

Mn-SOD와 GST 유전자 다형성에 따른 유아의 산화손상지표의 분포*

신유경^{1,2} · 최지원¹ · 오세영¹ · 정자용^{1†}

경희대학교 생활과학대학 식품영양학과,¹ 서울유유협동조합 중앙연구소²

Oxidative damage biomarker levels according to Mn-SOD and GST gene polymorphisms in preschool children*

Shin, You-kyung^{1,2} · Choi, Ji-Won¹ · Oh, Se-Young¹ · Chung, Jayong^{1†}

¹Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 02447, Korea

²R&D center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan, Kyunggi 15407, Korea

ABSTRACT

Purpose: Genetic polymorphisms in antioxidant defense and detoxification genes may modulate the levels of oxidative stress biomarkers. **Methods:** A total of 301 healthy preschool-aged children in the Seoul and Kyung-gi areas were recruited. DNA was extracted from blood for genotyping of manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) Val16Ala, glutathione S-transferase (GST) P1 Ile105Val, GSTT1 present/null, and GSTM1 present/null polymorphisms by PCR-restriction fragment length polymorphism or multiplex PCR analyses. In addition to a questionnaire survey, the levels of urinary 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine (8-OHdG) and plasma malondialdehyde (MDA) were measured by ELISA. **Results:** Significantly higher urinary 8-OHdG concentrations were observed in GSTP1 Ile/Val + Val/Val genotype ($p = 0.030$), and tended to be higher in Mn-SOD Val/Val genotype ($p = 0.065$). On the other hand, exposure to environmental tobacco smoking (ETS) and interaction between ETS and gene polymorphisms did not significantly influence either urinary 8-OHdG concentrations or serum MDA. **Conclusion:** Based on our findings, GSTP1 Ile/Val gene polymorphisms might modulate the levels of oxidative stress biomarkers in healthy preschool children.

KEY WORDS: Genetic polymorphism, Mn-superoxide dismutase, glutathione S-transferase, 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine

서 론

활성산소는 산소의 체내 대사과정과 더불어 흡연, 환경 오염 등의 외부 자극으로 인하여 생성된다. 활성산소의 일부는 체내에서 매우 중요한 역할을 하기도 하지만 대부분은 항산화 방어기전에 의해 제거되며, 생리적으로 정상적인 상태에서는 활성산소 생성과 항산화 체계에 의한 제거 작용이 균형을 이루고 있다.¹ 산화 스트레스는 체내 활성산소가 비정상적으로 과다하게 축적되어 있는 상태로, 산화 스트레스의 증가는 세포 내 DNA, 지질, 단백질 등의 파괴를 유도하여 노화는 물론 암을 비롯하여, 심혈관계 질환, 뇌 질환, 염증성 질환 등 다양한 질병의 발생에 관여한다.²⁻⁷ 활성산소에 의한 산화적 손상을 억제하기 위한 체내 항산

화 방어 체계는 항산화 영양소와 항산화 효소의 작용으로 이루어지는데 이러한 항산화 능력은 개개인에 따라 다르며 유전적 요인이 함께 관여하는 것으로 생각되고 있어 이에 대한 연구가 필요하다.

Superoxide dismutase (SOD)는 세포 내 효과적인 항산화 효소의 하나로 수퍼옥사이드 라디칼 (O_2^-)을 과산화수소로 전환함으로써 조직의 손상을 방지하는 역할을 한다. SOD는 3가지 isoform이 존재하는데 그 중 Mn-SOD는 O_2^- 의 주요 생성 장소인 미토콘드리아에 위치하여 기능을 한다. Mn-SOD 유전자는 염색체의 6q25 부위에 위치하고 5개의 코돈으로 이루어져 있으며 이들 코돈 부위를 변형시키는 단일염기다형성 (single nucleotide polymorphism, SNP)이 보고된 바 있다.⁸ 특히 Mn-SOD Val16Ala SNP는

Received: September 9, 2015 / Revised: September 25, 2015 / Accepted: October 16, 2015

*This work was supported by grants from the Basic Science Research Program of the National Research Foundation (NRF2013 R1A1A2007613).

†To whom correspondence should be addressed.
tel: +82-2-961-0977, e-mail: jchung@khu.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mn-SOD의 16번째 아미노산이 발린 (Val)에서 알라닌 (Ala)으로 치환되는 다형성으로 Mn-SOD의 기능을 변화시켜 산화적 손상과 관련된 여러 질병에 대한 위험도에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.⁹⁻¹¹

Glutathione S-transferase (GST)는 외부 이물질의 대사과정 중 생성된 친전자성 대사산물 (electrophilic metabolite)을 글루타티온과 결합시켜 배설을 유도함으로써 해독작용의 역할을 한다.¹² GST는 지질 과산화와 DNA의 산화적 손상을 일으킬 수 있는 다양한 물질들을 기질로 사용할 수 있어 매우 광범위하게 산화적 손상에 대한 방어 효소로 작용한다. GST는 GSTP1, GSTM1, GSTT1 등의 isoform 형태를 가지고 있으며, GSTP1의 경우 GSTP1 Ile105Val, GSTM1과 GSTT1의 경우 각각의 유전자에 대한 삽입/결손 (present/null) 유전자 다형성이 이들 효소의 활성화에 변화를 주는 것으로 보고된 바 있다.¹³⁻¹⁵

기존의 산화 스트레스 수준과 질병과의 관련성은 성인에 대한 연구가 주를 이루었으며, 유아기의 산화적 손상에 대한 연구는 상대적으로 미흡한 편이다. 그러나 유아기에서 흔하게 나타나는 천식, 아토피성 피부염 및 각종 염증성 질환 등의 발병 기전에 산화스트레스가 밀접하게 관련될 수 있음에 대한 보고가 증가하고 있어,¹⁶⁻¹⁸ 유아의 산화적 손상 정도와 관련 요인에 대한 이해가 필요하다. 이에 본 연구는 항산화 관련 유전자의 다형성과 간접흡연에의 노출이 유아의 산화적 손상 정도에 미치는 영향에 대해 알아보고자 수행되었다.

연구방법

연구대상

서울과 경기 지역에서 임의로 선정된 유치원들을 통해 본 연구의 참여에 동의하고 특정 질병이 없는 건강한 유아 301명을 대상으로 선정하였다. 대상자들로부터 정맥혈을 채혈하여 혈장과 buffy coat를 분리하였고, 소변을 수집하였다. 신장과 체중은 동일한 제품의 신장계 (SECA-225, SECA, Germany)와 체중계 (THD-305, TANITA, Japan)를 사용하여 연구조사원이 직접 측정하였으며, 유아의 보호자를 대상으로 아동의 나이, 최근 6개월간 영양 보충제 섭취 여부와 집안 내 흡연자 여부에 대해 설문으로 조사하였다. 본 조사의 프로토콜은 경희대학교 생활과학대학 생명윤리심의위원회의 승인을 받았다 (IRB 과제번호: KHU-HEC-01).

유전자 다형성의 분석

Genomic DNA를 buffy coat층으로부터 상업용 키트

(Whole blood genomic DNA MiniPrep kitTM, Axygen Biosciences, Union city, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. Mn-SOD Val16Ala 과 GSTP1 Ile105Val 유전자형 분석은 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)을 이용하여 수행하였다.¹⁹ 먼저 50 ng의 genomic DNA와 Mn-SOD 유전자와 특이적으로 결합하는 primer를 이용하여 107 bp PCR 생성물을 얻은 후, DNA 제한효소 *NgoM* IV (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)와 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. GSTP1의 경우 GSTP1에 대한 primer를 이용하여 176bp PCR 생성물을 얻은 후, DNA 제한 효소 *NgoM* IV과 반응시켰다. 반응 산물들은 ethidium bromide로 염색된 3.5% agarose gel에 전기영동 하여 분리한 후 Gel Doc XR systemTM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 통해 밴드의 크기를 확인하였다. 밴드의 크기와 개수에 따라 Mn-SOD Ala16Val 유전자형의 경우, 알라닌만을 가진 경우 (Ala/Ala형) 89 bp와 18 bp로 잘라지고, 발린만 있는 경우 (Val/Val형)에는 107 bp의 단일 밴드만 나타나며 Ala/Val 형은 107, 89, 18 bp의 세 개의 밴드로 나타났다. GSTP1 Ile105Val 유전자형은 176 bp의 단일 밴드는 Ile (이소루신)/Ile형, 91 bp와 85 bp의 두 개의 밴드는 Val/Val 형, 176, 91, 85 bp의 세 개의 밴드는 Ile/Val 형으로 판정하였다.

GSTM1과 GSTT1 유전자 다형성의 분석은 β -globin을 internal standard로 하여 multiplex PCR 방법을 사용하였다.²⁰ 즉, genomic DNA와 GSTM1, GSTT1 및 β -globin에 특이적인 primer를 모두 함께 넣고 PCR을 수행하였으며, 증폭된 PCR 생성물은 2% agarose gel에서 전기 영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 Gel Doc XR systemTM을 통하여 확인하였다. 유전자 다형성은 control인 268 bp 크기의 β -globin의 생성을 확인하여 PCR이 잘 이루어졌는지 확인을 한 후, 480 bp의 GSTT1과 215 bp의 GSTM1의 생성 여부를 확인함으로써 present/null 여부를 판정하였다.

혈장 MDA의 농도 측정

지질 최종 과산화물인 MDA의 농도를 BIOXYTECH[®] MDA-586TM 키트 (Oxis International Inc., Portland, OR, USA)를 이용하여 측정하였다. 1.5 mL EP tube에 probucol과 혈장을 넣고, NMPI와 100% methanol을 3:1로 섞어 희석된 NMPI를 가하였다. 0.2 M hydrochloric acid를 첨가하여, 45°C에서 60분간 incubate 한 후 13,000 g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 MDA보다 안정한 tetramethoxypropane을 이용하였다.

소변 중의 8-OHdG 농도의 측정

소변 중의 8-OHdG의 농도를 BIOXYTECH® 8-OHdG EIA 키트를 이용하여 측정하였다. 사용 지침서에 따라 소변 중의 8-OHdG과 1차 항체를 결합시키고, 발색 효소가 결합된 2차 항체와 반응시킨 후, 기질 용액을 넣어 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

통계분석

본 연구의 결과는 SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하여 분석하였다. 성별에 따른 일반적 특징과 유전자다형성 분포를 *t*-test 또는 χ^2 -test를 통해 비교하였다. 유전자다형성에 따른 산화손상지표 수준과 유전자다형성과 간접흡연 여부의 상호작용이 산화손상지표에 미치는 영향을 일반선형모델 (Generalized linear model)을 이용하여 분석하였으며, 이 때 대상자의 나이, 성별, 영양보충제 섭취 여부를 잠재적 혼란변수로 보고 모델에서 보정하였다. 모든 결과에 대한 통계적 유의성 검증은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

일반적 특징 및 유전자 다형성 분포

본 연구대상자의 일반적인 특징은 Table 1과 같다. 평균 연령은 5.2세, 남아의 비율은 51%이었고, 평균 체중은 남아가 20.8 kg으로 여아 19.7 kg에 비해 높았다. 지난 6개월간 일주일 이상 영양 보충제를 복용한 비율은 남아 36.4%, 여아 31.3%로 비슷하게 나타났다. “현재 집안에서 다른 사람이 핀 담배연기를 맡는 경우가 있다”의 질문에 “예”라고 응답한 비율은 남아 13%, 여아 19%로 전체 응답자의 약 16%가 간접흡연에 노출되어 있었다.

본 연구 대상자의 Mn-SOD Val16Ala 유전자 다형성 분포를 살펴본 결과 (Table 2), Val/Val형이 79.7%로 가장 많았고, Val/Ala형 18.3%, Ala/Ala형 2% 순이었으며, Val allele이 주된 allele (major allele)으로 나타났다. GSTP1 Ile105Val 유전자 다형성의 경우, Ile/Ile형이 72.8%로 가장

많았고, Ile/Val형 24.9%, Val/Val형 2.3% 순이었으며, Ile allele이 주된 allele으로 나타났다. 두 유전자형 모두 변이된 allele에 대한 homozygotes의 비율이 3% 미만이므로 이후 분석에서는 변이 allele을 가진 heterozygotes와 homozygotes를 한 그룹으로 묶고 wild type에 대한 homozygotes와의 두 그룹 간 산화손상지표 수준을 비교하였다. GSTT1 present/null 형과 GSTM1 present/null 형의 분포는 GSTT1 present 형의 비율이 49.2%, GSTM1 present 형의 비율이 41.5%로 나타났으며, 본 연구에서 분석한 모든 유전자 다형성에서 성별에 따른 분포의 차이는 나타나지 않았다.

Mn-SOD와 GST 유전자 다형성과 체내 산화손상지표 간의 관계

DNA 산화 손상 정도를 나타내는 생화학 지표인 소변의

Table 2. Genotype distributions and allelic frequencies for Mn-SOD, GSTP1, GSTT1, and GSTM1 gene polymorphisms in the study population

	Total (n = 301)	Boys (n = 154)	Girls (n = 147)	p ²⁾
Mn-SOD				
Val/Val	240 (79.7)	124 (80.5)	116 (78.9)	0.627
Val/Ala	55 (18.3)	26 (16.9)	29 (19.7)	
Ala/Ala	6 (2.0)	4 (2.6)	2 (1.4)	
Val allele	535 (88.9)	274 (89.0)	261 (88.8)	0.730
Ala allele	67 (11.1)	34 (11.0)	33 (11.2)	
GSTP1				
Ile/Ile	219 (72.8)	112 (72.7) ¹⁾	107 (72.8)	0.948
Ile/Val	75 (24.9)	38 (24.7)	37 (25.2)	
Val/Val	7 (2.3)	4 (2.6)	3 (2.0)	
Ile allele	513 (85.2)	262 (85.1)	251 (85.4)	0.990
Val allele	89 (14.8)	46 (14.9)	43 (14.6)	
GSTT1				
Present	148 (49.2)	73 (47.4)	75 (51.0)	0.532
Null	153 (50.8)	81 (52.6)	72 (49.0)	
GSTM1				
Present	125 (41.5)	63 (40.9)	62 (42.2)	0.824
Null	176 (58.5)	91 (59.1)	85 (57.8)	

1) Values are n (%). 2) p for difference between boys and girls

Table 1. General characteristics of the study population

	Total (n = 301)	Boys (n = 154)	Girls (n = 147)	p ²⁾
Age (years)	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1 ¹⁾	5.2 ± 0.1	0.936
Height (cm)	114.7 ± 0.5	115.6 ± 0.6	113.8 ± 0.7	0.065
Weight (kg)	20.3 ± 0.2	20.8 ± 0.3	19.7 ± 0.3	0.012
BMI (kg/m ²)	15.3 ± 0.1	15.5 ± 0.1	15.1 ± 0.1	0.065
Environmental tobacco smoking	48 (15.9)	20 (13.0)	28 (19.0)	0.131
Use of nutrient supplement during last 6 months	102 (33.9)	56 (36.4)	46 (31.3)	0.390

1) Values are means ± SE or n (%). 2) p for difference between boys and girls

8-OHdG 수준을 유전자 다형성에 따라 비교한 결과를 Table 3에 나타내었다. Mn-SOD Val/Val형인 경우 소변의 8-OHdG 농도가 9.99 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinine으로 Val/Ala 또는 Ala/Ala형의 7.77 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinine에 비해 높은 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 아니었다 ($p = 0.065$). GSTP1 Ile105Val 유전자 다형성은 소변의 8-OHdG 농도를 유의적으로 변화시키는 것으로 나타났는데 ($p = 0.03$), Ile/Ile형인 경우가 Ile/Val 또는 Val/Val형에 비해 유의적으로 낮았다 (9.25 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinine vs. 10.89 $\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinine, $p = 0.03$). GSTT1 present/null 혹은 GSTM1

present/null 유전자형은 소변의 8-OHdG에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 한편, 지질 과산화 지표인 혈장 MDA 수준은 이들 유전자 다형성에 따라 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (Table 3).

간접흡연 여부에 따른 Mn-SOD와 GST 유전자 다형성과 체내 산화손상지표 간의 관계

간접흡연에의 노출은 산화스트레스 증가의 주요 요인이 될 수 있다. 앞에서 살펴본 Mn-SOD와 GST 유전자 다형성과 체내 산화손상지표 간의 관계가 간접흡연에의 노출 여

Table 3. Concentrations of oxidative stress markers according to polymorphisms

	Urinary 8-OHdG ($\mu\text{M}/\text{mg}$ creatinine)		Plasma MDA (μM)	
Total	9.73 \pm 0.30 (73) ¹⁾		0.60 \pm 0.03 (104)	
Mn-SOD				
Val/Val	9.99 \pm 0.36 (63)	0.065 ²⁾	0.59 \pm 0.04 (84)	0.660
Val/Ala + Ala/Ala	7.77 \pm 1.12 (10)		0.64 \pm 0.10 (20)	
GSTP1				
Ile/Ile	9.25 \pm 0.41 (51)	0.030	0.58 \pm 0.05 (75)	0.349
Ile/Val + Val/Val	10.89 \pm 0.60 (22)		0.66 \pm 0.08 (29)	
GSTT1				
Present	9.52 \pm 0.54 (42)	0.527	0.62 \pm 0.06 (57)	0.652
Null	9.98 \pm 0.47 (31)		0.59 \pm 0.05 (47)	
GSTM1				
Present	9.48 \pm 0.59 (47)	0.534	0.58 \pm 0.06 (63)	0.625
Null	9.95 \pm 0.44 (26)		0.62 \pm 0.05 (41)	

1) Values are means \pm SE (n). 2) p for difference between genotypes after adjusted for age and sex

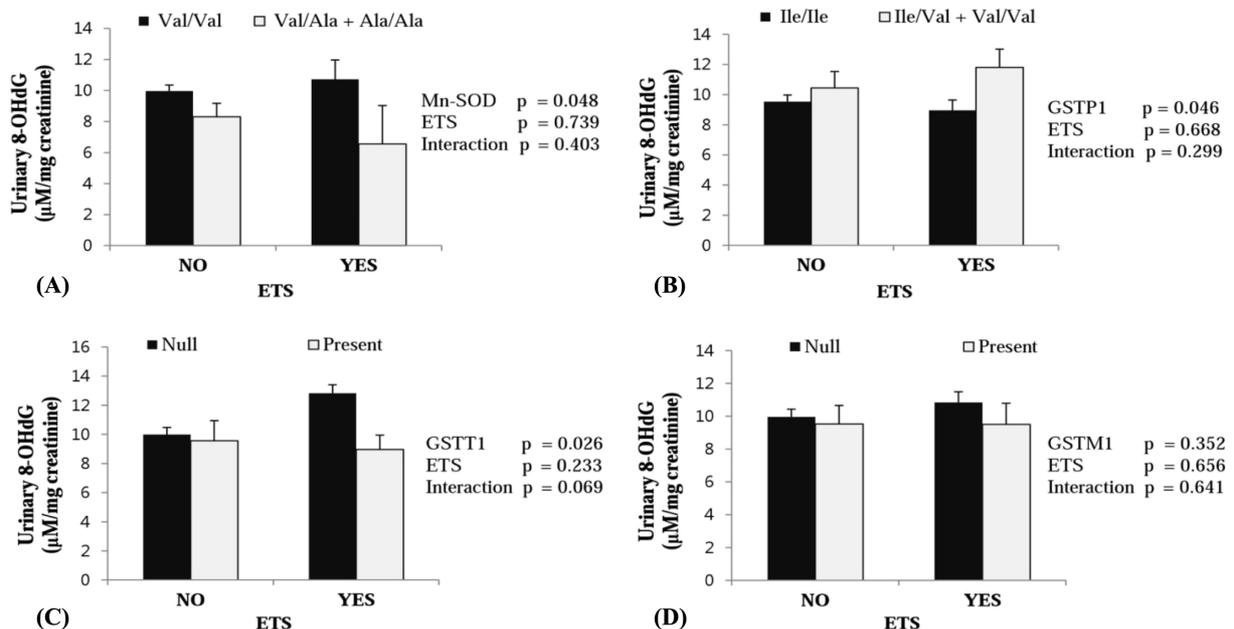


Fig. 1. The levels of urinary 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine (8-OHdG) according to exposure to environmental tobacco smoking (ETS) and gene polymorphisms. [(A) Mn-SOD, (B) GSTP1, (C) GSTT1, and (D) GSTM1] Data were analyzed using GLM models adjusted for age, sex, and nutrient supplement intake.

부에 따라 달라지는지 알아보기 위하여, 이들 유전자 다형성과 간접흡연과의 상호작용이 체내 산화손상지표에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, 간접흡연에의 노출 여부는 소변의 8-OHdG 수준에 유의한 영향을 주지 않았으며, 각 유전자 다형성과 간접흡연 간의 유의적인 상호작용도 나타나지 않았다 (Fig. 1). 또한, 간접 흡연 노출군과 비노출군의 유전자 다형성에 따른 혈중 MDA 농도에는 유의적인 차이가 없었다 (자료 미제시).

고 찰

본 연구는 건강한 유아를 대상으로 Mn-SOD Val16Ala, GSTP1 Ile105Val, GSTM1 present/null 및 GSTT1 present/null 유전자 다형성에 따른 산화손상지표 수준을 비교하고, 간접흡연에의 노출 여부가 이들 유전자다형성과 산화손상지표 간의 관계에 미치는 영향에 대해 알아보 고자 수행되었다.

본 연구 대상자에서 Mn-SOD Ala allele을 보유한 경우 (Val/Ala형 또는 Ala/Ala형), Val/Val형에 비해 DNA 산화손상지표인 8-OHdG 수준이 유의적인 수준에는 도달하지 못했으나 낮아지는 경향이 나타났다. Mn-SOD는 반응성이 강한 O₂를 제거하는 대표적 항산화 효소로 미토콘드리아에 위치하여 기능을 수행한다. Mn-SOD의 16번째 아미노산이 Val에서 Ala로 바뀌면 단백질의 2차 구조를 변형시켜 Mn-SOD가 미토콘드리아로 이동하는 정도와 mRNA의 안정성에 영향을 주는데, Ala형이 Val형에 비해 30~40% 정도 높은 활성의 Mn-SOD를 형성하는 것으로 보고된 바 있다.²¹ 따라서 Val allele을 보유하고 있는 경우, SOD의 활성이 낮아져서 산화스트레스에의 위험이 증가하는 것으로 생각된다. 정상인과 고콜레스테롤증 환자를 대상으로 한 선행 연구¹¹에서 Mn-SOD Val/Val형을 가진 경우, Val/Ala형 혹은 Ala/Ala형에 비해 SOD 활성이 유의적으로 낮게 나타난 바 있어 본 연구 결과를 뒷받침한다. 또한, 비만인을 대상으로 한 최근의 연구에서도²² Mn-SOD Val16Ala 유전자 다형성에 따라 SOD의 활성이 유의적으로 변화함이 보고되었다. 이들 기존 연구에서는 DNA 산화손상지표를 측정하지 않았으나, 본 연구 결과는 Mn-SOD Val16Ala 유전자 다형성이 DNA 산화적 손상에 대한 개인의 민감도 (susceptibility)에 중요한 조절 요인이 될 수 있음을 제시한다.

GST는 세 개의 isoform이 존재하는데, 이중 GSTT1 present/null 유전자 다형성과 GSTM1 present/null 유전자 다형성은 산화손상지표 수준과 유의적인 관련성이 없었던 반면, GSTP1 Ile/Ile형은 Ile/Val 또는 Val/Val형에 비해

8-OHdG 수준이 유의적으로 낮았다. GSTP1의 105번째 Ile이 Val으로 치환되는 경우, GSTP1 효소의 기질에 대한 친화도를 낮추어 암 등의 각종 질병에 대한 위험도를 높이는 것으로 알려져 있다.^{23,24} 특히, GSTP1은 폐와 피부 등 상피세포 조직 (epithelial tissue)에 광범위하게 발현되며, GSTP1 Ile105Val 유전자 다형성은 유아의 호흡기질환과 아토피성 피부염의 위험도에도 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다.²⁵⁻²⁹ 본 연구에서 GSTP1 Val allele을 보유하고 있는 경우 8-OHdG 수준이 높게 나타나는 것으로 보아, GSTP1 Ile105Val 유전자 다형성은 산화스트레스 및 이로 인한 손상 정도에 영향을 미쳐 산화스트레스 관련 질병의 위험도를 변화시키는 것으로 보인다. 한편, 본 연구에서는 GSTM1 혹은 GSTT1 present/null 유전자 다형성은 산화손상지표 수준에 유의적인 영향을 미치지 않았던 반면 젊은 성인을 대상으로 한 연구에서는³⁰ GSTM1 null형 또는 GSTT1 present 형에서 DNA 손상 정도가 높음을 보고한 바 있어 연령에 따라 이들 유전자형이 산화손상지표에 미치는 영향이 다를 수 있음을 제시한다.

한편, 개인의 유전적인 감수성과 산화스트레스의 관계에 있어서 외부 환경물질의 영향을 배제할 수 없으므로 이들 간의 상호관계에 대하여도 주목할 필요가 있다. 특히 담배 연기는 활성산소의 생성을 증가시키는 주요 인자인데 유아에게 간접 흡연은 가장 흔한 실내 공기오염원의 하나로서 여러 건강상의 문제를 유발할 수 있다.^{31,32} 우리나라 성인남자의 흡연율이 42.1%로 매우 높음을 고려할 때³³ 유아에서 간접흡연에의 노출이 산화스트레스에 미치는 영향 및 유전 요인과의 상호 관계에 대해 중요하게 다루어져야 하겠다.^{34,35} 하지만 본 연구에서는 간접흡연에의 노출 여부 자체는 산화손상지표 8-OHdG와 MDA 수준에 유의적인 영향을 미치지 않았으며, 유전자 다형성-간접흡연 노출 여부 간의 상호 작용도 나타나지 않았다. 본 연구의 경우, 간접흡연에의 노출 여부에 따라서만 ‘예/아니오’의 두 군으로 나누었고, 간접흡연에의 노출 정도 (노출 기간, 흡연량 등)에 따른 세부 구분을 하지 않아서 이들 변수에 대한 영향력을 고려하지 않은 제한점이 있다. 또한, 대상자 수가 비교적 적은 제한점이 있으므로, 추후 이를 보완한 후속 연구가 필요하다.

본 연구에서는 산화손상지표로 소변의 8-OHdG와 혈장의 MDA 수준을 측정하였다. 8-OHdG는 DNA의 구아노신 (guanosine) 잔기가 산화되어 형성되는 것으로 DNA 손상의 대표적 지표이며 체내 전반적인 산화스트레스 수준을 반영하는 생체지표이다.^{36,37} MDA는 지질 과산화물로서, MDA 역시 체내 산화스트레스 수준을 반영하는 지표로 흔하게 사용된다.³⁸ 본 연구에서 소변 8-OHdG의 수준은

일부 유전자 다형성에 따라 달라진 반면, 혈장 MDA 수준은 유전자 다형성에 따른 차이를 보이지 않았다. 이에 대한 이유는 분명치 않으나, 소변 8-OHdG가 혈장 MDA에 비해 산화스트레스 수준의 변화를 좀 더 민감하게 반영할 가능성을 제시한다. 지질 과산화 수준을 나타내는 다른 지표로는 아라키돈산의 비효소적 산화로 형성되는 F2-isoproteins가 있으며, 여러 동물과 인체 연구를 통해 산화스트레스를 반영하는 민감하고 타당한 지표로 보고된 바 있다.^{39,40} 따라서, 소변 중 F2-isoproteins 배설량과 항산화 효소 유전자 다형성 간의 관련성에 대해 추후 살펴보는 것도 의미가 있을 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 특정 질병이 없는 건강한 유아를 대상으로 하였으므로, 산화스트레스의 수준이 낮은 편이고 개인 간 MDA 수준의 차이가 크지 않았을 가능성이 있다.^{41,42}

기존의 산화스트레스 관련 연구는 주로 성인을 대상으로 이루어진 반면, 본 연구에서는 취학 전 아동의 산화스트레스 수준 및 관련 요인에 대해 분석한 장점을 가지고 있다. 특히, 산화손상지표로 소변 8-OHdG와 혈중 MDA의 두 가지 생체 지표를 측정하였으며, 건강한 유아에서 유전적 요인에 따라 소변 8-OHdG 수준이 달라질 수 있음을 규명하였다. 최근의 한 연구에서,⁴³ 배기가스 노출에 의한 소변 8-OHdG 수준이 GST나 사이토크롬 P450 (CYP) 등의 detoxification에 관여하는 유전자 다형성에 따라 달라지는 것으로 나타나 본 연구의 결과를 뒷받침한다. 소변은 혈액에 비해 비침습적 (non-invasive)으로 샘플을 취할 수 있는 장점이 있으며, 일반적으로 소변의 8-OHdG 수준은 혈청 8-OHdG 농도에 비해 10배 이상 높기 때문에⁴⁴ 적은 양의 샘플로도 산화손상 정도의 변화를 쉽게 측정할 수 있다. 또한, 본 연구에서는 소변 8-OHdG 농도를 크레아티닌 당량으로 보정함으로써 24시간 소변이 아닌 일반 수시뇨를 사용하여 의미 있는 결과를 도출할 수 있었다. 또한, Omata 등⁴⁵은 소아 아토피 피부염 환자에서 정상군에 비해 소변 8-OHdG 수준이 유의하게 증가함을 보였는데, 이는 소변 8-OHdG 지표가 유아기의 산화스트레스 관련 질병 위험도를 예측하는 데 있어 유용한 지표가 될 수 있음을 제시한다.

요 약

우리나라 일부 건강한 유아를 대상으로 Mn-SOD Val16Ala, GSTP1 Ile105Val, GSTT1 present/null, GSTM1 present/null 유전자 다형성 분포를 살펴본 결과, Mn-SOD Val/Val형, GSTP1 Ile/Ile형, GSTT1 null형, GSTM1 null형이 주된 (major) 유전자형인 것으로 나타났다. 이 중 Mn-SOD

Val/Val형은 Val/Ala 또는 Ala/Ala형에 비해 소변 8-OHdG 수준이 유의적이지는 않으나 높은 경향을 나타내었고, GSTP1 Ile/Ile형은 Ile/Val 또는 Val/Val형에 비해 소변 8-OHdG 수준이 유의적으로 낮았다. 간접흡연에의 노출 여부와 간접흡연-유전자 다형성의 상호 작용이 산화손상지표에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 건강한 유아에서 GSTP1 Val allele 보유한 경우 산화적 손상에 대해 취약할 수 있음을 제시하며, 추후 대규모 연구를 통한 검증 및 이들 유전자형을 보유한 대상자를 위한 효과적인 영양 중재방안에 대한 고려가 필요할 것으로 사료된다.

References

- Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983; 221(4617): 1256-1264.
- Zhang H, Davies KJ, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med* 2015; 8(Pt B): 314-336.
- Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16(1): 193-217.
- Dikalov SI, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(10): H1417-H1427.
- Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 90-101.
- Zhu H, Li YR. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(5): 474-480.
- Kim YJ, Kim EH, Hahm KB. Oxidative stress in inflammation-based gastrointestinal tract diseases: challenges and opportunities. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(6): 1004-1010.
- Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226(2): 561-565.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2010; 38(1): 96-109.
- Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, González-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res* 2013; 47(10): 781-792.
- Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, Schetinger MR, Loro VL. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dis-

- mutase gene polymorphism. *Clin Biochem* 2010; 43(13-14): 1118-1123.
12. Knapen MF, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 82(2): 171-184.
 13. Çelîk SK, Aras N, Yildirim Ö, Turan F, Görür A, Yildirim H, Tamer L. Glutathione S-transferase GSTM 1, null genotype may be associated with susceptibility to age-related cataract. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24(1): 113-119.
 14. Goodrich JM, Basu N. Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. *Toxicol In Vitro* 2012; 26(4): 630-635.
 15. Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Djukic T, Coric V, Jakovljevic J, Ivanisevic J, Pljesa S, Jelic-Ivanovic Z, Mimic-Oka J, Dimkovic N, Simic T. Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(1): 202-212.
 16. Brunst KJ, Baccarelli AA, Wright RJ. Integrating mitochondriomics in children's environmental health. *J Appl Toxicol* 2015; 35(9): 976-991.
 17. Ahn K. The role of air pollutants in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134(5): 993-999.
 18. McCrindle BW. Cardiovascular consequences of childhood obesity. *Can J Cardiol* 2015; 31(2): 124-130.
 19. Akyol O, Canatan H, Yilmaz HR, Yuce H, Ozyurt H, Sogut S, Gulec M, Elyas H. PCR/RFLP-based cost-effective identification of SOD2 signal (leader) sequence polymorphism (Ala-9Val) using NgoM IV: a detailed methodological approach. *Clin Chim Acta* 2004; 345(1-2): 151-159.
 20. Wilson MH, Grant PJ, Hardie LJ, Wild CP. Glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a decreased risk of myocardial infarction. *FASEB J* 2000; 14(5): 791-796.
 21. Sutton A, Khoury H, Prip-Buus C, Capanec C, Pessayre D, Degoul F. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13(3): 145-157.
 22. Becer E, Çirakoğlu A. Association of the Ala16Val MnSOD gene polymorphism with plasma leptin levels and oxidative stress biomarkers in obese patients. *Gene* 2015; 568(1): 35-39.
 23. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994; 224(3): 893-899.
 24. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19(2): 275-280.
 25. Aynacioglu AS, Nacak M, Filiz A, Ekinçi E, Roots I. Protective role of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Val105Val genotype in patients with bronchial asthma. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57(2): 213-217.
 26. Tamer L, Calikoğlu M, Ates NA, Yildirim H, Ercan B, Saritas E, Unlü A, Atik U. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology* 2004; 9(4): 493-498.
 27. Lee E, Chang HY, Lee KS, Suh DI, Yu HS, Kang MJ, Choi IA, Park J, Kim KW, Shin YH, Ahn KM, Kwon JY, Choi SJ, Lee KJ, Won HS, Yang SI, Jung YH, Kim HY, Seo JH, Kwon JW, Kim BJ, Kim HB, Lee SY, Kim EJ, Lee JS, Keyes KM, Shin YJ, Hong SJ; COCOA study group. The effect of perinatal anxiety on bronchiolitis is influenced by polymorphisms in ROS-related genes. *BMC Pulm Med* 2014; 14: 154.
 28. Reddy P, Naidoo RN, Robins TG, Mentz G, London SJ, Li H, Naidoo R. GSTM1, GSTP1, and NQO1 polymorphisms and susceptibility to atopy and airway hyperresponsiveness among South African schoolchildren. *Lung* 2010; 188(5): 409-414.
 29. Karam RA, Pasha HF, El-Shal AS, Rahman HM, Gad DM. Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children. *Gene* 2012; 497(2): 314-319.
 30. 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.
 31. Gergen PJ, Fowler JA, Maurer KR, Davis WW, Overpeck MD. The burden of environmental tobacco smoke exposure on the respiratory health of children 2 months through 5 years of age in the United States: Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1994. *Pediatrics* 1998; 101(2): E8.
 32. Yi O, Kwon HJ, Kim H, Ha M, Hong SJ, Hong YC, Leem JH, Sakong J, Lee CG, Kim SY, Kang D. Effect of environmental tobacco smoke on atopic dermatitis among children in Korea. *Environ Res* 2012; 113: 40-45.
 33. Ministry of Health and Welfare, Korea Centers for Disease Control and Prevention. Korean adults male smoking rate [Internet]. Cheongju: Ministry of Health and Welfare; 2015 [cited 2015 Sep 8]. Available from : <http://kosis.kr>.
 34. Holloway JW, Savarimuthu Francis S, Fong KM, Yang IA. Genomics and the respiratory effects of air pollution exposure. *Respirology* 2012; 17(4): 590-600.
 35. Wu J, Hankinson J, Kopec-Harding K, Custovic A, Simpson A. Interaction between glutathione S-transferase variants, maternal smoking and childhood wheezing changes with age. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24(5): 501-508.
 36. Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta* 2003; 334(1-2): 87-94.
 37. Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med* 2006; 68(1): 1-7.
 38. Carvalho AM, Miranda AM, Santos FA, Loureiro AP, Fisberg RM, Marchioni DM. High intake of heterocyclic amines from meat is associated with oxidative stress. *Br J Nutr* 2015; 113(8): 1301-1307.
 39. Ilyasova D, Scarbrough P, Spasojevic I. Urinary biomarkers of oxidative status. *Clin Chim Acta* 2012; 413(19-20): 1446-1453.
 40. Soto-Méndez MJ, Aguilera CM, Campaña-Martín L, Martín-Laguna V, Schümann K, Solomons NW, Gil A. Variation in hydration status within the normative range is associated with urinary biomarkers of systemic oxidative stress in Guatemalan preschool

- children. *Am J Clin Nutr* 2015; 102(4): 865-872.
41. Oztop D, Altun H, Baskol G, Ozsoy S. Oxidative stress in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Biochem* 2012; 45(10-11): 745-748.
42. Al-Alem U, Gann PH, Dahl J, van Breemen RB, Mistry V, Lam PM, Evans MD, Van Horn L, Wright ME. Associations between functional polymorphisms in antioxidant defense genes and urinary oxidative stress biomarkers in healthy, premenopausal women. *Genes Nutr* 2012; 7(2): 191-195.
43. Prasad SB, Vidyullatha P, Vani GT, Devi RP, Rani UP, Reddy PP, Prasad HM. Association of gene polymorphism in detoxification enzymes and urinary 8-OHdG levels in traffic policemen exposed to vehicular exhaust. *Inhal Toxicol* 2013; 25(1): 1-8.
44. He FF, Li HQ, Huang QX, Wang QY, Jiang HJ, Chen S, Su H, Zhang C, Wang YM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine are Associated with Elevated Urinary Angiotensin-2 Level in Type 2 Diabetic Patients with Albuminuria. *Kidney Blood Press Res* 2015; 40(4): 355-365.
45. Omata N, Tsukahara H, Ito S, Ohshima Y, Yasutomi M, Yamada A, Jiang M, Hiraoka M, Nambu M, Deguchi Y, Mayumi M. Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sci* 2001; 69(2): 223-228.