

디젤분진이 체세포에서의 DNA 손상에 미치는 영향

허 찬, 김남이, 정규혁¹, 문창규², 허문영*

강원대학교 약학대학, ¹성균관대학교 약학대학, ²서울대학교 약학대학

Genotoxic Effects of Diesel Exhaust Particle Extract in NIH/3T3 Cells

Chan Heo, Nam Yee Kim, Kyu-Hyuck Chung¹, Chang-Kiu Moon²
and Moon Young Heo*

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹College of Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

²College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

Diesel exhaust particle (< 2.5 μm , DEP_{2.5}) is known to be probably carcinogenic (IARC group 2A). DEP_{2.5} contains organic compounds such as polycyclicaromatic hydrocarbon (PAH), heterocyclic compounds, phenols, and nitroarenes. Reactive oxygen species (ROS) are generated by DEP_{2.5} without any biological activation system. Therefore, an alternative mechanism by which DEP_{2.5} could be carcinogenic is known by the generation of oxidative DNA damage. The aim of this study was to investigate genotoxic effects of DEP_{2.5} using single cell gel electrophoresis. In order to evaluate the mechanisms of DEP_{2.5} genotoxicity, the rat microsome mediated and DNA repair enzyme treated comet assays together with routine comet assay were performed. DEP_{2.5} was collected from diesel engine bus and dichloromethane extract was obtained. The organic extract of DEP_{2.5} revealed DNA damage itself in NIH/3T3 cells. And it showed both oxidative and microsome mediated DNA damages. Vitamin C as a model antioxidant reduced DNA damage in endonuclease III treated comet assay. One of flavonoid, galangin as a CYP1A1 inhibitor reduced DNA damage in the presence of S-9 mixture. Our results show that DEP_{2.5} are genotoxic and a great source of oxidative stress, but antioxidants can significantly reduce oxidative DNA damages. And DEP_{2.5} may contain indirect mutagens which can be inhibited by CYP inhibitors.

Key words : diesel exhaust particle, single cell gel electrophoresis, reactive oxygen species (ROS), antioxidant, CYP1A1 inhibitor

서 론

디젤분진은 수백 종 이상의 서로 다른 유기 및

무기성 물질들이 함유되어 있으며, 오래 전부터 도시 대기환경오염물질로서 위해성이 큰 문제가 되고 있다(환경부, 2000). 특히, 2.5 μm 이하인 미세디젤분진 (DEP_{2.5})은 polycyclicaromatic hydrocarbon (PAH), heterocyclic compounds, phenols, and nitroarenes 등의 돌연변이물질, 발암물질 및 기타 독성물

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-33-250-6914, E-mail: myheo@kangwon.ac.kr

질을 함유하고 있으며 인체에 대한 독성이 매우 커서 환경관리대상의 주요 입자상물질로서 취급되고 있다(Health Effects Institute, 1995; Health Effects Institute, 1999).

따라서 디젤분진은 IARC Group 2A Probably carcinogenic 물질이며(IARC, 1989a), 특히 폐암을 일으킬 수 있다는 연구보고가 많다(Maudely, 1996; McClellan, 1996; WHO, 1996; NIOSH, 1998; US EPA, 1999; Kato *et al.*, 2000). 디젤분진은 발암성과 함께 체내 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성에 의한 관련 질환으로서 염증, 알러지, 천식, 만성기관지염 등 잘 알려져 있다(Kagawa, 2002).

본 연구에서는 DEP_{2.5}의 체세포 DNA에 대한 손상도를 간단하게 측정할 수 있는 single cell gel electrophoresis (일명 comet assay)를 사용하였다(Singh *et al.*, 1988). 또한, DEP_{2.5}의 DNA 손상 메커니즘을 규명하기 위하여 산화적 DNA 손상도와 대사활성화에 따른 DNA 손상도를 비교평가하고, 항산화제 및 대사활성화 억제제에 의한 DNA 손상보호효과를 규명하고자 하였다. 한편, DNA 손상의 biomarker로서 comet assay를 이용하여 디젤분진의 체세포에서의 유전독성을 파악하여 향후 돌연변이원성물질을 함유하고 있는 디젤분진의 위해성 평가에 활용될 기초자료를 생산하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 디젤분진시료 및 시약

디젤분진은 환경부 '에코테크노피아'의 한국형 위해성평가 표준모델개발사업의 일환으로 개발된 디젤분진 포집장치로부터 포집된 분진(diesel exhaust particle, <2.5 μm) (DEP_{2.5})을 사용하였다. 분획의 추출은 EPA의 방법(Lewtas *et al.*, 1990)을 다소 수정하여 수행하였다. 디젤분진 포집장치에서 디젤분진이 입자크기별(DEP_{2.5})로 흡착되어 있는 teflon 여지를 1 cm × 1 cm 크기로 자른 후, dichloromethane (DCM)에 현탁시켜 30분간 두 번 초음파 추출하였다. DCM으로 추출된 crude extract (CE)는 liquid-liquid 추출에 의해 acidic (fraction 1) 및 basic (fraction 2) component를 분리하고, silica column chromatography에 의해 극성에 따라 분획하였다. Silica column에 통과시킨 후 흡착된 유효성분은

hexane (fraction 3, aliphatic compounds), DCM/hexane (fraction 4, aromatic compounds), DCM (fraction 5, slightly polar compounds), DCM/Methanol (MeOH) (fraction 6, moderately polar compounds) 및 MeOH (fraction 7, high polar compounds)로 각각 5개 분획으로 추출하였다. 각 분획된 시료는 용매를 증발 건조시킨 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 최종 추출물의 농도가 100 mg/mL가 되도록 다시 녹인 후 0.22 μm syringe filter로 여과하여 시험에 사용하였다. 유기성물질의 분획의 추출방법을 Scheme 1에 나타내었다. 한편, DMEM, trypsin EDTA 등 세포배양 시약들은 GIBCO사제, vitamin C 등 이화학시약들은 Sigma사제를 사용하였다. Rat 간세포로부터 얻은 S-9은 강원대학교 바이오산업공학부 이진하교수로부터 분양받아 사용하였다.

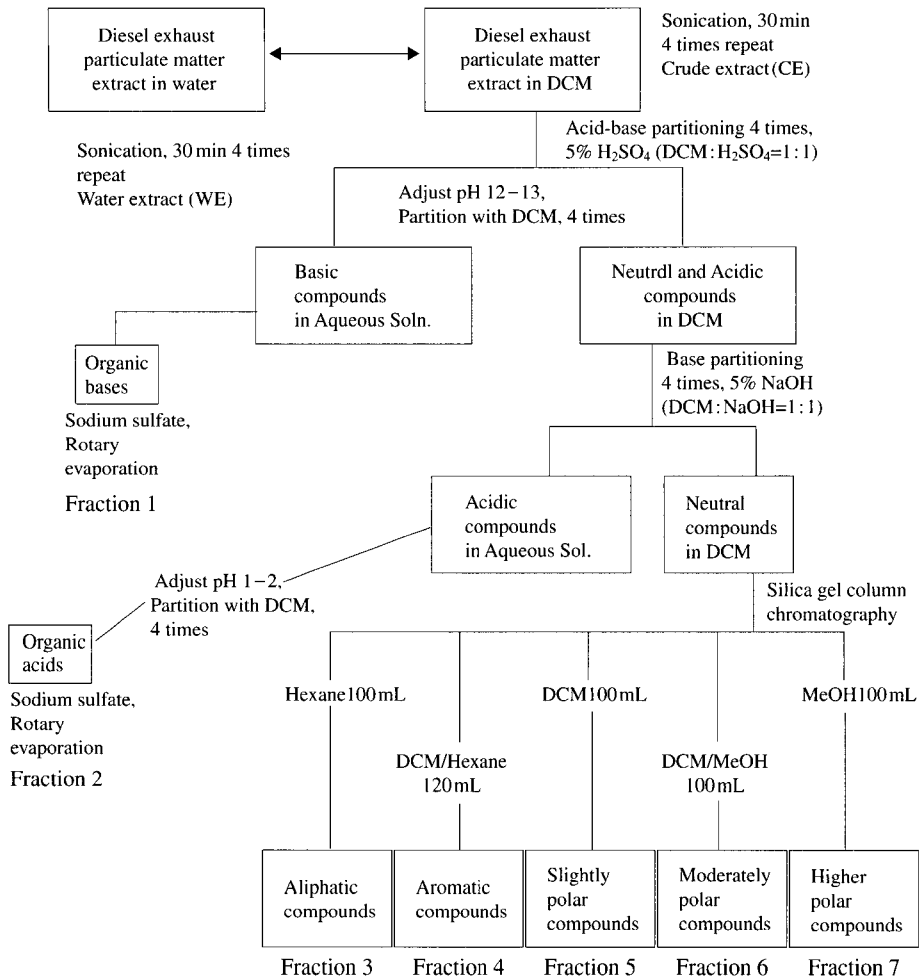
2. 세포독성시험

NIH/3T3 cells에 있어서의 세포독성에 대한 검체들의 효과를 MTT법(Cole, 1986)에 따라 microplate reader로 측정하였다. 이때 배지는 DMEM을 사용하였으며, cell은 well당 25,000개로 하고 10% FBS 함유배지 80 μL 중에서 24시간 배양 후 검체 10 μL를 가하고 CO₂ 배양기에서 20시간 더 배양한 후 MTT시약 15 μL를 가하고 4시간 배양 후 DMSO를 200 μL를 가하고 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay) 실험

다음 세 가지 방법(a, b, c)으로 comet assay를 실시하여 디젤분진의 DNA 손상도를 평가하였으며 아래에 실험방법을 기술하였다. 시험방법은 a) normal comet assay-single strand breaks 검출법, b) endonuclease III modified comet assay-oxidized pyrimidine base를 검출하기 위해 세포용해 후 endonuclease III 처리법, c) S-9 mix pretreated comet assay-대사활성화에 따른 single strand breaks 검출법들을 사용하였다.

NIH/3T3 cells을 10% FBS 함유배지 중 배양하여 다음과 같은 방법으로 comet 시험을 실시하였다(Singh *et al.*, 1988). 양성 대조 물질로는 디젤분진을 사용하였다. 이때 비타민 C를 동시처리하거나 단독



Scheme 1. Fractionation scheme of diesel exhaust particles.

투여하여 산화적 DNA 손상 억제효과도 평가하였다. 실험은 세포 5×10^3 개를 culture dish (6 well)에 심고, 24 h 후에 양성대조물질 10 μ L와 DMSO 10 μ L를 처리하였다. 45분 후 새로운 배지로 갈아주고 1시간 후 culture dish에 trypsin 2 mL를 넣어 세포를 harvest하여 시험관에 취했다. 1,000 rpm으로 원심분리 후 PBS로 세척 후 다시 1,000 rpm으로 원심 분리하였다.

상층액을 버리고 각각에 0.5% LMPA (low melting point agarose)를 1 mL를 가해준 뒤 각각 1분씩 섞어주었다. 0.65% NMPA (normal melting point agarose) 130 μ L를 미리 입힌 슬라이드 (fully

frosted)에 이 액 50 μ L를 떨어뜨린 후 커버슬라이드를 덮었다. 냉장고에서 약 30분간 굳힌 뒤 커버슬라이드를 제거하고 그 위에 다시 0.5% LMPA를 100 μ L를 떨어뜨린 후 커버슬라이드로 덮고 냉장고에서 30분간 굳혔다. 커버슬라이드를 제거한 후 lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가서 약 60분간 용해시켰다. 그 후 전기영동완충액 (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13)에 20분간 담가 정치하였다. 전기영동장치에 슬라이드를 양극 쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 전기영동하였다.

슬라이드를 꺼내 0.4 M tris (pH 7.5)에 30분간 담가 증화시켰다. Tray에 걸어 말린 후 ethidium bromide (2 µg/mL)를 20 µL를 각각에 떨어뜨린 후 515~560 nm의 excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하여 화상분석기(image analyzer)인 COMET 3.1 (Kinetic image, England)을 사용하여 슬라이드 당 50 cell을 분석하였다. 한편 endonuclease III 처리 시에는 endonuclease III buffer (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0 with KOH)에 30분간 씻고 endonuclease III 1 µg/mL를 30 µL 가한 후 커버글라스로 덮어서 37°C에서 30분간 반응시키는 것을 세포용해 후에 하였으며 이하 동일한 조작을 하였다.

또한, S-9 mix는 1 M KCl 66 µL, 0.25 M MgCl₂ · H₂O 64 µL, 0.2 M Glucose-6-phosphate 50 µL, 0.04 M NADP 200 µL, 0.2 M NaHPO₄ buffer (pH 7.4) 1 mL, H₂O 420 µL, S-9 200 µL를 넣어 전체량을 2 mL로 조제하였으며 시료와 함께 처리하였고 농도는 배지 중 10%로 하였다. Comet 시험의 데이터는 Olive tail moment (% DNA x distance of center of gravity of DNA, OTM)와 tail length (distance between the head and the last DNA fragment, TL)로 나타내었다(Duez *et al.*, 2004).

4. 통계처리

Student's t-test를 사용하였다.

결 과

1. 디젤분진(DEP_{2.5})의 세포독성

Fig. 1은 DEP_{2.5}의 세포독성 실험결과로서 5~25 µg/mL 농도에서는 대조군에 비해 63~66%의 세포독성을 나타내었고, 50~200 µg/mL의 농도에서는 83~85%의 세포독성을 유의성 있게 나타내었다.

2. 디젤분진(DEP_{2.5})의 DNA 손상

Fig. 2는 DEP_{2.5}의 농도에 따른 DNA손상 정도를 보여주는 것으로 각각 OTM과 TL을 나타낸다. 50~200 µg/mL의 농도에서 유의성 있게 농도의

존적으로 DNA 손상이 증가한 것으로 나타났다.

3. 디젤분진(DEP_{2.5})의 산화적 DNA 손상과 항산화제에 의한 억제효과

Fig. 3은 DEP_{2.5} 100 µg/mL에서 endonuclease III를 처리했을 때의 DNA 손상을 나타내었다. DEP_{2.5}에 endonuclease III를 처리했을 때 DNA손상이 증가되는 것(n=2, OTM에서 20.4%, TL에서 21.5%)으로 보아 유의성은 나타나지 않았으나 디젤분진은 DNA 염기의 산화적 손상을 일으키는 것으로

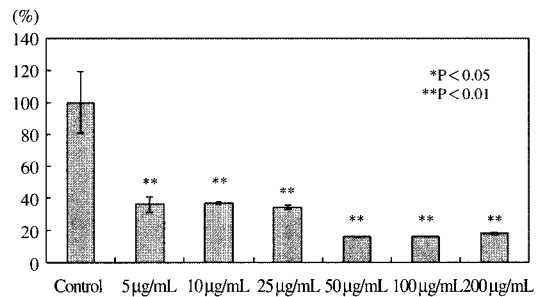


Fig. 1. Cytotoxicity of DEP_{2.5} in NIH/3T3 cells.

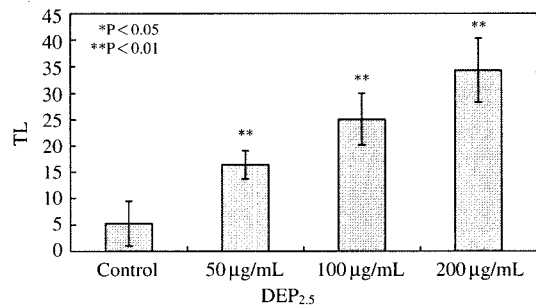
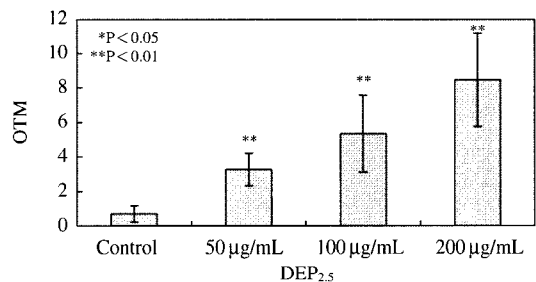


Fig. 2. Concentration-effect relationship of DEP_{2.5}-induced DNA damage.

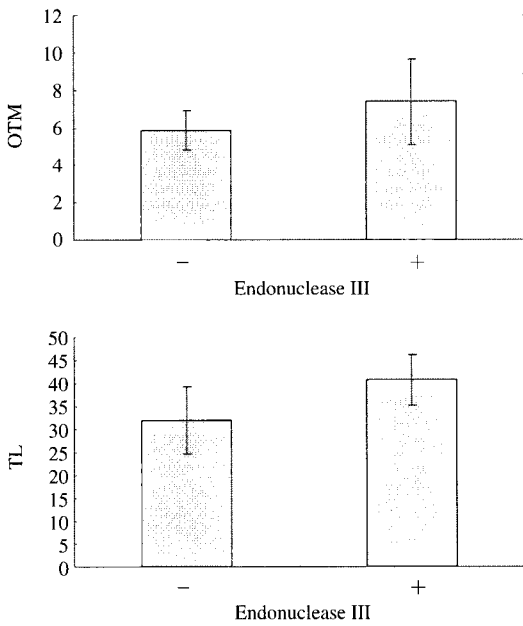


Fig. 3. DNA damage of DEP_{2.5} (100 µg/mL) with and without subsequent treatment of endonuclease III.

나타났다.

Fig. 4는 DEP_{2.5} 100 µg/mL에서 endonuclease III를 처리 했을 때와 처리하지 않았을 때 항산화제인 vitamin C의 효과를 농도별로 나타낸 것으로 endonuclease III를 처리시(n=2) 유의성은 나타나지 않았으나 농도의존적으로 DNA 손상이 줄어들었으며 비처리시보다 감소경향이 뚜렷하였다. 따라서 DEP_{2.5}는 pyrimidine 염기의 산화적 손상을 크게 일으키며 이 같은 손상은 vitamin C와 같은 항산화제에 의해 부분적으로 보호될 수 있는 것으로 나타났다(Iwai *et al.*, 2000; Greenwell *et al.*, 2002).

4. 디젤분진 (DEP_{2.5})의 대사활성화제 처리 시 DNA 손상과 CYP 저해제의 억제효과

Fig. 5에는 DEP_{2.5} 100 µg/mL에서의 S9 mixture 90분간 처리시의 DNA 손상도를 나타내었다. S-9 mixture 처리 시 DNA 손상이 유의성 있게 증가한 것(OTM 41.2%, TL 42.9%)으로 나타났다. 한편, Fig. 6에 DEP_{2.5} 100 µg/mL와 S-9 mixture 90분 처리 시 CYP1A1 저해제인 galangin 처리 시 DNA 손상 억제효과가 농도의존적으로 유의성 있게 나타

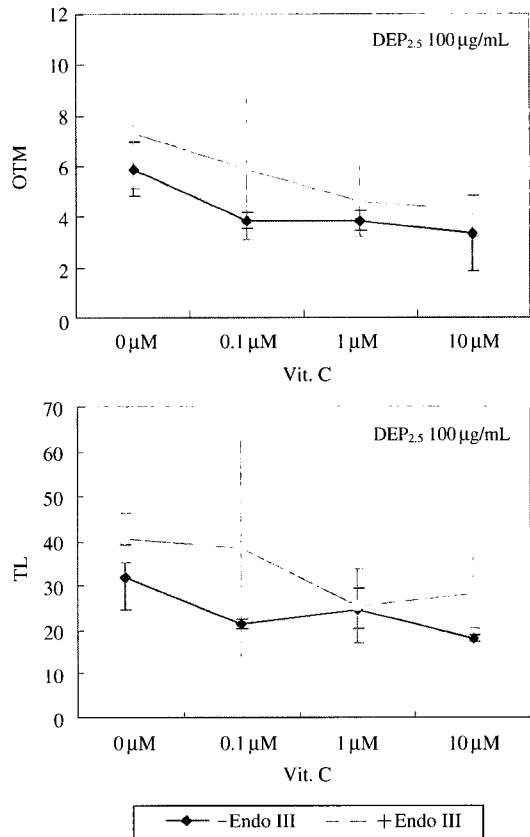


Fig. 4. Effect of vitamin C on DEP_{2.5}-induced DNA damage with and without subsequent treatment of endonuclease III.

났다. 따라서 DEP_{2.5}는 대사활성화시 DNA 손상이 증가되는 것으로 보아서 PAH 등 간접발암물질이 다량 함유되어 있으며 이들의 세포내 유전독성은 flavonoid의 일종인 galangin과 같은 물질에 의해 억제되어 부분적으로 보호될 수 있는 것으로 나타났다(Le Marchand *et al.*, 2000).

5. 디젤분진 (DEP_{2.5}) 분획들의 DNA 손상

Fig. 7에 DEP_{2.5}와 그 분획들의 50 µg/mL에서 endonuclease III 처리 시 DNA 손상정도를 나타내었다. Endonuclease III 처리 시 모든 분획에서 DNA 손상이 증가되었고 DEP_{2.5}와 비교해 볼 때 특히 분획 F5-F7에서의 DNA 손상정도가 큰 편으로 나타났다.

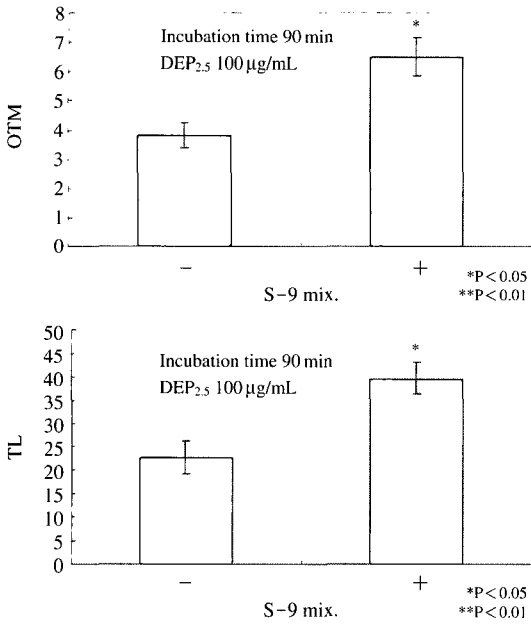


Fig. 5. DNA damage of DEP_{2.5} in the presence and absence of S-9 mixture.

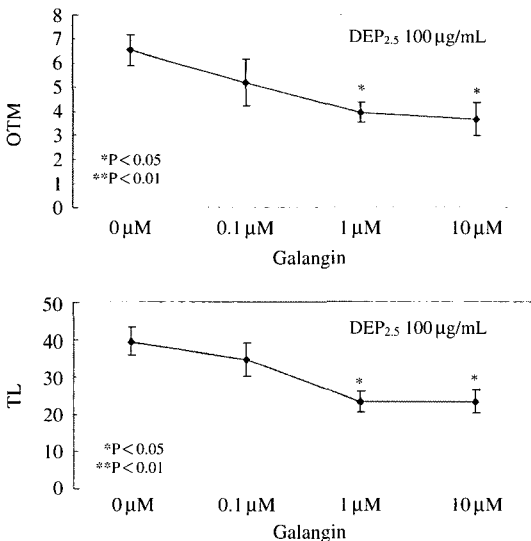


Fig. 6. Effect of CYP1A1 inhibitor, galangin on DEP_{2.5}-induced DNA damage in the presence of S-9 mixture.

Fig. 8은 DEP_{2.5}와 그 분획들의 50 µg/mL에 S-9 mixture 처리 시 DNA 손상정도를 보여준다. S-9

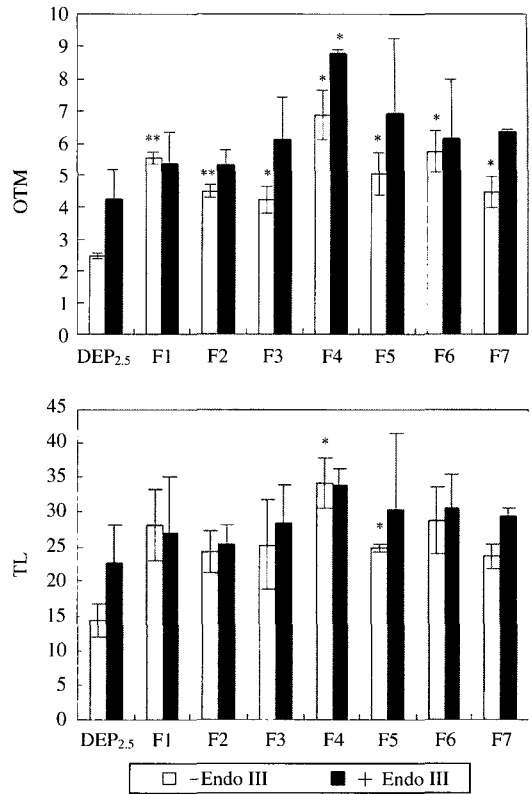


Fig. 7. DNA damage of DEP_{2.5} fractions(50 µg/mL) with and without subsequent treatment of endonuclease III (*P<0.05; **P<0.01).

mixture 처리 시 대부분의 분획에서 DNA 손상이 증가되었고 DEP_{2.5}와 비교해 볼 때 특히, F1-F4에서 DNA 손상정도가 더 큰 것으로 나타났다.

F1-F7로 갈수록 극성이 커지는 분획의 특성으로 볼 때 산화적 DNA 손상은 극성이 큰 분획들에서 크게 나타났으며, 대사활성화에 따른 DNA 손상은 극성이 낮은 쪽에서 크게 나타났다. 따라서 산화적 DNA 손상유발물질들은 DEP_{2.5}에 붙어있는 비교적 극성이 큰 물질들에 기인한 것으로 판단되며 DEP_{2.5}의 비극성분획에는 대사활성화가 필요한 비극성물질들이 분포하고 있는 것으로 판단된다.

고 찰

본 연구에서는 DEP_{2.5}의 유전독성작용기전으로서 직접적인 single strand breaks 생성과 함께 oxidized

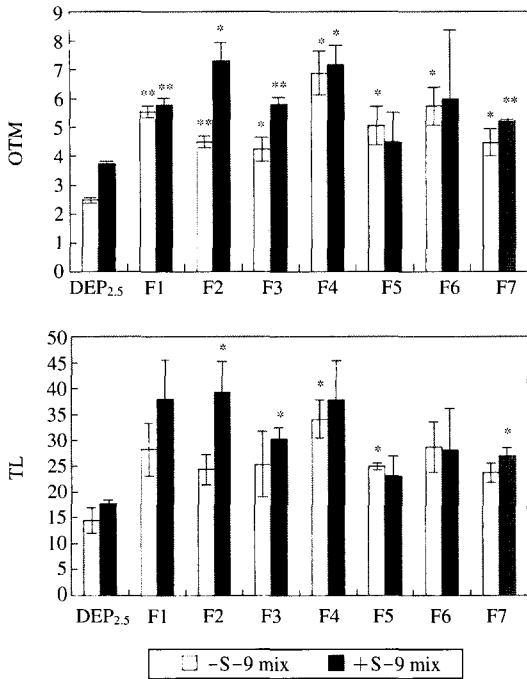


Fig. 8. DNA damage of DEP_{2.5} fractions (50 mg/mL) in the presence and absence of S-9 mixture (*P<0.05; **P<0.01).

base 생성에 의한 손상을 규명하고, S-9 mix 처리 후 대사활성화에 따른 DNA 손상도의 modulation을 파악하여 secondary genotoxicants의 존재를 파악하는데 연구목적이 있다.

DEP_{2.5}는 5~200 µg/mL의 처리농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타내었다. 또한, 50~200 µg/mL의 처리농도에서 농도의존적으로 DNA손상을 증가시켰다. 본 연구의 결과는 디젤분진 디클로로메탄추출물에 의한 human monocytic cell 또는 human lymphocyte에서 comet 시험을 이용한 DNA손상의 유의성 있는 증가현상을 보고한 것과 비슷하였다(Don Porto Carero *et al.*, 2001; Scheeper *et al.*, 2002)

대기부유분진 중에는 benzo(a)pyrene을 비롯한 여러 가지 발암성물질들과 함께 세포구성성분들의 산화적 손상을 일으키는 물질들이 함유되어 있으며(IARC, 1989b; Schins, 2002), 이들 환경독성물질들의 산화기전에 의하여 여러 가지 급만성 질환들과 관련되어 있음이 밝혀지고 있다(Li *et al.*, 2002; Bauling *et al.*, 2003). 따라서, 대기부유분진 중에 다

량 함유되어 있는 디젤분진들도 산화적 세포손상에 관여할 가능성이 높다. *in vivo*에서 디젤분진입자들의 흡입(Iwai *et al.*, 2000), 경구(Dyb Dahl *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2004), 기관주입 intratracheal instillation)(Moller *et al.*, 2003) 투여 시 8-hydroxy-2'-guanosine (8-OH-dG)생성, oxidized DNA base 생성, DNA adduct 생성, oxidative protein modifications 등이 보고 된 바 있다(Pohjla *et al.*, 2003).

본 연구에서 NIH/3T3 세포에서 DEP_{2.5} 처리 후 전기영동한 슬라이드를 endonuclease III로 처리한 후 comet assay를 실시한 결과 endonuclease III 처리하지 않은 슬라이드에서 보다 OTM에서 20.4%, TL에서 21.5% 증가되었다. 또한 DEP_{2.5}에 H₂O₂를 동시처리 시에는 DNA 손상도가 증가되었다(data not shown). 따라서 DEP_{2.5}는 *in vitro*에서 세포내 DNA의 oxidized base를 생성하는 것으로 나타났다. Endonuclease III는 apurinic (AP)에서 손상된 pyrimidines을 제거하는 N-glycosylase activity를 갖고 있다. 따라서 endonuclease III처리 후 comet 실험에서의 DNA의 손상도 증가는 oxidized base의 존재를 확인하는 증거가 된다(Farombi *et al.*, 2004).

한편, DEP_{2.5} (100 µg/mL)와 함께 항산화성 물질로서 잘 알려진 vitamin C를 0.1~10 µM 로 동시처리한 결과 DNA 손상 및 산화적 DNA 손상 모두 농도 의존적으로 감소되는 경향을 나타내었다. 따라서 vitamin C와 같은 항산화제는 DEP_{2.5}와 같은 pro-oxidant에 대한 유전독성억제효과가 있는 것으로 판단된다. 이 같은 결과는 vitamin C와 glutathione과 같은 세포내 항산화물질이 대기부유분진 등의 독성을 억제시켰다는 보고(Greenwell *et al.*, 2002; Bauling *et al.*, 2003), vitamin C가 고갈된 실험동물에서 디젤분진의 독성을 증가시킨다는 보고(Moller *et al.*, 2003)들과 관련이 있는 것으로 판단된다. 따라서 *in vivo* 연구나 임상연구가 필요하지만 디젤분진오염이 심한 곳에 거주하는 사람들의 산화적 유전독성보호물질로서의 항산화제의 응용이 고려된다.

DEP_{2.5}에는 benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene 등 다환방향족 탄화수소들이 많이 함유되어 있다(IARC, 1989a). 이들 비극성발암물질들은 체내에 흡수되어 간세포 등에서 대사되어 DNA와 비가역적 공유결합을 하여 돌연변이나 발암성을 야기시킨다고 알려져 있다(Pelkonen and Nebert, 1982; Gelboin,

1991). 또한, 디젤분진, 디젤분진의 유기용매추출물이 cytochrome P4501A1의 발현을 증가시켰다고 보고된 바 있다(Bauling *et al.*, 2003). 본 연구에서도 DEP_{2.5}에 S-9 mix을 처리하였을 때 DNA 손상도가 OTM에서 41.2%, TL에서 42.9%나 크게 증가된 것으로 보아서 DEP_{2.5}에는 다량의 다환방향족 탄화수소류가 함유되어 있는 것으로 추정된다.

또한, cytochrome p450 1A1의 저해제로 잘 알려져 있는 flavonoid화합물 중의 하나인 galangin (Heo *et al.*, 2001)을 DEP_{2.5}와 함께 0.1~10 μ M을 처리하였을 때 농도의존적인 억제경향을 나타내었다. Arylhydrocarbon receptor agonist인 β -naphthoflavon이 CYP1A1을 유도하고, 7-ethoxyreserufin O-deethylase (EROD)활성을 증가시키며, CYP1A1 inhibitor인 α -naphthoflavon (ANF)은 benzo(a)pyrene 유도 DNA 손상을 억제시켰다는 보고가 있다(Annas *et al.*, 2000). 따라서, DEP_{2.5}는 대사활성화에 의해 유전독성을 일으키는 2차 발암물질들을 함유하고 있으며 이 같은 물질들은 galangin과 같은 대사저해제에 의해 유전독성이 억제되는 것으로 보인다.

Flavonoid들에 의한 다환방향족 탄화수소류의 유전독성억제효과는 많은 연구결과들이 보고되고 있다(Das *et al.* 1987; Heo *et al.*, 1992; Edenharder *et al.*, 2003). 앞으로 *in vivo* 연구 및 임상연구를 비롯한 더 많은 관련 연구가 필요하지만 DEP_{2.5}와 같은 환경독성물질의 노출위험이 많은 사람들에게 flavonoid (e.g. galangin, quercetin)와 같은 cytochrome P4501A저해제가 독성경감효과를 나타낼 수도 있을 것으로 판단된다(Das *et al.*, 1987; Heo, 1992; Quadri *et al.*, 2000).

한편, DEP_{2.5}의 분획들에 대한 DNA 손상도를 측정한 결과 DEP_{2.5}보다 분획들의 손상도가 컸다. F1에서 F6으로 갈수록 극성이 커지는 분획의 특성으로 볼 때 산화적 DNA 손상은 극성이 높은 분획들에서 크게 나타났으며, 대사활성화에 따른 DNA 손상은 극성이 낮은 쪽에서 크게 나타났다. 따라서 산화적 DNA 손상유발물질들은 DEP_{2.5}에 붙어있는 비교적 극성이 큰 물질들에 기인 한 것으로 판단되며, DEP_{2.5} 비극성분획에는 대사활성화가 필요한 2차 발암물질들이 분포하고 있는 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 DEP_{2.5}의 DNA 손상도 측정을 위한 간단한 biomarker 개발목적으로 comet assay를 사용한 결과 DEP_{2.5}의 중요한 두 가지 유전독성기전인 산화적 DNA 손상과 대사활성화에 의한 DNA 손상도를 합리적으로 평가할 수 있었으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) DEP_{2.5}는 NIH/3T3 세포에서 농도 의존적으로 세포독성과 DNA 손상을 나타내었다.

2) DEP_{2.5}는 DNA 염기에 산화적 DNA 손상을 일으키며 항산화제인 vitamin C에 의하여 감소되었다.

3) DEP_{2.5}는 대사활성화에 의하여 DNA 손상을 증가시키며 CYP1A1저해제로서 flavonoid인 galangin에 의하여 감소되었다.

4) DEP_{2.5}의 분획들은 DEP_{2.5}보다 DNA 손상도가 컸으며 극성분획에서 산화적 손상도가 컸으며 비극성분획에서는 대사활성화에 따른 손상도가 컸다.

이상을 요약하면 DEP_{2.5}는 세포독성과 함께 DNA 손상을 야기시키며, 산화적 DNA 손상과 대사활성화에 의한 DNA 손상증가를 나타내었으며, 항산화성물질과 대사활성화저해제에 의해 감소될 수 있었다. 본 연구결과, 디젤분진의 체세포에서의 DNA 손상도를 파악하여 향후 돌연변이원성물질을 함유하고 있는 디젤분진의 유전독성평가에 활용될 기초자료를 얻을 수 있었으며 comet assay에 의한 디젤분진의 인체 위해성을 평가하는 데에도 중요한 자료로서 사용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003년 환경부의 차세대핵심환경기술 핵심사업 (Eco-technopia 21 project) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드리는 바이다.

참고 문헌

환경부. 환경백서, 2000.

Annas A, Brittebo E and Hellman B. Evaluation of benzo

- (a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis, *Mutat. Res.* 2000; 471(1-2): 145-155.
- Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, Marano F and Baeza-Squiban A. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells, *Am J Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 2003; 285(3): 671-679.
- Cole SP. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1986; 17: 259-263.
- Das M, Khan WA, Asokan P, Bickers DR and Mukhtar H. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in epidermis and lungs of SENCAR mice by naturally occurring plant phenols, *Cancer Res.* 1987; 47(3): 767-773.
- Don Porto Carero A, Hoet PH, Verschaeve L, Schoeters G and Nemery B. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1), *Environ. Mol. Mutagen* 2001; 37(2): 155-163.
- Duez P, Dehon G and Dubois J. Validation of raw data measurements in the comet assay, *Talanta* 2004; 63(4): 879-886.
- Dybdahl M, Risom L, Moller P, Autrup H, Wallin H, Vogel U, Bornholdt J, Daneshvar B, Dragsted LO, Weimann A, Poulsen HE and Loft S. DNA adduct formation and oxidative stress in colon and liver of Big Blue rats after dietary exposure to diesel particles, *Carcinogenesis* 2003; 24(11): 1759-1766.
- Edenharder R, Krieg H, Kottgen V and Platt KL. Inhibition of clastogenicity of benzo[a]pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice *in vivo* by fruits, vegetables, and flavonoids, *Mutat. Res.* 2003; 537(2): 169-181.
- Farombi EO, Moller P and Dragsted LO. Ex-vivo and *in vitro* protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells, *Cell Biol. Toxicol.* 2004; 20(2): 71-82.
- Gelboin HV. Benzo[a]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes, *Physiol. Rev.* 1980; 60(4): 1107-1166.
- Greenwell LL, Moreno T, Jones TP and Richards RJ. Particle-induced oxidative damage is ameliorated by pulmonary antioxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32(9): 898-905.
- Health Effects Institute (HEI). Diesel exhaust: a critical analysis of emissions, exposure and health effects. A Special Report of the Institute's Diesel Working Group, Health Effects Institute. Cambridge, MA. 1995.
- Health Effects Institute (HEI). Program summary: Research on Diesel Exhaust, Health Effects Institute. Cambridge, MA. 1999.
- Heo MY, Yu KS, Kim KH, Kim HP and Au WW. Anticlastogenic effect of flavonoid against mutagen-induced micronuclei in mice, *Mutation Research* 1992; 284: 243-249.
- Heo MY, Sohn SJ and Au WW. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate, *Mutation Research* 2001; 488: 135-150.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. In: *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, World Health Organization. IARC, Lyon, France. 1989; 46.
- International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. International Agency for Research on Cancer. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 1989; 46: 1-458.
- Iwai K, Adachi S, Takahashi M, Moller L, Udagawa T, Mizuno S and Sugawara I. Oxidative DNA damages and lung cancer, *Env. Res.* 2000; 84(3): 255-264.
- Kagawa J. Health effects of diesel exhaust emissions--a mixture of air pollutants of worldwide concern, *Toxicology* 2002; 27: 349-353.
- Kato A, Nagai A and Kagawa J. Morphological changes in rat lung after long-term exposure to diesel emissions, *Inhalation Toxicology* 2000; 12: 469-490.
- Lewtas J and Gallagher J. Complex mixtures of urban air pollutants: identification and comparative assessment of mutagenic and tumorigenic chemicals and emission sources, *IARC Sci. Publ.* 1990; 104: 252-260.
- Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM and Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages, *J. Immunol.* 2002; 169(8): 4531-4541.
- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR and Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92(2): 154-160.
- Mauderly JL. Lung overload: the dilemma and opportunities for resolution, *Inhalation Toxicology* 1996; 8: 1-28.
- McClellan RO. Lung cancer in rats from prolonged expo-

- sure to high concentrations of carbonaceous particles: implication for human risk assessment, *Inhalation Toxicology* 1996; 8: 193–226.
- Moller P, Daneshvar B, Loft S, Wallin H, Poulsen HE, Autrup H, Ravn-Haren G and Dragsted LO. Oxidative DNA damage in vitamin C-supplemented guinea pigs after intratracheal instillation of diesel exhaust particles, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 189(1): 39–44.
- Muller AK, Farombi EO, Moller P, Autrup HN, Vogel U, Wallin H, Dragsted LO, Loft S and Binderup ML. DNA damage in lung after oral exposure to diesel exhaust particles in Big Blue rats, *Mutat. Res.* 2004; 550(1–2): 123–132.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Carcinogenic Effects of Exposure to Diesel Exhaust. NIOSH Current Intelligence Bulletin 50. DHHS (NIOSH), Centers for Disease Control. Atlanta, GA. 1988.
- Pelkonen O and Nebert DW. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis, *Pharmacol. Rev.* 1982; 34(2): 189–222.
- Pohjola SK, Lappi M, Honkanen M, Rantanen L and Savela K. DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene, *Mutagenesis* 2003; 18(5): 429–438.
- Quadri SA, Qadri AN, Hahn ME, Mann KK and Sherr DH. The bioflavonoid galangin blocks aryl hydrocarbon receptor activation and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced pre-B cell apoptosis, *Mol. Pharmacol.* 2000; 58(3): 515–525.
- Scheepers PT, Coggon D, Knudsen LE, Anzion R, Autrup H, Bogovski S, Bos RP, Dahmann D, Farmer P, Martin EA, Micka V, Muzyka V, Neumann HG, Poole J, Schmidt-Ott A, Seiler F, Volf J and Zwirner-Baier I. BIOMarkers for occupational diesel exhaust exposure monitoring (BIOMODEM)—a study in underground mining, *Toxicol. Lett.* 2002; 134(1–3): 305–317.
- Schins RP. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers, *Inhal. Toxicol.* 2002; 14(1): 57–78.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research* 1988; 175: 184–191.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) Health Assessment Document for Diesel Emissions: SAB Review Draft. EPA/600/8–90/057D. National Center for Environmental Assessment, Washington DC. 1999.
- World Health Organization (WHO) Diesel fuel and exhaust emissions. International Program on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 171, Geneva, Switzerland. 1996.