

유전독성, 발암성 화학물질이 ROS 생성에 미치는 영향

고서연, 신윤용*

이화여자대학교 약학대학

Effect of Genotoxicity or Carcinogenicity Chemicals on the ROS Production

Seo Youn Go and Yhun Yhong Sheen*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

In the present study, ROS detection of L5178Y cells that were treated with twenty test compounds in order to find out hydrogen peroxide (H₂O₂) induction for genotoxicity and carcinogenic toxicity. Twenty test compounds were consist of four classes, such as genotoxic carcinogens, genotoxic noncarcinogens, nongenotoxic carcinogens, and nongenotoxic noncarcinogens. Genotoxic carcinogens are 1,2-dibromoethane, glycidol, melphalan, diethylstilbestrol and urethane. Genotoxic noncarcinogens are 8-hydroxyquinoline, emodin, acetonitrile and diallylphthalate, L-ascorbic acid. Nongenotoxic carcinogens are methyl carbamate, *O*-nitrotoluene, 1,4-dioxane, tetrachloroethylene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. And nongenotoxic noncarcinogens are D-mannitol, 1,2-dichlorobenzene, caprolactam, bisphenol A and chlorpheniramine maleate.

Key words : genotoxicity, carcinogenicity, oxidative stress, hydrogen peroxide (H₂O₂)

서론

현재 전 세계적으로 유통되고 있는 화학물질의 수는 10만여 종에 이르며 매년 2천여 종의 새로운 화학물질이 개발되어 상품화되고 있어 이들에 의한 인체 및 환경 위해성이 날로 증가하고 있는 추세이다(NTP, 1996; NTP, 2001). 따라서 폭발적으로 증가하고 있는 위해가능 물질들의 발암성 검출 및 발암작용 기전을 확인할 수 있는 발암독성 평가법 개발이 절실히 필요하게 되었다. 그리고 다양한 외

인성 물질들 중 각종 합성 화학물질들이 사람의 유전자, 즉 염색체(chromosome)나 DNA 상에서 변이를 일으킨다는 것이 알려진 이후 유전독성에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 현재 세계적으로 공통적으로 시행하고 있는 여러 가지 시험방법 중에서 유전자 돌연변이를 지표로 하는 시험으로서 유전변이를 가진 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 이용한 복귀돌연변이시험이 있다. 그러나 유전독성 평가는 발암독성 평가에만 국한되는 것이 아니다(Ellinger-Ziegelbauer, 2004). 예를 들면, DNA에 대한 상해성이 태아에 미친다면 최기형성(teratogenicity)으로 연결되고, 또한 생식세포(정자 또는 난자)에 영향을 미치게 된다면 다음 세대에 유전적 상해(gene-

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-3277-3028, Fax: +82-2-3277-2851
E-mail: yysheen@ewha.ac.kr

tic hazard)를 초래할 수 있다(Thybaud *et al.*, 2007). 유전독성의 역치연관 용량반응은 효소작용억제, 유전체불균형요인, 에너지 고갈, 반응성 활성산소 생성, 단백질 합성 억제, 지질과산화, 핵산분해, 체내 무기이온 불균형 등 세포 독성 반응 메커니즘과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Gaylor *et al.*, 2004; Fielden *et al.*, 2007). 유전독성이며 발암성, 유전독성이며 비발암성, 비유전독성이며 발암성, 비유전독성이며 비발암성으로 구분되는, 4가지 화합물 질군을 NTP, FDA, EPA 자료로부터 선정하였다. 이렇게 선정된 총 20가지 시험물질에 관한 정보는 다음과 같다. 유전독성 발암성물질로는 1,2-dibromoethane, glycidol, melphalan, diethylstilbestrol, urethane을 사용하였다. 1,2-dibromoethane은 살충제나 토양 훈증제로 사용될 뿐 아니라 가솔린에서도 anti-knocking agent로 널리 이용되는 물질로 피부암, 폐암, 전위암 등을 유발한다(Olson *et al.*, 1973; Rannug 1980; Letz *et al.*, 1984). Glycidol은 점성이 있는 액체로 물이나 유기 용매 모두에 잘 녹으며 흔히 vinyl 중합체 생산품의 안정화제로 사용된다. 독성으로는 피부암, 폐암, 전위암, 간암, 유선암, 자궁암 등을 일으킨다(Yamamoto *et al.*, 2001). Melphalan과 그 유도체는 암의 화학요법제로 이용되며, 폐암을 일으킨다는 보고가 있다. Diethylstilbestrol은 강력한 합성 에스트로젠이며 발암물질로 알려져 있고, 피부암과 구강암의 발생에 관련이 있다(Calle *et al.*, 1996). Urethane은 최면제로 사용되었던 물질로 폐암을 일으킨다(Field and Lang, 1988). 비유전독성 발암물질로는 methylcarbamate, *O*-nitrotoluene, 1,4-dioxane, tetrachloroethylene, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)을 사용하였다. Methyl-carbamate는 살충제로 이용되고, 유방암, 피부암, 결장암 등을 일으킨다. *O*-nitrotoluene은 미국에서 해마다 3,000만 파운드가 넘게 사용될 정도로 농업이나 고무 제품, 황색소나 직물이나 종이에 염색할 색소를 합성하는 데 많이 쓰이는 물질로서 혈관육종, 맹장암, 간세포성암을 일으킨다(Dunnick *et al.*, 2004). 1,4-dioxane은 계면활성제 합성에 쓰이는 용매이며, 비강암을 유발시킨다(Robinson *et al.*, 1980; Chiu *et al.*, 2006). Tetrachloroethylene은 드라이 크리닝에 쓰이는 주요 용매로 간암을 일으킨다. 또한, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin은 제초제로 쓰였던 물질로 자궁암, 췌장암을 일으킨다. 유전

독성 비발암물질로는 8-hydroxy quinoline, emodin, acetonitrile, diallylphthalate, l-ascorbic acid을 사용하였으며 8-hydroxyquinoline은 analytical colorimetric agent나 chelating agent, pesticide 등에 사용되는 물질이고 emodin은 하제나 항바이러스제, 간보호제로 이용된다(Andersen *et al.*, 1991; Krumbiegel and Schulz, 1993; Arosio *et al.*, 2000). acetonitrile은 네일리무버 등 화학용매로 사용되며 이는 생체 내에서 cyanide로 변해 독성을 일으키기도 하고, 위궤양 상피세포를 비후하게 만든다(Kurtet *et al.*, 1991). Diallylphthalate는 가소제로 많이 이용되며 l-ascorbic acid는 보통 Vitamin C라 부르며 항산화제이자 항암, anticlastogenic, antimutagenic한 성질을 가지고 있다(Cameron *et al.*, 1979; Shamberger, 1984; Frei *et al.*, 1989; Fraga *et al.*, 1991; Krinsky, 1993). 비유전독성 비발암물질로는 1,2-dichlorobenzene, D-mannitol, caprolactam, bisphenol A, chlorpheniramine을 사용하였다. 1,2-dichloroben-

Table 1. Genotoxicity and carcinogenicity of test compounds

	Ames	<i>in vitro</i> CA	<i>in vitro</i> MN	MLA	발암
1,2-dibromoethane	+	-	+	+	+
Glycidol	+	+	+	+	+
Melphalan	+	+	+	•	+
Diethyl stilbestrol	-	+	-	+	+
Urethane	-	+	-	•	+
8-hydroxyquinoline	+	+	-	+	-
Emodin	+	+	-	+	-
Acetonitrile	-	+	-	-	-
Diallylphthalate	-	-	-	-	-
L-Ascorbic acid	-	+	-	-	-
Methylcarbamate	-	-	-	-	+
<i>O</i> -nitrotoluene	-	-	-	-	+
1,4-dioxane	-	+	-	•	+
Tetrachloroethylene	-	+	-	+	+
TCDD	-	+	+	+/-	+
D-mannitol	-	-	-	-	-
1,2-Dichlorobenzene	-	-	-	-	-
Caprolactam	-	-	-	-	-
Bisphenol A	-	-	-	-	-
Chlorpheniramine maleate	-	-	-	-	-

CA: chromosome aberration

MN: MicroNuclei

MLA: Mouse Lymphoma assay

zene은 제초제 제조에 산업용매로 주로 사용되고, 간독성을 일으킨다는 보고가 있다(Younis *et al.*, 2003). D-mannitol은 삼투성 완화제로 사용되고 caprolactam은 nylon 6나 플라스틱 제조에 사용되며 bisphenol A는 폴리카보네이트나 에폭시수지의 제조, 진균제, 색소, 항산화제로 사용된다(Lee and Ferrando, 1984; Steinmetz *et al.*, 1997; Staples *et al.*, 1998). 또한 chlorpheniramine은 항히스타민제로 사용되는 의약품이다. 시험물질들의 유전독성 실험에 대한 정보는 다음과 같다(Table 1). 본 연구에서는 이들 4가지 화학물질들에 의한 활성산소 생성에 미치는 영향을 조사하여 유전독성 발암성과 활성산소 생성과의 관계를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

Melphalan, Urethane, Chlorpheniramine maleate, were purchased from Sigma (St. Louis, U.S.A.). Diethylstilbestrol was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). 1, 4-Dioxane, Tetrachloroethylene, Acetonitrile, L-Ascorbic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). 1,2-dibromoethane, Glycidol, 8-hydroxyquinoline, Emodin, Methylcarbamate, *O*-nitrotoluene, D-mannitol, 1,2-dichlorobenzene, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (Accu-standard Inc., New Haven, U.S.A.). Diallyl Phthalate, Caprolactam and Bisphenol A were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI.). Melphalan control (Acidic Ethanol, Ethanol : 5 M HCl=49 : 1).

2. 실험 방법

1) 세포 배양 및 약물 처치

Mouse lymphoma 유래의 L5178Y 세포를 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL)에서 배양하여 사용한다. 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하고 2~3일마다 한번씩 RPMI 1640배지를 이용하여 계대한다. 배양 세포를 12 well plate에 1 × 10⁶ cells/mL이 되도록 파종을 한 후, 각각의 well에 시험물질을 2시간 동안 처리한다. 그리고 세포를 1.5 mL microfuge tube에 모은

후 3,000 rpm, 3 min으로 원심분리하여 약물을 제거한 후 보통의 배양액에서 22시간 동안 배양한다.

2) 세포독성 시험

Mouse lymphoma 유래의 L5178Y 세포를 10% fetal bovine serum이 포함된 RPMI 1640 (Gibco BRL)에서 배양하여 사용한다. 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하고 2~3일마다 한번씩 RPMI 1640배지를 이용하여 계대한다. 배양 세포를 12 well plate에 1 × 10⁶ cells/mL이 되도록 파종을 한 후, 각각의 well에 시험물질을 2시간 동안 처리한다. 이때 시험물질들은 100배 stock을 만들어서 10 μL/1 mL로 처치하고, 8-hydroxyquinoline의 경우만 1,000배 stock을 만들어 시험물질 처치 시 10배 희석하여 사용하며, L-ascorbic acid의 경우 만든 후 색이 노란색으로 변하기 전에 사용한다. 각각의 well에서 cell을 모아서 vortexing한 후에 cell과 trypan blue를 1 : 1로 섞은 후에 hemocytometer cell count를 이용하여 cell의 숫자를 센다. 이때 cell viability가 80%가 되는 농도를 기준으로 하여 22시간 보통의 배양액에서 배양한 후 다시 cell의 갯수를 세어 cell viability가 60% 이상이 되지 않은 경우 농도를 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배로 희석하여 2시간 처치 시에 cell의 양이 100%를 넘지 않는 범위에서 동일한 방법으로 정한다.

3) ROS 측정

96 well plate에 1 × 10⁵ cells/well이 되도록 파종하여 Glycidol (GLY), urethane (URE), methylcarbamate (MC), 1,4-dioxane (DIOX), L-ascorbic acid (L-ASC), D-mannitol (MT), caprolactam (CAP), chlorpheniramine (CHLOR)은 물에 녹이고 1,2-dibromoethane (DBE), diethylstilbestrol (DES), *O*-nitrotoluene (NT), 2,3,7,8-tetra chlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), tetrachloroethylene (TCE), 8-hydroxyquinoline (HQ), emodin (EMO), acetonitrile (ACE), diallylphthalate (DAP), 1,2-dichloro benzene (DCB), bisphenol A (BIS)는 DMSO에 녹이고 melphalan (MEL)은 acidic ethanol에 녹여 각 농도별로 제조하여 처치하고 2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) 10 μM을 처치하고 시간별로 485/530 nm에서 형광을 측정하였다. 단백질 보정은 PBS로 2번 세척 후 well당 80 mM sodium phosphate buffer 112 μL, fluorescamine 48 μL 처치 후 15분

후 360/460 nm에서 형광을 측정하였다.

결 과

1. 세포독성 시험

L5178Y cell에 시험물질을 처리한 후 세포독성 시험을 한 결과는 Table 2와 같다. 8-hydroxyquinoline의 경우는 약물 처리 시 세포의 상태에 따라서 cell viability의 증감의 폭이 0~80%로 매우 컸다. 따라서 세포의 상태가 매우 양호할 때 시험물질의 고농도의 stock을 만들어서 약물 처리시마다 희석하여 사용하였다. Glycidol의 경우 2시간 처리시 4,000 µg/mL에서 cell viability가 80%였으나, 22시간 더 배양 후 0%로 감소하여 농도를 400 µg/mL으로 재설정하였다.

2. ROS (Reactive Oxygen Species) Analysis

20가지 시험물질을 가지고 ROS를 측정하여 각 그룹별로 정리하여 보았는데 (Figs. 1-4), 그룹만의 특징을 찾기는 어려웠다. 유전독성-발암성을 가지는 5가지 시험물질에서 1,2-dibromoethane과 urethane의 경우 대조군과 큰 차이를 보이지 않았고, glycidol의 경우 시험물질 처리 후 배지를 갈아주는 2시간까지는 대조군에 비해 2배 정도의 감소경향을 가지지만 배지를 갈아준 직후 30분에는 1.5배 이상의 증가경향을 볼 수 있었다. Diethylstilbestrol의 경우도 glycidol과 유사한 경향이지만 배지를 갈아준 후에도 대조군에 비해 ROS생성이 감소하는 경향을 보였다. Melphalan의 경우는 특이적으로 배지를 갈아주기 전 2시간 동안 ROS가 대조군에 비해 3배 이상으로 증가하는 경향이었으나, 배지를 갈아준 후부터는 대조군과 유사했다. 유전독성-비발암성을 가지는 5가지 시험물질에서는 배지를 갈아주는 2시간 동안 acetonitrile, diallylphthalate를 처리한 경우 ROS 생성이 대조군보다 2배 이상 적었고, 8-hydroxy quinoline, emodin, L-ascorbic acid를 처리한 경우 오히려 빈 well보다 적어서 반복실험을 해보았으나 같은 결과가 나왔다. 그리고 배지를 갈아서 약물을 제거한 후에는 emodin과 acetonitrile를 처리한 경우 대조군보다 1.5배까지 증가했다가 시간이 지날수록 감소하였고, diallyl-

Table 2. Cytotoxicity test

	Chemicals	Concentration (µg/µL)	Viability (%)
C	Control (sterile distilled water)		98
O	Control (DMSO)		97.8
N	Control (acidic ethanol)		96.2
	1,2-Dibromoethane	100	90
G	Glycidol	400	86
C	Melphalan	200	91.7
	Diethylstilbestrol	15	73.79
	Urethane	5000	87.2
	8-hydroxyquinoline	100	80
G	Emodin	30	66
N	Acetonitrile	5000	68
C	Diallylphthalate	250	66
	L-ascorbic acid	2500	99
	Methylcarbamate	5000	99
N	O-nitrotoluene	200	70
G	1,4-dioxane	4000	86.2
C	Tetrachloroethylene	100	90
	TCDD	10	86
	D-mannitol	5000	100
	1,2-Dichlorobenzene	50	61
N	Caprolactam	4000	50
	Bisphenol A	50	100
	Chlorpheniramine maleate	70	61

phthalate를 처리한 경우 대조군과 유사한 정도로 증가했다. L-ascorbic acid를 처리한 경우는 배지를 갈아주고 30분 후에 7배까지 증가하였다가 시간이 지날수록 급격히 감소하여 24시간 후에는 대조군의 2배 정도의 ROS가 측정되었다. 그리고 8-hydroxyquinoline을 처리한 경우는 배지를 갈아준 후에도 거의 100% ROS 생성을 억제하였다. 비유전독성-발암성을 가지는 시험물질에서 methylcarbamate, 1,4-dioxane, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin을 처리한 경우 2시간 동안은 대조군에 비해 2배 정도 감소의 경향이 나타났으나, 약물을 제거한 후에는 대조군과 유사하였다. 그리고 O-nitrotoluene, tetrachloroethylene을 처리한 경우 2시간 동안은 대조군과 유사하거나 감소의 경향을 보였지만 약물을 제거한 후에 O-nitrotoluene은 1.5배 이상, tetrachloroethylene은 2.5배 이상의 증가를 보였다가 감소하였다. 마지막으로 비유전독성-비발암성을 가지는 시험물질에서는 매우 다양한 경향들을 볼 수 있었

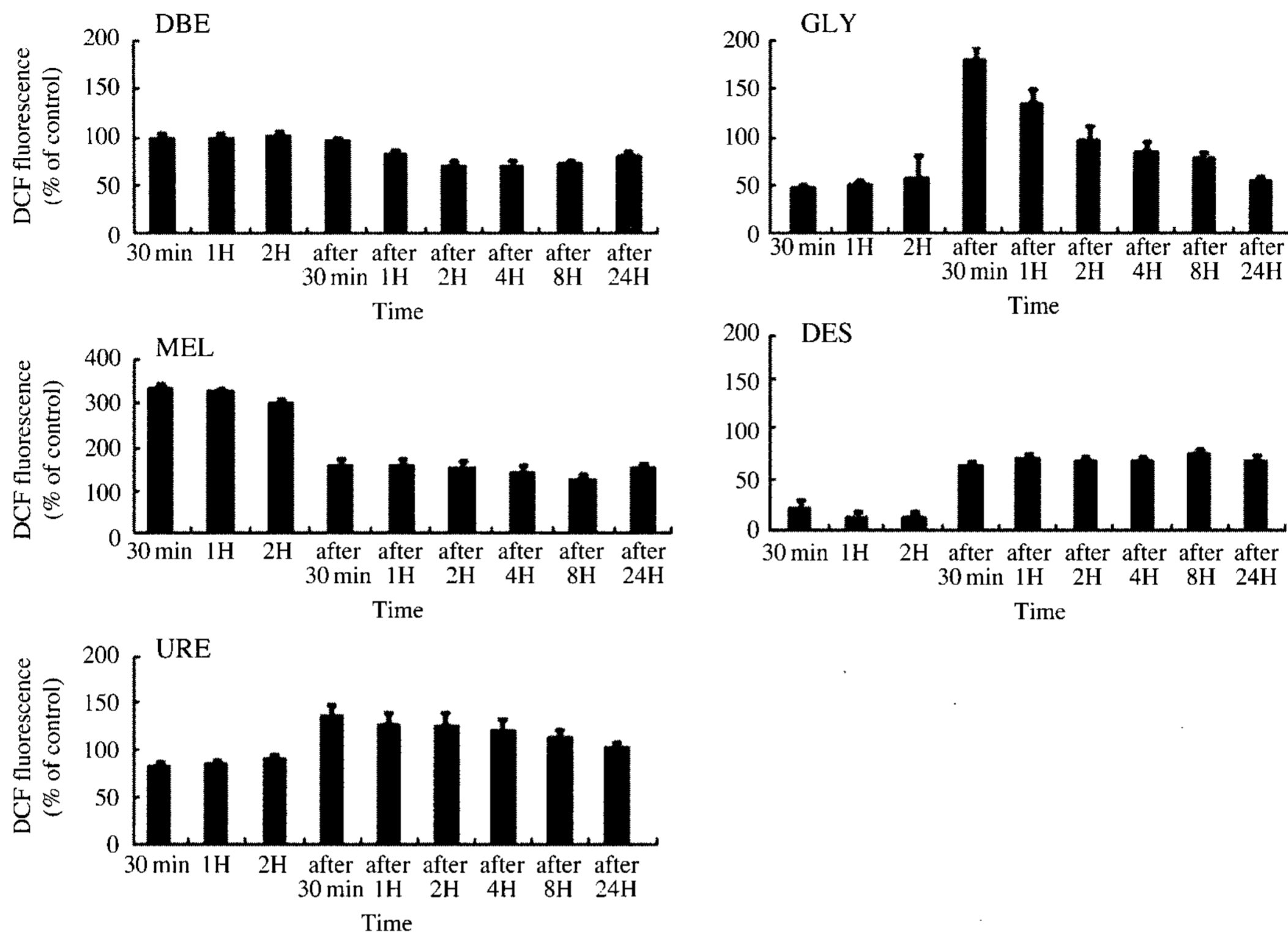


Fig. 1. Effects of genotoxic-carcinogen chemicals on ROS production. L5178Y cells were treated without (0.1% DMSO, 0.1% H₂O, 0.1% acidic ethanol) or with characteristics concentrations of test compounds, and then incubated with an oxidative sensitive dye, H₂DCFDA (10 μM) for 30 min, 1 h and 2 h. And L5178Y cells were treated with out or with characteristics concentrations of test compounds for 2 h, and then incubated with an oxidative-sensitive dye, H₂DCFDA (10 μM) for 30 min, 1 h, 2 h, 8 h and 24 h. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 488-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D. DBE=1,2-dibromoethane; GLY=glycidol; HQ=8-hydroxyquinoline; EMO=emodin; MC=Methyl-carbamate; NT=O-nitrotoluene; MAN=D-mannitol; DCB=1,2-dichloro-benzene; MEL con.=melphalan control (acidic Ethanol); MEL=melphalan; DES=diethylstilbestrol; URE=urethane; ACE=acetonitrile; DAP=diallylphthalate; L-ASC=L-ascorbic acid; DIOX=1,4-dioxane; TCE=tetrachloroethylene; TCDD=2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; CAP=caprolactam; BIS.A=bisphenol A; CHLOR=chlorpheniramine maleate; CON=Control; GC=Genotoxic carcinogen; GNC=Genotoxic noncarcinogen; NGC=Nongenotoxic carcinogen; N=Nongenotoxic noncarcinogen.

는데, bisphenol A를 처치한 경우 2시간 동안은 빈 well보다 적게 측정되었고, 시험물질을 제거한 후에는 대조군과 유사하다가 24시간째에는 증가하는 경향을 보였다. D-mannitol의 경우는 대조군과 유사한 경향을 보였다. 1,2-dichlorobenzene, caprolactam을 처치한 경우 2시간 동안은 대조군의 2배 혹은 그 이상의 감소 경향을 보이다가 시험물질을 제거한 후에는 각각 1.5배, 2.5배 이상의 증가경향을 보였다. 그리고 chlorpheniramine maleate를 처

치한 경우 초반 2시간 동안에는 대조군보다 2배 이상의 감소경향을 보이지만, 시험물질을 제거한 후에는 오히려 빈 well보다 ROS가 적게 측정되었다(Figs. 1-4).

고 찰

이번 연구에서는 유전독성-발암성, 유전독성-비발

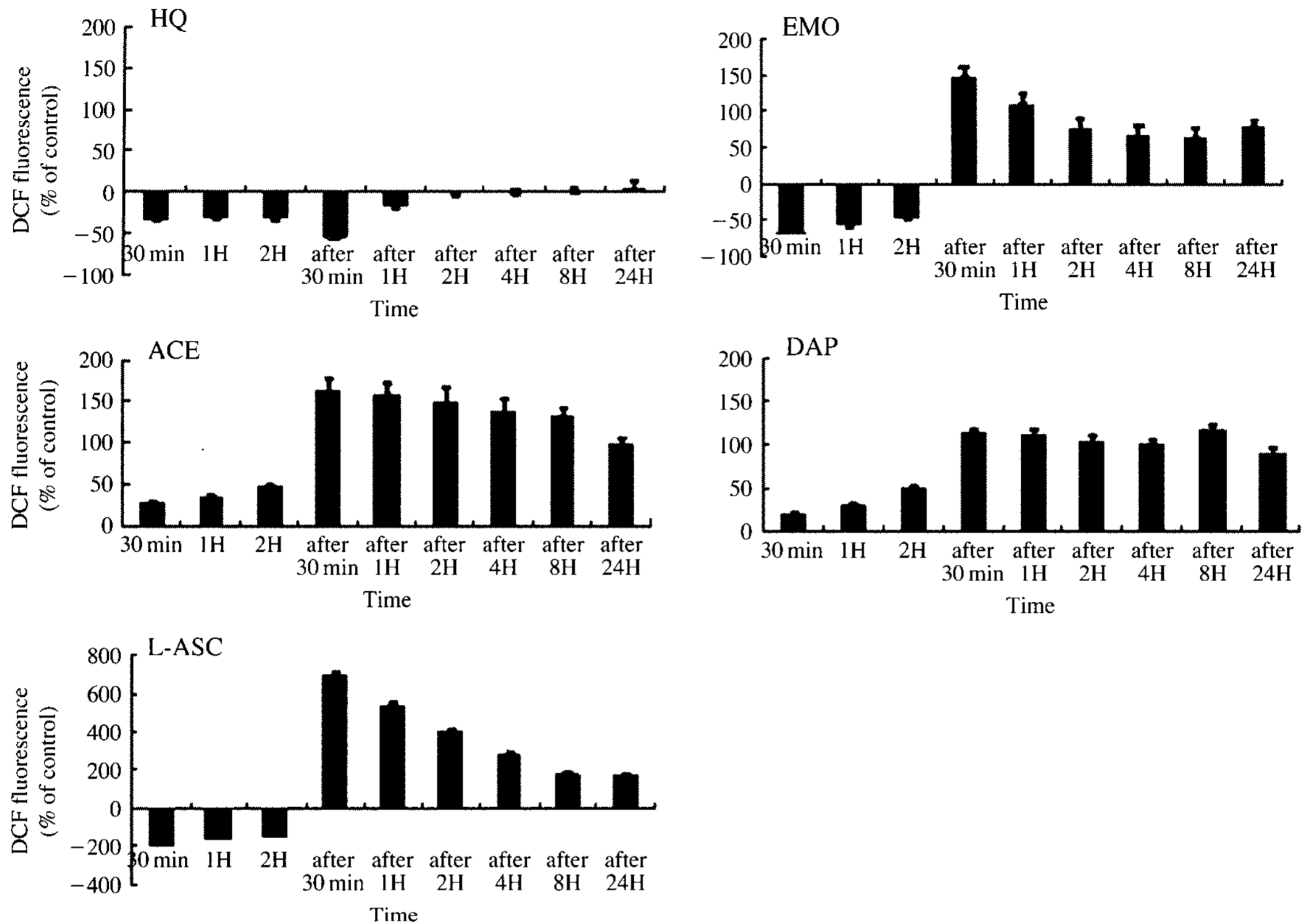


Fig. 2. Effects of genotoxic-noncarcinogen chemicals on ROS production. L5178Y cells were treated without (0.1% DMSO, 0.1% H₂O, 0.1% acidic ethanol) or with characteristics concentrations of test compounds, and then incubated with an oxidative sensitive dye, H₂DCFDA (10 μ M) for 30 min, 1 h and 2 h. And L5178Y cells were treated with out or with characteristics concentrations of test compounds for 2h, and then incubated with an oxidative-sensitive dye, H₂DCFDA (10 μ M) for 30 min, 1 h, 2 h, 8 h and 24 h. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 488-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean \pm S.D. DBE=1,2-dibromoethane; GLY=glycidol; HQ=8-hydroxyquinoline; EMO=emodin; MC=Methyl-carbamate; NT=*O*-nitrotoluene; MAN=D-mannitol; DCB=1,2-dichloro-benzene; MEL con.=melphalan control (acidic Ethanol); MEL=melphalan; DES=diethylstilbestrol; URE=urethane; ACE=acetonitrile; DAP=diallylphthalate; L-ASC=L-ascorbic acid; DIOX=1,4-dioxane; TCE=tetrachloroethylene; TCDD=2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; CAP=caprolactam; BIS.A=bisphenol A; CHLOR=chlorpheniramine maleate; CON=Control; GC=Genotoxic carcinogen

암성, 비유전독성-발암성, 비유전독성-비발암성 시험물질 처치군의 ROS 변화를 관찰하였다. 그리고 유전독성을 가지는 물질이 산화적 스트레스로 인한 메커니즘과 연관된 경우가 많아서 이번에 실험한 유전독성을 가지는 물질들의 공통된 경향을 파악하려고 ROS 측정을 하였으나 특징적인 공통점을 찾을 수는 없었다. 시험물질들의 선정과정에 있어서도 차이가 있었지만, 시험물질 고유의 작용기

전의 영향인 것으로 생각되었다. 시험물질 중에 특이적인 경우는 melphalan를 처치하고 30분만에 ROS가 3배 넘게 증가한 경우와 L-ascorbic acid를 제거한 후에 30분만에 ROS가 감소에서 7배까지 증가하는 경우, 그리고 chlorpheniramine maleate를 처치하고 초기에 2배 이상의 감소가 나타났는데, 시험물질을 제거한 후에는 빈 well보다도 적은 ROS가 생성되고 약간씩 증가 경향은 보였으나 여전히

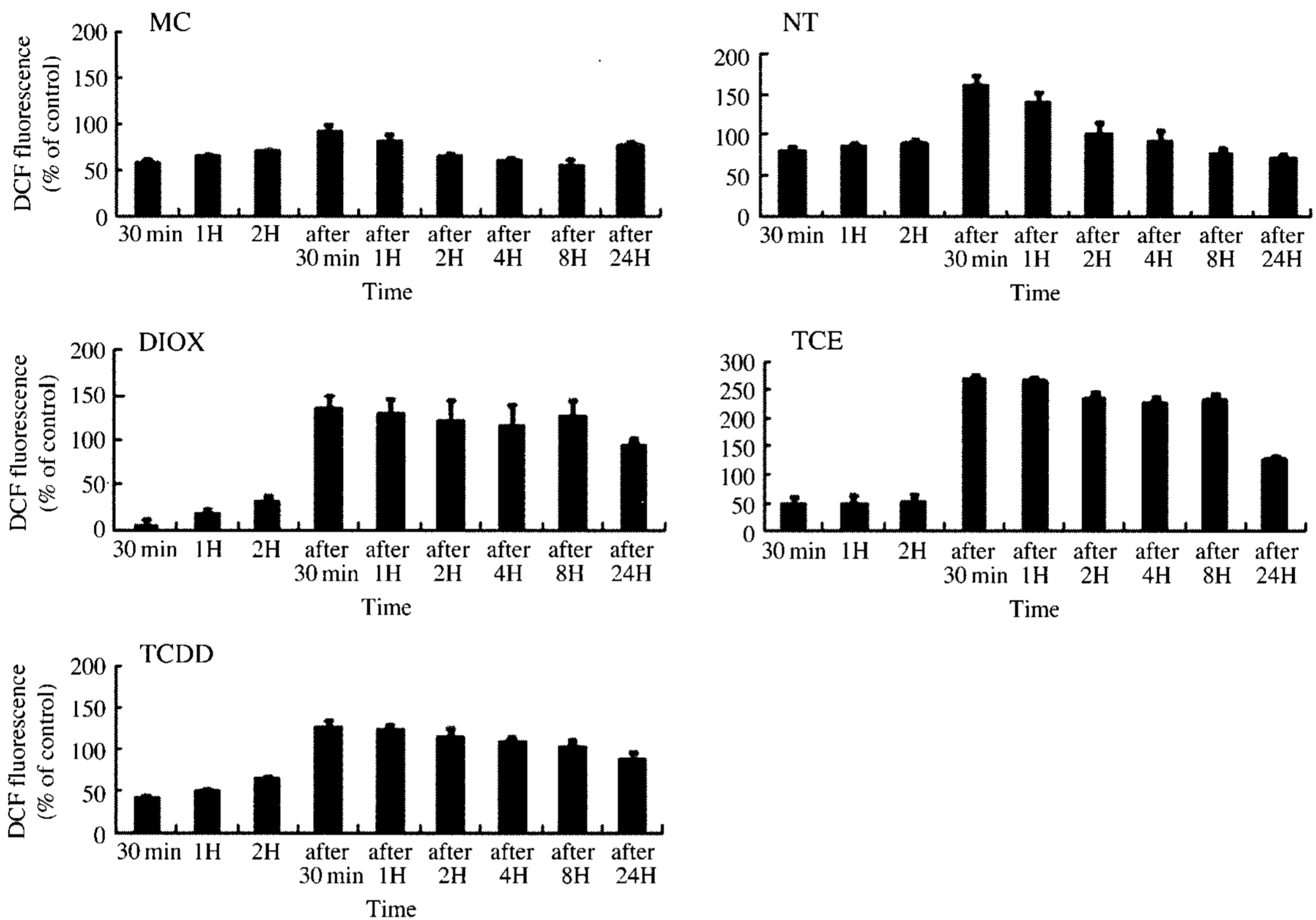


Fig. 3. Effects of nongenotoxic-carcinogen chemicals on ROS production. L5178Y cells were treated without (0.1% DMSO, 0.1% H₂O, 0.1% acidic ethanol) or with characteristics concentrations of test compounds, and then incubated with an oxidative sensitive dye, H₂DCFDA (10 μM) for 30 min, 1 h and 2 h. And L5178Y cells were treated with out or with characteristics concentrations of test compounds for 2 h, and then incubated with an oxidative-sensitive dye, H₂DCFDA (10 μM) for 30 min, 1 h, 2 h, 8 h and 24 h. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 488-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean ± S.D. DBE=1,2-dibromoethane; GLY=glycidol; HQ=8-hydroxyquinoline; EMO=emodin; MC=Methyl-carbamate; NT=*O*-nitrotoluene; MAN=D-mannitol; DCB=1,2-dichloro-benzene; MEL con.=melphalan control (acidic Ethanol); MEL=melphalan; DES=diethylstilbestrol; URE=urethane; ACE=acetonitrile; DAP=diallylphthalate; L-ASC=L-ascorbic acid; DIOX=1,4-dioxane; TCE=tetrachloroethylene; TCDD=2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; CAP=caprolactam; BIS.A=bisphenol A; CHLOR=chlorpheniramine maleate; CON=Control; GC=Genotoxic carcinogen; GNC=Genotoxic noncarcinogen; NGC=Nongenotoxic carcinogen; N=Nongenotoxic noncarcinogen.

빈 well보다 적게 측정되는 경우였다. ROS에 의해 유발되는 유전자로 알려져 있는 guanylatenucleotide binding protein 2가 melphalan, L-ascorbic acid, chlorpheniramine maleate에서 각각 10.27, 5.38, 10.03의 높은 비율로 증가했다(Paulus *et al.*, 2005; Tantin *et al.*, 2005). 이 세 가지 시험물질의 공통점은 시험물질 제거 후에 ROS가 급격히 감소를 하였는데, 그 이유가 guanylatenucleotide binding protein 2 때문이라고 생각되었다. 그리고 emodin과 8-

hydroxyquinoline은 처음에 빈 well보다 적은 ROS를 생성했다가 시험물질을 제거한 후 시간이 지날수록 ROS가 0%에 가까워지는 것을 알 수 있었다. 처음에 ROS가 너무 적은 이유가 측정시 사용하는 시약과의 작용 때문인 것 같아서 DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate)가 DCFH로 바뀌는 데 필요한 esterase의 작용에 영향을 미칠 것 같아서 esterase의 변화에 관심을 가지고 보았는데, 이 두 가지 시험물질에서만 공통적으로 Ppt1

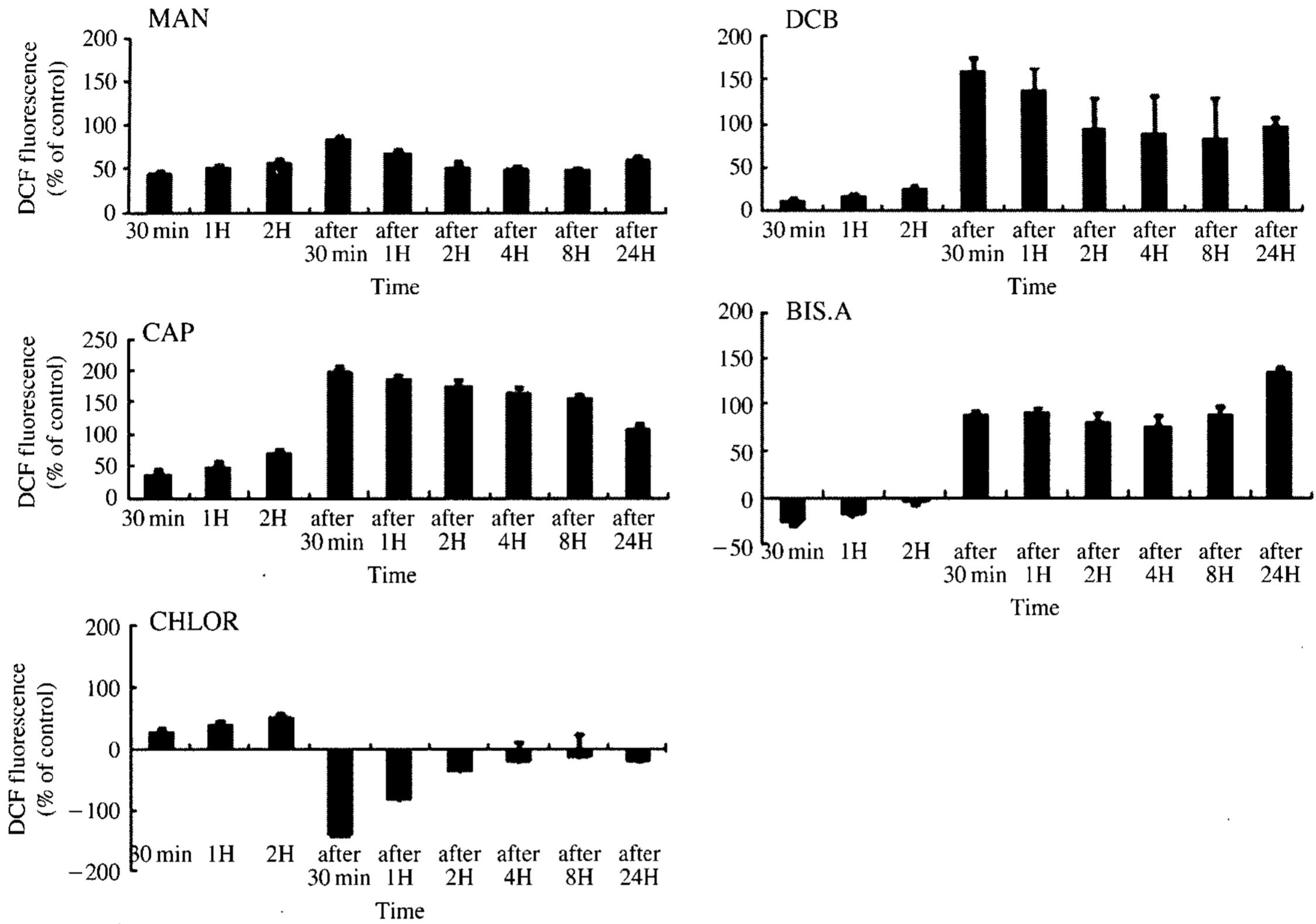


Fig. 4. Effects of nongenotoxic-noncarcinogen chemicals on ROS production. L5178Y cells were treated without (0.1% DMSO, 0.1% H₂O, 0.1% acidic ethanol) or with characteristics concentrations of test compounds, and then incubated with an oxidative sensitive dye, H₂DCFDA (10 μ M) for 30 min, 1 h and 2 h. And L5178Y cells were treated with out or with characteristics concentrations of test compounds for 2h, and then incubated with an oxidative-sensitive dye, H₂DCFDA (10 μ M) for 30 min, 1 h, 2 h, 8 h and 24 h. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader with 488-nm excitation and 530-nm emission. Upon the same cells, protein concentration was determined. DCF fluorescence was normalized to protein content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean \pm S.D. DBE=1,2-dibromoethane; GLY=glycidol; HQ=8-hydroxyquinoline; EMO=emodin; MC=Methyl-carbamate; NT=*O*-nitrotoluene; MAN=D-mannitol; DCB=1,2-dichloro-benzene; MEL con.=melphalan control (acidic Ethanol); MEL=melphalan; DES=diethylstilbestrol; URE=urethane; ACE=acetonitrile; DAP=diallylphthalate; L-ASC=L-ascorbic acid; DIOX=1,4-dioxane; TCE=tetrachloroethylene; TCDD=2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; CAP=caprolactam; BIS.A=bisphenol A; CHLOR=chlorpheniramine maleate; CON=Control; GC=Genotoxic carcinogen; GNC=Genotoxic noncarcinogen; NGC=Nongenotoxic carcinogen; N=Nongenotoxic noncarcinogen.

(palmitoyl-protein thioesterase 1)이 존재하며 증가하는 경향이였다. 이 유전자가 부족할 때 *in vivo*, *in vitro*에서 모두 ROS 증가를 가져온다는 논문이 있었다(Abbas *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006). 이 유전자가 8-hydroxyquinoline는 2.56, 3.87배 증가했고, emodin의 경우는 2.04배 증가했다. 따라서 이 유전자의 증가로 시험물질 처치 초기뿐만 아니라 시간이 지난 후에도 ROS 생성이 적은 것일 수 있다고

생각했다. 그 외에도 ROS와 관련된 유전자 중에서 copper chaperone for superoxide dismutase은 1,2-dichlorobenzene에서만 2.31배 증가하였는데, copper chaperone for superoxide dismutase는 ROS 생성을 억제하는 것으로 알려져 있어 시험물질 처치후 초기에 ROS의 감소가 이 기전에 의한 경향의 가능성이 있다고 생각되었다(Choi *et al.*, 2005). 그러나 ROS 측정을 통해 시험물질의 그룹간의 특징적인

경향을 알 수는 없었다.

감사의 글

이 연구는 식품의약품안전청사업 (07142응용연 696)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Abbas CA. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. *Yeasts in Food and Beverages* (Querol A and Fleet GH eds.) Springer. 2006.
- Andersen DO, Weber ND, Wood SG, Hughes BG, Murray BK and North JA. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives, *Antiviral Res* 1991; 16(2): 185-196.
- Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, De Castri D, Moscheni C and Annoni G. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride, *Pharmacol Toxicol* 2000; 87(5): 229-233.
- Calle EE, Mervis CA, Thun MJ, Rodriguez C, Wingo PA and Heath CW Jr. Diethylstilbestrol and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of US women, *Am J Epidemiol* 1996; 144(7): 645-652.
- Cameron E, Pauling L and Leibovitz B. Ascorbic acid and cancer: a review, *Cancer Res* 1979; 39(3): 663-681.
- Chiu WA, Micallef S, Monster AC and Bois FY. Toxicokinetics of inhaled trichloroethylene and tetrachloroethylene in humans at 1 ppm: empirical results and comparisons with previous studies, *Toxicol Sci* 2007; 95(1): 23-36.
- Choi SH, Kim DW, Kim SY, An JJ, Lee SH, Choi HS, Sohn EJ, Hwang SI, Won MH, Kang TC, Kwon HJ, Kang JH, Cho SW, Park J, Eum WS and Choi SY. Transduced human copper chaperone for Cu, Zn-SOD (PEP-1-CCS) protects against neuronal cell death, *Mol Cells* 2005; 20(3): 401-408.
- Dunnick JK, Burka LT, Mahler J and Sills R. Carcinogenic potential of *O*-nitrotoluene and *p*-nitrotoluene, *Toxicology* 2003; 183(1-3): 221-234.
- Ellinger-Ziegelbauer H, Stuart B, Wahle B, Bomann W and Ahr HJ. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver, *Mutat Res* 2005; 575(1-2): 61-84.
- Field KJ and Lang CM. Hazards of urethane (ethyl carbamate): a review of the literature, *Lab Anim* 1998; 22(3): 255-262.
- Fielden MR, Brennan R and Gollub J. A gene expression biomarker provides early prediction and mechanistic assessment of hepatic tumor induction by nongenotoxic chemicals, *Toxicol Sci* 2007; 99(1): 90-100.
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA and Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm, *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(24): 11003-11006.
- Frei B, England L and Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma, *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(16): 6377-6381.
- Friedberg EC, Walker GC and Siede W. *DNA repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington D.C. 1995.
- Gaylor DW. Are tumor incidence rates from chronic bioassays telling us what we need to know about carcinogens? *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 41(2): 128-133.
- Kim SJ, Zhang Z, Lee YC and Mukherjee AB. Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency leads to the activation of caspase-9 and contributes to rapid neurodegeneration in INCL, *Hum Mol Genet* 2006; 15(10): 1580-1586.
- Krinsky NI. Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation, *Ann N Y Acad Sci* 1993; 686: 229-242.
- Krumbiegel G and Schulz HU. Rhein and aloe-emodin kinetics from senna laxatives in man, *Pharmacology* 1993; 47(1): 120-124.
- Kurt TL, Day LC, Reed WG and Gandy W. Cyanide poisoning from glue-on nail remover, *Am J Emerg Med* 1991; 9(3): 271-272.
- Lee JR and Ferrando JR. Variables in the preparation of the large intestine for double contrast barium enema examination, *Gut* 1984; 25(1): 69-72.
- Letz GA, Pond SM, Osterloh JD, Wade RL and Becker CE. Two fatalities after acute occupational exposure to ethylene dibromide, *Jama* 1984; 252(17): 2428-2431.
- NTP. Annual Plan for Fiscal Year 1996. National Toxicology Program, Washington, DC. 1996.
- NTP. Annual Plan for Fiscal Year 1996. National Toxicology Program, Washington, DC. 2005.
- Olson WA, Habermann RT, Weisburger EK, Ward JM and Weisburger JH. Induction of stomach cancer in rats and mice by halogenated aliphatic fumigants, *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(6): 1993-1995.
- Paulus C, Sollars PJ, Pickard GE and Enquist LW. Transcriptome signature of virulent and attenuated pseudorabies virus-infected rodent brain, *J Virol* 2006; 80(4): 1773-1786.
- Rannug U. Genotoxic effects of 1,2-dibromoethane and 1,2-

- dichloroethane, *Mutat Res* 1980; 76(3): 269-295.
- Robinson JJ and Ciurczak EW. Direct gas chromatographic determination of 1,4-dioxane in ethoxylated surfactants, *J SOC Cosmet Chem* 1980; 31: 329-337.
- Shamberger RJ. Genetic toxicology of ascorbic acid, *Mutat Res* 1984; 133(2): 135-159.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res* 1998; 175(1): 184-191.
- Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST and Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, *Chemosphere* 1998; 36(10): 2149-2173.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM and Ben-Jonathan N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo, *Endocrinology* 1997; 138(5): 1780-1786.
- Tantin D, Schild-Poulter C, Wang V, Hache RJ and Sharp PA. The octamer binding transcription factor Oct-1 is a stress sensor, *Cancer Res* 2005; 65(23): 10750-10758.
- van Delft JH, van Agen E, van Breda SG, Herwijnen MH, Staal YC and Kleijnans JC. Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling, *Carcinogenesis* 2004; 25(7): 1265-1276.
- van Delft JH, van Agen E, van Breda SG, Herwijnen MH, Staal YC and Kleijnans JC. Comparison of supervised clustering methods to discriminate genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling, *Mutat Res* 2005; 575(1-2): 17-33.
- Yamamoto M, Horiuchi M, Ishiguro N, Shinagawa M, Matsuo T and Kaneko K. Glycidol degrades scrapie mouse prion protein, *J Vet Med Sci* 2001; 63(9): 983-990.
- Younis HS, Parrish AR and Glenn Sipes I. The role of hepatocellular oxidative stress in Kupffer cell activation during 1,2-dichlorobenzene-induced hepatotoxicity, *Toxicol Sci* 2003; 76(1): 201-211.