

## 디클로로벤지딘에 폭로된 흰쥐의 간장세포와 방광 상피세포에 형성된 DNA adducts의 $^{32}\text{P}$ -postlabeling과 GC/MS-SIM에 의한 분석

이진현<sup>†</sup>, 신호상, 장미선  
공주대학교 사범대학 환경교육과

### ABSTRACT

To identify and evaluate the dichlorobenzidine(DCB)-DNA adducts in liver cell and bladder epithelial cells by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling and GC/MS-SIM, we orally exposed the dichlorobenzidine (20mg/kg body wt./day) to male sprague-dawley rats for 14 days.

Two kinds of DCB-DNA adduct were found at the same site of thin layer chromatogram of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling method in liver cells and bladder epithelial cells. In liver cells, relative adduct labeling(RAL)  $\times 10^{12}$  of DCB-DNA adduct A1 were  $34.1 \pm 3.71$  and  $69.9 \pm 5.02$ , that of adduct A2 were  $74.1 \pm 10.1$  and  $105.1 \pm 10.1$  on 10 and 14 days after treatment, respectively. And in bladder epithelia cells, RAL  $\times 10^{12}$  of DCB-DNA adduct A1 were  $5.92 \pm 1.60$  and  $15.9 \pm 1.31$ , that of adduct A2 were  $9.81 \pm 2.81$  and  $22.8 \pm 1.79$  on 10 and 14 days after treatment, respectively.

DCB metabolites formed DNA adducts were monoacetyl-dichlorobenzidine(acDCB) and diacetyl-dichlorobenzidine(di-acDCB), which was identify by gas chromatography/mass spectrometry-scan ionization mode(GC/MS-SIM), along with hydrolysis, extraction and TFA(trifluoroacetyl anhydride) derivatization with DCB-DNA adducts isolated from live cells and bladder epithelial cells. The base peak of acDCB were 252 and 294 m/z, and that of di-acDCB were 252, 294 and 336 m/z.

In conclusion, the exposed DCB formed two kinds of DCB-DNA adduct, the proximate materials of that were acDCB and di-acDCB in liver and bladder epithelial cells. And the above GC/MS-SIM method was found the DCB-DNA adducts could be monitoring by gas chromatography.

### I. 연구배경 및 목적

디클로로벤지딘(3,3'-dichlorobenzidine, DCB)는 오렌지, 노랑, 빨강계통의 안료 중간체에 사용되는 원료로서 국내에서 생산하여 외국에 2,259톤 정도를 수출하고 있고, 국내에서는 약 600톤 정도 소모하고 있다. 디클로로벤지딘(DCB)의 인체 발암성에 대한 가능성이 발표되고 있음에도 불구하고, 그 동안 인체발암물질로 확정하지 못하는 이유는 디클로로벤지딘의 인체발암성을 평가할 수 있는 자료가 충분하지 않기 때문이다. 디클로로벤지딘은 발암물질로 확정된 벤지딘과 거의 유사한 구조식을 이루고 있을 뿐만 아

나라 체내에 흡수된 디클로로벤지딘은 N-아세틸화(acetylated)와 산화반응(oxidized)에 의하여 벤지딘의 발암성 대사물질과 동일한 N-수산화아미류(hydroxylamines)를 형성하기 때문에 벤지딘과 유사한 방광암을 발생할 것으로 예상하고 있다.

따라서 본 연구에서는 Talaska 등(1992)이 개발한 효과적인  $^{32}\text{P}$ -postlabeling방법에 의하여 DNA adducts을 분리하여 측정하고, 분리된 DNA adduct를 가수분해에 의하여 디클로로벤지딘의 대사물질을 추출하여 GC/MS로 디클로로벤지딘의 대사물질을 확인하여 측정하고자 하였다.

## II. 연구방법

연령이 4주이고, 체중이  $180 \pm 10\text{g}$ 인 40마리의 흰쥐(Female SD)에게 14일 동안 대조군에게는 식염수를, 투여군에게는 디클로로벤지딘( $20\text{mg/kg body wt./day}$ )을 경구로 매일 투여하였다. 투여한 후 4일, 7일, 10일 그리고 14일에 실험동물을 희생시키어 간장을 채취하였고, 방광의 내부표면에서 방광의 상피세포를 채취하였다. 그리고 채취한 시료에서 DNA를 분리한 후에 가수분해하여 DNA adduct를 추출하였다. 추출된 DNA adduct에  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 로 라벨링하고 TLC로 분리하여 DNA adduct를 측정하여 RAL(relative adduct level)값으로 나타내었다. 또한 DNA adduct에 결합되어 있는 디클로로벤지딘의 대사물질을 GC/MS에 의하여 확인하였다.

## III. 결과 및 고찰

DNA adduct는 발암물질에 의한 암 발생을 예방하는데 중요한 생체지표(biomarker)이다. 본 연구에서  $^{32}\text{P}$ -postlabeling방법에 의하여 디클로로벤지딘( $2\text{ mg/kg body wt./day}$ )에 14일 동안 경구 투여된 흰쥐의 간장세포와 방광상피세포에서 DNA adduct를 분리하였다. 본 연구 결과에서 간장세포와 방광상피세포 모두에서 각각 2개의 DNA adduct가 동일한 박막 이온교환 크로마토그래피(TLC)에서 분리되어 장기에 관계없이 디클로로벤지딘에 의하여 형성되는 DNA adduct가 두 개 종류임을 증명하였다.

본 연구에서 디클로로벤지딘( $2\text{ mg/kg body wt./day}$ )의 폭로에 의하여 형성된 두 종류 DNA adduct(A1과 A2)의  $\text{RAL} \times 10^{12}$ 값이 간장에서는 4일에는 각각  $0.75 \pm 1.43$ 와  $1.32 \pm 1.38$ 이었으나 7일째부터 크게 증가하여 14일에는 각각  $69.9 \pm 5.02$ 과  $105 \pm 10.04$ 로 매우 높게 나타났고, 방광 상피세포에 형성된 2개의 DNA adduct(A1과 A2)의  $\text{RAL} \times 10^{12}$ 값도 4일에 각각  $1.18 \pm 0.85$ 와  $3.94 \pm 1.56$ 이었으나 14일에는 각각  $9.81 \pm 2.81$ 과  $22.79 \pm 1.79$ 로 증가하였다. 또한 DNA adducts(A1과 A2)의 RAL값이 방광상피세포에 비해 간장세포에서 각각 5.5~7.1배와 2.8~4.7배 높게 나타났다. 이것은 체내에 흡수된 디클로로벤지딘이 간장에서 N-아세틸화와 산화반응에 의하여 N-수산화아미류를 형성하여 간장의 DNA와 결합한 후에 방광에 배설되어 방광상피세포와 결합하기 때문에 간장조직에서 DNA adduct가 높은 수준을 형성된 것으로 생각한다<sup>9)</sup>.

체내에 흡수된 디클로로벤지딘이 간장과 방광상피세포에서 2개의 DNA adduct를 형성한다는 본 연구의 결과와 디클로로벤지딘이 간장에서 N-아세틸화와 산화반응에 의한 N-수산화아미류의 형성에 대한 이론은 DNA와 결합한 디클로로벤지딘의 대사물질이 모노아세틸디클로로벤지딘과 디아세틸디클로로벤지딘이라고 예측할 수 있다. 본 연구에서는 GC/MS-SIM에 의하여 디아세틸디클로로벤지딘의 스펙트럼은 252 m/z, 294 m/z 그리고 336 m/z에서 기본피크가 나타났다. 그리고 <sup>32</sup>P-postlabeling방법에 의하여 간장과 방광세포에서 추출한 DNA adduct를 가수분해하여 DNA와 결합하고 있던 디클로로벤지딘의 대사물질을 추출한 후에 GC/MS-SIM으로 측정하여 표준 스펙트럼의 머무름시간과 기본피크의 구성을 대조하여 DNA adduct에 결합된 디클로로벤지딘의 대사물질이 모노아세틸디클로로벤지딘과 디아세틸디클로로벤지딘임을 확인하였다.

#### IV. 결 론

디클로로벤지딘은 생체에 폭로되어 간장과 방광세포에 동일하게 두 개의 DNA adduct를 형성하며, 그 DNA adduct를 형성하고 있는 DCB의 대사물질은 모노아세틸디클로로벤지딘과 디아세틸디클로로벤지딘임을 확인하였다.