

총 디젤분진의 DNA 손상작용과 야채 및 과일추출물의 보호효과

허 찬, 김 남 이, 허 문 영*

강원대학교 약학대학

Chemopreventive Effect of Vegetable or Fruit Extract Against Total Diesel Exhaust Particle Extract in NIH/3T3 Cells Using Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis

Chan Heo, Nam Yee Kim and Moon Young Heo*

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

ABSTRACT

In urban areas, diesel exhaust particles (DEP) are probably a major component of particulate matters, especially in Korea where drive many diesel vehicles. The aim of this study was to investigate genotoxic effects of DEP using single cell gel electrophoresis. In order to evaluate the mechanisms of DEP genotoxicity, the rat microsome mediated and DNA repair enzyme treated comet assays together with conventional comet assay were performed. Total diesel particles (DEP_T) was collected without size fractionation from diesel engine bus and dichloromethane extract was obtained. The organic extract of DEP_T revealed DNA damage itself in NIH/3T3 cells. The level of DNA breaks plus oxidative DNA lesions and microsome mediated DNA damage was assessed by modified single cell gel electrophoresis. DEP_T was able to induce oxidative DNA damage as well as microsome mediated DNA damage. Vitamin C as an 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. DEP_T is the sources of oxidative stress, but antioxidants can significantly reduce oxidative DNA damage. And DEP_T may contain indirect mutagens which can be inhibited by CYP1A1 inhibitors. The ethanol extracts of the mixed vegetables (BV) or the mixed fruits (BF) were evaluated for their *in vitro* antigenotoxic effects. BV and BF showed potent inhibitory effects against DEP_T induced DNA damage with oxidative DNA lesions and in the presence of S-9 mixture. These results indicate that BV and BF could prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P4501A1 in cell culture.

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

서 론

※ To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-33-250-6914, E-mail: myheo@kangwon.ac.kr

최근 대기오염은 대도시지역에서 공중보건학적

으로 큰 문제가 되고 있다. 여러 역학 조사에서 대기오염은 호흡기질환이나 심혈관계질환의 증가와 깊은 관련이 있다고 알려져 있다(Lewtas *et al.*, 1990; Künzli *et al.*, 2000). 특히, 디젤차량의 운행증가로 인하여 도시대기부유분진 중 디젤분진의 함량이 증가되고 있다(Baulig *et al.*, 2003). 디젤분진은 수백 종 이상의 서로 다른 유기 및 무기성 물질들이 함유되어 있으며, 오래 전부터 도시 대기환경오염물질로서 위해성이 큰 문제가 되고 있다(환경부, 2000). 특히, 디젤분진(diesel exhaust particle, DEP)은 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), heterocyclic compounds, phenols, and nitroarenes 등의 돌연변이물질, 발암물질 및 기타 독성물질을 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, 1989), 특히 폐암을 일으킬 수 있다는 연구보고가 많다(NIOSH, 1988; Maudely *et al.*, 1996; McClellan *et al.*, 1996; US EPA, 1999; WHO, 1996; Kato *et al.*, 2000). 디젤분진은 발암성과 함께 체내 활성산소(reactive oxygen species)의 생성과도 관련이 깊은 염증, 알러지, 천식, 만성기관지염 등도 관련질환으로서 잘 알려져 있다(Kagawa, 2002). 따라서 대기오염방지는 물론이고 대도시 거주주민의 입자상물질에 의한 질병 예방차원에서 화학예방요법제(chemopreventive agent)의 개발이 필요하다. 특히, 인간게놈의 안정성이 여러 가지 환경독성물질들에 의해 위협받고 있으므로 이같은 유전독성물질들이 DNA를 공격하여 야기시키는 돌연변이로부터 인간게놈을 보호할 수 있는 생리활성물질을 개발할 필요가 있다.

본 연구에서는 DEP_{2.5} (<2.5 μm)에 대한 체세포에서의 DNA 손상에 미치는 영향보고(허 등, 2004)에 이어서 총디젤분진(DEP_T)의 체세포 DNA에 대한 손상메커니즘을 규명하기 위하여 산화적 DNA 손상도와 대사활성화에 따른 DNA 손상도를 비교평가하고, 항산화제 및 대사활성화 억제제에 의한 DNA 손상보호효과를 규명하고자 하였다. 또한 실제 환경 중 인체에 흡입되는 상태인 DEP_T에 대한 유전독성에 대한 보호제로서 항산화활성과 대사활성화억제활성을 가지고 있는 야채 또는 과

일추출물의 효과를 규명하여 예방약학적으로도 활용가능성을 규명하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 디젤분진시료 및 시약

디젤분진은 환경부 '에코테크노피아'의 한국형 위해성평가 표준모델개발사업의 일환으로 개발된 디젤분진 포집장치를 사용하여 디젤엔진버스로부터 포집된 총디젤분진(DEP_T, total diesel exhaust particle)을 사용하였다. 포집된 총디젤분진은 dichloromethane을 가하여 30분씩 sonication하여 추출하고 농축하였다. 이를 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 최종 추출물의 농도가 100 mg/mL가 되도록 다시 녹인 후 0.22 μm syringe filter로 여과하여 bioassay에 사용하였다(성균관대학교 정규혁 교수 연구실로부터 분양 받았음). 한편, DMEM, trypsin EDTA 등 세포배양시약들은 GIBCO사제, vitamin C 등 이화학시약들은 Sigma제를 사용하였다. Rat 간세포로부터 얻은 S-9 (MOLTOX사, Boone, NC, USA)을 사용하였다.

2. 야채 및 과일추출물의 제조

항산화성 유전독성억제능을 가진 천연물을 제조하기 위하여 강원도 양구지방에서 재배된 배추(*Brassica campestris*), 무청(*Raphanus sativus*), 양파(*Allium cepa*), 오이(*Cucumis sativus*), 샐러리(*Apium graveolens*)를 구입하여 물로 세척한 후 건조기에서 건조하였다. 건조된 야채를 1:1:1:1:0.1 kg의 비율(제조목적상 임의의 비율로 제조)로 섞고 여기에 주정(대한주정) 20 L와 정제수 20 L를 가해 20일간 실온에서 방치하고 여과 후 농축하여 암녹색의 연조엑스(Bioactive Vegetables, BV)를 얻었다. 건조야채로부터의 회수율은 약 22% (w/w)였다. 한편, 강원도 양구산 사과(*Malus pumilar*), 배(*Pyrus communis*), 포도(*Vitis vinifera*), 제주산 감귤(*Citrus aurantium*)을 세척하고 1:1:1:1 kg의 비율(제조목적상 임의의 비율로 제조)로 섞고 주정(대한주정)을 30 L를 가하고 실온에서 20일간 방치하였다. 이것을 여과하고 농축하여 암갈색의 연조엑스(Bioactive Fruits, BF)를 얻었다. 생과일로부터의

회수율은 약 6.7% (w/w)였다 (이 등, 2004).

3. 세포독성시험

강원대학교 약학대학에서 보유 중인 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 μ L 중에서 24시간 배양 후 검체 10 μ L를 가하고 CO₂ incubator에서 20시간 더 배양한 후 MTT 시약 15 μ L를 가하고 4시간 배양 후 DMSO를 200 μ L를 가하고 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Ethoxyresorufin-deethylase (EROD) 및 methoxyresorufin-deethylase (MROD) 활성 측정

Fluorometer용 96 well plate에 microsome 20 μ L, 0.1 M Tris-sucrose buffer (pH 8.0)에 녹인 BF 혹은 BF 용액 20 μ L, 5 μ M ethoxyresorufin 20 μ L, 1 mM NADPH 20 μ L를 넣은 다음 530 nm (excitation), 590 nm (emission)에서 30분간 3분 간격으로 형광분광광도계 (Perkin Elmer)로 측정하였다. Standard는 resorufin을 단계 희석하여 각각 20 μ L를 넣고 0.1 M Tris-sucrose buffer (pH 8.0) 20 μ L, 5 μ M ethoxyresorufin 20 μ L, 5 μ M NADPH 20 μ L를 넣어 EROD활성 (CYP1A1)을 측정하였다. 한편, methoxyresorufin를 사용하여 동일하게 MROD (CYP1A2) 활성을 측정하였다 (Thapliyal *et al.*, 2001). 마우스간의 microsome 분리는 아래와 같이 실시하였다. 마우스에서 재빨리 간을 취한 다음 ice-cold buffer (250 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 0.1 mM PMSF, pH 7.4)에 넣어 polytron homogenizer로 homogenize하였다. Homogenate를 4°C에서 20,000 g로 20분간 원심 분리하였고 상등액을 4°C에서 100,000 g로 1시간동안 초고속 원심 분리하여 얻어진 pellet을 resuspension buffer (120 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM PMSF, pH 7.4)로 resuspend해서 다시 20,000 g로 20분간 원심 분리하였다. 얻어진 상등액을 100,000 g로 다시 1시간 초고속 원심분리한 다음 pellet을 200 μ L 이하의 resuspension buffer로 resuspend하여 20,000 g로 20분

간 원심 분리하여 최종 microsomal protein을 얻어 -80°C에 보관하였다. 또한, BCA 단백질 정량법을 사용하였다 (Smith *et al.*, 1985).

5. 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) conventional comet assay-single strand breaks 검출법, b) endonuclease III modified comet assay-oxidized pyrimidine base를 검출하기 위해 cell lysing 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 단독투여하여 산화적 DNA 손상 억제효과도 평가하였다. 실험은 cell 5×10^3 개를 culture dish (6well)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 cell을 harvest하여 test tube에 취했다. 1,000 rpm으로 원심 분리 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 slide (fully frosted)에 이 액 50 μ L를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮었다. 냉장고에서 약 30분간 굳힌 뒤 cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5%-LMPA를 100 μ L를 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 냉장고에서 30분간 굳혔다. Cover slide를 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 slide를 양극 쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 전기영동하였다.

슬라이드를 꺼내 0.4 M tris (pH7.5)에 30분간 담가 중화시켰다. Tray에 걸쳐 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 image analyzer인 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 cell lysis 후에 하였으며 이하 동일조작을 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 × 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).

6. 통계처리

대부분의 실험은 3회 반복 시행하였으며 통계처리는 Student's t-test 및 one way ANOVA test를 사용하였다.

결 과

1. 디젤분진 (DEP_T)의 세포독성

Fig. 1은 DEP_T의 세포독성 실험결과로서 10~200 µg/mL 사이에서 농도의존적으로 세포독성을 나타내었다. 특히, 50, 100, 150, 200 µg/mL에서는 세포생존율이 대조군(100%)에 비해 각각 75.5, 54.2, 48.3, 16.4%로 낮아졌다.

2. 디젤분진 (DEP_T)의 DNA 손상

Fig. 2는 DEP_T의 농도에 따른 DNA 손상 정도를 보여주는 것으로 각각 OTM과 TL을 나타내었다.

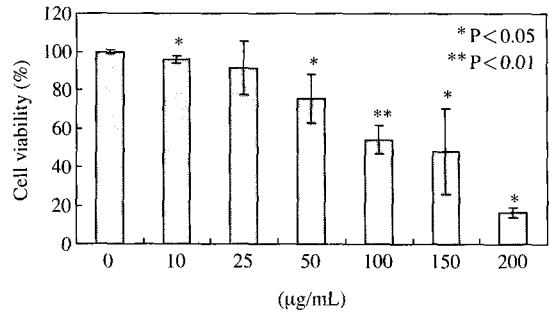


Fig. 1. Cytotoxicity in NIH/3T3 cells upon 20 h treatment with DEP_T. Each point represents the average of triplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

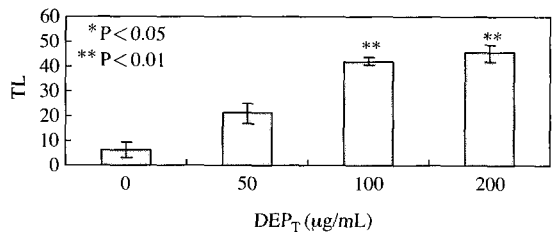
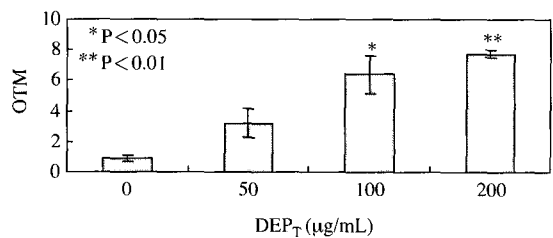


Fig. 2. DNA damage in NIH3T3 cells upon treatment with DEP_T for 45 min. Each point represents the average of triplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

50~200 µg/mL의 농도에서 농도 의존적으로 DNA 손상이 증가한 것으로 나타났으며, 100 µg/mL 및 200 µg/mL에서는 유의성 있는 손상증가가 나타났다.

3. 디젤분진 (DEP_T)의 산화적 DNA 손상과 항산화제에 의한 억제효과

Fig. 3은 DEP_T 100 µg/mL에서 endonuclease III를 처리했을 때의 DNA 손상을 나타내었다. DEP_T에

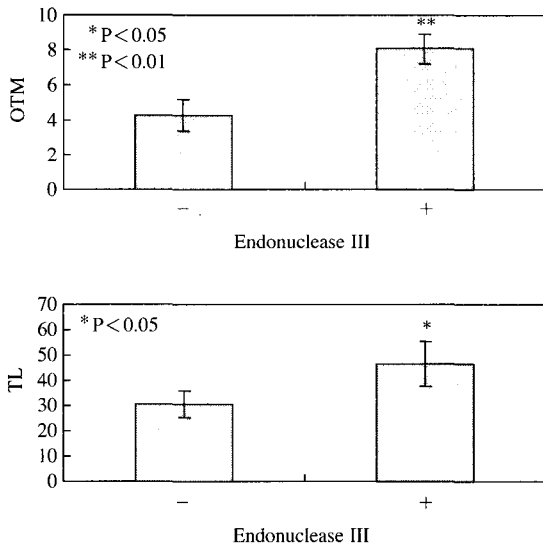


Fig. 3. DNA damage of DEP (100 µg/mL) with and without subsequent treatment of endonuclease III. Each point represents the average of triplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

endonuclease III를 처리했을 때 DNA 손상이 증가 되는 것(OTM에서 90.4%, TL에서 52.1%)으로 보아 디젤분진은 DNA 염기의 산화적 손상을 일으키는 것으로 나타났다.

Fig. 4는 DEP_T 100 µg/mL에서 endonuclease III를 처리 했을 때와 처리하지 않았을 때 항산화제인 vitamin C의 효과를 농도별로 나타낸 것으로 endonuclease III를 처리 시 농도의존적으로 DNA 손상이 줄어들었으며 비처리 시보다 감소경향이 뚜렷하였다. 따라서 DEP_T는 pyrimidine 염기의 산화적 손상을 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_T)의 대사활성화제 처리 시 DNA 손상과 CYP저해제의 억제효과

Fig. 5에는 DEP_T 100 µg/mL에서의 S-9 mixture 45분 및 90분간 처리 시의 DNA 손상도를 나타내었다. S-9 mixture 처리 시 DNA 손상이 증가한 것 [45분 : OTM 39.3%, TL 53.3% (p<0.05), 90분 : OTM 60.4% (p<0.05), TL 31.2%]으로 나타났다. 한

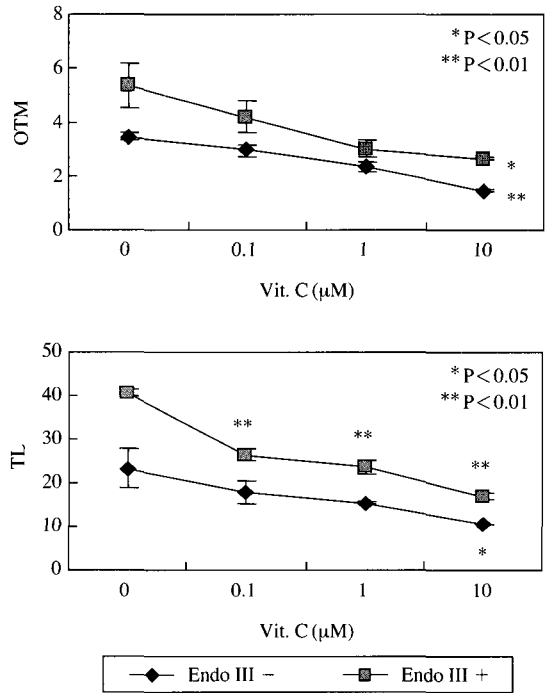


Fig. 4. Effect of vitamin C on DEP (100 µg/mL)-induced DNA damage with and without subsequent treatment of endonuclease III. Each point represents the average of triplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

편, Fig. 6에 DEP_T 100 µg/mL와 S-9 mixture 90분 처리 시 CYP1A 저해제인 galangin 처리 시 DNA 손상 억제효과가 농도의존적으로 나타났다. 따라서 DEP_T는 대사활성화 시 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(Marchand *et al.*, 2000).

5. BV와 BF의 디젤분진 (DEP_T)에 의한 DNA 손상에 대한 억제효과

Fig. 7에서는 DEP_T 100 µg/mL에 대한 BV 및 BF의 DNA 손상억제효과를 나타내었다. OTM 및 TL에서 BV, BF 모두 농도의존적인 억제경향을 나타내었다. Student's t-test로서는 용매대조군에 비하여 OTM에서 BV의 경우 50, 100, 150 µg/mL 모두 유

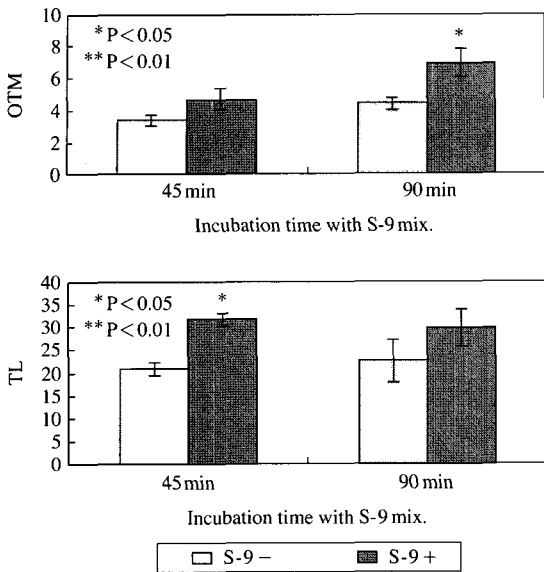


Fig. 5. DNA damage of DEP (100 µg/mL) in the presence and absence of S-9 mixture. Each point represents the average of triplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

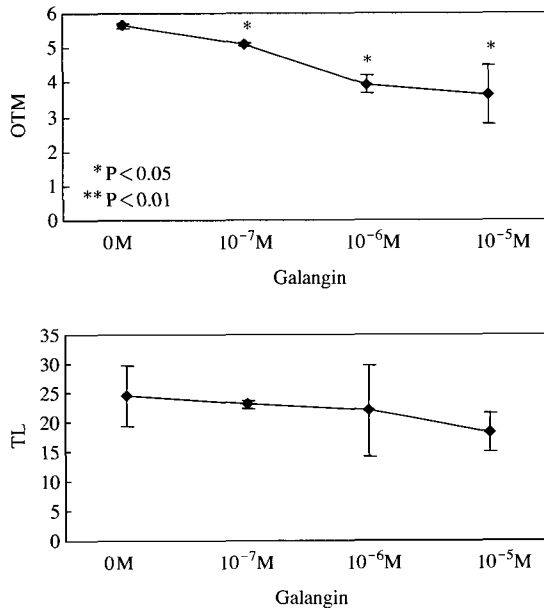


Fig. 6. Effect of CYP1A1 inhibitor, galangin on DEP (100 µg/mL)-induced DNA damage in the presence of S-9 mixture. Each point represents the average of triplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

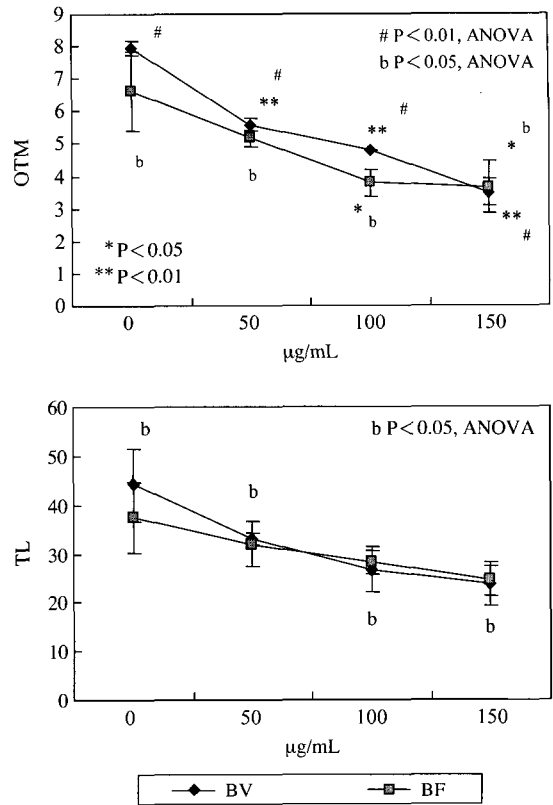


Fig. 7. Protective effect of BV and BF on DEP (100 µg/mL)-induced DNA damage by comet assay. Each point represents the average of triplicate determinants. Error bars mean standard deviation. *($p < 0.05$) and **($p < 0.01$) compared with cells treated with DMSO by student's t-test. Other symbols (# and b) represent to show the results of ANOVA test.

의성 ($p < 0.01$)을 나타내었고 BF의 경우에는 100, 150 µg/mL에서 유의성 ($p < 0.05$)을 나타내었다. TL에서는 BV, BF 모두 처리농도에서 유의성이 $p < 0.05$ 수준에서 나타내지 않았다. 그러나 one way ANOVA test로 통계분석결과 처리농도에 따라서 BV의 경우 OTM에서는 $p < 0.01$, TL에서는 $p < 0.05$ 의 유의적인 차이를 나타내었다. BF의 경우에는 OTM에서 $p < 0.05$ 의 유의적인 차이를 나타내었고 TL에서는 $p = 0.15$ 의 유의적인 차이를 나타내었다. Fig. 8에는 endonuclease III 처리 및 S-9 mix 처리 시 BV 및 BF의 억제효과를 나타내었다. 이 실험에서는 동질의 DEP_T 부족으로 $n = 2$ 로 실험하였다. Endonuclease III 및 S-9 mix 미처리조건 또는

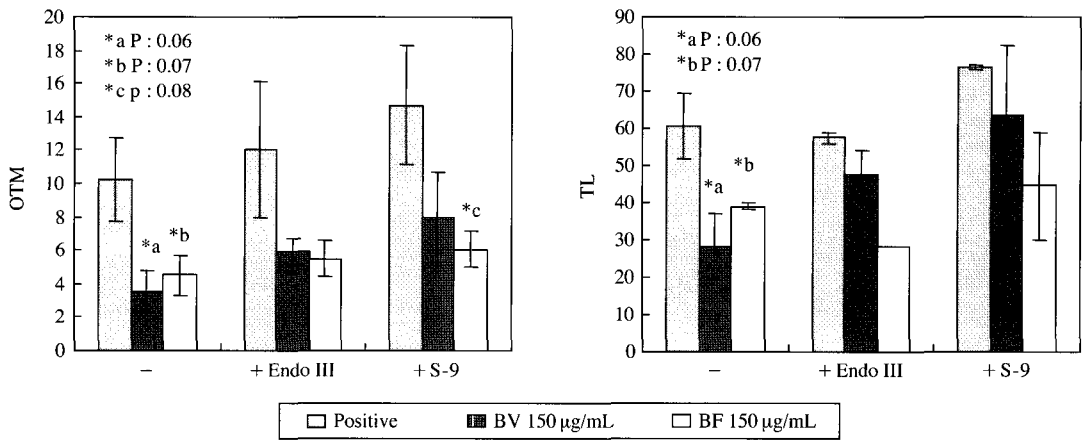


Fig. 8. Protective effect of BV and BF on DEP (100 µg/mL)-induced DNA damage with and without subsequent treatment of endonuclease III or S-9 mixture by comet assay. Each point represents the average of duplicate determinations. Error bars mean standard deviation (SD).

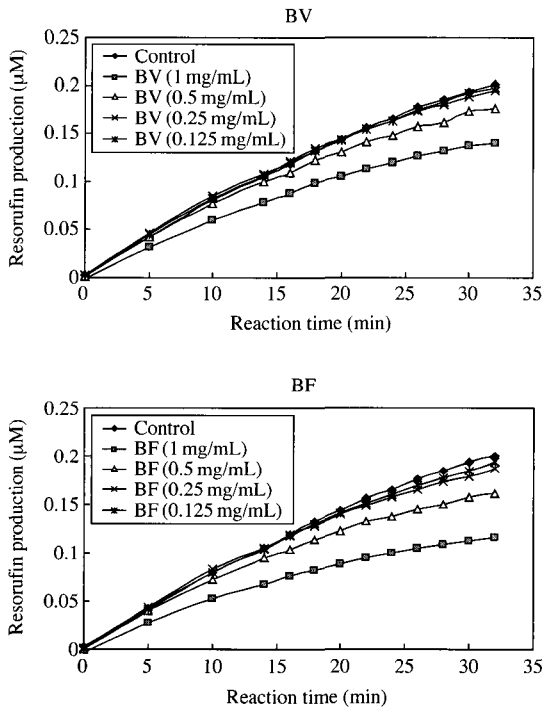


Fig. 9. Inhibition of EROD activity by BV and BF. Each point represents the average of triplicate determinations.

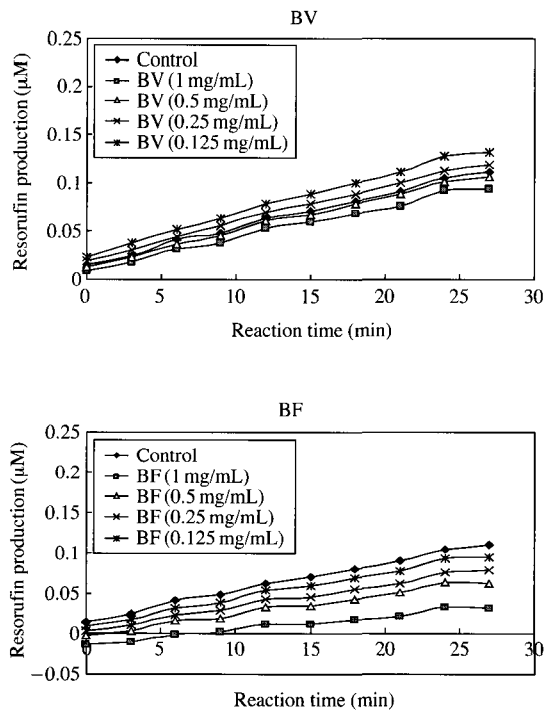


Fig. 10. Inhibition of MROD activity by BV and BF. Each point represents the average of triplicate determinations.

처리조건 하에 BV와 BF는 DEP_T 100 µg/mL 유도 DNA 손상이 양성대조군에 비해 OTM과 TL에서

낮아졌다. 한편 Fig. 9 및 10에 야채와 과일로부터 추출된 항산화효과를 가진 조성물인 BV와 BF

의 EROD와 MROD 억제효과를 나타내었다.

고 찰

본 연구는 DEP_T의 유전독성작용기전으로서 직접적인 single strand breaks 생성과 함께 oxidized base 생성에 의한 손상을 규명하고, S-9 mix 처리 후 대사활성화에 따른 DNA 손상도의 modulation을 파악하고, DEP_T와 같은 환경독성물질에 의한 유전독성을 억제할 수 있는 물질의 창출에 연구목적이 있다.

DEP_T는 10~200 µg/mL의 처리농도에서 유의성 있는 세포독성을 나타내었다(Fig. 1). 또한, 50~200 µg/mL의 처리농도에서 농도의존적으로 DNA손상을 증가시켰다(Fig. 2). 본 연구의 결과는 디젤분진 디클로로메탄추출물에 의한 human monocytic cell 또는 human lymphocyte에서 comet 시험을 이용한 DNA 손상의 유의성 있는 증가현상을 보고한 것과 비슷하였다(Carero *et al.*, 2001; Scheeper *et al.*, 2002). 또한 동물실험에서도 디젤분진에 의하여 간, 장 및 폐 조직에서 comet 시험에 의한 DNA 손상이 검출되었다는 보고도 있다(Muller *et al.*, 2004; Moller, 2005).

대기부유분진 중에는 benzo(a)pyrene을 비롯한 여러 가지 발암성물질들과 함께 세포구성성분들의 산화적 손상을 일으키는 물질들이 함유되어 있으며(IARC, 1989; Schins, 2002), 이들 환경독성물질들의 산화기전에 의하여 여러 가지 급 만성 질환들과 관련되어 있음이 밝혀지고 있다(Li *et al.*, 2002; Bauling *et al.*, 2003). 따라서 대기부유분진 중에 다량 함유되어 있는 디젤분진들도 산화적 세포 손상에 관여할 가능성이 높다. *In vivo*에서 디젤분진입자들의 흡입(Iwai *et al.*, 2000), 경구(Dybdahl *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2004), intratracheal instillation(Moller *et al.*, 2003) 투여시 8-hydroxy-2'-guanosine (8-OH-dG) 생성, oxidized DNA base 생성, DNA adduct 생성, oxidative protein modifications 등이 보고된 바 있다(Li *et al.*, 2003; Pohjla *et al.*, 2003).

본 연구에서 NIH/3T3 세포에서 DEP_T 처리 후 전기영동한 슬라이드를 endonuclease III로 처리한 후 comet assay를 실시한 결과 endonuclease III 처리

하지 않은 슬라이드에서 보다 OTM에서 90.4%, TL에서 52.1% 증가되었다(Fig. 3). 따라서 DEP_T는 *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 III 처리 후 comet 실험에서의 DNA의 손상도 증가는 oxidized base의 존재를 확인하는 증거가 된다(Farombi *et al.*, 2004). 환경분진 중에는 철이나 구리 같은 Fenton type 반응이나 Harber Weiss반응에 의해 ROS를 생성한다(Halliwell *et al.*, 1999). 그러나 탄소입자에 PAH가 흡착되어 있어 유기용매에 의해 추출된 지용성분획에는 B(a)P와 같은 물질이 함유되어 있어 CYP1A1을 발현시켜 ROS와 reactive PAH quinone를 생성시킨다(Kim *et al.*, 1997; Bonvallot *et al.*, 2001). 또한, 환경분진 중에는 quinone radical이 함유되어 있어 세포내에서 산화환원반응에 의해 hydroxyl radical을 생성시킨다(Dellinger *et al.*, 2001).

한편, DEP_T(100 µg/mL)와 함께 항산화성 물질로서 잘 알려진 vitamin C를 0.1~10 µM로 동시에 처리한 결과 DNA 손상 및 산화적 DNA 손상 모두 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 4). 따라서 vitamin C와 같은 항산화제는 DEP_T와 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; Lazarova *et al.*, 2004), 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. 천연항산화제들이 ROS에 의한 인간세포 손상을 보호하여 돌연변이와 같은 인간세포의 불안정성을 예방할 수 있으리라고 보여진다.

DEP_T에는 benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene 등 다환방향족 탄화수소류들이 많이 함유되어 있다(IARC, 1989). 이들 비극성발암물질들은 체내에 흡수되어 간세포 등에서 대사되어 DNA와 비가역적 공유결합을 하여 돌연변이 또는 발암성을 야기시킨다

고 알려져 있다 (Gelboin, 1980; Pelkonen *et al.*, 1982). 또한, 디젤분진, 디젤분진의 유기용매추출물이 cytochrome P4501A1의 발현을 증가시켰다고 보고된 바 있다 (Bauling *et al.*, 2003). 본 연구에서도 DEP_T에 S-9 mix을 45분간 처리하였을 때 DNA 손상도가 OTM에서 39.3%, TL에서 53.3%나 크게 증가된 것으로 보아서 DEP_T에는 다환방향족탄화수소류가 함유되어 있는 것으로 추정된다 (Fig. 5).

또한, cytochrome P450 1A1, 1A2의 저해제로 잘 알려져 있는 flavonoid화합물 중의 하나인 galangin (Heo *et al.*, 2001)을 DEP_T와 함께 $10^{-7}M - 10^{-5}M$ 을 처리하였을 때 농도의존적인 억제경향을 나타내었다 (Fig. 6). Arylhydrocarbon receptor agonist인 β -naphthoflavon (BNF)이 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_T는 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; Edenharter *et al.*, 2003). 앞으로 *in vivo*연구 및 임상연구를 비롯한 더 많은 관련 연구가 필요하지만 DEP_T와 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 *et al.*, 1992; Quadri *et al.*, 2000).

야채와 과일에는 항산화성분인 폴리페놀이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (Justesen *et al.*, 1997; Justesen *et al.*, 1998). 이에 본 연구에서는 5종의 야채로부터 추출된 야채생리활성추출물과 4종의 과일로부터 추출된 과일생리활성추출물들을 대상으로 하여 DEP_T에 의한 DNA 손상에 대하여 억제효과를 갖는지를 평가하였다. BV와 BF는 50~150 $\mu g/mL$ 에서 억제경향을 나타내었다 (Fig. 7). Endonuclease III 처리 시에도 억제효과를 나타내었다 (Fig. 8). 이는 BV 및 BF가 비교적 큰 항산화물질 (이 등, 2004; 허 등, 2005)이기 때문에 산화적 DNA 손상억제효과가 나타난 것으로 보인다. 또

한, S-9 mix 처리 시에도 억제경향을 나타내었는데 (Fig. 8) 이는 BV와 BF가 각각 EROD 및 MROD 억제활성을 가지고 있기 때문으로 판단된다 (Fig. 9, Fig. 10). BV와 BF에는 total polyphenol로서 각각 3.52, 0.96%로서 함량을 나타내며, total flavonoid로서는 각각 0.40, 0.075% 정도 함유하고 있다 (이 등, 2004). 기 발표된 논문에서도 배추, 무우청, 양파, 오이, 샐러리와 같은 야채와 사과, 배와 같은 과일에는 quercetin, kaempferol 배당체들이 다량 함유되어 있으며 (Herotog *et al.*, 1992), 감귤에는 hesperetin, naringenin 배당체 (Mouly *et al.*, 1998), 포도에는 resveratrol 등 (Matsuoka *et al.*, 2001) 항산화성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

역학적 조사연구에서 quercetin이나 naringenin이 풍부한 식품을 섭취하면 폐암을 예방한다는 보고 (Marchand *et al.*, 2000)가 있으며 quercetin은 동물모델에서 식이성발암물질에 의한 발암억제효과 (Yang *et al.*, 2001)가 보고된 바 있다. Quercetin은 benzo(a)pyrene의 diol-epoxide로의 대사활성화를 억제하였고 이는 특히 CYP1A1 wild type의 genotype에서 잘 나타났다고 보고하였다 (Schwarz *et al.*, 2005). 이 같은 관련연구보고로 보아 BV와 BF는 quercetin과 같은 flavonod 물질들을 다량 함유하고 있으므로 CYP 산화효소의 억제효과로 유전독성물질의 대사활성화가 저해되어 이 같은 chemopreventive 효과가 나타나는 것으로 판단된다.

따라서 BV와 BF는 항산화효과와 함께 CYP1A1, CYP1A2 효소억제효과로 디젤분진과 같은 환경독성물질에 대하여 항산화성 유전독성억제효과 (antioxidative antigenotoxic effect)를 나타내는 물질로서 활용 가치가 있을 것으로 판단된다.

결 론

본 연구에서는 DEP_T의 DNA 손상도 측정을 위하여 comet assay를 사용한 결과 DEP_T의 중요한 두 가지 유전독성기전인 산화적 DNA 손상과 대사활성화에 의한 DNA 손상도를 평가할 수 있었으며, 또한 유전독성억제제의 활성을 검정할 수 있었으며 다음과 같은 결론을 얻었다. DEP_T는 NIH/3T3 세포에서 농도의존적으로 세포독성과 DNA 손상을 나타내었다. DEP_T는 DNA 염기에 산화적 DNA 손

상을 일으키며 항산화제인 비타민 C에 의하여 감소되었다. DEP_T는 대사활성화에 의하여 DNA 손상을 증가시키며 CYP1A저해제로서 flavonoid인 galangin에 의하여 감소되었다. DEP_T는 BV 및 BF에 의해서 DNA 손상이 감소되었으며 이는 BV, BF의 항산화 효과 및 대사활성화억제로 인하여 감소되었다.

이상을 요약하면 DEP_T는 세포독성과 함께 DNA 손상을 야기시키며 산화적 DNA 손상과 대사활성화에 의한 DNA 손상증가를 나타내었으며 항산화성물질과 대사활성화저해제에 의해 감소될 수 있었다. 특히, 본 연구결과, BV 및 BF에 의해서 DNA 손상이 감소되었으며 이는 BV, BF의 대사활성화억제 및 항산화효과로 인하여 감소되었다. 따라서 BV, BF와 같은 항산화성 유전독성억제효과를 갖는 조성물은 디젤분진과 같은 환경분진의 노출로부터 보호효과를 가질 수 있다고 보여지며 인간체능의 안정성유지를 위하여 이러한 천연조성물의 예방약학적 응용에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 지역협력연구센터사업(한림대 실버생물산업기술연구센터)와 2003년 환경부의 차세대핵심환경기술핵심사업(Eco-technopia 21 project) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드리는 바이다. EROD 및 MROD 활성 측정에 도움을 준 강원대학교 약학과 생화학교실 임현 연구원에게도 사의를 표한다.

참고 문헌

이승철, 허 찬, 이승현, 김현표, 허문영. 야채 및 과일추출물의 항산화작용과 산화적 염색체손상에 대한 억제효과, 약학회지 2004; 48(2): 111-116.
 허 찬, 김남이, 김현표, 허문영. 야채 및 과일추출물의 항산화작용, 약학회지 2005; 49(3).
 허 찬, 김남이, 정규혁, 문창규, 허문영. 디젤분진이 체세포에서의 DNA손상에 미치는 영향, 환경독성학회지 2004; 19(4): 335-344.
 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.
 Baulig A, Sourdeval M, Meyer M, Marano F and Baeza-Squiban A. Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles, *Toxicol In Vitro* 2003; 17(5-6): 567-73.
 Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau R, Barouki R and Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome P450 1A1 expression, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 2001; 25: 515-521.
 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.
 Dellinger B, Pryor WA, Cueto R, Squadrito GL, Hegde V and Deutsch WA. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter, *Chem. Res. Toxicol.* 2001; 14: 1371-1377.
 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.
- Halliwel B and Gutteridge JM, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press 1999.
- 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, Sohn SJ and Au WW. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate, *Mutation Research* 2001; 488: 135-150.
- 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.
- Herotog MGL, Hollaman PCH and Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *J. Agric. Food Chem.* 1992; 40: 2379.
- 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.
- Justesen U, Knuthsen P and Leth T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett.* 1997; 114(1-2): 165.
- Justesen U, Knuthsen P and Leth T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* 1998; A99(1-2): 101.
- 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.
- Kagawa J. Health effects of diesel exhaust emissions-a mixture of air pollutants of worldwide concern, *Toxicology* 2002; 27: 349-353.
- Kim KB and Lee BM. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene, *Cancer Lett.* 1997; 113: 205-212.
- Künzli N, Kaiser R, Medina S, Studnicka M, Chanel O, Filliger P, Herry M, Horak F, Jr, Puybonnieux-Textier V and Quénel P. Public-health impact of outdoor and traffic-related air pollution: a European assessment, *The Lancet* 356(9232): 795-801.
- Lazarova M, Slamenova D. Genotoxic effects of a complex mixture adsorbed onto ambient air particles on human cells *in vitro*; the effects of Vitamins E and C, *Mutat Res.* 2004; 557(2): 167-75.
- 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.
- 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.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J and Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage, *Environ. Health Perspect.* 2003; 111: 455-460.
- Matsuoka A, Furuta A, Ozaki M, Fukuhara K and Miyata N. Resveratrol, a naturally occurring polyphenol, induces sister chromatid exchanges in a Chinese hamster lung (CHL) cell line, *Mutat. Res.* 2001; 494(1-2): 107.
- Mauderly JL. Lung overload: the dilemma and opportunities

- for resolution, *Inhalation Toxicology* 1996; 8: 1-28.
- McClellan RO. Lung cancer in rats from prolonged exposure 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.
- Mouly P, Gaydou EM and Auffray A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J Chromatogr. A.* 1998; 800(2): 171.
- 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.
- Schwarz D, Kisselev P and Roots I. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo[a]pyrene activation by quercetin. *Eur J Cancer* 2005; 41(1): 151-8.
- 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.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 1985; 150: 76-85.
- Thapliyal R and Maru GB. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo, *Food Chem Toxicol* 2001; 39(6): 541-547.
- 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.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT and Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds, *Annu Rev Nutr.* 2001; 21: 381-406.