

서울시내 주거지역 미세먼지의 유전독성 영향

오승민, 성혜경, 김은실, 김종극, 유병택, 정규혁*

성균관대학교 약학대학

Genotoxic Effect of Air-borne Particulate Matter in Residential Area of Seoul City

Seung-Min Oh, Hye-Kyoung Sung, Eun-Sil Kim, Jong-Geuk Kim,
Byung-Taek Ryu and Kyu-Hyuck Chung*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, 300, Chunchundong, Jangan-Gu, Suwon,
Gyeonggi-do 440-746, Korea

ABSTRACT

Ambient air particulate matters are classified into two distinct modes in size distribution, namely the coarse and fine particles. Correlation between high particulate concentration and adverse effects on human populations has long been recognized. However, the toxicology of these adverse effects has not been clarified. We investigated the genotoxic effect of PM_{2.5} collected from urban area in Seoul by comet assay (A549 cells), CBMN assay (CHO-K1 cells) and EROD-microbioassay (H4IIE cells). Results from *in vitro* micronucleus assay and comet assay showed that PM_{2.5} samples collected from traffic area, residential area and indoor air induced chromosomal damage and DNA breakage in a non-cytotoxic dose. The complex mixture effect of these PM_{2.5} extracts was quantified by EROD-microbioassay in terms of its bio-TEQ (biological-TCDD equivalent concentration) which was 70.87 ± 28.07 , 93.55 ± 21.80 and 14.31 ± 1.10 ng/g-PM_{2.5} in traffic area, residential area and indoor air samples, respectively. Conclusively, we suggested that PM_{2.5} collected from traffic area and residential area contains CYP1A inducer and genotoxic materials.

Key words : genotoxicity, PM_{2.5}, comet assay, micronucleus assay, EROD assay

서 론

대기 오염물질은 인체 호흡기를 통하여 직접적으로 체내에 유입되므로 건강상 매우 중요한 문제가 되고 있다. 도시환경은 디젤 자동차와 같은 이동원 (mobile source)으로부터 나오는 오염물질로 인해 대기오염이 심각해지는 것으로 알려져 환경오염으로 인한 건강문제로 제기되어 있다. 디젤 기

관은 전 세계적으로 가솔린 엔진에 비해 높은 출력과 연료의 경제성 때문에 대형 트럭이나 버스, 기관차, 선박에 널리 쓰이고 있다. 우리나라에서는 디젤연료가 가솔린 연료보다 저렴한 관계로 디젤차를 소비자가 선호하게 되었고 레저용 차량에 디젤 기관을 허용하면서 배기량이 일반 승용차보다 많은 디젤차량의 보유대수가 급격히 증가하고 있다. 이들 디젤 기관으로부터 배출되는 연소물은 환경적 측면에서는 전통적인 대기 오염 물질로 알려진 carbon monoxide (CO)와 Nitrogen oxides (NO)는 적게 방출하는 특징이 있는 반면 (Williams *et*

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-31-290-7714, E-mail: khchung@skku.edu

al., 1989), 입자상 대기오염물질의 배출량이 많은 특징을 가지고 있으며, 도시대기 중 미세먼지 (fine particulate matter 직경이 $2.5\mu\text{m}$ 이하의 크기 입자)의 주요 배출원이 되고 있다 (U.S. EPA, 1999). 따라서 이러한 디젤미세분진 (Diesel exhaust particles, DEP)은 넓은 비표면적을 가지고 있어 다양한 발암 및 돌연변이원성 물질들을 흡착하는 것으로 알려져 있으며 (Schuetzle, 1983; Mi *et al.*, 2000), 대표적인 물질로는 hydrocarbons (aliphatic 또는 aromatic), hydrocarbon derivatives, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), PAH derivatives, heterocyclic compounds 및 heterocyclic derivatives 등이 보고되었다 (U.S. EPA in California, 1998; Poniak *et al.*, 2003).

미세먼지는 폐저부 (peripheral lung)로 깊게 흡입되므로 호흡기관에 대해 병리학적 영향을 미치는 특성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Heyder, 1993). 최근에는 역학적 연구들을 통하여 미세먼지 농도의 증가와 질병률 (morbidity) 및 사망률 (mortality)의 증가와 관련이 있다는 것이 알려지고 있다 (Dockery and Brunekreef, 1996; Wilson and Suh, 1997). 특히 호흡성 입자 크기의 디젤분진은 폐암과 만성폐질환 (chronic obstructive pulmonary diseases)의 원인물질이라고 생각된다 (Schwartz, 1993; Timblin, 1998). 이미 동물실험에서 미세먼지가 호흡기계 (respiratory tract)에서 발암과 만성폐질환을 일으키는 것이 알려져 있으나 이들 질환을 일으키는 기전에 대해서는 아직 명확하게 규명되어 있지 않다 (Matsuo *et al.*, 2003; Rengasamy *et al.*, 2003). 다만 현재까지의 시험관내 (*in vitro*) 연구에 의해 미세먼지와 이의 유기성 추출물이 변이원성을 나타내는 것으로 보고된 바 있으며, 이로 인해 호흡기계 이상과 폐암이 발생되는 것으로 추정하고 있다 (Seemayer *et al.*, 1987; Hsiao *et al.*, 2000; Poma *et al.*, 2002; Knaapen *et al.*, 2002; Gabelova *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005; Healey *et al.*, 2005).

유전독성을 평가하기 위한 시험관내 (*in vitro*) 독성시험법으로는 주로 bacterial gene mutation assay와 human cell forward mutation assay가 사용되어 왔으나, 미세먼지의 경우에는 시료량이 매우 적으므로 보다 민감하게 평가할 수 있는 방법이 요구되고 있다. Single cell gel electrophoresis (SCGE) assay (Comet assay), cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay 및 EROD-microbioassay 등은

신속하고, 간단하면서도 민감하게 유전독성을 평가할 수 있는 방법으로 최근 활발히 이용되는 시험법이다. 특히 세포수준의 여러 가지 형태의 손상을 측정할 수 있어 환경시료의 유전독성을 평가하는데 매우 적합한 방법이다. 본 연구에서는 우리나라 도시대기 환경 중에 존재하는 미세먼지의 건강영향을 추정하기 위해 서울시내 주거지역 중 교통혼잡지역과 그 인근의 아파트 주거지역의 실외 및 실내공기에서 미세먼지 (PM 2.5)를 포집하여 유전독성을 평가하였다. 또한 미세먼지 중의 CYP1A 효소활성을 유도하는 물질을 EROD-microbioassay에 측정하고 생물학적 독성등가능도를 환산하여 독성량을 측정하였다.

실험 방법

1. 미세먼지의 채집 및 추출

미세먼지 시료로서 서울시 양천구 목동지역의 교통혼잡지역 (목동오거리)과 주거지역 (목동아파트 단지내) 및 아파트 실내 (목동아파트 실내공기)에서 각각 포집하였다. 목동오거리 교통혼잡지역 (Traffic area)과 그 인근 주거지역 (Residential area)은 오전 10시에서 오후 7시까지 하루 9시간씩 8일간, 실내 공기 (Indoor)의 경우 2일간 9시간 및 10시간씩 PM 2.5 및 PM10을 각각 포집하였다.

미세먼지는 Teflon이 코팅된 fiber filter (SIBA-TA, 1010)를 이용하여 cascade impactor가 장착된 high volume air sampler (Dusturbo, Korea)로 포집하였다. 미세먼지 중에 함유되어 있는 유용성물질을 Lewtas 등 (1990)의 방법을 수정한 방법에 의해 추출하였다. Cascade impactor에 PM 2.5 μm 의 입자크기의 미세먼지가 부착된 teflon filter의 무게를 달고 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 크기로 자른 후, dichloromethane (DCM)에 현탁시키고 30분간 2회 sonication하여 PM 2.5 추출물을 얻었다. PM 2.5 추출물은 최종농도가 100 mg/mL 가 되도록 DMSO에 녹인 후 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ syringe filter로 여과하여 사용하였다.

2. 유전독성 영향 평가

- 1) Single cell gel electrophoresis (Comet assay) 시험
Comet assay는 alkaline (pH 13) 조건에서 Human

alveolar epithelial cell인 A549 세포를 이용하여 Singh 등(1991)의 방법을 수정하여 실험하였다. 6-well plate에 세포를 키운 후 80% 정도 되었을 때 시료를 DMEM에 적정 농도로 희석하여 각 well에 DMSO의 농도가 0.1%가 넘지 않도록 처리하였다. 시료를 처리하고 6시간 정도 배양한 후 각 well에 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 탈리시킨 후 세포수를 측정하였다. 이 세포는 차가운 PBS로 2회 세척한 후 PBS 1 mL 당 $3 \times 10^3 \sim 10^4$ cell이 되도록 현탁시켜 얼음에 방치하였다. 이 세포는 37°C의 0.5% low-melting agarose에 현탁시킨 후 0.5% normal agarose로 미리 코팅된 (1 layer) fully frosted microscope slides에 도포하고 (2 layer), agarose가 굳은 후 다시 low melting agarose로 도포하였다 (3 layer). 이 슬라이드는 lysing solution (1% sodium sarcosinate, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0 and 1% Triton X-100)에 1시간 정도 넣어 세포를 용해시키고 unwinding 과정을 거쳐 전기영동 완충액 (1 mM Na_2EDTA 및 300 mM NaOH)에서 25 V로 20분간 전기영동하였다. 전기영동 후에 슬라이드는 ethidium bromide (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 염색하여 형광현미경 (Leica DMLB; excitation filter 515 ~ 560 nm, barrier filter 590 nm)에서 400배율로 관찰하였으며 auto image analysis system (Komet version 5.0; kimetic imaging Ltd. UK)을 이용하여 한 슬라이드당 100개의 세포를 분석하였다. DNA손상의 정도는 Olive tail moment (tail distance \times percentage of DNA in tail)를 이용하여 나타냈으며 시료 농도당 3개의 슬라이드를 만들었으며 반복 실험을 하였다.

2) *In vitro* 소핵시험

Chinese hamster ovary cell (CHO-K1)을 이용하여 *in vitro* 소핵시험을 수행하여 clastogen 및 aneugen으로서의 독성을 평가하였다. 8-well chamber slide에 well당 1.25×10^4 개로 분주한 후 24시간 정도 부착시켰다. 이때 각 well당 배양액 양은 200 mL로 하였고 준비된 시료는 vehicle농도가 0.1%가 넘지 않도록 시료를 배양액에 희석하여 처리하였다. CHO-K1세포의 경우에는 cytochrome P450이 결여되어 있다고 알려져 있어 (Born *et al.*, 2000) 이러한 대사에 대한 영향을 평가하기 위해서 xenobiotic metabolising enzyme인 rat liver microsomal

fraction (S9)을 첨가한 후의 반응을 관찰하였다. 시료의 반응 배양시간은 6시간으로 하고 시료가 처리되지 않는 배양액에서 20시간 회복 배양기간을 두어 실험하였다. 회복기간 동안에는 cytokinesis를 block시킬 수 있는 cytochalasin B (cyt-B, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 배양액에 처리하여 사용하였다. 배양이 완료된 세포는 PBS (Phosphate buffered saline)로 두 번 세척하고 1% sodium citrate로 4°C에서 5분간 처리한 후 1% acetic acid가 함유되어 있는 methanol로 20분간 실온에 방치하여 고정하였다. 슬라이드를 건조시킨 후 RNase (0.01 mg/mL in $2 \times \text{SSC}$)로 37°C에서 3~7분간 배양하고 이 slide를 $2 \times \text{SSC}$ 와 증류수로 각각 세척하고 건조시킨 후 5% Giemsa로 15분간 염색한 후 형성된 소핵을 관찰하였다. 실험의 정확성을 기하기 위해 적어도 시료처리 농도당 각 2 well씩 실험하였고 농도 당 1,000개의 세포를 관찰하였다. 소핵은 upright microscope을 이용하여 emulsion oil을 처리한 후 1,000 \times magnification에서 계수하였다. 소핵시험의 양성 판정은 용량 반응성이 있고 음성대조군에 비해 3배 이상의 소핵형성이 관찰되며 염색후의 세포 밀도가 대조군에 비해 25% 이상 감소되지 않는 경우로 하였다.

3. 간대사효소 활성 영향 평가

1) Micro-EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase)

Micro-EROD는 CYP1A계열의 효소로서 ethoxyresorufin이 EROD에 의해 형광을 띄는 resorufin으로 대사되는 성질을 이용하여 측정하는 기법이다 (Drenth *et al.*, 1998). 96 well-plate에 H4IIE (Rat hepatoma cell line) 세포가 80% 되었을 때 시료를 처리하였다. 시료를 처리한 후 48시간 배양한 후 각 well을 PBS로 2회 세척하고, 5 μM dicumarol 및 4 μM ethoxyresorufin이 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후 각 well의 배양액을 분리하여 형성된 resorufin의 형광을 fluorescence spectrophotometer로 excitation 530 nm, emission 588 nm에서 측정하였다. 측정된 형광수치에 대한 resorufin의 양은 미리 작성한 resorufin의 표준곡선을 이용하여 산정하였다. 제거하고 남은 세포는 PBS 및 증류수로 각각 2회 세척하고 10 mM EDTA (pH 10.4)로 녹인 후, Bradford 방법 (1976)에 의해 단백질을 정량하여 EROD 활성값을 보정하였다. 대조군으로는 0.1%

DMSO를 처치하여 사용하였다. Micro-EROD값의 정량적 평가는 TCDD (2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)의 최고 활성 유도 농도인 10^{-9} M의 EROD값을 100%로 하여 환경시료의 EROD 활성값과 비교한 TIR과 TCDD와 환경시료의 EROD값에 대한 dose-response curve의 상대적인 비를 이용하여 독성 equivalent를 구하는 Bio-TEQs로 산하였다.

2) CYP1A gene expression assay

H4IIE세포를 5×10^5 cell씩 60 mm dish에 5% FBS가 첨가된 DMEM으로 분주한 후 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기 (Forma scientific, U.S.A.)에서 배양하였다. 시료가 처치된 각 세포의 Total RNA는 TriZol (Gibco.)에 의해 추출한 후 -70°C에 보관하였다. CYP1A와 β -actin의 cDNA 서열은 GenBank를 이용하였다. CYP1A와 β -actin에 대한 PCR primer는 다음과 같이 specific primer를 이용하여 수행하였다 (5'CYP1A: 5'-GTT CCC AAA GGT CTG AAG AG-3', 3'CYP1A: 5'-CAT ATG GCA CAG ATG ACA TTG G-3', 5' β -actin: 5'-CCT GAC CCT GAA GTA CCC CA-3', 3' β -actin: 5'-CGT CAT GCA GCT CAT AGC TC -3'). RT-PCR은 Promega의 One step kit (Promega A 1250)를 사용하였는데, RNA 1 μ g에 specific primer (upstream 및 downstream, 각각 50 pmol), dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates, 0.2 mM), AMV reverse transcriptase (5 units), Tfl polymerase (5 units), Sterile RNase/DNase-free water, 1 \times AMV/Tfl buffer가 혼합된 Master mixture를 첨가하여 Thermocycler (Perkin Elmer)를 이용, 다음 parameter로 PCR을 수행하였다.

(a) Reverse transcription : 48°C (45 min), 95°C (2 min): 1 cycle

(b) Polymerase chain reaction (PCR)

- Denaturation : 94°C, 2 min: 1cycle

- Denaturation : 94°C, 30s; Annealing: 53°C,

1 min; Extension : 72°C, 2 min: 28 cycle

(c) Final extension : 72°C, 7 min : 1cycle

각 PCR product는 10 μ L를 Ethidium bromide (0.5 μ g/mL)가 포함된 1.5% w/v Agarose gel에서 Flat-bed gel electrophoresis를 수행하였으며 gel은 UV light하에서 관찰하여 Gel documentation &

analysis system (UVP)에 의해 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 주거지역 실외 및 실내공기의 미세먼지 (PM 2.5) 농도

목동오거리 교통혼잡지역 (Traffic area)과 그 인근 주거지역 실외 (Residential area, outdoor)에서 1주일간 매일 10시간씩 PM 2.5 및 PM 2.5~10을 포집하였으며 주거지역 실내 (Indoor)의 경우 2일간 9시간 및 10시간씩 PM 2.5 및 PM 2.5~10을 포집하였다. 세 지점의 PM 2.5 포집량을 측정할 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 교통 혼잡지역, 그 인근 주거지역의 실외 및 실내공기에서 각각 193.83, 65.45 및 102.60 μ g/m³로 나타나 자동차의 통행량이 많은 교통혼잡지역에서 주거지역 실외공기에 비해 약 2~3배 정도 많이 포집되었다. 주거지역 실내공기의 경우에는 실외 공기에 비해 1.5배 정도 높은 농도를 나타내었다. PM 2.5~10에 대한 PM 2.5의 비율은 교통혼잡지역, 주거지역 실내 및 실외공기에서 각각 88.2, 83.0% 및 80.7%로 나타났다 (Table 1). 홍콩의 주거지역의 실내 및 실외의 PM 2.5 양을 측정할 결과 도시 외곽의 경우 39.6 μ g/m³로 포집되었으며 중앙 도시부분 및 길가 주변 거주지에서는 각각 60.0 및 73.6 μ g/m³으로 길가 주변의 주거공간에서 PM 2.5가 더 많이 포집되는 것으로 보고된 바 있다 (Cao *et al.*, 2005). 더욱이 실내 공기에서의 PM 2.5양은 실외 공기의 오염에 비해 1~1.5배 정도 높은 것으로 나타나 실내 공기 오염의 심각성을 보고하였다 (Cao *et al.*, 2005). Breyse 등 (2005)은 미국 Baltimore에 거주하는 천식을 가지고 있는 아이들의 침실에서 PM 2.5를 포집한 결과 평균 45.1 ± 37.5 μ g/m³으로 나타났으며 흡연자가 있는 가정이 비흡연 집안보다 PM 양이 더 높은 것으로 확인되었다. 미국 California, New jersey 및 Texas에서의 PM 2.5 포집량의 경우 모두 20 μ g/m³ 정도로 나타났으며 실내외의 포집량이 이에 비슷하게 나타났다 (Meng *et al.*, 2005). 중국 Guangzhou의 병원의 실내공기에서는 PM 2.5가 80.27~108.63 μ g/m³으로 측정되었음을 보고한 바도 있다 (Wang *et al.*, 2005). 따라서 본 연구에서 측정된 미

세먼지의 농도는 일반적으로 보고되는 실외 및 실내공기의 농도에 비해 높은 것으로 나타났다. 이는 조사대상 지역인 목동지역의 교통량이 많아 실외 공기 PM 2.5량이 많으며 실내공기는 주거가구의 실내생활환경에 따라 다르겠으나 실외공기의 미세먼지 농도가 높은 영향으로 인하여 실내공기의 미세먼지 농도도 높은 것으로 추정되었다.

2. 주거지역 미세먼지의 유전독성 영향

Comet assay는 각각의 진핵세포에서 DNA의 단 일가닥 절단 (single strand breakage), 혹은 이중가닥 절단 (double strand breakage), alkali-labile sites 및 delayed-repair sites 등의 DNA손상을 검출하는데

있어서 민감하고 신뢰적이며, 빠른 방법으로 알려져 있다 (Rojas *et al.*, 1999; Cotelle and Féraud, 1999; Tice *et al.*, 2000). 특히 환경시료의 DNA 손상 monitoring 연구에 있어 comet assay는 다양한 형태의 DNA손상을 세포수준에서 민감하고 간편하면서 직접적으로 평가할 수 있는 방법으로 다량 채취가 어려운 미세먼지 등의 시료에 적합한 비교적 간단한 실험방법으로 이용이 가능하다. 또한 포유류 세포 및 사람을 대상으로 한 역학조사에서도 이용할 수 있는 방법으로 알려져 있다 (Tice *et al.*, 2000). 본 연구에서는 대기 중 미세먼지 노출에 따른 제 1의 표적기관이 될 수 있는 폐에 대한 효과를 관찰하기 위해 사람의 lung Type II epithelial cell인 A549 세포주를 사용하였다. 포집한 시료에 대해 Comet assay를 수행한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 용량의존적으로 DNA 손상이 유도된 것으로 나타났다. Komet 5.0 software를 이용하여 Olive tail moment 값을 정량한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 교통혼잡지역의 PM 2.5추출물은 20.90 ± 8.44 이었고 주거지역 실외시료는 24.49 ± 11.21 이었으며 실내시료의 경우에는 21.45 ± 16.34

Table 1. Collective amounts of PM 2.5 Unit : $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Sampling sites	PM 2.5 (PM 2.5/10 ratio)	PM 2.5 ~ PM 10
Traffic area	193.83 (88.2%)	25.91
Residential area, Outdoor	65.45 (83.0%)	13.40
Indoor	102.60 (80.7%)	24.48

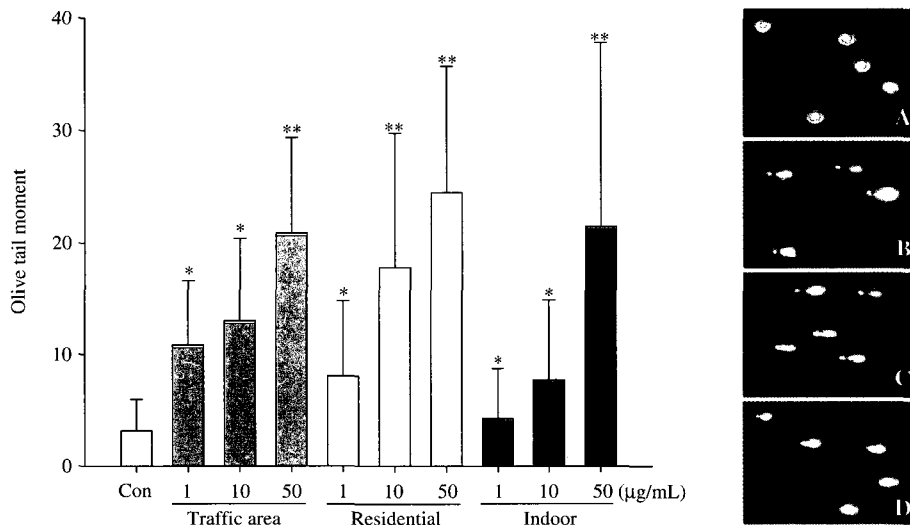


Fig. 1. DNA migration (Comet assay) induced by DCM extracts of Particles Matter (PM 2.5) in A549 cells. A549 cells were incubated with extracts (1 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in DMEM supplemented with 5% FBS for 24 hrs. The assays were carried out as described in the Materials and methods section. The results are expressed as means \pm S.D. of three separate experiments for each data point of the Olive tail moment (% DNA in tail \times distance between centers of mass). Comparisons were made using the Student's t-test. Significant difference from control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. A, Control (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); B, Traffic area (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); C, Residential area (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$); D, Indoor (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

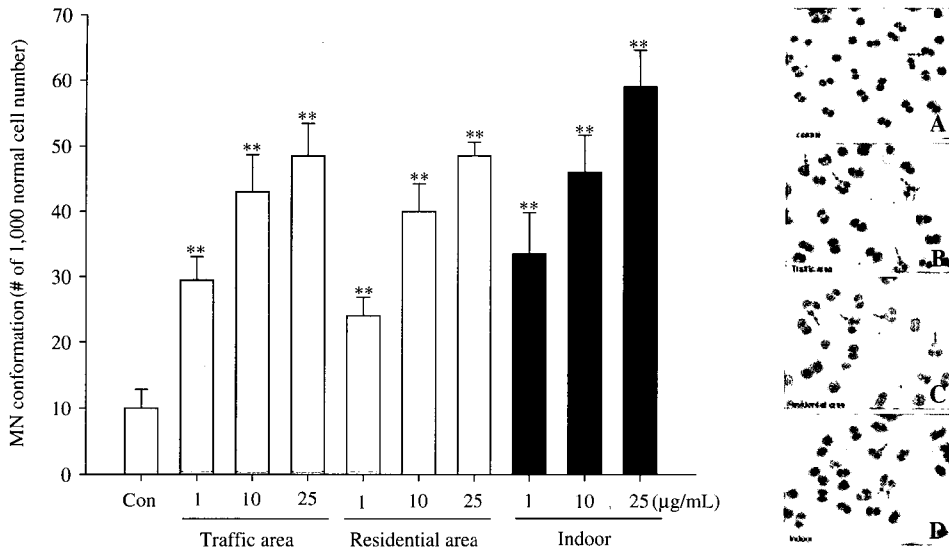


Fig. 2. Micronucleus formation induced by DCM extracts of Particles Matter (PM 2.5) in CHO-K1 cells with metabolic activation by induced rat liver homogenates (S9) and cytochalasin B. CHO-K1 cells were incubated with extracts (1~25 µg/mL) in RPMI supplemented with 5% FBS for 6 hrs and followed by recovery with cytochalasin B for 20 hrs. The assays were carried out as described in the Materials and methods section. The results are expressed as means \pm S.D. of three separate experiments for each data point of MN frequency per 1,000 cells. Comparisons were made using the Student's t-test. Significant difference from control: ** $p < 0.01$. A, Control (25 µg/mL); B, Traffic area (25 µg/mL); C, Residential area (25 µg/mL); D, Indoor (25 µg/mL).

로 나타나 최고 시험농도인 50 µg/mL의 경우 주거 지역 실외공기 시료가 다른 두 시료에 비해 약간 높게 나타났다.

또한 이러한 DNA 손상을 유도하는 세지점의 대기분진 시료들이 염색체 수준에서의 손상을 유도하는지를 측정하기 위해 *in vitro* Micronucleus (MN) test를 사용하였다. *in vitro* MN test는 clastogen 및 aneugen에 의해 생성된 acentric chromosome 또는 chromatid fragment 등의 염색체 이상을 확인하는 방법으로 CHO-K1 cell에서 cytochalasin B를 처리하여 1회의 세포분열 과정에서의 손상을 명확히 관찰할 수 있는 cytokinesis-block 방법을 이용하였다 (Matsuoka *et al.*, 1993; Kirkland, 1998; Gutierrez-Enriquez and Hall, 2003). 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 교통혼잡지역과 주거지역 시료에서의 소핵형성은 비슷한 수준으로 나타났으며 실내공기 시료의 경우 약간 높게 관찰되었으나 각각의 세 시료에 대해 상호 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Miller 등(1995)은 생성된 소핵이 대조군에 비해 세배 이상이고 용량의존적인 영향이 나타날 때

그 시료의 염색체 손상에 대한 양성물질로 평가함을 보고하였는데 본 연구에서 교통혼잡지점, 주거 지역 실외 및 실내공기 시료의 경우 대조군에 비해 각각 4.85, 4.85 및 5.90배로 모두 3배 이상의 소핵형성이 관찰되었으며 용량의존적인 반응도 나타나 염색체 이상에 대한 양성반응을 유도하는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

Hemminki와 Pershagen (1994)은 도시지역 거주자가 변두리지역 거주자에 비해 흡연에 의한 암 발생 위험이 1.5배까지 높아질 수 있음을 보고하였으며 이 원인으로 변두리지역에 비해 도시지역의 대기 중에 변이원성 물질과 발암성 물질이 더 많이 함유되어 있기 때문인 것으로 추정할 바 있다. 대기 중의 미세먼지는 수많은 화합물의 혼합물이므로 개개의 물질의 모두 분석 확인하는 것은 불가능하다. 따라서 유전독성 평가 기법 등 독성영향을 평가할 수 있는 시험법에 의해 조사대상 시료가 유전독성을 나타내는지와 그 강도는 어느 정도 인지를 평가하게 된다. 본 연구에서 목동지역 번화가의 교통혼잡지점과 주거지역의 실외 및 실내공

기의 PM 2.5 시료를 대상으로 유전독성을 평가한 결과 DNA 및 염색체 손상을 유발하는 것이 확인되어 이들 시료 중에 유전독성 유발물질이 존재하고 있음을 추정할 수 있었다.

3. 주거지역 미세먼지의 CYP1A 효소활성에 미치는 영향

도시환경의 미세먼지 중에는 변이원성 및 발암성 물질로서 주로 PAH류가 많이 함유되어 있다고 보고된 바 있어 (Hannigan *et al.*, 1998) 본 연구에서는 EROD-microbioassay에 의해 CYP1A 또는 monooxygenase를 유도하는 물질이 함유되어 있는지와 그 함유량을 측정하였다. 교통혼잡지역, 주거지역 및 실내에서 포집한 PM 2.5 시료의 DCM 추출물에 대해 EROD활성을 측정한 결과 Fig. 3B 및 Table 2에서 보는 바와 같이 TCDD에 대한 반응성이 교통혼잡 지역의 PM 2.5 추출물은 37.34 ± 1.61%, 주거지역 시료의 경우에는 52.07 ± 4.45%로 나타났다. 실내공기 시료의 경우에는 7.70 ± 0.59%로 나타나 가장 낮은 활성을 보였다. 각 지점 시료에서 나타난 EROD활성 값에 대해 Bio-TEQ를 계산한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 교통혼잡지역, 주거지역 및 실내공기 시료에서 각각 70.87 ± 28.07, 93.55 ± 21.80 및 14.31 ± 1.10 ng/g-PM 2.5로 나타났다. 이들 시료에 의한 CYP1A 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 교통혼잡지역, 주거지역 및 실내공기의 시료에서 농도 의존적인 유도가 확인되었으며 교통혼잡지역 및 주거지역의 최고농도인 50 µg/mL에서의 CYP1A발현 정도는 TCDD와 거의 유사하게 나타났다.

Hannigan 등(1998)은 사람세포를 이용하여 미국 로스앤젤레스 지역 대기 중의 미세먼지의 변이원성을 평가하고 원인을 추적한 결과 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) 화합물이 변이원성을 유

발하는 주요물질임을 확인한 바 있다. 또한 Oh와 Chung (2006)은 대기분진의 주요원인으로 알려진 diesel exhaust particles (DEP)가 유전독성물질을 포함하고 있으며 그 원인물질로써 dibenzo(a, h)anthracene, chysene 및 1, 2-benzanthracene이 indirect mutagen으로써 작용할 수 있음을 제안하였다. 본 실험에서는 교통혼잡지역 및 주거지역 실외에서 포집한 PM 2.5 시료에서 CYP1A 효소활성을 유도

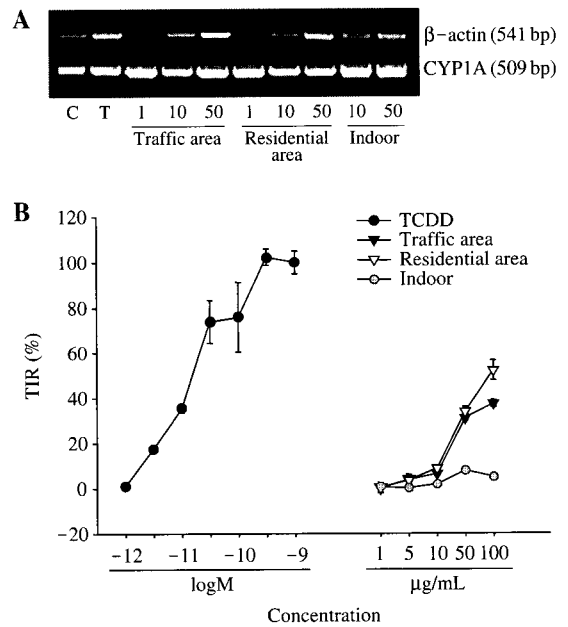


Fig. 3. CYP1A gene expression (A) and EROD activity (B) induced by DCM extracts of Particles Matter (PM 2.5) in H4IIE cells. H4IIE cells were incubated with samples (1 ~ 100 µg/mL) in MEM supplemented with 5% FBS for 48 hrs. (A) CYP1A mRNA level was measured by RT-PCR. (B) The EROD activity of the extracts of PM 2.5 relative to TCDD (10⁻⁹ M, 100%) is represented as the TIR (TCDD induction response). The results are expressed as means ± S.D. of three separate experiments for each data point.

Table 2. EROD activity of PM 2.5 extracts

Samples	Maximum effective concentration	TIR (%)	TEQ (ng/g-PM 2.5)
2, 3, 7, 8-TCDD	10 ⁻⁹ M	100.00 ± 5.02	-
PM 2.5 Traffic area	50 µg/mL	37.34 ± 1.61	70.87 ± 28.07
PM 2.5 Residential area, Outdoor	50 µg/mL	52.07 ± 4.45	93.55 ± 21.80
PM 2.5 Indoor	50 µg/mL	7.70 ± 0.59	14.31 ± 1.10

하는 작용이 있는 것으로 나타났고 TCDD에 대한 생물학적 독성등가농도가 유의하게 높은 것으로 보아 PAH류와 같은 효소활성 유도물질이 함유되어 있고 이들 물질이 유전독성을 유발하는 주요 원인일 가능성을 추정할 수 있었으나, 실내의 경우 유전독성은 실외 시료와 유사하나, CYP1A 효소활성의 경우 다른 지점보다 그 활성이 낮게 나타나 PAH류 외에 다른 물질이 주요 원인물질로서 관련되는 것으로 추정되었다.

결 론

본 연구에서는 우리나라 도시대기 환경 중에 존재하는 미세먼지의 건강영향을 추정하기 위해 서울시 양천구 목동의 교통 혼잡지역과 그 주변 주거지역의 실외 및 실내공기 등 3개 지점에서 미세먼지(PM_{2.5})를 포집하여 유전독성을 평가하였다.

High volume air sampler로 PM_{2.5}의 미세먼지시료를 포집하여 Comet assay를 이용하여 DCM 추출물에 의한 DNA 손상도를 조사한 결과 주거지역 실외공기, 교통혼잡지역 공기, 주거지역 실내공기 순으로 손상이 높은 것으로 나타났다. 또한 이와 같은 경향으로 염색체 손상도 유발함이 관찰되었다. EROD-microbioassay에 의해 CYP1A 또는 monooxygenase를 유도하는 물질이 함유되어 있는지와 그 함유량을 측정한 결과 Bio-TEQ 농도로서 교통혼잡 지역, 주거지역 실외시료 및 실내시료가 각각 70.87 ± 28.07 , 93.55 ± 21.80 and 14.31 ± 1.10 ng/g-PM_{2.5}로 나타났다. 또한 CYP1A 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인한 결과 EROD활성 값과 유사하고 농도 의존적인 반응성이 확인되어 이들 시료 중에 효소활성을 유도하는 물질이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

따라서 조사대상 3지점의 시료에는 유전독성을 유발하는 물질이 함유되어 있음이 추정되었으며 교통혼잡지역 및 주거지역 실외공기의 경우에는 자동차 배기가스에서 배출되는 PAH류와 같이 CYP1A 효소활성을 유도하는 물질이 주요 원인일 것으로 추정되었다. 한편 실내공기의 경우에는 유전독성은 이들 시료와 유사하나 CYP1A 효소활성 유도가 낮은 것으로 보아 실외공기와는 다른 원인 물질이 주로 함유되어 있는 것으로 추정되었다. 앞

으로 보다 많은 시료에 대해 체계적인 연구를 수행하여 원인 인과관계를 규명하는 것이 요구되었다.

감사의 글

본 연구는 한국환경기술진흥원의 차세대핵심환경기술개발사업(Eco-Technopia 21) 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Born BL, Hu JK and Lehman-McKeeman LD. *o*-Hydroxyphenylacetaldehyde is a hepatotoxic metabolite of coumarin, Drug Metabolism and Disposition 2000; 25 (2): 218-223.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of dye binding, Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
- Breyse PN, Buckley TJ, Williams D, Beck CM, Jo S-J, Merriman B, Kanchanaraksa S, Swartz LJ, Callahan KA, Butz AM, Rand CS, Diette GB, Krishnan JA, Moseley AM, Curtin-Brosnan J, Durkin NB and Eggleston PA. Indoor exposures to air pollutants and allergens in the homes of asthmatic children in inner-city Baltimore, Environmental Research 2005; 98: 167-176.
- Cao JJ, Lee SC, Chow JC, Cheng Y, Ho KF, Fung K, Liu SX and Watson JG. Indoor/outdoor relationships for PM_{2.5} and associated carbonaceous pollutants at residential homes in Hong Kong-case study, Indoor Air 2005; 15: 197-204.
- Cotelle S and Férard JF. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review, Environmental and Molecular Mutagenesis 1999; 34: 246-255.
- Dockery DW and Brunekreef B. Longitudinal studies of air pollution effects on lung function, Am J Respir Crit Care Med 1996; 154(6): s250-256.
- Drenth HJ, Bouwman CA, Seinen W and van der Berg M. Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP-19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3, Toxicol Appl Pharmacol 1998; 148: 50-55.
- Gabelova A, Valovicova Z, Horvathova E, Slamenova D,

- Binkova B, Sram RJ and Farmer PB. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia, *Mutat Res* 2004; 563(1): 49–59.
- Gutierrez-Enriquez S and Hall J. Use of the cytokinesis-block micronucleus assay to measure radiation-induced chromosome damage in lymphoblastoid cell lines, *Mutat Res* 2003; 535(1): 1–13.
- Hannigan MP, Cass GR, Penman BW, Crespi CL, Lafleur AL, Busby Jr WF and Thilly WG. Bioassay-directed chemical analysis of Los Angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay, *Environ Sci Technol* 1998; 32: 3502–3514.
- Healey K, Lingard JJ, Tomlin AS, Hughes A, White KL, Wild CP and Routledge MN. Genotoxicity of size-fractionated samples of urban particulate matter, *Environ Mol Mutagen* 2005; 45(4): 380–7.
- Hemminki K and Pershagen G. Cancer risk of air pollution: epidemiological evidence, *Environ Health Perspect* 1994; 102(Suppl. 4): 187–192.
- Heyder J. Regional deposition of inhaled particles in the human respiratory tract. In: U. Mohr *et al.* (Eds), *Advances in controlled clinical inhalation studies*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993 pp. 103–107.
- Hsiao WL, Mo ZY, Fang M, Shi XM and Wang F. Cytotoxicity of PM (2.5) and PM (2.5–10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays, *Mutat Res* 2000; 471(1–2): 45–55.
- Kirkland D. Chromosome aberration testing in genetic toxicology past, present and future, *Mutation Research* 1998; 404: 173–185.
- Knaapen AM, Shi T, Borm PJ and Schins RP. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter, *Mol Cell Biochem* 2002; 234–235(1–2): 317–26.
- Lewtas J, Chuang J, Nishioka M and Peterson B. Bioassay-directed fractionation of the organic extract of SRM1649 urban air particulate matter, *Int J Environ Anal Chem* 1990; 39: 245–256.
- Matsuo M, Shimada T, Uenishi R, Sasaki N and Sagai M. Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells, *Biol Pharm Bull* 2003; 26(4): 438–447.
- Matsuoka A, Yamazaki N, Suzuku T, Hayashi M and Sofuni T. Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test, *Mutation Research* 1993; 272: 223–236.
- Meng QY, Turpin BJ, Korn L, Weisel CP, Morandi M, Colome S, Zhang J, Stock T, Spektor D, Winer A, Zhang L, Lee JH, Giovanetti R, Cui W, Kwon J, Alimokhtari S, Shendell D, Jones J, Farrar C and Maberti S. Influence of ambient (outdoor) sources on residential indoor and personal PM 2.5 concentration: Analyses of RIOPA data, *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 2005; 15: 17–28.
- Mi HH, Lee WJ, Chen CB, Yang HH and Wu SJ. Effect of fuel aromatic content on PAH emission from a heavy-duty diesel engine, *Chemosphere* 2000; 41: 1783–1790.
- Miller BM, Pujadas E and Gocke E. Evaluation of the micronucleus test in vitro using Chinese hamster cells: Results of four chemicals weakly positive in the in vivo micronucleus test, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1995; 26: 240–247.
- Oh SM and Chung KH. Identification of mammalian cell genotoxins in respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed chemical analysis, *Toxicology Letters* 2006 (in press)
- Poma A, Arrizza L, Picozzi P and Spano L. Monitoring urban air particulate matter (fractions PM 2.5 and PM 10) genotoxicity by plant systems and human cells *in vitro*: a comparative analysis, *Teratog Carcinog Mutagen* 2002; 22(4): 271–84.
- Poniak M and Makhniashvili L. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons during diesel combustion, *Inter J Occup Safty & Ergonomics* 2003; 9(1): 17–26.
- Rengasamy A, Barger MW, Kane E, Ma JKH and Castranova V. Diesel exhaust particle-induced alterations of pulmonary phase I and phase II enzymes of rats, *J Toxicology and Environmental Health* 2003; 66: 153–167.
- Rojas E, Lopez MC and Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Journal of Chromatography B* 1999; 722: 225–254.
- Schuetzle D. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing, *Environ Health Perspect* 1983; 47: 65–80.
- Schwartz J. Particulate air pollution and chronic respiratory disease, *Environ Res* 1993; 62: 7–13.
- Seemayer NH, Hadnagy W and Tomingas R. Mutagenic and carcinogenic effects of airborne particulate matter from polluted areas on human and rodent tissue cultures, *Experientia Suppl* 1987; 51: 231–234.
- Shi T, Duffin R, Borm PJ, Li H, Weishaupt C and Schins RP. Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling

- locations. *Environ Res* 2005; in press.
- Singh NP, Tice RR, Stephens RE and Schneider EL. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides, *Mutat Res* 1991; 252: 289–296.
- Tice RR, Agurell ED, Anderson B, Burlinson A, Hartmann H, Kobayashi Y, Miyamae E, Rojas J, Ryu C and Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2000; 35: 206–221.
- Timblin C. Ambient particulate matter causes activation of the c-jun kinase/stress-activated protein kinase and DNA synthesis in the lung epithelial cells, *Cancer research* 1998; 58: 4543–4547.
- U.S. EPA in California. Report to the air resources board on the proposed identification of diesel exhaust as a toxic air contaminant; Part A exposure assessment. 1998.
- U.S. EPA. Monitoring and quality assurance group, Particulate Matter (PM_{2.5}) Speciation Guidance Document. 1999.
- Wang X, Bi X, Sheng G and Fu J. Hospital indoor PM₁₀/PM_{2.5} and associated trace elements in Guangzhou, China, *Science of the Total Environment* 2005; in press.
- Williams PT, Abbass MK and Andrews GE. Diesel particulate emission: the role of unburned fuel, *Combust flame* 1989; 75: 1–24.
- Wilson WE and Suh HH. Fine particles and coarse particles: Concentration relationships relevant to epidemiologic studies, *J Air Waste Manage Assoc* 1997; 47: 1238–1249.