

보건분야-연구자료
연구원 2000-45-195
H-RD-I-2000-45-195

유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(III)

- 면역화학 및 DNA polymorphism 분석을 통한 간장장애 평가-



한국산업안전공단
산업안전보건연구원



提 出 文

韓國産業安全公團 理事長 貴下

본 연구를 1999년도 산업안전보건연구원의 연구사업중 “유해
인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(Ⅲ)”에 대한 최종
결과 보고서로 제출합니다.

1999년 12월 31일

제 출 자 : 산업안전보건연구원장 정 호 근
연구책임자 : 책 임 연 구 원 김 기 웅
공동연구자 : 수 석 연 구 원 강 성 규
 책 임 연 구 원 양 정 선
 연 구 원 김 태 균
 손 남 석
 정 효 석

요 약 문

1. 과 제 명 : 유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구 (Ⅲ)
(면역화학 및 DNA polymorphism 분석 을 통한 간장장애 평가)

2. 연구기간 : 1999. 1. 1. - 1999. 12. 31.

3. 연 구 자 : 산업안전보건연구원 직업병연구센터
책임연구원 김기웅, 수석연구원 강성규

4. 연구목적

- Cytochrome P-450(CYP) 단일세포성면역항체를 이용하여 DMF 대사에 관여하는 CYP 동위효소 확인
- DMF의 노출형태에 따른 간장장애 파악
- CYP2E1과 aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2) 유전자다양성의 차이가 DMF의 대사와 간장장애에 미치는 영향을 파악하여 민감도지표 개발

5. 연구내용

1) 기초연구(동물실험)

- 흰쥐에 DMF, MEK, toluene을 단일 및 혼합투여 후, microsome을 분리하여 cytochrome P-450의 유도발현 확인
- 단일 및 혼합노출 후 간장독성 유발의 정도를 관찰

2) DMF 노출 근로자에 대한 연구

- 공기중 DMF 노출농도 및 뇨중 NMF의 배설량 측정
- 간기능 검사
- 혈액에서 genomic DNA 추출

- 동물실험 결과를 토대로 하여 DMF의 대사에 관여하는 CYP2E1과 ALDH2 유전자 증폭 및 유전자다양성 분석
- 유전자다양성과 DMF의 대사산물인 NMF의 배설량에 대한 상관성을 분석하여 개인간의 DMF 대사능의 차이를 파악
- 민감도지표(susceptibility marker) 개발

6. 활용계획

- DMF의 단일노출보다 toluene과의 혼합노출이 간장독성이 더 큰 것으로 나타나 DMF 취급 사업장의 기술지도에 활용
- DMF 대사에 있어서 개인간의 대사능의 차이를 유전자다양성 분석을 통하여 평가할 수 있는 민감도지표로 활용

7. 연구개요

본 연구에서는 강력한 간장독성물질로 알려져 있는 DMF를 대상으로 하여 개인간의 DMF 대사능의 차이와 노출형태에 따른 간장장애를 평가하고자 기초실험과 근로자에 대한 실험을 병행하여 수행하였다. 기초실험은 동물을 이용하여 DMF의 대사에 관여하는 CYP 동위효소의 형태를 파악하는 한편, 노출형태에 따른 간장독성의 차이를 보고자 하였다. 근로자에 대한 연구는 동물실험에서 나타난 결과를 토대로 하여 DMF 취급 근로자들에 있어서 개인에 따른 DMF의 대사능을 유전자다양성 분석을 통하여 평가하였다. 그 결과, 동물실험을 통하여 DMF의 대사에 주로 관여하는 효소가 CYP2E1 동위효소임을 단일세포성향체를 이용하여 확인하였으며, DMF와 toluene의 혼합된 형태의 노출이 DMF 단일노출과 DMF와 MEK가 혼합된 형태의 노출 보다 간장독성이 더 크다는 결과를 얻었다. 따라서 본 기초연구결과를 감안하여 보면, DMF 취급 근로자들의 간강장애 예방을 위해서는 DMF와 toluene의 혼합된 형태의 노출을 억제하는 것이 바람직할 것으로

로 보인다. 또한, 금번의 기초실험에서 DMF의 대사에 있어서 주로 CYP2E1 동위효소가 관여하는 것으로 나타나 DMF 취급 근로자를 대상으로 하여 DMF의 대사에 있어서 개인간 대사능의 차이를 CYP2E1 유전자다양성 분석을 통하여 평가하는 한편, DMF의 대사과정에서 부가적으로 생성되는 aldehyde를 제거시키며, 알코올의 대사에 관여하는 주요한 효소인 ALDH2에 대한 유전자다양성 분석을 통하여 DMF의 대사능을 평가하고자 하였다. 그 결과, CYP2E1의 경우는 CYP2E1*2/*2 (active form) 유전자형에서 ALDH2는 ALDH2*1/*1(inactive form) 유전자형에서 NMF의 생성이 증가되는 것으로 관찰되어 DMF의 대사에 있어서 개인간의 대사능은 유전자다양성에 따라 차이가 있는 것으로 나타났다. 따라서 금번의 연구에서 나타난 결과를 감안해 보면, 유전자다양성 분석을 통하여 유해화학물질의 노출에 따른 대사능을 평가하는데 있어서 민감도 지표(susceptibility marker)로 활용할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 본 연구에서는 NMF와 conjugation 반응을 통하여 다른 물질로 변형시키는 glutathione S-transferase(GST)와 같은 phase II 효소와의 상관성을 분석하지 못한 제한점을 가지고 있다. 따라서 추후에는 phase I 효소뿐만 아니라 phase II 효소에 대한 유전자다양성 연구가 지속적으로 이루어져서 개인에 따른 대사능의 차이, 직업성 질병의 평가와 발생기전 등을 규명할 수 있는 새로운 지표물질의 개발이 필요하다고 생각된다.

8. 중 심 어

[DMF, NMF, aldehyde dehydrogenase 2와 Cytochrome P-4502E1 유전자 다양성]

차 례

요약문

I. 서 론	1
II. 연구방법	6
1. 동물실험	6
1) 재료	6
2) 간 microsomes의 분리	7
3) 간장의 microsomal CYPs 정량 및 CYP 유도 확인	7
4) 간장의 조직학적 변화	8
2. DMF 노출 근로자에 대한 연구	8
1) 연구대상	8
2) 연구방법	9
(1) 공기중 DMF 및 뇨중 NMF 농도 측정	9
(2) DNA 추출 및 유전자다양성 분석	9
(3) 자료분석	10

Ⅲ. 연구결과	11
1. 동물실험	11
가. DMF의 대사와 CYPs의 유도	11
나. 간장의 조직학적 변화	15
2. DMF 노출 근로자 조사	15
가. 일반적 특성	15
나. 기증 DMF와 뇨중 NMF의 농도	17
다. 간기능 검사	17
라. ADHH2 유전자다양성 분석	19
마. CYP2E1 유전자다양성 분석	21
바. DMF의 대사와 유전형(genotype)의 상관성	23
Ⅳ. 고 찰	29
Ⅴ . 결 론	38
Ⅵ. 참고문헌	41

I. 서 론

N,N-dimethylformamide(DMF)는 극성 및 비극성 용매에 잘 녹으며, 수지류에 대한 뛰어난 용해성을 가지고 있어서 합성피혁, 합성섬유 및 필름제조 등에 널리 사용되고 있다(IPCS, 1991). DMF는 다른 유기용제와 마찬가지로 호흡기와 피부를 통하여 흡수되며(Mraz와 Nohova, 1992), 급성으로 노출될 경우에 복통, 구토, 어지러움증 및 혈압상승이 일어날 수 있으며, 만성적으로 노출될 경우에는 알코올에 대한 불내성, 체장질환 및 고환암 등 여러 건강장해를 일으킬 수 있으나(IPCS, 1991), 1차 표적기관이 간장으로 주로 간장독성을 유발한다(Clayton 등, 1963; Lauwerys 등, 1980; Mraz 등, 1989; Arlien-Soborg, 1992).

DMF는 강력한 간장독성 물질로서 체내에 흡수되면, 간장의 microsomes에 있는 이물질 대사 효소계 즉, cytochrome P-450 (CYP)에 의해서 DMF의 methyl기($-CH^3$) 하나가 수산화(hydroxylation, OH)되어 N-hydroxymethyl-N-methylformamide(HMMF)가 생성되고, HMMF는 다시 효소 또는 비효소반응을 통하여 N-methylformamide(NMF)로 대사변형 된다. 대사변형체인 NMF는 다시 CYP에 의해서 두가지 경로로 대사소실과정(metabolic fate)을 겪게된다. 하나는 NMF의 methyl기가 수산화되어 N-hydroxymethyl formamide(HMF)가 생성되는 과정이고, 다른 하나는 N-formyl기가 산화반응에 의해서 methylisocyanate(MIC)가 생성되고, 생성된 MIC는 다시 glutathion과 포합반응(conjugation)에 의해서 N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)systeine(AMCC)으로 대사되는 경로이다(Cooksey 등, 1983; Kestell 등, 1987; Pearson 등, 1991; Mraz와 Nohova, 1992). 흡수된 이물질들(xenobiotics)의 대부분은 이물질 대사 효소에 의해서 일련의 대사과정을 거치면서 흡수된 본래의 물질 보다 극성과 활성이 큰 물질

로 대사변형되어 해독대사가 이루어지는 반면, 일부는 활성화된 중간 대사체에 의해서 체내 독성이 유발된다. 따라서 흡수된 이물질들에 의한 체내의 독성은 흡수된 본래의 물질에 의해서도 유발될 수 있으나, 주로 활성화된 중간체들과 대사과정에서 부가적으로 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등에 의한 것이라 볼 수 있다. DMF의 경우에도 DMF의 자체보다는 CYP에 의해서 변형된 NMF나 HMMF와 같은 활성화된 대사 중간체에 의한 독성이 더 크다(Kennedy, 1986; Gescher, 1993; Bulcke 등, 1994). Mraz 등(1989)은 동물에 DMF를 1회 투여한 후, 대사산물을 측정된 결과, NMF의 배설량이 전체의 반을 차지하고 AMCC는 1-3%가 배설되는 것으로 보고하였으며, Kestell 등(1987)은 종에 따른 차이는 있으나 DMF 보다 NMF에 의한 간장독성이 크다고 보고하였다. 따라서 간장의 손상은 DMF의 노출농도와 노출형태에 의존하지만(Scaileteur와 Lauwerys, 1987), 대사과정에서 생성되는 활성화된 대사 중간체에 의한 영향이 크다고 볼 수 있기 때문에 대사속도가 간장독성과 밀접한 관계가 있다고 본다. Krivanek 등(1978)은 DMF에 노출 3시간 후에 NMF의 배설량이 최대였음을 보고하였으며, 김기웅 등(1999)도 우리 나라의 합성피혁제조업에서 DMF에 노출되는 근로자들을 대상으로 한 연구에서 DMF의 노출 수준과는 상관없이 노출 후 3시간에 NMF의 최대 배설량을 보였으며, 노출 정지 후 18시간 이후에는 0값에 근접한 매우 적은 양이 검출되었다고 보고하였다. 따라서 NMF의 배설량을 측정하여 DMF에 대한 대사속도를 결정한다면, DMF를 NMF로 대사변형시키는데 관여하는 효소와 생성된 NMF를 제거시키거나 다른 물질로 변형시키는 효소들의 활성을 파악하는 것이 매우 중요하다고 볼 수 있다. 즉, 위에서도 언급하였듯이 DMF를 HMMF로 1차 대사 변형시키는데 관여하는 CYP, 생성된 HMMF가 NMF로 변형되는데 관여하는 효소와 NMF와 포합반응을 통하여 다른 물질로 변형시키는 phase II 효소들로서 이들 효소의 활

성에 따라 NMF의 생성과 제거에 많은 영향을 미친다.

Imazu 등(1992)의 보고에 의하면, Wistar계 수컷 흰쥐에 체중 kg당 DMF 475 mg을 1주일 동안 피하 주사한 후, CYP의 함량 및 CYP 의존성 전자-전달계, phase II 효소인 glutathione-S-transferase(GSH)와 ROS 제거효소들의 활성도를 측정한 결과, CYP의 함량 및 CYP 의존성 전자-전달계의 활성도는 감소된 반면, GSH의 활성도는 현저히 증가되었고 하였다. 고상백 등(1999)은 DMF의 투여농도를 달리하여 흰쥐에 3일 동안 복강주사한 후 간장의 microsomes에서 CYP의 함량을 측정한 결과, 투여농도 변화에 따른 CYP 함량 변화는 없었으나 CYP2E1 동위효소에 선택적인 활성을 보이는 ρ -nitrophenol hydroxylase(ρ NPH)의 활성도는 투여군에서 대조군 보다 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었고, 투여농도 증가에 따라 활성도도 증가되었다고 보고하였다. Amato 등(1996)도 흰쥐의 체중 kg당 50, 200 및 400 mg의 DMF를 투여한 후 간장의 microsomes에서 CYP2B1과 CYP2E1 동위효소에 선택적인 활성을 보이는 pentoxyresolufin O-deethylase(PROD)와 aniline hydroxylase(AH)의 활성도가 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다고 보고하였다. Wang 등(1999)도 DMF를 투여한 흰쥐의 혈청에서 GST의 활성도가 증가하였음을 보고하였다. 이와 같이 DMF의 대사와 독성은 체내의 항상성 조절인자 즉, 효소의 활성도와 많은 연관성을 가지고 있으며, 그러한 이유중의 하나는 모든 이물질의 대사가 일련의 연쇄적인 반응을 통하여 이루어지기 때문이다. 그러나 이물질 대사효소의 활성은 내인성물질(endogenous substances)의 조성뿐만 아니라 대사 과정에 관여하는 효소들의 상호작용에 의한 영향으로 말미암아 효소활성이 차이를 보인다. 그러한 차이점은 효소의 고유한 성질에 의해서 특이성과 중복성을 가지고 있다는 것이다. 그 예로서, CYP2E1 동위효소는 ethanol에 의하여 유도발현 되며 ethanol 대사에 관여하는 특이성을 가지고 있는 반면, acetone

에 의해서도 유도되는 중복성을 가지고 있다. 또한 ethanol 대사에 관여하는 aldehyde dehydrogenase(ALDH)(Khanna 와 Israel, 1980)는 ethanol 뿐만 아니라 trichloroethylene의 대사에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Daniel, 1963).

Ikeda 등(1972)은 toluene이 benzene의 대사를 억제하며, benzene과 toluene을 단일투여한 군에서 보다 혼합하여 투여한 군에서 대사산물의 배설량이 감소되었다고 하였으며(Sato와 Nakajima, 1979), Riihimaki(1979)는 toluene과 xylene을 혼합하여 투여한 군에서 단일 투여 군에서 보다 노중 대사산물의 배설량이 감소되었다고 보고하였다. 김기웅 등(1996)은 benzene, toluene 및 xylene을 단일, 복합 및 혼합하여 흰쥐에 투여한 후, 간장의 microsomes에서 CYP의 함량, CYP 의존성 촉매효소의 활성화도, CYP 동위효소의 유도 및 대사산물의 배설량을 측정한 결과, 투여형태에 따라서 많은 차이를 보였음을 보고하였다. 이러한 연구결과들은 위에서도 언급하였듯이 효소의 중복성에 기인한 결과로서, 이물질 대사 효소들은 특정한 물질에 대하여 대사를 수행하지만 화학적으로 구조가 비슷한 물질에 대해서도 관여를 하기 때문에 나타난 결과라 할 수 있다. 이와 같은 연구는 산업체에서 사용되는 많은 유기용제들이 단일형태 보다는 혼합된 형태로 근로자들이 노출되기 때문에 노출되는 유기용제들의 상호작용과 그로 인한 건강장해를 평가하기 위한 목적으로 이루어지고 있다고 본다. DMF의 경우도 예외는 아니다. 금번 연구의 조사대상 사업장인 합성피혁 및 합성섬유제조업에서도 DMF 단일물질 보다는 DMF와 methyl ethyl ketone(MEK), DMF와 toluene을 혼합하여 사용하고 있었다. 따라서 DMF뿐만 아니라 DMF가 MEK 및 toluene과 같은 다른 유기용제들과 혼합된 형태로 노출될 경우에 이들 유기용제의 상호작용에 의한 영향 및 건강장해를 평가할 수 있는 생물학적 모니터링 방법이 개발되어야 할 것이다.

그러므로 금번 연구의 목적은 첫째, 동물을 모델로 하여 i) CYP 단일세포성

면역항체를 이용하여 DMF 대사에 어떤 CYP 동위효소가 관여하는 지를 확인하고 ii) DMF의 단일 노출과 DMF와 MEK, DMF와 toluene의 혼합물질에 노출될 경우 이들 유기용제가 간장에 미치는 영향을 상호 비교하여 간장독성을 평가하고자 하였다. 둘째로는 DMF 노출 근로자들을 대상으로 하여 노출되는 DMF의 농도와 뇨중 대사산물인 NMF의 배설량을 측정하여, DMF 대사에 관여하는 특정한 형태의 CYP 동위효소와 ALDH2 유전자다양성을 분석하여 개인의 유전자 차이에 의한 대사능을 비교하고 간기능 상태와 연관하여 DMF에 노출되는 근로자에 대한 생물학적 민감성지표(susceptibility marker)를 개발하고자 하였다.

II. 연구방법

1. 동물실험

1) 재료

Bovine serum albumin(BSA), cytochrome C, 7-ethoxyresorufin, glycerol, NADH, NADPH, pentoxyresorufin, sucrose, DMF, MEK 및 toluene 등은 sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 유전자다양성 분석에 사용된 Taq polymerase 및 제한효소는 TaKaRa 사(Otsu, Shiga, Japan)로부터, 그 밖의 일반적인 생화학 시약은 Aldrich 사(Milwaukee, WI, USA)와 Sigma 사로부터 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 실험동물은 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐(170 ± 10 g)로서 한국화학연구소 안정성센터로부터 분양 받아 실험 1주일 전부터 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$), 습도($55 \pm 5\%$) 및 채광조절(12hr light/dark)된 사육장에서 사료와 음용수를 자유로이 섭취시켰다. 실험군은 olive oil을 투여한 대조군, olive oil에 용해시켜 체중 kg 당 DMF 450(D1), 900(D2), 1,800(D3) mg, MEK(M) 324 mg과 toluene(T) 436 mg을 투여한 단일투여군 5개군, DMF와 MEK 혼합투여군(M+D1, M+D2, M+D3) 3개군, DMF와 toluene 혼합투여군(T+D1, T+D2, T+D3) 3개 군으로, 총 12개 군으로 하여 1일 1회씩 3일간 연속하여 복강주사 하였다. 각각의 실험군은 4마리로 하였다.

2) 간 microsomes의 분리

유기용제 마지막 투여 24시간 후에 sodium-thiopental(40 mg/kg)로 마취시킨 다음, 즉시 간을 절제하여 0.9% sodium chloride 용액으로 씻어내고, 응고된 혈액 및 지방질을 제거한 간을 0.25 mole sucrose 용액으로 균질화한 다음, 차등원심분리(12,000xg에서 40분, 105,000xg에서 60분) 하여 0.15 mole KCl로 씻어낸 후 침전물을 0.25 mole sucrose로 resuspension 하여(Park과 Kim, 1984) 단백질 정량과 면역항체 실험 등에 사용하였다. 모든 실험은 0-4℃에서 수행하였고 분리된 microsomal 단백질의 변성을 방지하기 위하여 -80℃에서 보관하였다.

3) 간장의 microsomal CYPs 정량 및 CYP 유도 확인

Microsomal 단백질의 농도는 BSA를 표준물질로 하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의해서 정량 하였다. CYP의 함량은 Omura와 Sato 방법(1964)에 따라서 일산화탄소를 간장의 microsomes에 bubbling 시킨 후 450 nm와 490 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 몰흡광계수 $91 \text{ Cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ 로부터 함량을 결정하였다.

Microsomal 단백질에 대한 전기영동은 Laemmli(1970) 방법에 의해서 Bio-Rad Protein Ili Cell Aparatus를 사용하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel(SDS-PAGE, 8.5%)을 만든 후 각각의 시료를 10 μl 씩 gel 위에 loading하여 전기영동을 실시한 다음, 김기웅 등(1997)의 방법에 따라 Millipore 사(Bedford, MA, USA)의 Immobilon-P nitrocellulose membrane을 microsomal 단백질이 분리된 gel 위에 올려놓고 235 mA로 전류를 조절하여 Immobilon-P nitrocellulose membrane으로 이전 시켰다. Western Immunoblot은 anti-mouse CYP 단일세포성항체를 이용하여 TROPIX 사(Bedford, MA, USA)의 Western-Light PlusTM kit을 사용하여 chemiluminescence 방법으로 실

시하였다. Western Immunoblot 분석에 사용된 CYP 단일세포성향체는 박상신 박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

4) 간장의 조직학적 변화

적출한 간장을 10% formalin 고정액에서 48시간 고정시킨 후, 수세하고 나서 ethanol 용액을 이용하여 탈수시키고 포매하였다. 포매한 조직은 조직절편기를 이용하여 박절한 후, Hematoxyline & Eosin 염색액으로 염색하여 수세하고, 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

2. DMF 노출 근로자에 대한 연구

1) 연구대상

본 연구의 대상은 합성피혁 및 섬유제조업에서 DMF, MEK와 toluene에 노출되는 남성 근로자 205명을 노출군으로 하였다. 대조군은 노출군의 성(sex)을 고려하여 DMF 뿐만 아니라 기타의 유해화학물질에 노출되지 않는 사무직 근로자 360명을 대상으로 하여 총 565명이었다. 연구대상자중 설문지 작성에 문제가 있는 대조군 대상자 10명과 노출군에 있어서 DMF의 대사산물인 NMF의 배설량 측정치가 의심이 가는 4명을 제외한 551명에 대하여 CYP2E1과 ALDH2에 대한 유전자다양성을 분석하였다. CYP2E1과 ALDH2 유전자는 DMF, MEK 및 toluene과 같은 물질뿐만 아니라 흡연, 음주 및 습관성 약물복용 등에 의한 영향을 받을 수 있으므로 사전에 작성된 설문지를 이용하여 조사하였다.

2) 연구방법

(1) 공기중 DMF 및 뇨중 NMF 농도 측정

공기중 DMF의 노출량은 작업자의 호흡구 위치에 개인시료채취기를 부착하여 실리카겔을 흡착제로 하여 DMF를 포집하였다. DMF가 포집된 실리카겔관은 밀봉된 상태로 실험실로 냉장운반 하여 24시간 이내에 미국국립산업안전보건연구원(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)의 공정시험법 Method 2004(1994)에 따라 분석하였다. 뇨중 NMF의 배설량은 Kawai 등(1992)의 방법에 따라 측정하였다. 분석에 사용된 소변은 작업 종료시 채취하여 냉장상태로 실험실로 운반하여 가스크로마토그래피(HP-5890, USA)로 분석한 후, creatinine으로 보정하여 배설량을 산출하였다.

(2) DNA 추출 및 유전자다양성 분석

연구에 사용된 genomic DNA는 채혈한 전혈(whole blood)을 QIAamp Blood kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 추출하였다.

추출된 genomic DNA는 primers를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chaine reaction, PCR)을 통하여 유전자의 특정 부위를 증폭시킨 후, 제한효소의 절단부위의 존재 유·무를 가지고 ALDH2와 CYP2E1에 대한 유전자다양성 분석을 하였다.

ALDH2에 대한 유전자다양성 분석은 Crabb 등(1989)의 방법을 다소 변형하여 다음과 같은 조건하에서 실행하였다. 추출된 genomic DNA 5 μ l, 5 pmole의 primer 1 (5'-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3')과 primer 2 (5'-CCACACT-CACAGTTTTCTCTT-3') 5 μ l, 2.5 mM dNTP mixture, 250 U Taq polymerase 와 PCR buffer를 혼합한 후, gene cyclerTM(Bio-Rad, USA)를 이용하여, 95℃에

서 5분간 predenaturation 시키고, 94℃에서 1분 denaturation, 60℃에서 1분 동안 annealing, 72℃에서 1분간 extension하여, 이 세단계를 1 cycle로 하여 31 cycles를 실행하여 exon 12 위치의 유전자를 증폭시켰다. PCR 생성물을 Ksp 632I 제한효소를 이용하여 digestion 시킨 후, 4% agarose gel 전기영동을 실시하고 전개된 띠(band)를 관찰하여 ALDH2 유전자다양성을 확인하였다.

CYP2E1 유전자다양성 분석은 Uematsu 등(1994)의 방법에 따라 primer 1은 5'-TGTCGTTCCCTTCCACAGGGC-3', primer 2는 5'-TCTGTTGTCAGGCTAG-AGTG-3'으로 하여 ALDH2 유전자 증폭방법과 동일하게 실행하였고, PCR 생성물의 절단은 Dra I(18 U) 제한효소를 사용하였다.

(3) 자료분석

조사대상자에 대한 자료는 개인용 컴퓨터를 이용하여 입력한 후 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 t-test, χ^2 -test 및 ANOVA 등 자료분석을 하였다.

III. 연구결과

1. 동물실험

가. DMF의 대사와 CYPs의 유도(induce)

(1) 간장의 microsomal CYPs 정량

Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 실험대상 동물로 하여 이물질로 DMF, MEK 및 toluene을 단일 및 혼합 처리한 후 간장의 microsomes에 있어서 total CYP의 함량을 측정하여 Fig. 1.에 나타내었다. DMF 단일 투여군의 경우, 투여농도에 의존한 total CYP의 함량 변화는 없었으나 투여군에서 대조군 보다 다소 감소된 측정치를 보였다($p>0.05$). MEK 및 toluene 혼합투여군에 있어서는 대조군과 DMF 단일 투여군에서 보다 CYP의 함량이 증가된 것으로 측정되었으나 통계학적인 유의한 차이는 없었다($p>0.05$).

(2) 면역항체를 이용한 CYP의 유도확인

기질의 종류에 따라 CYP 동위효소의 활성도가 특이성을 보이는데, CYP1A는 ethoxyresorufin-O-deethylase(EROD)에 대하여, CYP2B는 pentoxyresorufin-O-dealkylase(PROD)와 CYP2E는 ρ -nitrophenol hydroxylase(ρ NPH)에 대하여 선택적인 활성을 나타낸다.

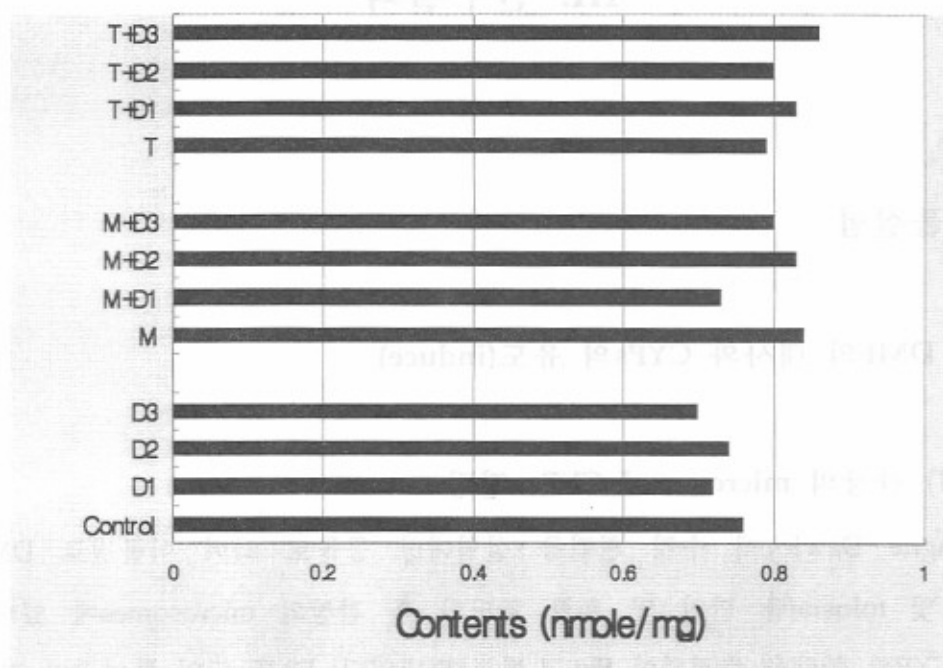


Fig. 1. Cytochrome P-450 contents in rat liver microsomes after intraperitoneally injection to organic solvents for 3 days. Bars indicate the mean value of samples from four animals analysed in duplicate. D1, DMF 450 mg/kg; D2, DMF 900 mg/kg; D3, DMF 1,800 mg/kg; M, methyl ethyl ketone(MEK) 324 mg/kg; T, toluene 436 mg/kg.

따라서 금번 연구에서는 DMF, MEK 및 toluene을 단일 및 혼합투여한 후에 CYP 의존성 촉매효소의 활성도를 측정하였다. 그 결과, CYP1A와 CYP2B에 대한 활성도 보다 CYP2E에 대한 활성도(ρ NPH)의 증가가 현저하여(본 연구에서는 나타내지 않았음), CYP2E1에 대한 단일세포성면역항체를 이용하여 CYP2E1 동위효소의 유도된 단백질의 양을 관찰하여 Fig. 2에 나타내었다.

DMF 단일 투여군에 있어서 CYP의 전체 함량은 투여농도 증가에 따라 다소 감소되는 것으로 측정이 되었으나, CYP2E1 동위효소의 유도는 투여농도에 의존하여 현저한 증가가 관찰되었다. DMF와 toluene, DMF와 MEK 혼합 투여군에서는 DMF 단일 투여군에서 보다, DMF와 MEK 혼합 투여군에서 보다는 DMF와 toluene 투여군에서 CYP2E1 동위효소의 유도가 증가된 것을 관찰하였다.

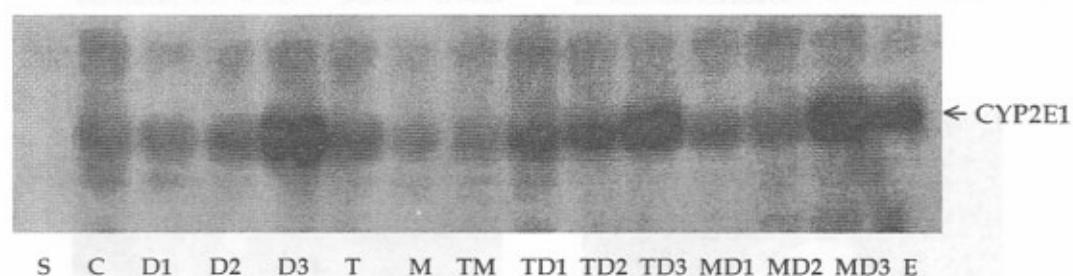
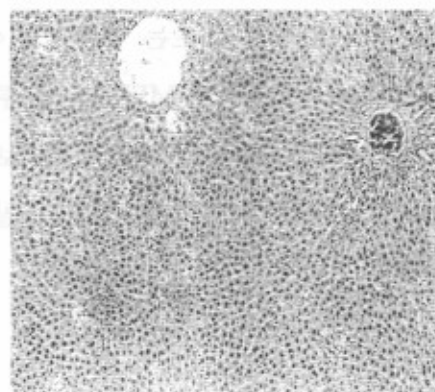
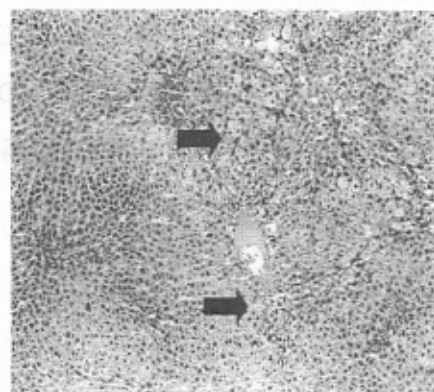


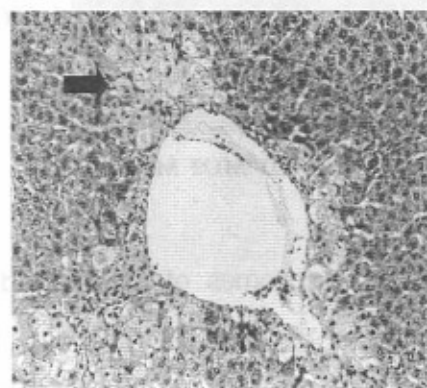
Fig.2. Western immunoblot analysis for hepatic microsomes of rats treated with organic solvents utilizing mouse monoclonal anti-rat CYP2E1 antibody. Liver microsomes (10 μ g) were loaded for the groups: C, control; D1, DMF 450 mg/kg; D2, 900 mg/kg; D3, 1,800 mg/kg; M, MEK 324 mg/kg; T, toluene 436 mg/kg; TM, MEK 324 mg/kg+T 436 mg/kg; TD1, T+D1; TD2, T+D2; TD3, T+D3; MD1, M+D1; MD2, M+D2; MD3, M+D3; E, ethanol (0.5 μ g loaded) and S, size marker.



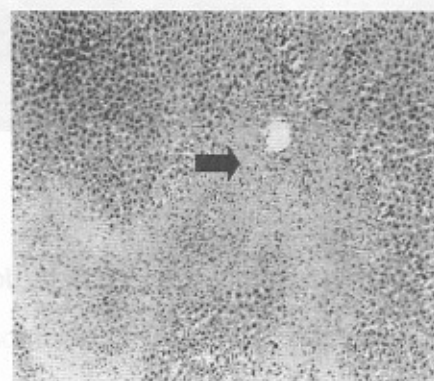
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig. 3. Microscopic images of Hematoxyline & Eosin staining on liver sections. (A) liver section from a control rat (x100), (B) liver section from rat treated with DMF 1,800 mg/kg (x100), (C) from rat treated with both DMF (1,800 mg/kg) and MEK (324 mg/kg)(x400) and (D) from rat treated with both DMF (1,800 mg/kg) and toluene (436 mg/kg)(x100).

나. 간장의 조직학적 변화

DMF, MEK와 toluene을 단일 및 혼합 투여한 후, 간장에 있어서 조직변화를 관찰하여 Fig 3.에 나타내었다. 대조군의 경우는 중심정맥(central vein) 부위의 다각형 간소엽(hepatic lobule)이 일정한 크기로 관찰된 반면, DMF 단일 투여군, DMF와 MEK, DMF와 toluene 혼합 투여군에서는 간 조직의 변화가 나타났다. 고농도의 DMF(1,800 mg/kg) 투여와 DMF와 MEK 혼합 투여군의 경우에는 중심정맥 부위인 zone 3 부근에서 공포변성과 일부 간 괴사가 있었으며, DMF와 toluene의 혼합 투여군에서는 심한 간 괴사가 관찰되었다.

2. DMF 노출 근로자 조사

가. 일반적 특성

연구 대상자는 총 551명으로 전부 남성 근로자였다. 대조군은 유해화학물질에 노출되지 않는 사무직 근로자 350명으로, 29세 이하가 34명(9.7%), 30에서 39세가 172명(49.1%) 이었고 40세 이상이 144명(41.1%)이었다. 이들 중 흡연자는 190명(54.3%)이며, 음주자는 324명(92.6%)이었다. DMF 노출군의 경우는 총 201명으로, 29세 이하가 123명(61.2%), 30에서 39세 이하가 58명(28.9%)이었으며, 40세 이상은 20명(10.0%)이었다. 또한 이들 노출군에 있어서 흡연자는 154명(76.6%)이었고 음주자는 161명(80.1%)이었다. 이들 두 군간에 있어서 연령 분포, 흡연 및 음주상태를 비교해 보면, 대조군의 경우 전체의 90%이상이 30세 이상인 반면, 노출군의 경우는 전체의 90%정도가 40세 미만으로 두 군간에 있

어서 연령의 차이가 통계학적으로 유의하였으며($p<0.001$), 흡연자는 노출군에서, 음주자는 대조군에서 많은 것으로 나타났다($p<0.001$).

Table 1. General characteristics of subjects

Item	Control (n=350)	Exposed (n=201)	Total (n=551)	Statistical Significance
Age(males)				$p<0.001$
>29	34(9.7)	123(61.2)	157(28.5)	
30-39	172(49.1)	58(28.9)	230(41.7)	
40<	144(41.1)	20(10.0)	164(29.8)	
Smoking status				$p<0.001$
Yes	190(54.3)	154(76.6)	344(62.4)	
No	160(45.7)	47(23.4)	207(37.6)	
Drink				$p<0.001$
Yes	324(92.6)	161(80.1)	485(88.0)	
No	26(7.4)	40(19.9)	66(12.0)	

Figures in parentheses indicate % of total

Table 2. Mean value of DMF in air of workplace and mean concentration of urinary NMF in the workers exposed to DMF.

Item	DMF(ppm)	NMF(mg/g Creatinine)
	7.98±13.06	29.67±43.459

나. 기중 DMF와 뇨중 NMF의 농도

연구대상 사업장에 있어서 근로자들이 노출되는 DMF의 평균농도는 7.98 ppm이었으며, 이들 대상 근로자들에 있어서 뇨중으로 배설되는 대사산물인 NMF의 평균 배설량은 29.67 mg/g creatinine이었다.

다. 간기능 검사

조사 대상자 551명에 대하여 AST, ALT, GGT를 측정한 결과, 측정군 모두의 평균치가 참고치의 정상범위 이내에 분포하고 있었다(Table 3). 대조군의 경우, AST의 평균치는 24.5 ± 11.1 U/L, ALT는 29.5 ± 16.7 U/L, GGT는 32.6 ± 38.3 U/L이었으며, 연령에 따른 간기능의 차이는 없었다. 노출군의 경우에도 연령에 따른 간기능의 차이는 없었으며, AST의 평균치는 30.8 ± 49.5 U/L, ALT와 GGT는 각각 31.3 ± 73.1 과 26.3 ± 25.7 U/L이었다. 두 군간에 있어서 간기능의 차이가 통계학적으로 유의하지는 않았으나 노출군에서 AST와 ALT는

다소 높은 반면, GGT는 감소된 측정치를 보였다. AST, ALT 및 GGT 중 어느 한 항목이 참고치의 범위를 초과하는 사람을 간기능 이상자로 분류하여 대조군 및 노출군에 있어서 간기능 이상자의 분포를 본 결과, 대조군의 경우는 350명중에 62명(17.7%)이, 노출군은 201명중 41명(20.4%)이 간기능 이상자로 나타났다. 간기능 이상자중 연령별 분포를 보면, 대조군의 경우, 20대가 9.7%(6명), 30 및 40대는 46.8%(29명)와 43.5%(27명)였으며, 노출군은 각각 56.1%(23명), 34.1%(14명)와 9.8%(4명)로 나타나, 대조군에 있어서는 고 연령층에서, 노출군에 있어서는 낮은 연령층에서 이상자가 많았다(Table 4)($p<0.001$).

Table 3. Clinical data of liver function in control and exposed workers by age

Age(yr)	AST		ALT		GGT	
	Control	Exposed	Control	Exposed	Control	Exposed
> 29	22.5 ± 8.3	32.3 ± 61.9	23.6 ± 13.2	34.7 ± 92.6	25.0 ± 21.3	23.9 ± 25.2
30 - 39	24.3 ± 9.1	26.8 ± 11.3	26.4 ± 17.5	25.4 ± 14.7	30.1 ± 23.0	30.1 ± 26.5
40 <	25.2 ± 13.5	32.9 ± 26.5	25.8 ± 16.4	28.0 ± 17.2	37.4 ± 52.9	29.8 ± 26.0
Total	24.5 ± 11.1	30.8 ± 49.5	25.9 ± 16.7	31.3 ± 73.1	32.6 ± 38.3	26.3 ± 25.7

Values represents mean ± S.D.

Reference values : AST, ≥45 U/L; ALT, ≥45 U/L; GGT, ≥50 U/L

Table 4. Prevalence of abnormality for the liver function test in control and exposed workers

Groups	>29	30 - 39	<40	Total
Control(n=350)*	6(9.7%)	29(46.8%)	27(43.5%)	62(100%)
Exposed(n=201)	23(56.1%)	14(34.1%)	4(9.8%)	41(100%)
Total(n=551)	29(28.2%)	43(41.7%)	31(30.1%)	103(100%)

Reference values : AST, ≥ 45 U/L; ALT, ≥ 45 U/L; GGT, ≥ 50 U/L

*: $p < 0.001$

라. ALDH2 유전자다양성 분석

Exon 12 부위가 증폭된 DNA를 Ksp 632I로 절단한 후, 4.0% agarose gel 전기영동을 실시하여 polymorphic site가 없는 대상자에서는 135 bp의 단일 band가, polymorphic site가 있는 대상자에서는 135, 112, 23 bp의 bands가 나타나는 것을 확인하여 ALDH2 유전자다양성 분석을 실시하였다(Fig. 4).

대조군의 경우 ALDH2*2/ALDH2*2(*2/*2, active form) 유전형은 66.9%, ALDH2*1/ALDH2*2(*1/*2, less active form) 유전형은 30.2%이었으며 ALDH2*1/ALDH2*1(*1/*1, inactive form) 유전형은 2.9%였다. 노출군의 경우에도 ALDH2*2/ALDH2*2 유전형은 66.7%이었고, ALDH2*1/ALDH2*2 유전형과

ALDH2*1/ALDH2*1 유전형은 각각 32.3%, 1.0%로 나타나 두 군간에 유전형의 차이는 보이지 않았다(Table 5). 따라서 DMF에 의한 ALDH2 유전자에 대한 영향이 없다고 가정한 상태에서 대조군과 노출군 대상자 전체를 한 집단으로 하여 ALDH2 유전자다양성 분포를 보면, ALDH2*2/ALDH2*2 유전형은 66.8%, ALDH2*1/ALDH2*2 유전형은 31.0%, ALDH2*1/ALDH2*1 유전형은 2.2%로 ALDH2*1와 ALDH2*2에 대한 빈도는 0.18과 0.82로 나타났다.

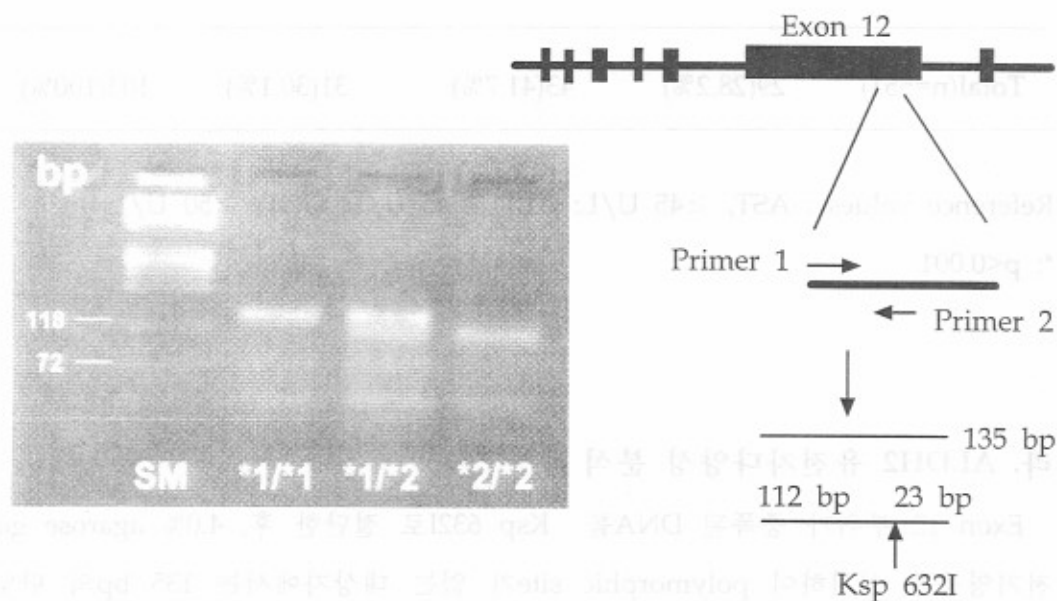


Fig. 4. Ksp 632I polymorphism of the ALDH2 gene detected by polymerase chain reaction. The amplified fragment is a 135 bp sequence containing the polymorphic site in exon 12. By digestion with Ksp 632I, individuals are divided into genotypes, namely, *1/*1, *1/*2, *2/*2, allele *1/*1 is absent from the Dra I site and *2/*2 allele is present. SM is size marker.

Table 5. Genotype and allele frequency of ALDH2 in control and exposed workers

Groups	ALDH2 genotype, case (%)			Allele frequency	
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1	*2
Control(n=250)	10(2.9)	106(30.2)	234(66.9)	0.18	0.82
Exposed(n=201)	2(1.0)	65(32.3)	134(66.7)	0.17	0.83
Total(n=551)	12(2.2)	171(31.0)	368(66.8)	0.18	0.82

마. CYP2E1 유전자다양성 분석

CYP2E1에 대한 유전자다양성 분석은 CYP2E1 유전자 intron 6 부위의 특정 부분을 증폭시킨 PCR 생성물을 Dra I 제한효소로 절단한 후, Dra I의 polymorphic site 존재 유·에 따라 유전자다양성을 확인하였다(Fig. 5).

대조군의 경우 CYP2E1*2/*2(*2/*2, active form) 유전형은 74.3%, CYP2E1*1/*2 (*1/*2, less active form) 유전형은 14.3%, CYP2E1*1/*1(*1/*1, inactive form) 유전형은 11.4%로 나타났으며, 노출군의 경우에도 CYP2E1*2/*2(*2/*2, active form) 유전형은 82.2%, CYP2E1*1/*2 (*1/*2, less active form) 유전형은 11.9%, CYP2E1*1/*1(*1/*1, inactive form) 유전형은 6.0%로 대조군과 비슷한 경향의 분포를 보였다. 대조군과 노출군 전체에 대한 CYP2E1 유전자다양성의 분포를 보면, *2/*2 형태의 유전형은 77.1%, *1/*2와 *1/*1 형태의 유전형은 각각 13.4%와 9.4%로 나타났으며, CYP2E1*1과 CYP2E1*2의 빈도는 0.16과 0.84이었다(Table 6).

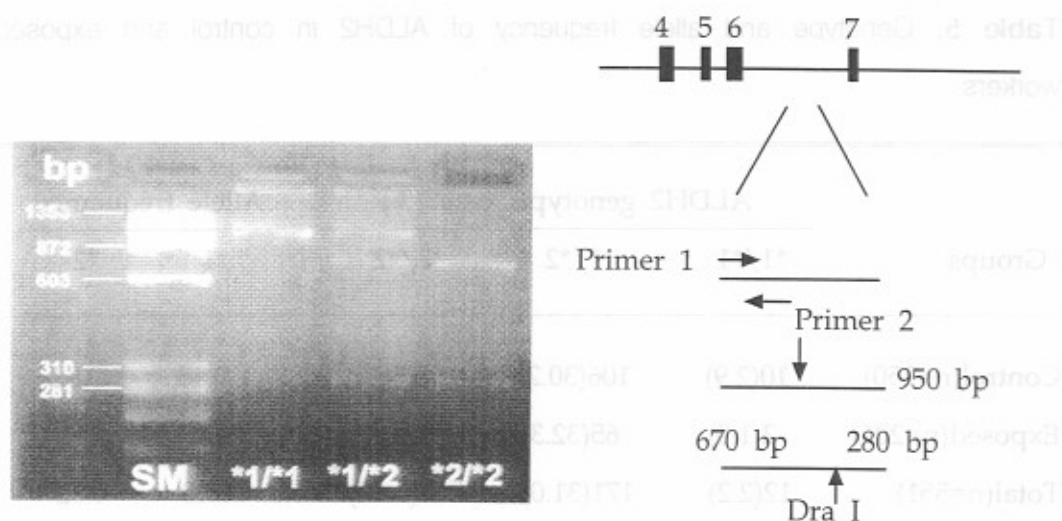


Fig. 5. CYP2E1 genotyping analysis. The amplified fragment is a 950 bp sequence containing the polymorphic site of Dra I in intron 6. Allele *1/*1 is absent from the Dra I site and *2/*2 allele is present. SM is size marker

Table 6. Genotype and allele frequency of CYP2E1 in control and exposed workers

Groups	CYP2E1 genotype, case (%)			Allele frequency	
	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1	*2
Control(n=250)	40(11.4)	50(14.3)	260(74.3)	0.19	0.81
Exposed(n=201)	12(6.0)	24(11.9)	165(82.1)	0.12	0.88
Total(n=551)	52(9.4)	74(13.4)	425(77.1)	0.16	0.84

바. DMF의 대사와 유전형(genotype)의 상관성

(1) 공기중 DMF 농도와 뇨중 NMF의 상관관계

DMF 노출 근로자 201명에 대한 기중 DMF의 평균 노출농도는 7.98 ppm(표준편차 ± 13.06)이었고, 뇨중 NMF의 배설량은 29.67 mg/g creatinine(표준편차 ± 43.459)이었다. 기중 DMF의 농도와 뇨중 NMF의 배설량에 대한 상관관계(r)는 0.230($p < 0.001$)이었다.

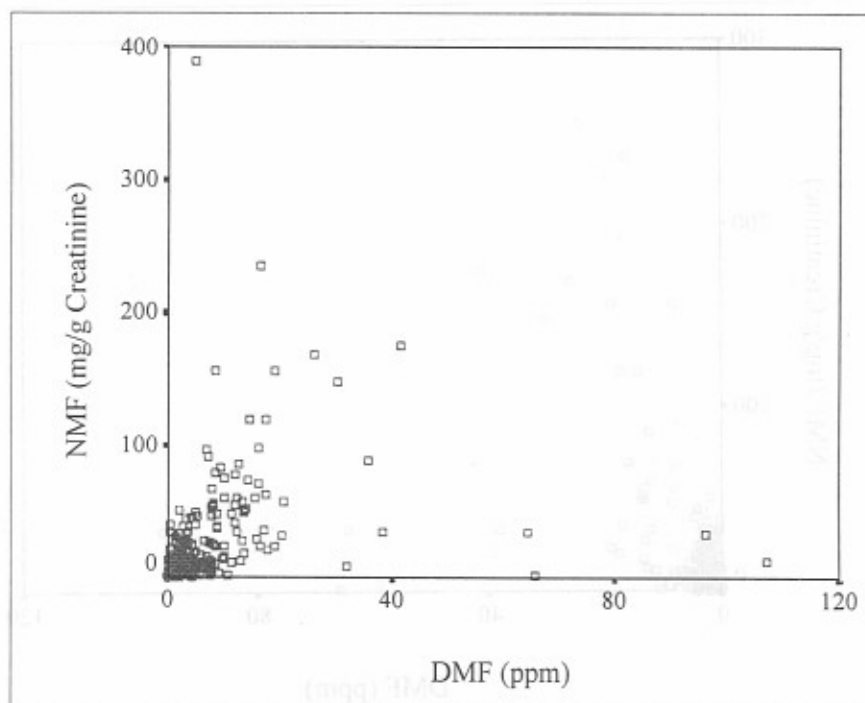


Fig. 6. Correlation between the concentration of DMF in breath zone air and NMF in urine of 201 workers occupationally exposed to DMF ($r=0.230$)($p < 0.001$).

(2) DMF의 대사와 유전형의 상관성

DMF 노출 근로자 201명에 대하여 기중 DMF의 농도와 뇨중 NMF의 배설량을 측정하여 상관성($r=0.230$, $p<0.001$)을 분석한 후, 이들 근로자들에 있어서 ALDH2와 CYP2E1의 유전형에 따라 DMF의 대사에 어떤 상관성이 있는지를 유전자다양성분석을 통하여 실시하였다.

먼저, ALDH2 유전형과 DMF 노출량과 NMF의 배설량에 대한 상관성을 분석하여 Fig. 7과 8에 나타내었다.

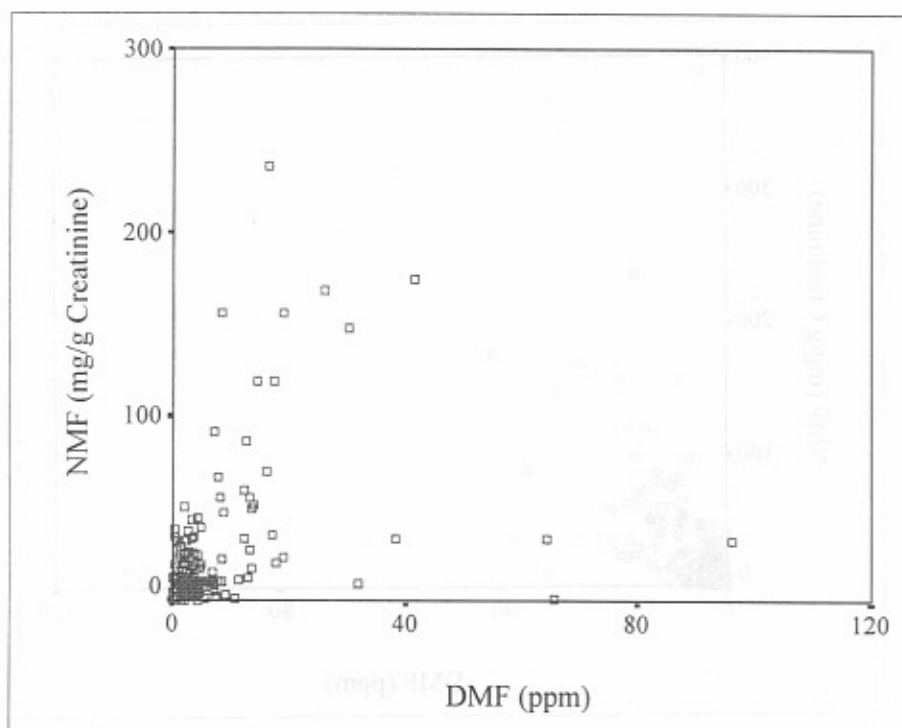


Fig. 7. Correlation between metabolism of DMF and ALDH2*2/ALDH2*2 gene (active form). $r=0.33$ ($p<0.001$).

노출군에 있어서 ALDH2*2/ALDH2*2(active form) 유전형을 가지고 있는 근로자는 134명이었으며, 이들에 있어서 DMF와 NMF에 대한 상관성(r)은 0.33($p<0.001$)이었다(Fig. 7). ALDH2*1/ALDH2*2(less active form)의 경우는 총 65명이었으나, 2명에 있어서 DMF의 노출량과 NMF의 배설량 차이가 너무 커서 생물학적인 지표로서의 의미가 없어 2명을 제외시킨 63명에 대한 상관성을 분석한 결과, $r=0.651$ ($p<0.001$)의 높은 상관성을 보였으며(Fig. 8), ALDH2*1/ALDH2*1(inactive form) 유전형을 가지고 있는 근로자는 전체 2명으로 분석을 하지 않았다.

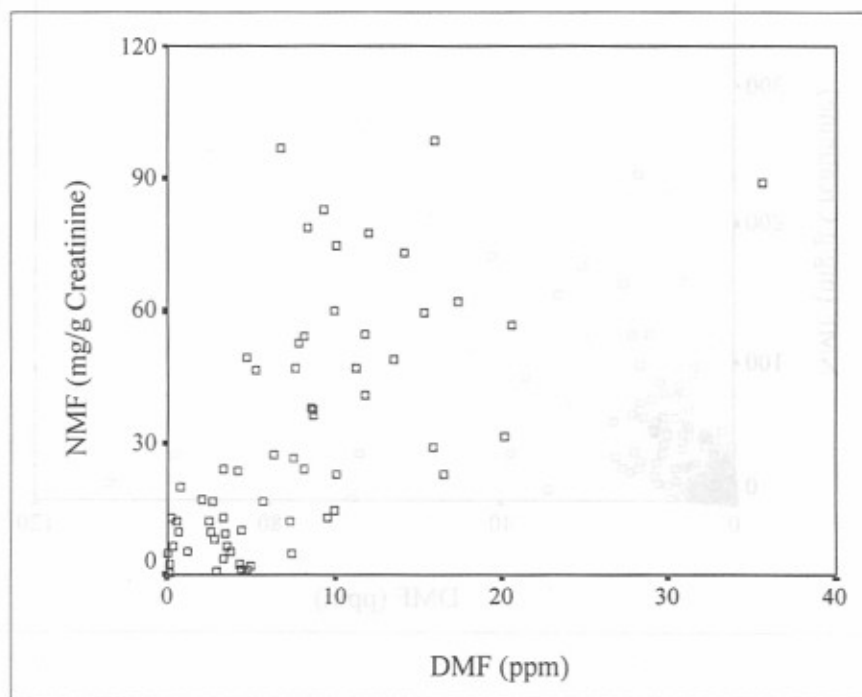


Fig. 8. Correlation between metabolism of DMF and ALDH2*1/ALDH2*2 gene (less active form). $r=0.651$ ($p<0.001$).

CYP2E1 유전형과 DMF의 대사와의 상관성을 분석하여 Fig. 9와 10에 나타내었다. CYP2E1*2/*2(active form) 유전형을 가지고 있는 근로자는 165명이었으며, 이들에 있어서 DMF의 대사와의 상관성 r 은 0.256($p<0.001$)이었다(Fig. 9). CYP2E1*1/*2(less active form) 유전형의 경우는 노출군 전체가 23명으로서 상관성은 0.267이지만 통계학적인 의미가 없었으며, CYP2E1*1/*1(inactive form)의 경우도 대상자는 23명이었으나 상관성은 없었다.

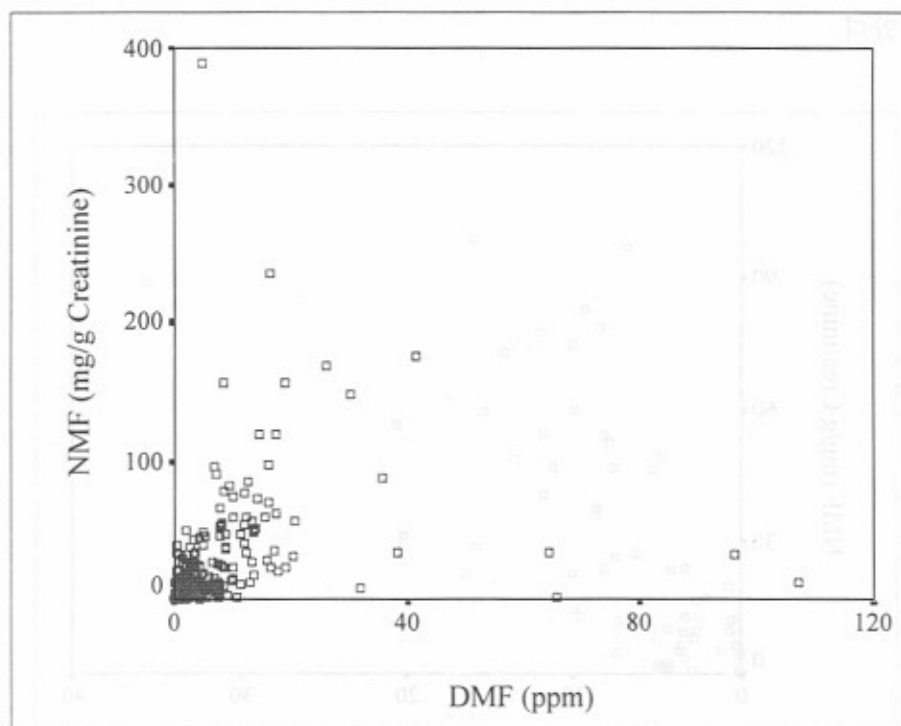


Fig. 9. Correlation between metabolism of DMF and CYP2E1*2/CYP2E1*2 gene (active form). $r=0.256(p<0.001)$.

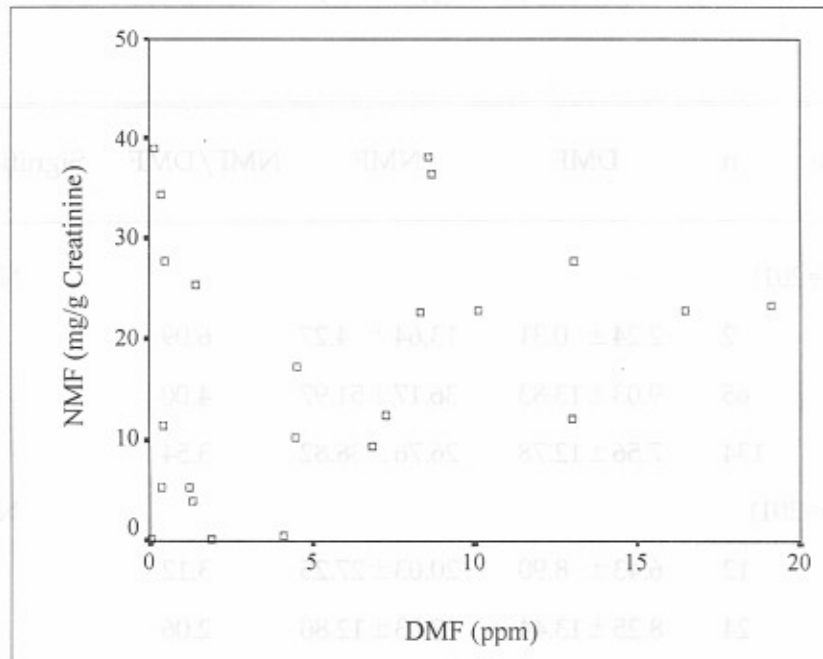


Fig. 10. Correlation between metabolism of DMF and CYP2E1*1/CYP2E1*2 (less active form). $r=0.267(p=0.218)$.

DMF 농도와 뇨중으로 배설되는 NMF의 양을 비교하여(DMF/NMF) ALDH2와 CYP2E1 유전형에 따른 배설량의 차이를 Table 7에 나타내었다.

ALDH2의 경우, active form(ALDH2*2/ALDH2*2)보다 inactive form(ALDH2*1/ALDH2*2)에서 NMF의 배설이 많은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았다($F=0.266$, $p<0.05$). 그러나 CYP2E1의 경우는 active form(CYP2E1*2/CYP2E1*2)에서 inactive form보다 NMF의 배설량이 많은 경향을 보였다($F=2.936$, $p=0.055$).

Table 7. ALDH2 and CYP2E1 phenotype analysis from mean NMF/mean DMF ratio.

Genotype	n	DMF	NMF	NMF/DMF	Significance
ALDH2(n=201)					N.S
*1/*1	2	2.24 ± 0.31	13.64 ± 4.27	6.09	
*1/*2	65	9.03 ± 13.83	36.17 ± 51.97	4.00	
*2/*2	134	7.56 ± 12.78	26.76 ± 38.82	3.54	
CYP2E1(n=201)					N.S
*1/*1	12	6.43 ± 8.90	20.03 ± 27.25	3.12	
*1/*2	24	8.25 ± 13.44	17.03 ± 12.80	2.06	
*2/*2	165	8.05 ± 13.31	32.21 ± 46.84	4.00	

IV. 고 찰

노출되는 유해화학물질과 그들의 대사산물을 측정하여 생물학적 모니터링을 실시하는 것은 노출을 평가하는데 있어서 특이성이 높은 방법중의 하나이다 (Gobba 등, 1997). 그러나 노출물질의 대사산물을 측정하여 평가하는데는 여러 가지 요인에 의한 제한점을 가지고 있다. 그러한 요인 중에 대표적인 것이 노출농도의 수준, 생활습관, 신체 및 유전적인 특성과 항상성 조절 인자의 상태 등을 들 수 있다. 특히, 항상성 조절인자와 유전적인 특성은 노출물질의 대사 과정에 있어서 활성화(phase I 효소)와 해독반응(phase II 효소) 사이에 불균형을 초래하여 건강장해를 유발하는데 큰 영향을 미칠 수 있다. 즉, 유해화학물질 중 체내의 독성이 큰 물질들은 본래의 흡수된 물질보다 활성화된 중간체에 의한 영향이 크다고 볼 수 있으며, 활성화된 중간체를 생성하는데 관여하는 효소들이 phase I 효소이고, 활성화된 중간체와 conjugation 반응을 통하여 해독화시키는데 관여하는 효소들이 phase II 효소들이다. 따라서 대사기전에 있어서 활성화와 해독화가 균형을 유지해야하며 그렇지 않고 활성화된 물질의 생성량이 많다면, 그 만큼 체내의 독성유발 가능성은 크다고 볼 수 있다.

따라서 본 연구는 첫째, CYP 단일세포성향체를 이용하여 DMF의 대사에 어떤 CYPs의 동위효소가 관여하며, 노출형태에 따라서 간장에 미치는 영향이 차이가 있는지를 동물실험을 통하여 파악하고자 하였으며 둘째, DMF의 대사에 직접적으로 관여하는 CYPs와 CYPs의 작용에 의하여 부수적으로 생성되는 aldehyde를 다른 물질로 생물학적인 변형을 시키는데 관여하는 ALDH2 유전자다양성을 분석하여 유전형에 따라 DMF의 대사와 간장장해에 어떠한 상관성이 있는지를 보고자 하였다. 셋째, ALDH2는 사람이 기호식품으로 음용되는

알코올의 대사에 직접적으로 관여하기 때문에 근로자들의 음주 유·무 상태와 ALDH2의 유전자형에 따라 DMF의 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 연구하고자 하였다.

CYP는 지방산, 스테로이드 및 prostaglandine 등의 내인성물질(endogenous substances) 뿐만 아니라 외인성물질(exogenous substances)인 화학물질, 환경오염물질 및 약물 등의 대사에 관여하는 효소로서 hydroxylation, N-oxidation, sulfoxidation, peroxidation, deamination, dehalogenation 및 N-, O-, S-dealkylation 등과 같은 다양한 반응을 통하여 해독(detoxification)과 활성화를 촉매하는 작용을 한다(Lu와 West, 1980; Sherson 등, 1992; Hanioka 등, 1995; Nelson 등, 1996; Kim 등, 1999). CYP의 발현은 종(species), 성별(sex), 노출되는 물질의 종류 및 노출형태 등에 따라 많은 차이를 보이는데, 사람, 동물 및 미생물 등에 있어서 밝혀진 CYP superfamily의 종류는 수 백종에 이르는 것으로 보고되고 있다(Nelson 등, 1996).

따라서 금번의 연구에서는 DMF의 노출로 인하여 유도되는 CYP의 동위효소의 형태를 파악하는 한편, 산업체에서 DMF를 취급하는 대부분의 근로자들은 DMF 단일물질에 노출되는 것보다는 MEK나 toluene과 같은 물질과 혼합된 형태로 노출되고 있으므로 DMF 단일물질과 혼합된 형태의 물질에 노출될 경우, 어떤 형태의 노출이 간장장해에 더 많은 영향을 초래하는지를 동물실험을 통하여 살펴보았다.

DMF 단일투여군은 체중 kg당 DMF 450(D1), 900(D2), 1,800(D3) mg을 투여하고, MEK와 toluene의 단일투여군은 체중 kg당 324 mg과 436 mg을 각각 투여하였으며, DMF와 MEK의 혼합투여군에서는 MEK(M) 324 mg을 D1, D2, D3에 혼합하여, DMF와 toluene 혼합투여군에서는 toluene(T) 436 mg을 D1, D2, D3에 각각 혼합하여 3일 동안 복강주사하였다. 그 결과, DMF 단일투여군

의 경우 CYP의 총 함량은 통계학적인 유의성은 없었으나 투여 농도에 의존하여 다소 감소되는 결과를 보였으며 혼합투여군에서는 DMF 단일투여군 보다 CYP의 함량이 다소 증가되었다. 그러나 CYP 단일세포성향체를 이용한 Western blot 분석에서는 CYP2E1 동위효소의 단백질 유도가 DMF의 투여농도에 의존하여 현저한 증가를 보였다. 또한 혼합투여군에서는 DMF와 MEK를 혼합하여 투여한 군에서 유도된 CYP2E1의 단백질보다 DMF와 toluene을 혼합하여 투여한 군에서 증가가 관찰되었다. 앞서서도 언급하였듯이 DMF의 대사에 있어서 CYP가 관여하여 HMMF로 1차 대사변형시키고, 변형된 HMMF는 다시 효소 및 비효소반응을 통하여 NMF가 생성되며(Mraz와 Nohova, 1992), 생성된 NMF가 DMF보다 간장독성이 크다고 한다면(Kennedy, 1986; Gescher, 1993; Bulcke 등, 1994), 금번 연구에서 DMF의 대사에 관여하는 CYP2E1 동위효소의 유도가 현저하였다는 것은 NMF의 생성량이 그 만큼 증가되었다는 것을 암시한다고 볼 수 있다. 따라서 CYP2E1 단백질의 유도가 증가되었다면 CYP2E1이 주로 존재하는 것으로 알려져 있는 간장의 zone 3 부위(Tsutsumi 등, 1989)에 조직 변화의 가능성이 있으므로 간장 조직의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 대조군에서는 zone 3 부위의 다각형 간소엽이 일정한 크기로 관찰된 반면, DMF 1,800 mg 투여군과 MEK와 DMF 1,800 mg 혼합투여군에서는 zone 3 부위에서 공포변성과 일부 간괴사가 일어났다. 그러나 DMF 1,800 mg과 toluene을 혼합하여 투여한 군에서는 심한 간괴사가 관찰되었다. 이러한 현상은 각각의 혼합물질간에 상호작용에 의하여 특정한 물질의 대사를 억제 혹은 촉진하여 나타난 결과라 볼 수 있다. 금번 연구대상 사업장 근로자들은 DMF 단일형태 보다는 DMF와 MEK, DMF와 toluene이 혼합된 형태의 노출이 대부분이었으므로 본 연구에서 나타난 결과를 감안할 때, DMF와 toluene이 혼합된 형태로의 노출을 방지하는 것이 간장의 손상을 억제할 수 있다고 본다.

1960~80년대까지의 CYP에 대한 연구는 주로 물질대사와 관련된 연구들이 대부분이었으나, 현재는 CYP의 DNA 염기서열과 그에 따른 고유의 성질이 서서히 밝혀지면서, 이 효소를 이용하여 질병의 예측과 질병의 발생기전을 파악하는데 susceptibility marker로 이용하고자 하는 생화학 및 분자생물학적인 측면의 연구가 활발히 이루어지고 있다(Goldstein, 1996).

CYP1A 동위효소는 폐암과 benzo(a)pyrene과 dioxine 등과 같은 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)계 물질에 의해 유발되는 발암성 연구를(Kawajiri 등, 1990; Shimada 등, 1992; Kiyohara 등, 1998; Smart와 Daly, 2000), CYP2D6는 암과 약물대사에 대한 연구를(Legrand-Andreoletti 등, 1998; Strange 등, 1999) 수행하고 있으며, 특히, CYP2E1은 알코올 대사와 산업체에서 주로 사용하고 있는 방향족화합물, 지방족화합물, keton 류, 할로젠화 물질 등의 대사와 관련된 많은 연구가 진행되고 있다(Uematsu 등, 1994; Parke, 1996; Tanak 등, 1997; Chang 등, 1997; Powell 등, 1998; Rossi 등, 1999).

또한, 내인성물질 및 외인성물질의 대사에 있어서 중요한 효소중의 하나가 ALDH이다. ALDH는 주로 cytosol과 mitochondria에 분포하며 스테로이드, 지질, 생체합성 아민 및 아미노산 등의 대사과정에서 생성되는 aldehyde와 알코올 및 유해화학물질의 대사과정에서 생성되는 활성화된 중간체의 대사에 직접적으로 관여하는 효소이다(Lindahl, 1992). 현재까지 밝혀진 ALDH 유전자의 family는 18개 종류로서, 약 86개의 유전자가 있으며, ALDH는 family와 subfamily groups에 따라서 기질에 대한 특이성이 차이를 보이는 것으로 보고되었다. 즉, ALDH1은 지방족 aldehyde와 retinaldehyde에 대하여, ALDH3는 방향족 aldehyde에 대하여, ALDH2는 mitochondria에 존재하며 주로 알코올 대사 과정에서 생성되는 acetaldehyde에 대하여 산화작용을 하는 것으로 알려져 있다(Vasilou 등, 1999).

본 연구에서는 동물실험 결과에서 나타나 바와 같이 DMF의 노출에 의하여 CYP2E1 동위효소가 유도되는 것을 확인하였으므로, DMF 취급근로자 201명과 대조군 근로자 350명을 대상으로 하여 CYP2E1과 ALDH2 유전자다양성을 분석하였다. ALDH2와 CYP2E1은 성별, 연령, 알코올성 간장질환(Takeshita 등, 1994; Carr 등, 1996; Tanaka 등, 1997)과 흡연(Uematsu 등, 1994) 등에 의한 영향을 받을 수 있으므로 본 연구에서는 대조군과 노출군 근로자들에 있어서 음주, 흡연상태와 간기능 상태 등을 조사하여 이들 유전자다양성과 상관성을 조사하였다.

연구대상 근로자들에 있어서 연령분포를 보면, 대조군에서는 40세 이상이 약 41%이었고, 노출군에서는 10% 였으며, 이들에 있어서 담배를 피우는 근로자는 대조군에서 54.3%인 반면, 노출군에서는 76.6%였다. 또한 음주자는 대조군에서 92.6%로 나타났으며 노출군에서는 80.1%로 두군간에 연령, 흡연 및 음주상태 등이 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.001$). 그러나 이들 인자와 ALDH2 및 CYP2E1 유전자다양성간에 통계학적인 차이는 보이지 않았다.

대조군에 있어서 AST, ALT 및 GGT의 평균측정치는 24.49 ± 11.06 , 25.87 ± 16.65 , 32.57 ± 38.31 이었으며, 노출군에서는 각각 30.77 ± 49.47 , 31.33 ± 73.09 및 26.27 ± 25.69 로 측정되었다. 두 군간에 있어서 간기능 상태를 비교한 결과, 통계학적인 유의한 차이는 없었으나 AST와 ALT는 노출군에서, GGT는 대조군에서 다소 높은 것으로 나타났다. 노출군에서 AST와 ALT의 평균측정치가 다소 높게 나타난 것은 DMF에 의한 영향으로 보여지며, 대조군에서 GGT가 높은 것은 대조군 근로자들에 있어서 음주자가 많았고 높은 연령에 의한 이유로 생각된다. 이러한 결과를 뒷받침하는 것이 대조군과 노출군에 있어서 연령별 간기능 이상자의 분포이다. 대조군의 경우 전체 대상자 350명중 간기능 이상자는 62명으로 17.7%였으며, 간기능 이상자중 43.5%가 40세 이상에서 나타난 반면,

노출군의 경우에는 전체 201명중 41명(20.4%)이 간기능 이상자였으며, 이중에 40세 이하가 90.2%이었다.

생명체는 DMF뿐만 아니라 대부분의 유해화학물질이 체내에 흡수되면 이들 물질을 제거시키기 위하여 자기방어 작용을 시작하는데, 그러한 반응의 하나가 이물질 대사효소의 활성화이다. 이물질을 대사시키기 위한 효소의 활성화는 효소의 발현(expression)과 밀접한 관계가 있으며, 효소의 발현은 효소에 따라서 전사(transcription) 혹은 번역(translation) 단계에서 조절된다. 그렇기 때문에 물질대사와 관련한 pharmacokinetics 연구에 있어서는 유전정보를 가지고 있는 DNA의 염기서열을 규명하고 이해하는 것이 매우 중요하다고 볼 수 있다. 또한 DNA의 염기서열과 기능의 규명은 많은 질병의 진단, 발생기전의 이해 및 치료제 개발 등 여러 분야에서 널리 사용될 수 있다.

현재 세계적으로 유전자에 대한 생화학 및 분자생물학적인 측면에서 많은 연구가 진행되고 있는데, 그 중에 하나가 유전자다양성 연구를 통한 질병발생 가능성과 약물 및 이물질 대사에 있어서 민감도 지표를 개발하고자 하는 연구이다. 그러므로 본 연구에서는 ALDH2와 CYP2E1에 대한 유전자다양성 연구를 통하여 유전자형에 따라 DMF 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 먼저, ALDH2 유전자다양성 실험에서 나타난 결과를 보면(Table 5), 대조군에 있어서 ALDH2*1/*1 유전형(in active form)은 2.9%(10명), ALDH2*1/*2 유전형(less active form)은 30.2%(106명)였고 ALDH2*2/*2 유전형(active form)은 66.9%(234명)이었다. 노출군에서도 ALDH2*1/*1, ALDH2*1/*2 및 ALDH2*2/*2 유전형은 각각 1.0%(2명), 32.3%(65명) 및 66.7%(134명)로 나타나 두 군간에 통계학적인 차이는 없었다. 따라서 대조군과 노출군을 한 집단으로 보고 551명에 대한 ALDH2 유전자의 분포를 분석한 결과, ALDH2*1/*1, ALDH2*1/*2 및 ALDH2*2/*2 유전형은 각각 2.2%(12명), 31.0%(171명)와 66.8%(368명)의 분포를

보였으며, ALDH2*1과 ALDH2*2의 빈도는 0.18과 0.82로 나타났다. 본 연구결과를 가지고 단정하기에는 다소의 미비점이 있다고 볼 수 있으나, 본 연구결과가 우리 나라 사람에 있어서 ALDH2 유전자다양성 분포라 생각된다.

CYP2E1 유전자다양성 분석결과(Table 6)를 보면, 대조군에서는 CYP2E1*1/1 (inactive form) 유전자형이 11.4%(40명), CYP2E1*1/*2(less active form)과 CYP2E1*2/*2(active form) 유전자형이 각각 14.3%(50명)와 74.3%(260명)로 나타났다으며, 노출군에서는 CYP2E1*1/*1, CYP2E1*1/*2와 CYP2E1*2/*2 유전자형이 각각 12.0%(6명), 11.9%(24명)와 82.1%(165명)로 나타나 두 군간에 있어서 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. CYP2E1의 경우에도 ALDH2와 마찬가지로 대조군과 노출군 연구대상자 총 551명을 한 집단으로 하여 유전자다양성의 분포를 본 결과, CYP2E1*1/*1은 9.4%(52명)이었고 CYP2E1*1/*2와 CYP2E1*2/*2 유전자형은 각각 13.4%(74명)와 77.1%(425명)의 분포를 보였으며, CYP2E1*1과 CYP2E1*2의 빈도는 0.16과 0.84로 나타났다. 따라서 본 연구결과가 우리 나라 사람에 있어서 CYP2E1 유전자다양성의 분포라 생각된다.

Rossi 등(1999)은 Benzene의 대사와 관련하여 glutathione S-transferase (GSTT1)의 유전자다양성을 분석한 결과, null 유전자형에서 benzene의 대사산물인 trans, trans-muconic acid의 배설이 증가되었다고 하였으며, 약물대사에 있어서도 유전자형에 따라 배설속도 및 배설량의 차이를 보인다고 하였다 (Meisel 등1997; Gill 등, 1999; Dilger 등, 1999).

본 연구에서는 노출군에 있어서 ALDH2와 CYP2E1에 대한 유전자다양성 분포를 분석하여, DMF의 노출농도와 NMF 배설량이 유전자형에 따라 어떤 차이가 있는지를 보았다. 노출군 근로자들이 DMF에 노출되는 평균농도는 7.98 ± 13.06 ppm이고 이들 근로자들에 있어서 뇨중 NMF의 평균배설량은 29.67 ± 43.459 mg/g creatinine으로 공기중 DMF와 뇨중 NMF의 배설량에 따른 상관

성(r)은 0.230($p < 0.001$)이었다. ALDH2 유전자의 경우, ALDH2*1/*1(inactive form) 유전자형을 가지고 있는 근로자는 2명으로 DMF의 평균노출농도는 2.24 ± 0.31 ppm, 뇨중 NMF의 배설량은 13.64 ± 4.27 mg/g creatinine으로 NMF/DMF 비율이 6.09였다. 그러나 이 유전자형을 가지고 있는 근로자가 적어서 상관성 및 기타의 분석은 하지 않았다. ALDH2*1/*2(less active form) 유전자형을 가진 근로자들(65명)에서는 공기중 DMF의 노출농도와 NMF의 배설량이 9.03 ± 13.83 ppm과 36.17 ± 51.97 mg/g creatinine으로 NMF/DMF의 비율은 4.00이었으며, 이 유전형과 DMF와 NMF의 상관성은 0.65($p < 0.001$)이었다(Table 7, Fig. 8). ALDH2*2/*2 유전형(134명)에서는 공기중 DMF의 노출농도와 NMF의 배설량이 각각 7.56 ± 12.78 ppm과 26.76 ± 38.82 mg/g creatinine이었으며, NMF/DMF의 비율은 3.54였고, 이 유전형에 있어서 DMF와 NMF와의 상관성은 0.33($p < 0.001$)이다(Table 7, Fig. 7). CYP2E1의 경우는 ALDH2 유전형과 상반되는 결과를 보였다(Table 7). CYP2E1*1/*1(inactive form) 유전자형을 가지고 있는 근로자는 12명으로 공기중 DMF의 농도와 뇨중 NMF의 배설량은 6.43 ± 8.90 ppm과 20.03 ± 27.25 mg/g creatinine이었고 NMF/DMF의 비율은 3.12로 통계학적으로 의미 있는 상관성은 보이지 않았다. CYP2E1*1/*2(less active form) 유전자형(24명)에서는 8.25 ± 13.44 ppm의 DMF에 노출되고 있었으며, 이들 근로자에 있어서 NMF의 배설량은 17.03 ± 12.80 mg/g creatinine이었으며, NMF/DMF 비율은 2.06으로 이 유전자형에 있어서 DMF와 NMF간의 상관성은 통계학적으로 유의하지 않았다($r=0.267$, $p=0.218$).

CYP2E1*2/*2(active form) 유전자형의 근로자는 165명으로 공기중 DMF와 뇨중 NMF의 평균농도가 8.05 ± 13.31 ppm과 32.21 ± 46.84 mg/g creatinine으로 NMF/DMF의 비율은 4.0이었으며 이 유전자형에 있어서 DMF와 NMF의 상관성은 0.256으로 통계학적인 의미가 있었다($p < 0.001$).

이상의 연구에서 나타난 결과를 보면, DMF의 대사와 관련하여 CYP2E1 유전자의 경우, CYP2E1*2/*2(active form)형의 유전자가 CYP2E1*1/*1(inactive form) 형의 유전자에서 보다 NMF의 배설량이 다소 증가된 반면, ALDH2 유전자에서는 ALDH2*1/*1 유전자형에서 NMF의 배설량이 증가되는 경향을 보였다. 따라서 CYP2E1*2/*2 (active form) 유전자형이 DMF가 HMMF로의 대사를 촉진시키는 반면, ALDH2는 HMMF가 NMF로 대사되는 과정에서 생성되는 aldehyde의 대사와 관련하여, 생성된 aldehyde의 대사가 제대로 이루어지지 않아서 aldehyde의 생성은 감소되고 그에 따라 NMF의 생성량이 증가되는 것으로 생각되어지며, 그렇기 때문에 비활성화 유전자형인 ALDH2*1/*1 유전자형에 있어서 NMF의 생성량이 증가된 것이라 판단된다. 그러나 본 연구에서는 aldehyde의 생성량을 측정하지 않았으며, NMF와 conjugation 반응을 통하여 다른 물질로 변형시키는데 관여하는 GST와 같은 phase II 효소에 대한 유전자 다양성을 분석하지 않아서, 생성된 NMF가 다른 물질로의 변형과 관련하여 유전자다양성의 차이를 파악하지 못한 제한점을 가지고 있다.

따라서 추후에는 phase I뿐만 아니라 phase II 효소에 대한 유전자다양성의 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 수컷 흰쥐를 이용하여 DMF, MEK 및 toluene을 단일 및 혼합투여한 후에 간장의 microsomes에 있어서 어떤 형태의 CYP 동위효소가 유도되는지를 CYP 단일세포성면역항체를 이용하여 확인하였으며, 노출형태에 따라 간장에 미치는 영향을 파악하였다. 또한 동물실험에서 얻은 결과를 이용하여 DMF의 대사에 관여하는 CYP2E1 동위효소와 DMF의 대사과정에서 생성되는 aldehyde와 알코올을 대사시키는데 관여하는 효소인 ALDH2에 대한 유전자다양성 분석을 통하여 유전자형에 따라 DMF의 대사와 간장장해에 어떠한 상관성이 있는지를 연구하였다.

1. DMF에 의하여 주로 CYP2E1 동위효소가 유도되었으며, 유도된 정도는 DMF 단일투여군에서보다 혼합투여군에서 현저한 증가를 보였다.
2. 노출형태에 따른 간장독성의 유발 정도를 알아보기 위하여 간장에 있어서 조직변화를 관찰한 결과, 고농도(1,800 ppm)의 DMF 단일투여군과 DMF와 MEK를 혼합투여한 군에서는 공포현상과 일부 간 피사가 일어났으며, DMF와 toluene 혼합투여군에서는 간장조직에 심한 간 피사가 일어나는 것을 관찰하였다.
3. 연구대상자에 있어서 연령분포는 대조군에서 40세 이상이 약 41%인 반면, 노출군에서는 10%였다. 흡연은 노출군에서 음주는 대조군에서 높았으며 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$).
4. 간기능 상태는 군간에 통계학적인 차이는 없었으나, 노출군에서 간기능이 다소 떨어지는 경향을 보였다. 간기능 이상자의 분포는 대조군의 경우 40세 이상에서 43.5%인 반면, 노출군에서는 40세 이하에서 약 70%로 나타났다.

5. 노출군에서 근로자들이 노출되는 DMF의 평균 노출농도는 7.98 ± 13.06 이었으며, 뇨중 NMF의 평균 배설량은 29.67 ± 43.459 mg/g creatinine이었다. DMF와 NMF의 배설량에 대한 상관성은 $0.230(p < 0.001)$ 이었다.
6. 대조군과 노출군에 있어서 ALDH2와 CYP2E1에 대한 유전자다양성의 차이는 보이지 않았다. 연구대상자 551명 전체에 대한 ALDH2 유전자다양성은 ALDH2*1/*1 유전자형이 2.2%(12명), ALDH2*1/*2와 ALDH2*2/*2는 각각 31.0%(171명)와 66.8%(368명)이었으며, ALDH2*1과 ALDH2*2에 대한 빈도는 0.18과 0.82%로 나타났다. CYP2E1 유전자다양성의 분석결과에서도 두 군간에 통계학적인 차이를 보이지 않았으며, 연구대상자 전체에 있어서 CYP2E1 *1/*1 유전자형은 9.4%(52명), CYP2E1*1/*2와 CYP2E1*2/*2 유전자형은 각각 13.4%(74명)와 77.1%(425명)의 분포를 보였으며, CYP2E1*1과 CYP2E1*2의 빈도는 0.16과 0.84%였다.
7. NMF의 생성량과 유전자다양성과의 상관성을 본 결과, CYP2E1 유전자의 경우 CYP2E1*2/*2(active form) 유전자형에서, ALDH2 유전자 경우 ALDH2* 1/*1(inactive form) 유전자형에서 NMF의 배설량이 증가되었다.

이상의 연구 결과를 보면, DMF와 toluene의 혼합된 형태의 노출이 DMF 단일노출과 DMF와 MEK가 혼합된 형태의 노출 보다 간장독성이 더 큰 것으로 나타나, DMF 취급 사업장에서는 DMF와 toluene의 혼합사용을 억제하는 것이 바람직할 것으로 보인다. DMF의 대사에 있어서 개인간의 대사능은 유전자형에 따라 차이를 보였는데, CYP2E1의 경우는 CYP2E1*2/*2 (active form) 유전자형에서 ALDH2는 ALDH2*1/*1(inactive form) 유전자형에서 NMF의 생성이 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 NMF와 conjugation 반응을 통하여 다른 물질로 변형시키는 GST와 같은 phase II 효소와의 상관성을 분석하지 못하

였다. 따라서 추후에는 phase I 효소뿐만 아니라 phase II 효소에 대한 유전자 다양성 연구가 지속적으로 이루어져서 개인에 따른 대사능의 차이, 직업성 질병의 평가와 발생기전 등을 규명할 수 있는 새로운 지표물질의 개발이 필요하다고 본다.

VI. 참고문헌

- 고상백, 차봉석, 김기웅, 강성규, 정효석. 흰쥐에서 N,N-dimethylformamide에 의한 간장의 microsomal cytochrome P-450의 유도. 예방의학회지 1999; 32(1):88-94
- 김기웅, 문영한, 박상신. 방향족 유기용제의 상호작용 및 대사에 관한 연구. 산업안전보건연구원 연구자료, 1996
- 김기웅, 장성근, 정효석, 이준연, 문영한, 박상신. 흰쥐에 있어서 styrene에 의한 간장의 microsomal cytochrome P450의 유도. 대한산업의학회지 1997;9(4): 604-613
- 김기웅, 최병순, 강성규, 문영한. 합성피혁제조업체 근로자들에 있어서 N-methylformamide 배설속도에 관한 연구. 대한산업의학회지 1999;11(1): 106-112
- Amato G, Longo V, Mazzaccaro A, and Gervasi PG. Microsomal oxidation of N,N-dimethylformamide and its effect on P450-dependent monooxygenase in rat liver. Chem Res Toxicol 1996;9:882-890
- Arlien-Soborg P. Solvent neurotoxicity. CRC Press Inc., Florida, 1992, 234-240
- Bulcke MV, Rosseel MT, Wijnants P, Buylaert W, Belpaire FM. Metabolism and hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide, N-hydroxymethyl-N-methylformamide, and N-methylformamide in the rat. Arch Toxicol 1994;68:291-295
- Carr LG, Yi IS, Li T-K, and Yin SJ. Cytochrome P4502E1 genotypes, alcoholism, and alcoholic cirrhosis in Han Chinese and Atayal natives

- of Taiwan. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:43-46
- Chang S-K, Jeong HS, Chai S, Kim KW and Park SS. Effect of trichloroethylene on the induction of rat liver microsomal enzymes. *J Biochem Mol Biol* 1997;30(4):237-239
- Clayton JW, Barenas JR, Hood DB, Schepers GWH. The inhalation toxicity of dimethylformamide(DMF). *Am Ind Hyg Assoc J* 1963;24:144-154
- Cooksey PG, Gate EN, Gescher A, Hickman JA, Langdon SP, Stevens MFG. The formation and metabolism of N-hydroxymethyl compounds. IV. Cytotoxicity and antitumor activity of N-hydroxymethylformamide, a putative metabolite of N-methylformamide. *Biochem Pharmacol* 1983;32:3037-3043
- Crabb D, Howard W, Eddenberg J, Bosron WF and Li TK. Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. *J Clin Invest* 1989;83:314-316
- Daniel JW. The metabolism of Cl-labelled trichloroethylene in the rat. *Biochem Pharmacol* 1963;12:795-802
- Dilger K, Greiner B, Fromm MF, Hofmann U, Kroemer HK and Eichelbaum M. Consequences of rifampicin treatment on propafenone disposition in extensive and poor metabolizers of CYP2D6. *Pharmacogenetics* 1999;9: 551-559
- Gescher A. Metabolism of N,N-dimethylformamide: key to the understanding of its toxicity. *Chem Res Toxicol* 1993;6:245-251
- Gill HJ, Tjia JF, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Back DJ and Park BK. The effect of genetic polymorphisms in CYP2C9 on sulphamethoxazole

- N-hydroxylation. *Pharmacogenetics* 1999;9:43-53
- Gobba F, Ghittori S, Imbriani M, Maestri L, Capodaglio E, Cavalleri A. The urinary excretion of solvents and gases for the biological monitoring of occupational exposure: a review. *Sci Total Environ* 1997;199:3-12
- Goldstein BD. Biological markers and risk assessment. *Drug meta Rev* 1996;28:225-233
- Hanioka H, Hamamura M, Kakino K, Ogata H, Jinno H, Takahashi A, Nishimura T and Ando M. Dog liver microsomal P450 enzyme-mediated toluene biotransformation. *Xenobiotica* 1995;25:1207-1217
- Ikeda M, Ohtsuji H, Imamura T. *In vitro* suppression of benzene and styrene oxidation by co-administrated toluene in rats and effects of phenobarbital. *Xenobiotica* 1972;2:101-106
- Imazu K, Fujjishiro K, Inoue N. Effect of dimethylformamide on hepatic microsomal monooxygenase system and glutathione metabolism in rats. *Toxicology* 1992;72(1):41-50
- IPCS. Environmental Health Criteria 114, Dimethylformamide. World Health Organization: Geneva, 1991
- Kawai T, Yasugi T, Mizunuma K, Watanabe T, Cai SX, Huang MY, Xi LQ, Qu JB, Yao BZ, Ikeda M. Occupational dimethylformamide excretion in urine after occupational dimethylformamide exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;63:455-460
- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shonida N, Watanabe J. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by

- DNA polymorphisms of the cytochrome P4501A1 gene. FEBS Lett 1990;263:131-133
- Kennedy JR. Biological effects of acetamide, formamide, and their monomethyl and dimethyl derivatives. CRC crit Rev. Toxicol 1986;17(2):129-182
- Kestell P, Threadgill MD, Gascher A, Gledhill AP, Shaw AJ, Farmer PB. An investigation of the relationship between hepatotoxicity and the metabolism of N-alkylformamides. J Pharmacol Exp Ther 1987;240: 265-270
- Kim K-W, Kim HY, Park SS, Jeong HS, Park SH, Lee JY, Jeong JH and Moon YH. Gender differences in activity and induction of hepatic microsomal cytochrome P-450 by 1-Bromopropane in Sprague-Dawley rats. J Biochem Mol Biol 1999;32(3):232-238
- Krinvanek ND, McLaughlin M and Fayerwerther WE. Monomethylformamide levels in human urine after repetitive exposure to dimethylformamide vapor. J Occup Med 1978;20:179-182
- Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, Takayama K, Hara N, Motohiro A, Tanaka K, Kono S and Hirohata T. The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. Pharmacogenetics 1998;8:315-323
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head a bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685
- Lauwerys RR, Kivits A, Lhoir M, Rigolet P, Houbeau D, Buchet JP and Roels HA Biological surveillance of workers exposed to dimethyl-

- formamide and the influence of skin protection on its percutaneous absorption. *Int Arch Occup Environ Health* 1980;45:189-293
- Legrand-Andreoletti M, Stucker I, Marez D, Galais P, Cosme J, Sabba N, Spire C, Cenee S, Lafitte JJ, Beaune P and Broly F. Cytochrome P450 CYP2D6 gene polymorphism and lung cancer susceptibility in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1998;8:7-14
- Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992;27:283-335
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:401-404
- Lu AYH, and West SB. Multiplicity of mammalian microsomes P-450. *Pharmacol Rev* 1980;31:277-295
- Meisel P, Schroeder C, Wulff K and Siegmund W. Relation between human genotype and phenotype of N-acetyltransferase(NAT2) as estimated by discriminant analysis and multiple linear regression: 1. Genotype and N-acetylation *in vivo*. *Pharmacogenetics* 1997;7:241-246
- Mraz J, Cross H, Gescher A, Threadgill MD, Fleck J. Differences between rodents and humans in the metabolic toxification of N,N-dimethylformamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989;98:507-516
- Mraz J, Nohova H. Absorption, metabolism and elimination of N,N-dimethylformamide in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 1992;64:85-92
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and

- Nebert DW. P450 superfamily: updata on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6:1-42
- NIOSH. NIOSH manual of analytical methods, 4th ed., Method 2004, U.S. Department of Health and Human Services, Cincinnati, 1994
- Omura T and Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239:2370-2378
- Park KH and Kim CR. Induction of the different forms cytochrome P-450 isozymes and comparison of aryl hydrocarbon hydroxylase levels on rat tissues by chemical treatment. *Korean Biochem J* 1984;17:10-19
- Parke DV. Personal reflections on 50 years of study of benzene toxicology. *Environ Health Perspect* 1996;104:1123-1128
- Pearson PG, Slater JG, Rashed MS, Han DH, Baillie TA. Carbamoylation of peptides and proteins *in vitro* by S-(N-methylcarbamoyl)glutathione and S-(N-methylcarbamoyl)cysteine, two electrophilic S-linked conjugates of methylisocyanate. *Chem Res Toxicol* 1991;4:436-444
- Powell H, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Smith DA and Park BK. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics* 1998;8:411-421
- Riihimäki V. Conjugation and urinary excretion of toluene and m-xylene metabolites in a man. *Scand J Work Environ Health* 1979;5:135-142
- Rossi AM, Guarnieri C, Rovesti S, Gobba F, Ghittori S, Vivoli G and Barale R. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism

- in humans. *Pharmacogenetics* 1999;9:445-451
- Sato A and Nakajima T. Dose-dependent metabolic interaction between benzene and toluene *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;48:249-256
- Scailteur V and Lauwerys RR. Dimethylformamide(DMF) hepatotoxicity. *Toxicology* 1987;43:231-238
- Sherson D, Sigsgaard T, Loft EOS, Poulsen HE, Jongeneelen FJ. Interaction of smoking, uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons, and cytochrome P4501A2 activity among foundry workers. *Br J Ind Med* 1992;49:197-202
- Shimada T, Yun C-H, Hiroshi Y, Gautier J-C, Beaune PH, Guengerich FP. Characterization of human lung microsomal cytochrome P-4501A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol* 1992;41:856-864
- Smart J and Daly AK. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2000;10:11-24
- Strange RC, Ellison T, Ichii-Jones F, Bath J, Hoban P, Lear JT, Smith AG, Hutchinson PE, Osborne J, Bowers B, Jones PW and Fryer AA. Cytochrome P450CYP2D6 genotypes: association with hair colour, Breslow thickness and melanocyte stimulating hormone receptor alleles in patients with malignant melanoma. *Pharmacogenetics* 1999;9:269-276
- Takeshita T, Morimoto K, Mao XQ, Hashimoto T, Furuyama J-I. Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde

- dehydrogenase in a Japanese population. *Hum Genet* 1994;94:217-223
- Tanaka F, Shiratori Y, Yokosuka O, Imazeki F, Tsukada Y, and Omata M. Polymorphism of alcohol-metabolizing gene affects drinking behavior and alcoholic liver disease in Japanese men. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21(4):596-601
- Tsutsumi M, Lasker JM, Shimizu M, Rosman AS, Lieber CS. The intralobular distribution of ethanol-inducible P450IIE1 in rat and human liver. *Hepatology* 1989;10(4):437-446
- Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, Motomiya M and Watanabe M. Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics* 1994;4:58-63
- Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF and Nebert DW. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics* 1999;9:421-434
- Wang RS, Nakajima T, Honma T. Different change patterns of the isozymes of cytochrome P450 and glutathione S-transferases in chemically induced liver damage in rat. *Ind Health* 1999;37(4):440-448

유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(Ⅲ)

(연구원 : 2000-45-195)

발 행 일 : 1999. 12. 31.

발 행 인 : 원 장 정 호 근

연구책임자 : 책임연구원 김 기 용

발 행 처 : 한국산업안전공단

산업안전보건연구원

직업병연구센터

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : 032-5100-926

F A X : 032-518-0862

인 쇄 처 : 성진문예사 (02) 2266-3033