근로자의 뇨중 상피세포에서 32P-postlabeling에 의한 발암물질의 DNA adducts측정에 대한 연구

공주대학교 환경교육과‡ · 연세대학교 의과대학 산업보건연구소[1] · 신시내티대학교 환경보건학과[2]

이진헌‡ · 노재훈[1] · 그린 탈라스카[2]

-Abstract-

Study on Measurement of Carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells among workers by 32P-postlabelling methods

Jin Heon Lee‡ · Jae Houn Roha[1] · Glenn Talaskab[2]

Kongju National University, Department of Environmental Education‡

Yonsei University, College of Medicine, Institute of Industrial Healtha[1]

University of Cincinnati, Department of Environmental Healthb[2]

Carcinogen-DNA adduct analysis has potential for biomonitoring the earliest effects of exposure to many chemical carcinogens. They are the covalent reaction products of electrophiles and nucle ophilic sites on DNA and the initial damage to DNA induced by many carcinogens. So many researchers begin to use them as biomarker for monitoring the earliest exposure of carcinogens and develop the effective analytical techniques about them. Randerath, Gupta and coworkers(1981, 1982) has also developed a 32P-postlabelling method as one among them.

A major project for biomonitoring workers with carcinogen-DNA adducts is to develop non-invasive samples instead of tissues of target organs such as baldder and lung. This study use the exfoliated urothelial cells in urine for examine benzidine-DNA adducts.

The content of exfoliated urothelial cells is not enough to significantly measure DNA content with spectrophotometer, and require the another way. So firstly washing the collected cells with PBS and 70% ethanol and centrifuge them for removing the crystals in urine, which block the isolation of DNA adducts. And then, measure the total nucleotide after 32P-postlabelling for calculating RAL. [γ-32 P]ATP using for 32P-postlabelling, can synthesize with [32P]H3PO4, and reagent and enzyme mixture (RM, EM), which is very economic in case of requiring a lot of them. Chromatography was composed of two steps. First step was to separate adduct ones from unadducted nucleotide, and secondary step was separate each adduct, which were performed with 4 kinds of solvents and different directions on TLC. With this procedure, we measure the DNA adducts in exfoliated urothelial cells of workers who were employed in benzidine and benzidine-dye company. RAL of adducts were 89.0×107 and 57.0×107 in them.

In conclusion, we can significantly measure the DNA adduct in exfoliated urothelial cells by using the above 32P-postlabelling procedures, and use them to be biomonitoring workers who exposed carcinogens.

Key words ; Carcinogen-DNA adducts, 32P- postlabeling, biomonitoring, exfoliated urothelial cells,

접수일 : 1999년 7월 8일, 채택일 : 1999년 10월 1일

*** 이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비(과학기술기초중점연구)에 의하여 지원되었음**

‡교신저자 : 충남 공주시 신관동 192 공주대학교 사범대학 환경교육과

Tel) 0416-850-8814 Fax) 0416-850-8810 E-mail) ejhl@knu.kongju.ac.kr

Ⅰ. 서 론

암에 의한 사망자수는 계속 증가하여 전 세적으로 년간 약 6백만에 달하고 있으며, 전체 사망자수의 약 40%에 이르고 있다(이인수, 1997). 1972년 닉슨 대통령이 암과의 전쟁을 선언한 후, 약 20여 년 동안 암에 대한 원인규명과 화학요법제의 개발 등에 많은 연구노력을 기울여 왔지만 결정적인 암 치료법은 아직 제시되지 않고 있다(NCI, 1996). 이러한 과정에서 1983년부터 시작된 암 예방프로그램으로 암 발생의 원인자인 발암물질에 폭로된 것을 감시할 수 있는 생체모니터링(biomonitoring)방법을 개발하고자 노력하고 있다. 근로자들에 폭로된 유해물질의 생체모니터링를 위하여 생체지표(biomarker)로 BEIs (biological exposure indices)를 사용하고 있으며(ACGIH, 1999), 발암물질의 생체모니터링을 위해서는 발암물질에 의하여 형성된 DNA adducts가 가장 적합한 생체지표로는 인정되고 있다. 그것은 인체에 폭로된 대부분의 발암물질이 암으로 진행되기 위해서는 반드시 DNA adducts를 형성하며, 동시에 이 시점에서 폭로를 중단하여 DNA adducts수준을 낮추면 암으로 진행되는 확률을 크게 낮출 수 있기 때문이다.

따라서 많은 연구자들이 DNA adducts를 효과적으로 측정할 수 있는 여러 가지 방법들, 즉 HPLC-형광측정법(synchronous fluorometric detector, Rahn et al., 1982; Vahakangas et al., 1985), 면역측정법(immunoassay, Muller & Rajewsky, 1980; Poirier et al., 1977; Santella et al., 1985), 전기영동법(electrophore labeling, Fisher et al, 1985), 생화학적 32P-postlabeling방법(Gupta et al., 1982; Guta, 1985; Reddy & Randerath, 1986; Talaska et al, 1992) 등을 연구하였다. 특히 생화학적 ^{32}P-postlabeling방법은 시료를 채취한 후에 방사능 물질([γ-^{32}P]ATP)을 부착하여 DNA adducts를 측정하기 때문에 실험대상자에게 방사능 물질을 폭로시킬 필요가 없는 좋은 장점을 지니고 있는데, Talaska(1992)는 이 방법을 더욱 개선하여 소량의 방사능물질에 의해서도 높은 감도, 즉 10^{7}-10^{10}개의 정상 뉴클레오티드 중에서 1개의 DNA adduct를 분리할 수 있다고 보고하였다(Talaska et al, 1992).

이 방법에 의하여 인체에서 발암물질로 형성된 DNA adducts를 모니터링하는 경우에 부딪치는 문제점은 대상 표적장기에서 비관혈적(non-invasive)으로 채취하기 어렵다는 점이다. 폐와 방광과 같은 내부 장기들은 환경과 작업장에서 폭로되는 각종 발암물질에 의하여 암이 가장 많이 발생하는 부위이다(Siverberg & Lubera, 1987). 이들 표적장기로부터 비관혈적 시료를 채취하기가 어렵기 때문에 대리조직(surrogate tissues)으로 혈액의 임파구를 이용하였다.

그러나 발암물질이 유전자 독성으로 변하는 과정에서 나타나는 활성화, 무독화, 생활성화 등이 표적장기의 약동력학적 특성과 대사기전 등에 의하여 각 물질마다 독특하기 때문에 특정 발암물질은 특정부위와 반응한다는 사실이다(Beland, et al., 1983). 그러므로 표적장기의 시료 대신에 사용한 혈액 임파구에서 측정한 발암물질-DNA adducts의 결과를 해석하는데 주의하야 하며, 사전에 동물실험에 의하여 표적장기와 혈액 임파구 사이에서 발생한 DNA adducts의 상관성을 제시되어 있어야 한다.

최근에 방광에서 탈락된 상피세포, 즉 요로 상피세포(exfoliated urothelial cells)를 많은 연구에서 사용하고 있다. 이들은 정기적으로 방광에서 탈락되어 뇨와 함께 배설되고 있기 때문에 악성 표현형(phenotype)을 파악하기 위한 세포독성 연구을 위하여 오래전부터 사용되어 왔다. Reali(1987)은 흡연자들의 요로상피세포에서 소핵(micronucli)이 많이 증가한다는 연구결과를 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 방광에서 정기적으로 탈락되어 배설되는 요로상피세포(exfoliated urothelial cells)을 비관혈적 시료(non-invasive sample)로 선택하여 이 세포에서 발암물질로 형성된 DNA adducts를 효과적으로 측정하는 방법을 연구하였다. 그리고 방광암과 밀접한 관계가 있는 벤지딘 및 벤지

딘계 물질을 함유하고 있는 염료와 안료제조 사업장에서 종사하고 있는 근로자들을 대상으로 생체모니터링하는데 적용하는 연구를 하였다.

II. 연구의 기본 틀

비관혈적 시료(non-invasive samples)인 뇨에서 배설되는 상피세포의 양은 매우 적기 때문에 이 시료에서 DNA adducts를 정확하게 측정하기 위해서는 측정의 감도가 매우 좋아야 한다. Talaska(1992)가 개선한 ^{32}P-postlabeling방법은 감도가 매우 높기 때문에 요중 상피세포에 형성된 DNA adducts를 측정할 수 있는데 응용할 수 있을 것으로 생각된다 (Talaska, et al., 1992) .

본 연구의 기본 틀은 인체의 뇨에서 상피세포를 채취하는 단계부터 DNA adducts의 RAL(relative adducts labeling)를 계산하는 단계까지 7단계로 Figure 1과 같이 구성하였다.

벤지딘 및 벤지딘 염료를 취급하는 사업장의 근로자들에게서 뇨를 채취하여 상피세포를 분리하여 분쇄시키고, RNA와 단백질을 효소로 분해하여 DNA를 분리한다. 분리된 DNA 시료는 MN(micrococcal endonuclease)와 SPD(spleen phosphodiesterase)의 혼합물로 가수분해하여 3'-phosphodeoxynucleotides를 형성시키고, polynucleotide kinase와 [γ-^{32}P] ATP를 사용하여 3', 5'-bisphosphodeoxynucleotides의 형태로 라벨링한다.

라벨링된 시료는 TLC(anionexchange thinlayer chromatography)상에서 4단계로 크로마토그래피하여, adducts된 뉴클레오티드를 3',5'-bisphosphodeoxynucleotides에서 분리한다.

TLC상에 spot형태로 분리된 adduct는 필름으로 감광하여 확인하고 오려내어, LSC(liquid scintillation counter)로 spot에 존재하는 라벨링된 adducts의 CPM (count per minute)를 측정한다.

DNA adducts의 수준은 아래 공식과 같이 계산된 RAL(relative adducts labeling)로 나타내는데, 분자는 adduct된 뉴클레오티드의 CPM를 사용하고 분모는 뉴클레오티드의 CPM를 사용하여 계산한다 (Talaska et al., 1992).

$$RAL = \frac{CPM\ of\ adducts\ nucleotides}{CPM\ of\ total\ nucleotides}$$

III. 연구방법 및 실험재료

1) 연구 대상자

이 연구에 사용된 비관혈적 시료(뇨 시료)는 3개의 염료 및 안료 작업장에서 벤지딘과 벤지딘계 물질을 취급하는 33명의 근로자를 대상으로 채취하여 시료로 사용하였다.

2) 요로 상피세포(Exfoliated urothelial cells) 분리방법

대상 근로자가 제출한 뇨(284±114 mL)를 냉장고에 보관하면서 요로 상피세포를 분리하는 시료로 사용하였다. 냉장고에 보관한 뇨 시료가 얼었을 경우에는 세포가 손상되지 않도록 5분마다 흔들면서 따뜻한 물에서 녹이고, 10㎛여과지로 여과하여 요로 상피세포를 채취하여 10ml Phosphate Buffer Solution (PBS)용액이 있는 페트리디쉬에서 붓으로 여과지에 채취된 세포들을 수집하였다.

세포가 수집된 PBS용액을 15ml 시험관에 옮기고 4℃, 600-1,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전시키어 세포를 용액에서 분리시키고, 새로운 PBS용액으로 위 과정을 2회 이상 반복하여 세포를 세척한 후에 500㎕의 1% SDS(sodium dodecul sulfate, Sigma L5750)와1mM EDTA의 혼합용액으로 침전물을 부유시키어 1.5ml Eppendorf튜브에 옮기었다. 이 용액을 냉장고(-40 -70℃)에 보관하면서 DNA adducts 측정시험의 시료로 사용하였다.

3) DNA 분리방법

냉동실에 보관된 요로 상피세포 시료를 뜨거워지지

Figure 1. Fundamental procedures of ^{32}P-postlabeling method for DNA adducts in exfoliated urothelial cells

않도록 녹인 후에 얼음이 들어 있는 곳에 보관하면서 실험에 사용하였다. 시료를 15ml 시험관(Corex No.15)에 옮긴 후에, 1,000㎕의 1% SDS(sodium dodecul sulfate, Sigma L5750)와 1mM EDTA의 혼합용액과 24㎕의 1M Tris(pH 7.4, Trizma base, Sigma 1503)를 넣고, 조직분쇄기(Brinkman Homogenizer)로 세포를 분쇄시키었다. 시험관에 24㎕ RNase A(10mg/ml, Sigma #R-5125)와 8㎕ RNase T_1(5㎍/㎕, Sigma #R-8251)를 넣고 혼합한 후에 37℃에서 인큐베이션(60분)시키고, 다시 60㎕ Proteinase K(10mg/ml, BM #161519)를 넣고 혼합한 후에 37℃에서 인큐베이션(30분)시키었다. 시험관에 1.2ml 페놀를 넣고 혼합한 후에 -4℃, 7,000rpm에서 원심분리(10분)하여 스포이드로 상층액을 새로운 시험관에 옮기고, 계속해서 0.6ml 페놀과 0.6ml sevag을 동시에 넣고 동일한 실험과정을 거치고, 다음은 1.2ml sevag(chloro- form: isoamyl alcohol, 24:1)를 넣고 동일한 과정을 마친 후에 상층액을 분리하여 시료로 사용하였다.

새로운 시험관에 옮겨진 시료에 100㎕ 4M LiCl (Sigma L0505)용액과 10㎕ glycogen(30㎍/㎕)를 넣고 혼합하였다. 냉동실에 보관하였던 100% 에틸알코올을 시험관에 충분히 넣고 섞어주면서 실같이 형성되는 DNA의 침전물을 확인하였다. 시험관을 -80℃ 냉장고에 약 15분 동안 저장한 후에 -4℃, 7,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 침전물(pellet)이 실험관의 바닥에 붙어 있는 DNA를 확인한 후에 에틸알코올을 조심스럽게 쏟아 버렸다.

염을 제거한 각 시험관을 흡수종이(보통 거름종이) 위에 거꾸로 세워놓아서 침전물을 실온에서 건조시키고, 50-70㎕의 1% SSC(NaCl과 Trisodium citrate의 혼합물)와 1mM EDTA 혼합용액으로 시험관에 붙어있는 DNA 덩어리를 용해시키었으며, 이 시료를 Eppendorf튜브에 옮겨서 DNA의 stock용액으로 사용하였다.

4) DNA 농도 측정방법

DNA adducts측정에 사용될 stock용액의 DNA농도를 측정하기 위해 1% SSC(NaCl과 Trisodium citrate의 혼합물)와 1mM EDTA 혼합용액에 녹아있는 stock용액에서 10㎕을 취하여 590㎕의 물에 희석하고, 바탕시료에는 stock용액 대신에 10㎕의 1% SSC와 1mM EDTA 혼합용액을 희석하여 스펙트로포토미터로 흡광도를 측정하였다.

5) DNA 가수분해 방법

4㎕의 stock용액에 2㎕ MN((Micrococcal Nuclease) 와 SPD(Spleen Phosphodiesterase) 혼합액, 2㎕ 5×salt(pH 7.0, calcium chloride와 succinic acid 혼합물), 그리고 2㎕ H_2O 등으로 구성된 6㎕ 혼합용액을 첨가하여 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다.

6) [γ-^{32}P]ATP 합성방법

업자에게서 구입한 [$^{32}P_i$]오르토인산염(orthophosphate, 1000㎕Ci/㎕ ^{32}P-H_3PO_4, Amersham Pharmacia Biotech)용기가 방사능으로 오염되었는지를 확인하고 EM(Enzyme Mix)과 RM(Reagent Mix), 그리고 0.1N HCl를 첨가하고 20-30분 동안 23℃(실온)에서 반응을 시킨 후에 [γ-^{32}P]ATP가 합성되었는지 실험하였다(Table 2와 Table 3).

합성된 [γ-^{32}P]ATP용액의 합성정도는 희석용액(합성용액 3㎕와 물 1250㎕)을 TLC(5cm×10cm)상에서 1.25M LiCl용액으로 크로마토그래피한 후에 필름(Chronex 4 film)으로 확인하였고, 합성용액의 활성도(activity, ㎕Ci/㎕)는 LSC(liquid scintillation counter)로 측정하였다.

7) ^{32}P-postlabeling방법

가수분해가 완료된 시료에 0.28㎕ PNK(T_4 polynucleotide kinase, Amersham Life Science, #E70031Z), 1.5㎕ PNK buffer, 그리고 10mM Bicine(pH 9.6, Sigma #B-3876)를 넣고 합성된 200 300㎕Ci[γ-^{32}P]ATP를 첨가한 후에 37℃에서 인큐베이션(40분)하여 ^{32}P-postlabeling 하였다.

Table 1. Reagent Mix(RM, ICN Modification)

Reagent	For mix
1M Tris-HCl, pH 9.0	900 μℓ
1M $MgCl_2$	210 μℓ
1M dTT(Dithiothreitol)	210 μℓ
10 mM L-glycerol-3-Phosphate(PO_4)	210 μℓ
100 mM NAD	90 μℓ
200 mM Sodium Pyruvate(fresh)	90 μℓ
20 mM ADP(fresh)	90 μℓ
Total Volume	1.80 ml

Table 2. Enzyme Mix(EM, ICN Modification)

Reagent	For mix
Glycerol-3-PO_4-Dehydrogenase(BM#127124)	90 μℓ
Triose-PO_4-Isomerase(BM#109754)	3 μℓ
Glyceraldehyde-PO_4-Dehydrogenase(BM#105686)	52 μℓ
3-Phosphoglycerate Kinase(BM#108430)	7 μℓ
Lactate Dehydrogenase(BM#127230)	52 μℓ
50 mM Tris-HCl, pH 9.0	1789 μℓ
1M dTT(Dithiothreitol)	7 μℓ
Total Volume	2.0 ml

라벨링이 끝나면 4μℓ apyrase(Sigma A-6535)를 첨가하고 37℃에서 인큐베이션(30분)하여 반응하지 않은 잉여[γ-^{32}P]ATP는 [$^{32}P_i$]오르토인산염(^{32}P H_3PO_4)으로 분해시키었다.

8) 총 뉴클레오티드 측정방법

^{32}P-postlabeling된 4μℓ의 시료용액에 746μℓ 10mM Bicine(pH 9.6)을 첨가하여 희석용액을 만들었다. 이 희석용액에서 5μℓ을 채취하여 TLC(thin-layer ion exchange chromatography, 10cm×20cm)의 밑부분(약 1.5cm)에 spotting하고, 0.15M sodium phosphate buffer(pH 6.0)와 0.5M LiCl용액에서 크로마토그래피하여 총 뉴클레오티드를 분리하였다.

TLC상에 분리된 뉴클레오티드의 위치를 필름(Chronex 4 film)으로 감광하여 확인하고, 그 부위를 오려내어 5ml 에틸알코올(70%)이 들어있는 계수용기에 넣은 후에 액체 신틸레이션 계수기(Liquid Scintillation Counter)로 CPM(count per minute)를 측정하여 RAL(relative adducts labeling)를 계산하는데 사용하였다.

9) 크로마토그래피에 의한 DNA adducts분리방법

^{32}P-postlabeling된 시료는 박막 이온교환 크로마토그래피(TLC, thin-layer ion exchange chromatography)를 이용하여 두 단계로 실험이 수행하였다. 먼저 ^{32}P-postlabeling된 시료에서 발암물질로 형성된 DNA adducts를 분리하고, 다음은 DNA adducts를 종류별로 분리하였다.

시료에서 발암물질에 의하여 형성된 DNA adducts를 분리하기 위하여 거름종이(20cm×30cm)을 상단에 부착한 TLC(10cm×20cm)에 18μℓ ^{32}P-postlabeling된 시료를 spotting하고, D1용매(0.65M NaH_2PO_4, pH 6.0)로 18시간 동안 크로마토그피하여 분리하였다. DNA adducts를 종류별로 다시 분리하기 위하여 TLC상에 있는 DNA adducts의 위치를 확인한 후에 오려서 새로운 TLC(10cm×10cm)에서 D3용액(3.6M Lithium Formate, 8.5M Urea, pH 3.5), D4용액(0.8M LiCl, 0.5M Tris-HCl, 8.5M Urea, pH 8.0), D5용액(1.5M 0.65M NaH_2PO_4, pH 6.0) 등의 용매를 사용하고 방향을 바꾸면서 1시간 20 30분 동안 크로마토그래피하였다(Figure 2).

10) DNA adduct 측정방법

TLC상에 분리된 DNA adducts의 위치를 확인하기 위하여 TLC위에 필름을 포개어 -70℃에서 2-3일 동안 감광시키었다. 필름에 나타난 spot를 통하여 TLC상에 위치한 DNA adducts가 확인되면 가위로 오려서 70% 에탄올(5ml)이 들어있는 방사능 계수용기에 넣고 액체 신틸레이션 계수기(liquid scintillation counter)로 CPM(count per minute)를 측정하여

RAL(relative adducts labeling)를 계산하는데 사용하였다.

Figure 2. Chromatography of Secondary procedures for separating each adducts with D3 solvent(3.6M Lithium Formate, 8.5M Urea, pH 3.5), D4 solvent(0.8M LiCl, 0.5M Tris-HCl, 8.5M Urea, pH 8.0) and D5 solvent(1.5M NaH2PO4, Sodium Phosphate Monobasic, pH 6.0).

Table 3. Ion-Exchange mobile phase used in ^{32}P-postlabeling TLC

TLC direction	Composition of mobile phases
D1	0.65M NaH_2PO_4(Sodium Phosphate Monobasic, pH 6.0)
D3	3.6M Lithium Formate, 8.5M Urea, pH3.5
D4	0.8M LiCl, 0.5M Tris-HCl, 8.5M Urea, pH8.0
D5	1.5M NaH_2PO_4(Sodium Phosphate Monobasic, pH 6.0)

Ⅳ. 연구결과

1) 스펙트로포토미터에 의한 총 뉴클레오티드의 CPM추정

(1) 스펙트로포토미터에 의한 DNA농도 측정

DNA농도를 측정하여 총 뉴클레오티드의 CPM를 추정하기 위하여 먼저 스펙트로포토미터로 신뢰도가 높은 DNA농도를 측정해야 한다. Figure 3은 실험동물의 간 세포에서 분리한 DNA를 스펙트로포토미터로 측정한 DNA 농도의 결과이고, Figure 4는 근로자의 뇨에 배출된 요로 상피세포(exfoliated urothelial cells)에서 DNA를 분리하여 스펙트로포토미터로 측정한 DNA 농도의 결과이다.

1 mg/ml DNA를 스펙트로포토미터로 측정하면 260nm의 파장(Abs_{260})에서 흡광도가 20이 되고, 즉 1 mg/ml DNA = 20 Abs_{260}, 또한 본 연구에서는 10㎕ DNA stock용액을 590㎕ 물에 혼합하였기 때문에 DNA농도는 아래 식과 같이 계산하였다. 이 방법에 의하여 계산된 DNA 농도가 높은 신뢰도를 얻기 위해서는 Abs_{230}/Abs_{260}의 비율이 약 0.45이하이고, Abs_{260}/Abs_{280}의 비율이 2.0 이상이어야 한다.

$$[\text{DNA}]\ \text{농도} = \frac{Abs_{260} \times \text{Dilution factor}}{Abs_{260}\ \text{of}\ 1\ \text{mg/ml DNA}}$$

(2) DNA농도에서 총 뉴클레오티드의 CPM 추정

스펙트로포토미터로 측정한 DNA농도를 이용하여 총 뉴클레오티드의 CPM를 추정하여 계산한 결과가 Table 4와 같다. 이를 위하여 필요한 상수들과 계산공식은 다음과 같다(Reddy & Randerath, 1986).

1㎍DNA = 3240 pmol of deoxynucleotide phosphate(dNp)

Specific Activity of [^{32}P] = 3.75(±0.17) $\times 10^6$ CPM/pmol

Specific Activity of [^{32}P]는 다음과 같이 계산할 수 있다.

CPM of [^{32}P] = 3.75(±0.17)$\times 10^6$ CPM/pmol
$\times$3240 pmol dNp/1㎍ DNA
= 12.15(±0.17) $\times 10^9$ CPM/1㎍ DNA

Figure 3. Absorbances of DNA solution isolated from bladder tissue of experimental animals

Figure 4. Absorbances of DNA solution isolated from exfoliated urothelial cells in normal human's urine.

만약 Xμg/μℓ DNA시료에서 4μℓ를 취하여 ^{32}P-postlabeling하였다면, 총 뉴클레오티드를 나타내는 CPM(count per minute)은 다음 공식에 의하여 계산할 수 있다.

총 뉴클레오티드에 의한 [^{32}P]의 추정 CPM
= 12.15(±0.17)×10^9 CPM/1μg DNA × X μg/μℓ DNA × 4μℓ

Table 4. Comparison of parameter between bladder tissue of experimental animal and exfoliated urothelial cells in human's urine

Parameter	Guideline	Bladder Tissue of Experimental Animal	Exfoliated urothelial cells in Human's urine
Abs_{230}	-	0.1017	0.0899
Abs_{260}	-	0.2277	0.0909
Abs_{280}	-	0.1173	0.0614
Abs_{230}/Abs_{260}	below 0.45	0.4466	0.9890
Abs_{260}/Abs_{280}	above 2.0	1.9412	1.4805
DNA Content (mg/ml)	-	0.6831	0.2727
CPM/μℓ of total nucleotides	-	8.3×10^9	3.3×10^9

Abs : Absorbance

2) ^{32}P-postlabeling에 의한 총 뉴클레오티드의 CPM 측정결과

총 뉴클레오티드의 CPM를 측정하기 위하여 먼저 가수분해된 DNA 용액을 염기별로 분리하여 염기의 구성상태를 확인하고, 또한 뉴클레오티드를 총체적으로 분리하여 LSC(liquid scintillation counter)로 CPM를 측정하였다.

Stock 시료에서 4μℓ를 채취한 후에 200μCi [γ-^{32}P]ATP/sample로 ^{32}P-postlabeling하여 TLC상에서 염기별로 분리한 결과가 Figure 5이다. 염기들이 ATP, 구아닌(dG), 아데닌(dA), 시토신(dC), 그리고 티민(dT)과 오르토인산(Pi) 등의 순서로 분리되었다. Figure 6은 8개의 stock 시료에서 2번씩 반복 채취하여 분리한 총 뉴클레오티드의 결과이고, 각 시료의 총 뉴클레오티드의 CPM를 측정한 결과가 Table 5와 같다.

3) [γ-^{32}P]ATP 합성 결과

[$^{32}P_i$]오르토인산염(orthophosphate, 1000μCi/μℓ ^{32}P H_3PO_4, Amersham Pharmacia Biotech)을 효소(RM과 EM)에 의하여 합성된 [γ-^{32}P]ATP를 희석하여(3μℓ용액을 1250μℓ물에 희석) TLC에 전개한 후에 필름으로 감광시키어 현상한 결과가 Figure 7과 같다. 좌측 필름의 밑 부분에 합성된 [γ-^{32}P]ATP가 큰 점(spot)으로 나타났고, 맨 위에 합성되지 않은 ^{32}P-H_3PO_4가 작은 점(spot)으로 나타났다. 우측 필름은 약 1시간 30분 동안 크로마토그래피를 하여 [γ-^{32}P]ATP가 상단까지 전개된 모습을 보여주고 있다. Table 5는 희석용액의 CPM를 LSC(liquid scintillation counter)로 측정하여 합성된 [γ-^{32}P]ATP의 Activity(μCi/μℓ)를 계산한 결과이다(1 μCi = 1.1×10^6 CPM = 2.2×10^6 DPM).

4) DNA adducts의 RAL계산 결과

(1) RAL(relative adducts labelling)의 계산

TLC상에서 4단계의 크로마토그래피에 의하여 분리된 DNA adducts는 필름으로 감광하여 위치를 확인하고, 그 부위를 오려서 LSC(liquid scintillation counter)로 CPM(count per minute)를 측정한 결과를 가지고 계산한 RAL(relative adducts labelling)이 Table 5와 같다.

LSC로 측정된 라벨링된 ^{32}P 방사능의 양은 CPMAA값으로 나타난다. 이것을 이용하여 측정시 사용하였던 부피에 해당되는 CPM으로 환산하여 RAWCPM값을 계산하였다. 만약 4μℓ 채취한 stock 용액이 postlabeling과정에서 최종 부피가 21μℓ되었고, 이중에서 adducts를 측정하기 위하여 TLC에 spotting한 부피가 18μℓ이었다면, 4μℓ stock용액중에서 spot하는데 85.7%(18/21=0.857) 사용한 것이므

Figure 5. Chromatography for each base nucleotide(Thymine, dT; Cytosine,dC; Adenine,dA; Guanine,dG) with 0.15M sodium phosphate buffer(pH 6.0) solvent

Figure 6. Chromatography for total nucleotide(dNp) with 0.5M LiCl solvent

Table 5. Activity of [γ-^{32}P]ATP synthesized from [^{32}P]H_3PO_4 with enzymes

NUM	TIME sec	RAWCPM	AVGCPM	AVGVOL	DPM/μℓ	ADJUSTED DPM/μℓ	ACTIVITY μCi/μℓ
1	0.05	3817140					
1	0.05	3787348					
1	0.05	3806689	3803725				
2	0.05	3959994		3885002			
2	0.05	3964774					
2	0.05	3974068	3966279				
3	0.03	7292392			1489680	6.2E+08	282.8361
3	0.03	7263957					
3	0.03	7292826	7283058				
4	0.03	7282271		7287598			
4	0.03	7300039					
4	0.03	7294106	7292138				

note : Volumes of diluted stock solution ; 1 and 2, 5μℓ; 3 and 4, 10μℓ

로 RAWCPM은 CPMAA/0.857과 같이 계산하였다. LSC에서 사용한 70% 에틸알코올의 CPM값과 실험기간 동안 발생한 ^{32}P의 반감기를 고려하여 보정된 값을 계산하기 위하여 아래 공식에 의하여 ADJCPM를 산출하였다. 또한 TLC의 바탕CPM를 제거하여 순수한 adducts의 CPM을 NETCPM로 계산하였다.

$$ADJCPM = \left(\frac{RAWCPM - 70\%\text{에탄올 CPM}}{\text{반감율}}\right) + 70\%\text{에탄올 CPM}$$

(2) 염료 및 안료 사업장의 DNA adducts 측정결과

벤지딘과 벤지딘-염료를 취급하는 산업장의 근로자에서 채취한 뇨 시료(비관혈적 시료)의 요로상피세포에서 분석한 DNA adducts의 RAL값이 Figure 8과 같다. 발암물질로 형성된 RAL(relative adducts labelling)이 벤지딘를 취급하는 근로자에서는 89.0×10^7이었고, 벤지딘계 염료를 취급하는 근로자에서도 57.0×10^7로 높게 나타났다.

Ⅴ. 고 찰

인체에 폭로된 대부분의 발암물질들은 암을 발생하기 위하여 DNA adducts를 형성하는데, 이 시점에 폭로되는 것을 중지하여 DNA adducts 수준을 낮추면 암이 발생될 확율을 낮게 할 수 있으므로 발암물질에 대한 생체모니터링(biomonitoring)의 생체지표(biomarker)로 DNA adducts를 사용하기 시작하였다(Wogan, 1988). 그러나 DNA adducts를 모니터링할 경우에 대상 표적장기에서 비관혈적(non-invasive) 료를 채취하는 것이 어렵기 때문에 대리조직으로 혈액의 임파구를 이용하는 연구가 많이 수행되었다(Joppich-Kuhn, et al., 1997).

최근에 방광에서 탈락된 상피세포, 즉 요로 상피세포(exfoliated urothelial cells)를 많은 연구에서 사용하고 있다. 이들은 정기적으로 방광에서 탈락되어 뇨와 함께 배설되고 있기 때문에 악성 표현형(phenotype)을 파악하기 위한 세포독성 연구을 위

Table 6. The RAL calculation with CPM of DNA adducts and total nucleotide.

(1) CPM of DNA adducts

(2) CPM of total nucleotide

Figure 7. Chromatography of [γ^{-32}P]ATP synthesized from [^{32}P]H_3PO_4 with enzymes

Figure 8. DNA-adducts levels in exfoliated urothelial cells of workers expoured bebzidine and benzidine-dye. Error bars show standard errors.

하여 오래 전부터 사용되어 왔다(Reali, 1987; Talaska, et al., 1990).

뇨에 배설된 요로상피세포(exfoliated urothelial cells)에서 DNA adducts를 측정할 경우에 나타나는 방해물질은 뇨와 함께 배설된 각종 많은 결정체들이다. 여기에는 요산, 옥살염, 삼인산염 결정체들이 주로 해당되는데, 제거되지 않은 결정체들은 요로상피세포에서 DNA를 분리할 때 방해작용을 할 뿐만 아니라 TLC상에서 크로마토그래피로 adducts를 분리하는 과정에서도 방해작용을 한다(Talaska, et al., 1990). 이런 결정체들은 PBS(phosphate sucrose buffer)에 의하여 약 90% 이상 제거될 수 있다고 보고되었는데(Talaska, et al., 1990), 본 연구에서는 PBS에 의한 2-3회 세척방법, 분리된 DNA를1% SSC-1mM EDTA용액으로 녹인 후에 원심분리에 의하여 결정체를 침전시키는 방법, 그리고 70% 에틸알코올로 여러번 용출하는 방법에 의하여 결정체들을 완전히 제거하였다.

DNA adducts를 RAL로 나타내기 위해서는 DNA 농도를 측정하여야 한다. 뇨에 배설된 요로상피세포는 약 70,000개(범위;16,800 109,200개)이며, 세포 당 약 4 pg DNA가 존재하므로 각 시료에서 약 280ng DNA을 얻을 수 있다(Talaska, et al., 1990). 그러나 실제로 얻는 DNA의 양은 매우 적다. Talaska 등(1990)은 이론치의 약 46%을 얻었다고 보고하였다. 따라서 스펙트로포토미터로 측정한 DNA농도는 신뢰도가 매우 낮기 때문에 본 연구에서는 ^{32}P-postlabeling에 의하여 총 뉴클레오티드의 양을 측정하여 RAL계산에 사용하였다.

분리된 DNA는 [^{32}P]ATP에 의하여 쉽게 ^{32}P-postlabeling되지만 polynucleotide kinase를 사용하면 DNA와 함께 RNA로 라벨링되기 때문에 RNA를 완전히 제거하는 것이 매우 중요하다(Guta & Randerath, 1976; Guta, et al., 1980; Reddy, et al., 1981). 본 실험에서는 0.24mg의 RNase A와 40U의 RNase T_1를 사용하여 RNA를 소화시키어 RNA를 제거하였다(Talaska, et al., 1990).

DNA의 가수분해는 MN SPD(micrococcal nuclease & spleen phosphodiesterase)에 의하여 효과적으로 반응이 일어나며, 이 효소의 농도, pH 그리고 반응시간 등에 의하여 크게 영향을 받는다(Talaska, et al., 1990). 시료에 1.5㎍/㎕ 효소를 혼합하여 pH는 6-7범위로 조정한 후에 37°C에서 3시간 동안 반응시키었을 경우에 가장 효과적으로 가수분해가 되었다. 그러나 DNA adducts를 형성한 발암물질의 종류에 따라 반응시간, pH범위 등의 변수가 약간 차이가 있으므로 주의해야 한다. dibenzo[c,g]carbazol로 형성된 DNA adducts는 37°C에서 4-6시간 반응시키었을 때, benzo[a]pyrene로 형성된 DNA adducts는 pH 7에서 6-9시간 반응시키었을 때, 그리고 4-aminobiphenyl-DNA adducts는 pH 6에서 3시간 반응시키었을 때에 효과적이었다고 보고하였다(Talaska, et al., 1990).

^{32}P를 디옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotides)에 라벨링시키는데 효과적인 효소는 polynucleotide kinase(PNK)이다(Guta & Randerath, 1976; Guta, et al., 1980; Reddy, et al., 1981). Vodick & Hemminki(1991)은 어떤 발암물질에 의하여 형성된 DNA adducts이라도 적당한 반응조건만 만족시켜주면 ^{32}P을 효과적으로 라벨링할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 시료 당 0.28㎕ PNK, PNK buffer 그리고 10mM bicine(pH 9.6)을 혼합고 반응시키어 가수분해로 형성된 3'-phosphodeoxynucleotides를 3',5'-diphosphodeoxynucleotides형태로 라벨링하였다.

라벨링에 사용하는 [^{32}P]ATP는 Johnson & Walseth (1979)가 보고한 반응원리에 의하여 실험실에서 일반적으로 합성하였다. [^{32}P]ATP를 업자로부터 구입할 수 있지만 사용하는 양이 많은 경우에는 [^{32}P]오르토인산염에 비하여 매우 비싸기 때문에(약 20배) 합성하여 사용하는 것이 경제적이다. 이것은 효소반응에 의한 [^{32}P]ATP 합성방법으로서 구입한 [^{32}P]오르토인산이 D-글리셀알데히드-3-인산염과 반응시키어 1,3-디인산글리셀염(diphosphoglycerate)을 생성시키고, phosphogylcerate kinase의 촉매작용에 의하여

생성된 물질과 ADP로 부터 [γ-^{32}P]ATP를 생성시킨다($^{32}P_i$ + ppA → $^{32}p_i$ppA). 이 방법을 사용하면 [^{32}P]ATP를 98%의 효율로 합성할 수 있고, 활성도는 3,000 Ci/mmol를 유지할 수 있다. 때때로 합성과 관련하여 문제점가 발생되는 경우는 업자로 부터 공급된 오르토인산염(ortho phosphate)에 문제가 있는 경우가 대부분이며, 이런 때에는 합성효율이 50%로 될 수도 있다(Talaska, et al., 1992). 이런 문제가 발생하였을 경우에 [^{32}P]ATP과정에서 첨가하게 되는 효소혼합용액(cocktail)의 양을 증가시키고, 반응온도(37℃)을 높이거나 반응시간을 연장하여 실험과정을 약간 변형시킴으로써 합성효율을 증가시키었다. [^{32}P]ATP가 낮은 비율로 합성되었다는 것은 ^{32}P의 활성도가 낮은 것을 의미함으로 이것에 의한 ^{32}P라벨링은 잘 이루어지지 않는다. 특히 carrier free에 의하여 라벨링하는 경우에는 [^{32}P]ATP와 3'-인산디옥시뉴클레오티드(phosphodeoxy nucleotide)의 비율에 의하여 라벨링의 수준이 결정되기 때문에, 결국 [^{32}P]ATP의 합성효율이 라벨링에 크게 영향을 미치게 된다(Johnson & Walseth, 1979; Talaska, et al., 1992).

라벨링된 시료는 크로마토그래피에 의하여 adducts들을 분리한다. ^{32}P-postlabeling방법에서는 플라스틱판 위에 고정상으로 PEI(polyethyleneimine)을 사용한 얇은 박막이온교환 크로마토그래피(TLC, thin-layer ion exchange chromatography)을 가장 많이 사용하는데, 이것은 PEI이 강력한 음이온 교환기의 역할을 하여 다양한 음이온 용매을 이동상으로 사용할 수 있으며 또한 넓은 pH범위(pH 1 pH 9)에서 안정하기 때문이다(Talaska, et al., 1992).

크로마토그래피는 크게 두 단계로 구분할 수 있는데, 먼저 정상 뉴클레오티드로 부터 DNA adducts들을 분리하고, 다음에는 크로마토그래피에 의하여 adducts를 종류별로 분리하였다. 라벨링한 시료를 spota한 TLC의 상단에 거름종이를 부착한 상태에서 D1용매로 18시간 동안 크로마토그래피를 실시하여 정상 뉴클레오티드를 거름종이로 이동시켜 adducts를 분리한 후에 다른 TLC에서 용매와 크로마토그래피의 방향을 바꾸면서 adducts를 분리하기 때문에 동시에 많은 시료(약 8개)를 대상으로 실험할 수 있고, 또한 각종 종류의 adducts들을 높은 감도로 분리할 수 있었다.

본 연구에서는 이런 실험과정에 의하여 염료와 안료 사업장에 종사하고 있는 근로자들의 요로상피세포에서 벤지딘으로 형성된 DNA adducts를 분리하였다. 벤지딘은 폭로된 근로자들에게서 방광암이 높은 비율로 발생된다는 많은 연구결과가 보고되었다(NIOSH, 1980; Martin, et al., 1982; 1983; Kadlubar, et al., 1986). 체내에 흡수된 벤지딘은 간장에서 아세틸화된 후에 방광세포의 DNA와 결합하여 N-(Deoxyguanosin-8-yl)-N'-ABZ형태의 adducts를 형성한다(Martin, et al., 1982). 또한 벤지딘계 염료도 근로자에게 폭로되어 흡수되면 체내에서 분해되어 벤지딘이 유리되기 때문에 벤지딘과 같은 adducts를 형성하게 된다(NIOSH, 1980). 본 연구에서도 벤지딘계 염료에 폭로된 근로자들에게서 adducts가 높은 수준으로 측정되었다.

VI. 결 론

발암물질의 폭로에 의하여 형성되는 DNA adducts를 생체지표(biomarker)로 사용하여 생체 모니터링하기 위해서는 표적장기인 폐와 방광과 같은 내부 장기로부터 비관혈적 시료(non- invasive sample)를 채취하여 분석할 수 있는 방법을 개발하는 것이 매우 중요하다.

본 연구에서는 방광의 비관혈적 시료로 요로상피세포(exfoliated urothelial cells)를 선택하여 DNA adducts를 측정하는 방법을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

DNA adducts를 분석하기에 충분한 요로상피세포를 얻기 위해서는 근로자들로부터 많은 양의 뇨(약 300ml 이상)를 채취해야 하지만, 스펙트로포토미터로 측정할 수 있을 만큼 충분한 DNA 농도를 얻을 수

없으므로 총 뉴클레오티드의 양은

Covalent binding of Benzidine and N-Acetylbenzidine to DNA at the C-8 atom of deoxyguanosine in vivo and in vitro. Cancer Research 1982:42 ; 2678-2696

Martin CN, Beland FA, Kennelly JC, Kadlubar FF. Binding of benzidine, N-acetylbenzidine, N,N'-diacetylbenzidine and Direct blue 6 to rat liver DNA. Environmental Health Perspectives 1983:49;101-106

Muller R, Rajewsky MF. Immunological qualification by high-affinity antibodies of O^6-ethyldeoxyguanosine in DNA exposed to N-ethyl-N-nitrosourea. Cancer Res 1980:40;887

NCI. National Cancer Institute Annual Report, NCI; 1994-1996

Poirier MC, Yuspa SH, Weinstein IB, Blobstein S. Detection of carcinogen-DNA adducts by radioimmunoassay. Nature 1977:270:186

Rahn RO, Chang SS, Holland JM, Shugart LR. A fluorometric-HPLC assay for quantitating the binding of benzo[a]pyrene metabolites to DNA. Biochem Biophys Res Commun 1982;109:262

Reali D, DiMarino F, Bahramandpour S, Carducci A, Barale R, Loprieno N. Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. Mutat Res 1987;192:145-149

Reddy MV, Gupta RC, Randerath K. Anal. Biochem 1981;117-271

Reddy MV and Randerath K. Nuclease P_1-mediated enhancement of sensitivity of ^{32}P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 1986;7(9):1543-1551

Santella RM, Hsieh LL, Lin CD, Weinstein IB. Quantification of exposure to benzo[a]pyrene with monoclonal antobodies. Envoron Health Perspect 1985;62:95

Siverberg E and Lubera J. Cancer statistics 1987 Ca-AJ, Clinicians, 37, 1987. p.2-19

Talaska G, Dooley KL, Kadlubar FF. Detection and characterization of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-amino-biphenyl-treated dogs by ^{32}P-postlabelling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography. Carcinogenesis 1990 11(4):639-646

Talaska G, Roh. JH, Getek, T. ^{32}P-postlabeling and mass spectrometric methods for analysis of bulky, polyaromatic carcinogen-DNA adducts in humans. J of Chromatography 1992;580:293-323

Vahakangas K, Haugen A, Harris CC. An applied synchronous fluorescence spectrophotometric assay to study benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts. Carcinogenesis 1985 6:1109

Vodick P and Hemminki K. Chem.-Biol. Interactions 1991;77:39

Wogan GN. Detection of DNA damage in studies on cancer etiology and prevention, In:Bartsch H, Hemminki K, O'Neill IK, editors. DNA Damaging Agents in Humans Methods of Detection, International Agency for Research on Cancer. Lyon, France. 1988. p.32-51