

# 혈장 총 유리기 포집 능력(TRAP) 수준 및 항산화 비타민 영양상태와 인체 임파구 DNA 손상정도와의 상호관련성 연구\*

강 명 희<sup>§</sup>

한남대학교 이과대학 식품영양학과

## The Associations between Plasma Concentrations of Total Radical-Trapping Antioxidant Potential(TRAP), Antioxidant Vitamins and DNA Damage in Human Lymphocytes\*

Kang, Myung-Hee<sup>§</sup>

Department of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

### ABSTRACT

The spontaneous frequency of genetic damage and the possible relationship of this damage to total radical-trapping antioxidant potential(TRAP) and antioxidant vitamins, including plasma levels of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, cryptoxanthin, retinol,  $\alpha$ -tocopherol and  $\gamma$ -tocopherol in humans were investigated in 57 subjects using two indices of genetic damage, SCE & HFC frequency. The mean of SCE and HFC frequencies were weakly correlated with plasma TRAP( $r = -0.305, p < 0.1$  for SCEs;  $r = -0.297, p < 0.1$  for HFCs, respectively), but those were strongly negatively correlated with plasma  $\beta$ -carotene( $r = -0.385, p < 0.01$  for SCEs;  $r = -0.392, p < 0.01$  for HFCs) and cryptoxanthin( $r = -0.312, p < 0.05$  for SCEs;  $r = 0.335, p < 0.05$  for HFCs, respectively) levels in the subjects. However, those DNA damage markers including SCE and HFC did not correlate with either plasma  $\alpha$ -carotene,  $\alpha$ -tocopherol or retinol concentrations. The mean of SCE and HFC frequencies were positively correlated with plasma  $\gamma$ -tocopherol level( $r = 0.421, p < 0.01$  for SCEs;  $r = 0.390, p < 0.01$  for HFCs, respectively). These findings indicate that increased cytogenetic DNA changes, as determined by SCE and HFC frequencies are possibly associated with generation of free radicals in lymphocytes and decreased plasma antioxidant vitamin( $\beta$ -carotene and cryptoxanthin) status in the subjects. (*Korean J Nutrition* 34(4) : 401~408, 2001)

**KEY WORDS:** sister chromatid exchange(SCE), high frequency cell(HFC), total radical-trapping antioxidant potential(TRAP), carotenoids, tocopherols, retinol.

### 서 론

인체에 미치는 유전 독성 물질의 유해 정도를 측정해 볼 수 있는 방법 중의 하나로 소개되고 있는 것이 자매 염색분체 교환법(SCE, sister chromatid exchange)이다. 이 방법은 현미경을 통해 인체 임파구의 염색체를 관찰함으로써 DNA의 손상 여부를 쉽게 알아 볼 수 있는 방법일 뿐 아니라<sup>1)</sup> 한 개인이 세포 독성화적인 환경에 노출되었는가를 알려주는 좋은 marker가 된다.<sup>2,3)</sup> 염색체에 손상이 일어나는 것은 carcinogenesis에 있어서 결정적인 단계에 있다는 것

을 의미한다고 볼 수 있으며<sup>4)</sup> 인체가 발암물질(carcinogen)에 노출되었을 때 나타나는 염색체(DNA)의 손상을 알아보는 방법으로 SCE 방법이 유용하다는 것이 여러 연구에서 보고되고 있다.<sup>5,6)</sup> 유해물질에 노출되지 않은 정상인의 경우 임파구의 SCE 빈도수는 세포 당 4~14개<sup>5)</sup> 인데 비해, 여러 돌연변이 유발물질에 노출되었을 때는 SCE 빈도수가 증가한다. 유해물질의 노출과 관련하여 그 동안 흡연이 인체 임파구 SCE 빈도수를 높인다는 연구결과가 보고되어 왔으며,<sup>7,8)</sup> SCE 수준은 인간의 질병상태와 관련된다는 연구가 최근 활발히 진행되면서 암,<sup>9,10)</sup> 유전적인 질병<sup>11)</sup> 및 감염성 질환<sup>12)</sup> 등 여러 질병이 있는 환자들의 임파구 SCE 빈도수가 건강한 사람들에 비해 높다는 결과들도 다수 보고되고 있다.

현재까지 인체 세포 내에서 SCE가 생기는 자세한 기전은 아직도 알려져 있지 않다. 그러나 세포의 SCE pattern은 일반적인 계놈의 불안정성(instability)을 잘 나타내주고

접수일 : 2001년 5월 23일

채택일 : 2001년 6월 13일

\*This work was supported by 1999 Korea Research Foundation Grant(KRF-99-D00461).

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

있으므로, SCE 측정법은 현재 염색체(DNA)의 instability에 대한 민감하고도 신뢰할 만한 indicator로 널리 사용되고 있다. 최근 여러 연구자들은 염색체 불안정성 증후군(chromosome instability syndrome) 환자들의 세포에서 SCE 빈도수가 증가하는 것은 체내 활성 산소 물질(active oxygen species)의 증가와 관련이 있을 것임을 제안하였다.<sup>13)</sup> 또 흡연자의 임파구에서 볼 수 있는 SCE 빈도수의 증가는 식세포(phagocyte) 및 활성 중성구에서 유도된 활성 산화물질(reactive oxidants, RO) 발생 증가와 관련이 있는 것도 보고되고 있다.<sup>2,14)</sup> 즉 어떤 환경이든 신체 내 oxygen free radical의 발생이 증가하는 환경이 되면 이것이 세포 내 염색체 손상의 주요 원인이 되어 SCE 빈도수가 증가하는 것으로 생각해 볼 수 있다.

신체 내에서 활성 산소 대사물질의 독성 작용을 막기 위한 방어 작용으로 효소계와 비효소계의 방어 기전들이 존재하며, 우리 몸에서 활성 산화제의 독성과 이를 중화시킬 수 있는 방어계와의 균형이 깨어지면 조직의 손상이 초래된다.<sup>14)</sup> 세포 내 방어 기전은 superoxide radical과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 제거 항산화 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등에 의해 수행되며,<sup>15)</sup> glutathione과 ascorbate도 세포 내 활성 산화제의 독성을 중화시키는데 중요한 역할을 담당한다.<sup>16)</sup> 이에 비해 세포 밖의 활성 산화제 중화는 주로 혈장과 간질액에 고농도로 존재하는 비 효소계 방어 기전, 특히 ascorbate 및 지용성 항산화 비타민들에 많이 의존한다. Ascorbate는 superoxide radicals 및 HOCl과 반응하여 이를 제거한다.<sup>17)</sup> 또 인체 혈액에 존재하는 주된 peroxy radical-trapping antioxidants인 비타민 E는 활성 산화제의 피해로부터 세포막을 보호해 주며, singlet oxygen을 제거해 주는 β-carotene도 peroxy radical을 중화시킴으로써 지용성 상태에서의 chain breaking antioxidant로서의 역할을 담당한다.<sup>18)</sup>

그 동안 많은 연구자들은 미생물 감염 환자<sup>19)</sup>나 trauma 환자들<sup>20)</sup>에게서, 그리고 흡연시<sup>21)</sup> 활성 산화제의 생산 증가와 동시에 혈장과 백혈구의 비타민 C, 비타민 E, β-carotene 등의 수준이 감소되는 것을 관찰하였으며 이는 식세포 유도 활성 산화제를 중화하기 위해 이런 항산화 비타민들이 소모되었기 때문이라고 보았다. 더 나아가 혈장 내에 비타민 C, 비타민 E, β-carotene의 농도가 충분하면 활성 중성구에 의해 생긴 세포 밖의 HOCl까지도 중화시킬 수 있는 것이 밝혀졌다.<sup>22)</sup> 이런 연구들로 미루어보아 인체내 항산화 비타민들의 영양 상태는 흡연 및 감염과 관계된 조직의 손상과 carcinogenesis의 감수성에 대한 중요한 결정인자인 것으로 보인다.<sup>17)</sup> 그 동안 인체의 DNA 손상과 이

에 영향을 미치는 항산화 비타민의 영양상태에 관한 연구들이 많이 보고되었으나 항산화 비타민이 종류별로 폭 넓게 연구되지 못하였으며 혈장의 TRAP 수준과 DNA 손상도의 관계를 본 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 본 연구는 성인을 대상으로 인체내 항산화 비타민들의 영양상태 및 혈장 TRAP(total radical-trapping antioxidant potential) 농도와, 임파구 SCE 빈도수로 표현될 수 있는 DNA 손상 정도와의 상관 관계를 알아봄으로써 인체 임파구 SCE 빈도수 증가의 mechanism을 영양학적으로 규명해 보고자 하는 목적으로 수행되었다. 본 연구에서의 가정은 다음과 같았다.

첫째, DNA 손상 정도를 나타내주는 SCE 빈도수가 증가하면 신체 내 free radical 생산도 증가할 것이다. 이를 확인해 보기 위해 대상자들의 인체 임파구 SCE 빈도수를 먼저 측정하고, 신체 내 free radical 생산 정도에 대해서는 간접적인 방법, 즉 발생된 free radical을 얼마나 제거하는지를 알아보는 방법인 혈장 TRAP 농도를 측정하여 그 상관성을 봄으로써 SCE와 free radical 발생과의 상관관계를 확인하였다.

둘째, SCE 빈도수의 증가는 세포 밖에서의 free radical을 제거하는데 큰 역할을 하는 것으로 알려진 항산화 비타민들의 혈장 수준을 낮출 것이다. 이 가정을 검증하기 위해서는 free radical을 제거하는 것으로 알려져 있는 혈장 지용성 항산화 비타민들의 수준을 측정해보고 그 결과와 대상자들의 SCE 빈도수 간의 연관성을 분석해 보았다. 항산화 비타민들로는 retinol, α-tocopherol, γ-tocopherol, α-carotene, β-carotene, cryptoxanthin 등을 측정하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구 대상자

본 연구는 오스트리아 비엔나 지역에 거주하는 23~64세의 성인 남녀를 대상으로 실시되었다. 나이, 건강상태, 흡연상태 등을 조사하였으며 최종 선정된 대상자는 남자 24명, 여자 33명으로 모두 57명이었으며 이중 53%가 흡연자였다.

### 2. 채혈 및 생화학적 분석

#### 1) 혈액 채취

총 57명의 대상자로부터 본인의 동의를 얻어 채혈을 하였다. 대상자들은 채혈하기 전 8시간 이상 음식을 먹지 않도록 지도하였으며 이들로부터 약 10mL의 혈액을 제공받아 분석에 사용하였다. SCE 검사를 위해서는 heparin-

ated sterile 시험관에 전혈 3ml를 담고, 혈장 항산화 비타민의 분석과 혈장 TRAP 분석을 위해서는 항 응고제가 처리된 시험관에 혈액을 담아 3,000rpm에서 15분간 원심 분리한 후 혈장을 분리하여 미리 호일로 씌운 시험관에 넣은 후, 분석 시까지 -80℃ 냉동고에 보관하였다. 모든 혈액은 채혈하는 동안 냉장고에 보관하였다.

## 2) DNA 손상도 측정을 위한 SCE(sister chromatid exchange) test

### (1) 혈액 세포 배양

혈액 세포 중 임파구 배양을 위한 배양액으로 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco Co)을 사용하였으며 100unit/ml penicillin/Streptomycin(Sigma)과 15% heat inactivated fetal calf serum(Gibco co)을 첨가하여 pH 7.0으로 적정하였다. 배양액 10ml에 전혈 0.8ml를 첨가하고 Phytohemagglutinin(PHA, Sigma) 100µl와 5mM 5-bromodeoxyuridine(BudR)(Sigma) 50µl, heparin 100µl를 넣어서 잘 혼합하였다. BudR을 투여한 후 부터는 photolysis를 방지하기 위하여 모든 조작을 빛이 차단된 곳에서 실시하였고 배양 용기도 알루미늄 호일로 이중으로 싸서 37℃ 5% CO<sub>2</sub> incubator에 넣어 배양하였다.

### (2) 표본 제작

배양이 시작되고 70시간이 되면 배양을 중단시키기 위해 10 mg/ml의 colchicine(BDH)을 50µl씩 분주하고 다시 2시간 더 배양시켰다. 72시간의 배양이 끝나면 배양액을 원심분리관에 옮겨 1000rpm에서 5분간 원심분리 시키고 상등액은 제거하였다. 그후 Water bath에서 37℃로 예열된 0.075M KCl을 8ml씩 넣어 침전된 세포들을 조심스럽게 부유 시키고 5분간 water bath에서 정치시킨 후 다시 1000 rpm으로 5분간 원심분리 시켜 상등액을 제거하고 적당량(8ml 정도)의 고정액(methanol: glacial acetic acid = 3 : 1)으로 고정한 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 시켰다. 동일한 방법으로 고정액을 가하여 원심 분리하는 과정을 3회 정도 반복하여 적혈구를 완전히 제거한 후에 ethanol로 깨끗이 닦은 슬라이드 위에 떨어 뜨려 자연 건조시켰다. 표본 염색은 1974년 Perry & Wolff<sup>23)</sup>에 의해 개발된 Fluorescence plus Giemsa technique을 사용하였다. 53.4g의 NaHPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O를 약 800ml의 증류수에 녹인 다음 pH 10.4로 정확히 맞추어 1l의 Srenson's buffer를 사용하여 만든 5% Gurr's Giemsa 액에 슬라이드를 담가 15분간 염색하였다. 염색된 슬라이드를 흐르는 물에 살짝 씻어낸 후 증류수에 담갔다 꺼내어 여과지로 물기를 닦아내고

자연 건조시켰다.

### (3) SCE 관찰

표본은 광학 현미경으로 관찰하면서 2차 분열된 중기 염색체(M2)를 가진 세포를 찾고 46개의 염색체 수를 확인한 다음 이 중 염색체 교환이 일어난 곳을 모두 세어 SCE를 관찰하였다. 염색체 교환이 염색체의 centromere에서 관찰될 경우 같은 지점에서 twisting이 일어난 경우는 제외하였다. 각 표본 당 세포는 50개씩을 관찰한 후 세포 당 평균 빈도수를 계산하여 SCE 빈도수로 표시하였다. 대상자 1인에 대한 50개의 염색체 표본 중 세포당 SCE 빈도수가 전체 SCE 빈도수의 95 percentile 이상인 세포는 high frequency cell(HFC)로 분류하여 HFC 빈도수를 구하였다.<sup>24)</sup> SCE 빈도수의 측정 및 평가 작업은 단일 관찰자에 의해 수행되었으며 대상자에 대한 정보를 차단하여 측정 및 평가 작업이 blind로 실시되도록 하였다.

### 3) 혈장 TRAP 측정

혈장 중 TRAP은 Rice-Evans and Miller<sup>25)</sup>의 inhibition assay 법에 따라 분석하였다. 이 방법은 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazole-6-sulfonate), 150 µM)와 metmyoglobin(2.5µM)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(75µM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 흡광도를 측정하는데 기초를 두고 있으며 그 흡광도의 억제 정도는 sample(0.84% plasma)에 들어 있는 항산화 능력에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30℃에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

### 4) 혈장 항산화 비타민 측정

혈장 지용성 항산화 비타민인 carotenoids(α-carotene, β-carotene, cryptoxanthin), α-tocopherol 및 γ-tocopherol 그리고 retinol 함량은 reversed-phase HPLC를 이용하여 분석하였다.<sup>26)</sup> 즉, -80℃에 냉동되어 있던 혈장을 꺼내어 실온에서 녹여 methanol로 단백질을 침전시킨 후 n-hexane으로 지질 성분을 추출하였다. Rotary evaporator로 n-hexane을 증발시킨 후 남은 부분을 dichloromethane과 methanol이 15 : 85의 비율로 섞인 eluent (mobile phase)로 녹여낸 후, 150µl를 취해 HPLC의 guard-column에 주입시키고 UV detector가 달린 HPLC로 분석하였다. α-carotene, β-carotene, cryptoxanthin 등

carotenoids는 450nm,  $\alpha$ - 및  $\gamma$ -tocophrol은 295nm, 그리고 retinol은 325nm에서의 흡광도를 읽은 후 각 영양소의 농도는 external calibration curve를 사용하여 curve 밑의 area로부터 계산하였다. 분석시 사용한 HPLC의 조건은 Table 1과 같다.

### 3. 자료의 처리

모든 자료는 MS의 excel database system을 이용하여 입력한 후 SPSS-PC+ 통계 package(version 7.0)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치  $\pm$  표준오차(SE)를 구하였으며 두 군간의 유의적인 차이는 Student t-test에 의해 알아보았다. 각 군별 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F 값을 구하였고 LSD(least-significant-difference) test를 이용하여 각 군 간의 유의성의 차이를 검증하였다. 변수들 간의 이변량 상관관계는 Pearson's correlation coefficient인 r 계수로 검증하였다.

**Table 1.** HPLC apparatus and conditions for retinol, carotenoids, tocopherols and ubiquinone

HPLC-precolumn	Merck, LiChrospher 100 RP-18(10 $\mu$ m) 4 $\times$ 4mm
HPLC-column	Merck, LiChrospher 100 RP-18(10 $\mu$ m) 250 $\times$ 4mm
Pump	Gynkotek High Precision Pump Model 300 $^{\circ}$ C - Flow rate: 0.8ml/min, Pressure: 35 - 40 bar
Detector	Linear Uvis 204 - Wave lengths: 325nm for retinol 295nm for tocopherol 450nm for carotenoids
Integrator	Merck-Hitachi L-7500 Chromato-Integrator - Running time: 35min
Mobile phase	Methanol/Dichloromethane = 85: 15(v/v)

## 실험결과

대상자들의 일반 사항 및 혈장 TRAP 농도와 항산화 비타민 영양상태는 Table 2와 같다. 평균 나이는 남자 33.0세(24~64세), 여자 38.6세(23~57세)로 여자의 나이가 많았으나 유의적인 차이는 아니었으며 전체 대상자 평균 나이는 36.4세(23~64세)였다. 대상자 중 흡연자 비율은 53%를 보였으며 성별 차이는 보이지 않았다. 흡연자의 평균 나이는 35.7  $\pm$  2.0세, 비흡연자의 평균 나이는 37.1  $\pm$  2.4세로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈장 TRAP 농도는 남자 1.32  $\pm$  0.08mM, 여자 1.22  $\pm$  0.06mM로 여자에 비해 남자에게서 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다. 대상자의 혈장 항산화 비타민 수준은 남자보다 여자에게서 대체로 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다. 그러나 여자의 혈장  $\beta$ -carotene 수준은 31.08  $\pm$  3.31 $\mu$ g/dl로서 21.01  $\pm$  3.53 $\mu$ g/dl을 보인 남자에 비해 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ). 인체 DNA 손상정도는 비흡연자에 비해 흡연자에게서 더 높게 일어나고 있음이 보고되고 있으므로<sup>7,8,26,27</sup> 본 연구에서는 대상자를 흡연자와 비흡연자로 나누어 DNA 손상정도를 SCE 빈도수 및 HFC 빈도수로 관찰하였으며 그 결과는 Table 3과 같다. 흡연자의 세포당 SCE 빈도수는 평균( $\pm$  SE) 10.41  $\pm$  0.40을 보여 8.90  $\pm$  0.40을 보인 비흡연자에 비해 유의적으로 높았으며, 평균 HFC도 비흡연자에 비해 흡연자에게서 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ).

대상자의 혈장 TRAP 및 항산화 비타민 영양상태와 DNA 손상정도를 나타내는 지표인 SCE와 HFC 빈도수와의 상관관계를 본 결과는 Table 4와 같다. 혈장 TRAP 수준과 SCE 혹은 HFC 빈도수 사이에는 약한 역의 상관관계( $r =$

**Table 2.** Characteristics and plasma level of TRAP, antioxidant vitamins in male and female subjects(mean  $\pm$  SEM)

	Male(n = 23)	Female(n = 34)	Total(n = 57)
Age	33.0 $\pm$ 2.3	38.6 $\pm$ 1.9	36.4 $\pm$ 1.5
Current smokers	n = 12(52.2%)	n = 18(52.9%)	n = 30(52.6%)
Cigarettes/day	14.8 $\pm$ 2.0	11.2 $\pm$ 1.4	12.6 $\pm$ 1.2
Duration of smoking(yrs)	12.1 $\pm$ 1.4	13.9 $\pm$ 2.4	13.3 $\pm$ 1.6
Smoking pack years	6.5 $\pm$ 1.4	8.4 $\pm$ 2.0	7.7 $\pm$ 1.4
TRAP(mM)	1.32 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.06 <sup>NS1)</sup>	1.25 $\pm$ 0.04
$\alpha$ -carotene( $\mu$ g/dl)	9.76 $\pm$ 1.50	13.14 $\pm$ 1.36	11.84 $\pm$ 1.03
$\beta$ -carotene( $\mu$ g/dl)	21.01 $\pm$ 3.53	31.08 $\pm$ 3.31*	27.12 $\pm$ 2.51
Cryptoxanthin( $\mu$ g/dl)	27.67 $\pm$ 7.16	43.46 $\pm$ 8.64	35.94 $\pm$ 5.73
Retinol( $\mu$ g/dl)	48.21 $\pm$ 2.54	47.11 $\pm$ 1.93	47.56 $\pm$ 1.53
$\alpha$ -tocopherol(mg/dl)	1.00 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.05	1.07 $\pm$ 0.03
$\gamma$ -tocopherol( $\mu$ g/dl)	103.7 $\pm$ 8.1	114.5 $\pm$ 11.7	110.1 $\pm$ 7.7

1) NS,  $p > 0.05$       \*:  $p < 0.05$

**Table 3.** Frequencies of spontanous SCE and HFC<sup>1)</sup> per cell of the subjects

	No. of subject	SCE/cell		HFC/cell	
		Mean ± SEM	p-value <sup>2)</sup>	Mean ± SEM	p-value
Total	57	9.72 ± 0.30		5.78 ± 0.95	
Smokers	30	10.41 ± 0.40		7.60 ± 1.39	
Nonsmokers	27	8.90 ± 0.40	0.011	5.64 ± 1.13	0.030

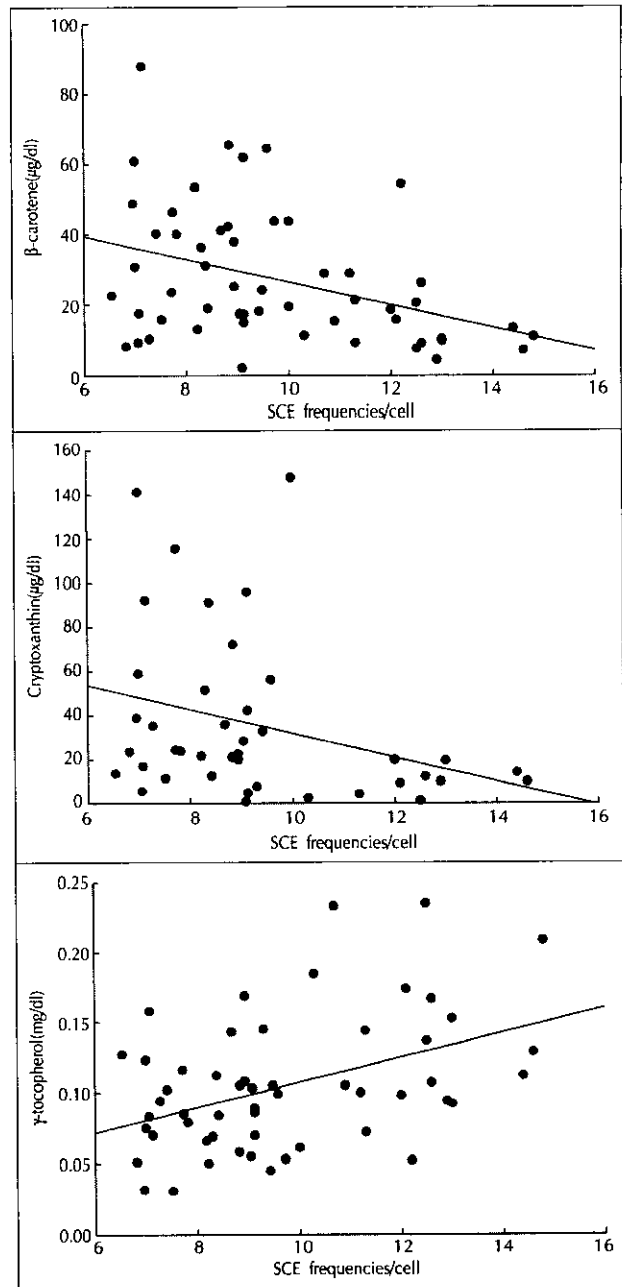
1) HFC: mean of high SCE frequency cells which were calculated from the highest five metaphases for each study subject  
 2) Significance between smokers and nonsmokers using Student t-test

**Table 4.** Significance of correlation between DNA damage endpoints and TRAP or antioxidant vitamin status<sup>1)</sup>

	SCEs/cell		HFCs/cell	
	r <sup>1)</sup>	p-value	r	p-value
TRAP	-0.305	0.085	-0.297	0.093
α-carotene	-0.117	0.419	-0.162	0.260
β-carotene	-0.385** <sup>2)</sup>	0.004	-0.392**	0.003
Cryptoxanthin	-0.312*	0.047	-0.335*	0.032
Retinol	0.188	0.182	0.134	0.344
α-tocopherol	-0.011	0.935	-0.033	0.812
γ-tocopherol	0.421**	0.001	0.390**	0.003

1) Pearson's correlation coefficients  
 2) \*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01

-0.304, r = -0.297, p < 0.1)가 관찰되었다. SCE 혹은 HFC 빈도수는 혈장 β-carotene 수준과 각각 역의 상관관계(상관계수 r = -0.385 및 r = -0.392, p < 0.01)를 나타내었고, cryptoxanthin 수준과도 각각 음의 상관관계(r = -0.312, r = -0.335, p < 0.05)를 보였다. 그러나 혈장 γ-tocopherol 수준과는 양의 상관관계(r = 0.421, r = 0.390, p < 0.01)를 보였다(Fig. 1). 나머지 항산화 비타민들과 SCE 혹은 HFC 빈도수와는 유의적인 상관관계를 볼 수 없었다. 대상자를 DNA 손상도에 따라 SCE 빈도수가 낮은 저손상군(SCE ≤ 8.4), SCE 빈도수가 중간인 중손상군(SCE 8.41~10.5), SCE 빈도수가 높은 고손상군(SCE > 10.5)의 세 군으로 나누어 각 군의 혈장 TRAP 수준 및 항산화 영양소 수준을 관찰한 결과는 Table 5와 같다. SCE 빈도수가 낮은 저손상군에 비해 SCE 빈도수가 높은 고손상군에서 혈장 TRAP 수준이 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 아니었다. 혈장 α-tocopherol 농도도 SCE 빈도수에 따른 군별로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 혈장 β-carotene과 cryptoxanthin 수준은 저손상군에 비해 고손상군에서 유의적으로 감소하였으며, 혈장 γ-tocopherol 수준은 저손상군 및 중손상군에 비해 고손상군에서, 혈장 retinol 수준은 중손상군에 비해 고손상군에서 유의적으로 증가하였다. 혈장 TRAP과 항산화 영양



**Fig. 1.** Regression analysis of plasma β-carotene, cryptoxanthin and γ-tocopherol levels on mean SCEs/cell in the subjects.

상태와의 상호관련성을 Pearson의 상관계수로 살펴본 결과는 Table 6과 같다. 혈장 TRAP 농도는 대상자의 항산화 영양상태와 아무런 관련성을 보이지 않은 반면, 혈장 α-carotene 수준은 혈장 β-carotene 및 cryptoxanthin 수준과 각각 양의 유의적인 상관관계를 보였다(r = 0.496, p < 0.01; r = 0.365, p < 0.05). 혈장 β-carotene 수준은 cryptoxanthin 수준과 양의 상관관계(r = 0.724, p < 0.01), 혈장 retinol 수준과는 음의 상관관계(r = -0.368,

**Table 5.** Plasma concentrations of TRAP and antioxidant vitamins of low, medium and high frequencies of SCE groups<sup>1)</sup>

	SCE frequencies/cell		
	Low(≤ 8.4)(n = 17)	Medium(8.41 - 10.5)(n = 16)	High(> 10.5)(n = 17)
TRAP(μmole/L)	1.33 ± 0.09	1.32 ± 0.07	1.12 ± 0.10
α-carotene(μg/dL)	11.53 ± 1.24	13.61 ± 1.94	10.80 ± 2.28
β-carotene(μg/dL)	33.13 ± 4.98 <sup>a</sup>	31.67 ± 4.51 <sup>a</sup>	17.33 ± 2.81 <sup>b</sup>
Cryptoxanthin(μg/dL)	47.86 ± 10.25 <sup>a</sup>	37.73 ± 9.83 <sup>ab</sup>	11.16 ± 2.08 <sup>b</sup>
α-tocopherol(mg/dL)	1.05 ± 0.08	1.07 ± 0.04	1.08 ± 0.06
γ-tocopherol(mg/dL)	84.54 ± 8.04 <sup>a</sup>	95.91 ± 9.26 <sup>a</sup>	134.01 ± 12.42 <sup>b</sup>
Retinol(μg/dL)	46.25 ± 1.88 <sup>ab</sup>	44.58 ± 2.68 <sup>a</sup>	52.09 ± 3.16 <sup>b</sup>

1) Mean ± SEM: Values within each row not sharing a common superscript letter are statistically different at  $p < 0.05$ (One-way ANOVA and the least-significant-difference test)

**Table 6.** Pearson's correlation coefficients between plasma TRAP and antioxidants in the subjects

	TRAP	AC	BC	CR	RE	AT
α-carotene(AC)	NS					
β-carotene(BC)	NS	0.496** <sup>1)</sup>				
Cryptoxanthin(CR)	NS	0.365*	0.724**			
Retinol(RE)	NS	NS	-0.368**	-0.461**		
α-tocopherol(AT)	NS	NS	NS	NS	0.304*	
γ-tocopherol(GT)	NS	NS	NS	NS	NS	0.439**

1) \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$

$p < 0.01$ )를 보였으며, 혈장 cryptoxanthin 수준은 혈장 retinol 수준과 음의 상관관계를 보였다( $r = -0.461$ ,  $p < 0.01$ ). 혈장 retinol은 α-tocopherol과 양의 상관관계를 보였으며( $r = 0.304$ ,  $p < 0.05$ ), α-tocopherol 수준은 γ-tocopherol과 양의 상관관계를 보였다( $r = 0.439$ ,  $p < 0.01$ ).

## 고찰 및 결론

인체 DNA 손상정도를 알아보기 위해 임파구 SCE 빈도수를 측정하는 방법은 염색체 이상을 보는 다른 방법보다 더 민감한 mutagenic biomarker 임이 보고되고 있다.<sup>29)</sup> 관찰한 세포중에서 SCE 빈도수가 높은 5개의 세포를 선정하여 그 평균을 구하는 HFC 지표는 유전독성물질에 만성적으로 노출되었을 경우 이를 분석해내는데 SCE 빈도수보다 더 강력하다는 보고도 있다.<sup>4,29)</sup> HFC는 SCE에 비해서 지속적이고 누적적인 영향을 반영하는데, 혹은 보다 민감한 임파구 집단의 존재를 알아내는데 더 좋은 지표가 되므로 SCE 빈도수 분석의 중요성만큼 HFC 분석도 중요하게 취급될 수 있다.<sup>30)</sup>

본 연구에서는 흡연자의 SCE와 HFC 빈도수가 비흡연자에 비해 높았으며 이는 여러 선행 연구들<sup>31-39)</sup>에서 보고된 바와 같다. 흡연자에게서 SCE 빈도수가 증가하는 이유 중 하나는 흡연에 따른 ROS의 증가로 인해 흡연자의 항산화 영양상태가 나빠지기 때문이다. 체내 ROS가 증가하면 항

산화 영양상태가 악화되며 이는 DNA 손상도를 증가시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 DNA 손상 정도를 나타내 주는 SCE 빈도수가 증가하면 신체 내 free radical 생산도 증가할 것이며 세포 밖에서의 free radical을 제거하는데 큰 역할을 하는 것으로 알려진 항산화 비타민들의 혈장 수준을 낮출 것이라는 가정 하에 이 지표들 간의 관련성을 분석하여 보았다. 연구 결과, 대상자의 DNA 손상정도는 혈장 TRAP 수준 및 혈장 β-carotene, cryptoxanthin 및 γ-tocopherol 수준과 상호 관련성이 있는 것으로 나타났다. 즉, 대상자의 DNA 손상정도를 나타내는 SCE 및 HFC 빈도수는 혈장 TRAP 수준과 약한 역의 상관관계를 보였고, 혈장 β-carotene 및 cryptoxanthin 수준과 강한 역의 상관관계를 보여 임파구 SCE 빈도수의 증가는 신체 내 free radical 포집능인 TRAP 수준을 낮추고 항산화 영양소의 수준도 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 인체 임파구 DNA 손상도가 증가하는 것은 대상자의 free radical 생산이 증가하는 것에 간접적으로 기인하며, 이는 항산화 영양상태가 낮아지는 것과 연관되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 체내 free radical 생산 증가로 인한 항산화 영양상태 저하가 임파구 DNA 손상 증가의 한 기전이 될 수 있음을 나타내준다.

SCE 빈도수로 본 DNA 손상과 이에 영향을 미치는 혈장 항산화 비타민 수준에 관한 연구는 많지 않다. 외국에서의 연구로는 최근 혈장 α-tocopherol, 비타민 C, β-carote-

ne 및 retinol 수준과 SCE 빈도수와의 관계를 본 연구들<sup>31,34</sup>이 있으나 항산화 비타민들 중 최근 체내 항산화제로서의 중요성이 활발히 보고되고 있는  $\gamma$ -tocopherol 이나  $\alpha$ -carotene 및 여러 carotenoids 들의 혈장 수준과 SCE 빈도수와의 관계에 관한 보고는 거의 없으며, 혈장의 TRAP 수준과 SCE 빈도수와의 관계를 본 연구도 아직 보고된 바 없다. 이 방면에 대한 국내에서의 연구도 매우 제한되어 있다. 인체 임파구 SCE 빈도수에 관한 연구가 몇 편 보고되고 있으나,<sup>27,32,33,35</sup> 흡연과 관련된 연구가 대부분이며, 혈장 항산화 비타민이나 혈장 TRAP 수준과 관련시켜 본 연구는 없다. 또 혈중 항산화 비타민 수준에 관한 연구도 여러 편 보고되고 있으나, 주로 흡연자와 환자들을 대상으로 항산화 비타민 수준과 면역 능력,<sup>36</sup> 항산화 효소 활성,<sup>37</sup> 지질과산화 및 혈중 지질 수준과의 관련성<sup>38,39</sup>을 본 연구들이며 혈장 항산화 비타민 수준을 인체 임파구 SCE 빈도수 및 혈장 TRAP 수준과 관련시켜 그 mechanism을 분석하여 본 연구는 국내에서 아직 보고된 바 없다. 외국에서의 연구를 보면, van Popple 등<sup>40</sup>은 남자 흡연자를 대상으로 혈장 항산화 비타민 수준과 임파구 SCE 빈도수와의 관계를 분석해 본 결과, 흡연자에게서 SCE 빈도수가 높은 동시에 혈장 beta-carotene과 vitamin C 수준이 낮음을 관찰하였으나 SCE 빈도수와 혈장 항산화 비타민 수준사이에 어떤 유의적 상관관계는 발견하지 못하였다. 그러나 Hageman 등<sup>31</sup>은 흡연자의 임파구 SCE 빈도수와 혈장 vitamin E 수준사이에 역의 상관관계가 있음을 보고하였다. 또 *In vitro* 방법으로 인체 임파구 SCE 빈도수를 감소시키는 효과가 있음이 보고되었다.<sup>41</sup> 1989년 van Rensburg 등<sup>2</sup>은 흡연자의 SCE 빈도수와 reactive oxidants의 발생정도 사이에는 정의 상관관계가 있었다고 보고하였다. 한편 녹차를 규칙적으로 섭취하는 사람의 SCE 빈도수가 커피 마시는 사람의 SCE 빈도수보다 더 낮았으며,<sup>7</sup> 비타민 A, C 및 E 그리고 selenium 섭취가 임파구 SCE 빈도수에 미치는 영향을 본 결과, 비타민 C와 E 섭취는 SCE 빈도수와 상관관계가 나타나지 않은 반면, 비타민 A와 selenium의 섭취는 SCE 빈도수와 역의 상관관계가 있음이 보고되었다.<sup>4</sup> 그러나 흡연자에게 14주 동안 beta-carotene을 보충 투여한 후에도 임파구 SCE 빈도수는 변화가 없었다는 연구도 있다.<sup>42</sup> 우리 나라에서 진행된 선행연구<sup>27</sup>에서는 노인의 비타민 C 섭취량과 임파구 SCE 빈도수 사이에 유의적인 역의 상관관계가 있는 것이 보고되었다.

본 연구결과, 인체 임파구 SCE 빈도수의 증가가 free radical의 발생으로 인한 TRAP 수준의 저하와 관련이 있을 뿐 아니라 항산화 비타민 중 혈장  $\beta$ -carotene 및 cryp-

toxanthin 수준 저하와도 관련이 있는 것을 관찰하였으며 이 결과로부터 인체 임파구 DNA 손상에 대한 작용 기전을 부분적으로 밝힐 수 있었다. 그러나 임파구 SCE 빈도수와 혈장  $\gamma$ -tocopherol 수준 사이에 유의적인 정의 상관관계가 있는 것으로 나타난 것은 해석하기 어려웠다. 최근 *in vitro* 실험에서 지질 과산화물에 대한  $\gamma$ -tocopherol의 항산화 활성도가  $\alpha$ -tocopherol보다도 높다는 연구결과<sup>42,43</sup>가 보고되면서, 식품에 다량 함유되어 있어 인체 비타민 E의 주된 공급형태이면서도 그 동안 상대적으로 소홀히 취급되어 왔던  $\gamma$ -tocopherol에 대한 관심이 증가하고 있다. 그러나 아직까지 인체 혈장의  $\gamma$ -tocopherol 수준과 관련된 분자역학 연구는 많이 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서 SCE 및 HFC 빈도수와 혈장  $\gamma$ -tocopherol 수준과의 사이에 정의 상관관계가 나타난 것은 그 원인을 알기 어려우나 상당히 흥미 있는 결과라고 볼 수 있다. 앞으로 혈장  $\alpha$ -tocopherol 뿐 아니라  $\gamma$ -tocopherol 수준과 여러 관련요인에 관한 분자 역학적인 접근이 이루어져야 하리라고 본다.

Literature cited

- 1) Wilcosky TC, Rynard SM. Sister chromatid exchange. In: Hulka BS, Wilcosky TC, Griffith JD(Eds), Biological Markers in Epidemiology. New York, Oxford University Press, pp.105-12, 1990
- 2) van Rensburg CE, Theron A, Richards GA, van der Merwe CA, Anderson R. Investigation of the relationship between plasma levels of ascorbate, vitamin E and beta-carotene and the frequency of sister-chromatid exchanges and release of reactive oxidants by blood leucocytes from cigarette smokers. *Mutation Research* 215(2): 167-172, 1989
- 3) Anderson R, Theron AJ, Ras GJ. Ascorbic acid neutralizes reactive oxidants released by hyperactive phagocytes from cigarette smokers. *Lung* 166: 149-159, 1988
- 4) Cheng TJ, Christiani DC, Xu X, Wain JC, Wiencke JK, Kelsey KT. Glutathione S-transferase genotype, diet, and smoking as determinants of sister chromatid exchange frequency in lymphocytes. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 4: 535-542, 1995
- 5) Ashby J, Richardson CR. Tabulation and assessment of 113 human surveillance cytogenetic studies conducted between 1965 and 1984. *Mutation Research* 154: 111-133, 1985
- 6) Wolff S(ed). Sister Chromatid Exchange. New York: John Wiley & Sons, 1982
- 7) Shim, JS, Kang MH, Kim YH, Roh JK, Roberts C, Lee IP. Chemopreventive effect of green tea(*Camellia sinensis*) among cigarette smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 4: 387-391, 1995
- 8) Kelsey KT, Wiencke JK, Little FF, Baker Jr EL, Little JB. Effects of cigarette smoking and solvent exposure on sister chromatid exchange frequency in painters. *Environment Molecular Mutagenesis* 11: 389-399, 1988
- 9) Dhillon VS, Kler RS, Dhillon I. Chromosome instability and sister chromatid exchange(SCE) studies in patients with carcinoma of cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 86: 54-57, 1996
- 10) Dhillon VS, Bhasker R, Kler RS, Husain SA. Sister chromatid exchange(SCE) studies in breast cancer patients: a follow-up study. *Cancer Genet Cytogenet* 80: 115-117, 1995

- 11) Shubber EK, Hamami HA, Allak BMA, Khaleel AH. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes from infants with Downs syndrome. *Mutation Research* 248: 61-72, 1991
- 12) Kang MH, Genser D, Elmadfa I. Increased sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of patients with Crohn's disease. *Mutation Research* 381: 141-148, 1997
- 13) Lee KH, Abe S, Yanabe Y, Matsuda I, Yochida MC. Superoxide dismutase activity and chromosome damage in cultured chromosome instability syndrome cells. *Mutation Research* 244: 251-256, 1990
- 14) Anderson R. Assessment of the roles of vitamin C, vitamin E, and  $\beta$ -carotene in the modulation of oxidant stress mediated by cigarette smoke-activated phagocytes. *American Journal of Clinical Nutrition* 53: 358S-361S, 1991
- 15) Fanton JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocytes-dependent inflammatory reactions. *American Journal of Pathology* 107: 397-418, 1982
- 16) Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Levine M. Ascorbic acid content of human B and T lymphocytes and monocytes. *Annual New York Academy of Science* 587: 275-277, 1990
- 17) Frei B, Sticker R, Ames BN. Anti-oxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of National Academy of Science USA* 85: 9748-9752, 1988
- 18) Burton GW, Ingold KU.  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569-573, 1984
- 19) Barton GM, Roath OS. Leukocyte ascorbic acid in abnormal leukocyte states. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research* 46: 271-274, 1976
- 20) Maderazo EG, Woronick CL, Hickingbotham N, Mercier E, Jacobs L, Bhagavan H. Additional evidence of auto-oxidation as a possible mechanism of neutrophil locomotory dysfunction in blunt trauma. *Crit Care Med* 18: 141-147, 1990
- 21) Pacht ER, Kasek H, Mohamed JR, Cromwell DG, Davis WB. Deficiency of vitamin E in the alveolar macrophage cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* 77: 789-796, 1986
- 22) Anderson R, Theron AJ. Physiological potential of ascorbate,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol individually and in combination in the prevention of tissue damage, carcinogenesis and immune dysfunction mediated by phagocyte-derived reactive oxidants. *World Review of Nutrition and Dietetics* 62: 27-58, 1990
- 23) Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature(London)* 258: 121-125, 1974
- 24) Moore DH, Carrano AV. Statistical analysis of high SCE frequency cells in human lymphocytes. In: Tice RR, Hollaender(eds), *Basic Life Sciences*, Vol 29, 469. Plenum, New York, 1984
- 25) Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. In: *Methods in Enzymology* vol 234, Academic Press Inc, pp.279-293, 1994
- 26) Kang MH, Genser D, Elmadfa I. Increased sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of patients with Crohn's disease. *Mutation Res* 381: 141-148, 1997
- 27) Kang MH, Lee JH. The effect of smoking habits and dietary factors of elderly people on gene mutation. *The research reports of MIWON Research Institute of Korean Food & Dietary Culture* 5: 463-486, 1992
- 28) Therman E, Susman M. Human chromosomes: Structure, behavior, and effects, 3rd ed, Springer, New York, pp.126-134, 1993
- 29) Carbonell E, Peris F, Xamena N, Creus A, Marcos R. SCE analysis in human lymphocytes of a Spanish control population. *Mutation Res* 335: 35-46, 1995
- 30) Tates AD, Grummt T, van Dam FJ, de Zwart F, Kasper FJ, Rothe R, Stirn H, Zwinderman AH, Natarajan AT. Measurement of frequencies of HPRT mutants, chromosomal aberrations, micronuclei, sister-chromatid exchanges and cells with high frequencies of SCEs in styren/dichloro-methane-exposed workers. *Mutation Res* 313: 249-262, 1994
- 31) Hageman G, vanden Oetelaar, Welle I, Beurskens-Comuth, Kleinjans J. Influence of smoking behavior in relation to plasma retinol and  $\alpha$ -tocopherol on sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 4: 289-293, 1995
- 32) Cho SS, Kang MH. The variation of the SCE frequency of human lymphocytes by smoking habits and dietary factors in college students. *Korean J Nutrition* 26(3): 313-324, 1993
- 33) Kang MH. Influence of dietary factors of smokers on smoking-induced DNA damage as reflected by sister chromatid exchanges(SCE). *Korean J Nutrition* 27(7): 740-751, 1994
- 34) MacGregor JT, Wehr CM, Hiatt RA, Peters B, Tucker JD, Langlois RG, Jacob RA, Jensen RH, Yager JW, Shigenaga MK, Frei B, Eynon BP, Ames BN. 'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutation Research* 377(1): 125-135, 1997
- 35) Kang MH, Lim SS. The effect of ginseng intake on the frequency of sister chromatid exchanges of human lymphocytes of adult smokers. *Korean J Nutrition* 27(3): 253-262, 1994
- 36) Kim WK. Effects of vitamin C supplementation on immune status in smoking and nonsmoking male college students. *Korean J Nutrition* 31(8): 1244-1253, 1998
- 37) Yoon GA. The relation of the elevated plasma lipid levels to plasma vitamin E status and activities of erythrocyte glutathione peroxidase in smokers. *Korean J Nutrition* 31(8): 1254-1262, 1998
- 38) Cho SH, Choi YS. Relation of serum vitamin E and lipoperoxide levels with serum lipid status in Korean men. *Korean J Community Nutrition* 2(1): 44-51, 1997
- 39) Yoon GA. Changes of vitamin C level, lipid peroxidation and lipid concentration in plasma of smokers and non-smokers. *Korean J Nutrition* 30(10): 1180-1187, 1997
- 40) van Popple G, Verhagen H, van't Veer P, van Bladeren PJ. Markers for cytogenetic damage in smokers: associations with plasma antioxidants and glutathione S-transferase mu. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2(5): 441-447, 1993
- 41) Edenharter R, Kerkhoff G, Dunkelberg H. Effects of  $\beta$ -carotene, retinol, riboflavin,  $\alpha$ -tocopherol and vitamin C and K1 on sister-chromatid exchanges induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole(Trp-P-2) and cyclophosphamide in human lymphocytes cultures. *Food and Chemical Toxicology* 36: 897-906, 1998
- 42) Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. Gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(7): 3217-3222, 1997
- 43) Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Figott V, Custer LJ, Moridan LJ. Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5): 1771-1775, 1993