

## 산업폐기물 소각장 근로자에서 요중 PAHs 대사 산물과 혈중 aromatic-DNA adducts

이경호<sup>1</sup> · Masayoshi Ichiba<sup>2</sup> · 최인미<sup>1</sup> · 최재욱<sup>3</sup> · 조수현<sup>1</sup> · 강대희<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 의과대학 예방의학교실

<sup>2</sup>Department of Community Health Science, Saga Medical School, Saga, Japan

<sup>3</sup>고려대학교 의과대학 예방의학교실

## Association of PAH-DNA adducts and Urinary PAH metabolites influenced by polymorphisms of xenobiotic metabolism enzymes in industrial waste incinerating workers

Kyoung-Ho Lee<sup>1</sup>, Masayoshi Ichiba<sup>2</sup>, Inmi Choi<sup>1</sup>, Jae-wook Choi<sup>3</sup>, Soo-Hun Cho<sup>1</sup>, and Daehee Kang<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Preventive Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, KOREA

<sup>2</sup>Dept. Community Health Science Saga Medical School, Nabeshima, Saga 849-8501, JAPAN

<sup>3</sup>Korea University College of Medicine, Seoul, KOREA

(Received December 6, 2002 / Accepted December 26, 2002)

**ABSTRACT** : This study evaluated the concentrations of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in industrial waste incineration workers. The effect of genetic polymorphisms of xenobiotic metabolism enzymes on urinary concentration of PAH metabolites was assessed. And, aromatic DNA adduct levels were also determined in total white blood cells. Fifty employees were recruited from a company handling industrial wastes located in Ansan, Korea: non-exposed group (n=21), exposed group (n=29). Sixteen ambient PAHs were determined by GC/MSD (NIOSH method) from personal breathing zone samples of nine subjects near incinerators. Urinary 1-hydroxypyrene glucuronide (1-OHPG), a major pyrene metabolite, was assayed by synchronous fluorescence spectroscopy after immunoaffinity purification using monoclonal antibody 8E11 (SFS/IAC). Multiplex PCR was used for genotyping for *GSTM1/T1* and PCR-RFLP for genotyping of *CYP1A1* (*MspI* and *Ile/Val*). PAH-DNA adducts in peripheral blood WBC were measured by the nuclease P1-enhanced postlabeling assay. Smoking habit, demographic and occupational information were collected by self-administered questionnaire. The range of total ambient PAH levels were 0.00-7.00 mg/m<sup>3</sup> (mean 3.31). Urinary 1-OHPG levels were significantly higher in workers handling industrial wastes than in those with presumed lower exposure to PAHs (p=0.006, by Kruskal-Wallis test). There was a statistically significant dose-response increase in 1-OHPG levels with the number of cigarettes consumed per day (Pearson correlation coefficient=0.686, p<0.001). Urinary 1-OHPG levels in occupationally exposed smoking workers were highest compared with non-occupationally exposed smokers (p=0.053, by Kruskal-Wallis test). Smoking and *GSTM1* genotype were significant predictors for log-transformed 1-OHPG by multiple regression analysis (overall model R<sup>2</sup>=0.565, p<0.001), whereas smoking was the only significant predictor for log-transformed aromatic DNA adducts (overall model R<sup>2</sup>=0.249, p=0.201). Aromatic DNA adducts was also a significantly correlation between log transferred urinary 1-OHPG levels (pearson's correlation coefficient=0.307, p=0.04). However, the partial correlation coefficient adjusting for Age, Sex, and cigarette consumption was not significant (r=0.154, p=0.169). The significant association exists only in individuals with the *GSTM1* null genotype (pearsons correlation coefficient=0.516, p=0.010; partial correlation coefficient adjusting for age, sex, and cigarette consumption, r=0.363, p=0.038). Our results suggest that the significant increase in urinary 1-OHPG in the exposed workers is due to higher prevalence of smokers among them, and that the association between urinary PAH metabolites and aromatic DNA adducts in workers of industrial waste handling may be modulated by *GSTM1* genotype. There results remain to be confirmed in future larger studies.

**Keywords** : Polycyclic aromatic hydrocarbon, Incinerator, 1-hydroxypyrene glucuronide, Aromatic DNA adducts, Genetic polymorphism

\*To whom all correspondence should be addressed

## 서 론

최근 산업 폐기물 소각에 의한 환경오염에 대한 관심이 고조되고 있으며, 쓰레기 소각장에서 발생하는 다이옥신(dioxins)과 같은 유해물질과 환경 오염물질에 관한 건강상 장애에 대한 관심이 점차 증가되고 있다(Rappe *et al.*, 1989; Safe, 1990; Fiedler, 1996). 소각장에서는 다이옥신 뿐만 아니라 PAHs(polycyclic aromatic hydrocarbons)와 같은 다양한 열분해 산물이 발생되고 있으며, 이에 관한 독성학적인 연구가 많이 이루어졌다(Morsell *et al.*, 1988; Till *et al.*, 1997). PAHs는 주로 가정용 난방, 쓰레기 소각, 자동차 배기가스와 담배 연기 등에서 유기물질의 불완전 연소에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다(Biorseth *et al.*, 1985). PAHs와 같이 다 경로 노출을 통해 인체로 흡수되는 물질의 평가에 있어서는 생체지표의 활용도가 증대되고 있으며, 다양한 PAHs 중에서 pyrene의 대사 산물인 소변 내 1-hydroxypyrene(1-OHP)은 좋은 biomarker로서 평가되고 있다(Jongeneelen *et al.*, 1987, 1988). 하지만, 최근에는 pyrene 대사의 최종 부산물 중의 하나인 소변 내 1-hydroxypyrene glucuronide(1-OHPG)에 의한 평가가 이루어지고 있으며, 이 소변 내 1-OHPG는 1-OHP에 비해 3-5배의 형광성을 띄고 있어 PAHs의 저노출군에서도 검출이 가능한 생물학적 지표로 알려져 있으며, 특히 단시간에 많은 시료를 쉽고, 빠르게 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다고 보고되고 있다(Strickland *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1995). 또한, 1-OHPG는 1-OHP와 좋은 상관관계가 있는 것으로 보고 되어졌다(Strickland *et al.*, 1999). 본 연구에서는 PAHs의 대사산물로서 소변 내 1-OHPG를 분석하였다.

Glutathione S-transferase(GST)은 외부물질이 체내로 들어와 제1상 반응을 거친 후 생긴 친전자성 물질에 glutathione을 결합하여 해독하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Rushmore *et al.*, 1993), *GSTM1*(mu1)의 homozygotic deletion에서는 폐암, 방광암, 대장암의 위험이 높은 것으로 보고 되었다(Zhong *et al.*, 1991; McWilliams *et al.*, 1995; Brockmoller *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). *GSTT1*(theta1) gene deficiency는 암 발생과 연관성이 있다는 보고가 있으나, 아직 명확하게 기전을 밝혀진 연구 결과는 거의 없다(Norppa *et al.*, 1995; Scarpato *et al.*, 1996). 본 연구에서 사용되어진 다른 유전자 감수성 지표로서 cytochrome P450 1A1(CYP1A1) gene codes가 PAHs의 대사에 밀접한 연관성이 있는 것으로 보고 되어졌다(Jongeneelen *et al.*, 1987; Crofts *et al.*, 1994). CYP1A1의 polymorphisms은 일본과 독일의 인구집단에서 폐암과 연관성이 높다는 연구가 보고 되어졌으며(Kawajiri *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 1992;

Drakoulis *et al.*, 1994), 필란드인이나 Caucasian에게서는 폐암과 연관성이 없다는 연구 결과도 있었다(Drakoulis *et al.*, 1994; Tefre *et al.*, 1991). 일부 어떤 연구는 Caucasians에게서 CYP1A1 polymorphism과 폐암과 연관이 있다는 보고도 있었다(Xu *et al.*, 1996).

현재 많은 연구에서는 직업적으로 폭로되는 PAHs의 소변 내 대사 산물의 농도가 *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, CYP1A1의 유전자 다형성에 의해 차이가 있다고 보고되어지고 있다(Gabbani *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998; Merlo *et al.*, 1998; Poirier *et al.*, 1998). Gabbani 등(1996)은 코크스 오븐(coke oven) 작업자에게서 *GSTM1* genotype과 소변 내 1-OHP와 연관성이 있다고 보고 하였고, Merlo 등 (1998)은 교통경찰공무원에게서 소변 내 1-OHP의 정도가 흡연과 CYP1A1 *MspI* polymorphism에 영향이 있는 것을 보고 하였고, coke oven 근로자에게서는 또한 *MspI* homozygous variant genotypes을 가진 사람이 그렇지 않은 사람보다 1-OHP의 농도가 높게 나타나는 것으로 보고하였다.

PAH-DNA adducts는 PAH가 인체 내 흡수된 후 대사과정을 거쳐 활성화된 형태의 PAH가 critical bimolecular인 DNA와 안정적인 공유결합을 통해 새로운 부가물을 만든 것이고, 이것이 chemical carcinogenesis를 시작하는 가장 초기 단계의 발암물질과 인체물질간의 상호 작용으로 이해되고 있다.

산업장에서 PAH의 노출량이 많은 주물, 주조작업 근로자에게서의 PAHs의 노출과 관련된 PAH-DNA adduct에 관한 연구가 이미 이루어졌다(Perera *et al.*, 1988). 그 뿐만 아니라, coke-oven 작업자(Harris *et al.*, 1985), 환경에서 흡연자(Santella *et al.*, 1992) 그리고, 산업공단 지역의 오염이 심한 지역의 지역 주민을 대상으로 한 연구도 있다(Perera *et al.*, 1992). 지난 수십 년 동안 DNA adduct의 정량법이 개발되었으며, 현재는 Immunoassay, fluorescence assay, and <sup>32</sup>P-postlabeling과 같은 정량법이 개발되어, 직업적 또는 환경적으로 유해물질에 폭로된 사람들을 대상으로 한 연구에서 적용되어지고 있다(dellOmo *et al.*, 1993).

본 연구에서는 산업폐기물 소각장에서 종사하는 근로자를 대상으로 호흡기 위치에서의 공기 중 PAHs의 농도 평가, 백혈구 내의 DNA를 이용한 aromatic-DNA adducts의 분석 그리고, 소변 내 PAH의 대사 산물인 1-OHPG의 농도를 평가하였으며, 개인의 감수성 지표로서 *GSTM1*, *GSTT1*, CYP1A1 *MspI*, CYP1A1 *IleVal*에 관한 유전자 다형성을 평가하였다.

## 대상 및 방법

### 연구대상

본 연구의 대상은 산업 폐기물을 전문으로 소각하는 회사

에 근무하는 근로자 50명을 대상으로 연구를 실시하였으며, 그 중에서 29명의 근로자는 산업폐기물 소각 시 유해인자에 직접 노출되는 집단(exposure group)이며, 이들의 업무는 주로 소각로를 운전하고, 폐기물을 운반하는 일을 하고 있었다. 반면에 21명의 근로자는 본 회사에 근무는 하고 있으나, 직접 폐기물을 취급하지 않거나 사무직 근로자로서 연구 대조군(control group)으로 선정하였다.

**시료 수집**

작업장 내 공기 중 PAHs의 측정은 9명 근로자의 호흡기 위치에서 6시간 이상 개인시료포집 방법(personal air sampling)으로 이루어 졌다. 개인시료 포집기(Gilian, USA)를 이용하여 1.7 l/min의 유량으로 포집을 하였으며, 입자상 물질은 37 mm 테프론 필터(37 mm-diameter Teflon filter, SKC, USA)에 주로 포집을 하였고, 휘발성 물질은 100/50 mg XAD-2 resin이 포함된 glass sorbent tube를 이용하여 포집을 하였다. 일부 PAHs는 UV에 민감한 반응을 하므로 알루미늄 foil을 이용하여 포집 시 빛을 차단시켰다.

소변의 수집은 작업이 종료된 후 50 ml polypropylene tube를 이용하여 수집하였으며, creatinine과 1-OHPG분석이 이루어지기 전까지 -20°C에서 보관되어졌고, 혈액은 소변이 모아지는 시기에 수집되었으며, 5 ml EDTA sterile vacutainer tube에 수집되어 분석이 이루어지기 전까지 -70°C로 보관되어 졌다.

모든 근로자에 대하여 흡연 여부, 알코올 섭취, 음식물 섭취, 보호구 착용여부 등과 같은 일반적인 개인정보는 자기기입식 설문지를 통하여 조사 되어졌다.

**공기 중 PAHs의 분석**

공기 중 PAHs의 분석은 미국국립산업안전보건연구소(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)에서 제공한 method 5515에 의하여 PAHs를 분석하였다. 수집된 PAHs가 함유된 Teflon (PTFE) filters와 XAD-2 absorbent materials에 dichloromethane 1 ml를 넣은 다음 30분동안 sonication하여 추출을 하였다. 추출된 시료를 gas chromatography(GC)(Hewlett Packard 5890 series Plus II)에 mass selective detector(Hewlett Packard 5972 MSD)를 이용하여 정량하였다. internal standard로서는 fluoranthrene를 이용하였고, 컬럼은 HP5MS(30 m×0.25 mm×0.25 mm film thickness)column을 사용하였다. 분석된 PAHs는 미국환경보호청(Environmental Protection Agency, EPA)에서 대기오염의 지표로 설정하고 있는 16가지 즉, naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, \*benzo

(ghi)perylene, \*benzo(a)anthracene, \*chrysene, \*benzo(b)fluoranthene, \*benzo(k)fluoranthene, \*benzo(a)pyrene, \*indeno(1,2,3-cd)pyrene, \*dibenzo(ah)anthracene(\*carcinogenic PAHs)를 이용하였다.

**소변 내 1-hydroxypyrene glucuronide의 분석**

소변 내 1-hydroxypyrene glucuronide 분석은 Strickland 등(1994)이 개발한 방법을 개조하여 이용하였다. 수집한 소변 4 ml를 4N HCl 0.1 ml를 첨가한 후 90°C에서 1시간 동안 dry-bath incubator에서 hot acid처리한다. 그리고 methanol 4 ml과 물 4 ml로 Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge(Waters, USA)를 차례로 활성화한 후 hot acid 처리된 소변을 여과시키고, 4 ml의 물로 1차 세척을 한 후 30% methanol로 2차 세척을 한다. 마지막으로 80% methanol 4 ml로 cartridges를 통과하여 소변 시료를 용출하여 culture tube (12×75 mm, Corning, USA)에 받는다. Sep-Pak C<sub>18</sub>를 이용하여 얻은 시료는 약 0.5 ml 정도 되도록 SpeedVac을 사용하여 농축을 한 다음, 0.5×phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)를 첨가하여 다시 4 ml이 되도록 한다. 이렇게 처리된 시료는 monoclonal antibody 8E11(MAb 8E11)이 결합된 cyanogen bromide(CNBr)-activated Sepharose 4B를 poly-prep chromatography column(0.8×4 cm, BIO RAD)에 충전하여 만들어진 immunoaffinity columns(IAC)을 통과시켜 정제를 한다. 먼저 0.5×PBS 4 ml로 IAC를 세척한 후 시료를 column을 통과시키고, 다시 0.5×PBS 4 ml로 column을 세척한다. 그리고, 0.5×PBS로 희석된 25% Methanol 4 ml를 column을 통과 시킨 후 마지막으로 0.5×PBS로 희석된 70% Methanol 4 ml로 column에 결합된 1-OHPG를 분리한다. 처리된 시료를 완전히 건조 시킨 후 물 2 ml로 녹여서 synchronous fluorescence spectroscopy (SFS, Perkin-Elmer LS50B Luminescence spectrometer)로 excitation-emission wavelength difference를 34 nm로 하여 분석하였다. 각각의 소변 시료는 creatinine kit(Sigma-Aldrich, USA)을 이용하여 creatinine 농도를 측정하고 1-OHPG농도를 보정하였다.

**유전자 다형성 분석**

수집된 혈액에서 DNA를 추출하였고, *GSTM1/T1*의 유전자 다형성은 multiplex PCR을 이용하여 확인하였다(Chen et al., 1996). PCR 반응의 조성은 d-nucleoside triphosphate (dNTP) 0.2 mM, Tris-HCl(pH8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, Taq polymerase 1.25 unit(TaKaRa R004A), 각 primer 50 pmole, template 5 µl(50-100 ng/µl)로 반응액이 총 50 µl가 되게 하였다. Thermal cycler는 BioRad사의

Gene cycler™를 사용하여 94°C 4분 동안 pre-incubation 시킨 후, denaturation 과정으로 94°C 20초, annealing-primer 부착과정으로 57°C 20초, extension-DNA 복사 과정으로 72°C 45초를 30회 반복하였고, 그 후 다시 72°C 5분간 thermal cycler에서 incubation시켰다. 여기서 얻어진 PCR product 10 µl를 3% Metaphor agarose gel(FMC BioProducts Cat. 50180)에 loading하여 50V에서 1시간 동안 running 한 후 UV transilluminator하에서 band를 확인하고 사진을 남겼다. *GSTM1*은 210bp, *GSTT1*은 480bp 위치에서 확인되는 것을 기준으로 유전자 다형성을 확인하였고,  $\beta$ -globin을 내부 대조군으로 설정하였다. CYP1A1 genotyping은 PCR-RFLP 방법으로 분석을 하였다(Crofts *et al.*, 1994).

#### Aromatic DNA adduct 분석

본 연구의 DNA adducts 분석은 <sup>32</sup>P-postlabeling method (Reddy and Randerath, 1986)의 nuclease P1 digested version으로 분석되어졌다. 이 분석 방법은 먼저 5 µg DNA를 micrococcal nuclease와 spleen phosphodiesterase를 이용하여 가수분해를 한다. 이 가수분해된 것을 제한 효소인 nuclease P1으로 자르고 난 후, 건조 시킨 다음 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP와 T4 polynucleotide kinase를 혼합하여 2 µl로 만들어서

labeling을 한다. Label된 시료는 4단계의 solvent system으로 polyethyleneimine-cellulose thin layer chromatography plates(Macherry-Nagel, Germany)를 이용하여 spotting과 developing을 하였다. D1용액, 1 M sodium phosphate, pH 6.0; D3용액, 3.6 M lithium formate, 8.5 M urea, pH 3.5; D4용액, 0.8 M lithium chloride, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0; D5용액, 1.6 M sodium phosphate, pH 6.0를 이용하여 크로마토그래피 하였다.

DNA adducts은 Fuji imaging plate에 thin layer plates에 폭로 시킨 후 using Bio-Image Analyzer(BAS2000; Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)로 정량 하였다.

#### 통계적 분석

자료 분석은 SPSS(statistical package for social science; Window Version 9.0) 통계 패키지를 이용하여 두 집단 차이의 유의성을 판단하기 위해 Kruskal-Wallis test를 하였고, 각 변수들의 상관관계는 Pearson과 Spearman correlation coefficient를 이용하였다. 이 때 통계적 유의성 검정수준은  $p < 0.05$ 로 정하였고, 1-OHPG에 관한 여러 교란 변수를 보정하기 위해서 multiple general linear regression model을 이용하였다.

**Table 1.** Urinary 1-OHPG level ( $\mu$ mol/mol creatinine) in relation to smoking status and metabolic genotypes<sup>a</sup>

Groups	Incinerator workers		Controls		All subjects		p-value
	N	Mean $\pm$ S.D.	N	Mean $\pm$ S.D.	N	Mean $\pm$ S.D.	
1-OHPG	29	0.24 $\pm$ 0.11	21	0.16 $\pm$ 0.07	50	0.21 $\pm$ 0.10	p = 0.006
Smoking							
Smokers	20	0.28 $\pm$ 0.09	10	0.21 $\pm$ 0.07	30	0.26 $\pm$ 0.09	p = 0.053
Non-smokers	5	0.09 $\pm$ 0.04	8	0.12 $\pm$ 0.03	13	0.11 $\pm$ 0.03	p = 0.143
		p = 0.001		p = 0.004		p < 0.001	
GSTM1							
Present	16	0.26 $\pm$ 0.12	8	0.16 $\pm$ 0.09	24	0.22 $\pm$ 0.11	p = 0.050
Null	12	0.22 $\pm$ 0.98	13	0.16 $\pm$ 0.07	25	0.19 $\pm$ 0.09	p = 0.142
		p = 0.430		p = 0.772		p = 0.317	
GSTT1							
Present	10	0.25 $\pm$ 0.11	12	0.16 $\pm$ 0.08	22	0.20 $\pm$ 0.10	p = 0.041
Null	18	0.23 $\pm$ 0.11	9	0.17 $\pm$ 0.07	27	0.21 $\pm$ 0.10	p = 0.100
		p = 0.774		p = 0.670		p = 0.673	
CYP1A1 <i>MspI</i>							
*1A/*1A	12	0.25 $\pm$ 0.12	11	0.14 $\pm$ 0.05	23	0.20 $\pm$ 0.11	p = 0.016
*1A/*2C or *2C/*2C	16	0.23 $\pm$ 0.10	9	0.19 $\pm$ 0.09	25	0.22 $\pm$ 0.10	p = 0.396
		p = 0.546		p = 0.210		p = 0.403	
CYP1A1 <i>Ile/Val</i>							
*1A/*1A	19	0.24 $\pm$ 0.11	11	0.14 $\pm$ 0.05	30	0.20 $\pm$ 0.10	p = 0.009
*1A/*2A or *2A/*2A	9	0.28 $\pm$ 0.11	9	0.19 $\pm$ 0.09	18	0.24 $\pm$ 0.11	p = 0.102
		p = 0.313		p = 0.102		p = 0.173	

<sup>a</sup>All statistical tests were performed by Kruskal-Wallis test

## 결 과

산업폐기물 소각장에서 발생하는 공기중 PAH의 농도를 근로자의 호흡기 위치에서 일부(9군데) 측정한 결과 0.00-7.00  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 로 나타나고 있었다. 하지만 benzo[a]pyrene를 포함한 발암성 물질은 발견되지 않았다(data not shown). PAHs중 pyrene의 대사 산물인 소변 내 1-hydroxypyrene glucuronide(1-OHPG)의 농도는 소각장에서 산업폐기물을 직접 다루는 근로자가 대조군인 사무직 근로자에 비해서 통계적으로 유의하게 높게 나타나고 있었다( $p=0.006$  by Kruskal-Wallis Test)(Table 1). 1-OHPG의 산술 평균농도는, 노출군에서  $0.24 \pm 0.11 \mu\text{mol}/\text{mol creatinine}$ 이며, 대조군에서  $0.16 \pm 0.07 \mu\text{mol}/\text{mol creatinine}$ 으로 나타났다. 또한 소변 내 1-OHPG의 농도는 흡연자가 비흡연자보다 통계적으로 유의하게 높게 나타나고 있었다( $p<0.001$ , by Kruskal-Wallis Test)(Table 1). 그리고, 흡연자 집단 중에서도 소각장에서 유해인자에 직접 노출되는 근로자가 대조군 근로자보다 1-OHPG의 농도가 높게 나타나는 것을 알 수 있었다( $p=0.053$  by Kruskal-Wallis test)(Table 1). 하루 흡연량과 log 치환된 1-OHPG의 농도와의 상관 관계는 통계적으로 매우 유의하게 나타나고 있었다(Pearson's correlation,  $r=0.686$ ,  $p<0.001$ )(Fig. 1). 또한, 다중선형회귀분석법으로 소변 내 1-OHPG의 농도에 영향을 줄 수 있는 요인을 분석한 결과 흡연과 *GSTM1* genotype가 통계적으로 유의하게 관여하는 것으로 나타났다(overall model  $R^2=0.565$ ,  $p<0.001$ )(Table 2).

Aromatic DNA-adduct/ $10^8$ nucleotides은 흡연상태의 따라

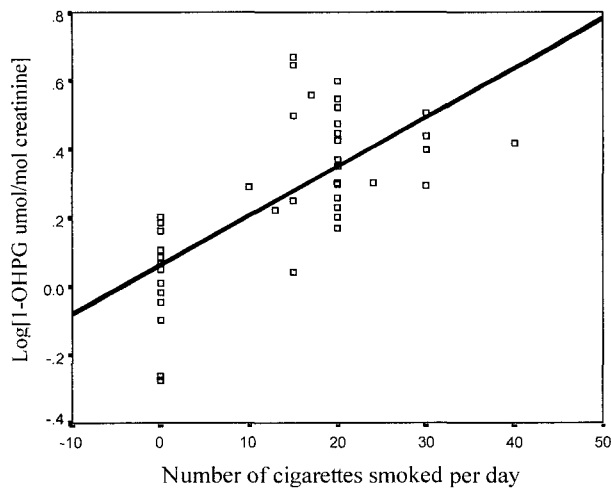


Fig. 1. Relationship between log [1-OHPG] and number of cigarettes smoked per day (Pearson's correlation,  $r=0.686$ ,  $p<0.001$ ).

Table 2. Relationship of log-transformed 1-OHPG concentrations by multiple linear regressions among 50 workers (overall model  $R^2 = 0.565$ ,  $p<0.001$ )

Variables	$\beta$	Std. error	P-value
Age	-0.227	0.004	0.158
Cigarettes per day	0.726	0.003	0.000
Occupational exposure <sup>a</sup>	0.099	0.058	0.470
<i>GSTM1</i> <sup>b</sup>	0.262	0.053	0.047
<i>GSTT1</i> <sup>b</sup>	0.007	0.054	0.956
<i>CYP1A1</i> *1A/*2A <sup>c</sup>	-0.168	0.061	0.223

<sup>a</sup>exposure versus control group.

<sup>b</sup>present versus null.

<sup>c</sup>wild type versus mutant variant.

서 다르게 나타나고 있었다. 전체 인원에서 흡연자 aromatic DNA-adduct의 수준이 비흡연자의 수준보다 높게 나타나고 있으나, 통계적으로 유의하지는 않았다( $p=0.077$ , Kruskal Wallis Test)(Table 3). 그리고, aromatic DNA-adduct의 농도가 유해 물질이 직접 노출된 소각장 근로자와 사무직 근로자와 비교해 보았을 때 큰 차이를 볼 수 없었다(Table 3). 하지만, log 치환된 aromatic-DNA-adduct를 다중회귀분석한 결과 흡연상태가 중요한 요소란 것을 알 수 있었다 (Table 4).

소변 내 1-OHPG의 농도와 aromatic DNA-adduct의 상관관계를 보면 두 변수간에 통계적으로 매우 유의한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(Pearson's correlation coefficient  $r=0.307$ ,  $p=0.040$ )(Fig. 2). 또한, *GSTM1* null genotype에서 log 1-OHPG의 농도와 log aromatic DNA-adduct의 수준을 비교하였을 때 유의한 연관성이 있는 것으로 나타났다 (Pearson correlation coefficient,  $r=0.516$ ,  $p=0.010$ )(Fig. 3).

## 고 찰

본 연구는 산업폐기물 소각장에서 발생하는 다환성방향족 탄화수소(PAHs)에 대한 유전자 다형성에 의한 소변내 1-OHPG의 농도와 이와 연관된 aromatic DNA-adduct의 수준을 알아내고, 대사에 관여하는 유전자의 다형성을 통하여 개인의 감수성 차이에 따른 소변내 1-OHPG로 노출과 <sup>32</sup>P-postlabeling를 이용하여 aromatic DNA adduct를 평가하였다. 하지만, 공기 중의 PAHs의 양은 측정이 이루어 졌으나, 벤조피렌(benzo[a]pyrene)과 같은 발암성 물질은 공기 중 PAHs에 발견되지 않았으며, 시료의 수도 충분하지 못하여 자료를 올리지 않았다.

PAHs중 pyrene의 내부용량 물질로서 1-OHP가 많이 분석되어 왔으나, 본 연구에서는 1-OHPG를 분석하였다. 예전에 많이 분석되어졌던 1-OHP는 분석시간이 길며, 분석시 많은

**Table 3.** Aromatic DNA adducts/10<sup>8</sup>nucleotides in relation to smoking status and genetic polymorphisms<sup>a</sup>

Groups	Incinerator workers		Controls		All subjects		P-value
	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	
DNA-adduct	26	0.52 ± 0.19	20	0.55 ± 0.23	46	0.53 ± 0.21	p = 0.731
Smoking							
Smokers	17	0.56 ± 0.20	11	0.60 ± 0.23	28	0.58 ± 0.21	p = 0.638
Non-smokers	5	0.39 ± 0.14	7	0.50 ± 0.25	12	0.46 ± 0.21	p = 0.465
		p = 0.055		p = 0.467		p = 0.077	
GSTM1							
Present	14	0.49 ± 0.16	7	0.62 ± 0.22	21	0.53 ± 0.19	p = 0.156
Null	11	0.54 ± 0.23	13	0.51 ± 0.23	24	0.52 ± 0.23	p = 0.706
		p = 0.661		p = 0.285		p = 0.707	
GSTT1							
Present	8	0.58 ± 0.23	12	0.51 ± 0.21	20	0.54 ± 0.22	p = 0.512
Null	17	0.48 ± 0.17	8	0.60 ± 0.26	25	0.52 ± 0.20	p = 0.200
		p = 0.431		p = 0.512		p = 0.873	
CYP1A1 MspI							
*1A/*1A	11	0.56 ± 0.22	10	0.50 ± 0.24	21	0.53 ± 0.23	p = 0.324
*1A/*2C or *2C/*2C	14	0.47 ± 0.17	9	0.63 ± 0.21	23	0.53 ± 0.20	p = 0.078
		p = 0.324		p = 0.288		p = 0.851	
CYP1A1 Ile/Val							
*1A/*1A	17	0.53 ± 0.20	10	0.53 ± 0.26	27	0.53 ± 0.22	p = 0.763
*1A/*2A or *2A/*2A	8	0.51 ± 0.18	9	0.57 ± 0.22	17	0.54 ± 0.20	p = 0.531
		p = 0.977		p = 0.870		p = 0.736	

<sup>a</sup>All statistical tests were performed by Kruskal-Wallis test

**Table 4.** Relationship of log [aromatic DNA adducts/10<sup>8</sup> nucleotides] by multiple linear regressions among 50 workers (overall model R<sup>2</sup> = 0.249, p=0.201)

Variables	β	Std. error	P-value
Age	-0.552	0.004	0.014
Cigarettes per day	0.465	0.004	0.031
Occupational exposure <sup>a</sup>	-0.110	0.068	0.563
GSTM1 <sup>b</sup>	0.176	0.063	0.315
GSTT1 <sup>b</sup>	-0.005	0.069	0.979
CYP1A1 *1A/*2A <sup>c</sup>	-0.125	0.075	0.526

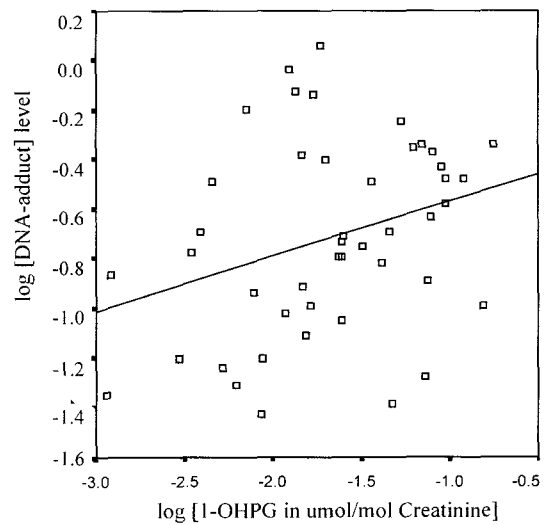
<sup>a</sup>exposure versus control group.

<sup>b</sup>present versus null.

<sup>c</sup>wild type versus mutant variant.

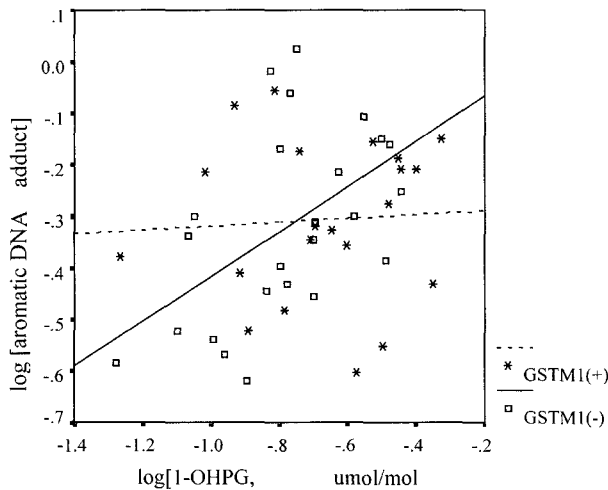
어려움이 있었다(Jongeneelen *et al.*, 1987). 또한 Singh 등 (1995)이 HPLC를 이용한 1-OHP 분석 방법을 개발하였으나, 많은 시료를 분석하기에는 어려움이 많았다. 본 연구에서는 synchronous fluorescence spectroscopy/immunoaffinity column(SFS/IAC)을 이용하여 보다 빠르고, 많은 시료의 1-OHPG를 분석할 수 있었다(Lee *et al.*, 1999). 이미 SFS/IAC를 이용한 분석 방법에서 소변 내 1-OHPG와 소변 내 1-OHP와 통계적으로 유의한 연관성이 있는 것으로 보고 되어졌다(Strickland *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999).

본 연구에서 소각장의 소각로에서 근무하는 근로자에게서



**Fig. 2.** Pearsons correlation coefficient between log [aromatic DNA adducts/10<sup>8</sup> nucleotides] and log [1-OHPG μmol/mol creatinine] r=0.32, p=0.04 (Partial correlation coefficient adjusting for age, sex, and cigarette consumption=0.154, p=0.169).

의 소변 내 1-OHPG의 농도가 기존의 연구에서 확인된 carbon-electrode 제조 공정(van Delft *et al.*, 1998)이나



**Fig. 3.** Correlation between log [aromatic DNA adduct] and log [urinary log 1-OHPG] categorized by *GSTM1* genotype; *GSTM1* (-), Pearson correlation coefficient=0.516 ( $p=0.010$ ), partial correlation coefficient adjusting for age, sex and cigarette consumption=0.363 ( $p=0.038$ ); *GSTM1* (+), Pearson correlation coefficient  $r=0.045$  ( $p=0.839$ ), partial correlation coefficient adjusting for age, sex and cigarette consumption=-0.199 ( $p=0.256$ ).

coke oven 근로자들(Kuljukka *et al.*, 1997)보다 높은 농도의 PAHs는 아니지만, PAHs가 폭로되고 있다는 것은 1-OHPG의 분석을 통하여 알 수 있었다. 특히, 산업폐기물 소각장 내에서도 소각로에서 근무하는 근로자에게서 소변내 1-OHPG의 농도가 현저하게 높게 나타나고 있었다. 또한 흡연은 PAH의 대사 산물에 매우 중요한 요소로 작용하고 있었으며, 흡연을 하는 집단 중에서 소각로에서 근무하는 근로자가 대조군으로 선정된 집단 보다 1-OHPG의 농도가 높게 나타나고 있었다.

본 연구에서 산업 폐기물 소각로에서 소변 내 1-OHPG와 aromatic DNA-adduct과의 연관성이 매우 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 다른 연구에서도 비슷하게 나타나고 있었다(Binkova *et al.*, 1995). 또한, 흡연 여부에 따라서는 aromatic DNA-adduct의 수준이 유의한 차이를 보여주고 있었다. 하지만, 유전자 다형성에 의한 PAHs의 대사 산물과 DNA adduct의 관계에서는 유의한 차이를 나타내고 있지 않았다. PAHs의 대사에 관여하는 GST isozymes에 대한 영향은 몇 가지 암 발생 위험으로 볼 때, 일부 연구 논문에서는 유전자의 결손이 일반적으로 통계적으로 유의하지 않다고 보고되어졌다(Vos *et al.*, 1991; Warholm *et al.*, 1994; Gabbani *et al.*, 1996; Poirier *et al.*, 1998).

본 연구에서 CYP1A1의 유전자 다형성에 관한 소변 내 PAHs의 대사 산물인 1-OHPG와의 관계에서 기존의 연구와

마찬가지로 통계적으로 유의한 차이를 볼 수 없었다(Poirier *et al.*, 1998). 하지만, Wu 등(1998)은 coke-oven 근로자에게서 PAHs의 대사가 CYP1A1 MspI genotype에 따라서 차이가 있는 것으로 보고 하였다. 일부 연구에서 coke-oven과 굴뚝청소부와 같이 고농도로 폭로되는 집단에서 CYP1A1의 유전자 다형성이 DNA-adduct의 형성과 PAHs의 대사에 연관되어 있다고 보고되어졌다(Ichiba *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1998). 본 연구에서는 적은 시료의 수와 유해인자의 노출량이 다른 연구에 비해 적어서 유전자 다형성에 의한 차이는 발견되지 않은 것으로 판단되어 진다.

결론적으로, 본 연구는 쓰레기 소각장에서 일하는 근로자에게서 PAH 노출에 대한 것을 고려 할 때 소변내 1-OHPG의 농도가 좋은 생물학적인 지표로 이용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 그리고, 그것은 aromatic DNA adduct와도 약간의 영향이 있는 것으로 밝혀 졌다. 하지만 유전자 다형성으로 볼 때 PAHs의 대사 산물인 1-OHPG와 aromatic DNA adduct는 유의한 영향이 없는 것으로 밝혀 졌다.

PAHs가 고농도로 폭로되는 작업장의 근로자는 *GSTM1* null 형태에서 DNA 부산물로 인한 질병의 위험이 높을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)”으로 지원 받은 과제입니다.

### 참고문헌

Binkova, B., Lewtas, T., Miskova, Lenicek, J. and Sram, R. (1995): DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population, *Carcinogenesis* **16**, 1037-1046.

Biorseth, A. and Ramdahl, T. (1985): Source and Emission of PAH, Handbook of polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Marcel Dekker, New York.

Brockmoller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Staffeldt, B. and Roots, I. (1994): Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B host factors of bladder cancer susceptibility: a case control study, *Cancer Res.* **54**, 4103-4111.

Chen, H., Sandler, D.P., Taylor, J.A., Shore, D.L., Liu, E., Bloomfield, C.D. and Bell, D.A. (1996): Increased risk for myelodysplastic syndromes among those with glutathione transferase theta 1 (*GSTT1*) genetic defect, *Lancet* **347**, 195-197.

Crofts, F., Taioli, E., Trachman, J., Cosma, G.N., Currie, D., Toniolo, P. and Garte, S.J. (1994): Functional significance of different human CYP1A1 genotypes, *Carcinogenesis* **15**,

- 2961-2963.
- dell Omo, M. and Lauwerys, R.R. (1993): Adducts to macromolecules in the biological monitoring of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Crit. Rev. Toxicol.* **23**, 111-126.
- Drakoulis, N., Cascorbi, I., Brockmüller, J., Gross, C.R. and Roots, I. (1994): Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (1889 A to G), and a T to C mutation in the 3-flanking region, *Clin Invest* **72**, 240-248.
- Fiedler, H. (1996): Sources of PCDD/PCDF and impact on the environment, *Chemosphere* **32**, 55-64.
- Gabbani, G., Hou, S.M., Nardini, B., Marchioro, M., Lambert, B. and Clonfero, E. (1996): GSTM1 and NAT2 genotypes and urinary metabolites in coke oven workers, *Carcinogenesis* **17**, 1677-1681.
- Harris, C.C., Vahakangas, K., Newman, M.J., Trivers, G.E., Shamsuddin, A., Sinopoli, N., Mann, D.L. and Wright, W.E. (1985): Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to the adducts in serum from coke-oven workers, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **82**, 6672-6676.
- Hayashi, S., Watanabe, J. and Kawajiri, K. (1992): High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotype of P4501A1 and Mu-class glutathione S-transferase genes, *Japan J Cancer Res* **83**, 866-870.
- Ichiba, M., Hagnar, L., Rannug, A., Hgstedt, B., Alexandrie, A.K., Carstensen, U. and Hemminki, K. (1994): Aromatic DNA adducts, micronuclei and genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 in chimney sweeps, *Carcinogenesis* **15**(7), 1347-1352.
- Jongeneelen, F.J., Arizon, R.B.M. and Henderson, P.T. (1987): Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine, *J. Chromatogr.* **413**, 227-232.
- Jongeneelen, F.J., Arizon, R.B.M., Scheepers, P.T.J., et al. (1988): 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments, *Ann. Occup. Hyg.* **32**, 35-43.
- Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J. and Hayashi, S. (1993): The CYP1A1 gene and cancer susceptibility, *Crit Rev Oncol Hematol* **14**, 77-87.
- Kuljukka, R., Vaaranrinta, R., Mutanen, P., Veidebaum, T., Sorsa, M., Kalliokoski, P. and Peltonen, K. (1997): Assessment of occupational exposure to PAHs in an Estonian coke oven plant-correlation of total external exposure to internal dose measured as 1-hydroxypyrene concentration, *Biomarkers* **2**, 87-94.
- Lee, C.K., Cho, S.H., Kang, J.W., Lee, S.J., Ju, Y.S., Sung, J.H., Strickland, P.T. and Kang, D. (1999): Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Tox Letters* **108**, 209-215.
- Lin, H.J., Prbst Hensch, N.M. and Ingles, S.A. (1995): Glutathione transferase (GSTM1) null genotype, smoking, and prevalence of colorectal adenoma, *Cancer Res* **55**, 1224-1226.
- McWilliams, J.E., Sanderson, B.J.S., Harris, E.L., Richert-Boe, K.E. and Henner, W.D. (1995): Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4**, 589-594.
- Merlo, F., Andreassen, A., Weston, A., Pan, D.F., Haugen, A., Valreio, F., Reggiardo, G., Fontana, V., Garte, S., Puntoni, R. and Abbondandolo, A. (1998): Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 147-155.
- Morsell, L. and Zappoli, S. (1988): PAH determination in samples of environmental interest, *Sci. Total Environ.* **73**(3), 257-266.
- Norppa, H., Hirvonen, A., Jarventaus, H., Uuskula, M., Tasa, G., Ojajarvi, A. and Sorsa, M. (1995): Role of GSTT1 and GSTM1 genotypes in determining individual sensitivity to sister chromatid exchange induction by diepoxybutane in cultured human lymphocytes, *Carcinogenesis* **16**, 1261-1264.
- Perera, F.P., Hemminki, K., Young, T.L., Santella, R.M., Brenner, D. and Kelly, G. (1988): Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers, *Cancer Res.* **48**, 2288-2291.
- Perera, F.P., Hemminki, K., Grzybowska, E., Motykiewicz, G., Santella, R.M., Young, T.L., Dickey, C., Brandt-Rauf, P., DeVivo, I., Blaner, B., Tsai, W. and Chorazy, M. (1992): Molecular damage from environmental pollution in Poland, *Nature* **360**, 256-258.
- Poirier, M.C., Weston, A., Schoker, B., Shamkhani, H., Pan, C.F., McDiarmid, M.A., Scott, B.G., Deeter, D.P., Heller, J.M., Jacobson-Kram, D. and Rothman, N. (1998): Biomonitoring of United States Army soldiers serving in Kuwait in 1991, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 545-551.
- Rappe, C. and Buser, H.R. (1989): Chemical and physical properties, analytical methods, sources and environmental levels of halogenated dibenzodioxins and dibenzofurans In: Halogenated biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products (Kimbrough RD, Jensen AA, eds), Amsterdam: Elsevier, 71-102.
- Reddy, M.V. and Randerath, K. (1986): Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of <sup>32</sup>P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts, *Carcinogenesis* **7**, 1543-1551.
- Rushmore, T.H. and Pickett, C.B. (1993): *Glutathione S-transferase*, structure, regulation and therapeutic implication, *J. Biol. Chem.*, **268**, 11475-11478.
- Safe, S. (1990): Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds : environmental and mechanistic consideration which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), *Crit. Rev. Toxicol.* **21**, 51-88.
- Santella, R.M., Grinberg-Funes, R.A., Young, T.L., Dickey, C., Singh, V.N., Wang, L.W. and Perera, F.P. (1992): Cigarette smoking related polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral mononuclear cells, *Carcinogenesis* **13**, 2041-2045.
- Scarpato, R., Migliore, L., Hirvonen, A., Falck, G. and Norppa, H. (1996): Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides : characterization of GSTM1, GSTT1, and NAT2



- genotypes, *Environ Mol Mutagen* **27**, 263-269.
- Singh, R., Tucek, M., Maxa, K., Tenglerova, J. and Weyand, E.H. (1995): A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide : a potential biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, *Carcinogenesis* **16**, 2909-2915.
- Strickland, P.T. and Kang, D.H. (1999): Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter, *Toxic Letters* **108**, 191-199.
- Strickland, P.T., Kang, D.H., Bowman, E.D., Fitzwilliam, A., Downing, T.E., Rothman, N., Groupman, J.D. and Weston, A. (1994): Identification of 1-hydroxypyrene glucuronide as a major pyrene metabolite in human urine by synchronous fluorescence spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry, *Carcinogenesis* **15**, 483-487.
- Tjelle, R., Ryberg, D., Haugen, A., Nebert, D.W., Skaug, V. and Brresen, A.L. (1991): Human CYP1A1(cytochrome P-450) gene: lack of association between the MspI restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in Norwegian population, *Pharmacogenetics* **1**, 20-25.
- Til, M., Behnisch, P., Hagenmaier, H., Bock, K.W. and Schrenk, D. (1997): Dioxinlike components in incinerator fly ash: A comparison between chemical analysis data and results from a cell culture bioassay, *Environ. Health Perspect.* **105**, 1326-1332.
- Wärholm, M., Alexandrie, A., Hogberg, J., Sigvardsson, K. and Rannug, A. (1994): Polymorphic distribution of glutathione transferase activity with methyl chloride in human blood, *Pharmacogenetics* **4**, 307-311.
- Wu, M.T., Huang, S.L., Ho, C.K., Yeh, Y.F. and Christiani, D.C. (1998): Cytochrome P450 1A1 MspI polymorphism and urinary 1-hydroxypyrene concentrations in coke-oven workers, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7**, 823-829.
- Xu, X., Kelsey, K.T., Wiencke, J.K., Wain, J.C. and Christiani, D.C. (1996): Cytochrome P450 CYP1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**, 687-692.
- Zhong, S., Howie, A.F., Ketterer, B., Taylor, J., Hayes, J.D., Beckett, G.J., Wathen, C.G., Wolf, C.R. and Spurr, N.K. (1991): Glutathione S-transferase m locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility, *Carcinogenesis* **12**, 1533-1537.
- van Delft, J.H.M., Steenwinkel, M.S.T., van Asten, J.G., van Es, J., Kraak, A. and Baan, R.A. (1998): Monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a carbon-electrode manufacturing plant, *Ann Occup Hyg* **42**, 105-114.
- Vos, R.M.E., van Welie, R.T.H., Peters, W.H.M., et al. (1991): Genetic deficiency of human class mu glutathione S-transferase isoenzymes in relation to the urinary excretion of the mercapturic acids of Z- and E-1,3-dichloropropene, *Arch Toxicol* **65**, 95-99.