

Stem cell과 Myeloperoxidase가 스티렌, 하이드로퀴논 및 트리클로로에틸렌에 의한 림프구의 자매염색분체 교환과 소핵체 유도에 미치는 영향

순천향대학교 의과대학 예방의학교실, 가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실¹⁾, 미생물학교실²⁾

이경재 · 김형아¹⁾ · 신민정¹⁾ · 성재혁¹⁾ · 박정일¹⁾ · 한 훈²⁾ · 이세훈¹⁾

— Abstract —

Effects of Stem Cell and Myeloperoxidase on Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei Induction of Peripheral Lymphocytes by Styrene, Hydroquinone and Trichloroethylene

Kyung-Jae Lee, Hyoung-Ah Kim¹⁾, Minjung Shin¹⁾, Jae Hyug Sung¹⁾,
Chung Yill Park¹⁾, Hoon Han²⁾, Se-Hoon Lee¹⁾

Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Soonchunhyang University,
Department of Preventive Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea¹⁾
Department of Microbiology, College of Medicine, The Catholic University of Korea²⁾

Objectives : The objective of this study was to identify the possible role of stem cell and myeloperoxidase (MPO) in the metabolic activation of styrene, hydroquinone and trichloroethylene, by investigating the effects of stem cell from umbilical cord blood and MPO on the frequency of sister chromatid exchange (SCE) and micronuclei (MN) induction in cultured human peripheral lymphocytes exposed to these chemicals.

Methods : Isolated lymphocytes from whole blood were cultured for 72 hours. The cells were treated with 1.50 mM styrene, 50 μ M hydroquinone and 1.50 mM trichloroethylene dissolved with acetone (30 μ l in total volume) at 24 hours after the beginning of culture. Control group was treated with acetone only. Immediately after adding these chemicals, 1.3×10^6 cells/ml and 2.6×10^6 cells/ml stem cell or 1.0 and 2.0 unit MPO with H₂O₂ (for substrate) were added to the cultures. Slides were stained with Giemsa's solution, and acridine orange for sister chromatid exchange, and for micronucleus analysis, respectively.

Results : The results were as follows: 1) Myeloperoxidase and stem cell did not significantly affect the frequencies of SCE or MN in the control group. 2) The frequency of SCE or MN with exposure to styrene did not differ from control in the absence of stem cell or MPO. Sister chromatid exchange induced by styrene was significantly increased by adding stem cell or MPO in dose-dependent relationship. The frequency of MN induced by styrene significantly increased in the presence of 2.0 unit MPO. 3) The frequency of SCE was significantly increased with exposure to hydroquinone than acetone treated control in the absence of stem cell or MPO. Sister chromatid exchange induction by hydroquinone significantly increased dose-dependently in the presence of stem cell or MPO. There was a tendency of increase of the MN frequency induced by hydroquinone in the presence of stem cell or MPO, but not significant. 4) It was found that trichloroethylene itself did not increase SCE or MN frequency. Frequency of SCE induced by trichloroethylene was significantly increased with adding stem cell (low and high) and 2.0 unit MPO. Even though stem cell or MPO increased the frequency of MN of lymphocyte exposed to trichloroethylene, the difference was not significant.

Conclusions : Authors found that the frequencies of both sister chromatid exchange and micronucleus induced by styrene, hydroquinone, and trichloroethylene were increased significantly with the treatment of stem cell or myeloperoxidase. It was suggested that myeloperoxidase may therefore play an important role in the metabolic activation of styrene, hydroquinone, and trichloroethylene and myeloperoxidase probably be involved in the myelotoxicity of these chemicals.

Key Words : Styrene, Hydroquinone, Trichloroethylene, Sister chromatid exchange, Micronucleus, Myeloperoxidase, Stem cell

〈접수일 : 2001년 6월 5일, 채택일 : 2001년 9월 11일〉

교신저자 : 이 세 훈(Tel : 02-590-1236) E-mail : ashlee@cmc.cuk.ac.kr

* 본 연구는 한국학술진흥재단 기초의학 연구(1998-021-F00228) 지원을 받아 이루어졌음.

서 론

스티렌(Styrene; CAS No. 100-42-5)은 산업장에서 옥조를 비롯한 가정용품, 운수기구, 선박, 건설 등에 널리 사용되고 있는 물질이다. 스티렌은 외부에서 대사촉진제를 추가하지 않고 전혈 배양시킨 사람의 림프구에서 염색체 변이(chromosomal aberration: CA), 자매염색분체 교환(sister chromatid exchange: SCE), 소핵체(micronuclei: MN)를 유도하는 것으로 밝혀졌으며(Lee & Norppa, 1995), 직업성 노출 근로자의 말초 림프구에는 대조군에 비해 SCE와 CA가 많다(Karakaya et al, 1997). 또한 최근 연구에 의하면 조혈계와 림프계 악성종양과의 연관성이 제기되고 있다(Matanoski et al, 1997).

하이드로퀴논(hydroquinone; CAS No. 123-31-9)은 산업장에서 사진의 현상제 및 환원제, 항산화물질로 사용된다(ACGIH, 1991). 벤젠의 대사산물 중 하나이며 벤젠에 노출된 근로자 림프구의 변이 원성에 관여되는 중요한 물질로(Vian et al, 1995), 마우스를 이용한 생체내 실험에서도 하이드로퀴논에 의해 골수에서 MN이 증가한다고 보고된 바 있다(Adler et al, 1991).

트리클로로에틸렌(trichloroethylene, TCE; CAS No. 79-01-6)은 금속세척과 섬유 화학 공장 등에서 널리 사용되고 있는 할로겐화 화합물로 설치류를 이용한 장기간의 발암성 연구에서 얻어진 증거를 바탕으로 사람에서의 TCE 노출에 관심이 증가되고 있고 백혈병, 림프종, 요도계암 등을 일으킨다고 보고된 바 있지만 아직도 논란의 여지가 있다(Anttila et al, 1995; Blair et al, 1998).

이처럼 이들 물질들은 사람과 설치류에서 조혈계와 림프계 악성종양을 일으킬 수 있다고 의심되는 물질들이다. 골수독성과 조혈계와 림프계 악성종양 간의 밀접한 연관성 때문에 골수독성에 관여하는 대사산물들이 이러한 암발생에도 관여하리라 생각된다(Medinsky et al, 1994).

스티렌, TCE 자체는 독성 물질이 아니고 대사작용을 통해 독작용이 있는 대사산물로 활성화된다고 본다(Lee & Norppa, 1995; Motohashi et al, 1999). 이들 물질에 대한 이전의 연구는 대부분 간

에서의 대사에 집중되어 왔는데, 이 물질들의 대사 과정에는 모두 cytochrome P450이 관여하여 반응성 물질로 산화될 수 있다고 알려져 있다(Kenyon et al, 1996).

골수, 말초혈액 그리고 제대혈액은 실질적인 stem cell을 포함하는 CD34+ 세포를 함유하고 있으며(Strogl et al, 1993), CD34+ 세포는 미성숙 아세포 모양, 림프구와 과립구 보다 다소 큰 모양을 가진 골수세포의 0.5 % 내지 2 % 정도 차지하고 있다(Civin et al, 1984). 특히 myeloperoxidase (MPO; EC 1.11.1.7)는 다량의 과립백혈구가 존재하는 곳인 골수와 제대혈액에 풍부하다고 알려져 있다(Smith et al, 1989).

포유동물의 MPO는 chloroperoxidase와 유사한 분해작용을 가지며 부타디엔의 에폭시화에 관여한다고 알려져 있다(Duescher & Elfarrar, 1992). 더욱이 벤젠의 대사과정 중에 하이드로퀴논과 관련해서 MPO가 관여하리라는 가능성이 보고된 바 있어(Medinsky et al, 1994; Smith, 1996) 조혈계와 림프계 악성종양을 일으키는 이들 물질에 대한 MPO의 관여를 시사하고 있다. 그러나 아직까지 스티렌과 TCE의 대사에 MPO가 관여하는 지에 관해서는 연구된 바가 거의 없는 실정이며, MPO가 많이 들어있는 사람의 제대혈액 stem cell이 하이드로퀴논, 스티렌 그리고 TCE의 대사에 관여하는 지에 대한 연구는 전무한 실정이다.

세포유전학적 방법은 변이원성 혹은 발암성 물질에 노출되는 집단에 대한 변이원성 비교에 이용되어 왔다. 그 중에서 SCE는 염색체내에서 같은 구조를 가진 염색분체들의 교환에 의한 염색체 손상을 나타내는 민감한 지표로 변이원성이나 발암성이 의심되는 물질에 대한 선별검사로서 사용될 수 있다. MN 검사법은 감수분열 단계에서 핵으로부터 떨어져 나온 염색체 또는 조각을 관찰하는 방법이며 암 발생을 예측할 수 있는 변이원성을 확인하는 표지검사(marker test)로서 발암성 물질 노출을 빠르고 민감하게 정량적으로 볼 수 있는 지표이다(MacGregor et al, 1994).

본 연구의 목적은 조혈계와 림프계 악성종양을 일으킨다고 의심되는 물질인 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE가 MPO가 풍부한 stem cell과 사람의 MPO 효소에 의해 대사성 활성화되는 지를 알아보고자 세포유전학적 방법을 이용하여 하이드로퀴논, 스티렌 및

TCE에 stem cell이나 사람의 MPO가 SCE와 MN 빈도에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 재료

1) 림프구

해파린이 처리된 정맥혈(20대 비흡연 남자)을 혈액원으로부터 제공받아 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Sweden)로 림프구를 분리하여 실험에 사용하였다. 림프구를 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하고, trypan blue(Sigma, U.S.A.) 염색으로 현미경 하에서 그 수를 관찰하였다. SCE와 소핵 빈도 실험을 위해 사용한 배양액 중 림프구 수는 문헌고찰(Norppa et al, 1985; Vian et al, 1995)과 예비실험을 통해 1.3×10^6 cells/ml로 정하여 배양액에 주입하였다.

2) stem cell

stem cell은 가톨릭대학교 제대혈세포은행에서 제공받았다. 제공받은 stem cell을 Ficoll-Hypaque (Bionetics, U.S.A.)로 원심분리하여, PBS와 항생제가 포함된 RPMI media에 각각 1회씩 세척하였다. hemacytometer를 이용하여 stem cell수를 측정 한 후 냉동(-20℃)과 상온에서 해동을 반복하여 stem cell을 파괴시켜 세포액을 유출시킨 후 원심분리하고 상층액을 취하여 배양액에 주입하였다. stem cell의 농도는 예비실험을 거쳐 배양 림프구수의 1, 2배수로서 1.3×10^6 cells/ml과 2.6×10^6 cells/ml(최종 배양액중 농도)로 정하였다.

3) 화학물질 농도설정

예비실험을 통하여 하이드로퀴논(純正化學, 일본)은 0.05 mM, 스티렌(純正化學, 일본)과 TCE(純正化學, 일본)는 1.50 mM로 농도를 결정하였고 총량 주입량이 30 μ l가 되도록 아세톤으로 희석하여 배양액에 첨가하였다. 대조군에는 아세톤 30 μ l를 첨가하였다.

2. 방법

1) SCE 빈도

SCE 빈도 실험을 위한 배양은 Norppa 등의 방법(1985)에 따라 멸균 조작 하에 두 개의 바이얼에

이중으로 배양하였다. 배양액은 15 %의 fetal bovine serum(Gibco, U.S.A.), 1 %의 L-glutamin (Gibco, U.S.A.), 1 %의 phytohaemagglutinin(Gibco, U.S.A.), 1 %의 5-bromo-2-deoxyuridine (Sigma, U.S.A.)과 82 %의 RPMI 1640 medium(Gibco, U.S.A.)으로 구성되었다. 각각의 바이얼에 배양액을 6 ml씩 주입한 후, 최종 배양액중 림프구 농도가 1.3×10^6 cells/ml 이 되도록 0.3 ml를 첨가하여 이를 37℃ 5 % CO₂ 하에서 72시간 동안 배양하였다.

배양 개시 24시간 후 준비한 화학물질과 stem cell 상층액 또는 MPO를 첨가하였다.

배양 종료 2.5시간 전에 colchicine(Sigma, U.S.A.) 0.1 μ g/ml을 가하고, 배양 시작 72시간 후 림프구를 원심분리하여 0.6 %의 KCl 용액을 4 ml씩 주입하였다. 37℃ 5 % CO₂ 하에서 약 10분간 배양을 시킨 후 메탄올:아세트산(3:1) 혼합액으로 3회 이상 고정시키고 영하 20℃에서 1시간 이상 보관하였다. 고정액을 원심분리한 후 상층액을 버리고 남은 림프구를 슬라이드에 떨어뜨려 공기 중에서 24시간 이상 건조시킨 후 Perry와 Wolff(1974)의 fluorescence-plus-Giemsa 염색법을 변형시킨 Husgafvel-Pursiainen 등(1980)의 방법으로 염색하여 SCE 빈도를 관찰하였다. 슬라이드 분석시 재코드화하여 한 사람이 맹검(blind)으로 시행하되 한 배양당 46개의 염색체가 있는 25개의 metaphase를 분석했기 때문에 매 처리당 50개의 세포에서 SCE를 분석하였다.

세포독성 정도를 나타내는 세포분열지수(replication index; RI)는 매 군당 100개의 세포분열 제 1기, 2기, 3기 metaphase를 분석하여 그 백분율로 표시하되 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$RI_s = \frac{1 \times G_1 + 2 \times G_2 + 3 \times G_3}{100}$$

단, RI_s = 세포분열지수(Replication index)

G_1 =제 1기 metaphase, G_2 =제 2기 metaphase,

G_3 =제 3기 metaphase

2) MN 빈도

림프구 배양은 Luomahaara와 Norppa의 방법(1994)의 멸균조작법으로 이중으로 배양하였다. 배양액은 15 %의 fetal calf serum (Gibco, U.S.A.), 1 %의 L-glutamin (Gibco, U.S.A.), 1 %의

phytohaemagglutinin (Gibco, U.S.A.)과 83 %의 RPMI 1640 medium (Gibco, U.S.A.)으로 구성되어 있으며 각 바이알에 6 ml씩 주입하였고 분리된 림프구(0.3 ml)를 첨가하였다. 37°C의 5 % CO₂ 하에서 배양하여 24시간이 경과한 후 준비한 화학물질과 stem cell의 상층액 또는 MPO를 H₂O₂와 함께 0.5 ml를 첨가하였다.

배양한 지 44시간이 경과한 후 6 µg/ml의 cytochalasin-B(Sigma, U.S.A.)를 각 바이알에 주입하였다. 배양 72시간 후 림프구를 원심분리하여 수확하고 RPMI:증류수(1:1)로 만든 hypotonic solution을 각각 4 ml씩 주입하였다. 약 4분정도 배양한 후 아세톤:메탄올 혼합액(3:1)으로 3회 이상 고정시키고 마지막에는 5 %의 아세톤-메탄올로 고정시켰다. 이 고정액을 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 림프구를 슬라이드에 떨어 뜨려 공기중에서 말렸다. 슬라이드를 염색하기 전까지 순수 메탄올에 담아 -20°C 냉동고에 보관하였으며(Norppa et al, 1994), acridine orange로 염색(Hayashi et al, 1983)을 하여 형광현미경 600배율로 MN을 분석하였다.

MN 분석은 슬라이드를 다시 코딩하여 한 사람이 맹검으로 시행하되 한 슬라이드당 간기(interphase)세포 중 500개의 이핵체를 세어 MN을 분석하여 매 처리당 1,000개의 이핵체를 분석하였다. 세포독성의 정도를 보여주는 세포분열지수(replication index : RI)는 매 군당 1000개의 1, 2, 3, 4기의 간기를 분석하여 그 백분율로 표시하고 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$RI_M = \frac{1 \times G_1 + 2 \times G_2 + 3 \times G_3 + 4 \times G_4}{100}$$

단, RI_M = 세포분열지수(Replication index)

G1=제 1기 interphase, G2=제 2기 interphase,

G3=제 3기 interphase, G4=제 4기 interphase

3. 통계 분석

SCE의 빈도와 MN 빈도의 분석은 윈도우용 SAS 6.12(Statistical Analysis System version 6.12, 1994)를 사용하여 통계처리하였다. SCE 빈도 분석을 위해 각 물질 농도별 SCE 빈도의 차이, 대조군과 각 농도간의 SCE 빈도의 차이를 보고자 t-test를 이용하였으며, 각 물질별 농도간 SCE 빈도 차이를 보고자 분산분석(ANOVA)과 Duncan's 다중비교분

석(Duncan's multiple-range test) 및 Repeated measured ANOVA를 실시하였다. MN 분석을 위해 카이제곱검정(χ^2 -test)을 실시하였다

결 과

1. stem cell이 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE에 의한 SCE와 MN 빈도에 미치는 영향(표1)

1) 대조군

화학물질대신 희석제인 아세톤 만을 첨가한 대조군의 평균 SCE 빈도는 7.00 ± 2.18 개였으며, stem cell을 첨가함에 따라 SCE 빈도는 1.3×10^6 cells/ml과 2.6×10^6 cells/ml에서 각각 7.54 ± 2.49 개와 7.68 ± 2.39 개로 증가하였지만, 통계적으로 유의하지 않았다. RI_S 는 0.0, 1.3×10^6 , 및 2.6×10^6 cells/ml에서 각각 1.71, 1.76, 1.59였다. MN은 stem cell의 농도가 0.0, 1.3×10^6 , 및 2.6×10^6 cells/ml일 때 각각 7, 7, 9개였으나, 통계적으로 유의하지 않았다. RI_M 는 0.0, 1.3×10^6 과 2.6×10^6 cells/ml에서 각각 1.74, 1.76, 1.68이었다.

2) 스티렌에 의한 SCE와 MN의 빈도 변화

배양액에 스티렌과 함께 stem cell을 각각 1.3×10^6 과 2.6×10^6 cells/ml씩 첨가하였을 때의 SCE와 MN 빈도 변화는, stem cell을 첨가하지 않았을 때 평균 SCE 빈도가 7.79 ± 2.31 개로 대조군에 비해 유의한 차가 없었다. 배양액에 스티렌과 함께 첨가한 stem cell의 농도가 증가함에 따라 점차 SCE 빈도는 용량-반응관계로 증가하여 stem cell 1.3×10^6 과 2.6×10^6 cells/ml를 첨가하였을 때 평균 SCE 빈도가 각각 9.01 ± 2.15 개와 9.05 ± 1.72 개로 효소를 첨가하지 않았을 때에 비하여 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). 이 때의 RI_S 는 0.0, 1.3×10^6 , 및 2.6×10^6 cells/ml에서 각각 1.88, 1.51, 1.73이었다.

스티렌 노출시 MN 빈도는 stem cell을 첨가하지 않았을 때 8개였으며, 1.3×10^6 과 2.6×10^6 cells/ml인 경우 10, 12개로 유의한 차이는 없었다. RI_M 는 0.0, 1.3×10^6 , 및 2.6×10^6 cells/ml에서 각각 1.63, 1.72, 1.61이었다.

3) 하이드로퀴논에 의한 SCE와 MN의 빈도 변화

배양액에 하이드로퀴논과 함께 stem cell을 각각

Table 1. Mean frequency of sister chromatid exchange and frequency of micronucleus in cultured(72h)human lymphocytes after a 48h treatment with 1.50 mM styrene, 0.05 mM hydroquinone, and 1.50 mM trichloroethylene in the presence or absence of stem cell

Chemical	Stem cell (cells/ml)	SCE [†] /cell		Micronucleus [‡] /1000cells	
		Mean±SD	RI _S [§]	%	RI _M
Control	0.0	7.00±2.18	1.71	7	1.74
	1.3×10 ⁶	7.54±2.49	1.76	7	1.76
	2.6×10 ⁶	7.68±2.39	1.59	9	1.68
Styrene	0.0	7.79±2.31	1.88	8	1.63
	1.3×10 ⁶	9.01±2.15*	1.51	10	1.72
	2.6×10 ⁶	9.05±1.72*	1.73	12	1.61
Hydroquinone	0.0	8.84±2.05 [‡]	1.48	9	1.62
	1.3×10 ⁶	10.56±3.76*	1.65	11	1.56
	2.6×10 ⁶	10.99±3.82*	1.73	12	1.53
Trichloroethylene	0.0	7.05±1.96	1.80	7	1.70
	1.3×10 ⁶	8.65±2.20**	1.73	9	1.68
	2.6×10 ⁶	8.83±3.09**	1.78	10	1.64

[†]: Mean number of sister chromatid exchange observed in metaphase cells. The frequencies of SCE was counted from 50 cells per treatment (25 cells from two duplicate cultures)

[‡]: Total number of micronuclei (MN) observed in binucleate cells. The frequency of MN was counted from 1000 binucleate cells per treatment (%)

[§]: Replication index in sister chromatid exchange

^{||}: Replication index in micronuclei

*: P<0.05 compared with 0.0 cells/ml stem cell

**: P<0.001 compared with 0.0 cells/ml stem cell

[‡]: P<0.001 compared with corresponding control

1.3×10⁶과 2.6×10⁶ cells/ml씩 첨가하였을 때의 SCE와 MN 빈도 변화는, 하이드로퀴논 첨가시 평균 SCE 빈도는 stem cell이 없을 때 8.84±2.05개로 대조군에 비해 증가하였고(P<0.001), stem cell 첨가 농도에 따라 SCE 빈도가 용량-반응관계로 유의하게 증가하여 1.3×10⁶과 2.6×10⁶ cells/ml에서 각각 10.56±3.76, 10.99±3.82로 유의하게 증가하였다(P<0.05). RI_S는 stem cell의 농도가 0.0, 1.3×10⁶, 및 2.6×10⁶ cells/ml일 때 각각 1.48, 1.65, 1.73이었다.

MN 빈도는 stem cell의 농도 0.0, 1.3×10⁶, 및 2.6×10⁶ cells/ml에서 각각 9, 11, 12개였으나, 유의한 차이는 없었다. RI_M는 0.0, 1.3×10⁶, 및 2.6×10⁶ cells/ml에서 각각 1.62, 1.56, 1.53으로 농도 증가에 따라 감소하였다.

10⁶과 2.6×10⁶ cells/ml씩 첨가하였을 때의 SCE 빈도 변화는, TCE 노출시 stem cell을 첨가하지 않은 경우에 평균SCE 빈도가 7.05±1.96개로 대조군과 유의한 차이가 없었다. stem cell을 1.3×10⁶과 2.6×10⁶ cells/ml을 첨가했을 때 SCE 빈도는 각각 8.65±2.20개와 8.83±3.09개로 stem cell을 첨가하지 않은 때에 비하여 유의하게 증가하였다(P<0.001). 이때 RI_S는 0.0, 1.3×10⁶, 및 2.6×10⁶ cells/ml에서 각각 1.80, 1.73, 1.78이었다.

MN 빈도는 stem cell의 농도가 0.0, 1.3×10⁶, 및 2.6×10⁶ cells/ml일 때 각각 7, 9, 10개였으나, 유의한 차이는 없었다. RI_M는 0.0, 1.3×10⁶과 2.6×10⁶ cells/ml에서 각각 1.70, 1.68, 1.64로 농도 증가에 따라 감소하였다.

4) 트리클로로에틸렌에 의한 SCE와 MN의 빈도 변화 배양액에 TCE과 함께 stem cell을 각각 1.3×

Table 2. Mean frequency of sister chromatid exchange (SCE) and frequency of micronucleus in cultured (72h) human lymphocytes after a 48h treatment with 1.50 mM styrene, 0.05 mM hydroquinone, and 1.50 mM trichloroethylene in the presence or absence of myeloperoxidase

	Myeloperoxidase (unit)	SCE [†] /cell		Micronucleus [†] /1000cells	
		Mean±SD	RI _S [§]	%	RI _M
Control	0.0	8.52±2.92	2.23	8	1.83
	1.0	9.04±3.60	2.19	9	1.72
	2.0	9.08±2.92	2.08	10	1.73
Styrene	0.0	9.62±3.45	2.08	11	1.50
	1.0	11.66±2.95**	1.96	18	1.67
	2.0	12.18±3.49**	1.82	23*	1.76
Hydroquinone	0.0	14.90±5.17 [‡]	1.55	10	1.77
	1.0	15.40±4.61	1.49	12	1.51
	2.0	16.60±3.78**. ^a	N/A ^b	13	1.47
Trichloroethylene	0.0	9.04±3.69	2.01	11	1.79
	1.0	9.56±3.27	2.05	12	1.66
	2.0	12.04±3.75**	1.96	17	1.62

[†], [‡]: See Table 1 for sister chromatid exchange and micronucleus analysis, and for replication index (§, ||)

*: P<0.05 compared with 0.0 unit myeloperoxidase

** : P<0.001 compared with 0.0 unit myeloperoxidase

[‡]: P<0.001 compared with corresponding control

^a: Only 5 cells were scored due to toxicity

^b: RI_S was unscorable because of the cytotoxicity

2. myeloperoxidase가 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE에 의한 SCE와 MN 빈도에 미치는 영향(표 2)

1) 대조군

대조군의 평균 SCE 빈도는 8.52±2.92개였으며, MPO를 첨가함에 따라 SCE 빈도는 1.0, 2.0 unit에서 각각 9.04±3.60개와 9.08±2.92개로 증가하였지만, 통계적으로 유의하지 않았다. RI_S는 0.0, 1.0, 및 2.0 unit에서 각각 2.23, 2.19, 2.08이었다. MN은 MPO의 농도가 0.0, 1.0, 및 2.0 unit일 때 각각 8, 9, 10개로, 유의한 차이가 없었다. RI_M는 0.0, 1.0과 2.0 unit에서 각각 1.83, 1.72, 1.73이었다.

2) 스티렌에 의한 SCE와 MN의 빈도 변화

배양액에 스티렌과 함께 MPO를 각각 1.0, 2.0 unit씩 첨가하였을 때의 SCE 빈도와 MN 빈도 변화는, 스티렌 노출시 MPO를 첨가하지 않았을 때 평균 SCE 빈도가 9.62±3.45개로 대조군에 비해 유의한 차이가 없었다. 배양액에 스티렌과 함께 첨가한

효소 농도가 증가함에 따라 점차 SCE 빈도는 증가하여 MPO 1.0, 2.0 unit를 첨가하였을 때 평균 SCE 빈도가 각각 11.66±2.95개와 12.18±3.49개로 효소를 첨가하지 않았을 때에 비하여 유의하게 증가하였다(P<0.001). 이 때의 RI_S는 2.08에서 1.82 범위였으며 효소를 첨가함에 따라 감소하였다.

스티렌 노출시 MN 빈도는 MPO를 첨가하지 않았을 때 11개로 대조군과 유의한 차이는 없었으나 MPO를 2.0 unit 첨가하였을 때 MN 빈도가 23개로 효소를 첨가하지 않았을 때에 비해 유의하게 증가하였으며(P<0.05), RI_M는 1.50에서 1.76 범위였다.

3) 하이드로퀴논에 의한 SCE와 MN의 빈도 변화

배양액에 하이드로퀴논과 함께 MPO를 각각 1.0, 2.0 unit씩 첨가하였을 때의 SCE 빈도와 MN 빈도 변화는, 하이드로퀴논을 첨가시 평균 SCE 빈도는 MPO를 첨가하지 않았을 때 14.90±5.17개로 대조군에 비해 유의하게 증가하였고(P<0.001), 효소 첨가 농도에 따라 SCE 빈도가 유의하게 증가하여 효소를 2.0 unit 첨가한 경우에는 세포 독성(cytotox-

ic) 양상까지 보였다($P < 0.001$). RI_S 도 효소를 첨가하지 않았을 때 1.55로 낮았으며 효소 첨가에 따라 감소하였다.

하이드로퀴논 첨가시 MN 빈도는 효소를 첨가하지 않았을 때 10개로 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. 또한 효소 첨가에 따른 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 다른 물질 노출시 MN 빈도를 관찰할 때와는 달리 배양액에 하이드로퀴논과 함께 MPO를 첨가하였을 때 현미경 관찰에서 보이는 세포 상태가 좋지 않았다. 이는 SCE 빈도 관찰에서 같은 농도의 하이드로퀴논과 함께 효소 2.0 unit를 첨가하였을 때 세포독성 양상을 보인 점을 감안하면, 이와 무관하지 않다고 생각된다. 이 때의 RI_S 는 MPO를 첨가하지 않았을 때 1.77이었으며, MPO를 첨가함에 따라 감소하여 효소를 2.0 unit 첨가하였을 때는 RI_M 가 1.47로 낮아졌다.

4) TCE에 의한 SCE와 MN의 빈도 변화

배양액에 TCE과 함께 MPO를 각각 1.0, 2.0 unit씩 첨가하였을 때의 SCE 빈도와 MN 빈도는, TCE 노출시 MPO를 첨가하지 않은 경우에 평균 SCE 빈도가 9.04 ± 3.69 개로 대조군과 유의한 차이가 없었다. 효소를 2.0 unit 첨가하였을 때 12.04 ± 3.75 개로 MPO를 첨가하지 않았을 때에 비하여 유의하게 증가하였다($P < 0.001$). 이 때 RI_S 는 2.05에서 1.96 범위를 보였다.

MN 빈도 변화를 보면, MPO를 첨가하지 않았을 때 MN 빈도가 11개로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았고 효소 첨가에 따른 유의한 차이도 없었다. 이 때의 RI_M 는 1.79에서 1.62 범위로 MPO를 첨가하지 않았을 때 RI_M 가 1.79이었으며 효소를 첨가함에 따라 감소하였다.

고 찰

본 연구는 산업장에서 흔히 사용되고 있고 조혈계와 림프계 악성종양과의 연관성이 제기되고 있는 스티렌, 하이드로퀴논, TCE에서의 대사성 활성화에 MPO가 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 이를 위해 세포유전학적 방법을 이용하여 사람의 stem cell과 추출된 사람의 MPO 효소가 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE에 의한 사람의 말초혈액 림프구에서

SCE와 MN 빈도에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보고자 연구를 수행하였다.

체대혈액에서 얻은 조혈모세포는 골수 조혈모세포보다 훨씬 더 원시적(primitive)이라는 특성을 가지고 있다. 평균적으로 체대혈액에는 $CD34^+$ 인 세포가 $14.8 \times 10^4/ml$ 정도로 존재하며 체대혈액은 림프구골수계 조혈모세포(lymphohematopoietic stem cell)에서 발현되는 $CD34^+$ 세포수가 1-2 % 정도 들어있고 골수의 1-2 %, 말초혈액내에는 0.1 % 미만으로 말초혈액보다 많이 들어있다(Serke et al, 1991).

문헌 조사와 예비실험을 통하여 림프구 수, 각각의 화학물질, 및 stem cell과 MPO 농도를 결정하여 실험한 결과, 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE 노출시 stem cell과 MPO를 첨가함에 따라 SCE 빈도가 용량-반응 관계로 유의하게 증가하였다. MN 빈도는 각 화학물질에서 첨가되는 효소의 농도에 따라 증가하는 경향이 있었으나 MPO를 첨가하였을 때 대조군에 비해 유의한 차이는 없었다. 다만 스티렌 노출시 효소를 2.0 unit 첨가하였을 때 MN 빈도가 증가하여 효소를 첨가하지 않았을 때에 비해 유의하게 증가하였다.

스티렌에 관한 최근 연구에 의하면, 스티렌과 다발성 골수암, 림프육종, 림프종, 골수성 백혈병 등과의 연관성이 제시되고 있다(Matanoski et al, 1997; Motohashi et al, 1999). 스티렌은 cytochrome P450에 의해 에폭시기를 가진 산화스티렌으로 산화되는데 이것이 스티렌 원래의 물질보다 훨씬 더 독성이 강한 활성화 대사산물로 알려져 있다. 스티렌의 대사에는 oxyhemoglobins의 역할로 여겨지는 적혈구의 대사작용(Norppa et al, 1983)과 prostaglandin endoperoxide synthetase (PES) 등의 촉매작용 등이 관여한다고 알려져 있다(Stock et al, 1986; Lee & Norppa, 1995). MPO가 스티렌의 대사에 관여하는 지에 대한 연구로는 MPO가 스티렌에 대한 길항선택적인 에폭시화를 일으킬 수 있다는 보고(Tuynman et al, 2000)만 있을 뿐이다. 본 연구에서 나타난 스티렌에 MPO 첨가에 따른 SCE 빈도와 MN 빈도의 결과는 MPO가 스티렌의 대사성 활성화 과정에 관여하리라는 가능성을 제시하는 것으로 생각된다.

벤젠 노출은 골수이형성 증후군과 급성 골수성 백혈병과의 연관성이 있다(Zhang et al, 1998). 또한

벤젠과 그 대사산물들에 노출된 사람의 말초림프구에서 SCE와 MN 빈도가 증가되는 소견들이 관찰되었으며, 이들 대사산물들에 의한 MN빈도의 증가가 관찰되었다(Robertson et al, 1991). 골수에서는 MPO가 벤젠 대사에 관여하여 1,2,4-benzoquinone과 같은 독성 물질을 생성할 것으로 제시되었다(Snyder & Hedli, 1996). 본 연구결과 제대혈액의 stem cell과 MPO가 하이드로퀴논에 의해 유도되는 SCE와 MN의 빈도를 증가시키는 것으로 보아 이들이 하이드로퀴논 대사에 관여함을 간접적으로 보여주었다. 또한 이 연구에서는 stem cell과 MPO를 첨가하지 않았을 때도 하이드로퀴논에 의한 SCE 빈도가 대조군에 비해 유의하게 증가한 것은 하이드로퀴논 자체가 벤젠의 활성화대사산물 중의 하나이기 때문(Vian et al, 1995)으로 해석된다.

최근 연구에 의하면, TCE에 의한 간과 조혈계 및 림프계의 발암성에 대해서는 아직도 논란의 여지가 있다(Morgan et al, 1998; Sujatha & Hegde, 1998). 일부 연구에서는 SCE와 MN 빈도가 증가하는 소견을 보여주고 있다(Kligerman et al, 1994). TCE는 cytochrome P450에 의해 주로 간에서 대사되어 chloral hydrate를 거쳐 트리클로로에탄올, 트리클로로아세트산 등으로 대사된다고 알려져 있다(Fisher et al, 1998). 그러나 TCE 대사과정에 MPO가 관여하는 지에 대해서는 아직 연구된 바가 없었다. 본 연구에서 TCE에 stem cell이나 MPO를 첨가하였을 때 SCE와 MN 빈도가 증가된 것으로 보아, TCE 대사과정에도 스티렌 및 하이드로퀴논과 마찬가지로 cytochrome P450 이외에 MPO가 관련될 가능성을 간접적으로 시사해 주고 있다고 생각된다. 따라서 이를 확인하기 위해서는 TCE에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 스티렌, 하이드로퀴논, 및 TCE에 의해 유도되는 SCE와 MN 빈도가 사람의 stem cell과 MPO 첨가로 용량-반응 관계로 증가되는 것을 증명하였으며 이로써 이들 물질의 대사과정에 microsomal cytochrome P450 등에 의한 촉매작용 이외에 stem cell과 MPO의 촉매작용이 있음을 간접적으로 제시하였다. 따라서 이들 화학물질들의 골수독성과 유전독성 기전을 설명할 수 있는 가능성을 제시한 것으로 생각된다.

본 연구의 제한점으로는, 실험과 분석이 실험실내

(in vitro)에서 이루어진 연구이며 또한 제대혈 stem cell과 MPO가 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE에 의한 SCE와 MN유도에 미치는 영향을 관찰함으로써 간접적으로 대사성 활성화의 여부를 연구한 결과이므로 향후 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 제대혈액 중에서 분리한 stem cell은 일부 림프구를 포함한 다른 세포성분이 포함되어 있을 가능성을 배제할 수 없었다는 제한점도 있다고 본다.

요 약

목적 : 스티렌, 하이드로퀴논 및 트리클로로에틸렌(TCE)이 사람의 stem cell과 human myeloperoxidase(MPO)에 의해 대사성 활성화되는 지를 규명하고자 스티렌, 하이드로퀴논 및 TCE에 사람의 stem cell 또는 MPO 효소의 첨가가 이들 화학물질에 의한 자매염색분체교환(SCE)과 소핵체(MN) 빈도에 미치는 영향을 관찰하였다.

방법 : 건강한 남자의 전혈에서 림프구를 분리하여 72시간동안 이중배양하되 배양개시 24시간만에 0.05 mM 하이드로퀴논, 1.50 mM 스티렌, 혹은 1.50 mM TCE를 전체용량이 30 μ l가 되도록 아세톤에 희석하여 배양액에 주입하였고 대조군은 아세톤으로 처리하였다. 화학물질 처리 후 즉시 1.3×10^6 및 2.6×10^6 cells/ml 농도의 제대혈액으로부터 나온 stem cell 세포액의 상층액이나 1.0 및 2.0 unit의 human myeloperoxidase를 H₂O₂와 함께 첨가하였다. SCE분석을 위한 배양액에는 배양종료 2.5시간 전에 colchicine을 가한 후 수확하여 Giemsa염색을 하여 metaphase 세포에서 SCE빈도를 분석하였다. MN분석을 위한 배양액에는 배양개시 44시간 만에 cytochalasin-B를 가하였고 acridine orange 염색 후 이핵체에서 MN수를 분석하였다.

결과 : 1. stem cell이나 MPO 자체는 SCE나 MN의 빈도에 영향을 미치지 않았다.

2. stem cell이나 MPO는 스티렌에 의해 유도되는 SCE의 빈도를 용량-반응관계로 유의하게 증가시켰고, MN빈도의 경우 stem cell이나 MPO에 의해 증가되는 경향이 있었으나 2.0 unit MPO를 첨가한 경우에만 첨가하지 않은 경우에 비하여 유의하게 증가하였다.

3. 하이드로퀴논은 stem cell이나 MPO가 없는 상태에서도 대조군에 비하여 SCE빈도가 대조군에 비하여 높았다. stem cell이나 MPO는 하이드로퀴논에 의한 SCE 빈도를 용량-반응관계로 유의하게 증가시켰지만, MN의 경우에는 증가시키는 경향만 있을 뿐 유의한 차이는 아니었다.

4. TCE자체는 SCE나 MN빈도를 증가시키지 않았다. stem cell은 1.3×10^6 및 2.6×10^6 cells/ml 농도 모두에서 SCE빈도를 유의하게 증가시켰고 MPO는 2.0 unit 농도에서만 유의하게 증가시켰다. stem cell이나 MPO모두 TCE에 의한 MN빈도를 증가시키는 경향이 있었으나 유의한 차이는 아니었다.

결론 : 저자들은 스티렌, 하이드로퀴논, 및 트리클로로에틸렌에 의해 유도되는 자매염색분체교환과 소핵체의 빈도가 사람의 stem cell이나 myeloperoxidase에 의해 증가됨을 발견하였으며, 이러한 결과는 myeloperoxidase가 이들 물질의 대사성활성화에 관여함을 암시하고, 또한 아마도 이 물질들의 골수독성과 관련이 있는 것이라고 제시된다.

참고문헌

- Adler ID, Kliesch U, Van Hummelen P, Kirsch-Volders M. Mouse micronucleus tests with known and suspect spindle poisons: results from two laboratories. *Mutagenesis* 1991;6:47-53.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists Inc. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. 6th Ed. Cincinnati: ACGIH Inc. 1991.
- Anttila A, Pukkala E, Sallmen M, Hernberg S, Hemminki K. Cancer incidence among Finnish workers exposed to halogenated hydrocarbons. *J Occup Environ Med* 1995;37(7):797-806.
- Blair A, Hartge P, Stewart PA, McAdams M, Lubin J. Mortality and cancer incidence of aircraft maintenance workers exposed to trichloroethylene and other organic solvents and chemicals: extended follow up. *Occup Environ Med* 1998;55:161-171.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-165.
- Duescher RJ, Elfarra AA. 1,3-Butadiene oxidation by human myeloperoxidase. *JBC* 1992;267(28):19859-19865.
- Fisher JW, Mahle D, Abbas R. A human physiologically based pharmacokinetic model for trichloroethylene and its metabolites, trichloroacetic acid and free trichloroethanol. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;152:339-359.
- Hayashi M, Sofuni T, Ishidate M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutat Res* 1983;120:241-247.
- Husgafvel-Pursiainen KK, Maki-Paakkanen J, Norppa H, Sorsa M. Smoking and sister chromatid exchanges. *Hereditas* 1980;92:247-250.
- Karakaya AE, Karahalil B, Yilmazer M, Aygün N, Şardaş S, Burgaz S. Evaluation of genotoxic potential of styrene in furniture workers using unsaturated polyester resins. *Mutat Res* 1997;392:261-268.
- Kenyon EM, Kraichely RE, Hudson KT, Medinsky MA. Differences in rates of benzene metabolism correlate with observed genotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;136(1):49-56.
- Kligerman AD, Bryant MF, Doerr CL, Erexson GL, Evansky PA, Kwanyuen P, McGee JK. Inhalation studies of the genotoxicity of trichloroethylene to rodents. *Mutat Res* 1994;322(2):87-96.
- Lee S-H, Norppa H. Effects of indomethacin and arachidonic acid on sister chromatid exchange induction by styrene and styrene-7,8-oxide. *Mutat Res* 1995;348:175-181.
- Luomahaara S, Norppa H. Induction of micronuclei in cultured human lymphocytes treated with vinblastin before and after mitogen stimulation. *Mutat Res* 1994;324:29-34.
- MacGregor JT, Claxton LD, Lewtas J, Jensen R, Lower WR, Pesch GG. Monitoring environmental genotoxicants. In : Brusick DJ, editor. *Methods for genetic risk assessment*. Lewis publishers, 1994:171-184.
- Matanoski G, Elliott E, Tao X, Francis M, Correa-Villasenor A, Santos-Burgoa C. Lymphohematopoietic cancers and butadiene and styrene exposure in synthetic rubber manufacture. *Annals New York Academy of Sciences* 1997;837:157-169.
- Medinsky MA, Schlosser PM, Bond JA. Critical issues in benzene toxicity and metabolism: the

- effect of interactions with other organic chemicals on risk assessment. *Environ Health Persp* 1994;102 suppl 9:119-124.
- Morgan RW, Kelsh MA, Zhao K, Heringer S. Mortality of aerospace workers exposed to trichloroethylene. *Epidemiology* 1998;9(4):424-431.
- Motohashi N, Nagashima H, Molnar J. Trichloroethylene I. Carcinogenicity of trichloroethylene. In *Vivo* 1999;13(3):211-214.
- Norppa H, Heikonen H, Autio K. Storage in methanol of smears intended for acridine orange staining. *Mutat Res* 1994;308:115-116.
- Norppa H, Tursi F, Pfaffli P, Maki-Paakkanen J, Jarventaus H. Chromosome damage induced by vinyl acetate through in vitro formation of acetaldehyde in human lymphocytes and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1985;45:4816-4821.
- Norppa H, Vainio H, Sorsa M. Metabolic activation of styrene by erythrocytes detected as increased sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Cancer Research* 1983;43:3579-3582.
- Perry P, Wolff S. New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature (London)*. 1974;251:156-158.
- Robertson ML, Eastmond DA, Smith MT. Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 1991;249:201-209.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide, Release Version 6.12, 4th Ed Cary SAS Institute Inc 1994.
- Serke S, Sauberlich S, Abe Y, Huhn D. Analysis of CD34 positive hemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood: Flow-cytometrical studies and in-vitro colony(CFU-GM, BFU-E) assays. *Ann Hematol* 1991;62:45-53.
- Smith MT. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ Health Persp* 1996;104 suppl 6:1219-1225.
- Smith MT, Yager JW, Steinmetz KM, Eastmond DA. Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity. *Environ Health Persp* 1989;82:23-29.
- Snyder R, Hedli CC. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Persp* 1996;104 suppl 6:1165-1171.
- Stock BH, Bend JR, Eling TE. The formation of styrene glutathione adducts catalyzed by prostaglandin H synthase. A possible new mechanism for the formation of glutathione conjugates. *JBC* 1986;261(3):5959-5964.
- Strogl H, Takimoto M, Mmjdiw O, Gritsch G, Scheinecker C, Hocker P, Knapp W. Myeloperoxidase expression in CD34+ normal human hematopoietic cells. *Blood* 1993;82(7):2069-2078.
- Sujatha TV, Hegde MJ. C-mitotic effects of trichloroethylene on bone marrow cells of mice. *Mutat Res* 1998;413(2):151-158.
- Tuynman A, Spelberg JL, Kooter IM, Schoemaker HE, Wever R. Enantioselective epoxidation and carbon-carbon bond cleavage catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase and myeloperoxidase. *JBC* 2000;275(5):3025-3030.
- Vian L, Van Hummelen P, Bichet N, Gouy D, Kirsch-Volders M. Evaluation of hydroquinone and chloral hydrate on the in vitro micronucleus test on isolated lymphocytes. *Mutat Res* 1995;334:1-7.
- Zhang L, Wang Y, Shang N, Smith MT. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Res* 1998;22(2):105-113.