韓國營養學會誌 35(2) : 213~222, 2002

인체 산화적 DNA 손상에 대한 Human Biomonitoring 도구로서 Alkaline Comet Assay의 활용 가능성 연구*

박 은 주 · 강 명 희**§

경남대학교 자연과학대학 생명과학부, 한남대학교 이과대학 식품영양학과**

Application of the Alkaline Comet Assay for Detecting Oxidative DNA Damage in Human Biomonitoring*

Park, Eun Ju · Kang, Myung-Hee**§

Division of Life Sciences, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea
*Department of Food and Nutrition,** Han Nam University Daejeon 306-791, Korea*

ABSTRACT

The alkaline comet assay has been used with increasing popularity to investigate the level of DNA damage in biomonitoring studies within the last decade in Western countries. The purpose of this study was to evaluate the usefulness of the alkaline comet assay as a biomarker of oxidative DNA damage for monitoring in the Korean population, and also to evaluate the effect of nutritional status and lifestyle factors on H2O2 induced oxidative DNA damage measured by the alkaline comet assay in human lymphocytes. The study population consisted of 61 healthy Korean male volunteers, aged 20 - 28. Epidemiological background data including dietary habits, smoking habits and anthropometrical measurements were collected through personal interviews. After blood collection, the comet assay in peripheral lymphocytes and plasma lipids analysis was carried out and the results analyzed. Tail moment (TM) and tail length (TL) of the comet assay were used to measure DNA damage in the lymphocytes of the subjects. Statistically significant ($p < 0.05$) positive correlations were observed between DNA damage (TM or TL) and smoking habits expressed as cigarettes smoked per day and pack years ($r = 0.311$ and 0.382 for TM, $r = 0.294$ and 0.350 for TL, respectively). There were also significant positive correlations between DNA damage parameters and waist-hip ratio. Higher plasma triglyceride levels were associated with increased damage to DNA. There were no correlations between the consumption frequencies of vegetables and DNA damage to the subjects. However, consumption frequencies of fruit and fruit juice intake were inversely associated with the TM and TL. The results indicate that the comet assay is a simple, rapid and sensitive method for detecting lymphocyte DNA damage induced by cigarette smoking. Consumption of fruit or fruit juices could potentially modify the damaged DNA in the human peripheral lymphocytes of young Korean men. (*Korean J Nutrition* 35(2) : 213~222, 2002)

KEY WORDS: human biomonitoring, alkaline comet assay, oxidative DNA damages, cigarette smoking, WHR, plasma triglyceride, fruit consumption.

서 론

세포 내 DNA 손상 정도를 측정하는 것은 인체에 유해한 독성물질에 의한 유전독성의 발생 여부를 알아내는 좋은 도구일 뿐 아니라 암, 동맥경화와 같은 퇴행성질환의 유병 여부를 초기에 판단할 수 있는 방법으로 알려져 있다. 따라서 인체 조직에서의 DNA 손상은 인구 집단의 biomonitoring 연구 또는 분자역학연구에서 효과적인 생물학적 biomarker로 이용되고 있다.[1-5]

현재까지 밝혀진 암의 원인 혹은 위험요인으로 노화, 흡연, 환경오염, 만성 감염 등을 들 수 있다. 이 요인들에 의해 신체 내에서 광범위한 해로운 활성을 가진 활성산화물질(reactive oxygen species, ROS)의 생산이 비정상적으로 높아지며, 증가한 ROS 농도가 항산화계의 방어한계를 넘어서면 oxidative stress 현상이 일어나고 그 결과로 암 발생의 초기단계인 DNA의 손상을 유발하게 되며 이는 세포의

접수일 : 2002년 1월 7일
채택일 : 2002년 2월 20일
*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HMP-00-B-22000-00157).
§To whom correspondence should be addressed.

© 2002 The Korean Nutrition Society

돌연변이를 유발해서 암으로까지 발전하게 된다고 알려져 있다.[6-9] 따라서 DNA 손상을 효과적으로 측정할 수 있는 biomarker가 있다면 암 위험요인 소지자의 암 발생여부를 조기에 가려낼 수 있으며 DNA 손상을 억제함으로 암을 예방하기 위한 interventaion 연구를 실시해 볼 수 있을 것이다.

인체의 DNA 손상을 monitoring하는 방법으로 그 동안 DNA adduct, chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchanges (SCE), micronuclei (MN), 8-hydroxy-deoxy-guanosine 등 여러 가지 방법이 사용되어 왔으나, 이제까지 사용되었던 방법들보다 쉽고 또 DNA 손상에 민감한 방법으로 최근 소개되고 있는 것이 comet assay 또는 single cell gel electrophoresis (SCGE) 분석법이다.[10,11] Comet assay는 1984년 Ostling and Johanson[12]에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 처음 도입되었으며 Singh 등[13]에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지해 낼 수 있는 방법으로 발전되어 그 동안 많은 연구자들에 의해 암 유발원이나 독성물질에 대한 유전독성실험에 다양하게 적용되어져 왔다.

최근에 와서 comet assay는 영국의 Collins 등[14,15]에 의해 환경적인 요인이나 질병 등에 의한 인체의 DNA 손상을 위한 monitoring 방법으로 제안되었다. 이 comet assay는 간편하고 신속하게 다양한 재료들을 이용해 DNA 손상여부를 cell level에서 감지할 수 있어 분자역학적 연구에 있어서 매우 유용한 연구방법이며, 이제까지 DNA 손상 human monitoring법으로 많이 사용되어왔던 SCE 분석법에 비해 훨씬 간단하고 민감한 것으로 보고되고 있다.[16] Comet assay를 이용하면 oxygen radical의 형성에 의한 DNA 손상과 항산화제의 관계 등을 쉽게 관찰할 수 있으며, 최근 oxidative stress에 노출되어 있는 흡연자의 DNA 손상 정도가 비흡연자에 비해 유의하게 증가되어 있음이 보고되었다.[17] Rao 등[18]은 구강암환자의 oral squamous cell에서 유의적으로 높은 DNA 손상을 보고하였으며, 그 밖에 라돈 노출이 심한 지역 거주자 및 유방암환자에서 comet assay를 이용해 관찰한 DNA 손상이 유의적으로 높은 것이 관찰되었다.[19,20]

Comet assay가 우리 나라에 도입된 지는 2~3년 되었으나, 이 방법을 이용하여 그 동안 수행된 연구는 cell line 또는 동물을 이용하여 유전독성물질 또는 항 유전독성물질을 검색한 것 이 보고되었을 뿐,[21,22] 인체를 대상으로 임파구 DNA 손상 monitoring 방법으로 comet assay를 사용한 선행연구는 국내에 아직 보고된 바 없다. 이에 저자들은 최근 관심을 끌고 있는 comet assay 법을 영양학 연구에 도입하여 건강한 인체를 대상으로 이 방법이 영양상태 및 생활습관에 따른 인체 임파구 DNA 손상여부를 알아볼 수 있는 human monitoring 지표로 사용할 수 있는지를 확인하고자 본 연구를 계획하였다.

연구대상 및 방법

1. 대상자 선정

본 연구는 대전 지역에 거주하는 20~28세 사이의 건강한 성인 남자 61명을 대상으로 실시되었다. 설문지의 내용은 나이, 건강상태 등 일반사항, 신장과 체중, 흡연에 관한 사항, 비타민 영양제 복용 여부, 알코올 섭취 여부 등으로 구성하였다. 회수된 설문지를 검토하여 설문지 대답이 불성실한 사람과 비타민 영양제를 복용하고 있는 사람은 대상자에서 제외하였다. 설문지를 통하여 인구 특성, 건강상태 및 생활습관 (흡연, 음주, 운동 등)을 조사하였고, 신장, 체중 BMI, WHR, 체지방량 등의 신체계측조사도 실시하였으며, 영양소 섭취상태 및 식습관은 24시간 회상법 및 식품섭취빈도조사를 이용하여 조사하였다.

2. 채혈 및 생화학적 분석

1) 혈액 채취 및 임파구 분리

총 61명의 대상자로부터 본인의 동의를 얻어 채혈을 하였다. 대상자들은 채혈하기 전 8시간 이상 음식물을 먹지 않도록 지도하였으며 대상자들의 혈액은 아침식사 전에 채혈 후 heparinated sterile tube에 담아 2시간 이내에 alkaline comet assay를 실시하도록 하였다. 신선한 전혈 70 μl을 1 ml의 PBS에 섞은 후 Histopaque 1077를 이용해 임파구만을 분리해 내었다. 나머지 혈액은 원심분리하여 혈장을 분리한 뒤 혈장 지질 분석을 위해 −80℃에서 냉동보관하였다.

2) 혈청 지질 분석

혈장 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 중성지방 수준은 (주)인화제약의 kit 시약을 이용하여 Photometric Autoanalyzer (Biotron Scientific instruments BTR 815)로 측정하였다. LDL 콜레스테롤은 Friedwald식을 이용하여 계산하였다.[23]

3) Alkaline comet assay을 이용한 임파구 oxidative DNA damage 측정

Alkaline comet assay는 Singh (1988)의 방법을 수정, 보완하여 실시하였으며 대략적인 comet assay의 과정을 그림으로 도식하여 Fig. 1에 나타내었다. 임파구 DNA에 산화적 스트레스를 가하기 위해 200 μM H_2O_2를 함유한

PBS 1 ml를 전혈로부터 분리한 임파구와 섞은 후 얼음 위에서 5분간 처리한 뒤 세척하였다. H_2O_2 처리를 끝낸 임파구는 75 μl의 0.7% low melting agarose gel (LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose (NMA)가 pre-coating된 fully frosted slide 위로 임파구와 LMA의 혼탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어 4℃ 냉장고에 약 10분간 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μl를 slide 위에 떨어뜨린 후 다시 cover glass를 덮어 gel이 굳을 때까지 냉장 보관하였다. Gel이 굳은 것을 확인한 뒤 cover glass를 벗기고 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA, 10 mM Tris)에 사용직전에 1% Triton X-100와 10% DMSO를 섞은 후 slide를 담가 차운, 암실에서 1시간 동안 침지 시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 slide를 electrophoresis tank에 배열하고 실험직전 제조하여 냉장 보관하였던 전기영동 buffer (300mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA, pH > 13)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 ± 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가

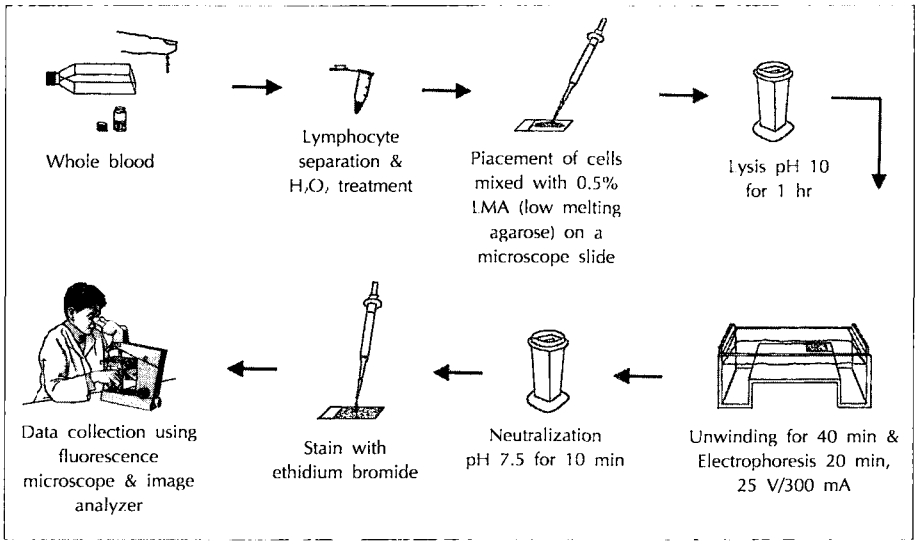

Fig. 1. Alkaline comet assay scheme.

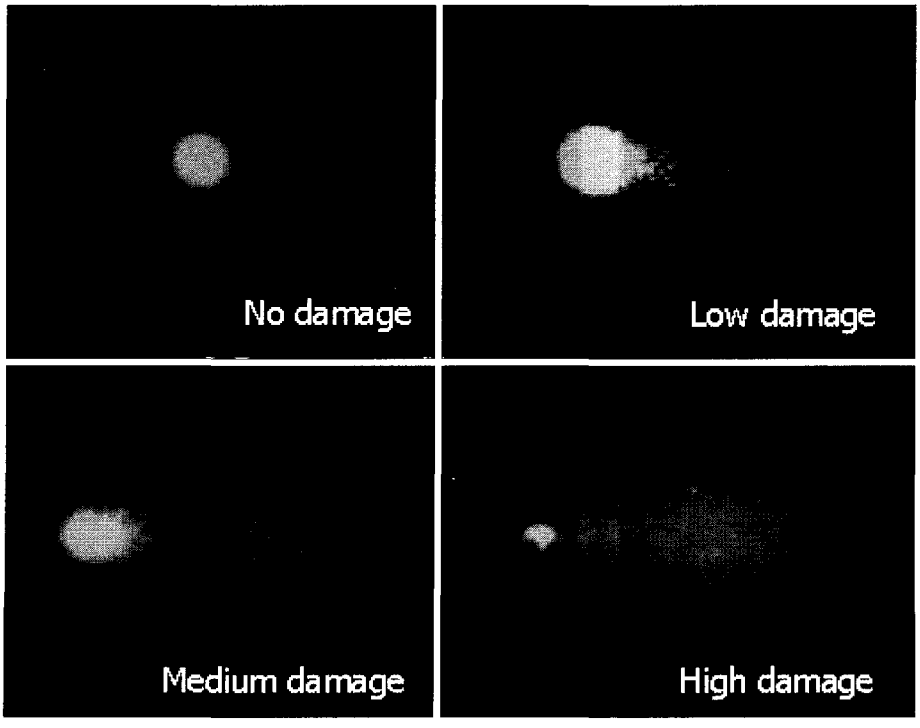

Fig. 2. Images of comets obtained by single-cell gel electrophoresis representing different degrees of DNA damage.

부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris 완충용액 (pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 μl/ml 농도의 ethidium bromide로 핵을 형광 염색하고 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경 (Leica, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera (Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 4.0 comet image analyzing system (Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. Comet image의 예는 Fig. 2와 같다. 임파구의 DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리 (tail length, TL) 또는 tail length에 tail내 함유된 DNA%를 곱해준 tail moment (TM) 값을 측정하여 나타내었으며 각 대상자 당 2개의 slide를 만들어 각각 50개씩 총 100개의 임파구에서 DNA 손상정도를 측정하였다.

3. 자료의 처리

모든 자료는 MS의 excel database system을 이용하여 입력한 후 SPSS-PC+ 통계 package (version 7.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±평균오차 (SE)를 구하였으며 두 그룹간의 평균치에 대한 유의적인 차이는 Student t-test로 검증하였다. 각 변량 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석 (ANOVA)을 시행하여 F값을 구하였고 LSD (least-significant-difference) test를 실시하였다. 변수들 간의 이변량 상관관계는 Pearson's correlation coefficient인 r 계수로 검증하였다.

결 과

1. 조사대상자들의 인구 통계적 특성, 생활습관 및 항산화 영양소 섭취량

연구 대상자의 연령, BMI, 흡연, 음주 운동 등의 생활습관 및 항산화 영양소 섭취량을 비롯한 식습관에 관한 자료는 Table 1과 같다. 대상자 61명의 평균나이는 24.3 ± 0.5 세였고 평균 BMI는 22.5 ± 0.5 kg/m^{2}이었다. 이들 중 흡연자는 총 30명이었고 흡연자들은 평균 하루에 15개피를 평균 5.8년간 피워왔으며 하루에 한 갑 (20개피)을 피우는 것을 기준으로 하여 계산한 흡연력 (packyears)은 4.2년이었다. 음주 습관 조사에서 대상자의 90%인 55명이 음주를 한다고 응답하였으며 평균 음주량은 alcohol 양으로 환산했을 때 일주일에 137.6 g을 섭취하였다. 하루에 30분 이상 규칙적으로 운동한다고 답한 대상자는 29명이었고 과일쥬스, 커피, 녹차를 규칙적으로 마신다고 응답한 대상자는 각각 46, 32, 24명이었다. 대상자들의 평균 항산화 영양소 섭취량을 보면, retinol과 β-carotene으로부터 섭취한 비타민 A 섭취량만 권장량에 다소 부족하게 섭취하였을 뿐, 나머지 영양소들은 모두 권장량보다 높았다 (Table 1).

2. DNA 손상과 생활습관과의 관계

대상자의 생활습관 중 DNA 손상에 영향을 주는 요인을 규명하기 위해 흡연, 음주, 운동 습관과 DNA 손상 지표인 TM 또는 TL와의 상관관계를 조사해 본 결과 흡연이 DNA 손상정도에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Table 2). 또한 TM과 TL은 모두 하루에 피우는 담배 개피수가 많을수록, 담배를 피워 온 햇수가 길수록 정량적으로 증가하였다 (Fig. 3). 임파구 내 DNA 손상에 대한 흡연의 효과는 대상자들을 흡연자와 비흡연자로 나누어 비교하였을 때 더 뚜렷이 관찰되었다. 즉 흡연자들은 비흡연자들에 비해 TM으로 나타낸 DNA 손상정도가 38% 정도 높은 것으로 나타났다 (50.73 ± 5.63 vs. 31.53 ± 3.79 $p < 0.01$, Fig. 4). 흡연 외의 음주나 운동 습관은 DNA 손상과는 유의적인 상관관계를 보이지 않았다.

Table 1. Characteristics of the study population

Variables	n = 61
Age (yrs)	24.3 ± 0.5[1] (20 28)
BMI (kg/m^2)	22.5 ± 0.5
Smokers	30
Cigarettes/day	15.0 ± 1.7
Cigarettes smoked years	5.8 ± 0.6
Pack-years[2]	4.2 ± 0.8
Alcohol drinkers (consumption, g/wk)	55 (137.6 ± 23.5)
Regular exercisers (exercise time, min/d)	29 (50.0 ± 5.7)
Fruit juice drinkers (consumption, cups/d)	46 (0.42 ± 0.05)
Coffee drinkers (consumption, cups/d)	32 (2.1 ± 0.2)
Green tea drinkers (consumption, cups/d)	24 (1.04 ± 0.11)
Antioxidant vitamin intakes	
Vitamin A (μg RE)[3]	569.1 ± 32.4 (81.3% of RDA[4])
(β-Carotene, μg/d)	(2644.4 ± 221.3)
Vitamin E (mg/d)	17.6 ± 1.21 (170.6% of RDA)
Vitamin C (mg/d)	75.7 ± 6.9 (108.1% of RDA)
Folate (μg/d)	258.7 ± 18.2 (103.5% of RDA)

1) Mean ± S.E.
2) Calculated by multiplying the numbers of packs smoked per day by the years smoked
3) Including β-Carotene consumption
4) RDA = Recommended Dietary Allowances for Koreans, 7th revision, 2000

3. DNA 손상과 신체계측과의 관계

대상자의 체중, BMI, 허리-엉덩이 둘레비 (WHR), 체지방량과 임파구 DNA 손상정도와의 상호관련성을 pearson의 상관계수로 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 신체계측치 중에서는 WHR이 DNA 손상정도와 유의적인 양의 상관관계를 보여주었다 (TM : r = 0.289, p = 0.044, TL : r = 0.294, p = 0.040, Fig. 5).

Table 2. Pearsons correlation coefficients between various life-style

Variables	Tail moment		Tail length (μm)	
	r[1)]	p value	r	p value
Smoking habit				
Cigarettes/day	0.311*	0.019	0.294*	0.028
Cigarettes smoked years	0.298*	0.026	0.256	0.057
Pack-years[2)]	0.382**	0.004	0.350**	0.008
Alcohol consumption (g/week)	0.096	0.481	0.133	0.328
Exercise time (min/day)	-0.119	0.382	-0.114	0.404

1) Pearson's correlation coefficients
2) Calculated by multiplying the numbers of packs smoked per day by the years smoked
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

4. DNA 손상과 식이성 요인과의 관계

과일, 채소류, 커피, 녹차의 섭취 빈도 및 항산화 영양소 섭취 수준 등의 식이성 요인이 H_2O_2로 유도된 임파구 DNA 손상 회복에 어느 정도 영향을 미치는지 보기 위해 식이성 요인과 임파구 DNA 손상정도와의 상관관계를 살펴보았다 (Table 4). 식이성 요인 중에서는 과일 쥬스의 섭취빈도가 높을수록 oxidative stress에 의한 임파구 DNA 손상이 회복되어 TM 값이 유의적으로 감소하였다 (TM : r = -0.265, p = 0.049, Fig. 6). 또한 과일 섭취빈도에 따라 대상자를 과일을 매일 섭취하는 군과 과일을 거의 섭취하지 않는 군으로 나누었을 때 과일을 매일 섭취하는 군은 그렇지 않은 군에 비해서 DNA 손상 회복에 따라 TM 값이 유의적으로 감소한 것으로 나타났다 (TM : 30.92 ± 4.01 vs. 48.76 ± 7.68, p = 0.05, Fig. 7). 그 밖에 채소

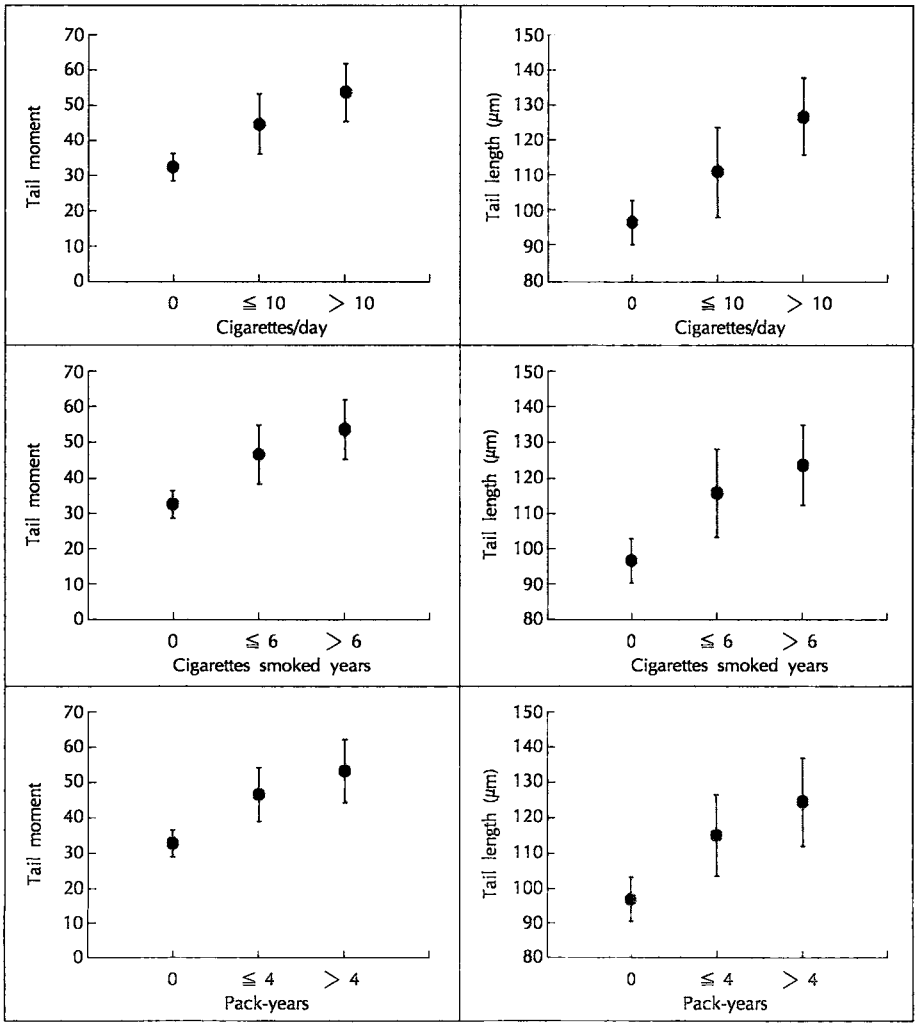

Fig. 3. Dose-dependent effects of smoking habits (cigarette smoked per day, cigarette smoked years and packyears) on oxidative DNA damage in lymphocytes (tail moment & tail length), Values are mean ± S.E.

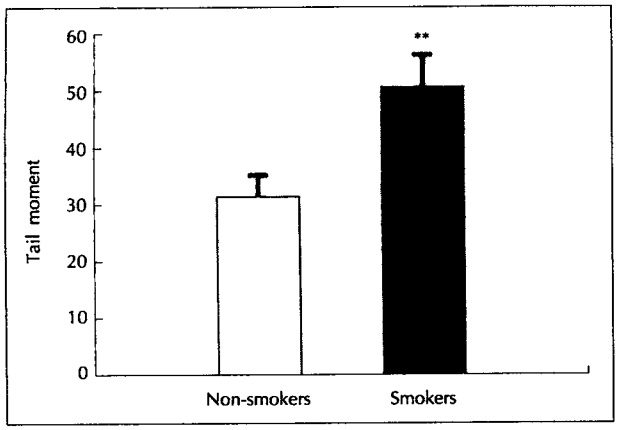

Fig. 4. Effect of smoking on oxidative DNA damage in lymphocytes (tail moment). Error bars represent the standard error of the mean, **: Significantly different from non- smokers at $p < 0.01$ by Student t-test.

Table 3. Pearson's correlation coefficients between DNA damage (tail moment or tail length) and anthropometric measurements

Variables	Tail moment		Tail length (μm)	
	r[1)]	p value	r	p value
Body weight (kg)	0.110	0.425	0.117	0.395
Body mass index (kg/m^2)	0.001	0.991	0.021	0.882
WHR (waist/hip ratio)	0.289*	0.044	0.294*	0.040
Body fat mass (kg)	0.084	0.544	0.095	0.490

1) Pearson's correlation coefficients
*: $p < 0.05$

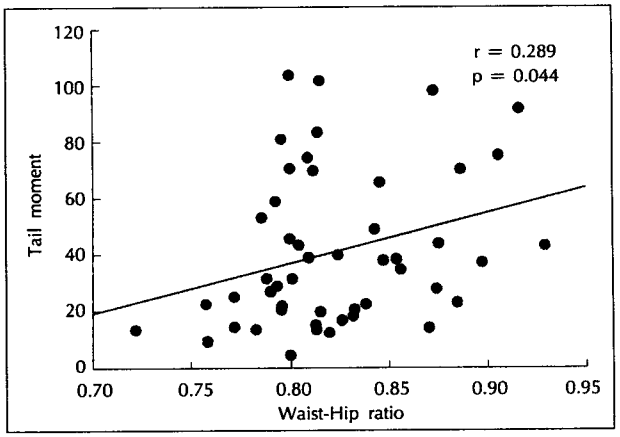

Fig. 5. Relationship between oxidative DNA damage in lymphocytes (tail moment) and waist/hip ratio (WHR).

류 섭취 빈도, 커피 및 녹차 섭취 빈도, 항산화 영양소 섭취량은 DNA 손상과 유의적인 상관관계를 보이지 않았다 (Table 4).

5. DNA 손상과 혈장 지질 profile과의 관계

혈장 지질 성분 중에서는 대상자의 혈장 중성지방 수준이 높을수록 임파구 DNA 손상정도가 유의적으로 증가하였다 (TM : r = 0.289, p = 0.031, TL : r = 0.282, p = 0.035, Fig. 8). 혈장 총 콜레스테롤, HDL-, LDL-콜레스테롤은 DNA 손상과 아무런 관련성을 보이지 않았다 (Table 5).

고 찰

Comet assay는 분자독성학을 비롯한 유전자 손상에 관련된 연구에 광범위하게 적용되는 최신 연구기법으로서, 분석결과 현미경 상에서 보이는 모양이 혜성의 모습과 같아 comet assay라고 부르며, single cell gel electrophoresis assay라 부르기도 한다. 이 분석법의 이론은 근본적으로 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례하는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 DNA 손상을 입은 세포를 lysis하여 핵만 남긴 후 전기영동을 하게 되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동하게 된다. 이 때 DNA의 손상을 민감하게 감지하기 위하여 pH 13이상의 alkali buffer로 DNA를 unwinding 시켜 이중나선 구조를 풀어 single strand breakage를 정량 하므로 이 방법을 alkaline comet assay라고 부른다.[24-26] 최근 몇 년 사이에 과학선진국에서 human biomonitoring 연구에 이 comet assay를 사용하려는 연구가 많이 시도되고 있다.[27] 이 연구들은 크게 세 영역으로 나누어 볼 수 있는데 첫 번째로는 암, 심혈관 질환 등의 예방을 위한 dietary intervention 연구, 두 번째는 환자를 대상으로 한 질병에 따른 DNA 손상정도 평가, 마지막으로 작업장, 환경 또는 생활습관에 따른 위험물질에의 노출정도를 평가하는 연구가 있다.

본 연구는 우리 나라에서 human biomonitoring에 comet assay를 처음 도입한 연구로서, 건강한 젊은 성인 남자 61명을 대상으로 영양실태, 생활습관, 식습관 등을 조사하여 임파구 내 산화적 DNA손상에 영향을 미치는 위험요인을 살펴 본 결과 흡연, WHR, 혈장 중성지방 수준, 과일쥬스 섭취량 및 과일류 섭취 빈도가 DNA 손상정도와 각각 유의적인 상관관계를 보여주는 것으로 나타났다. 이 요인들 중 대상자의 임파구 oxidative DNA 손상정도와 가장 상관관계가 높은 것은 흡연이었으며 이는 여러 선행연구에서 보고된 바와 같다.[28-34] Betti 등은 100명의 건강한 성인을 대상으로 한 연구에서 흡연자가 비흡연자에 비해 comet assay로 본 임파구 DNA 손상이 유의적으로 증가해 있음을 밝혔다.[28,29] 최근에 그리스인과 인도인을 대상으로 한 biomonitoring 연구에서도 흡연이 comet assay로 분석한 DNA 손상에 큰 영향을 미친다는 것이 보고된 바 있다.[31,34]

이렇게 흡연이 인체의 DNA 손상을 유발시키는 원인으로는 담배 연기에 다량 함유되어 있는 tar, nicotenes, po-

Table 4. Pearson's correlation coefficients between DNA damage (tail moment or tail length) and dietary factors

Variables	Tail moment		Tail length (μm)	
	r[1)]	p value	r	p value
Fruit juice consumption (cups/day)	−0.265*	0.049	−0.258	0.057
Frequency score of Vegetables	0.142	0.301	0.131	0.340
Coffee consumption (cups/day)	−0.133	0.339	−0.133	0.298
Green tea consumption (cups/day)	−0.162	0.236	−0.172	0.213
Antioxidant vitamnin intakes				
Retinol (mg/100 g)	0.085	0.539	0.112	0.416
β-Carotene (μg/100 g)	0.073	0.597	0.039	0.779
Vitamin E (mg/100 g)	−0.057	0.681	−0.048	0.730
Vitamin C (mg/100 g)	−0.030	0.830	−0.056	0.687
Folate (μg/100 g)	−0.029	0.832	−0.071	0.607

1) Pearson's correlation coefficients *: $p < 0.05$

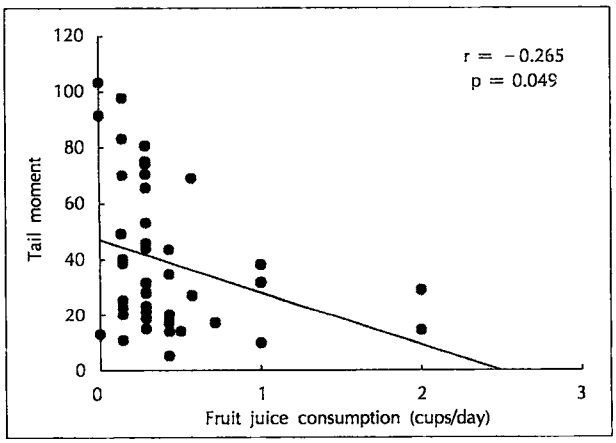

Fig. 6. Relationship between oxidative DNA damage in lymphocytes (tail moment) and fruit juice consumption.

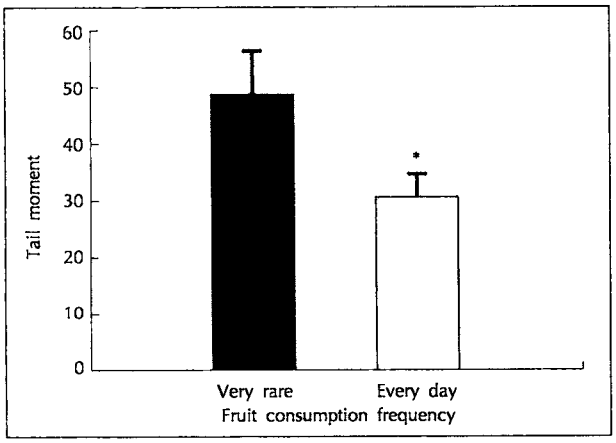

Fig. 7. Effect of fruit consumption on oxidative DNA damage in lymphocytes (tail moment). Error bars represent the standard error of the mean, *: $p = 0.05$ significant between the two groups divided by fruit consumption frequency, every day ($n = 15$), very rare ($n = 18$).

lycyclic aromatic hydrocarbons (PHA)를 비롯한 다양한 발암원을 들 수 있다. 담배 연기에 함유되어 있는 발암원들은 인체 내 DNA와 공유 결합을 하거나 활성 산소종(reactive oxygen species)을 생성시킴으로 DNA를 손상시키는 것으로 알려져 있다.[35,37] 흡연으로 인해 손상된 DNA는 촉진과정 (pregression)을 거쳐 암으로 계속해서 발전하게 되며, 이런 이유로 인해 흡연자들이 폐암을 비롯한 다양한 암의 발생률 및 암으로 인한 사망률이 비흡연자에 비해 훨씬 높게 된다.

이제까지 comet assay로 측정된 DNA 손상과 흡연과의 관계를 본 대부분의 선행 연구에서 흡연 자체가 DNA strand break를 증가시킨다는 것을 알아냈지만 DNA 손상정도와 하루에 피우는 담배 개수 또는 축적된 타르 양과의 상관관계를 밝히지는 못했다.[28,38,39] 그러나 본 연구에서는 흡연에 의한 DNA 손상은 하루에 피우는 담배 개피수가 많을수록, 담배를 피워 온 햇수가 길수록 정량적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이는 흡연량이 많을수록, 흡연을 오랫동안 할수록 흡연으로 인한 발암원의 체내 축적량이 많아지게 되고 그로 인해 DNA의 손상정도가 증가하기 때문으로 사료된다. 이와 같이 DNA 손상에 대한 흡연의 효과가 이와 관련된 대부분의 연구결과 뚜렷하게 나타났기 때문에 많은 연구자들이 comet assay를 이용한 human biomonitoring 연구시 대상자들을 선택할 때 반드시 흡연습관을 통제할 것을 권유하고 있다.[32]

본 연구 대상자의 DNA 손상정도는 WHR과 유의적인 양의 상관관계를 보였으나 흡연의 영향을 통제한 후 편상관관계를 알아본 결과, 이 상관관계는 더 이상 보이지 않았다. 즉 WHR이 높은 대상자일수록 DNA 손상이 높았던 것은 흡연의 영향이 개입된 결과였던 것으로 생각된다. 이는 본 연구에서 흡연자의 WHR이 비흡연자보다 높았을 뿐 아니라, WHR이 흡연량 및 흡연력과 유의적인 양의 상관관계를 보인 것에 기인한 것으로 보인다 (결과 미제시). 흡연자에

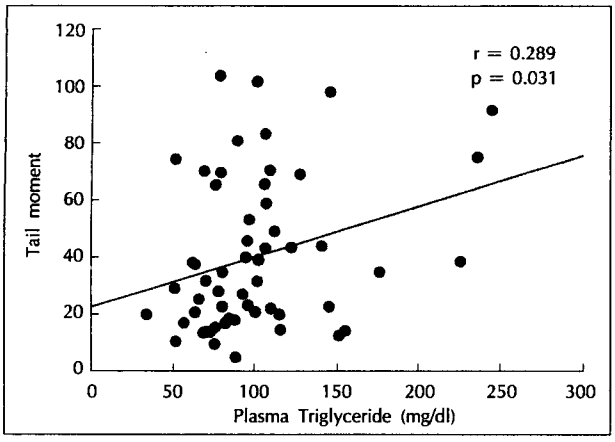

Fig. 8. Relationship between oxidative DNA damage in lymphocytes (tail moment) and plasma triglyceride concentration.

Table 5. Pearson's correlation coefficients between DNA damage (tail moment or tail length) and plasma lipid profiles

Variables	Tail moment		Tail length (μm)	
	r[1)]	p value	r	p value
Total cholesterol (mg/dl)	−0.223	0.099	−0.199	0.141
LDL-cholesterol (mg/dl)	−0.238	0.083	−0.235	0.087
HDL-cholesterol (mg/dl)	0.037	0.785	0.077	0.573
Triglycerides (mg/dl)	0.289*	0.031	0.282*	0.035

1) Pearson's correlation coefficients
*: $p < 0.05$

서 WHR이 증가된 것은 Shimokata 등[40]에 의해서 보고된 바 있으며 이는 흡연이 체지방의 분포에 좋지 않은 영향을 미치기 때문이라고 알려져 있다.

혈장 중성지방과 DNA 손상과의 유의적인 양의 상관관계를 보인 논문은 아직 보고되지 않았다. 다만 고지혈증 환자가 정상인에 비해 comet assay로 본 산화적 스트레스에 의한 임파구 내 DNA 손상이 유의적으로 높아 있음이 보고된 바 있다.[41] 본 연구 결과 대상자들에서 혈장 중성지방 수준이 증가할수록 DNA 손상이 유의적으로 증가한 것은 고중성지방혈증으로 인한 내피 세포에서의 superoxide radical과 다른 산소 자유기의 생성이 증가되었다는 Plotnick 등[42]의 연구결과와 관련지어 설명될 수 있다. 이 때 생성된 산소 자유기는 일산화 질소 (NO)를 불활성화시킴으로 인해 내피 세포 기능 이상을 나타내고 동맥 경화증에 중요한 역할을 하는 LDL 콜레스테롤의 산화 작용을 증가시키며 또한 DNA와 결합하여 DNA 손상을 초래한다고 알려져 있다.[43-46] 본 연구는 건강한 젊은 성인 남성을 대상으로 하였기 때문에 혈중 중성지방의 수준이 심혈관질환의 위험수준이라고 알려진 200 mg/dl 이상인 대상자가 3명밖에 되지 않아 고중성지방혈증인과 정상인으로 나누어 DNA 손상정도를 비교하는데는 무리가 따른다. 앞으로 고지혈증환자를 대상으로 한 biomonitoring 연구가 후속연구로 진행되어야 할 것이다.

식이성 요인 중에서는 과일 쥬스 섭취량 및 과일류 섭취빈도가 많을수록 oxidative stress에 대한 저항력 증가로 인해 DNA 손상회복 효과를 보였다. 과일과 채소의 풍부한 섭취가 다양한 종류의 암을 예방한다는 것은 이제까지 많은 역학 조사를 통해 밝혀졌다.[47] 현재까지 comet assay로 본 DNA 손상과 평상시의 과일, 채소류 섭취 빈도와의 상관관계를 본 논문은 발표된 바 없다. 다만 최근에 과일, 채소류를 이용한 intervention 연구를 통해 이들이 인체 DNA 손상에 미치는 영향을 살펴본 연구가 몇 편 보고[48-50]되고 있다. Collins 등[48]은 500 ml의 키위 쥬스 섭취 후에 H_2O_2로 유발되었던 DNA 손상이 유의적으로 감소하였음을 보고하였다. 여대생들에게 토마토 퓨레를 3주간 동안 섭취시킨 후에 comet assay로 본 임파구 DNA 손상의 보호효과가 있음이 보고되었고[49] 또한 330 ml의 토마토 쥬스와 당근 쥬스, 10 g의 말린 시금치 가루를 각각 2주간 씩 보충한 결과 DNA 손상이 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.[50]

앞서 살펴보았던 토마토, 당근, 시금치 등 채소류를 이용한 intervention 연구에서 이들 채소류가 DNA 손상에 보호 효과를 보인 반면, 본 연구 결과에서는 대상자의 평상시 채소류 섭취빈도가 DNA 손상에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이는 방광암 환자를 대상으로 한 연구에서 대상자의 과일 섭취량은 방광암과 역의 상관관계를 나타냈지만 채소 섭취량은 아무런 상관관계가 없었다는 Zeegers 등[51]의 연구 결과와 어느 정도 일치한다고 할 수 있다. 과일류는 그 종류가 한정되어 있고 대부분 생으로 섭취하며 과일류에 대한 싫고 좋은 기호가 뚜렷하게 나누어지는 반면 채소류의 경우 종류와 조리 방법이 매우 다양하고 또한 한국인의 식단에서는 반찬으로 채소류가 대부분 포함되기 때문에 채소류를 거의 먹지 않는다고 답한 대상자가 전체 61명 대상자 중 2명밖에 없어서 채소류 섭취량에 따른 DNA 손상정도를 비교하기가 어려웠다. 따라서 앞으로 암 또는 심혈관질환 예방 효과에 대한 채소류의 효과를 연구할 때는 전체적인 채소류의 섭취량을 조사하는 것보다는 토마토, 당근 등 항산화 영양소가 풍부한 채소를 선별하여 식품 빈도조사를 하는 것이 더 효과적이라고 사료된다.

항산화 영양소의 섭취량과 DNA 손상정도와는 상관관계를 보이지 않았는데 이는 본 연구에서 24시간 회상법을 이용하여 조사 전날의 섭취량을 분석한 것이 때문에 대상자들의 평상시 항산화 영양소 섭취량을 반영하는데는 제한점이 있기 때문이라고 생각된다. 또한 섭취한 항산화 영양소의 흡수율과 이용율이 개인에 따라 또는 생활 습관에 따라 다

르므로 DNA 손상 회복에 대한 항산화 영양소의 효과를 보기 위해서는 섭취량 뿐만 아니라 혈액내 항산화 영양소 수준도 함께 비교하는 것이 의미가 있을 것이다.

요약 및 결론

서구에서는 최근 몇 년 동안 인구집단의 DNA 손상 정도를 biomonitoring 하는 연구 방법으로 alkaline comet assay가 많이 이용되어 오고 있다. 본 연구는 한국인 성인을 대상으로 산화적 DNA 손상의 biomarker로 alkaline comet assay의 활용도를 평가하려는 목적과 인체 임파구에서의 alkaline comet assay에 의해 측정되는 H_2O_2 유발 DNA 손상 및 회복에 미치는 영양상태와 생활습관의 영향을 평가하기 위한 목적으로 시도되었다. 연구대상은 20-28세의 한국인 건강한 남성 자원자 61명이었으며, 질문지를 이용하여 식습관, 흡연습관을 알아보고, 간단한 신체계측조사를 수행하였다. DNA 손상정도를 알기 위해 채혈 후 임파구에서 comet assay를 수행하였으며 혈장 지질을 분석하였다. 대상자의 임파구 DNA 손상정도는 comet assay의 Tail moment (TM)와 tail length (TL)값으로 측정하였다.

TM과 TL로 살펴본 대상자의 DNA 손상 정도는 각각 흡연, WHR, 혈장 중성지방 수준과 양의 상관관계를 보였으며, 이 요인들 중 대상자의 산화적 DNA 손상정도와 가장 상관관계가 높은 것은 흡연이었다 ($r = 0.311$ 및 0.382 for TM, $r = 0.294$ 및 0.350 for TL). 흡연에 의한 DNA 손상은 하루에 피우는 담배 개피수가 많을수록, 담배를 피워 온 햇수가 길수록 정량적으로 증가하는 것으로 나타났다. 식이성 요인 중에서는 과일 쥬스 섭취량 및 과일류 섭취빈도가 많을수록 DNA 손상이 유의적으로 감소하여 DNA 손상 회복효과를 보였으나, 대상자의 채소류 섭취빈도 및 항산화 영양소 섭취량과 DNA 손상과는 유의적인 상관관계를 보이지 않았다.

이상의 결과에서 alkaline comet assay를 이용한 인체 임파구 내 DNA 손상 측정 방법은 인체의 DNA 손상측정을 위한 human biomonitoring 방법으로 민감하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 뿐 만 아니라 comet assay로 측정한 성인 남성의 DNA 손상 정도에 가장 큰 영향을 미치는 위험 요인은 흡연임을 알 수 있었으며, DNA 손상정도와 과일의 섭취 사이에 상관관계가 나타난 것으로부터, 흡연 및 기타 요인으로 인해 손상된 DNA는 과일 또는 과일쥬스 섭취에 의해 효과적으로 회복될 수 있을 가능성을 예측할 수 있었다. 본 연구 결과 우리 나라 사람의 인체 DNA 손상 biomarker로 alkaline comet asasy를 이용할 수 있는 것으로 나타났으므로 이를 활용한 다양한 biomonitoring 연구와 intervention 연구가 활발하게 이루어 질 것으로 기대된다.

Literature cited

1) Wogan GN. Detection of DNA damage in studies on cancer etiology and prevention. *IARC Sci Publ* 89: 32-51, 1988
2) Kaldor J, Day NE. Epidemiological studies of the relationship between carcinogenicity and DNA damage. *IARC Sci Publ* 89: 460-468, 1988
3) Santella RM. DNA damage as an intermediate biomarker in intervention studies. *PSEMB* 216: 166-171, 1997
4) Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 7: 9-16, 1998
5) Bonassi S, Neri M, Puntoni R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res* 480-481: 349-358, 2001
6) Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922, 1993
7) Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann NY Acad Sci* 686: 12-18, 1993
8) Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease. Oxford University press, Oxford, 1994
9) Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in men. *J Mol Med* 74: 297-312, 1996
10) Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. Application of the comet assay for DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. *Mutat Res* 416 (1-2): 21-35, 1998
11) Poli P, buschini A, Restivo FM, Ficarelli A, Cassoni F, Ferrero I, Rossi C. Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14 (6): 547-556, 1999
12) Ostling O, Johanson KJ. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 123: 291-298, 1984
13) Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191, 1988
14) Collins A, Dusinska M, Franklin M, somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applicaions. *Environ Mol Mutagen* 30 (2): 139-142, 1997
15) Ross GM, McMillan TJ, Wilcox P, Collins AR. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Reports on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res* 337 (1): 57-60, 1995
16) Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333, 1994
17) Rojas E, Valverde M, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutration Research* 370 (2): 115-120, 1996
18) Rao GV, Kumar GS, Ahuja YR. Single cell gel electrophoresis on peripheral blood leukocytes of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 26: 377-380, 1997
19) Hellman B, Friis L, Vaghef H, Edling C. Alkaline single cell gel elec-

trophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon. *Mutat Res* 442 (2): 121-132, 1999
20) Vaghef H, Nygren P, Edling C, Bergh J, Hellman B. Alkaline single-cell gel electorphoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat Res* 395 (2-3): 127-138, 1997
21) Choi JW, Park JH, Ji ST, Choi OB, Shin HK. Antigenotoxic effect of dominant bacterial isolates from kimchi *in vitro*. *Korean J Food Sci Technol* 31 (4): 1071-1076, 1999
22) Kim SJ, Chung HW. Effect of antioxidants and chelating agents on 1, 2,4-benzenetriol-induced DNA damage in HL-60 cells analysed by alkaline comet assay. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 20 (1): 7-13, 2000
23) Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
24) McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De M대 MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res* 288: 47-63, 1993
25) Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59, 1995
26) Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and appliacations. *J Chromatography* 722: 225-254, 1999
27) Kassie F, Parzefall W, Knasmueller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 463: 13-31, 2000
28) Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by Comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333, 1994
29) Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by Comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res* 343: 207-210, 1995
30) Piperakis SM, Visvardis EE, Sagnou M, Tassiou AM. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis* 19: 695-698, 1998
31) Piperakis SM, Petrakou E, Tsilimigaki S. Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 36: 243-249, 2000
32) Moller P, Knusdsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confouding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9 (10): 1005-1015, 2000
33) Zhu CQ, Lam TH, Jiang CQ, Wei BX, Xu QR, Chen YH. Increased lymphocyte DNA strand breaks in rubber workers. *Mutat Res* 470 (2): 201-209, 2000
34) Dhawan A, Mathur N, Seth PK. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutat Res* 474: 121-128, 2001
35) United States Surgeon General. Reducing the Health Consequences of Smoking: 25 Years of Progeress. Washington, DC: Office on Smoking and Health, 1989
36) Leanderson P, Tagesson C. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation. *Chem Biol Interact* 81: 197-208, 1992
37) Pryor W, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate. *Ann NY Acad Sci* 686: 12-28, 1993
38) Hughes CM, McKelvey-Martin VJ, Lewis SEM. Human sperm DNA integrity assessed by the comet assay and ELISA assays. *Mutagenesis* 14: 71-75, 1999
39) Frenzilli G, Betti C, Davini T, Desideri M, Fornai E, Giannessi L, Maggiorelli F, Paoletti P, Barale R. Evaluation of DNA damage in leukocytes of ex-smokers by single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 375: 117-123, 1997
40) Shimokata H, Muller DC, Andres R. Studies in the distribution of body fat. III. Effects of cigarette smoking. *JAMA* 261 (8): 1169-1173, 1989
41) Harangi M, Remenyik E, Seres I, Varga Z, Katona E, Paragh G. Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mutat Res* 513: 17-25, 2002
42) Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal. *JAMA* 278: 1682-1686, 1997
43) Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551, 1993
44) Shiode N, Nakayama K, Morishima N, Yamagata T, Matsuura H, Kajiyama G. Nitric oxide production by coronary conductance and resistance vessels in hypercholesterolemic patients. *Am Heart J* 131: 1051-1057, 1996
45) Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 330 (2): 181-185, 1993
46) Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA: a review. *Mutat Res* 195: 137-149, 1998
47) Terry P, Terry JB, Wolk A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. *J Int Med* 250: 280-290, 2001
48) Collins BH, Horska A, Hotten PM, Riddoch C, Collins AR. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutr Cancer* 39 (1): 148-153, 2001
49) Riso P, Pinder A, Santangelo A, Porrini M. Does tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr* 69: 712-712, 1999
50) Pool-Zobel BL, Bub A, Muller 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* 18 (9): 1847-1850, 1997
51) Zeegers MP, Goldbohm RA, van Den Brandt PA. Consumption of vegetables and fruits and urothelial cancer incidence: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (11): 1121-1128, 2001