

35종의 특정 화학성분들의 *in vitro* 활성 평가

신한재* · 손형옥 · 박철훈 · 이형석 · 민영근 · 현학철
KT&G 중앙연구원 분석과학연구소
(2007년 5월 28일 접수)

Evaluation of the *in vitro* biological activity of selected 35 chemicals

Han-Jae Shin*, Hyung-Ok Sohn, Chul-Hoon Park, Hyeong-Seok Lee,
Young-Keun Min and Hak-Chul Hyun
KT&G Central Research Institute
(Received May 28, 2007)

ABSTRACT : The objective of this study was to investigate the contribution of various smoke constituents to the toxicological activity of total particulate matter(TPM) or the gas/vapor phase(GVP). These components included phenol compounds, aromatic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic amines, and carbonyl compounds. The mutagenic and cytotoxic potencies were assessed using the *Salmonella* mutagenicity assay with *S. typhimurium* TA98 strain and the neutral red uptake cytotoxicity assay(NRU) with BALB/c 3T3 fibroblast cells, respectively. The *Salmonella* mutagenicity test showed that heterocyclic amines exhibited significantly higher levels of toxicity compared to other smoke constituents. Among them, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline(MeIQ) was shown the most mutagenic compound with a specific mutagenicity of 7.9×10^5 revertants/ μg . An analysis of the possible contribution revealed that MeIQ account for only 0.85% of the 2R4F-TPM mutagenicity in TA98. NRU data demonstrated that high cytotoxic activity was obtained for hydroquinone, formaldehyde, and acrolein. Based on the results of the present study, the contribution of acrolein to the cytotoxicity of the GVP fraction was calculated as 61%. Thus, a large proportion of the cytotoxic activity of this complex mixture, cigarette smoke gas phase, can be attributed to the acrolein.

Key words : Total particulate matter, gas-vapor phase, mutagenicity, cytotoxicity

담배 주류연은 약 5,000 종류의 다양한 형태의 화학물질로 구성되어있고, 이들 화학물질의 대부분은 극히 미량의 농도로 존재하는 것으로 알려져 있다(Green and Rodgman, 1996). Dube와 Green

(1982)은 담배 자체에는 2,550종의 물질들이 있고 흡연 시 열분해와 열합성 반응물에 의해 형성된 2,470종의 성분은 연기에만 존재하는 것으로 보고 하였다. 담배가 연소될 때 생성물은 크게 입자상




































*연락처 : 305-805, 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea(Phone : 82-42-866-5542 ; fax : 82-42-866-5426 ; e-mail : hjshin@ktng.com)

(particulate phase)과 기체상(gas phase)으로 구분된다. 담배연기 중의 입자상 물질은 cambridge glass fiber filter에 포집된 지름이 0.1 um이상인 입자로서, 이것을 전연기응축물(total particulate matter : TPM)의 양으로 표시한다(Thomson, 1992). 가스상 물질은 담배연기 중 glass fiber filter에 포집되지 않고 통과한 물질로 정의하며, 이를 전통적으로 가스상 성분(gas/vapor phase : GVP)이라고 한다. 담배연기 주류연은 주로 무게의 90-96%가 질소(~60%), 산소(~13%), CO₂(13%), CO(13%) 등의 가스상 성분들로 이루어져 있으며, 또한 1% 내외의 hydrocarbons 및 aldehydes 그리고 그 외 여러 화합물로 이루어져 있다(Johnstone and Plimmer, 1959; Stedman, 1968). 담배연기 무게의 약 5%를 차지하고 있는 고체상의 주요성분으로는 알카로이드 계열의 화합물(담배연기 중 0.2-0.6%)과 300 여종 이상의 폐놀성 성분들이 보고되고 있다(Baker *et al.*, 2004; Stedman, 1968). 고체상 성분 중에는 극히 미량의 농도로 존재하는 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), aromatic amines, heterocyclic amines 등이 존재하는 것으로 알려져 있다. Cooper 등(1954)이 담배연기 성분 중 발암성 물질로서 benzo(a)pyrene을 최초로 보고한 이후, 50여종의 PAHs 및 aromatic amines 성분들이 DNA 손상 및 adduct 형성에 관련이 있다는 연구 결과들도 보고되고 있다(Manabe and Wada, 1990; Phillips, 2002). 또한 aldehyde 화합물과 hydrocarbon 및 alcohol류 등은 담배연기의 세포독성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Curvall *et al.*, 1984). 그러나 전체 담배독성에 대하여 특정 연기 성분들의 독성 기여도에 관한 연구와 어떠한 mechanism으로 독성이 발현되는지 거의 잘 알려져 있지 않고 있다(Rodgman and Green, 2003).

담배연기에 대한 독성 연구는 미생물을 이용한 돌연변이 유발성 평가와 포유류 유래세포를 사용하는 세포독성 평가 등이 주로 이루어지고 있다(DeMarini, 1983; Doolittle *et al.*, 1990; Bombick *et al.*, 1998; Putnam *et al.*, 2002). 또한 CORESTA 중심으로 담배연기의 안전성을 평가할 수 있는 표준방법의 제정 활동이 활발히 진행되고 있고, 특히

Table 1. The list of 35 selected chemicals

Smoke constituent	CAS No.	structure
Aromatic amines		
1-Aminonaphthalene	134-32-7	
2-Aminonaphthalene	91-59-8	
3-Aminobiphenyl	2243-47-2	
4-Aminobiphenyl	92-67-1	
Aniline	62-53-3	
o-Toluidine	95-53-4	
Aminophenylnorharman		
Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)		
Acenaphthene	83-32-9	
Anthracene	120-12-7	
Benzo(a)pyrene	50-32-8	
Benzo(a)anthracene	56-55-3	
Benzo[e]pyrene	192-97-2	
Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	
Benzo(k)fluoranthene	207-08-9	
Chrysene	218-01-9	
Fluoranthene	206-44-0	
Naphthalene	91-20-3	
Phenols		
Catechol	120-80-9	
Hydroquinone	123-31-9	
O-Cresol	95-48-7	
Heterocyclic aromatic amines		
AaC	26148-68-5	
MeAaC	68006-83-7	
Trp-P-2	72254-58-1	
Trp-P-1	62350-06-0	
MeIQ	77094-11-2	
IQ	76180-96-6	
Carbonyl and volatile compounds		
Acetaldehyde	75-07-0	
Acrolein	107-02-8	
Formaldehyde	50-00-0	
Propionaldehyde	123-38-6	
Butyraldehyde	123-72-8	
Crotonaldehyde	4170-30-3	
Benzen	71-43-2	
Other compounds		
Harman	486-84-0	
Norharman	244-63-3	

Salmonella 균주를 이용하는 돌연변이 유발성 및 BALB/c 3T3 세포를 이용하는 세포독성 평가는 권고방법까지 제시되었다(Andreoli *et al.*, 2003).

따라서 본 연구에서는 인체에 유해한 독성 정도를 기준으로 35종의 특정 담배연기 성분(Table 1)들을 선택하여(Hoffman *et al.*, 2001), 이들 성분에 대한 돌연변이 유발성 및 세포독성을 측정하고 이들 성분이 2R4F 표준담배의 TPM 및 GVP 성분의 전체 독성에 얼마나 기여하는 지 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), L-glutamine, penicillin/streptomycin solution, phosphate-buffered saline (PBS) 등은 GIBCO(USA)제품을 사용하였다.

Dimethylsulfoxide(DMSO), 2-Aminoanthracene (2-AA), acetaldehyde, acrolein, benzen, butyraldehyde, formaldehyde, propionaldehyde, 1-aminonaphthalene, 2-aminonaphthlene, aniline, o-toluidine, hydroquinone, sodium dodecyl sulfate(SDS), nuetral red 등은 Sigma-Aldrich(USA) 제품을 사용하였다. 모든 polycyclic aromatic hydrocarbon류의 시약들은 Supelco(USA)사로부터 공급받았으며, 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole(AaC), 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAaC), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[3,4-b]indole (Trp-P-2), aminophenyl-norharman, harman, norharman 등은 TRC(Canada) 그리고 3-amino-1,4-dimethyl-5Hpyrido[3,4-b]indole(Trp-P-1), (2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline(MeIQ), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline(IQ) 등은 Wako(Japan) 제품을 사용하였다. 그 외의 유기용매들은 특급시약을 사용하였다.

담배연기 입자상 및 가스상 분획의 제조

담배연기의 입자상 성분(TPM)은 표준담배(Kentucky reference cigarette ; 2R4F) 20개피를 자동흡연장치(Heinr Borgwaldt RM20/CS ; Germany)를 이용하여 CORESTA 표준흡연조건

(puff volume: 35 mL, puff frequency: 60 sec, puff duration: 2 sec)하에서 연소시키고, 92 mm cambridge filter pad를 이용하여 포집하였다. 적당량의 DMSO를 사용하여 filter pad로부터 TPM을 추출해서, 농도가 10 mg/mL이 되도록 한 후 -70℃에 보관하면서 시험에 사용하였다. 담배연기로부터 가스상 성분의 분획(gas/vapor phase, GVP)의 제조를 위해 100 mL gas washing bottle을 사용하였다. CORESTA 표준흡연조건에 따라 10 개피의 담배시료를 자동흡연장치를 이용하여 연소시킨 후, Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 20 mL PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas washing bottle에 포집하였다. 이와 같은 방법으로 흡연한 담배연기로부터 제조한 GVP 용액 중 carbonyl 화합물의 분석은 Health Canada의 official method(1999)에 따라서 측정 하였다.

시험균주 및 배지

복귀돌연변이 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98 균주는 Molecular Toxicology Inc.(USA)에서 구입하였다. 균주는 냉동 보관 되어있는 시험균주 용액 50 µL를 25 mL의 액체배지(2.5% Oxoid Nutrient broth No. 2)에 접종해 shaking incubator를 이용하여 37℃에서 약 10 시간 배양한 후 사용하였다. 최소배지(minimal glucose agar plate)는 1.5% Bacto agar와 Vogel-Bonner medium E 및 2% glucose를 함유해서 만들었고 Top agar는 0.6% agar와 0.5% NaCl로 조제하였으며, top agar에는 0.05 mM의 histidine-biotin을 첨가하였다.

복귀돌연변이 시험

복귀돌연변이 시험은 Maron과 Ames(1983)이 제시한 방법에 따라 수행하였고, 특정성분들에 대한 돌연변이 유발성 검색을 위해서 *Salmonella typhimurium* TA98 균주를 사용하였다. 시험물질의 처리는 대사활성효소계(S-9 mix)가 적용된 direct plate incorporation 방법으로 하였다. 고압 증기 멸균한 top agar를 dry bath에서 45℃로 예열한 멸균 tube에 2 mL 씩 분주한 다음, 시험물질 용액 0.1 mL과 균배양액 0.1 mL을 top agar에 혼

합하고 즉시 vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼지게 하여 굳게 하였다. 부형제균(음성대조균)은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조균은 양성대조물질 용액을 같은 방법으로 가하여 실시하였다. top agar가 굳은 후 플레이트 뚜껑을 닫은 상태에서 플레이트를 뒤집어 37°C에서 약 48 시간 배양 후 집락을 계수하였다.

세포주 및 세포배양

실험에 사용한 BALB/c 3T3 fibroblast 세포주(BALB/c 3T3)는 American Type Culture Collection(ATCC)으로부터 분양받아 사용하였으며, 세포주기는 18 ± 2 시간이었다. BALB/c 3T3 세포는 10% FBS, 100 U penicillin/mL 와 100 µg streptomycin/mL이 포함된 DMED 배양액을 사용하였다. 배양된 세포는 2~3일마다 0.25% trypsin-0.03% EDTA용액을 이용하여 계대 유지하였다. 세포주의 자연발생적 돌연변이 생성을 최소화하기 위하여 구입 후부터 18번미만으로 계대 배양한 세포만을 실험에 사용하였다. 배양은 CO₂ 배양기(Forma, USA)를 이용하여 포화 습도하에서 37°C, 5% CO₂ 상태로 배양하였다.

세포독성 시험

특정성분들에 대한 세포독성은 리소솜에 의한 neutral red 흡수 정도를 측정하는 Neutral red cytotoxicity assay 방법을 사용하였다(Borenfreund and Puerner, 1985). BALB/c 3T3 세포(1×10^4 cells)를 96 well plate(n=6)에 이식해서 24 시간동안 배양한 후 시험물질을 처리하였다. 모든 실험에서 사용되는 대조군은 최고농도의 시료가 첨가된 1%의 DMSO 또는 10%의 PBS 처리군으로 하였다. 시험물질의 처리 후 22 ± 2 시간 동안 5% FBS, 100 U penicillin/mL 와 100 µg streptomycin/mL이 포함된 DMEM 배양액에서 배양하였으며, 세포 배양이 끝나면 배양액을 제거한 후 150 µL의 neutral red 용액(40 µg/mL)을 처리하여 37°C에서 배양하였다. 3 시간 경과 후 neutral red 용액을 제거하고, 200 µL의 고정액(0.5% formaldehyde-1% CaCl₂)으로 세포를 세척하였다. 유기용매 용액

(50% ethanol-1% acetic acid) 150 µL을 첨가해서 실온에서 15 분간 neutral red를 추출한 후 microplate reader (BIO-TEK, USA)를 사용해서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

통계학적인 방법

복귀돌연변이 시험 결과는 시료로부터 각 농도군 3 개의 평판으로부터 얻은 집락 수의 평균±표준편차와, 용량상관성이 나타나는 초기농도 범위에서 구해진 기울기 값을 이용해서 계산된 활성도 값(Specific activity, revertants/µg)을 표시하였다. 돌연변이 유발성에 대한 시료들간의 유의적인 차이 ($p < 0.05$)는 선형회귀분석을 통해서 구해진 각각의 시료들에 대한 활성도 값에 대한 일원분산분석(ANOVA)과, 사후분석으로는 Duncan test를 이용하여 검증하였다. 시료에 대한 세포독성의 수치는 EC₅₀ 값으로 표기하였다. EC₅₀ 값은 대조군에 비하여 50%의 생존율을 나타내는 시료의 농도이며, 용량-반응식을 이용하여 값을 구하였다. 세포독성 결과의 모든 EC₅₀ 측정값은 µg/mL 또는 cig./mL로 환산하여 표시하였다. SPSS (version 10.0) 통계프로그램을 이용하여 일원분산분석(ANOVA)을 실시하였고 사후분석으로는 Duncan test를 통해서 $p < 0.05$ 의 수준에서 각 시험군과의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

특정 화학 성분의 복귀돌연변이 활성

화학물질의 돌연변이 유발성 측정은 Maron과 Ames(1983) 등의 plate incorporation 방법이 널리 사용되고 있다. 지금까지 연구결과에 따르면 대사활성효소계(S-9 mix)를 처리한 *Salmonella typhimurium* TA98 균주를 사용했을 경우 담배 TPM 성분에 대한 돌연변이 활성의 민감도(sensitivity)가 가장 높은 것으로 보고되고 있다(Doolittle *et al.*, 1990). 그러므로 본 연구에서는

Table 2. Mutagenic activity of selected chemicals in *S. typhimurium* TA98 with S-9 metabolic activation

Chemical	Dose (µg/plate)	Revertants/plate	Chemical	Dose (µg/plate)	Revertants/plate
1-Aminonaphthalene	0.5	32±4	Benzo[b]fluoranthene	0.5	36±3
	1	36±2		1	34±1
	10	55±10		10	90±6
	100	86±13		100	109±18
2-Aminonaphthalene	0.5	40±9	Benzo[k]fluoranthene	0.5	45±4
	1	40±4		1	60±6
	10	81±9		10	99±7
	100	145±15		100	109±15
3-Aminobiphenyl	0.5	39±6	Chrysene	0.5	32±4
	1	39±14		1	47±2
	10	41±5		10	53±15
	100	56±4		100	71±4
4-Aminobiphenyl	0.5	43±2	Fluoranthene	0.5	38±6
	1	70±15		1	47±5
	10	362±7		10	57±6
	100	1062±47		100	69±8
Acenaphthene	0.5	40±5	Naphthalene	0.5	31±3
	1	32±6		1	35±6
	10	38±4		10	39±3
	100	43±1		100	28±4
Anthracene	0.5	40±8	Harman	0.5	37±7
	1	39±7		1	36±4
	10	41±5		10	40±6
	100	38±2		100	45±4
Benzo[a]anthracene	0.5	39±4	Norharman	0.5	42±3
	1	45±3		1	40±7
	10	131±17		10	36±3
	100	167±38		100	38±4
Benzo[e]pyrene	0.5	44±9	Hydroquinone	0.5	35±4
	1	66±5		1	37±3
	10	75±16		10	41±7
	100	93±16		100	38±4
Benzo[a]pyrene	0.5	140±27	MeIQ	0.001	826±88
	1	277±4		0.005	2399±108
	2	412±37		0.01	2330±213
AaC	0.1	67±10	IQ	0.001	214±20
	0.5	412±27		0.005	462±31
	1	737±96		0.01	1056±56
MeAaC	0.1	45±9	Aniline	1	37±3
	0.5	91±9		10	33±11
	1	207±11		100	34±1
Trp-P-2	0.001	69±5	O-Toluidine	1	39±1
	0.005	167±11		10	35±6
	0.01	298±28		100	41±1
Trp-P-1	0.005	77±5	Aminophenylnorharman	0.005	53±8
	0.01	152±9		0.01	72±13
	0.005	491±70		0.05	243±21

Salmonella typhimurium TA98를 이용하여 담배 TPM 및 연기 주요성분들에 대한 돌연변이 유발성을 조사하였다.

S. typhimurium TA98 균주에 S-9 mix를 첨가한 대사활성법에서 2 µg/plate의 양성대조 물질(2AA) 첨가시 음성대조군(30-50 집락수)에 비해 복귀돌연변이 집락수가 증가(1000-2000 집락수)되어 본 실험이 적정히 이루어졌음을 알 수 있었다. 담배연기 중 함유된 26성분에 대한 돌연변이 유발성을 비교하기 위해 복귀돌연변이 집락수가 유의적으로 증가하는 적정농도를 결정한 후, 복귀돌연변이 본 실험을 실시하여 집락수의 변화를 조사하였다(Table 2).

Aromatic amine류 0.5-100 µg/plate 농도범위에서 돌연변이 유발성을 조사한 결과 aniline, o-toluidine, 3-aminobiphenyl 등은 복귀돌연변이 집락수가 유의하게 증가하지 않았으나 1-aminonaphthalene, 2-aminonaphthalene, 4-aminobiphenyl 등은 농도의존적(1-100 µg/plate)으로 집락수가 증가하는 것을 확인하였다. 특히 4-aminobiphenyl 100 µg/plate 처리시 복귀돌연변이 집락수가 1,062로서 높은 돌연변이 유발성을 나타냈다. 10 종의 polycyclic aromatic hydrocarbon(PAH)류의 돌연변이 유발성을 0.5-100 µg/plate 농도범위에서 측정된 결과 acenaphthene, anthracene, chrysene, naphthalene 등은 집락수가 증가하지 않았으나 benzo[a]anthracene, benzo[e]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, fluoranthene 등은 고농도(100 µg/plate) 처리시 음성대조군에 비해 집락수가 2-3배 증가하였다. Benzo[a]pyrene 은 저농도(0.5-2 µg/plate)에서도 복귀돌연변이 집락수가 140-412으로 농도의존적으로 증가되었고, PAH류 중 가장 높은 돌연변이 유발성을 나타내었다. 6종의 heterocyclic amine류의 돌연변이 유발성을 측정된 결과, AaC와 MeAc 등은 0.1-1 µg/plate 범위에서 농도 의존적인 복귀돌연변이 집락수가 증가되는 것이 관찰되었고, Trp-P-1와 Trp-P-2 등은 0.001-0.05 µg/plate 범위에서 집락수가 통계적으로 유의하게 증가되는 것이 관찰되었다. IQ는 0.001-0.01 µg/plate 농도범위에서 복귀돌연변이 집락수가 현저히 증가하였으며, MeIQ

0.001µg/plate 처리시 집락수가 826으로 음성대조군에 비해 크게 증가되어 26개 성분들중에서 가장 높은 돌연변이 유발성을 나타내었다. L-tryptophan의 열분해시 발생하는 β-carboline류의 일종인 harman 또는 norharman 등은 100 µg/plate 까지 처리했을 때 복귀 돌연변이 활성은 나타나지 않았으나, aminophenylnorharman은 0.01-0.05 µg/plate 범위에서는 복귀 돌연변이 집락수가 농도 의존적으로 증가하였다. Aminophenylnorharman은 담배 연기 중에는 존재하지는 않지만 TA98 균주의 acetyltransferase에 의해 norharman과 aniline이 결합되어 생성되어지는 aminophenyl-β-carboline 유도체의 일종으로 특히 YG1024 균주에서 높은 돌연변이 유발성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Totsuka *et al.*, 2004). TA 98 균주를 사용하는 본 실험조건에서도 복귀돌연변이 활성을 보이지 않는 aniline 또는 o-toluidine 등에 norharman을 첨가한 혼합물에 대한 돌연변이 유발성을 측정된 결과 1-100 µg/plate 범위에서 집락수가 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(Data not shown). 이와같은 결과는 담배연기 TPM의 돌연변이 활성은 단일 성분 자체뿐만 아니라 여러 성분의 결합에 의한 시너지 효과를 보이는 것으로 사료된다.

Table 3에서는 2R4F 표준담배의 연기성분 양을 이용하여 담배 TPM의 돌연변이 활성에 대한 특정 담배연기 성분이 미치는 기여도를 조사하였다. 표준담배 TPM 1 µg당 복귀돌연변이 집락수는 2.51 이고 전체 TPM 양은 11.3 mg이므로 1개피당 집락수는 28,363이었다. PAH계열 화합물 중 돌연변이 유발성이 가장 높은 benzo(a)pyrene의 specific activity는 189 revertants/µg이었고, 2R4F 1개피 연기중 포함된 함량은 7 ng이었으며 이것의 돌연변이 활성은 1.3 revertants/cigarette로서 전체 TPM의 돌연변이 활성의 0.005% 미만인 것으로 나타났다. 단백질의 열분해 과정중 생성되는 heterocyclic amine류는 *Salmonella test*를 통해서 높은 돌연변이원성으로 잘 알려져 있다(Manabe and Wada, 1990). TA 98 균주를 사용한 본 연구에서도 6종의 heterocyclic amine류의 복귀 돌연변이 집락수가 다른 성분들에 비해 높았으며, 특히

Table 3. Contribution of selected chemicals to the overall mutagenicity of TPM of 2R4F cigarette

Chemicals	Dose range ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Specific activity (revertants/ μg)	Kentucky reference cigarette 2R4F		
			Yield*	Total activity (revertant/cig.)	Contribution (%)
TPM	25-200	2.51	(mg/cig.) 11.3	28,363	100
PAH			(ng/cig.)		0.005
Benzo(a)pyrene	0.5-2	189	7.0	1.326	
Benzo(a)anthracene	0.5-100	1.07	20-70	0.022	
Benzo(e)pyrene	0.5-100	0.39	4.7	0.002	
Benzo(b)fluoranthene	0.5-100	0.63	4	0.003	
Benzo(k)fluoranthene	0.5-100	0.50	6	0.003	
Chrysene	0.5-100	0.28	20.5	0.006	
Fluoranthene	0.5-100	0.24	56.2	0.014	
Aromatic amines			(ng/cig)		0.000
1-Aminonaphthalene	0.5-100	0.47	15.1	0.007	
2-Aminonaphthalene	0.5-100	0.99	10.3	0.010	
4-Aminobiphenyl	0.5-100	9.61	1.7	0.016	
Heterocyclic amines			(ng/cig)		1.120
AaC	0.1-1	724	30	21.72	
MeAaC	0.1-1	170	5	0.849	
Trp-P-1	0.001-0.01	25,860	0.8-1.1	20.69	
Trp-P-2	0.005-0.05	9,043	0.5	4.522	
MeIQ	0.0001-0.001	790,667	0.3	237.2	
IQ	0.0001-0.005	96,978	0.3	29.09	

* Data from Hoffmann *et al.*, 2001

IQ와 MeIQ의 specific activity는 각각 96,978, 790,667 revertants/ μg 로써 현저히 높은 돌연변이 활성을 나타냈다. 그러나 2R4F 담배 연기중 포함된 이들 성분의 함량은 상당히 낮았기(0.3-30 ng/cigarette) 때문에 전체 TPM의 돌연변이 활성의 1.1%인 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 4,000 여종의 여러 가지 화학물질이 포함된 TPM의 전체 돌연변이 활성은 어떤 특정 성분의 높은 독성기여도 때문이 아니라 수많은 성분들의 활성과 또한 여러 성분의 반응에 생성된 새로운 화합물의 시너지 작용에 의한 것으로 사료된다.

특정 화학 성분의 세포독성

화학물질에 대한 *in vitro* 세포독성은 다양한 방법들에 의해 측정되어지고 있으며, 특히 담배 TPM 시료에 있어서는 neutral red uptake 법이 가장 효과적이라고 알려져 있고, CORESTA에서도 이 방법을 표준방법으로 권장하고 있다(Bombick *et al.*, 2001). 본 연구에서도 BALB/c 3T3 fibroblast 세포를 이용한 neutral red uptake 법을 사용해서 담배연기 및 특정 단일 성분들에 대한 세포독성을 조사하였다.

담배연기 TPM에 함유된 6 성분에 대한 세포독성

35종의 특정 화학성분들의 *In vitro* 활성 평가

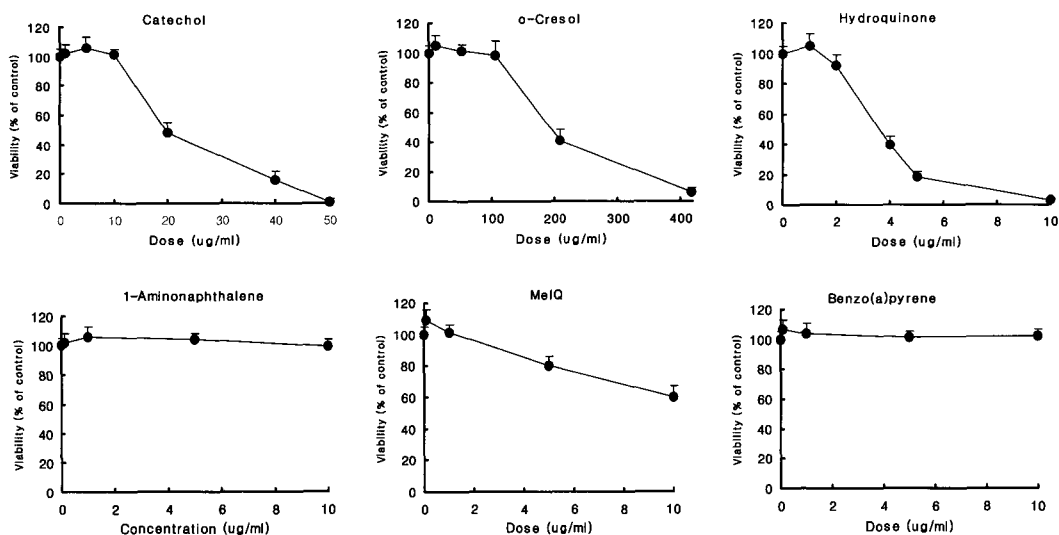


Fig. 1. Cytotoxicity of single constituent in mainstream smoke particulate phase.

을 비교하기 위해 세포를 사멸시키는 적정농도를 결정한 후, 이들 성분에 대한 세포독성 실험을 실시하여 세포 생존율의 변화를 조사하였다(Fig. 1).

3종의 phenol류에 대하여 여러 농도범위에서 세포 생존율을 측정된 결과 catechol은 10-50 $\mu\text{g/mL}$, o-cresol은 100-400 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 hydroquinone

는 2-10 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 세포 생존율은 농도 의존적으로 감소하였다. PAH류, aromatic amine류, 그리고 heterocyclic amine류 등을 대표해서 benzo(a)pyrene, 1-aminonaphthalene, 그리고 MeIQ에 대한 세포생존율을 1-10 $\mu\text{g/mL}$ 농도범위에서 조사한 결과, benzo(a)pyrene, 1-aminonaphthalene

Table 4. Contribution of catechol, o-cresol, hydroquinone, and MeIQ to the cytotoxicity of the cigarette smoke particulate phase

Smoke constituents	Dose range ($\mu\text{g/mL}$)	EC ₅₀ value ($\mu\text{g/mL}$)	Kentucky reference cigarette 2R4F		
			Yield* (mg/cig.)	Toxicity index	Contribution to TPM EC ₅₀ (%)
TPM	25-120	103.2	11.3	109.49	100
Phenols			(ng/cig.)		
Catechol	10-50	33.4	37.90	1.135	1.037
o-Cresol	100-400	213.9	1.89	0.009	0.008
Hydroquinone	1-10	3.4	32.40	9.529	8.700
Heterocyclic aromatic amines			(ng/cig)		
MeIQ	1-20	12	0.3	0.000	0.000

* Data from Hoffmann *et al.*, 2001

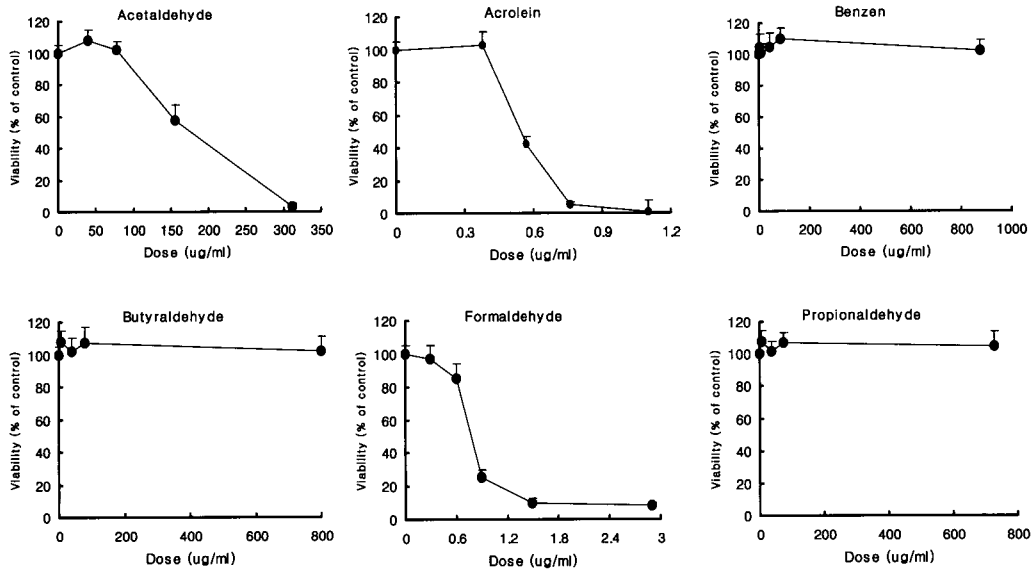


Fig. 2. Cytotoxicity of single constituent in mainstream smoke gas/vapor phase.

등은 세포독성을 나타내지 않았으나, MeIQ는 농도의존적으로 세포 생존율이 60%까지 감소되었다. Table 4 에서는 2R4F 표준담배의 연기성분 양을 이용하여 담배 TPM의 세포독성에 대한 특정연기 성분이 미치는 기여도를 조사하였다.

Catechol, o-cresol, hydroquinone, 그리고 MeIQ의 EC₅₀은 각각 33.4, 213.9, 3.4 그리고 12 µg/mL 으로서 hydroquinone이 가장 높은 세포독성을 나타내었다. 2R4F 1개피 중에 포함된 단일성분의 양을 고려해서 독성기여도를 조사한 결과, 전체 TPM의 세포독성에 대하여 hydroquinone이 8.7%의 비교적 높은 독성 기여도를 보이는 것으로 나타났다. 지금까지 많은 연구에서 담배연기 중 가스상 성분과 특히 저분자량의 carbonyl 화합물 등은 세포독성에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Curvall *et al.*, 1984). 본 연구에서는 담배 흡연시 Cambridge filter pad를 통과한 가스상 성분들을 20 mL PBS(pH 7.4) 용액이 있는 gas-washing bottle에 포집한 GVP 용액 및 가스상의 6 성분에 대한 세포독성을 비교하기 위해 이들 성분 에 대한 세포 생존율의 변화를 조사하였다(Fig. 2).

Benzene, butyraldehyde, 그리고 propionaldehyde 등은 처리 할 수 최대농도(1000 µg/mL) 까지도 세포독성이 관찰되지 않았다. 3종의 carbonyl 화합물 에 대하여 여러 농도범위에서 세포 생존율을 측정 한 결과 acetaldehyde는 100-300 µg/mL, acrolein 은 0.3-0.9 µg/mL, 그리고 formaldehyde는 0.6-1.8 µg/mL의 범위에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소되었다. GVP 용액 내에 존재하는 특정 연기 성분들의 양을 측정해서 이들 성분들이 2R4F GVP의 세포독성에 대하여 미치는 기여도를 조사 하였다(Table 5).

Acetaldehyde, acrolein 그리고 formaldehyde의 EC₅₀은 각각 146.5, 0.61 그리고 1.2 µg/mL로서 acrolein이 가장 높은 세포독성을 나타내었고, 전체 GVP의 세포독성에 대해서도 acrolein이 61.0%의 현저히 높은 독성 기여도를 보이는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 carbon을 함유한 필터를 채택한 담배의 경우 이들 가스상 성분들이 효과적으로 제거되어 전 연기(whole smoke) 수준에서 낮은 세포독성을 보이는 경우를 잘 설명하는 결과라고 판단된다(Bombick *et al.*, 1997; Lauterbach, 2002).

Table 5. Contribution of acetaldehyde, acrolein, and formaldehyde to the cytotoxicity of the cigarette smoke gas/vapor phase

Smoke constituents	Dose range (µg/mL)	EC ₅₀ value (µg/mL)	Kentucky reference cigarette 2R4F		
			Yield	Toxicity index	Contribution to GVP EC ₅₀ (%)
	(cig./mL)	(cig./mL)	(cigarette)		
GVP	0.009-0.012	0.0107	1	93.458	100
Carbonyls	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/cig.)		
Acetaldehyde	50-300	146.5	454.0	3.099	3.31
Acrolein	0.3-0.6	0.61	34.8	57.049	61.0
Formaldehyde	0.3-1.8	1.21	5.0	4.132	4.42

결 론

본 연구에서는 35종 특정 화학 성분들의 세포 독성 및 돌연변이 유발성을 측정하여, 2R4F 표준 담배의 TPM 및 GVP 성분의 전체 활성에 대한 기여도를 조사하였다. *Salmonella typhimurium* TA98을 이용하여 대사활성법으로 담배 TPM 및 연기 주요성분들에 대한 돌연변이 유발성을 조사한 결과, 6종의 heterocyclic amine류 등이 현저히 높은 돌연변이 활성을 나타내었고, 특히 MeIQ의 specific activity는 7.9×10^5 revertants/µg로서 가장 높은 돌연변이 활성을 보였다. 그러나 2R4F 담배 연기 중 포함된 성분의 함량은 상당히 낮기(0.30 ng/cigarette) 때문에 전체 TPM의 돌연변이 활성에 대한 기여도는 0.85%인 것으로 나타났다. BALB/c 3T3 fibroblast 세포를 이용해서 담배 연기의 TPM 및 GVP에 함유된 특정성분들에 대한 세포독성을 측정한 결과, hydroquinone 및 acrolein의 EC₅₀이 각각 3.4 µg/ml과 0.6 µg/ml로서 현저히 높은 세포독성을 보였다. 2R4F 표준담배 1개피 중 포함된 단일성분의 양을 고려해서 독성기여도를 조사한 결과, TPM의 세포독성에 대하여 hydroquinone이 8.7% , 그리고 GVP에 대하여 acrolein이 61%의 높은 세포독성 기여도를 보이는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

Andreoli, C., Gigante, D. and Nunziata, A.

(2003) A review of *in vitro* methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol. in Vitro* 17: 587-594.

Baker, R. R., Massey, E. D. and Smith, G. (2004) An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food Chem. Toxicol.* 42: S53-S83.

Bombick, D. W., Ayres, P. H., Putnam, K., Bombick, B. R. and Doolittle, D. J. (1998) Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 3. *In vitro* toxicity of whole smoke. *Food Chem. Toxicol.* 36: 191-197.

Bombick, D. W., Bombick, B. R., Swauger, J. and Doolittle, D. J. (2001) The use of *in vitro* short term tests to evaluate progress toward reducing the toxicity of cigarette smoke. CORESTA Meet. Smoke-Techno Group, Xian: Paper No. ST4.

Bombick, D. W., Bombick, B. R., Ayres, P. H., Putnam, K., Avalos, J., Borgerding, M. F. and Doolittle, D. J. (1997) Evaluation of the genotoxic and cytotoxic potential of mainstream whole smoke and smokecondensate from a cigarette containing a novel carbon filter. *Fund. Appl. Toxicol.* 39: 11-17.

Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological

- alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24: 119-124.
- Cooper, R. L., Lindsey, A. J. and Wallwe, R. E. (1954) The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke. *Chem. Ind.* 46: 14-18.
- Curvall, M., Enzell, C. R. and Pettersson, B. (1984) An evaluation of the utility of four in vitro short term tests for predicting the cytotoxicity of individual compounds derived from tobacco smoke. *Cell Biol. Toxicol.* 1: 173-193.
- DeMarini, D. M. (1983) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutat. Res.* 114: 59-89.
- Doolittle, D. J., Lee, C. K., Ivett, J. L., Mirsalis, J. C., Riccio, E., Rudd, C. J., Burger, G. T. and Hayes A. W. (1990) Comparative studies on the genotoxic activity of mainstream smoke condensate from cigarettes which burn or only heat tobacco. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 93-105.
- Dube, M. F. and Green, C. R. (1982) Method of collection of smoke for analytical purpose. *Rec. Adv. Sci.* 8: 42-102
- Green, C. R. and Rodgman, A. (1996) The tobacco chemists research conference: a half century forum for advances in analytical methodology of tobacco and its products. *Rec. Adv. Tob. Sco.* 22: 131-304.
- Health Canada (1999) Determination of selected carbonyls in mainstream tobacco smoke. Tobacco Control Program Health Canada-Official method T-104.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I. and EI-Bayoumy, K. (2001) The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 767-790.
- Johnstone, R. A. W. and Plimmer, J. R. (1959) The chemical constituents of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Review* 59: 885-936.
- Lauterbach, J. H. (2002) Smoke chemistry: A useful predictor of smoke toxicology. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 28: 6-68.
- Manabe, S. and Wada, O. (1990) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in cigarette smoke condensate and cigarette smoke-polluted indoor air. *Environ. Pollute.* 64: 121-132.
- Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113: 173-215.
- Phillips, D. H. (2002): Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23: 1979-2004.
- Putnam, K. P., Bombick, D. W. and Doolittle D. J. (2002) Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol. in Vitro* 16: 599-607.
- Rodgman, A. and Green, C. R. (2003) Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke-hazard and hoopla. *Beitrag zur Tabakforschung* 20: 481-545.
- Stedman, R. L. (1968) The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Review* 68: 153-207.
- Thomson, H. V. (1992) International reference method for the smoking of cigarettes. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 18: 69-94.
- Totsuka, Y., Takamura-Enya, T., Nishigaki, R., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2004) Mutagens formed from β -carbolines with aromatic amines. *J. Chromatography B.* 802: 135-141.