

디클로로벤지딘에 폭로된 흰쥐의 간장세포와 방광 상피세포에 형성된 DNA adducts의 ^{32}P -postlabeling과 GC/MS-SIM에 의한 분석

이진현[†] · 신호상 · 장미선
공주대학교 사범대학 환경교육과

Study on measurement of DNA adducts formed in liver cells and bladder epithelial cells of rats exposed dichlorobenzidine(DCB) by ^{32}P -postlabeling and GC/MS-SIM method

Jin Heon Lee[†] · Ho-Sang Shin and Mi Seon Jang
Department of Environmental, Kongju National University

ABSTRACT

To identify and evaluate the dichlorobenzidine(DCB)-DNA adducts in liver cell and bladder epithelial cells by ^{32}P -postlabeling and GC/MS-SIM, we orally exposed the dichlorobenzidine(20mg/kg body wt./day) to male Sprague-Dawley rats(185 ± 10g) for 14 days.

Two kinds of DCB-DNA adduct(A1 and A2) were found at the same site of thin layer chromatogram of ^{32}P -postlabeling method in liver cells and bladder epithelial cells. In liver cells, relative adduct labeling(RAL) × 10¹² of DCB-DNA adduct A1 were 34.1 ± 3.71 and 69.9 ± 5.02, that of adduct A2 were 74.1 ± 10.1 and 105.1 ± 10.1 on 10 and 14 days after treatment, respectively. And in bladder epithelia cells, RAL × 10¹² of DCB-DNA adduct A1 were 5.92 ± 1.60 and 15.9 ± 1.31, that of adduct A2 were 9.81 ± 2.81 and 22.8 ± 1.79 on 10 and 14 days after treatment, respectively.

DCB metabolites formed DNA adducts were monoacetyl-dichlorobenzidine(acDCB) and diacetyl-dichlorobenzidine(di-acDCB), which was identify by gas chromatography/mass spectrometry-scan ionization mode(GC/MS-SIM), after hydrolysis of DCB-DNA adducts isolated from live cells and bladder epithelial cells. The base peak of acDCB were 252 and 294 m/z, and that of di-acDCB were 252, 294 and 336 m/z.

In conclusion, the exposed DCB formed two kinds of DCB-DNA adduct, the proximate materials of that were acDCB and di-acDCB in liver and bladder epithelial cells. And the above GC/MS-SIM method was found the DCB-DNA adducts could be monitoring by gas chromatography.

Keywords : ^{32}P -postlabeling, GC/MS-SIM, dichlorobenzidine(DCB), monoacetyl-benzidine(acDCB), diacetyl-benzidine(di-acDCB)

I. 서 론

디클로로벤지딘(3,3'-dichlorobenzidine, DCB)은 오렌지, 노랑, 빨강 계통의 안료 중간체에 사용되는 원료로서 국내에서 생산하여 외국에 2,259톤 정도를 수출하고 있고, 국내에서는 약 600톤 정도 소모하고 있다.¹⁾

미국산업위생전문가협회(ACGIH)에서는 디클로

로벤지딘(DCB)을 실험동물에 암을 발생하는 A3물질로 확정하여 관리하기 시작하였고³⁾, 우리나라에서도 2000년부터 산업안전보건법의 제37조에 염료와 안료제조에서 발암물질로 인정된 벤지딘, 디클로로벤지딘과 이를 함유한 물질, 그리고 벤지딘 염산염을 제조금지물질로 규정하고 있다.²⁾

디클로로벤지딘(DCB)의 인체 발암성에 대한 가능성이 발표되고 있음에도 불구하고^{4,5)}, 그 동안 인체 발암물질로 확정하지 못하는 이유는 디클로로벤지딘의 인체 발암성을 평가할 수 있는 자료가 충분하지 않기 때문이다^{6,7)}. 디클로로벤지딘은 발암물질로 확정된 벤지딘과 거의 유사한 구조식을 이루고 있을 뿐만 아

[†]Corresponding author: Dept. of Environmental Education,
Kongju National Univ.
Tel : 041-850-8814, Fax : 041-850-8810
E-mail : ejhl@kongju.ac.kr

나라 체내에 흡수된 디클로로벤지딘은 N-아세틸화(acetylated)와 산화반응(oxidized)에 의하여 벤지딘의 발암성 대사물질과 동일한 N-수산화아민류(hydroxylamines)를 형성하기 때문에 벤지딘과 유사한 방광암을 발생할 것으로 예상하고 있다⁹⁾. 실제로 이와 같은 자료들을 근거로 디클로로벤지딘을 인체 발암가능물질로 분류하여 미국 환경청(EPA)에서는 CWA, CERCLA, RCRA, SARA, TSCA하에서 유해 독성물질로 관리하고 있고, 미국 식품위생부(FDA)에서는 식품, 첨가물, 색소, 약품 등에 사용되는 것을 철저히 금지시키고 있으며, 미국 후생복지부(U.S. Dep. of Health and Human Service)에서는 벤지딘과 같이 방광암을 발생하는 A1물질로 분류될 것으로 기대된다고 보고하였다^{6,7)}. 미국 산업안전보건연구원(NIOSH)에서도 디클로로벤지딘의 폭로에 의하여 직업성 암, 특히 방광암의 발생 가능성이 높기 때문에 이에 대한 주의 깊은 관리를 요구하고 있다¹⁰⁾.

오늘날 암에 의한 사망자수는 계속 증가하여 전 세계에서 연간 약 6백만에 달하고 있으며, 전체 사망자수의 약 40%에 이르고 있다¹¹⁾. 1972년 닉슨 대통령이 암과의 전쟁을 선언한 후, 약 20여년 동안 암에 대한 원인규명과 화학요법제의 개발 등에 많은 연구노력을 기울여 왔지만 결정적인 암 치료법은 아직 제시되지 않고 있다¹²⁾. 이러한 과정에서 1983년부터 시작된 암 예방프로그램으로 암 발생의 원인자인 발암물질에 폭로된 것을 감시할 수 있는 생체모니터링(biomonitoring)방법이 개발되었다. 유해물질의 폭로를 감시할 수 있는 생체지표(biomarker)로 BEI(biological exposure index)를 개발하여 사용하는 것과 같이, 발암물질의 폭로를 감시하기에 적합한 생체지표를 개발하기 위한 연구가 진행되었다.

인체에 폭로된 대부분의 발암물질이 암을 일으키기 위해서는 반드시 DNA와 결합한다는 사실을 바탕으로 DNA adducts를 측정하게 되었는데, 폭로를 중단시켜 DNA adducts의 수준을 감소시키면 암으로 진전될 확률을 낮출 수 있다는 사실이 인정됨으로 인하여 DNA adducts를 발암물질의 생체지표(biomarker)로 사용하기 위한 본격적인 연구가 진행되었다¹³⁾.

일반적으로 발암물질에 의하여 형성된 DNA adducts는 회복(repair), lethal mutation(세포사망), silent mutation(세포내 변화 없음), activated oncogen(암의 발생시작) 등의 4단계 중에서 한 단계로 진전된다. 따라서 암 발생은 activated oncogen

단계로 진행되어야 되는데, 이러한 현상은 게놈(genome)의 특정부위, 즉 성장(growth), 분화(differentiation), 통신(communication) 등과 같은 주요기능을 관장하는 유전인자(genome)의 부위에 발암물질이 결합하여 adducts가 형성된 경우에 발생한다^{14,21)}. 그러나 이러한 유전인자의 부위 수는 매우 적다. 쥐의 경우는 450개의 염기쌍 중에서 12개의 특정 염기쌍이 그 기능을 담당하고 있고, 사람의 경우는 6×10^9 개의 염기쌍 중에서 오직 103~104개의 염기쌍만이 종양발생과 관련된 부위라고 알려져 있다. 따라서 발암물질에 의하여 DNA adducts가 형성되어도 모두 암으로 진전되지 않으며, 또한 발암물질의 폭로를 중단시켜 DNA adducts 수준을 감소시키면 종양과 관련된 염기쌍에 adducts가 형성될 확률은 그만큼 감소시키게 되어 암을 예방할 수 있다¹⁵⁾.

발암성 평가에서 발암물질과 DNA가 결합하여 형성한 DNA adducts를 측정하게 방법이 중요시됨에 따라 여러 가지 분석방법이 개발되었는데, 유해화학물질에 방사능 탄소 또는 방사능 수소를 결합시키는 합성방법이 개발됨에 따라 발암물질이 DNA에 미치는 영향에 대한 이해와 DNA adducts를 측정하는 방법에 대한 연구는 엄청난 발전을 가져오게 되었다.

특히 Talaska 등¹⁵⁾은 소량의 방사능 물질(γ -³²P[ATP])을 사용하여 높은 감도로 DNA adducts를 측정하는 효과적인 ³²P-postlabeling방법을 개발하였고, 이 방법을 이용하여 각종 발암물질의 폭로에 대한 비관혈적 모니터링에 적용하였다¹⁶⁻²⁵⁾. 그러나 이 측정방법은 아직도 방사능물질(γ -³²P[ATP])을 사용해야 한다는 한계점에 직면해 있다. 더욱이 방사능물질의 사용에 대한 규제가 엄격해짐에 의하여 새로운 측정방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 Talaska 등(1992)이 개발한 효과적인 ³²P-postlabeling방법에 의하여 DNA adducts를 분리하여 측정하고, 분리된 DNA adduct를 가수분해에 의하여 디클로로벤지딘의 대사물질을 추출하여 GC/MS로 디클로로벤지딘의 대사물질을 확인하여 측정하고자 하였다. 특히 분리된 DNA adduct를 가수분해하여 DNA와 결합한 디클로로벤지딘의 대사물질을 분리측정하는 방법은 DNA adduct를 가스크로마토그래피(GC)에 의하여 생체모니터링하는데 중요하게 이용될 수 있다고 생각한다.

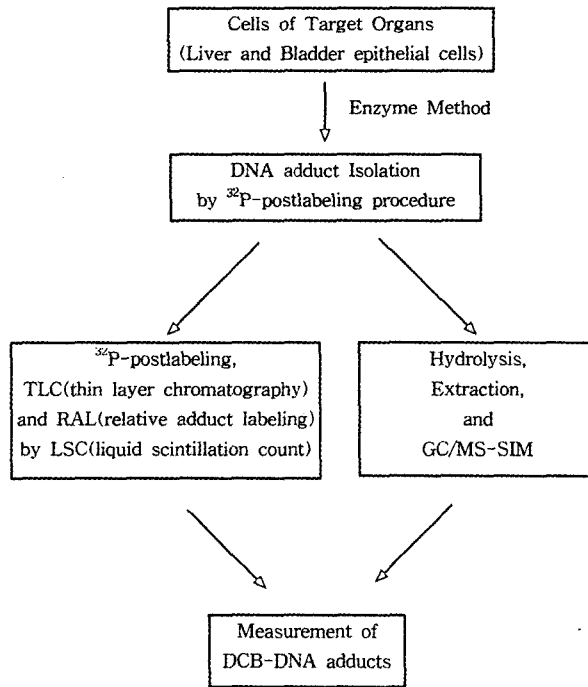


Fig. 1 Schematic diagram depicting the experimental procedure DCB ; dichlorobenzidine.

II. 연구방법

디클로로벤지딘의 폭로로 인하여 간장세포와 방광 상피세포에 형성된 DNA adduct를 측정하기 위하여 Figure 1과 같이 실험을 설계하였다. ^{32}P -postlabeling방법에 의하여 디클로로벤지딘에 의하여 형성된 DNA adduct의 종류와 RAL값을 측정하였고, GC/MS에 의하여 DNA adduct를 형성하고 있는 디클로로벤지딘의 대사물질을 확인하여 측정하였다.

1. 실험동물 및 시료채취

연령이 4주이고, 체중이 $180 \pm 10\text{g}$ 인 40마리의 흰쥐 (Female Sprague-Dawley)를 대한 바이오링크에서 공급받아, 일주일 동안 Macrolone cage(온도 18°C , 습도 30~70%)에서 물과 사료를 자유롭게 주며 적응시켰다.

실험동물군을 대조군과 투여군으로 설정하여 각 실험군에 5마리씩 총 40마리를 배정하여 14일 동안 대조군에게는 식염수를 투여하였고, 투여군에게는 디클로로벤지딘(20mg/kg body wt./day)을 경구로 매일 투여하였다. 디클로로벤지딘이 물에 용해되지 않기 때문에 citric acid와 sucrose가 1:1로 함유된 증

류수에 디클로로벤지딘을 $10,000\text{ppm}$ 으로 에멀션화하여 사용하였다. 시료채취를 위하여 투여한 후 4일, 7일, 10일 그리고 14일에 실험동물을 희생시켜, 간장을 채취하였고, 방광의 내부표면에서 방광의 상피세포를 채취하였다.

2. DNA adduct분리

1) DNA 분리

생체시료를 15ml 시험관(Corex 재질)에서 $1,000\ \mu\text{l}$ 1% SDS- 1mM EDTA용액과 $24\ \mu\text{l}$ 1M Tris(pH 7.4)를 넣은 후에 조직분쇄기 (Brinkman Homogenizer)로 세포를 분쇄시킨 후에, $24\ \mu\text{l}$ RNase A(10mg/ml)와 $8\ \mu\text{l}$ RNase T1($5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 그리고 $60\ \mu\text{l}$ Proteinase K(10mg/ml) 등의 효소로 분해시켰다. 그리고 1.2ml 페놀, 0.6ml 페놀과 0.6ml sevag 그리고, 1.2ml evag 등에 의하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 $100\ \mu\text{l}$ 4M LiCl용액과 $10\ \mu\text{l}$ glycogen ($30\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) 그리고 냉동된 100% 에틸알코올에 의하여 확인하였고, $40\ \mu\text{l}$ 의 1% SSC- 1mM EDTA용액으로 용해시켜 DNA의 stock용액으로 사용하였다.

2) DNA 가수분해

1.5ml Eppendorf 튜브에 4 μ l stock용액을 채취하고, 2 μ l MN((Micrococcal Nuclease) SPD(Spleen Phosphodiesterase), 2 μ l 5X salt(pH 7.0), 2 μ l H₂O로 6 μ l 혼합용액(cocktail solution)을 만들어 첨가한 후에 37 $^{\circ}$ C에서 DNA를 가수분해하였다.

3) DNA adduct추출

5 μ l의 가수분해된 시료에 10mM TBA(tetrabutylammonium)을 시료와 섞이지 않도록 표면 위에 첨가하고, 0.1M NH₄ formate, pH 3.5와 증류수의 혼합물을 혼합한 후에 증류수로 포화시킨 부탄올(n-butanol)로 DNA adduct를 추출하였다. 부탄올로 추출된 시료는 완전히 건조시킨 후에 10mM bicine, pH 9.6에 용해시키어 DNA adduct분석시료로 사용하였다.

3. ³²P-postlabeling분석1) ³²P-postlabeling

추출된 DNA adduct용액에 0.28 μ l polynucleotide kinase(PNK), 1.5 μ l PNK buffer, 그리고 10mM bicine(pH 9.6)를 넣고 40~50 μ Ci [γ -³²P]ATP를 첨가한 후에 37 $^{\circ}$ C에서 ³²P-postlabeling을 실시하였다^{14,21)}.

2) 크로마토그래피

박막 이온교환 크로마토그래피(TLC)를 이용하여 ³²P-postlabeling된 시료에서 발암물질로 형성된 DNA adducts를 분리한 후에 DNA adducts를 종류별로 분리하였다. 첫째 단계에서는 D1용매(0.65M NaH₂PO₄, pH 6.0)로 18시간 동안 크로마토그래피하여 분리하였고, 둘째 단계에서는 D3용액(3.6M lithium formate, 8.5M urea, pH 3.5), D4용액(0.8M LiCl, 0.5M Tris-HCl, 8.5M urea, pH 8.0), D5용액(1.5M 0.65M NaH₂PO₄, pH 6.0) 등의 용매를 사용하여 크로마토그래피하였다^{14,21)}.

3) DNA adduct 측정 및 계산

TLC상에 분리된 DNA adducts는 필름을 사용하여 위치를 확인하고, 액체 신타레이션 계수기(liquid scintillation counter)로 CPM(count per minute)를 측정하여 RAL(relative adducts labeling)를 계산하였다.

4. GC/MS분석방법

1) 발암물질-DNA adduct의 가수분해

시료 10mg에 1N HCl를 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 1시간 가열 및 환류시키고, 냉각시키어 약 pH 7로 중화시키며, 3ml ethylacetate로 추출하여 질소가스로 완전히 증발·건조시켰다. 건조된 시료를 100 μ l ethylacetate로 녹인 후에 3 μ l 시료를 취해 직접 GC/MS에 주입하여 정성분리하였다²⁶⁾.

2) GC/MS 분석

GC/MS분석을 위하여 Hewlett-Packard(HP)사의 GC(HP 5890 series), MSD(HP 5971), 그리고 자동주입기(HP 1513A) 등의 분석장비를 사용하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Analytical conditions of GC/MS-SIM for analyzing dichlorobenzidine-DNA adducts

Subjects	Analytical Conditions
EI mode	70 eV, 230 $^{\circ}$ C
Column	ultra2(Cross-linked 5 % pH ME Siloxane 50m \times 0.2mm I.D. \times 0.33 μ m F.T.)
Carrier gas	He at 1.0 ml/min
split	pulse split 15:1
Infection port temp.	320 $^{\circ}$ C
Transfer line temp.	320 $^{\circ}$ C
Oven temp. program	initial temp : 100 $^{\circ}$ C initial time : 0 min rate : 20 $^{\circ}$ C/min final temp : 310 $^{\circ}$ C final time : 10 min
Solvent delay	3.0 min
Scan mode	mass range 40~800 m/z
SIM mode	1 group : 252 m/z 2 group : 294 m/z 3 group : 336 m/z

EI: electron multiplier; SIM: selective ion mode

III. 결과 및 고찰

1. ³²P-postlabeling에 의한 간장세포와 방광세포에 형성된 DNA adduct

디클로로벤지딘(20mg/kg body wt./day)을 14일 동안 매일 투여한 흰쥐의 간장세포와 방광세포에서 형성된 DNA adducts를 ³²P-postlabeling한 후에 박막 이온교환 크로마토그래피(TLC)로 분리하여 필름으로 확인하였다.

A와 C는 대조군이고 B와 D는 14일에 실험군의 방광 상피세포와 간장세포에 형성된 DNA adduct이다.

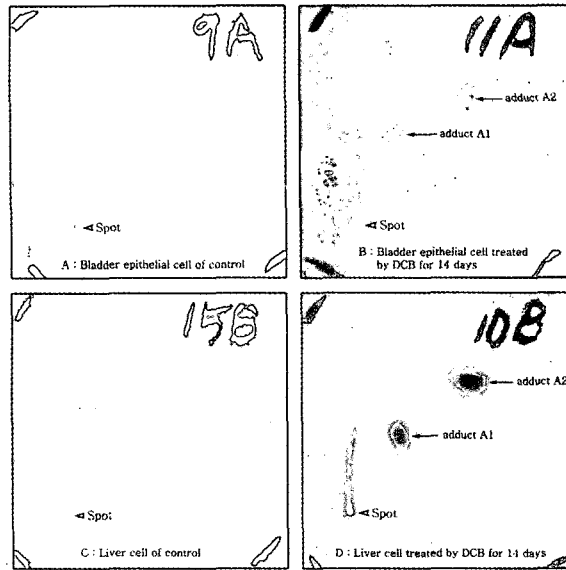


Fig. 2 DCB-DNA adduct map obtained by ^{32}P -postlabeling method of liver cells and bladder epithelial cells isolated from Sprague-Dawley rats after orally treated for 14 days with dichlorobenzidine(20mg/kg body wt/day). 1 : DCB-DNA adduct A1; 2 DCB-DNA adduct A2.

4일, 7일, 10일 그리고 14일에 모든 실험동물의 간장 세포와 방광 상피세포에서 모두 2개의 DNA adducts가 형성되었고, 또한 박막 이온교환 크로마 토그래피에서 동일한 위치에 나타났다.

2. DNA adduct의 RAL수준

디클로로벤지딘(20 mg/kg body wt./day)을 14일 동안 매일 경구로 투여한 흰쥐의 간장세포와 방광 상피세포에 형성된 DNA adduct의 RAL(relative adduct labeling)은 Figure 3과 Figure 4와 같다. 간장세포에 형성된 2개의 DNA adducts의 $\text{RAL} \times 10^{12}$

값이 4일에는 각각 0.75 ± 1.43 와 1.32 ± 1.38 이었으나 7일째부터 크게 증가하여 14일에는 각각 69.9 ± 5.02 과 105 ± 10.04 로 매우 높게 나타났다. 또한 방광 상피세포에 형성된 2개의 DNA adduct의 $\text{RAL} \times 10^{12}$ 값도 4일에 각각 1.18 ± 0.85 와 3.94 ± 1.56 이었으나 14일에는 각각 9.81 ± 2.81 과 22.79 ± 1.79 로 증가하였다. 따라서 DNA adducts의 RAL값이 방광 상피세포에 비하여 간장세포에서 DCB-DNA adduct A1(좌측 spot)이 5.5~7.1배 높게 나타났고, DCB-DNA adduct A2(우측 spot)는 2.8~4.7배 높게 나타났다.

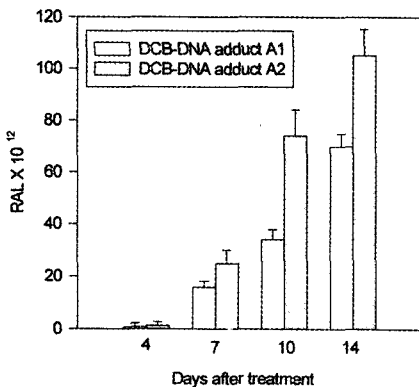


Fig. 3 Levels of DCB-DNA adducts in liver cells of Sprague-Dewley rats orally treated with 20mg/kg body wt. dichlorobenzidine(DCB).

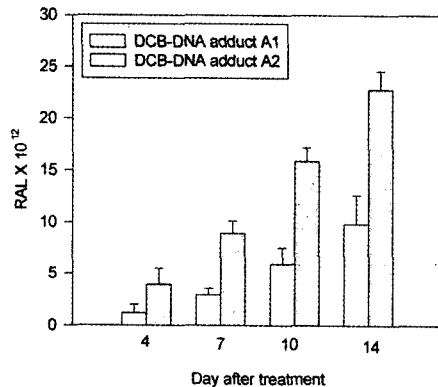


Fig. 4 Levels of DCB-DNA adducts in bladder epithelial cells of sprague-dewley rats orally treated with 20mg/kg wt. dichlorobenzidine(DCB).

3. GC/MS-SIM에 의한 DNA adduct에 결합된 DCB대사물질의 확인

디클로로벤지딘, 모노아세틸클로로벤지딘 그리고 디아세틸디클로로벤지딘을 GC/MS-SIM에 의하여

측정한 크로마토그램이 Figure 5와 같으며, 이들의 기본피크는 Figure 6과 같이 나타났다. 기본피크가 디클로로벤지딘 스펙트럼에서는 252 m/z에서 나타났고, 모노아세틸클로로벤지딘 스펙트럼에서는 252

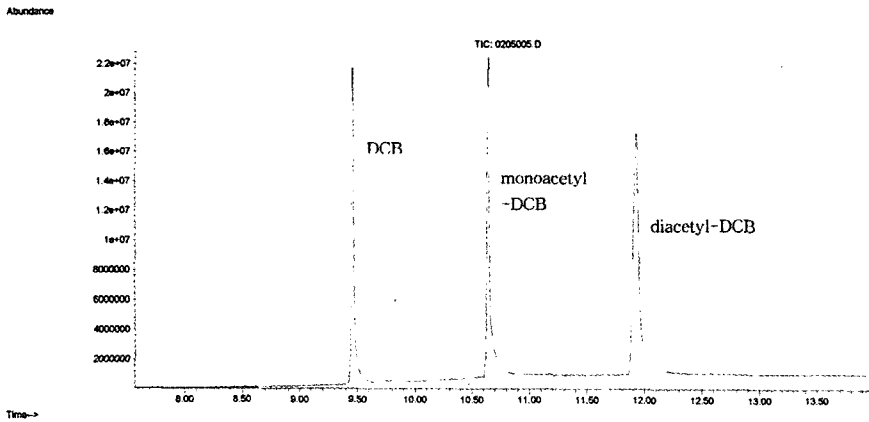


Fig. 5 Chromatogram of dichlorobenzidine(DCB), monoacetyl-DCB(acDCB) and diacetyl-DCB(di-acDCB) obtained by gas chromatography/mass spectrometry-scan ionization mode(GC/MS-SIM) analysis.

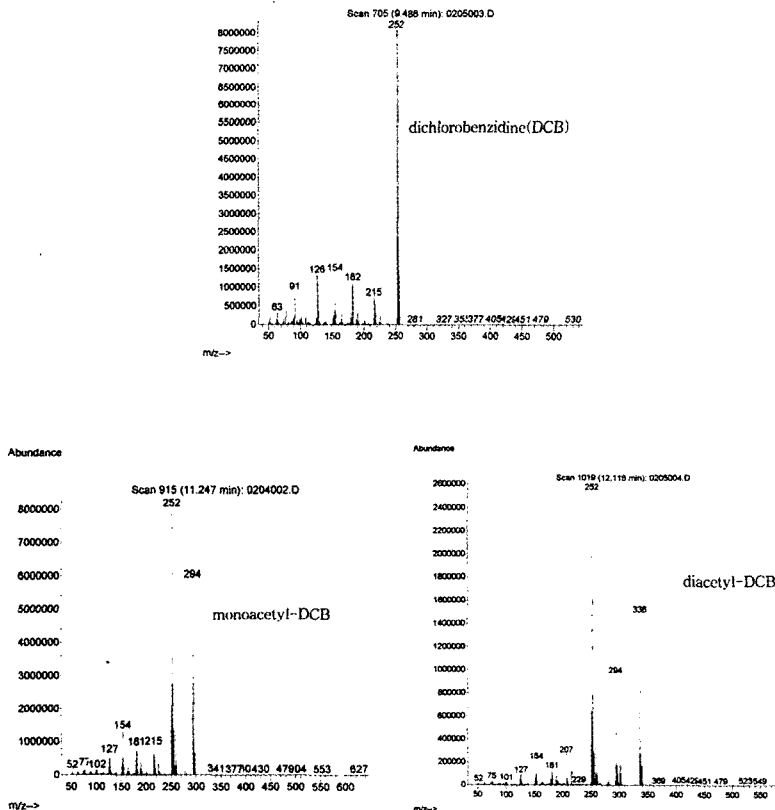


Fig. 6 Fragmentation pattern of dichlorobenzidine(DCB), monoacetyl-DCB and diacetyl-DCB obtained by GC/MS-SIM analysis.

m/z와 294 m/z로 구성되었으며, 디아세틸클로로벤지딘 스펙트럼에서는 252 m/z, 294 m/z 그리고 336 m/z 등으로 구성되어 나타났다.

디클로로벤지딘 (20mg/kg body wt./day)에 폭로된 흰쥐의 간장세포와 방광 상피세포에서 추출한 DNA adducts를 가수분해한 후에 에틸아세테이트로 추출하여 GC/MS-SIM으로 측정하여 이들 표준 크로마토그램의 머무름시간과 기본피크가 일치함을 확인하였다. 따라서 DNA adduct를 형성하고 있는 디클로로벤지딘의 대사물질은 모노아세틸디클로로벤지딘과 디아세틸디클로로벤지딘임을 확인하였다.

디클로로벤지딘은 발암물질로 이미 잘 알려진 벤지딘과 거의 유사한 구조식을 이루고 있기 때문에 인체 발암성에 대한 논란이 계속 대두되고 있다^{4,5)}. 특히 많은 양의 디클로로벤지딘을 생산하고 소비하고 있는 우리나라의 경우에는 이에 대한 생체모니터링 방법을 구축하는 것이 매우 중요하다¹⁾.

DNA adduct는 발암물질에 의한 암 발생을 예방하는데 중요한 생체지표 (biomarker)이며, 개량된 ^{32}P -postlabeling방법이 매우 효과적이라고 보고되고 있다. 특히 이 방법은 $10^7 \sim 10^{10}$ 개의 정상 뉴클레오티드에서 1개의 DNA adduct를 측정할 수 있을 정도로 감도가 매우 높다¹⁵⁾. 실제로 이 방법에 의하여 벤지딘과 각종 다환성방향족탄화수소 (PAHs)의 폭로에 인하여 표적장기에 형성된 DNA adduct를 신뢰성이 높은 생체모니터링을 실시하였다¹⁶⁻²⁵⁾. 본 연구에서도 동일한 ^{32}P -postlabeling방법에 의하여 디클로로벤지딘 (2 mg/kg body wt./day)에 14일 동안 경구 투여된 흰쥐의 간장세포와 방광상피세포에서 DNA adduct를 분리하였다 (Figure 2). 본 연구 결과에서 간장세포와 방광상피세포 모두에서 각각 2개의 DNA adduct가 동일한 박막 이온교환 크로마토그래피 (TLC)에서 분리되었다. 이것은 장기에 관계없이 디클로로벤지딘에 의하여 형성되는 DNA adduct가 두 개 종류임을 증명할 것이다.

본 연구에서 디클로로벤지딘 (2 mg/kg body wt./day)의 폭로에 의하여 형성된 두 종류 DNA adducts (A1과 A2)의 $\text{RAL} \times 10^{12}$ 값이 간장에서는 4일에는 각각 0.75 ± 1.43 와 1.32 ± 1.38 이었으나 7일째부터 크게 증가하여 14일에는 각각 69.9 ± 5.02 과 105 ± 10.04 로 매우 높게 나타났고, 방광 상피세포에 형성된 2개의 DNA adducts (A1과 A2)의 $\text{RAL} \times 10^{12}$ 값도 4일에 각각 1.18 ± 0.85 와 3.94 ± 1.56 이었으나 14일에는 각각 9.81 ± 2.81 과 22.79 ± 1.79 로 증가하였다 (Figure 3과 Figure 4). 또한 DNA

adducts (A1과 A2)의 RAL값이 방광상피세포에 비해 간장세포에서 각각 5.5~7.1배와 2.8~4.7배 높게 나타났다. 이것은 체내에 흡수된 디클로로벤지딘이 간장에서 N-아세틸화와 산화반응에 의하여 N-수산화아민류를 형성하여 간장의 DNA와 결합한 후에 방광에 배설되어 방광상피세포와 결합하기 때문에 간장조직에서 DNA adduct가 높은 수준이 형성된 것으로 생각한다⁹⁾. 이 등²⁵⁾은 4주 동안 80ppm의 벤지딘에 오염된 음용수를 섭취한 흰쥐의 간장과 방광에서 형성된 DNA adduct가 한 종류였으며, $\text{RAL} \times 10^9$ 값이 각각 152.8과 38.0이어서 간장이 방광에서보다 RAL값이 약 3.0~4.1배 높았다고 보고하였다. 또한 Joppich-Kuhn 등⁵⁾은 0.006%의 디클로로벤지딘에 오염된 음용수를 4주 동안 섭취한 흰쥐 (Wistar)의 해모글로빈에 결합한 아세틸디클로로벤지딘이 $40.8 \pm 6.0 \text{ ng/g}$ 이라고 보고하였다.

체내에 흡수된 디클로로벤지딘이 간장과 방광상피세포에서 2개의 DNA adduct를 형성한다는 본 연구의 결과 (Figure 2)와 디클로로벤지딘이 간장에서 N-아세틸화와 산화반응에 의한 N-수산화아민류의 형성에 대한 이론²⁸⁾은 DNA와 결합한 디클로로벤지딘의 대사물질이 모노아세틸디클로로벤지딘과 디아세틸디클로로벤지딘이라고 예측할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 GC/MS-SIM에 의하여 이들에 대한 표준 스펙트럼을 측정하였다 (Figure 5와 Figure 6). 모노아세틸디클로로벤지딘의 스펙트럼은 252 m/z과 294 m/z에서 기본피크가 나타났고, Figure 6의 디아세틸디클로로벤지딘의 스펙트럼은 252 m/z, 294 m/z 그리고 336 m/z에서 기본피크가 나타났다. 그리고 ^{32}P -postlabeling방법²⁷⁾에 의하여 간장과 방광세포에서 추출한 DNA adduct를 가수분해하여 DNA와 결합하고 있던 디클로로벤지딘의 대사물질을 추출한 후에 GC/MS-SIM으로 측정하여 표준 스펙트럼의 머무름시간과 기본피크의 구성을 대조하여 DNA adduct에 결합된 디클로로벤지딘의 대사물질이 모노아세틸디클로로벤지딘 (mono-acetyl-dichlorobenzidine)과 디아세틸디클로로벤지딘 (di-acetyl-dichlorobenzidine)임을 확인하였다.

따라서 디클로로벤지딘의 생체폭로에 의하여 형성된 DNA adduct는 가수분해를 통하여 DNA에 결합된 디클로로벤지딘의 대사물질을 분리할 수 있고, 이것을 에틸아세테이드에 용해시켜 가스 크로마토그래피 (GC)로 측정할 수 있음을 증명하였다.

IV. 결 론

디클로로벤지딘(20mg/kg body wt./day)을 14일 동안 매일 경구투여한 흰쥐 (female Sprague-Dawley)의 간장세포와 방광세포에서 형성된 DNA adducts의 측정에 대한 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

방광 상피세포와 간장세포에 형성된 DNA adduct를 ^{32}P -postlabeling하여 박막 이온교환 크로마토그래피에 분리하였을 때, 2개의 DNA adducts가 방광 상피세포와 간장세포에서 모두 나타났고, 각각의 위치도 동일하였다.

간장세포에 형성된 2개의 DNA adducts(A1과 A2)의 RAL $\times 10^{12}$ 값이 4일에는 각각 0.75 ± 1.43 와 1.32 ± 1.38 이었으나 7일째부터 크게 증가하여 10일과 14일에 각각 34.1 ± 3.71 와 74.1 ± 10.1 및 69.9 ± 5.02 과 105 ± 10.04 로 매우 높게 나타났다. 방광 상피세포에 형성된 2개의 DNA adducts(A1과 A2)의 RAL $\times 10^{12}$ 값도 4일에 각각 1.18 ± 0.85 와 3.94 ± 1.56 이었으나 10일과 14일에는 각각 5.92 ± 1.60 과 9.81 ± 2.81 및 15.9 ± 1.31 과 22.79 ± 1.79 로 증가하였다. 따라서 DNA adduct의 RAL값이 방광상피세포에 비하여 간장세포에서 DCB-DNA adduct A1이 5.5~7.1배 높게 나타났고, DCB-DNA adduct A2는 2.8~4.7배 높게 나타났다.

또한 DNA adduct에 결합되어 있는 디클로로벤지딘의 대사물질이 GC/MS-SIM에 의하여 모노아세틸 디클로로벤지딘과 디아세틸 디클로로벤지딘임을 확인하였고, 본 실험에서 적용한 가수분해와 추출과정을 통하여 DNA adduct와 결합되어 있는 디클로로벤지딘의 대사물질을 분리하여 가스 크로마토그래피(GC)로 측정하여 생체모니터링할 수 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R02-2000-00203)지원으로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) CIS : 한국정밀화학총람. Chemical Information Service(CIS), 232-233, 1998.
- 2) 노동부 : 산업안전보건법, 80-90, 1999.
- 3) ACGIH , TLVs and BEIs : Threshold Limit Values for chemical substances and physical agents and Biological Exposure Indices. ACGIH Publication, 1989, 1999.
- 4) Ouellet-Hellstrom, R., Rench, J.D. : Bladder cancer incidence in arylamine workers. JOEM, 38(12):1239-1247, 1996.
- 5) Joppich-Kuhn, R., Hanggi, R., Sagesdorff, P., Smith, A.E.: Weideli, H.J., Joppich, M. , Determination of dichlorobenzidine-hemoglobin adducts by GC/MS-NCI. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 69:240-246, 1997.
- 6) ATSDR : Decision guide for identifying substance-specific data needs related to toxicological profile. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. Division for Toxicology, Atlanta, GA, 203, 1989.
- 7) IARC : Reasonably anticipated to be carcinogen , 3,3'-dichlorobenzidine and 3,3'-dichloro benzidine 2HCl(CAS Nos. 91-94-1 and 621-83-9), 1-10, 1994.
- 9) Albrecht W. and Neumann H.G. : Biomonitoring of aniline and nitrobenzene. Arch. Toxicol., 57:1-5, 1985.
- 10) NIOSH : NIOSH pocket guide to chemical hazard, U.S. Dep. of Health and Human Services Public Health Service, National Institute for Occupational Safety and Health, 84, 1997.
- 11) 이인수 : 암의 화학예방에 관한 국제연구그룹 설립계획. 대한암예방학회지, 1:53-54, 1997.
- 12) NCI : National Cancer Institute Annual Report. NCI, 1-50, 1994-1996.
- 13) Lauwerys, R.R. and Hoet, P. : Industrial chemical exposure, Guidelines for biological monitoring. 2nd edition, Lewis Publication, 1-14, 1993.
- 14) 이진현, 강희숙 : 개량된 ^{32}P -postlabeling에 의한 발암물질-DNA adducts의 생물학적모니터링방법에 대한 연구. 공주대학교 환경연구, 7:21-36, 2000.
- 15) Talaska, G., Roh, J.H. and Getk, T. : ^{32}P -postlabeling and mass spectrometric methods for analysis of bulky, polyaromatic carcinogen-DNA adducts in humans, J. of Chromatography, 580:293-323, 1992.
- 16) Talaska, G., Al-Juburi, A.Z.S.S. and Kadlubar, F.F. : Smoking related carcinogen-DNA adducts in biopsy samples of human urinary bladder: Identification of N-

- (deoxyguanosin -8-yl)-4-aminobiphenyl as a major adducts. Proc. natl. Acad. Sci. USA, 88:5350-5354, 1991.
- 17) Talaska, Dooley, K.L. and Kadlubar, F.F. : Detection and characterization of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P-postlabeling and subsequent thin-layer and high pressure liquid chromatography. Carcinogenesis, 11(4): 639-646, 1990.
- 18) Talaska, G., Roh, J.H., Schamer, M., Reilman, R., Xue, W. and Warshawsky, D. : ³²P-postlabeling analysis of dibenz[a,j]acridine-DNA adducts in mice : Identification of proximate metabolites. Chemico-Biological Interactions, 95 : 161-174, 1995.
- 19) 이진현, 그린탈라스카 : 피부에 폭로된 폐가솔린 엔진오일로 인한 표적장기의 DNA adducts형성과 d-limonene 세척효과에 대한 평가. 한국환경위생학회지, 24(3) : 92-98, 1998.
- 20) 이진현, 그린탈라스카 : 피부에 폭로된 폐가솔린 엔진오일의 표적장기 DNA adducts형성과 케로신의 세척효과에 관한 연구. 한국산업위생학회지, 8(2) : 289-295, 1998.
- 21) 이진현, 노재훈, 그린 탈라스카 : 근로자의 요증 상피세포에서 ³²P-postlabeling에 의한 발암물질의 DNA adduct측정방법 개발. 한국산업위생학회지, 10(1), 1-17, 2000.
- 22) 이진현, 신호상, 김양호, 노재훈, 이범규 : GC/MS-SIM과 ³²P-postlabeling방법에 의한 염료와 안료를 제조하는 사업장 근로자들의 방광암 조기발견을 위한 Biomarker개발에 관한 연구. 한국환경위생학회지, 26(1)36-44, 2000.
- 23) Jin-Heon Lee and Glenn Talaska : Effects of kerosene cleaning on the formation of DNA adducts in the skin and lung tissues of mice dermally exposed to used gasoline oil(UGEO). Journal of Toxicology and Environmental Health, 56:463-470, 1999.
- 24) Ho-Sang Shin and Jin-Heon Lee : Identifying the biomarker for noninvasive biomonitoring benzidine-based dyes manufacturing workers by ³²P-postlabeling and GC/MS-SIM. ICOH, 440-443, 2001.
- 25) 이진현, 신호상, 장미선, 홍춘표, 최석남 : 벤지딘으로 오염된 음용수를 섭취한 흰쥐에서 간장세포와 방광세포에 형성된 발암물질-DNA adduct에 관한 연구. 27(3):63-70, 2001.
- 26) Ho-Sang Shin, Jin Heon Lee, Hye-Sil Ahn, Choon Pyo Hong and Suk Nam Choi : Simultaneous determination of benzidine, acetylbenzidine and diacetylbenzidine in rat urine. Bull. Korean Chem. Soc.22(7):685-688, 2001.
- 27) 노재훈, 이진현, 그린탈라스카 : 발암물질의 생체 모니터링. 군자출판사, 1-75, 1998.
- 28) Kadlubar, F.F., Miller, J.A. and Miller, E.C. : Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. Cancer Res., 37:805-814, 1977.