

원숭이 간 약물대사효소 유전자 발현에 미치는 3-methylcholanthrene 영향

이경원 · 아사오카^{1*} · 신윤용
이화여자 대학교 약학대학
¹교토대학교 영장류 연구소

Effects of 3-methylcholanthrene on the Expression of Drug Metabolizing Enzyme Genes in Monkey Liver

Kyung W. Lee, Kazuo Asaoka*, and Yhun Y. Sheen

College of Pharmacy, Ewha Womans University,

¹Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University

(Received June 2, 2004 / Accepted June 15, 2004)

ABSTRACT: In order to understand the mechanism of the regulation of drug metabolizing enzyme gene expression, we have studied the induction of CYP1A1 and GST α , μ , π enzymes in Japanese monkey and rhesus monkey after the treatment with 3-methylcholanthrene (3MC) and di-n-butyl phthalate (DBP) and bisphenol A (BPA). The levels of mRNA were measured by RT-PCR in brain, intestine and liver. In the case of adult monkey, treatment with 3MC induced CYP1A1 mRNA in liver by 10-fold. The treatment with DBP induced CYP1A1 mRNA. Effects of 3MC and DBP on GST mRNA expression was not clear. But GST μ was slightly inhibited by the treatment with 3MC and DBP. GST π was not induced by the treatment with 3MC and DBP in liver. GST α was slightly induced by the treatment with 3MC and DBP in liver. In the case of fetus monkey, the basal levels of fetus CYP1A1 mRNA and GSTs mRNA were relatively low compared to adult monkey. As the age of monkey increased, the basal levels of CYP1A1 mRNA were also increased. 3MC induced the expression of CYP1A1 mRNA in liver. The levels of GST μ and GST α were not changed by the treatment with 3MC and DBP. GST π was slightly induced by the treatment with 3MC and DBP.

Key words : 3MC, Monkey, CYP1A1, GST

서 론

생체내 전환에 가장 큰 역할을 하는 장기는 간이며 주로 간세포 내에 존재하는 약물대사효소가 그 역할을 담당한다. 1 상 생체내 전환은 일반적으로 cytochrome P450 (CYP)에 의한 산화적 대사작용에 의해 일어나며 이러한 CYP는 세포내의 단백질과 핵산에 결합하여 세포기능에 변화를 가져올 수 있는 친전자성 대사체를 만들어내기도 한다. CYP에 의해 생성된 친전자성 대사체는 microsomal epoxide hydrolase (mEH)에 의해 배설되기 쉬운 dihydrodiols로 해독된다. 또 이 대사체는 2 상 생체내 전환에 관여하는 대표적인 약물대사효소인 glutathione S-transferase (GST)에

의해 glutathione에 포함되기도 한다. 1상과 2상 약물대사효소 사이의 조합은 지난 수년에 걸쳐 명백해져 왔으며, 이 조합의 결과로 생체내 전환에 의한 활성화와 해독화 사이의 균형이 이루어진다. 또한 이것은 약물의 조직 특이적인 독성 뿐만 아니라 발암성에도 결정적인 역할을 하게 된다(Murray *et al.*, 1988; de Waziers *et al.*, 1990; Anttila *et al.*, 1992). 원숭이는 사람과 가장 가까운 종이기 때문에 사람에서의 대사와 독성을 예측하기 위한 적절한 동물 모델로 생각되고 있다. 특히 필리핀원숭이(cynomolgus monkey 또는 crab-eating monkey; *Macaca fascicularis*)와 마모셋원숭이(marmoset; *Callithrix jacchus*)가 일반적으로 많이 사용되고 있다. 사람과 원숭이가 속하는 영장류(영장목, Primates)는 고등영장류인 침원숭이(침원숭이 이목, Anthropoidea)와 하등영장류인 원시원숭이(원시원숭이 이목, Prosimii)로 나누어지고 침원숭

*To whom correspondence should be addressed

이는 다시 원숭이와 유인원(Man-like Apes)로 나누어진다. 원숭이에는 꼬리감기원숭이과(Cebidae), 마모셋과(Callitrichidae), 긴꼬리원숭이과(Cercopithecidae) 등이 있고 유인원에는 성성이과(Pongidae)와 긴팔원숭이과(Hylobatidae), 사람과(Hominidae) 등이 있다. 마모셋은 마모셋과 마모셋속(Callithrix)에 속하는 원숭이이고 필리핀원숭이는 긴꼬리원숭이아과(Cercopithecinae)의 마카쿠속(Macaca)에 속하는 원숭이이다. 본 실험에 사용한 원숭이는 필리핀원숭이와 같이 마카쿠속에 속하는 원숭이인 일본원숭이(Japanese monkey 또는 Japanese macaque; *Macaca fasciata*)와 히말라야원숭이(rhesus monkey 또는 rhesus macaque; *Macaca mulatta*)이다. 필리핀 원숭이를 이용한 약물대사효소 발현실험을 살펴보면, 필리핀 원숭이의 간 microsome에서 hydroxylation, O-dealkylation, N-dealkylation 등의 CYP에 의한 일반적인 약물대사반응이 관찰되었다. 필리핀원숭이의 CYP1A, CYP2A 또는 CYP2B, CYP2C, CYP3A 등의 단백질의 본질적인 활성은 사람과 비슷하며 AROD 반응의 속도는 사람, 랫트와 모두 비슷하나 AROD 활성의 본질적인 MEPB profile은 사람보다는 랫트와 더 비슷하다고 한다(Richard *et al.*, 1994). 마모셋 원숭이에서는 CYP2D19와 CYP3A21을 분리할 수 있었는데, 각각은 사람의 CYP2D6, CYP3A4와 90% 동일하고 3A21의 값은 필리핀 원숭이의 3A8에 비해 동일성이 3% 낮으나 개나 설치류보다는 동일성이 11~23% 높은 것으로 나타났다. 따라서 마모셋원숭이는 사람과 비영장류 실험동물 사이의 중간 정도에 위치한다는 것을 알 수 있었다(Igarashi *et al.*, 1997).

Phthalate는 플라스틱의 가소제로 사용되는 물질로 내분비계 장애물질로 의심되는 물질은 di-ethyl hexyl phthalate (DEHP 또는 DOP), di-n-butyl phthalate (DBP), butylbenzyl phthalate (BBP), di-ethyl phthalate (DEP), adipate 계통인 di-ethyl hexyl adipate (DEHA) 등의 약 10 여종이 있다. Bisphenol A는 식품과 음식의 포장재로 사용되는 폴리카보네이트 플라스틱과 금속제품을 코팅하는 데 이용되는 에폭시 수지의 제조에 사용되며 치과 치료에 사용하는 몇몇 중합체에도 포함되어 있는 내분비계 교란물질이다.

본 실험에서는 긴꼬리원숭이아과의 마카쿠속에 속하는 일본원숭이(Japanese monkey 또는 Japanese macaque)와 히말라야원숭이(rhesus monkey 또는 rhesus macaque)를 사용하여, 원숭이의 간과 소장에서 약물대사효소로서 CYP1A1, GST α , GST μ , GST π 등의 mRNA 발현 정도를 역전사 연쇄증폭반응(RT-PCR)을 통하여 알아보았고 전형적인 CYP1A1 유도제인 3-methylcholanthrene과 내분비계 교란물질인 di-n-butyl phthalate가 이에 미치는 영향을 알아보았다.

실험 재료 및 방법

실험동물

일본 교토 대학에서 원숭이의 냉동 조직을 받아 분석하였다. 사용된 원숭이의 종류는 일본원숭이(Japanese monkey 또는 Japanese macaque; *Macaca fasciata*)와 히말라야원숭이(rhesus monkey 또는 rhesus macaque; *Macaca mulatta*)이다.

약물처치

일본 교토 대학의 영장류 연구센터에서 약물처치된 원숭이의 장기를 제공받았다. 무처치 어미 일본원숭이로부터 간과 소장의 조직을 제공받았고 무처치 태아 일본원숭이, 무처치 성인 일본 원숭이, 3-methylcholanthrene (3MC)를 처치한 어미 일본원숭이와 태아 일본원숭이, di-n-butyl phthalate (DBP)를 처치한 어미 일본원숭이와 태아 일본원숭이, DBP를 처치한 어미 히말라야원숭이와 태아 히말라야원숭이, Bisphenol A (BPA)를 처치한 태아 일본원숭이로부터는 간, 소장, 뇌 조직을 제공받았다. 특히 태아 원숭이의 약물 처치는 165일 중 145일째의 태아 원숭이에 행해졌다. 3MC는 10 mg/Kg의 농도로, DBP는 1 g/Kg의 농도로, BPA는 500 mg/Kg의 농도로 투여되었다.

조직에서의 total RNA 분리

조직 0.2 g에 TRIzol reagent 2.5 ml를 가한 후 이를 homogenizer를 사용하여 분쇄시킨 후 상온에 5분간 반응시켰다. 분쇄액에 CHCl₃를 0.5 ml (TRIzol reagent 2.5 ml 당)를 가한 후, 15초 동안 강하게 vortexing하고, 상온에 다시 3분간 방치시켰다. 4°C에서 15분간 11,000 g로 원심분리한 후, 수층인 상층을 취하였다. 수층과 동일 용적의 CHCl₃을 가한 후 강하게 vortexing하여 추출하고 다시 수층인 상층을 취해 동일 용적의 차가운 isopropyl alcohol을 가하고 위·아래로 흔들어 섞어 주었다. 상온에 20분간 반응시키고 4°C에서 10분간 11,000 g로 원심분리하여 RNA pellet을 얻었다. 이를 isopropyl alcohol과 동일한 용적의 75% ethanol로 세척한 후, vortexing하고 4°C에서 5분간 7,500 g로 원심분리하였다. 이 세척과정을 2회 반복한 후 얻은 RNA pellet을 speed vac을 이용하여 gel상으로 말린 후 적당량의 0.1% DEPC 용액에 녹였다. 55~60°C에 10분간 방치시킨 후, 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정해서 다음의 식으로 농도를 구하였다. 260 nm에서의 흡광도와 280 nm에서의 흡광도의 비율을 계산하여 OD₂₆₀/OD₂₈₀이 1.65 이상인 것을 RT-PCR에 사용하였다.

역전사연쇄증폭반응(RT-PCR)

분리한 total RNA의 3 µg에 해당하는 양에 0.1% DEPC 용액을 가해서 10.5 µl가 되게 한 다음, 여기에 random primer 0.1 µg을 넣고 70°C에서 10분간 반응시킨 후, 얼음에서 급속히 냉각시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1 µl, 100 mM DTT 2 µl, 5× first strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.0), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] 4 µl와 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase 200 units, RNasin 20 units를 넣었다. 23°C에서 10분간 방치시키고 37°C에서 1 시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열하여 반응을 종결시켰다. RT product 1 µl에 forward primer와 reverse primer를 각각 10 pmol씩 넣고 10× reaction buffer 1 µl, 25 mM MgCl₂ 1 µl, 2.5 mM dNTPs 0.5 µl, Taq polymerase 0.5 units을 가하고 삼차 증류수로 전체량이 10 µl이 되게 한 후에 다음의 조건으로 Minicyler(MJ research)에서 반응시켰다.

PCR 반응의 결과는 ethidium bromide로 염색한 1.5~2% agarose gel상에서 전기 영동하여 확인하였고 image analyzer를 사용하여 상대적인 양을 정량하였다.

Competitive PCR

PCR tube에 RT product 1 µl와 일정농도의 DNA competitor 1 µl를 넣은 후 10 µl PCR과 동량의 시약을 넣고 전체량이 10 µl가 되도록 삼차 증류수를 가하고 반응시켰다. Ethidium bromide로 염색된 2% agarose gel상에서 전기 영동한 후 image analyzer로 분석하여 RT product 1 µl (3/20 µg total RNA)에 포함되어 있는 목적 mRNA의 copy 수를 결정하였다.

결 과

3MC와 DBP가 원숭이 간의 CYP1A1 mRNA 발현에 미치는 영향

다환상 방향족 화합물이며 전형적인 CYP1A1 유도제인 3-methylcholanthrene (3MC)와 가스제로 많이 쓰이며 내분비 장애물질 중의 하나인 di-n-butyl phthalate (DBP)가 원숭이 간의 약물 대사 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 무처치 일본 원숭이, 3MC-처치 일본 원숭이, DBP-처치 일본 원숭이, DBP-처치 히말라야 원숭이의 간에서의 CYP1A1 mRNA 발현정도를 RT-PCR로 살펴보았다. 각각은 임신한 원숭이와 임신하지 않은 원숭이의 발현 정도를 비교하였으며, 어미 원숭이와 태아 원숭이의 발현 정도도 비교하였다. 사람의 CYP1A1 primer로 원숭이 간의 RT product를 증폭시킨 후 1.5% agarose gel에 전기영동시켜 460 bps의 PCR

product를 얻을 수 있었다(Fig. 1). 이것을 image analyzer를 사용해 정량하고 153 bps의 actin 양으로 보정한 후 무처치 성인 원숭이의 값을 기준(100%)으로 환산하였다(Fig. 1). 환산 결과, 임신한 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 68%로 임신하지 않은 성인 원숭이보다 낮게 나타났다. 3MC에 의해서 임신한 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 933%로 크게 증가하였으며 DBP에 의해서도 임신하지 않은 원숭이는 299%, 임신한 원숭이는 788%로 크게 증가하였다. DBP를 처치한 히말라야 원숭이는 127%로 일본원숭이보다는 작았지만 무처치 성인 원숭이보다는 조금 높게 나타났다. 태아 원숭이의 경우에는 성인 원숭이보다는 본질적인 CYP1A1 mRNA 발현정도가 낮게 나타나서 무처치 일본원숭이의 태아와 DBP-처치 히말라야원숭이의 태아에서는 mRNA가 나타나지 않았다(Fig. 2). 그러나 3MC를 처치한 태아 원숭이는 1023%로 어미 원숭이 만큼의 증가를 보였고 DBP를 처치한 일본원숭이의 경우에도 어미 원숭이에 비해서는 매우 작았지만 109%를 나타내었다.

3MC와 DBP가 원숭이 간의 GST mRNA 발현에 미치는 영향

다환상 방향족 화합물이며 전형적인 약물대사효소 유도제인 3-methylcholanthrene (3MC)와 가스제로 많이 쓰이며 내분비 장애물질 중의 하나인 di-n-butyl phthalate (DBP)가 원숭이 간의 약물 대사 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 무처치 일본 원숭이, 3MC-처치 일본 원숭이, DBP-처치 일본원숭이, DBP-처치 히말라야 원숭이의 간에서의 GST

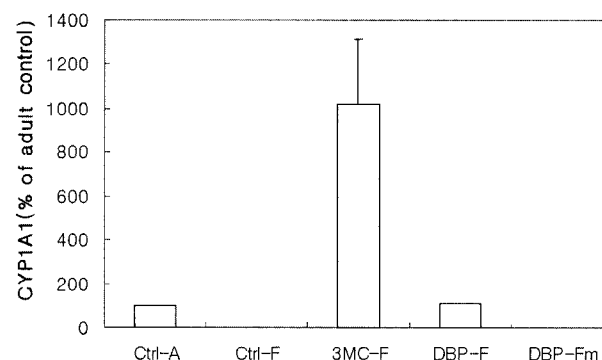


Fig. 1. The relative levels of CYP1A1 mRNA in adult monkey liver after the treatment of 3MC and DBP: Each data of CYP1A1 mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; control Japanese monkey (Mff) mother (Ctrl-M); control Mff adult (Ctrl-A); 3MC treated Mff mother (3MC-M); DBP treated Mff adult (DBP-A); DBP treated Mff mother (DBP-M); DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); control Mff fetus (Ctrl-F); 3MC treated Mff fetus (3MC-F); DBP treated Mff fetus (DBP-F); DBP treated Mm fetus (DBP-Fm)

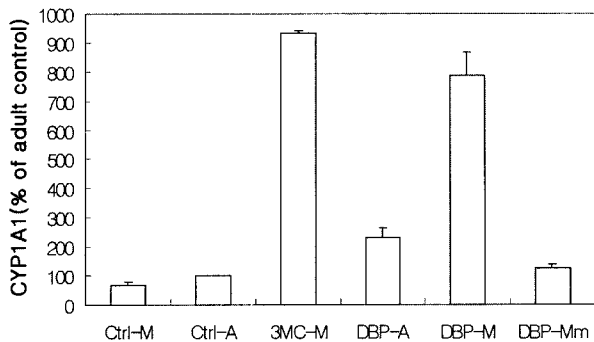


Fig. 2. The relative levels of CYP1A1 mRNA in fetal monkey liver after the treatment of 3MC and DBP: Each data of CYP1A1 mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; control Japanese monkey(Mff) mother (Ctrl-M); control Mff adult (Ctrl-A); 3MC treated Mff mother (3MC-M); DBP treated Mff adult (DBP-A); DBP treated Mff mother (DBP-M); DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); control Mff fetus (Ctrl-F); 3MC treated Mff fetus (3MC-F); DBP treated Mff fetus (DBP-F); DBP treated Mm fetus (DBP-Fm).

mRNA 발현정도를 RT-PCR로 살펴보았다. 각각은 임신한 원숭이와 임신하지 않은 원숭이의 발현 정도를 비교하였으며, 어미 원숭이와 태아 원숭이의 발현정도도 비교하였다. 원숭이 간의 RT product를 사람의 GST α , GST μ , GST π 의 각각의 primer로 증폭시키고 1.8% agarose gel에 전기영동시킨 결과 227 bps의 GST α , 468 bps의 GST μ , 245 bps의 GST π PCR product를 얻을 수 있었다. 각각을 image analyzer로 정량한 후 actin 양으로 정량한 후 무처리 성인 원숭이의 값을 100%로 환산하였을 때(Fig. 3), GST α 의 mRNA 발현 정도는 무처리 임신한 원숭이에서 86%, 3MC-처리 임신한 원숭이에서 59%, DBP-처리 성인 원숭이에서 112%, DBP-처리 임신한 원숭이에서 38%, DBP-처리 임신한 히말라야원숭이에서는 34%로 나타났다. 이와 같이 성인 원숭이의 GST α mRNA의 발현 정도는 임신하지 않은 원숭이가 임신한 원숭이보다 높게 나타났으며, 태아 원숭이의 경우에는 무처리 태아 원숭이는 53%, 3MC-처리 태아 원숭이는 70%, DBP-처리 태아 원숭이는 80%, DBP-처리 히말라야 원숭이는 117%로 3MC나 DBP를 처리한 태아 원숭이의 GST α mRNA 발현 정도가 무처리 태아 원숭이의 발현 정도보다 높은 것으로 나타났다(Fig. 4). GST μ 의 mRNA 발현 정도는 무처리 임신한 원숭이에서 114%, 3MC-처리 임신한 원숭이에서 63%, DBP-처리 성인 원숭이에서 125%, DBP-처리 임신한 원숭이에서 53%, DBP-처리 임신한 히말라야원숭이에서는 60%로 나타났다. 임신한 원숭이만을 비교해보면 3MC나 DBP 처리에 의해 GST μ mRNA의 발현 정도가 무처리 원숭이보다 낮게 나타났

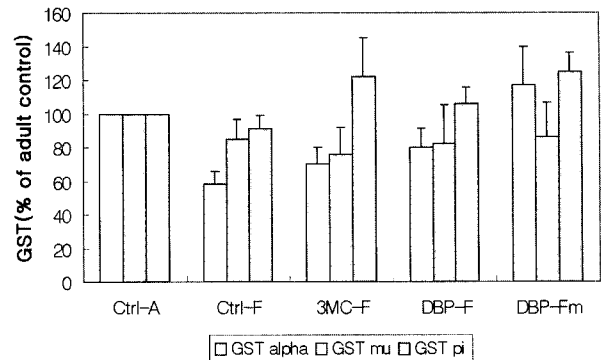


Fig. 3. The relative levels of GST mRNA in adult monkey liver after the treatment of 3MC and DBP: Each data of GST mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; control Japanese monkey(Mff) mother (Ctrl-M); control Mff adult (Ctrl-A); 3MC treated Mff mother (3MC-M); DBP treated Mff adult (DBP-A); DBP treated Mff mother (DBP-M); DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); control Mff fetus (Ctrl-F); 3MC treated Mff fetus (3MC-F); DBP treated Mff fetus (DBP-F); DBP treated Mm fetus (DBP-Fm).

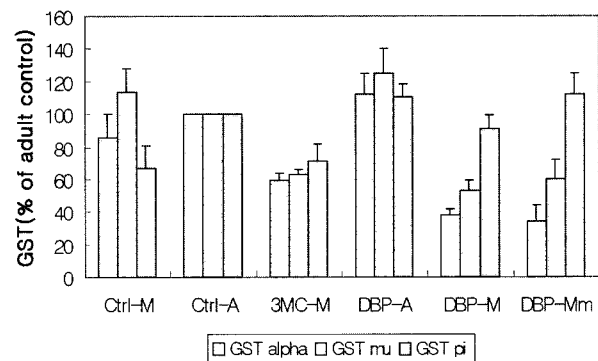


Fig. 4. The relative levels of GST mRNA in fetal monkey liver after the treatment of 3MC and DBP: Each data of GST mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; control Japanese monkey(Mff) mother (Ctrl-M); control Mff adult (Ctrl-A); 3MC treated Mff mother (3MC-M); DBP treated Mff adult (DBP-A); DBP treated Mff mother (DBP-M); DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); control Mff fetus (Ctrl-F); 3MC treated Mff fetus (3MC-F); DBP treated Mff fetus (DBP-F); DBP treated Mm fetus (DBP-Fm).

다. 태아 원숭이의 GST μ mRNA의 발현 정도를 비교해보면 무처리 태아 원숭이는 85%, 3MC-처리 태아 원숭이는 76%, DBP-처리 태아 원숭이는 82%, DBP-처리 히말라야 원숭이는 86%로 비슷한 발현 정도를 보였다. GST π 의 mRNA 발현 정도는 무처리 임신한 원숭이에서 67%, 3MC-처리 임신한 원숭이에서 71%, DBP-처리 성인 원숭이에서

111%, DBP-처리 임신한 원숭이에서 91%, DBP-처리 임신한 히말라야원숭이에서는 112%로 임신한 원숭이끼리만 또는 임신하지 않은 원숭이끼리만을 비교해보면 GST π mRNA의 발현정도가 다소 증가한 것으로 나타났다. 태아 원숭이의 경우에도 무처리 태아 원숭이는 91%, 3MC-처리 태아 원숭이는 122%, DBP-처리 태아 원숭이는 106%, DBP-처리 히말라야 원숭이는 125%로 3MC와 DBP 처리에 의해서 약간의 증가를 보였다.

고 찰

원숭이는 사람에서의 대사와 독성을 예측하기 위한 적절한 동물모델로 생각되고 있다. 원숭이 중 약물대사와 독성 실험에 가장 많이 사용되는 원숭이는, 본 실험에 사용된 일본원숭이(Japanese monkey)나 히말라야원숭이(rhesus monkey)와 같이 마카쿠속에 속하는 필리핀원숭이(cynomolgus monkey)다. 필리핀 원숭이의 CYP1A1 아미노산 서열은 사람과 94% 동일하고, CYP1A2의 경우는 93% 동일하다(Komori *et al.*, 1992; Sakuma *et al.*, 1998). 필리핀원숭이의 간 microsome에서, β -Naphtho flavone (β -NF) 처리에 의해 CYP1A1의 단일클론항체에 의해 검출되는 단백질이 유도되고 arylhydrocarbon hydroxylase (AHH)로 알려진 benzopyrene 3-hydroxylation의 활성이 유도되는 것으로 CYP1A1 유도를 확인하였고 β -NF에 caffeine의 N3-demethylation이 증가하는 것으로 CYP1A2의 유도도 확인하였다. β -NF에 의해 필리핀원숭이에서는 CYP1A1과 CYP1A2가 모두 현저히 유도된다는 것이 MROD와 EROD의 증가를 통해서도 관찰되었는데, 이것에는 종에 따른 차이를 보인다. 랫트에서는 CYP1A1이 CYP1A2에 비해 EROD 활성이 크고 토끼에서는 CYP1A2가 EROD 활성이 큰 반면, 마우스에서는 CYP1A1과 CYP1A2가 비슷한 활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 또 랫트에서는 CYP1A1은 우선적으로 EROD에 작용하고 CYP1A2는 MROD에 우선적으로 작용하는 반면 사람이나 마우스에서는 CYP1A2가 EROD와 MROD에 같은 속도로 작용한다는 보고가 있었다(Bullock *et al.*, 1995). 일반적으로 MROD와 EROD의 활성은 3MC나 TCDD 등의 다환상 방향족 화합물에 의해 크게 증가하고, PROD와 BROD는 phenobarbital (PB)에 의해 증가하므로 MROD와 EROD의 활성은 CYP1A에 의해 촉매되고 PROD와 BROD의 활성은 CYP2B에 의해 촉매된다고 생각되고 있다. 그런데 마카쿠속과는 다른 속의 원숭이인 마모셋원숭이에서는 다른 경향을 보인다는 보고가 있었다. 사람이나 설치류에서 CYP1A1의 활성에 선택적으로 나타나는 AHH가 CYP1A1에 의해 효과적으로 촉매되지 않고, PB가 PROD를 증가시

키지 않으며 TCDD가 PROD나 BROD의 활성을 증가시킨다는 것이다. 그러나 TCDD가 PROD나 BROD의 활성을 유도하는 것은 β -NF를 처리한 필리핀원숭이에서도 나타나며 사람에서도 CYP1A1이 PROD의 활성을 촉매할 수 있다는 보고도 있었다(Thomas *et al.*, 1996; Bullock *et al.*, 1995; Richard *et al.*, 1994). 무처리 마모셋원숭이의 간에서는 CYP1A2는 검출되나 CYP1A1은 검출되지 않으며 TCDD 처리에 의해서는 둘 다 유도된다. 이것은 필리핀 원숭이의 간에 본질적인 CYP1A1과 CYP1A2가 존재하지 않는 것과는 다르나 TCDD에 유도되는 것과는 같다. CYP1A1의 경우 사람의 간 microsome에서도 단백질은 검출되지 않으나 RT-PCR를 사용해 mRNA는 검출할 수 있다고 한다(Thomas *et al.*, 1996). 본 실험에서 일본원숭이와 히말라야 원숭이에서도 RT-PCR을 이용하여 본질적인 CYP1A1 mRNA를 검출할 수 있었다. 약물처치를 하지 않은 일본원숭이의 간에서 추출한 total RNA 3/20 μ g의 RT product는 약 5×10^4 copies의 competitor에 해당하는 CYP1A1을 포함하고 있었고 3MC 처리에 의해 10배 이상 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 또 임신한 원숭이의 간에서의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 임신하지 않은 원숭이보다 작게 나타났으며, 태아 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 성인 원숭이의 발현정도의 10% 이하인 것으로 나타났다. 그러나 3MC 처리된 태아 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 3MC 처리된 어미만큼 증가하였다. DBP도 CYP1A1 mRNA의 발현을 증가시켰다. 그러나 임신한 성인 일본원숭이에서의 발현유도가 임신하지 않은 성인 일본원숭이보다 크게 나타났으며, 히말라야원숭이에서의 유도정도는 매우 작았다. 태아원숭이에서도 DBP에 의해 CYP1A1 mRNA가 유도되었지만 유도된 정도는 3MC에 의해 유도된 정도의 10%에 그쳤다. 태아 히말라야 원숭이에서는 DBP 처리에 의해 CYP1A1 mRNA 발현이 유도되지 않았다. 이와 같이 성인 원숭이에서는 3MC 뿐만아니라, 작은 정도이지만 DBP에 의해서도 CYP1A1 mRNA의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 실제로 TCDD와 경쟁하여 AhR과 결합할 수 없음에도 불구하고 CYP1A1 유전자의 발현을 활성화시키는 외인성 물질이 관찰되고 있어, 다른 신호전달 경로들이 고려되고 있다. 그 예로, CYP1A1 유도물질이 매우 약한 AhR 리간드이거나 생체내에서 AhR과 결합할 수 있는 형태로 전환되는 것이 생각되고 있으며 RARs 신호전달 경로나 tyrosine kinase 활성화와 같은 다른 신호전달 경로를 통해서 반응을 나타낼 수도 있다고 생각되고 있다(Delescluse *et al.*, 2000).

사람, 원숭이, 개의 간세포를 1차 배양하여 유도제로 3MC, PB, oltipraz, 1,2-dithiol-3-thione을 처리한 결과들

보면 PB와 oltipraz 처치에 의해 사람과 원숭이와 개 모두에서, 모든 검체에서 발현정도가 증가한 것은 아니지만 GST α 가 강하게 유도되었고 3MC에 의해서는 주로 사람의 간세포에서만 GST α 가 유도되었다고 한다. 또, 원숭이와 개에서 GST μ mRNA가 검출되었으나 oltipraz에 의해서만 유도되었고 GST π mRNA는 개의 간세포에서 발현되었으나 3MC에 의해 영향을 받지 않았다는 보고가 있었다(de Souse *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000). 영장류인 사람, 히말라야원숭이, 마모셋원숭이, 나무뒤쥐의 약물대사효소 활성을 비교해본 결과 특히 glutathion peroxidase와 GST의 활성은 종간에 매우 큰 차이를 보였다고 한다(Kurata *et al.*, 1993). 랫트의 경우 GST α 는 GST1a, 1b, 2, 8, 10 등의 아과를 포함하고 GST μ 는 3, 4, 6, 9 등의 아과를 포함하며 GST π 는 GST7, GST θ 는 GST 5, 12, 13 등의 아과를 포함한다. 랫트를 이용한 생체내 실험결과 3MC에 의해 GST α 에 속하는 GST1b와 GST π 에 속하는 GST7 아과의 mRNA 발현정도가 증가하였으며 생체의 실험에서도 비슷한 결과를 얻었다고 한다(Dwivedi *et al.*, 1993; Dervel *et al.*, 1993; Morel *et al.*, 1993; Langouet *et al.*, 1995; Sippel *et al.*, 1996).

감사의 글

이 연구는 과학기술부 특정연구개발사업의 일환으로 추진되고 있는 바이오챌린저사업의 연구과제로 지원받았음.

참고문헌

- Anttila, S., Hukkanen, J., Hakkola, J., Stjernvall, T., Beaune, P., Edwards, R. J. and Boobis, A. R. Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **16**, 242-249 (1992)
- Bullock, P., Pearce, R., Draper, A., Podval, J., Bracken, W., Veltman, J., Thomas, P. and Parkinson, A. Induction of liver microsome cytochrome P450 in cynomolgus monkeys. *Drug. Metab. Dispos.* **23**(7), 736-748 (1995)
- Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G. and Rahmani, R. Is CYP1A1 induction always related to AhR signaling pathway? *Toxicology* **153**(1-3), 73-82 (2000)
- Dervel, M., Igarashi, T. and Satoh, T. Differential induction of glutathion S-transferase subunits by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and ethoxyquin in rat liver and kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* **1158**(2), 175-180 (1993)
- de Sousa, G., Langouet, S., Nicolas, F., Lorenzon, G., Placidi, M., Rahmani, R. and Guillouzo, A. Increase of cytochrome P-450 1A and glutamine transcripts in cultured hepatocytes from dogs, monkeys and humans after cryopreservation. *Cell. Biol. Toxicol.* **12**(4-6), 351-358 (1996)
- de Waziers, I., Cugnenc, P. H., Yang, C. S., Leroux, J. P. and Beaune, P. H. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathion transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 387-394 (1990)
- Dwivedi, R. S., Primiano, T. and Novak, R. F. Xenobiotic-modulated expression of glutathion S-transferase genes in primary rat hepatocyte culture. *Biochem. Biophys. Acta.* **1174**(1), 43-53 (1993)
- Igarashi, T., Sacuma, T., Isogai, M., Nagata, R. and Kamataki, T. Marmoset liver cytochrome P450s: study for expression and molecular cloning of their cDNAs. *Arch. Biochem. Biophys.* **339**(1), 85-91 (1997)
- Komori, M., Kikuchi, O., Sakuma, T., Funaki, J., Kitada, M. and Kamataki, T. Molecular cloning of monkey liver cytochrome P-450 cDNAs: similarity of the primary sequences to human cytochrome P-450. *Biochim. Biophys. Acta.* **1171**, 141-146 (1992)
- Langouet, S., Morse, F., Meyer, D. J., Fardel, O., Corcos, L., Ketterer, B. and Guillouzo, A. A comparison of the effect of inducers on the expression of glutathione-S-Transferases in the liver of the intact rat and in hepatocytes in primary culture. *Hepatology* **23**(4), 881-887 (1996)
- Morel, F., Fardel, O., Meyer, D. J., Langouet, S., Gilmore, K. S., Meunier, B., Tu, C. P., Kensler, T. W., Ketterer, B. and Guillouzo, A. Preferential increase of glutathion S-transferase class alpha transcripts in cultured human hepatocytes by phenobarbital, 3-methylcholanthrene, and dithiolethiones. *Cancer Res.* **53**(2), 231-234 (1993)
- Murray, G. I., Barnes, T. S., Sewell, H. F., Ewen, S. W. B., Melvin, W. T. and Burke, M. D. The immunocytochemical localization and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 465-475 (1998)
- Sakuma, T., Hieda, M., Igarashi, T., Ohgiya, S., Nagata, R., Nemoto, N. and Kamataki, T. Molecular cloning and functional analysis of cynomolgus monkey CYP1A2. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 131-139 (1998)
- Sippel, H., Lindros, K. O. and Oninon, T. Distribution of glutathion S-transferase isoforms in rat liver after induction by beta-naphthoflavone or 3-methylcholanthrene. *Pharmacol. Toxicol.* **79**(2), 80-86 (1996)
- Spatzenegger, M., Horsmans, Y. and Verbeeck, R. K. Differential activities of CYP1A isozymes in hepatic and intestinal microsomes of control and 3-methylcholanthrene-induced rats. *Pharmacol. Toxicol.* **86**(2), 71-77 (2000)
- Wang, C., Bammler, T. K., Guo, Y., Kelly, E. J. and Eaton, E. L. Mu-class GSTs are responsible for aflatoxin B(1)-8,9-epoxide-conjugating activity in the nonhuman primate *macaca fascicularis* liver. *Toxicol. Sci.* **56**(1), 26-36 (2000)