



메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구

OSHRI

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



연구보고서

메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구

서동석

산업재해예방

안전보건공단

산업안전보건연구원



요약문

- 연구기간 2022년 02월 ~ 2022년 11월
- 핵심단어 발암원성, 비유전적독성, 후생유전학, 메틸화
- 연구과제명 메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구

1. 연구배경

암은 공중보건의 중요한 문제로 전 세계적으로 주요 사망 원인이며 향후 더욱 증가할 것으로 예측되고 있다. 이로 인하여 경제적인 부담도 증가될 것으로 예측된다. 암의 발생은 복잡한 과정으로 원인을 이해하거나 치료방법을 찾는 것은 매우 어려운 일이다. 그러나 암 발생의 위험 요소를 회피하거나 예방할 수 있으며 조기에 발견하면 치료도 가능 할 수 있다.

암은 다양한 환경적인 원인에 의해 발생한다. 잠재적인 발암원성을 확인하기 위해서는 실험적으로는 랫드와 마우스를 이용하는 장기 생물분석이 수행되고 있으나 비경제적이며 동물 윤리적인 문제가 있다. 그래서 대규모 스크리닝 프로그램에 사용하데 어렵다.

암의 발생은 화학물질이 체세포 돌연변이를 통해 발생된다는 것이 지배적이고, 이러한 생각은 암 연구와 사전 스크리닝 전략에 영향을 주었다. 화학물질의 규제와 관련해서는 in vitro 분석으로 박테리아 돌연변이 시험을 수행한 후 in vitro 포유동물 세포를 이용한 시험을 수행하고, 이후 동물에서 발현되는지 여부를 평가하기 위해 단기 in vivo 연구를 수행한다. 그러나 유전독성 화학물질은 이러한 사전 스크리닝 전략으로는 확인되지 않을 수도 있고, 비유전독성 발암 물질은 모든 유전독성 검사에서 음성이므로 확인되지 않고 있다. 그러나 비유

전독성 발암물질은 국제암연구소인 IARC 발암물질 분류에서 상당히 존재하고 있으며 그와 관련된 잠재적인 위험을 포함하고 있다. 더욱이 가까운 미래에는 유전독성 물질 대비 비유전독성 물질의 비율은 더욱 증가 할 것으로 예측되고 있다.

최근에는 많은 동물의 희생이 따르는 설치류를 이용한 생물 검정을 회피하기 위해 세포형질전환 검정(CTA)이 다시 각광을 받고 있다. 생체 내 신생물 발생 과정의 여러 단계를 모방하는 *in vitro* CTA는 가능한 비유전독성 물질을 검출하는 데 유용한 것으로 보고되어 있다. 특히 Bhas 42 세포를 이용하는 CTA는 개시제 없이도 촉진제 활성을 확인할 수 있다. 많은 연구에서 비유전독성 물질의 작용 방식은 DNA 메틸화의 변형, 히스톤 변형, 비암호화 RNA 및 염색질 재형성을 포함하는 후생 유전학적 변형을 포함하고 있어 후생 유전학적 조절 장애는 거의 모든 사람에서 암의 특징이다. 이러한 변형 중에서 DNA 메틸화는 명백히 유전적이며 후생유전학적 마커로 평가되고 있다. 이러한 변형된 DNA 메틸화에 따른 유전자 발현 패턴은 다양한 암과 관련이 있다.

본 연구는 산업화학 물질인 Anisol, 2-methoxyethanol, 1,2-dichlorobenzene이 세포 형질전환을 유도하는 동안 메틸화 특성에 관한 정보를 분석하여 발암 관련 후생유전학적 평가를 위하여 수행하였다.

2. 주요 연구내용

1) 시험물질

본 연구에서는 작업 환경내에서 노동자들에게 노출이 가능하고 유전독성 시험의 결과가 음성이며 발암성 평가가 필요한 산업화학물질인 Anisol, 2-methoxyethanol, 1,2-dichlorobenzene을 시험물질로 선정하였다. 또한, 음성대조물질로는 0.1% DMSO (Dimethylsulfoxide)를, 양성대조물질로는 TPA(12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate)를 선정하였다.

2) 세포주 및 세포배양

본 연구에 사용한 세포주는 특별히 발암 잠재력이 있는 화학물질에 반응하여 형질 전환되어 비교적 높은 형질전환 빈도를 유도하고, 반응 잠복기가 비교적 짧으며, 화학물질의 발암 가능성 평가에 필요한 배양 용기를 적게 사용하는 장점이 있는 Bhas 42 세포주를 사용하였다.

마스터 셀 스톱과 워킹 셀 스톱 위한 세포의 배양은 10% FBS(M10F)가 보충된 MEM(Minimum Essential Medium) 배지를 이용하여 배양하였다. 시험물질을 처리하기 3일 전에 세포를 DMEM/F12(Dulbcco's Modified Eagle Medium)에 5% FBS가 보충된 DF5F에서 유지관리 및 세포 계대 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 및 95% O₂ 하에 가습된 배양기에서 배양하였다.

3) 세포형질전환시험을 통한 메틸화 분석

선정된 산업화학물질의 후생유전학적 평가를 위한 일환으로 염색체내 메틸화 분석을 수행하기 위하여 산업화학물질을 세포형질시험(촉진시험)을 수행하고 Illumina사에서 제안한 시험방법에 따라 DNA를 추출하여 Illumina Infinium Mouse Methylation BeadChip로 >285K CpGs 부위에 대해 메틸화 분석을 조사하였다.

분석결과 모든 시험 노출군에서는 주로 Hyper CpGs 구역에서 메틸화가 높게 관찰되었으나, Anisol과 1,2-dichlorobenzene 노출군은 대조군과의 메틸화는 유사한 차이를 보였고, 2-methoxyethanol 노출군은 다소 높은 메틸화 경향을 보였다. 메틸화된 기능적 위치는 TSS1500 및 TS200 프로모터 부위와 염색체의 Body 위치였으나 대조군과 각 시험물질 노출군간의 평균 beta-value의 절대 값이 주로 0.2 이내 낮은 범위의 관계를 보였다.

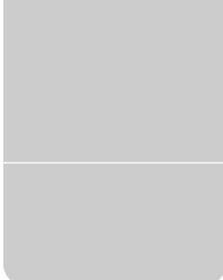
이러한 결과로부터 선정된 산업화학물질은 CpG 구역에서 대조군간에 유의한 메틸화 차이를 보이지 않았고, 세포형질전환 시험에서 모두 음성의 결과를 보여서 메틸화 변화에 의한 후생유전학적 변화를 유발하지 않는 것으로 판단된다.

3. 연구 활용방안

산업화학물질(Anisol, 2-methoxyethanol, 1,2-Dichlorobenzene)에 대한 기전기반 후생유전학적 정보를 제공함으로써 산업화학물질의 발암성 평가를 위한 기전기반 연구를 위한 증거 가중자료로 활용될 수 있으며, 추후 산업화학물질의 통합적시험 평가를 통한 발암원성 평가에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

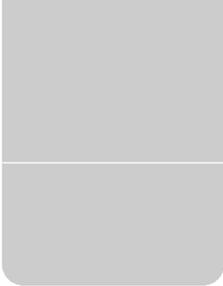
4. 연락처

- 연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학연구실 연구위원 서동석
 - ☎ 042) 869. 8514
 - E-mail seeds@kosha.or.kr



목 차

I. 서론	1
1. 배경	3
2. 목표	7
II. 연구방법	9
1. 시험물질	11
2. 세포주 및 세포배양	16
3. Cell growth assay	18
4. Cell transformation assay	21
5. DNA Methylation assay	23



목 차

Ⅲ. 결과 및 고찰	29
1. Cell growth assay	31
2. DNA Methylation assay	32
Ⅳ. 결론	67
참고문헌	71
Abstract	85

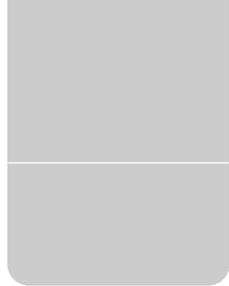
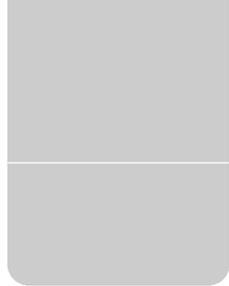


표 목차

〈표 II-1〉 시험물질별 처리농도	18
〈표 III-1〉 시험물질 별 세포 생존률	31
〈표 III-2〉 시험물질별 처리농도 설정	32
〈표 III-3〉 QC Result of DNA	33
〈표 III-4〉 DMSO 및 TPA 대비 각 시험물질 노출군의 Delta mean	47
〈표 III-5〉 Delta mean에 의한 Hyper, Hypo methylation CpGs의 수	50
〈표 III-6〉 Delta mean에 의한 기능적 methylation CpGs의 수	55

그림목차

[그림 II-1] Time line of the cell growth assay component of the promotion test	18
[그림 II-2] Time line of the promotion test	20
[그림 II-3] Infinium Methylation Array Procedure	22
[그림 II-4] Bisulfite conversion	25
[그림 III-1] 시험물질별 세포 생존률	32
[그림 III-2] Electrophoresis image of DNA for each samples	33
[그림 III-3] Number of detected CpGs by detection P value for each samples	34
[그림 III-4] Distribution of failure CpGs with detection P-value ≥ 0.05 ..	35
[그림 III-5] Check BMIQ for each test chemical treatment samples ..	36
[그림 III-6] Box plot to compare distribution of before/after BMIQ normalization and data transformation	38
[그림 III-7] Density plot o compare distribution of before/after BMIQ normalization and data transformation	39
[그림 III-8] Level plot using Pearson's correlation coefficient	39
[그림 III-9] Correlation matrix for all samples	40
[그림 III-10] Hierarchical clustering for all samples	40
[그림 III-11] MDS (Multidimensional scaling) plot for all samples	41
[그림 III-12] Distribution of methylation level for all samples	44
[그림 III-13] Scatter plot of methylation level for all samples	47



그림목차

[그림 III-14]	Histogram of Delta mean for all samples	50
[그림 III-15]	Number of Hyper, Hypo methylation CpGs by delta mean ..	55
[그림 III-16]	Box plot of Hyper, Hypo methylated CpGs by Delta mean ..	58
[그림 III-17]	Distribution of functional location for Hyper, Hypo methylated CpGs	62
[그림 III-15]	Number of Hyper, Hypo methylation CpGs by delta mean	57
[그림 III-16]	Box plot of Hyper, Hypo methylated CpGs by Delta mean	60
[그림 III-17]	Distribution of functional location for Hyper, Hypo methylated CpGs	64
[그림 III-18]	Heat map of the two-way Hierarchical clustering	67

I. 서론



I. 서론

1. 배경

암은 전 세계적으로 주요 사망 원인이며 여전히 공중보건의 중요한 문제로 전 세계적으로 연간 약 800만명이 암으로 사망하고 있으며 향후 20년 동안 약 70% 증가할 것으로 예상되고 있다.^{1,2)} 2010년에는 암으로 인한 연간 경제적 비용은 1조 1600억 달러로 추정되고 있어¹⁾ 경제적 부담 또한 증가될 것으로 판단된다. 수십 년 동안의 암 연구에도 불구하고 그 기전에 대한 연구는 여전히 수행되고 있다. 이는 효과적인 치료방법의 개발 및 예방을 위해서 매우 중요하다. 암은 다양한 인자와 다단계의 과정으로 100가지 이상의 명확한 암의 유형과 다른 기관에서 발견되는 종양의 하위 유형이 존재한다.³⁾ 이러한 복잡성으로 인해 질병의 기원을 이해하거나 치료 방법을 찾는 것은 매우 어렵다. 암의 30% 이상은 위험 요소를 회피함으로써 예방할 수 있고 나머지는 조기에 발견하거나 정확하게 치료할 수 있다.²⁾

화학적 발암 기전에 대한 연구와 효율적인 예방 전략 및 조치의 설계는 인간의 건강을 보호하기 위해서 매우 중요하다.^{4,5)} 암은 본질적으로 주로 환경적(화학물질의 노출, 생활방식, 음식 및 작업)인 원인이다: 암에 대한 다양한 유형의 증거에서 약 80%가 환경 구성 요소이다.^{4,6-10)} 암에 대한 잠재적인 발암성 영향을 확인하기 위하여 실험적으로 랫드와 마우스를 이용하는 장기 생물 검정을 설계하여 수행되고 있다. 그러나 이러한 생물 검정은 시간과 비용이 많이 소요되고 많은 동물의 희생이 요구된다. 이러한 이유로 대규모 스크리닝 프로그램에 실제로 사용할 수 없다. 이러한 여러 이유로 화학적 발암성은 단기 생물분석¹¹⁻¹³⁾에서 이론적 모델(즉, 구조-활성관계)에 이르기 까지 예측 모델을 만드는 것이 목표였다.^{5,14,15)}

암 발생의 체세포 돌연변이 이론은¹⁶⁾ 화학물질이 암을 유도한다는 것이

지배적이었고, 암에 대한 대부분의 연구와 사전 스크리닝 전략에 영향을 주었다.^{12,13,17)} 화학물질의 규제와 관련하여서는 화학물질의 유형 및 용도에 따라 크게 다르다. 그러나 지배적인 트렌드는 1단계에서 in vitro 분석으로 박테리아 돌연변이(예, Ames 시험) 시험을 먼저 수행한 다음 in vitro 포유동물 세포를 이용한 시험(유전자 돌연변이 또는 염색체 이상 감지)을 수행한다. 2단계에서는 1단계 in vitro 단계에서 검출된 돌연변이 가능성이 실제로 전체 동물에서 발견되는지 여부를 평가하기 위하여 단기 in vivo 연구(일반적으로 골수 세포유전학 분석)를 수행한다. 따라서 in vitro 시험의 음성 결과는 일반적으로 돌연변이가 없음을 나타내기에 충분한 것으로 고려된다. 반면 in vitro 시험의 양성의 결과는 화학물질이 돌연변이 유발 가능성을 나타내기에 충분한 것으로 간주된다(즉, 거짓 또는 허위일 수 있음).^{18~23)}

30년 이상 축적된 유전독성시험의 결과는 발암물질에 대한 사전 스크리닝 전략으로 과학적 가설의 결론을 도출할 수 있게 한다.¹⁷⁾ Ames 시험은 DNA 반응성 화학물질에 대한 발암성을 가장 잘 예측하는 것으로 보인다. 살모넬라 균에서 음성이지만 다른 in vitro 분석(예, 염색체 이상)에서는 양성인 화학물질의 경우 발암성과 상관관계가 없다는 예측력은 분명하지 않다(다른 in vitro 분석에서는 과도한 비율의 위양성 결과가 생성됨).^{13,24)} 다른 가설은 in vitro 분석이 양성인 경우 in vivo 유전독성 분석을 통해 확인 되어야 한다. 그러나 기존의 in vivo 시험은 민감하지 않고, 유전독성이 분명한 많은 발암물질에 대해 대부분 위음성 결과를 제공한다는 것이 입증되었다.^{20,25)} 결과적으로 유전독성 화학물질은 현재의 사전 스크리닝 전략으로는 탐지되지 않을 수 있다.

또 하나의 중요한 문제는 후생유전 또는 비유전독성 발암물질을 확인하는 것이다. 비유전독성 발암성은 더 파악하기 어렵고, 더 적게 연구되고 있으며, 때로는 인간에 대한 위해성(risk)이 적절히 평가되지 않고 있다.^{24~26)} 전통적으로 비유전독성 발암물질은 설치류 2년 발암성 생물검정에서 검출되었지만,^{29,30)} 새로운 규제 정책은 새로운 발암성 생물검정 수를 크게 줄이고³¹⁾ 유전독성의 엔드포인트에 의존하고 있다. 그러나 비유전독성 발암물질은 모든 유전독성

검사에서 음성이므로 확인되지 않는다. 비유전독성 발암물질을 검출하기 위한 대체법을 개발하는 정당성은 인체에서 알려진 발암물질(국제암연구소인 IARC의 발암물질 구분1에서 최대 25%) 중에서 상당히 존재하고 그와 관련된 상당한 잠재적인 위험을 포함하고 있다.³²⁾ 또한 DNA 반응성(구조경보 포함)에 대해 산업화학자들은 과학적 지식을 통해 새로운 디자인을 설계할 수 있기 때문에 환경에서 유전독성 발암성 물질 대비 비유전독성 물질의 비율이 가까운 미래에는 증가 할 가능성이 있다.

또한, REACH에 따르면 주요 시험 배터리가 유전독성이기 때문에 비유전독성 발암물질은 검출되지 않는다. REACH 이전에는 대부분 비유전독성 발암물질은 랫드와 마우스에 대한 90일 아만성독성시험, 독성동태 및 분포 연구, 랫드와 마우스 모두에 대한 2년 발암성 생물검정을 포함하는 다양한 시험을 사용하여 확인되었다. 설치류 생물 검정을 대규모로 사용하는 것을 회피하기 위해 채택된 사전 스크리닝 방법의 결합으로 세포형질전환 검정(CTA)이 다시 각광을 받게 되었다. 이는 비유전독성 발암물질을 평가하기 위해 수년 동안 제안되었지만 과학계 내에서는 여러 차례 호불호를 받았다. CTA는 생체내 다단계 과정의 일부 단계를 모방하고 있다. 세포형질전환은 발암성 세포의 특징인 배양된 세포에서 특정표현의 변형을 유도하는 것으로 정의된다.³³⁾ 이러한 표현형의 변형은 포유동물 세포를 발암물질에 노출시켜 유도 될 수 있다. 악성 세포의 특성을 획득한 형질전환 세포는 감수성 동물에서 종양을 유도하는 능력이 있다.^{34,35)} 최근 발암성 사전 스크리닝에 대한 CTA의 기여가 재검토 되었다. 경제협력개발기구(OECD)는 CTA를 재고하고 상세한 보고서를^{36,37)} 발표했고 ECVAM (European Center for Validation of Alternative Methods)는 CTA의 사전 밸리데이션을 수행하였다.^{38,39)}

비유전독성의 발암물질은 발암 과정에서 DNA의 손상 없이 다양한 기전을 통해 종양을 유도한다. IARC 그룹 1, 2A 및 2B 발암물질의 12% (45/371)는 유전독성이 없는 것으로 보고되어 있다.⁴⁰⁾ 생체 내 신생물 발생 과정의 여러 단계를 모방하는 in vitro CTA는 가능한 비유전독성 물질을 검출하는 데 유용한

것으로 보고되어 있다.^{41,42)} 특히 Bhas 42 세포를 이용하는 CTA는 개시제 없이도 촉진제의 활성을 확인할 수 있으며 BALB/c 3T3 CTA 및 다른 CTA 보다 우수하다(밸리데이션 연구 보고서).^{43,44)} 최근 몇 년 동안 Bhas 42 CTA는 여러 포괄적인 국제 검증 연구^{43,45,46)}를 거쳤으며 현재 OECD 지침문서⁴⁷⁾로 되어있다.

최근에는 비유전독성 물질의 위해성 평가에서 기전기반 접근 방식의 중요성이 높아졌다. 그러나 현재 CTA는 비유전독성 물질의 발암 과정의 주요 분자 이벤트에 대한 정보를 제공하지 않는다. 실제로 비유전독성 물질은 후생 유전학적 변화, 종양 촉진, 내분비 조절, 면역 억제 및 염증 반응을 포함하여 다양한 작용 방식을 가지고 있다.^{48~50)} 이러한 다양성으로 인해 하나의 시험방법으로 모든 비유전독성 물질을 감지하는 것은 불가능하다.⁴⁰⁾ 아마도 비유전독성 물질의 모든 작용 방식을 포함하는 시험 배터리의 수행은 시간이 많이 소요되고 복잡하다. 많은 연구에서 비유전독성 물질의 작용 방식은 DNA 메틸화의 변형, 히스톤 변형, 비암호화 RNA 및 염색질 재형성을 포함하는 후생 유전학적 변형을 포함하고 있다.^{51,52)} 그래서 후생 유전학적 조절 장애는 거의 모든 사람에서 암의 특징이다.⁵³⁾ 이러한 변형 중에서 DNA 메틸화는 명백히 유전적이며,⁵⁴⁾ DNA 메틸화를 표준 후생유전적 마커⁵⁵⁾로 간주된다. 또한, 변형된 DNA 메틸화에 따른 유전자 발현 패턴의 변화는 다양한 암과 관련이 있다.⁵⁶⁾

특히, DNA CpG 섬에서 시토신 염기의 메틸화는 장기 발달, 노화 및 다양한 질병 상태에서 중요한 후생유전학적 조절기전이다.⁵⁷⁾ 종양 억제 유전자의 프로모터 영역에 위치한 CpG 섬의 과메틸화는 암에서 유전자 조절을 위한 가장 일반적인 기전 중 하나로 확고하게 확립되어 있다.^{58,59)} 따라서 CpG 섬의 DNA 메틸화 상태에 대한 고처리량 프로파일링은 후생유전학적 영향을 이해하는 데 중요하다.^{60~62)} Microarray 기반 Illumina Infinium 메틸화 분석은 높은 처리량, 높은 정확도, 작은 샘플 요구량 및 상대적으로 경제적이므로⁵⁷⁾ 최근 후생유전학 연구에 널리 사용되고 있다.^{63~65)}

2. 목표

본 연구는 작업 환경내에서 노동자들에게 노출이 가능하고 유전독성시험 결과가 음성으로 발암성 규명이 필요한 산업화학물질(2-methoxyethanol, Anisol, 1,2-dichlorobenzene)의 발암 기전과 관련된 후생유전학적 평가의 일환으로 염색체내 메틸화를 분석하기 위하여 수행하였다. 따라서 산업화학물질인 Anisol, 2-methoxyethanol, 1,2-dichlorobenzene이 세포 형질전환을 유도하는 동안 메틸화 특성에 관한 정보를 분석함으로써 암 관련 후생유전학적 평가를 수행하였다.

II. 연구방법



II. 연구방법

1. 시험물질

1) 2-methoxyethanol(CAS No. 109-86-4)

(1) 물리·화학적 특성

글리콜에테르 부류에 속하는 2-Methoxyethanol(또는 methyl cellosolve)는 주로 용매로 사용되는 유기 화합물로서 다음과 같은 물리·화학적 특성을 가지고 있다.

- 가) 화학식 : $C_3H_8O_2$
- 나) 몰 질량 : 76.09 g/mol
- 다) 외형 : 무색 액체
- 라) 냄새 : 에테르류⁶⁶⁾
- 마) 밀도 : 0.965 g/cm³
- 바) 녹는점 : -85 °C(-121 °F, 188 K)
- 사) 용해도 : 물에 섞일수 있음⁶⁶⁾
- 아) 증기압 : 6 mmHg(20 °C)⁶⁶⁾

(2) 용도

- 가) 2-Methoxyethanol은 다양한 유형의 화합물을 용해하고, 물 및 기타 용매와 혼합되고 유명한 glycol ethers 용매 부류에 속한다.
- 나) 2-Methoxyethanol은 바니시, 염료, 수지 등 다양한 용도의 용매로 사용되고, 비행기 제빙 용액의 첨가제로도 사용된다.

다) 유기금속 화학에서는 일반적으로 carbonylchlorohydridotris (triphenylphosphine)ruthenium (II)와 같은 Vaska 착물 및 관련 화합물 합성에 사용된다. 이런 반응 동안 알코올은 수소화물과 일산화탄소의 공급원으로 된다.

(3) 독성 정보

- 가) 2-Methoxyethanol은 생체내에서 다양한 증식 조직에 독성영향이 있다. 특히 조혈 및 림프기관, 고환의 정세관 상피 및 자궁의 배아 및 태아 조직이 영향을 받으며, 고환의 손상을 유발한다.⁶⁷⁾
- 나) 고농도에 노출된 근로자는 과립구 감소증, 거대적혈구 빈혈, 정자 과소증 및 무정자증의 위험이 있다.⁶⁷⁾
- 다) 2-Methoxyethanol은 알코올 탈수소효소에 의해 Methoxyacetate로 산화되어 소변으로 배설되고, methoxyacetate는 2-Methoxyethanol 관련 독성의 주된 원인으로 보고되어 있다.⁶⁸⁻⁷¹⁾
- 라) Salmonella 균주에 대한 돌연변이 유발성에서는 점 돌연변이를 일으킬 수 있다는 증거는 없다.⁷²⁾
- 마) 인간 섬유아세포에서 DNA 복구 증가를 유도하지 않았다. 생체 대사체가 없는 경우 DNA 합성이 약간 억제되었다.⁷²⁾
- 바) 랫드를 이용한 우성 치사시험에서 돌연변이 유발 증거는 없었다.⁷²⁾
- 사) 랫드의 골수에 대한 세포유전학적 연구에서 염색체 손상의 증거는 나타나지 않았다.
- 아) Drosophila melanogaster에서 성 관련 열성 치사시험 결과 재현할 수 없는 유전독성 효과가 나타날 수 있어 확실히 배제할 수 없었다.
- 자) 수컷 랫드에 대한 우성 치사시험에서 고농도 흡입 노출시 불임이 발생하였다.⁷²⁾

(4) 노출규정

- 가) 우리나라와 ACGIH의 경우 허용기준(8시간-TWA)을 5 ppm으로 설정하고 있다.
- 나) OSHA(1989)에서는 Permissible Exposure Limits(PEL)을 8시간-TWA로서 25 ppm으로 설정하고 있다.
- 다) 2-Methoxyethanol의 생식장애 및 성장 건강장애를 예방하기 위해 1993년에는 PEL을 0.1 ppm으로 낮출 것을 제안되었다.⁷³⁾

2) Anisol(CAS No. 100-66-3)

(1) 물리·화학적 특성

Anisol 또는 methoxybenzene은 주로 합성으로 만들어지며 다른 합성 화합물의 전구체이며 에테르로 다음과 같은 물리·화학적 특성을 가지고 있다.⁷⁴⁾

- 가) 화학식 : C_7H_8O
- 나) 몰 질량 : 108.14 g/mol
- 다) 외형 : 무색 액체
- 라) 냄새 : 아니스씨를 연상시키는 냄새
- 마) 밀도 : 1.30 g/cm³
- 바) 녹는점 : -17.03 °C(
- 사) 용해도 : 0.991
- 아) 증기압 : 2.42 mmHg(25 °C)

(2) 용도

- 가) Anisol은 실용적이고 교육적으로 가치가 있는 표준시약이다.⁷⁸⁾
- 나) Anisol은 향수, 곤충 페로몬 및 의약품의 전구체이다. 예로 합성 anethole은 anisol로 부터 제조된다.

(3) 독성 정보

가) Anisol은 3개의 노출경로에서 유해지 않다.⁷⁵⁾

- 랫드 경구 LD₅₀ 3700 mg/kg bw
- 마우스 경구 LD₅₀ 2800 mg/kg bw
- 토끼 피부 LD₅₀ >5000 mg/kg bw
- 랫드 gmqdlq LC₅₀ >6.51 mg/L

나) 주요 유해성은 가연성이다.⁷⁶⁾

다) 유전독성시험인 in vitro 복귀돌연변이시험(Ames 시험), 유전자 돌연변이 시험(마우스 리포마 L5178Y 세포), 염색체이상시험에서 모두 음성이다.⁷⁶⁾

(4) 노출규정

국내 및 외국법에 의한 규제는 “해당없음”이다.⁷⁶⁾

3) 1,2-dichlorobenzene(CAS No. 95-50-1)

(1) 물리·화학적 특성

1,2-dichlorobenzene 또는 orthodichlorobenzene은 인접한 2개의 염소 원자로 구성된 벤젠의 유도체로써 다음과 같은 물리·화학적 특성을 가지고 있다.

- 가) 화학식 : C₆H₄Cl₂
- 나) 몰 질량 : 147.0 g/mol
- 다) 외형 : 무색 액체
- 라) 냄새 : 나프탈렌
- 마) 밀도 : 1.30 g/cm³(25 °C)
- 바) 녹는점 : -17.3 °C(1.35 °F, 256.12 K)
- 사) 용해도 : 155.8 mg/L(25 °C)
- 아) 증기압 : 2.08 hPa(25 °C)

(2) 용도

- 가) 1,2-dichlorobenzene는 주로 농약 합성의 중간체인 1,2-dichloro-4-nitrobenzene의 전구체로 사용된다. 그리고 다용도의 고비점 용매로도 일부 사용된다.
- 나) 풀러렌(fullerenes)을 용해하고 작업하는 데 선호되는 용매이다.
- 다) 이것은 흰개미, 메뚜기 천공충을 위한 살충제이며, 역사적으로는 미국 산림청에서 널리 퍼진 껍질 딱정벌레 발생을 퇴치하기 위해 사용 했다.
- 라) 금속 표면의 탄소기반 오염을 제거하는 데 사용된다.

(3) 독성 정보

- 가) 1,2-dichlorobenzene의 사람 노출 자료를 따르면 100 ppm 농도가 눈과 호흡기에 산발적인 자극을 유발하는 것으로 보고되어 있다.⁷⁷⁾
- 나) 복귀돌연변이시험 결과 돌연변이성은 관찰되지 않았다.⁷⁸⁾
- 다) 마우스 림포마 분석 결과 대사체가 있는 경우 양성인 결과를 보였다.⁷⁹⁻⁸¹⁾
- 라) 소핵시험 결과 전체적으로 음성으로 평가되었다.^{80,82)}
- 마) 사용 가능한 자료, WoE 평가, 노출 평가 및 용도에 대한 문서를 업데이트한 후 전문적인 사용이 예상되지 않으므로 인체 노출이 중요하지 않다는 사실을 기반으로 평가 회원국은 1,2-dichlorobenzene은 돌연변이를 유발하지 않으며 돌연변이에 대한 우려가 제거되었다고 결론지었다.⁸³⁾

(4) 노출규정

OSHA와 NIOSH는 8시간-TWA를 50 ppm으로 설정했다.⁷⁷⁾

4) 대조물질

- 가) 음성대조물질로는 시험물질의 용매인 DMSO(Dimethylsulfoxide), Anhydrous (invitrogen™, Ca No. D12345)를 사용하였다. 배지의 최종 용매 농도는 0.1%로 하였다.
- 나) 양성대조물질로 TPA(12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) (Sigma-Aldrich, CAS No. 16561-29-8)을 0.1% DMSO를 이용하여 최종농도 50 ng/ml로 처리 하였다.

2. 세포주 및 세포배양

1) 세포주

Bhas 42 세포주(Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank No. JCRB0149)는 v-Ha-ras 종양 유전자를 BALB/3T3 A31-1-1 (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank No. JCRB0601) 세포주에 안정적으로 형질 감염시켜 형성된 클론으로 유도되었다.⁸⁴⁾ 또 BALB/3T3 A31-1-1 세포와 유사하게 형질 전환되지 않은 Bhas 42 세포는 밀도 의존적 접촉에 의해 억제되는 단일 세포층을 형성하며 융합될 때까지 성장시킨 세포를 분리하여 누드 마우스에 피하 이식할 경우 비종양성이다. 그러나 발암성 물질에 자극 노출된 세포는 형태학적으로 변형되고 융합성 단층위에 형질전환된 병소가 별개의 콜로니로 형성된다. 이러한 변형된 병소는 생체내에서 종양을 형성할 수 있다.⁸⁵⁾ 형질전환 빈도는 형태학적 기준을 사용하여 발암성 손상을 받은 Bhas 42 세포 중 형질 전환된 병소의 매개변수를 열거하여 정량화할 수 있다.

2) 세포배양

(1) 세포보존

Bha 42 세포를 주의하여 세포의 밀도가 적절히 유지되도록 3회 계대 배양 하였다.

가) 세포는 100 mm dish에서 10% FBS(M10F)와 함께 세포 밀도가 70% 초과하지 않도록 배양하였다.

나) 그런 다음 적절한 동결 보존제(5% 디메틸 설피록사이드)를 포함하는 M10F에 5×10^5 cells/ml의 세포 밀도로 현탁하여 0.5 ml 분취량으로 동결 보존되는 마스터 셀 스톱을 만들었다.

다) 한 개의 스톱 마스터 세포를 해동하여 두 번째 동결보존 전에 M10F에서 2회 계대 배양하였다.

라) 이러한 세포 집단으로 부터 약 20개의 워킹 셀 스톱을 동결 보존하였다 (2.5×10^5 cells/0.5 ml).

(2) 세포배양

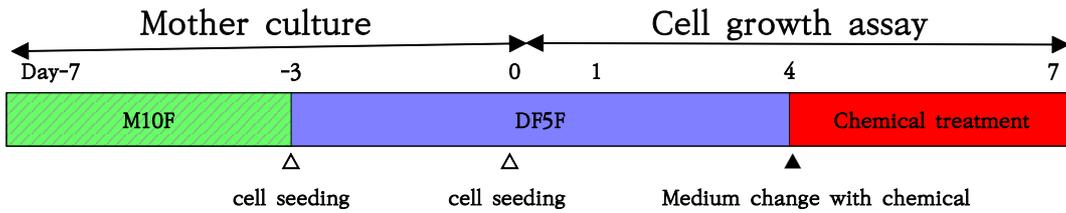
마스터 셀 스톱과 워킹 셀 스톱 위한 세포의 배양은 10% FBS(M10F)가 보충된 MEM(Minimum Essential Medium) 배지에서 배양하였다. 컴플리트 세포의 60~70%만 계대 배양하였다. 세포는 5% CO₂ 및 95% O₂ 하에 가습된 배양기에서 배양하였다. 시험물질을 처리하기 3일 전에 세포를 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에 5% FBS가 보충된 DF5F에서 유지관리 및 세포 계대 배양하였다.

(3) 세포주의 적절한 플레이팅 효율(PE, Plating efficiency)

형질전환 분석에 적합한 FBS 로트를 확인하기 위하여 하나의 워킹 스톱 세포를 이용하여 사용하는 6 well 플레이트에 웰당 100개의 세포를 플레이팅하여 10일간 배양하여 자발적인 세포 변형이 유발되지 않는 것을 확인하였다.

3. Cell growth assay

Cell growth assay은 각 시험물질의 적절한 처리 농도를 결정하기 위해 형질전환 분석 전에 수행하였다. 아래의 그림과 같이 수행하였다.



[그림 II-1] Time line of the cell growth assay component of the promotion test

1) 처리농도

Cell growth assay를 위한 각 시험물질 별 처리농도는 아래의 표와 같이 처리하였다.

〈표 II-1〉 시험물질별 처리농도

시험물질	처리농도
DMSO	0.1%
TPA	50 ng/ml
Anisol	2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 $\mu\text{l/ml}$
2-methoxyethanol	2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 $\mu\text{l/ml}$
1,2-dichlorobenzene	2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06, 0.03 $\mu\text{l/ml}$

2) 시험절차

(1) 세포 해동: Day -7

Day -7에 워킹 스톱 셀을 빠르게 해동하여 0.5 ml(2.5×10^5 cells)을 10 ml M10F가 담긴 100 mm culture dish에 넣고 CO₂ 배양기에서 3일간 배양하였다.

(2) 세포 계대: Day -3

Day -3에 배양 중인 세포에서 배지를 제거하고 0.25% Trypsin-EDTA 1 ml을 넣고 CO₂ 배양기에서 약 2분간 처리하고, PBS 9 ml를 넣고 회수하여 냉장 상태에서 5분간, 3,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 그런 다음 세포를 재부유시켜 100 mm culture dish에 10 ml DM5F가 들어있는 2개의 dish에 dish당 1.0×10^5 cells를 계수하여 넣고 CO₂ 배양기에서 3일간 계대 배양하였다.

(3) 세포 파종: Day 0

Day 0에 배양 중인 세포에서 배지를 제거하고 0.25% Trypsin-EDTA 1 ml을 넣고 CO₂ 배양기에서 약 2분간 처리하고, PBS 9 ml를 넣고 회수하여 냉장 상태에서 5분간, 3000 rpm으로 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 그런 다음 세포를 재부유시켜 96 well plate의 각 well에 200개의 세포를 0.01 ml DM5F로 파종하였다.

(4) 시험물질 처리: Day 4

Day 4에 배양 중인 세포에서 배지를 제거하고 시험물질별 각 농도를 포함한 배지를 각 well 당 0.01 ml 넣고 3일간 처리하였다.

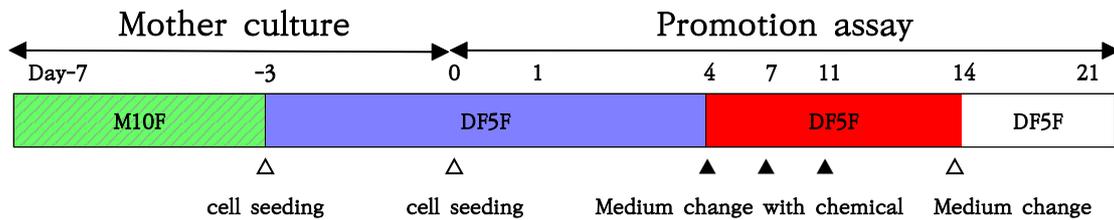
(5) 생존률 분석: Day 7

Day 7에 세포 생존률은 WST-8(Quanti-Max™ WST-8 Cell Viability Assay Kit)를 이용하여 다음의 절차에 따라 분석하였다.

- 가) 시험물질의 처리가 종료된 96 well 플레이트에 각 well에 Quanti-Max™ 10 μ l 넣고 배양기에서 0.5~4시간 반응 시켰다.
- 나) 1분간 가볍게 흔든 후 450 nm에서 플레이트 리더를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

4. Cell transformation assay; Promotion assay

Promotion assay의 시험 절차는 아래의 그림과 같이 수행하였다.



[그림 II-2] Time line of the promotion test

1) 처리농도

Cell transformation assay를 위한 각 시험물질 별 처리농도 Cell growth assay 결과를 기반으로 Anisol과 2-methoxyethanol은 1.0과 0.5 μ l/ml를, 1,2-dichlorobenzene는 0.2와 0.1 μ l/ml를 처리하였다. 또한, 음성대조물질인 DMSO는 0.1%, 양성대조물질인 TPA는 50 ng/ml를 처리하였다. 각 시험물질의 노출일은 세포 파종 후 4~14일 동안 노출하였으며 노출하는 동안 4, 7, 11일에 시험물질을 교체하며 처리하였다.

2) 시험절차

(1) 세포 해동: Day -7

Day-7에 워킹 스톱 세포 0.5 ml을 빠르게 해동하여 10 ml M10F 배지에 넣고 원심분리한 후 10 ml M10F 배지 담긴 100 mm 배양 dish에 넣었다 (2.5×10^5 cells).

(2) 세포 계대: Day -3

Day -3에 배양 중인 세포를 Trypsin-EDTA로 처리하고 10 ml DF5F 배지에 넣고 원심분리한 후 10 ml DF5F 배지 담긴 2개의 100 mm 배양 dish에서 배양하였다(1.0×10^5 cells/dish).

(3) 세포 파종: Day 0

Day 0에 배양 중인 세포를 Trypsin-EDTA로 처리하고 6웰 플레이트의 각 웰당 4,000 cells/2 ml로 파종하였다.

(4) 시험물질 처리: Day 4, 7, 11

Day 4, 7, 11에 배양 중인 배지를 제거하고 시험물질별 각 농도를 포함한 새로운 배지로 교환하여 세포를 재노출 시켰다.

(5) 배지 교환: Day 14

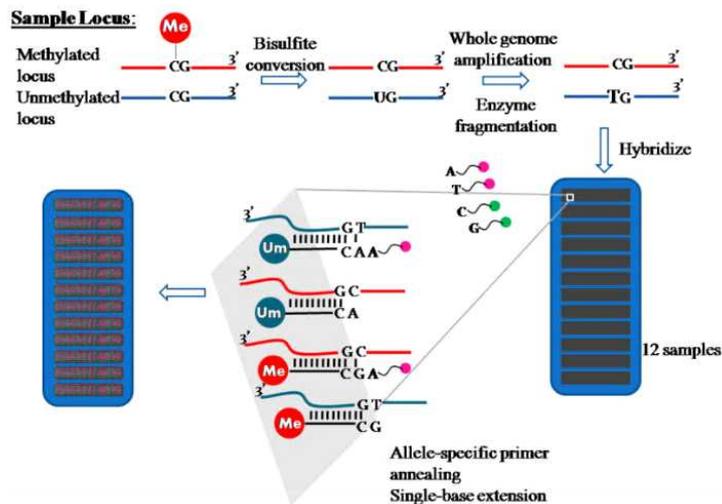
Day 14에 처리 중인 배지를 제거하고 시험물질이 함유되지 않은 새로운 배지로 교체하였다.

(6) 세포 수거: Day 21

Day 21에 배양 중인 세포를 PBS 2 ml로 세척한 다음 Trypsin- EDTA 200 μ l로 3분간 처리하고 PBS 2 ml을 넣어 회수하여 냉장 상태에서 5분간, 3000 rpm으로 원심 분리하여 펠렛 형태로 세포를 수집하여 DNA을 추출하기 전까지 냉동 (-70 $^{\circ}$ C)보관 하였다.

5. DNA Methylation assay

DNA 메틸레이션의 분석은 다음과 같은 절차에 따라 다양한 메틸롬 영역에서 285K 이상의 CpGs의 특성을 갖는 Infinium Mouse Methylation BeadChip kits(Illumina Inc., San Diego, CA)를 이용하여 (주마크로젠(서울특별시 강남구 테헤란로 238)에서 수행하였다.



[그림 II-3] Infinium Methylation Array Procedure

1) DNA 추출

세포로부터 DNA의 추출은 QIAwave DNA Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., Germany)을 이용하여 다음의 절차에 따라 수행하였다.

- (1) 냉동 보관된 세포를 해동한 다음 PBS를 추가하였다. 세포수가 적절한(최대 5×10^6)지 확인하고 4 μl RNase A(100 mg/ml)를 추가한 다음 마이크로 튜브를 밀봉하고, 볼텍스로 혼합하고 실온에서 5분간 배양하였다.
- (2) 각 샘플에 에탄올이 추가되지 않은 Buffer AL 200 μl 를 추가하였다.
- (3) 마이크로 튜브를 적절하게 밀봉하고 마이크로 튜브의 렉 위에 투명 커버를 놓고 렉을 15초 동안 위아래로 강하게 흔든 다음 원심분리기가 3000 rpm에 도달하도록 한 다음 원심분리기를 중지하였다. 그런 다음 배양하는 동안 캡 위에 무게를 올려놓고 56°C에서 10분간 배양하였다.
- (4) 캡을 조심스럽게 제거하고 각 샘플에 200 μl 에탄올을 추가하고 캡으로 마이크로 튜브를 밀봉하였다. 마이크로 튜브 렉위에 투명한 덮개를 놓고 15초 동안 렉을 위아래로 세게 흔들었다.
- (5) S-Block 위에 DNeasy 96 플레이트를 놓고 마이크로 튜브에서 캡을 제거하고 용해 혼합물(최대 900 μl)를 DNeasy 96 플레이트의 각 well로 조심스럽게 옮겼다.
- (6) AirPore 테이프 시트로 DNeasy 96 플레이트를 밀봉하고 6000 rpm에서 4분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 모든 용해물이 각 well에 있는 막을 통과했는지 확인하고, well에 남아있는 경우에는 추가로 4분 동안 원심분리하였다.
- (7) 테이프를 제거하고 각 샘플에 Buffer AW1 500 μl 를 조심스럽게 추가 하였다. 새로운 AirPore 테이프 시트로 각 DNeasy 96 플레이트를 밀봉 하고 6000 rpm에서 2분간 원심분리하였다.

- (8) 테이프를 제거하고 각 샘플에 Buffer AW2 500 μ l를 조심스럽게 추가하였다. AirPore 테이프 시트로 DNeasy 96 플레이트를 밀봉하지 않고 6000 rpm에서 15분간 원심분리하였다.
- (9) 새로운 Elution Microtubes RS의 새로운 렉에 DNeasy 96 플레이트를 올바른 방향으로 놓았다. DNA를 용출하기 위하여 각 샘플에 200 μ l Buffer AE를 추가하고 DNeasy 96 플레이트를 새로운 AirPore 테이프 시트로 밀봉한 다음 실온에서 1분 배양하고 6000 rpm에서 4분 동안 원심분리하였다.
- (10) DNA의 수율을 높이기 위하여 9번 단계를 반복한 다음 사용하기 전까지 보관을 위하여 Elution Microtubes RS를 새로운 캡으로 밀봉하여 보관하였다.

2) DNA 품질관리

펠렛 형태의 세포로부터 DNA를 추출하여 DNA 양 및 품질에 대해서 다음과 같은 방법으로 확인하였다.

(1) DNA량 측정

synergy HTX를 이용한 picogreen (Promega, cat. #E2670) 방법으로 수행하였다. 일반적인 오염물질이 있는 경우에도 dsDNA를 특이적이고 정확하게 정량하는 형광기반의 정량화로 DNA 양을 정량화 하였다.

(2) DNA 순도 분석

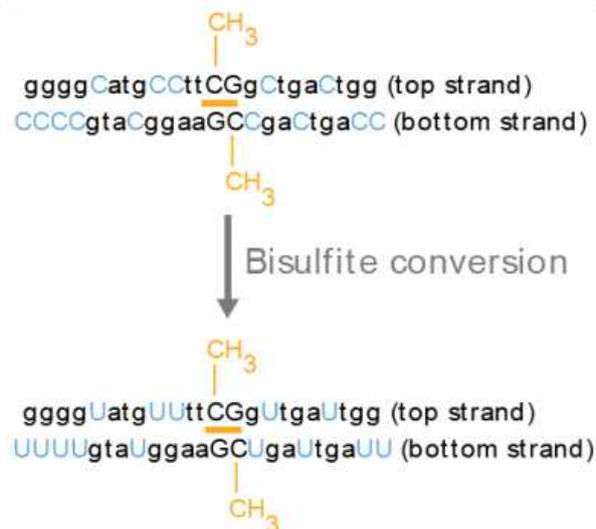
DNA 양을 측정은 NanoDrop 장비를 이용하여 수행하였다. 260 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량화하였다. 순도가 1.7~2.0 값은 비교적 DNA의 순도가 높은 것으로 간주하였다.

(3) DNA 상태 평가

샘플에서 DNA의 상태는 겔 전기 영동법을 이용하여 확인하였다. 세제나 단백질과 같은 불순물은 DNA 밴드가 번지게 보일 수 있다. 260 nm 판독을 방해하는 RNA는 종종 겔 바닥에서 보일 수 있으며, 목표 밴드 아래의 사다리 또는 번지게 보이면 DNA에 흡집이나 다른 손상이 있을 수 있음을 나타낼 수 있다.

3) BCD(bisulfite-converted DNA) 제작 (Pre-AMP)

계놈 DNA 샘플을 메틸화되지 않은 시토신을 우라실로 전환시키지만 메틸화된 시토신은 변환되지 않도록 중아황산염(bisulfite)을 처리하였으며 다음과 같은 절차로 수행하였다.



- (1) DNA Methylation Kit의 시험방법에 따라 DNA를 변성시키고 전환 시약을 추가하였다.
- (2) 16 사이클 동안 95°C에서 30초, 50°C에서 1시간 조건으로 thermal cycler에서 배양하였다:

- (3) DNA를 정제될 때까지 4°C에서 10분간 유지하였다.
- (4) 중아황산염으로 변환된 BCD 샘플을 BCD 플레이트로 옮겼다.
- (5) 플레이트를 가열 밀봉하고 -25~-15°C에 보관하였고, 분석하기 전에 플레이트를 완전히 해동하고 내용물을 볼덱스로 혼합하였다.

4) BCD 플레이트 준비

- (1) BCD 샘플을 실온에서 해동하였다.
- (2) BCD 샘플을 TCY 플레이트의 각 well에 10 μ l씩 넣었다.

5) MSA4 플레이트 제작(Pre-AMP)

- (1) MA1 20 μ l를 MSA4 플레이트에 추가 후 4 μ l의 BCD 샘플을 추가하였다.
- (2) 4 μ l의 0.1N NaOH를 첨가하여 BCD 샘플을 변성시켰다.
- (3) RPM 시약으로 BCD 샘플을 중화시켰다.
- (4) 마지막으로 MSM(Multi-Sample Amplification Master Mix)을 플레이트에 추가하였다.

6) MSA4 플레이트 배양(Post-Amp)

MSA4 플레이트를 Illumina Hybridization Oven에서 37°C에서 20-24시간 동안 배양하여 DNA의 샘플 량의 수천배 균일하게 증폭시켰다.

7) DNA 단편화(Post-Amp)

DNA를 효소로 단편화시켰고, dNTP, 프라이머 및 효소로 정제하여 에레이에 적용하였다. 과정은 엔드포인트 조각화를 사용하여 과잉으로 조각화 되는 것을 방지하였다.

8) DNA 침전(Post-Amp)

이소프로판올(isopropanol) 침전 후 4°C에서 원심분리하여 단편화된 DNA를 수집하였다.

9) DNA 재현탁(Post-Amp)

단편화되고, 재현탁된 DNA 샘플을 BeadChip에 분배하였다.

10) BeadChip에 Hybridization(Post-Amp)

- (1) 침전된 DNA를 Illumina Hybridization 오븐에서 BeadChip을 배양하여 BeadChip에 Hybridization시켰다.
- (2) 증폭되고 단편화된 DNA 샘플은 Hybridization 되는 동안 유전자좌 특이적 50 mer(1개의 비드에 공유적으로 결합됨)에 어닐링(annealing)된다.
- (3) Infinium I 분석에 대한 각 CpG 유전자좌에 해당하는 두가지 비드 유형: 한 비드 유형은 메틸화(C)에 해당하고 다른 비드 유형은 CpG부위의 메틸화 되지 않은(T) 상태에 해당된다. 하나의 비드 유형은 Infinium II 분석에 대한 각 CpG 유전자좌에 해당된다.

11) BeadChip 세척(Post-Amp)

Hybridization되지 않은 DNA와 비특이적으로 Hybridization된 DNA는 세척되고 BeadChip은 염색 및 확장을 준비하였다.

12) BeadChip 확장 및 염색(XStain)(Post-Amp)

칩은 모세관을 통과한 챔버에서 확장 및 염색되었다. 캡처된 DNA를 주형으로 하여 BeadChip의 올리고의 단일 염기 확장은 BeadChip의 감지 가능한 레이블을 통합하고 퀴리 CpG 사이트의 메틸화 수준을 결정한다.

13) 이미징 BeadChip

비드에 있는 단일 염기 확장 제품의 형광단을 여기 시키기 위해 레이저를 사용하는 Illumina iScan scanner을 이용하여 BeadChip을 표준 Illumina 절차에 따라 스캔하였다. 스캐너로 형광단에서 방출되는 빛의 고해상도 이미지를 기록하였다.

14) 자료 분석

스캔한 분석 자료의 내보내기 및 분석은 Illumina GenomeStudio v2011.1 (Methylation Module v1.9.0) 및 R3.6.0을 이용하여 수행되었다. Methylation 자료는 먼저 QC 및 색상 균형 검사를 한 후 모든 프로브의 평균을 기반으로 배경을 수정하고 크기를 조정 하였다. Beta-value 및 M-value 통계를 산출하였다. 전처리는 Bioconductor lumi 패키지에 포함된 방법으로 수행되었다.

Ⅲ. 결과 및 고찰



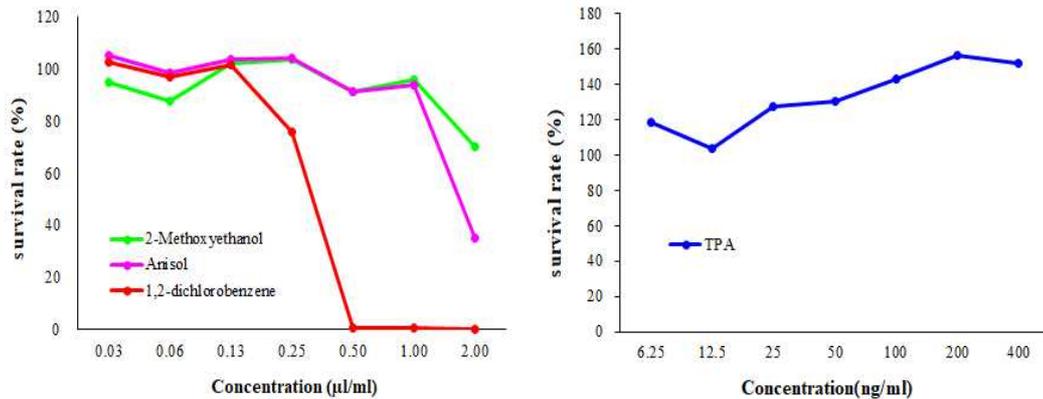
Ⅲ. 결과 및 고찰

1. Cell growth assay

Cell transformation assay(Promotion assay)에 처리용량을 설정하기 위하여 Cell growth assay를 수행하였다. Cell growth assay의 결과는 아래의 <표 Ⅲ-1>, [그림 Ⅲ-1]과 같다. Cell transformation assay를 위한 처리농도는 메틸화 분석을 위한 DNA 추출량을 감안하여 Anisol과 2-methoxy-ethanol은 1.0과 0.5 $\mu\text{l/ml}$ 를, 1,2-dichlorobenzene은 0.2와 0.1 $\mu\text{l/ml}$ 로 설정하였다<표 Ⅲ-2>.

<표 Ⅲ-1> 시험물질 별 세포 생존률

처리 농도 (ng/ml)	TPA (%)	처리 농도 ($\mu\text{l/ml}$)	Anisol (%)	처리 농도 ($\mu\text{l/ml}$)	2methoxy ethanol (%)	처리 농도 ($\mu\text{l/ml}$)	1,2dichloro benzene (%)
6.25	118.59	0.03	105.10	0.03	94.90	0.03	102.59
12.5	103.53	0.06	98.67	0.06	87.69	0.06	97.18
25.0	127.53	0.13	103.84	0.13	102.12	0.13	101.80
50.0	130.67	0.25	104.16	0.25	103.53	0.25	76.08
100.0	142.75	0.50	91.45	0.50	91.29	0.50	0.47
200.0	156.39	1.00	93.96	1.00	95.84	1.00	0.47
400.0	152.00	2.00	35.45	2.00	70.43	2.00	0.16



[그림 III-1] 시험물질별 세포 생존률

<표 III-2> 시험물질별 처리농도 설정

시험물질	처리농도
DMSO	0.1%
TPA	50 ng/ml
Anisol	1.0, 0.5 µl/ml
2-methoxyethanol	1.0, 0.5 µl/ml
1,2-dichlorobenzene	0.2, 0.1 µl/ml

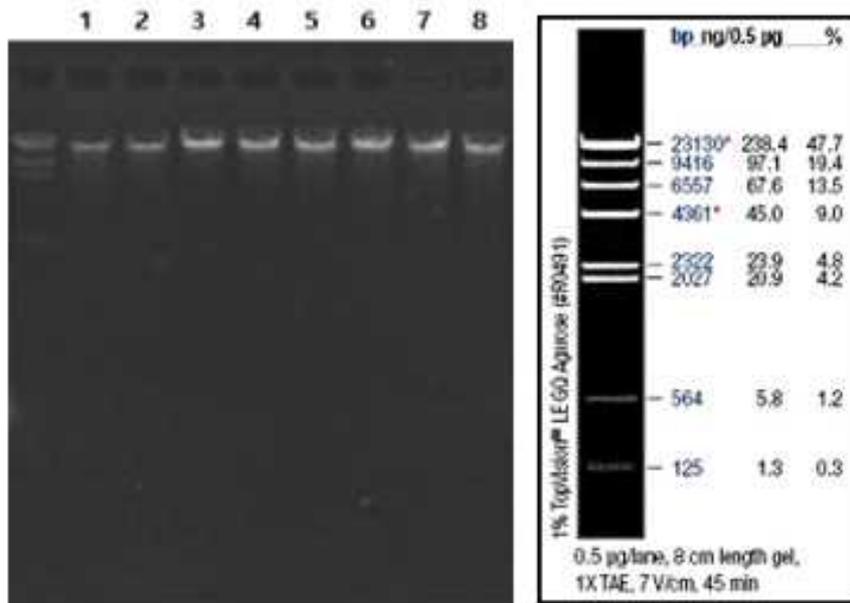
2. DNA Methylation assay

1) DNA의 QC 결과

수집한 세포로부터 DNA를 추출하여 DNA의 량 및 품질을 확인한 결과 아래와 같이 모든 DNA가 기준에 적합하였음을 확인하였다.

〈표 III-3〉 QC Result of DNA

시험물질	처리농도	순도 (A260/ A280)	순도 (A260/ A230)	농도 (ng/μl)	부피 (μl)	총량 (μg)	결과
DMSO	0.1%	1.87	1.59	80.26	40	3.21	적합
TPA	50 ng/ml	1.85	1.54	54.58	40	2.18	적합
Anisol	1.0 μl/ml	1.85	1.90	86.97	40	3.48	적합
Anisol	0.5 μl/ml	1.86	1.96	111.20	40	4.45	적합
2-methoxy ethanol	1.0 μl/ml	1.87	2.05	100.82	40	4.03	적합
2-methoxy ethanol	0.5 μl/ml	1.87	1.94	91.49	40	3.66	적합
1,2-dichloro benzene	0.2 μl/ml	1.87	1.62	74.17	40	2.97	적합
1,2-dichloro benzene	0.1 μl/ml	1.89	2.00	94.13	40	3.77	적합
QC Criteria		>1.5	>1.0	13	-	>0.5	



[그림 III-2] Electrophoresis image of DNA for each samples

2) 자료의 전처리

자료를 수정, 필터링, 변환 및 정규화를 통해 통계적으로 잘못된 결론을 회피하기 위한 체계적 편향을 줄이기 위해 전처리하였다.

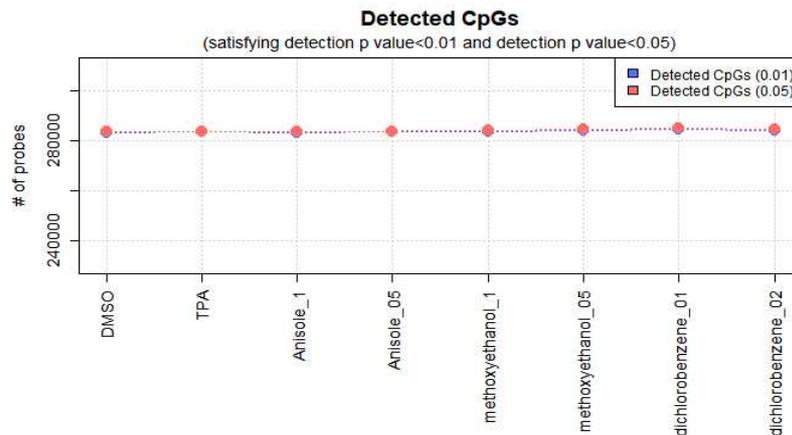
(1) 배경 보정 및 염료 바이어스 평준화

라이브러리(ENmix)는 BeadChip 강도 데이터를 6개로 분할하고 메틸화 및 비메틸화 강도, 2가지 색상 채널 및 2가지 프로브 유형별로 모델링하였다.

(2) Filtering criteria

가) 검출된 P 값에 의한 각 샘플에 대한 검출된 CpG의 수

나) 검출된 P 값 < 0.01 및 < 0.05에서 아래의 그림에서와 같이 평균적으로 약 283807.5와 284192.3 CpG가 검출되었다.

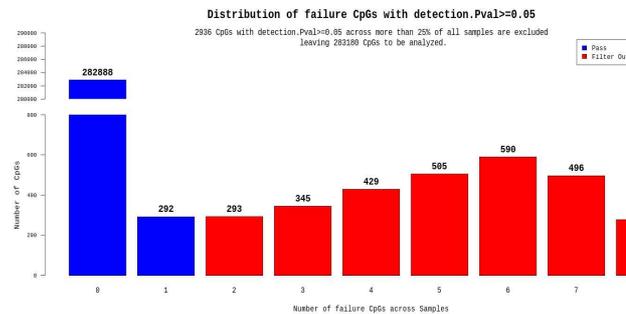


[그림 III-3] Number of detected CpGs by detection P value for each samples

다) 모든 샘플의 25%이상 검출된 P 값이 ≥ 0.05 인 CpG를 제외하였다.

다) 분석할 283180 CpG를 남겨두고 BMIQ 정규화를 위해 각 샘플에서 적어도 하나 이상의 NA 값을 가진 CpG는 아래의 그림에서 보는 바와

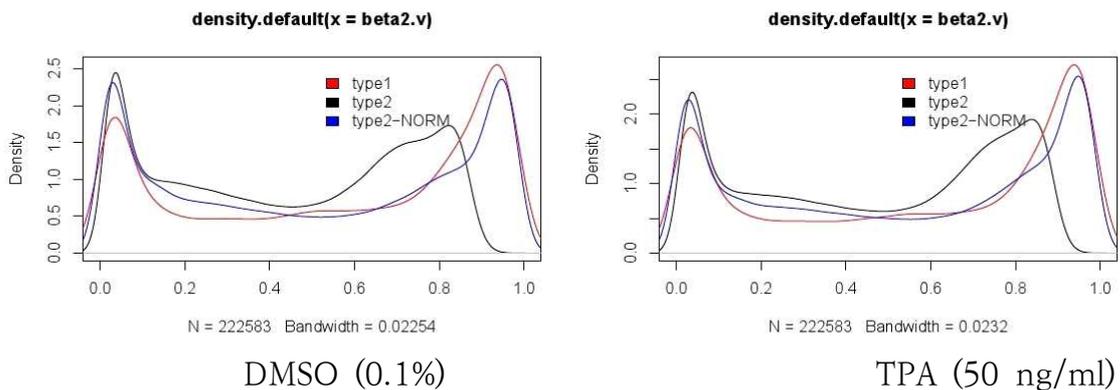
같이 DMSO 0.1% 노출 샘플은 292개, TPA 50 ng/ml 노출 샘플은 293개, Anisole 1.0 $\mu\text{l/ml}$ 노출 샘플은 345개, Anisole 0.5 $\mu\text{l/ml}$ 노출 샘플은 429개, 2-methoxyethanol 1.0 $\mu\text{l/ml}$ 노출 샘플은 585개, 2-methoxyethanol 1.0 $\mu\text{l/ml}$ 노출 샘플은 590개, 1,2-dichlorobenzene 0.2 $\mu\text{l/ml}$ 노출 샘플은 496개, 1,2-dichloro benzene 0.1 $\mu\text{l/ml}$ 노출 샘플은 278개를 제외하였다.

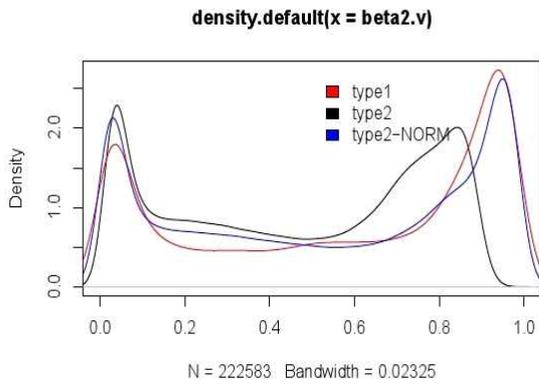


[그림 III-4] Distribution of failure CpGs with detection P-value ≥ 0.05

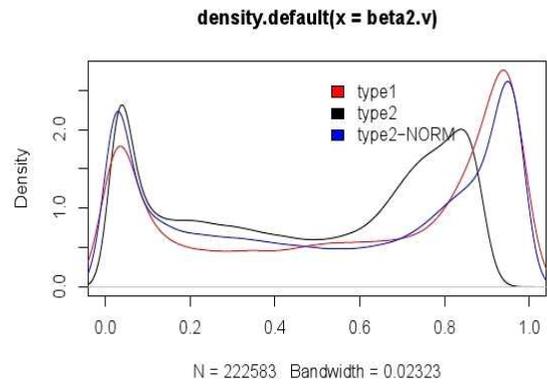
(3) BMIQ(Beta Mixture Quantile) normalization

BMIQ.R을 이용하여 분석 편향을 줄이기 위해 beta-mixture 분위수 정규화 방법으로 아래의 그래프에서 보는 바와 같이 정규화 하였다.⁸⁶⁾ 각 시험물질에 노출된 모든 샘플의 그래프는 유사했다.

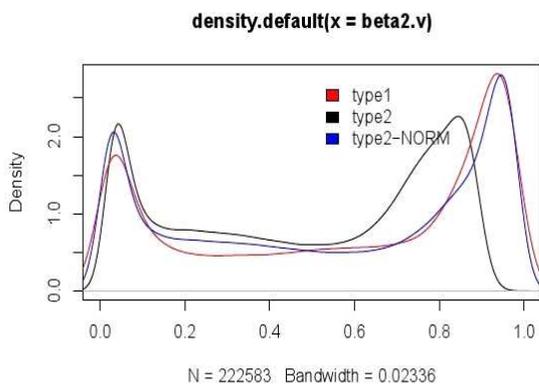




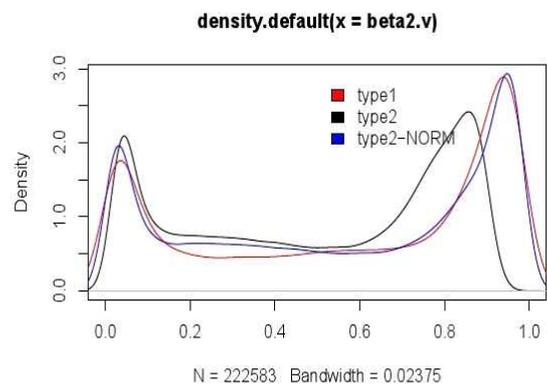
Anisol (1.0 $\mu\text{l/ml}$)



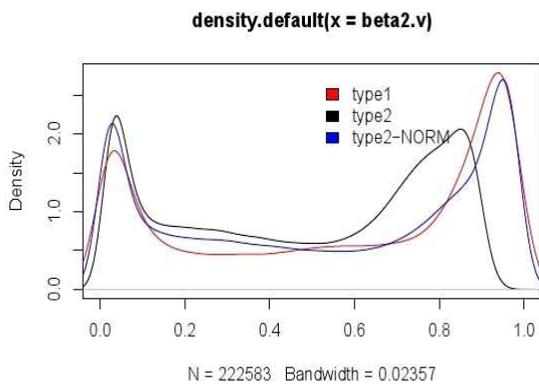
Anisol (0.5 $\mu\text{l/ml}$)



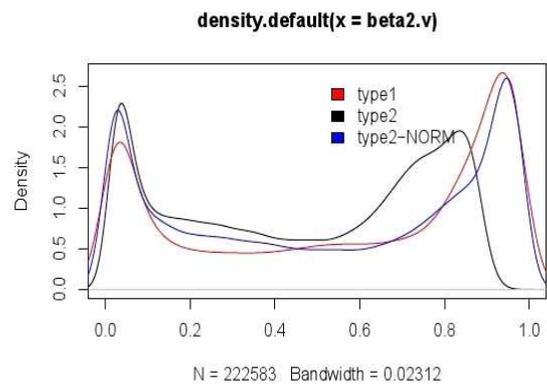
2-methoxyethanol(1.0 $\mu\text{l/ml}$)



2-methoxyethanol (0.5 $\mu\text{l/ml}$)



1,2-dichlorobenzene (0.2 $\mu\text{l/ml}$)



1,2-dichlorobenzene (0.1 $\mu\text{l/ml}$)

[그림 III-5] Check BMIQ for each test chemical treatment samples

(4) 자료변환(Data transformation)

가) Beta-value는 메틸화된 프로브 강도(intensity)와 전체 강도(메틸화 프로브 강도와 비메틸화의 프로브 강도의 합)의 비율이다.

$$Beta_i = \frac{\max(y_{i,methy},0)}{\max(y_{i,unmethy},0)+\max(y_{i,methy},0)+\alpha}$$

나) M-value는 메틸화된 프로브 대 비메틸화된 프로브 강도의 log2 비로 계산하였다.⁸⁷⁾

$$M_i = \log_2 \left(\frac{\max(y_{i,methy},0)+\alpha}{\max(y_{i,unmethy},0)+\alpha} \right)$$

다) Beta-value는 보다 직관적인 생물학적 해석을 갖지만, M-value는 메틸화 수준의 차이를 분석하는데 통계적으로 더 유효하다.

라) 메틸화의 차이를 분석하기 위해서 M-value을 사용하였고, 결과 보고에는 Beta-value가 포함되었다.

마) 시험군과 대조군간의 평균 beta의 차이를 나타내는 delta-mean을 산출하였다.

바) delta-mean을 M-value로 변환하여 대조군과 비교하여 비메틸화 강도와 메틸화 강도의 비율을 측정하여 Odds Ratio를 다음과 같이 산출하였다.

$$M \text{ value} = \log_2 \left(\frac{\text{beta}}{1-\text{beta}} \right)$$

$$\begin{aligned} \text{Log2OR} \left(\frac{\text{Test}}{\text{Control}} \right) &= \text{mean} \left(\text{Log2} \left(\frac{\text{Test beta}}{1-\text{Test beta}} \right) \right) - \text{mean} \left(\text{Log2} \left(\frac{\text{Control beta}}{1-\text{Control beta}} \right) \right) \\ &= \text{mean} \left(\text{Log2} \left(\text{Odds of Test} \right) \right) - \text{mean} \left(\text{Log2} \left(\text{Odds of Control} \right) \right) \end{aligned}$$

$$\therefore \text{OR} \left(\frac{\text{Test}}{\text{Control}} \right) = 2^{\text{log2OR} \left(\frac{\text{Test}}{\text{Control}} \right)}$$

사) 대조군과 시험물질 노출군간의 메틸화율의 비율을 나타내는 Fold Change을 다음과 같이 산출하였다.

$$L \text{ value} = \log_2 (\text{beta})$$

$$\text{Log2FC} \left(\frac{\text{Test}}{\text{Control}} \right) = \text{mean} (\text{Log}_2 (\text{Test beta})) - \text{mean} (\text{Log}_2 (\text{Control beta}))$$

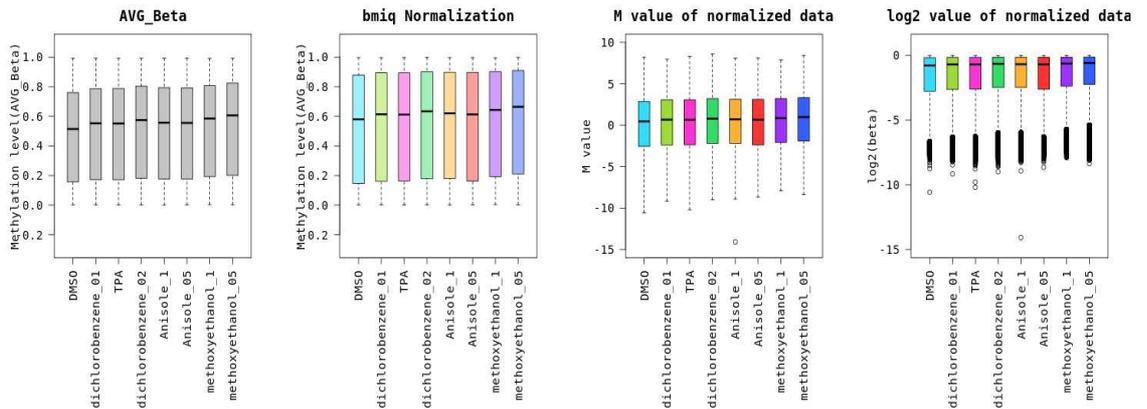
$$\therefore \text{OR} \left(\frac{\text{Test}}{\text{Control}} \right) = 2^{\text{Log2FC}} = 2^{\text{Log2OR} \left(\frac{\text{Test}}{\text{Control}} \right)}$$

3) 자료(Data)의 품질 검사

메틸화 분석을 위하여 분석한 자료에 대한 품질을 수행한 결과 모든 시험물질 처리 샘플은 유사한 분포를 보여 적합한 것으로 판단되었다.

(1) Box plot

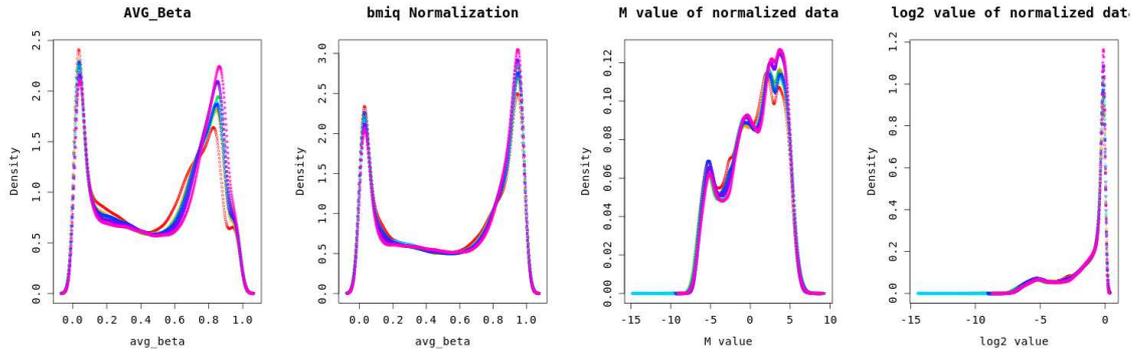
BMIQ 정규화 및 Data 변환 전후의 분포를 비교하기 위해 box plot을 그렸다. Beta-value는 각 CpG 부위의 메틸화 강도를 반영한다. 모든 시험군에서 유사한 형태의 분포를 보이는 것을 확인하였다.



[그림 III-6] Box plot to compare distribution of before/after BMIQ normalization and data transformation

(2) Density plot

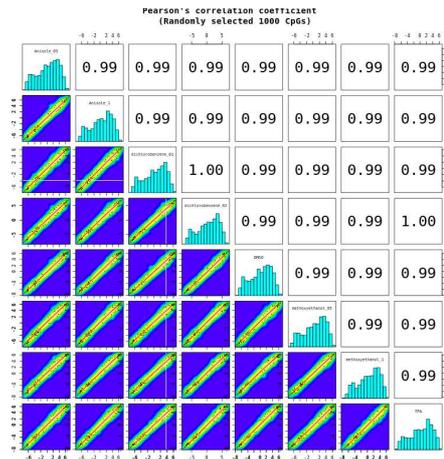
BMIQ 정규화 및 자료 변환 전후의 분포를 비교하기 위해 density plot을 그렸다. 모든 시험군에서 유사한 형태의 분포를 보이고 있다.



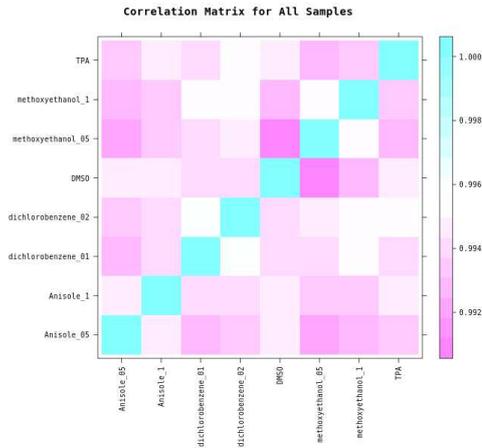
[그림 III-7] Density plot o compare distribution of before/after BMIQ normalization and data transformation

(3) 샘플간 재현성

M-value를 이용한 Pearsons의 상관관계를 사용하여 모든 시험군의 재현성의 정도를 확인하기 위하여 level plot을 그렸다. 모든 샘플은 상관계수(r)이 +1에 가까우며 양의 상관관계를 보이고 있다.



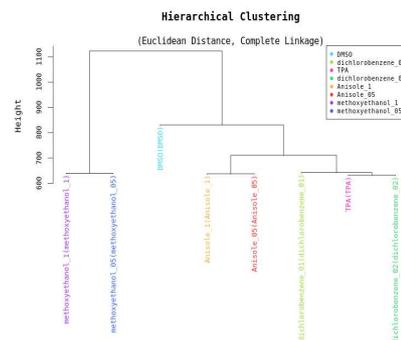
[그림 III-8] Level plot using Pearson's correlation coefficient



[그림 III-9] Correlation matrix for all samples

(4) Hierarchical clustering

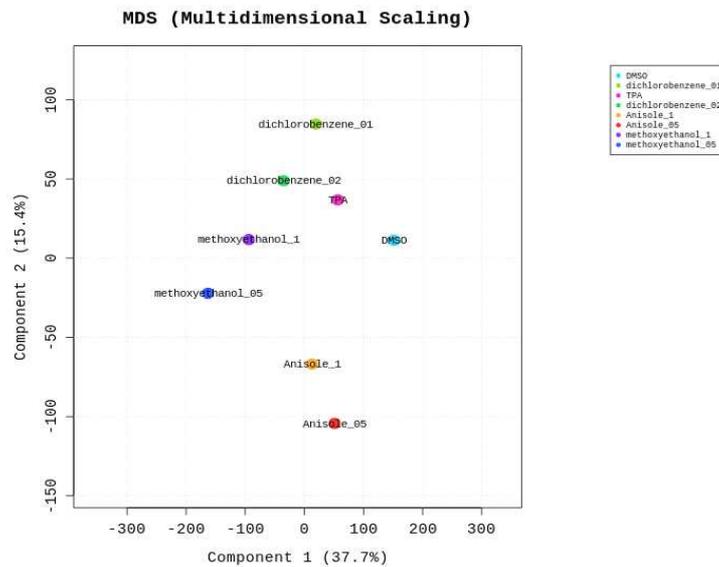
각 시험물질 노출군의 M-value를 이용하여 Hierarchical 클러스팅 방법을 사용하여 계층적으로 군집화된 dendrogram을 그렸다. 아래와 같이 3개의 클러스트와 한 개의 싱글톤으로 그려졌다. 샘플간 군집화 패턴은 밀집된 군집을 생성하는 경향이 있는 것으로 생각되며, TPA 노출군은 1,2-dichlorobenzene 노출군과 좀 더 유사성이 높은 것으로 판단된다. 반면, DMSO 처리군은 시험물질 처리군과는 다른 군집을 보이는 것으로 그려졌다.



[그림 III-10] Hierarchical clustering for all samples

(5) MDS (Multidimensional scaling) plot

M-value를 이용하여 샘플간 데이터 포인트 간의 차이점을 시각적으로 표현하기 위하여 2-D 그래픽을 그렸다.



[그림 III-11] MDS (Multidimensional scaling) plot for all samples

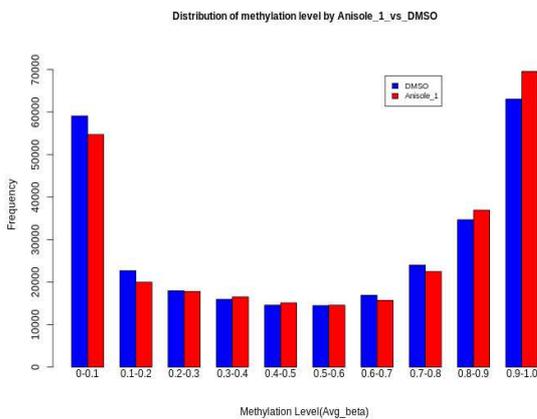
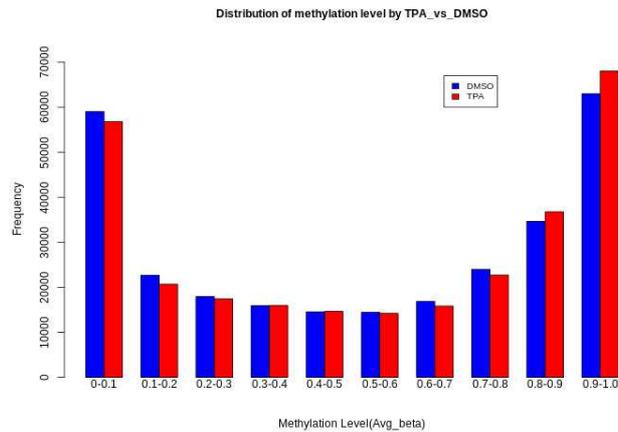
위에서 보는 바와 같이 각 시험물질 처리군은 시험물질 노출농도별 근접한 거리를 두고 있으며 TPA 노출군은 1,2-dichlorobenzene 노출군과 좀 더 근접한 포인트를 보이고 있다. DMSO 처리군은 시험물질 노출군과는 다른 거리를 두는 것으로 보인다.

4) 메틸화(Methylation) 분석 결과

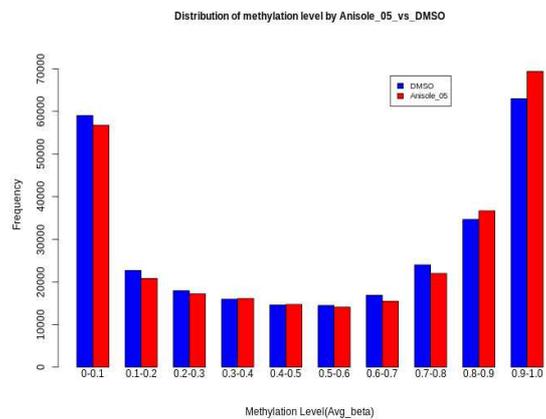
(1) 메틸화 수준(Methylation level) 분포

대조군을 포함한 모든 시험물질 노출군의 메틸화 수준의 분포를 분석한 결과 다음과 같으며, 모든 시험물질 노출군의 메틸화 수준은 평균 beta-value가 0~0.1 및 0.9~1.0에서 높은 수준을 보이는 유사한 형태의 분포를 보이고 있다. 대조군

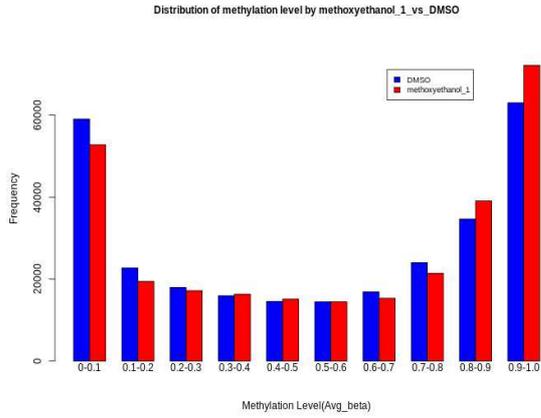
대비 각 시험물질 처리군의 평균 beta-value의 차이는 DMSO 및 TPA 노출군 대비 각 시험물질 노출군은 평균 beta-value가 0~0.1에서는 메틸화 수준이 조금 낮았으며 0.9~1.0에서는 조금 높은 경향을 보이는 유사한 양상을 보였다. 그리고 0.2~0.6에서는 거의 차이를 보이지 않았다.



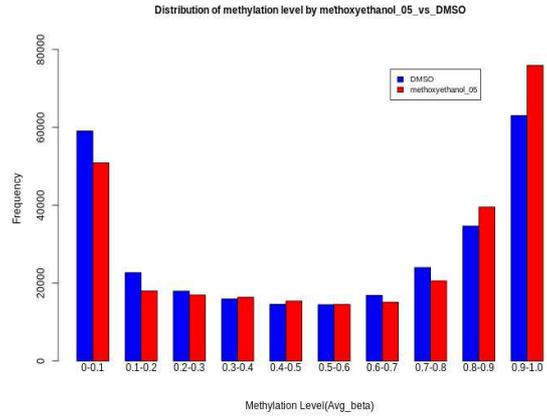
1.0 $\mu\text{l/ml}$



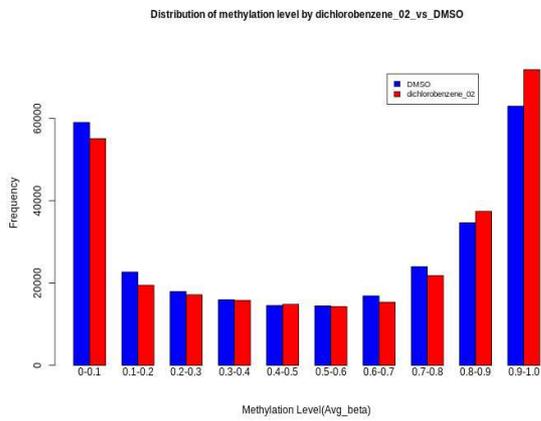
0.5 $\mu\text{l/ml}$



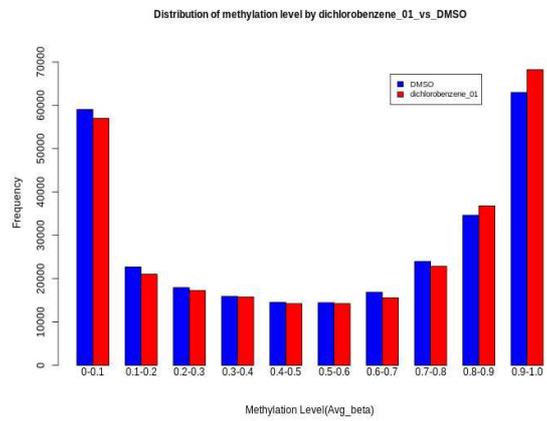
1.0 $\mu\text{l/ml}$



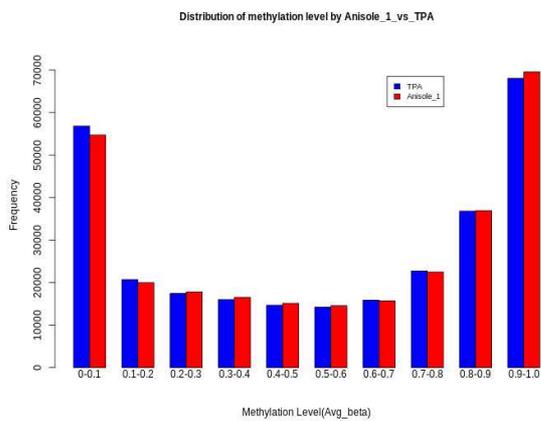
0.5 $\mu\text{l/ml}$



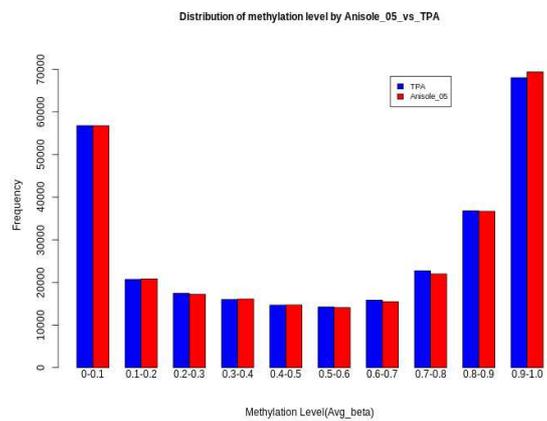
0.2 $\mu\text{l/ml}$



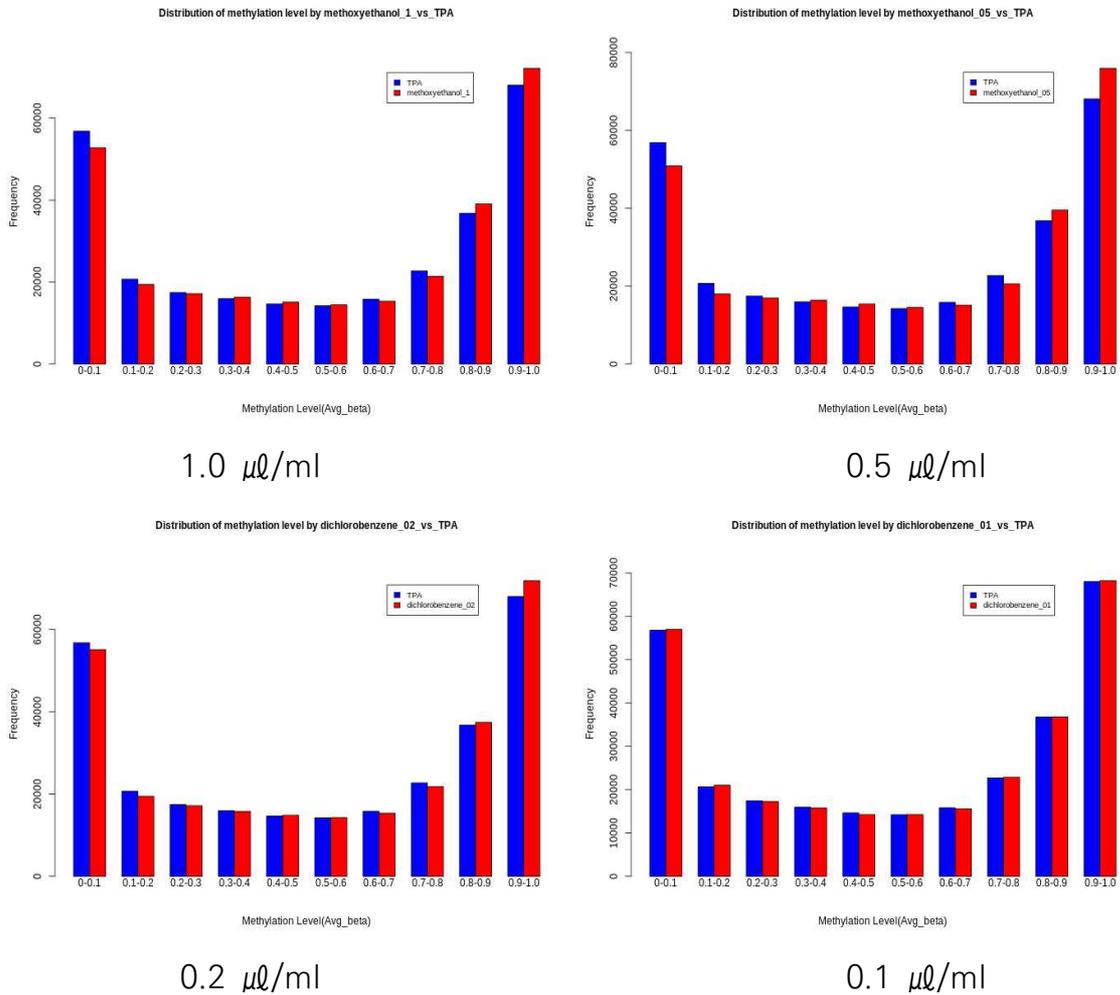
0.1 $\mu\text{l/ml}$



1.0 $\mu\text{l/ml}$



0.5 $\mu\text{l/ml}$

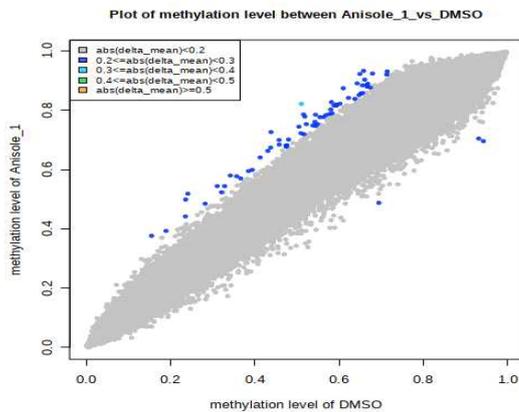
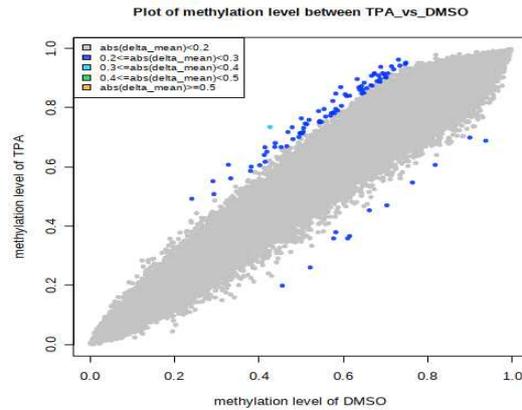


[그림 III-12] Distribution of methylation level for all samples

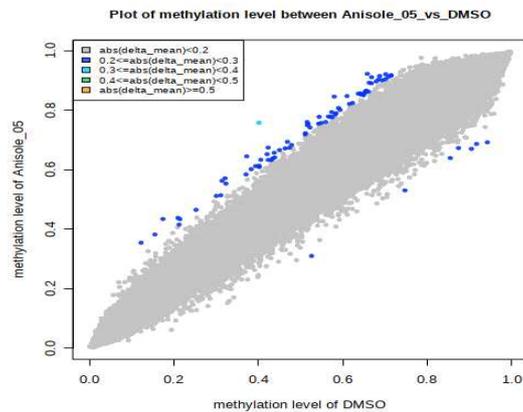
(2) 메틸화 수준(Methylation level)의 Scatter plot

다음의 메틸화 수준에 대한 산점도는 총 CpG 부위에서 DNA의 메틸화 수준을 대조군인 DMSO와 TPA 대비 각 시험물질 노출군간 비교한 것이다. 대부분 0.2 이하의 메틸화 수준을 보이고 있으며, 일부 파란색 산점도는 delta-mean이 0.2~0.3을 보여주고 있다. DMSO 대비 TPA 노출군에서는 delta-mean 0.3 이상은 거의 없었다. DMSO 대비 2-mthoxyethanol과 1,2-dichlorobenzene 노출군에서는 0.3 이상의 delta-mean를 갖는 산점도를 약간 보이고 있다.

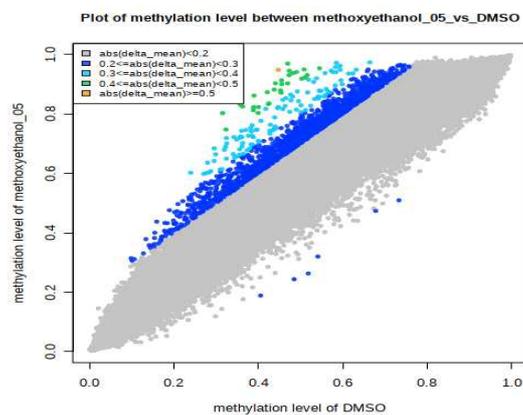
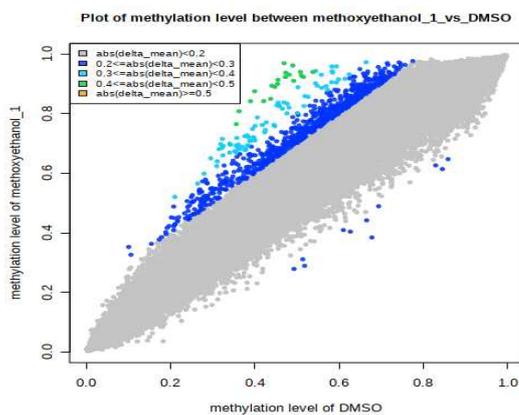
반면, TPA 대비해서는 1,2-dichlorobenzene 노출군에서는 0.3 이상의 delta-mean를 갖는 산점도를 보였다. 그러므로 각 시험물질 노출군은 모두 전체적으로 낮은 메틸화 수준(0.5 이하)을 보인 것으로 평가되었다.



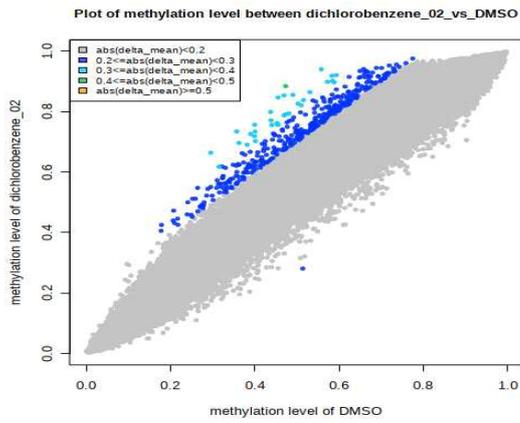
1.0 $\mu\text{l/ml}$



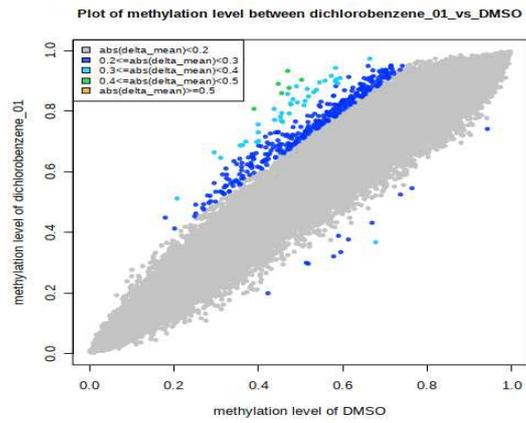
0.5 $\mu\text{l/ml}$



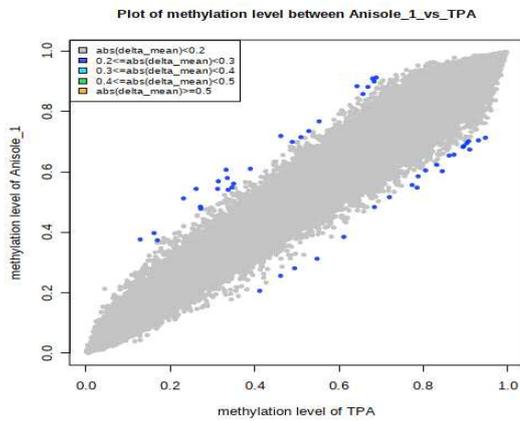
1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$



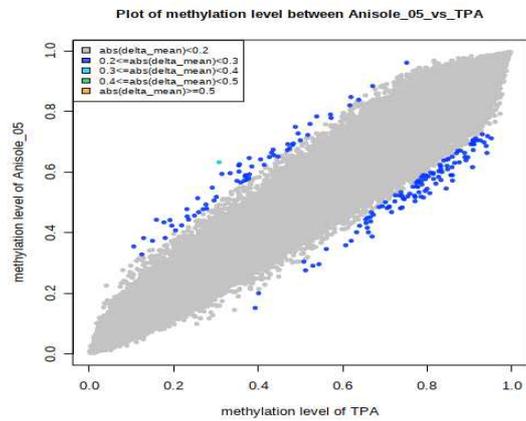
0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$



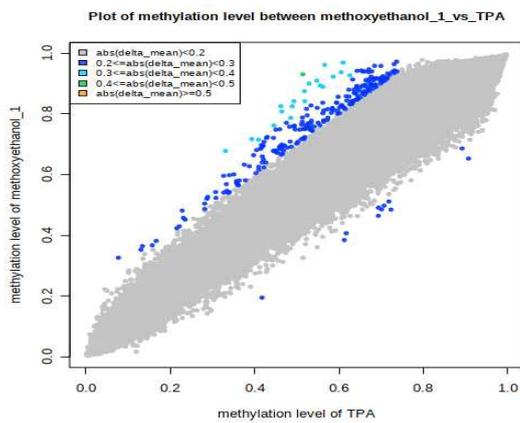
0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$



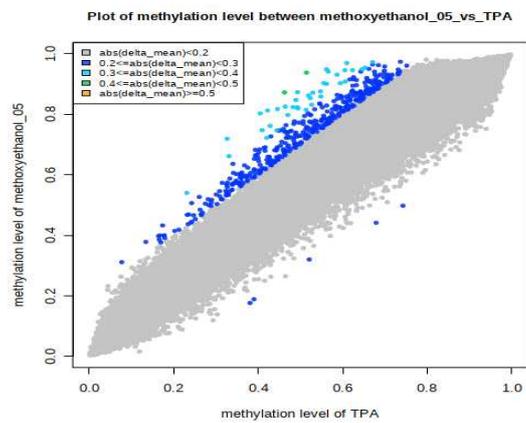
0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$



1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

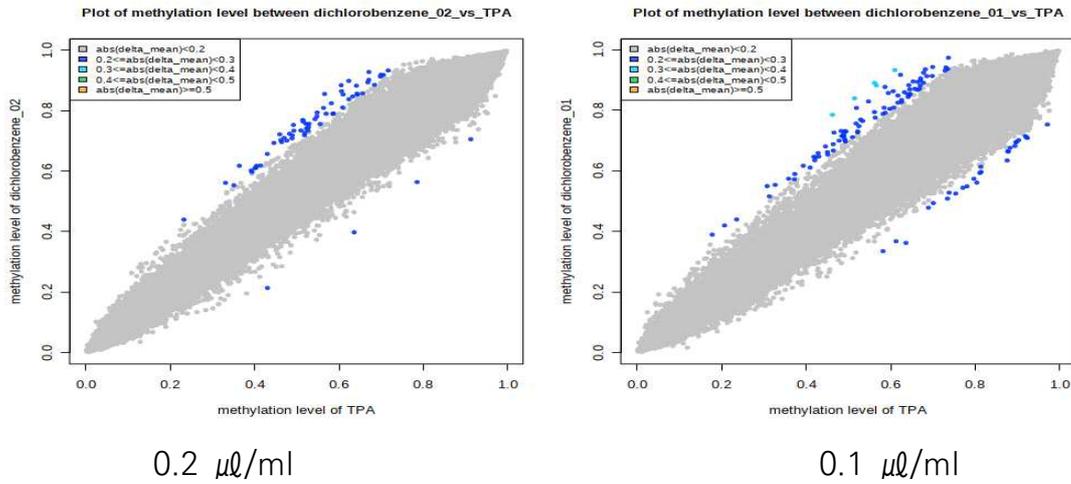


0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$



1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$



[그림 III-13] Scatter plot of methylation level for all samples

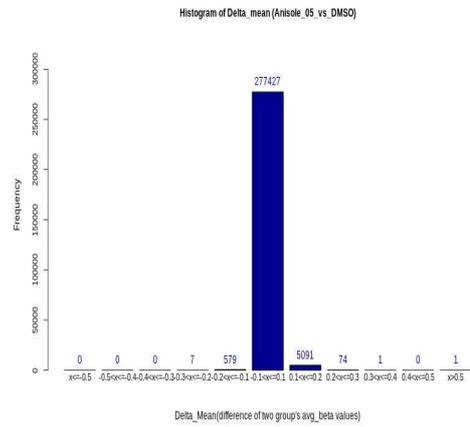
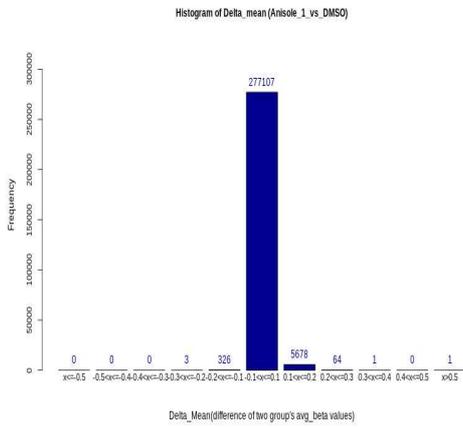
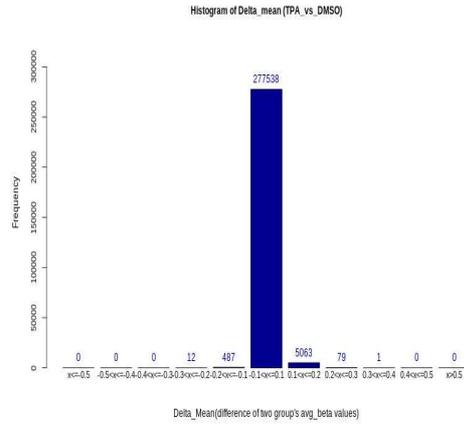
(3) Dela mean 히스토그램

다음의 그래프는 DNA의 메틸화 위치를 대조군인 DMSO와 TPA 대비 각 시험물질 노출군간의 평균 beta-value를 비교한 것이다. 대부분 평균 beta-value이 주로 절대값 0.2 이내 낮은 범위의 관계를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

<표 III-4> DMSO 및 TPA 대비 각 시험물질 노출군의 Delta mean

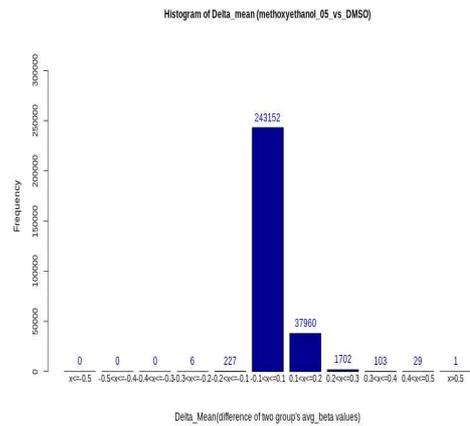
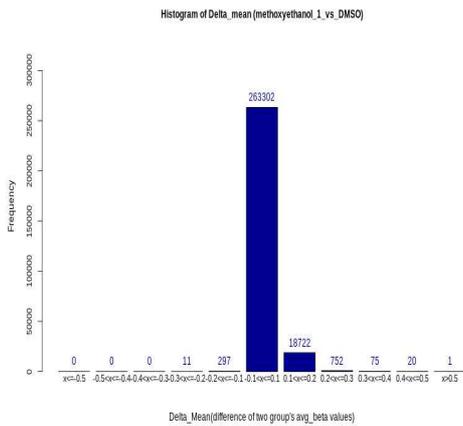
시험물질	처리농도	DMSO						TPA					
		-0.3X(-0.2)	-0.2X(-0.1)	-0.1X(0.0)	0.1X(0.2)	0.2X(0.3)	0.3X(0.4)	-0.3X(-0.2)	-0.2X(-0.1)	-0.1X(0.0)	0.1X(0.2)	0.2X(0.3)	0.3X(0.4)
DMSO	0.1%	-	-	-	-	-	-	12	487	277538	5063	79	1
TPA	50 ng/ml	12	487	277538	5063	79	1	-	-	-	-	-	-
Anisol	1.0 μl/ml	3	326	277107	5678	64	1	22	1172	279748	2211	26	0
Anisol	0.5 μl/ml	7	579	277427	5091	74	1	109	3267	277012	2727	63	1
2-methoxy ethanol	1.0 μl/ml	11	297	263302	18722	752	75	11	914	275133	6892	208	20
2-methoxy ethanol	0.5 μl/ml	6	227	243152	37960	1702	103	5	436	268503	13794	403	37
1,2-dichloro benzene	0.2 μl/ml	1	244	269762	12773	367	32	4	323	279742	3050	61	0
1,2-dichloro benzene	0.1 μl/ml	11	579	274799	7408	337	38	27	1691	278904	2470	82	5

메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구



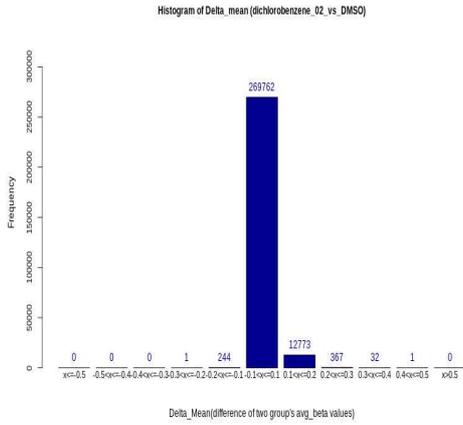
1.0 $\mu\text{l/ml}$

0.5 $\mu\text{l/ml}$

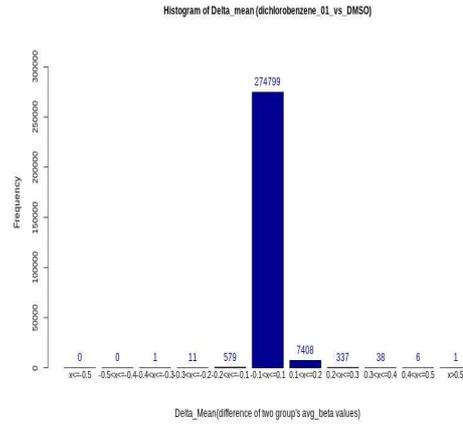


1.0 $\mu\text{l/ml}$

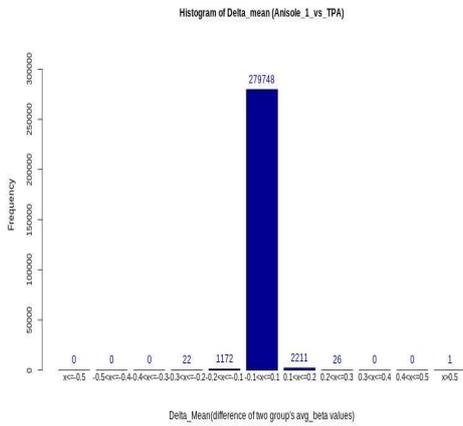
0.5 $\mu\text{l/ml}$



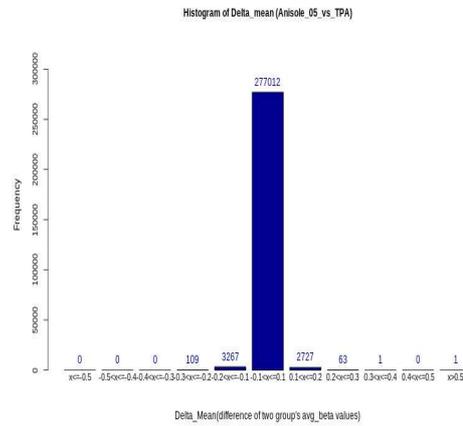
0.2 $\mu\text{l/ml}$



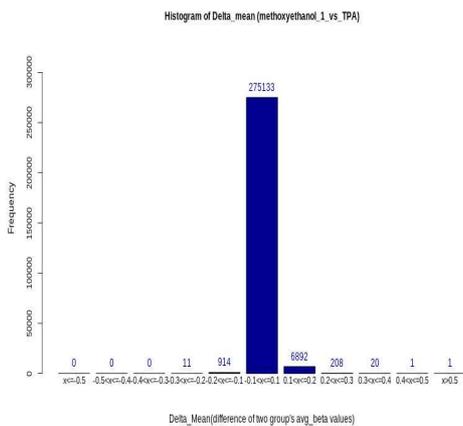
0.1 $\mu\text{l/ml}$



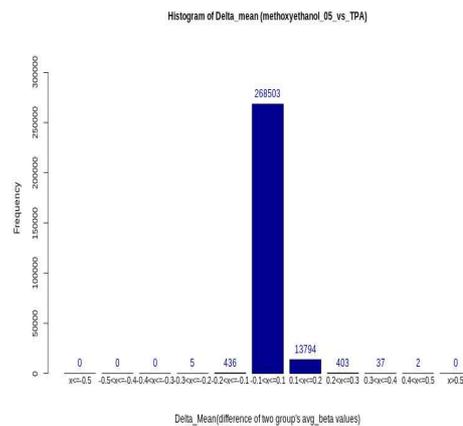
1.0 $\mu\text{l/ml}$



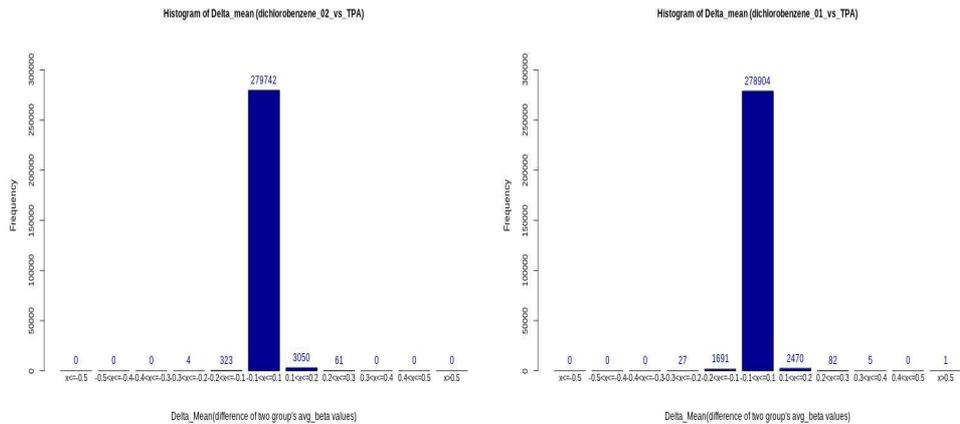
0.5 $\mu\text{l/ml}$



1.0 $\mu\text{l/ml}$



0.5 $\mu\text{l/ml}$



0.2 $\mu\text{l/ml}$

0.1 $\mu\text{l/ml}$

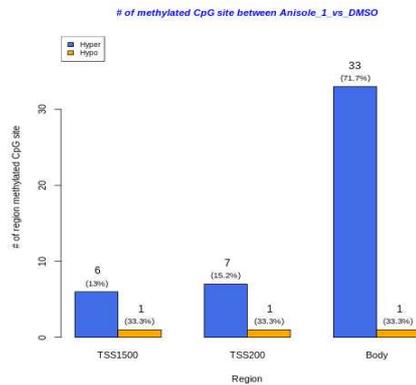
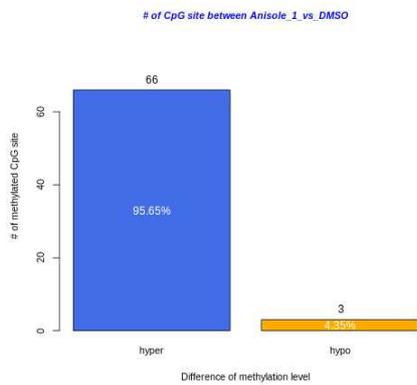
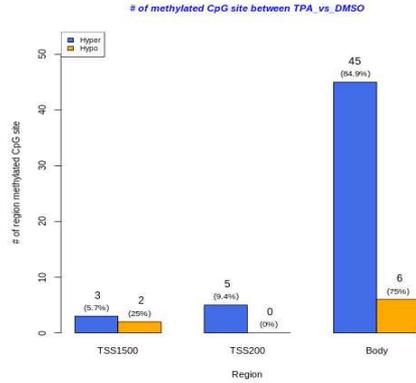
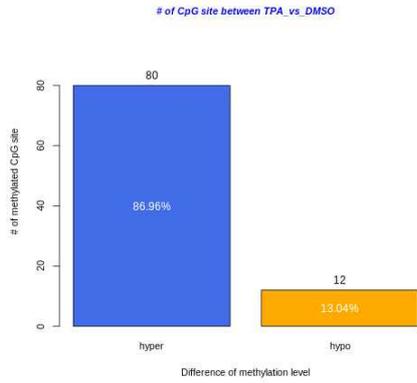
[그림 III-14] Histogram of Delta mean for all samples

(4) Delta mean에 의한 Hyper, Hypo methylation CpGs의 수

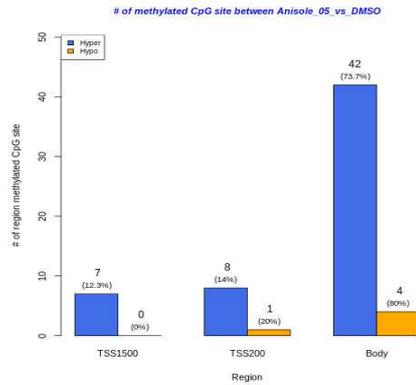
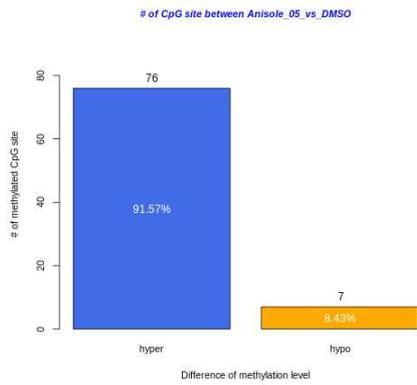
고밀도(Hyper)와 저밀도(Hypo) CpGs 섬에서의 메틸화된 CpG 수를 확인한 결과 모든 시험물질 노출군은 주로 고밀도 CpGs 섬에서 메틸화된 CpG 개수가 약간 많았고, 2-methoxyethanol과 1,2-dichlorobenzene 노출군에서는 고밀도 CpGs 섬에서 메틸화된 CpG가 약간 많은 경향을 보였으나 전체적으로 메틸화된 CpG 개수는 미미한 수준으로 판단되었다.

〈표 III-5〉 Delta mean에 의한 Hyper, Hypo methylation CpGs의 수

시험물질	처리농도	DMSO		TPA	
		Hyper	Hypo	Hyper	Hypo
DMSO	0.1%	-	-	80	12
TPA	50 ng/ml	80	12	-	-
Anisol	1.0 $\mu\text{l/ml}$	66	3	27	22
Anisol	0.5 $\mu\text{l/ml}$	76	7	65	109
2-methoxy ethanol	1.0 $\mu\text{l/ml}$	848	11	230	11
2-methoxy ethanol	0.5 $\mu\text{l/ml}$	1835	6	442	5
1,2-dichloro benzene	0.2 $\mu\text{l/ml}$	400	1	61	4
1,2-dichloro benzene	0.1 $\mu\text{l/ml}$	382	12	88	27

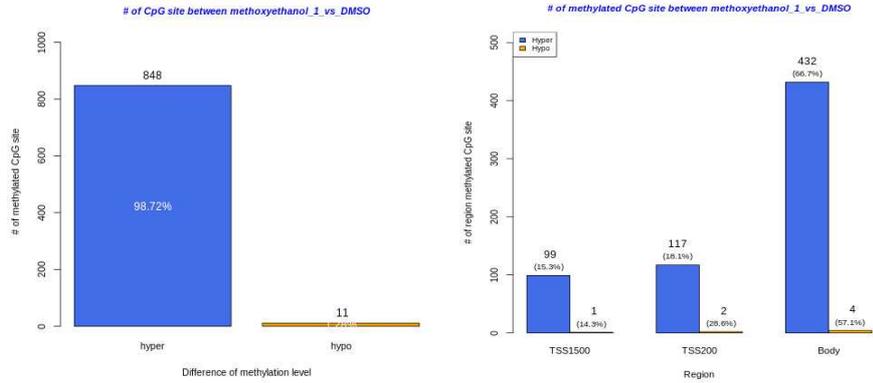


1.0 $\mu\text{l/ml}$

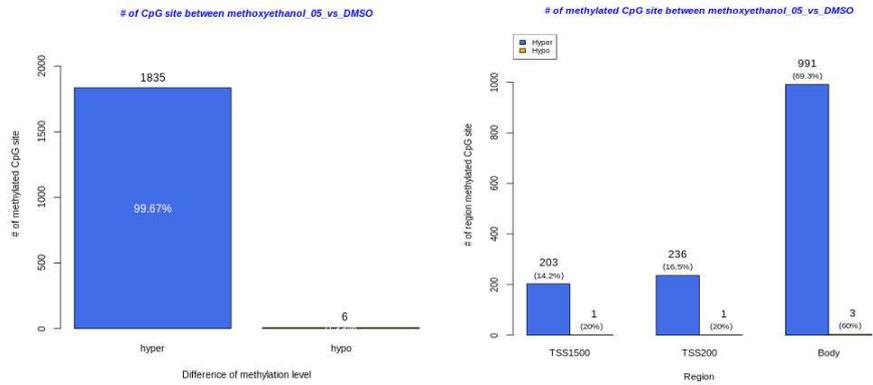


0.5 $\mu\text{l/ml}$

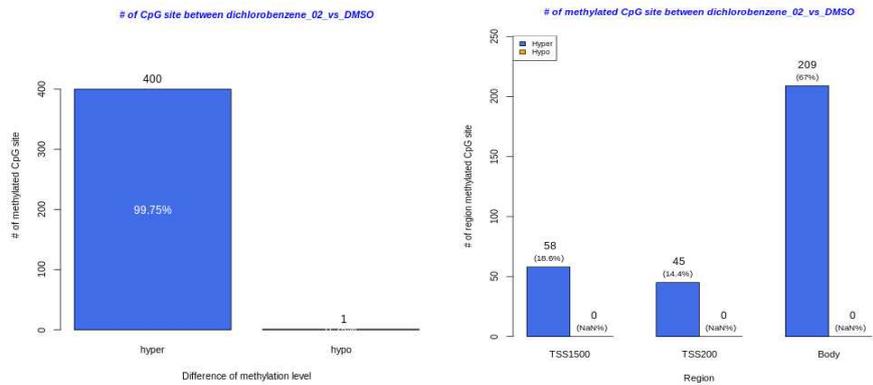
메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구



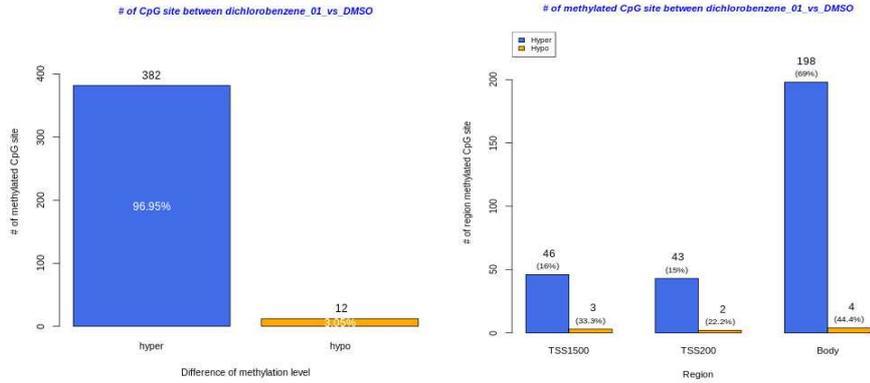
1.0 $\mu\text{l/ml}$



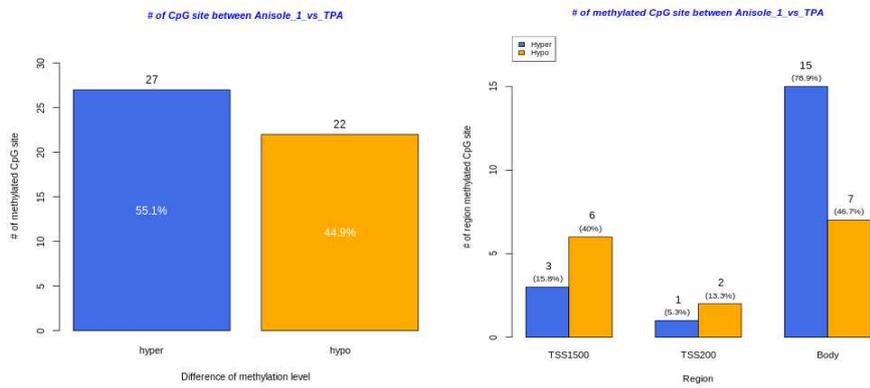
0.5 $\mu\text{l/ml}$



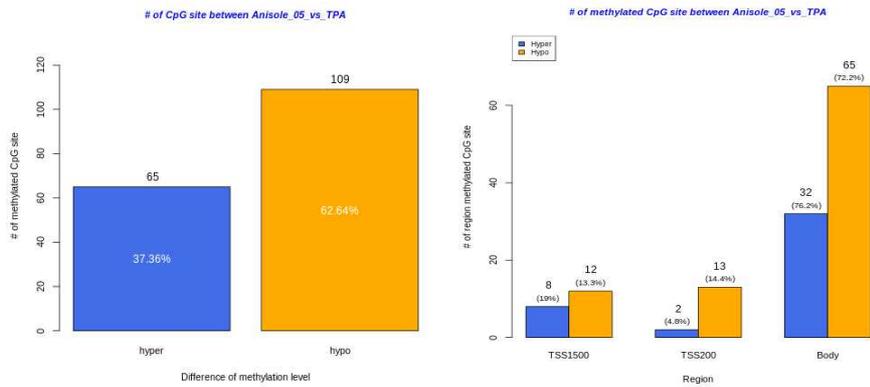
0.2 $\mu\text{l/ml}$



0.1 $\mu\text{l/ml}$

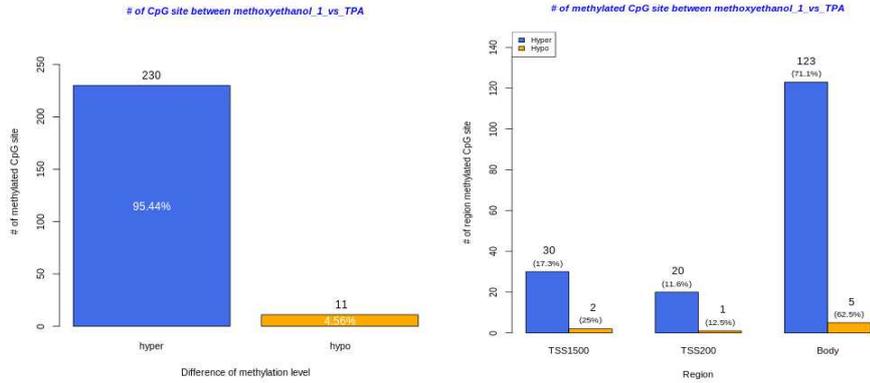


1.0 $\mu\text{l/ml}$

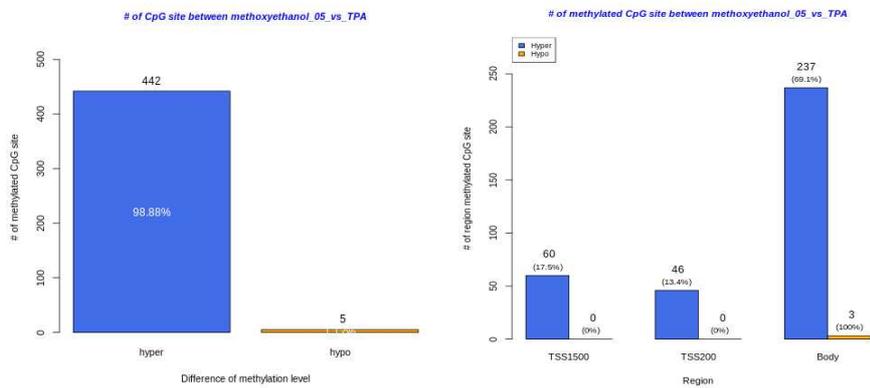


0.5 $\mu\text{l/ml}$

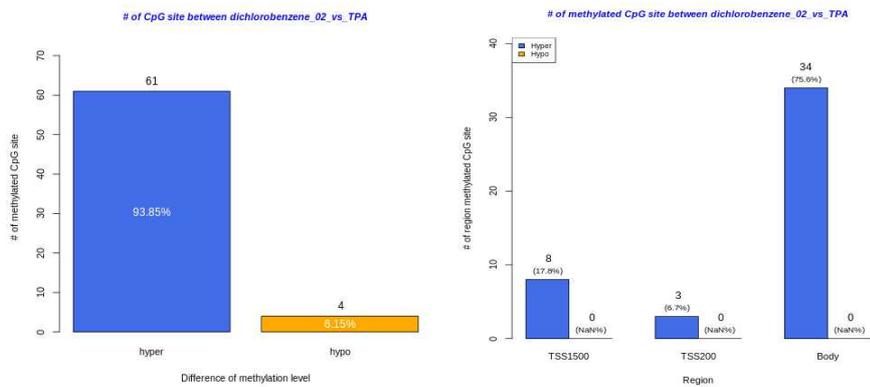
메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구



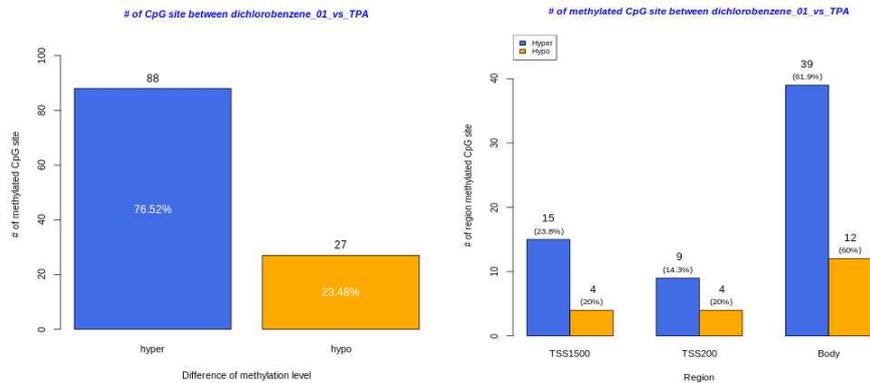
1.0 $\mu\text{l/ml}$



0.5 $\mu\text{l/ml}$



0.2 $\mu\text{l/ml}$



0.1 $\mu\text{l/ml}$

[그림 III-15] Number of Hyper, Hypo methylation CpGs by delta mean

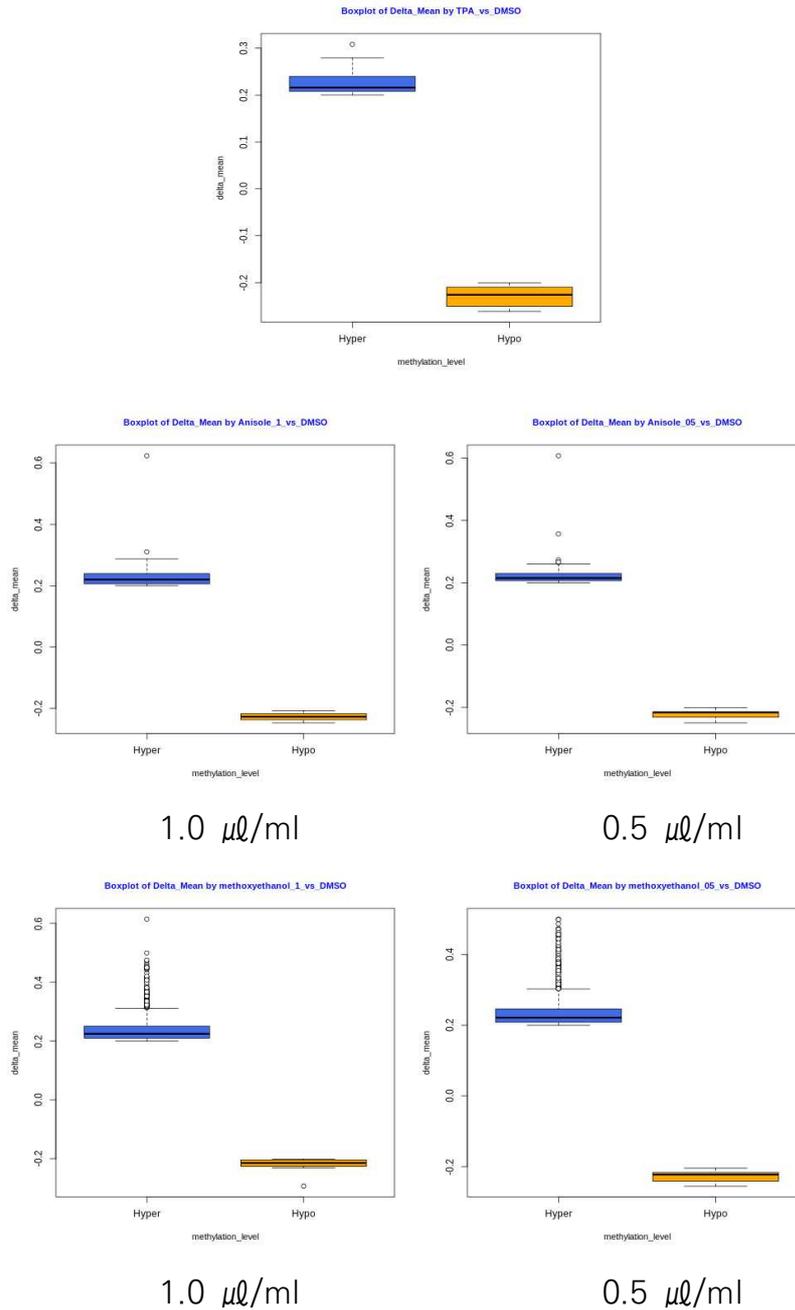
고밀도와 저밀도 CpGs 섬에서의 기능적 메틸화된 CpGs 수를 확인한 결과 다음과 같으며 2-methoxyethanol 노출군에서 메틸화된 CpGs가 많은 경향을 보였고, 그 다음으로는 1,2-dichlorobenzene 노출군에서 다소 많은 경향을 보였다. 모든 시험군에서는 저밀도 CpGs 구역보다는 주로 고밀도 CpGs 구역의 TSS1500과 TS200 프로모터 부위, 염색체의 Body 위치에 메틸화된 CpGs 개수가 많은 것을 확인할 수 있었다.

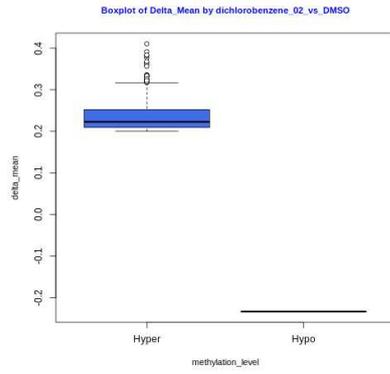
<표 III-6> Delta mean에 의한 기능적 methylation CpGs의 수

시험물질	처리농도	DMSO						TPA					
		Hyper			Hypo			Hyper			Hypo		
		TSS1500	TSS200	Body									
DMSO	0.1%	-	-	-	-	-	-	3	5	45	2	0	6
TPA	50 ng/ml	3	5	45	2	0	6	-	-	-	-	-	-
Anisol	1.0 $\mu\text{l/ml}$	6	7	33	1	1	1	3	1	15	6	2	7
Anisol	0.5 $\mu\text{l/ml}$	7	8	42	0	1	4	8	2	3	12	23	65
2-methoxy ethanol	1.0 $\mu\text{l/ml}$	99	117	432	1	2	4	30	20	123	2	1	5
2-methoxy ethanol	0.5 $\mu\text{l/ml}$	203	236	991	1	1	3	60	46	237	0	0	3
1,2-dichloro benzene	0.2 $\mu\text{l/ml}$	58	45	209	0	0	0	8	3	34	0	0	0
1,2-dichloro benzene	0.1 $\mu\text{l/ml}$	46	43	198	3	2	4	15	9	39	4	4	12

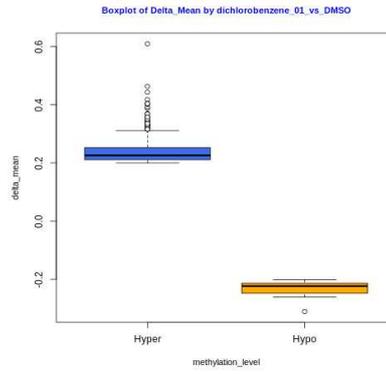
(5) Hyper, Hypo methylation CpGs의 box plot

고밀도와 저밀도 CpG 섬에서의 대조군 대비 메틸화된 각 시험물질 노출군의 Delta-mean은 고밀도 CpG 섬에서는 0.2, 저밀도 CpG 섬에서는 -0.2의 강도를 보이는 것을 확인되었다.

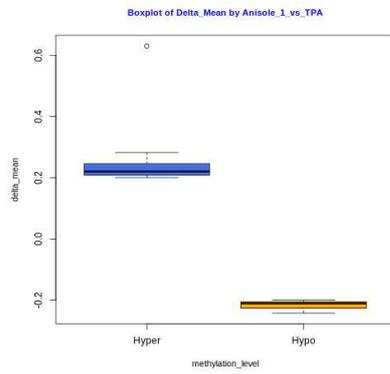




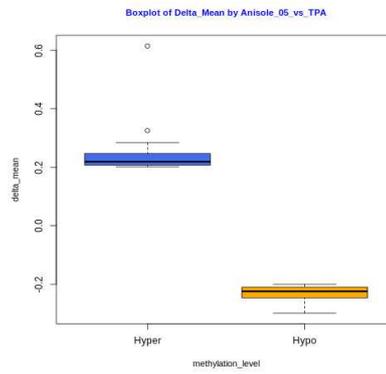
0.2 $\mu\text{l/ml}$



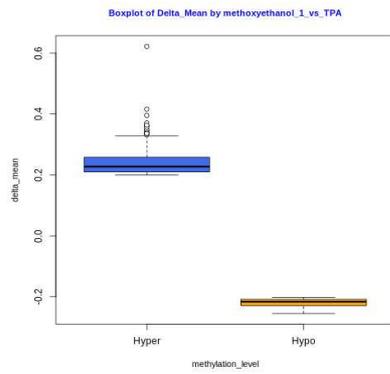
0.1 $\mu\text{l/ml}$



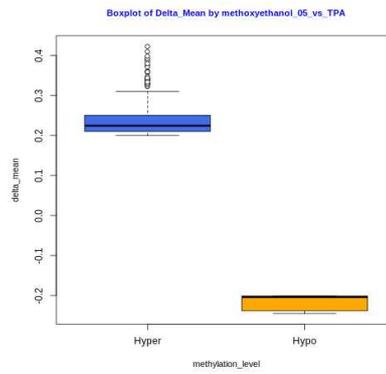
1.0 $\mu\text{l/ml}$



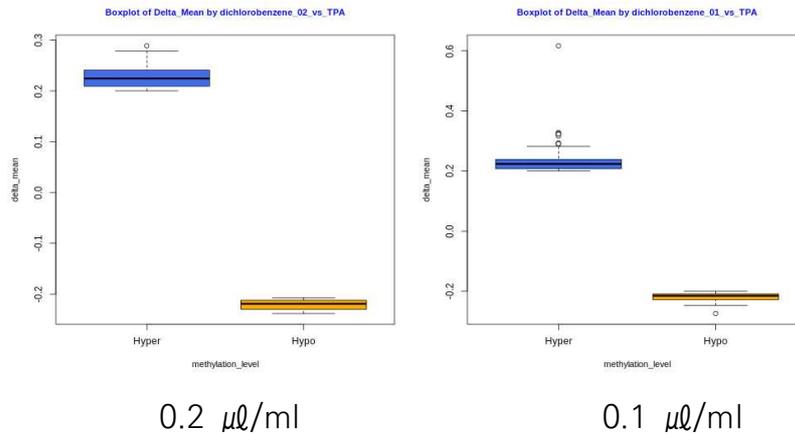
0.5 $\mu\text{l/ml}$



1.0 $\mu\text{l/ml}$



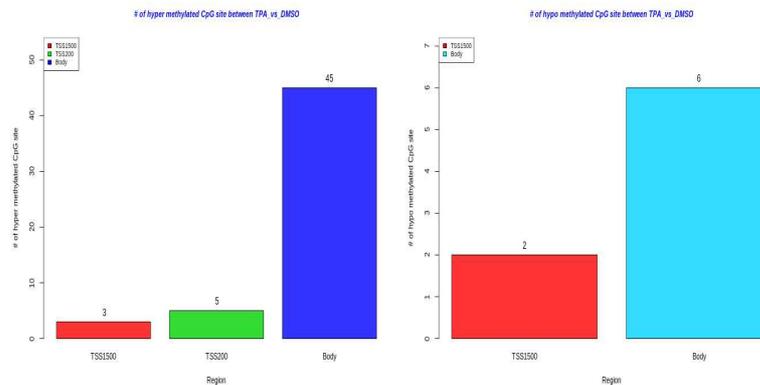
0.5 $\mu\text{l/ml}$

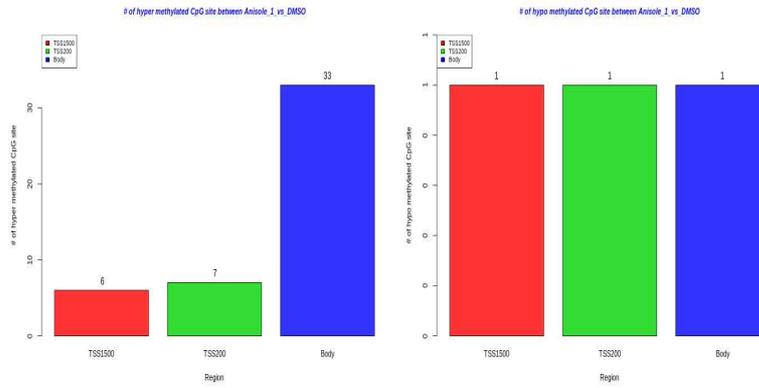


[그림 III-16] Box plot of Hyper, Hypo methylated CpGs by Delta mean

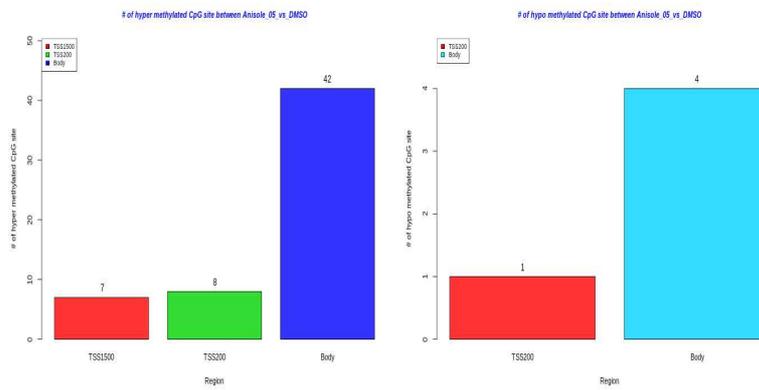
(6) Hyper, Hypo methylation CpGs에 대한 기능적 위치의 분포

고밀도와 저밀도 CpG 섬에서의 기능적 메틸화된 CpG 수를 확인한 결과이다. 앞에서 언급했듯이 2-methoxyethanol 노출군에서 메틸화된 CpG 수가 약간 많은 경향을 보였고, 그 다음으로 1,2-dichlorobenzene 노출군에서 약간 많은 경향을 보였다. 모든 시험군에서는 주로 고밀도 CpG 섬의 TSS1500과 TS200 프로모터 부위, 염색체의 Body 위치에서 메틸화된 CpG 개수가 많은 것을 확인할 수 있었다.

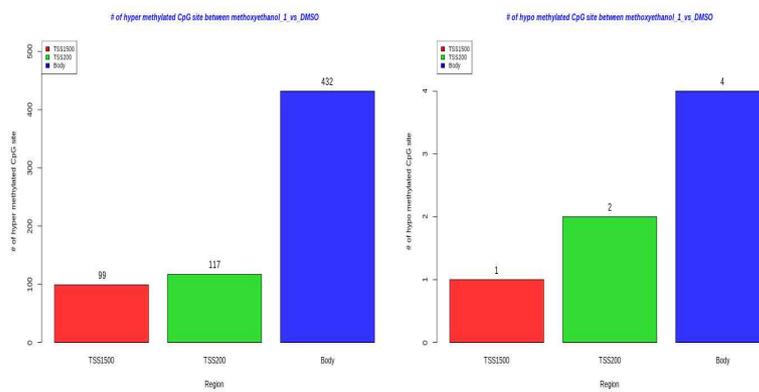




1.0 $\mu\text{l/ml}$

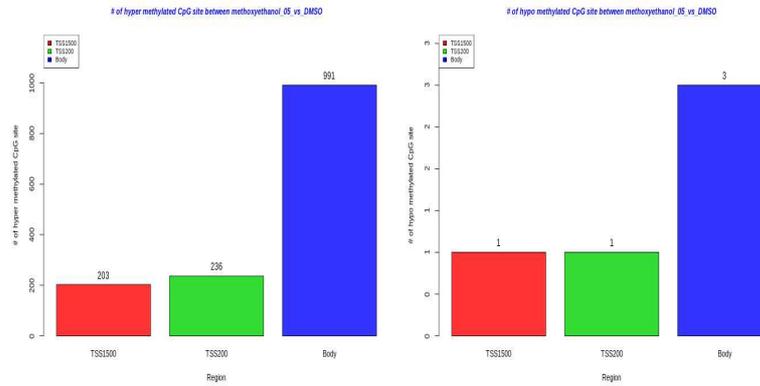


0.5 $\mu\text{l/ml}$

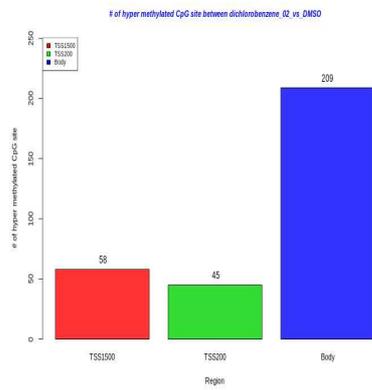


1.0 $\mu\text{l/ml}$

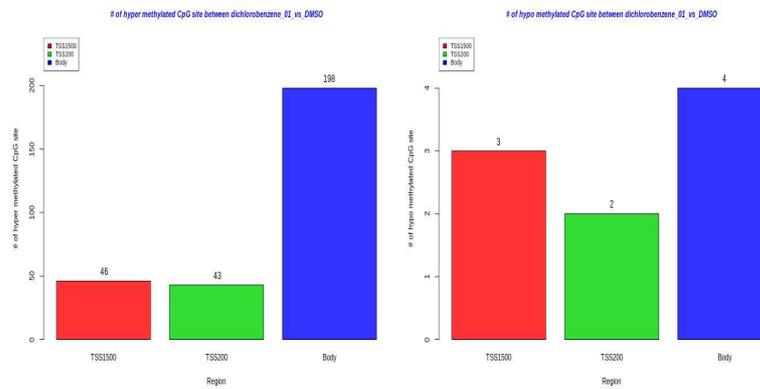
메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구



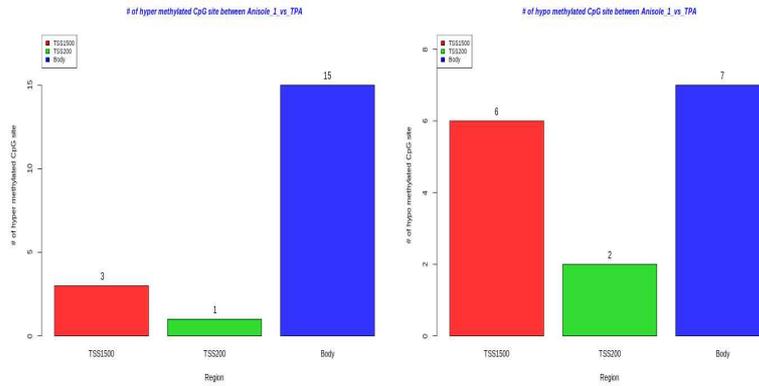
0.5 $\mu\text{l/ml}$



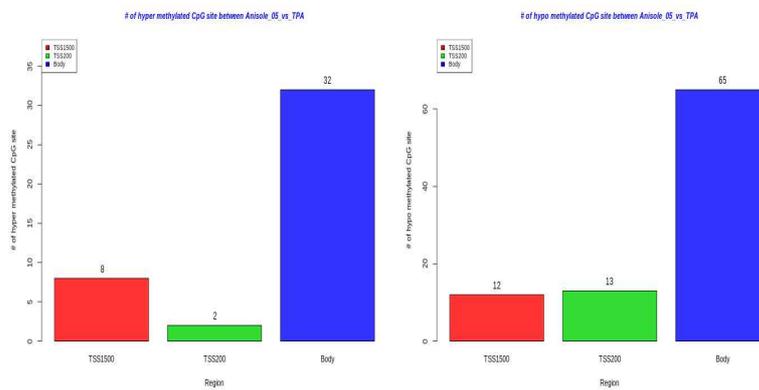
0.2 $\mu\text{l/ml}$



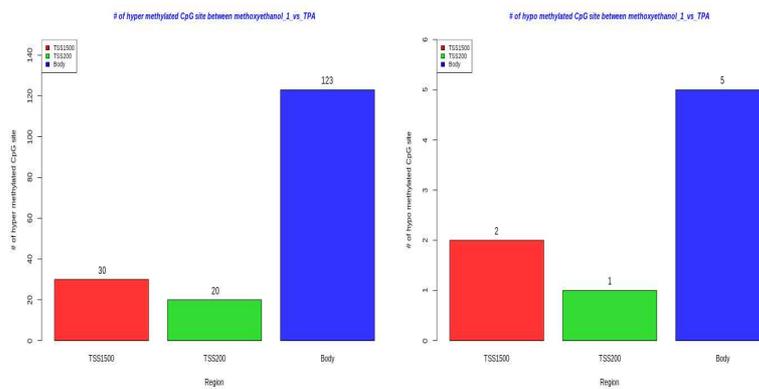
0.1 $\mu\text{l/ml}$



1.0 $\mu\text{l/ml}$

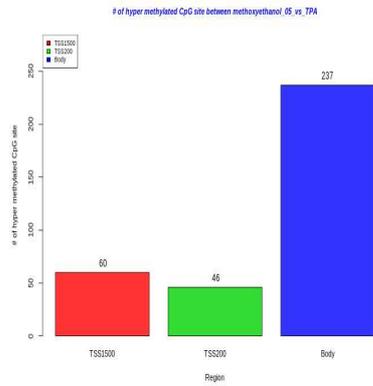


0.5 $\mu\text{l/ml}$

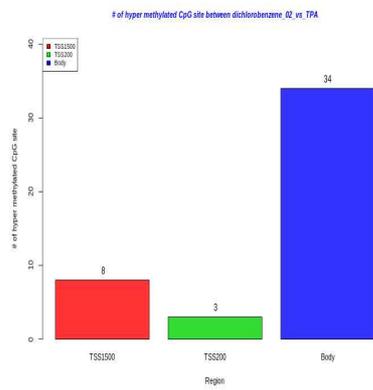


1.0 $\mu\text{l/ml}$

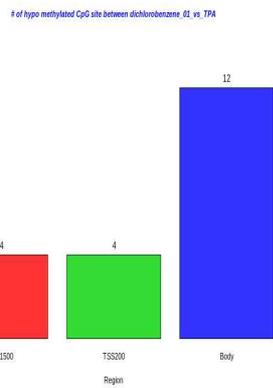
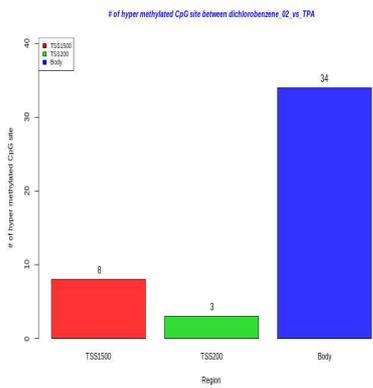
메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구



0.5 $\mu\text{l}/\text{ml}$



0.2 $\mu\text{l}/\text{ml}$

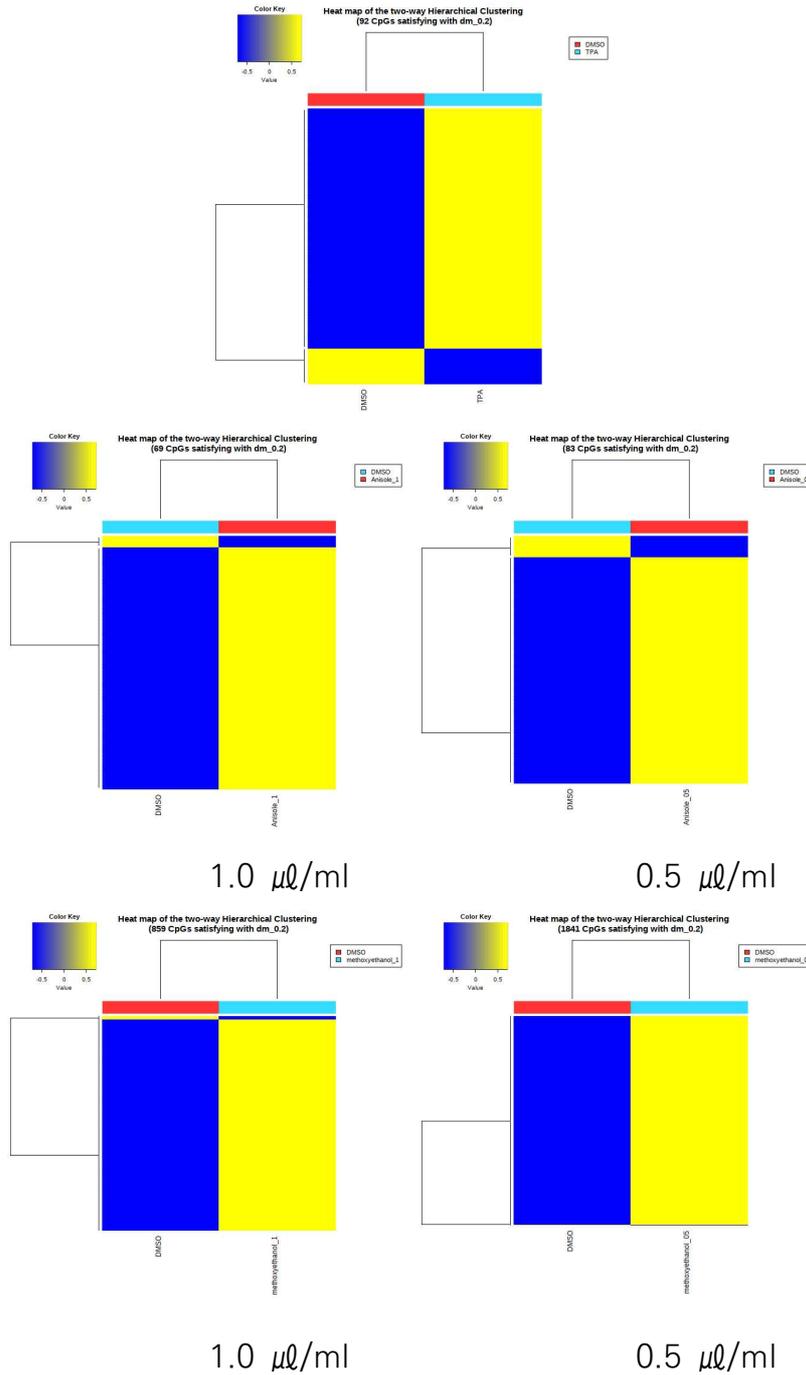


0.1 $\mu\text{l}/\text{ml}$

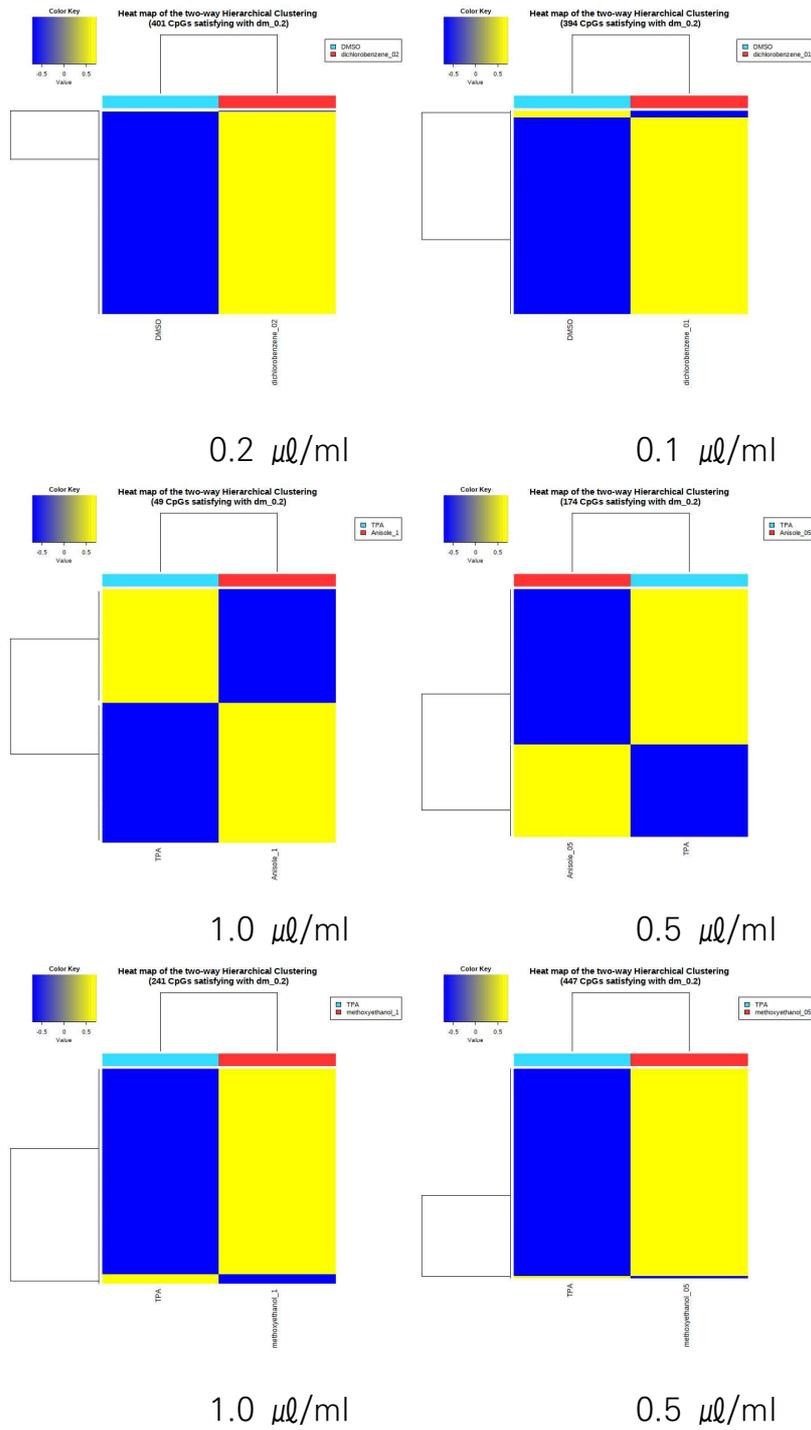
[그림 III-17] Distribution of functional location for Hyper, Hypo methylated CpGs

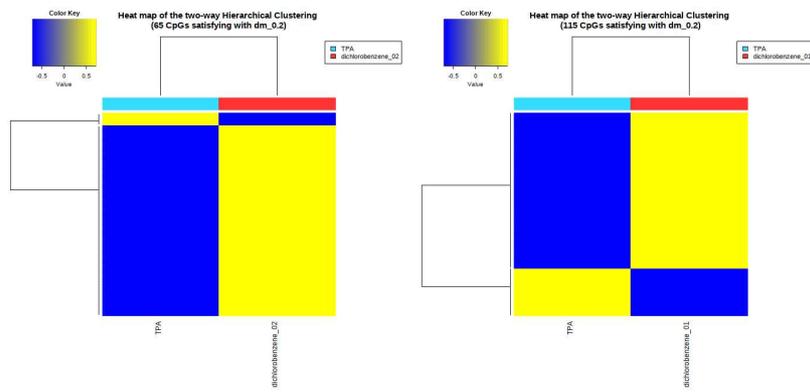
(7) Cluster 분석: Hierarchical clustering에 대한 Heat map

유의성있는 자료의 M-value를 이용하여 대조군 대비 각 시험물질 노출군간 메틸화된 CpG 거리 유사성에 대한 Hierarchical clustering의 Heat map그렸다.



메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생 유전학적 발암원성 연구





0.2 $\mu\text{l/ml}$

0.1 $\mu\text{l/ml}$

[그림 III-18] Heat map of the two-way Hierarchical clustering

IV. 결론



IV. 결론

본 연구는 발암성 규명이 필요한 산업화학물질인 Anisol, 2-methoxyethanol, 1,2-dichlorobenzene에 대한 후생유전학적 평가의 일환으로 염색체내 메틸화 양상을 조사하였다.

선정된 산업화학물질을 Bhas 42 세포주에 노출한 다음 Illumina사에서 제공한 방법에 따라 DNA를 추출하여 Illumina Infinium Mouse Methylation BeadChip로 >285K CpGs 구역에서 메틸화 양상을 분석하였다.

분석결과 음성대조군 대비 모든 시험 노출군에서는 주로 고밀도 CpG 섬에서 메틸화된 CpG 수가 많았다. Anisol과 1,2-dichlorobenzene 노출군은 음성대조군과 양성대조군간의 메틸화된 CpG 개수의 차이와 유사한 차이를 보였고, 2-methoxyethanol 노출군에서 약간 높은 경향을 보였고, 주로 메틸화된 구역은 고밀도 CpG 섬의 TSS1500과 TS200 프로모터 위치, 염색체의 Body 위치였으나 대조군과 각 시험물질 노출군 간의 평균 beta-value는 주로 절대값 0.2 이내 낮은 범위의 관계를 보였다.

이러한 결과로부터 선정된 산업화학물질은 CpG 구역에서 대조군과와 유의한 메틸화 차이를 보인다고 생각되지 않는다. 세포형질전환 시험에서 각 시험물질들은 음성의 결과를 보였다. 따라서 선정된 산업화학물질은 메틸화 변화에 의한 후생유전학적 변화를 유발하지 않는 것으로 판단된다. 또한, TPA는 C1 domain^{88,89)}에 직접 결합하여 신호 전달 효소 단백질 효소(PKC)를 활성화하는 작은 분자의 물질이다. 일반적으로 TPA는 설치류의 피부 발암을 위한 종양 촉진제로 사용되며 흑색종, 유방암 및 구강암과 같은 종양에서 악성 세포의 증식과 관련이 있다.^{90~92)} 그러나 TPA로 처리된 림프종 세포에서는 대조군에 비해 세포 증식이 감소하였기 때문에 TPA의 기능에 대해 논란이 있다.^{93~94)} 따라서 시험물질 노출군과 유사한 메틸화 변화 양상을 보인 TPA 또한 Bhas 42 세포주의 형질전환은 메틸화의 관련성은 낮을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. World Cancer Report 2014, B.W.S.a.C.P. Wild, Editor 2014, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France.
2. World Health Organization(WHO). (2014A). Cancer(Fact Sheet). Retrieved November 17, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70 p.
4. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagnier L, Epstein S, Sasco AJ. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res*. 2007;105:414-429 p.
5. Benigni R, Bossa C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. *Chem Rev*. 2011;111:2507-2536 p.
6. Tomatis L, Huff J, Hertz-Picciotto I et al. Avoided and avoidable risks of cancer. *Carcinogenesis*. 1997;18:97-105 p.
7. Sokal RR, Oden NL, Rosenberg MS, Thomson BA. Cancer incidences in Europe related to mortalities, and ethnohistoric, genetic, and geographic distances. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97:6067-6072 p.
8. Belpomme D, Irigaray P, Sasco AJ, Newby JA, Howard V, Clapp R, Hardell L. The growing incidence of cancer: role of lifestyle and screening detection. *Int J Oncol*. 2007;30:1037-1049 p.

9. Liechtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer. *N Engl J Med.* 2000;343:78-84 p.
10. Benigni R. Social sexual inequality and sex difference in cancer incidence. *Environ Res.* 2007;104(1):128-134 p.
11. Zeiger E. Historical perspective on the development of the genetic toxicity test battery in the United States. *Environ Mol Mutagen.* 2010;51:781-791 p.
12. Zeiger E. History and rationale of genetic toxicity testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environ Mol Mutagen.* 2004;44(5):363-371 p.
13. Zeiger E. Identification of rodent carcinogens and non-carcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. *Regulat Toxicol Pharmacol.* 1998;28:85-95 p.
14. Hansch C. Structure-activity relationships of chemical mutagens and carcinogens. *Sci Total Environ.* 1991;109,110, 17-29 p.
15. Benigni R, Netzeva TI, Benfenati E, Bossa C, Franke R, Helma C, Hulzebos E, Marchant C, Richard A, Woo YT, Yang C. The expanding role of predictive toxicology: an update on the (Q)SAR models for mutagens and carcinogens. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25:53-97 p.
16. Baker SG, Cappuccio A, Potter JD. Research on early-stage carcinogenesis: are we approaching paradigm instability? *J Clin*

- Oncol. 2010;28:3215-3218 p.
17. Benigni R. Alternatives to the carcinogenicity bioassay for toxicity prediction: are we there yet? *Exp Opin Drug Metab Toxicol.* 2012;8:1-11 p.
 18. Zeiger E. Strategies and philosophies of genotoxicity testing: what is the question? *Mutat Res.* 1994;304:309-314 p.
 19. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. S2(R1). ICH Geneva, Switzerland. 2008.
 20. Kirkland D, Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo. *Mutat Res.* 2008;654:114-132 p.
 21. Elespuru RK, Agarwal R, Atrakchi AH, Bigger CAH, Heflich RH, Jagannath DR et al. Current and future application of genetic toxicity assays: the role and value of in vitro mammalian assays. *Toxicol Sci.* 2009;109:172-179 p.
 22. EFSA. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J.* 2011;9:2379.
 23. Kirkland D, Aardema MJ, Henderson L, Muller L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I Sensitivity,

- specificity and relative predictivity. *Mutat Res.* 2005;584; 1-256 p.
24. Benigni R, Bossa C, Tcheremenskaia O, Giuliani A. Alternatives to the carcinogenicity bioassay: in silico methods, and the in vitro and in vivo mutagenicity assays. *Exp Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6;1-11 p.
25. Benigni R, Bossa C, Tcheremenskaia O, Battistelli CL, Crettaz P. The New ISSMIC Database on in vivo micronucleus, and its role in assessing genotoxicity testing strategies. *Mutagenesis.* 2012;27;87-92 p.
26. Lai DY, Woo YT. Reducing carcinogenicity and mutagenicity through mechanism-based molecular design of chemicals. In Boethling RS, Voutchkova AM. eds. *Green Processes. Volume 9: Designing Safer Chemicals* Wiley Heidelberg. 2012.
27. Benigni R. Mechanisms of action of chemical carcinogens and their role in structure-activity relationships (SAR) analysis and risk assessment, 1st ed. *Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Models of Mutagens and Carcinogens.* CRC Press Boca Raton FL.;2003.41-80 p.
28. Huff J. Long-term chemical carcinogenesis bioassays predict human cancer hazards. Issues, controversies, and uncertainties. *Ann NY Acad Sci.* 1999;895;56-79 p.
29. Huff J. Value, validity, and historical development of carcinogenesis studies for predicting and confirming carcinogenic risks to humans. In: Kitchin KT. 1st ed. *Carcinogenicity Testing, Predicting,*

- and Interpreting Chemical Effects. New York: Marcel Dekker;1999;21-123 p.
30. Melnick RL, Kohn MC, Portier CJ. Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1996;104:123-134 p.
 31. Huff J. More toxin tests needed. *Science.* 2008;319:725-726 p.
 32. Hernandez LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res.* 2009;682:94-109 p.
 33. Barrett JC, Ts'o PO. Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 1978;75:3761-3765 p.
 34. Berwald Y, Sachs L. 1965 In vitro transformation of normal cells to tumour cells by carcinogenic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst.* 1965;35:641-661 p.
 35. Berwald Y, Sachs L. In vitro cell transformation with chemical carcinogens. *Nature.* 1963;200:1182-1184 p.
 36. OECD. Detailed Review Paper on Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens. OECD Series on Testing and Assessment. 2007;31.
 37. Vasseur P, Lasne C. OECD Detailed Review Paper (DRP) number 31 on 'Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens': main results and conclusions. *Mutat Res.*

2012;744:8-11 p.

38. Corvi R, Aardema MJ, Gribaldo L, Hayashi M, Hoffmann S, Schechtman LM, Vanparys P. ECVAM prevalidation study on in vitro cell transformation assays: general outline and conclusions of the study. *Mutat Res.* 2011;744:12-19 p.
39. Vanparys P, Corvi R, Aardema MJ, Gribaldo L, Hayashi M, Hoffmann S, Schechtman LM. Application of in vitro cell transformation assays in regulatory toxicology for pharmaceuticals, chemicals, food products and cosmetics. *Mutat Res.* 2012;744:111-118 p.
40. Hernández LG, van Steeg H, Luijten M, van Benthem J. Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutat Res.* 2009;682:94-109 p.
41. Kakunaga T. A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from Balb 3T3. *Int J Cancer.* 1973;12:463-473 p.
42. Meyer AL. In vitro transformation assays for chemical carcinogens. *Mutat Res.* 1983;115:323-338 p.
43. Hayashi M, Kojima H, Corvi R, Stokes W, Jacobs A, Morita T, Schechtman L, Suzuki A. The Validation Management Team Report on the Bhas 42 CTA. EU Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing; Ispra, Italy. EURL ECVAM Recommendations. 2012.
44. Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S et

- al. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* 2010;702:100–122 p.
45. Tanaka N, Sasaki K, Hayashi K, Sakai A, Asada S, Muramatsu D et al. An international collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells. *AATEX.* 2009;14:831–848 p.
46. Sakai A, Sasaki K, Hayashi K, Muramatsu D, Arai S, Endou N et al. An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res.* 2011;725: 57–77 p.
47. OECD Organisation for Economic and Cooperative Development. Guidance Document on the in vitro Bhas 42 cell transformation assay. Series on Testing and Assessment. No. 231. Paris. [(accessed on 3 December 2016)]. Available online: [https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO\(2016\)1.pdf](https://www.oecd.org/env/ehs/testing/ENV_JM_MONO(2016)1.pdf)
48. Melnick RL, Kohn MC, Portier CJ. Implications for risk assessment of suggested nongenotoxic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 1996;104(Suppl. 1):123–134 p.
49. Hattis D, Chu M, Rahmioglu N, Goble R, Verma P, Hartman K, Kozlak M. A preliminary operational classification system for nonmutagenic modes of action for carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol.* 2009;39:97–138 p.
50. Waters MD, Jackson M, Lea I. Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and

- toxico genomics methods. *Mutat Res.* 2010;705:184-200 p.
51. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1057-1068 p.
52. Herceg Z, Lambert MP, van Veldhoven K, Demetriou C, Vineis P, Smith MT et al. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis.* 2013;34: 1955-1967 p.
53. Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: Targeting epigenetic changes in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16:241-263 p.
54. Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:1182-1188.
55. Greally JM, Jacobs MN. In vitro and in vivo testing methods of epigenomic endpoints for evaluating endocrine disruptors. *ALTEX.* 2013;30:445-471 p.
56. Pan Y, Liu G, Zhou F, Su B, Li Y. DNA methylation profiles in cancer diagnosis and therapeutics. *Clin Exp Med.* 2018;18:1-14 p.
57. Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010;11(3):191-203 p.
58. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene.* 2002;21(35): 5427-5440 p.
59. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association

- with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042–2054 p.
60. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet.* 2007;3(10):2023–2036 p.
61. O'Riain C, O'Shea DM, Yang Y, Le Dieu R, Gribben JG, Summers K et al. Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma. *Leukemia.* 2009;23(10):1858–1866 p.
62. Breton CV, Byun HM, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(5):462–467 p.
63. Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK, Maxwell AP, Beck S, Savage DA. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genomics.* 2010;3:33 p.
64. Thirlwell C, Eymard M, Feber A, Teschendorff A, Pearce K, Lechner M et al. Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium Human Methylation BeadChip. *Methods.* 2010;52(3):248–54 p.
65. Grafodatskaya D, Choufani S, Ferreira JC, Butcher DT, Lou Y, Zhao C et al. EBV transformation and cell culturing destabilizes

- DNA methylation in human lymphoblastoid cell lines. *Genomics*. 2010; 95(2);73-83 p.
66. NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards. "#0401". National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH).
67. Greenburg L, Mayers MR, Goldwater LJ, Burke WI, Moskowitz S. Health Hazards in the Manufacture of "Fused Collars." I. Exposure to Ethylene Glyco Monomethyl Ether. *J industr Hyg and Tox*. 1938;20;134-47 p.
68. Medinsky MA, Singh G, Bechtold WE, Bond JA, Sabourin PJ, Birnbaum LS, Henderson RF. Diposition of three glycol ethers administered in drinking water to male F344N rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990;102(3);443-455 p.
69. Blair AH, Valle BL. Some catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*. 1966;5(6);2026-34 p.
70. Tsai CS. Relative reactivities of primary alcohols substrates of liver alcohol dehydrogenase. *Canad J Biochem*. 1968;46(4);381 p.
71. Miller RR, Hermann EA, Langvardt PW, McKenna MJ, Schwetz BA. Comparative metabolism and disposition of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in male rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983;67(2);229-237.
72. McGregor DB, Willins MJ, McDonald P, Holstrom M, McDonald D, Niemeier RW. Genetic effects of 2-methoxyethanol and bis (2-methoxyethyl) ether. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1983;70(2);303-316.

73. Occupational Safety and Health Administration (OSHA): Occupational Exposure to 2-Methoxyethanol, 2-Ethoxyethanol and their Acetates(Glyco Ethers), Proposed Rule Federal Register. 1993;54:15526-15632 p.
74. Smith, Michael B. Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure 6th ed, New York: Wiley-Interscience; 2007.
75. ECHA, 2011. Anisole Registration Dossier. Retrieved from. <https://echa.europa.eu/lt/registration-dossier/-/registered-dossier/14423/1/2>.
76. "CDC-Immediately Dangerous to Life or Health Concentrations (IDLH): o-Dichlorobenzene-NIOSH Publications and Products". www.cdc.gov. 16 November 2017. Retrieved 22 April 2018.
77. "CDC-NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards -o-Dichlorobenzene". www.cdc.gov. Retrieved 22 April 2018.
78. Shimizu M, Yasui Y, Matsumoto N. Structural specificity of aromatic compounds with special reference to mutagenic activity in Salmonella typhimurium-a series of chloroor fluoronitrobenzene derivatives. Mutat Res. 1983;116:217-238 p.
79. Myhr BC, Caspary WJ. Chemical mutagenesis at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells: results for 31 coded compounds in the National Toxicology Program. Environmental and Molecular Mutagenesis. 1991;18:51-83 p.
80. Kim YJ, Ryu JC. Evaluation of the Genetic Toxicity of Synthetic

Chemical (XVII) – In vitro Mouse Lymphoma Assay and in vitro Supravital Micronucleus Assay with 1,2-Dichlorobenzene. *Molecular and Cellular Toxicology*. 2007;3:113-118 p.

81. Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeiger E, Haseman JK, Spalding J et al. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vivo genetic toxicity assays. *Science*. 1987;236:933-941 p.
82. Shelby MD, Erexson GL, Hook GJ, Tice RR. Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: Results with 94 chemicals. *Environ Mole Muta*. 1993;21:160-179 p.
83. ECHA. SUBSTANCE EVALUATION CONCLUSION as required by REACH Article 48 and EVALUATION REPORT for 1,2-dichlorobenzene. Substance Evaluation Conclusion document EC No 202-425-9. 16 January 2020.
84. Sasaki K, Mizusawa H, Ishidate M. Isolation and characterization of ras-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Jpn J Cancer Res*. 1988;79:921-930 p.
85. Sasaki K, Umeda M, Sakai A, Yamazaki S, Tanaka N. Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2015;33:1-35 p.
86. Teschendorff AE, Marabita F, Lechner M, Bartlett T, Tegner J.

- Gomez-Cabrero D. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. 2013;29(2):189-196 p.
87. Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, Lin SM. Comparison of beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:1-9 p.
88. Castagna M. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257:7847-7851 p.
89. Chen HW. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 expression by docosahexaenoic acid mediated by heme oxygenase 1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced MCF-7 human breast cancer cells. *Archives of toxicology*. 2013;87:857-869 p.
90. Fukushima K, Takahashi K, Fukushima N, Honoki K, Tsujiuchi T. Different effects of GPR120 and GPR40 on cellular functions stimulated by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016; 475:25-30 p.
91. Lii CK. Docosahexaenoic acid inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced fascin-1-dependent breast cancer cell migration by suppressing the PKCdelta- and Wnt-1/beta-catenin-mediated pathways. *Oncotarget*. 2016;7; 25162-25179 p.
92. Slaga TJ, Scribner JD, Viaje A. Epidermal cell proliferation and

promoting ability of phorbol esters. Journal of the National Cancer Institute. 1976;57;1145-1149 p.

93. Alfredsson CF, Rendel F, Liang QL, Sundstrom BE, Nanberg E. Altered sensitivity to ellagic acid in neuroblastoma cells undergoing differentiation with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and all-trans retinoic acid. Biomedicine & pharmacotherapy=Biomedecine & pharmacotherapie. 2015;76;39-45 p.
94. Strair RK. Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2002;8;2512-2518 p.

Abstract

Study on epigenetic carcinogenicity of industrial chemicals through methylation analysis

This study was conducted to investigate the methylation patterns of DNA as part of the epigenetic evaluation of Anisol, 2-methoxyethanol, and 1,2-dichlorobenzene, which are industrial chemicals requiring carcinogenicity.

After exposing the selected industrial chemicals to the Bhas 42 cell line, DNA was extracted according to the method provided by company Illumunina, and methylation was analyzed for >285k CpGs sites with Illumina Infinium Mouse Methylation BeadChip.

As a result of the analysis, all test chemical exposure groups had a higher number of CpGs methylated at the Hyper CpGs sites than the negative control group. Anisol and 1,2-dichlorobenzene exposure groups had similar differences in the number of methylated CpGs compared to the negative control group and the positive control group, but the 2-methoxyethanol exposure group showed a slightly higher tendency. Methylated sites were mainly observed in the TSS1500 and TS200 promoter sites and body sites. However, the average beta-value of each test chemical exposure group showed a low-range relationship mainly within the absolute value of 0.2.

From these results, the selected industrial chemicals did not show significant methylation differences from the control groups at CpGs sites, and the results of the cell transformation tests were also negative, so it is judged that they do not induce epigenetic changes due to methylation changes.

The industrial chemicals selected from these results did not show a significant methylation difference from the control group at CpGs sites, and all industrial chemicals were also negative as a result of the cell transformation test, so it is judged that epigenetic changes caused by methylation changes are not induced. In addition, TPA, which showed similar methylation patterns to the test chemical-exposed groups, is thought to have low methylation relevance to transformation in Bhas 42 cell lines.

Key words : Anisol, 2-methoxyethanol, 1,2-dichlorobenzene, epigenetic, methylation

연구진

연구기관 : 산업안전보건연구원

연구책임자 : 서동석 (연구위원, 산업화학연구실)

연구기간

2022. 02. 01. ~ 2022. 11. 30.

본 연구보고서의 내용은 연구책임자의 개인적 견해이며,
우리 연구원의 공식견해와 다를 수도 있음을 알려드립니다.

산업안전보건연구원장

**메틸화 분석을 통한 산업화학물질의 후생유전학적 발암원성 연구
(2022-산업안전보건연구원-860)**

발행일 : 2022년 11월 30일

발행인 : 산업안전보건연구원 원장 김은아

연구책임자 : 산업화학연구실 연구위원 서동석

발행처 : 안전보건공단 산업안전보건연구원

주소 : (44429) 울산광역시 중구 종가로 400

전화 : 042-869-8514

팩스 : 042-869-8693

Homepage : <http://oshri.kosha.or.kr>

I S B N : 979-11-92782-53-9