

단세포전기영동법(Single Cell Gel Electrophoresis Assay)을 이용한 농약 살포자의 DNA손상 평가

이연경¹ · 이도영² · 이은일 · 이동배³ · 류재천⁴ · 김해준¹ · 설동근^{1*}

¹고려대학교 의과대학 예방의학교실 및 환경의학연구소, ²고려대학교 보건대학원

³충남대학교 의과대학 예방의학교실, ⁴한국과학기술연구소

Evaluation of DNA damage in Pesticide Sprayers using Single Cell Gel Electrophoresis

Yeon Kyeng Lee¹, Do Young Lee², Eunil Lee¹, Dong Bae Lee³,

Jae Chun Ryu⁴, Hae-Joon Kim¹ and Donggeun Sul^{1*}

¹Department of Preventive Medicine, School of Medicine and Institute for Environmental Health, Medical Science Research Center, Korea University, 5 Anamdong Sungbukku, Seoul, 136-701 Korea

²School of Public Health, Korea University

³Department of Preventive Medicine, Medicine college, Chungnam National University,

6 Munwhadong Chungku, Taejon, 301-747, Korea

⁴Toxicology Laboratory, Korea Institute of Science and Technology, PO Box 131, Seoul, 130-650, Korea

(Received September 20, 2001 / Accepted October 20, 2001)

ABSTRACT : Single cell gel electrophoresis (SCGE) assay, also called comet assay, is a rapid and sensitive method to detect DNA damage in single cell level. To evaluate the DNA damage of lymphocytes of pesticides sprayers, SCGE assay was carried out for 50 pesticides sprayers and 58 control subjects. They were interviewed with structured questionnaire to get the information about the kinds and amount of pesticide. Insecticides and fungicides were predominant among pesticides. Major components of pesticides were organophosphorus, organosulfate, carbap, carbamates, and triazole. Sprayed pesticides were classified into two groups. Group I included organophosphorus, organoarsenic, organotin, tetrazine, triazole and gramoxone, which were known to cause DNA damages. Group II pesticide were carbamates, surfactants, organosulfates, etc., which were not found as DNA damaging agents in scientific documents. Olive tail moments of 100 lymphocytes were measured by KOMET 3.1 program for each person. The means of tail moments were compared between farmers exposed to pesticides and control subjects. Farmers showed higher tail moments than control subjects (2.07 ± 1.40 vs 1.53 ± 0.77 , $p < 0.05$). The means of tail moments also were compared among group I sprayers ($n=36$), group II sprayers ($n=24$) and, control subjects, and the means of tail moments were 3.45 ± 3.20 , 2.66 ± 2.20 and 1.53 ± 0.77 respectively. The difference between means of group I sprayers and controls was statistically significant ($p < 0.05$). In conclusion, this study showed higher DNA damage in farmers exposed to pesticides than control subjects, and comet assay could be useful as a biological monitoring method of genotoxic pesticides for farmers.

Keywords: comet assay, DNA damage, human lymphocytes, pesticides sprayers, tail moment

서 론

환경돌연변이 물질에 대한 관심이 고조되고 돌연변이 유발 물질과 발암물질 사이에 강한 관계가 존재한다는 인식 (Ames 등, 1973)으로 인해 환경유해물질의 세포독성이 외에

도 변이원성(mutagenicity)이나 발암성(carcinogenicity) 등 세포유전학적인 피해가 더욱 문제시되고 있으며 이에 따라 세포에 미치는 독성이나 암발생 등을 연구하기 위해서 세포의 DNA 손상을 민감하게 감지하기 위한 많은 연구들이 이루어져 왔다. 이러한 연구방법으로 염색체이상, 자매염색분체 교환빈도, 소핵검사, 변이원성 검사 등이 있다. 많은 *in vitro* 연구에서 농약이 자매염색분체 교환(Ribas *et al.*,

*To whom correspondence should be addressed

1996) 빈도를 증가시키고 농약에 노출된 근로자의 말초혈액 임파구에서 소핵의 형성을 증가시킨다고(Kevelordes *et al.*, 1996; Gebel *et al.*, 1997) 보고하고 있으며 특히 제초제 등은 DNA와 상호작용을 통하여 건강에 위해를 미치는 것으로 알려져 있다(IARC, 1991).

단세포전기영동법(single cell gel electrophoresis assay (SCGE))은 분자독성학을 비롯하여 유전자 손상에 관련된 연구에 널리 적용되어지는 방법으로 처음 Ostling과 Johanson (1984)에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis 방법으로, 형광현미경 하에서 DNA 손상정도가 혜성같이 나타나므로 comet assay라고도 불리우는데, 적은 세포수(10,000개 이하)로도 실험이 가능하고 하루만에 결과를 얻을 수 있으며, 비교적 저렴한 실험비용이 소요되어 최근 들어 이 방법은 방사선(Singh *et al.*, 1988; Olive *et al.*, 1990)이나 화학물질(Tice *et al.*, 2000)뿐만 아니라 비노출 인구집단에 대한 유전독성을 평가하고, DNA repair(Tice, 1995), apoptosis (O'Connell and Rogan, 2000)를 연구하는데 사용되어지고 있다.

또한 SCGE assay는 기존에 잘 알려진 염색체 이상이 갖는 실험방법의 복잡성이거나, 사람에게 적용하기 힘든 소핵검사나 관찰자의 개인 변이가 심한 자매염색분체검사 등에 비하여 더 손쉽고 간단하며 높은 민감도를 갖는 방법으로 알려져 있다(Wojewodzka *et al.*, 1999). 외국에서 활발하게 연구가 수행되고 있는 comet assay는 국내에서는 류재천 등에 의해 처음으로 소개되었으며(1997), 이후 페록시즘 중심물질의 투여에 의한 *in vitro*에서 DNA 손상 연구 보고(김종원 등, 2001) 등이 있을 뿐이고, 유전독성물질에 노출되는 사람을 대상으로 한 현장 연구는 보고되지 않았다.

현재까지의 comet assay를 이용한 연구 중 농약에 관계된 연구로는 사람 혈액의 림포구를 이용한 *in vitro* 연구에서 제초제에 의해 comet tail이 증가했다는 보고(Ribas *et al.*, 1995)가 있으며, Lebailly 등(1998)은 농약 살포 당일 살포전과 농약 살포 후 다음날 혈액을 채취하여 comet assay를 통한 DNA 손상정도를 보고한 연구가 있다. 최근 연구로 Garaj-Vrhovac와 Zeljezic(2000)등은 농약 공장 근로자 10명을 대상으로 comet assay를 수행하여 농약 공장 근로자에서 DNA 손상이 유의하게 증가하였다고 보고하였다.

국내에서 수행된 농약 노출자에 대한 연구로는 농작업자가 느끼는 증상에 대한 조사인 농부증 조사(이인배 등, 1999), 유기인자 농약 노출에 따른 cholinesterase치의 측정(서동식, 1983; 신동천 등, 1994)과 농약 중독에 관련된 연구(정종학과 조재연, 1983; 보건사회부, 1990)가 주를 이루며, 농약

노출에 따른 DNA 손상에 대한 연구는 많지 않았다. 그러나 농약의 사용농도가 과거보다 저농도로 사용되어지고, comet assay는 저농도의 유전독성물질에 대한 검사로서 유용성이 밝혀져 있음을 고려해보면, 농약 사용에 따른 지속적인 유전자 독성 검사가 수행되어져야 할 것으로 생각된다.

유전자 독성을 검사하는 데 있어 comet assay의 민감성과 간편성 등을 고려해볼 때 농약 살포에 따른 유전독성을 평가하는 방법으로 comet assay가 유용할 것으로 판단되었다. 따라서 이 연구는 국내에 comet assay를 사람에 적용한 예가 없으므로 일반인에 대한 참고치를 제시하고, 농약 살포 근로자의 노출 영향을 평가하는 새로운 생물학적 지표로서 comet assay를 사용한 DNA 손상정도를 평가하여 노출평가에 대한 새로운 결과를 제시하고자 하였다.

연구대상 및 방법

조사대상

조사대상 농약 살포자는 의정부시 농업기술센타의 협조를 얻어 비교적 농작업이 많은 것으로 생각되어지는 6개 동(전체 12개 동)의 농민 72명을 대상으로 직접 방문하여 설문조사와 채혈을 시행하였다. 조사대상자 중 현재 농사일을 중단하였거나 2000년 1월 이후 농약을 살포한 적이 없거나 부적합한 22명을 제외한 50명을 분석대상으로 하였다.

대조군으로는 서울시 일부대학 건강진단 센터와 산업의학 센터의 건강진단에 참여한 사람 및 일부 도시 보건소 방문자를 대상으로 하였으며 이중 직업적으로 농약에 노출된 적이 없고 혈액채취와 면접조사에 응한 58명을 연구 대상으로 하였다.

조사방법

가. 면접조사

사전에 면접조사방법과 설문내용에 대하여 교육을 받은 2명의 면접조사원이 개인면접법을 이용하여 설문조사자료를 수집하였다. 농약 살포자에 대한 조사는 조사대상 지역의 각 가구를 직접 방문하여 실시하였으며 조사대상자의 일반적인 특성인 성, 연령, 농작업과 관련된 총 농업종사기간, 현재 경작현황, 경작물 및 2000년 1월 이후 조사시점까지의 농약 살포횟수, 또한 조사대상자의 DNA 손상에 영향을 끼칠 수 있는 흡연 관련 변수인 흡연량, 흡연기간, 상용하는 담배명 및 음주관련 변수인 주량, 음주량, 주당 음주 횟수 및 음주 기간 등을 조사하였다.

대조군의 경우 면접조사자가 건강진단센타와 산업의학센타 및 시 보건소를 직접 방문하여 연구에 참여하기를 동의

한 사람을 대상으로 농약살포자용과 같은 설문지를 이용하여 면접조사를 실시하였다.

Comet assay 실험방법

가. 림프구 분리

상완정맥에서 헤파린 처리된 진공 주사기(Becton Dickinson vacutainer systems)로 약 1 ml의 혈액을 채혈 후 ice box에 보관하여 채혈 당일에 실험실로 운반하여 즉시 림프구를 분리하여 comet assay에 사용하였다. 혈액 1 ml을 15 ml의 conical tube(Corning, USA)에 옮긴 후, 동량의 serum-free RPMI 1640(Gibco BRL, USA)으로 희석한 후, 이를 1ml의 Ficoll-Paque(Amersham Pharmacia, Sweden)을 이용하여 림프구를 분리하였다. 1800 rpm에서 15분간 원심분리한 후 분리된 림프구를 serum free RPMI 1640으로 세 번 세정하였다. 적정 세포수를 얻기위해 혈구측정기 (Improved neubauer haematocytometer, Germany)로 세포수를 계수하여 약 $5\sim6\times10^5/ml$ 이 되도록 희석 또는 농축하였으며 림프구 분리후 즉시 comet assay를 실시하였다.

나. Tail moment 값 측정

실험에 이용된 agarose는 normal melting point agarose (Amresco, USA; 이하 NMP agarose)와 low melting point agarose(Amresco, USA; 이하 LMP agarose)였으며 이를 microwave를 이용하여 DPBS(Gibco, USA)에 녹여 1% NMP agarose와 1% LMP agarose 및 0.5% LMP agarose로 만들어 사용하였다. Fully frosted slide(Fisher Scientific)에 첫 번째 층인 NMP agarose가 균등히 도포 될 수 있도록 NMP agarose 50 µl를 도포한 후 coverglass를 덮지 않고 말린다. 첫 번째 층인 NMP agarose 100 µl를 도포하여 coverglass를 덮어 agarose가 균등히 도포되도록 한 후 전조시켜 coverglass를 벗긴다. 두 번째 층은 lymphocytes 50 µl와 1% LMP agarose 50 µl을 섞어 슬라이드에 도포하여 coverglass를 쓰워 약 10분간 건조하였다. Coverglass를 벗긴 후 0.5% LMP agarose를 도포하고 다시 coverglass를 쓰워 말린후 coverglass를 제거한 채 pH 10인 lysis buffer [2.5 M NaCl(Shinyo, Japan), 100 mM EDTA, 2Na (Amresco, USA), 10 mM Tris-HCl(Gibco BRL, USA, pH 10.0), 1% Sodium Sarcosinate, 1% Triton X-100 (Amresco, USA) 10% DMSO]에 넣어 4°C에 1시간 30분 동안 담갔다가 꺼내서 pH 13의 unwinding buffer [1 mM EDTA (Amresco, USA), 300 mM NaOH (Sigma, USA)]에 20분간 담근다. Lysis와 unwinding 시에는 슬라이드를 넣은 coplan jar를 알루미늄호일로 감싸 빛에 노출되지 않도록 하였다.

슬라이드를 전기영동장치(Sub Cell GT agarose gel electrophoresis systems, BioRad)에 틈이 생기지 않도록 배

열하고 25 V, 300 mA (0.8 V/cm)로 고정하여 unwinding buffer와 같은 buffer를 사용하여 20분간 전기영동을 하였다. 전기영동후 alkali와 detergent를 제거하기 위해 neutralization buffer [400 mM Tris-HCl(Gibco BRL, USA, pH 7.4)에 5분씩 세 번 washing한다. 직접 결과 관찰을 하지 않을 때 슬라이드는 에탄올(absolute ethanol, Sigma)로 5분간 고정한 후 추후 관찰하였다. 실험은 추가적인 DNA 손상을 막기 위하여 황색등 아래서 실시하였다.

슬라이드는 각 조사대상자에 대하여 두 개씩 작성하였다. 슬라이드 관찰직전에 DNA intercalating agent인 ethidium bromide (10 µl/ml) 50 µl로 형광염색하여 515-560 nm의 excitation filter와 590 nm barrier filter를 이용하여 형광 현미경 하에서 판독하였다. 염색한 슬라이드는 형광현미경 하에서 image analysis software(Komet 3.1)을 이용하여 슬라이드 당 50개의 세포로부터 olive tail moment(tail moment)값을 측정하였다. 슬라이드간의 편차를 줄이기 위하여 슬라이드 상에 이름을 적은 부분 쪽부터 일정한 방향으로 관찰되는 모든 세포에 대하여 무작위로 tail moment 값을 측정하였다. 개인간 또는 개인내의 림프구 variability나 개인 건강상태를 고려하기 위하여 SCGE assay를 수행시 개인 당 2개의 슬라이드를 제작하였으므로 적어도 100개의 세포를 관찰하였다. 100회 관찰하여 얻은 tail moment 값의 Cronbach α 는 0.9627(0.9532-0.9711)이었다.

통계분석

조사대상자들의 일반적 특성에 관한 통계적 유의성은 Chi-square test로 분석하였고, tail moment 값은 각 조사대상자 당 100개 세포를 관찰하여 그 평균값을 tail momnet 값으로 사용하였다. 농약을 살포한 농민들과 대조군과의 비교는 t-test를 수행하였다. 살포한 농약의 종류에 둘로 분류하였는데, 유기인제, 유기비소, 유기주석, 테트라진, 트리아졸, 그라목손 등 유전자 손상이 보고된 농약을 group I으로 그 외 유전자 손상에 대한 보고가 없는 농약을 group II로 구분하여, 1군, 2군, 대조군의 tail moment를 분산분석을 이용하여 분석하였고, 다중 비교는 Duncan 방법을 사용하였다.

분석시 통계프로그램은 SAS(Strategic application system) windows version 6.12를 사용하였다.

결 과

조사대상자의 특성

조사대상자의 연령, 성별, 흡연습관의 일반적 특성은 Table 1과 같다. 농약 살포자수는 50명으로 남자 34명, 여자 16명이었으며, 대조군은 58명으로 남자 31명, 여자 27명

Table 1. General characteristics of studied subjects

Classification	Exposure	Control	p-value*	명(%)
Sex				
Male	34(68.0)	31(53.4)	0.123	
Female	16(32.0)	27(46.6)		
Age(years)				
< 41	9(18.0)	19(32.8)	0.242	
41-50	18(36.0)	21(36.2)		
51-60	16(32.0)	14(24.1)		
60 <	7(14.0)	4(6.9)		
Smoking				
No	25(50.0)	40(69.0)		
Yes	25(50.0)	18(31.0)	0.045	
Total	50(100.0)	58(100.0)		

*P-value by chi-square test.

이었다 ($P>0.05$) 연령 분포는 대조군이 40대 미만이 32.8%로 농약 살포자 18.0%보다 높았고, 농약 살포자가 60세 이상이 14.0%, 대조군이 6.9%로 서로 분포에 차이가 있었으나 통계적으로 유의하지는 않았다($P>0.05$). 흡연관은 현재 흡연을 하는 경우와 비흡연자로 구분하였는데 흡연군은 농약 살포자에서 48.2%로 대조군 31.0%보다 약간 높았으며 비흡연자는 농약 살포자 49.2%, 대조군 69.0%이었다. 흡연 습관은 두 군에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ($P=0.045$).

대조군과 노출군에서의 남녀, 연령대 및 흡연에 따른 Comet assay 결과

대조군에서의 평균 tail moment값은 1.53이었으며 남자는 1.45이었고, 여자는 1.61로 여자에서 좀더 높은 tail moment를 보였으나 성별에 따른 통계적인 유의한 차이를 보이지 않았다. 연령군에 따른 tail moment 값은 연령이 증가함에 따라 일정한 형태를 보여주지 않고 있으며, 통계적으로도 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 2). 대조군의 평균 tail moment값으로부터 일반인들의 참고치를 구하기 위해 90 percentile값을 구한 결과 2.55가 산출되었는데, 이후 Komet 4.0으로 수행한 서울지역 대조군에 대한 우리 실험실의 다른

Table 2. Tail moments in control subjects by sex and age

Age\ sex	Male		Female		Total	
	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.
<41	11	1.27±0.81	8	1.92±0.68	19	1.55±0.81
41-50	13	1.72±1.02	8	1.67±0.61	21	1.70±0.87
51-60	5	1.23±0.40	9	1.38±0.77	14	1.33±0.65
60<	2	1.29±0.19	2	1.15±0.12	4	1.22±0.15
Total	31	1.45±0.84	27	1.61±0.69	58	1.53±0.77

The 90 percentile value from control subjects: 2.55 (1.9 from our unpublished data)

Table 3. Tail moments in pesticide exposure farmers by sex and age

Age\ sex	Male		Female		Total	
	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.
<41	4	2.10±2.40	5	2.49±2.29	9	2.32±2.20
41-50	14	1.79±1.24	4	1.87±0.55	18	1.81±1.11
51-60	11	2.49±1.59	5	1.84±0.93	16	2.29±0.86
60<	5	1.77±0.59	2	2.29±1.33	7	1.92±0.77
Total	34	2.05±1.43	16	2.11±1.38	50	2.07±1.40

Table 4. Tail moments of exposure farmers and control subjects by smoking habits

	Exposure		Control	
	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.
Smoking	25	1.89 ± 1.25	18	1.57±0.98
No smoking	25	2.24 ± 1.54	7	1.51±0.67

연구에서는 90 percentile 값이 1.9였다(unpublished data) (Table 2).

농약 살포자들의 경우 평균 tail moment 값은 2.07로 높았고, 여성의 경우 2.11로 남성의 2.05보다 높았지만, 통계적으로 유의하지는 않았다(Table 3). 연령에 따른 변화양상도 일정하지 않았고 통계적으로도 유의하지 않았다.

농약 살포자와 대조군 간의 분포가 통계적으로 유의한 차이가 나왔던 흡연 여부에 따른 tail moment값은 Table 4와 같다. 농약살포자에서는 비흡연자가 2.24, 흡연자가 1.89로 비흡연자가 도리어 높게 나왔으며 통계적으로 유의한 차이는 없었다($p>0.05$). 대조군에서는 흡연자가 1.57, 비흡연자가 1.51로 나왔지만 역시 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

농약 살포자와 대조군의 Comet assay 결과

농약 살포자와 대조군의 tail moment값은 2.07, 1.53으로 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Table 5). 남성과 여성으로 나누었을 경우 남성 농약 살포자의 tail moment값은 2.05, 남성 대조군은 1.45로 통계적으로 유의한 차이가 있었으며, 여성의 경우도 농약 살포자의 tail moment값이 2.11로 대조군의 1.61로 높았지만 통계적으로 유의하지는 않았다.

살포된 농약은 살충제와 살균제가 90% 이상을 차지하였고, 성분은 유기인계, 유기유황계, 칼탑제, 카바마이트계와 트리

Table 5. Tail moments between exposure and control subjects by sex

	Exposure		Control		p-value
	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.	
Male*	34	2.05±1.43	31	1.45±0.84	0.043
Female	16	2.11±1.38	27	1.61±0.69	0.190
Total*	50	2.07±1.40	58	1.53±0.77	0.017

Table 6. Tail moments of farmers exposed to pesticides which caused DNA damages or not

Group I [†]		Group II [†]		Control		
No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.	No	Mean±S.D.	
Male	21	2.16±1.49	13	1.88±1.38	31	1.45±0.84
Female	9	2.44±1.75	7	1.69±0.52	27	1.61±0.69
Total*	30	2.24±1.55	20	1.82±1.13	58	1.53 ± 0.77

[†] Group I sprayers used pesticides such as organophosphorus, organoarsenic, organotin, tetrazine, trazole and gramoxone which were known to DNA damage compounds.

[†] Group II sprayres used pesticides which were not reported about DNA damage such as carbamates, surfactants, organosulfates.

*Statistically significant difference between Group I, Gorup II and control by ANOVA ($p<0.05$), Multiple comparison analysis showed statistically significant between Group I and control ($p<0.05$).

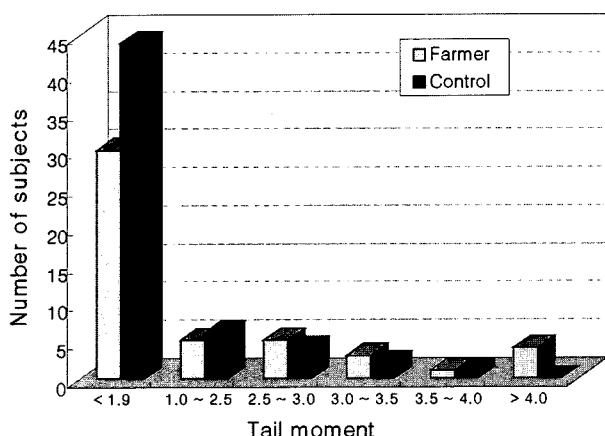


Fig. 1. Distribution of tail moments in farmers and control subjects

이출계순으로 많았다. 사용된 농약은 DNA 손상이 알려진 유기인제, 유기비소, 유기주석, 테트라진, 트리아졸, 그라목손을 group I으로 그외 기타 농약을 group II로 구분하여 group I, II 및 대조군의 tail moment값을 서로 비교하였다.

group I을 살포한 경우 tail moment값은 2.24, group II를 살포한 경우는 1.82이였다. 대조군의 1.53에 비해 group I과 group II를 살포한 경우에 통계적으로 유의하게 증가된 tail moment를 보였고 ($p<0.05$ by ANOVA), 분산분석 후의 다중비교를 실시한 결과 세 개의 군 중에서 group I를 살포한 경우와 대조군이 통계적으로 유의하였다(Table 6).

농약살포자와 대조군들의 tail moment값의 분포를 보면 거의 유사한 형태를 취하면서 농부들의 경우 tail moment값이 2.5이상인 경우가 증가하면서 4.0이상인 경우도 관찰되었다(Fig 1).

고 찰

생물학적 모니터링은 화학물질이나 화학물질의 대사산물의 측정과 평가를 하는 것으로(Hoet, 1996), 타당한 방법을

통한 생물학적 노출 모니터링은 internal dose의 양적, 질적 측정을 제공한다. 그러나 현재까지 농약으로 알려진 화학물질의 약 50종 이하에 대해서만 생물학적 모니터링 자료가 가능한 실정이다. 따라서 농약노출에 대한 적합한 생물학적 지표의 선택, 검출방법의 개발, 측정결과의 평가와 해석 등에 대하여 최근 연구되어지고 있는 문제들이다.

농약에 노출된 농부들에 대한 생물학적 모니터링으로서 유전독성을 측정하는 것은 화학물질이나 그 대사물질에 의한 유전자 손상을 평가하는 것으로 농약과 관련된 암 발생 위험과 연관된 것이므로 그 중요성이 매우 크다. 유전독성지표들은 일시적이거나 영구적인 유전독성을 평가하기 위해 사용되어지고 있는데, 세포유전학적인 endpoint를 찾기 위하여 주로 사용하는 방법들은 염색체 이상, 자매염색분체교환, 소핵검사 등이다. 이 검사들은 주로 실험실적이며 시간이 많이 소비되고, 유전독성의 전반적인 상태를 반영한다. 특정 화학물질에 의한 유전자 독성은 DNA adduct를 검사하는 것으로, ^{32}P 방사선 동위물질 표식자를 사용하는 방법인데, 이러한 방법은 생물학적 모니터링에 사용되기는 어렵다(Moller et al., 2000).

단일세포전기영동법(comet assay)은 적은 세포로도 양적으로 유전자 손상을 평가하며 빠르고 민감하게 DNA 손상을 평가할 수 있어 매우 간편한 유전독성 실험 방법으로 인정되고 있다. 국내에서는 아직까지 유해물질에 노출된 집단을 대상으로 DNA 손상정도를 평가한 연구가 발표되지 않았으나 외국에서는 과거 5년 동안 *in vivo*와 *in vitro* 연구를 통한 DNA 손상과 회복에 대하여 comet assay의 이용이 증가하고 있다(Garaj-Vrhovac & Zeljezic, 2000; Ribas 등, 1995). Comet assay는 Singh et al.(1988)과 Olive(1990)에 의해 좀더 민감하게 DNA 손상을 감지할 수 있는 방법으로 변형되었으며, OECD guideline으로 채용되기 위해 분석방법이 수령되었다(Tice et al., 2000).

일반인(대조군)에 대한 참고치를 제시하기 위해 일반인에 있어서 comet assay를 실시한 결과 tail moment는 1.53 ± 0.77 이었으며 남자는 1.45 ± 0.84 , 여자는 1.61 ± 0.69 였다. 남녀간

에 차이가 통계적으로 유의하지 않았고, 표본크기도 작기 때문에 참고치를 구하기 위해 전체 대조군의 90 percentile값을 구한 결과 2.55로 나타났다(Table 2). 그러나 이 연구 이후 우리 실험실에서 Komet 4.0프로그램을 사용하여 대조군 41명에 대한 조사를 한 결과 90 percentile값은 1.9로 낮게 나왔다. 그러나 평균값은 1.5로 유사하였고, 표준편차가 작아 90 percentile값이 작게 나온 것이다(unpublished data). 또 한 다른 대조군들의 자료도 2.0을 넘는 경우가 거의 없기 때문에 1.9값이 더 적절한 참고치로 판단된다.

성별에 따른 DNA 손상 정도는 많은 논란을 일으키는 주제이며, 좀더 많은 수의 대상자를 선정하여 이에 대한 추가 조사가 이루어져야 할 것으로 보여지지만, Moller 등(2000)은 여성이 DNA손상이 높다고 보고하였고, 우리 연구에서도 여자가 남자보다 약간 더 높은 tail moment를 보였다. 우리 연구에서 여성의 tail moment값이 높은 것은 농약 살포자와 대조군 각각에서 남녀별로 비교하여도 동일한 현상을 보였다(Table 2, 3). 또한 연령에 따른 tail moment 값의 차이를 보이지 않았는데 이는 Lebailly 등(1998)의 음주나 흡연, 연령에 따른 DNA 손상정도가 차이가 없다는 보고와 유사하였다.

흡연의 유전자 손상에 대한 연구를 살펴보면 그리스, 터키, 폴란드의 연구에서 흡연이 유전자 손상에 영향을 준다는 보고와 Frenzilli 등(1997)은 흡연을 중단한 1년 이후 금연자와 흡연자 사이에 DNA 손상에 통계적으로 유의한 차이를 보였다고 보고하였으나, 최근에 발표된 전반적인 연구들은 흡연의 영향에 따른 차이를 나타내는데 실패하였다(Gregio D'Arce *et al.*, 2000; Somomorovska *et al.*, 1999; Wojewodzka *et al.*, 1999). 우리 연구 결과 역시 흡연에 따른 DNA손상 정도가 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 4). Moller 등 (2000)은 흡연 여부에 따라 DNA 손상이 차이를 보인 연구 보고들은 주로 유럽의 남부지역에 속한 경우가 많아, 흡연습관의 차이, 담배의 타르(tar)양, 또는 그 지방 특유의 식이 섭취등이 영향을 주었을 가능성을 제기하고 있다.

우리 연구결과 농약 살포자에 있어서 tail moment 값은 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났고(농약살포자 2.07, 대조군 1.53, Table 5), 연령, 성별, 흡연에 따른 차이는 유의하지 않았다(Table 2-4). 이러한 결과는 Garaj-Vrhovac와 Zeljezic(1999, 2000)의 결과와 일치하는 것이며 농약살포근로자에 있어 염색체 이상을 증가시키고, 자매염색분체 교환을 야기한다는 결과와 일치하는 것이다. 또한 농약에 노출되는 시간이 길고 살포 횟수가 많을수록, 살포 하지 오래지 않을수록 남녀 모두에서 DNA 손상이 증가되는 경향을 보였지만, 통계적으로 유의하지는 않았다.

살포 농약에 따라 유전자 손상을 일으키는 것으로 보고된 경우와 그렇지 않은 경우를 나누어서 분석한 결과 유전자 손상을 일으키는 농약을 살포한 경우가 그렇지 않은 농약을 살포한 경우보다 tail moment값은 높았지만, 분산분석의 다중비교에서는 통계적인 차이를 보이지 않았다(Table 6). 두 종류의 농약 살포에 따른 tail moment값의 차이가 통계적으로 유의하지 않은 것은 표본의 크기가 작을 뿐 아니라, 여러 종류의 농약을 살포하기 때문에 실제로 DNA손상을 일으키는 농약을 살포한 양에 대한 조사가 이뤄지지 못한 한계를 가지고 있기 때문인 것으로 생각한다.

농약 살포자와 대조군의 tail moment값의 분포를 조사한 결과 농약 살포자에서 tail moment의 평균값이 높은 것은 전체적인 농약 살포자와 대조군이 서로 다른 분포를 보이는 것이 아니라 일부 농약 살포자의 tail moment값이 높기 때문이라는 것을 알 수 있다. 이것은 농약 살포량, 살포 농약, 살포 기간 등 다양한 요인들로 인해서 농약 살포에 따른 DNA손상이 많은 사람들이 일부 존재한다는 것을 보여주고 있다. 이런 현상이 농약 살포에 의한 것인지 개인적인 감수성 등에 의해 영향을 받는지 여부등은 향후 조사가 더 이뤄져야할 것이다.

이 연구결과 조사대상자와 대조군 간에 성별, 연령별, 흡연 등에 의한 tail moment값의 차이를 보이지 않았고, 농약 살포자와 대조군 간에 유전자 손상이 농약 살포자에서 일반인보다 통계적으로 유의하게 높았으며 특히 DNA 손상이 알려진 group I 농약을 살포한 경우 높은 DNA 손상정도를 보였다. 그러므로 이 연구는 농약 노출에 의해 림프구 DNA손상이 증가한 결과를 보였다. 림프구의 DNA손상이 개인간의 변이가 매우 큰 것을 감안할 때 각 개인에서의 유전자 손상에 대한 절대평가에는 제한적이지만 림프구에서의 comet assay 결과는 농약 살포자에 대한 집단적인 유전자 손상을 평가하는 방법으로는 매우 유용할 것으로 생각하며, 향후 개인적인 감수성, 농약 노출 지표에 의한 노출 평가 등을 통해 개인 수준에서의 농약 노출에 의한 유전자 손상 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참고문헌

- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD (1973): Carcinogens are mutagens. *Proc Natl Acad Sci*, **70**, 2281-2285.
- Frenzilli G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fornai E, Giannessi L, Maggiorelli F, Paoletti P, Barale R (1997): Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res*, **375**(2), 117-123.
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D (1999): Chromosomal aberrations and frequency of micronuclei in workers employed in pesticide production. *Biologia*, **54**(6), 707-712.

- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D (2000): Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis(SCGE) assay Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutat Res*, **469**, 279-285.
- Gebel T, Kevekordes S, Pav K, Edenharder R, Dunkelberg H (1997): In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone marrow micronucleus test. *Arch Toxicol*, **71**, 193-197.
- Gregio D'Arce LP, Colos IM (2000): Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratog Carcinog Mutagen*, **20**(3), 161-170.
- Hoet P (1996): General principles. In: Biological monitoring of chemical exposure in the workplace. vol 1. WHO, Geneva, pp. 1-19.
- International Agency for Research on Cancer (1991): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 53, Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides. Lyon, France.
- Kovelordes S, Gebel T, Pav K, Edenharder R, Dunkelberg H (1996): Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in the sister chromatid exchanges test with human lymphocytes *in vitro*. *Toxicol Lett*, **89**, 35-42.
- Lebailly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemeyen D, Godard T, Sichel F, LeTalaer JY, Henry-Amar M, Gauduchon P (1998): 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*, **7**(10), 917-27.
- Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H (2000): The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**(10), 1005-15.
- O'Connell KM, Rogan MT (2000): Apoptosis in human Jurkat T cells after culture with live *Taenia crassiceps* cysticerci *in vitro*. *Parasitology*, **120**, 649-55.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990): Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiation Research*, **122**(1), 86-94.
- Ostling O, Johanson KJ (1984): Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **123**, 291-356.
- Ribas G, Frenzilli G, Barale R, Marcos R (1995): Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutat Res*, **344**, 41-54.
- Ribas G, Surrallés J, Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R (1996): Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazide in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*, **11**(3), 221-227.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-191.
- Somorovska M, Jahnova E, Tulinska J, Zamecnikova M, Sarmanova J, Teranova A, Vodickova L, Liskova A, Vallova B, Soucek P, Hemminki K, Norppa H, Hirvonen A, Tates AD, Fuortes L, Dusinska M, Vodicka P (1999): Biomonitoring of occupational exposure to styrene in a plastics lamination plant. *Mutat Res*, **428**(1-2), 255-69.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, **35**(3), 206-21.
- Tice RR (1995): The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in: DH Phillips and S Venitt (Eds). Environmental Mutagenesis, Bio Scientific Publishers, Oxford, pp. 315-339.
- Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I (1999): Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay. *Mutat Res*, **440**(1), 19-25.
- 김종원, 한의식, 박미선, 엄미숙, 김인숙, 전혜승, 정해관, 심웅섭, 오혜영(2001): Di(2-ethylhexyl) phthalate에 의해 유도된 DNA 손상과 소핵형성. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **21**(1), 34-43.
- 류재천, 김현주, 서영록, 김경란(1997): DNA damage와 Apoptosis를 정량화하는 단세포전기영동법. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **17**(2), 71-77.
- 보건사회부 (1990): 농약사용으로 인한 농촌주민들의 인체증독실태.
- 서동식(1983): 유기인체의 노출에 의한 혈중 cholinesterase의 변화. 예방의학회지, **16**(1), 51-58.
- 신동천, 이순영, 정상혁, 원종우, 박종세, 박승자 (1994): 농약살포자 혈중 콜린에스테라제 활성도의 변화 및 농약성분. 대한산업의학회지, **6**(2), 402-410.
- 이인배, 이연경, 장성실, 이석구, 조영채, 이동배, 이태용 (1999): 일부 농촌 지역 비닐하우스 재배자들의 농부증 실태와 관련요인. 농촌의학회지 **24**(1), 13-34.
- 정종학, 조재연 (1983): 경북 지방의 농약증독에 대한 역학적 조사. 농촌의학회지, **8**(1), 28-33.