J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 21, No. 4, 375~380 (2006)

내분비장애물질에 대한 노출과 DNA-adduct 생성

양 미 희※

숙명여자대학교약학대학 독성학교실

DNA-adducts and Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals

Mi-Hee Yang※

Department of Toxicology, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University
Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT

Endocrine disrupting chemicals (EDC) have been emphasized due to their threats in human health. Waste incinerator emission has been emphasized as a source of EDC including polychlorinateddibenzofurans (PCDD/F) and other carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) has been used as an exposure biomarker for the PAHs. On the other hand, etheno-DNA adducts, e.g. 1, N^6-ethenodeoxyadenosine (εdA), has been developed as an useful effective or response biomarker for carcinogenesis. Thus, I investigated association between urinary 1-OHP and εdA levels due to distance from an incinerator which was built more 10 years ago in the middle of a farm in P city. I designated the EDC-high and -low exposed group due to distance from the incinerator, i.e. within 2.5 km and 5.0~7.5 km from the incinerator, respectively. The study subjects were age and sex-matched males and females (mean age, 61.3± 9.6 yrs; total 40 persons, male, 10; female, 10 for the each group). Urinary 1-OHP and εdA were analyzed with HPLC-FD and IP-HPLC-FD, respectively. As results, the distance from the incinerator was not associated with urinary 1-OHP nor εdA levels (p=0.43 and 0.82, respectively). On the other hand, urinary εdA levels were significantly higher in the hyperlipidemia group (N=10) than normal group (N=30). In conclusion, urinary 1-OHP nor εdA levels can not be suggested as an incinerator-related exposure nor effective biomarker. However, not only distance from the incinerator bot also systemic approaches including wind and soil contamination are required to assume exposure levels of incinerator-related EDC.

Key words : 1-OHP, Endocrine disrupting chemicals, incinerator, DNA-adduct

서 론

다이옥신 등 내분비장애물질 (Endocrine disrupting chemicals, EDC)에 대한 노출은 인간, 종(種)의 위기를 우려할 위험을 내포하기 때문에 전 세계적으로 협력하여 속히 풀어야할 과제이다 (Colborn *et al.*, 1996). 그러나, 유감스럽게도 EDC의 노출 용량-반응 (dose-response)관계에 의거한 반응종말점 (end point)이 명확히 밝혀지지 않아 (Roy *et al.*, 1997), EDC와 인체건강危害, 특히 발암과의 관계는 아직 명확히 究明되지 못하여 EDC에 대한 시급한 규제나 정책이 확립되지 못한 실정이다. 그러므로, 본 연구는 EDC의 반응종말점을 찾고 발암까지 이르

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-2077-7179, E-mail: myang@sookmyung.ac.kr

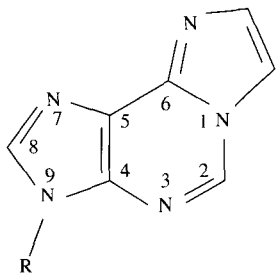

Fig. 1. Chemical structure of 1, N^6-ethenodeoxyadenosine (εdA).

는 일련의 작용機構를 분자역학(molecular epidemiology)기법을 통하여(Kawamoto *et al.*, 1999)수행하였다. 즉, 기존 분석역학의 제한점인 병인과 발병사이의 알지 못하는 black box인 병인에서 발생까지 일련의 작용 mechanism을 분자생물학적으로 설명하는 기법을 사용하여, 내분비장애물질이 인체내 병변을 초래하는 반응지표의 발굴에 노력하였다. 본인은 본연구에서 내분비장애물질에 고도노출이 우려되는 우리나라 소각장 주민의 건강위해 연구를 수행하여, DNA-microarray를 이용, 내분비장애물질 반응 후보유전자 40종을 발굴하였고(Yang, 2005), 이와 더불어 발암화를 잘 반영하는 비침해적인 조기진단지표를 이용하여 내분비장애물질과 발암 관련성에 대하여 연구하기 위하여 조기 발암원 노출 생체지표인 생체내 DNA 변성 부가체, 즉 etheno-DNA adducts에 주목하였다. 최근 DNA adducts는 대표적인 비침해적 생체시료인 뇨에서 측정이 가능하게 되었고(Bartsch *et al.*, 1999; Bartsch *et al.*, 2000; Bartsch *et al.*, 2002; Hasnaoka *et al.*, 2002), 특히, immnunoprecipitation-high performance liquid chromatography/fluorescence detector (IP-HPLC-FD)를 이용하여 방사선 동위원소를 쓰지 않고도 손쉽게, 1, N^6-ethenodeoxyadenosine (εdA, Fig. 1) 등 DNA adducts를 정량하는 방법이 개발되었다(Bartsch *et al.*, 1999).

한편, 다환성방향족탄화수소는 소각장 등 탄소, 수소 화합물의 불완전 연소에 의해 생성되는 물질로 다이옥신 등 EDC를 다수 포함한다고 알려져 있다(Yang *et al.*, 2006). 본 연구에서는 다환성방향족탄화수소의 노출지표로 알려진 뇨 중 1-hydroxypyrene (1-OHP)을 분석하여 본 소각장 주변 주민의 내분비장애물질 노출 정도를 추정하였다. 그러므로, 본 연구에서는 내분비장애물질에 대한 노출과 암화의 관련을 구명하기 위하여 우리나라 소각장 주민의 소변 중 1-OHP과 εdA level의 상관을 조사하였다.

방 법

1. 연구 대상

P시 소각장 반경 2.5 km 내 및 그 밖(반경 5~7.5 km)에 거주하는 성, 나이를 일치한 각 20명을 각각 내분비장애물질 고노출군, 저노출군으로 추정, 모집하여 식이, 직업, 질병 등에 대한 설문을 실시하였고, 아침 식전 소변을 채집하였다(남녀, 각각 20명; 평균연령, 61.3±9.6년). 또한, 임상의에 의하여 혈액검사를 통하여 당뇨병, 고지혈증 등에 관한 검진을 실시, 그 정보를 제공받았다.

2. 1-OHP 및 creatinine 분석

뇨 중 1-OHP는 역상 HPLC/FD법으로 측정하였다(Hara *et al.*, 1997). 또한 뇨의 농도를 보정하기 위하여 뇨 중 creatinine은 ion pair 역상 HPLC/UVD법으로 분석하였다(Ogata *et al.*, 1987). 1-OHP 측정을 위한 HPLC system은 SP930D (Younglin Instrument, Seoul)펌프, type830 (MIDAS, AJ Emmen, Netherlands) autosampler, FP-2020 Plus Intelligent Fluorescence Detector (Jasco, Tokyo, Japan)으로 구성되었다. Creatinine 분석을 위한 UV detector는 SPD-10A UV-VIS detector (Shimazu, Kyoto, Japan)을 사용하였다.

컬럼은 모두 Waters Symmetry®C18, 5 μm (150×4.6 mm: Milford, MA)를 사용하였다.

3. DNA-adduct분석

뇨 중 εdA은 IP-HPLC-FD법으로 측정하였다(Nair, 1999; Hanaoka *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006). 간단히, 뇨 3 mL를 0.22 micron filter로 여과 후, 여과한 뇨 2 mL에 내부표준액인 1, N^6-ethenoadenosine [2, 8-^{3}H] (synthesized by reacting adenosine-[2, 8-^{3}H]) 10,000 DMP, 5′-bromodeoxyuridine 2 pmol를

spike하였다. 이에 냉 ethanol 2 mL를 가하여 단백 침전 후, 진공건조하여 건조물을 증류수 50 μL에 녹여 상등액을 preparative HPLC로 분리하여 3 fraction으로 나누어 채집 후, 내부표준물질 fraction에서 liquid scintillation counter로 수득률을 점검하였다. 추정 εdA fraction은 진공건조 후, 추가적으로 내부표준액 5,000 DMP을 가한 후, antibody enrichment법에 의거, 항원-항체반응, 침전, elution과정을 거쳐 역상 HPLC/FD법으로 εdA를 정량하였다. 정량에 사용된 HPLC 시스템은 다음과 같다: HP1100 pump, HP1046A fluorescence detector (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany), 250×4.6 mm Lichrospher 100 RP 18E 5 μm column (Bischoff, Leonberg, Germany); 이동상, 20 mM $(NH_4)_3PO_4$ buffer (pH 5)/methanol, 30분간 9 : 1에서 8 : 2; 유속, 1 mL/min; exitation 230/emission 410 nm; 표준품 εdA standard (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany)으로 검량선을 작성하여 정량하였다.

4. 통계분석

뇨 중 1-OHP 및 εdA level을 기하학적 치환 후 EDC 고노출, 저노출군의 두 그룹간 비교를 위하여 T-test를 사용하였다. 1-OHP와 εdA level과의 비교는 regression analysis를 수행하였다. 모든 통계분석은 JMP (SAS Institute, Cary, NC) 제4버전을 사용하였다.

결 과

1. 실험대상자분포

Table 1과 같이 성, 연령을 일치하도록 모집하였다. 또한, 남녀간에도 연령에 유의적인 차이가 없이 모집하였다 (남, 녀 평균연령, 각각 62.3±2.2세 및 60.4±2.2세). 두 군간의 당뇨, 고지혈 등 질병에 대한 분포의 차이도 없었다.

2. 1-OHP의 분포

검출한 뇨 중 1-OHP의 농도 범위는 0.0295~0.196 μg/L, creatinine 보정 시 0.026~0.726 μg/g creatinine로 나타났다. 통계분석을 위하여 검출한계 이하의 시료는 최소농도의 반값으로 처리하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 정규분포를 따르지 않고 왼쪽으로 치우치는 분포를 가지므로 통계분석을 위하여 기하학적 치환을 수행하였다.

Table 1. Characteristics of subjects

	EDC -high exposure	EDC -low exposure
Male (N)	10	10
Female	10	10
Age (yrs)	61.5±2.2	61.1±2.2
Diabetes	2	2
Hyperlipidemia	5	5

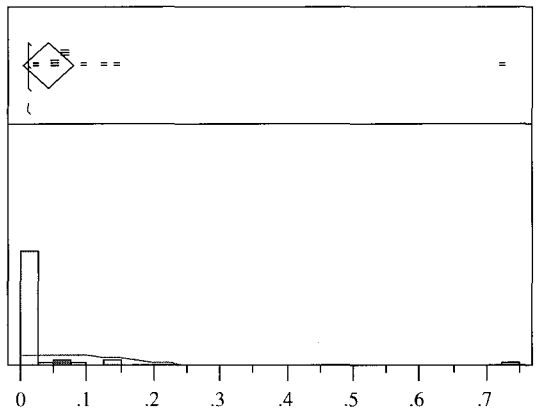

Fig. 2. Distribution of urinary 1-OHP: Histogram of 1-OHP levels with outlier box plot (mean±std, 0.04±0.12 μg/g creatinine).

3. 1-OHP와 EDC 노출과의 관계

EDC에 대한 노출을 반영하는 인자로 소각장과의 거리, 뇨 중 1-OHP level을 선택하여 분석한 결과, 소각장에서 가까이 거주하는 EDC 고노출군으로 추정한 인구에서 뇨 중 1-OHP level은 소각장과 멀리 떨어진 지역에 거주하는 EDC 저노출군으로 추정한 인구와 유의적인 차가 없었다 (고노출군 *vs.* 저노출군, geometric mean of 1-OHP (μg/g creatinine) geometric std, 1.06, 1.09 *vs.* 1.14, 1.44; p=0.43). 따라서 본 연구대상자에서 뇨 중 1-OHP는 소각장 유래 EDC에 의한 노출과는 직접관련이 없는 것으로 사료되었다.

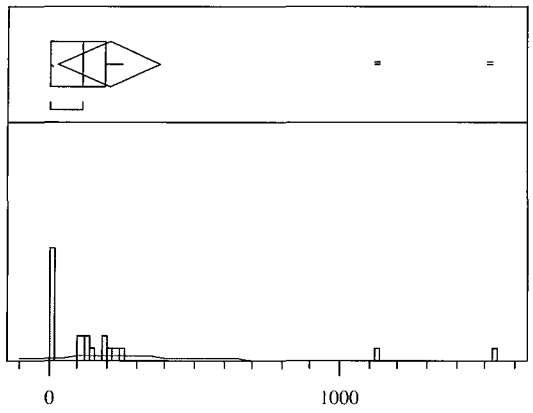

Fig. 3. Distribution of urinary εdA: Histogram of εdA levels with outlier box plot (mean±std, 206.8±387.7 pmol/g creatinine).

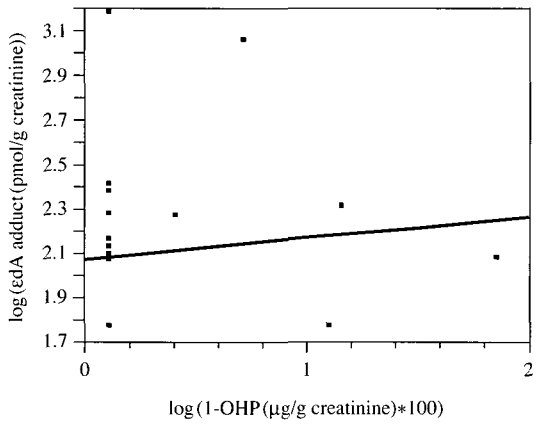

Fig. 4. Lack of association between urinary 1-OHP and εdA adduct levels: Regression coefficient=0.09, p=0.63.

4. DNA-adduct의 분포

뇨 중 εdA의 농도는 31.8~1364.9 fmol/mL의 범위로 나타났다. Creatinine 보정 시, 115.4~1520 pmol/g creatinine의 범위였다. 통계분석을 위하여 검출한계이하의 뇨 중 εdA시료는 최소농도의 반값으로 처리한 후, Fig. 3에서 보는 바와 같이 정규분포를 따르지 않고 왼쪽으로 치우치는 분포이므로, 통계분석을 위하여 기하학적 치환을 수행하였다.

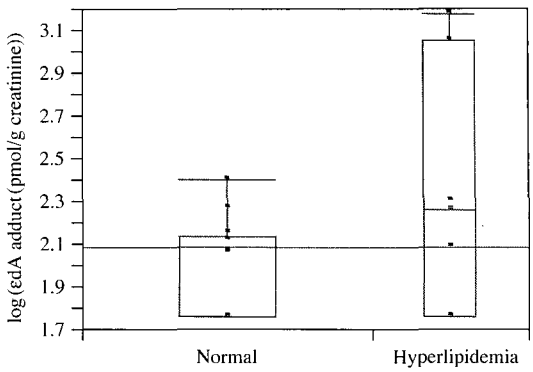

Fig. 5. Association between hyperlipidemia and urinary εdA adduct levels: p=0.04.

5. DNA-adduct와 EDC 노출과의 관계

뇨 중 εdA level과 소각장과의 거리를 비교할 때, 소각장에 가까이 사는 지원자에게서 유의적인 εdA level 증가는 나타나지 않았다 (고노출군 *vs.* 저노출군, geometric mean of εdA (pmol/g creatinine), geometric std, 131.8, 2.69 *vs.* 120.2, 2.57; p=0.82). 또한, 뇨 중 εdA과 1-OHP level 사이에도 유의적 관련이 관찰되지 않았다 (Fig. 4).

그러나, 흥미로운 것은 자원자 중 고지혈증군 (N=10)에서 정상군 (N=30)과 비교 시 유의적으로 높은 뇨 중 εdA level을 보였다 (Fig. 5).

고 찰

유기염소계화학물, 중금속을 비롯한 혼합 폐기물은 소각장에 투하되어 소각과정을 거쳐 더 독성이 큰 화합물로 변화할 가능성이 높다. 소각을 통해 생성된 다양한 형태의부산물은 공기 중 부유먼지, 질소산화물, 유황산화물, PAHs 등 다양한 형태로 토양, 수질, 공기를 오염시킬 수 있으므로 소각장은 거주지역과는 안전거리를 확보하여 설치되어야 하고 소각된 부산물은 용출될 위험이 없는 곳에 매립하는 등 철저한 관리가 필요하다. 유감스럽게도 우리나라의 경우, 오래된 산업폐기물 소각장은 여전히 거주지 인변에 버젓이 존재하여 주민들과의 마찰을 빚으며 주민의 건강을 위협하고 있다.

현재, 소각장 관련 인체위해연구는 다양한 역학

연구를 중심으로 진행되어왔다(Franchini *et al.*, 2004). 예를 들면, 노후된 소각장과 최신 설비를 갖춘 소각장에서 일하는 노동자의 혈 중 PCDD/F level 비교를 통하여 기술적으로 오염을 통제할 수 있는 방안이 제안되었다(Schecter *et al.*, 1995). 그러나, 소각장과의 노출거리와 혈 중 PCDD/F level에서는 기존의 보고들로부터 유의적 양의 관계가 나타나지 않았다 (Gonzalez *et al.*, 2000; Leem *et al.*, 2006).

본 연구는 P시의 농가 한 가운데 설치된 지 10수년된 소각장에 주목하여 그 지역 주민을 대상으로 소각장 유래물질 중, 특히 PAHs 노출과 암 등 유전자손상으로 인한 질환의 대표적인 effective biomarker 중 하나인 DNA-adduct를 중심으로 연구하였다. 본 연구에서도 소각장과의 거리는 뇨 중 1-OHP level, DNA-adduct level과 유의적인 양의 관계를 나타내지 않았다. 한편, 소각장과는 관련이 없으나 다양한 매체로부터 PAHs 노출로 추정되는 뇨 중 1-OHP level도 DNA-adduct level과는 유의적 양의 관계가 관찰되지 않았다 (Fig. 4).

흥미로운 것은 자원자 중 고지혈증으로 진단된 그룹에서 유의적인 εdA level의 상승이 관찰되었다. 아직, '고지혈증과 DNA-adduct'와의 관계는 많이 연구되어 있지 않으나, εdA는 지방산화에 의해 유도되며, 이는 비타민 E 및 채소의 섭취에 의해 예방될 가능성이 있고 (Hagenlocher *et al.*, 2001), 관상동맥질환과 DNA-adduct level의 양의 관계가 예견된 점 (Van Schooten *et al.*, 1998)을 고려할 때, 향후 이러한 관련성은 질병의 기전 및 병인학을 밝히는데 활용가능성이 높을 것으로 추정된다.

결 론

본 연구로부터 내분비장애물질의 강력한 노출원으로 추정되는 소각장과 거주거리는 EDC의 노출지표의 하나로 설정한 PAHs 노출지표, 1-OHP, 암화의 조기 진단 혹은 effective biomarker인 DNA-adduct, εdA와는 유의적 관련이 관찰되지 않았다. 따라서 이 두 지표는 소각장 유래의 특이적인 지표로는 제안하기 어렵다. 그러나, 소각장유래의 노출을 단순히 거리로 국한하지 않고 거주기간, 풍향, 토양오염 등을 고려하는 다각적인 접근도 필요하다. 한편, εdA의 경우, 지원자 중 고지혈증군에서 상승하는 경향이 나타나 향후 이러한 질환에 대한 유용한 생체지표로서의 활용이 기대된다.

감사의 글

자원자모집, 시료채집에 도움을 주신 인하의대 임종한 교수님, DNA-adduct 분석에 도움을 주신 독일 암연구소(DKFZ, Heidelberg)의 Dr. Bartsch H 및 Dr. Nair J에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Bartsch H, Nair and Owen RW. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants, Biol Chem 2002; 383: 915-921.

Bartsch H and Nair J. Ultrasensitive and specific detection methods for exocylic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress, Toxicology 2000; 153: 105-114.

Bartsch H. Key notes: Exocyclic DNA adducts as new biomarkers for DNA damage in man, Exocyclic DNA adducts in muatagenesis and carcinogenesis, IARC 1999; 150: 1-16.

Colborn T, Dumanoski D and Myers JP. Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? New York: Penguin Books USA Inc., 1996.

Franchini M, Rial M, Buiatti E and Bianchi F. Health effects of exposure to waste incinerator emissions:a review of epidemiological studies, Annali dell'Istituto superiore di sanita 2004; 40(1): 101-115.

Gonzalez CA, Kogevinas M, Gadea E, Huici A, Bosch A, Bleda MJ, *et al.* Biomonitoring study of people living near or working at a municipal solid-waste incinerator before and after two years of operation, Archives of environmental health 2000; 55(4): 259-267.

Hagenlocher T, Nair J, Becker N, Korfmann A and Bartsch H. Influence ofdietary fatty acid, vegetable, and vitamin intake on etheno-DNA adducts in white blood cells of healthy female volunteers: a pilot study, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10(11): 1187-1191.

Hanaoka T, Nair J, Takahashi Y, Sasaki S, Bartsch H and Tsugane S. Urinary level of 1,N (6)-ethenodeoxyadenosine, a marker of oxidative stress, is associated with salt

excretion and omega 6-polyunsaturated fatty acid intake in postmenopausal Japanese women, Int J Cancer 2002; 100: 71-75.

Hara K, Hanaoka T, Yamano Y and Itani T. Urinary 1-hydroxypyrene levelsof garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, Sci Total Environ 1997; 199: 159-164.

Kawamoto T and Yang M. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and metabolism of carcinogens, In Hanaoka T (ed.) Search for black boxes of environ-ment-induced cancers: Challenge of molecular epidemiology in occupational medicine. Institute of Occupational Science Press, Human science-frontier series 2000 [III]), 1999.

Lee KH, Bartsch H, Nair J, Yoo DH, Hong YC, Cho SH, *et al.* Effect of short-term fasting on urinary excretion of primary lipid peroxidation products and on markers of oxidative DNA damage in healthy women, Carcinogenesis 2006; 27(7): 1398-1403.

Leem JH, Lee DS and Kim J. Risk factors affecting blood PCDDs and PCDFs in residents living near an industrial incinerator in Korea, Archives of environmental contamination and toxicology 2006; 51(3): 478-484.

Nair J. Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans. In: Singer B , Bartsch H, eds. International Agency for Research on Cancer (IARC) Sci Publ vol 150 Lyon: IARC 1999. 55-61.

Ogata M and Taguchi T. Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of aromatic organic solvents by automated high performance liquid chromatography Ind Health 1987; 25: 225-228.

Roy D, Palangat M, Chen CW, Thomas RD, Colerangle J, Atkinson A and Yan ZJ. Biochemical and molecular changes at the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals, J Toxicol Environ Health 1997; 50: 1-29.

Schecter A, Papke O, Ball M, Lis A and Brandt-Rauf P. Dioxin concentrations in the blood of workers at municipal waste incinerators, Occupational and environmental medicine 1995; 52(6): 385-387.

Van Schooten FJ, Hirvonen A, Maas LM, De Mol BA, Kleinjans JC, Bell DA, *et al.* Putative susceptibility markers of coronary artery disease: association between VDR genotype, smoking, and aromatic DNA adduct levels in human right atrial tissue, Faseb J 1998; 12(13): 1409-1417.

Yang M. Development of exposure biomarkers forendocrine disrupting chemicals using DNA microarray, J Environ Toxicol 2005; 20: 327-332.

Yang M, Park MS and Lee HS. Endocrine disrupting chemicals: human exposure and health risks, J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 2006; 24(2): 183-224.