

보건분야 - 연구자료
연구원 2002-3-3
H-RD-I-2002-3-3

유전자다형성 분석에 의한 건강장해 평가(Ⅱ)

- 유전자다형성과 면역반응에 의한 건강장해 평가 -

한국산업안전공단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 『유전자다형성 분석에 의한 건강장해 평가
(Ⅱ)』 최종 보고서로 제출합니다.

2001년 12월 31일

주관 연구부서 : 산업안전보건연구원 직업병연구센터

연구책임자 : 책임연구원 김 기 웅

공동연구자 : 수석연구원 최 병 순

선임연구원 이 미 영

연구원 고 경 선

이 정 오

김 태 균

정 효 석

요 약 문

1. 과 제 명 : 유전자다형성 분석에 의한 건강장해 평가(Ⅱ)
(유전자다양성과 면역반응에 의한 건강장해 평가)
2. 연구기간 : 2001. 1. 1 ~ 2001. 12. 31.
3. 연 구 자 : 총괄연구책임자 김 기 웅 (책임연구원)
공 동 연 구 자 최 병 순 (수석연구원)
4. 연구목적

본 연구의 목적은 1) toluene 대사에 관여하는 CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1과 toluene의 대사과정에서 생성되는 semi-quinone계 물질과 ROS의 대사에 관여하는 NQO1에 대한 유전자다형성(genetic polymorphism) 분석을 통하여, 이들 각각의 유전자 아형과 toluene의 대사상관성을 알아보고 유전자 아형에 따른 개인간의 대사능 차이를 평가하고자 하였으며, 2) 저 농도의 toluene 이 세포성 면역과 체액성 면역에 어떠한 영향을 미치는지를 파악하여 toluene 에 노출되는 근로자에 대한 민감성지표 개발과 건강장해를 평가하는데 기초자료로 활용하고자 한다.

5. 연구내용

- 기중 toluene 노출농도와 뇨중 마노산 측정
- 혈액 DNA 추출 및 중합효소연쇄반응에 의한 유전자 증폭
- CYP2E1과 NQO1 유전자다형성 분석
- GST subfamily인 GSTM1, GSTT1 및 GSTP1 유전자다형성 분석
- 이들 유전자 아형과 toluene의 대사상관성 분석
- 혈청의 hydroxyl radical, hydrogen peroxide 및 과산화지질 농도 측정
- 세포성(CD4, CD8, CD3 및 NK cell) 면역기능 측정
- 체액성(IgA, IgG 및 IgM) 면역기능 측정
- toluene이 면역기능에 미치는 영향 평가

6. 활용계획

본 연구에서는 toluene의 노출농도, 대사산물의 배설량 및 toluene의 대사에 관여하는 효소에 대한 유전자다형성 분석 등의 연구를 통하여 얻은 결과를 바탕으로, 유전자 아형에 따른 toluene의 대사상관성을 분석하여 민감성지표를 개발하고 저 농도의 toluene 노출이 면역기능에 어떠한 영향을 미치는지를 파악하여 근로자의 건강장해를 평가하는데 기초자료로 활용

7. 연구개요

Toluene의 체내 흡입은 주로 호흡기를 통하여 이루어지며, 흡입된 toluene의 25-45% 정도는 변하지 않은 상태로 호기를 통하여 배출되고, 약 40-60%가 체내에 흡수된다. 흡수된 toluene은 cytochrome P-450(CYP)에 의하여 benzene

고리에 붙어있는 메틸기가 수산화(hydroxylation)되어 benzyl alcohol(BAH)과 benzaldehyde (BAL)로 변형되어 benzoic acid (BA)가 생성되고, BA는 glycine과 포합반응(conjugation)을 통하여 마노산(hippuric acid)으로 변형된 후, 소변으로 배설된다. Toluene에 의한 체내 독성은 toluene 자체에 의해서도 일어나지만 활성화된 대사 중간체와 부가적으로 생성되는 활성산소종들에 의하여 신경 및 면역계 독성이 유발된다.

그러므로 본 연구에서는 toluene의 노출농도, 뇨중 마노산의 배설량 및 toluene의 대사에 관여하는 CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 및 NQO1에 대한 유전자다형성 분석을 통하여 각각의 유전자 아형과 toluene의 대사상관성을 분석하여 toluene에 대한 민감성과 면역기능을 파악하고자 하였다.

그 결과, 본 연구에서는 저 농도의 toluene 대사에 CYP2E1*2/CYP2E1*2, GSTM1과 GSTT1의 present, GSTP1 AA 및 NQO1*1/NQO1*1의 유전자 아형이 다른 아형에서 보다 통계학적으로 유의하게 높은 대사상관성을 보였다.

Toluene 노출군에 있어서 혈청 HR, HP 및 과산화지질의 농도는 대조군에 비하여 전반적으로 증가된 경향을 보였으나 HP의 농도만 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.04$). 또한, 저 농도의 toluene 노출이 특이면역기능은 다소 항진시킨 반면, 비 특이적 면역기능은 저하시켰다. 이러한 결과는 CYP의 작용에 의해서 toluene이 대사되는 과정에서 HR 및 HP가 생성되고 그러한 물질들이 비 특이면역 기능을 저하시킨 결과라 생각된다.

8. 중 심 어

Toluene, 마노산, CYP2E1, GST subfamily 및 NQO1 유전자다형성, 활성산소종, 세포성 및 체액성 면역

차 례

요 약 문	i
차 례	iv
표 및 그림목차	vi
제 1 장 서 론	1
1. 연구배경	1
2. 연구목적	4
제 2 장 연구방법	6
1. 연구대상	6
2. 연구방법	6
가. Toluene 노출농도 및 요중 마노산의 배설량	6
나. 유전자다형성 분석	7
(1) CYP2E1 유전자다형성 분석	7
(2) GST subfamily 유전자다형성 분석	8
(3) NQO1 유전자다형성 분석	9
다. 혈청 HR, HP 및 과산화지질 농도	11
라. 면역기능 측정	12
마. 간기능 검사	12
바. 자료분석	13

제 3 장 연구결과	14
1. 연구대상자의 일반적 특성	14
2. Toluene 대사에 관여하는 효소의 유전자다형성 분포	16
3. Toluene의 대사와 유전자다형성	21
가. CYP2E1 유전자다형성과 toluene의 대사상관성	22
나. GST subfamily 유전자다형성과 toluene의 대사상관성	24
다. NQO1 유전자다형성과 toluene의 대사상관성	30
4. HR, HP 및 과산화지질 농도	33
5. 세포성과 체액성 면역	34
제 4 장 고 찰	38
참고문헌	44

표 목 차

<표 2-1> 중합효소연쇄반응에 사용된 primer 염기서열	10
<표 3-1> 연구 대상자의 일반적 특성	15
<표 3-2> 연구 대상자의 CYP2E1과 NQO1 유전자다형성의 분포	19
<표 3-3> 연구 대상자의 GST subfamily 유전자다형성 분포	20
<표 3-4> 연구 대상자의 혈청 HR, HP 및 과산화지질 평균농도	33
<표 3-5> Lymphocyte subpopulations과 혈청 immunoglobulin의 농도	36
<표 3-6> 노출군 대상자에 있어서 측정된 변수간의 상관관계	37

그 립 목 차

[그림 3-1] CYP2E1과 NQO1에 대한 유전자다형성	17
[그림 3-2] GSTM1, GSTT1과 GSTP1에 대한 유전자다형성	18
[그림 3-3] 노출군 대상자에 있어서 기중 toluene과 뇨중 마노산의 상관관계	21
[그림 3-4] CYP2E1*1/CYP2E1*2 유전자 아형과 toluene의 대사상관성	22
[그림 3-5] CYP2E1*2/CYP2E1*2 유전자 아형과 toluene의 대사상관성	23
[그림 3-6] GSTT1 present 아형과 toluene의 대사상관성	24
[그림 3-7] GSTT1 null 아형과 toluene의 대사상관성	25
[그림 3-8] GSTM1 present 아형과 toluene의 대사상관성	26
[그림 3-9] GSTT1 null 아형과 toluene의 대사상관성	27
[그림 3-10] GSTP1 AA 아형과 toluene의 대사상관성	28
[그림 3-11] GSTP1 AG 아형과 toluene의 대사상관성	29
[그림 3-12] NQO1*1/NQO1*1 아형과 toluene의 대사상관성	30
[그림 3-13] NQO1*1/NQO1*2 아형과 toluene의 대사상관성	31
[그림 3-14] NQO1*2/NQO1*2 아형과 toluene의 대사상관성	32
[그림 3-15] 혈액 lymphocyte subpopulations의 분석형태	34

제 1 장 서 론

1. 연구배경

Toluene은 하나의 고리를 가진 방향족탄화수소(monocyclic aromatic hydrocarbon, MAH)계 물질 중의 하나로 도료, 잉크, 페인트, 접착제 및 화학공업 제품의 원료 등으로 널리 사용되는 물질이다(IPCS, 1985). Toluene의 체내 흡입은 주로 호흡기를 통하여 이루어지며, 흡입된 toluene의 25-45% 정도는 변하지 않은 상태로 호기를 통하여 배출되고, 약 40-60%가 체내에 흡수된다. 흡수된 toluene은 cytochrome P-450(CYP)에 의하여 benzene 고리에 붙어있는 메틸기가 수산화(hydroxylation)되어 benzyl alcohol(BAH)과 benzaldehyde(BAL)로 변형되어 benzoic acid (BA)가 생성되고, BA는 다시 glycine과 포합반응(conjugation)을 통하여 마뇨산(hippuric acid)으로 변형된 후, 소변으로 배설된다(IPCS, 1985). 따라서 마뇨산은 toluene 노출에 대한 생물학적 모니터링 방법으로 사용되고 있다.

Toluene에 의한 체내독성은 toluene 자체에 의해서도 발생되지만 대사과정에서 생성되는 BAL과 semi-quinone계 같은 활성화된 중간체에 의하여 유발된다(Mattia 등, 1991; Mattia 등, 1993; Murata 등, 1999). BAL은 체내에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시키는 한편, toluene은 glutathione peroxidase(GP)와 같은 ROS 제거효소(scavenger enzymes)의 활성을 감소시킴으로서 독성을 나타내게 된다(Tabatabaie와 Floyd, 1996). 또한

저 농도의 toluene 노출은 toluene 뿐만 아니라 MAH계 물질의 대사에 관여하는 aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)의 활성도, CYP2B1과 CYP4B1 등의 작용을 억제시킨다(Furman 등, 1998). 효소는 기질 특이성과 중복성을 가지고 있는데, 이러한 현상은 유해화학물질에 복합노출 될 경우, 다른 물질의 대사에도 관여하는 AHH, CYP2B1 및 CYP4B1의 활성이 억제됨으로써 이물질 대사 장애를 초래하며, 그로 인하여 ROS의 생성이 증가되는 원인이 될 수 있다.

산소를 호흡하는 생물은 체내에 존재하는 산소의 부분적인 환원으로 superoxide ion(O_2^-)과 hydroxyl radical($\cdot OH$) 같은 free radical이 생성되어 지방질 성분과 지질과산화반응(lipid peroxidation)을 통하여 지질의 자동산화를 촉진시켜 이상대사를 초래하는데, 방사선, 화학물질, 중금속 및 흡연 등에 의한 영향을 받으면 free radical과 같은 ROS의 생성이 현저히 증가된다(Nelson, 1995; Wurzel 등, 1995). 생성된 ROS는 세포막, 단백질 및 핵산 등과 같은 거대분자(macromolecules)와 공유결합을 통하여 기능억제 및 손상을 초래하고 체내의 항상성이 불균형화되는 현상을 나타내어 궁극적으로는 암을 포함한 많은 질병을 유발한다(Oleinik 등, 1987; Viguier 등, 1990; Kasprzak, 1991).

그러나 정상적인 생체는 항상성을 유지하기 위한 자기방어 시스템을 가지고 있다. 즉, 간과 혈액에 존재하는 superoxide dismutase(SOD)는 반응성이 큰 O_2^- 를 H_2O_2 로의 전환을 촉매하고(McCord와 Fridovic, 1969) 이렇게 생성된 H_2O_2 는 GP와 catalase 등에 의해서 분해되어 free radical과 과산화지질(lipid peroxide, LPO)의 축적에 의한 세포손상을 억제시킨다. 또한 간장과 신장에서 높은 활성을 보이는 NAD(P)H: quinone oxidoreductase(NQOR)는 cytosolic flavoprotein으로 MAH계 물질의 대사과정에서 생성되는 quinone과 그 유도체의 해독대사에 관여하며, 산화성 스트레스(oxidative stress)와 redox cycling에 의하여 생성되는 ROS로부터 세포를 보호한다. 체내에 존재하는 과량의 ROS는

중추신경계 및 면역계 손상을 초래한다. Allan 등에(1987) 의하면 lymphocyte subpopulations의 손상은 H_2O_2 와 같은 ROS의 농도에 의존하는데, 저 농도의 H_2O_2 는 CD8 세포에, 고 농도의 H_2O_2 는 CD4 세포와 IgG의 활성을 선택적으로 감소시킨다고 하였으며, toluene에 의한 면역과 신경독성은 toluene 자체와 대사과정에서 생성된 BAL과 같은 ROS에 의해서 이루어짐이 보고되었다 (Tabatabaie와 Floyd, 1996).

이물질에 의한 체내 독성유발은 흡입된 물질의 양, 대사효소의 활성도, 대사과정에서 생성되는 활성화된 중간체와 ROS와 같은 부가물의 생성량에 의존한다고 볼 수 있다. 따라서 체내의 항상성조절인자의 상태와 유전적인 요인은 이물질 대사와 독성발현에 매우 중요한 역할을 하는데 특히, 유전적인 요인은 이물질 대사에 있어서 매우 중요하다. 즉, 이물질 대사효소는 흡수된 물질에 의하여 특정한 유전자(DNA)를 유도(induction)시켜 mRNA를 합성하고, 효소들은 이 mRNA의 정보에 의해서 합성되어진 후, 대사에 관여하기 때문에 이물질 대사에 관여하는 효소의 유도와 활성은 유전자에 의해서 조절되기 때문이다. 그러므로 많은 연구자들은 이물질 대사 효소에 대한 유전자다형성 연구를 통하여 인종과 개인에 따라 효소의 유전자다형성의 차이가 있음을 보고하였고, 그러한 연구결과를 토대로 하여 개인에 따른 이물질 대사능과 건강의 위험도를 평가하는데 민감도지표(susceptibility marker)로 활용하고자 하는 연구를 활발히 수행하고 있다.

2. 연구목적

Toluene은 산업체에서 널리 사용되는 물질로서 대사기전(IPCS, 1985)과 독성유발(Zenz, 1988) 등에 관한 연구는 오래 전부터 시도되었는데, 그 중에 대사기전과 관련해서 phase I 효소인 CYP와 phase II 효소인 glutathion-linked enzymes에 대한 연구는 여러 연구자들에 의해 *in vitro*와 *in vivo* system에서 각기 다른 형태로 수행되었다.

CYP는 함량에 따른 정도의 차이는 있지만 체내의 전반적인 기관에 분포하며, 지방족 및 방향족 물질의 hydroxylation, N-oxidation과 epoxidation 그리고 할로젠화물질에 대한 dehalogenation 등의 촉매작용을 통하여 유기용제, 약물 및 환경오염물질 등을 대사시키는데 있어서 맨 처음단계에 관여하여 흡입된 물질을 수용성화시키는 작용을 한다. Glutathion-linked enzyme들은 CYP에 의해서 변형된 대사 중간체와 포합반응을 통하여 해독화과정에 관여하므로 toluene 뿐만 아니라 MAH계 및 많은 유해화학물질의 대사에 있어서 CYP와 glutathion-linked enzyme에 대한 연구는 활발히 이루어지고 있다.

우리 직업병연구센터 생화학연구실에서도 toluene과 여러 유기용제의 대사와 독성발현 등과 관련하여 효소의 활성화도, ROS 및 면역항체 연구 등을 수행하였다. 그 결과, toluene에 의하여 CYP2E1 동위효소가 유도됨을 단일세포성향체를 이용하여 확인하였으며(김기웅 등, 1996), MAH계 물질에 노출되는 산업체 근로자의 lymphocytes에서 CYP1A1, CYP2B1과 CYP2E1에 대한 단일세포성향체를 이용하여 노출을 평가할 수 있는 새로운 생물학적인 모니터링 방법을 개발하고자 하는 연구를 수행하였다(김기웅 등, 1997). 또한 민감도지표를 개발하기 위하여 근로자의 혈액 genomic DNA를 추출하여 노출물질의 대사에

CYP와 glutathion S-transferase(GST) subfamily의 유전자 아형(genotype)이 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구를 지속적으로 수행하여, dimethyl-formamide를 포함한 유기용제의 대사에 유전자 아형에 따라 차이가 있음을 밝혔다(김기웅 등, 1998; 1999; 2000). 그러나 저 농도의 toluene 노출과 관련하여 ROS와 면역계에 대한 연구 및 대사효소의 유전자다형성에 대한 연구는 국내·외적으로 아직 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구는 규명된 toluene의 대사기전과 우리의 연구결과를 토대로 하여, (1) toluene 대사에 관여하는 CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1과 toluene의 대사에서 생성되는 semi-quinone계 물질의 대사와 ROS의 대사에 관여하는 NQO1에 대한 유전자다형성(genetic polymorphism) 분석을 통하여 개인간의 대사능을 평가하고자 하였으며, (2) toluene의 노출이 면역계에 어떠한 영향을 미치는지를 파악하기 위하여 연구를 수행하였다.

제 2 장 연구방법

1. 연구대상

본 연구의 대상은 비디오테이프 제조업 2개 사업장에서 toluene에 노출되는 남성 근로자 137명을 노출군으로 하고 toluene 뿐만 아니라 다른 유해화학물질에 노출되지 않는 공공기관 1곳과 통신업체 2곳의 사무직 근로자 353명을 대조군으로 하여 총 490명을 대상으로 하였다. Toluene의 대사에 관여하는 CYP2E1, GST subfamily 및 NQO1 효소들은 흡연, 음주, 습관성 약물복용 및 질병의 유·무 등과 밀접한 관련이 있으므로 이들 요인에 의한 영향을 배제시키기 위하여 사전에 작성된 설문지를 이용하여 조사하였다. 이들 대상자 중 설문지를 통하여 얻은 정보를 바탕으로 하여 연령 및 생활습관 등이 비슷하고 질병이 없는 대상자를 재 선정하여, 노출군은 비디오테이프 제조업 1개 사업장에서 34명씩 총 68명을 대상으로 하였고, 대조군은 사업장 1곳 당 10명씩으로 총 30명을 대상으로 하여 활성산소종 및 면역기능을 측정하였다.

2. 연구방법

가. Toluene의 노출농도 및 요중 마노산의 배설량

시료 채취와 분석은 미국국립산업안전보건연구소(National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH)에서 추천하는 공정시험법(1996) 'Method 1501 방향족 탄화수소류'에 의하여 실시하였다. 공기중 toluene의 포집은 활성탄을 흡착제로 하여 저유량 개인용시료포집기(Low Flow Sampler, Gilian, USA)를 이용하여 분당 200 ml의 유속으로 근로자의 호흡구 위치에서 포집하였다. Toluene이 포집된 활성탄관은 밀봉된 상태로 실험실로 냉장 운반하여 24시간 이내에 분석하였다. 마뇨산 분석에 사용된 소변은 근로자의 작업 종료 시점에 플라스틱 통을 이용하여 채취한 다음, 냉장상태로 실험실로 운반하여 고성능액체크로마토그래피(Shiseido Nanospace SI-1, Japan)를 이용하여 분석한 후, creatinine으로 보정하여 배설량을 산출하였다.

나. 유전자다형성 분석

연구에 사용된 genomic DNA는 연구 대상자로부터 채혈한 전혈(whole blood)을 QAIamp Blood Kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 적절한 primers(표 2-1)를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR) 방법에 따라 각각의 유전자에 대한 특정한 부위를 증폭시킨 다음, 제한효소를 사용하여 DNA를 절단시킨 후, 전기영동을 실시하여 확인하였다.

(1) CYP2E1 유전자다형성 분석

Uematsu 등의 방법(1994)을 다소 변형하여 *intron* 6 부위에서 PCR 방법에 의하여 유전자다형성 분석을 실행하였다. 추출된 genomic DNA 5 μ l, 5 pmole의 sense primer와 anti-sense primer 5 μ l, 2.5 mM dNTP mixture, 2.5 U Taq polymerase

와 PCR buffer를 혼합한 후, gene cyclerTM(Bio-Rad, USA)를 이용하여 먼저, 95℃에서 5분간 predenaturation시킨 다음, 94℃에서 1분 denaturation, 60℃에서 1분 동안 annealing, 72℃에서 1분간 extension하는 과정을 1 cycle로 하여 31 cycles를 실행한 후 마지막으로 72℃에서 2분간 연장 반응하여 유전자를 증폭시켰다. PCR 생성물을 *Dra* I(6 U) 제한효소를 이용하여 37℃에서 12시간 동안 digestion시킨 후, 4% agarose gel 전기영동을 실시하고 전개된 띠(band)를 관찰하여 CYP2E1의 유전자 아형을 확인하였다.

(2) GST subfamily 유전자다형성 분석

(가) GSTM1 유전자다형성 분석

Kristensen 등(1998)의 방법을 다소 변형하여 *exon* 4와 5 부위에서 PCR 방법에 의하여 분석하였다. 추출된 genomic DNA 5 μ l, 30 pmole의 sense primer와 anti-sense primer 5 μ l, 2.5 mM dNTP mixture, 2.5 U Taq polymerase와 PCR buffer를 혼합한 후, gene cyclerTM(Bio-Rad, USA)를 이용하여 먼저, 95℃에서 5분간 predenaturation시킨 다음, 94℃에서 1분 denaturation, 60℃에서 1분 동안 annealing, 72℃에서 1분간 extension하는 과정을 1 cycle로 하여 31 cycles를 실행한 후 마지막으로 72℃에서 2분간 연장 반응하여 유전자를 증폭시킨다. PCR 반응물을 4% agarose에 전기영동을 실시하여 전개된 띠(275 bp)의 존재 유·무에 따라 present 아형(+)과 null 아형(-)으로 분류하였다.

(나) GSTT1 유전자다형성 분석

GSTM1의 분석방법(Kristensen 등, 1998)과 동일한 조건하에서 primers를 달리 하여 *exon* 4와 *intron* 5 부위에서 유전자를 증폭시킨 후, PCR 반응물을 4%

agarose에 전기영동을 실시하여 전개된 띠(480 bp)의 존재 유·무에 따라 present 아형(+)과 null 아형(-)으로 분류하였다.

(다) GSTP1 유전자다형성 분석

Kristensen 등(1998)의 방법을 다소 변형하여 *exon* 5 부위에서 PCR 방법에 의하여 GSTP1 유전자다형성을 분석하였다. 추출된 genomic DNA 5 μ l, 30 pmole의 sense primer와 anti-sense primer 5 μ l, 2.5 mM dNTP mixture, 2.5 U Taq polymerase와 PCR buffer를 혼합한 후, gene cyclerTM(Bio-Rad, USA)를 이용하여 먼저, 95°C에서 5분간 predenaturation시킨 다음, 94°C에서 1분 denaturation, 60°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 1 cycle로 하여 35 cycles를 실행한 후 마지막으로 72°C에서 2분간 연장 반응하여 유전자를 증폭시켰다. PCR 생성물을 *Alw26 I*(5 U) 제한효소를 이용하여 37°C에서 12시간 동안 digestion시킨 후, 4% agarose gel 전기영동을 실시하고 전개된 띠(band)를 관찰하여 GSTP1의 유전자 아형을 확인하였다.

(3) NQO1 유전자다형성 분석

Gaedigk 등(1998)의 방법을 다소 변형하여 *exon* 6 부위에서 PCR 방법에 의하여 NQO1 유전자다형성을 분석하였다. 추출된 genomic DNA 5 μ l, 5 pmole의 sense primer와 anti-sense primer 5 μ l, 2.5 mM dNTP mixture, 2.5 U Taq polymerase와 PCR buffer를 혼합한 후, gene cyclerTM(Bio-Rad, USA)를 이용하여 먼저, 95°C에서 5분간 predenaturation시킨 다음, 94°C에서 1분 denaturation, 60°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 과정을 1 cycle로 하여 35 cycles를 실행한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 연장 반응하여 유전자를 증폭시켰

다. PCR 생성물을 *Hinf* I(12 U) 제한효소를 이용하여 37℃에서 12시간 동안 digestion시킨 후, 4% agarose gel 전기영동을 실시하고 전개된 띠(band)를 관찰하여 NQO1의 유전자 아형을 확인하였다.

<표 2-1> 중합효소연쇄반응에 사용된 primer의 염기서열

Primers	Sequence
CYP2E1	
Sense	5'-TGTCGTTCCCTTCCACAGGGC-3'
Anti-sense	5'-TCTGTTGTCAGGCTAGAGTG-3'
GSTM1	
Sense	5'-CTGCCCTACTTGATTGATG-3'
Anti-sense	5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'
GSTT1	
Sense	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
Anti-sense	5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
GSTP1	
Sense	5'-TCCTTCCACGCACATCCTCT-3'
Anti-sense	5'-AGCCCCTTCTTTGTTTCAGC-3'
NQO1	
Sense	5'-CCTGAGGCCTCCTTATCAG-3'
Anti-sense	5'-CAAAGAGGCTGCTTGGAGC-3'

다. 혈청 hydroxyl radical(HR), hydrogen peroxide(HP) 및 과산화지질(LPO) 농도

혈청 hydroxyl radical과 hydrogen peroxide의 농도는 Choi와 Yu(1995)의 방법을 다소 변형하여 측정하였다. 먼저 hydroxyl radical의 농도 측정은 반응 혼합물을 A와 B로 나누어서 0.54 M NaCl, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM NaN₃, 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate를 각각 혼합하여 혈청을 첨가한 후, A 용액은 37℃에서 15분간 반응시키고, B 용액은 실온에서 방치시킨 다음 A와 B 용액에 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)와 20% acetic acid 및 증류수를 혼합하였다. 그리고 1.2% thiobarbituric acid(TBA)를 가하고 100℃에서 30분간 가열한 다음, 실온에서 냉각시켜 원심분리(700xg)한 후, 상층액을 취하여 흡광광도계(Beckman DU 650, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량 곡선을 이용하여 함량을 산출하였다. Hydrogen peroxide의 농도는 0.4 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 0.1 M MgCl₂, 0.2 M nicotinamide, 50 mM NaN₃, 60 mM NADPH와 혈청을 혼합한 다음, 37℃에서 15분간 반응시키고 1.2 M trichloroacetic acid 1.0 ml를 첨가한 후, 원심분리(3,000 rpm, 10분 동안)하고 상층액을 취하여, 10 mM ferrous ammonium sulfate와 2.5 M KSCN 첨가하고 10분간 실온에서 방치한 다음, 흡광광도계(Beckman DU 650, USA)를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량 곡선을 이용하여 함량을 측정하였다. 과산화지질의 함량은 Yagi(1987) 방법에 의하여 TBA법으로 측정하였다. 반응 혼합물로 8.1% SDS 200 μ l와 혈청 100 μ l를 혼합한 후, 20% acetic acid 1.5 ml를 가하여 진탕 혼합하였다. 그리고 1.2% TBA 용액을 첨가하고

100℃ 항온수조에서 30분간 반응시키고 나서 실온에서 냉각시킨 후, 700xg에서 10분간 원심분리하고 흡광광도계(Beckman DU 650, USA)를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정한 후, 표준검량 곡선을 이용하여 과산화지질의 함량을 측정하였다.

라. 면역기능 측정

세포성면역은 mouse IgG1-FITC/mouse IgG1-PE(negative control), anti-T4(CD4-FITC)/anti-T8(CD8-PE), anti-T3(CD3-FITC)/anti-3G8(CD16+CD56-PE) 등 단일세포성면역항체를 이용하여 Flow cytometry(XL Coulter Epics, Coulter Co, Florida, USA)로 채혈 후, 8 시간 이내에 CD4(helper cell), CD8(suppressor cell) 및 자연세포독성세포(natural killer cell, NK cell) 등을 측정하였다. 체액성 면역은 IgA, IgG 및 IgM을 측정하여 평가하였다. 면역글로블린의 측정은 단일세포성항체를 이용하여 Behring Nephelometer Analyzer II(DADE Behring Co, USA)로 측정하였다.

마. 간기능 검사

채혈한 연구 대상자의 혈액을 원심분리하여 혈청 300 μ l을 취하여 Roche사의 COBAS MIRA 생화학자동분석기를 이용하여 간기능 평가지표로 사용되는 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) 및 gamma glutamyl transferase(GGT) 등을 분석하였다.

마. 자료분석

연구 대상자에 대한 측정자료는 개인용 컴퓨터를 이용하여 입력한 후, Version 10.0 SPSS 통계프로그램(SPSS Inc., USA)을 이용하여 t-test, χ^2 -test, 상관성 등을 분석하였다.

제 3 장 연구결과

1. 연구 대상자의 일반적 특성

연구 대상자 490명은 전부 남성 근로자로서 평균연령이 36세(± 6.97)이었다. 이중 대조군 근로자는 353명으로 평균연령이 38.2세(± 7.46)였으며 흡연자는 191명(54.1%), 음주자는 325명(92.1%)이었다. 노출군 근로자는 137명으로 평균연령이 33.8세(± 6.48)이었고 흡연자와 음주자는 각각 102명(74.5%)과 124명(90.5%) 나타났는데, 두 군간에 흡연자만 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). 이들 연구 대상자들에 있어서 간기능을 측정한 결과, 노출군에 있어서 AST, ALT 및 GGT는 각각 24.18(± 34.43), 23.07(± 15.17), 36.90(± 30.27) U/L로 측정되었으며, 대조군의 경우에도 AST, ALT 및 GGT의 측정치가 각각 24.45(± 11.03), 25.96(± 16.87) 및 32.82(± 38.70) U/L로 측정되어 두 군간에 간기능의 차이는 없었다. 노출군 근로자들이 노출되는 toluene의 평균농도는 6.17(± 4.25) ppm으로 1일 8시간 작업 허용기준치의 약 1/14 수준의 저 농도에 노출되고 있었으며, 이들에 있어서 뇨중 마뇨산의 배설량은 0.51(± 0.37) mg/g creatinine이었다. 대조군에 있어서 뇨중 마뇨산의 농도는 0.24 $\pm$ 0.26 mg/g creatinine으로 노출군에서 보다 통계학적으로 유의하게 적은 배설량을 보였다($p < 0.05$) <표 3-1>.

<표 3-1> 연구 대상자의 일반적 특성

	노출군 (137명)	대조군 (353명)
연령(세)	33.79±6.48	38.23±7.46
흡연상태		
흡연자	102(74.5%)	191(54.1%)
비흡연자	35(25.5%)	162(45.9%)
음주상태		
음주자	124(90.5%)	325(92.1%)
비음주자	13(9.5%)	28(7.9%)
간기능		
AST(U/L)	24.18±34.43	24.45±11.03
ALT(U/L)	23.07±15.17	25.96±16.87
GGT(U/L)	36.90±30.27	32.82±38.70
Toluene과 뇨중 마노산 농도		
Toluene(ppm)	6.17±4.25	—
마노산(mg/g creatinine)*	0.51±0.37	0.24±0.26

평균±표준편차.

참고치: AST와 ALT, ≤45 U/L; GGT, ≤50 U/L.

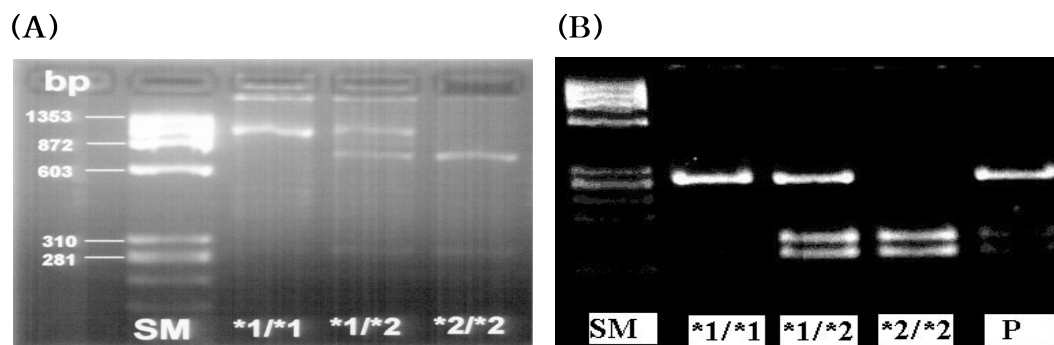
*p<0.05

2. Toluene 대사에 관여하는 효소의 유전자다형성 분포

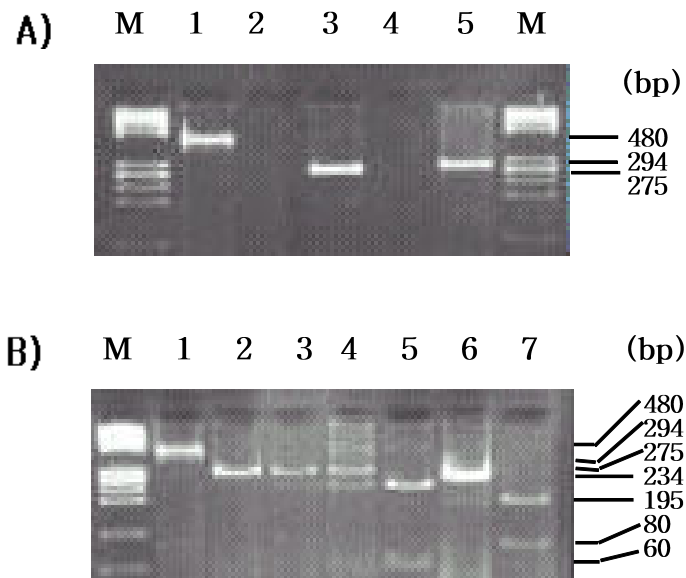
Toluene의 대사에 관여하는 효소인 CYP2E1, GST subfamily 및 NQO1의 유전자다형성은 PCR 방법에 의하여 유전자를 증폭시킨 후, CYP2E1은 *Dra I*, GSTP1은 *Alw26 I*, NQO1은 *Hinf I* 제한효소를 이용하여 절단한 다음, agarose gel 전기영동을 실시하여 유전자 아형을 확인하였다[그림 3-1과 그림 3-2].

CYP2E1의 경우, 노출군에서 CYP2E1*1/CYP2E1*1 유전자 아형은 2.2%(2명), CYP2E1*1/CYP2E1*2와 CYP2E1*2/CYP2E1*2의 유전자 아형은 각각 8.8%(12명)와 89.1%(122명)의 분포를 보였으며, CYP2E1*1과 CYP2E1*2에 대한 allele frequency는 각각 0.06과 0.94로 나타났다. 대조군의 경우는 CYP2E1*1/CYP2E1*1은 11.3%(40명), CYP2E1*1/CYP2E1*2는 14.2%(50명), CYP2E1*2/CYP2E1*2는 74.5%(263명)의 분포를 보였으며, CYP2E1*1과 CYP2E1*2의 allele frequency는 0.18과 0.82로 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). NQO1의 경우, 노출군에 있어서 NQO1*1/NQO1*1은 27%(37명), NQO1*1/NQO1*2와 NQO1*2/NQO1*2는 각각 57.7%(79명)와 15.3%(21명)의 분포를 보였으며, NQO1*1과 NQO1*2의 allele frequency는 0.71과 0.29였다. 대조군의 경우에도 NQO1*1/NQO1*1, NQO1*1/NQO1*2와 NQO1*2/NQO1*2는 각각 34.1%(159명), 52.1%(255명)와 16.5%(81명)로 NQO1*1과 NQO1*2의 allele frequency는 0.66과 0.34로 두 군간에 유전자 아형의 분포 차이는 없었다<표 3-2>. Phase II 효소군인 GST subfamily 중의 하나인 GSTT1의 경우, 노출군에 있어서 present 아형은 42.3%(58명), null 아형은 57.7%(79명)의 분포를 보였고, 대조군에서는 present 아형과 null 아형이 각각 47.9%(169명)와 52.1%(184명)로 나타났다. GSTM1의 경우에도 노출군에

서는 present 아형이 48.9%(67명), null 아형은 51.1%(70명)의 분포를 보였으며, 대조군에서는 present 아형이 49.9%(176명), null 아형은 50.1%(177명)로 나타나 두 군간에 있어서 GSTT1과 GSTM1의 분포 차이는 보이지 않았다. GSTP1의 경우에도 AA 아형은 노출군에서 62.8%(86명), 대조군에서는 73.1%(258명)의 분포를 보였으며, 두 군에 있어서 AG 유전자 아형은 각각 34.3%(47명)와 26.6%(94명), GG의 분포는 노출군에서 2.9%(4명), 대조군에서 0.3%(1명)로 나타났는데, 두 군간에 있어서 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 <표 3-4>.



[그림 3-1] CYP2E1과 NQO1에 대한 유전자다형성. (A) CYP2E1. 4% agarose gel 전기영동 결과(*1/*1, 950 bp; *1/*2, 950, 670과 280 bp; *2/*2, 670과 280 bp). (B) NQO1. 4% agarose gel 전기영동 결과(*1/*2, 283 bp; *1/*2, 283, 151과 132 bp; *2/*2, 151과 132 bp). SM, size marker.



[그림 3-2] GSTM1, GSTT1과 GSTP1에 대한 유전자다형성. A) PCR 생성물에 대한 4% agarose gel 전기영동 결과(M, size marker; 1과 2, GSTT1(480 bp,+)과 GSTT1(-); 3과 4, GSTM1(275 bp,+)과 GSTM1(-); 5, GSTP1(294 bp,+). B) *A/w* 26 I 제한효소를 이용하여 GSTP1(+)과 GSTM1(+)의 PCR 생성물을 절단하고 4% agarose gel 전기영동을 실시한 결과(M, size marker; 1, GSTT1(+)의 PCR 생성물; 2, GSTP1(+)의 PCR 생성물; lane 3, GSTP1(294 bp, AA); 4, GSTP1(294, 234와 60 bp, AG); 5, GSTP1(234와 60 bp, GG); 6, GSTM1(+)의 PCR 생성물(275 bp); 7, 제한효소에 의하여 절단된 GSTM1(195와 80 bp).

<표 3-2> 연구 대상자의 CYP2E1과 NQO1 유전자다형성의 분포

유전자 아형	노출군 (137명, %)	대조군 (353명, %)	총 대상자 (490명, %)
CYP2E1*			
*1/*1	3(2.2)	40(11.3)	43(8.8)
*1/*2	12(8.8)	50(14.2)	74(12.6)
*2/*2	122(89.1)	263(74.5)	385(78.6)
NQO1			
*1/*1	37(27.0)	122(34.1)	159(32.4)
*1/*2	79(57.7)	176(49.2)	255(52.1)
*2/*2	21(15.3)	60(16.8)	81(16.5)

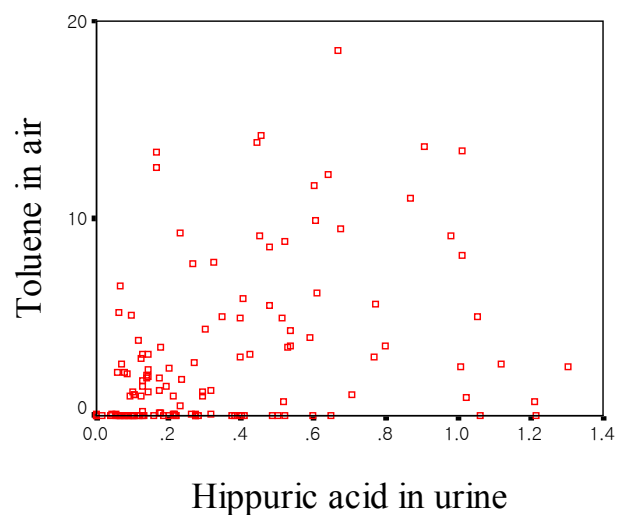
* p>0.05

<표 3-3> 연구 대상자의 GST subfamily 유전자다형성 분포

유전자 아형	노출군 (137명, %)	Control (353명, %)	Total (490명,%)
GSTT1			
present	58(42.3)	169(47.9)	227(46.3)
null	79(57.7)	184(52.1)	263(53.7)
GSTM1			
present	67(48.9)	176(49.9)	243(49.6)
null	70(51.1)	177(50.1)	247(50.4)
GSTP1			
AA	86(62.8)	258(73.1)	344(70.2)
AG	47(34.3)	94(26.6)	141(28.8)
GG	4(2.9)	1(0.3)	5(1.0)

3. Toluene의 대사와 유전자다형성

근로자들이 노출되는 toluene의 기중 평균농도는 $6.17(\pm 4.25)$ ppm이었고, 뇨중으로 배설되는 마뇨산의 평균농도는 $0.51(\pm 0.37)$ mg/g creatinine으로 기중 toluene의 농도와 뇨중 마뇨산의 상관성(대사상관성)은 $0.377(p<0.01)$ 이었다[그림 3-3].

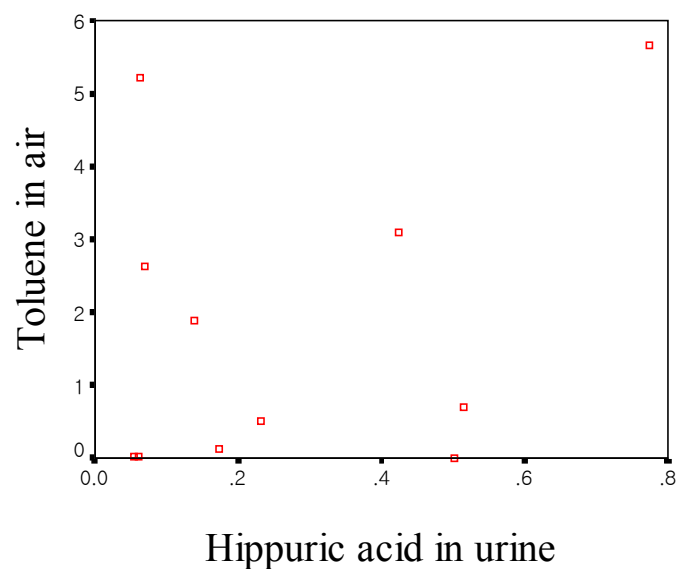


[그림 3-3] 노출군 대상자에 있어서 기중 toluene과 뇨중 마뇨산의 상관관계 ($r=0.377$, $p<0.01$).

가. CYP2E1 유전자다형성과 toluene의 대사상관성

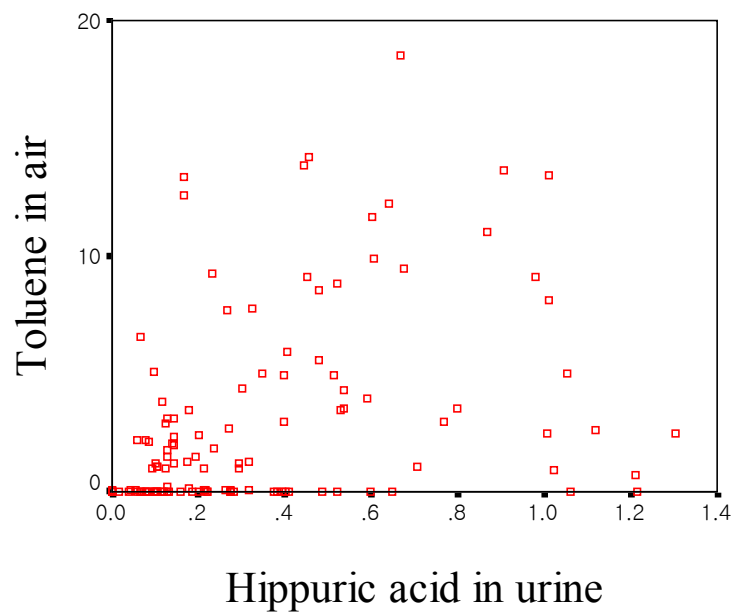
Toluene의 대사에 있어서 맨 처음단계에 관여하는 CYP2E1에 대한 유전자 아형과 대사상관성을 분석하여 [그림 3-4]와 [그림 3-5]에 나타내었다.

노출군에 있어서 CYP2E1*1/CYP2E1*1 유전자 아형을 가지고 있는 사람은 3명(2.2%)으로서 대사상관성은 분석하지 않았다.



[그림 3-4] CYP2E1*1/CYP2E1*2 유전자 아형과 toluene의 대사상관성 ($r=0.300$, $p=0.371$)

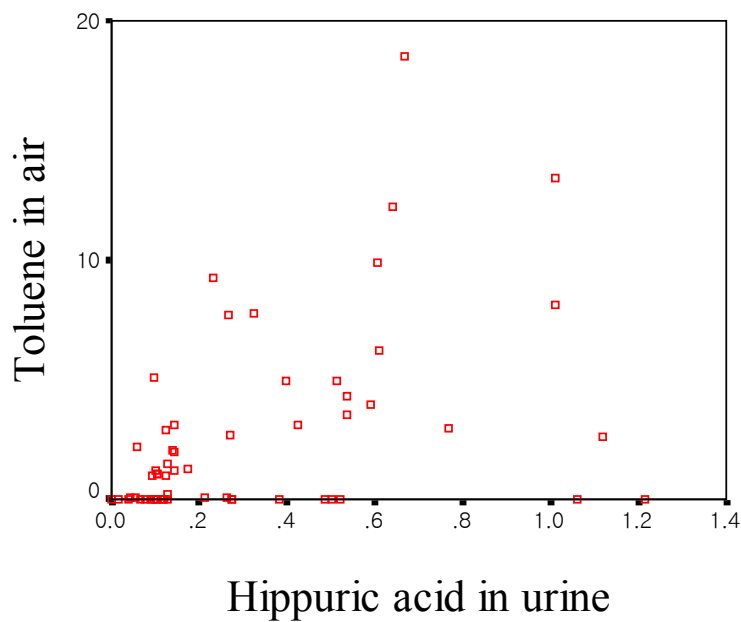
CYP2E1*1/CYP2E1*2과 CYP2E1*2/CYP2E1*2 유전자 아형을 가지고 있는 사람은 각각 12명(8.8%)과 122명(89.1%)으로 이들 유전자 아형과 toluene의 대사상관성을 본 결과, CYP2E1*1/CYP2E1*2 유전자 아형에서는 0.300의 상관성(r)을 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다($p=0.371$)[그림 3-4]. 그러나 CYP2E1*2/CYP2E1*2 유전자 아형에서는 0.370의 상관성을 보였다($p<0.01$)[그림 3-5].



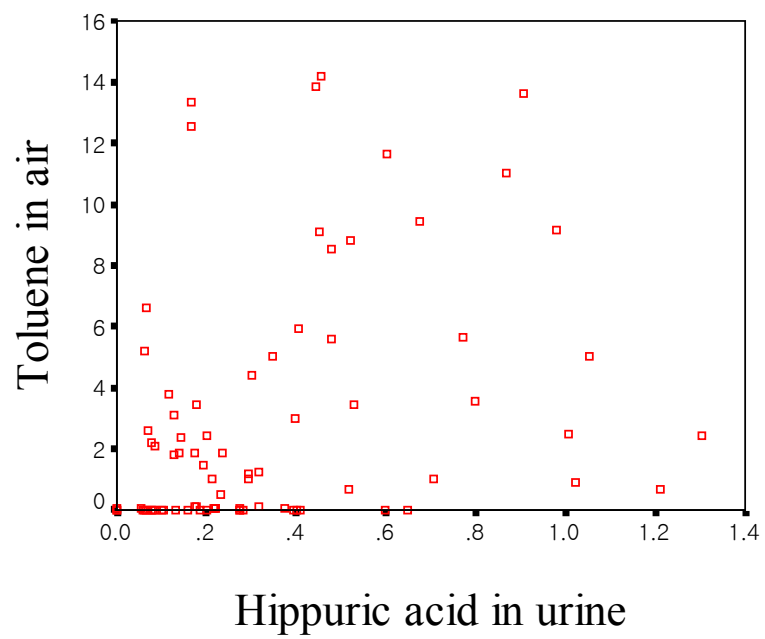
[그림 3-5] CYP2E1*2/CYP2E1*2 유전자 아형과 toluene의 대사상관성 ($r=0.370$, $p<0.01$)

나. GST subfamily 유전자다형성과 toluene의 대사상관성

CYP2E1에 의해서 변형된 중간체를 해독화시키는 과정에 관여하는 GST subfamily의 경우, GSTT1의 present 아형과 null 아형을 가진 근로자는 각각 58명(42.3%)과 79명(57.7%)이었다. 이들 각각의 유전자 아형과 toluene의 대사상관성을 본 결과, present 아형에서는 상관성(r)이 0.441($p < 0.01$)[그림 3-6], null 아형에서는 0.330($p < 0.01$)을 보였다[그림 3-7].

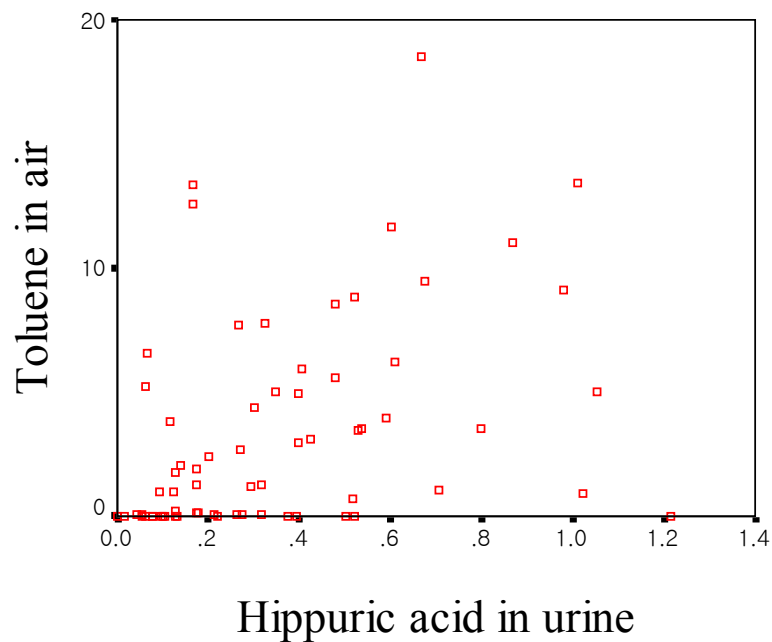


[그림 3-6] GSTT1 present 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.441$, $p < 0.01$)

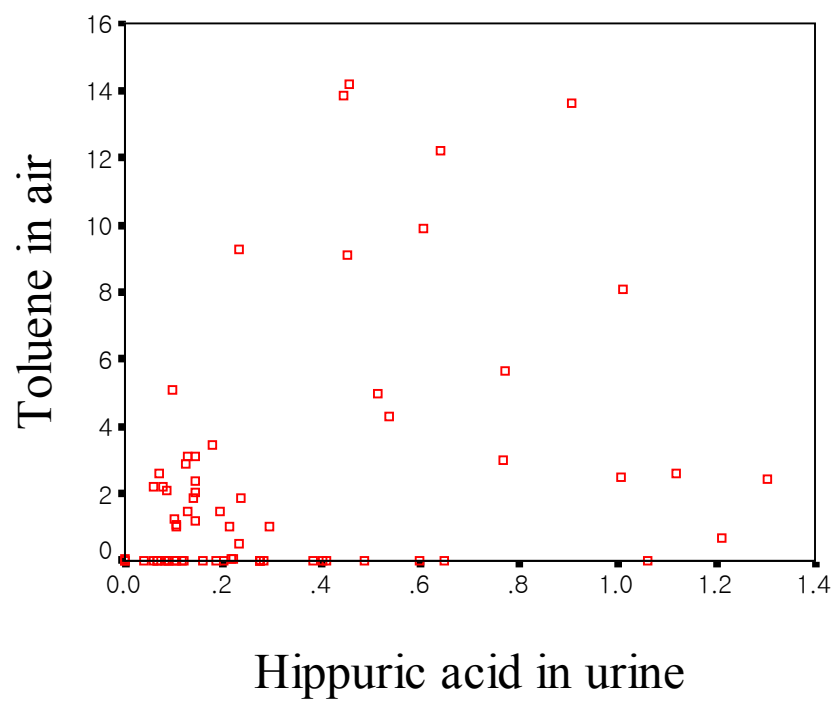


[그림 3-7] GSTT1 null 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.330$, $p<0.01$)

GSTM1의 경우, present 아형을 가진 근로자는 67명(48.9%), null 아형을 가진 근로자는 70명(51.1%)으로 이들 유전자 아형과 toluene의 대사상관성을 분석 결과, present 아형에서는 0.404($p<0.01$)의 상관성을[그림 3-8], null 아형에서는 0.350($p<0.01$)의 상관성을 보였다[그림 3-9].

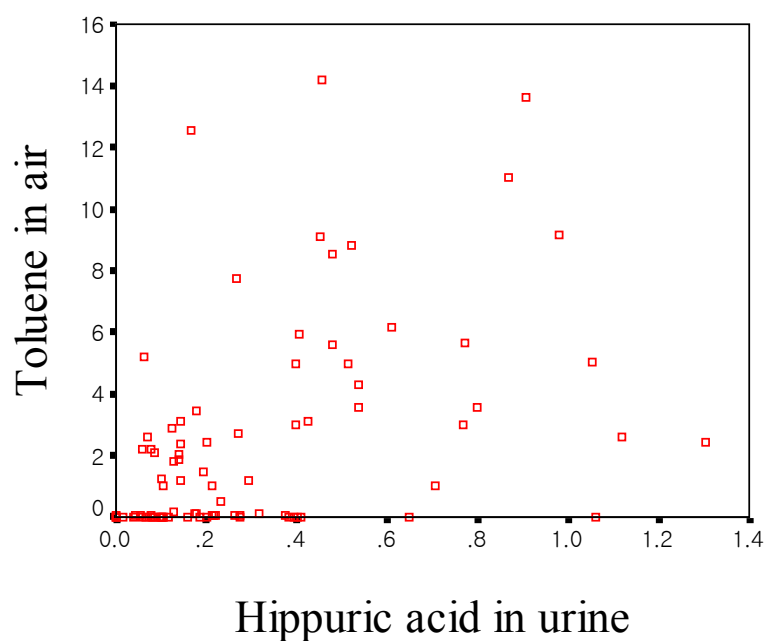


[그림 3-8] GSTM1 present 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.404$, $p<0.01$)



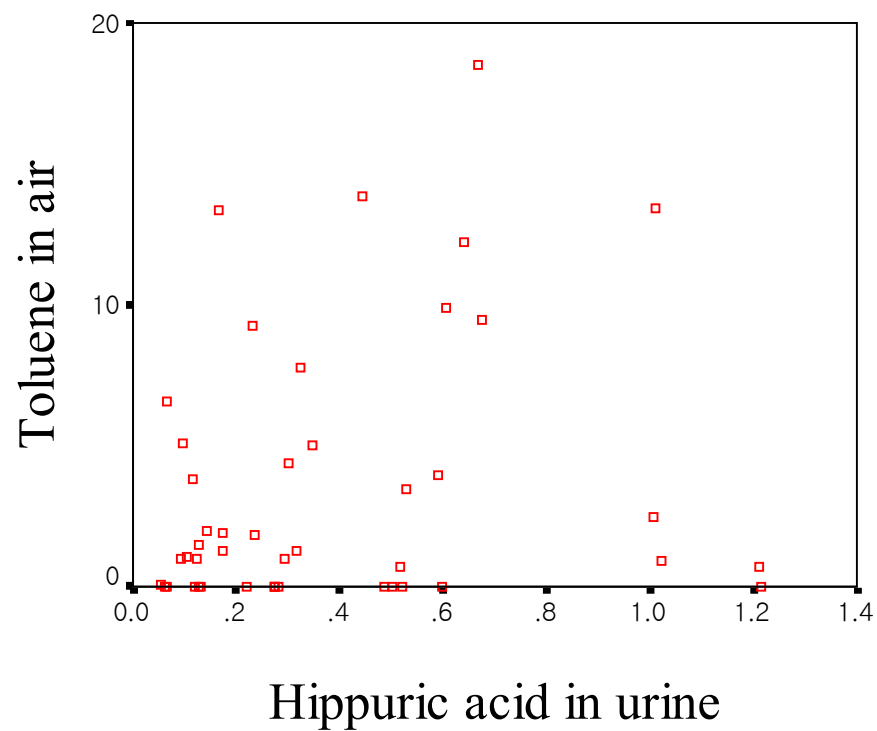
[그림 3-9] GSTM1 null 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.350$, $p<0.01$)

GSTP1은 sense와 anti-sense primer로 *exon* 5 위치의 유전자를 증폭시킨 다음, *Alw 26 I* 제한효소를 이용하여 절단시킨 후, agarose gel 전기영동을 실시하여 GSTP1AA, GSTP1AG와 GSTP1GG에 대한 유전자다형성의 분포를 분석한 결과, AA 아형을 가지고 있는 근로자는 86명(62.8%), AG와 GG 유전자 아형을 가지고 있는 근로자는 각각 47명(34.3%)과 4명(2.9%)으로 나타났다. 따라서 GG 유전자 아형을 제외한 AA와 AG 유전자 아형에 대하여 toluene의 대사상관성을 분석하여 [그림 3-10]과 [그림 3-11]에 나타내었다.



[그림 3-10] GSTP1 AA 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.458$, $p<0.01$)

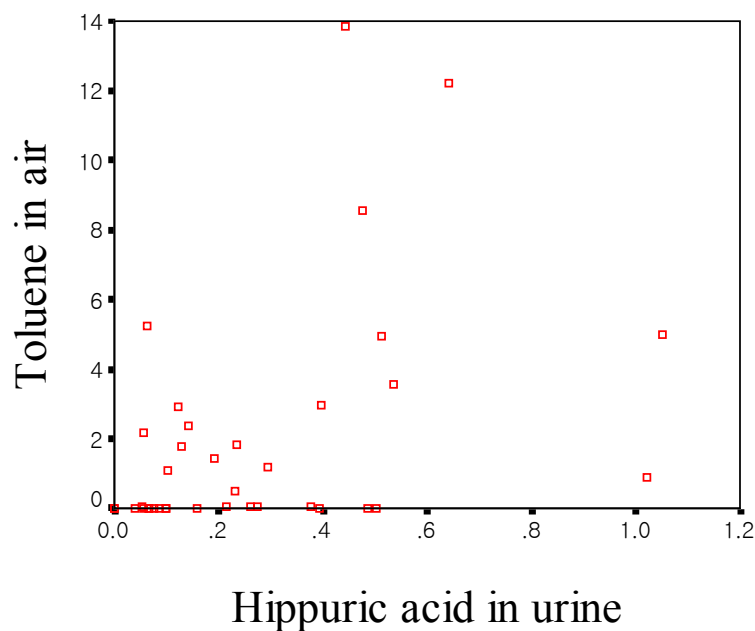
AA 유전자 아형에서 toluene과의 대사상관성은 0.458($p<0.01$)[그림 3-10], AG와의 상관성은 0.212($p=0.157$)로 나타났다[그림 3-11].



[그림 3-11] GSTP1 AG 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.212$, $p=0.157$)

다. NQO1 유전자다형성과 toluene의 대사상관성

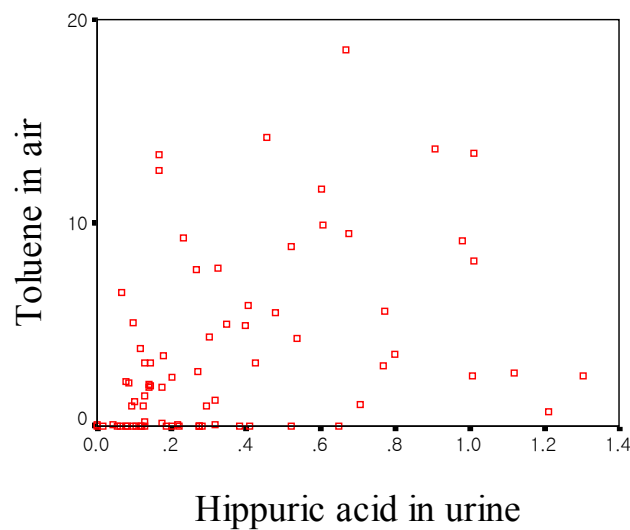
Toluene이 흡수되면 이물질 대사 효소의 작용에 의하여 일련의 대사과정을 거치면서 활성화된 중간체와 부가적으로 ROS가 생성되는데, NQO1은 ROS와 semi-quinon계를 대사시키는데 주로 관여한다. 따라서 이 효소의 유전자 아형이 toluene의 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 파악하기 위하여 유전자다형성 분석을 실시하였다. 노출군 근로자 중에 NQO1*1/NQO1*1 유전자 아형을 가지고 있는 사람은 27%(37명)로 toluene과의 대사상관성은 0.421($p<0.01$)이었다[그림 3-12].



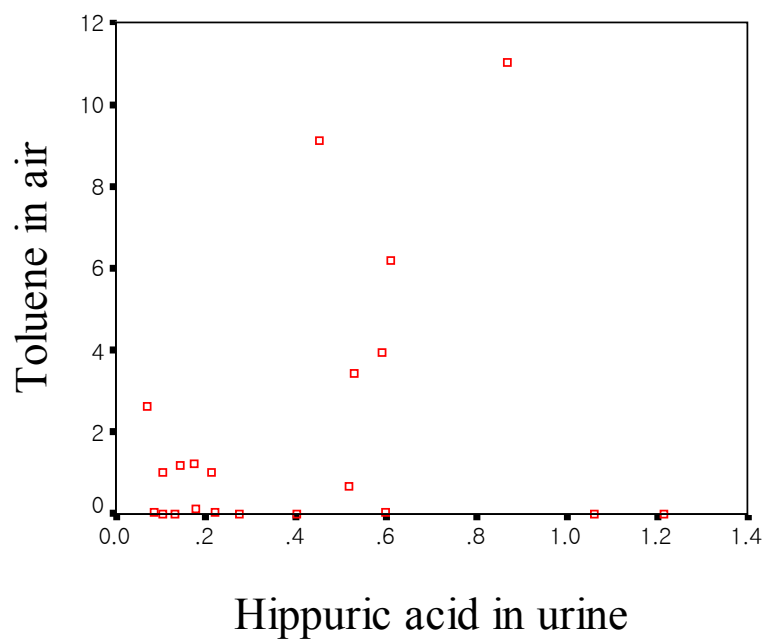
[그림 3-12] NQO1*1/NQO1*1 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.421$, $p<0.01$)

HA

NQO1*1/NQO1*2와 NQO1*2/NQO1*2 유전자 아형을 가지고 있는 사람은 각각 57.7%(79명)와 15.3%(21명)로 나타났으며, 이들 유전자 아형에 있어서 상관성을 보면, NQO1*1/NQO1*2 유전자 아형에서 0.386($p<0.01$)[그림 3-13], NQO1*2/NQO1*2 유전자 아형에서는 0.286($p=0.210$)의 상관성을 보였다[그림 3-14].



[그림 3-13] NQO1*1/NQO1*2 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.386$, $p<0.01$)



[그림 3-14]. NQO1*2/NQO1*2 아형과 toluene의 대사상관성($r=0.286$, $p=0.210$)

4. Hydroxyl radical, hydrogen peroxide 및 과산화지질 농도

노출군과 대조군 근로자들에 있어 hydroxyl radical(HR), hydrogen peroxide (HP) 및 과산화지질(LPO)의 농도를 측정하여 <표 3-4>에 나타내었다.

노출군과 대조군에 있어서 hydroxyl radical의 농도는 각각 $2.7(\pm 1.4)$ 과 $2.5(\pm 1.2)$ nmol/mg protein이었고, hydrogen peroxide는 각각 $4.2(\pm 0.8)$, $2.9(\pm 0.6)$ nmol/mg protein으로 측정되었다. 또한 과산화지질의 농도는 노출군에서 $2.3(\pm 0.8)$ nmol/ml serum이었고 대조군에서 $2.2(\pm 0.4)$ nmol/ml serum으로 측정되었다. 이들 모든 측정치가 노출군 근로자에서 다소 높은 경향을 보였으나, hydrogen peroxide의 측정치만 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$).

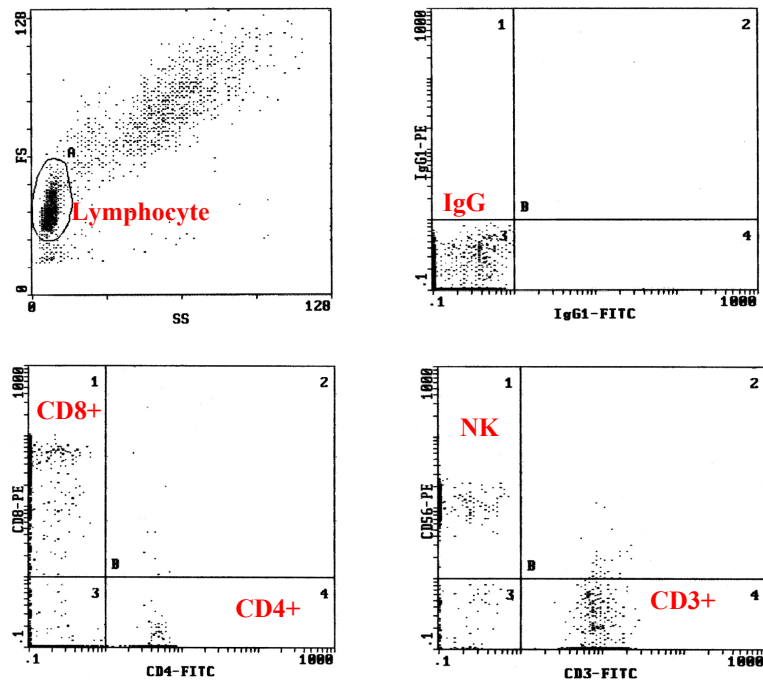
<표 3-4> 연구 대상자의 혈청 hydroxyl radical(HR), hydrogen peroxide(HP) 및 과산화지질(LPO)의 평균농도

	노출군(68명)	대조군(30명)
HR (nmol/mg protein)	2.7 ± 1.4	2.5 ± 1.2
HP (nmol/mg protein)*	4.2 ± 0.8	2.9 ± 0.6
LPO (nmol/ml serum)	2.3 ± 0.8	2.2 ± 0.4

* $p < 0.05$

5. 세포성 및 체액성 면역

노출군과 대조군에 있어서 세포성[그림 3-15] 및 체액성 면역 측정결과는 <표 3-5>에 나타내었다.



[그림 3-15] 혈액 lymphocyte subpopulations의 분석형태

세포성 면역 상태에서 CD4의 평균 측정치는 노출군에서 $1145.5(\pm 318.8)$ 개, 대조군에서 $1066.4(\pm 198.6)$ 개로 측정이 되었으며, CD8은 노출군에서 $795.7(\pm 237.0)$ 개, 대조군에서 $900.4(\pm 229.2)$ 개로 각각 측정되었는데, CD4는 노출군에서, CD8는 대조군에서 다소 증가된 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. CD4/CD8 비율은 노출군에서 1.44 ± 1.35 로 대조군의 1.18 ± 0.90 보다 높게 나타났으나 통계학적으로 유의하지는 않았다. CD3의 경우, 노출군에서 $1724.0(\pm 499.5)$ 개, 대조군에서는 $1836.4(\pm 314.8)$ 개로 측정되었으나 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. NK cell은 노출군에서 $120.6(\pm 160.1)$ 개, 대조군에서는 $650.0(\pm 247.3)$ 개로 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.01$).

체액성 면역 상태에서 IgA, IgG 및 IgM을 살펴보면, 노출군에 있어서 IgA는 $257.7(\pm 112.9)$ mg/dl, 대조군에서는 $228.9(\pm 79.4)$ mg/dl로 측정되었다. IgG와 IgM은 노출군에서 $1319.6(\pm 230.1)$ 과 $145.5(\pm 94.4)$ mg/dl, 대조군에서는 $1270.3(\pm 236.7)$ 과 $119.2(\pm 56.7)$ mg/dl로 각각 측정되었다. 전반적으로 대조군에 비해 노출군에서 다소 높은 경향을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. <표 3-6>은 각 변수들간의 단순상관관계를 나타낸 것인데, toluene과는 CD3, hydrogen peroxide는 CD8, CD3 및 NK cell과 통계학적으로 유의한 음의 상관관계를 보였다.

<표 3-5> Lymphocyte subpopulations과 혈청 immunoglobulin의 농도

	노출군(68명)	대조군(30명)
T lymphocytes (per mm ³ whole blood)		
CD4	1145.5±318.8	1066.4±198.6
CD8	795.7±237.0	900.4±229.2
CD4/CD8 ratio	1.44±1.35	1.18±0.90
CD3	1724.0±499.5	1836.4±314.8
NK cell**	120.6±160.1	650.0±247.3
Immunoglobulins (mg/dl):		
IgA	257.7±112.9	228.9±79.4
IgG	1319.6±230.1	1270.3±236.7
IgM	145.5±94.4	119.2±56.7

** p<0.01

<표 3-6> 노출군 대상자에 있어서 측정된 변수간의 상관관계

	Age	Smo	Dri	CD4	CD8	CD3	NK	HR	HP	LPO	Tol	HA
Age	1.00											
Smo	-0.16*	1.00										
Dri	-0.09	0.15	1.00									
CD4	-0.24*	0.03	0.09	1.00								
CD8	0.05	-0.08	-0.06	0.13	1.00							
CD3	-0.08	-0.15	-0.09	0.35**	0.08	1.00						
NK	0.16	-0.21*	-0.15	-0.22*	0.20	0.07	1.00					
HR	0.03	0.13	-0.13	0.04	0.15	0.03	0.02	1.00				
HP	-0.31**	0.14	-0.01	-0.01	-0.27**	-0.22*	-0.56**	-0.06	1.00			
LPO	0.03	-0.06	0.02	0.07	-0.14	0.03	0.06	0.26*	-0.02	1.00		
Tol	0.14	0.06	-0.15	-0.13	0.06	-0.29*	-0.01	-0.04	0.20	-0.10	1.00	
HA	0.08	-0.03	-0.11	-0.11	0.16	-0.19	-0.09	0.10	0.05	0.05	0.78**	1.00

Smo, smoking; Dri, drinking; HR, hydroxyl radical; HP, hydrogen peroxide;
LPO, lipid peroxide; Tol, toluene; HA, hippuric acid

* p<0.05

** p<0.01

제 4 장 고 찰

유해화학물질의 노출수준과 체내에 흡수된 양을 평가하는데 있어서 특이성이 큰 방법 중의 하나가 체액(소변 및 혈액 등)에서 노출된 물질과 그들의 대사산물을 측정하는 것이다(Gobba 등, 1997). 그러나 이러한 평가방법은 호르몬, 효소 등과 같은 내인성물질(endobiotics)의 상태, 생활습관, 질병의 유·무, 습관성 약물복용, 환경 및 유전적인 요인 등에 의한 제한점을 가지고 있다. 그러한 이유는 외부로부터 체내에 흡입되는 이물질을 인식할 수 있는 신호전달 체계, 이물질 대사효소의 활성 및 자가면역 시스템 등이 체계적이며 복합적으로 이루어져야만 체내의 항상성을 유지할 수 있기 때문이다. 특히, 유전적인 요인은 내인성물질 및 외인성물질(exobiotics)의 대사에 관여하는 효소의 유도 및 활성을 조절하므로 매우 중요하다. 즉, 외부로부터 흡수된 물질을 대사시키기 위해서는 먼저 흡수된 물질에 의하여 특정한 유전자가 유도되어 mRNA를 합성하고, 이 mRNA의 정보를 받아 단백질이 합성된 후, 대사에 관여하는 과정을 유전자가 조절한다.

이물질 대사에 관여하는 효소는 크게 phase I, phase II 및 ROS 제거효소 등으로 분류할 수 있다. Phase I 효소는 redox 작용을 통하여 내인성물질 및 외인성물질을 수용성물질로 대사 변형시키는 작용을 하고, phase II 효소는 phase I 효소들에 의해서 대사변형 된 중간체를 해독화시키는 작용을 한다. 또한 ROS 제거효소들은 활성화된 대사 중간체와 체내의 거대분자들이 반응하는 동안에 생성되거나 대사과정에서 부가적으로 생성되는 ROS를 제거시키는데 관여한다.

본 연구에서도 위에서 언급한 바와 같이 이들 세 부류의 효소에 대한 유전자다형성

을 분석하여 toluene의 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 보고자 연구를 수행하였다.

Toluene의 대사에 있어서 맨 처음단계에 관여하는 phase I 효소인 CYP2E1은 steroids 및 prostaglandine 등의 내인성 물질뿐만 아니라 화학물질, 환경오염물질 및 약물 등의 대사에 관여하는 효소로서 다양한 반응을 통하여 이들 물질을 수용성물질로 변형시키는 작용을 한다(Lu와 West, 1996). CYP는 특이성과 중복성을 가지는 성질이 있으며, 현재까지 밝혀진 CYP subfamily의 종류만도 수백 중에 이른다. 그렇기 때문에 이 효소의 발현은 종(species), 성별(sex), 노출물질에 따라서 많은 차이를 보인다(Nelson 등, 1996). Phase II 효소 군인 GST도 여러 종류의 subfamily를 가지고 있다. GSTM family는 폐, 결장, 위, 신장, 유방 및 간장에서(Kristensen 등, 1998), GSTT family는 적혈구와 림포사이트에서(Wiencke 등, 1995), GSTP는 태반, 비장, 심장 및 폐 조직에서 발현되는 것으로 알려져 있다(Kelley 등, 1994).

NQO1과 NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2(NQO2)는 cytosolic flavoprotein으로 quinone과 그 유도체의 해독대사에 관여하며, 산화성 스트레스(oxidative stress)와 redox cycling에 의하여 생성되는 ROS로부터 세포를 보호하는 항산화작용을 하며 주로 간장과 신장에서 높은 활성도를 보인다(Venugopal 등, 1997). Rosvold 등 (1995)은 chromosome 16q22.1에 NQO1 돌연변이 부위가 있음을 밝혔고, 돌연변이는 사람 NQO1 유전자의 *exon* 6 부위의 609번째의 C 염기가 T 염기로 바뀌면서 일어난다고 하였다. NQO1의 돌연변이는 인종에 따라 차이를 보이는데, Caucasian에서는 4%, African-American에서는 5%, Hispanic에서는 16%, Korean Asian에서는 19% 그리고 Chinese Asian에서는 22% 정도가 된다고 알려져 있다(Traver 등, 1996). NQO1뿐만 아니라 CYP, GST subfamily 의 경우에도 인종, 질병 및 암 발생에 있어서 민감성이 있다(Stephens 등, 1994; Maezawa 등, 1994; Xu 등, 1998; Naoe 등, 2000). 금번의 연구결과에서 나타난 우리나라 사람(노출군과 대조군 전부)에 있어서 CYP2E1*1과 CYP2E1*2의 allele frequency는 각각 0.15와 0.85로 Lee 등(1997)과

김 등(2000)이 보고한 연구결과와 비슷한 분포를 보였으며, GSTM1과 GSTT1 null 아형의 경우에도 각각 50.4%와 53.7%로 김 등(2000)과 이 등(2000)의 결과와 비슷한 분포를 보였다. Semi-quinone계 물질과 ROS를 제거시키는데 관여하는 NQO1의 돌연변이 유전자 아형의 분포는 약 16.5%로 Traver 등(1996)의 연구결과와 비슷한 분포를 나타냈으며, NQO1*1과 NQO1*2에 대한 allele frequency는 0.56과 0.44였다.

노출군과 대조군에 있어서 CYP2E1, GST subfamily 및 NQO1의 유전자다형성 분포를 상호 비교한 결과, CYP2E1 유전자다형성의 분포만 차이를 보였는데 이러한 결과는 시료 수의 크기에 의존하여 나타난 결과로 볼 수 있다. 따라서 노출군 근로자들에 있어서 CYP2E1, GST subfamily 및 NQO1 유전자 아형에 따라 toluene의 대사에 어떠한 영향을 미치는지를 보았다. CYP2E1의 경우, CYP2E1*2/CYP2E1*2 아형에서 toluene과의 대사상관성이 0.370($p<0.01$)인 반면, CYP2E1*1/CYP2E1*2 아형에서는 0.300 ($p=0.371$)의 상관성을 보였으나 통계학적으로 유의하지 않았다. 또한 GSTM1과 GSTT1의 경우, present 아형에서는 각각 0.404($p<0.01$)와 0.441($p<0.01$)의 대사상관성을 보였고, null 아형에서는 0.350($p<0.01$)과 0.330($p<0.01$)의 대사상관성을 보여 present 아형에서 다소 높은 상관성을 보였다. Toluene이 BAL로 대사 변형되는 과정에 CYP2E1이 중요한 역할을 하는데(Nakajima 등, 1997), Kawamoto 등(1995)에 의하면 aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2)와 CYP1A1 유전자 아형은 toluene의 대사에 영향을 미치는 반면, CYP2E1의 5'-flanking region에 있어서 유전자 아형에 따른 영향은 없다고 보고하였다. 그러나 금번 연구에서는 CYP2E1 *intron* 6 부위의 CYP2E1*2/CYP2E1*2 유전자 아형에서 다른 아형보다 높은 toluene의 대사상관성을 보여 CYP2E1 유전자다형성이 toluene의 대사에 영향을 미치며, 민감성이 있는 것으로 나타났다. 통계학적으로 유의한 차이는 없지만 GSTM1과 GSTT1의 present 아형이 null 아형보다 다소 높은 대사상관성을 보였으며, GSTP1의 경우에도 GSTP1 AG 및 GG 유전자 아형에서 보다 AA 아형에서 대사상관성이 높은 것으로

나타났다.

NQO1은 quinone계 물질과 ROS를 대사시키는 효소 중의 하나로서 NQO1 *exon* 6부위 609번째의 C 염기가 T 염기로 바뀐(cysteine이 threonine으로) 유전자 아형에서는 quinone계 물질과 ROS의 대사가 저하되어 성인의 급성 백혈병 유발에 대한 위험성이 크다(Smith 등, 2001). Moran 등(1999)은 MAH계 물질인 benzene의 독성은 benzene의 대사과정에서 생성되는 quinone계 물질과 ROS에 의해서 유발되며, NQO1 돌연변이 아형(NQO1*2/NQO1*2)을 가진 사람에서 위험이 더 크다고 보고하였다. Toluene의 경우에도 적은 양이지만 대사과정에서 semi-quinone계 물질과 ROS가 생성된다(Murata 등, 1999). 따라서 급변 연구에서는 NQO1 유전자 아형에 따라 toluene의 대사에 어떤 영향을 미치는지를 파악하고자 하였다. NQO1*1과 NQO1*2의 allele frequency는 0.56과 0.44로 나타났으며, NQO1*1/NQO1*1과 NQO1*1/NQO1*2 유전자 아형에서 toluene과의 대사상관성은 각각 0.421($p<0.01$)과 0.386($p<0.01$)이었으며, NQO1*2/NQO1*2에서는 0.286($p=0.210$)으로 통계학적인 유의성은 없었다. 따라서 NQO1 유전자다형성과 toluene의 대사상관성은 돌연변이 아형인 NQO1*2에서 보다 NQO1*1 유전자 아형에서 큰 것으로 나타났다.

이물질이 생체내에 흡입되면 자기방어 시스템 즉, 이물질을 제거 및 해독시키려는 면역반응이 일어나는데 이러한 반응에는 특정항원에 대해서만 반응하는 특이면역반응과 그렇지 않은 비 특이면역반응이 있다. 특이면역반응에는 세포성면역과 체액성면역을 들 수 있다. 따라서 본 연구에서는 toluene에 의한 세포성면역을 알아보기 위하여 CD4, CD8, CD3 및 NK cell을 측정하였고, 체액성면역을 알아보기 위해서는 IgA, IgG 및 IgM을 측정하였다. ROS는 활성과 반응성이 큰 물질로서 면역계의 작용을 억제시키는데, toluene의 대사과정에서도 CYP oxidase system에 의해서 ROS와 semi-quinone계 물질이 생성된다

(Bondy와 Naderi, 1994; Tabatabaie와 Floyd, 1996).

그러므로 본 연구에서는 먼저, 대조군과 노출군 근로자들에 있어서 혈청 중 HR, HP 및 과산화지질과 같은 ROS의 함량을 측정하여 toluene이 이들 물질의 생성에 어떠한 영향을 미치며, toluene과 이들 물질이 세포성 및 체액성 면역과는 어떠한 관계가 있는지를 보았다.

노출군 근로자들에 있어서 혈청 HR과 HP의 농도는 2.7 ± 1.4 과 4.2 ± 0.8 nmole/mg protein, LPO의 농도는 2.3 ± 0.8 nmol/ml serum으로 측정되었으며, 대조군 근로자에서는 HR, HP 및 LPO의 농도가 각각 2.5 ± 1.2 와 2.9 ± 0.6 nmole/mg protein, 2.2 ± 0.4 nmol/ml serum으로 측정되었으나, HP의 농도만 두 군간에 통계학적으로 유의한 증가를 보였다($p < 0.05$). ROS의 생성량은 유해화학물질의 노출에 의해서 증가되기도 하지만 나이, 흡연, 음주 및 방사선 노출 등에 의하여 생성량이 차이를 보일 수 있는데, 본 연구에서는 두 군간에 이러한 요인의 차이는 없었다. 따라서 노출군에 있어서 HP 함량의 증가는 CYP oxidase system에 의하여 toluene의 대사과정에서 생성되어 증가된 것으로 보인다. 세포성면역 세포 중에 CD4 세포는 class II MHC(major histocompatibility complex)와 항원을 인식하여 활성화되고, CD8 세포는 class I MHC에 결합하는 세포표면 항원에 대하여 인식되어 virus 감염세포를 파괴시키는 역할을 한다. 또한 NK cell은 혈류 중에 존재하며, 비 특이적으로 암세포와 바이러스 감염세포를 죽이며 면역반응의 조절과 항체생산에 관여하는 세포이다. 금번 연구에 있어서 CD4, CD8, CD3 및 NK cell 등을 측정한 결과, CD4를 제외한 다른 세포에서는 대조군에서 보다 노출군에서 감소된 경향을 보였으나, 단지 NK cell에서만 통계학적으로 유의한 차이를 보였다. 또한, 체액성면역 세포인 IgA, IgG 및 IgM은 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나 대조군에서 보다 노출군에서 다소 증가된 경향을 보였다.

면역기능을 평가하는 방법에는 먼저, 각각의 세포성 및 체액성면역을 측정하여 특이 및 비 특이적 면역을 평가할 수 있고, CD4/CD8의 비율을 가지고 자가면역성(비율의 증가)과 후천적 면역 결핍(비율의 감소) 등을 평가할 수 있다.

본 연구에서 대조군보다 노출군 근로자들에 있어서 CD8, CD3 및 NK cell의 측정치는 감소되고 CD4와 CD4/CD8의 비율, 그리고 체액성면역 측정치가 증가를 보인 것은 저 농도의 toluene 흡수가 특이면역기능은 항진시키는 반면, 비 특이적 면역기능은 억제시킨 결과라 생각된다.

면역기능에 영향을 줄 수 있는 요인은 연령, 성별, 유전적인 요인과 질병, 습관성 약물복용, 음주 및 흡연 그리고 환경적 요인 등이 있는데, 본 연구에서 대조군 및 노출군 근로자간에 환경적 요인을 제외한 기타의 요인은 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 따라서 toluene, 혈청의 HR, HP 및 과산화지질의 농도와 세포성 면역세포간의 상관성을 분석한 결과, HP는 CD8($r=-0.27$, $p<0.01$), CD3($r=-0.22$, $p<0.05$) 및 NK cell($r=-0.56$, $p<0.01$)과 toluene은 CD3($r=-0.29$, $p<0.05$)와 통계학적으로 유의한 음의 상관성을 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면, toluene 대사에 관여하는 효소들인 CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 및 NQO1 등의 유전자다형성이 toluene의 대사에 영향을 주며, 이물질 대사 효소들의 작용에 의하여 toluene의 대사과정에서 HP 및 HR 등과 같은 ROS 물질이 생성되는 것으로 나타났다. 체내에 흡입된 저 농도의 toluene은 항원으로 작용하여 특이면역 기능을 항진시키는 반면, toluene의 대사과정에서 생성되는 HR 및 HP와 같은 ROS는 비 특이면역 기능을 억제시키는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 김기웅, 문영한, 박상신. 방향족 유기용제의 상호작용 및 대사에 관한 연구. 산업보건연구원 연구자료 1996.
- 김기웅, 김양호, 박정선, 오세민, 양정선, 김태균, 손남석, 정효석, 문영한, 박상신. 유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(I). 산업보건연구원 연구보고총람 1997;6:575-589
- 김기웅, 강성규, 김태균, 정효석, 손남석, 이관형, 박상신. 유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(II). 산업보건연구원 연구자료 1998.
- 김기웅, 강성규, 양정선, 김태균, 손남석, 정효석. 유해인자별 생물학적 지표물질 개발에 관한 연구(III). 산업안전보건연구원 연구자료 1999.
- 김기웅, 강성규, 김태균, 손남석, 정효석. 유전자다형성 분석에 의한 건강장해 평가(I). 산업안전보건연구원 연구자료 2000.
- 이경호, 이정미, 최인미, 김재용, 임형준, 이상윤, 윤기정, 고상백, 최홍렬, 조수현, 강대희. 콜타르가 함유된 페인트 사용 조선업 근로자에서 요충 1-hydroxypyrene glucuronide와 대사효소 유전자 다형성에 관한 연구. 한국환경성독물연변이·발암원학회지 2000;20-1:34-39
- 이광묵. 유기용제 폭로평가를 위한 biological monitoring. 한국의 산업의학 1981;20:1
- Allan IM, Lunec J, Salmon M, Bacon PA. Reactive oxygen species selectively deplete normal T lymphocytes via a hydroxyl radical dependent mechanism. Scand J Immunol 1987;26:47-53

- Bondy SC, Naderi S. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem Pharmacol* 1994;48:155-159
- Choi J-H and Yu BP. Brain synaptosomal aging: Free radicals and membrane fluidity. *Free Rad Biol Med* 1995;18:133-139.
- Furman GM, Silverman DM, Schatz RA. Inhibition of rat lung mixed-function oxidase activity following repeated low-level toluene inhalation: possible role of toluene metabolites. *J Toxicol Environ Health* 1998;54:633-645
- Gaedigk A, Tyndale RF, Jurima-Romet M, Sellers EM, Grant DM and Leeder JS. NAD(P)H:quinone oxidoreductase: polymorphism and allele frequencies in Caucasian, Chinese and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics* 1998;8:305-313
- 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
- IPCS. Environmental Health Criteria 150, Toluene. World Health Organization: Geneva, 1985
- Kasprzak KS. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem Res Toxicol* 1991;4:604-615
- Kawamoto T, Koga M, Murata K, Matsuda S, Kodama Y. Effects of ALDH2, CYP1A1, and CYP2E1 genetic polymorphisms and smoking and drinking habits on toluene metabolism in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;133:295-304

- Kelley MK, Enqvist-Goldstein A, Montali J, Wheatley JB, Schmidt JR DE, Kaura LM. Variability of glutathione S-transferase isozyme patterns in matched normal and cancer breast human tissue. *Biochemical J* 1994; 304:843-848
- Kristensen VN, Andersen TI, Erikstein B, Feitvik G, Skovlund E, Nesland JM, Brorresen-Dale A-L. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics* 1998;8:441-447
- Lee KH, Kwak BY, Kim JH, Yoo SK, Yum SK, Jeong HS. Genetic polymorphism of cytochrome P-4502E1 and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in a Korean population. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21: 953-956
- Lu AYH and West SB. Multiplicity of mammalian microsomal cytochrome P-450. *Pharmacol Rew* 1980;31:277-295
- Maezawa Y, Yamauchi M, Toda G. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:561-565
- Mattia CJ, Adams JD Jr, Bondy SC. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 1993;46: 103-110
- Mattia CJ, LeBel CP, Bondy SC. Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation. *Biochem Pharmacol*

1991;42: 879–882

McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase; Enzymatic function erythrocyte (Hematoerythrocyte). J Bio Chem 1969;244:6049–6055

Moran JL, Siegel D, Ross D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:8150–8155

Murata M, Tsujikawa M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage by minor metabolites of toluene may lead to carcinogenesis and reproductive dysfunction. Biochem Biophys Res Commun 1991;261:478–483

Nakajima T, Wang RS, Elovaara E, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Raunio H, Pelkonen O, Vainio H, Aoyama T. Toluene metabolism by cDNA-expressed human hepatic cytochrome P450. Biochem Pharmacol 1997;53:271–277

Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, Utsunomiya A, Maruta A, Jin-nai I, Kamada N, Kubota Y, Nakamura H, Shimazaki C, Horiike S, Koder Y, Saito H, Ueda R, Wiemels J, Ohno R. Analysis genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2000;6:4091–4095

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
- Nelson SD. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. *Drug Meta Rew* 1995;27: 147-177
- NIOSH. NIOSH manual of analytical methods, 4th ed., Method 1051, U.S. Department of Health and Human Services, Cincinnati, 1996
- Oleinick NL, Chiu S, Ramakrishnan, N and Xue L. The formation, identification, and significance of DNA-protein cross-links in mammalian cells. *Br J Cancer* 1987;55:135-140
- Rosvold EA, McGlynn KA, Lustbader ED, Buetow KH. Identification of an NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics* 1995;5:199-206
- Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, Roddam P, Cartwright R, Morgan G. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 2001;1422-1426
- Stephens EA, Taylor JA, Kaplan N, Yang CH, Hsieh LL, Lucier GW, Bell DA. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 1994;4:185-192
- Tabatabaie T, Floyd RA. Inactivation of glutathione peroxidase by benzaldehyde. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141:389-393
- Traver RD, Rothman N, Smith MT, Yin SY, Hayes RB, Li GL. Incidence

- of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1). *Proc Am Assoc Cancer Res* 1996;37:1894
- 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
- Venugopal R, Joseph P, Jaiswal AK. Gene expression of DT-diaphorase in cancer cells. In: Forman HJ, Cadenase E, editors. *Oxidative stress and signal transduction*. New York: Chapman & Hall, pp. 441-475, 1997
- Viguier M, Tranney ES, Emam M and Debre P. Induction of mouse syngeneic MLR by in vivo renogeneic immunization with HLA-DR antigens. *Hum Immunol* 1990;28:354-364
- Wiencke JK, Pemble S, Ketterer B, Kelsey KT. Gene deletion of glutathione-S-transferase θ : correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4:234-259
- Wurzel H, Yeh CC, Gairola C and Chow CK. Oxidative damage and antioxidant status in the lungs and bronchoalveolar lavage fluid of rats exposed chronically to cigarette smoke. *J Biochem Toxicol* 1995;10: 11-17
- Xu X, Wiencke JK, Niu T, Wang M, Watanabe H, Kelsey KT, Christiani DC. Benzene exposure, glutathione S-transferase theta homozygous deletion, and sister chromatid exchanges. *Am J Ind Med* 1998;33:

157-163

Yagi K. Lipid peroxide and human diseases. Chem Physics Lipids 1987;45:
337-351

Zenz C. Occupational medicine 2nd ed., Chicago, Year Book Medical
Publishers, Inc., 1988

유전자다형성 분석에 의한 건강장해 평가 (II)

- 유전자다형성과 면역반응에 의한 건강장해 평가 -

(연구원 2002-3-3)

발 행 일 : 2001년 12월 31일

발 행 인 : 원 장 정 호근

연구책임자 : 책임연구원 김 기웅

발 행 처 : 한국산업안전공단

산업안전보건연구원

직업병연구센터

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100-926

F A X : (032) 518-0862
