

산화적 스트레스에 의한 *N'*-methyl-*N'*-nitroguanidine의 유전독성증가

강진석, 정기경, 서수경, 김주환, 이화옥, 정해관, 김승희, 박순희*

식품의약품안전청 국립독성연구원 독성연구부

Increased Genotoxicity of *N'*-methyl-*N'*-nitroguanidine by Oxidative Stress

Jin Seok Kang, Ki Kyung Jung, Soo Kyung Suh, Joo Hwan Kim,
Hwa Ok Lee, Hai Kwan Jung, Seung Hee Kim and Sue Nie Park*

Department of Toxicological Researches, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

ABSTRACT

To investigate the possible enhancement of genotoxicity in stress environment, we examined the effect of genotoxic material in oxidative stress-induced condition using human cell line. Human lymphoblast cell line, TK6 was treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) for induction of oxidative stress, and treated with *N'*-methyl-*N'*-nitroguanidine (MNNG), as a genotoxic material. We carried out MTS assay to set treatment doses. TK6 was treated with H_2O_2 as 6.75 (low dose) or 13.5 μM (high dose) for 2 h, and treated with MNNG as 0.117 (low dose), 0.234 (middle dose), 0.468 μM (high dose) for 2 h. As results, a treatment of MNNG induced DNA damage as dose dependently. And TK6 treated with H_2O_2 at low as well as high dose followed by MNNG treatment showed higher DNA damage compared to MNNG alone treated groups. Malondialdehyde, as a marker of lipid peroxidation was increased in H_2O_2 and MNNG treated groups. Real-time RT-PCR analyses for expression of several antioxidative enzymes showed that catalase mRNA and glutathione peroxidase 1 mRNA expression were decreased in H_2O_2 and MNNG treated groups. Taken together, we conclude that genotoxicity induced by MNNG is enhanced in a condition of oxidative stress induced by H_2O_2 and it suggests that it should be associated with induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant enzymes.

Key words : genotoxicity, oxidative stress, hydrogen peroxide (H_2O_2), *N'*-methyl-*N'*-nitroguanidine (MNNG), TK6 cell line

서 론

현대인은 과도한 스트레스 환경에서 일하며 생

활하고 있는데, 이러한 스트레스는 체내에서 활성 산소를 생성하며 이로 인하여 여러 가지 손상이 나타난다. 활성산소란 반응성 산소물(reactive oxygen species) 혹은 산소라디칼(oxygen radical)를 포함하는 것으로 산소분자의 불완전 환원 혹은 전자 각에서의 전자의 재배치 등으로 생기는 반응성이

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-380-1792, Fax: +82-2-388-6453
E-mail: suenie@kfda.go.kr

높은 산소산물을 말한다. 이에 superoxide (O_2^-), hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 있다. 생체에서는 끊임없이 활성산소가 생성되고 또한 이를 계속 제거하여 생성과 제거가 균형을 이루고 있어 우리는 건강한 세포의 기능을 유지하고 있다. 그러나 어떤 원인에 의하여 그 생성이 급격히 증가하거나 또는 이들을 제거하는 기능이 저하될 경우 활성산소에 의한 독작용을 받아 각종 질병이 유발되는데 (Mates *et al.*, 1999), 이같은 활성산소의 독작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 한다. 산화적 스트레스에 의한 독작용은 무작위하게 나타나지만 발생하는 부위 및 발생기전에 따라서 여러 질병을 유발한다 (Wiseman and Halliwell, 1996).

생성된 유해산소는 생체의 방어기전에 의하여 제거되지만, 미처 제거하지 못하게 되면 생체에 여러 손상을 일으키게 된다. 활성산소는 생체내에서 DNA 손상, 단백질 손상, 지질 손상 등을 일으킨다. 먼저 DNA 손상은 deoxyribose부분을 공격하여 base 유리, base가 산화되어 다른 구조로 변화시키며, 구아닌이 산화되어 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)이 생성된다. 8-OHdG은 활성산소에 의한 DNA 손상 정도를 나타내는 지표로 사용되며, 미토콘드리아 DNA에서 핵의 DNA보다 10배 이상의 8-OHdG 포함되는 사실로 보아 미토콘드리아가 활성산소 발생의 주된 장소임을 암시한다. 또, 단백질 손상은 카르보닐 화합물 등의 형성에 의해 몇 개의 아미노산이 산화되면서 나타난다. 한편, 지질 손상은 활성산소에 의해 세포막의 주성분인 지질이 산화되어 과산화 지질이 생성되며, 세포막 성질 변하거나 세포 내부가 들어나게 되며, 과산화 지질은 강한 산화력을 가지므로 단백질 등의 다른 성분을 산화시킨다.

활성산소는 생체의 주요물질 중 특히 DNA에 다양한 파괴작용을 유발함이 밝혀지고 있다. 특히 지금까지 알려진 많은 발암물질, 예를 들면, 방사선, 자외선 및 각종화합물들이 활성산소를 생성한다는 사실은 활성산소의 발암작용을 뒷받침해주는 매우 유력한 증거라고 할 수 있으며, 활성산소가 암을 비롯한 여러 질환의 발생과 관련되는 것이 보고되었다 (Sanz *et al.*, 1995; Wiseman and Halliwell, 1996; Elchuri *et al.*, 2005).

일반적으로 많은 유전독성물질에 대한 발암성은

보고되어 있지만, 산화적 스트레스조건에서는 이 유전독성물질에 대한 세포 혹은 동물의 감수성의 변화에 대해서는 연구된 바가 적다. 일반적으로 산화적 스트레스 환경에서 발암물질 혹은 인체에 위험한 유해물질, 혹은 잠재적 유해물질에 노출될 때 그 물질에 대한 감수성이 다를 것으로 사료된다.

예를 들면, 식품에 존재하는 heterocycline amine을 섭취하면 간암 등의 암이 유발되는 것이 보고되어 있지만 (Sugimura, 1986, 2000; Ohgaki *et al.*, 1987; Kato *et al.*, 1988; Kushida *et al.*, 1994; Nagao *et al.*, 1997; Nagao, 1999; Fukushima, 1999; Sugimura *et al.*, 2004), 산화적 스트레스에 의한 간세포손상이 있는 경우 간암유발력이 증가됨이 실험적으로 증명되었다 (Kang *et al.*, 2006). 또, 베타 카로틴(beta-carotene)은 일반적으로 항산화제로 잘 알려져 있지만 베타 카로틴의 분해산물이 세포독성과 유전독성을 유발하며 (Alija *et al.*, 2004), 산화적 스트레스 하에서는 이 유전독성이 증가된다고 보고되었고 (Alija *et al.*, 2005), 최근에는 이것이 beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET)과 Alpha-Tocopherol Beta-carotene Cancer prevention (ATBC) 화학적 암예방 임상시험에서 베타 카로틴 분해산물이 발암성 반응을 보인 것과 관련이 있다고 제시되었다 (Alija *et al.*, 2006).

이러한 과학적 보고들로 볼 때 유해물질 혹은 기존의 유익한 물질일지라도 스트레스 환경에서 유전독성에 대한 감수성이 변화될 수 있는 가능성이 있음에 따라 이들 물질의 활성을 좀 더 민감하게 평가할 수 있는 시스템을 개발하는 것이 필요하다. 이에 본 연구에서는 사람의 세포주를 이용하여 산화적 스트레스 모델을 만들고 이를 토대로 기존의 유전독성 시험법을 이용하여 식품·의약품성분들의 유전독성 감수성 및 위험도를 평가하고자 한다. 또, 나아가 산화적 스트레스 환경하에서 식품의약품 등의 유전독성 감수성 및 위험도를 평가함으로써 새로운 유전독성 시험법 개발 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 시험물질

사람 세포주 TK6 (human lymphoblast cell line)는 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA;

CRL-8015TM)에서 구입하였다. RPMI 1640, fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin은 Gibco BRL(USA)에서 구입하였으며, sodium bicarbonate, DMSO, hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Sigma사로부터 구입하였고, *N*'-methyl-*N*'-nitroguanidine (MNNG)는 TCI로부터 구입하였다.

세포배양을 위해 RPMI 1640 배지에 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 4.5 g/L glucose, 1.5 g/L sodium bicarbonate와 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 37°C, 습도 95%, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였고, 2~3일마다 한번씩 계대배양하였다.

시험물질로는 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂ (Sigma, H1009)를 사용하였고, 유전독성물질로는 MNNG (TCI, M0527)를 사용하였다. 시험물질의 용해를 위해 사용된 DMSO는 세포 성장과 형질 전환을 유도하지 않는 0.5% 이내로 사용되었다.

2. MTS assay

H₂O₂와 MNNG에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, G5421, USA)를 사용하였다.

TK6 cell을 5 × 10⁵ cells/mL로 조정하여 50 μL씩 96 well plate에 분주하였다. Overnight incubation한 후 H₂O₂와 MNNG를 농도별로 처리하고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 배양한 후에 MTS assay를 이용하여 세포독성시험을 실시하였다. TK6 세포를 96 well plate에 5 × 10⁵ mL의 세포를 50 μL씩 분주한 후에 시험물질을 농도별로 처리하고 24시간 배양하였다. 세포가 함유된 100 μL 세포배양액이 담긴 96-well plate에 MTS 333 μL/mL와 25 μM PMS를 20 μL를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양하고, ELISA plate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. MNNG 및 H₂O₂에 대한 Comet assay

MTS에 근거하여 MNNG 및 H₂O₂ 투여농도를 설정하였다. 산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂를 2시간 처리한 후 MNNG를 각 세포에서 2시간 처리한 후 시료를 채취하였다.

TK6 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640에서

배양하여 사용하였다. 5%의 CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였고 2~3일마다 한번씩 RPMI 1640배지를 이용하여 계대하였다. 배양 세포를 12-well plate에 1 × 10⁵ cells/mL이 되도록 파종을 한 후, 각각의 well에 H₂O₂를 저농도 및 고농도 투여 균으로 각각 6.75 혹은 13.5 μM을 2시간 처리하였고, MNNG를 저, 중, 고농도의 농도를 사용하여 각각 0.117, 0.234, 0.468 μM을 2시간 처리하였다.

시험물질을 처리한 세포를 LMAgarose에 섞어서 세포와 agarose의 비율이 1:10이 되도록 조정하고 나서, 이어 Comet SlideTM에 즉시 75 μL를 떨어뜨린 후 굳히고, 슬라이드를 lysis solution에 담그고 4°C에서 30~60분간 방치한다. 이어서 alkaline solution에 Comet SlideTM을 20~60분 방치한 후 슬라이드를 전기영동기계로 옮기어 25 V, 200 mA에서 30분간 전기영동을 실시한다. 70% 알콜에 5분간 담근 후 자연 건조시키고 나서 ethidium bromide로 염색한 후 형광현미경으로 관찰하고, 영상분석 프로그램 (Komet 3.1)를 이용하여 tail moment (tail DNA × tail length)값을 측정하여 DNA strand break 정도를 확인하였다.

4. 지질과산화 정량

산화적 스트레스를 유발하기 위하여 H₂O₂를 2시간 처리한 후 MNNG를 각 세포에서 2시간 처리한 후 시료를 채취하였다. MTS에 근거하여 MNNG 및 H₂O₂ 투여농도를 설정하였다. 배양 세포를 12 well plate에 1 × 10⁵ cells/mL이 되도록 파종을 한 후, 각각의 well에 H₂O₂ 6.75 μM을 2시간 처리하였고, MNNG를 저, 중, 고농도의 농도를 사용하여 각각 0.117, 0.234, 0.468 μM을 2시간 처리하였다.

시험물질을 처리한 세포를 cold PBS로 세정한 후 26 게이지 주사기를 사용하여 세포를 lysis한 후 3,000 × g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액에 있는 malondialdehyde (MDA)의 양을 MDA-586 kit (BIOTYTECH, USA)를 사용하여 정량하였다. MDA standard curve를 작성한 후 샘플에 대한 MDA의 양을 환산하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다.

5. Total RNA 분리

시험물질을 처리한 세포주에서 각 투여시간 및

투여용량별로 시료를 채취하였다. 샘플을 PBS로 세척한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 배양된 세포를 모은 후 RLT buffer를 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 이어 RLT buffer와 동량으로 70% ethanol을 homogenized lysate에 첨가하여 pipetting하여 잘 혼합시키고, RNeasy mini column이 장착된 2 mL collection tube에 샘플을 넣어주고 8,000 × g 이상으로 15초 동안 원심 분리한 후 여과액은 버리고 RNeasy column에 RW1 buffer를 넣어 닫고, 8,000 × g 이상으로 15초 동안 원심 분리하였다. 여과액과 collection tube는 버리고 RNeasy column을 새로운 2 mL collection tube로 옮겼다. RPE buffer를 RNeasy column에 넣어 튜브를 조심히 닫고 column을 washing하기 위해 8,000 × g 이상으로 15초 동안 원심 분리한 후 여과액은 버렸다. RPE buffer를 RNeasy column에 넣어 닫고, RNeasy silica-gel 막을 건조시키기 위해 8,000 × g 이상으로 2분 동안 원심 분리하였다. 이어서 RNeasy column을 새로운 1.5 mL collection tube에 옮긴 후 RNase-free water를 RNeasy silica-gel membrane 중앙에 분주하고 튜브를 조심히 닫아주고 1~2분 후 8,000 × g 이상으로 1분 동안 원심 분리하여 elution하였다.

분리된 total RNA는 spectrophotometer (Eppendorf, Germany)를 이용하여 정량하였다. 이때 260/280 nm의 ratio값이 1.8~2.1에 해당하는 샘플만 다음 단계로 진행하였다. 정량을 마친 total RNA를 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology, USA)을 이용하여 degradation 여부를 확인하였다. 준비된 샘플은 실험에 사용하기 전까지 -70°C에 보관하였다.

6. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

cDNA 합성을 위해 TaqMan[®] Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 2 µg의 total RNA를 10X RT Buffer 10 µL, 25 mM MgCl₂ 22 µL, deoxyNTPs mixture 20 µL, random hexamers 5 µL, RNase inhibitor 2 µL, MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL) 2.5 µL를 첨가하여, 25°C에서 10분, 37°C에서 1시간, 95°C에서 5분간 처리한 후 즉시 얼음에 10분간 둔 후에 -20°C에서 분석시까지 보관하였다. cDNAs는 human catalase, gluta-

thione peroxidase 1 (Gpx), superoxide dismutase 1 (Cu/Zn-SOD; SOD1), superoxide dismutase 2 (MnSOD; SOD2) mRNA에 대한 oligonucleotide primers와 probe (Applied Biosystems, CA, USA)를 사용하여 증폭하였으며, 증폭방법은 TaqMan[®] Gene Expression Assays 제조사의 매뉴얼에 따라 실시하였다. PCR program cycles은 다음과 같이 실시하였다. 50°C에서 2분간, 95°C에서 10분간 initial denaturing 한 후에 40 cycles (95°C for 15 sec, 60°C for 1 min)을 반복하여 증폭하였다. Beta-actin mRNA를 internal standard로 사용하였으며, 각 유전자의 발현을 real-time quantitative PCR로 정량하였으며, beta-actin mRNA 발현수준에 의해 보정하였다. 모든 PCR products는 linear cycle로 증폭되었다. 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다.

7. 통계학적 분석

Comet assay의 tail moment, MDA 및 real-time RT-PCR 데이터는 JMP program (SAS Institute, Cary, USA)을 사용하여 유의수준을 검증하였다.

결 과

1. MTS assay

H₂O₂에 대한 MTS assay 결과 농도의존적으로 세포생존율이 저하되었으며, H₂O₂에 대한 독성감수성을 고려하여 H₂O₂ 시험농도를 최고농도 13.5 µL, 최저농도 6.75 µM로 설정하였다. 또한 MNNG에 대한 MTS assay 결과 농도의존적으로 세포생존율이 저하되었으며, MNNG에 대한 독성감수성을 고려하여 MNNG를 저, 중, 고농도로 각각 0.117, 0.234, 0.468 µM을 설정하였다.

2. Comet assay

H₂O₂ 투여용량 6.75와 13.5 µM에서는 대조군에 비해 증가를 나타내지 않았으나, 27 µM에서는 대조군에 비해 유의적인 증가가 보였다(p<0.01) (Fig. 1A). 이와 같은 사항을 고려하여 각각의 well에 H₂O₂를 저농도 및 고농도 투여군으로 각각 6.75 혹은 13.5 µM을 선택하여 2시간 처치하였고, MNNG는 저, 중, 고농도의 농도로 각각 0.117, 0.234,

0.468 μM 을 2시간 처치하였다.

처치결과 MNNG 처치별 용량의존적으로 DNA 손상이 증가하였다. 이에 비해 H_2O_2 를 저농도로 처치한 경우 MNNG 단독투여군에 비교하여 DNA 손상이 증가하였으며, 특히 MNNG 고용량 투여군에 있어서 H_2O_2 전처치에 DNA 손상이 크게 증가하였

다(Fig. 1B, C). Comet assay의 대표적인 예를 Fig. 2에 표시하였다.

3. 지질과산화 정량

MDA standard curve를 작성한 후 샘플에 대한 MDA의 양을 환산하였다. 샘플에 있는 MDA의 양을 측정된 결과 H_2O_2 를 처치하고 MNNG를 투여한 군에서 MDA의 양이 증가양상이 관찰되었다(Fig. 3).

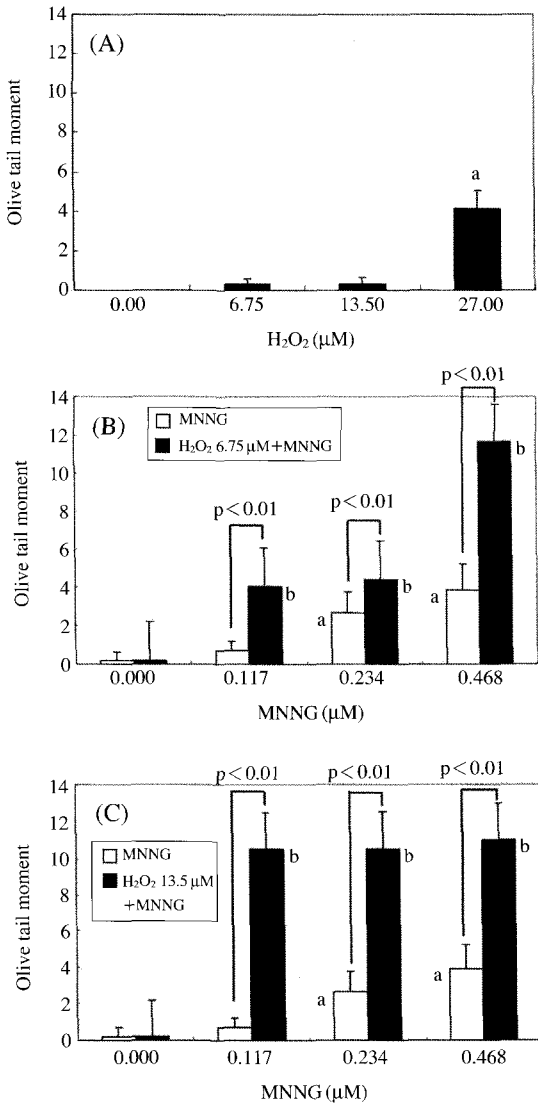


Fig. 1. Tail moment of test compounds in TK6 cells assessed by the comet assay. (A) Dose finding study of H_2O_2 ; (B) H_2O_2 6.75 μM treatment (C) H_2O_2 13.5 μM treatment; *Significantly different from control ($p < 0.01$); ^bSignificantly different from H_2O_2 control ($p < 0.01$).

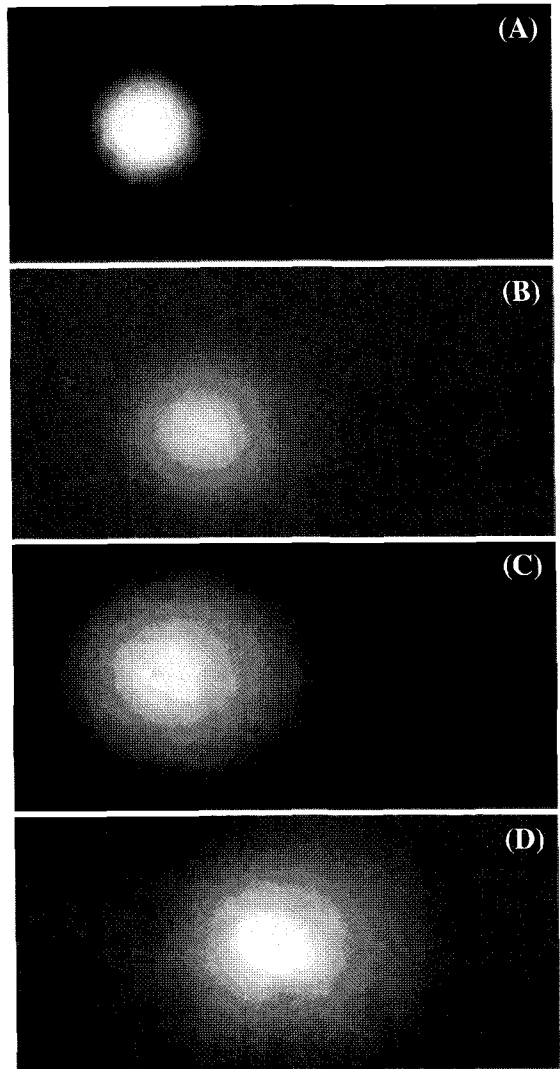


Fig. 2. Representative images of DNA damage by the treatment of MNNG in TK6 cell line. (A) Control; (B) MNNG 0.468 μM ; (C) H_2O_2 6.75 μM + MNNG 0.468 μM ; (D) H_2O_2 13.5 μM + MNNG 0.468 μM .

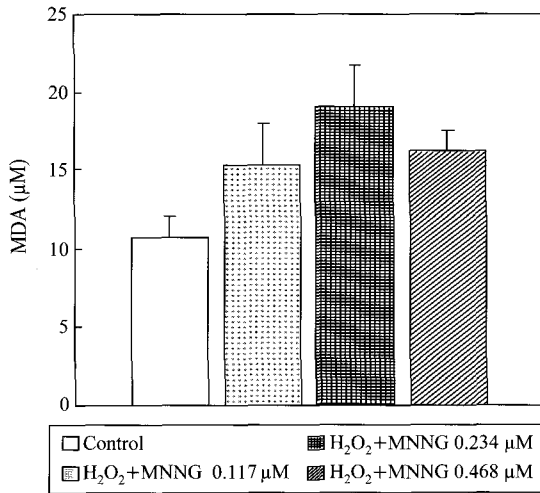


Fig. 3. Quantification of lipid peroxidation in TK6 cell treated with H₂O₂ and MNNG. TK6 cells were lysed and centrifuged to get supernatant. Malondialdehyde (MDA) in supernatant was quantified as described in the Materials and Methods.

4. Real-time RT-PCR

분리된 total RNA는 260/280 nm ratio가 1.8~2.1의 값을 나타내었다. 분리된 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time RT-PCR 방법에 의해 human catalase, Gpx, SOD1, SOD2 mRNA의 발현을 조사하였다. Catalase mRNA 발현은 H₂O₂ 전처리 및 MNNG 투여군에서 감소되었으나, MNNG 투여용량별 변화는 크게 나타나지 않았다. Gpx mRNA 발현은 H₂O₂ 전처리 및 MNNG 저농도 및 중농도 처리군에서 감소되었으나, MNNG 고농도 처리군에서는 차이가 나타나지 않았다. SOD1 mRNA 및 SOD2 mRNA 발현은 H₂O₂ 전처리 및 MNNG 투여군에서 변화가 나타나지 않았다(Fig. 4).

고 찰

현재 전 세계적으로 유통되고 있는 화학물질의

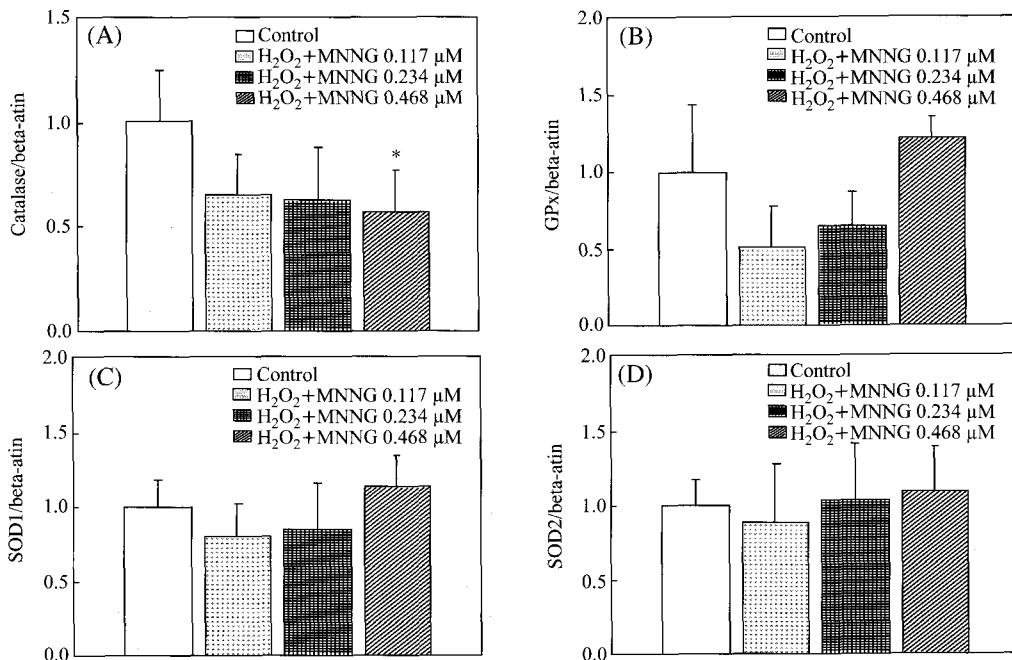


Fig. 4. Real-time RT-PCR analysis of human catalase, glutathione peroxidase 1 (Gpx), superoxide dismutase 1 (Cu/Zn-SOD; SOD1), superoxide dismutase 2 (MnSOD; SOD2) mRNA in TK6 cell treated with H₂O₂ and MNNG. Catalase, Gpx, SOD1 or SOD2 mRNA was quantified and normalized with beta-actin mRNA expression as described in the Materials and Methods. (A) Catalase; (B) Gpx; (C) SOD1; (D) SOD2. Note the significant differences of the gene expression between control and treated groups. *Significantly different from control group ($p < 0.05$).

수는 10만여 종에 이르며 매년 2천여 종의 새로운 화학물질이 개발되어 상품화되고 있어 이들에 의한 인체 및 환경 위해성이 날로 증가하고 있는 추세이다. 최근에는 EU REACH 도입 계기로 화학물질 위해성에 대한 규제 강화가 세계적으로 확산되고 있다. 이러한 실정에서 국민의 보건과 안전을 위한 화학물질에 대한 안전성, 독성, 위해성 평가는 더욱 중요시되고 있으며, 특히 식품, 의약품, 오염물질 등의 각종 유해가능성 물질들이 인간에게 장기적으로 노출됨으로써 야기되는 발암성 유발은 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 현재 사망원인의 주요 원인으로 암이 있는데, 이 암을 유발하는데 이런 유해가능성 물질들이 관여하는 것으로 추정하고 있다. 이런 유해가능성 물질들은 현재 시행되는 발암독성 평가의 장기간 시험과 다수의 동물 사용에 따른 고비용 문제 때문에 충분한 발암성 시험데이터가 없는 실정이다. 또한 신체적 조건이 약화되었을 때 이들 유해가능성 물질에 의한 발암성 증가 가능성이 제기되었다. 이런 경향으로 볼 때 스트레스 등의 요인에 의한 유해가능성 물질의 리스크를 평가하는 것이 필요하다고 판단된다.

화학물질에 대한 유전독성 평가와 의약품 개발을 효율적이고 경제적으로 성취하기 위해서는 복합적 조건하에서 단기간내에 유전독성을 검색할 수 있는 독성작용기전에 근거한 시험법 개발이 필요하다.

유전독성시험은 시험물질의 발암성을 예측하기 위한 단기 검색법의 하나로 중요한 역할을 하여 왔다. 유전독성의 본래 의미는 세포 또는 개체수준에서 돌연변이(mutation)를 유발하는 성질을 의미하였으나, 현재는 광범위한 개념을 도입하여 세포 유전물질(DNA)에 상해성을 나타내는 성질을 포함하는 것으로 통용되고 있다.

유전독성을 검사하는 시험으로서 살모넬라균 또는 대장균을 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test), 배양세포를 이용한 염색체이상 시험법(chromosome aberration assay), 마우스를 이용하는 소핵시험(micronucleus test)이 제시되어 있다. 이와 같은 유전독성시험법은 하나의 물질에 의한 정성적인 평가가 이루어지는 경향이 있다. 유전독성시험을 실시할 경우 시험물질의 종류에 따라 결과에 많은 차이가 있다는 것이 알려져 있다. *In vitro* 시험계에서 양성이어도 *in vivo* 시험계에서 음성이 된 경우

도 많다. 여기에는 역치연관 용량반응에 기인하는 경우들이 있는데, 유전독성의 역치연관 용량반응은 효소작용억제, 유전체불균형요인, 에너지 고갈, 반응성 활성산소 생성, 단백질 합성 억제, 지질과산화, 핵산분해, 체내 무기이온 불균형 등 세포 독성 반응 메커니즘과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 유전독성의 결과에는 여러 가지 인자가 영향을 미칠 수 있으므로, 이런 복합적인 요인을 고려하여 평가하는 것이 중요하다. 또, 특정한 시험계에서 양성으로 된 경우에는 그 활성을 정량적으로 파악하는 것이 중요하다. 하지만, 화학물질별로 메커니즘에 근거한 시험법을 적용하여 유전독성시험을 실시하는 것은 매우 비효율적이고 비경제적이다.

본 실험에서 유전독성을 평가하기 위해 사용한 단세포전기영동법(Single cell gel electrophoresis assay; Comet assay)은 처음 Ostling과 Johanson에 의해 각각의 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis 방법으로(Ostling and Johanson 1984), 형광현미경하에서 DNA 손상정도가 해상같이 나타나므로 comet assay라 불리운다. 이것은 agarose gel과 섞은 세포를 고농도의 염으로 용해하면 핵단백질이 빠져나가게 되어 핵 모양을 지니면서 내부에 DNA를 포함하는 핵양체(nucleoid)가 되고, 이 핵양체내에 DNA가닥 절단(DNA strand breakage)이 있는 경우 알카리 상태에서 DNA 염기쌍이 분리되면서 전기영동시 양극 쪽으로 이동되어 원래 구조로부터 확장된 tail의 형태를 보이게 된다. 이 comet tail의 정도를 측정함으로써 DNA 손상을 정량화하는 것이 단세포전기영동법이다. 손상을 받지 않은 세포는 완전한 형태로 head만을 보이게 된다.

실험과정은 단일세포수준에서 손상의 정도에 대한 정량이 가능하므로 적은 샘플의 양으로도 실험이 가능하며 형광염색에 의해 빠르고 민감하게 DNA 손상을 평가할 수 있어 매우 간편한 유전독성 실험방법으로 인정되고 있다. 보통 처리물질에 의한 손상정도는 tail에 존재하는 DNA양을 포함하는 파라미터인 tail moment를 주로 사용하고 있다.

유전독성시험을 위한 용량설정을 위해 MTS assay로 TK6 세포에 대한 감수성을 판단하였다. H₂O₂와 MNNG에 대한 MTS assay 결과 농도의존적인 세포생존율을 관찰하였으며, MNNG가 상대

적으로 적은 농도에서 세포사를 유발하는 것으로 판단되었다. H_2O_2 투여농도 설정에 있어서 세포생존율에 영향을 미치지 않으면서 유전독성을 유발하지 않는 농도를 찾고자 시험한 결과 $27 \mu M$ 에서는 유전독성을 유발하였으나, 6.75 혹은 $13.5 \mu M$ 에서는 유전독성을 유발하지 않았다. 또, MNNG의 경우 세포생존율에 영향을 미치지 않으면서 유전독성을 유발하는 농도를 $0.468 \mu M$ 로 설정하여 공비 2로 하여 중농도 및 저농도를 설정하였다. 이 같은 설정은 MNNG에 의해 유전독성이 유발되는 농도에서 산화적 스트레스에 의해 유전독성이 증폭되는지 여부를 판정하기 위함이다. H_2O_2 저농도 및 고농도 투여군으로 각각 6.75 혹은 $13.5 \mu M$ 를 2시간 처치하였고, MNNG를 저, 중, 고농도의 농도를 사용하여 각각 0.117 , 0.234 , $0.468 \mu M$ 를 2시간 처치하여 Comet assay를 실시한 결과 MNNG 처치별 용량의존적으로 DNA 손상이 증가하였다. 또, H_2O_2 를 전처치 후 MNNG를 투여한 경우가 MNNG 단독투여군에 비교하여 DNA 손상이 증가하였다. 특히 MNNG 고용량 투여군에 있어서 H_2O_2 전처치에 의해 DNA 손상이 크게 증가할 뿐만 아니라 MNNG 저용량 투여군에 있어서도 H_2O_2 전처치에 의해 DNA 손상이 증가가 나타났는데, 이는 산화적 스트레스가 가해진 경우 저용량의 유전독성물질이 노출될 경우 유전독성이 크게 증폭될 수 있음을 의미한다.

생체내 산화적 스트레스의 마커로서 지질과산화물을 들 수 있다. 이 지질과산화의 대표적인 산물인 MDA를 정량한 결과 H_2O_2 를 처치하고 MNNG를 투여한 군에서 MDA의 양이 증가되었으며, MNNG 투여용량에 따라 MDA의 양이 증가됨을 확인하였다.

또, 산화적 스트레스 유발과 유전독성물질 처치에 따른 항산화효소의 변화를 살펴보기 위해 real-time RT-PCR로 관련효소의 발현을 조사해본 결과 catalase mRNA 발현은 H_2O_2 전처치 및 MNNG 투여군에서 전체적으로 감소하는 양상을 나타내어, 산화적 스트레스가 가해진 상황에서는 catalase mRNA 발현이 감소하는 것으로 생각된다.

일반적으로 생체내에서 산화적 스트레스는 정상 세포의 기능유지에 적절히 필요하다고 알려져 있지만, 많은 양의 산화적 스트레스의 생성은 DNA, 지질, 단백질등을 산화시켜 세포손상을 유발한다고

알려져 있다 (Mates *et al.*, 1999). 마우스에 glutathione 효소를 과발현시킨 결과 이 마우스는 산화적 스트레스에 영향을 덜 받는 것으로 나타났으나 (Ran *et al.*, 2004), CuZnSOD가 결핍된 마우스는 산화적 스트레스에 의한 손상이 지속적으로 또, 광범위하게 진행되어 간암발생이 증가된다고 보고되었다 (Elchuri *et al.*, 2005). 또, 실험적으로 glutathione 효소를 결핍시키면 DNA 결손이 증가된다고 보고되었다 (Reliene and Schiestl, 2006).

이러한 것으로 보아 산화적 스트레스에 대한 산물을 생체내에서 처리하기 위해서는 phase II 효소의 역할이 중요하다고 볼 수 있다. 하지만, MNNG 투여용량별 변화는 관찰되지 않았는데, 이는 유전독성물질인 MNNG 투여농도에 의한 직접적인 항산화효소의 변화는 없는 것으로 판단된다. 또, GPx mRNA 발현은 H_2O_2 전처치 및 MNNG 저농도 혹은 중농도 처치군에서 전체적으로 감소하는 양상을 나타냈으나, MNNG 고농도 처치군에서는 이 같은 감소가 나타나지 않았다. 이는 H_2O_2 전처치 후에 MNNG 저농도 혹은 중농도 처치를 한 경우 GPx mRNA의 감소가 유전독성증가에 관여할 가능성이 있는 것으로 생각된다. 하지만 MNNG 고농도 처치군에서 GPx mRNA의 감소가 나타나지 않은 것이 어떠한 기전에 의한 것인지는 본 실험을 통해 규명하기 어려우며, 추가적인 연구를 요망한다. 한편 SOD1 mRNA 및 SOD2 mRNA의 발현은 H_2O_2 전처치 및 MNNG 저농도 혹은 중농도 투여군에서 약간의 감소경향을 나타내었다. 이는 GPx mRNA의 감소보다는 경미하게 나타났다. 이와 같은 결과를 종합하면 H_2O_2 전처치 및 MNNG 처치군에서 항산화효소 가운데 catalase mRNA 및 GPx mRNA 발현이 감소되며, 이는 산화적 스트레스에 의한 MNNG 유전독성증가와 연관되는 것으로 생각된다.

본 실험을 통해 *in vitro* 산화적 스트레스 유발 모델 확립하였고, 정상상태와 스트레스 상태에서 유전독성물질에 대한 유전독성 평가를 실시하였다. 이는 스트레스가 식품의약품 등의 유전독성에 미치는 영향을 평가함으로써 이들 물질에 대한 위험도 및 감수성 평가를 개선하고자 하였다. 또한, 산화적 스트레스 조건에서는 유전독성물질의 유전독성이 저용량에서도 증가되는 것을 확인하였으며, 향후 산화적 스트레스 조건에서 보다 다양한 유전독성물질의 저용량 노출에 따른 유전독성 평가가

수행되어야 할 것으로 판단된다. 또한, 환경 중에 산화적 스트레스 유발 물질이 존재할 경우 낮은 농도의 유전독성물질에 의해서도 유전자 손상을 더욱 증가시킬 수 있는 가능성이 있으므로 산화적 스트레스 유발 환경에서는 위해물질의 노출저감화가 필요할 것으로 생각된다.

본 유전독성 평가법은 독성물질에 대한 안전성 평가기술 확립 및 유전체자료 제출에 대한 가이드라인 작성에 활용될 예정이며, 향후 이를 기반으로 한 새로운 개념의 안전성 평가시스템은 식품·의약품 안전성평가 분야의 기술을 선진화하고, 국가 경쟁력을 향상 시킬뿐만 아니라 신약 개발에도 커다란 도움이 될 것으로 생각된다. 또, 나아가 산화적 스트레스 환경하에서 식품·의약품 등의 유전독성 감수성 및 위험도를 평가함으로써 새로운 유전독성 시험법 개발 가능성을 제시할 수 있다고 생각된다. 이런 유전독성 평가방법은 독성물질에 대한 안전성평가기술 확립 및 유전체자료 제출에 대한 가이드라인 작성에 활용될 예정이며, 향후 이를 기반으로 한 새로운 개념의 안전성 평가시스템을 통해 식품·의약품 안전성평가 분야의 기술을 선진화하고, 국가 경쟁력을 향상 시킬뿐만 아니라 신약 개발에도 커다란 도움이 될 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 기본사업연구(06131기본사629)에 의해 수행되었음에 감사 드립니다.

참고 문헌

- Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Langhans CD, Siems W and Eckl PM. Cytotoxic and genotoxic potential of beta-carotene and cleavage products under oxidative stress, *Biofactors* 2005; 24: 159-163.
- Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Langhans CD, Siems W and Eckl PM. Beta-carotene breakdown products enhance genotoxic effects of oxidative stress in primary rat hepatocytes, *Carcinogenesis* 2006; 27: 1128-1133.
- Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Siems W and Eckl PM. Cytotoxic and genotoxic effects of beta-carotene breakdown products on primary rat hepatocytes, *Carcinogenesis* 2004; 25: 827-831.
- Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ and Huang TT. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005; 24: 367-380.
- Fukushima S. Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline: relevance to risk assessment, *Cancer Lett* 1999; 143: 157-159.
- Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Totsuka Y, Yoshimura I and Fukushima S. Existence of a no effect level for MeIQx hepatocarcinogenicity on a background of thioacetamide-induced liver damage in rats, *Cancer Sci* 2006; 97: 453-458.
- Kato T, Ohgaki H, Hasegawa H, Sato S, Takayama S and Sugimura T. Carcinogenicity in rats of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, *Carcinogenesis* 1988; 9: 71-73.
- Kushida H, Wakabayashi K, Sato H, Katami M, Kurosaka R and Nagao M. Dose-response study of MeIQx carcinogenicity in F344 male rats, *Cancer Lett* 1994; 83: 31-35.
- Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
- Nagao M. A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens--heterocyclic amines-based on molecular information, *Mutat Res* 1999; 431: 3-12.
- Nagao M, Ushijima T, Toyota M, Inoue R and Sugimura T. Genetic changes induced by heterocyclic amines, *Mutat Res* 1997; 376: 161-167.
- Ohgaki H, Hasegawa H, Suenaga M, Sato S, Takayama S, and Sugimura T. Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) from cooked foods, *Carcinogenesis* 1987; 8: 665-668.
- Ostling O and Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 291-298.
- Ran Q, Liang H, Gu M, Qi W, Walter CA, Roberts LJ, 2nd, Herman B, Richardson A and Van Remmen H. Transgenic mice overexpressing glutathione peroxidase 4 are protected against oxidative stress-induced apoptosis, *J Biol Chem* 2004; 279: 55137-55146.
- Reliene R and Schiestl RH. Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice, *Carcinogenesis* 2006; 27: 240-244.
- Sanz N, Diez-Fernandez C, Fernandez-Simon L, Alvarez A

- and Cascales M. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis, *Carcinogenesis* 1995; 16: 1585-1593.
- Sugimura T. Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan, *Science* 1986; 233: 312-318.
- Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens, *Carcinogenesis* 2000; 21: 387-395.
- Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H and Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish, *Cancer Sci* 2004; 95: 290-299.
- Wiseman H and Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochem J* 1996; 313 (Pt 1): 17-29.