

보건분야-연구자료
연구 원 2001-88-411

금속화합물에 의한 유전적 및 산화적 손상에 관한 연구

- 6가 크롬화합물에 의한 8-hydroxydeoxyguanine 및 lipid peroxidation 생성

한 국 산 업 안 전 공 단
산업안전보건연구원

제 출 문

한국산업안전공단 이사장 귀하

본 보고서를 2001년도 산업안전보건연구원 연구사업인
“금속화합물에 의한 유전적 및 산화적 손상에 관한 연구”의
연구결과 최종보고서로 제출합니다.

2001년 12월 31일

연구주관부서 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터

연구 책임자 : 선임연구원 맹 승 희

공동 연구자 : 유 일재, 김 현영, 이 권섭, 임 철홍, 이 종윤

요 약 문

1. 과 제 명 : 금속화합물에 의한 유전적 및 산화적 손상에 관한 연구

2. 연구기간 : 2001년 1월 1일 - 2001년 12월 31일

3. 연 구 자 : 총괄연구책임자 : 맹 승희 (선임연구원)

공 동 연 구 자 : 유 일재 (수석연구원)

: 김 현영 (책임연구원)

: 임 철홍 (선임연구원)

: 이 권섭 (기술직 3급)

: 이 종윤 (연구보조원)

4. 연구목적

본 연구는 스테인레스 용접공정, 도금산업과 주물산업, 금속제조업, 단열재 제조업, 색소제조 및 취급업, 목재보존제 제조 및 취급업 등의 크롬 사용 작업장에서 공기중 다량 방출되며, 사람에게 있어서 암발생과 관련이 있는 것으로 보고됨에 따라 EPA와 IARC에서 흡입되었을 경우 human carcinogen으로 정해 놓고 있는 6가 크롬에 대한 생물학적, 유전

독성학적 지표로서 활용할 지표를 모색하기 위한 목적의 일환으로, 6가 크롬에 의해 유도될 수 있는 genomic DNA의 구조적 손상의 하나인 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG)의 수준과 세포수준에서의 산화적 손상으로 발암잠재성을 나타내는 지질과산화의 반응산물인 malondialdehyde (MDA)의 농도를 관찰하고자 하였다. 이를 위해 근로자들의 주된 폭로경로인 흡입의 방법으로 실험동물에게 크롬산 화합물을 폭로시켜 폐조직 내에 생성되는 8-OHdG를 측정분석하고 또한 혈장 내 생성된 MDA의 농도를 측정분석함으로써 6가 크롬 폭로에 의한 유전적 및 산화적 손상 정도를 평가하고자 하였다.

5. 연구내용

실험동물 흰쥐와 흡입폭로장치를 이용하여 일정 폭로농도로 제조한 크롬산 나트륨 ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)의 수용액을 미스트의 상태로 1일 6시간, 주 5일로 1주간, 2주간 및 3주간씩 반복흡입폭로시킨 흰쥐의 폐조직과 혈액에서 산화적 손상을 관찰하기 위해 폐조직에서의 8-OHdG 및 그 회복효소활성 (8-OHdG repair activity)과 혈액 내에서 MDA의 농도를 측정함으로써 6가 크롬 폭로에 의한 유전적 및 산화적 손상을 측정하였다. 또한 흡입챔버 내의 공기중 농도, 실험동물에서의 혈중 및 요중 크롬농도를 함께 측정함으로써 폭로지표들과의 관계도 관찰하였다.

6. 활용계획

금속화합물로서 발암성의 위험이 있는 6가 크롬화합물에 의한 유전독성지표인 8-OHdG와 잠재유전독성을 나타내는 산화적 손상에 관한 지표인 지질과산화의 반응물인 MDA의 유용성을 실험동물 특히 근로자의 주된 폭로경로와 같이 흡입폭로한 실험동물에서 검토하여, 유용성이 있다고 검토된 측정지표를 적용한 크롬폭로근로자에 대한 현장연구에 적용할 수 있게 함으로써 6가 크롬에 의한 유전독성을 근로자 폭로 초기에 제시함으로써 6가 크롬에 의한 암발생을 효과적으로 예방하는데 사용가능할 것으로 생각되었음.

7. 연구개요

본 연구결과 6가 크롬 화합물의 하나인 크롬산 나트륨의 수용액 미스트를 흰쥐에게 흡입폭로시켰을 때 폐조직에 생성된 8-OHdG의 농도는 저농도 (0.18 mg/m^3)로 단기간 (1주일) 폭로시킨 실험군에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 상승하였으나, 고농도군 (0.9 mg/m^3)과 2주 이상 폭로군에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

8-OHdG의 회복 활성도 (repair activity)를 측정한 결과, 1주간 및 2주간 폭로군에서는 농도가 높아짐에 따라 회복활성도가 감소하는 경향을 나타내었으나 3주간 폭로군에서는 저농도 및 고농도군 모두에서 정상수준으로 회복되었음이 관찰되었다.

따라서 6가 크롬 화합물의 폭로농도와 8-OHdG 생성 수준과의 양

반응 관계가 관찰되지 않아 8-OHdG의 생성은 크롬폭로된 사람집단에 쓰일 수 있는 지표로서 제한성이 있음을 확인하였다.

한편 6가 크롬 화합물에 흡입폭로된 흰쥐 혈액 내에 생성된 지질 과산화물인 MDA의 농도를 측정한 결과, 1, 2 및 3주 폭로군 모두에서 MDA 농도는 대조군에 비하여 모두 상승되었고, 폭로농도와의 양 반응 관계와 함께 흰쥐 요중 크롬농도와 상관성을 나타내어 이 지표는 실험적으로 볼 때 크롬폭로 사람집단에 적용할 유용성이 있다고 판단되었다.

8. 중 심 어

6가크롬, 8-hydroxydeoxyguanine, Malondialdehyde, inhalation

목 차

제 1 장 서 론	1
1. 연구배경 및 목적	1
제 2 장 재료 및 방법	5
1. 화학물질	5
2. 실험동물 및 사육환경	5
3. 크롬화합물의 폭로방법	6
4. 챔버 내 크롬농도의 측정	7
5. 크롬 폭로 흰쥐의 전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도 측정	7
6. 크롬 폭로 흰쥐의 요중 크롬농도 측정	8
7. 폐조직에서의 8-OH-dG 측정	9
8. 폐조직 추출액에서의 8-OH-Gua 수복효소활성도 측정	10
9. 혈액에서의 지질과산화의 측정	13
10. 통계적 분석	14
제 3 장 연구결과	15
1. 흡입 챔버내의 공기중 크롬농도	15
2. 크롬 흡입폭로된 흰쥐에서의 전혈, 적혈구중 크롬농도 및 요중 크롬 농도	16
3. 흰쥐 폐 조직에서의 8-OHdG의 생성	18
4. 흰쥐 폐 조직에서의 8-OHdG 회복 효소 활성 (repair activity) ·	20
5. 흰쥐 혈액에서의 Malondialdehyde (MDA)의 측정	23
6. 흰쥐에서 각 노출변수와 8-OHdG level, MDA농도와의 상관성 ·	24

제 4 장	고 찰		27
제 5 장	결 론		33
제 6 장	참고문헌		35

제 1 장 서 론

1. 연구배경 및 목적

금속화합물 중에는 생체 내에서 대사 도중 superoxide에 의해 유도되는 Fenton-type의 반응을 거쳐 hydroxy radical을 생성하는데 (Kawanishi et al., 1986) 금속산화물에 의한 독성에 있어 이러한 hydroxy radical과 같은 활성산소에 의한 산화적 손상이 관여하는 것으로 보고되고 있다(Itoh et al., 1995; Kortenkamp et al., 1996).

활성산소에 의한 유전적 및 산화적 손상의 대표적인 것으로 DNA의 8-hydroxyguanine (8-OHGua/8-OHdG)의 생성과 세포 내에 생성된 지질과산화 (lipid peroxidation)를 지표로 하여 많이 연구 보고되어 왔다 (Herman et al., 1999; Kasai & Nishimura, 1984). 8-OHGua는 시험관 내에서는 물론 방사선 및 활성산소를 유발하는 화합물에 의해 인체에서 생성되는 것이 보고되어 있으며 이것의 작용은 DNA polymerase반응에서 GC-TA transversion을 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Kasai et al., 1986; Shibutani et al., 1991). GC-TA transversion은 ras gene의 condon 12 즉 glycine을 code하는 GTT로 변화되고 이로 인하여 세포가 malignant transformation되는 것이 보고되어 있다 (Kamiya et al., 1992). 또한 DNA의 8-OHGua를 제거하는 효소가 사람 및 대장균에서 발견됨으로써 이러한 8-OHGua는 비생리적인 염기라는 사실이 입증되기도 하였다.

이러한 면에서 어떤 물질이 DNA에 8-OHdG를 생성시킨다면 이 물질이 발암원으로 작용할 가능성이 높다고 할 수 있다. 즉 8-OHdG 생성여부를 화합물의 발암성 평가 지표로 사용할 수 있게 되므로 최근 들어 8-OHdG는 DNA의 산화적 손상 및 발암성평가 지표로 활용할 수 있는 가능성이 제시되고 있다.

지질 과산화는 그 반응 산물인 malondialdehyde (MDA)의 농도로써 평가되어 있는데 세포수준에서의 산화적 손상을 반영하며 크롬에 대해서는 주로 실험동물의 간세포에서 연구가 소수 이루어져 있고 (Bagchi et al., 1997; Susa et al., 1997), 사람집단을 대상으로 한 연구로는 최근 망간 폭로 근로자의 혈장에 있어서 MDA의 농도가 대조군에 비해 유의하게 높았음을 보고하였다 (Yiin et al., 1996). MDA는 지방산의 산화 중 생성되는 과산화물의 분해산물 중의 하나로 발암성이 있는 glycylaldehyde 및 β -propiolactone등과 구조가 비슷하며, 주로 아미노기와 높은 반응성에 의해 DNA와 반응하여 유전적 손상을 가져와 발암성과 돌연변이 유발성을 나타내는 것으로 보고되어 있다 (Shamberger, et al., 1974). 이러한 지질과산화는 8-OHdG와 보상적으로 유해 화학물질에 대한 산화적 손상의 지표로 볼 수 있다.

크롬은 지각에서도 풍부한 금속원소의 하나로 특히 3가 크롬은 사람에 있어서 일일 섭취량 50-60 μg 정도를 필요로 하는 당과 지방대사에 필요한 필수 영양소 중의 하나이기도 하다 (Anderson, 1997). 그러나 오염된 환경이나 스테인레스 용접공정, 도금산업과 주물산업, 금속제조업, 단열재 제조업, 색소제조 및 취급업, 목재 보존제 제조 및 취급업 등의 크롬 사용 작업장에서 공기 중 다량 방출되는 6가 크롬은 흡입, 피부접촉 및 섭취의 경로를 통해 인체에 흡수되어 피부궤양, 알레르기성 피부염, 비중격 천공, 폐암 등 사람들에게 나타날 수 있는 잠재적 건강유해성이 보고되기도 하였다 (WHO, 1988).

크롬폭로에 의한 생물학적 영향을 결정하는 주요 요인은 생물유용성

(bioavailability), 화학물질의 종류 (chemical speciation), 수용성, 세포 내 환원, DNA와 크롬의 상호작용으로 이들 요인에 따라 세포독성 및 유전독성 효과가 좌우된다. 3가 크롬의 경우는 체내에 들어 온 후 세포막 투과가 쉽지 않으나 6가 크롬은 양이온 막 전달체 (anionic membrane transporter)를 통해 세포 내에 침투되어 3가 크롬으로 환원되는데, 세포 내로 일단 들어온 6가 크롬 자체는 DNA, RNA, 단백질, 지질과 같은 거대분자 (macromolecule)와 반응하지 않으나 환원되어 생긴 3가 크롬이나 환원중간산물인 4가 크롬과 5가 크롬은 거대분자와 공유 결합하여 반응하게 되는 것으로 보고되어 있다 (Singh et al., 1998). 즉 6가 크롬은 대사적으로 환원이 일어나면서 일시적으로 산화상태인 5가 크롬과 4가 크롬을 발생시키고 동시에 활성 산소종 (ROS, reactive oxygen species)의 형태로 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 발생시킨다. 이러한 활성 산소종 (ROS), 중간 산화상태의 5가 크롬 및 4가 크롬 그리고 궁극적 환원 형태인 3가 크롬과 같은 환원물은 DNA와 상호작용을 할 수 있어 다양한 범위의 유전독성효과를 초래한다. 즉 6가 크롬의 세포 내 대사적 환원이 어떤 유전적 상호작용을 일으키기 위한 전제조건이 된다 (Kortenkamp, et al., 1991; Snow, 1992).

지금까지의 보고에 의하면 크롬에 의해 유도될 수 있는 genomic DNA의 구조적 손상은 산화적 DNA 손상의 한 형태인 8-oxodeoxyguanosine, DNA-DNA 가교형성 (DDC), Cr-DNA adduct, single-strand break, DNA-단백질 가교형성 (DPC) 및 염색체이상 등을 들 수 있으며 이러한 DNA 병변은 다양한 기능적 손상을 초래하는데 DNA polymerase의 포획과 DNA 복제저해, RNA polymerase 포획과 전사 (transcription)의 저해, DNA topoisomerase의 저해 및 돌연변이 (mutagenesis) 등이 보고되어 있다 (Bridgewater et al., 1994; Manning, 1992; Tsou et al., 1996; Xu et al., 1996).

본 연구에서는 금속 산화물 중 크롬산화물에 의한 암 발생 초기 단계를 지적할 수 있는 세포수준에서의 생물학적 효과 혹은 반응지표 (biologically effective or response marker)를 유용성 있게 적용할 수 있는 방법이 필요함을 인지하고, 사람이 크롬에 가장 빈번하게 노출될 수 있는 경로인 흡입의 방법으로 실험동물에 6가 크롬 화합물을 폭로시켜 폐조직에서 8-OHdG와 혈액 내의 지질 과산화의 반응산물인 MDA의 양을 측정함으로써 6가 크롬화합물에 의한 유전적 및 산화적 손상을 평가하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 화학물질

연구대상물질인 크롬화합물은 수용성의 6가 크롬을 포함하고 있는 크롬산 나트륨 ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)으로 순도 98.0%이상의 일본 Junsei (주)에서 구입한 시약용 1급 (Lot No. A013438501)을 사용하였다.

폐조직내에서 DNA를 추출하기 위해 사용한 DNA extractor WB Kit는 Wako Biochemicals (Osaka)에서 구매하여 사용하였다.

Proteinase K 및 2M sodium acetate는 Applied Biosystem (Foster City, CA)에서 구매하여 사용하였으며, Nuclease P1와 alkaline phosphatase는 Sigma (St. Louis, MO)에서 그리고 protein assay kit는 Bio-Rad (Richmond, CA)에서 구매하여 사용하였다. 이외의 시약들 또한 높은 순도의 상품을 구매하여 사용하였다.

MDA 측정에 사용한 trichloroacetic acid 및 thiobarbituric acid는 Sigma제를 사용하였으며, 염산은 Merk제를 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 10주령의 특정 병원체 부재동물 (specific pathogen free, SPF)인 Sprague-Dawley계의 흰쥐를 대한동물실험센터에서 분양 받아 barrier system의 청정동물실에서 1주간 순화시킨 후 건강하고 발육 양호한 동물을 사

용하였다.

순화시킨 동물들은 체중을 지표로 하여 체중편차가 최소화 되도록 해서 대조군, 저농도 폭로군 및 고농도 폭로군으로 구분하여 각 군당 20마리씩 하여 3대의 흡입챔버 (inhalation chamber)내에 5연식 금망 케이지를 사용하여 군별, 동물별로 각각 개별 수용하였다. 이들은 다시 각각 1주간 폭로군, 2주간 폭로군, 3주간 폭로군으로 구분하였다. 폭로물질의 농도는 정화된 청정공기를 이용하여 희석 조절하였으며, 사육환경의 온도는 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 35-60%, 환기횟수는 11-12/시간, 압력은 $-9 \sim -11 \text{ mmAq}$ (음압), 조명은 150 - 300 Lux로 12시간으로 하였으며, 사용한 사료는 실험용 멸균사료 (제일제당 주식회사)를, 음수는 멸균 정제수를 자동급수로 하여 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. 크롬화합물의 폭로방법

내부용적 1 m^3 의 흡입챔버 (Model No. SIS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)와 미스트 발생장치 등을 이용하여 전신 폭로시켰다.

군별 폭로농도는 예비실험을 통해 설정하였는데 저농도는 0.18 mg/m^3 , 고농도는 0.9 mg/m^3 를 목표농도로 하였다.

흡입 폭로방법은 미스트 발생장치 (Model No. VG-4R, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용하여 크롬산 나트륨을 증류수에 용해시켜 분사시킨 후 청정공기와 일정농도로 혼합하여 흡입챔버내로 공급함으로써 실험동물에 전신폭로시켰다. 폭로시간은 1일 6시간, 주 5일로 하되 각 농도당 5-6마리씩 하여 1주간, 2주간 및 3주간 후에 희생시키는 것으로 하였다.

폭로중의 챔버내 환경조건들은 챔버내에 부착된 센서와 환경제어장치 (Model No. ICS-20RG, SIBATA Co., LTD, Japan)를 이용하여 30분에 1회씩

측정토록 하였으며 측정치는 자동기록 되도록 하였다.

4. 챔버 내 크롬농도의 측정

흡입챔버내 기중 크롬의 농도를 측정하기 위해서는 PVC 여과지 (pore size 5.0 μm , 37 mm)를 개인 시료 채취기 (Personal air sampler, Gillian, USA)에 이용하여 흰쥐의 호흡기 위치에서 평균 유속 1.5 ℓ/min 으로 4시간 동안 공기 중 시료를 채취하였다.

크롬 농도의 분석은 Wang 등 (1999)의 분석방법인 'ultrasonication and strong anion-exchange solid phase extraction method'에 의해 실시하였다. 즉 채취한 시료를 15 ml 플라스틱 원심 분리관에 옮겨서 10 ml 0.05 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/0.05\text{M NH}_4\text{OH}$ (pH 8) 완충용액 10 ml을 첨가한 후 실온에서 30분 동안 초음파 분산기에서 분해시켰다. 초음파 분해 후 상등액의 3 ml을 strong anion - exchange 카트리지에 넣었다. 이것을 3 ml의 증류수로 세척한 후 6가 크롬은 유속 2 ml/ml에서 0.5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/0.1\text{M NH}_4\text{OH}$ (pH 8) 완충용액 3 ml씩 3회 첨가한 9 ml에서 용리시켰다. 분리시킨 용출액을 37% HCl용액 100 μl 를 첨가하여 산성화시켰다. 여기에 20 mM diphenylcarbazide 2 ml를 첨가한 후 형성된 6가 크롬 복합체를 540 nm에서 UV-Spectrophotometer (Ceil 3000, England)로 측정하였다.

5. 크롬 폭로 흰쥐의 전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도 측정

전혈 3 ml을 헤파린 처리된 vacutainer에 채혈하여 전혈 중 크롬농도측정에 사용하였고, 적혈구내 농도를 측정하기 위해서는 전혈 5 ml을 15 ml

vacutainer에 채혈하여 같은 양의 normal saline용액과 혼합하여 완전히 세척한 다음 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 제거하였다. 동일한 과정을 5회 반복한 후 2.5 ml의 초순수를 첨가한 후 적혈구중 크롬 측정 시료로 사용하였다. 적혈구 중 크롬농도의 측정은 1.25% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와 1% Triton X-100으로 조제한 희석액 600 μl 와 1% HNO_3 200 μl 를 취하여 여기에 적혈구 시료 200 μl 를 혼합한 후 크롬바탕보정장치와 자동시료 주입장치가 부착된 흑연로 원자 흡수 분광광도계 (GF-AAS, SIMAA 6000, German)로 측정하였다. 전혈 시료의 전처리를 위해 1.25% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 와 1% Triton X-100용액을 사용하였다.

GF-AAS는 건조 3단계 [1단계: 50-80 °C (40초), 2단계: 80-120 °C (10초), 3단계: 120-400°C (30초)], 회화 3단계 [1단계: 400-600°C (40초), 2단계: 600°C (10초), 3단계: 700°C (5초)], 원자화 단계 2,900°C (5초)로 온도프로그램을 설정하였으며 분석파장은 357.9 nm로 분석하였다.

표준용액조제는 1000 ppm (Sigma)의 크롬원액을 1% HNO_3 로 희석하여 0.5, 1.0, 1.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 로 조제하여 만들었다.

6. 크롬 폭로 흰쥐의 요중 크롬농도 측정

요중 크롬은 흡입폭로 종료 후 약 15 ml을 채취하여 농질산 2 ml을 주입한 후 microwave oven에서 유기물질을 완전히 분해시켰다. 산처리된 시료 0.2ml를 10% 질산 200 μl 와 600 μl 의 1% Triton X-100에 잘 혼합한 후 혈중 크롬 분석방법과 동일한 기기와 온도 프로그램조건, 파장으로 분석하였다.

표준용액의 조제는 크롬액 1000 ppm 원액을 1%의 HNO_3 로 희석하여 4, 8, 16, 24 $\mu\text{g}/\ell$ 표준용액을 만들었다. 요중 크롬의 농도는 요비중 그리고 요중 크

레아틴으로 보정하여 $\mu\text{g}/\ell$, $\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine으로 표시하였다.

요비중은 요비중계 (UCT-1, Japan)를 이용하여 측정하였고 요중 크레아틴은 요시료를 원심분리 시킨 후 상등액을 생화학분석기 (Olympus AU 400, Japan)를 이용하여 Jaffe method로 분석하였다. 요중 크롬농도의 검출한계는 $0.10 \mu\text{g}/\ell$ 이었다.

7. 폐조직에서의 8-OH-dG 측정

1주, 2주, 3주의 정해진 기간동안 0, 0.18, 0.9 mg/m^3 을 목표농도로 하여 폭로가 끝난 흰쥐들을 가벼운 에테르 마취하여 흉강과 복강을 절개하고 복대 동맥에서 혈액을 탈혈시킨 후 재빠르게 폐조직을 적출, 차가운 생리식염수로 폐조직에 남아 있는 혈액을 제거한 후 DNA 추출을 위한 조작을 할 때까지 -80°C 의 냉동고에 보관하였다.

폐조직의 8-OH-dG를 측정하기 위해서는 Asami들 (1998)의 방법에 준하여 실시하였다. 우선 DNA를 추출하기 위해서는 폐조직의 가장 신선한 부위의 조직 약 200 mg에 lysis buffer를 넣어 Potter-type의 호모지네이저로 균질화시켰다 균질화된 nuclear DNA는 DNA extractor WB Kit (Wako, Japan)를 사용하여 추출하였다.

위의 방법으로 추출한 DNA를 nuclease P1과 10 mM sodium acetate용액으로 만든 acid phosphatase로 소화시켜 37°C 에서 30분간 incubation시킨 후 전기화학검출 (ECD, electro chemical detection)에 간섭을 일으킬수 있는 iodide ion을 제거하기 위해 이온교환수지인 Muromac (Muromachi Kagaku, Tokyo, Japan)을 처리하였다. 다시 15,000 rpm으로 5분간 원심분리시킨후 상

등액을 Ultrafree-Probind Filter (Millipore, USA)로 옮겨 1분간 10,000 rpm에서 원심분리하여 전기화학검출기(Coulochem II, Model 5011, ESA Inc., USA ; guard cell, model 5020 (0.35V); analytical cell, model 5011 (electrode 1, 0.15V; electrode 2, 0.3V))와 UV검출기가 부착된 고속액체크로마토그래피(HPLC-ECD system)로 분석하였다. 표준샘플로는 20 μ l의 deoxyguanosine (0.5 mg/ml)과 8-hydroxydeoxyguanosine (5 ng/ml)의 용액을 주사하였다. 이때 사용한 HPLC 컬럼은 Beckman Ultrasphere-ODS (4.6×250mm)였으며, elution을 위해서는 8% methanol을 포함한 10 mM의 NaH₂PO₄를 사용하였다. 8-OH-dG는 10⁵의 guanine residues당 8-OH-dG의 수로 계산하였다.

8. 폐조직 추출액에서의 8-OH-Gua 수복효소활성도 측정

8-OH-Gua 수복효소활성도 측정하기 위해서는 Hirano들 (2000)의 방법에 준한 Base excision repair activity assay를 다음과 같이 실시하였다.

가) 폐조직 추출액의 준비 및 단백질의 정량

폐조직의 적당량 (약 100 mg)에 buffer A (50 mM Tris HCl, pH 7.4; 50 mM KCl; 3mM EDTA; 5 mM magnesium acetate, 3 mM β -mercaptoethanol)를 넣어 얼음속에서 균질화시킨 후 원심분리하였다 (15,000 rpm, 40분). 폐조직 추출액인 상등액은 -80℃에 보존하였다. 추출액에 대한 단백질의 정량을 bovine serum albumin (BSA)을 표준용액으로 하고 protein assay kit (Bio-Rad)를 이용하여 분광분석기 (spectrophotometer, Simazu, Japan)로 595 nm의 파장에서 측정함으로 실시하였다. 단백질 정량이 끝난 샘플

플들은 각 샘플당 총단백질농도는 5 mg/ml로 조정하여 두었다.

나) 8-OH-Gua 수복효소활성의 측정 및 정량

8-OH-Gua 수복 효소 활성도를 측정하기 위하여 8-OH-dG residue를 그 배열에 포함하고 이를 형광 표식한 22-mer double strand의 합성 oligodeoxynucleotide (5'-GGTGGCCTGACG*CATTCCCCAA-3' ; G*, 8-OH-Gua)를 Dr. Kasai (일본 산업의과대학)에게 제공받아 사용하였으며 그 방법은 Figure 1과 같았다.

위에서의 폐추출액 (총 단백질량 50 μ g)을 0.05 pmol의 double stranded DNA substrate와 형광표지된 합성 oligodeoxynucleotide를 첨가하여 25℃에서 1시간 incubation시킨다. 이 혼합물에 0.3M의 sodium acetate용액과 에탄올을 넣어 -80℃에 60분이상 방치한 후 원심분리하였다 (13,000 rpm, 20분). 80%의 에탄올로 세척한 후 Speed vac (Tomy low Temp. Trap unit, Japan)에서 건조시켰다. 건조시킨 샘플에 Auto Load Sequencing Kit의 정지액과 증류수 등을 첨가하여 잘 현탁시킨 후 90℃에서 2분간 incubation시킨 후 얼음에 식혀서 20%의 denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. Base excision repair activity에 대한 결과로 생산되는 excised fragment는 Pharmacia ALF DNA sequencer (Fragment Manager, Ver. 1.1; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 분석하였다.

효소활성도의 계산은 전체 22 mer oligodeoxynucleotide의 활성도에 대한 11 mer의 활성도 퍼센트로 계산하였다.

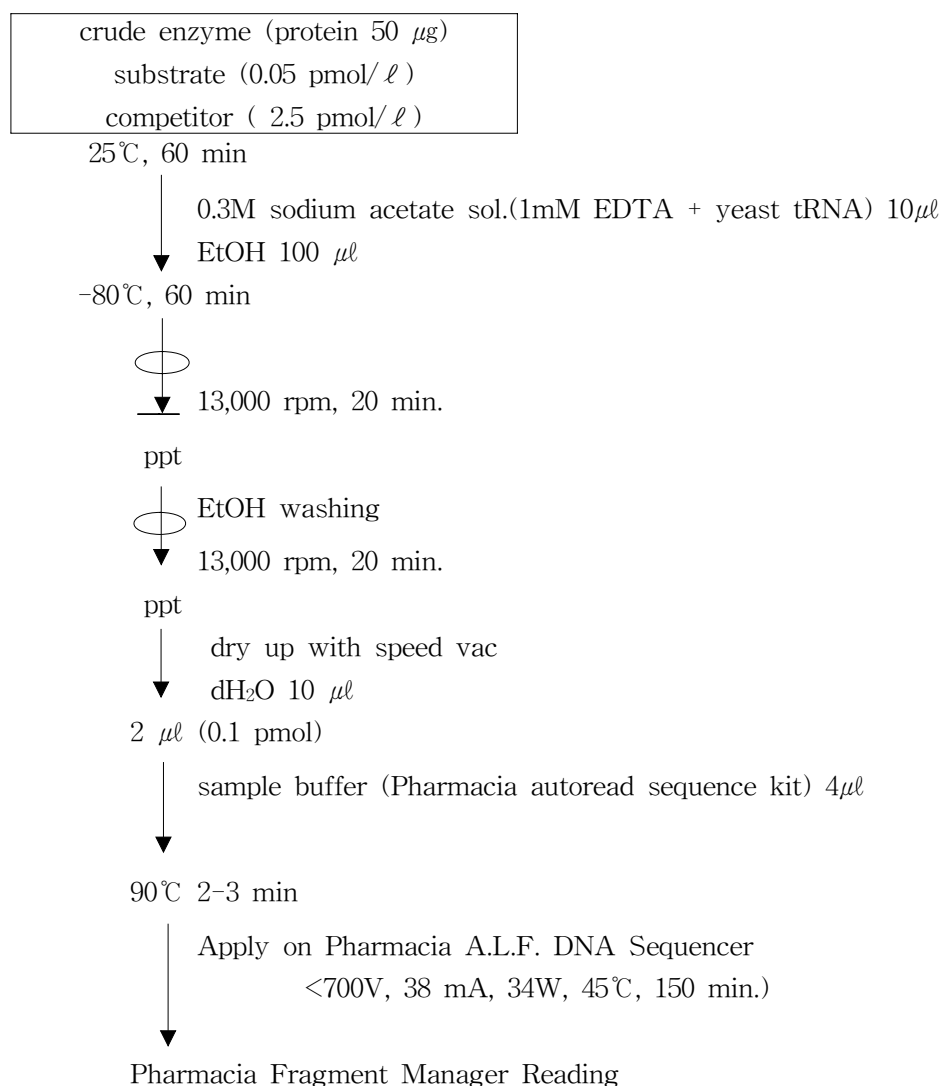


Figure 1. Flowchart of 8-OHdG repair activity assay

ppt, precipitate
 assay buffer, 50 mM Tris.Cl (pH 7.4)
 50 mM KCl
 5 mM EDTA

9. 혈액에서의 지질과산화의 측정

크롬에 의해 반복 흡입 폭로시킨 흰쥐의 혈액내 형성된 지질과산화 (lipid peroxidation)의 수준은 혈액 내 plasma lipoperoxide를 인산으로 가수분해시켜 그 산물인 malondialdehyde (MDA)를 분석하여 측정하는데 시험관내에서 thiobarbitic acid와 adduct를 형성시켜 측정하는 것으로 Nielsen 등(1997)의 방법에 준하여 실시하였다.

즉, 헤파린 처리된 vacutainer에 크롬 흡입폭로된 흰쥐의 복대동맥에서 채취한 혈액을 2,500g에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다.

분리한 혈장과 TCA-TBA-HCl 조제시약 (15% w/v trichloroacetic acid; 0.375% w/v thiobarbituric acid; 0.25 N HCl)을 1:2로 혼합하여 끓는 물 속에서 열을 가해 반응시킨다. 반응이 끝나면 이를 식힌 후 1,000g에서 10분간 원심분리한 후 535nm의 파장에서 형광 분광분석계(UV-spectrophotometer, Beckman U650)을 이용하여 MDA 농도를 측정하였다. 이 때 반응물의 농도는 분자흡수계수 (molar absorption coefficient)를 $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 하여 다음의 계산식으로 산출하였다.

$$\text{Molar concentration, } C_m \text{ (S)} = \frac{E(s) - E(RB)}{\epsilon d} \frac{Fv}{Sv}$$

(mol/L)

E(s) : sample extinction

E(RB) : reagent blank extinction

ϵ : molar extinction coefficient, $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Fv : final volume

Sv : sample volume

10. 통계적 분석

본 연구에서 대조군과 폭로군 간 변수들의 차이 및 변수간의 상관관계를 통계학적으로 검정하기 위해서는 SPSS 10.0 프로그램을 이용, ANOVA 및 Pearson의 상관분석 등을 실시하였다.

제 3 장 연구결과

1. 흡입 챔버내의 공기중 크롬농도

흡입챔버내 공기 중 6가 크롬농도를 측정한 결과, 각 농도군에 있어 폭로기간에 따른 농도차이는 통계학적으로 유의하지 않았다 (Table 1).

그러나 당초 실험물질인 크롬산 나트륨의 목표 폭로농도는 0.18 mg/m³ 및 0.90 mg/m³이었으므로 실제 폭로된 측정농도는 목표농도보다 약 10% 낮게 측정되었다.

Table 1. Airborne hexavalent chromium concentrations measured from sodium chromate mist-exposed inhalation chambers with two concentration levels.

exposure duration (week)	No. of samples	chromium concentration (mg/m ³)	
		GM (GSD)	
		Low exposure	High exposure
1	5	0.151 (1.15)	0.813 (1.32)
2	7	0.148 (1.35)	0.776 (1.32)
3	5	0.155 (1.26)	0.794 (1.32)
total	17	0.166 (1.20)	0.794 (1.29)

low exposure, 0.18 mg/m³ ; high exposure, 0.9 mg/m³

2. 크롬 흡입폭로된 흰쥐에서의 전혈, 적혈구중 크롬농도 및 요중 크롬 농도

크롬산 나트륨 ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)을 농도별 및 폭로기간에 따라 흡입 폭로시킨 흰쥐의 혈중 및 요중 크롬 농도를 측정한 결과 Table 2와 같았다.

크롬 폭로 저농도군 (0.18 mg/m^3)에서 살펴보면, 전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도는 폭로기간에 따라 증가하는 경향을 보였으나 각 군간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 한편 요중 크롬 농도의 경우 1주 폭로군에서 $189.19 \mu\text{g/g creatinine}$ 으로 가장 높게 나타났으며 각 군간의 차이 또한 통계적으로 유의하였다.

크롬 폭로 고농도군 (0.9 mg/m^3)에서 살펴보면 전혈 및 적혈구 중 크롬의 농도는 폭로기간이 길수록 높게 나타났으며 그 차이도 통계적으로 유의하였다. 또한 요중 크롬의 농도는 저농도에서와 마찬가지로 1주 폭로군에서의 농도가 가장 높았고 각 군간의 농도는 통계적으로 유의하게 차이를 나타내었다. 이로써 요중 크롬은 폭로초기에 농도가 상승하였다가 일단 배설되고 시간이 지남에 따라 배설율이 낮아짐을 나타내었다.

Table 2. Mean chromium concentrations in whole blood, erythrocytes, and in urine of rats exposed to sodium chromate

exposure duration (week)	N ^a	GM (GSD)					
		Cr in blood ($\mu\text{g}/\ell$)		Cr in erythrocytes ($\mu\text{g}/\ell$)		Cr in urine* ($\mu\text{g}/\text{g}$ creatinine)	
		low exposure	high exposure	low exposure	high exposure	low exposure	high exposure
1	5	19.87(1.17)	175.07(1.10)	27.78(1.26)	273.59(1.12)	189.19(1.10)	934.76(1.05)
2	5	24.23(1.15)	255.21(1.12)	36.80(1.20)	419.08(1.10)	145.20(1.12)	385.74(1.10)
3	6	28.03(1.55)	269.22(1.17)	46.36(1.66)	437.93(1.15)	163.42(1.07)	840.43(1.10)

a, number of studied

*, $p < 0.001$, ANOVA test

low exposure, $0.18 \text{ mg}/\text{m}^3$; high exposure, $0.9 \text{ mg}/\text{m}^3$

크롬산 나트륨을 흡입 폭로시켜 챔버내 공기중 6가 크롬, 전혈, 적혈구 및 요중 크롬 농도간의 상관관계를 분석한 결과 Table 3과 같았다. 각 항목은 모두 서로 상관성이 높게 나타났는데 특히 전혈 중 크롬 농도와 공기중 6가 크롬의 상관정도 및 적혈구 중 크롬농도와 공기중 6가 크롬 농도의 상관정도는 거의 비슷하여 ($R^2 = 0.942$ 및 0.946) 혈중 크롬측정은 전혈이나 적혈구 어느 쪽 하나의 매질을 택하여 측정하여도 상등함을 보여주었다.

Table 3. Correlation coefficient matrix among selected study variables of rats exposed to sodium chromate

	Log Cr-A	Log Cr-WB	Log Cr-E	Log Cr-U
Log Cr-A	1.000			
Log Cr-WB	0.942**	1.000		
Log Cr-E	0.946**	0.994	1.000	
Log Cr-U	0.824**	0.798**	0.825**	1.000

Log Cr-A, Log hexavalent chromium in air (mg/m^3)

Log Cr-WB, Log hexavalent chromium in whole blood ($\mu\text{g}/\ell$)

Log Cr-E, Log hexavalent chromium in erythrocytes ($\mu\text{g}/\ell$)

Log Cr-U, Log hexavalent chromium in urine ($\mu\text{g}/\text{g creatinine}$)

**, $p < 0.01$, Pearson's Correlation

3. 흰쥐 폐 조직에서의 8-OHdG의 생성

크롬산 나트륨 ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)을 흡입폭로시킨 흰쥐의 폐조직에 생성된 DNA 산화적 손상의 지표인 8-OHdG의 수준을 측정한 결과 Table 4 및 Figure 2와 같았다. 1주간 흡입 폭로시킨 흰쥐의 폐조직에서의 8-OHdG의 수준 ($8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$)은 저농도군에서는 $0.44\ 8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$ 으로 대조군의 것에 비해 74.0% 증가하여 통계적으로 유의하게 상승하였으며 ($p < 0.05$), 고농도군에서도 $0.36\ 8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$ 으로 대조군에 비해 41.7% 상승한 양상을 나타내었으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

2주간 흡입 폭로시킨 실험군에 있어서 폐조직에서의 8-OHdG의 수준 ($8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$)은 저농도군 및 고농도군 모두에서 $0.30\ 8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$ 으로 대조군에 비하여 각각 7.4%, 8.1% 상승하였으나 통계적 차이는 관찰되지 않았다. 3주간 흡입 폭로시킨 실험군에 있어서도 저농도 및 고농도군에서 모두 $0.29\ 8\text{-OHdG}/10^5\text{dG}$ 으로 대조군에 비하여 4.9% 상승하였으나 통계적 차이는

관찰되지 않았다.

즉 본 연구에서 관찰된 8-OHdG의 수준은 단시간에서 낮은 농도로 폭로된 흰쥐의 폐조직에서만 관찰되었고 폭로시간이 길어지거나 폭로농도가 높아지게 되면 8-OHdG는 정상의 수준으로 회복됨을 나타내었다.

Table 4. 8-OHdG levels in lung tissue of rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Exposure duration (week)	N ^a	8-OHdG/ 10^5 dG (mean $\pm$ SD) (% to control mean value)		
		control	low exposure	high exposure
1	5	0.25 $\pm$ 0.05	0.44 $\pm$ 0.14	0.36 $\pm$ 0.06
		(100.0 $\pm$ 20.4)	(174.0 $\pm$ 53.6)*	(141.7 $\pm$ 22.3)
2	5	0.30 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.05
		(100.0 $\pm$ 23.7)	(107.4 $\pm$ 13.8)	(108.1 $\pm$ 17.4)
3	6	0.27 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.12
		(100.0 $\pm$ 22.6)	(104.9 $\pm$ 11.2)	(104.9 $\pm$ 39.69)

a, number of studied

*, $p < 0.05$, Multiple comparison versus control (Dunn's method)

low exposure, 0.18 mg/m^3 ; high exposure, 0.9 mg/m^3

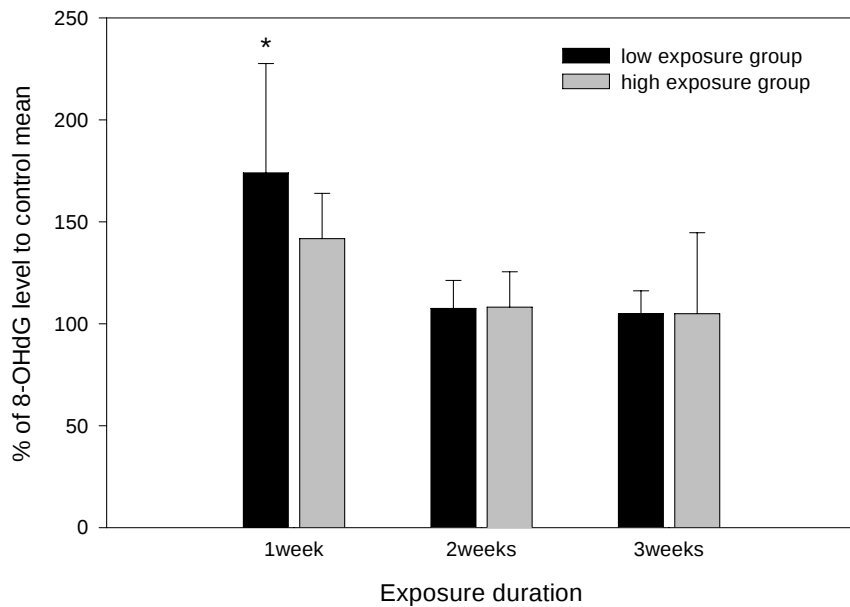


Figure 2. 8-OHdG levels in lung tissue of rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 *, $p < 0.05$, Multiple comparison versus control (Dunn's method)

4. 흰쥐 폐 조직에서의 8-OHdG 회복 효소 활성 (repair activity)

크롬산 나트륨 ($\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)을 흡입 폭로시킨 흰쥐의 폐조직에 생성된 DNA 산화적 손상의 지표인 8-OHdG에 대한 회복효소 활성도 (8-OHdG repair activity)를 측정한 결과 Table 5 및 Figure 2와 같았다.

1주간 크롬산 나트륨에 흡입 폭로시킨 흰쥐의 경우 저농도군에서는 대조

군에서 보다 회복활성도가 약 13% 감소하였고, 고농도군에서는 약 20% 감소하여 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 ($p<0.05$) 감소한 수치를 나타내어 6가 크롬의 폭로 농도가 증가함에 따라 8-OHdG에 대한 회복효소 활성도가 감소한 결과를 나타내었다.

2주간 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서는 저농도군에서는 8-OHdG에 대한 회복효소 활성도가 약 18% 감소하였고 고농도군에서는 약 21% 감소한 수치를 나타내어 크롬산 나트륨의 폭로 농도가 증가함에 따라 모두 통계적으로 유의하게 8-OHdG에 대한 회복효소 활성도가 감소한 결과를 나타내었다.

한편, 3주간 흡입 폭로시킨 흰쥐의 경우 저농도군에서는 대조군보다 8-OHdG에 대한 회복효소 활성도가 약 11%, 고농도군에서는 약 15% 감소를 나타내었으나 모두 통계적 유의성은 없었다.

즉 8-OHdG에 대한 회복효소의 활성도는 크롬 폭로후 크롬의 영향으로 그 활성도가 감소되나 일정시간이 지난 후에는 크롬에 적응되어 거의 정상의 수준으로 회복됨을 나타내었다.

Table 5. The repair activity of 8-OHdG in the lung tissue of rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Exposure duration (week)	N ^b	Repair activity ^a (%)		
		control	low exposure	high exposure
1	5	55.5 ± 5.4 (100.0 ± 9.7)	48.4 ± 4.3 (87.2 ± 7.4)	44.5 ± 6.3* (80.1 ± 11.4)
2	5	55.5 ± 2.6 (100.0 ± 4.9)	45.4 ± 2.8* (81.7 ± 5.0)	43.8 ± 5.9* (79.0 ± 10.6)
3	6	55.7 ± 9.3 (100.0 ± 16.7)	49.6 ± 5.7 (89.0 ± 10.2)	47.2 ± 5.9 (84.7 ± 10.7)

a, Enzyme activity of fluorescence-marked 11 mer oligodeoxynuceotide to that of 22 mer substrate enzyme activity (%)

b, number of studied

*, $p < 0.05$, Multiple comparison versus control (Dunn's method)

low exposure, 0.18 mg/m³; high exposure, 0.9 mg/m³

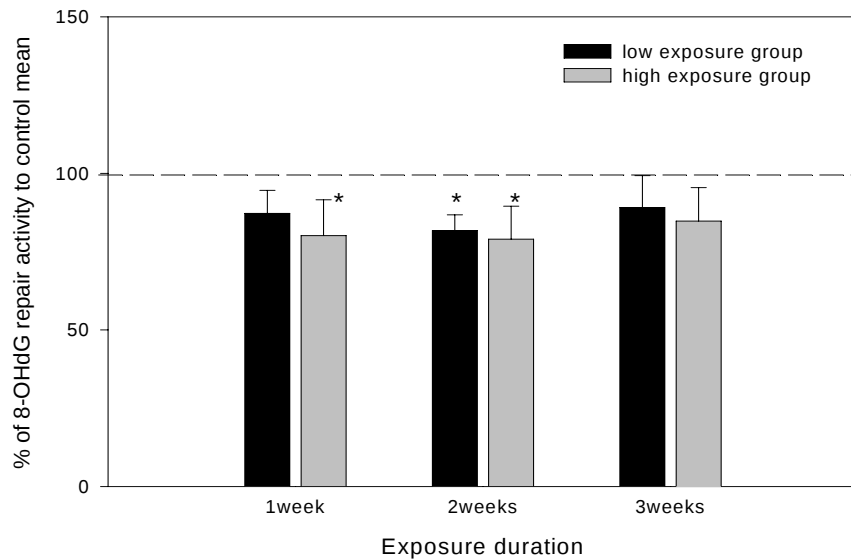


Figure 2. The repair activity of 8-OHdG in the lung tissue of rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 *, $p < 0.05$, Multiple Comparison versus control(Dunn's method)
 low exposure, 0.18 mg/m^3 ; high exposure, 0.9 mg/m^3

5. 흰쥐 혈액에서의 Malondialdehyde (MDA)의 측정

크롬 흡입폭로에 의한 지질과산화의 정도를 파악하기 위해 크롬산 나트륨을 흡입폭로시킨 흰쥐의 혈장 내의 MDA를 측정한 결과, Table 6 및 Figure 4와 같았다.

1주간 크롬산 나트륨에 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서 저농도군 및 고농도

군에서 생성된 MDA농도는 각각 $5.63 \mu\text{mol}/\ell$ 및 $5.94 \mu\text{mol}/\ell$ 로 대조군의 것에 비해 각각 24.8%, 31.8% 정도 통계적으로 유의하게 상승하였으며 양반응 관계를 나타내었다 ($R^2=0.61$, $p<0.01$).

2주간 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서는 저농도군 및 고농도군에서 생성된 MDA농도는 각각 $2.81 \mu\text{mol}/\ell$ 및 $3.14 \mu\text{mol}/\ell$ 로 대조군에 비해 각각 19.8%, 35.4% 정도 상승한 양상을 나타내었으나 고농도군에서만 통계적 유의성을 나타내었으며 폭로 농도에 따른 양반응 관계 또한 보여 주었다 ($R^2=0.59$, $p<0.05$).

3주간 흡입 폭로시킨 흰쥐에 있어서는 저농도군 및 고농도군에서 생성된 MDA농도는 각각 $4.08 \mu\text{mol}/\ell$ 및 $4.12 \mu\text{mol}/\ell$ 로 대조군의 것에 비해 각각 11.9%, 19.9% 정도 통계적으로 유의하게 상승하였으며 수치적으로 양반응 관계를 나타내었으나 통계적으로는 유의하지 않았다.

이와 같은 결과로써 6가 크롬을 흡입시킨 흰쥐에 있어서 혈액내 MDA는 폭로 후 2주정도 까지는 양반응 관계와 함께 대조군에 비해 유의하게 생성되지만 3주 이후에는 대조군 수준으로 회복되는 양상을 나타내어 6가 크롬폭로에 의한 지질과산화 현상은 폭로초기에 대해서는 유용한 지표가 될 수 있었다.

6. 흰쥐에서 각 노출변수와 8-OHdG level, MDA농도와의 상관성

크롬산 나트륨을 흡입 폭로시킨 흰쥐에 대해 측정한 혈중 크롬, 적혈구내 크롬, 요중 크롬농도의 폭로변수들과 폐조직 세포내 생물학적 효과지표인 8-OHdG level, MDA농도의 상관성을 다변량 회귀분석을 실시한 결과, 1주 폭로군에서 8-OHdG level과 요중 크롬농도 ($R^2=0.51$, $p<0.05$) 그리고 MDA와 요중 크롬농도와 상관성 ($R^2=0.62$, $p<0.01$)이 관찰되었다. 2주 폭로군과 3주 폭로

군에서는 8-OHdG와 MDA의 농도는 노출 변수들과 상관관계를 나타내지 않았다. 또한 생물학적 효과 지표인 8-OHdG level과 MDA의 농도 변수간의 상관성도 관찰되지 않았다.

이로써 8-OHdG와 MDA는 실험동물에 있어서의 크롬 폭로 후 초기에 내적 폭로량 즉 요증 크롬을 어느 정도 반영하는 지표라고 간주되었다.

Table 6. The Malondialdehyde (MDA) concentration in the blood plasma of the rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol}/\ell$).

Exposure duration (week)	N ^c	MDA ($\mu\text{mol}/\ell$, mean $\pm$ SD) (% to control mean value)		
		control	low exposure	high exposure
1 ^b	5	4.51 $\pm$ 0.50 (100.0 $\pm$ 11.2)	5.63 $\pm$ 0.24 (124.8 $\pm$ 5.4)*	5.94 $\pm$ 0.62 (131.8 $\pm$ 13.7)*
2 ^a	5	2.35 $\pm$ 0.22 (100.0 $\pm$ 9.5)	2.81 $\pm$ 1.10 (119.8 $\pm$ 11.7)	3.14 $\pm$ 1.21 (135.4 $\pm$ 24.6)*
3	6	3.44 $\pm$ 0.33 (100.0 $\pm$ 9.70)	4.09 $\pm$ 0.37 (118.9 $\pm$ 10.7)*	4.13 $\pm$ 0.21 (119.9 $\pm$ 6.0)*

*, $p < 0.05$, Multiple comparison versus control (Dunn's method)

^a, $p < 0.05$, ^b, $p < 0.01$, Multiple regression by dose variable

^c, number of animals studied

low exposure, 0.18 mg/m^3 ; high exposure, 0.9 mg/m^3

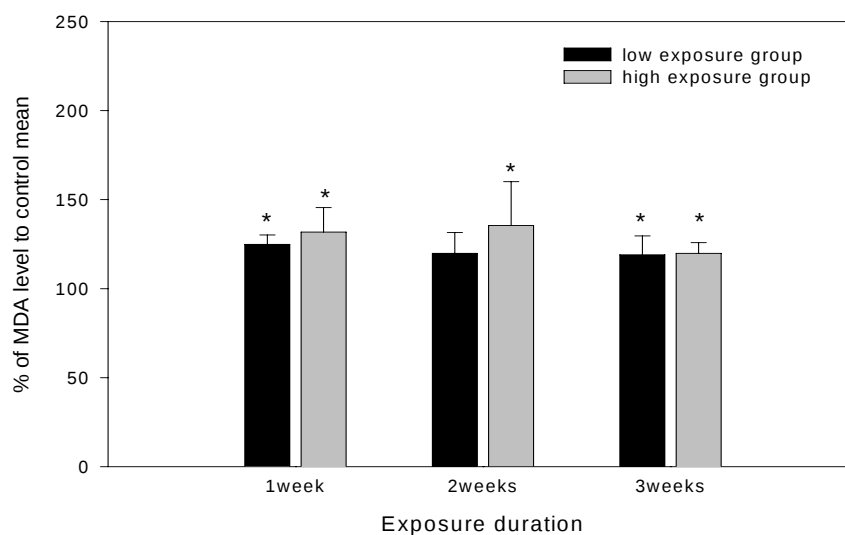


Figure 4. The Malondialdehyde (MDA) concentration in the blood plasma of the rats inhaled with $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\mu\text{mol}/\ell$).

*, $p < 0.05$, Multiple Comparison versus control (Dunn's method)

low exposure, $0.18 \text{ mg}/\text{m}^3$; high exposure, $0.9 \text{ mg}/\text{m}^3$

제 4 장 고 찰

크롬에 노출된 사람의 체내에 흡수된 크롬량은 크롬화합물의 노출수준, 크롬의 원자가, 체내에서의 용해정도 및 물질의 환원능력, 입자의 크기 등에 의해 영향을 받는다. 한편 크롬 화합물의 생물학적 노출의 평가에 이용되어 왔던 기존의 요중 및 혈중 크롬농도는 크롬 노출로 인한 체내 부하의 유해성 평가보다는 개인의 식이 습관이나 일반 생활환경의 오염원을 포함한 최근 총크롬 노출량을 반영하며 3가 크롬과 6가 크롬의 노출을 구별할 수 없어 6가 크롬에 직업적으로 노출된 근로자의 노출평가도구로 부적합하다는 것이 지적되기도 하였다 (Harzdorf & Lewalter, 1997; Lukanova et al., 1996).

크롬 특히 6가 크롬은 시험관내 (*in vitro*) 혹은 생체내 (*in vivo*) 연구방법에 따른 몇몇의 연구보고에 따르면 유전적 수준 (genomic level) 혹은 세포수준에서 유전자변이 (gene mutation), DNA 병변, 거대분자합성의 저해, 세포주기변화, apoptosis, premature terminal growth arrest, 신생조직변형 (neoplastic transformation), 산화적 손상 등을 일으키는 것으로 보고되고 있다 (Bridgewater, et al., 1994; De Flora & Wetterhahn, 1989; Elias, et al., 1989).

6가 크롬에 의한 발암성에 대해서는 실험동물과 사람에 대한 역학조사에서 그 유의성이 제시되어 왔는데, 크롬 폭로 작업장 근로자나 환경적으로 폭로된 사람들에게 대해 실시한 역학조사결과에 따르면 크롬 폭로자들에 있어서 비중격천공, 호흡기도 및 피부궤양 등의 장애 뿐 아니라 폭로 후 오랜 시간 후에 폐암을 비롯한 호흡기계 암을 유발하는 것으로 보고되어 있다. (Ishikawa et al.,

1994; Kortenkamp, 1997; Sorhan et al., 1998).

이러한 유해성이 있는 크롬에 폭로되는 사람의 건강보호를 위해 산업장에서는 노출기준을 설정해 놓고 환경적으로 관리하고 있다 (노동부, 1998; NIOSH, 1994; ACGIH, 2000). 공기 중 총크롬 및 6가 크롬농도 이외에 크롬 폭로의 내적 폭로지표인 요중 크롬과 혈중 크롬농도 또한 폭로를 확인하는 방법은 되나 그 자체만으로 잠재적인 발암의 위험성에 대한 지표가 될 수 없다는 제한점을 가지고 있다.

따라서 크롬에의 폭로와 암 발생 위험과의 관계 설립이 필요하다고 여겨져 그 동안 6가 크롬의 효과를 모니터링하기 위한 세포학적인 감시 연구가 이루어져 왔다. 주로 크롬폭로근로자의 혈액 림프구를 이용한 염색체이상이나 자매염색체 교환을 실시함으로써 초기 생물학적 효과지표 (early biological effect marker)와 내적 폭로지표 (internal exposure marker)의 상대적 민감도에 대한 평가가 가능하게 되었다 (Choi et al., 1987; Nagaya, 1986; Nagaya et al., 1991; Sbrana et al., 1990). 그러나 대부분의 연구에서는 내적 폭로지표를 주로 크레아티닌으로 보정한 요중 크롬을 채택하였으며 연구결과의 대부분은 폭로군과 대조군에 있어서 염색체이상 혹은 자매염색체이상의 빈도 차이가 없었고 통계적으로 유의한 증가를 나타낸 연구보고는 소수이었다.

따라서 크롬 폭로 후 오랜 시간이 지난 뒤 발생될 수 있는 암이라는 질병에 이르는 생물학적 변화 중 초기단계에 감지할 수 있는 좀더 유용한 생물학적 효과 또는 반응 지표 (biologically effective or response marker, Shulte & Perera, 1997)의 필요성이 강조되어 왔다.

6가 크롬에 폭로되면 hydroxy radical 등과 같은 활성산소가 생성하고, 이렇게 체내에 생성된 라디칼은 세포내 DNA에 광범위한 손상을 일으키며 이러한 DNA의 손상들 중 핵산의 guanine을 C-8 위치에서 수산화하여 8-OHdG를

생성하는 것으로 보고되고 있다 (Kasai & Nishimura, 1986). 따라서 조직 내의 8-OHdG 농도는 조직에 생성된 oxygen free radical의 양을 반영하므로 세포내 산화적 손상의 유용한 지표로 간주되어 왔다. 본 연구에서는 6가 크롬화합물의 하나인 크롬산 나트륨을 사람의 가장 잦은 폭로경로가 될 수 있는 전흡입폭로방법으로 흰쥐에 폭로시켜 폐조직내에 생성되는 8-OHdG의 수준과 그의 회복활성도 (8-OHdG repair activity)을 측정하여 이들 지표의 유용성을 검토하였다.

먼저 흡입챔버를 이용하여 크롬산 나트륨을 미스트의 상태로 흡입폭로시킨 흰쥐에 대해 전혈, 적혈구 및 요중 크롬농도를 측정한 결과 실험적으로 폭로시켰던 공기중 농도와 좋은 상관관계를 나타내었는데 이때 챔버내 폭로농도와의 전혈과의 상관성과 적혈구와의 상관성은 거의 같게 나타났다. 즉 혈액 내에서 측정하는 크롬의 폭로량은 전혈과 적혈구에서 상등함을 나타내었다.

크롬산 나트륨 미스트에 흡입폭로된 흰쥐의 폐조직에 생성된 8-OHdG의 수준은 1주간동안 저농도 (0.18 mg/m^3)로 폭로시켰을 경우에만 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 상승하였음을 나타내었고 고농도 (0.9 mg/m^3)로 폭로시키거나 폭로기간을 길게 한 경우에는 대조군에 비해 차이를 나타내지 않았다. 이러한 양상은 Kim 등 (1999)이 기관지 내로 6가 크롬수용액을 3일 연속으로 강제 투여 시켜 관찰한 흰쥐 폐에서의 결과와 비슷하였으나 이들은 저농도군에서의 결과에서도 통계적으로 유의한 차이는 나타내지 못하였다. 이러한 결과간의 차이는 폭로경로와 폭로기간의 차이라고 보여진다.

한편, 폭로농도 및 폭로기간에 따라 8-OHdG 회복활성도 (repair activity)를 측정한 결과 1주간 크롬산 나트륨 미스트에 흡입 폭로된 흰쥐의 경우 폭로농도가 증가함에 따라 8-OHdG 회복활성도는 감소하는 경향을 나타내었으며, 이러한 감소경향은 2주간 폭로시켰을 경우 더욱 강하여지나 3주 째에 이르면 대

조균의 수준으로 모두 회복되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 상기의 Kim 등이 비교적 저농도 단계별로 투여하였을 경우 8-OHdG의 농도와 회복활성도 간의 유의한 상관성을 나타냈던 결과와는 상이한 것이나 비교적 고농도 단계별로 투여한 경우 상관성이 없었던 결과와는 같은 양상이었다.

생체 내에는 8-OHdG에 대한 방어기전이 존재하는데 (Chung et al., 1991; Kasai & Nishimura, 1986), E. coli에 존재하는 8-OHGua endonuclease는 Fapy-DNA glycosylase라고 불리며 endonuclease activity뿐 아니라 glycosylase activity도 갖고 있다 (Tchou et al., 1991). 사람의 세포 내에도 8-OHdG만을 제거하는 endonuclease가 존재함이 입증되었으나 (Chung, et al., 1991; Tchou et al., 1991), 포유동물세포에서는 endonuclease와는 별도의 8-hydroxyguanine glycosylase가 있어서 DNA 서열 내에 있는 8-hydroxyguanine이 단독염기상태로 잘려 나오게 된다 (Bessho et al., 1993).

본 연구 결과 6가 크롬에 저농도로 폭로되면 폭로 후 단시간 동안 8-OHdG가 형성되고 곧바로 정상으로 회복되는 양상을 나타내었으나 회복기구의 현상이라 추측하였던 8-OHdG repair enzyme의 활성은 오히려 정상보다 크롬폭로 후 오히려 감소하는 경향을 나타내었는데 즉 8-OHdG repair enzyme activity 자체가 크롬폭로에 의해 영향을 받아 일정기간 동안 감소함으로써 폭로초기 생성된 8-OHdG의 회복 기능의 역할을 할 수 없어 일시적으로 8-OHdG의 양을 상승시키게 하는 것으로 생각되었다. 그러나 이러한 효소활성억제효과도 시간이 지남에 따라 회복되는 것으로 관찰되어 결국 일정시간 후에는 크롬의 폭로가 지속되더라도 8-OHdG 수준과 회복효소는 모두 정상수준으로 유지됨이 관찰되었다. 고농도의 크롬에 폭로되는 경우는 1주 폭로에서도 8-OHdG를 형성하지 않는 것으로 나타났는데 이는 고농도이므로 폐세포에 크롬이 작용하는 시간이 저농도보다 빨라 동물의 폐를 적출하는 최소기간 1주보다 훨씬 전에

일시적으로 8-OHdG를 형성하였다가 제거되었을 가능성을 배제할 수 없다. 또한 본 연구에서 크롬 폭로 공기중 농도와 8-OHdG의 농도와의 양반응 관계는 발견할 수 없었으나 흰쥐에서 측정된 적혈구내 크롬농도와 요중 크롬과의 상관성도 관찰되지 않았다.

유전 독성은 정상적으로는 암에 이르는 신생물 변형 (neoplastic transformation)에 대한 전제조건으로 여겨지고 있다. 크롬은 다양한 범위의 유전 독성 병변을 나타내고 이들 중 어떤 것들은 세포주기 포획 그리고 apoptosis와 같은 세포반응과도 관련된다. Manning과 Patierno (1996)의 보고에 따르면 발암과정 (carcinogenesis)과 apoptosis는 산화적 스트레스(oxidative stress)와 같은 자극에 따라 일어나기도 하며 공통적으로 myc, bcl-w 및 p53과 같은 조절 유전자 (common regulatory gene)을 공유하고 있다. Singh 등 (1998)은 크롬 폭로에 의해 발생하는 apoptosis는 크롬폭로 후 수시간 내에 관찰되며 돌연변이는 적어도 2번의 세포주기이상 지나야 하므로 크롬에 의해 야기되는 apoptosis는 실질적으로 돌연변이나 발암과정에 포함될 가능성은 희박한 것으로 보고하였다. 이때 이들은 크롬폭로에 의한 산화적 손상 (oxidative stress)은 apoptosis에 대한 유발자 역할을 한다고 보고하였다.

지금까지 산화적 스트레스는 금속에 의한 발암과정에서 주요한 메카니즘을 가지고 있다고 암시되어 왔으나 본 연구결과는 6가 크롬이 hydroxyl radical을 형성하여 암을 유발한다는 가설을 의심케 하며 오히려 6가 크롬은 이들 hydroxyl radical을 생성하지 않거나 암을 유발하는 산화적 손상과는 다른 효과를 나타내는 활성산소종 (ROS)가 생성되거나 혹은 그 생성량이 적어 이에 의한 유전적 손상의 정도는 크지 않을 것으로 생각되어 8-OHdG의 농도가 크롬 폭로된 사람들에게 쓰일 수 있는 유용한 지표가 될 수 없다고 판단하였다.

6가 크롬은 LD₅₀의 50%의 농도일 때 효과적으로 reactive oxygen species

를 형성하여 산화적 세포 및 DNA 손상을 초래하는 것으로 보고하고 있다. 이들은 또한 LD₅₀의 50%의 농도로 크롬산 나트륨을 경구로 투여한 실험동물에서 세포내 지질 과산화와 함께 간세포 핵내 DNA-single strand break를 관찰하였다 (Bagchi et al., 1997). 지질과산화는 oxygen free radical에 의해 조직에 손상을 일으키는 일반적인 기전의 하나로 다양한 질병과 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며 (Wong, 1987), 그의 지질 과산화 산물인 Malondialdehyde (MDA)는 지닌 glycylaldehyde 및 β -propiolactone과 구조가 비슷하여 주로 아미노기와 높은 반응성에 의해 유전적 손상을 가져올 수 있음이 보고되었다 (Shamberger, et al., 1974). 따라서 MDA의 농도측정으로 크롬 폭로에 의한 암발생의 초기단계의 세포수준에서의 산화적 손상을 나타낼 수 있는 지를 발견하기 위해 상기와 동일한 크롬산 나트륨 미스트에 흡입 폭로된 흰쥐의 혈장 내에서 MDA 농도를 측정하였다. 그 결과 1주, 2주, 3주간 흡입폭로시킨 흰쥐에서의 MDA농도는 대조군에 비해 모두 상승되었음을 나타내었고 동시에 흡입시켰던 공기중 크롬의 농도와 양반응 관계도 관찰되었다. 이러한 결과는 Bagchi 등 (1995)이 크롬산 나트륨을 만성적으로 폭로시킨 흰쥐의 요에서 측정했던 지질과산화물을 관찰한 결과와 일치하였다.

따라서 본 연구결과, 크롬에 의한 지질 과산화는 실험동물에 있어서는 크롬 폭로에 대한 유용한 반응지표로 관찰되었다.

제 5 장 결 론

본 연구에서는 크롬폭로에 의한 암 발생의 초기단계 변화인 세포 내 유전 독성 및 산화적 손상을 평가, 세포 생물학적 효과 또는 반응 지표로서의 유용성을 실험적으로 검토하고 크롬 폭로된 사람 집단에의 적용성 여부를 판단하기 위한 목적으로, 흡입챔버를 이용하여 크롬 미스트를 폭로시킨 실험동물에서 산화적 손상을 평가하기 위해 두 가지 지표 즉, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 및 지질과산화의 반응산물인 malondialdehyde (MDA)의 농도를 측정함으로써 이들 지표의 유용성을 관찰한 결과 다음과 같았다.

1. 6가 크롬 화합물에 흡입 폭로된 흰쥐의 폐조직에 생성된 8-OHdG의 농도는 저농도 (0.18 mg/m^3)로 단기간 (1주일) 폭로시킨 실험군에서는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 상승하였으나, 고농도군과 2주 이상 폭로군에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

2. 8-OHdG의 회복 활성도 (repair activity)를 측정한 결과, 1주간 및 2주간 폭로군에서는 농도가 높아짐에 따라 회복활성도가 감소하는 경향을 나타내었으나, 3 주간 폭로군에서는 저농도 및 고농도군 모두에서 정상 수준으로 회복되었음이 관찰되었다.

3. 6가 크롬화합물의 폭로농도와 8-OHdG 생성 수준과의 양 반응 관계가 관찰되지 않아 8-OHdG 생성은 크롬 폭로된 사람집단에 쓰일 수 있는 지표로서

제한성이 있음을 확인하였다.

4. 6가 크롬 화합물에 흡입 폭로된 흰쥐 혈액 내에 생성된 지질 과산화물인 malondialdehyde (MDA)의 농도를 측정한 결과, 1, 2 및 3주 폭로군 모두에서 MDA농도는 대조군에 비하여 모두 상승되었고, 폭로농도와의 양 반응 관계와 함께 흰쥐 요중 크롬농도와도 상관성을 나타내어 이 지표는 실험적으로는 크롬폭로 사람집단에 적용할 유용성이 있다고 판단되었다.

이상의 결과에 따라 본 연구에서 검토하였던 크롬 폭로에 의한 유전적 및 산화적 손상지표들 크롬 폭로에 의한 산화적 손상을 평가하기 위해서 지질과산화 측정이 8-OHdG 측정보다 유용성이 있다고 판단되었다.

제 6 장 참고문헌

노동부 고시 제 97-65호, 화학물질 및 물리적 인자의 노출기준 (1998)

Aiyar, J. K.M. Borges, R.A. floyd, KE. Wetterhahn : Role of chromium (V), glutathione thiyl radical and hydroxyl radical intermediates in chromium(VI)-induced DNA damage. *Toxicol. Environ. Chem.* 22, 135-148 (1989)

American Conference of Governmental Industrial Hygienist (ACGIH) : *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Indices for 1999-2000*. ACGIH, Cincinnati, OH (2000)

Anderson, R.A.: Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 26, 35-41 (1997)

Asami, S., T. Hirano, R. Yamaguchi, Y. Tsurudome, H. Itoh and H. Kasai (1998). Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochemical & Biophysical Research com.* 243, 678-682 (1998)

Bagchi, D., E.A. Hassoun, and M. Bagchi : Oxidative stress induced by chronic administration of sodium dichromate [Cr(VI)] to rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 110C, 281-287 (1995)

Bagchi, D., P.J. Vuchetich, M. Bagchi, E.A. Hassoun, M.X. Tran, L. Tang, S.H. Stohs : Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (chromium VI) and cadmium chloride (Cadmium II) to rat. *Free Radical Biology & Medicine* 22, 471-478 (1997)

Bessho, T., R. Roy, K. Yamamoto, H. Kasai, S. Nishimura, K. Tano and S. Mitra : Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian

N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 8901-8904 (1993)

Bigaliev, A.B., M.S. Elmesova, M.N. Turebaev and R.K. Bigaliev : Cytogenetic study of the mutagenic activity of industrial substances. *Zdravookhr. Kaz.* 8, 48-50 (1978)

Bridgewater, L.C., F.C.R. Manning and S.R. Patierno : Base-specific arrest of *in vitro* DNA replication by carcinogenic chromium : relationship to DNA interstrand crosslinking. *Carcinogenesis* 14, 2421-2427 (1994)

Choi, Y.J., Y.W. Kim and C.W. Cha : A study on sister chromatid exchanges in lymphocytes in some metal plating workers. *Korea University Medical Journal* 24, 249-257 (1987)

Chung, M.H., H. Kasai, D.S. Jones, H. Inoue, H. Ishikawa, E. Ohtsuka and S. Nishimura : An endogenous activity of *Escherichia coli* that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Mutation Research* 254, 1-12 (1991).

De Flora, S. and K.E. Watterhahn : Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.* 7, 169-244 (1989)

Elias, Z., O. Poirot, H. Pezerat, H. Suquet, O., Schneider, M.C. Daniere, F. Terzetti, F. Baruthio, M. Fournier and C. Cavalier : Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 10, 2043-2052 (1989)

Harzdorf, C. and J. Lewalter : Analytical methodology for biological monitoring of chromium. *Regul. Toxicol. and Pharmacol.* 26, 586-593.

Herman, A., D. Brahram, O.D. Lars, G. Mikael, M. Ase, S.L. Hansenm, O. Henrik, N. Flemming, N. Per Sabros, R. Edith, W. Hakan and E.K. Lisbeth : Biomarkers for exposure to ambient air pollution - Comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ. Health Perspectives* 107, 223-238 (1999)

Hirano, T., K. Higashi, A. Sakai, Y. Tsurudome, Y. Ootsuyama, R. Kido and H. Kasai : Analyses of oxidative DNA damage and its repair activity in the livers of 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-treated rodents. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 681-685 (2000)

Ishikawa, Y., K. Nakagawa, Y. Satoh, T. Kitagawa, H. Sugano, T. Hirano and E. Tsuchiya : Characteristics of chromate workers' cancer, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions : an autopsy study. *Br. J. Cancer* 70, 160- 166 (1994)

Itoh, M., M. Nakamura, T. Suzuki, K. Kawaki, H. Horitsu and K. Takamizawa : Mechanism of chromium (VI) toxicity in *Escherichia coli* : is hydrogen peroxide essential in Cr(VI) toxicity? *J. Biochem.* 117, 780-786 (1995)

Kamiya, H., K. Miura, H. Ishikawa, H. Inoue, S. Nishimura and E. Ohtsuka : c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent position. *Cancer Res.* 52, 3483-3485 (1992)

Kasai, H. and S. Nishimura : Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acid Research* 12, 2137-2145 (1984)

Kasai, H., P.F. Crain, Y. Kuchino, S. Nishimura, A. Ootsuyama and H. Tanooka : Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7, 1849-1851 (1986).

Kasai, H. and S. Nishimura : Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical-forming agents. *Environ. Health Perspect.* 67, 111-116 (1986)

Kawanishi, S., S. Inoue, S. Sano. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol.*

Chem. 261, 5952–5958 (1986).

Kim, H., H.S. Kim, R. Kim, H.Y. Kim and J.H. Chung : Effects of exposure to hexavalent chromium on the level of 8-hydroxydeoxyguanosine and the activities of superoxide dismutase and 8-hydroxyguanine endonuclease in rat lung. *Korean J. Prev. Med.* 32, 101–107 (1999)

Kortenkamp, A., P. O'Brien and D. Beyersmann : The reduction of chromate is a prerequisite of chromium binding to cell nuclei. *Carcinogenesis* 12, 1143–1144 (1991).

Kortenkamp, A., M. Casadevall, S.P. Faux, A. Jenner, R.O. Shayer, N. Woodbridge, P. O'Brien : A role for molecular oxygen in the formation of DNA damage during the reduction of the carcinogen chromium (VI) by glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 329, 199–207 (1996)

Kortencamp, A. : Review : Problems in the biological monitoring of chromium (VI) exposed individuals, *Biomarkers* 2, 73–80(1997)

Lukanova, A., P. Toniolo, A. Ihtkovich, V. Nikalova, T. Panev, T. Popov, E. Taioli, M. Costa : Occupational exposure to Cr (VI) : Comparison with between chromium levels in lymphocytes, erythrocytes, and urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 69, 39–44 (1996)

Manning, F.C.R. and S.R. Patierno : Apoptosis : inhibitor or instigator of carcinogenesis. *Cancer Invest.* 14, 455–465 (1996)

Manning, F.C.R., J. Xu and S.R. Patierno : Transcriptional inhibition by carcinogenic chromate : relationship to DNA Damage. *Mol. Carcinog.* 6, 270–279 (1992).

Nagaya, T. : No increase in sister-chromatid exchange frequency in lymphocytes of chromium platers. *Mutation Research* 170, 129–132 (1986)

Nagaya, T., N. Ishikawa, H. Hata and T. Otobe : Sister-chromatid

exchanges in lymphocytes from 12 chromium platers : a 5-year follow-up study. *Toxicology Letters* 58, 329-335 (1991)

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) : NIOSH recommendations for Occupational Safety and Health. Compendium of Policy Document and Statements. NIOSH, Cincinnati, OH. pp. 63-64 (1994)

Nielsen, F., B.B. Mikkelsen, J.B. Nielsen, H.R. Anderson, P. Grandjean : Plasma-malondialdehyde as biomarker for oxidative stress : reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem* 43, 1209-1214 (1997)

Sbrana, I., S., Caretto, D. Lascialfari, G. Rossi, M. Marchi and N. Loprieno : Chromosomal monitoring of chromium-exposed workers. *Mutation Research* 242, 305-312 (1990)

Shamberger, R.J., T.L. Androne and C.E. Willis : Antioxidants and cancer. VI. malondialdehyde has initiating activity as a carcinogen. *J. Nat. Cancer Inst.* 53, 1771-1773 (1974)

Shibutani, S., M. Takeshita and A.P. Grollan : Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxo dG. *Nature* 349, 431-434 (1991)

Shulte, P.A. and F.P. Perera : A conceptual and historical framework for molecular epidemiology. In : *Molecular Epidemiology Part I, Academic Press Inc., New York*, pp. 3-44 (1997)

Singh, J., D.L. Carlisle, D.E. Pritchard, S.R. Patierno : Chromium-induced genotoxicity and apoptosis : Relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncol. Rep.* 5, 1307-1318 (1998)

Snow, E.T. : Metal carcinogenesis : mechanistic implications. *Pharmacol. Ther.* 53, 31-65 (1992)

Sorhan, T., D.C. Burges, L. Hamilton, J.M. Harrington: Lung cancer mortality in nickel/chromium platers, 1946-1995. *Occup. Environ. Med.* 55,

236-242 (1998)

Susa, N., S. Ueno, Y. Furukawa, J. Ueda and M. Sugiyama : Potent protective effect of melatonin on chromium (VI)-induced DNA single strand break, cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. & Applied Pharmacol.* 144, 377-384 (1997)

Tchou, J., H. Kasai, S. Shibutani, M.H. Chung, J. Laval, A.P. Grollman and S. Nishimura : DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4690-4694 (1991)

Tsou, T-C, C-L Chen, T-Y Liu and J-L Yang : Induction of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by chromium (III) plus hydrogen peroxide and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* 17, 103-108 (1996).

Wang, J., K. Ashley and D. Marlow : Field method for the determination of hexavalent chromium by ultrasonication and strong anion-exchange solid phase Extraction. *Analytical Chemistry* 71, 1027-1032 (1999)

World Health Organization (WHO): *Environmental Health Criteria 61: Chromium*. WHO, Geneva (1988)

Wong, S.H.Y., J.A. Knight, S.M. Hopfer, O. Zaharla, C.N. Leach Jr. and F.W. Sundermann : Lipoperoxides in plasma as measured by liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin. Chem.* 33, 214-220 (1987)

Xu, J., G.J. Bubley, B. Detrick, L.J. Blankenship and S.R. Patierno : Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA crosslinks and S-phase blockade of the cell cycle. *Carcinogenesis* 17, 1511-1517 (1996)

Yiin, S.J., T.H. Lin and T.S. Shih : Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. *Scand. J. Work Environ. Health* 22, 381-6 (1996).

본 연구보고서에 기재된 내용은 연구책임자의
개인적 견해이며, 우리 공단의 공식견해가 아
님을 알려드립니다.

한국산업안전공단 이사장

금속화합물에 의한 유전적 및 산화적 손상에 관한 연구
(연구원 2001 - 88 - 411)

발 행 일 : 2001년 12월 31일

발 행 일 : 산업안전보건연구원 원장 정 호 근

연구책임자 : 산업안전보건연구원 산업화학물질연구센터 선임연구원 맹 승 희

발 행 처 : 한국산업안전공단 산업안전보건연구원

주 소 : 인천광역시 부평구 구산동 34-4

전 화 : (032) 5100 - 842

F A X : (032) 5180 - 867
