J Korean Soc Food Sci Nutr
36(6), 708~719(2007)

한국식품영양과학회지

Glutathione *S*-Transferase 유전적 다형성이 항산화 체계에 미치는 영향

전경임 · 박은주†
경남대학교 식품영양학과

Effect of Glutathione *S*-Transferase Polymorphisms on the Antioxidant System

Gyeong-Im Jeon and Eunju Park†
Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract

Glutathione *S*-transferase genotypes GSTT1, GSTM1 and GSTP1 were characterized in 104 healthy male and female subjects and compared with parameters of oxidative stress at the level of DNA and lipids, with antioxidant enzymes, and with plasma antioxidants in smokers and non-smokers. Of the 104 subjects studied, 57.4% were GSTT1 present and 47.6% were GSTM1 present. The GSTP1 polymorphisms a and b were represented as follows: a/a, 75.5%; a/b, 21.6%; b/b type, 2.9%. The GSTT1 null genotype was associated with decreased glutathione in erythrocytes and elevated lymphocytes DNA damage. GST-Px was higher in GSTT1 null compared with GSTT1 present type. The homozygous GSTP1 genotype was not associated with any antioxidant status or DNA damage. The difference in plasma α-carotene and erythrocytes GSH-Px and GST activities between smokers and non-smokers was detected in the GSTT1 null genotype. Plasma γ-tocopherol and β-carotene decreased significantly in smokers having GSTM1 null genotype. When GSTT1 and GSTM1 were combined, plasma lycopene and erythrocyte GST were reduced in smokers in both null types of these genes. As for GSTP1 genotype, plasma α-carotene and erythrocytes GSH-Px decreased significantly in smokers with GSTP1 b/b, while erythrocytes GSH-Px activities decreased in smokers with GSTP1 a/b. The different β-carotene level between smokers and non-smokers was seen with both GSTP1 a/a and a/b genotype. It seems that polymorphisms in the phase II metabolizing enzyme glutathione *S*-transferase may be important determinants of commonly measured biomarkers.

Key words: glutathione *S* transferase polymorphisms; oxidative stress; DNA damage; antioxidant status; smoking

서 론

최근 우리나라는 급속한 경제 성장에 따라 생활양식과 식생활의 많은 변화를 겪고 있으며, 그에 따라 질병의 양상도 달라지고 있다(1). 통계청이 발표한 바에 따르면 1974년 이후 현재까지 악성신생물, 즉 암으로 인한 사망이 우리나라 사망률의 수위를 차지하고 있으며, 1983년에는 암으로 인한 사망률이 10만명당 72명이었던 것에 비해 2002년에는 130.7명으로 20년 동안 2배 정도로 꾸준히 증가하는 추세이다(2). 현재까지 밝혀진 암의 원인 혹은 위험요인으로 노화, 흡연, 환경오염, 만성 감염 등을 들 수 있으며, 이 요인들에 의해 신체 내에서 해로운 활성을 가진 활성산화물질(reactive oxygen species, ROS)의 생산이 비정상적으로 높아진다고 알려졌다(3,4).

ROS는 산소의 체내 대사과정 또는 흡연, 환경오염 등의 외부인자로부터 생성되며 일부는 체내에서 매우 중요한 역할도 하고 항산화 방어기전에 의해 제거되면서 균형을 유지하게 된다(5). 세포내 방어 기전은 superoxide radical과 H_2O_2 제거 항산화 효소인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등에 의해 수행되며(6), glutathione과 ascorbate도 세포 내 ROS의 독성을 중화시키는데 중요한 역할을 담당한다(7). 세포외의 ROS의 중화는 주로 혈장과 간질액에 고농도로 존재하는 비 효소계 방어 기전, 특히 ascorbate 및 지용성 항산화 비타민(vitamin E, carotenoids)들에 의해 이루어지고 있다(8,9). 그런데 나이를 먹으면서, 또는 환경오염에 노출이 증가되면서 ROS의 생성속도가 높아져 항산화계와의 균형이 깨어지면 산화적 스트레스 현상이 일어나고 그 결과로 DNA 손상을 유발하게 되며 이는 세포의 돌연변이를 유발해서 암으로까지 발전하게 된다고 알려져 있다(10).

최근들어 암 연구분야에 DNA 손상을 측정하기 위한 다양한 분자생물학적 지표들(molecular biomarkers)이 도입

†Corresponding author. E mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82 55 249 2218, Fax: 82 55 244 6504

되어 암 위험요인 소지자의 암 발생여부를 조기에 가려내거나 DNA 손상을 억제시킬 수 있는 항돌연변이 또는 항암물질을 이용한 중재 연구가 활발히 진행되고 있다(11-13). 인체의 DNA 손상을 측정하는 방법으로 그동안 DNA adduct, chromosomal aberration, sister chromatid 등의 방법이 사용되어 왔으나 비교적 최근에 소개된 comet assay(single cell gel electrophoresis)는 보다 신속하며 민감하게 DNA 손상정도를 측정할 수 있어서 분자역학연구(molecular epidemiology)에 다양하게 적용되어져 왔다(14-18). 우리나라에서도 comet assay를 이용해 건강한 성인 남성의 DNA 손상정도에 가장 큰 영향을 미치는 위험요인이 산화적 스트레스를 유발하는 흡연임이 보고되었고 또 흡연자들을 대상으로 한 포도주스 보충연구에서 포도의 항산화물질에 의해 DNA 손상이 유의적으로 감소하였음을 보고한 바 있다(19,20). 그밖에 Rao 등(21)은 구강암 환자의 oral squamous cell에서 유의적으로 높은 DNA 손상을 보고하였으며, 라돈 노출이 심한 지역 거주자 및 유방암, 난소암 환자에서 comet assay를 이용해 측정한 DNA 손상이 유의적으로 높은 것이 관찰되었다(22-24). 그러나 Wojewodzka 등(25)과 Nia 등(26)의 몇몇 연구들에서는 흡연과 DNA 손상간의 관련성이 없음을 보고하기도 하였으며 또한 4주간 매일 600 g의 채소와 과일의 섭취는 DNA 손상에 아무런 영향을 미치지 않았다는 등 상기의 연구결과와 서로 상반되는 것으로 나타났다(27).

이는 연구 대상자들의 인종적 차이, 표본수의 차이, 실험조건 및 방법의 차이 등으로 상반된 결과의 원인을 생각해 볼 수 있지만 무엇보다도 흡연을 비롯한 산화적 스트레스 유발 또는 발암물질이나 과일과 채소 같은 항산화물질 또는 항암물질에 대한 개인의 유전적 감수성(individual genetic susceptibility) 차이가 가장 큰 원인이라고 볼 수 있다(28-30). 즉, 외부 환경물질의 활성과 해독에 관여하는 효소 또는 산화적 스트레스를 유발하거나 억제하는 효소의 유전적 다형성(genetic polymorphisms)이 존재하기 때문에 개인에 따른 차이가 존재하며 이런 개인차이는 연구 전체의 결과에 영향을 미치므로 비슷한 연구 디자인임에도 불구하고 상반된 결과를 낼 수도 있는 것이다. 외부 환경물질의 체내 해독 및 산화적 스트레스에 관여하는 대표적인 효소로 glutathione *S*-transferase가 있으며 최근에 이 효소의 유전적 다형성과 암 발생률의 관계에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(31-34).

Glutathione *S*-transferase(GST)는 xenobiotic 대사효소인 phase II군(Fig. 1)의 속하는 효소로 phase I 효소계를 거친 전기친화적 합성물(electrophilic compounds)과 glutathione을 접합함으로 발암물질에 대해 보호체계를 형성하며 또한 체내에서 생성되는 유리 라디칼을 제거함으로 세포를 산화적 스트레스로부터 보호하는 등 발암물질로부터 인체를 보호하는 역할을 담당하는 매우 중요한 효소이다(35).

GST 효소는 α(GSTA), μ(GSTM), π(GSTP), θ(GSTT) 등 4가지의 아형이 알려져 있으며 이 중 GSTM1, GSTT1, GSTP1의 유전자 다형성이 보고되었다. GSTM1과 GSTT1은 결손 변이(null type)가 있는 경우 각각의 mRNA와 단백질이 생성되지 않아 효소의 기능을 상실하므로 발암물질 해독 및 산화적 스트레스 보호과정에 이상이 생겨 발암물질이 축적되어 암 위험률을 높인다고 알려져 있다. GSTP1 유전적 다형성은 전기친화적 기질(electrophilic substrate)에 붙는 소수성 결합 부위에 인접한 adenine(A)이 guanine(G)으로 치환되어 Isoleuicine(I_{105})이 Valine(V_{105})으로 바뀌어 나타나게 된다. 이러한 변화는 전기친화적 기질에 대한 특이활성도와 친화력에 영향을 끼쳐 GSTP1 효소활성도가 낮아져 암의 위험을 증가시킨다고 알려졌다(35,36).

이상에서 알 수 있듯이 GST는 산화 스트레스 방어작용 및 발암물질의 해독작용에 관여하므로 이 효소의 유전적 다형성은 개인의 암 위험률의 중요한 결정인자라고 볼 수 있다. 또한 GST 유전적 다형성은 산화 및 항산화와 관련된 생체지표, 즉 DNA 손상정도, 체내 항산화관련 효소 및 항산화 영양소 농도에 영향을 줄 수 있다는 것을 가정해 볼 수 있을 것이다. 이는 앞에서 언급한 흡연과 같은 산화물질이나

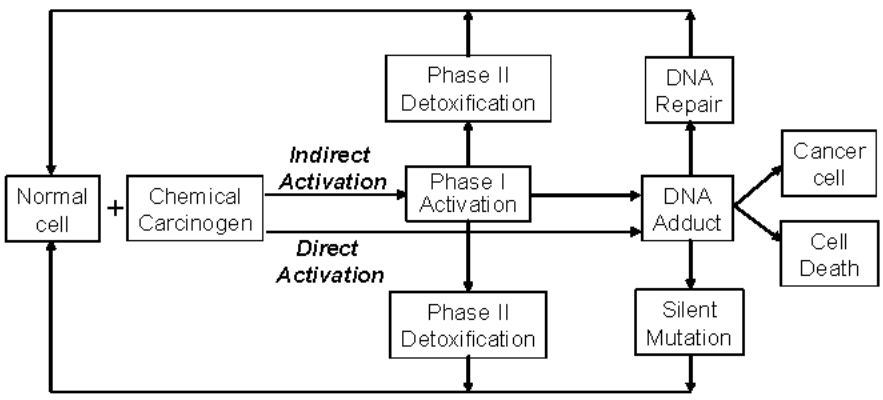

Fig. 1. Hypothetical pathway from exposure of the cell to either the development of cancer or cell death, with possible preventive mechanisms indicated (29).

과일, 채소에 함유된 항산화 물질에 대해 개인마다 다르게 반응하는 것은 유전적 감수성의 개인차에서 비롯된다는 것과 같은 맥락이라고 볼 수 있다. 따라서 population 연구에서 암 위험의 생체지표를 측정할 때 GST genotype을 조사하는 것은 매우 중요하다. 그러나 이제까지 보고된 GST 유전적 다형성에 관한 연구는 주로 암환자와 대조군을 대상으로 한 case-control 연구로 GST 유전적 다형성과 특정 암과의 관련성을 밝혔을 뿐이며 GST 유전적 다형성에 따른 DNA 손상정도, 체내 산화 및 항산화 관련 효소, 항산화 영양소 수준과의 관계에 대해서는 거의 연구가 되어 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 건강한 성인들을 대상으로 GST 유전적 다형성을 분석한 뒤 그들의 GSTM1, GSTT1 및 GSTP1 유전적 다형성에 따라 그룹을 나누어 DNA 손상정도, 항산화 효소 및 항산화 영양소 수준이 어떤 차이가 있는지 비교해 보고자 한다. 또한 우리 주위에서 가장 쉽게 접할 수 있으면서 산화유발물질을 다량 함유하고 있는 것으로 알려진 흡연과 GST 유전자 다형성의 상호관계를 살펴보고자 GST 유전적 다형성을 흡연 습관과 연관시켜 그룹을 나눈 뒤 산화·항산화 관련 생체지표에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 한다.

대상 및 방법

대상자 선정

본 연구는 경상남도에 거주하는 19세 이상 성인 남녀 104명을 대상으로 실시되었다. 설문지의 내용은 나이, 건강상태 등 일반사항, 신장과 체중, 흡연에 관한 사항, 비타민 영양제 복용 여부, 알코올 섭취 여부 등으로 구성하였다. 설문지를 통하여 인구 특성, 건강상태 및 생활습관(흡연, 음주, 운동 등)을 조사하였고, 신장, 체중 BMI, 체지방량 등의 신체계측 조사도 실시하였으며, 영양소 섭취상태 및 식습관은 24시간 회상법 및 식품섭취 빈도조사를 이용하여 조사하였다.

채혈

총 104명의 대상자로부터 본인의 동의를 얻어 채혈을 하였다. 채혈전 최소 8시간 이상은 음식물을 먹지 않도록 지도한다. 실험 대상자로부터 채혈한 혈액은 heparinated sterile tube에 담아 glutathione *S*-transferase polymorphisms 확인을 위해서 전혈 500 ㎕를 취해 -80°C 냉동고에 보관하였다. Comet assay를 위해서는 75 ㎕의 전혈(whole blood)을 취해 임파구를 분리한다. 나머지 혈액은 lithium-heparinic polystyrene에 담아 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 항산화 지용성 비타민과 TRAP 등의 분석을 위해 -80°C 냉동고에 보관하였다. 적혈구는 isoosmotic hosphate buffered saline으로 처리한 후 질소를 채운 뒤 항산화효소 분석을 위해 -80°C 냉동고에 보관하였다.

혈장 생화학치 분석

혈장 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방, GOT, GPT 및 포도당 수준은 (주)BCS의 kit 시약을 이용하여 Photometric Autoanalyzer(Biotron Scientific instruments BTR 815)로 측정하였다. LDL 콜레스테롤은 Friedewald식을 이용하여 계산하였다(37).

Table 1. Primer sequences used in the PCR reactions

Primer	Seqeunce (5′ 3′)
GSTT1 forw.	ttc ctt act ggt cct cac act tc
GSTT1 rev.	tca ccg gat cat ggc cag ca
GSTM1 forw.	gaa ctc cct gaa aag cta aag c
GSTM1 rev.	gtt ggg ctc aaa tat acg gtg g
GSTP1 forw.	acc cca ggg ctc tat ggg aa
GSTP1 rev.	tga ggg cac aag aag ccc ct
β Globin forw.	caa ctt cat cca cgt tca cc
β Globin rev.	gaa gag cca agg aca ggt ac

Glutathione *S*-transferase polymorphisms 확인

Glutathione *S*-transferase polymorphisms 확인은 GSTM1은 Pemble 등(38)의 방법을, GSTT1은 Bell 등(39)의 방법을, 그리고 GSTP1은 Harries 등(40)의 방법을 수정하여 실시하였다. 냉동보관해 두었던 전혈 500 ㎕를 DNA extraction kit(QIAamp DNA Blood Mini kit)를 사용하여 DNA를 추출하였다. Internal standard로 β-globin을 사용하여 유전자 확인을 위한 multiple PCR을 시행하였다. PCR 과정을 위한 primer는 (주)바이오니아에서 제작한 primer를 사용하였으며 염기서열은 Table 1과 같다.

GSTM1과 GSTT1의 유전자형 분석을 위해서 0.1 ㎍ genomic DNA를 각각의 10 nmol/mL primers, 5 mM/mL dNTP, 0.5 Unit Taq polymerase(Takara rTaq), 200 mM/mL Tris-HCl(pH 8.3), 500 mM/mL KCl과 30 mM/mL $MgCl_2$를 20 ㎕의 PCR 혼합액에 첨가하여 94°C에서 5분 처리 후 94°C에서 30초, 58°C에서 45초, 72°C에서 30초의 조건으로 35회 반복한 후 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 ethidium bromide(0.1 ㎍/mL)를 포함한 2.8% agarose gel에서 전기영동하여 UV 하에서 분석하였다.

GSTP1 유전자형 분석을 위해서 위와 같은 조건으로 PCR을 한 뒤 증폭된 PCR 산물을 BsmAI(New England Biolabs Inc.) 제한 효소를 사용하여 55°C에서 4시간 반응 후 ethidium bromide(0.1 ㎍/mL)를 포함한 2.8% agarose gel에서 전기영동하여 UV 하에서 분석하였다. 분석한 결과는 Fig. 2에서와 같이 나타난다. GSTP1의 유전자형은 176 bp PCR 산물이 BsmAI 효소에 의해 잘라지지 않은 경우, 제한부위가 없는 homozygous(a/a) wild type 유전자형이며 BsmAI 효소에 의해 잘라지는 경우 91과 85 bp 두개의 band가 있는 homozygous(b/b) wild type이며 3개의 band가 모두 나타나는 경우 heterozygous(a/b) heterozygous type이라고 한다.

적혈구내 항산화효소의 분석

적혈구내 catalase, glutathione peroxidase, glutatione

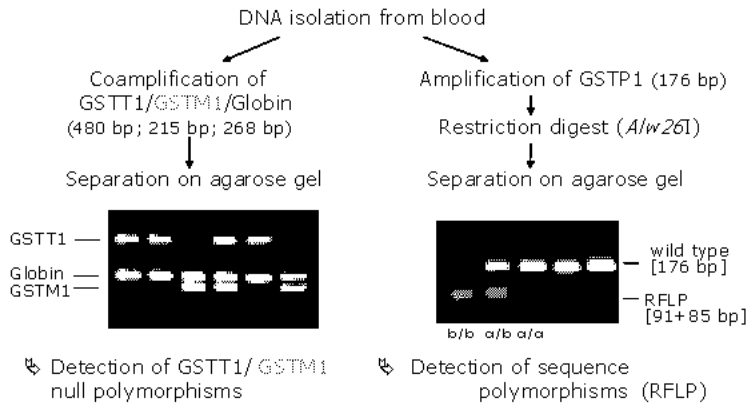

Fig. 2. GST genotyping.

S-transferase 등의 항산화효소와 glutathione의 분석은 각각 UV/VIS spectrophotometer에 의해 실시하였다. Catalase는 적혈구를 hydrogen peroxide로 처리한 후 hydrogen peroxide의 감소량을 240 nm에서 30초간 측정함으로써 값을 얻었다(41). Glutathione peroxidase는 과산화물(t-butyhydroperoxide)에 의해 glutathione이 산화되는 반응을 촉매한다. 그 다음에 이어지는 반응에서 산화된 glutathione은 glutathione reductase와 NADPH의 존재하에 다시 glutathione으로 환원되는데 이 때 감소된 NADPH 농도를 340 nm에서 90초간 측정함으로써 glutathione peroxidase의 항산화정도를 측정하였다(42). Glutathione *S*-transferase의 활성은 Habig 등(43)의 방법으로 측정하였다. 0.1 M phophate buffer 2935 μL, 0.1 M glutathione 30 μL, 효소원 10 μL, 0.12 M 2-4 CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 25 μL를 혼합하여 25℃에서 20초 간격으로 3분간 340 nm에서 측정한다. 활성단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 340 nm에서의 흡광계수로 환산하여 나타내었다. Glutathione(GSH)의 농도는 kit 시약(CALBIOCHEM, USA)을 이용하여 분석하였다.

혈장 항산화 비타민의 분석

혈청 지용성 항산화 비타민, retinol, α-tocopherol, γ-tocopherol, α-carotene, β-carotene, cryptoxanthin, coenzyme Q10의 분석은 HPLC에 의해 실시하였다(44). -80℃에 냉동되어 있던 혈장을 꺼내어 녹인 후 ehtanol로 단백질을 제거하였다. n-Hexane으로 지방을 추출한 후 rotary evaporator로 hexane을 증발시킨 후 mobile phase(methanol : dichloromethane-85:15) 150 μL에 녹여 HPLC의 guard column에 주입시켰다. Flow rate는 0.8 mL/min로 하며 UV/VIS detector를 사용하였다. 각 비타민별로 retinol은 325 nm, tocopherols은 295 nm, carotenoids는 450 nm, coenzyme Q10는 270 nm에서의 흡수율을 모니터하였다. 각 영양소의 농도는 external calbration curve를 사용하여 curve 밑의 area로부터 계산하였다.

혈장의 TRAP 분석

최근에 개발된 혈장 총 유리기포집 항산화능(TRAP, total radical-trapping antioxidant potential) 측정법은 sample 내 α-tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합된 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 나타내므로 시간과 노력을 절약할 수 있는 매우 유용한 방법이다. Sample 중 TRAP은 Rice-Evans와 Miller의 inhibition assay 법(45)에 따라 분석하였다. 이 방법은 ABTS(2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate), 150 μM)와 metmyoglobin(2.5 μM)을 H_2O_2(75 μM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 absorbance를 측정하는데 기초를 두고 있으며, 그 absorbance의 억제 정도는 sample에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample을 6분 동안 30℃에서 배양한 후 UV/VIS spectrometer로 740 nm의 파장에서 absorbance를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)으로 표현하였다.

LDL의 conjugated diene 측정

Conjugated dienes(CD) 형성은 지질의 과산화 현상으로 생기는 첫 물질이므로(46) LDL 산화정도를 보기 위해 혈장 CD 수준을 분석하였다. 혈장(1 mg/mL EDTA)에 trisodium citrate buffer(pH 5.05, 5 N HCl, 50,000 IU/L heparin)를 넣어 LDL을 침전시키고 Na-phosphate buffer(pH 7.4, 0.9% NaCl)로 녹였다. 다음으로는 chloroform : methanol(2:1) 3 mL를 첨가하고 증류수를 1 mL 넣은 후 지용성 부분만 취하여 rotary evaporator로 증발시켰다. 이것을 cyclohexane 1 mL로 녹인 후 234 nm에서 spectrophotometer로 분석하였

다(47).

Alkaline comet assay을 이용한 임파구 oxidative DNA damage 측정

Alkaline comet assay의 자세한 실험방법은 저자의 선행 연구에서 서술한 바 있다(15). 간단히 요약하면 전혈로부터 분리한 임파구에 산화적 스트레스를 가하기 위해 200 μM H_2O_2를 처리하였다. Alkali lysis buffer를 사용하여 DNA의 double strand를 풀어주었으며 lysis가 끝난 slide를 전기영동 buffer로 unwinding시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. Ethidium bromide로 핵을 형광 염색하여 형광현미경(Leica, Germany)으로 관찰하면서 CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image를 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다.

통계처리 및 각 요인과의 상관관계 분석

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치±표준오차(SE)를 구하고 두 군간의 평균치의 유의성은 Student's t-test로 검증하였다. 세 군 이상의 군별 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F값을 구하고 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군 간의 유의성 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

대상자 특성

연구 대상자의 연령, 성별, 흡연여부 및 GST 유전자 분포는 Table 2와 같다. 대상자 104명의 평균나이는 35.4±1.2세였고 남자가 88명, 여자 16명이었으며 그들 중 흡연자는 76명(남성 흡연자 74명, 여성 흡연자 2명)이었다. 전체 대상자들 중 각각 60명(57.4%), 42명(40.6%)이 GSTT1과 GSTM1의 유전자를 가지고 있었으며, GSTT1과 GSTM1 유전자 둘 다를 가진 대상자는 27명(25.7%), 둘 중에 하나만 가지고 있는 사람은 47명(45.5%) 그리고 둘 다 없는 사람은 30명으로 28.7%에 해당되었다. GSTP1 유전자의 경우 BsmAI 효소에 의한 제한부위가 없는 homozygous(a/a) wild type은 79명(75.5%)로 대부분의 대상자가 여기에 해당되었으며, heterozygous(a/b) heterozygous type은 22명(21.6%), 그리고 BsmAI 효소에 의해 잘라져 homozygous(b/b) wild type으로 나타난 대상자는 3명(2.9%)이었다.

Table 2. Characteristics of the study population N(%)

Variables	n=104
Age (yrs)	35.4±1.2[1] (19~69)
Male/Female	88/16 (84.6/15.4)
Smoker/Non smoker	76/28 (73.1/26.9)
GSTT1	
Present	60 (57.4)
Null	44 (42.6)
GSTM1	
Present	42 (40.6)
Null	62 (59.4)
GSTT1 and GSTM1 combined	
Both present	27 (25.7)
Null/Present	47 (45.5)
Both null	30 (28.7)
GSTP1	
a/a	79 (75.5)
a/b	22 (21.6)
b/b	3 (2.9)

[1]Mean±SE.

GSTM1 null type의 경우 유럽인, 일본인, 미국인들 중 50~60%, 인도인, 미국 흑인에서는 25%에서 나타나며 GSTT1 null type의 경우 아시아인에서는 50~60%, 유럽인, 미국인에서는 10~20%로 보고되었다(48). GSTP1의 경우 a/a, a/b, b/b type이 아시아인에서는 각각 66%, 30%, 4%, 백인에서는 각각 45%, 45%, 10%, 히스패닉 및 흑인은 30%, 50%, 20%의 분포로 인종마다 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다(49). 본 연구 대상자들의 GST 유전자 다형성 분포는 기존의 아시아인을 대상으로 한 연구와는 크게 다르지 않았으나, 백인, 히스패닉 또는 흑인들과는 매우 다른 GST 유전자 분포를 가지고 있다는 것이 본 연구를 통해서도 확인되었으므로 GST 효소 대사 관련 임상실험에서는 실험대상자의 인종이 큰 confounding factor로 작용한다는 것을 고려해야 할 것이다.

GST 유전자 다형성에 따른 혈장 생화학 분석치 및 항산화 영양상태 분석

연구 대상자 104명을 GSTT1 유전자 present type과 null type으로 나눈 뒤 그들의 혈장 생화학 분석치, 혈장 및 적혈구의 다양한 항산화 영양상태 및 임파구의 DNA 손상정도를 비교하여 Table 3에 나타내었다. GSTT1 present와 null 군간의 성별 분포는 차이가 없었으나 GSTT1 present 군의 흡연자 분포가 GSTT1 null 군에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났다. GSTT1 null type은 산화적 스트레스를 더 많이 받고 있는 것으로 알려진 흡연자의 비율이 present 군에 비해 낮음에도 불구하고 적혈구 GSH의 농도는 유의적으로 낮고 임파구 DNA 손상정도는 유의적으로 높은 것으로 나타났다.

GSTM1 유전자의 경우 present와 null type 간의 성별, 흡연자 분포는 유의적인 차이가 없었다(Table 4). 적혈구 GSH-Px의 활성만이 GSTM1 null type이 present type에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났으며, 나머지 다른 지표에서는 GSTM1 null type과 present type간의 유의적인 차이가 없었다.

GSTP1 유전자(Table 5)는 그 다형성에 따라 세 그룹으로 나누어지며, GSTP1 유전자 다형성에 따른 항산화 영양상태의 유의적인 차이는 없었다. 그러나 대부분의 대상자가 ho-

Table 3. Mean values of biomarkers calculated for different GSTT1 polymorphisms

Variables	GSTT1 present (N=60)	GSTT1 null (N=44)
Male/Female (%)	53/7 (87.9/12.1)	37/7 (83.7/16.3)
Smoker/Nonsmoker (%)	50/10 (82.8/17.2)	28/16 (62.8/37.2)*
Age (yrs)	34.1±1.6[1)]	36.0±1.9
Anthropometrics		
Height (cm)	170.0±1.0	168.6±1.2
Weight (kg)	69.0±1.4	71.8±1.8
BMI (kg/m^2)	23.8±0.4	25.1±0.4
Body fat (%)	21.4±0.8	23.0±0.9
Systolic blood pressure (mmHg)	127.1±1.6	130.9±2.8
Diastolic blood pressure (mmHg)	77.8±1.3	80.8±1.7
Plasma biochemicals		
GOT (U/L)	29.1±1.5	29.4±1.2
GPT (U/L)	25.4±2.2	23.4±1.8
Glucose (mg/dL)	85.3±4.8	79.9±1.5
Total cholesterol (mg/dL)	173.3±4.0	173.3±5.8
HDL cholesterol (mg/dL)	44.3±1.1	43.4±1.7
LDL cholesterol (mg/dL)	102.7±3.2	105.4±5.3
Triglycerides (mg/dL)	127.5±10.1	119.8±9.9
HDL C/Total C	26.8±0.9	26.0±1.0
Atherogenic index	2.96±0.13	3.13±0.18
Plasma antioxidant		
TRAP (mM)	1.27±0.01	1.28±0.01
Retinol (μg/dL)	97.2±3.2	91.9±3.4
γ Tocopherol (μg/dL)	190.1±12.4	211.9±10.4
α Tocopherol (μg/dL)	2018.0±102.2	1905.4±70.2
Lycopene (μg/dL)	15.3±1.6	14.0±2.0
α Carotene (μg/dL)	8.2±0.7	8.9±0.9
β Carotene (μg/dL)	36.1±2.6	38.9±3.9
Coenzyme Q10 (μg/dL)	108.5±8.2	105.6±8.0
Plasma lipid peroxidation		
Conjugated dienes (μM)	4.36±0.21	4.13±0.22
Erythrocytes antioxidants		
Catalase (U/g Hb)	164.3±6.5	162.4±8.9
Glutathione peroxidase (U/g Hb)	39.9±2.5	45.7±3.2
Glutathione S transferase (U/g Hb)	0.55±0.03	0.59±0.04
Glutathione (μM)	9.80±0.30	8.60±0.50*
Lymphcytes DNA damage		
Tail DNA (%)	7.71±0.23	8.91±0.37**
Tail moment	3.57±0.23	5.31±0.48**
Tail length (μm)	30.3±1.3	39.4±2.2**

[1)]Mean±SE.
*p<0.05, **p<0.01 significantly different by Chi square test for ratio of smokers/non smokers and by Student's t test for others.

mozygous(a/a) wild type에 속했고 homozygous(b/b) wild type은 104명의 대상자 중 3명뿐이어서 이 세 그룹의 항산화 영양상태를 비교하기 위한 ANOVA 통계 분석으로는 GSTP1 유전자 다형성에 따른 결과를 정확히 해석하기는 무리가 있는 것으로 생각되어 GSTP1 b/b type을 제외하고 a/a와 a/b 만을 Student's t-test로 비교해 보았으나 두 그룹 간에도 유의적인 차이는 없었다(자료 미제시).

155명의 중년남성을 대상으로 GST 유전자 다형성에 따른 DNA 손상도, 항산화 영양상태 등을 살펴 본 Dusinska 등(50)의 연구결과에서 대상자의 48%에 해당하는 GSTM1 null type이 present type에 비해 GSH 농도가 낮은 것으로 나타났으며, 대상자의 79%에 해당하는 GSTT1 null type의 경우 혈장 비타민 C의 농도가 present type에 비해 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 또한 81명의 임산부를 대상으로 GSTM1 유전자다형성과 산화적 DNA 손상도(소변내 8-hydroxydeoxy-guanosine 배설 측정)와의 관계를 살펴 본 결과 GSTM1 null type에 속하는 대상자들은 소변으로 손상된 DNA의 배출이 유의적으로 높은 것으로 보고하였다(51). 이와 같이 GSTT1 또는 GSTM1 null type에 해당하는 대상자들이 산화적 스트레스를 겪고 있는 것은 GSTT1 또는 GSTM1 유전자가 결손된 경우 환경오염물질이나 다양한 산화물질의 해독능력이 떨어지게 되고 이로 인해 체내 독성을 나타내는 대사물질이 원활하게 제거되지 못하고 체내 쌓이게 되며, 산화적 스트레스 영향을 더 많이 받게 되기 때문이라고 사료된다.

GSH-Px는 H_2O_2를 물로 중화시키는 반응의 촉매역할을 하는 항산화 효소로 알려져 있다(4). 흡연 등의 산화적 스트레스 유발 인자에 의해 적혈구 GSH-Px 활성의 반응은 연구

Table 4. Mean values of biomarkers calculated for different GSTM1 polymorphisms

Variables	GSTM1 present (N=42)	GSTM1 null (N=62)
Male/Female (%)	37/5 (87.8/12.2)	51/9 (85/15)
Smoker/Nonsmoker (%)	35/7 (82.7/17.1)	41/19 (68.3/31.7)
Age (yrs)	34.6±1.9[1)]	35.1±1.6
Anthropometrics		
Height (cm)	169.9±1.1	169.1±1.0
Weight (kg)	70.0±1.7	70.3±1.4
BMI (kg/m^2)	24.2±0.4	24.5±0.4
Body fat (%)	22.4±0.9	21.9±0.8
Systolic blood pressure (mmHg)	127.6±2.6	129.5±1.9
Diastolic blood pressure (mmHg)	79.8±1.6	78.7±1.4
Plasma biochemicals		
GOT (U/L)	26.8±1.0	30.9±1.5
GPT (U/L)	26.3±2.4	23.4±1.9
Glucose (mg/dL)	79.2±1.6	85.5±4.6
Total cholesterol (mg/dL)	178.3±6.4	169.9±3.6
HDL cholesterol (mg/dL)	105.8±5.8	102.5±2.9
LDL cholesterol (mg/dL)	44.1±1.5	43.8±1.2
Triglycerides (mg/dL)	133.2±10.0	118.1±9.8
HDL C/Total C	26.7±1.1	26.3±0.8
Atherogenic Index	3.03±0.18	3.03±0.13
Plasma antioxidant		
TRAP (mM)	1.28±0.01	1.28±0.01
Retinol (μg/dL)	98.9±4.1	92.2±2.8
γ Tocopherol (μg/dL)	203.9±12.5	196.3±11.4
α Tocopherol (μg/dL)	2013.7±102.2	1940.2±86.5
Lycopene (μg/dL)	14.5±2.0	14.9±1.5
α Carotene (μg/dL)	9.0±0.9	8.2±0.7
β Carotene (μg/dL)	37.6±3.8	37.6±3.8
Coenzyme Q10 (μg/dL)	118.3±9.3	99.7±7.3
Plasma lipid peroxidation		
Conjugated dienes (μM)	4.24±0.18	4.28±0.23
Erythrocytes antioxidants		
Catalase (U/g Hb)	161.1±8.0	165.1±7.0
Glutathione peroxidase (U/g Hb)	36.7±2.8	46.4±2.7*
Glutathione *S* transferase (U/g Hb)	0.57±0.04	0.56±0.03
Glutathione (μM)	9.11±0.43	9.41±0.37
Lymphcytes DNA damage		
Tail DNA (%)	8.30±0.38	8.17±0.25
Tail moment	4.38±0.42	4.27±0.33
Tail length (μm)	35.2±2.2	33.5±1.6

[1)]Mean±SE. *$p<0.05$ significantly different by Student's t test.

자마다 상이한 결과를 제시하고 있다. 예를 들면 Ozguner 등(52)은 흡연자들의 적혈구 GSH-Px 활성이 비흡연자에 비해 유의적으로 높다고 하였고, Kocyigit 등(53)은 적혈구 SOD활성은 흡연자에서 높지만 적혈구 GSH-Px 활성은 낮은 것으로 보고하였다. 또한 Durak 등(54)은 흡연자와 비흡연자간의 적혈구 항산화 효소활성은 차이가 없는 것으로 보고하였다. 이렇게 연구자마다 산화적 스트레스에 의한 GSH-Px 활성의 반응이 차이가 나는 것은 각 연구자마다 선택한 대상자들의 흡연량, 흡연년수, 대상자 성별 등의 차이에 의한 것으로 추측된다. 또한 흡연으로 인한 산화적 스트레스 상태에서 GSH-Px가 H_2O_2를 중화시키기 위해 그 활성이 증가되었거나, H_2O_2를 중화시키기 위해 이미 GSH-Px가 소진되어 그 활성이 감소된 것으로 해석될 수 있을 것 같기는 하나 아직은 이를 뒷받침할 만한 충분한 자료가 불충분하다. 따라서 본 연구결과 GSTM1 null type에서 적혈구 GSH-Px 활성이 present type에 비해 유의적으로 높게 나타난 것에 대해 정확한 해석을 위해서는 이에 관한 좀 더 자세한 기전 연구가 필요한 것으로 사료된다.

흡연과 GST 유전자 다형성의 상호작용

흡연은 우리 주위에서 가장 쉽게 접할 수 있는 산화유발물질을 다량 함유하고 있는 것으로써 여러 연구 결과 흡연으로 인한 산화적 스트레스와 암, 심혈관질환 등의 다양한 질병과의 관계가 밝혀졌다(55). GST는 흡연과 같은 산화적 유발물질이 체내로 들어 왔을 때 흡연의 함유된 다양한 유리 라디칼과 발암물질을 제거함으로 인체를 산화적 스트레스로부터 보호하는 중요한 역할을 담당하고 있다(35,36). 따라서 GST 유전자가 결손된 경우 GST 유전자를 다 갖춘 경우에

Table 5. Mean values of biomarkers calculated for different GSTP1 polymorphisms

Variables	GSTP1 a/a (N=79)	GSTP1 a/b (N=22)	GSTP1 b/b (N=3)
Male/Female (%)	72/7 (90.9/9.1)	15/7 (68.2/31.8)	3/0 (100/0)
Smoker/Nonsmoker (%)	61/18 (76.6/23.4)	14/8 (63.6/36.4)	3/0 (100/0)
Age (yrs)	34.2±1.3[1)]	38.4±3.1	28.3±5.3
Anthropometrics			
Height (cm)	169.9±0.8	166.6±1.8	175.8±1.8
Weight (kg)	71.1±1.2	67.2±2.5	64.9±1.2
BMI (kg/m^2)	24.6±0.3	24.1±0.5	21.0±0.8
Body fat (%)	21.9±0.6	22.7±1.7	18.9±2.2
Systolic blood pressure (mmHg)	128.0±1.7	132.6±3.7	126.0±1.5
Diastolic blood pressure (mmHg)	78.6±1.2	81.5±2.2	76.7±6.0
Plasma biochemicals			
GOT (U/L)	29.5±1.2	28.6±1.5	30.0±4.0
GPT (U/L)	25.4±1.8	21.5±1.9	24.7±4.4
Glucose (mg/dL)	84.3±3.7	80.1±2.1	73.7±1.8
Total cholesterol (mg/dL)	175.0±4.1	170.9±5.7	147.7±11.8
HDL cholesterol (mg/dL)	104.1±3.5	104.1±5.0	86.0±9.4
LDL cholesterol (mg/dL)	43.9±1.1	43.9±2.0	45.7±5.2
Triglycerides (mg/dL)	132.0±8.5	108.4±13.5	80.0±32.0
HDL C/Total C	26.1±0.8	27.0±1.3	31.6±5.0
Atherogenic Index	3.09±0.12	2.90±0.19	2.36±0.62
Plasma antioxidant			
TRAP (mM)	1.28±0.01	1.27±0.02	1.33±0.05
Retinol (μg/dL)	95.2±2.7	96.0±5.4	88.6±8.6
γ Tocopherol (μg/dL)	202.6±10.1	193.7±16.4	199.1±8.8
α Tocopherol (μg/dL)	2021.5±73.4	1812.3±154.9	1783.8±222.9
Lycopene (μg/dL)	15.2±1.5	12.4±2.0	16.0±5.4
α Carotene (μg/dL)	8.6±0.7	8.0±1.2	8.1±3.0
β Carotene (μg/dL)	35.2±2.5	41.7±4.6	51.8±21.5
Coenzyme Q10 (μg/dL)	106.0±6.7	112.1±12.8	124.4±12.2
Plasma lipid peroxidation			
Conjugated dienes (μM)	4.29±0.19	4.22±0.24	4.66±0.84
Erythrocytes antioxidants			
Catalase (U/g Hb)	162.9±6.3	168.8±10.1	157.6±22.7
Glutathione peroxidase (U/g Hb)	43.5±2.5	41.3±3.4	29.9±6.2
Glutathione S transferase (U/g Hb)	0.57±0.03	0.57±0.06	0.44±0.14
Glutathione (μM)	9.15±0.32	9.66±0.58	10.12±0.56
Lymphcytes DNA damage			
Tail DNA (%)	8.29±0.26	8.09±0.34	7.79±0.65
Tail moment	4.49±0.33	3.77±0.32	3.74±0.79
Tail length (μm)	35.5±1.6	30.0±2.0	29.7±6.4

[1)]Mean±SE.

비해 훨씬 더 산화적 스트레스의 영향을 많이 받을 것으로 가정해 볼 수 있다. 이에 대상자들을 각 GST 유전자 보유 여부에 따라 그룹을 나눈 뒤 다시 흡연자와 비흡연자로 나누어 항산화 영양상태를 살펴 본 결과를 Fig. 3~6에 나타내었다.

혈장 α-carotene 농도, 적혈구 GSH-Px와 GST 활성은 GSTT1 null type의 경우 흡연자에 비해 비흡연자가 유의적으로 높게 나타났으며, GSTT1 present type에서는 흡연자와 비흡연자간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 GSTT1 null type의 흡연자는 GSTT1 present type의 흡연자에 비해 산화적 스트레스를 더 많이 받는 것으로 사료된다. 반면 β-carotene의 혈장농도는 GSTT1 present type에서는 흡연자가 비흡연자에 비해 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 3).

한편, GSTM1 유전자의 경우 GSTM1의 null type에서 흡연자의 경우 비흡연자에 비해 혈장 γ-tocopherol과 β-carotene 수준이 유의적으로 낮은 것으로 나타났다(Fig. 4). GSTT1과 GSTM1 유전자를 조합하여 이 두 유전자가 다 있는 경우(both present), 둘 중에 하나만 있는 경우(present/null), 둘 다 없는 경우(both null)로 나누어 살펴 본 결과, 혈장 lycopene과 적혈구 GST 활성이 both null type의 유전자를 가진 흡연자가 같은 type의 비흡연자에 비해 유의적으로 낮은 것으로 나타났다(Fig. 5).

GSTP1 유전자의 경우 혈장 α-carotene과 적혈구 GSH-Px 활성은 a/a type의 흡연자가 비흡연자에 비해 유의적으로 낮았고, 적혈구 catalase의 활성은 a/b type에서 흡연자가 비흡연자에 비해 유의적으로 낮았으며, β-carotene 농도는 두 type 모두에서 유의적으로 흡연자가 낮게 나타났다(Fig. 6).

Dusinska 등(50)의 연구결과에서도 GSTT1 null type에

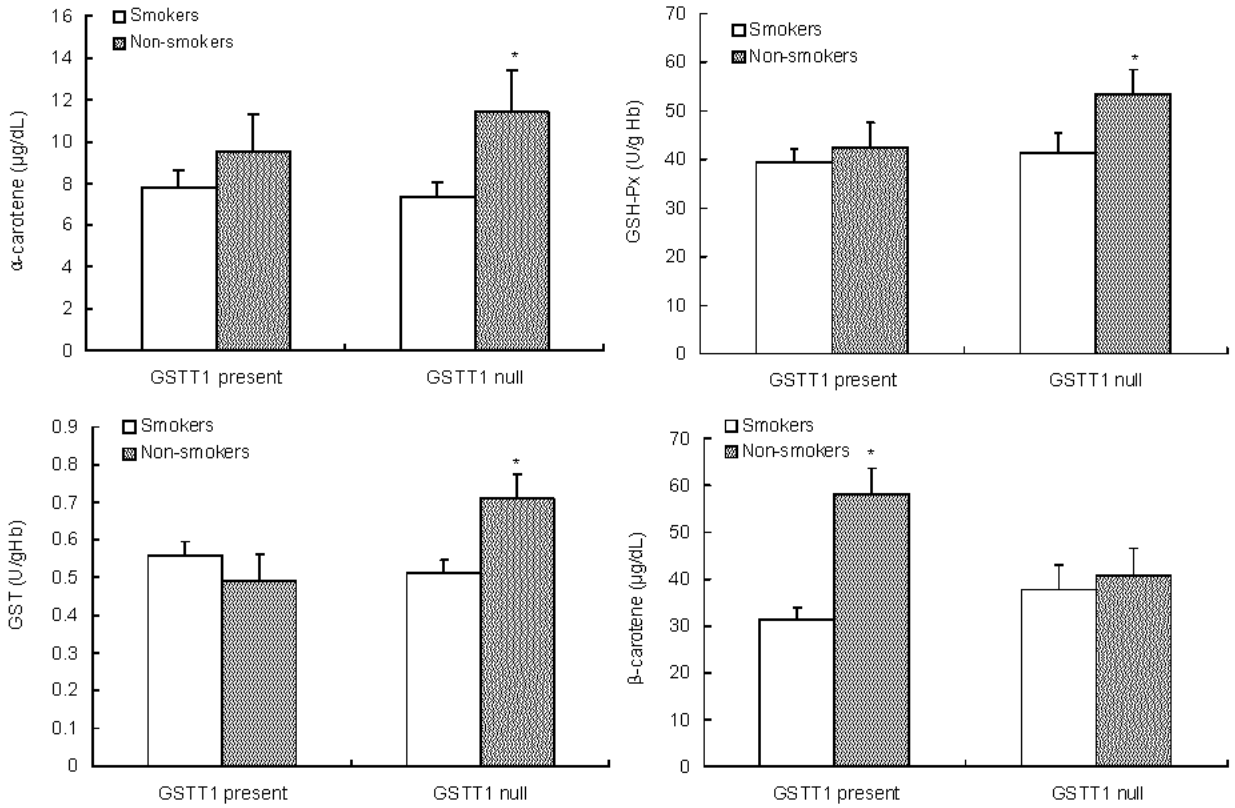

Fig. 3. Antioxidant status in smokers and non-smokers, classified according to GSTT1 genotype.
Bars indicate SE of mean. *p<0.05 significantly different between smokers and non-smokers by Student's t-test.

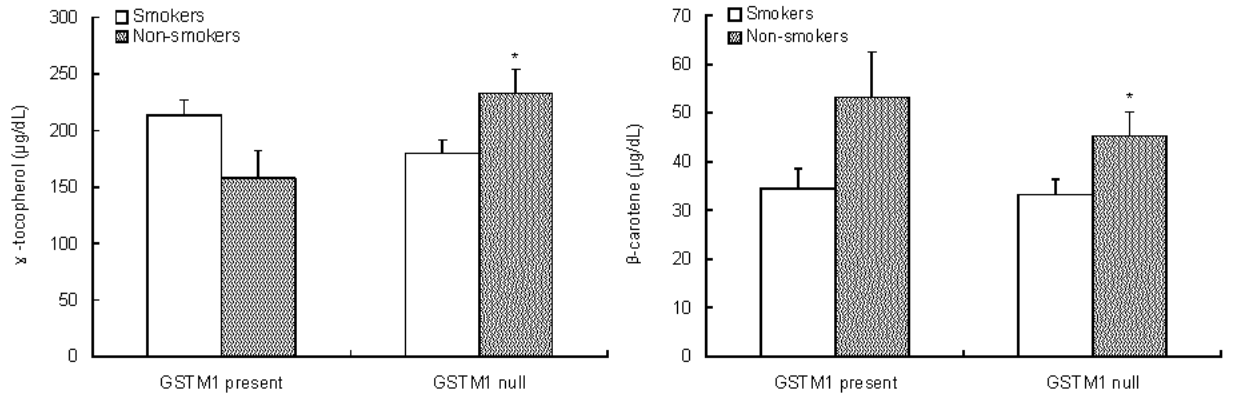

Fig. 4. Antioxidant status in smokers and non-smokers, classified according to GSTM1 genotype.
Bars indicate SE of mean. *p<0.05 significantly different between smokers and non-smokers by Student's t-test.

서 임파구 DNA 손상정도가 흡연자와 비흡연자간의 차이가 유의적이었으며, GSTP1 b/b type의 경우 혈장 비타민 C 농도와 임파구 DNA 손상도가 흡연자와 비흡연자간의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 이는 GST 유전자가 결손되거나 변형된 경우 흡연에 의한 산화적 스트레스가 더 심각한 것을 반영하는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 기존의 연구에서 밝혀진 GSTT1, GSTM1 유전자가 결손된 흡연자가 왜 폐암이나 관상동맥질환에 걸릴 가능성이 높은지를 설명할 수 있는 유용한 기초자료라고 사료된다(56,57).

요 약

본 연구에서는 104명의 성인남녀를 대상으로 그들의 GSTT1, GSTM1, GSTP1의 유전적 다형성 분포도를 조사한 결과, 전체 대상자들 중 각각 60명(57.4%), 42명(40.6%)가 GSTT1과 GSTM1의 유전자를 가지고 있었으며, GSTT1과 GSTM1 유전자가 둘 다를 가진 대상자는 27명(25.7%), 둘 중에 하나만 가지고 있는 사람은 47명(45.5%) 그리고 둘 다 없는 사람은 30명으로 28.7%에 해당되었다. GSTP1 유전자의 경우

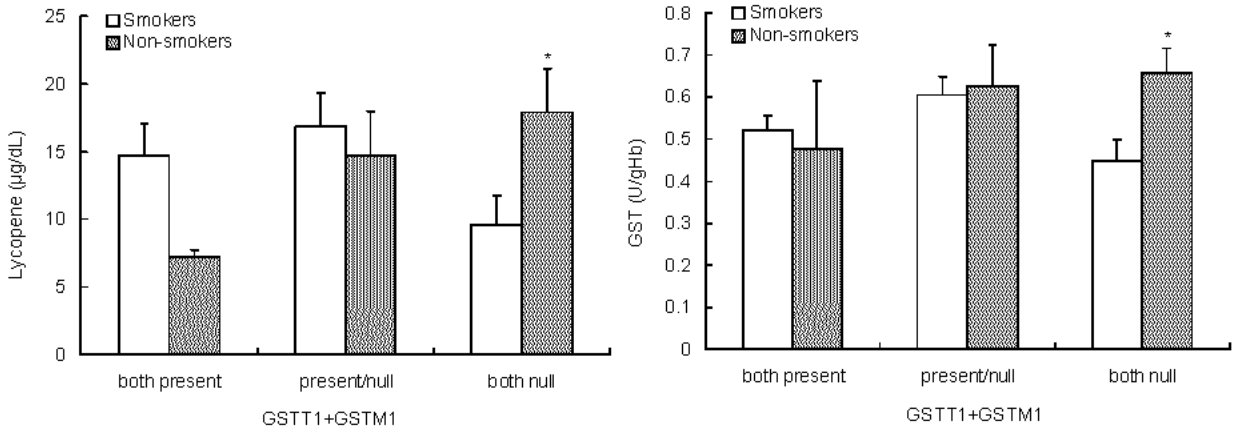

Fig. 5. Antioxidant status in smokers and non-smokers, classified according to GSTT1 and GSTM1 combined genotype.
Bars indicate SE of mean. *p<0.05 significantly different between smokers and non-smokers by Student's t-test.

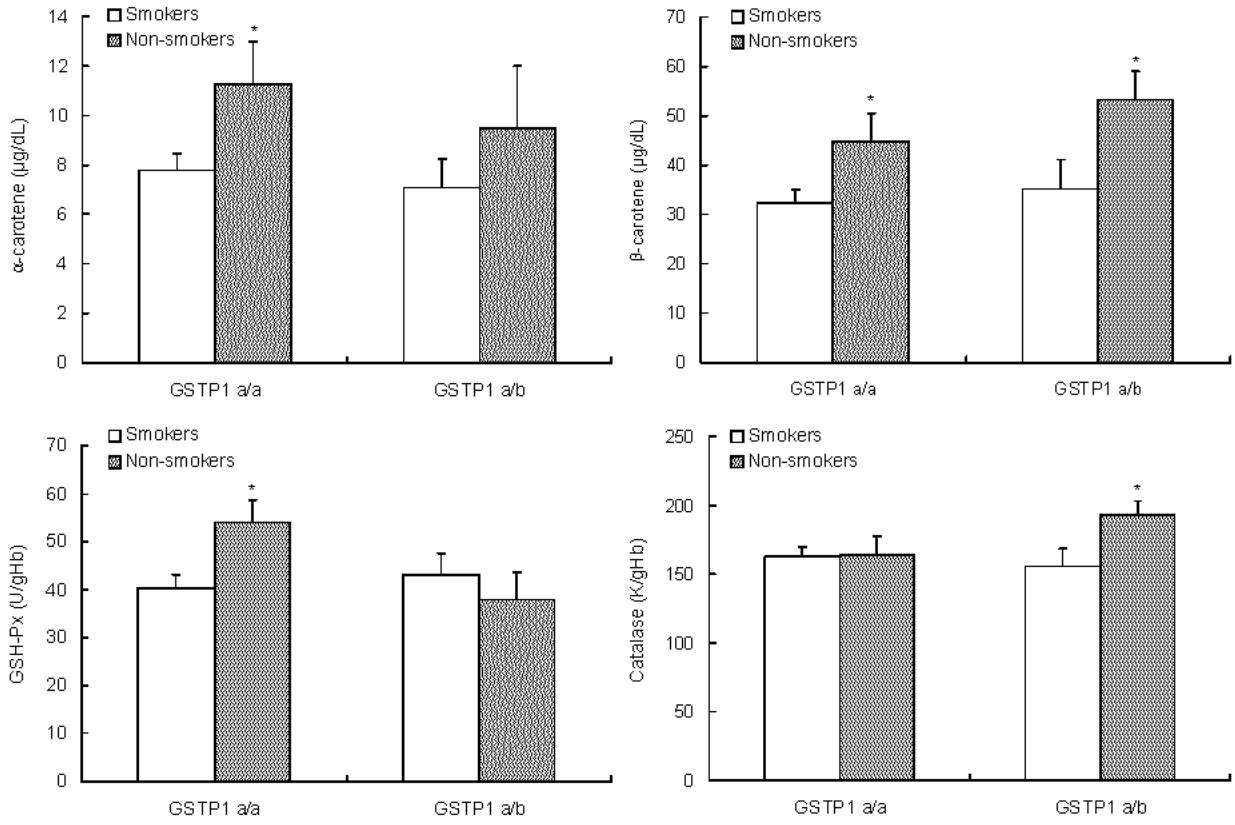

Fig. 6. Antioxidant status in smokers and non-smokers, classified according to GSTP1 genotype.
Bars indicate SE of mean. *p<0.05 significantly different between smokers and non-smokers by Student's t-test.

homozygous(a/a) wild type은 79명(75.5%)으로 대부분의 대상자가 여기에 해당되었으며, heterozygous(a/b) heterozygous type은 22명(21.6%), 그리고 homozygous(b/b) wild type으로 나타난 대상자는 3명(2.9%)이었다. GSTT1 null type은 산화적 스트레스를 더 많이 받고 있는 것으로 알려진 흡연자의 비율이 present 군에 비해 낮음에도 불구하고 적혈구 GSH의 농도는 유의적으로 낮고 임파구 DNA 손상정도는 유의적으로 높은 것으로 나타났다. GSTM1 유전자의 경우 적혈구 GSH-Px의 활성만이 GSTM1 null type이 present type에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타났으며, 나머지 다른 지표에서는 GSTM1 null type과 present type 간의 유의적인 차이가 없었다. GSTP1 유전자 다형성에 따른 항산화 영양상태의 유의적인 차이는 없었다. 흡연과 GST 유전자 다형성의 상호작용결과, 혈장 α-carotene 농도, 적혈구

GSH-Px와 GST 활성은 GSTT1 null type의 경우 흡연자에 비해 비흡연자가 유의적으로 높게 나타났으며, GSTT1 present type에서는 흡연자와 비흡연자간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. GSTM1 유전자의 경우 GSTM1의 null type에서 흡연자의 경우 비흡연자에 비해 혈장 γ-tocopherol과 β-carotene 수준이 유의적으로 낮았다. GSTT1과 GSTM1 유전자가 둘 다 없는 경우(both null)에는 흡연자의 혈장 lycopene과 적혈구 GST 활성이 비흡연자에 비해 유의적으로 낮았다. GSTP1 유전자의 경우 혈장 α-carotene과 적혈구 GSH-Px 활성은 a/a type의 흡연자가 비흡연자에 비해 유의적으로 낮았고, 적혈구 catalase의 활성은 a/b type에서 흡연자가 비흡연자에 비해 유의적으로 낮았으며, β-carotene 농도는 두 type 모두에서 유의적으로 흡연자가 낮았다. 이상의 연구 결과 GST 유전적 다형성에 따라 산화, 항산화 관련 효소 활성 및 항산화 영양소 수준의 상태가 차이가 있음을 알 수 있었으며, 특히 흡연자의 경우 GST 유전자 type에 따라 항산화 영양상태가 더 큰 영향을 받음을 알 수 있었다. 이러한 연구 결과는 유전적 다형성에 따라 항산화 영양소의 권장수준을 책정하는데 기초연구자료로 활용될 수 있을 것이다. 즉, GSTT1 또는 GSTM1 null type의 경우 비흡연자에 비해 흡연자가 항산화 영양소 수준이 더 낮게 나타났으므로 그들의 체내 항산화 영양 상태를 증가시킬 수 있는 여러 방안들, 즉 항산화 비타민의 보충 투여 및 야채와 과일의 섭취 권장 등이 고려될 수 있을 것이다. 또한 GST 유전자 다형성에 따라 항산화 영양상태의 차이가 있으므로 항산화 관련 *in vitro* 실험, 동물 및 인체 실험의 결과 해석 시 나타나는 개인 간의 변이차이는 GST 유전자 다형성으로 일부분 설명될 수 있으리라 기대된다. 향후 대상자의 범위를 좀 더 넓혀서 GST 유전자 다형성과 항산화 영양상태의 관계를 규명하고자 하며 더불어 산화물질 해독에 관여하는 다른 유전자(CYP 450, SULT 등)의 역할에 대해서도 계속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-003-C00217).

문 헌

1. 이홍규. 1997. 한국인의 질병양상의 변화. 한국인의 식생활과 질병. 서울대학교 출판부, 서울. p 30 44.
2. Homepage of Korean national statistic office. http://nso.go.kr (accessed Jan 2007)
3. Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16: 33 50.
4. Sun Y. 1990. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biol Med* 8: 583 599.
5. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915 7922.
6. Fanton JC, Ward PA. 1982. Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocytes dependent in flammatory reactions. *Am J Pathol* 107: 397 418.
7. Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Levine M. 1990. Ascorbic acid content of human B and T lymphocytes and monocytes. *Ann NY Acad Sci* 587: 275 277.
8. Frei B, Sticker R, Ames BN. 1988. Anti oxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9748 9752.
9. Burton GW, Ingold KU. 1984. β Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224: 569 573.
10. Anderson R. 1991. Assessment of the roles of vitamin C, vitamin E, and β carotene in the modulation of oxidant stress mediated by cigarette smoke activated phagocytes. *Am J Clin Nutr* 53: 358S 361S.
11. Santella RM. 1997. DNA damage as an intermediate bio marker in intervention studies. *PSEMB* 216: 166 171.
12. Poulsen HE, Prieme H, Loft S. 1998. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 7: 9 16.
13. Bonassi S, Neri M, Puntoni R. 2001. Validation of bio markers as early predictors of disease. *Mutat Res* 480 481: 349 358.
14. Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microgel electrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291 298.
15. Park E, Kang MH. 2002. Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Kor J Nutr* 35: 213 222.
16. Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applicaions. *Environ Mol Mutagen* 30: 139 142.
17. Ross GM, McMillan TJ, Wilcox P, Collins AR. 1995. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Reports on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutat Res* 337: 57 60.
18. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. 1994. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323 333.
19. Park E, Kang MH. 2004. Smoking and high plasma trigly ceride levels as risk factors for oxidative DNA damage in the Korean population. *Ann Nutr Met* 48: 36 42.
20. Park YK, Park E, Kim JS, Kang MH. 2003. Daily grape juice consumotion reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat Res* 529: 77 86.
21. Rao GV, Kumar GS, Ahuja YR. 1997. Single cell gel elec trophoresis on peripheral blood leukocytes of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 26: 377 380.
22. Hellman B, Friis L, Vaghef H, Edling C. 1999. Alkaline sin gle cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon. *Mutat Res* 442: 121 132.
23. Vaghef H, Nygren P, Edling C, Bergh J, Hellman B. 1997. Alkaline single cell gel electorphoresis and human bio monitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclo phosphamide. *Mutat Res* 395: 127 138.
24. Baltaci V, Kayikcioglu F, Alpas I, Zeyneloglu H, Haberal A. 2002. Sister chromatid exchange rate and alkaline comet

assay scores in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 84: 62 66.
25. Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanenko T, Collins AR, Szumiel I. 1999. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay. *Mutat Res* 440: 19 25.
26. Nia AB, Van Schooten FJ, Schilderman PA, De Kok TM, Haenen GR, Van Herwijnen MH, Van Agen E, Pachen D, Kleinjans JC. 2001. A multi biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms. *Carcinogenesis* 22: 395 401.
27. Moller P, Vogel U, Pedersen A, Dragsted LO, Sandstrom B, Loft S. 2003. No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 1016 1022.
28. Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. 2001. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett* 120: 269 280.
29. Lai C, Shields PG. 1999. The role of interindividual variation in human carcinogenesis. *J Nutr* 129: 552S 555S.
30. Sinha R, Caporaso N. 1999. Diet, genetic susceptibility and human cancer etiology. *J Nutr* 129: 556S 559S.
31. Garcea G, Sharma RA, Dennison A, Steward WP, Gescher A, Berry DP. 2003. Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. *Eur J Cancer* 39: 1041 1052.
32. Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, Eyfjord JE. 2001. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1169 1173.
33. Malats N, Camus Radon AM, Nyberg F, Ahrens W, Constantinescu V, Mukeria A, Benhamou S, Batura Gabryel H, Bruske Hohlfeld I, Simonato L, Menezes A, Lea S, Lang M, Boffetta P. 2000. Lung cancer risk in non smokers and GSTM1 and GSTT1 genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 827 833.
34. Buch SC, Notani PN, Bhisey RA. 2002. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis* 23: 803 807.
35. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. 2001. Glutathione *S* transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482: 21 26.
36. Strange RC, Jones PW, Fryer AA. 2000. Glutathione *S* transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 112 113: 357 363.
37. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499 502.
38. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. 1994. Human glutathione *S* transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1): 271 276.
39. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. 1993. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen metabolism gene glutathione *S* transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1159 1164.
40. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. 1997. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione *S* transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 18: 641 644.
41. Beutler E. 1984. Glutatione peroxidase. In *Red cell metabolism: A mannual for biochemical methods*. Verlag Grune and Straton, New York. p 71 73.
42. Aebi H. 1974. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer HU, ed. Verlag Chemie, Weinheim. p 673 678.
43. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130 7139.
44. Genser D, Kang MH, Vogelsang H, Elmadfa I. 1999. Status of lipid soluble antioxidants and TRAP in patients with Crohn's disease and healthy controls. *Eur J Clin Nutr* 53: 675 679.
45. Rice Evance C, Miller NJ. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* 234: 279 293.
46. Ahotupa M, Vasankari TJ. 1999. Baseline diene conjugation in LDL lipids: An indicator of circulating oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* 27: 1141 1150.
47. Ahotupa M, Ruutu M, Mäntylä E. 1996. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low density lipoproteins. *Clin Biochem* 29: 139 144.
48. Kim WJ, Kim H, Kim CH, Lee MS, Oh BR, Lee MH, Katoh T. 2002. GSTT1 null genotype is a protective factor against bladder cancer. *Urology* 60: 913 918.
49. Kim MH, Kim YS, Lee SR, Shim SS, Hur SE, Lee WJ, Moon HS, Ahn JJ, Chung HW. 2003. Relationship between genetic polymorphisms of the glutathione *S* transferase and endometriosis susceptibility in Korean populations. *Kor J Gynecol* 46: 2403 2409.
50. Dusinska M, Ficek A, Horska A, Raslova K, Petrovska H, Vallova B, Drlickova M, Wood SG, Stupakova A, Gasparovic J, Bobek P, Nagyova A, Kovacikova Z, Blazicek P, Liegebel U, Collins AR. 2001. Glutathione *S* transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res* 482: 47 55.
51. Hong YC, Lee KH, Yi CH, Ha EH, Christiani DC. 2002. Genetic susceptibility of term pregnant women to oxidative damage. *Toxicol Lett* 129: 255 262.
52. Ozguner F, Koyu A, Cesur G. 2005. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicol Ind Health* 21: 21 26.
53. Kocyigit A, Erel O, Gur S. 2001. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clin Biochem* 34: 629 633.
54. Durak I, Yalcin S, Burak Cimen MY, Buyukkocak S, Kacmaz M, Ozturk HS. 1999. Effects of smoking on plasma and erythrocyte antioxidant defense systems. *J Toxicol Environ Health A* 56: 373 378.
55. Chow CK. 1993. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann N Y Acad Sci* 686: 289 298.
56. Ozturk O, Isbir T, Yaylim I, Kocaturk CI, Gurses A. 2003. GST M1 and CYP1A1 gene polymorphism and daily fruit consumption in Turkish patients with non small cell lung carcinomas. *In Vivo* 17: 625 632.
57. Olshan AF, Li R, Pankow JS, Bray M, Tyroler HA, Chambless LE, Boerwinkle E, Pittman GS, Bell DA. 2003. Risk of atherosclerosis: interaction of smoking and glutathione *S* transferase genes. *Epidemiology* 14: 321 327.

(2007년 3월 12일 접수; 2007년 5월 18일 채택)