNA 손상을 평가하지만 자매염색체교환분석은 복제된 세포에서 평가하기 때문이라고 설명하였다. Kalweit 등(1988)도 세포주기 중 G<sub>0</sub>기(휴지기)보다 G<sub>1</sub>기(세포성장기)의 세포가 높은 회복 능력을 가지며, 따라서 높은 효율의 회복 과정을 거치는 자매염색체교환분석이 흡연으로 인한 DNA 손상을 감지하는데 단세포전기영동분석보다 낮은 민감도를 가질 수 있다고 하였다.

본 연구에서는 단세포전기영동분석으로 비흡연자에 비해 흡연자에서 DNA 손상정도가 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다. 총 대상자를 분석한 결과 comet length와 손상된 세포의 빈도가 비흡연자에 비해 흡연자에서 유의하게 높게 나타났으며(표 1), DNA 손상과 성별, 연령, 흡연여부, 음주량 등의 몇몇 변수와의 상관성 분석 결과에서도 흡연여부만이 높은 상관관계를 갖고있음을 알 수 있었다(표 2). 또한 40세 이상과 미만 및 흡연여부로 전체 대상자를 4개 군으로 나누어 비교한 DNA 손상 정도(그림 1)도 단지 흡연 집단과 40세 미만의 비흡연 집단 간에서만 DNA 손상에 유의한 차이가 있다고 나타났다. 남성이나 일부 연령에서 DNA 손상 정도가 유의하게 높다고 나타난 것은 본 연구에 참여한 여성들이 모두 비흡연자이며 일부 연령군에서 흡연자의 비율이 높았기 때문에 흡연이 혼란요인으로 작용해 나타난 결과로 보이며, 흡연여부에 대해 보정해준 이후 성별과 연령에 따른 연관성은 소실되었다(표 2). 비흡연자 63명에 대한 분석에서도 성별에 따른 DNA 손상정도는 남성이 24.63±0.42 μm 여성이 23.64±0.30 μm로 남성에서 다소 높게 나



**Fig. 1.** Comparison of DNA damage by the categories of age and smoking in the total subjects. Vertical bars indicate the standard error of means. (a: p<0,005 when compared to the nonsmokers under 40 years, b: p<0,005 when compared to the nonsmokers over 40 years).

왔으나, 통계적 유의성은 없었다(data not shown). Betti 등(1994)도 여성보다 남성에서 comet length가 길었으나, 역시 통계적으로 유의한 차이는 발견할 수 없었다고 하였다.

단세포전기영동법을 이용해 흡연과 연령에 따른 백혈구 내 DNA 손상을 비교한 몇몇 연구 결과를 살펴보면, Betti 등(1994, 1995)은 흡연자에서 DNA 손상이 유의하게 증가하며, 연령군별로는 나이가 든 사람과 젊은 사람에서 DNA 손상이 비슷한 양상을 보인다고 하여 본 연구와 일치되는 결과를 보고하였다. 반면에 Dhawan 등(2001)은 인도인을 대상으로 흡연자에서 DNA 손상은 마찬가지로 유의하게 증가하나, 20대와 비교하여 30대, 40대, 50대의 DNA 손상이 유의한 차이를 보였다고 보고하였다. Piperakis 등(1998)은 서로 다른 두 연령 그룹을 대상으로 백혈구 DNA에서 흡연과 연령의 영향을 평가하였는데 흡연자와 고연령군에서 DNA 손상이 증가하였고 흡연이 더 강력한 영향을 미친다고 보고하였다. 본 연구에서도 흡연군에서는 저연령군과 고연령군 간에 아무런 차이가 없었으나, 비흡연군에서는 통계적인 유의성은 없었지만 고연령군의 DNA 손상 정도가 4~11% 정도 높은 것으로 관찰되어 흡연의 DNA 손상에 미치는 영향이 연령보다 훨씬 강함을 알 수 있었다. 앞의 여러 연구 결과를 종합해 볼 때 본 연구결과와 마찬가지로 DNA 손상정도에 가장 큰 영향을 미치는 것은 흡연력이라 할 수 있을 것이다. 노화가 DNA 손상에 미치는 영향에 대한 연구들이 일관된 결과를 보이고 있지는 않지만 몇몇 연구는 고연령군에서 DNA 손상이 유의하게 증가한다는 결과를 보이고 있고, 이를 설명하는 대표적인 가설은 나이가 들어감에 따라 DNA 단일가닥 절단과 염기손상은 증가하지만 동시에 회복 능력은 줄어든다는 것이다(Piperakis 등, 1998; Zhu 등, 1999; Dhawan 등, 2001). 흡연자에서 DNA 손상이 증가한다는 이들의 결과와는 달리 Andreoli 등(1997)과 Wojewodzka 등(1999)은 흡연자와 비흡연자간의 DNA 손상에 유의한 차이를 발견하지 못하였고, Wojewodzka 등(1999)은 흡연 이외의 DNA 손상의 원인이 되는 내, 외적 요인이나 세포내 손상 회복능력이 관여되었을 것으로 추정하였다.

본 연구에서는 36명의 흡연자에서 흡연량에 따른 DNA 손상정도의 차이도 비교하였는데, 총흡연기간, 하루흡연량 및 SPY(smoke pack years)로 정량한 흡연총량의 증가에 따라 DNA 손상에 유의한 차이가 나타나지는 않았다(표 3). Dhawan 등(2001)도 SPY로 정량한 흡연량의 증가에 따라 DNA 손상이 증가하는 경향은 나타나지 않았고, Betti 등(1995)과 Fernzilli 등(1997)도 DNA 손상과 흡연량 또는 하루흡연량의 연관성은 발견할 수 없었다고 보고한 바 있다. 이와 같은 결과들은 양의 과다에 관계없이 흡연이 상당한 DNA 손상을 야기함을 가리키는 것으로, Frenzilli 등(1997)

은 금연 후 DNA 손상의 변화를 관찰하기 위하여 90명의 흡연자를 1년 간 follow-up한 결과, 이 기간동안 완전히 금연을 한 사람들이 금연하지 못한 사람에 비해 DNA 손상이 유의하게 감소하는 것을 관찰한바 있어 이와 같은 사실을 뒷받침하고 있다.

간접흡연의 폐해는 노출되는 일반대중의 규모가 크기 때문에 심각한 공중보건상의 위험요소로 규정되어 있다(Jenkins 등, 1996). 본 연구에서는 간접흡연의 영향을 평가하기 위해 남성과 여성 비흡연자에서 가정 또는 직장에서 ETS 노출에 따른 DNA 손상차이를 분석하였는데 남성과 여성 모두에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다(표 4). 이는 직장과 가정에서의 일상적인 간접흡연 노출의 계량화가 어려웠고 2점척도 답변에 주관적 요소가 크게 영향을 미쳤을 가능성이 있으며, 한과 김(2000)은 ETS 노출된 비흡연자에서 nicotine의 대사산물인 뇨 cotinine 농도가 유흥업소 종사자(과대 노출자)를 제외하고는 비노출자와 유의한 차이가 없었음을 보고한 바 있다. 또한 Wojewodzka 등(1999)이 지적하였듯이 DNA 손상이 세포의 회복능력으로 신속히 복구될 만큼 ETS 노출이 적다면 유의한 차이가 관찰되지 못하였을 것이며 앞으로 간접흡연의 세포독성을 규명하는 데는 과대 노출자를 포함하는 보다 세밀한 연구가 필요하다.

## 감사의 글

이 연구는 2000년도 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소 학술지원비에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

- 김병모, 정해원(2001): 비스페놀 A 및 Diethylstilbestrol의 유전 독성 평가를 위한 염색체이상, 자매염색체교환, 소핵형성, 단일세포 겔 전기영동법의 활용. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **21**, 135-141.
- 이연경, 이도영, 이은일, 이동배, 류재천, 김해준, 설동근(2001): 단세포전기영동법(Single Cell Gel Electrophoresis Assay)을 이용한 농약 살포자의 DNA손상 평가. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **21**, 128-134.
- 한정호, 김성균(2000): 흡연자와 비흡연자의 뇨 cotinine 농도에 관한 연구. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **20**, 75-81.
- Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. (1997) Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat Res.* **377**(1), 95-104.
- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. (1994): Microgel electrophoresis assay (Comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutation Research*, **307**, 323-333.

- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. (1995): Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutation Research*, **343**, 201-207.
- Dhawan A, Mathur N, Seth P.K. (2001): The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutat Res* **474**(1-2), 121-8.
- Ferger B, Spratt C, Earl CD, Teismann P, Oertel WH, Kuschinsky K. (1998): Effects of nicotine on hydroxy free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, **358**, 351-359.
- Frenzilli G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fornai E, Giannessi L, Maggiorelli F, Paoletti P, Barale R. (1997): Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutation Research*, **375**, 117-123.
- Fortier I, Marcoux S, Brisson J. (1994): Passive smoking during pregnancy and the risk of delivering a small for gestational age infant. *Am J Epidemiol*, **139**, 294-301.
- Hellman B, Vaghef H, Friis L. (1997): Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragment in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers. *Int Arch Occup Environ Health*, **69**, 185-192.
- Jenkins RA, Palausky A, Counts RW, Bayne CK, Dindal AB, Guerlin MR. (1996): Exposure to environmental tobacco smoke in sixteen cities in the United States as determined by personal breathing zone air sampling. *J Expo Anal Env Epidemiol*, **6**, 473-502.
- Kalweit S, Vasudev V, Obe G. (1988): Liquid-holding experiments with human lymphocytes. III. Experiments with G0 and G1 cells. *Mutat Res*, **207**, 41-44.
- McLaughlin JK, Hrubec Z, Bolt WJ, Fraumeni JF Jr (1995): Smoking and cancer mortality among US veterans: a 26-year follow-up. *Int J Cancer*, **60**, 190-193.
- Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM. (1998): Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **19**(4), 695-8.
- Rojas E, Valverde M, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. (1996): DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.*, **370**, 115-120.
- Sardas S, Walker D, Akyol D, Karakaya AE. (1995): Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis techniques. *Mutat Res*, **335**, 213-217.
- Seidman DS, Ever-Hadani P, Gale R. (1990): Effect of maternal smoking and age on congenital anomalies. *Obstet Gynecol*, **76**, 1046-1049.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-191.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000): Single Cell Gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206-221.
- Veins P, Caporaso N. (1995): Tobacco and cancer: epidemiology and laboratory. *Environ Health Prospect*. **103**, 156-160.
- Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. (1998): Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation I. strand breakage. *Mutat Res*. **416**, 21-35.
- Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. (1999): Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay. *Mutat Res*. **440**, 19-25.
- Zenzen MT, Bielecki R, Reed TE. (1999): Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril*, **72**, 330-335.
- Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ, Wei BX, Lou X, Liu WW, Lao XQ, Chen YH. (1999): Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the Comet assay. *Mutat Res*. **21**, **444**(1), 1-6.