

## 춘천지역 대기부유분진의 DNA 손상효과

김남이 · 임병찬\* · 원운재\* · 현근우\* · 최금중\* · 송은정 · 허분영#

강원대학교 약학과, \*강원도 보건환경연구원

(Received August 15, 2007; Revised September 27, 2007)

### Genotoxicity of Total Suspended Particulate in Chuncheon Area

Nam Yee Kim, Beng-Chan Lim\*, Wun-Jae Weon\*, Geun-Woo Hyun\*, Geum-Jong Choi\*,  
Eun Jeong Song and Moon Young Heo#

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

\*Kangwon Institute of Health & Environment, 728, Sancheon 2-ri, Shinbuk-eup, Chuncheon 200-822, Korea

**Abstract** — This study was to evaluate the genotoxic effects of airborne particulate matters using single cell gell electrophoresis (comet assay) in A549 human lung carcinoma cells. The total suspended particulate (TSP) was collected on back-up filter in Chuncheon, Kangwon Do, South Korea from April, 2003 to February, 2005. The concentrations of TSP, B(a)P and most of heavy metals seemed to be higher in spring and winter, and lower in summer. And they showed higher concentration in the commercial areas and the residential area having more traffics than in the rural area. It was found that A549 cells interacting with the organic extract of TSP showed more DNA single-strand breaks compare to untreated cells. The genotoxicity of the organic extract of TSP was increased with the pre-treatment of S-9 mixture during the culture or with the treatment of endonuclease after cell lysis. The DNA damage by the organic extract of TSP was higher in winter and the commercial area than in summer and the rural area. This study suggests that TSP, heavy metals and B(a)P analyzed showed significant variation depend on the seasons and the areas which are correlated with the DNA damage evaluated by Comet assay, indicating that genotoxic biomarker is useful for toxicological evaluation of air quality.

**Keywords** □ total suspended particulate, heavy metals, benzo(a)pyrene, DNA damage, comet assay

대기부유분진 중 호흡성 입자크기의 미세먼지나 디젤분진 등은 폐저부로 깊게 흡입되어 호흡기관에 대해 병리학적 영향을 미치며, 특히 폐암과 만성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)의 원인물질이 된다.<sup>1,2)</sup> 또한, 미세먼지와 이들의 유기용매 추출물에 의한 유전독성이 각종 호흡기계통의 질환과 폐암발생에 관련이 있다는 연구결과가 보고되고 있다.<sup>3-5)</sup> 외국에서는 대기 중 미세먼지의 유전독성관련 연구가 많이 이루어지고 있으나 우리나라에서는 별로 없는 형편이다. 이에 본 연구에서는 대기부유입자의 환경독성학적 영향을 파악하기 위하여 우선 비교적 오염이 적은 도시로 알려진 춘천지역의 대기부유분진 중 중금속 및 benzo(a)pyrene의 분석과 유전독성 평가를 실시하였다. 대기부유분진 및 중금속의 농도자료는 강원도 보건환경연구원의

기초자료<sup>6)</sup>를 분석하고 본 연구에서의 benzo(a)pyrene 농도와 DNA 손상도 간의 상호관련성을 검토하였다.

대기시료 채취지역인 춘천시는 면적이 1,116.35 Km<sup>2</sup>이며 전체 면적의 76%가 산악지역으로 되어있는 분지 형태로 대기 오염물질이 정체되기 쉬운 지형이다. 또한 소양댐, 춘천댐, 의암댐에 의한 인공호수로 인해 안개 일수가 상대적으로 많다. 상주인구는 94,957 세대 256,454명('05. 12. 31 현재)인 중·소규모의 도시이며 산업의 유형은 도·소매업, 숙박·음식업 및 서비스업 등이 전체의 80% 이상을 차지하고 있으며 대기오염 배출업소는 영세한 5종 사업장으로 전체의 0.8%에 불과하다. 그러나 매년 자동차의 운행이 증가하고 있어 이동오염원에 의한 대기오염은 증가될 전망이다.<sup>7)</sup> 이에 따라 본 연구에서는 춘천지역의 유전독성 관련 입자상물질의 오염현황을 평가하고 이와 관련된 환경보건학적 영향인 유전독성을 측정하여 DNA 손상 바이오마커를 이용한 환경독성도모니터링에 응용될 수 있는 유용한 자료를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 033-250-6914 (팩스) 033-253-9647  
(E-mail) myheo@kangwon.ac.kr

## 재료 및 방법

### 대기부유분진의 포집

본 실험에서 사용된 총대기부유분진(total suspended particulate, 이하 TSP)은 2003년 4월부터 2005년 2월까지 춘천지역의 옥천동(2004년 이전 요선동)[상업지역], 후평2동(2004년 이전 효자동)[주택지역 I], 후평1동[주택지역 II], 산천리[전원지역]에 설치된 강원도 보건환경연구원 측정망에서 월별로 TSP를 Anderson high volume air sampler(Model 122, Kimoto, Japan)를 사용하여 back-up filter(glass microfiber, 20.3×25.4 cm, PM 2000, Whatman)에 포집하였다.<sup>6)</sup>

### 시약

Benzo(a)pyrene, normal melting point agarose, low melting point agarose, Triton X-100, ethidium bromide, Tris 등 각종 시약은 Sigma사에서, 세포배양에 쓰이는 Ham's F12 nutrient mixture(F12K), phosphate-buffered saline(PBS), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA, l-glutamine, penicillin-streptomycin, sodium dodecyl sulfate(SDS)는 GIBCO사에서 구입하였다. Acetonitrile, benzene은 Fisher scientific사에서 구입하였다. Hydrogen peroxide, sodium acetate, sodium chloride 등 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. Rat 간세포로 만든 S-9은 Moltox(USA)사에서 구입하여 사용하였다.

### 세포배양

실험에서 사용된 cell line은 A549 cell(CCL-185)로서 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 분양 받아 강원대학교 약학대학 유전독성실험실에서 수시로 계대하여 실험목적에 맞게 배양하였다. 세포배양은 10% FBS(GIBCO), 2% l-glutamine(GIBCO), 2% penicillin-streptomycin(GIBCO)을 함유한 F12K배지(GIBCO)를 사용하였다.

### 중금속 분석

TSP가 포집된 filter를 산처리 및 초음파 추출하여 유도결합 플라즈마 발광 광도계(inductively coupled emission spectroscopy, Optima 4300DV, Perkin Elmer)를 이용하여 대기부유분진 중 중금속을 분석하였다. 분석된 중금속은 철(Fe), 구리(Cu), 망간(Mn), 납(Pb), 카드뮴(Cd), 크롬(Cr), 니켈(Ni)이었다.<sup>6)</sup>

### B(a)P 분석

Benzo(a)pyrene[이하 B(a)P] 분석을 위해 전체 filter의 1/8을 절취하여 세절 후 ethanol 5 ml, benzene(HPLC용) 6 ml를 가해 초음파장치 내에서 15분간 추출 후 기포를 제거하고 다시 15분간 추출하였다.<sup>8)</sup> 이 추출액을 3,000 rpm에서 30분간 원심분리

후 상등액 2 ml를 취하고 5% NaOH 수용액 3 ml를 가하고 vortex mixer로 약 1분간 격렬히 교반하여 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 이 benzene층 1 ml를 취하여 감압농축한 후 acetonitrile(HPLC용) 0.5 ml에 용해시키고 clarification한 후 검액으로 하였다. HPLC(Shimadzu 10A with RF-535 fluorescence detector)를 이용하여 대기부유분진의 추출물 중 B(a)P를 정량하였다. HPLC용 column은 RP-18(4.5  $\mu$ m×25 cm, Mightysil, Kanto)분석조건은 이동상으로 94 % acetonitrile을 사용하고, 유량 2 ml/min, excitation wavelength 370 nm, emission wavelength 406 nm에서 형광강도를 측정하여 검량선을 작성하고 검액 중의 B(a)P를 정량하였으며 시료 분석이전에 회수율을 측정하여 분석정도관리를 하였다.

### Alkaline single cell gell electrophoresis(Comet assay)

Comet assay<sup>9)</sup>를 위해서는 전체 filter의 1/8을 절취하여 세절 후 dichloromethane 25 ml를 가해 초음파장치 내에서 1시간 추출 후 여과하여 증발농축하였다. 농축된 잔사에 dimethyl sulfoxide 0.2 ml를 가해 검액으로 하였다. 시험방법은 세 가지로서 single strand breaks를 검출하기 위한 conventional Comet assay와 oxidized pyrimidine base를 검출하기 위해 cell lysing 후 endonuclease III 처리법(Endo III 법), 그리고 세포배양 시 S-9 mix 대사활성화에 따른 single strand breaks 검출법(S-9 mix 법)를 사용하였다.

Cell  $5 \times 10^4$ 개를 6-well culture dish에 심고(12-well에는  $2.5 \times 10^4$ 개) 24시간 후에 양성대조물질 30  $\mu$ l를 처리하였다. 45분 후 새로운 배지로 갈아주고 1시간 후 culture dish에 trypsin 1 ml(12-well에는 400  $\mu$ l)를 넣어 cell을 harvest하여 test tube에 취했다. 1,000 rpm으로 3분간 원심분리 후 PBS로 세척 후 다시 1,000 rpm으로 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 각각에 0.5%-LMPA(low melting point agarose)를 300  $\mu$ l를 가해준 뒤 적절히 현탁하였다. 0.65%-NMPA(normal melting point agarose) 130  $\mu$ l를 미리 입힌 slide(fully frosted)에 이 액 50  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 cover slide를 덮었다. 냉장고에서 약 30분간 굳힌 뒤 cover slide를 제거하고 그 위에 다시 0.5%-LMPA를 130  $\mu$ l를 떨어뜨린 후 cover slide로 덮고 냉장고에서 30분간 굳혔다. Cover slide를 제거한 후 lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, pH 10, 10% DMSO, 1% Triton X-100)에 담가서 약 60분간 빛을 차단한 채로 용해시켰다. 그 후 전기영동완충액(300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 13)에 20분간 담그고 빛을 차단하여 정치하였다. 전기영동장치에 slide를 양극 쪽으로 배열한 뒤 25 V, 300 mA에서 15분간 전기영동 하였다. 슬라이드를 꺼내 0.4 M tris(pH 7.5)에 30분간 담가 중화시켰다. Tray에 걸어 말린 후 ethidium bromide(2  $\mu$ g/ml)를 20  $\mu$ l를 각각의 슬라이드에 떨어뜨린 후 cover slide를 덮어 염색한 후 515~560 nm의

excitation filter와 590 nm의 barrier filter를 이용하여 형광현미경으로 관찰하여 Comet 시험 전용 image analyzer인 KOMET 5.5(Kinetic image, England)를 사용하여 슬라이드 당 50 cell을 분석하였다. 한편 endonuclease III 처리 시에는 endonuclease III buffer(40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, pH 8.0 with KOH)에 10분간 씻고 endonuclease III 1 µg/ml를 30 µl 가한 후 커버글라스로 덮어서 37°C에서 30분간 반응시키는 것을 cell lysis 후에 하였으며 이하 동일조작을 하였다. 또한, S-9 mixture는 1 M KCl 66 µl, 0.25 mM MgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 64 µl, 0.2 M Glucose-6-phosphate 50 µl, 0.04 M NADP 200 µl, 0.2 M NaHPO<sub>4</sub> buffer(pH 7.4) 1 ml, H<sub>2</sub>O 420 µl, S-9 200 µl를 넣어 전체량을 2 ml로 조제하였으며 농도는 배지 중 10%로 하고 시료와 함께 처리하였다. 실험의 결과는 Olive tail moment(% DNA×distance of center of gravity of DNA, OTM)<sup>10)</sup>으로 나타내었다. 한편, 통계처리는 Student's t-test를 사용하였다.

**결 과**

**대기부유분진(TSP) 농도**

Fig. 1은 춘천지역의 4개소에서 포집된 TSP의 계절별, 지역별 평균농도를 나타낸 것이다. 계절구분은 3월~5월은 봄, 6월~8월은 여름, 9월~11월은 가을, 12월~2월은 겨울로 하였다. 또한 지역구분은 옥천동(2004년 이전은 요선동)은 상업지역, 후평2동(2004년 이전은 효자동)은 주거지역 I, 후평1동은 주거지역 II, 산천리는 전원지역으로 구분하여 평균값으로 비교하였다. TSP 농도의 평균치는 전 측정기간에 걸쳐 134.1 µg/m<sup>3</sup>(25~628 µg/m<sup>3</sup>)이었으며, 계절별로는 봄(243.1 µg/m<sup>3</sup>)>겨울(137.7 µg/m<sup>3</sup>)>여름(87.7 µg/m<sup>3</sup>)>가을(86.2 µg/m<sup>3</sup>) 순으로 봄, 겨울에 높게 나타났고, 지역별로는 후평2동(152.3 µg/m<sup>3</sup>)>옥천동(150.5 µg/m<sup>3</sup>)>후평1동(131.2 µg/m<sup>3</sup>)>산천리(102.4 µg/m<sup>3</sup>) 순으로 전원지역에서 낮게 나타났다.

**중금속 농도**

Fig. 2는 TSP 중의 중금속 농도를 측정된 결과이다. 계절별로는 Fe, Mn, Pb, Cd, Cr, Ni 등 대부분의 중금속들이 봄>겨울>가을>여름 순으로 감소하였으며 봄에 높고 여름에 낮은 경향을 나타내었다. 그러나 특이하게 Cu의 경우, 여름도 봄과 거의 같은 농도로 높았다. 대부분의 중금속농도는 지역별로 후평2동>옥천동>후평1동>산천리 순으로 감소하였으며 전원지역의 농도가 낮은 편이었다. TSP 중 중금속은 Fe, Mn, Cu가 농도가 비교적 높은 major element였으며 Pb, Cd, Cr, Ni 등은 Fe, Mn, Cu에 비해 농도가 훨씬 낮은 minor element로 나타났다.

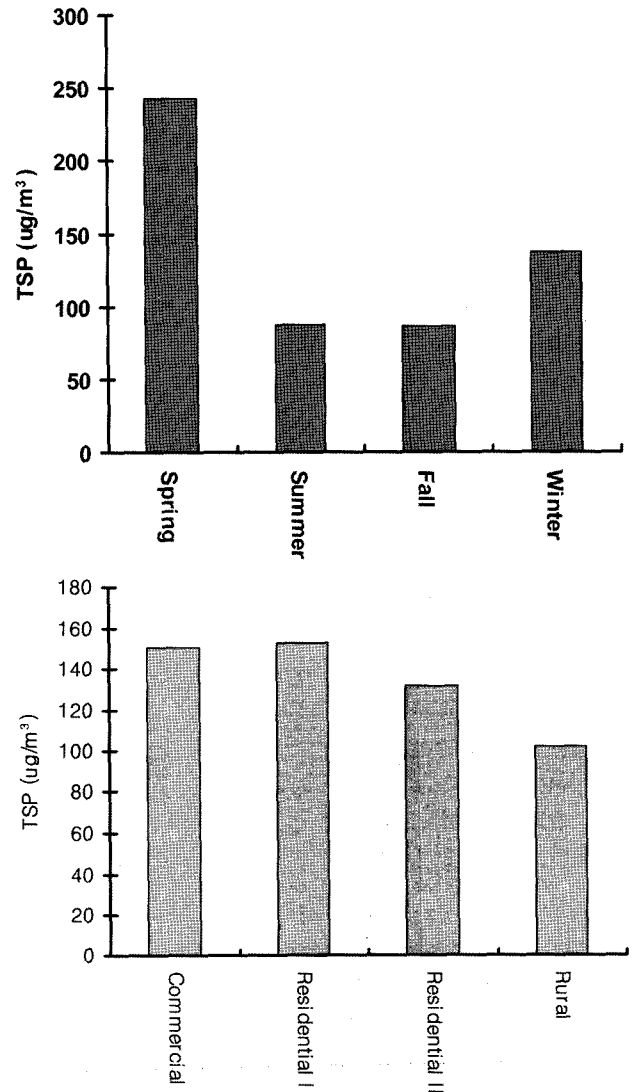


Fig. 1 – (a) Seasonal and (b) regional variations of TSP concentration in Chunchon area among sampling period (n=92, 2003. 4~2005. 2).

**Benzo(a)pyrene 함량**

Fig. 3, 4에 월별, 계절별, 지역별 B(a)P 농도를 나타내었다. 전 측정기간에 걸쳐 평균치는 2.4 ng/m<sup>3</sup>(N.D.-13.0 ng/m<sup>3</sup>)를 나타내었으며 계절별로는 겨울(4.3 ng/m<sup>3</sup>)>가을(3.0 ng/m<sup>3</sup>)>봄(1.6 ng/m<sup>3</sup>)>여름(0.7 ng/m<sup>3</sup>) 순으로 B(a)P 농도를 나타내었으며, 겨울에 높고 여름에 낮았다. 지역별로는 옥천동(3.5 ng/m<sup>3</sup>)>후평1동(2.3 ng/m<sup>3</sup>)>후평2동(2.1 ng/m<sup>3</sup>)>산천리(1.9 ng/m<sup>3</sup>) 순으로 B(a)P 농도가 감소하였으며 전원지역의 농도가 낮은 편이었다.

**대기부유분진의 DNA 손상**

대기부유분진의 DNA 손상효과를 검출하기 위하여 각 대기부유분진시료를 동일하게 처리하여 추출 후 동일량의 용매에 녹인 후 실험하였다. Fig. 5에서 S-9 mix 또는 endonuclease III를 처

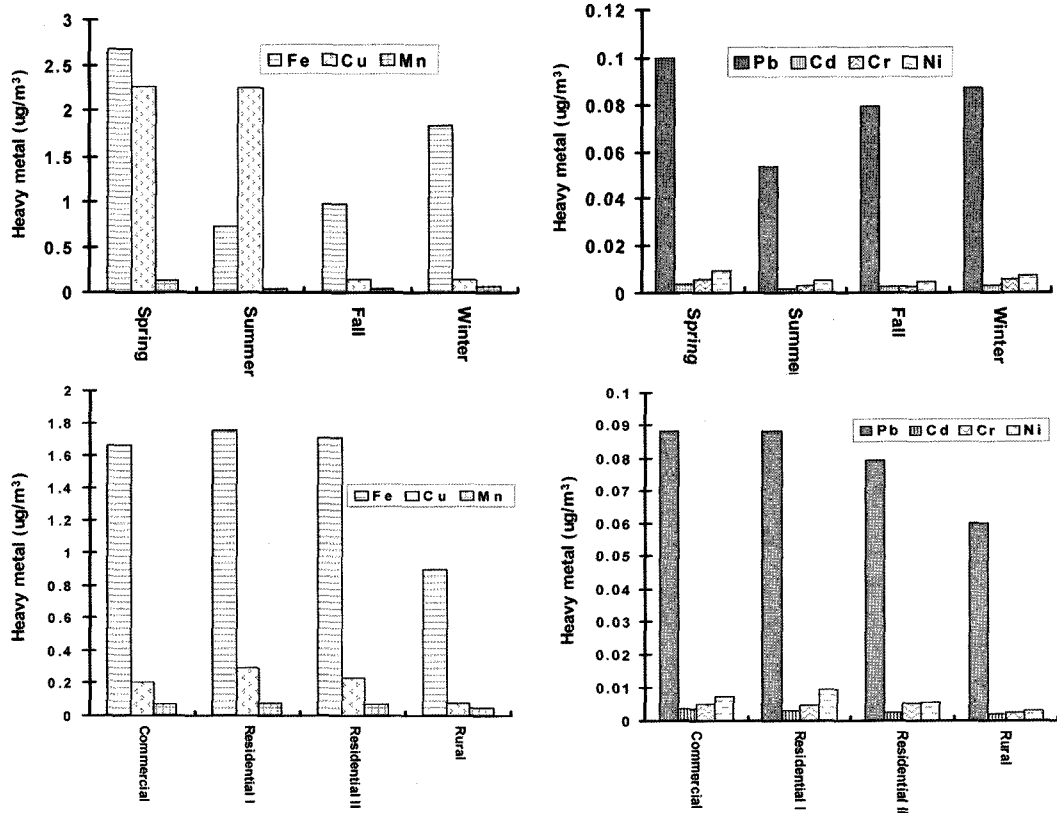


Fig. 2 – Seasonal and regional variations of heavy metals content in Chuncheon area among sampling period (n=92, 2003. 4~2005. 2).

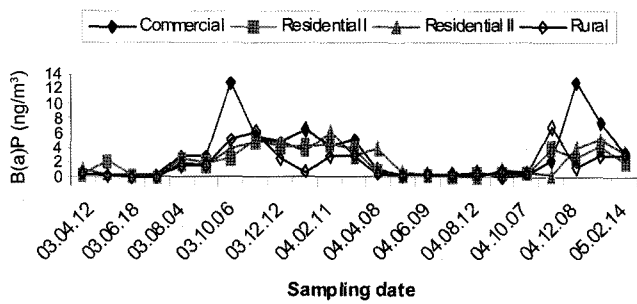


Fig. 3 – Monthly variation of B(a)P concentration in Chuncheon area among sampling period (n=91, 2003. 4~2005. 2).

리하지 않았을 경우에는 OTM 값에서 계절별, 지역특성별로 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 그러나 세포주에 대기부유분진추출물을 가하고 S-9 mix를 처리하여 대사활성화를 유도한 후 Comet assay를 실시한 결과 OTM 값이 비유도시 유도하지 않았을 때보다 전체적으로 높아졌으며, 계절별로는 겨울(3.1)=봄(3.1)>가을(2.7)>여름(2.3) 순으로 감소하였고, 지역별로는 옥천동(3.2)>후평2동 (2.8)=후평1동>산천리(2.5) 순으로 감소하였다. 특히 S-9 mix 유도 OTM은 B(a)P 농도와 같이 겨울에 높고 여름에 낮았으며 상업지역이 높고 전원지역이 낮았다. S-9 mix 처리 시의 DNA손상은 중금속들과 B(a)P와 같이 뚜렷한 계절변동

과 지역변동을 나타내었다. 한편 DNA excision repair효소인 endonuclease III를 처리했을 경우 비처리 시보다 측정치가 대부분 증가한 것으로 보아 대기부유분진 추출물에 의한 세포내 DNA 염기의 산화적 손상이 검출되었다. OTM 값으로 비교해 보았을 때 계절별로는 endonuclease III 효소 처리 시 여름(3.5)>가을(3.0)>겨울(2.8)>봄(2.3)의 순으로 감소하였고, 지역별로는 옥천동(3.2)>후평1동(3.0)>산천리(2.8)>후평2동(2.6) 순으로 감소 경향을 나타내었다. 그러나 endonuclease 효소 처리 시 DNA 손상은 중금속이나 B(a)P 농도처럼 뚜렷한 계절변동과 지역변동을 나타내지는 않았다.

**대기부유분진, 중금속 및 B(a)P 농도와 생물학적 파라미터들 간의 상호관련성**

Sampling 기간 동안의 TSP를 비롯한, 중금속, B(a)P 농도 및 DNA손상도 등 11개 파라미터(n=69-92, each parameter)들 사이의 상관계수( $r^2$ )를 검토하였다(data not shown). 이 중에서 TSP와 Fe(0.887), Cr(0.574), Ni(0.571)의 상관성이 높았으며 Fe와 Mn(0.963), Cr(0.718), Ni(0.565)가 높은 편이었다. Mn의 경우에는 Cr(0.660)과 Ni(0.537)의 상관성이 다소 높았다. Cr과 Ni은 0.556을 나타내었다. TSP와 B(a)P는 0.031로서 낮았으나, TSP와 B(a)P 모두 S-9 mix 비처리 시의 DNA손상도(각각 0.002,

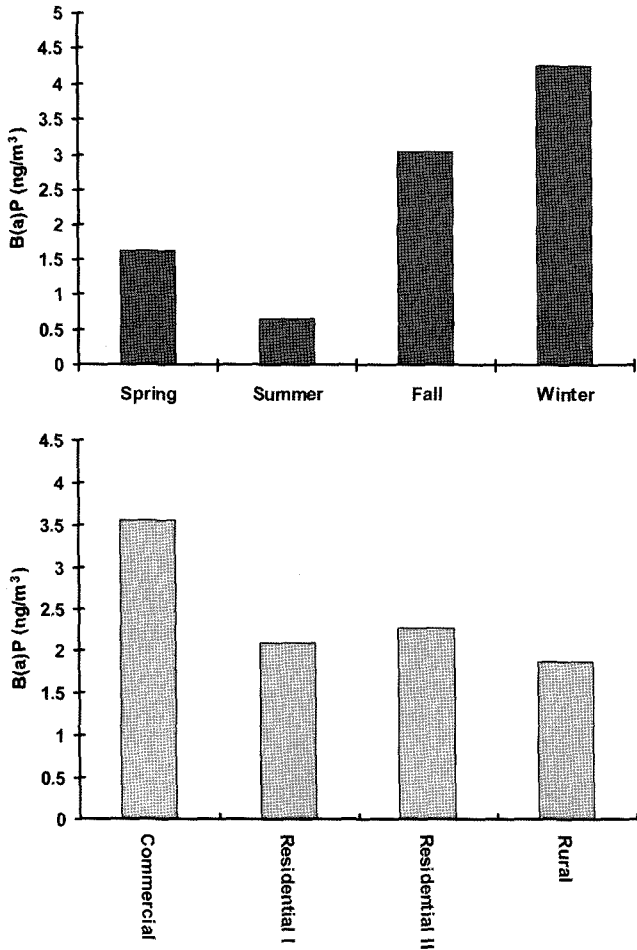


Fig. 4 - (a) Seasonal and (b) regional variations of B(a)P concentration in Chuncheon area among sampling period (n=91, 2003. 4~2005. 2).

0.004)보다는 처리 시 DNA손상도(각각 0.045, 0.039)에서 상관 계수가 높아졌다. 그러나 중금속들과 endonuclease III 비처리 시, 또는 처리 시에서 상관성은 대부분 낮았으며 처리 시에도 미처리 시에 비해 높아지지 않았다.

### 고 찰

대기부유분진은 B(a)P와 같은 다환 방향족 탄화수소(PAH) 등이 함유하고 있으며<sup>11-15</sup> 특히 B(a)P는 비극성발암물질로서 체내에 흡수되어 간세포 등에서 대사되어 DNA와 비가역적 공유결합을 하여 돌연변이나 암을 유발하는 것으로 알려져 있다.<sup>16,17</sup> 또한 대기부유분진 속에는 체내 산화적 stress를 유발하는 중금속이 다량 함유되어 있다. 이 같은 B(a)P나 중금속들은 세포내에서 활성산소(reactive oxygen species, ROS)를 생성하여 세포나 세포소기관에 손상을 초래한다.<sup>18,19</sup> 또한 생체 내 여러 단백질의 아미노산을 산화시켜 단백질의 기능을 저하시키고 DNA 염

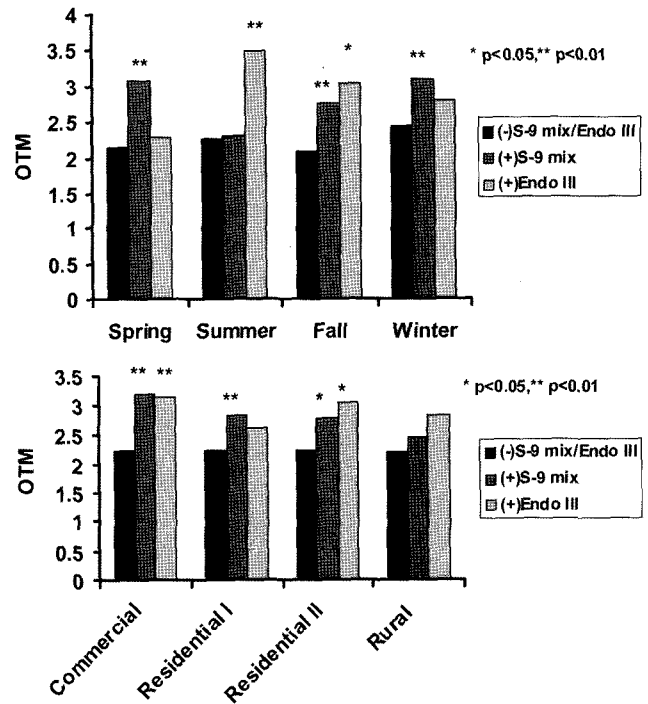


Fig. 5 - Seasonal and regional variations of DNA damage (OTM) in the organic extract of TSP in Chuncheon area among sampling period (n=69-88 in each parameter, 2003. 4~2005. 2). The extracts of TSP were treated to the cells without (■) or with co-treatment (■) of S-9 mix during culture. For evaluation of DNA oxidation, after culture without S-9 mix, the slides were treated in the endonuclease III solution (□). \*p<0.05 and \*\*p<0.01 with respect to (-) S-9 mix/Endo III

기의 변형, 유리, 절단, 당의 산화 분해 등을 초래하여 돌연변이나 암을 유발하는 원인이 된다.<sup>20</sup>

본 연구에서 2003년 4월부터 2005년 2월까지 춘천시 4개의 측정망을 기준으로 계절별, 지역별 대기질을 분석 평가한 결과, TSP의 농도는 봄>겨울>여름>가을 순이었다. 3~5월로 분류된 봄철에 황사발생에 의해 농도가 높은 것으로 판단된다. 황사는 봄철에 중국 및 몽골의 사막 및 사막화지대에서 발생한 미세먼지가 편서풍을 따라 이동하다가 하강기류에 의해 지표면에 떨어지면서 우리나라 전역의 대기 중 먼지량을 증가시키고 있다.<sup>21</sup> 한편, 겨울철은 다른 계절에 비해 대기순환이 적어 대기의 정화가 둔하고 여름은 7~8월의 장마철 세정효과에 의해 TSP 농도가 낮은 것으로 판단된다.<sup>22</sup> TSP의 지역별 농도는 옥천동>후평2동>후평1동>산천리 순으로 나타났다. 상업지역(옥천동)과 인구밀집지역인 주거지역으로서 교통량이 많은 지역(후평2동, 후평1동)의 TSP 농도가 높은 것으로 평가되며, 전원지역으로서 녹지가 많고 건물이 적어 확산이 잘되는 산천리의 TSP 농도는 상대적으로 낮게 나타났다. 본 조사기간 중 TSP의 평균농도(134.1 µg/m³)는 우리나라 7대 도시(서울, 부산 등)의 1991~1997년까

지의 평균농도( $77.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ,  $\beta$ 선 흡수법),<sup>23)</sup> 일본 시즈오카 평균 농도범위( $39.3\sim 91.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )<sup>24)</sup> 보다 높게 나타났으나 대만 도시 지역의 2004~2005년까지의 평균농도범위( $112.5\sim 157.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ )과는 비슷한 수준이었다.<sup>25)</sup>

중금속의 함량도 구리를 제외한 철, 망간, 납, 카드뮴, 크롬, 니켈이 계절별로는 봄>겨울>가을>여름 순으로 감소하는 경향을 보였고, 구리의 경우는 여름철에도 높은 함량을 보였다. 중금속은 계절별로는 봄철에 토양과 같은 자연발생원기여가 큰 철과 망간이 가장 많은 것으로 보아 봄철에 황사현상의 영향을 받고 있는 것으로 판단된다. 그리고 납, 카드뮴, 크롬, 니켈 등 미량 금속들도 철이나 망간처럼 봄, 겨울에 높고 가을, 여름에 낮은 비슷한 거동을 하는 것으로 보아 인위적인 발생원 기여도 있지만 자연발생원 기여도 함께 받는 것으로 보인다.<sup>26)</sup> 다만 구리가 여름에 높게 나타난 점은 춘천지역에 구리의 배출원이 있는 것인지 파악해 볼 필요가 있다고 본다. 지역별로도 대부분의 중금속이 대기부유분진과 동일한 순서로 감소하였다. 대부분의 중금속 농도(구리의 경우도)가 전원지역인 산천리가 가장 낮고 기타지역에서 높아지는 것으로 보아 교통량이나 인구밀집 등에서도 영향을 받고 있음을 보여주고 있다. 산업장 대기오염물질 배출량이 적은 춘천의 지역특성을 고려해볼 때 봄철 황사의 잔류와 도로, 아스팔트의 비산먼지 및 자동차 배기가스의 중금속의 발생 원인으로 추정된다.<sup>26)</sup> 본 조사기간 중 중금속농도는 우리나라 제주지역의 2002년 TSP 중 중금속농도들<sup>27)</sup>보다 높은 편이었으며 동일 기간 서울 및 부산(PM10)과 비교하여 구리를 제외하고 낮은 편이었다. 일본 나고야의 2003년도 PM10 중 중금속농도<sup>28)</sup>보다는 높은 편이었으나 대만 도시지역의 2004~2005년까지의 중금속 농도와는 비슷한 수준이었으며 본 조사결과와 유사하게 여름에 낮고 겨울에는 높은 계절변동을 나타내었다.<sup>25)</sup>

TSP 중에 함유된 B(a)P를 정량한 결과 겨울>가을>봄>여름 순으로 감소하였다. TSP의 경우에는 봄철에 가장 높았음에 비하여 B(a)P는 겨울철에 가장 높은 것으로 보아 난방연료의 소비와 같은 화석연료 발생원의 기여가 커졌기 때문으로 판단된다. 지역별로는 옥천동>후평1동>후평2동>산천리 순으로 역시 교통량이 많은 상업, 주거지역이 전원지역보다 농도가 높았던 것으로 보아 인위적 오염원의 증가가 원인으로 파악된다.<sup>5)</sup> 인위적 발생량과 함께 겨울철에는 낮은 기온과 적은 일사량에 의해 가스상 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)류가 입자상으로 성장변화가 일어난다.<sup>13)</sup> 한편 여름철에는 기온이 높고 일사량이 많으며, 강우에 의한 세정효과에 의해 PAH가 쉽게 휘발 및 제거되어 그 양이 감소하게 된다. 그러므로 계절별 변화량을 보았을 때 B(a)P 농도는 여름이 낮고 겨울철이 높게 나타났다.<sup>12,14)</sup> 본 조사기간 중 B(a)P 평균농도는  $2.4 \text{ ng}/\text{m}^3$ 으로서 일본의 토교지역 1996~1997년 기하평균농도범위<sup>29)</sup>  $0.93\sim 2.15 \text{ ng}/\text{m}^3$ , 도쿄, 삿포로, 북큐슈 등의 1997년도 TSP 중

평균농도 범위<sup>30)</sup>  $0.45\sim 0.78 \text{ ng}/\text{m}^3$ 보다 높은 편이었으며, 우리나라 서울 1998~1999년 PM2.5 중 B(a)P 농도<sup>31)</sup>  $2.58 \text{ ng}/\text{m}^3$ 와는 유사하였다.

대기부유분진 추출물에 함유된 중금속의 산화적 stress에 의한 유전독성 평가를 위해 A549 세포에 Comet assay를 실시하였다. 또한 시료 처리된 세포의 cell lysis 후 endonuclease III를 처리하여 산화적 DNA 손상도를 평가하였다. Endonuclease III는 apurinic(AP) site에서 손상된 pyrimidines를 제거하는 N-glycosylase activity를 가지고 있다. 따라서 endonuclease III 처리 후 comet assay 후 DNA 손상도 증가로 산화된 염기를 확인할 수 있다.  $\text{H}_2\text{O}_2$  같은 산화제에 의한 DNA single strand breaks (SSB)는 endonuclease III 처리 시 증가한다는 연구결과가 있다.<sup>32)</sup> 또한,  $\text{Fe}^{2+}$ 는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 함께 single strand break(SSB)와 산화염기부가체를 생성을 촉진시킨다.<sup>33)</sup> 실제로 A549 cell에  $\text{Fe}^{2+}$ 를 처리하여 Comet assay를 실시한 결과 DNA 손상도는 증가하였다 (data not shown). 따라서 대기 중에 존재하는 Cu와 Fe와 같은 중금속에 의해 산화적 DNA 손상이 유발 및 촉진된다고 예상할 수 있다.

Fig. 4에서 endonuclease III를 처리하지 않았을 경우에는 OTM 값에서 계절별, 지역별로 차이가 뚜렷이 나타나지 않았다. 그러나 endonuclease III를 처리했을 경우 비처리 시보다 측정치가 대부분 증가한 것으로 보아 대기부유분진 추출물에 의한 세포내 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine adduct 생성 등 DNA 염기의 산화적 손상이 있는 것으로 판단된다.<sup>34,35)</sup> 그러나 Fe, Mn, Cu와 같은 ROS 생성촉진에 관여한 전이금속의 농도가 봄철과 여름철에 높았음에 비하여 산화적 손상 excision repair 효소인 endonuclease III 처리 시에 봄철과 여름철의 OTM 값이 높아지지 않은 것은 본 연구에서 사용한 대기부유분진의 추출물이 디클로로메탄추출물로서 지용성이 크기 때문에 충분히 중금속이 추출되지 않았으며, 대기부유분진 중 유기금속이나 quinone 물질에 의한 산화적 손상만이 주로 반영되었기 때문으로 보인다. 따라서 중금속과 DNA 산화적 손상과의 관련성을 크게 하기 위해서는 대기부유분진의 수용성추출물로서 비교해야 할 것으로 판단된다.

한편 세포주에 대기부유분진추출물 시료 및 S-9 mixture를 처리하여 대사활성화를 유도한 후 OTM 값으로 비교한 결과 비유도 시보다 전체적으로 높아졌으며, S-9 mix 유도 OTM은 B(a)P 농도와 같이 겨울에 높고 여름에 낮았으며 상업지역과 교통량이 많은 주거지역에서 높고 전원지역이 낮았다. 따라서 대기부유분진추출물은 PAH와 같은 탄화수소가 함유된 유기성 추출물이므로 B(a)P농도와 거동을 유사하게 하는 것으로 보인다.<sup>36,37)</sup>

전 측정기간 동안의 TSP를 비롯한, 중금속, B(a)P 농도 및 DNA손상도 등 11개 파라미터들 사이의 상관관계를 검토한 결과는 TSP의 경우 Fe, Cr, Ni의 상관성이 높았으며 Fe의 경우는

Mn, Cr과 Ni과 높은 편이었다. Mn의 경우에는 Cr과 Ni과의 상관성이 다소 높았다. 한편 Cr과 Ni도 다소 높았다. 높은 상관관계를 나타내는 중금속들은 동일한 발생원 기여가 높다고 볼 수 있다. 한편, TSP와 B(a)P의 상관관계는 매우 낮았다. 이는 본 측정시료가 미세분진인 PM10이나 PM2.5가 아니라 TSP를 대상으로 하고 있으며 춘천지역의 TSP가 봄철에 황사의 영향을 크게 받고 있기 때문에 입자상물질농도와 다환방향족탄화수소와의 상관성이 잘 나타나지 않은 것으로 보인다. 따라서 향후 PM10이나 PM2.5에서의 상관성 검토가 필요하다고 보여 진다. 한편, 중금속들과 endonuclease III 비처리 시 또는 처리 시에서 상관성은 대부분 낮았으며 처리 시에도 높아지지 않았다. 이 또한 유전독성을 평가하는데 사용한 대기부유분진추출물이 수용성이 아니라 지용성추출물을 사용했기 때문으로 보인다.<sup>38)</sup> 그러나 TSP와 B(a)P 모두 S-9 mix 비처리 시의 DNA손상도보다 처리 시 DNA손상도에서 상관계수가 높아진 것으로 보아 함유 B(a)P 등이 S-9 mix 처리 시 유전독성을 더 크게 나타낼 수 있음을 보여 준다. 따라서 향후 대기부유분진의 인체에 미치는 환경독성을 파악하기 위하여 TSP 뿐 만 아니라 PM10, PM2.5 등에 대해서도 중금속, B(a)P 같은 화학적 분석과 함께 생물학적 평가를 위한 바이오마커 (biomarker)<sup>39-42)</sup>로서 DNA손상과 같은 유전독성을 활용할 수 있다고 본다.

**결 론**

본 연구에서는 춘천지역의 유전독성 관련 입자상물질의 오염 현황을 평가하고 이와 관련된 환경보건학적 영향인 유전독성을 측정하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 대기부유분진(TSP)과 함유된 대부분의 중금속 및 B(a)P 농도는 겨울철에 함량이 높고 여름철에 낮았으며, 교통량이 많은 상업지역, 주거지역이 녹지지역보다 높은 농도를 나타내었다.
2. 대기부유분진 유기용매추출물은 A549 세포에서 DNA 손상을 나타내었다. Endonuclease III 처리에 의해 산화적 DNA 손상이 검출되었으며, 특히 S-9 mix 전처리 시에도 DNA 손상이 증가하였으며 계절적, 지역적 변동도 나타났다.
3. 인체에 영향을 미치는 환경독성을 파악하기 위하여 추후 대도시오염지역과의 비교 연구를 통하여 대기부유분진(TSP, PM10, PM2.5) 중 중금속, B(a)P 같은 화학적 분석 뿐 만 아니라 생물학적 평가를 위한 바이오마커(biomarker)로서 DNA손상 같은 유전독성자료를 활용할 수 있다고 본다.

**참고문헌**

1) Heyder, J. : Regional deposition of inhaled particles in the human respiratory tract. *In: Mohr, U., et al. (Eds.), : Advances*

in controlled clinical inhalating studies. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 103-107 (1993).

2) Schwartz, J. : Particulate air pollution and chronic respiratory disease. *Environ. Res.* **62**, 7 (1993).

3) Oh, S. M., Sung, H. K., Kim, E. S., Kim, J. G., Ryu, B. T. and Chung, K. H. : Genotoxic effect of air-borne particulate matter in residential area of Seoul City. *J. Environ. Toxicol.* **20**, 365 (2005).

4) Seemayer, N. H., Hadnagy, W. and Tomingas, R. : Mutagenic and carcinogenic effects of airborne particulate matter from polluted areas on human and rodent tissue cultures. *Experientia Suppl.* **51**, 231 (1987).

5) Matsuo, M., Shimada, T., Uenishi, R., Sasaki, N. and Sagai, M. : Diesel exhaust particle-induced cell death of cultured normal human bronchial epithelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 438 (2003).

6) Beng-Chan, L., Wun-Jae, W., Seung-Soon, W., Geun-Chan, O., Nak-Gi, H., Myong-Ryul, B., Ki-Hyun, N., Yong-Jin, K. and Sung-Seok, K. : The specific character of temporal and spatial distribution by total suspended particle (TSP) and heavy metals in Chuncheon air quality. *Rep. Inst. Health & Environ.* **17**, 74 (2006).

7) Woo, S. S., Shoi, G. J., Hong, N. G., Weon, W. J., Oh, G. C., Lim, B. C., Kim, Y. J. and Jeong, U. H. : Estimation of atmosphere quality in Chuncheon area. *Rep. Inst. Health & Environ.* **16**, 145 (2005).

8) Shon, D. H., Heo, M. Y. and Namkoong, Y. : Studies on benzo(a)pyrene concentrations in atmospheric particulate matters. *J. Korea Air Pollution Res. Assoc.* **3**(2), 11 (1987).

9) Sing, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. : A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184 (1988).

10) Olive, P. L., Banath, R. E. and Durand, R. E. : Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay. *Radiat. Res.* **122**, 86 (1990).

11) Kim, D. H., Sohn, D. H. and Heo, M. Y. : Studies on relationship between polynuclear aromatic hydrocarbon concentration and genotoxic effects of total suspended particulate extract. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **4**, 32 (1990).

12) Martina, R., Andrea, M., Laura, M., Olf, H. and Alicia, R. : Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of the Total Environment* **348**, 199 (2005).

13) Kiss, G., Varga-Puchonya, Z., Rohrbacherb, G. and Hlavayc, J. : Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons on atmospheric aerosol particles of different sizes. *Atmospheric Research* **46**(3-4), (1998).

14) Menchini, E., Monfredini, F. and Merli, F. : The temporal

- variability of the profile of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air: a study in a medium traffic area in Rome 1993~1998. *Atmos. Environ.* **33**, 3739 (1999).
- 15) Guo, H., Lee, S. C., Ho, K. F., Wang, X. M. and Zou, S. C. : Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. *Atmos. Environ.* **37**, 5307 (2003).
  - 16) Gelboin, H. V. : Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* **60**, 1107 (1980).
  - 17) Pelkonen, O. and Nebert, D. W. : Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* **34**, 189 (1982).
  - 18) Hanna, L. K., Jonas, N. and Lennart, M. : Genotoxicity of airborne particulate matter: the role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. *Mutat. Res.* **565**, 1 (2004).
  - 19) Risom, L., Moller, P. and Loft, S. : Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat. Res.* **592**, 119 (2005).
  - 20) Marnett, L. J. : Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361 (2000).
  - 21) Lee, B. K., Lee, H. K. and Jun, N. Y. : Analysis of regional and temporal characteristics of PM10 during an Asian dust episode in Korea. *Chemosphere* **63**, 1106 (2006).
  - 22) Moon, H. B., Kannan, K., Lee, S. J. and Ok, G. : Atmospheric deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in an urban and a suburban area of Korea from 2002 to 2004. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **51**, 494 (2006).
  - 23) Lee, J. T., Kim, H., Hong, Y. C., Schwartz, H. J. and Christiani, D. C. : Air pollution and daily mortality in seven major cities of Korea, 1991~1997. *Environ. Res.* **84**, 247 (2000).
  - 24) Kume, K., Ohura, T., Noda, T., Amagai, T. and Fusaya, M. : Seasonal and spatial trends of suspended-particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban Shizuoka Japan. *J. Hazard Mater.* in press (2007).
  - 25) Fang, G. C., Wu, Y. S., Wen, C. C., Huang, S. H. and Rau, J. Y. : Ambient air particulate concentrations and metallic elements principal component analysis at Taichung Harbor (TH) and WuChi Traffic (WT) near Taiwan Strait during 2004~2005. *J. Hazard Mater.* **137**, 314 (2006).
  - 26) Jo, W. K. and Park, J. H. : Analysis of roadside inhalable particulate matter (PM10) in major Korean cities. *Environ. Manage* **36**(6), 826 (2005).
  - 27) Kim, K. H., Mishra, V. K., Kang, C. H., Choi, K. C., Kim, Y. J., Kim, D. S., Youn, Y. H. and Lee, J. H. : The metallic composition of aerosols at three monitoring sites in Korea during winter 2002. *Environ. Monit. Assess.* **121**(1-3), 381 (2006).
  - 28) Fukai, T., Kobayashi, T., Sakaguchi, M., Aoki, M., Saito, T., Fujimori, E. and Haraguchi, H. : Chemical characterization of airborne particulate matter in ambient air of Nagoya, Japan, as studied by the multielement determination with ICP-AES and ICP-MS. *Anal. Sci.* **23**, 207 (2007).
  - 29) Koyano, M., Endo, O., Katoh, M., Valdivia, R., Marileo, I., Morita, K., Goto, S. and Matsushita, H. : Polynuclear aromatic hydrocarbon concentration and mutagenicity of airborne particles in urban air: Comparison of Tokyo area and Sandiego. *J. Health Science* **48**, 256 (2002).
  - 30) Kakimaoto, H., Matsumoto, Y., Shigegatsu, S., Kanoh, F., Arashidani, K., Tang, N., Akutsu, K., Nakajima, A., Awata, Y., Toriba, A., Kizu, R. and Hayagawa, K. : Comparison of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons and nitro-polycyclic hydrocarbons in an industrialized city (Katakayushu) and two commercial cities (Sapporo and Tokyo). *J. Health Science* **48**, 370 (2002).
  - 31) Park, S. S., Kim, Y. J. and Kang, C. H. : Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk PM(2.5) and size-segregated aerosol particle samples measured in an urban environment. *Environ. Monit. Assess.* in press (2007).
  - 32) Wu, L. T., Chu, C. C., Chung, J. G., Chen, C. H., Hsu, L. S., Liu, J. K. and Chen, S. C. : Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **556**(1-2), 75 (2004).
  - 33) Shi, H., Hudson, L. G. and Liu, K. J. : Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biol.* **37**, 582 (2004).
  - 34) Hsiao, W. L., Mo, Z. Y., Fang, M., Shi, X. M. and Wang, F. : Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutat. Res.* **471**(1-2), 45 (2000).
  - 35) Shi, T., Duffin, R., Borm, P. J., Li, H., Weishaupt, C. and Schins, R. P. : Hydroxyl-radical-dependent DNA damage by ambient particulate matter from contrasting sampling locations. *Environ. Res.* **101**, 18 (2006).
  - 36) Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlahogianni, T., Bakeas, E. B., Triantafyllaki, S., Paraskevopoulou, V. and Dassenakis, M. : Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). *Chemosphere* **65**, 760 (2006).
  - 37) Knaapen, A. M., Shi, T., Borm, P. J. and Schins, R. P. : Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell Biochem.* **234-235**(1-2), 317 (2002).
  - 38) Gutierrez-Castillo, M. E., Roubicek, D. A., Cebrian-Garcia, M. E., De Vizcaya-Ruiz, A., Sordo-Cedeno, M. and Ostrosky-Wegman, P. : Effect of chemical composition on the induction



- of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen.* **47**, 199 (2006).
- 39) Farmer, P. B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R. J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T. A., Garte, S., Taioli, E., Gabelova, A. and Cebulska-Wasilewska, A. : Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* **544**(2-3), 397 (2003).
- 40) Buschini, A., Cassoni, F., Anceschi, E., Pasini, L., Poli, P. and Rossi, C. : Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* **44**, 1723 (2001).
- 41) Hsiao, W. L., Mo, Z. Y., Fang, M., Shi, X. M. and Wang, F. : Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. *Mutat. Res.* **471**(1-2), 45 (2000).
- 42) Hannigan, M. P., Cass, G. R., Penman, B. W., Crespi, C. L., Lafleur, A. L., Busby, Jr. W. F. and Thilly, W. G. : Bioassay-directed chemical analysis of Los Angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3502 (1998).