

## 벤젠 대사산물에 의해 유도된 HL-60 세포의 8번 및 21번 염색체의 이수성 및 상호전좌

김수영 · 정해원\*  
서울대학교 보건대학원

### Detection of Benzene Metabolite Induced Aneuploidy and Translocation in HL-60 Cells by Fluorescence *in situ* Hybridization using Whole Chromosome-specific Probes for Chromosome 8 and 21

Su Young Kim, and Hai Won Chung\*  
School of Public Health, Seoul National University

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

**ABSTRACT** : Benzene is a widespread human carcinogen, inducing leukemia and hematotoxicity. Exposure to benzene metabolites has been shown to cause genetic damage, including aneusomy and chromosome aberrations. Fluorescence *in situ* hybridization(FISH) procedure was used to determine if the benzene metabolite, 1, 2, 4-benzenetriol(BT), hydroquinone(HQ) and *trans, trans*-muconic acid(t,t-MA) induced specific chromosomal change in HL-60 cells. Treatment with BT, HQ and t,t-MA resulted in the induction of monosomy 8 and 21 in HL-60 cells in a dose-dependent manner. All of these metabolites also induced trisomy 8 and 21, but no correlation between frequencies of trisomy and concentration was found. Translocations between chromosome 8 and another unidentified chromosome [t(8:?)], and between chromosome 21 and another unidentified chromosome [t(21:?) were found. However, translocation between chromosome 8 and 21 [t(8:21)] was not found. Results indicate that the benzene metabolites, BT, HQ and t,t-MA, induce chromosome specific numerical and structural aberrations, and the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) approach may be a useful and powerful technique for detection of aneuploidy.

**Keywords** : 1, 2, 4-benzenetriol (BT), hydroquinone (HQ), *trans, trans*-muconic acid (t,t-MA), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), aneuploidy

## 서 론

1897년 이래 백혈병 및 골수계통의 질환을 유발하는 것으로 알려진 벤젠에 대한 독성 연구가 그 동안 활발히 진행되어 왔으나 벤젠의 발암기전 및 백혈병 유발기전은 몇몇 가설로 추측되고 있을 뿐 아직까지 명확히 밝혀지지 않고 있다(Martyn, 1996, Ross *et al.*, 1996). 벤젠은 호흡 또는 피부접촉 등 다양한 노출경로를 통해 인체에 흡수된다. 벤젠은 직업적 노출 뿐 만 아니라 흡연, 기술린(emissions) 혹은 불완전 연소산물 등에 의한 환경적 노출에 의해 대기로부터 실내에 이르기까지 광범위하게 인체에 유해한 영향을 끼치고

있다(Wester *et al.*, 1986). 또한 벤젠 뿐 만 아니라 대사산물인 phenol, hydroquinone, catechol 및 1, 2, 4-benzenetriole 등은 모두 세포유전독성을 유발한다고 알려져 있는 환경오염 물질로서 이에 대한 환경적 감시(monitring)가 중요시 되어 왔으며, 이들은 일반적인 식품의 구성성분으로서 뿐 만 아니라, 의약품에도 흔히 이용되고 있다. Hydroquinone과 catechol은 커피와 담배에 매우 높은 농도로 존재하며 phenol은 음식물과 화장품의 구성성분으로 알려져(Marcon *et al.*, 1999, Wallace., 1989) 있어 벤젠 및 그 대사산물이 우리 주위에 널리 퍼져 있다는 사실을 추측할 수 있다.

인간과 동물을 대상으로 한 연구에서 벤젠과 그 대사산물은 염색체이상, 자매염색체교환, 소핵유발 및 DNA 손상을 유발하는 것으로 보고되고 있다(Tsutsui *et al.*, 1997).

\*To whom correspondence should be addressed

Zhang 등에 따르면 20  $\mu\text{M}$  농도의 BT를 처리한 급성아골수성 세포주인 HL-60 세포에서 방추사(spindle) 형성이 정상적으로 이루어지지 않고 삼중극(tripolar)을 형성하게 되며 농도가 증가할수록 방추사가 형성되지 않는다고 보고하고 있어, BT가 이수성(aneusomy)을 유발하는데 관여한다고 제안하고 있다(Zhang *et al.*, 1994).

실제로 사람 세포주 및 사람 림프구에 벤젠대사산물, 1, 2, 4-benzenetriol(BT) 혹은 hydroquinone(HQ) 등을 처리하여 실험적으로 5번, 7번 및 8번 염색체의 이수성을 유발한다는 것을 확인한 바 있다(Stillman *et al.*, 1997, 1999, 2000, Zhang *et al.*, 1998b, Chung and Kim, 2002). 또한 대규모 벤젠 취급 작업자들을 대상으로 한 역학조사결과에서도 백혈병환자들에게서 특이적으로 발견되어지는 것으로 알려진 염색체(5번, 7번, 8번 및 21번)의 구조적 이상 및 수적 이상이 유발된 것으로 알려져 있다(Smith *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1998a, 1999). 특히 염색체 C-group(6-12) 및 x 염색체에서 이수성이 특이적으로 발생한다는 보고가 있으며(Erdogan and Aksoy, 1973, Le Beau, 1990), 또한 Acute myeloleukemia (AML) 환자에게서 발견되어지는 8번 염색체와 21번 염색체간 상호전좌 [t(8;21)]가 벤젠에 노출된 사람에게서 발견되는 것으로 보고되고 있다(Smith, *et al.*, 1998).

이러한 연구결과는 벤젠 노출로 인한 특정염색체의 획득 또는 손실로 나타나는 이수성 및 8번 염색체와 21번 염색체간 상호전좌[t(8;21)]가 벤젠 노출로 인한 암발생에 특이적으로 관여할 수 있다는 가능성을 추정할 수 있게 하는 근거가 된다.

염색체이상 분석은 물리·화학적 환경오염물질의 유전독성을 평가하는 생물학적 지표로서 오랫동안 이용되어 왔다. 그러나 일반 염색체이상 빈도는 특정 위험물질에 대한 유전독성을 평가할 수 있다기보다는 모든 위해물질에 대한 영향 정도를 나타낼 수 있었을 뿐이다. 따라서 특정한 유해물질의 노출로 인한 특정 염색체의 변화를 찾을 수 있다면 유해물질에 특이적인 지표로서 활용 가능성이 매우 클 것으로 판단되지만 현재까지는 개발된 지표가 별로 없다. 기존의 염색체이상 분석은 숙련된 기술 및 많은 시간을 요구하는 등의 단점을 가지고 있으나, 비교적 최근에 개발된 fluorescence *in situ* hybridization(FISH)기법은 이러한 단점을 보완해 주고 있다. 특히 FISH기법은 기존의 염색체이상 분석에서는 관찰이 불가능했던 특정 염색체 부위의 구조적 이상, 즉 상호전좌와 삽입 등은 물론 특정 염색체의 수적 이상도 보다 정확하고 빠르게 관찰할 수 있다. 즉 사람의 염색체 각각을 자기 다른 색깔의 형광물질로 표지시켜 특정 염색체의 수가 증가되는 ploidy 및 결실 그리고 염색체끼리의 상호전좌를

확실히 구분할 수 있어 FISH기법은 각종 유전병과 암의 진단 및 치료 후 예후판정에까지 이용되는 등 그 활용성이 증대되고 있다(Eastmond *et al.*, 1995, Natarajan *et al.*, 1996).

따라서 본 연구에서는 벤젠대사산물인 1, 2, 4-benzenetriol (BT), hydroquinone(HQ) 및 *trans,trans*-muconic acid(t,t-MA)를 처리한 HL-60세포에서 벤젠 노출에 의해 특이적으로 나타나는 8번 및 21번 염색체의 수적·구조적 염색체 이상을 FISH기법을 이용하여 조사하고, 이를 벤젠 노출의 생물학적 지표로서 활용가능성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 세포배양

본 실험에서는 사람의 급성아골수성 백혈병 세포주인 HL-60세포 (Korean Cell Line Bank: KCLB)주를 사용하였다.

### 벤젠 대사산물 1, 2, 4-benzenetriol(BT), hydroquinone (HQ) 및 *trans, trans*-muconic acid (t,t-MA) 처리

사람의 급성아골수성 백혈병 세포주인 HL-60세포주(Korean Cell Line Bank: KCLB)를 10% 우태아혈청(GIBCO)과 100 unit/ml의 penicillin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 streptomycin을 포함하는 RPMI 1640(GIBCO) 배지에서 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 항온기에 24시간 배양 후 벤젠대사 산물을 농도별로 처리하여 37°C 항온기에서 48시간 배양하였다. 즉 벤젠대사 산물인 HQ, BT 및 t,t-MA를 10, 20, 30 및 40  $\mu\text{M}$ 의 농도로 각각 처리하였다.

### 염색체 표본 작성

벤젠대사산물이 처리된 HL-60세포에 표본작성 3시간 전에 colcemid를 처리하고 저장액(0.075 M KCl)에 15분간 처리 후 고정시켜(methanol:acetic acid=3:1) 염색체 표본 슬라이드를 작성하였다.

### 벤젠 대사산물에 의한 HL-60 세포의 세포 생존률

배지가 함유된 T25 플라스크에 HL-60세포를 같은 수로 분주한 다음 벤젠 대사산물 BT, HQ 및 t,t-MA를 농도별로 처리한 후 48시간 동안 CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하고 나서 농도별로 생존한 세포수를 측정하였다. 세포 생존률은 대조군에서의 생존세포수에 대한 처리군에서의 생존 세포수의 비로 표현하였다(Bornfreund and Puerner, 1983).

### FISH(fluorescence *in situ* hybridization)

본 실험에서는 Spectrum Green이 표지된 8번 염색체

WCP probe(Vysis)와 Spectrum Orange가 표지된 21번 q 염색체 WCP probe(Vysis)를 이용하여 직접법에 의해 FISH를 수행하였다(Smith *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1998a).

#### 염색체 슬라이드 준비

준비된 슬라이드를 2×SSC(Sodium chloride, Sodium citrate) 용액에 37°C에서 15분씩 2번 방치한 후 상온의 70%, 85%, 100% Ethanol series에서 각각 2분씩 탈수과정을 거치도록 했다. 탈수된 슬라이드는 73±1°C에서 5분간 70% formamide/2×SSC 용액에서 변성(Denaturation)시킨 후 -20°C의 70%, 85%, 100% ethanol에서 각 2분씩 거친 후 상온에서 건조하였다.

#### DNA probe 준비

Spectrum Green으로 표지된 8번 염색체 WCP probe (Vysis) 1 µl, Spectrum Orange로 표지된 21q 염색체 WCP probe 1 µl, WCP hybridization buffer 7 µl 및 1 µl 증류수를 섞어 만든 hybridization mix는 어두운 상태에서 73±1°C에서 5분간 변성시킨 후, hybridization시키기 전까지 45-50°C의 slide warmer에 놓아두었다.

#### Hybridization

준비된 슬라이드에 probe를 10 µl를 점적한 후 22 mm×50 mm cover glass의 가장자리에 rubber cement (BORDEN)를 적용하여 수분증발을 막도록 한 다음 수분이 유지되는 상자(Humidity box)에 넣어 충분히 hybridization되도록 37°C의 배양기에서 16시간동안 방치하였다.

#### 세척

슬라이드를 꺼내 Rubber cement를 조심스럽게 제거하고 슬라이드를 72°C의 0.4×SSC(AMRESCO)에 5분간 담궈둔 후 꺼내어, 2×SSC(AMRESCO)에 50 µl 0.5% NP-40를 넣은 용액에 담가 2분간 세척하였다.

그 다음, 슬라이드를 말리고 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole, Vysis)로 대조 염색한(counterstain) 후, 관찰할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

#### 관찰 및 사진 촬영

형광 현미경(NIKON, Biophot)을 이용하여 triple band filter인 D/F/TXRD(DAPI/FICT/Texas Red, Chroma Technology Corp. 61002)로는 Spectrum Orange 및 DAPI를 동시에 관찰하였으며, UV-2A filter(NIKON, DM400)로는 DAPI를 관찰하였다.

#### 통계분석

염색체이상 빈도의 양-반응 관계를 조사하기 위해 Spss 10.0 통계패키지를 이용하여 Kendall rank correlation test를 실행하였다.

## 결 과

본 연구에서는 HL-60 세포의 세포생존율을 감안하여 BT 및 HQ의 경우 세포 생존율이 50 %이상인 10, 20, 30, 및 40 µM 이하 농도를 처리하여 염색체이상을 관찰하였으며, t,t-MA의 경우 10, 20, 30, 및 50 µM 이하 농도를 처리하여 염색체이상을 관찰하였다.

벤젠 대사산물 BT, HQ 및 t,t-MA에 의한 HL-60 세포 주에서의 8번 및 21번 염색체의 수적 이상은 Table 1 및 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

HL-60 세포주에서의 벤젠대사산물에 의해 유도된 염색체의 수적 이상 형태는 monosomy가 대부분이었으며 trisomy도 관찰되었다. 즉 8번 및 21번 염색체의 monosomy 빈도는 벤젠대사산물 BT, HQ 및 t,t-MA의 농도가 증가함에 따라 양-반응 관계를 나타내었다 (p=0.000). 특히 벤젠 대사산물들이 처리되지 않은 대조군에서도 이수성이 무척 높게 나타났으나 농도가 증가함에 따라 monosomy의 빈도가 증가하였으며 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 또한 8번 및

**Table 1.** Frequency of 1, 2, 4-benzenetriol (BT), hydroquinone (HQ), *trans, trans*-muconic acid (t,t-MA)-induced aneuploidy in HL-60 cells identified by FISH with the DNA probes for chromosome 8 and 21

Dose (µM)	No. of cells scored	Monosomy of chromosome		Trisomy of chromosome	
		# 8	# 21	# 8	#21
<b>BT</b>					
0	400	22(5.50)	35(8.75)	3(0.75)	5(1.25)
10	400	38(9.50)	62(15.50)	4(1.00)	4(1.00)
20	400	57(14.25)	88(22.00)	4(1.00)	4(1.00)
30	400	62(15.50)	93(23.25)	7(1.75)	3(0.75)
40	400	79(19.75)	108(27.00)	5(1.25)	4(1.00)
Kendall's τ		0.130	0.142	0.021	-0.010
p		0.000	0.001	0.283	0.646
<b>HQ</b>					
0	400	22(5.50)	35(8.75)	3(0.75)	5(1.25)
10	400	52(13.00)	84(21.00)	3(0.75)	3(0.75)
20	400	52(13.00)	96(24.00)	3(0.75)	2(0.50)
30	400	68(17.00)	104(26.00)	4(1.00)	3(0.75)
40	400	92(23.00)	128(32.00)	4(1.00)	6(1.50)
Kendall's τ		0.141	0.156	0.010	0.007
p		0.000	0.000	0.061	0.776
<b>t,t-MA</b>					
0	400	20(5.00)	27(6.75)	10(2.50)	6(1.50)
10	400	22(5.50)	30(7.50)	13(3.25)	3(0.75)
30	400	34(8.50)	44(11.00)	8(2.00)	6(1.50)
50	400	59(14.75)	53(13.25)	6(1.50)	6(1.50)
Kendall's τ		0.118	0.080	-0.023	-0.013
p		0.000	0.001	0.283	0.590

The number in parenthesis indicate percent of numerical chromosome aberrations.

토 의

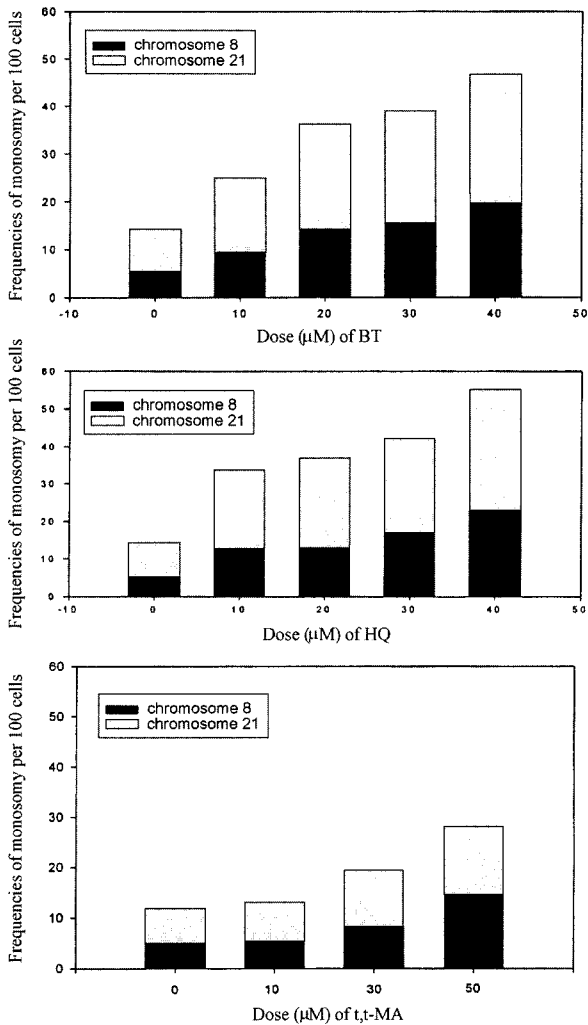


Fig. 1. Frequency of 1, 2, 4-benzenetriol (BT), hydroquinone (HQ), trans, trans-muconic acid (t,t-MA)-induced monosomy in HL-60 cells identified by FISH with the DNA probes for chromosome 8 and 21.

21번 염색체의 trisomy도 이들 대사산물에 의해 유도되었으나 양 반응관계는 관찰되지 않았다(p>0.05).

Table 2에서 보는 바와 같이 BT 및 HQ가 처리된 HL-60 세포에서 8번 염색체로부터 다른 염색체로 이동한 상호전좌와 삽입 및 21번 염색체로부터 다른 염색체로 이동한 상호전좌 및 삽입을 관찰할 수 있었으나, 8번 및 21번 염색체간 상호전좌[(8:21)]는 관찰할 수 없었다. 관찰되어진 염색체 이상 중 삽입은 벤젠 대사산물 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 BT의 농도가 증가함에 따라 삽입의 빈도는 유의하게 증가하였다(p<0.05).

본 연구에서는 HL-60 세포주에 벤젠대사산물인 BT, HQ 및 t,t-MA를 처리하여 혈액암(hematological malignancies)에 이환된 환자들에게서 일반적으로 발견되어지는 것으로 알려진 염색체이상 중 8번 및 21번 염색체의 수적·구조적 이상이 유도되는지를 FISH기법을 통해 조사하였다.

가장 일반적으로 관찰된 염색체이상은 8번 및 21번 염색체의 monosomy이었으며, 이들 모두 벤젠대사산물의 농도가 증가함에 따라 염색체이상빈도가 유의하게 증가하였다. 염색체 8번 및 21번에 특이적인 trisomy도 관찰되었으나 벤젠대사산물의 농도가 증가함에 따른 양-반응 관계를 관찰할 수 없었다.

Stillman 등(1997)은 사람 lymphoblast(림프상 세포주)에서 HQ의 농도가 증가함에 따라 염색체 5번, 7번 및 8번 monosomy의 빈도가 증가하였지만 trisomy의 빈도는 통계적으로 유의하지 않았다고 보고하고 있으며, Chung과 Kim(2002)도 *in vitro* 상태에 벤젠대사산물인 BT, HQ 및 t,t-MA가 처리된 사람 림프구에서 5번, 7번, 8번 및 21번 염색체의 monosomy 및 trisomy가 유도되었다고 보고하고 있어 본 연구결과를 뒷받침해 주고 있다.

또한 Zhang 등(1998b)에 의하면 *in vitro* 상태에 HQ 및 BT가 처리된 사람 림프구에서 염색체 5번 및 7번의 monosomy가 유도되었다고 보고하고 있으며, Zhang 등(1994)의 또 다른 연구결과에서는 동원체에 특이적인 probe(centromere specific probe)를 이용하여 BT가 처리된 급성아골수성 세포주인 HL-60세포주에서 염색체 7번 및 9번의 trisomy가 유도되었다고 보고하고 있다.

벤젠 노출의 내적 노출지표(internal marker)로 활용되고 있는 t,t-MA를 *in vitro* 상태에서 HL-60세포주에 처리한 결과 8번 및 21번 염색체의 수적이상이 관찰되었으나, 현재까지 자매염색체교환(sister chromatid exchange)을 일으키지만 양-반응관계를 보이지는 않는다는 연구결과 및 Chung과 Kim(2002)에 의한 연구결과를 제외하곤 본 연구결과에서와 같이 수적 이상 유도물질(aneusen)로서 t,t-MA의 성격을 비교할 만한 연구결과는 없는 상태이다.

이러한 연구결과 모두, 특히 C group 염색체(6-12)에서 무작위적인 염색체이상이 아닌 특정 염색체의 선택적 염색체 이상, 즉 수적 이상을 보고하고 있다. 또한 본 연구결과에서는 이러한 C group 염색체는 아니지만 염색체 21번의 수적 이상을 관찰할 수 있었다.

Zhang 등에 따르면 20 µM 농도의 BT를 처리한 급성아골수성 세포주인 HL-60 세포에서 방추사(spindle) 형성이 정상적으로 이루어지지 않고 삼중극(tripolar)을 형성하게 되

**Table 2.** Frequencies of translocation and insertion induced by benzene metabolites, 1, 2, 4-benzenetriol (BT) and hydroquinone (HQ) in HL-60 cells using fluorescence *in situ* hybridization with the DNA probes for chromosome 8 or chromosome 21

Dose ( $\mu$ M)	No. of cells scored	No. of translocation [t(8:?)]	No. of translocation [t(21:?)]	No. of translocation [t(8:21)]	No. of insertion [ins(8:?)]	No. of insertion [ins(21:?)]	No. of insertion [ins(8:21)]
Control	400	1(0.25)	5(1.25)	0(0.00)	51(0.13)	23(0.06)	0(0.00)
<b>BT</b>							
10	400	2(0.50)	4(1.00)	0(0.00)	64(0.16)	31(0.08)	0(0.00)
20	400	4(1.00)	12(3.00)	0(0.00)	64(0.16)	64(0.16)	0(0.00)
30	400	4(1.00)	4(1.00)	0(0.00)	153(0.38)	73(0.18)	0(0.00)
40	400	4(1.00)	13(3.25)	0(0.00)	169(0.42)	79(0.20)	0(0.00)
<b>HQ</b>							
10	400	1(0.25)	5(1.25)	0(0.00)	124(0.31)	25(0.06)	0(0.00)
20	400	2(0.50)	4(1.00)	0(0.00)	89(0.22)	32(0.08)	0(0.00)
30	400	1(0.25)	5(1.25)	0(0.00)	197(0.49)	47(0.12)	0(0.00)
40	400	8(2.00)	5(1.25)	0(0.00)	128(0.32)	44(0.11)	0(0.00)

The number in parenthesis indicates percentage of frequencies of chromosome aberrations.

t(8:21) indicates translocation between chromosome 8 and chromosome 21.

t(8:?) indicates translocation between chromosome 8 and unknown chromosome.

t(21:?) indicates translocation between chromosome 21 and unknown chromosome.

ins(8:21) indicates insertion between chromosome 8 and chromosome 21.

ins(8:?) indicates insertion between chromosome 8 and unknown chromosome.

ins(21:?) indicates insertion between chromosome 21 and unknown chromosome.

며 농도가 증가할수록 방추사가 형성되지 않는다고 보고하고 있어, BT가 이수성(aneusomy)을 유발하는데 관여한다고 제안하고 있다(Zhang *et al.*, 1994).

벤젠은 간에서 대사되어 benzene oxide를 거쳐 phenolic metabolites로 전환된 후 즉시 BT와 HQ가 형성된다. 이들 대사산물은 bone marrow에 전달되어 산화됨으로써 semiquinone과 reactive oxygen species(ROS)로 변화되어 백혈병 및 암의 유발기전에 관여한다고 알려져 있다(Zhang *et al.*, 1993, 1994). 또한 benzene oxide는 benzene glycole로 전환된 후 t,t-MA로 산화되어 인체 밖으로 배출되는 것으로 알려져 있다(Rusch *et al.*, 1977). 결국 이들 벤젠 대사산물은 spindle 형성을 방해하여 aneusomy를 유발하는 결과를 초래하게 되는 것으로 판단된다(Irons *et al.*, 1980, Pfeifer *et al.*, 1983, Zhang *et al.*, 1994).

한편 벤젠 대사산물이 처리되지 않은 HL-60 세포주 대조군에서도 8번 및 21번 염색체의 monosomy의 빈도가 무척 높게 나타났으나 농도가 증가함에 따라 양-반응 관계를 보이고 있으며, 이는 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

HL-60 세포는 급성 아골수성 백혈병 환자에서 유래된 세포주로서 종양세포의 성장과 분화를 연구하는데 광범위하게 이용되고 있으며(Collins *et al.*, 1980) 이 세포의 핵형은 각 연구자에 따라 상이하게 보고되고 있어 배양조건 뿐 아니라 세대 회수에 따라 계속적으로 핵형의 변화를 나타내는 특성을 보이고 있어 벤젠 대사산물이 처리되지 않은 대조군

에서 8번 및 21번 염색체의 수적이상이 관찰된다고 할 수 있다.

본 연구결과 HL-60 세포에서 삼입 및 aneusomy의 빈도가 농도가 증가함에 따라 높은 빈도로 증가하는 현상을 관찰할 수 있었는데 이는 HL-60 세포주 내의 myeloperoxidase (MPO)가 높은 수준으로 존재하기 때문이다. 즉 MPO는 분화 과정 중 골수세포 전단계에서 발현되는 골수 세포내 주요 peroxidase로서 분화초기 계통의 골수성 세포인 HL-60 세포에 높은 수준으로 존재하게 되는데(Subrahmanyam *et al.*, 1991a, 1991b, Shen *et al.*, 1996) 이 효소는 벤젠 대사산물인 BT와 HQ의 활성을 증가시킴으로써 그 결과 산출되는 semiquinone과 ROS가 세포내 tubulin과 같은 주요 단백질에 영향을 미치거나 DNA의 염기에 작용하여 8-hydroxiguanine을 형성하여 DNA 손상회복 과정을 통해 DNA breakage를 일으키는데 관여한다고 추정할 수 있다(Kolachana *et al.*, 1993, Zhang *et al.*, 1994).

벤젠에 노출된 작업자들의 림프구에서 AML 환자나 혈액 암에서 일반적으로 발견되는 염색체 8번 및 21번 trisomy 및 염색체 8번과 21번간의 상호전좌 [t(8:21)]를 포함한 다양한 특정 염색체이상이 보고되고 있다(Smith *et al.*, 1998, Smith and Rothman, 2000).

본 연구에서는 8번 및 21번 염색체에서 알 수는 없으나 8번 및 21번을 제외한 다른 염색체로의 상호전좌는 관찰되었으나 대조군에 비해 빈도차이는 보이지 않았으며, 염색체

8번 및 21번 간 상호전좌는 발견되지 않았다. 이는 본 실험의 *in vitro* 상태에서 처리한 BT, HQ 및 t,t-MA 외에 벤젠이 인체에 노출되었을 때 대사과정을 통해 벤젠독성을 일으킬 수 있는 대사산물이 본 실험에 사용된 3가지 대사물질 이외에도 *in vivo* 상태에서도 많이 존재하며 이들의 상호작용에 의하여 더욱 강력한 벤젠독성이 유발됨에 따라 t(8:21)가 유발될 수도 있을 것으로 가정한다면 본 *in vitro* 실험 결과를 부분적으로 설명할 수 있을 것으로 판단된다.

구조적 염색체 이상을 유도하는 기전에는 벤젠의 대사산물이 DNA 복제 및 염색체 분리(chromosome segregation)에 관여하는 topoisomerase II의 작용에 영향을 미침으로써 유도될 것이라고 알려져 있다(Chen and Eastmond, 1995). 즉 BT 및 HQ의 단독 처리시 각각 500  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M 이상의 고농도에서 topoisomerase II의 작용이 억제되었으며 폐놀계 대사산물 특히 4,4'-biphenol과 horseradish peroxidase 및 과산화수소수를 함께 처리하였을 때 10  $\mu$ M 농도에서도 topoisomerase II를 억제한다고 설명하고 있어, 벤젠 대사산물간의 상승작용 효과를 추측할 수 있다. 또한 벤젠에 대한 myelotoxicity 및 genotoxicity는 벤젠대사산물인 phenol, 및 hydroquinone, mucoaldehyde 혹은 catechol의 상승효과에 의해 소핵 빈도가 증가된다는 연구보고도 있다(Chen and Eastmond, 1995, Eastmond *et al.*, 1987).

따라서 벤젠 노출 작업자들의 *in vivo* 상태에서의 림프구에서 관찰된 염색체 이상과 각각의 벤젠 대사산물에 *in vitro* 상태에서 노출된 HL-60세포에서의 이상 결과와는 다를 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 환경부 G7 환경기술 개발사업 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Borenfreund E. and Puerner J.A. (1983): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays, *J. Tissue Culture Methods*, **9**, 7-9.
- Chen H.W., and Eastmond D.A. (1995): Topoisomerase inhibition by phenolic metabolites: a potential mechanism for benzene's Clastogenic effects, *Carcinogenesis*, **16**, 2301-2307.
- Chung H.W. and Kim S.Y. (2002): Detection of chromosome-specific aneusomy and translocation by benzen metabolites in human lymphocyte using fluorescence in situ hybridization with DNA probes for chromosome 5, 7, 8 and 21, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, **65**, 365-372.
- Collins S.J., Bodner A., Ting R., Gallo R.C. (1980): Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells., *Int. J. Cancer*, **15**, 2, 213-218.
- Eastmond D.A., French R.C., Ross D., Smith M.T. (1987): Metabolic activation of 1-naphthol and phenol by a simple superoxide-generating system and human leukocytes., *Chem. Biol. Interact.*, **63**, 1 47-62.
- Eastmond D.A., Schuler M., Rupa D.S. (1995): Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat. Res.*, **348**, 153-162.
- Erdogan G., and Aksoy M. (1973): Cytogenetic studies in thirteen patients with pancytopenia and leukaemia associated with long-term exposure to benzene, *New Istanbul Contrib. Clin. Sci.*, **10**, 230-247.
- Irons R.D., and Neptune D.A. (1980): Effects of the principal hydroxy-metabolites of benzene on microtubule polymerization, *Ach. Toxicol.* **45**, 297-305.
- Kolachana P., Subrahmanyam V.V., Meyer K.B., Zhang L., Smith M.T. (1993): Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells *in vitro* and in the bone marrow *in vivo.*, *Cancer Res.*, **53**, 5, 1023-6.
- Le Beau M.M. (1990): Chromosomal abnormalities in hematologic malignant disease, In Mendelsohn, M.L. and Albertini, R.J. (eds) *Progress in Clinical and Biological Research: Mutation and Environment* Wiley-liss, New York, NY, Vol. 340, pp 325-335.
- Marcon R.F., Zijno A., Crebelli R.R., Carere A., Veidebaum T., Peltonen K., Parkes R., Schuler M., Eastmond D. (1999): Chromosome damage and aneuploidy detected by interphase multicolour FISH in benzene-exposed shale oil workers, *Mutat. Res.*, **445**, 155-166.
- Martyn T.S. (1996): The mechanism of benzene-induced leukemia: A hypothesis and speculations on the causes of leukemia, *Environ. Health. Perspect.* **104**, suppl. **6**, 1219-1225.
- Natarajan A.T., Balajee A.S., Boei J.J.W.A., Darroudi F., Dominguez I., Hande M.P., Meijers M., Slijepcevic P., Vermeulen S., Xiao Y. (1996): Mechanism of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence in situ hybridization, *Mutat. Res.*, **372**, 247-258.
- Pfeiffer R.W. and Irons R.D. (1983): Alteration of lymphocyte function by quinones through a sulfhydryl-dependent disruption of microtubule assembly, *Int. J. Immunopharmacol.* **5**, 463-470.
- Ross D., Siegel D., Schattenberg D.G., Sun X.M., Moran J.L. (1996): Cell-specific activation and detoxification of benzene metabolites in Mouse and Human bone marrow: Identification of Target cells and a potential role for modulation of apoptosis in benzene toxicity, *Environ. Health Perspect.* **104**, (Suppl 6), 1177-1182.
- Rusch G.M., Leong B.K.J., Laskin S. (1977): Benzene metabolism, *J. Toxicol. Environ. Health. Suppl* **2**: 23-36.
- Shen Y., Shen H.M., Shi C.Y., Ong C.N. (1996): Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells., *Hum. Exp. Toxicol.*, **15**, 5, 422-427.
- Smith M.T., and Rothman N. (2000): Biomarkers in the molecular epidemiology of benzene-exposed workers, *J. Toxicol.*

- Environ. Health. Part A.* **61**, 439-445.
- Smith M.T., Zhang L., Wang Y., Hayes R.B., Li G., Wiemels J., Dosemeci M., Titenko-Holland N., Xi L., Kolachana P., Yin S., Rothman N. (1998): Increased translocations and aneuploidy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene, *Cancer Res.* **58**, 2176-2181.
- Stillman, W.S., Varella-Garcia M., Gruntmeir J.J., Irons R.D. (1997): The benzene metabolite, hydroquinone, induces dose-dependent hypoploidy in a human cell line, *Leukemia*, **11**, 1540-1545.
- Stillman W.S., Varella-Garcia M., Irons R.D. (1999): The benzene metabolites hydroquinone and catechol act in synergy to induce dose-dependent hypoploidy and -5q31 in a human cell line, *Leuk Lymphoma*, **35**(3-4), 269-281.
- Stillman W.S., Varella-Garcia M., Irons R.D. (2000): The benzene metabolite, hydroquinone, selectively induces 5q31- and -7 in human CD34+CD19- bone marrow cells, *Exp. Hematol.*, **28**, 169-176.
- Subrahmanyam V.V., Kolachana P., Smith M.T. (1991a): Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity., *Free Radic. Res. Commun.*, **15**, 5, 285-296.
- Subrahmanyam V.V., Ross D., Eastmond D.A., Smith M.T. (1991b): Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukemia. *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 5, 495-515.
- Tsutsui T., Hayashi N., Maizumi H., Huff J., Carl Barrett J. (1997): Benzene-, Catechol-, hydroquinone- and phenol-induced cell transformation, gene mutations, chromosome aberrations, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells, *Mutat. Res.*, **373**, 113-123.
- Wallace L.A. (1989): Major sources of benzene exposure, *Environ. Health Perspect.*, **82**, 165-169.
- Wester, R.C., Maibach H.I., Gruenke L.D., Craig J.C. (1986): Benzene levels in ambient air and breath of smokers and non-smokers in urban and pristine environments, *J. Toxicol. Environ. Health.*, **18**, 4, 567-73.
- Zhang L., Robertson M.L., Kolachana P., Davison A.J., Smith M.T. (1993): Benzene metabolite, 1,2,4-benzenetriol, induces micronuclei and oxidative DNA damage in human lymphocytes and HL60 cell, *Environ. Mol. Mutagen.* **21**, 339-348.
- Zhang L., Rothman N., Wang Y., Hayes R.B., Li G., Dosemeci M., Yin S., Kolachana P., Titenko-Holland N., Smith M.T. (1998a): Increased aneuploidy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene, *Carcinogenesis*, **19**, 1955-1961.
- Zhang L., Rothman N., Wang Y., Hayes R.B., Yin S., Titenko-Holland N., Dosemeci M., Wang Y.Z., Kolachana P., Lu W., Xi L., Li G.L., Smith M.T. (1999): Benzene increases aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence in situ hybridization in interphase and metaphase cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, **34**, 260-268.
- Zhang L., Venkatesh P., Creek M.L., Smith M.T. (1994): Detection of 1,2,4-benzenetriol induced aneuploidy and microtubule disruption by fluorescence in situ hybridization and immunocytochemistry., *Mutat. Res.*, **320**, 315-327.
- Zhang L., Wang Y., Shang N., Smith M.T. (1998b): Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes, *Leuk. Res.*, **22**, 105-113.