

일부 한국 성인 남성 흡연자들의 림프구 DNA 손상의 증가

이주현^{1,2)}, 이은일^{1,2)}, 오은하^{2,3)}, 이준영^{1,4)}, 설동근^{2,5)}, 김주자⁶⁾

고려대학교 의과대학 예방의학교실 및 대학원 보건학과¹⁾, 고려대학교 의과대학 유전체 및 단백질 환경독성의과학센터²⁾, 고려대학교 의과대학 BK21 의과학사업단³⁾, 고려대학교 의과대학 의학통계학교실⁴⁾, 고려대학교 의과대학 대학원⁵⁾, 순천향대학교 의과대학 산업의학과⁶⁾

Increased DNA Damage of Lymphocytes in Korean Male Smokers

Joohyun Lee^{1,2)}, Eunil Lee^{1,2)}, Eunha Oh^{2,3)}, Juneyoung Lee^{1,4)}, Donggeun Sul^{2,5)}, Jooja Kim⁶⁾

Department of Preventive Medicine, College of Medicine and Postgraduate Studies of Public Health, Graduate School, Korea University¹⁾; Medical Research Center for Environmental Toxico-Genomics and Proteomics, College of Medicine, Korea University²⁾; Brain Korea21 Program for Biomedical Science, College of Medicine, Korea University³⁾; Department of Biostatistics, College of Medicine, Korea University⁴⁾; Graduate School, College of Medicine, Korea University⁵⁾; Department of Occupational Medicine, Soonchunhyang University Hospital⁶⁾

Objective : The purpose of this study was to evaluate the levels of DNA damage in human lymphocytes caused by smoking and other lifestyle factors.

Methods : The study population consisted of 173 normal healthy male adults from 21 to 59 years old. The demographic and lifestyle variables were obtained from administered questionnaires. The level of lymphocytic DNA damage in the peripheral blood was evaluated by the Comet assay. Statistical analyses were done by general linear model analysis and Dunnett's multiple comparison.

Results : The difference in DNA damage between smokers and non-smokers was statistically significant. The means for the Tail%DNA were found to be 10.48 in the current smokers and 9.60 in the non-smokers ($p < 0.05$). The tail moment means were 1.58 and 1.45 ($p < 0.05$) for the current smokers and non-smokers, respectively. The number of cigarettes smoked per day did not result in a

significant difference in the level of DNA damage among the smokers. Other lifestyle factors such as age, and drinking and exercise habits were not related to DNA damage.

Conclusions : The DNA damage in the lymphocytes of smokers was found to be significantly higher than that for non-smokers. However, the number of cigarettes smoked per day was not related to DNA damage. Further study is needed to evaluate the relationship between the amount of smoking and level of damage to DNA. In addition, the status of DNA repair activities should be assessed.

J Prev Med Public Health 2007;40(1):16-22

Key words : Comet assay, DNA damage, Lymphocytes, Life style, Smoking

서론

인체에 유해한 독성물질에 대한 세포의 DNA손상을 감지하는 기술 중에 하나인 Comet 분석법은 직업적으로 유전독성 물질에 노출되는 근로자들의 생물학적 모니터링을 위해 광범위하게 사용되고 있다 [1]. 이 방법은 1984년에 Ostling과 Johanson에 의해 처음으로 도입되었고, 1988년에는 보다 민감하고 신속하게 DNA손상을 감지할 수 있는 알카리 방법으로 발전되었다

[2]. Comet 분석법은 어떠한 세포에서도 유전독성을 평가할 수 있는 매우 민감한 방법으로 생물학적 모니터링 뿐 아니라 다양한 실험에서 사용되었으며, OECD 지침으로 채택되기 위하여 Comet 분석법의 표준화에 대한 권고안이 나오게 되었다 [3]. 이후 Comet 분석법을 법적인 관리방법으로 사용하기 위해 더 자세한 권고안이 필요하여 Hartmann 등 [4]이 새로운 권고안을 제시하였다.

Comet 분석법은 DNA손상을 증가시키는 생활요인, 즉 연령, 흡연 습관 [1,5],식이습

관, 운동 습관 등의 영향을 받는 것으로 보고되었다. 운동의 경우에는 격렬한 운동을 실시한 직후 DNA손상이 증가하고 [6,7],식이습관에 의한 것은 주로 비타민C 등의 항산화제 복용과 관련된 연구이거나 [1], 채식주의자와 같은 특이한 식습관의 영향을 보고한 것 [8]으로 통상적인 생활 습관 중에서는 흡연이 DNA손상에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 알려져 있다.

많은 *in vitro* 실험에서 흡연이 DNA손상을 증가시키는 것은 확인되었으며 [9,10], 흡연에 의한 DNA손상에 대한 기전도 보고되었다 [11,12]. 또한 사람들을 대상으로 한 연구에서도 흡연자가 비흡연자보다

DNA손상이 증가되었다고 보고하였다 [8,13-15]. 그러나 Møller 등 [1]이 흡연의 영향에 관련된 연구들을 고찰한 결과 매우 많은 연구들에서 흡연에 의한 DNA손상 증가를 찾을 수 없으며, 심지어 흡연자의 DNA손상이 더 낮다는 연구도 있음을 보고하였다. 흡연에 의한 DNA손상이 잘 나타나지 않는 이유는 대상수가 적어 통계적 유의성을 나타내지 못한 경우도 있지만 흡연과 DNA손상이 유의하게 나타난 연구들이 대부분 유럽의 남쪽, 즉 이태리, 프랑스, 그리스, 터키 등에 국한되어 있어 국가 및 지역에 따른 흡연 습관의 차이 등에 의해 기인한 것으로 추정하였다. 또한 DNA손상 정도는 하루에 피우는 담배 양 및 함유된 타르 양과는 상관성이 없다고 하였으며 [14], Wojewodzka 등 [16]은 습관적 흡연이 DNA손상을 일으키지는 않는다고 하였다. 이와 같이 흡연에 따른 DNA손상에 대한 연구결과들이 일치된 결과를 보이지 않고 있으며, 흡연에 의한 DNA손상을 나타내는 연구들은 연구대상자들이 남유럽 지역에 국한되고 있다. 한편 Comet 분석법으로 사람의 림프구에서 흡연의 영향을 연구한 국내의 연구로는 Park과 Kang의 연구가 흡연습관과 DNA손상이 양의 상관성이 있었음을 보고하였다 [17]. 그러나 이 연구는 채취한 림프구에 H₂O₂를 가해서 DNA손상을 일으킨 후에 비교한 것으로 흡연자와 비흡연자의 림프구 DNA손상을 직접 비교한 것이 아니어서 외국의 연구결과와는 비교할 수 없다. 그러므로 우리나라 사람들을 대상으로 흡연에 의한 DNA손상이 일어나는지 연구할 필요성이 있다.

이와 같이 Comet 분석법을 이용한 흡연 습관에 따른 림프구의 DNA손상 평가에서 결과가 상이하게 나타나는 것은 국가마다 흡연 습관의 양상에 차이가 있고, 아직까지는 Comet 분석법을 통한 연구가 불충분한 실정이며 실험방법에서도 차이를 보이기 때문이다. 더욱이 HPRT유전자의 돌연변이 빈도와 같이 흡연 영향으로 인한 유전독성의 증거로서 확실한 지표가 되는 것이 있는 반면에 Comet 분석법으로 평가한 흡연에 의한 DNA손상 정도의 결과를

유전독성의 증거로 삼기에는 불충분하며, 현재로서는 명확한 결론이 내려지지 않은 상황이다. 따라서 본 연구는 우리나라에서 외국 연구결과와 비교할 수 있는 표준화된 Comet 실험방법을 적용하여, 직업적 노출이 없는 비교적 많은 수의 일반 성인 집단을 대상으로 흡연을 중심으로 다른 생활 요인의 영향까지 고려한 DNA손상 평가가 필요하다고 생각한다.

본 연구에서는 이러한 필요성들을 근거로 건강한 성인 남성들을 대상으로 한 흡연 양상에 따른 DNA손상을 Comet 분석법을 통해 평가함으로써 세포 유전적 측면에서의 흡연의 영향을 알아보고, 음주량과 운동 빈도와 같은 다른 생활습관이 어느 정도 관련성이 있는지를 함께 평가하여 흡연 및 흡연량에 따른 DNA손상 상관성에 대한 서로 다른 연구결과들과 비교 평가할 수 있을 것으로 기대하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

연구대상은 서울지역 모병원의 건강진단대상자 중에서 직업적으로 환경독성물질에 노출되지 않고, 건강진단에서 이상 소견이 발견되지 않은 126명과 건강한 20대 학생 48명을 대상으로 하였다. 이들 20-60대의 성인 남성 174명을 대상으로 2002년 7월부터 10월까지 생활 요인 조사 및 Comet 분석법을 실시하였다. 이중 60대가 1명뿐이어서 분석에서는 제외하였다. 대상자는 자기기입식 설문 조사를 통하여 개

Table 1. Characteristics of the study subjects

Age (years)	Smoking status	Study subjects (N=173)	
		Between groups	Total
20 ~ 29	Non-smoker	31 (35%)	88 (51%)
	Ex-smoker	16 (18%)	
	Smoker	41 (47%)	
30 ~ 39	Non-smoker	9 (20%)	44 (25%)
	Ex-smoker	4 (9%)	
	Smoker	31 (70%)	
40 ~ 49	Non-smoker	7 (23%)	30 (17%)
	Ex-smoker	6 (20%)	
	Smoker	17 (57%)	
50 ~ 59	Non-smoker	4 (36%)	11 (6%)
	Ex-smoker	2 (18%)	
	Smoker	5 (45%)	

인의 일반적인 특성과 음주량, 운동 빈도를 조사하였고, 흡연자의 경우 흡연기간(년)과 하루 평균 흡연량(개피)등의 흡연력을 조사하였으며, 비흡연자에게는 과거흡연여부와 금연 년 수를 기입하게 하였다. 또한 항산화제 섭취 여부와 질병 유무에 따른 내복약 조사를 함께 실시하였다.

조사 대상자 중 20~29세가 88명, 30~39세가 44명, 40~49세가 30명, 50~59세가 11명이었다. 또한 흡연자가 94명, 비흡연자가 79명으로 이 중 금연자가 28명이었고, 연령대별 흡연자 비율은 20대 47%, 30대 70%, 40대 57% 그리고 50대에서 45%로 조사되었다 (Table 1,3).

2. 연구방법

1) Comet 분석법을 이용한 림프구 DNA 손상 측정

혈액 림프구의 DNA에서 single stranded break 손상을 측정하기 위해 Singh 등 [2]의 방법을 일부 수정하여 Comet 분석법을 실

Table 2. DNA damage of lymphocytes in human male adults according to age

Age (years)	Smoking status	Tail % DNA		Tail moment		No (%)
		Group	Total	Group	Total	
		(mean ± SD)				
20 ~ 29	Non-smoker	9.69 ± 2.19	9.80 ± 1.90	1.48 ± 0.33	1.46 ± 0.26	31 (35%)
	Ex-smoker	9.06 ± 1.86		1.44 ± 0.21		16 (18%)
	Smoker	10.17 ± 1.62*		1.47 ± 0.24		41 (47%)
30 ~ 39	Non-smoker	9.65 ± 2.08	10.30 ± 1.88	1.49 ± 0.30	1.61 ± 0.44	9 (20%)
	Ex-smoker	10.95 ± 0.41		1.54 ± 0.23		4 (9%)
	Smoker	10.42 ± 1.93		1.66 ± 0.49		31 (70%)
40 ~ 49	Non-smoker	9.38 ± 0.91	10.88 ± 2.21	1.37 ± 0.12	1.68 ± 0.60	7 (23%)
	Ex-smoker	11.66 ± 3.10		1.91 ± 0.99		6 (20%)
	Smoker	11.23 ± 2.07		1.73 ± 0.53		17 (57%)
50 ~ 59	Non-smoker	9.19 ± 0.87	9.99 ± 1.59	1.33 ± 0.15†	31.42 ± 0.18	4 (36%)
	Ex-smoker	9.22 ± 0.54		1.26 ± 0.06†		2 (18%)
	Smoker	10.96 ± 1.90		1.57 ± 0.10		5 (45%)
Mean age				32.57		

* p<0.05 with Dunnett multiple comparison as compared to the ex-smoker group
 † p<0.05 with Dunnett multiple comparison as compared to the smoker group

시하였으며, 자세한 실험방법은 Ji 등 [18]의 논문에 기술되어 있으며 간략한 실험방법은 다음과 같다. 혈액은 상완 정맥에서 2 ml를 채취하여, 냉장 보관하면서 즉시 실험실로 운반하였다. 림프구 분리는 Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia, Sweden)를 이용하였고, 모든 실험은 전기영동 전까지 채혈 당일 날에 이루어졌다. 분리된 림프구는 1% low melting point 아가로오스에 섞어 이미 1% normal melting point(LMP) 아가로오스가 도포된 슬라이드(fully frosted slide, Fisher Scientific)에 도포하여 cover glass를 씌워 약 10분간 건조하였다. cover glass를 제거하고 pH 10인 lysis buffer [2.5 M NaCl(Shinyo, Japan), 100 mM EDTA (Amresco, USA), 10 mM Tris(Gibco BRL, USA, pH 10.0), 1% Triton X-100 (Amresco, USA)]에 넣어 4 °C에 1시간 30분 동안 담갔다 꺼내서 pH 13의 unwinding buffer [1 mM EDTA(Amresco, USA), 300 mM NaOH(Sigma, USA)]에 20분간 담갔다. Lysis와 unwinding 시에는 슬라이드를 넣은 coplan jar를 알루미늄호일로 감싸 빛에 노출되지 않도록 하였다.

슬라이드를 전기영동장치(Sub Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems, BioRad)에 틸이 생기지 않도록 배열하고 25 V, 300 mA로 고정하여 unwinding buffer와 같은 buffer를 사용하여 20분간 전기영동을 하였다. 전기영동 후 neutralization buffer [400 mM Tris-HCl (Gibco BRL, USA, pH 7.4)]에 5분씩 세 번 washing하였다. 실험 직후 관찰을 하지 않을 슬라이드는 에탄올(absolute ethanol, Sigma)로 5분간 고정한 후 추후 관찰하였다. 모든 실험은 추가적인 DNA손상을 막기 위하여 황색등 아래서 실시하였다.

슬라이드는 각 조사대상자에 대하여 두 개씩 작성하여, 각각 50개 이상, 총 100개 이상의 세포를 관찰하였다. 슬라이드 관찰직전에 ethidium bromide(10 µg/ml) 50 µl로 형광 염색하여 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm barrier filter를 이용하여 형광 현미경 하에서 판독하였다. 각 세포의 DNA손상 정도는 image analysis software (Komet 4.0, Kinetic Imaging, UK)를 이용하

여 세포 전체 DNA 중 꼬리부분의 DNA 비율을 나타내는 Tail%DNA와 꼬리부분의 중심과 머리 부분의 중심 사이의 길이와 Tail%DNA을 곱한 값의 Tail moment(Olive tail moment)값을 측정하였다.

Comet 분석법은 일반인들을 대상으로 낮은 농도의 환경 유해물질 노출의 영향을 규명하는데 기존의 유전독성 방법들에 비해 더 민감한 방법이며 [19], 이 분석법의 원리는 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례하는 전기영동의 이론을 기초로 하고 있다. 즉, DNA손상을 입은 세포를 lysis 하여 핵만 남긴 후 전기영동을 하게 되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동하게 된다. 이 때 DNA손상을 민감하게 감지하기 위하여 pH 13 이상의 alkali buffer로 DNA를 unwinding 시켜 이중 나선 구조를 풀어 single strand breakage를 정량화 하는 것이다 [20-22].

DNA손상을 정량화할 때 사용되는 방법도 여러 가지가 존재한다. DNA가 풀려서 생긴 꼬리 (tail)부분은 일정 길이 이상 진행되지 않기 때문에 tail에 존재하는 DNA 양 (Tail%DNA)을 측정하는 것이 정확한 방법으로 인정되고 있으며, 또한 Hellman 등 [23]은 Tail moment 값을 DNA손상 정량에 가장 유익한 parameter로 보았다. 이에 가장 좋은 지표로 제시되는 [24] Tail% DNA, Tail moment 두 가지 지표를 모두 사용한 본 연구는 DNA손상에 미치는 흡연의 영향을 입증하는 결과로서 제시하기에 타당하다고 볼 수 있겠다.

2) 자료 처리 방법

연령은 20대, 30대, 40대, 50대로 구분하였으며 생활 요인에 대해서는 현재 흡연자, 금연자, 흡연 경험이 없는 비흡연자 세 그룹으로 나누어 평균과 표준편차를 구하였으며, 각 그룹별 유의성 검증을 위해서 one-way 분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 흡연량은 1일 동안 평균적으로 피우는 개피수로 1-10 개피, 11-20 개피, 21-36 개피군으로 나누어 분석하였으며, 음주정도는 한번에 음주하는 음주량(소주 기준)과 빈도(주중 횟수)를 함께 고려하여 1주에 소주 한병(300 ml) 이상과 이하로 구분하였고, 운동의 경우는 안하는 경우와 주 1-3회, 주

Table 3. DNA damage of lymphocytes in human male adults according to the smoking history (mean±SD)

Smoking history	Number of subjects	Tail % DNA	Tail moment
Non-smoker	51	9.60 ± 1.93	1.45 ± 0.29
Ex-smoker	28	9.89 ± 2.24	1.54 ± 0.51
Current smoker	94	10.48 ± 1.83 [†]	1.58 ± 0.41
Total	173	10.13 ± 1.96 [*]	1.54 ± 0.40

^{*} p<0.05 by General linear model analysis, among the smoking history groups

[†] p<0.05 with Dunnett multiple comparison as compared to the non-smoker group

5회 이상 실시하는 경우로 나누어 General Linear Model 및 Dunnett 방법으로 다중비교를 시행하였다. 흡연을 포함한 연령, 음주, 운동 등의 전체 변수를 General Linear Model을 활용하여 Least Square Mean을 비교한 결과 흡연군에서만 유의한 차이를 보여 각각의 변수에 대한 분석을 통해 DNA손상에 미치는 영향을 알아보았다.

연구결과

1. 연령에 따른 DNA손상 비교

연령에 따른 Tail%DNA 값은 20대에서 9.80, 30대 10.30, 40대 10.88, 50대 9.99로 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 40대까지 증가하는 양상을 보였다 (Table 2). Tail moment 값도 20대에서 1.46, 30대 1.61, 40대 1.68, 50대에서 1.42로 40대까지 증가하는 양상을 보였으며, 40대 군이 통계적으로 유의하게 가장 높았다. 그러나 흡연 여부에 따라 나누어보면 연령이 증가함에 따라 DNA손상 값은 변화되지 않았다.

2. 흡연과 흡연량에 따른 DNA손상 분석

흡연군, 비흡연군, 금연군으로 대상자를 나누어 분석한 결과 Tail%DNA 값은 비흡연군에서 9.60, 금연군 9.89, 흡연군 10.48로, 흡연군에서 가장 유의하게 높은 값을 보였고 (p<0.05), Tail moment 값은 비흡연군 1.45, 금연군 1.54, 흡연군 1.58로 증가하는 양상을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다 (Table 3)(Figure 1). 그러나 금연군을 포함한 흡연 경험이 있는 흡연군과 비흡연군을 비교한 결과 비흡연군 1.45, 흡연군 전체 1.57로 통계적으로 유의한 차이

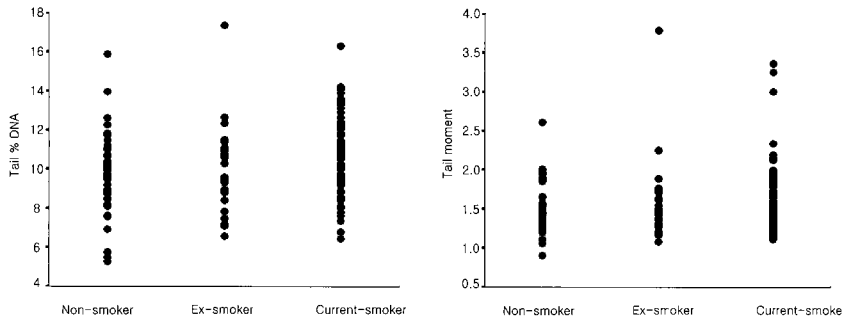


Figure 1. DNA damage of lymphocytes in human male adults according to the smoking history.

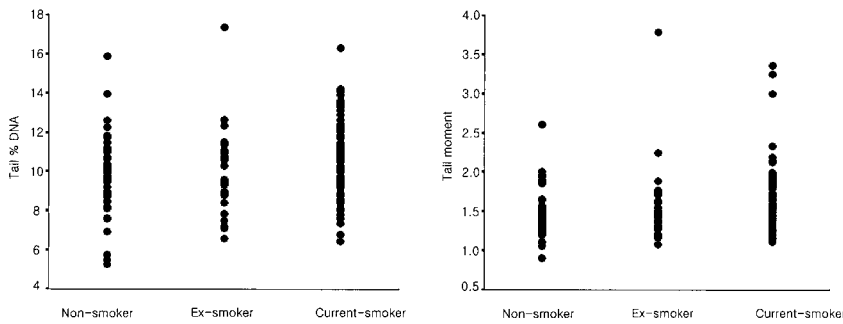


Figure 2. DNA damage of lymphocytes in human male adults according to the smoking habits.

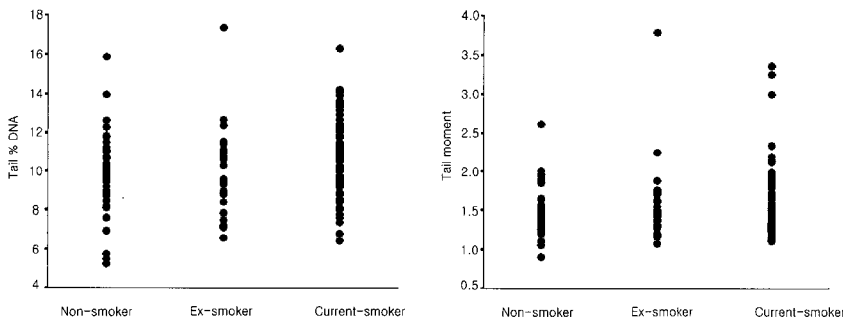


Figure 3. DNA damage of lymphocytes in human male adults of the 20 year old age bracket according to smoking habits.

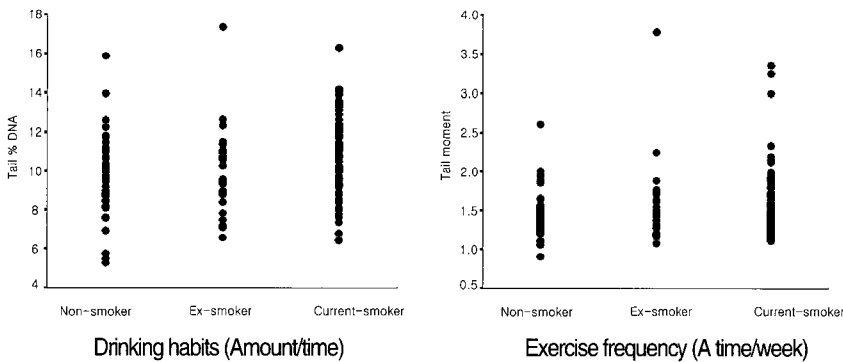


Figure 4. DNA damage of lymphocytes in human male adults according to the drinking habits and the frequency of exercise.

를 보였다 ($p < 0.05$).

흡연자에서 흡연량에 따라 DNA손상 차이를 분석한 결과, Tail%DNA 값은 하루 1-

10 개피를 피우는 군에서 10.49, 하루 흡연량이 11-20 개피인 군 10.05, 21-36 개피인 군 11.26으로 20 개피 이상이 높은 값을 보

였으나 통계적으로 유의하지 않았고, Tail moment 값도 유사하게 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Figure 2).

3. 음주량과 운동 빈도에 따른 DNA 손상 비교

음주량에 따른 Tail%DNA 값은 비음주군 10.50, 음주군은 소주 1병(300 ml) 미만은 9.69, 한병 이상은 10.19로 통계적으로 유의하지는 않았지만 음주군이 도리어 낮은 경향을 보였다 (Figure 4). Tail moment 값도 유사한 양상을 나타내었다. 운동 빈도에 따른 Tail%DNA 값은 운동을 안 하는 군에서 10.19, 주 1-3회 하는 군에서 9.97, 주 5회 이상 주기적으로 운동을 실시하는 군에서 10.19의 값을 나타냈으며 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Figure 4). Tail moment 값도 유사한 양상을 보였다.

고찰

본 연구를 통해 연령, 흡연, 음주, 운동 여부 등에 따른 DNA손상을 일반인 대상으로 표준화 된 Comet 분석법을 통해 평가한 결과 현재 흡연습관 유무의 영향만이 뚜렷하게 DNA손상을 증가시킴을 확인하였으며, 현재 흡연자의 경우의 흡연량에 따른 손상의 차이는 유의하게 나타나지 않는 것으로 관찰되었다.

인체는 DNA복구 기전에 의해 DNA손상이 일정 부분 회복되고, 더욱이 그 회복 능력마저도 개인차가 있기 때문에 DNA복구가 잘 일어나는 사람들에서는 흡연에 의한 DNA손상이 잘 평가되지 않을 수도 있는데, 그럼에도 불구하고 본 연구가 흡연습관이 DNA손상의 증가를 초래한다는 결과를 도출한 것은 그만큼 세포 유전적 측면에서 흡연습관의 영향이 크다는 결론을 입증하는 것이며, 이에 대한 충분한 증거가 Comet 분석법을 통해서 도출되었다는 것에 큰 의의가 있었다.

Comet 분석법을 통해 흡연이 DNA손상에 미치는 영향에 대한 국외의 연구보고들을 살펴보면, 이탈리아인 200명을 대상으로 실시한 연구에서는 흡연자의 DNA이동이 10% 증가하는 것으로 나타났으나,

하루 흡연량과의 상관성은 보이지 않았고 [25], 또한 DNA손상 정도와 하루에 피우는 담배 개수 또는 축적된 타르 양과는 상관 관계가 없는 것으로 보고되었다 [14,26]. 본 연구에서도 흡연자와 비흡연자 사이에 DNA손상은 통계적으로 유의한 차이를 보였으나 (Table 3)(Figure 1), 흡연량에 따른 차이는 없는 것으로 관찰되어 일치된 결과라 볼 수 있겠다 (Figure 2).

이 연구결과는 Møller 등 [1]의 논문에서 제시한 것처럼 남유럽 국가들의 결과와 유사하게 흡연에 따른 DNA손상 차이를 나타낸 연구가 되었으며, 흡연에 따른 DNA손상이 차이를 보이지 않는다는 다른 연구결과 [16,23,27-29]와는 다른 결과를 보였다. Hoffmann 등 [30]의 흡연과 DNA손상을 Comet 분석법으로 평가한 연구들에 대한 메타 분석 결과, 흡연을 유전독성 노출로서 평가하여 연구한 경우는 흡연에 따른 DNA손상이 유의한 차이가 있었고, 직업에 관련된 연구에서 흡연을 혼란변수로서 조사한 경우는 흡연에 따른 DNA손상이 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 임의적인 단위를 사용하여 DNA손상을 평가한 경우는 통계적으로 유의한 차이를 보였지만, Image 프로그램을 사용한 경우는 경향성만을 보였는데, 본 연구결과는 흡연을 유전독성물질로서 조사한 것으로 Hoffmann 등 [30]의 메타 분석결과와 일치된 결과를 보였으며, Image 프로그램을 사용하였음에도 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

이와 같이 국외의 Comet 분석법을 수행한 선행 연구들에서 흡연에 의한 DNA손상의 증가 양상은 연구마다 완벽하게 일치된 결과를 보이고 있지 않으며, 흡연량에 따른 상관성도 뚜렷하지 않은데, 그 이유에 대하여 Wojewodzka 등 [16]은 세 가지로 설명하고 있다. 첫째는 흡연에 의한 영향이 DNA adduct형성이 주된 기전이기 때문에 Comet 분석법으로 평가하는 single strand breakage가 흡연의 영향을 잘 나타내지 못할지도 모른다는 것이다. 둘째는 흡연자들은 이미 유전독성물질인 담배에 노출되고 있어 DNA복구 기전이 활성화되어 있어 DNA손상에 대한 저항이 생길 가능

성 등이 있기 때문이다. 마지막으로 인구 집단에서 흡연의 영향이 일치하지 않는 이유 중의 하나는 흡연 요인만을 정밀하게 정량적으로 조사한 연구가 극히 드물며, 나아가서는 흡연의 정도와 흡연 행태에 따른 비교가 매우 어려웠기 때문으로 보고 있다 [19]. 본 연구 결과에서도 흡연에 따른 DNA손상의 증가는 관찰되었으나 흡연량에 따른 양-반응 관계는 나타나지 않았다. Wojewodzka 등이 제시한 세 가지 가능한 이유 중에서 첫 번째는 DNA손상 증가가 관찰되었기 때문에 해당되지 않는 것으로 보이며, 두 번째 세 번째 이유는 모두 해당될 수 있는 것으로 보인다. Comet 분석법 자체가 DNA손상과 회복을 모두 반영하고 있기 때문에 DNA손상에 대한 저항성이나 취약성에 있어서 개인적 편차가 있을 가능성이 높다. 또한 요 중 코티닌 분석 등 흡연에 대한 정량적 평가를 하지 못하고 단순히 흡연 개피수로 흡연량을 측정하여 정밀한 흡연량 분석에 있어서 제한적이었다.

한편 흡연의 정도에 따른 림프구의 DNA손상이 상관성을 보이지 않는 보고가 주를 이루고 있지만, oxidative stress에 의한 손상을 평가하기 위해 H₂O₂로 림프구에 스트레스를 주고 DNA손상을 관찰한 경우 흡연의 정도와 DNA손상이 상관성을 보인 연구 보고들도 있다 [17,31]. 이것은 흡연 정도에 따른 림프구의 DNA손상이 직접적으로 있지는 않지만, 스트레스를 받을 경우 DNA손상이 더 증가될 수 있음을 보이고 있다. 또한 흡연자들이 비흡연자들에 비해 발암성 물질에 대하여 더 높은 유전독성 반응을 보였다는 보고도 있어 [32], 향후 직접적인 DNA손상과 DNA손상의 취약성 등에 흡연이 어떤 영향을 미치는지 추가적인 연구가 필요하다.

더 나아가 일반 인구집단을 대상으로 생활습관에 따른 DNA손상 평가를 위해서는 흡연 외 연령, 음주, 운동, 식이습관 등 다른 요인들의 영향을 통제할 필요가 있다. 본 연구에서 연령대별로 DNA손상이 30대와 40대가 증가한 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었으며 (Table 2), 이것은 30대, 40대에서 흡연자 및 금연

자가 많기 때문인 것으로 판단된다 (Table 1). 국외 연구에서도 비록 연령의 범위가 좁기는 하였으나 연령의 영향이 일관되게 발견되지 않고 있으나 [27,33,34], 60세 이상의 대상자들에서 DNA손상이 증가되었다는 보고가 있다 [5]. 하지만 본 연구는 60대 대상자의 DNA손상 수치는 높았지만 대상자수가 1명밖에 되지 않아 자료로 제시하지 못하였다.

DNA손상을 증가시킬 수 있는 또 다른 생활 요인 중 하나로 운동의 영향을 조사한 Hartmann 등 [7]의 연구에서 단거리 3종 운동 등과 같은 격렬한 운동 직후에는 백혈구에서 DNA손상이 유의하게 증가되었으나, 유산소 운동 후에는 증가하지 않았다고 보고하였다. Hartmann 등 [6]에 의하면 유산소 운동을 과도하게 한 경우 DNA손상이 증가되지 않았으며, 무산소 운동을 가볍게 한 경우에는 6시간 후부터 DNA손상 증가가 관찰되었고 24시간 때 최고로 높아졌으며 72시간 후에는 정상 상태로 돌아오는 것이 관찰되었다. 본 연구에서는 운동을 거의 매일 주기적으로 하는 대상자들의 경우의 DNA손상이 통계적으로 유의하지는 않았지만 낮은 경향을 보였다 (Figure 4). DNA손상이 운동의 영향을 받지 않는 이유는 어느 정도로 격렬한 유산소 운동을 하는지, 무산소 운동을 하는지 등을 구분하기 힘들었고, 또한 운동에 관한 조사가 운동 직후가 아닌, 대상자들의 일반적인 생활 습관으로써의 운동 회수만을 조사하여 검사 시점에서 운동의 직접적인 DNA손상 영향을 분석하는 데는 제한점이 있었다. 마지막으로 음주에 따른 DNA손상 여부도 비음주군과 유의한 차이를 보이지 않았는데 (Figure 4), 국외 선행 연구들 중 음주에 따른 DNA손상에 대한 연구 보고가 많지는 않으나, Lebaillly 등 [35]의 연구에서의 음주에 따른 DNA손상 차이가 없다는 연구 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

본 연구는 건강한 일반 성인 남성들 중 흡연자가 비흡연자에 비해 DNA손상이 유의하게 증가하는 것을 생활요인으로 인한 개인차가 크게 존재함에도 불구하고, Comet 분석법을 통해 집단적인 수준에서

명확히 증명하였다는 점에서 의의가 있다고 생각한다. 또한 흡연으로 인한 미래에 발생 가능성이 있는 질병 위험 뿐 아니라 현재 시점에서의 유전독성 영향이 있음을 명확히 밝히는 연구를 수행함으로써 흡연 습관의 개선을 위한 자료 제공 측면에서도 의미가 있을 것이다. 그러므로 우리나라의 경우 흡연은 세포 유전적 측면에서 혈액 중 림프구의 DNA손상을 증가시킬 가능성이 높기 때문에 작업장, 일반 환경 또는 생활습관에 따른 유전 독성물질에의 노출정도를 평가하는 연구를 수행할 시 흡연습관을 반드시 고려해야 할 것이며, 흡연량의 차이가 DNA손상 증가로 나타나지 않는 이유에 대해서는 향후 지속적인 연구가 요구된다.

요약 및 결론

본 연구는 한국인 성인 남성 대조군을 통해서 직업상 유독물질에 노출되지 않은 개인의 일상적인 생활 요인, 특히 흡연으로 인한 DNA손상을 Comet 분석법을 통하여 평가하려는 목적으로 시도되었다. DNA손상에 영향을 줄 수 있는 연령, 운동, 음주 등의 습관에 대한 조사도 함께 실시하였다.

Comet 분석법을 이용한 국외의 연구결과와 같이 우리나라에서도 흡연에 의한 DNA손상이 증가하며, 흡연량과의 상관성은 없는 것으로 나타났다. 그러나 흡연량에 따른 DNA손상 차이를 발견하지 못한 것은 향후 후속 연구가 필요하며, Comet 분석법에서 나타나는 DNA손상에 가장 영향을 줄 수 있는 세포내 DNA손상 회복 능력에 대한 평가도 함께 이뤄져야 할 것이다.

참고문헌

1. Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The Comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(10): 1005-1015
2. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 184-191
3. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35(3): 206-221
4. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(1): 45-51
5. Singh NP, Danner DB, Tice RR, Pearson JD, Brant LJ, Morrell CH, Schneider EL. Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat Res* 1991; 256(1): 1-6
6. Hartmann A, Plapperet U, Raddatz K, Grunert-Fuchs M, Speit G. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 1994; 9(3): 269-272
7. Hartmann A, Pfuhrer S, Dennog C, Germdnik D, Pilger A, Speit G. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radical Biol Med* 1998a; 24(2): 245-251
8. Dhawan A, Mathur N, Kishore Seth P. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutat Res* 2001; 474(1-2): 121-128
9. Nakayama T, Kaneko M, Kodama M, Nagata C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature* 1985; 314(6010): 462-464
10. Fielding S, Short C, Davies K, Wald N, Bridges BA, Waters R. Studies on the ability of smoke from different types of cigarettes to induce single-strand breaks in cultured human cells. *Mutat. Res* 1989; 214(1): 147-151
11. Leanderson P, Tagesson C. Cigarette tar promotes neutrophil-induced DNA damage in cultured lung cells. *Environ. Res* 1994; 64(2): 103-111
12. Hess RD, Brandner G. DNA damage by filtered, tar-and aerosol-free cigarette smoke in rodent cells: A novel evaluation. *Toxicol. Lett* 1996; 88(1-3): 9-13
13. Poli P, Buschini A, Spaggiari A, Rizzoli V, Carlo-Stella C, Rossi C. DNA damage by tobacco smoke and some antitubercular drugs evaluated using Comet assay. *Toxicology* 1999; 108(2-3): 267-276
14. Frenzilli G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fomai E, Giannesi L, Maggiorini F, Paoletti P, Barale R. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 1997; 375(2): 117-123
15. Kopjar N, Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochimica Polonica* 2006; 53(2): 321-336
16. Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline Comet assay. *Mutat Res* 1999; 440(1): 19-25
17. Park EJ, Kang MH. Application of the alkaline Comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean Nutri Soc* 2002; 35(2): 213-222 (Korean)
18. Ji S, Oh E, Sul D, Choi JW, Park H, Lee E. DNA damage of lymphocytes in volunteers after 4 hour use of mobile phone. *J Prev Med Public Health* 2004; 37(4): 373-380 (Korean)
19. Kassie F, Parzefall W, Knasmoller S. Single cell gel electrophoresis assay: A new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000; 463(1): 13-31
20. McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993; 288(1): 47-63
21. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The Comet assay: A comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339(1): 37-59
22. Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. *J Chromatography* 1999; 722(1-2): 225-254
23. Hellman B, Friis L, Vaghef H, Edler L. Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: A study on subjects with residential exposure to radon. *Mutat Res* 1999; 442(2): 121-132
24. Lee E, Oh E, Lee J, Sul D, Lee J. Use of the Tail Moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci* 2004; 81(1): 121-132
25. Betti C, Davini T, Giannesi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by Comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res* 1995; 343(4): 201-207
26. Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SEM. Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assay. *Mutagenesis* 1999; 14(1): 71-75
27. Pitarque M, Vaglenov A, Nosko M, Hirvonen A, Norppa H, Creus A, Marcos R. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe

- workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat Res* 1999a; 441(1): 115-127
28. Pitarque M, Creus A, Marcos R, Hughes JA, Anderson D. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutat. Res.* 1999b; 440(2): 195-204
29. Somorovska M, Jahnova E, Tulinska J, Zamecnikova M, Sarmanova J, Terenova A, Vodickova L, Liskova A, Vallova B, Soucek P, Hemminki K, Norppa H, Hirvonen A, Tates AD, Fuortes L, Dusinska M, Vodicka P. Biomonitoring of occupational exposure to styrene in a plastics lamination plant. *Mutat. Res* 1999; 428(1-2): 255-269
30. Hoffmann H, Hogel J, Speit G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: A meta-analysis. *Mutagenesis* 2005; 20(6): 455-466
31. Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1998; 19(4): 695-698
32. Rupa DS, Reddy PP, Reddi OS. Frequencies of chromosomal aberrations in smokers exposed to pesticides in cotton fields. *Mutat Res* 1989; 222(1): 37-41
33. Sram RJ, Podrazilova K, Dejnek J, Mrackova G, Pilcik T. Single cell gel electrophoresis assay: Sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis* 1998; 13(1): 99-103
34. Hartmann A, Fender H, Speit G. Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the Comet(single cell gel) assay. *Environ Mol Mutagen* 1998b; 32(2): 17-24
35. Lebaillly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemenev D, Godard T, Sichel F, LeTalaer JY, Henry-Amar M, Gauduchon P. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: Discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7(10): 917-927