한국산업위생학회지 제17권 제3호(2007년 9월)
J Korean Soc Occup Environ Hyg 2007;17(3):235-244

Styrene 노출에 반응을 보이는 혈청 단백질에 대한 프로테오믹스 분석

김기웅† · 허경화 · 원용림 · 정진욱 · 김태균 · 박인정

한국산업안전공단 산업안전보건연구원

Proteomic analysis of serum proteins responsive to styrene exposure

Ki-Woong Kim† · Kyung-Hwa Heo · Yong Lim Won · Jin Wook Jeong · Tae Gyun Kim and Injeong Park

Occupational Safety and Health Research Institute, KOSHA
34-4, Gusan-Dong, Bupyong-Ku, Incheon 403-711, Korea

By comparing the proteins from the workers exposed to styrene with the ones from controls, it may be possible to identify proteins that play a role in the occurrence and progress of occupational disease and thus to study the molecular mechanisms of occupational disease. In order to find the biomarkers for assessing the styrene effects early, before clinical symptoms develop and to understand the mechanisms of adverse health effects, we surveyed 134 employees, among whom 52 workers(30 male and 22 female) were chronically exposed to styrene in 10 glass-reinforced plastic boat manufacturing factories in Korea and 82 controls had never been occupationally exposed to hazardous chemicals including styrene. The age and drinking habits and serum biochemistry such as total protein, BUN and serum creatinine in both groups were significantly different. Exposed workers were divided into three groups according to exposure levels of styrene(G1, below 1/2 TLV; G2, 1/2 TLV to TLV; G3, above TLV). The mean concentration of airborne styrene in G1 group was 10.93±11.33 ppm, and those of urinary mandelic acid(MA) and phenylglyoxylic acid(PGA) were 0.17±0.21 and 0.13±0.11 g/g creatinine, respectively. The mean concentration of airborne styrene in G2 and G3 groups were 47.54±22.43 and 65.33±33.47 ppm, respectively, and levels of urinary metabolites such as MA and PGA increased considerably as expected with the increase in exposure level of styrene. The airborne styrene concentration were significantly correlated to the urinary concentration of MA(r=0.784, p=0.000) and PGA(r=0.626, p<0.001). In the 2D electrophoresis, the concentration of five proteins including complement C3 precursor, alpha-1-antitrypsin(AAT), vitamin D binding protein precursor(DBP), alpha-1-B-glycoprotein(A1BG) and inter alpha trypsin inhibitor(ITI) heavy chain-related protein were significantly altered in workers exposed to styrene compared with controls. While expression of complement C3 precursor and AAT increased by exposure to styrene, expression of DBP, A1BG and ITI heavy chain-related protein decreased.

접수일 : 2007년 7월 19일, 채택일 : 2007년 9월 11일
† 교신저자 : 김기웅(인천광역시 부평구 기능대학길 25(구산동 34−4) 한국산업안전공단 산업안전보건연구원 직업병연구센터
Tel: 032-5100-821, Fax: 032-502-7197, E-mail: k0810@kosha.net)

These results suggest that the exposure of styrene might affects levels of plasma proteinase, carriers of endogenous substances and immune system. In particular, increasing of AAT with the increase in exposure level of styrene can explain the tissue damage and inflammation by the imbalance of proteinase/antiproteinase and decrease of DBP, A1BG and ITI heavy chain-related protein in workers exposed to styrene is associated with dysfunction and/or declination in immune system and signal transduction

Key Words : Styrene, Mandelic acid(MA), Phenylglyoxylic acid(PGA), Proteomics, Molecular biomarkers

Ⅰ. 서 론

스티렌은 플라스틱제조 산업에서 널리 사용되는 매우 중요한 화학물질 중의 하나이며, 배기가스 및 담배연기 등에 포함되어 있는 환경오염물질이기도 하다(Miller 등, 1994). 사람에 있어서 스티렌의 대사기전은 잘 알려져 있다(Sumner와 Fennell, 1994). 스티렌의 대사는 cytochrome P-450(CYP)2B 1/2(김 기 웅 등, 1997), CYP2B6(Nakajima 등, 1993), CYP2E1(Guengerich 등, 1991) 등 동위효소의 촉매작용에 의해서 스티렌이 epoxide 중간체인 styrene-7,8-oxide(7,8-SO)가 생성되고, 7,8-SO는 (R)7,8-SO와 (S)7,8-SO 2개의 거울상이성질체(enantiomers)로 존재하며 유전독성을 유발시킨다(Laffon 등, 2002). 7,8-SO의 해독대사는 microsomal epoxide hydrolase(mEH)의 작용에 의해서 epoxide의 ring이 열리면서 styrene glycol(SG)이 생성된 후, NAD(P)H 의존성 탈수소효소에 의해서 mandelic acid(MA)와 phenylglyoxylic acid(PGA)로 배설된다(Ohtsuji와 Ikeda, 1971). 그 이외에도 적은 양이지만 뇨중으로 배설되는 물질은 7,8-SO가 glutathione S-transferase(GST)와 포합반응(conjugation)에 의해서 생성되는 phenylhydroxyethyl mercapturic acids (PHEMAs)(Haufroid 등, 2001)와 styrene-3,4-oxide로부터 생성되는 4-vinyl- phenol(4-VP)(Pantarotto 등, 1978) 등이 있다. 이와 같이 스티렌뿐만 아니라 여러 가지 화학물질의 대사와 관련하여 약물역동학적(pharmacokinetics) 연구가 활발히 진행되는 것은 체내 흡수물질에 대하여 특이성이 큰 생물학적 모니터링 지표물질을 찾기 위함과 대사기전을 통하여 질병 발생기전을 파악하는데 목적이 있다. 현재 스티렌 노출 근로자에 대한 생물학적 모니터링은 소변으로 배설되는 스티렌의 대사산물 농도를 측정하여 평가하고 있다(ACGIH, 2002). 그러나 이러한 방법은 다소의 문제점을 가지고 있는데, 그 중의 하나가 짧은 체내 반감기이다. Wigaeus 등(1984)은 스티렌 293 mg/m^3 (68 ppm)을 2시간 동안 노출시킨 사람에서 스티렌의 혈중 반감기는 약 40분, 소변에 있어서 MA와 PGA의 반감기는 각각 4시간과 9시간 정도라고 보고하였으며, 지방조직에서는 혈액이나 소변에서 보다 긴 반감기를 가지고 있는 것으로 보고되었다(IPCS, 1983). 이러한 짧은 반감기는 스티렌 노출 근로자의 소변을 이용하여 생물학적 모니터링을 실시할 경우, 작업시간과 강도에 의존하여 소변을 채취하는 시간에 따라 1일 8시간 작업기준으로 환산하여 평가할 경우에 과대 혹은 과소평가될 소지가 많다. 또한 스티렌 대사산물의 배설량은 흡연습관에 따라 차이를 보이는데(Manini 등, 2003), 이러한 차이는 스티렌의 대사에 관여하는 효소의 활성도와 이들 효소의 유전자 아형과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Ma 등, 2005).

따라서 많은 연구자들은 스티렌뿐만 아니라 산업체에서 노출되는 유해화학물질의 체내 독성유발 기전과 정확한 생물학적 모니터링 방법을 개발하기 위하여 새롭게 개발되는 분석기기를 이용한 새로운 분석방법의 개발(Manini 등, 2004), 흡수된 물질의 생물학적 변형(biotransformation)과 관련된 효소학적 연구(Carlson 등, 2006) 및 유전자다형성 연구를 통한 대사 민감도(metabolic susceptibility)(Ma 등, 2005)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 이외에도 체내 독성과 질병을 진단하고 이해하기 위하여 국내·외적으로 활발히 연구되고 있는 분야가 단백질체학(proteomics) 연구이다. 단백질체학은 유전자 다음 세대(post genomic era)의 연구로 각광을 받고 있는 분야로서 생명체의 전체 유전자인 genome에 의해서 발현되는 모든 단백질의 총합인 프로테옴(proteomes)을 다루는 분야의 학문으로서(Anderson과 Anderson, 1998) 생명과학, 의학 및 약학, 농업 및 기타의 많은 분야에서 연구되고 있다. 프로테오믹스의 가장 큰 특징은 정상과 비정상 상태에서 변화되는 단백질의 구조와 기능 비교, 세포의 생리상태 변화 및 번역 후 변형(post translational modification)의 해석 및 단백질끼리의 결합상태 등을 파악하여 생물학적 동요(perturbation)를 이해할 수 있다는 것이다. LoPachin 등(2003)은 신경독성 연구에 있어서 단백질의 기능과 활성에 대한 연구의 접근은 화학물질의 노출에 의하여 생성되는 adducts와 생체 내 물질에 의해 중재되는 인산화와 glycosylation 반응을 통한 번역 후 변형의 영향으로 인하여 단백질의 기능과 활성을 이해하는데 어려움이 있다고 하였다. 이러한 연구에서 많이

사용되고 있는 물질 중의 하나가 n-hexane의 대사중간체인 2,5-hexanedione(2,5-HD)이다. DeCaprio 등(1982)은 2,5-HD가 생체 내 신경섬유 단백질의 아민기와 반응하여 2,5-dimethylpyrrole adducts를 생성하고, 이 adducts가 신경섬유 단백질의 serine과 위치선택(regioselectivity) 결합을 함으로서 인산화반응을 일으킨다고 보고하였다(DeCaprio 등, 1997). 위에서 언급한 생체 내 물질에 의한 중재반응, 독성, 약물의 대사기전 및 질병의 진단 등의 목적으로 많은 연구자들에 의하여 단백질체학에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Stierum 등, 2005; Boyd-Kimball 등, 2006).

따라서 이번 연구의 목적은 신경독성을 유발하는 물질인 스티렌을 대상물질로 하여 스티렌의 노출에 의해 발현되거나 양적인 변화를 보이는 특이 단백질을 파악하여, 스티렌에 의해 유발되는 질병에 대한 기전을 이해하는데 자료를 제공하고 건강장해를 평가할 수 있는 생물학적 지표물질로 활용하고자 하였다.

Ⅱ. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구의 노출군 대상자는 합성수지선박제조업(FRP 조선소) 10개 사업장의 적층 작업공정에서 스티렌 단일물질에 노출된 근로자였고, 스티렌뿐만 아니라 기타의 유해화학물질에 노출된 적이 없는 사무직 근로자를 대조군 대상자로 선정하였다. 이들 대상자에 대하여 연구목적과 방법 등을 자세히 설명한 다음, 연구에 참여를 희망한 대조군 대상자 82명과 노출군 대상자 52명을 1차 연구대상자(134명)로 선정하였으며, 노출군 대상자는 노출농도 수준별로 실험군 I(TLV의 1/2 이하), 실험군 II(TLV 1/2 - TLV) 및 실험군 III(TLV 이상)로 구분하여 연구를 진행하였다.

먼저, 실험군 I, II, III에 포함된 각각의 대상자로부터 설문지와 직접면담을 통하여 얻은 정보를 바탕으로 연령, 근무력, 흡연 및 음주습관, 습관성 약물복용 및 질병상태 등을 고려하여 비슷한 조건의 대상자를 군당 6명씩 선정한 다음, 대조군에서도 위에서 언급한 방법에 따라 노출군 대상자와 동일한 조건을 가진 대상자 6명을 선정하여 총 24명을 최종 연구대상자로 하여 스티렌의 노출에 의하여 변화된 혈청 단백질의 동정과 농도를 분석하였다. 대조군과 노출군 대상자는 흡연경험이 없고 술은 1개월에 1-2회 정도 마시며 습관성 약물복용과 질병이 없는 대상자였으며, 이들의 평균연령은 47.1±1.0세, 근무력은 12.2±2.5년이었다. 이 연구는 한국산업안전공단 산업안전보건연구원의 자체 구성된 연구윤리심의위원회의를 거쳐 진행되었으며, 연구는 참여에 동의한 연구대상자로부터 동의서를 받은 다음, 연구를 진행하였다.

2. 연구 내용

1) 공기중 스티렌 농도 및 뇨중 대사산물의 배설량

작업장내 공기 중 styrene의 채취와 분석은 미국국립산업안전보건연구소(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)에서 추천하는 공정시험법(1996) ‘Method 1501 방향족 탄화수소류’ 에 의하여 실시하였다. 공기중 스티렌의 포집은 활성탄을 흡착제로 하여 저유량 개인용시료포집기(Low Flow Sampler 113 D, Gilian, USA)를 이용하여 분당 200 ㎖의 유속을 조절한 다음, 근로자의 호흡구 위치에서 6시간 이상 포집(활성탄관의 파과를 방지하기 위하여 2 시간 간격으로 활성탄관을 교체)하였다. 스티렌이 포집된 활성탄관은 밀봉된 상태로 실험실로 냉장 운반한 다음, 흡착제를 GC용 바이알에 넣고 1 ㎖의 이황화탄소를 넣고 탈착시킨 후, 가스크로마토그래피(CP-3800 GC/FID, Varian Ltd., USA)를 이용하여 분석하였다. 스티렌의 뇨중 대사산물을 분석하기 위한 소변은 근로자의 작업종료 시점에 플라스틱 통을 이용하여 채취한 후, 냉동된 상태로 실험실로 운반하였다. 스티렌의 뇨중 대사산물 분석은 Ogata 등의 방법을 약간 변형하여 시행하였다(Ogata 등, 1988). 근로자로부터 채취한 소변을 잘 섞어준 다음, 50 ㎕를 취하여 액체크로마토 그라피 이동상 700 ㎕와 잘 섞은 후 10분간 원심분리한 상등액을 액체크로마토그라피로 분석하였다. 액체크로마토그라피(Waters, USA)를 위한 고정상은 Supelcosil C18 컬럼 (15 cm x 2.1 mm, 입자직경 5 ㎛), 이동상은 탈이온수 1 ℓ 에 n-tetrabutylammonium bromide 5.5 g과 KH_2PO_4 1.5 g을 녹인 완충용액과 메탄올을 부피비 10:6으로 혼합한 용액을 사용하였다. 이동상 유속 1 ㎖/min, UV 검출기 검출파장 225 nm으로 뇨중 mandelic acid(MA), phenylglyoxylic acid (PGA)와 마뇨산(hippuric acid, HA)을 분석한 후, creatinine으로 보정하여 배설량을 산출하였다.

2)혈청 단백질 발현 분석

(1) 혈청 단백질 추출 및 정량

혈청 알부민, transferrin 및 IgG의 제거 및 농축은 CNBr activated sepharose 4B에 알부민, transferrin 및 IgG에 대한 polyclonal antibody가 coupling된 column을 이용하여 elution buffer[0.1 M glycine(pH 3.0)]를 이용하여 1 ㎖/min의 유속으로 시료를 용출시켰다(김기웅, 2005). 용출된 혈청시료에 trichloroacetic acid(TCA)를 혼합한 후 얼음에서 1 시간 동안 정치시킨 다음, 16,000 rpm(4℃)에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물을 ether를 이용하여 2회 세척하고 건조시킨 다음, lysis buffer(8 M urea)로 용해시키고 나서 상온

에서 1 시간 동안 정치 후, 원심분리(3,000 rpm, 5분)하여 얻은 상층액을 Lowry 방법(1951)에 따라 정량한 다음, 단백질 동정 및 서열분석 실험에 사용하였다.

(2) 2차원(2 dimension, 2D) 전기영동

대상자 각각의 혈청을 동일한 농도로 희석시킨 다음, 7 ㎕씩 취하여 93 ㎕ lysis buffer와 혼합하고 상온에서 약 1시간 동안 방치시킨 후, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상층액 90 ㎕(350 ㎍)를 immobiline drystrip(pH 4-7) (Amersham Biosciences사, USA)에 잠적하였다. Immobiline drystrip에 450 ㎕의 rehydration buffer를 골고루 퍼지게 한 다음, 일정 시간동안 rehydration을 시키고 나서 cover fluid oil 2 ㎖을 시료표면에 고르게 덮은 후, immobiline drystrip cover를 덮고 Ettan™ IPGphor II™(Amersham Biosciences, USA)을 이용하여 IEF를 실행하였다. IEF가 종료된 후 immobiline drystrip을 꺼내 과량의 cover fluid oil을 제거한 다음, immobiline drystrip을 equilibration 용액에서 15분 동안 서서히 shaking 하였다. Immobiline drystrip에 묻어있는 equilibration 용액을 증류수를 이용하여 세척한 다음, 11% SDS-PAGE gel에 immobiline drystrip을 올려놓고 agarose sealing solution을 넣어 완전히 굳은 다음에 12 mA/gel로 18시간 동안 전기영동을 실시하였다. SDS-PAGE gel을 꺼내어 고정액(40% methanol + 10% acetic acid)에서 1 시간 동안 shaking incubation 시킨 다음, 30% ethanol과 증류수를 이용하여 2차 세척하고 0.02% sodium thiosulfate 용액으로 1분 동안 sensitizing 한 후, 증류수로 2회 세척하였다. SDS-PAGE gel을 silver nitrate 용액(0.2% silver nitrate + 37% HCOH 0.2 ㎖)에 넣고 20분 동안 shaking incubation한 다음, 증류수로 2회 세척하고 전개용액(3% sodium carbonate in 37% HCOH 0.5 ㎖)에서 약 4분 동안 반응시킨 후, 5% glycine으로 반응을 종료하고 나서 image 분석을 실시하였다(김기웅 등, 2005).

(3) 단백질 동정 및 서열분석

각각의 단백질 spot을 선별하여 cutting한 다음, 단백질 동정과 서열분석을 실시하였다. Cutting한 단백질 spot을 증류수로 2회 세척하고 de-staining 용액(30 mM potassium ferricyanide + 100 mM sodium thiosulfate)을 이용하여 silver 염색을 완전히 제거하였다. 증류수로 2회 세척하고 0.1 M ammonium bicarbonate 용액 200 ㎕를 넣고 상온에서 20분간 정치한 다음, 200 ㎕ acetonitrile을 첨가하고 600 rpm으로 5분 동안 vortex하고 나서 0.1 M ammonium bicarbonate 용액을 넣고 5분 동안 600 rpm으로 다시 vortex하였다. Acetonitrile 200 ㎕를 넣고 5분 동안 600 rpm으로 vortex한 후, 상온에서 gel을 건조시켰다. 건조된 gel에 200 ng trypsin 용액을 넣고 얼음에서 45분 동안 정치시킨 후 용액을 완전히 제거한 다음, 50 mM ammonium bicarbonate solution 40 ㎕ 넣고 37℃에서 약 8-14 시간 동안 incubation 시킨다. Incubation 시킨 시료를 poros reverse phase R2(20-30 ㎛ bead size, PerSeptive Biosystems)가 packing된 gel loading tip(Eppendorf, Hamburg, Germany)에 넣고, 60% acetonitrile과 5% formic acid를 이용하여 desalting과 농축을 시켰다. 농축된 동일 시료를 나누어서 일부는 delayed-extraction reflectron time-of-flight mass spectrometer(Model MALDI-R Micromass, Manchster, UK)를 사용하여 단백질을 동정하였고, 일부는 ElectroSpray Ionization Mass/Mass(ESI-MS/MS, Q-TOF)(Micromass, Manchster, UK)를 사용하여 단백질 서열을 분석하였다. 분석된 단백질은 MASCOT 프로그램(www.matrixscience.com)을 이용하여 NCBI database에 저장된 단백질과 비교하여 확인하였다.

3. 자료분석

자료에 대한 통계분석은 SPSS(Window version 12.0)를 이용하여 노출군과 대조군간의 결과 차이를 t-검정하였고, 관련성은 χ^2-test와 상관분석(Pearson correlation)을 실시하였다. .

Ⅲ. 연구결과

노출군과 대조군의 1차 선정 대상자의 전체 평균연령은 각각 49.2±7.48과 46.8±9.2세로 두 군간에 유의한 차이를 보였으며($p<0.05$), 근무경력은 평균 13년으로 두 군간에 차이를 보이지 않았다. 그러나 대조군에서 흡연자(35.4% vs 23.1%)와 음주자(79.3% vs 59.6%)가 노출군보다 높았다. 이들 대상자들의 ALT, AST 및 GGT는 노출군에서 다소 높은 측정치를 보였으나 참고치 범위였고 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 공기중 스티렌의 농도와 대사산물의 배설량에 대한 상관성은 스티렌의 농도와 MA가 0.784($p<0.000$), PGA의 농도와는 0.626($p<0.001$)의 상관성을 보였다(Fig. 1). 실험군 I의 대상자들은 평균 10,93±11.33 ppm의 스티렌에 노출되고 있었으며, 스티렌의 대사산물인 MA와 PGA의 뇨중 배설량은 각각 0.17±0.21과 0.13±0.11 g/g creatinine이었다. 실험군 II와 III가 노출되는 스티렌의 평균농도는 47.54±22.43과 65.33±33.47 ppm으로 뇨중 MA와 PGA의 배설량은 기중 styrene의 농도에 의존하여 증가된 배설량을 보였다(Table 1). 대조군과 실험군별 대상자의 혈청에 다량 존재하는 알부민, transferrin과 IgG를 polyclonal antibodies가 coupling된 CNBr activated sepharose 4B column을 이용하여 제거시킨 다음, 2차 전기영동을 실시하여 육안으로 확인된 단백질 spot은 약 100여개 정도였으나 이중 MALD-TOF를 이용하여 동정된 단백질은 15개였고 스

틴렌 노출로 인하여 발현된 특이 단백질은 확인되지 않았다 (Fig. 2). 그러나 실험군별 스티렌의 노출농도와 관련하여 발현정도의 차이를 보이는 단백질은 5개였다($p<0.05$) (Table 2). 이들 5개의 단백질 중 complement C3 precursor(CC3P)와 alpha-

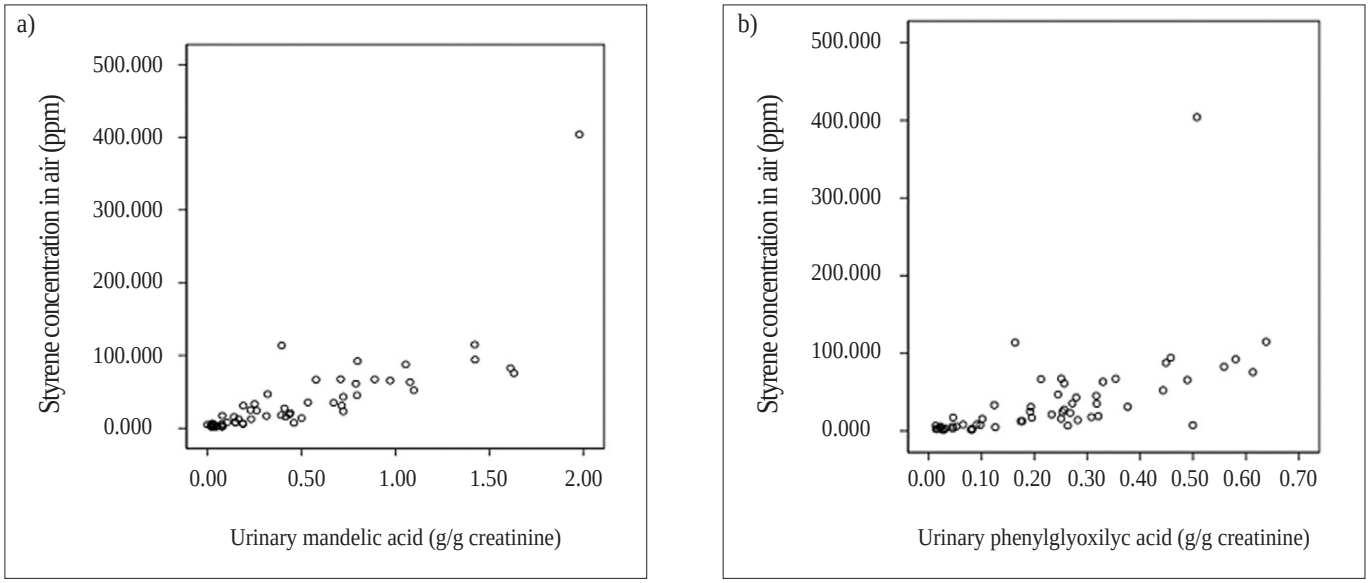

Fig. 1. Correlation between airborne styrene and metabolites concentration.
a) r=0.784 (p=0.000) and b) r=0.626 (p=0.001)

Table 1. Concentration of styrene in airborne and its urinary metabolites insubjects.

		Metabolites (g/g creatinine)	
	Styrene in air (ppm)	MA	PGA
Control (n=6)	No exposure	0.0	0.0
G Ⅰ (n=6)	10.97±11.33	0.17±0.21	0.13±0.11
G Ⅱ (n=6)	47.54±22.43	0.65±0.28	0.29±0.10
G Ⅲ(n=6)	65.33±33.47	0.79±0.52	0.34±0.19

MA, mandelic acid; PGA, phenylglyoxylic acid

Table 2. Quantity of serum protein in subjects **Unit: intensity**

Groups	2D gel spot(Norm Quant.)				
	CC3P	AAT	DBP	A1BG	ITI-P
Control(n=6)	1292±501	78±56	4131±968	1517±123	426±457
G I(n=6)	2970±1402	89±88	1236±1888	1269±336	36±85
G3(n=6)	1844±1240	91±98	1318±1401	1030±346	138±201
G3(n=6)	3159±880	256±1191	1806±1642	1043±352	389±270
p-value	0.041	0.013	0.037	0.088	0.042

1-antitrypsin(AAT)의 발현은 노출군에서 높았으며 vitamin D binding protein precursor(DBP), alpha-1-B- glycoprotein(A1BG) 및 inter alpha trypsin inhibitor(ITI) heavy chain-related protein(ITI-P)의 발현은 대조군에서 높은 것으로 나타났으나, AAT의 경우에 스티렌의 고농도 노출군(실험군 III)에서 대조군 보다 발현의 강도가 현저하게 높았다. 따라서 스티렌의 노출과 관련이 있는 이들 5개의 단백질이 Fig. 2에서 제시한 단백질과 동일한지를 확인하기 위하여 ESI-MS/MS를 사용하여 단백질 서열을 분석한 다음, MASCOT 프로그램(www.matrixscience.com)을 이용하여 NCBI database에 저장된 단백질 염기서열과 비교하여 동일한 단백질임을 확인하였다(Table 3).

Ⅳ. 고 찰

이번 연구에서 우리는 스티렌의 노출로 인하여 발현되는 특이 단백질은 확인하지 못하였으나 양적으로 유의한 변화를 보이는 몇 종의 단백질은 관찰하였다. 그러한 단백질 중에 스티렌의 노출로 인하여 증가된 단백질은 보체전구체(complement C3 precursor)와 AAT였으며, 감소된 단백질은 DBP, A1BG 및 ITI heavy chain-related protein이었다. 이들은 주로 혈청 단백질의 분해, 면역 및 근육과 관련된 물질에 대한 항상성(homeostasis) 유지와 내인성 물질의 운반체로서 역할을 수행하는 단백질들이다.

체내 흡수된 스티렌은 주로 간장에서 이물질(xenobiotic) 대사효소인 CYP에 의하여 대사되며, 체내 독성은 스티렌보다 활성과 반응성이 큰 7,8-SO와 같은 대사중간체에 의하여 발생된다. 이들 대사중간체에 의한 독성의 주 표적기관은 중추신경계로 알려져 있으나, 조혈 및 면역계, 신장, 뇌심혈관계, 호흡기계 및 생식계 등 인체 전번에 걸쳐서 독성을 유발시킨다고 보고되었다(IPCS, 1983). 이번의 단백질체학 연구결과에서 양적인 변화를 보인 몇 종의 단백질들은 위에서 언급한 바와 같이 스티렌의 대사가 이루어지는 간장에서 합성되어 혈장으로 이동한 다음, 스티렌의 표적기관에서 항상성유지 기능을 수행하는 단백질들로서 스티렌의 노출에 영향을 받아 양적인 변화를 보인 것이라 생각된다.

스티렌의 노출로 증가된 보체전구체는 면역과 밀접한 관련이 있다(DiScipio, 1982). 보체는 생물학적 인자(바이러스, 세균 등)를 포함하여 이물질에 대하여 반응하는 효소계의 구성 단백질이라 볼 수 있으며, 이들은 항원-항체결합과 체내 흡수된 이물질에 직접 작용하여 면역응답하는 체액성(humoral immune system)과 세포성 면역(cellular immune system) 반응에 보조적인 역할을 한다. 김기웅 등의 연구

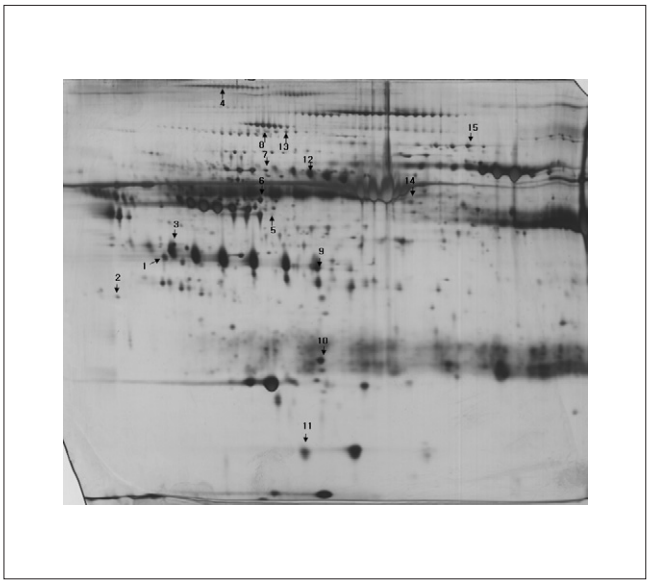

Fig. 2. 2D map of proteins expression pattern in serum of subjects. PI, 4.0-7.0 and molecular weight, 10-200 kDa. 1, Complement C3 precursor; 2, alpha-1-antitrypsin; 3, serum paraxonase; 4, inter-alpha-trypsin inhibitor C terminal; 5, vitamin D binding protein precursor; 6, chain A antithrombin Iii; 7, alpha-1-B-glycoprotein; 8, ITI heavy chain-related protein; 9, heptoglobin alpha 1 chain; 10, pre-serum amyloid P component; 11, heptoglobin alpha 1 chain; 12, hypothetical protein isoform 3; 13, ITI heavy chain-related protein; 14, cytochrome b and 15, complement factor B isoform 3.

(2005)에서 신경독성을 유발하는 n-hexane에 노출되는 사람의 혈청에서 보체전구체의 발현이 증가되었으며, 이는 n-hexane의 노출이 보체전구체의 면역응답에 영향을 준 결과라 하였다. 이번 연구에서도 스티렌 노출 근로자의 혈청에서 보체전구체가 증가된 것은 스티렌을 이물질로 하여 면역응답 반응을 보인 결과라 생각된다. AAT도 스티렌의 노출에 의하여 발현이 증가되었는데, AAT는 chromosome 14에 encode되고 아미노산 394개(MW 52,000)로 구성되어 있는 serine proteinase inhibitor(SERPIN) 중의 하나이다(Travis 등, 1988). AAT는 proteolytic 효소의 활성 조절(Janciauskiene 등, 1999), 조직의 손상 및 항염증작용에 관여하며(Ikari 등, 2001), plasma에 있어서 AAT 농도는 연령 및 성별(Ritchie 등, 2000), 활성산소종(Ueda 등, 2002)과 독성물질(Ucar 등, 2005)의 노출로 인하여 양적인 변화를 보이며 유전적인 영향과 밀접한 관련이 있다(Stoller와 Aboussouan, 2005). Plasma에서 AAT의 농도변화는 폐장, 간장, 신장, 심혈관계 및 당뇨병 등의 발병에 영향을 미치며(Lisowska-Myjak, 2005), 특히 염증반응과 혈압에 많은 영향을 초래한다(Engstrom 등, 2002[b]). 조직의 손상과 염증은 proteinase(elastase 등)와 AAT와 같은 antiproteinase (antielastase)의 불균형에 의해서 일어나며, 이러한 불균형은 흡연, 활성

Table 3. Identification of CC3P, AAT, DBP, A1BG and ITI-P proteins by Q-TOP-MS/MS. Sequence of human proteins (by MASCOT program, www.matrixscience.com) matched peptide sequences are bold letters.

CC3P

1551 KVQLSNDFDE YIMAIEQTIK SGSDEVQVGQ QRTFISPIKC REALKLEEKK
1601 HYLMWGLSSD FWGEKPNLSY IIGKDTWVEH WPEEDECQDE ENQKQCQDLG
1651 AFTESMVVFG CPN

AAT

101 EGLNFNLTEI PEAQIHEGFQ ELLRTLNQPD SQLQLTTGNG LFLSEGLKLV
151 DKFLEDVKKL YHSEAFTVNF GDHEEAKKQI NDYVEKGTQG KIVDLVKELD

DBP

101 PFPVHPGTAE CCTKEGLERK LCMAALKHQP QEFPTYVEPT NDEICEAFRK
151 DPKEYANQFM WEYSTNYGQA PLSLLVSYTK SYLSMVGSCC TSASPTVCFL
201 KERLQLKHLS LLTTLSNRVC SQYAAYGEKK SRLSNLIKLA QKVPTADLED
251 VLPLAEDITN ILSKCCESAS EDCMAKELPE HTVKLCDNLS TKNSKFEDCC
301 QEKTAMDVFV CTYFMPAAQL PELPDVELPT NKDVCDPGNT KVMDKYTFEL

A1BG

1 AIFYETQPSL WAESESLLKP LANVTLTCQA RLETPDFQLF KNGVAQEPVH
51 LDSPAIKHQF LLTGDTQGRY RCRSGLSTGW TQLSKLLELT GPKSLPAPWL
101 SMAPVSWITP GLKTTAVCRG VLRGVTFLLR REGDHEFLEV PEAQEDVEAT
151 FPVHQPGNYS CSYRTDGEGA LSEPSATVTI EELAAPPPPV LMHHGESSQV
201 LHPGNKVTLT CVAPLSGVDF QLRRGEKELL VPRSSTSPDR IFFHLNAVAL
251 GDGGHYTCRY RLHDNQNGWS GDSAPVELIL SDETLPAPEF SPEPESGRAL
301 RLRCLAPLEG ARFALVREDR GGRRVHRFQS PAGTEALFEL HNISVADSAN
351 YSCVYVDLKP PFGGSAPSER LELHVDGPPP RPQLRATWSG AVLAGRDAVL
401 RCEGPIPDVT FELLREGETK AVKTVRTPGA AANLELIFVG PQHAGNYRCR
451 YRSWVPHTFE SELSDPVELL VAES

ITI-P

1 SPEQQETVLD GNLIIRYDV

산소종 및 환경독성물질의 노출에 의하여 유발되는 것으로 알려졌다(Ueda 등, 2002).

이번 연구에서 노출군 대상자를 스티렌 노출수준별로 (Table 2)와 같이 구분하여 AAT의 농도를 비교한 결과, 스티렌의 노출농도가 증가함에 따라 AAT의 농도도 증가되었다 (Table 2). 노출군 대상자의 AAT 농도에 영향을 줄 수 있는 인자는 연령 및 성별, 흡연, 습관성 약물복용 및 노출물질을 들 수 있다. 이번 연구에서는 스티렌의 노출을 제외하고는 위에서 언급한 인자들에 의한 AAT의 농도변화를 배제시키기 위하여 동일한 조건의 대상자를 선정하여 연구를 진행하였기 때문에 AAT의 증가는 스티렌의 노출에 의한 것으로 생각되며, 이러한 결과는 스티렌의 대사과정(Sumner와 Fennell, 1994)에서 생성되는 반응성과 활성이 큰 7,8-SO가 활성산소종처럼 작용하여 나타난 결과라 판단된다. 반면 DBP, A1BG 및 ITI-P의 농도는 스티렌의 노출로 인하여 감소되었다(Table 2). DBP의 주요한 역할은 vitamin D와 그것의 대사산물을 운반하는 것이지만 이 외에도 중요한 생물학적 기능은 근육단백질인 actin의 분해, macrophage의 활성화 및 지방산의 운반 등이다(Speeckaert 등, 2006). Vitamin D는 T-cell의 분열과 분화를 조절하는 역할(Mahon 등, 2003)을 수행하는 환경 vitamin으로서 생체의 자기면역체계에 매우 중요한 물질이다. 이번 연구에서 vitamin D 운반체 역할을 하는 DBP가 스티렌의 노출에 의하여 감소되었다는 것은 스티렌이 면역계에 영향을 미치고 있음을 단적으로 보여준 결과라 생각된다.

이번 연구에서 면역에 대한 연구를 직접적으로 진행하지 않았기 때문에 단언할 수는 없으나 일부 연구자들에 의하여 제시된 연구결과를 토대로 판단해보면, DBP의 감소는 vitamin D의 운반을 저하시켜 macrophage의 활성 감소, Th1/Th2 cytokine의 불균형과 IgE의 생성증가(Matheu 등, 2003)의 원인으로 작용하여 면역계에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 생물학적 기능이 정확히 규명되어 있지는 않지만 당단백질의 일종으로 알려져 있는 A1BG가 스티렌의 노출로 인하여 감소된 것도 면역계와 신호전달체계에 영향이 있음을 암시한 결과라 생각된다.

간장에서 생성되어 세포의 간질(extracellular matrix)을 안정화시키는데 관여하는 plasma proteinase 중의 하나인 ITI-P(Diarra-Mehrpoue 등, 1989)도 스티렌의 노출로 인하여 감소되었다. 이러한 결과는 proteinase와 antiproteinase의 불균형을 초래하는 원인으로 작용하여 조직의 손상과 염증반응을 유발하는데 관여할 것으로 생각된다.

따라서 이상의 결과를 종합해 보면, 스티렌은 혈청에 존재하는 proteinase (SERPIN)의 농도를 변화시킴으로 proteinase와 antiproteinase의 불균형을 초래하여 조직의 손상과 결합조직의 염증을 유발하는 것으로 생각된다. 또한 DBP, A1BG 및 ITI-P의 발현을 감소시켜 면역계와 내인성 물질 운반체의 기능저하 및 신호전달(signal transduction)에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

Ⅳ. 결 론

이번 연구는 합성수지선박제조업(FRP 조선소) 10개 사업장의 적층 작업공정에서 스티렌 단일물질에 노출되는 근로자 52명을 노출군으로, 스티렌뿐만 아니라 기타의 유해화학물질에 노출된 적이 없는 사무직 근로자 82명을 대조군 대상자로 하였다. 이들 대상자중 노출군은 스티렌 노출수준별로 실험군 I(TLV 1/2 이하), 실험군 II(TLV 1/2 - TLV), 실험군 III(TLV 이상)로 구분하여 연령, 성별, 생활습관 및 질병상태 등을 고려하여 조건이 동일한 대상자를 실험군당 6명씩 선정하여(대조군 포함) 총 24명에 대하여 스티렌의 노출로 발현되거나 양적인 변화를 보이는 특이 단백질을 파악하여 다음의 결론을 얻었다.

1. 노출군 대상자들의 실험군별 스티렌의 평균 노출농도와 대사산물인 MA와 PGA 농도를 비교한 결과, 실험군 I의 노출농도는 10.93±11.33 ppm, MA와 PGA는 0.17±0.21과 0.13±0.11 g/g creatinine이었고 실험군 II와 III의 스티렌 평균 노출농도는 47.54±22.43(MA, 0.65±0.28; PGA, 0.29±0.10)와 65.33±33.47 ppm(MA, 0.79±0.52; PGA, 0.34±0.19)이었다.

2. 대상자 24명의 혈청을 이용하여 2차 전기영동을 실시한 결과, 15개의 단백질을 동정하였다. 15개의 단백질 중 스티렌의 노출에 의하여 농도변화를 보인 단백질은 5개였으며, 이들 단백질 중 CC3P와 AAT는 스티렌의 노출에 의하여 증가된 반면, DBP, A1BG 및 ITI-P는 감소되었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 스티렌의 노출은 혈청에 존재하는 AAT와 같은 proteinase(SERPIN)의 농도를 변화시켜 proteinase와 antiproteinase의 불균형을 초래하여 조직의 손상과 염증을 유발시키며, DBP, A1BG 및 ITI-P의 발현 감소는 면역계와 내인성 물질 운반체의 기능저하 및 신호전달(signal transduction)에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

따라서 이번의 단댁질체학 연구는 유해화학물질 노출 근로자에 대한 독성기전을 규명하고 노출에 대한 생물학적 지표물질 개발 가능성을 보임에 따라 향후 이러한 분야의 연구가 필요할 것으로 판단된다.

REFERENCES

김기웅, 장성근, 정효석, 이준연, 문영한, 박상신. 흰쥐에 있어서 styrene에 의한 간장의 microsomal cytochrome P450의 유도. 대한산업의학회지 1997;9: 604- 613

김기웅, 최병순, 이미영, 원용림. 유기용제 만성 노출에 의한 건강장해 평가지표 개발에 관한 연구. 한국산업안전공단 산업안전보건연구원 2005.

ACGIH. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio, ACGIH, 2002

Andeson NL, and Anderson NG. Proteom and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 1998;19:1853-1861

Boyd-Kimball D, Poon HF, Lynn BC, Cai J, Pierce Jr WM, Klein JB, Ferguson J, Link CD, Butterfield DA. Proteomics identification of proteins specifically oxidized in Caenorhabditis elegans expressing human Aβ (1-42): Implications for Alzheimer's disease. Neurobiol aging 2006;27: 1239-1249

Carlson GP, Turner M, Mantick NA. Effects of styrene and styrene oxide on glutathione-related antioxidant enzymes. Toxicol 2006;227:217-226

DeCaprio AP, Olajos EJ and Weber P. Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: Conversion of primary amines to substituted pyrrole derivatives by 2,5-hexanedione. Toxicol Appl Pharmacol 1982;65: 440-450

DeCaprio AP,Kinney EA, and Fowke JH. Regioselective binding of 2,5-hexanedione to high-molecular-weight rat neurofilament proteins in vitro. Toxicol Appl Pharmacol 1997;145:211-217

Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sesboue R, Mattei MG, Passage E, Salier JP, Martin JP. Human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. Eur J Biochem 1989;179: 147-154

DiScipio RG. The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. Immunology. 1982;45:587-595

Engstrom G, Lind P, Hedblad B, Stavenow L, Janzon L, Lindgarde F. Long-term effects of inflammation-sensitive plasma proteins and systolic blood pressure on incidence of stroke. Strok 2002;33:2744-2749

Guengerich FP, Kim DH and Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. Chem Res Toxicol 1991;4:168-179

Haufroid V, Jakubowski M, Janasik B, Ligocka D, Buchet JP, Bergamashi E, Manini P, Mutti A, Ghittori S, Arand M, Hangen N, Oesch F, Hirvonen A, Lison D. Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. Pharmacogenetics 2002;12:691-702

Ikari Y, Mulvihill E, and Schwartz SM. Slpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and alpha 2-marcroglobulin are the antiapoptotic factors of vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2001;276:11798- 11803

IPCS. Environmental Health Criteria 26, Styrene. World Health Organization: Geneva, 1983

Janciauskiene S, Wright HT, Lindgren S. Atherogenic properties of human monocytes induced by the carboxyl terminal proteolytic fragment of alpha-1-antitrypsin. Atherosclerosis 1999;147:263-275

Laffon B, Pasaro E, Mendez J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the comet assay. Toxicol Lett 2002;126:61-68

Lisowska-Myjak B. AAT as a diagnostic tool. Clinica Chimica Acta 2005; 352:1-13

LoPachin RM, Jones RC, Patterson TA, Slikker WJr, Barber DS. Application of proteomics to the study of molecular mechanisms in neurotoxicology. Neurotoxicology 2003;24(6):761-775

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RT. Protein measurement with the folin phrnol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-275

Ma M, Umemura T, Mori Y, Gong Y, Saijo Y, Sata F, Kawai T, Kishi R. Influence of genetic polymorphisms of styrene-metabolizing enzymes and smoking habits on levels of urinary metabolites after occupational exposure to styrene. Toxicol Lett 2005;160:84-91

Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D dependant on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. J Cell Biochem 2003;89:922-932

Manini P, Andreoli R, Nissen WMA. Liquid chromatography-mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. J Chromatogr A 2004;1058: 21-37

Manini P, Buzio L, Andreoli R, Goldoni M, Bergamaschi E, Jakubowski M, Vodicha P, Hirvonen A, and Mutti A. Assessment of biotransformation of the arene moiety of styrene in volunteers and occupationally exposed workers. Toxicol Appl Pharmcol 2003;189:160-169

Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of

vitamin D-induced alteration of Th1/Th2 cytokine expression: Enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. J Allergy Clin Immunol 2003;112:585-592

Miller RR, Newhook R, Poole A. Styrene production, use, and human exposure. Crit Rev Toxicol 1994;24(S1):S1-S10

Nakajima T, Elovaara E, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Vainio H, Aoyama T. Characterization of the human cytochrome P450 isozyme responsible for styrene metabolism. IARC Sci Publ 1993;127:101-108

NIOSH. NIOSH manual of analytical methods, 4th ed., Method 1051, U.S. Department of Health and Human Services, Cincinnati, 1996

Ogata M, Taguchi T. Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolite of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated hight performace liquid chromatography. Int Arch Occup Environ Health 1998; 61:131-140

Ohtsuji H, Ikeda M. The metabolism of styrene in rat and the stimulatory effect of phenobarbital. Toxicol Appl Pharmacol 1971;18:321-328.

Pantarotto C, Fanelli R, Bidoli F, Morazzoni P, Salmona M, Szezawinski K. Arene oxides in styrene metabolism, a new perspective in styrene toxicity? Scand J Work Environ Health 1978;4(Suppl 2):67-77

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, α 1-acid glycoprotein(orosomucoid), α1-antitrypsin, and heptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal 2000;14:284-292

Speeckaert M, Huang G, Delanghe JR, Taes YEC. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein(Gc-globulin) and its polymorphism. Clinica Chimica Acta 2006;372:33-42

Stierum R, Heijne W, Kienhuis A, Ommen BV, Groten J. Toxicogenomics concepts and applications to study hepatic effects of food additives and chemicals. Toxicol Appl Pharmacol 2005;207:S179-S188

Stoller JK, Aboussouan LS. α1-antitrypsin deficiency. Lancet 2005;365: 2225-2236

Sumner SJ, Fennell RT. Review of the metabolic fate of styrene. Crit Rev Toxicol 1994;24(S1):S11-S33

Travis J, Shieh BH, and Potempa J. The functional role of acute phase plasma proteinase inhibitors. Tokai J Exp Clin Med 1988;13:313-320

Ucar G, Tas C, Tumer A. Monoamine oxidase inhibitory activities of the scorpion Mesobuthus gibbosus (Buthidae) venom peptides. Txico 2005; 45:43-52

Ueda M, Mashiba S, Uchida K. Evaluation of oxidized alpha-1-antitrypsin in blood as an oxidative stress marker using anti-oxidative α1-AT monoclonal antibody. Clinica Chimica Acta 2002;317:125-131

Wigaeus E, Lof A, Nordqvist MB. Uptake, distribution, metabolism, and elimination of styrene in man. A comparison between single exposure and co-exposure acetone. Br J Ind Med 1984;41(4):539-546