

흡연 여부에 따른 Glutathione S-transferase (GST) M1 및 T1 유전자 다형성이 우리나라 젊은 성인의 임파구 DNA 손상과 항산화 영양상태 지표들 간의 관련성에 미치는 영향*

한정화 · 이혜진 · 강명희[§]

한남대학교 대덕밸리캠퍼스 생명나노과학대학 식품영양학과

Lymphocyte DNA Damage and Anti-Oxidative Parameters are Affected by the Glutathione S-Transferase (GST) M1 and T1 Polymorphism and Smoking Status in Korean Young Adults*

Han, Jeong-Hwa · Lee, Hye-Jin · Kang Myung-Hee[§]

Department of Food & Nutrition, Daedeok Valley Campus, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

ABSTRACT

Glutathione S-transferase (GST) is a multigene family of phase II detoxifying enzymes that metabolize a wide range of exogenous and endogenous electrophilic compounds. GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms may account for inter-individual variability in coping with oxidative stress. We investigated the relationships between the level of lymphocyte DNA and antioxidative parameters and the effect on GST genotypes. GSTM1 and GSTT1 were characterized in 301 young healthy Korean adults and compared with oxidative stress parameters such as the level of lymphocyte DNA, plasma antioxidant vitamins, and erythrocyte antioxidant enzymes in smokers and non smokers. GST genotype, degree of DNA damage in lymphocytes, erythrocyte activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase (GSH-Px), and plasma concentrations of total radical-trapping antioxidant potential (TRAP), vitamin C, α - and γ -tocopherol, α - and β -carotene, and cryptoxanthin were analyzed. Lymphocyte DNA damage assessed by the comet assay was higher in smokers than that in non-smokers, but the levels of plasma vitamin C, β -carotene, TRAP, erythrocyte catalase, and GSH-Px were lower than those of non-smokers ($p < 0.05$). Lymphocyte DNA damage was higher in subjects with the GSTM1-null or GSTT1-present genotype than those with the GSTM1-present or GSTT1-null genotype. No difference in erythrocyte antioxidant enzyme activities, plasma TRAP, or vitamin levels was observed in subjects with the GSTM1 or GSTT1 genotypes, except β -carotene. Significant negative correlations were observed between lymphocyte DNA damage and plasma levels of TRAP and erythrocyte activities of catalase and GSH-Px after adjusting for smoking pack-years. Negative correlations were observed between plasma vitamin C and lymphocyte DNA damage only in individuals with the GSTM1-present or GSTT1-null genotype. The interesting finding was the significant positive correlations between lymphocyte DNA damage and plasma levels of α -carotene, β -carotene, and cryptoxanthin. In conclusion, the GSTM1-null and GSTT1-present genotypes as well as smoking aggravated antioxidant status through lymphocyte DNA damage. This finding confirms that GST polymorphisms could be important determinants of antioxidant status in young smoking and non-smoking adults. Consequently, the protective effect of supplemental antioxidants on DNA damage in individuals carrying the GSTM1-null or GSTT1-present genotypes might show significantly higher values than expected. (Korean J Nutr 2011; 44(5): 366 ~ 377)

KEY WORDS: oxidative stress, GST polymorphisms, antioxidative status, DNA damage, smokers.

접수일: 2011년 9월 29일 / 수정일: 2011년 10월 10일 / 채택일: 2011년 10월 13일

*This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2009-0069893).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: mhkang@hnu.kr

서 론

DNA 손상은 일반적으로 암의 개시단계에서 필연적으로 일어나는 과정으로 생각되며 체내 산화 스트레스 정도를 측정하기 위한 biomarker로 동물 및 인체 적용시험에서 광범위하게 사용되어 왔다.¹⁾ 산화 스트레스에 의해 신체내 활성 산소(reactive oxygen species, ROS) 수준이 올라가면 세포 내 DNA 손상이 증가하게 됨과 동시에 신체내 항산화 영양상태에 영향을 주어 항산화 비타민의 수준이 낮아지고, 항산화 효소 수준도 감소되는 것이 기존의 여러 선행연구에서 보고되었다.^{2,3)}

흡연자, 만성질환자, 암 환자 등 심한 산화 스트레스 조건에 있는 사람들은 체내 ROS가 증가하므로 항산화 비타민 수준 등 체내 항산화 영양상태가 낮고 DNA 손상은 높을 것이다. 과일과 채소에 있는 비타민 C, 비타민 E, carotenoids를 비롯한 여러 항산화물질들은 산화적 손상으로부터 DNA를 보호함으로써 암을 예방할 수 있음이 보고되고 있으며 이런 보호 효과의 기전으로 비타민 A, C, E 등 항산화 비타민의 활성이 제시되었다.⁴⁾ 그동안 많은 연구자들이 비흡연자에 비해 흡연자의 산화적 DNA 손상이 유의적으로 높음을 보고하였으며, DNA 손상정도를 감소시키기 위해 항산화식품 및 과일주스 등을 보충 섭취시킨 후 DNA 손상 감소효과를 본 영양중재 연구들이 수행되었다.⁵⁻⁷⁾ 그러나 이러한 결과들은 평균적인 값을 나타낸 것으로 개개인의 모든 수준이 다 같지는 않았을 것이다.

각 개인은 그의 유전적 배경에 따라 산화 스트레스 관련 암의 위험이 달라지며 이 위험에 대해 보이는 반응에도 개인 차이를 보인다. 인체 연구에서 산화스트레스에 대한 신체 반응에 개인 간 변이(inter-individual variation)가 나타나는 것은 각 개인이 가진 유전적인 민감도가 다르기 때문이며⁸⁾ 이 민감도는 외부 유해 물질 해독에 관여하는 효소의 유전자 다형성(genetic polymorphism)으로 설명할 수 있다.⁹⁾ Hoffman 등¹⁰⁾은 흡연자의 DNA 손상도가 이 유전적 다형성에 따라 달라질 수 있음을 관찰하고, 대상자의 유전독성 효과의 개인 차이를 더 잘 이해하기 위해서는 유전자 다형성을 고려할 필요가 있음을 제기하였다.

Glutathione S-transferase (GST)는 여러 발암 물질에 glutathione을 결합시켜 독성 물질을 해독시키는 역할을 하는 phase II 해독효소이다.¹¹⁾ 포유류의 간에서 발견되는 수용성 GST의 경우 현재까지 적어도 여덟 개(alpha, mu, pi, sigma, theta, kappa, omega 및 zeta)가 밝혀졌으며,¹²⁾ 이 중에서 특히 GSTM1(mu)과 GSTT1(theta) 유전자 다형성이 흡연, DNA

손상 및 항산화와 관련이 깊은 것이 보고되고 있다.¹³⁾

GST의 유전자 다형성은 외부 독성물질을 활성화 시키거나 해독시키는 각 개인의 능력에 지대한 영향을 미치며 이에 따라 질병의 민감도가 달라질 수 있다.¹⁴⁾ 인체에서 GSTM1이나 GSTT1 genotype이 null type을 보이면 이는 GSTM1 혹은 GSTT1 효소들이 결손되어 있다는 의미이며 체내에서 활성화된 발암물질을 제거해 주는 능력이 낮아 암의 위험율이 높아진다.¹⁵⁾ 특히 흡연자에 있어 GSTM1 효소의 결손은 담배로 인한 발암물질의 해독작용에 결손을 가져오게 되어 폐암의 위험을 증가시키며,¹⁶⁾ GSTM1과 GSTT1 null genotype을 가진 흡연자들은 같은 null genotype을 가진 비흡연자에 비해 관상동맥질환(CAD) 위험도가 높을 뿐 아니라 DNA 손상정도도 높음이 보고되었다.^{17,18)}

최근 우리나라에서도 GST 유전자 다형성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 주로 환자를 대상으로 질병의 위험과 유전자 다형성의 관련성에 관한 것이며, 우리나라 성인의 DNA 손상 및 항산화 영양상태 지표들 간의 상관성을 GST 유전자 다형성에 따라 분석한 연구는 거의 보고된 바 없다. 최근 우리나라 연구로 흡연자와 비흡연자의 DNA 손상정도를 비교하여 흡연자의 DNA 손상이 감소됨을 관찰하여 보고한 연구¹⁹⁾가 있으며, GST 유전자 다형성 관련하여서는 최근에 우리나라 건강한 성인을 대상으로 하여 GST 유전자 다형성에 따른 항산화 상태²⁰⁾ 및 DNA 손상과 지질 양상을 관찰한 연구²¹⁾가 있을 뿐이다.

따라서 본 연구는 건강한 우리나라 성인에서 산화 스트레스에 의해 생성되는 임파구 DNA 손상 수준과 GST 유전자 다형성, 그리고 항산화 영양상태 사이의 상관관계를 분석해 봄으로써 임파구 DNA 손상을 변화시키는 요인이 무엇인지를 밝혀 앞으로 개인 맞춤형 영양처방 연구의 기초자료로 삼고자 하는 목적으로 시도되었다.

실 험 방 법

연구대상자 선정 및 채혈

본 연구는 20~30세의 대전 소재 H대학교에 재학 중인 건강한 대학생 및 대학원생 남녀 301명을 대상으로 수행되었다. 대상자로부터 본인의 동의를 얻어 채혈하였고, 채혈 전 최소 8시간 이상은 음식을 먹지 않도록 지도하였다. 채혈한 혈액은 10 mL heparinated sterile tube (Vacutainer Becton Dickinson Co.)에 담아 실험실에 가져온 후, glutathione s-transferase 유전자 다형성 분석을 위해서 전혈 500 μ L를 취해 -80°C 냉동고에 보관하였다. Comet 분석용 전혈은 100 μ L heparinated sterile tube에 별도로 담고, 나머지는 1,000 rpm

에서 15분간 원심 분리하여 상층의 platelet-rich plasma (PRP)를 취하여 ascorbic acid 측정용 시료로 삼았다. 분리하고 남은 혈장은 다시 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 혈장과 혈구를 분리한 후 상층의 platelet-deficient plasma (PDP)는 항산화 비타민과 TRAP (Total radical-trapping antioxidant potential) 분석을 위해 -80°C 냉동고에 보관하였다. 적혈구는 iso-osmotic phosphate buffered saline (pH 7.4)을 첨가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리를 세 번 반복한 뒤 buffer와 1 : 1로 희석하여 erythrocyte suspension으로 만들었다. 비타민 C 분석용 혈장을 제외한 혈장과 적혈구는 분석 항목별로 분주하여 분석 전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다.

일반사항 조사

설문지를 통해 연구대상자의 성별, 나이, 흡연여부, 흡연량, 흡연력, 금연기간, 알코올 섭취 여부, 알코올의 종류와 섭취량 등의 일반사항을 조사하였다. 채혈 전에 혈압계를 사용하여 대상자의 수축기 및 이완기 혈압을 측정하였고, 신장계로 신장을 측정한 후 Inbody 520 (Bio-electrical Impedance Fatness Analyzer, (주)바이오스페이스)을 이용하여 체중, body mass index (BMI), waist-hip ratio (WHR)를 조사하였다.

Glutathione s-transferase 유전자 다형성 분석

Glutathione s-transferase (GST) M1은 Pemble 등²²⁾의 방법을, GSTT1은 Bell 등²³⁾의 방법을 수정하여 수행하였다. 냉동 보관하여 두었던 전혈 500 μL 를 취하여 DNA Genomic Blood Mini kit을 사용하여 DNA를 추출하였다. Internal standard로 β -globin을 사용하여 유전자 확인을 위한 multiple PCR을 시행하였다. PCR 과정을 위한 primer는 (주)바이오니아에서 제작한 primer를 사용하였으며 염기서열은 Table 1과 같다.

GSTM1과 GSTT1 유전자 분석을 위해서 0.1 μg genomic DNA를 각각의 10 nmol primers, 5 mM dNTP, 0.5 Unit Taq polymerase (Takara rTaq), 200 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl과 30 mM MgCl_2 를 20 μL 의 PCR 혼합액에 첨가하여 94°C 에서 7분 처리 후 94°C 에서 30초, 65°C 에서 30초, 72°C 에서 30초의 조건으로 30회 반복한 후 72°C 에서 5분간

반응시켰다. 증폭된 PCR product는 ethidium bromide (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 포함한 1% agarose gel에서 전기영동 하여 UV 하에서 확인하였다.

적혈구 항산화 효소 활성 측정

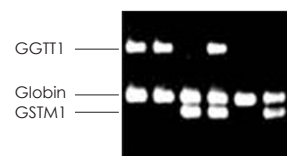
적혈구 Catalase는 과산화수소가 물과 산소로 분해되는 반응을 촉매하며 반응속도는 과산화수소 농도와 비례하므로 과산화수소의 감소량을 측정함으로써 효소활성도를 측정할 수 있다. 과산화수소의 농도가 너무 높으면 (0.1 M 이상) catalase에 의한 반응이 억제되므로 약 0.01 M의 적은 농도를 사용해야 하며, 반응이 잘 이루어지게 하기 위해서는 반응 시작 후 늦어도 30초 후에는 과산화수소 절반을 분해할 수 있도록 효소의 농도를 결정해야 한다. 대상자들의 적혈구 catalase의 분석은 전보²⁴⁾에서와 같이 UV/VIS spectrophotometer (shimadzu UV-1601)에 의해 수행되었다. 용혈된 적혈구에 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)와 hydrogen peroxide를 첨가한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 240 nm, 20°C 에서 30초간 측정하였다.

Superoxide dismutase (SOD)는 pyrogallol (1, 2, 3-trihydroxybenzol)의 자동산화물을 억제하는 SOD의 양을 측정하는데 기초를 두고 있다. Pyrogallol은 수용액 내에서 황색의 색소를 형성하며 빠르게 자동 산화하는데 그 색소의 농도를 분광광도계로 측정하게 된다. 적혈구 SOD 활성도를 측정하기 위해 적혈구 현탁액을 증류수로 용혈시킨 후 ethanol과 chloroform을 가하고 이를 3,000 U/min에서 2분간 원심 분리하였다. 그 상층액을 여러 농도로 나누어 37°C 에서 10분간 배양 후 20 μL 의 pyrogallol (1, 2, 3-trihydroxybenzol)를 첨가하여 그 농도를 UV/VIS spectrophotometer로 320 nm에서 180초간 측정하였다.²⁴⁾ 적혈구 내 SOD의 활성은 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는 항산화능으로 정의하였다.

Glutathione peroxidase (GSH-Px)는 과산화물 (T-butylhydroperoxide)에 의해 glutathione이 산화되는 반응을 촉매한다. 이때 산화된 glutathione은 glutathione reductase와 NADPH의 존재 하에 다시 glutathione으로 환원되고 NADPH는 NADP로 산화된다. 이를 이용해 용혈시킨 적혈구에 glutathione, glutathione reductase, NADPH를 첨가한

Table 1. Primer sequences used in the PCR reactions

Primer	Sequeunce (5' ----- 3')
GSTT1-forw.	tfc ctt act ggt cct cac atc tc
GSTT1-rev.	tca ccg gat cat ggc cag ca
GSTM1-forw.	gaa ctc cct gaa aag cta aag c
GSTM1-rev.	gtf ggg ctc aaa tat acg gfg a
β -globin-forw.	caa ctt cat cca cgt tca cc
β -globin-rev.	gaa gag cca agg aca ggt ac



후 37°C에서 10분간 배양한 후에 T-butylhydroperoxide를 넣어 반응시켰으며 이때 감소된 NADPH의 농도를 UV/VIS spectrophotometer로 340 nm에서 90초 동안 측정함으로써 GSH-Px의 항산화 정도를 측정하였다.²⁴⁾

혈장 항산화 비타민 분석

대상자들의 혈장 ascorbic acid는 전보²⁴⁾에서와 같이 2, 4-dinitrophenylhydrazine method에 의해 UV/VIS spectrometer로 분석하였다. 혈장을 metaphosphoric acid로 처리하여 단백질을 침전시키고 ascorbic acid를 안정화시켰다. Ascorbic acid는 copper-sulfate로 처리하면 dehydroascorbic acid로 산화된 뒤 diketogluconic acid로 가수분해된다. 이를 2, 4-dinitrophenylhydrazine으로 처리하면 안정한 적갈색물의 osazone이 형성되는데 이것을 UV/VIS spectrophotometer로 520 nm에서 측정하여 혈장 ascorbic acid의 농도를 분석하였다.

대상자들의 혈장 α -tocopherol, γ -tocopherol, 및 carotenoids (α -carotene and β -carotene)은 전보²⁴⁾에서와 같이 ethanol로 단백질을 제거하고 n-hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시키고, mobile phase (metanol: dichloromethane = 85 : 15)에 녹여 HPLC로 측정하였다.

혈장 TRAP 수준 분석

혈장 총 유리포집 항산화능 (Total Radical-trapping Antioxidant Potential, TRAP)은 수용성 azo 화합물 ABTS [2, 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline 6-sulfonate)] radical이 열에 의해 분해되면 일정한 비율로 peroxy radical을 생성한다는 이점을 이용한 방법으로써⁷⁾ 혈장 내 α -tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리 포집 항산화능을 나타내므로 시간과 노력을 절약할 수 있는 매우 유용한 방법이다. 혈장 중 TRAP 수준은 전보²⁴⁾에서와 같이 Rice-Evans와 Miller의 inhibition assay에 따라 분석하였다. 이 방법은 ABTS [2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate), 150 μ M]와 metmyoglobin (2.5 μ M)을 H₂O₂ (75 μ M)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 absorbance의 억제 정도는 sample (0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30°C에서 배양한 후 UV/VIS spectrophotometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 수준은 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC

(Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, mM)로 표현하였다.

Alkaline comet assay를 이용한 임파구 DNA 손상 측정

Alkaline comet assay는 전보²⁴⁾에서와 같이 Singh (1998)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였다. 신선한 전혈 70 μ L을 900 μ L PBS에 섞은 후 Histopaque 1077을 100 μ L 사용해 임파구만을 분리하였다. 처리 과정을 마친 임파구 20 μ L를 채취하여 75 μ L의 0.7% low melting agarose gel (LMA)과 섞은 후, normal melting agarose (NMA)가 precoating 된 fully frosted slide 위로 고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4°C 냉장보관 하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μ L로 한 겹 더 덮었다. Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris)에 사용직전에 1% Triton X-100와 10% Dimethyl sulfoxide를 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 냉장 보관하였던 전기영동 buffer (300 mM NaOH, 10 mM Na₂EDTA, pH > 13)를 채워 40분 동안 unwinding시켜 DNA의 알칼리에 취약한 부위가 드러나게 한 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 Tris 완충용액 (pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 μ L/mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera (Nikon Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 comet image analyzing system (Kinetic image 4.0, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 임파구의 DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편 거리인 tail length (TL), % DNA in tail, 그리고 TL과 % DNA in tail을 곱한 값인 tail moment (TM) 등 3가지 분석 지표로 살펴보았다.²⁴⁾ 각 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

자료의 처리

모든 자료의 처리는 MS사의 Excel database system을 이용하여 입력한 후 statistical package for social science (SPSS-PC+, version 19.0)을 이용하여 처리하였다. 각 자료를 검토한 후에 사분위 범위 (inter quartile range)의 1.5배 밖에 있는 이상치 (outlier)는 제외하고 통계처리 하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 \pm 표준오차 (SE)를 구하였고 두 군 간의 평균치의 유의성은 Student's t-test를 사용하였다. 세군 이상의 평균치의 유의성은 일원분산분석 (one-way ANOVA) 및 이원분산분석 (two-way ANOVA)을 실시하여 F값을 구

하였고, LSD (least significant difference) 혹은 Duncan's multiple range test로 사후 검증하여 구하였다. 변수들 간의 이변량 상관관계는 Pearson's correlation coefficient인 r 계수로 검증하였고, 제어할 변수가 있을 경우는 편상관계수 (partial correlation)를 구하였다. 모든 결과에 대하여 통계적 유의성 검증은 $\alpha = 0.05$ 수준으로 하였다.

결 과

연구대상자들의 일반사항

연구대상자의 일반사항은 Table 2와 같다. 대상자 301명 중 남성은 137명으로 평균나이는 20.7 ± 0.2 세였고, 여성은 164명으로 20.5 ± 0.2 세였다. 대상자 중 흡연자는 88명 (남성 흡연자 84명, 여성 흡연자 4명)으로 남자 흡연자의 비율이 더 많았다. 남성 흡연자는 하루 평균 13.3 ± 0.8 개피의 담배를 피우고 평균 4.4 ± 0.3 년 동안 흡연을 하였고, 여성 흡연자는 하루 평균 3.8 ± 0.6 개피의 담배를 피우고 평균 2.5 ± 1.0 년 동안 흡연을 하였다. 흡연량과 흡연횟수를 감안하여 1년에 한 갑 (20개피)을 피우는 것을 기준으로 계산한 흡연력 (pack years)²⁾은 남성 흡연자는 3.0 ± 0.3 년이었고 여성 흡연자는 0.4 ± 0.1 년이었다.

임파구 DNA 손상 및 항산화 지표에 대한 흡연의 영향

임파구 DNA 손상은 흡연의 영향을 받는 것으로 나타났다. 대상자의 임파구 DNA 손상을 tail length (TL)로 보았을 때와 tail moment (TM)로 보았을 때 흡연자의 DNA 손상도가 비흡연자에 비해 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 1). 그러나 % DNA in tail (TD) 지표로 본 DNA 손상도는 흡연여부에 따라 차이를 보이지 않았다. 혈장 α -tocopherol 이나 γ -to-

copherol 수준은 차이를 보이지 않은 반면 혈장 비타민 C와 β -carotene 수준이 흡연자에 비해 비흡연자에서 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$) (Fig. 2). 혈장 총항산화력을 나타내는 TRAP 수준도 흡연자에 비해 비흡연자에서 높았으며, 대상자의 적혈구 SOD는 흡연에 따른 차이를 보이지 않은 반면, catalase와 GSH-Px 활성도는 흡연자에 비해 비흡연자에서 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$) (Fig. 3).

임파구 DNA 손상 및 항산화 지표에 대한 GST 유전자 다형성의 영향

전체 대상자 중 24.6%가 GSTM1-present genotype이었고, 75.4%가 GSTM1-null genotype이었다. GSTT1으로 분류해 보았을 때 33.2%가 GSTT1-present genotype이었고, 66.8%가 GSTT1-null genotype을 보였다. 대상자의 GSTM1 genotype에 따라 임파구 DNA 손상 및 항산화 지표 값을 비교해 본 결과는 Table 3과 같다. TL 및 TM으로 본 임파구 DNA 손상은 GSTM1 genotype에 따라 차이를 보이지 않았으나 TD로 본 임파구 DNA 손상은 GSTM1-present geno-

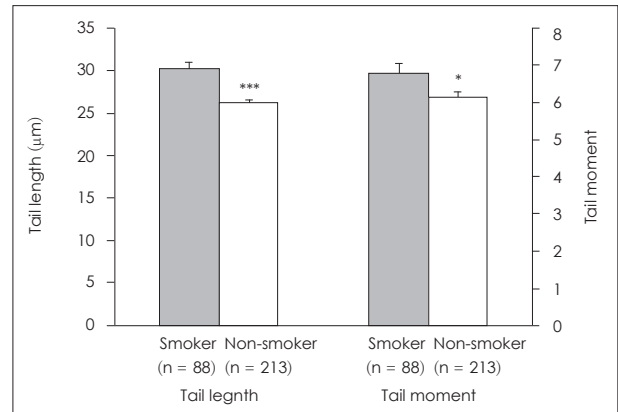


Fig. 1. Levels of lymphocyte DNA damage of smokers and non-smokers, measured with the comet assay. Bars indicates S.E. of mean. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$.

Table 2. General characteristics of the subjects

Variables	Men (n = 137)	Women (n = 164)
Age, yrs (range)	$20.7 \pm 0.2^{1)}$ (18-30)	20.5 ± 0.2 (18-29)
Smoker, n (%)	84 (61.3%)	4 (2.4%)
Height, cm	175.3 ± 0.5	161.0 ± 0.4
Body weight, kg	71.3 ± 1.0	55.4 ± 0.7
BMI, kg/m ²	23.2 ± 0.3	21.4 ± 0.2
Waist-hip ratio	0.83 ± 0.004	0.81 ± 0.003
SBP ²⁾ , mmHg	126.7 ± 1.0	114.7 ± 0.9
DBP ³⁾ , mmHg	81.7 ± 0.7	75.0 ± 0.6
Smoking habits		
Cigarettes/day	13.3 ± 0.8	3.8 ± 0.6
Smoking years	4.4 ± 0.3	2.5 ± 1.0
Pack-years ⁴⁾	3.0 ± 0.3	0.4 ± 0.1

1) All values are means \pm S.E. 2) SBP: systolic blood pressure 3) DBP: diastolic blood pressure 4) Pack-years: (Cigarettes smoked/day \times years smoked)/20

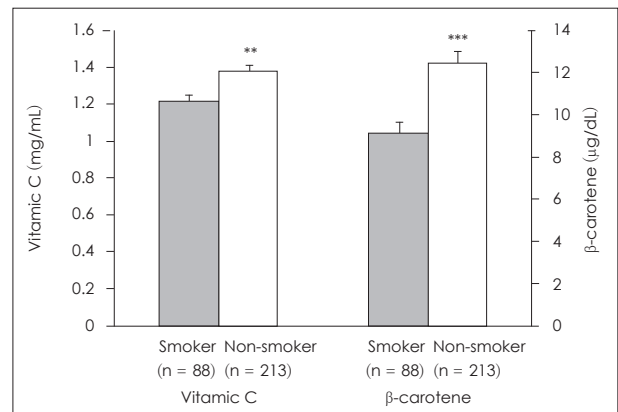


Fig. 2. Plasma concentration of vitamin C and β -carotene of smokers and non-smokers. Bars indicates S.E. of mean. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

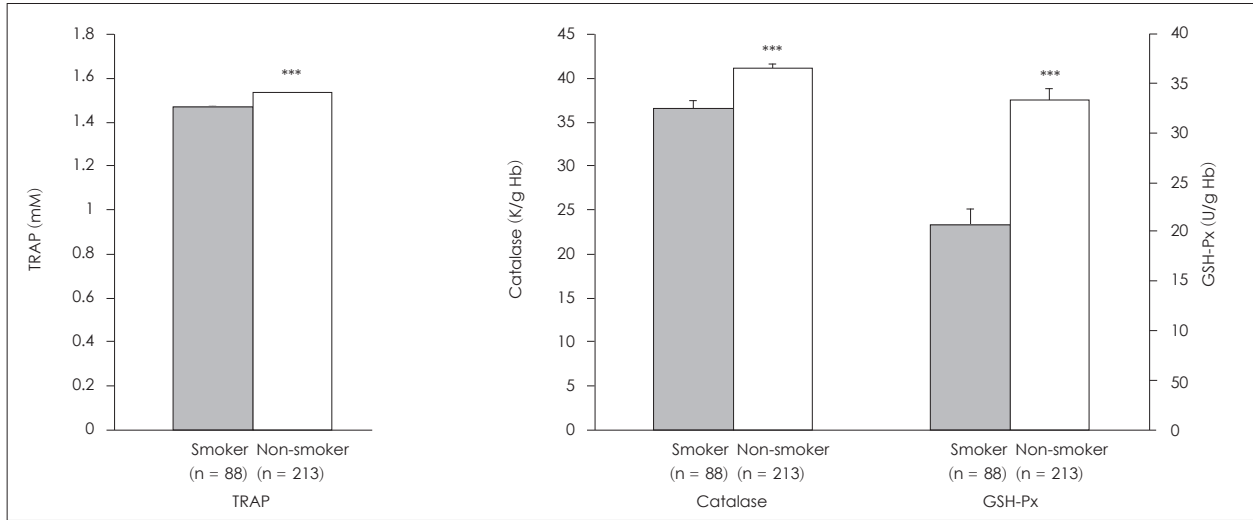


Fig. 3. Plasma levels of TRAP and erythrocyte catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities of smokers and non-smokers. Bars indicates S.E. of mean. ***: $p < 0.001$.

Table 3. Mean values of biomarkers in the subjects measured for GSTM1 genotypes

Variables	GSTM1 genotype		Significance
	Present (n = 74)	Null (n = 227)	
% tail DNA ¹⁾ (TD)	19.3 ± 0.5 ²⁾	21.5 ± 0.3	0.001 ³⁾
Tail moment ¹⁾ (TM)	5.99 ± 0.26	6.41 ± 0.16	NS ⁴⁾
Tail length ¹⁾ (TL)	27.4 ± 0.8	27.2 ± 0.5	NS
Plasma vit C (mg/dL)	1.31 ± 0.05	1.33 ± 0.03	NS
Plasma α-tocopherol (μg/dL)	1219 ± 78	1220 ± 38	NS
Plasma γ-tocopherol (μg/dL)	119.7 ± 8.2	127.7 ± 4.2	NS
Plasma α-carotene (μg/dL)	3.74 ± 0.27	4.02 ± 0.16	NS
Plasma β-carotene (μg/dL)	10.8 ± 0.8	11.6 ± 0.5	NS
Plasma cryptoxanthin (μg/dL)	21.7 ± 0.9	22.1 ± 0.6	NS
Plasma TRAP (mM)	1.52 ± 0.01	1.52 ± 0.01	NS
Erythrocyte catalase (K/g Hb)	39.6 ± 0.9	39.9 ± 0.5	NS
Erythrocyte SOD (U/g Hb)	2301 ± 40	2243 ± 22	NS
Erythrocyte GSH-Px (U/g Hb)	27.2 ± 1.7	30.6 ± 1.0	NS

1) Measured with the comet assay 2) Mean ± S.E. 3) Values of GSTM1-present genotype are significantly different from those of GSTM1-null genotype by Student t-test 4) NS: statistically not significant between GSTM1-present and GSTM1-null genotype by Student t-test

type에 비해 GSTM1 null genotype에서 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 혈장 항산화 비타민은 GSTM1 genotype에 따라 차이를 보이지 않았으며 적혈구 항산화 효소 활성도도 GSTM1 genotype에 따른 차이가 나타나지 않았다.

대상자를 GSTT1 genotype에 따라 분류하여 임파구 DNA 손상 및 항산화 지표 값을 본 결과 TL로 본 DNA 손상도는 차이를 보이지 않았으나 TD와 TM으로 본 DNA 손상도가 GSTT1-present genotype에 비해 null genotype에서 오히려 유의적으로 낮아 GSTM1에서와 반대의 경향을 보였다 (Table 4). 대상자의 혈장 β-carotene 수준은 GSTT1-present genotype에 비해 null genotype에서 유의적으로 높았다. 적혈구

항산화 효소 활성도는 GSTT1 genotype 간 차이를 보이지 않았다.

임파구 DNA 손상, 흡연 및 GST genotype 간의 관련성

대상자의 임파구 DNA 손상도와 항산화 지표에 영향을 미치는 요인이 흡연과 GST genotype인 것으로 나타났으므로 GST 흡연자와 비흡연자 중 어느 군의 DNA 손상도가 GST genotype에 의해 더 영향을 받는지를 알아보기 위해 two-way ANOVA로 분석한 결과는 Table 5와 같다. GSTM1 genotype에서 임파구 DNA 손상도에 미치는 흡연과 GSTM1 genotype의 영향이 모두 나타났으며 흡연과 GSTM1 geno-

type의 상호작용 효과는 없었다. GSTT1의 경우도 GSTM1에서처럼 흡연의 영향과 GSTT1 genotype의 영향이 모두 나타났으며, 역시 흡연과 GSTT1 genotype의 상호작용 효과는 나타나지 않았다. 이와 같은 상호작용 결과는 GSTM1 gen-

otype 및 GSTT1 genotype 모두 흡연의 영향과 GSTT1 genotype의 영향이 독립적이라는 것을 보여주었다.

Fig. 4는 GSTM1 present 및 GSTM1 null, 그리고 GSTT1 present 및 GSTT1 null 각 군에 있어서 흡연자와 비흡연자의

Table 4. Mean values of biomarkers in the subjects measured for GSTT1 genotypes

Variables	GSTT1 genotype		Significance
	Present (n = 100)	Null (n = 201)	
% tail DNA ¹⁾ (TD)	22.3 ± 0.6 ²⁾	20.4 ± 0.3	0.004 ³⁾
Tail moment ¹⁾ (TM)	6.84 ± 0.23	6.04 ± 0.16	0.005
Tail length ¹⁾ (TL)	27.8 ± 0.6	27.0 ± 0.5	NS ⁴⁾
Plasma vit C (mg/dL)	1.35 ± 0.04	1.32 ± 0.03	NS
Plasma α-tocopherol (μg/dL)	1229 ± 56	1215 ± 43	NS
Plasma γ-tocopherol (μg/dL)	121.9 ± 5.8	127.5 ± 4.8	NS
Plasma α-carotene (μg/dL)	3.74 ± 0.23	4.06 ± 0.17	NS
Plasma β-carotene (μg/dL)	9.8 ± 0.6	12.2 ± 0.6	0.003
Plasma cryptoxanthin (μg/dL)	22.2 ± 0.9	21.9 ± 0.6	NS
Plasma TRAP (mM)	1.51 ± 0.01	1.52 ± 0.01	NS
Erythrocyte catalase (K/g Hb)	40.0 ± 0.8	39.8 ± 0.5	NS
Erythrocyte SOD (U/g Hb)	2247 ± 38	2263 ± 23	NS
Erythrocyte GSH-Px (U/g Hb)	29.6 ± 1.5	29.8 ± 1.1	NS

1) Measured with the comet assay 2) Mean ± S.E. 3) Values of GSTM1-present genotype are significantly different from those of GSTM1-null genotype by Student t-test 4) NS: statistically not significant between GSTM1-present and GSTM1-null genotype by Student t-test

Table 5. Effect of smoking and exercise on lymphocyte DNA damage according to the GSTM1 or GSTT1 genotypes in the subjects

Variables	% tail DNA (TD)		Tail moment (TM)		Tail length (TL)	
	Mean ± S.E.	Significance	Mean ± S.E.	Significance	Mean ± S.E.	Significance
GSTM1 genotype						
Smokers ¹⁾ (n = 88)						
GSTM1 present (n = 23)	19.0 ± 1.0 ²⁾	NS ³⁾	6.47 ± 0.48	NS	31.3 ± 1.3	NS
GSTM1 null (n = 65)	21.0 ± 0.6		6.88 ± 0.27		29.9 ± 0.8	
Non-smokers ⁴⁾ (n = 213)						
GSTM1 present (n = 51)	19.4 ± 0.6	0.001 ⁵⁾	5.80 ± 0.31	NS	25.9 ± 0.9	NS
GSTM1 null (n = 162)	21.8 ± 0.4		6.22 ± 0.19		26.1 ± 0.5	
Smoking effect	–	NS	–	NS	–	0.000 ⁶⁾
GSTM1 effect	–	0.015 ⁷⁾	–	NS	–	NS
Interaction	–	NS	–	NS	–	NS
GSTT1 genotype						
Smokers (n = 88)						
GSTT1 present (n = 37)	20.6 ± 0.9	NS	6.61 ± 0.40	NS	29.4 ± 1.1	NS
GSTT1 null (n = 51)	20.4 ± 0.6		6.91 ± 0.29		30.8 ± 0.9	
Non-smokers (n = 213)						
GSTT1 present (n = 63)	23.2 ± 0.7	0.000 ⁵⁾	6.96 ± 0.28	0.000	26.9 ± 0.7	NS
GSTT1 null (n = 150)	20.3 ± 0.4		5.74 ± 0.19		25.7 ± 0.6	
Smoking effect	–	0.016 ⁶⁾	–	NS	–	0.000 ⁶⁾
GSTT1 effect	–	0.003 ⁷⁾	–	0.028 ⁷⁾	–	NS
Interaction	–	NS	–	NS	–	NS

1) Smoked 8 or more cigarettes/day for 6 months or longer 2) Mean ± S.E. 3) NS: Statistically not significant between GSTT1-present and GSTT1-null genotype by Student t-test 4) Currently not smoked 5) Values of GSTM1-present or GSTT1-present genotype are significantly different from those of GSTM1-null or GSTT1-null genotype by Student t-test 6) p-value of smoking effect by two-way ANOVA 7) p-value of GSTM1 or GSTT1 effect by two-way ANOVA

임파구 DNA 손상의 차이를 나타내 주고 있다. DNA 손상정도 (TL)는 GSTM1 present 및 GSTM1 null군 모두 흡연자에 비해 비흡연자에서 낮았다. GSTT1의 경우도 마찬가지로 GSTT1 present 및 GSTT1 null군 모두 흡연자에 비해 비흡연자의 DNA 손상이 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$).

임파구 DNA 손상, 항산화 지표 및 GST 유전자 다형성 간의 상관관계

흡연이 대상자의 DNA 손상도에 미치는 영향이 크므로 흡연의 영향을 제어한 후 전체 대상자의 임파구 DNA 손상도와 항산화 관련 지표들 간의 상관관계를 본 결과 tail length

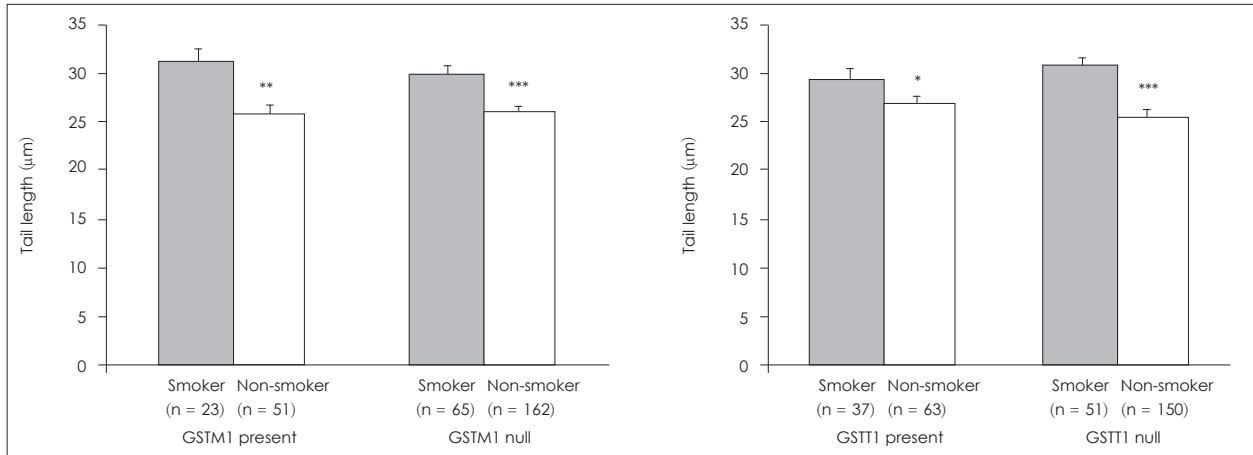


Fig. 4. Lymphocyte tail length of the cell reflected DNA damage in the smokers and nonsmokers by GSTM1 or GSTT1 null/present genotype of the subjects. Bars indicates S.E. of mean. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

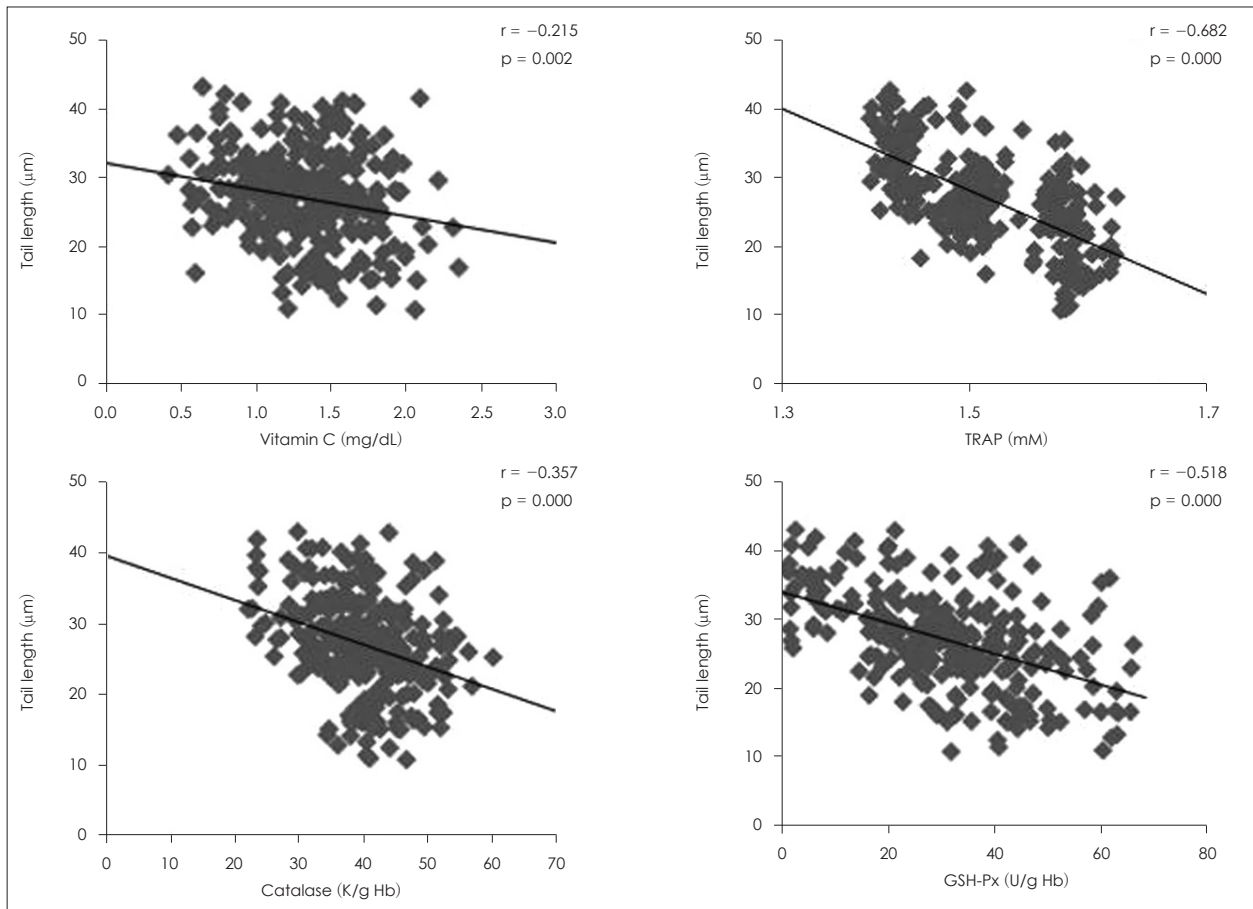


Fig. 5. Pearson's correlations between lymphocyte DNA damage (tail length) and their plasma antioxidant parameters or erythrocyte enzymes in the all subjects ($n = 301$) after adjusting smoking pack-years. r = Pearson's correlation coefficient, p = probability.

로 본 임파구 DNA 손상도와 혈장 비타민 C, TRAP, 적혈구 catalase, 혹은 GSH-Px 활성도 사이에 음의 상관관계가 나타났다 ($p < 0.001$)(Fig. 5).

역시 흡연의 영향을 제어한 후, 임파구 DNA 손상도와 항산화 관련 지표들 간의 상관관계를 대상자의 GST 유전자 다형성별로 나누어 본 결과는 Table 6과 같다. 먼저 대상자를 GSTM1 genotype으로 본 경우, present type에서 DNA 손상도와 혈장 비타민 C, TRAP, 적혈구 catalase 혹은 GSH-Px 활성도 사이에 유의적인 음의 상관관계가 나타났다 ($p < 0.05$). 이에 비해 GSTM1 null type에서는 present type에서 보였던 DNA 손상도와 비타민 C 사이에 음의 상관성이 없어졌으며, 나머지 DNA 손상도와 혈장 TRAP, 적혈구 catalase 혹은 GSH-Px 활성도 사이에 유의적인 음의 상관관계는 여전히 나타났다 (Table 6). 대상자를 GSTT1 genotype으로 나누어 본 경우, present genotype에서 DNA 손상도와 혈장 TRAP, 적혈구 catalase 혹은 GSH-Px 활성도 사이에 음의 상관관계가 나타났으며 이 음의 상관성들은 GSTT1-null genotype에서도 보였다. GSTT1-null genotype에서는 DNA 손상도와 혈장 비타민 C 사이에도 음의 상관관계를 보였으며, DNA 손상도와 혈장 α -carotene, β -carotene 혹은 cryptoxanthin 수준 사이에 present genotype에서는 나타나지 않았던 유의적인 정의 상관관계를 보였다 (Table 6).

고찰

GST는 phase II 해독 효소이므로 GST 유전자 다형성은 각 개인에 있어서 외부 독성물질을 대사시키거나 해독시키는 능력에 지대한 영향을 미치며 이에 따라 개인의 질병 민감도도 달라질 수 있다.¹⁴⁾ 또 흡연하거나 혹은 산화 스트레스가 있을 때 증가하는 ROS의 증가 속도도 GST 효소에 의해 영향 받음이 보고되었다.²⁵⁾ 따라서 GST 유전자 다형성에 따라 DNA 손상은 어떻게 변화하는지, 또 DNA 손상과 항산화 지표들 사이의 상관성은 어떻게 영향을 받는지를 살피는 것은 항산화 상태 개선을 위한 개인별 맞춤 영양처방과 관련되어 매우 의미있는 시도일 것이다.

본 연구결과 대상자의 임파구 DNA 손상도에 가장 크게 영향을 미치는 요인은 흡연과 GST 유전자 다형성인 것으로 나타났다. 흡연을 하게 되면 신체 내에서 자유유리기가 많이 생성되어 ROS 생산이 비정상적으로 높아져서 oxidative stress 현상이 나타나며 그 결과로 세포의 DNA 손상이 증가하는 것이 이미 보고된 바 있다.^{19,26)} 흡연의 이러한 영향은 본 연구에서 대상자를 GSTM1 및 GSTT1 genotype으로 나눈 후에 흡연에 따라 분석하였을 때에 각 genotype 안에서 흡연자의 DNA 손상도가 비흡연자에 비해 높은 것으로 나타나 대상자

Table 6. Pearson's correlation coefficients between lymphocyte DNA damage and antioxidant-related parameters according to the GSTM1 and GSTT1 genotypes in the subjects after adjusting smoking pack-years

Variables	GSTM1				GSTT1			
	Present (n = 74)		Null (n = 227)		Present (n = 100)		Null (n = 201)	
	$r^{1)}$	$p^{2)}$	r	p	r	p	r	p
Tail DNA								
Plasma TRAP		NS	-0.192	0.017		NS		NS
Plasma α -carotene		NS		NS		NS	0.232	0.007
Plasma β -carotene		NS		NS		NS	0.222	0.010
Tail moment								
Plasma vitamin C	-0.356	0.019		NS		NS		NS
Plasma α -carotene		NS		NS		NS	0.200	0.020
Plasma β -carotene		NS		NS		NS	0.207	0.016
Plasma cryptoxanthin		NS	0.253	0.001		NS	0.265	0.002
Plasma TRAP	-0.436	0.004	-0.522	0.000	-0.387	0.002	-0.540	0.000
Erythrocyte catalase	-0.492	0.001	-0.161	0.041		NS	-0.292	0.001
Erythrocyte GSH-Px	-0.503	0.001	-0.188	0.019		NS	-0.302	0.000
Tail length								
Plasma vitamin C	-0.478	0.001		NS		NS	-0.228	0.008
Plasma cryptoxanthin		NS	0.282	0.000	0.251	0.045	0.256	0.003
Plasma TRAP	-0.674	0.000	-0.695	0.000	-0.617	0.000	-0.700	0.000
Erythrocyte catalase	-0.546	0.000	-0.318	0.000	-0.344	0.005	-0.356	0.000
Erythrocyte GSH-Px	-0.703	0.000	-0.481	0.000	-0.439	0.000	-0.549	0.000

1) r = Pearson's correlation coefficients 2) p = probability 3) NS = not significant

의 DNA 손상에 미치는 흡연의 영향이 큼을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

대상자들의 DNA 손상도는 흡연 뿐 아니라 대상자의 GST 유전자 다형성에 따라서도 차이를 보였으며, GSTM1의 경우는 null genotype에서, GSTT1의 경우는 반대로 present genotype에서 유의적으로 높게 나타났다. GSTM1의 경우 null genotype에서 DNA 손상이 증가한 결과들이 몇몇 연구에서 보고되었으며 Topinka 등²⁷⁾은 환경적으로 공기 오염에 노출된 인구집단 중 GSTM1-null genotype에서 GSTM1-present genotype에 비해 DNA 손상이 높음을 관찰하였고, Bennett 등²⁸⁾은 GSTM1-null genotype인 비흡연 여성이 환경적으로 담배에 노출되었을 때 폐암 발생 위험이 유의하게 증가함을 보고하였다. 또 본 연구에서 GSTT1의 경우 null genotype이 아닌 present genotype에서 DNA 손상이 증가하였는데 이러한 결과는 Dusinska 등²⁹⁾이 GSTT1-present genotype에 속하는 대상자들의 H₂O₂ sensitivity로 본 DNA 손상정도 (%DNA in tail)가 null genotype보다 유의적으로 높았다고 보고한 것과 일치한다. GST 효소는 ROS 대사체의 수준을 감소시키고 redox cycling에 의해 산화 스트레스를 조절하는 중요한 역할을 수행하므로 DNA 손상 지표들이 GST genotype에 의해 영향을 받음을 가정해 볼 수 있으나, 본 연구의 결과로 볼 때 GST의 종류에 따라 GSTM1과 GSTT1의 역할이 다를 수 있음을 생각해 볼 수 있다. 그러나 왜 GSTM1에서와는 달리 GSTT1에서는 present genotype에서 DNA 손상이 높은지에 대해서는 명확하게 밝히기 어렵다. 앞으로 GSTM1 외에도 GSTT1 genotype과 산화 스트레스 지표 간의 관련성에 관한 더 깊은 연구가 필요할 것이다.

GST 효소의 유전자 다형성은 몇몇 영양소들과 항산화제의 생체유용성, 대사, 친화성, 활성 등을 변화시켜 산화 스트레스의 민감성을 증가시키는데 민감성이 증가한다는 것은 항산화 영양소를 많이 섭취해야 할 필요가 있다는 의미로 생각해 볼 수 있을 것이다.³⁰⁾ 본 연구에서 DNA 손상도와 대상자의 항산화 지표들과의 상관관계가 GST 유전자 다형성에 따라 어떻게 달라지는지를 알아본 결과, 몇 가지 흥미로운 사실을 볼 수 있었다. 먼저 GSTM1 genotype의 경우는 present와 null genotype에서 모두 혈장 TRAP, 적혈구 catalase, GSH-Px 활성도와 음의 상관관계를 보였으나 혈장 비타민 C 수준은 GSTM1 present genotype에서만 DNA 손상도와 역의 상관성을 보였을 뿐 null genotype에서는 상관성이 나타나지 않았는데 (Table 6), 이는 GSTM1의 경우 present genotype이 null genotype보다 더 민감하게 DNA 손상도를 반영해 준다는 것을 시사한다. 최근 유럽 이탈리아 인구집단에서 암과 영양에 대한 전향적 연구 (EPIC study) 결과를 보면

PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons)-DNA adducts와 혈장 retinol, α -carotene 및 β -carotene 사이에 음의 상관관계가 GSTM1-present genotype에서는 안 나타나고 GSTM1-null genotype에서는 나타났으며, α -tocopherol 혹은 γ -tocopherol 사이에 약한 음의 관련성도 GSTM1-null genotype에서 보였다.³¹⁾ 그러나 이 연구에서 GSTM1 genotype과 몇 가지 혈장 비타민들, 즉 β -cryptoxanthin, lutein, lycopene, zeaxanthin, retinol 및 총 carotenoids 사이엔 아무런 상관관계도 나타나지 않았다. 본 연구에서 GSTT1 genotype의 경우는 DNA 손상도와 비타민 C와의 역의 상관관계가 present genotype에서는 보이지 않았고, null genotype에서 나타나 GSTM1 genotype과는 상반되는 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 DNA 손상도와 항산화 지표들 간의 상관성에 대한 민감도는 GSTM1의 경우는 present genotype에서, GSTT1의 경우는 null genotype에서 더 높다는 것을 말해준다.

한 가지 특이한 결과는 GSTT1 null genotype에서 지용성 항산화 비타민인 혈장 α -carotene, β -carotene 혹은 cryptoxanthin 등 carotenoids 농도와 DNA 손상도 사이에 정의 상관관계가 보였다는 것이다. 192명의 일본인을 대상으로 한 연구에서는 GSTM1 유전자 다형성에 관계없이 혈장 β -carotene과 α -tocopherol 수준은 DNA adducts에 영향을 미치지 않음이 보고³²⁾되었고, 이탈리아 EPIC 연구에서는 GSTM1-null genotype인 건강한 성인의 혈장 α -, β -carotene, retinol 수준이 높을수록 DNA 손상 정도가 낮았으며, present genotype에서는 이러한 경향이 나타나지 않았다.³³⁾ 그러나 Wang 등³³⁾은 GSTT1-null genotype이면서 혈청 β -carotene 수준이 높게 나타난 대상자들의 DNA adducts 수준이 GSTT1 present genotype이면서 항산화 비타민 수준이 낮았던 대상자 보다 높음을 관찰하여 본 연구에서와 유사한 결과를 보고하였다. DNA 손상도와 혈장 carotenoids 수준이 이렇게 정의 상관관계를 보이는 원인은 명확하지 않다. 앞으로 GSTM1 및 GSTT1 유전자 다형성에 따라 DNA 손상과 지용성 비타민 간의 상관관계가 수용성 비타민과의 상관관계와 다른 기전에 대해서는 더욱 철저한 연구가 필요할 것이다.

본 연구의 제한점으로는 GSTM1 및 GSTT1 유전자 다형성에 따른 입파구 DNA 손상도와 항산화 지표의 차이와 상관성을 보기에는 전체 대상자 수가 많지 않았다는 점, 대상자 중 비흡연자에 비해 흡연자의 수가 상대적으로 적어서 흡연 상태 및 GSTM1 및 GSTT1 유전자 다형성이 DNA 손상에 미치는 영향을 일관성 있게 보기 힘들었다는 점, 그리고 대상자가 젊은 대학생들이어서 DNA 손상정도가 적었던 점을 들 수 있다. 본 연구 전체의 대상자 수는 301명으로 적지 않으나 이들을 GSTM1 및 GSTT1으로 다시 분류할 경우 각각의

genotype의 대상자 수는 많지 않다고 볼 수 있다. GSTM1 + / GSTT1- 등으로 genotype간 combination 효과를 보고자 할 경우 산화 스트레스와 관련된 지표의 반응을 명확하게 보기 위해서는 좀 더 다양한 연령의 많은 대상자 수가 필요할 것이다. 특히 흡연의 영향을 좀 더 정확하고 일관성 있게 알아보기 위해서는 흡연력이 높은 대상자를 보강하여 실험을 진행할 필요가 있을 것으로 생각된다.

이 결과들로부터 우리나라 성인의 임파구 DNA 손상도와 항산화 지표들은 GST 유전자 다형성에 따라 차이를 보였으며, 흡연자, GSTM1-null genotype, GSTT1-present genotype 일 경우 DNA 손상을 포함한 항산화 지표가 악화되는 것을 알 수 있었다. 또 임파구 DNA 손상도와 항산화 영양상태 관련 요인들 사이에 나타나는 상관성의 양상이 GSTM1 및 GSTT1 유전자 다형성에 따라 달라짐을 관찰할 수 있었으며 GSTM1-present genotype 및 GSTT1-null genotype의 경우 DNA 손상과 항산화 영양상태 관련요인과의 역의 상관성이 다소 높은 것으로 보아 항산화상태에 더 민감하게 작용할 가능성을 볼 수 있었다. 이 민감성으로 인해 영양중재 연구를 하여 항산화 영양상태를 보강해 줄 때의 DNA 손상 회복 효과는 GSTM1-present genotype과 GSTT1-null genotype에서 더 유리하게 나타날 가능성이 있다. 이와 같은 가정은 Brennan 등³⁰이 암환자에게 watercress를 주었을 때 그 보호효과는 유전적으로 GSTM1과 GSTT1 null genotype인 대상자에게서 더 두드러지게 나타난다고 보고한 것으로도 일부 뒷받침 될 수 있을 것이다. 본 연구결과는 항산화 식품을 통한 영양처방이 더 필요한 집단을 선별하는 연구 및 각 개인의 GSTM1 및 GSTT1 genotype에 따라 맞춤형 영양처방을 할 수 있는 연구를 위한 기초 자료로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

요약 및 결론

본 연구는 젊은 성인 집단을 대상으로 glutathione S-transferase (GST) M1 및 T1 유전자 다형성에 따라 DNA 손상 정도와 신체 항산화 영양 상태 지표와의 상관성이 어떻게 나타나는지를 알아보기 위해 수행되었다. 이를 위하여 건강한 대학생 301명을 대상으로 설문지를 통해 대상자들의 일반 사항을 조사하였고, 혈액을 채취하여 GST genotype, DNA 손상 정도, 적혈구 항산화 효소 활성, 혈장 항산화 비타민 수준 및 혈장 TRAP 수준을 측정하였다.

대상자의 임파구 DNA 손상정도는 비흡연자에 비해 흡연자에서 높았고 혈장 비타민 C, β -carotene, TRAP 수준, 적혈구 catalase와 GSH-Px 활성도 등은 비흡연자에서 유의적

으로 높았다 ($p < 0.05$). GSTM1의 경우는 null genotype에서, GSTT1의 경우는 present genotype에서 임파구 DNA 손상이 유의적으로 높았으며, β -carotene을 제외하고 혈장 항산화 비타민과 적혈구 항산화 효소 활성도는 GSTM1 및 GSTT1 genotype에 따라 차이를 보이지 않았다.

흡연의 영향을 제어한 후 전체 대상자의 임파구 DNA 손상도와 항산화 관련 지표들 간의 상관관계를 본 결과 임파구 DNA 손상도와 혈장 비타민 C, TRAP, 적혈구 catalase, 혹은 GSH-Px 활성도 사이에 음의 상관관계가 나타났다. 또 DNA 손상도와 비타민 C 수준의 경우 음의 상관관계가 GSTM1은 present genotype에서, GSTT1은 null genotype에서 나타났다. 특이한 결과로 GSTT1의 경우 DNA 손상도와 혈장 α -carotene, β -carotene 혹은 cryptoxanthin 수준 사이에 present genotype에서는 나타나지 않았던 유의적인 정의 상관관계가 나타났다.

이상의 결과로부터, 우리나라 젊은 성인에서 흡연을 하거나, GSTM1 유전자가 결손되거나 GSTT1 유전자가 있을 경우 DNA 손상정도가 높아져서 항산화 상태가 악화됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 앞으로 항산화 식품을 보충하는 영양중재 실험을 수행할 경우 GSTM1-null genotype 및 GSTT1-present genotype 대상자에서 항산화 영양상태의 개선을 통한 DNA 손상 보호효과가 더 유리하게 나타날 가능성을 암시해 준다.

Literature cited

- 1) Begg CB, Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics* 1994; 50(4): 1088-1101
- 2) Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutat Res* 2009; 681(1): 51-67
- 3) Porrini M, Riso P, Brusamolino A, Berti C, Guarnieri S, Visioli F. Daily intake of a formulated tomato drink affects carotenoid plasma and lymphocyte concentrations and improves cellular antioxidant protection. *Br J Nutr* 2005; 93(1): 93-99
- 4) Lagadu S, Lechevrel M, Sichel F, Breton J, Pottier D, Couderc R, Moussa F, Prevost V. 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative damage in oesophageal cancer patients: lack of association with antioxidant vitamins and polymorphism of hOGG1 and GST. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 157
- 5) Pool-Zobel BL, Bub A, Müller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis* 1997; 18(9): 1847-1850
- 6) Noroozi M, Angerson WJ, Lean ME. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1998; 67(6): 1210-1218
- 7) Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res* 2003; 529(1-2): 77-86
- 8) Marcon F, Andreoli C, Rossi S, Verdina A, Galati R, Crebelli R.

- Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutat Res* 2003; 541(1-2): 1-8
- 9) Sinha R, Caporaso N. Diet, genetic susceptibility and human cancer etiology. *J Nutr* 1999; 129(2S Suppl): 556S-559S
 - 10) Hoffmann H, Isner C, Högel J, Speit G. Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 2005; 20(5): 359-364
 - 11) Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. *IARC Sci Publ* 1999; (148): 231-249
 - 12) Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem* 1994; 26(3): 295-308
 - 13) Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6(9): 733-743
 - 14) Nan HM, Kim H, Lim HS, Choi JK, Kawamoto T, Kang JW, Lee CH, Kim YD, Kwon EH. Effects of occupation, lifestyle and genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. *Carcinogenesis* 2001; 22(5): 787-793
 - 15) Ye Z, Song H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005; 41(7): 980-989
 - 16) Davies SM, Bhatia S, Ross JA, Kiffmeyer WR, Gaynon PS, Raddloff GA, Robison LL, Perentesis JP. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100(1): 67-71
 - 17) Masetti S, Botto N, Manfredi S, Colombo MG, Rizza A, Vassalle C, Clerico A, Biagini A, Andreassi MG. Interactive effect of the glutathione S-transferase genes and cigarette smoking on occurrence and severity of coronary artery risk. *J Mol Med (Berl)* 2003; 81(8): 488-494
 - 18) Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, Testa A. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat Res* 2007; 633(1): 1-12
 - 19) Park E, Kang MH. Smoking and high plasma triglyceride levels as risk factors for oxidative DNA damage in the Korean population. *Ann Nutr Metab* 2004; 48(1): 36-42
 - 20) Jeon GI, Park E. Effect of glutathione S-transferase polymorphisms on the antioxidant system. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2007; 36(6): 708-719
 - 21) Jo HR, Lee HJ, Kang MH. Antioxidative status, DNA damage and lipid profiles in Korean young adults by glutathione S-transferase polymorphisms. *Korean J Nutr* 2011; 44(1): 16-28
 - 22) Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300(Pt 1): 271-276
 - 23) Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(14): 1159-1164
 - 24) Park EJ, Kim JS, Jeon EJ, Kim HY, Park YK, Kang MH. The effects of purple grape juice supplementation on improvement of antioxidant status and lymphocyte DNA damage in Korean smokers. *Korean J Nutr* 2004; 37(4): 281-290
 - 25) Kim YD, Eom SY, Zhang YW, Kim H, Park JD, Yu SD, Lee CH, Arashidani K, Kawamoto T, Kim H. Modification of the relationship between urinary 8-OHdG and hippuric acid concentration by GSTM1, GSTT1, and ALDH2 genotypes. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30(4): 338-342
 - 26) McGill HC Jr. The cardiovascular pathology of smoking. *Am Heart J* 1988; 115(1 Pt 2): 250-257
 - 27) Topinka J, Binková B, Mracková G, Stávková Z, Peterka V, Benes I, Dejmek J, Leníček J, Pilčík T, Srám RJ. Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. *Environ Mol Mutagen* 1997; 30(2): 184-195
 - 28) Bennett WP, Alavanja MC, Blomeke B, Vähäkangas KH, Castrén K, Welsh JA, Bowman ED, Khan MA, Flieder DB, Harris CC. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(23): 2009-2014
 - 29) Dusinská M, Ficek A, Horská A, Raslová K, Petrovská H, Vallová B, Drlicková M, Wood SG, Stupáková A, Gasparovic J, Bobek P, Nagyová A, Kováčiková Z, Blazicek P, Liegel U, Collins AR. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res* 2001; 482(1-2): 47-55
 - 30) Reszka E, Wasowicz W, Gromadzinska J. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. *Br J Nutr* 2006; 96(4): 609-619
 - 31) Palli D, Masala G, Vineis P, Garte S, Saieva C, Krogh V, Panico S, Tumino R, Munnia A, Riboli E, Peluso M. Biomarkers of dietary intake of micronutrients modulate DNA adduct levels in healthy adults. *Carcinogenesis* 2003; 24(4): 739-746
 - 32) Wang Y, Ichiba M, Oishi H, Iyadomi M, Shono N, Tomokuni K. Relationship between plasma concentrations of beta-carotene and alpha-tocopherol and life-style factors and levels of DNA adducts in lymphocytes. *Nutr Cancer* 1997; 27(1): 69-73
 - 33) Wang Y, Ichiba M, Iyadomi M, Zhang J, Tomokuni K. Effects of genetic polymorphism of metabolic enzymes, nutrition, and life-style factors on DNA adduct formation in lymphocytes. *Ind Health* 1998; 36(4): 337-346
 - 34) Brennan P, Hsu CC, Mollan N, Szeszenia-Dabrowska N, Lisowska J, Zaridze D, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Gemignani F, Chabrier A, Hall J, Hung RJ, Boffetta P, Canzian F. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet* 2005; 366(9496): 1558-1560