

담배주류연의 세포독성에 대한 담배필터의 영향

신한재* · 손형욱 · 한정호 · 박철훈 · 허재연 · 이동욱 · 황건중 · 현학철

KT&G 중앙연구원
(2005년 6월 3일 접수)

Effect of Cigarette Filter on Cytotoxicity Potential of Mainstream Smoke

Han-Jae Shin*, Hyung-Ok Sohn, Jung-Ho Han, Chul-Hoon Park,
Jae-Yeon Hur, Dong-Wook Lee, Keon-Joong Hwang and Hak-Chul Hyun

KT&G Central Research Institute

(Received June 3, 2005)

ABSTRACT : The objective of this study was to evaluate the effect of cigarette filter on *in vitro* cytotoxicity of cigarette mainstream smoke from the cigarette. In this work, we used 3 types of cigarettes included non-filtered 2R4F cigarette, cellulose acetate-filtered 2R4F cigarette, and carbon dual-filtered 2R4F cigarette which was made from original 2R4F by replacing with an acetate filter containing carbon. The cytotoxicity of both the cigarette smoke condensate (CSC), which was collected in Cambridge filter pad, and the gas/vapor phase (GVP), which was bubbled through in phosphate-buffered saline in a gas-washing bottle, was determined using a neutral red uptake assay with CHO-K1 cells. With regard to cytotoxicity when calculated on an equal puff basis, the cytotoxicity of CSC from the filtered cigarettes was lower than that of the non filtered cigarette. Also, EC_{50} value of GVP from carbon filter cigarette was 40.9 puff/L, indicating the cytotoxicity to be 20% lower than that of the CA filter cigarette. The cytotoxicity of the GVP was correlated to the several vapor phase components (formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, crotonaldehyde and MEK). In conclusion, carbon filter, which significantly reduced the amount of carbonyl compounds in mainstream cigarette smoke, results in significant reductions in the cytotoxicity potential of the smoke.

Key word : cigarette smoke condensate, gas-vapor phase, CHO cells, cytotoxicity

저타르, 저니코틴 제품에 대한 소비자의 요구에 따라 오늘날 판매되는 담배의 대부분은 필터를 부착하고 있다 (Jenkins and McRae, 1996). 전 세계적으로 가장 많이 사용되는 필터 소재는 cellulose acetate (CA)이며, 필터 미 부착 담배에

비하여 타르와 니코틴을 40~50% 까지 감소시킬 수 있다고 알려져 있다(Keith and Derrick, 1965). 현재까지 필터에 의한 담배연기 성분의 선택적 제거능을 부여하기 위해 다양한 첨가제의 처리 및 화학적 성질의 변환 등 많은 방법이 제안 되었지

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea

만(Morie, 1977), 탄소를 함유한 이중 또는 삼중 필터가 상업적으로 가장 많이 사용되고 있다. 탄소를 함유한 필터는 CA 필터보다 비점이 낮은 (>152°C) 물질을 제거하는데 효과적이며 (Morie and Baggett, 1975), CA 필터로는 제거되지 않은 formaldehyde, acetaldehyde, acetone, 그리고 acrolein 등과 같은 저분자량의 aldehyde류를 크게 감소시킨다고 보고 되고 있다(Keith, 1975). 한편 이런 aldehyde 화합물과 hydrocarbon 및 alcohol류 등은 담배연기의 세포독성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Curvall *et al.*, 1984)

따라서 본 연구에서는 CA 필터로 이루어진 표준담배(Kentucky Reference Cigarette, 2R4F), CA 필터를 탄소필터로 대체한 표준담배, 필터가 제거된 표준담배(양절담배) 등 3종의 시료의 담배연기 응축물(CSC) 및 가스상 분획에 대한 세포독성을 조사하였고, 담배연기 성분들과의 상관성을 비교 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

Nutrient Mixture Ham's F-12 medium (Ham's F-12), fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin solution, phosphate-buffered saline(PBS) 등은 GIBCO(Grand Island, NY, USA) 제품을 사용하였다. Dimethylsulfoxide (DMSO), mitomycin C(MMC), sodium dodecyl sulfat(SDS), colchicine, cyclophosphamide, neutral red 등은 Sigma(St, Louis, USA) 제품을 사용하였다. 그 외의 유기용매들은 특급시약을 사용하였다.

담배시료의 제조

본 연구에서 사용된 담배시료는 CA 필터가 부착된 표준담배(Kentucky reference cigarette 2R4F)를 기준으로 해서, CA 필터를 carbon dual 필터(탄소함량 : 2 mg/mm)로 대체한 담배와 필터가 제거된 양절담배를 각각 제조하였다. 필터 담배는 공기회석율 0% 및 EPD 170 mmH₂O로 맞

추어서 선별하였다. 제조된 3 종류의 담배를 CORESTA 조건으로 설정되어있는 항온 항습실 (온도 22 ± 2°C, 상대습도 60 ± 5%)에서 48시간 조화시킨 후 실험에 사용하였다.

담배연기 응축물 및 가스상 분획의 제조

담배연기응축물(CSC)은 담배시료 10 개피를 RM20/CS 흡연장치(Heinr Borgwaldt, Germany)를 이용하여 CORESTA 표준흡연조건(puff volume: 35 mL, puff frequency : 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 puff 수 5회 연소시켜 생성된 담배연기를 44 mm Cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. DMSO를 사용해서 Cambridge filter pad로부터 CSC를 추출하여 농도가 10 mg/mL이 되도록 한 후 -70°C에 보관하면서 시험에 사용하였다.

담배연기로부터 가스상 성분의 분획(gas/vapor phase, GVP)의 제조를 위해 100 mL gas washing bottle을 이용하였다. CORESTA 표준흡연조건에 따라 10개피의 담배시료를 RM20/CS 흡연장치를 이용하여 5 puff 연소시킨 후, Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 20 mL PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas washing bottle에 포집하였다. 이와같은 방법으로 5회 흡연한 담배연기로부터 제조한 GVP는 포집 후 2시간 내에 세포독성을 측정하였다.

화학성분의 분석

담배연기 중 tar, 니코틴 분석은 ISO 3308에 준하여, 각각의 담배시료 20개피를 RM20 흡연 장치를 이용하여 담배를 연소시키면서 92 mm Cambridge filter pad를 TPM을 포집하여 분석하였다. 연기응축물 중의 니코틴분석은 ISO 10315에 준하여 GC 분석을 실시하였다. 담배의 주류연 중 carbonyl 화합물의 분석은 Health Canada의 official method(1999)에 따라서 측정했으며, 휘발성 및 반휘발성 성분의 분석은 ATD-400이 장착된 HP5890 GC를 이용하여 분석하였다.

세포주 및 세포배양

실험에 사용한 Chinese hamster ovary

(CHO-K1)세포주는 한국세포주은행 (KCLB)으로 부터 분양받아 사용하였으며, 세포주기는 14 ± 2 시간이다. CHO-K1 세포는 10% FBS, 100 U penicillin 100 u/mL와 streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 포함된 Ham's F12 배양액을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 0.25% trypsin-0.03% EDTA 용액을 이용하여 계대 유지하였다. 세포주의 자연발생적 돌연변이 생성을 최소화하고자 구입 후 부터 18번 미만으로 계대 배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO₂ 배양기(VISION, Korea)를 이용하여 포화 습도하에서 37°C, 5% CO₂ 상태로 배양하였다.

세포독성 시험

담배연기로부터 얻은 시험물질의 세포독성은 리소솜에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 Neutral red cytotoxicity assay 방법을 사용하였다(Borenfreund and Puerner, 1985). CHO-K1 세포(2×10^4 cells)를 96 well plate(n=6)에 이식해서 24 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 CSC에 첨가된 1%의 DMSO 또는 GVP에 첨가된 10%의 PBS 처리군으로 하였다. 시험물질의 처리 후 22 ± 2 시간 동안 5% FBS, penicillin 100 U/mL 와 streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 포함된 Ham's F12 배양액에서 배양했으며, 세포배양이 끝나면 배양액을 제거한 후 150 μl 의 neutral red 용액(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리하여 37°C에서 배양하였다. 3 시간 경과 후 neutral red 용액을 제거하고, 200 μl 의 고정액(0.5% formaldehyde-1% CaCl₂)으로 세포를 세척하였다. 유기용매 용액

(50%ethanol-1% acetic acid) 150 μl 을 첨가해서 실온에서 15분간 neutral red를 추출한 후 microplate reader(BIO-TEK, USA)를 사용해서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

통계학적인 방법

시료에 대한 세포독성의 수치는 EC₅₀ 값으로 표기하였다. EC₅₀ 값은 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내는 시료의 농도이며, 용량-반응식을 이용하여 값을 구하였다. 세포독성 결과의 모든 EC₅₀ 측정값은 CSC/mL 또는 puff/L로 환산해서 표준편차와 함께 표시하였다. SPSS(version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 one way ANOVA test를 실시하였다. 사후분석으로는 Duncan test를 통해서 p<0.05의 수준에서 각 시험군과의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

담배필터에 따른 연기일반성분 이행량

CA 필터담배, carbon 필터담배 그리고 양질담배의 일정한 puff 수에 대한 연기일반성분에 대한 이행량을 비교하고자, puff 수 5로 연소시켜 TPM, tar, 및 nicotine등에 대한 이행량을 측정하였다. Table 1에서와 같이 CA 필터담배와 carbon 필터담배의 TPM, tar 그리고 nicotine등에 대한 이행량은 필터 특성과 관계없이 비슷한 값을 보

Table 1. Description of cigarettes utilized in this study including FTC analyses of TPM, Puff, Tar, and nicotine in mainstream smoke

Cigarette	Puff (Puff. NO)	TPM (mg/cig.)	Tar (mg/cig.)	Nicotine (mg/cig.)
CA filter	5	7.59	5.95	0.43
Carbon filter	5	7.33	5.81	0.41
Non filter	5	16.29	13.23	0.95

여주고 있다. 양절담배의 경우 TPM, tar 및 nicotine의 이행량이 각각 16.29 mg/cig., 13.23 mg/cig., 0.95 mg/cig.으로 필터담배의 경우보다 2배이상 높았다. 그러나 연기성분 중 nicotine/tar 비는 3가지 담배시료 모두에서 7.2%로 동일한 값을 나타냈다. 이와같은 결과는 필터 미 부착 담배에 비하여 필터 부착시 tar와 nicotine을 60~80% 까지 감소시킨다는 보고(Keith and Derrick, 1965)와 일치하는 것이며, carbon 필터를 사용시 고체상성분의 이행량은 CA 필터와 비슷한 것으로 생각된다.

담배연기 응축물 (CSC)에 대한 세포독성

In vitro 세포독성은 미토콘드리아의 활성을 측정하는 MTT/XTT법과 세포질 막의 손상을 측정하는 LDH법 등 다양한 방법에 의해서 측정되어 진다. 담배시료에 대한 세포독성은 리소솜에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 neutral red uptake 법이 가장 효과적이라고 알려져 있으며 (Putnam *et al.*, 2002), CORESTA에서도 세포독성의 표준방법으로 권장하고 있다 (Bombick *et al.*, 2001). 본 연구에서도 CHO-K1 세포를 이용

한 neutral red uptake 법을 사용해서 CA 필터담배, carbon 필터담배 그리고 양절담배로부터 제조된 CSC에 대한 세포독성을 측정 비교 하였다. 담배주류연의 세포독성에 대한 담배필터의 영향을 조사하기 위하여 동일한 puff 수(5회)로 연소시켜 담배시료를 제조하였다. 세 종류 담배의 puff 횟수의 증가에 따라서 세포 생존율이 감소되었으며, 특히 양절담배에서 가장 급격하게 감소되었다(Fig. 1). 용량-반응식을 이용해서 구한 CA 필터담배, carbon 필터담배 그리고 양절담배의 EC₅₀ 값은 각각 68.0 ± 3.7, 67.5 ± 4.5, 그리고 28.8 ± 3.1 puff/L로서 양절담배에서 2 배 이상 높은 세포독성을 보였다(Table 2). 그러나 CSC 단위 농도당 EC₅₀ 값은 각각 95~100 µg CSC/mL로서 담배시료 간 유의적인 차이는 없었다(Data not shown). 이와 같은 결과는 새로운 carbon 필터를 채택한 담배의 CSC에 대한 CSC 농도당 세포독성은 기존의 필터담배에 비해 유의적인 차이가 없었다는 보고와 일치하는 결과이다 (Bombick *et al.*, 1997). 그러므로 양절담배에 비하여 필터담배의 담배개피 당 세포독성이 낮은 이유는 CSC의 성분에 대한 선택적 감소보다는

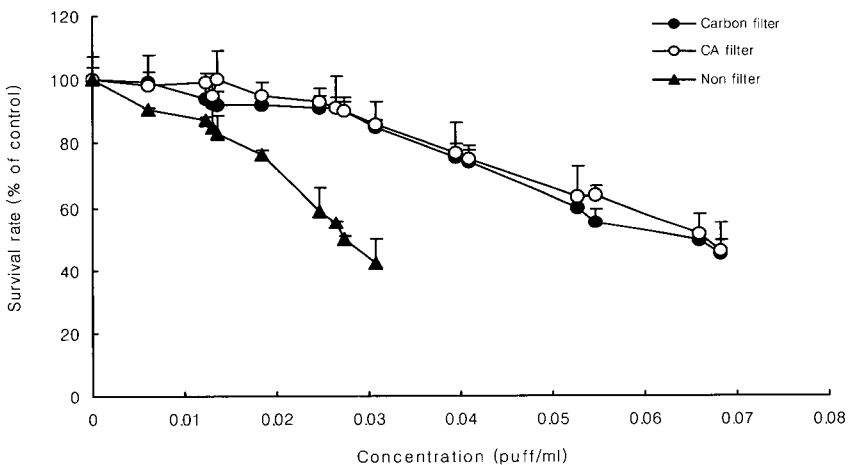


Fig. 1. Cytotoxicity of the CSC from the cigarettes with CA filter, carbon filter and non filter. CHO-K1 cells were incubated in the presence of various doses of CSC (puff/ml) for 22 hr. The cytotoxicity was determined by neutral red uptake assay and calculated as a percentage of the control. Data were expressed as mean ± S.D.

tar 등과 같은 전체 고체상 성분의 이행량의 감소에 의한 것으로 사료된다.

가스상 성분 (GVP)에 대한 세포독성

지금까지 많은 연구에서 담배연기 중 증기상 성분과 특히 저분자량의 aldehyde 화합물등은 탄소를 함유한 필터에 의하여 효과적으로 제거된다고 알려져 있다(Keith, 1975). 본 연구에서는 담배의 흡연시 Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 20 mL PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas-washing bottle에 포집한 GVP에 대해 세포독성을 조사하였다. Fig. 2 에서와 같이, 모든 담배시료에 대한 GVP를 세포에 처리시 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소되었으며, 특히 양절담배의 경우 세포생존율이 가장 급격하게 감소하였다. 용량-반응식을 이용해서 구해진 CA 필터담배, carbon 필터담배 그리고 양절담배의 GVP에 대한 EC₅₀ 값은 각각 32.5 ± 3.1, 40.9 ± 3.3 그리고 25.6 ± 3.5 puff/L 로서 carbon 필터담

배의 세포독성이 현저하게 낮았다(Table 2). 이와 같은 결과는 carbon을 함유한 필터를 채택한 담배의 경우 전 연기 (whole smoke) 수준에서 낮은 유전독성 및 세포독성을 보이는 경우와 일치하는 결과이다(Bombick *et al.*, 1997; Lauterbach, 2002).

담배필터에 따른 가스상 성분의 이행량

담배연기의 세포독성은 가스상에 포함되는 carbonyl 계열의 화합물들과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Wynder and Hoffmann, 1967). 특히 1,3-butadiene, acetaldehyde, benzene, acrylonitrile 그리고 acrolein 등은 세포독성과 정의 상관성이 있다고 알려져 있다(Bombick *et al.*, 1997; Tewes *et al.*, 2003). 본 연구에서는 담배시료의 GVP에 대한 세포독성 결과를 자세하게 이해하기 위해 CA 필터담배, carbon 필터담배 그리고 양절담배에 대한 가스상 성분들에 대하여 조사하였다. 각 담배를 5회 흡연한 후 acetaldehyde 의

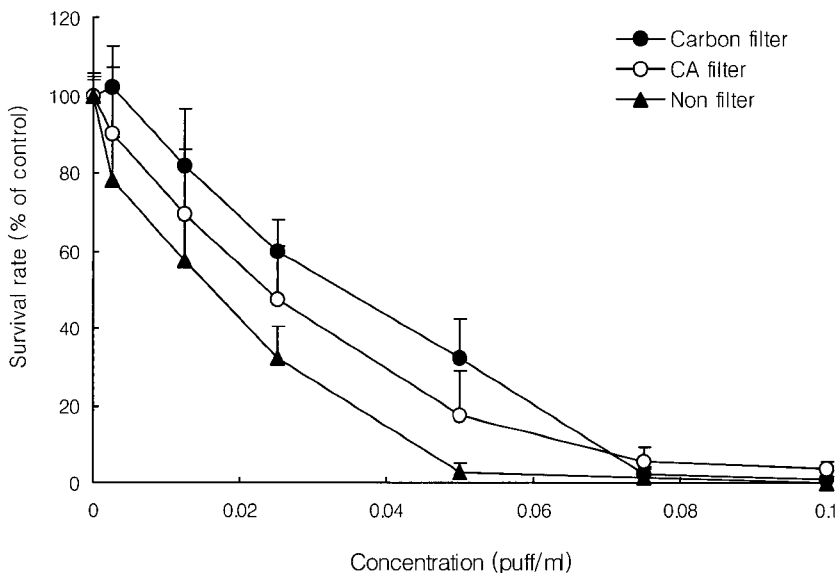


Fig. 2. Cytotoxicity of the gas/vapor phase from the cigarettes with CA filter, carbon filter and non filter. CHO-K1 cells were incubated in the presence of various doses of gas/vapor phase (puff/ml) for 22 hr. The cytotoxicity was determined by neutral red uptake assay and calculated as a percentage of the control. Data were expressed as mean ± S.D.

Table 2. Cytotoxicity of cigarette smoke

Cigarette	Smoke fraction	EC ₅₀ on the calculation basis	
		puff/L (mean ± S.D.)	Relative to non filter(%)
Non filter	TPM	28.8 ± 3.1	100
	GVP	25.6 ± 3.5	100
CA filter	TPM	68.0 ± 3.7	42.4
	GVP	32.5 ± 3.1	78.0
Carbon filter	TPM	67.5 ± 4.5	42.6
	GVP	40.9 ± 3.3	63.5

EC₅₀ means effective concentration in puff/L culture medium that reduced the number of viable cells in the exposed culture by 50% compared to the untreated control.

7종의 carbonyl 화합물, acrylonitrile 외 3종의 volatile 화합물 그리고 ammonia 및 HCN 등의 이행량을 분석 하였다. Fig. 3 에서와 같이 carbonyl 화합물 중 formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, crotonaldehyde 그리고 MEK의 이행량은 양절담배 > CA 필터담배 > carbon 필터담배 순으로 낮은 값을 나타냈으며, 각 담배시

료의 GVP에 대한 세포독성 결과와 정의 관계가 있었다. 또한 HCN과 ammonia는 양절담배에 비하여 두 종류의 필터담배에서 이행량이 약 50% 정도 감소되었으며, CA 필터담배와 carbon 필터담배 간의 차이는 없었다. 이와 같은 분석 결과로부터, HCN과 ammonia 등과 같은 성분들은 담배필터에 의해서 크게 제거되는 것으로 나타났으

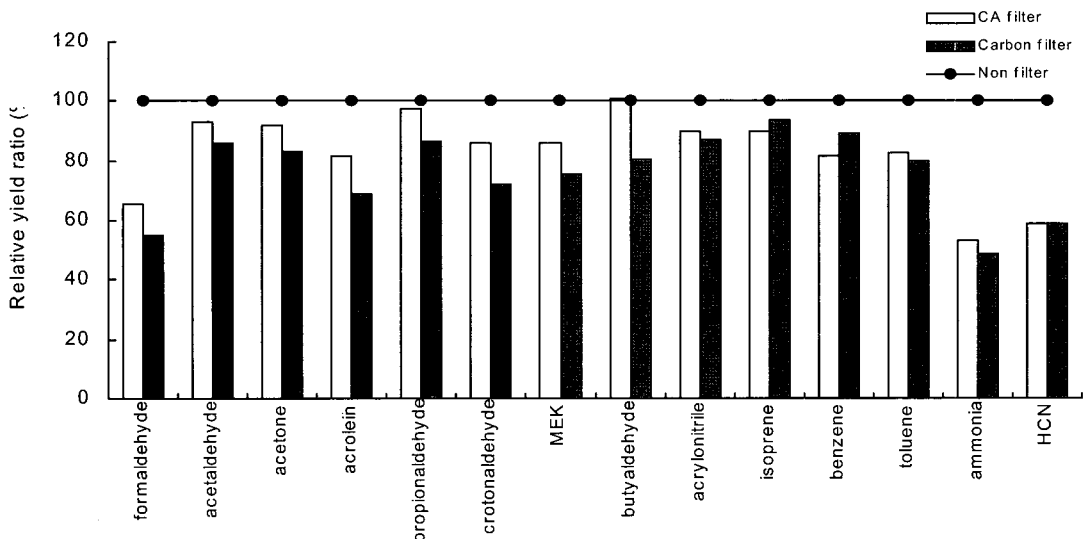


Fig. 3. Relative composition of gas-vapor phase from mainstream smoke cigarettes with CA filter, carbon filter and non-filter. Carbonyls: Formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, propionaldehyde, crotonaldehyde, MEK, butylaldehyde. Volatile: Acrylonitrile, isoprene, benzene, toluene.

며, formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, crotonaldehyde 그리고 MEK 등은 담배시료의 GVP에 대한 세포독성에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 필터종류에 따른 담배의 주류연 성분이 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위해, cellulose acetate(CA) 필터의 표준담배(Kentucky Reference Cigarette, 2R4F), CA 필터를 carbon 필터로 대체한 표준담배, 필터가 제거된 표준담배(양절담배) 등 3종의 시료를 사용하였다. 담배연기의 세포독성은 CHO-K1 세포주를 이용한 neutral red uptake법을 사용해서 측정하였다.

양절담배의 경우 TPM, tar 및 nicotine의 이행량이 각각 16.29 mg/cig., 13.23 mg/cig., 0.95 mg/cig.으로 CA 필터 또는 carbon 필터 담배의 경우보다 2배 이상 높았다. 담배 연기응축물(CSC)의 puff당 세포독성은 양절담배에 비해 필터담배에서 현저하게 낮았으나, CSC 단위 농도당 세포독성은 담배시료 간 유의적인 차이가 없었다. Gas washing bottle를 이용하여 포집한 가스상 분획(GVP)에 대한 세포독성을 비교한 결과, CA 필터담배, carbon 필터담배 그리고 양절담배의 EC₅₀ 값이 각각 32.5, 40.9, 25.6 puff/L로서, carbon 필터담배의 세포독성이 가장 낮았다.

각각의 담배시료에 대한 가스상 성분들의 이행량을 조사한 결과, carbonyl 화합물의 경우 양절담배에서 상대적으로 높았으며, carbon 필터담배에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 담배필터를 사용함으로써 HCN과 ammonia 등과 같은 성분들을 약 50% 제거하는 것으로 나타났으며, 또한 formaldehyde, acetaldehyde, acetone, acrolein, crotonaldehyde 그리고 MEK 등은 담배시료의 GVP에 대한 세포독성과 정의 관계가 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Borenfreund, E. and Puerer, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.
- Bombick, D. W., Bombick, B. R., Ayres, P. H., Putnam, K., Avalos, J., Borgerding, M. F. and Doolittle, D. J. (1997) Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smokecondensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fund. Appl. Toxicol.* 39: 11-17.
- Bombick, D. W., Bombick, B. R., Swauger, J. and Doolittle, D. J. (2001) The use of *in vitro* short term tests to evaluate progress toward reducing the toxicity of cigarette smoke. CORESTA Meet. Smoke-Techno Group, Xian: Paper No. ST4.
- Curvall, M., Enzell, C. R. and Pettersson, B. (1984) An evaluation of the utility of four *in vitro* short term tests for predicting the cytotoxicity of individual compounds derived from tobacco smoke. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 173-193.
- Health Canada (1999) Determination of selected carbonyls in mainstream tobacco smoke. Tobacco Control Program Health Canada-Official method T-104.
- Jenkins, R. W. and McRae, D. D. (1996) Fifty years of research on cigarette smoke formation and delivery at the Tobacco Chemist's Research Conference. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 22: 337-391.
- Keith, C. H. and Derrick, J. C. (1965) Cigarette filter efficiency as measured with a homogeneous solid aerosol. *Tob. Sci.* 9: 116-120.
- Keith, C. H. (1975) Experimental and theoretical aspects of cigarette smoke filtration. *ACS Symp.* 17: 79-90.

- Lauterbach, J. H. (2002) Smoke chemistry: A useful predictor of smoke toxicology. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 28: 6-68.
- Morie, G. P. and Baggett, M. S. (1975) Selective removal of semi-volatile components of cigarette smoke by various filters. *Beitr. Tabakforsch.* 8: 150-152.
- Morie, G. P. (1977) Selective filtration of tobacco smoke components: A review. In ACS Symp. 173rd ACS meeting Agricultural and Food Chemistry Division. pp. 553-583.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W. and Doolittle D. J. (2002) Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. in Vitro* 16: 599-607.
- Tewes, F. J., Meisgen, T. J., Veltel, D. J., Roemer, E. and Patskan, G. (2003) Toxicological evaluation of electrically heated cigarette. Part 3: genotoxicity and cytotoxicity of mainstream smoke. *J. Appl. Toxicol.* 23: 341-348.
- Wynder, E. L. and Hoffmann, D. (1967) Tobacco and tobacco smoke; studies in experimental carcinogenesis. Academic Press, New York, USA.