Environmental Mutagens & Carcinogens 24-3 : 143-150 (2004)

송어 간세포와 생쥐 간세포에서 TCDD가 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향 비교 연구

김지선 · 민경난 · 신윤용*
이화여자대학교 약학대학

Comparative Study of TCDD Effect on CYP1A1 Gene Expression in Trout and Mouse Liver Cells.

Ji-Sun Kim, Kyung-Nan Min, and Yhun-Yhong Sheen*
College of Pharmacy, Ewha Womans Univ, Seoul, Korea
#11-1, Daehyun-dong, sudaemunku, seoul, 120-750, Korea

(Received September 9, 2004 / Accepted September 21, 2004)

ABSTRACT **: In mammalian, cytochrome P4501A1 (CYP1A1) is very important for metabolism of xenobiotics such as PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbon) and heterocyclic amine, and it is induced by environmental contaminants such as PAHs, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) and 3-MC (3-methylcholanthrene). In fish, like mammalian, when it is exposed to environmental contaminants, they cause specific and sensitive induction of CYP1A. Therefore, induction of CYP1A in fish and mammalian is widely used as a biomarker for exposure of environmental contaminants. In this study, to compare the function of Cyp1a1 in fish with it in mammalian, we have used rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) hepatoma cells (RTH-149) and mouse hepatocyte (Hepa-I). In order to examine induction of Cyp1a1 by TCDD, we have used the bioassay system. We examined effects of TCDD on the *Cyp1a1*-luciferase reporter gene activity, 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity and Cyp1a1 mRNA level.**

Key words : **CYPIAI, Hepa I, rainbow, trout, EROD, TCDD, 3mc, PAit**

서 론

사람을 비롯한 모든 생물체는 외인성 물질 (xenobiotics)이라 불리는 자연에서 유래되거나 합성된 수많은 화학물질에 노출되고 있다. 이것은 식품 첨가물, 환경오염물, 의약품, 농약, alkaloids, 열분해 산물 등을 포함한다. 이러한 외인성 물질들은 대부분 소수성 (hydrophobic) 형으로 쉽게 배설되지 않아 체내에 축적되어 독성을 나타나내게 된다. 따라서 생물체로부터 외인성 물질을 제거하기 위한 기관들이 잘 발달되어 있다. 이것은 배설과정을 포함하는 큰 효소계로 구성되어 있다. 이것을 외인성 물질의 생체 내 전환 (biotransformation)이라고 하며, 크게 소수성 형으로부터 쉽게 배설되는 형태인 친수성 (hydrophilic) 형으로 외인성 물질의 구조에 변형이 가해지는 두 단계로 구분할 수 있다. 1 상 (phase I) 생체 내 전환은 외인성 물질을 aromatic hydroxylation, aliphatic hydroxylation, epoxidation, dealkylation, nitrogen oxidation, oxidative dehalogenation과 같은 산화작용, reductive dehalogenation, nitroreduction, azoreduction과 같은 환원작용, 가수분해 작용 등을 통해 좀 더 극성인 물질로 바꾸는 과정이다. 이 과정을 통해 외인성 물질은 2 상 생체 내 전환이 쉽게 일어나는 형태로 바뀌게 된다. 이러한 1 상 생체 내 전환에 대표적인 효소계는 cytochrome P450 초과 (CYP450 superfamily)이다. 2 상 (phase II) 생체 내 전환은 1 상 생체 내 전환의 산화형의 대사물에 glucuronic acid, glutathione, sulfate, cysteine 혹은 acetate 등과 같은 작고 친수성이고 내인적 (endogenous)인 물질을 결합시켜 포합체를 만드는 것이다. 2 상 생체 내 전환에 관여하는 효소에는 glutathione transferase, UDP-glucuronosyl-transferase, N-acetyltransferase 등이 있다 (Gonzalez, 1989; Porter *et al.*, 1991).

1 상 생체 내 전환에 대표적인 효소계인 cytochrome P450는 heme을 포함하는 단백질로 산화반응을 촉매 하는 효소

*To whom correspondence should be addressed

이고, 다양한 동종 효소를 갖고 있다. Cytochrome P450의 기질은 약 200,000개 이상으로 치료약물의 대부분과 그 외의 환경오염물질, 발암물질과 같은 외인성 물질, steroids, fatty acids, eicosanoids, retinoids, prostaglandins와 같은 내인성 물질을 포함하고, 이러한 내인성 물질의 합성과 분해, 외인성 물질의 대사에 관여한다 (Nelson *et al.*, 1996; Lewis *et al.*, 1998). Cytochrome P450 효소계는 아미노산 서열의 상호유사성에 기인하여 14개의 유전자 과 (gene family)로 분류, 명명 되었다. 그 중 외인성 물질에 의해 유도되는 유전자 과는 다환상 방향족 화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons : PAHs)에 의해 유도되는 CYP1A와 barbiturate에 의해 유도되는 CYP2B, steroid에 의해 유도되는 CYP3A등이 있다. 다양한 CYP 효소계의 동종 효소들 중 CYP1A1은 다환상 방향족 화합물과 heterocyclic amine과 같은 외인성 물질의 대사에 중요한 역할을 하며, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) 또는 3-MC (3-methylcholanthrene) 등에 의해 발현이 증가한다. 그리고 간, 피부, 신장, 폐 등 대부분의 조직에서 아주 낮은 수준으로 발현되어 있고, 많은 외인성 물질을 세포독성, 유전독성 물질로 대사시킨다 (Denison and Whilock, 1995; Chou *et al.*, 1986; Guengerich, 1988; Nelson *et al.*, 1996; Thummel and Wilkinson, 1998; Rogers *et al.*, 2002).

포유류가 아닌 종에서의 *CYP1A* 유전자에 대한 연구는 주로 어류에서 이루어져 왔다. 어류는 모든 척추동물 종의 상당한 비율을 차지하며, 환경오염에 민감하게 반응하기 때문이다. 어류에서 cytochrome P450는 발암물질에 의한 환경오염의 생화학적 지표로서 연구되어 왔다 (Jimenez and Stegeman, 1990; Stegeman and Lech, 1991; Stegeman and Hahn, 1994; Goksøyr, 1995; Buhler and Wang-Buhler, 1998). 어류에서 몇몇 cytochrome P450의 동종체 (isoform)들이 발견 되었지만, CYP1A가 탄화수소류 (hydrocarbons)에 의해 유도되는 cytochrome P450로 가장 주목을 받고 있다 (Stegeman, 1989; Stegeman and Hahn, 1994). 포유류와 마찬가지로 어류에서도 polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs)와 dibenzofurans (PCDFs)의 planar congeners, polychlorinated biphenyls (PCBs), 몇몇 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated naphthalenes 등과 같은 환경오염물질에 의해 민감하고 특이적으로 CYP1A이 유도된다 (Bucheli and Fent, 1996). 따라서 CYP1A 유도작용은 어류와 어류 세포 체계에서 이러한 오염물질에 대한 노출의 생체 지표 (biomarker)로 사용되고 있다 (Fent, 2001). 어류의 CYP1A의 분자 생물학적인 연구는 trout (Heilmann *et al.*, 1988), plaice (Leaver *et al.*, 1993), sea bream (Mizukami *et al.*, 1994), tomcod (Roy *et al.*, 1995), butterfly fish (Vrolijk and Chen, 1995), scup and toadfish (Morrison *et al.*, 1995), killifish (Morrison *et al.*, 1998) 등으로부터 *CYP1A* cDNA가 cloning된 후 빠르게 진행되고 있다.

어류의 *CYP1A* 유전자는 CYP1A1의 특징을 갖고 있는 단백질을 만든다. 그리고 어류에서 하나 이상의 *CYP1A* 전사가 존재한다 (Leaver *et al.*, 1988; Haasch *et al.*, 1989; Wirgin *et al.*, 1991; Goksøyr *et al.*, 1991; Wolkers *et al.*, 1996). Trout CYP1A 단백질과 포유류의 CYP1A1의 아미노산 서열을 비교해 보면, 40% 정도의 차이를 보인다 (Nebert and Gonzalez, 1987). 그리고 어류 역시 다환성 탄화수소 수용체가 존재하고, 포유류와 유사하게 *CYP1A* 유전자 조절이 일어난다 (Hahn *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 1997). Rainbow trout에 3-MC를 처치한 군으로부터 두개의 *CYP1A* 유전자 clone이 분리 되었고, 염기서열의 유사성, 5' flanking 부위의 XRE 존재 유 · 무, intron sequence의 차이 등에 기초하여 CYP1A1, CYP1A2로 구분하였다. 아미노산 서열에서 포유류의 CYP1A1과 CYP1A2는 27-30%의 차이를 보이는 반면에, 어류에서는 4%의 차이만을 보인다 (Berndtson and Chen, 1994).

본 논문에서는 어류와 포유류에서의 Cyp1a1 작용을 비교하기 위하여, rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) hepatoma 세포인 RTH-149 세포와 mouse hepatocyte인 Hepa-I 세포를 이용하여 실험하였다. TCDD의 Cyp1a1 유도 능력을 살펴보기 위하여 생물학적 정량 (bioassay) 방법을 이용하였고, 다환성 탄화수소 수용체의 활성을 통한 유전자 활성을 측정하여 정량하였다. RTH-149 세포와 Hepa-I 세포에 각각 *pmCyp1a1-Luc*을 transfection하고, TCDD를 처치하여, 이들에 의한 *Cyp1a1* 유전자 발현 정도를 측정하였다. 또한 각각의 세포에서 TCDD에 의해 유도된 Cyp1a1 효소활성 측정을 위해 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 활성을 측정하였고, Cyp1a1 mRNA level의 변화를 살펴보았다.

실험 재료 및 방법

세포 배양

Hepa-I mouse hepatocyte cell은 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다. RTH-149 rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss)* hepatoma cell은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다. Hepa-I 세포는 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 3일에 1회 1 : 4의 비율로 계대 배양하였다. RTH-149 세포는 Table 1의 10%

FBS-MEM 배지를 사용하여 6일에 1회 1 : 3의 비율로 계대 배양하였다. Hepa-I 세포는 37°C humidified 5% CO_2 incubator 내에서 배양하였고, RTH-149 세포는 21°C incubator 내에서 배양하였다. Hepa-I 세포와 RTH-149 세포는 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

약물 처치

DMSO에 용해한 약물을 각각의 배양조건과 같은 medium으로 희석하여 세포에 처치하고 Hepa-I 세포는 37°C humidified 5% CO_2 incubator에서 24시간, RTH-149 세포는 21°C incubator 내에서 48~72시간 배양하였다. 대조군은 약물을 용해시킨 용매만을 처치한 것으로, 이때 용매로 사용한 DMSO의 최종농도가 0.2%를 넘지 않도록 하였다.

Plasmids

Mouse cytochrome p4501a1 gene의 −1642 ~ +53 5' flanking 부위를 포함하는 luciferase plasmid (*pmCyp1a1-Luc*)를 사용하였다.

Transformation

pmCyp1a1-Luc plasmid는 plasmid를 100 ng정도 취하여 전체량이 10 μL가 되게 한 뒤, E. coli TG1 cell 15 μL를 넣어주고, Human *pECE-RXRa* plasmid는 plasmid를 100 ng정도 취하여 전체량이 10 μL가 되게 한 뒤, E. coli DH5a cell 15 μL를 넣어준 후 얼음에서 45분 이상 방치하였다. 이를 42°C에서 90초간 열처리한 뒤에 얼음에서 1~2분 동안 급냉시킨 후, SOC 배지 150 μL를 넣어 37°C에서 2~3시간 진탕 배양하였다. 배양액 50~100 μL를 50 μg/mL ampicillin을 포함하는 LB agar 평판 배지에 도포하고 37°C 배양기에서 16시간 동안 배양하여 단일 세포 집락을 얻었다.

Plasmid preparation

Transformation하여 얻어진 단일 세포 집락을 50 μg/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지 500 μL에 접종하여 37°C에서 약 2시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 50 μg/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지 300 mL에 500~1,000배 희석하여 37°C에서 12~16시간 진탕 배양하였다. 그 배양액을 4°C에서 세포 침전물을 모은 뒤 EndoFree plasmid maxi kit를 사용한 Modified alkaline lysis 방법으로 plasmid를 분리하였다. 완전히 건조시킨 뒤 멸균된 증류수에 녹이고 희석하여 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정해 양을 정량하였다. 이 중 260 nm : 280 nm에서의 흡광도 비가 1.8 이상인 DNA를 실험에 사용하였으며, 0.8% agarose gel에서 전기영동으로 plasmid의 상태 및 크기를 확인하였다.

Transfection

Hepa-I 세포를 48 well plate에 seeding하고 60% 정도 찰 때까지 배양하였다. Lipofectamin 2.5 μg을 포함하는 serum, antibiotics free MEM medium (without phenol red) 12.5 μL 용액과, *pmCyp1a1-Luc* construct 100 ng을 포함하는 serum free medium 12.5 μL 용액 또는 *pmCyp1a1-Luc* construct 100 ng과 *pECE-RXRa* 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150 ng을 포함하는 serum free medium 12.5 μL 용액을 섞고 상온에서 45분간 반응시킨 다음 100 μL의 serum free medium을 더 가해 섞어주었다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척한 후 위에서 반응시킨 혼합액을 각 well당 125 μL씩 가했다. 이를 37°C humidified 5% CO_2 incubator에서 5시간 배양하고 2×serum, antibiotics MEM medium (without phenol red) 125 μL를 넣어주었다.

RTH-149 세포를 48 well plate에 seeding하고 70% 정도 찰 때까지 배양하였다. Tfx™-50 0.3 μL와 *pmCyp1a1-Luc* 100 ng 또는 *pmCyp1a1-Luc* 100 ng과 *pECE-RXRa*의 3배 양의 Tfx™-50을 serum, antibiotics free MEM medium (without phenol red) 125 μL에 넣고 잘 섞은 후 15분간 방치하였다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척하고 여기에 위에서 반응시킨 혼합액을 각 well당 125 μL씩 가했다. 21°C incubator에서 1시간 배양한 뒤 2×serum, antibiotics MEM medium (without phenol red) 125 μL를 넣어주었다.

Luciferase 활성 측정

Gene construct를 transfection시키고, 약물을 24~72시간 동안 처치한 뒤 luciferase 활성을 측정하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤, reporter lysis buffer 50 μL를 가하고 15분 동안 상온에서 incubation하여 lysis시켰다. 그 후 well에 물을 100 μL씩 가하고 바닥을 긁은 후 cell lysate에 luciferase assay reagent (luciferin)를 가하여, Berthold luminometer로 relative luminescence를 측정하였다. 수치는 단백질 정량에서 얻어진 단백질 양을 기준으로 RLU (relative luminescence unit/μg protein)로 환산하여, 대조군에 대한 fold induction으로 나타내었다. Reporter lysis buffer는 5×를 멸균 증류수로 1×로 희석하여 사용하였으며, luciferase assay reagent는 luciferase assay buffer (10 mL)를 luciferase assay substrate에 넣어 reconstitution시키고 microtube에 분주하여 −20°C에서 보관한 것을 상온에서 녹인 뒤 사용하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin (2 mg/mL)을 standard로 하여 micro BCA protein assay reagent kit를 사용하여 cell lysate의 supernatant protein 양을 ELISA reader로 측정하였다. microtest III flexible assay 96 well plate에 cell lysate 20 μL를 넣고 멸균된 증류수를 가하여 총량이 50 μL가 되게 하였다. 다음 micro BCA reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, tetrate를 0.2 N sodium hydroxide에 포함한 것), micro BCA reagent B (BCA detection reagent), micro BCA reagent C (4% cupric sulfate pentahydrate)를 50 : 48 : 2의 비율로 섞은 혼합액을 각 well에 50 μL씩 가한 뒤 60°C에서 1시간 반응시키고 그 후에 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다. 같은 plate에서 excitation 360 nm, emission 460 nm로 fluorescence를 측정한 후 standard curve를 이용해 총 단백질양을 정량 하였다. 이 때 standard로 2 mg/mL BSA을 사용하였다.

EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) 활성 측정

EROD 활성과 단백질 양은 Kennedy 등의 방법 (Kennedy *et al.*, 1994)에 따라 세포가 배양된 48 well plate에서 fluorescent product인 resorufin과 총 단백질양을 flurorescence plate reader를 이용해 동시에 측정하였다. 일정량의 세포가 배양된 48 well plate에 sodium phosphate buffer (80 mM) 82 μL를 가하였다. 그 후 7-ethoxyresorufin 11.2 μL를 가한 후 Hepa-I 세포는 37°C에서, RTH-149 세포는 상온에서 10분간 안정화시켰다. β-NADPH 18.8 μL를 가해 반응을 개시한 후 Hepa-I 세포는 37°C에서 15분간, RTH-149 세포는 상온에서 30분간 반응 시키고, 그 후 fluorescamine 48 μL를 가해 반응을 종결시켰다. 15분 후 excitation 530 nm, emission 590 nm로 fluorescence를 측정한 후 standard curve를 이용해 resorufin양을 정량 하였다. 이 때 standard로 10 μM resorufin을 사용하였다.

RNA preparation

약물 처치한 세포를 PBS로 2회 세척한 후 Trizol reagent를 가하여 상온에서 5분간 방치한다. 여기에 1 mL의 Trizol reagent 당 0.2 mL의 $CHCl_3$를 가하고 15초간 격렬히 vortex로 섞어준 후 3분간 방치한다. 이를 4°C에서 11000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 수층을 취한다. 여기에 동량의 $CHCl_3$를 가하고 5~10 초간 vortex로 섞어준 후 상층을 취한다. 여기에 동량의 isopropanol을 가하고 가볍게 흔들어 섞은 후 상온에서 10분간 방치한 후 4°C에서 11000 rpm으로 10분간 원심분리 한다. 얻어지는 pellet을 0.1% DEPC 용액으로 희석한 75% ethanol로 반복 세척하고 남아있는 ethanol을 완전 건조시킨 뒤 멸균된 0.1% DEPC 용액에 녹이고 적당히 희석하여 260 nm 파장에서 흡광도를 측정한 뒤 다음의 식에 따라 농도를 구하였다.

RT (Reverse Transcription)

분리한 total RNA 1 μg에 해당하는 양에 0.1% DEPC 용액을 가해 10.5 μL가 되게 한 다음, 여기에 random primer 0.5 μg을 넣고 70°C에서 10분간 반응시키고 얼음에서 급냉시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1 μL, 100 mM DTT 2 μL, 5×first strand buffer (250 mM Tris-HCL pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$) 4 μL와 M-MLV Reverse Transcriptase 200 units, RNasin 20 units를 넣은 후 23°C에서 10분간 방치시킨 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 박아 반응을 종결시켰다.

PCR (Polymerase Chain Reaction)

RT product 1 μL에 forward/reverse primer를 각각 10 pmol씩 넣고 10×reaction buffer 1 μL, 25 mM $MgCl_2$ 1 μL, 2.5 mM dNTP 0.5 μL, Taq polymerase 0.5 units을 가하고 총량이 10 μL가 되게 한 후 Table 3의 조건으로 Minicycler에서 반응시켰다. PCR product는 ethidium bromide로 염색한 2% agarose gel상에서 전기영동 하여 확인한 뒤, image analyzer를 사용하여 상대적인 양을 정량하였다.

결 과

RTH-149 세포에서 TCDD가 luciferase 활성에 미치는 영향

RTH-149 세포에 *pmCyp1a1-Luc*을 transfection 한 후, 0.1 pM부터 1 nM까지 농도의 TCDD를 72시간 처치한 후 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 TCDD 농도 의존적으로 luciferase 활성이 증가하였고, 1 nM TCDD 처치 시 luciferase 활성은 대조군에 비해 97.8배 증가하였다 (Fig. 1).

RTH-149 세포에서 TCDD가 EROD 활성에 미치는 영향

RTH-149 세포에 0.1 pM부터 1 nM까지 농도의 TCDD를 48시간 처치한 후 EROD 활성을 측정하였다. 그 결과 TCDD 농도 의존적으로 EROD 활성이 증가하였고, 1 nM TCDD 처치시 10 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

RTH-149 세포에서 TCDD 처치 시간에 따른 mRNA 발현의 변화

RTH-149 세포에 1 nM 농도의 TCDD를 12, 24, 36, 48, 60, 72시간 동안 처치한 후, trout Cyp1a1 mRNA 발현을 역

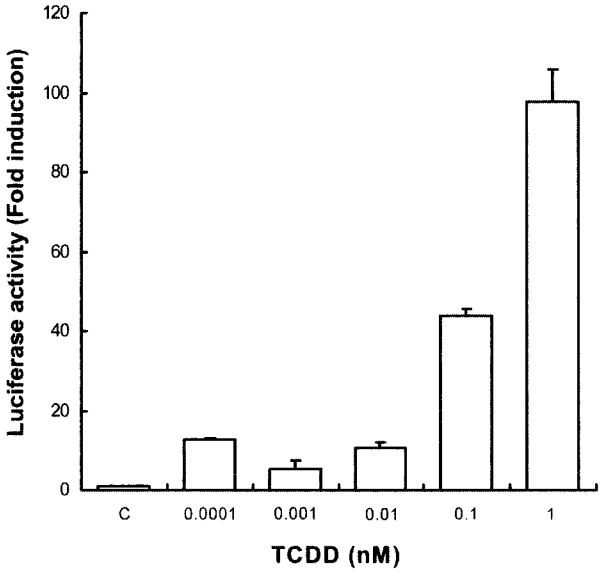

Fig. 1. The dose response of TCDD on the *pmCyp1a1* transcription in RTH-149 cells. Cells were transfected with *pmCyp1a1-Luc* plasmid. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 72 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control).

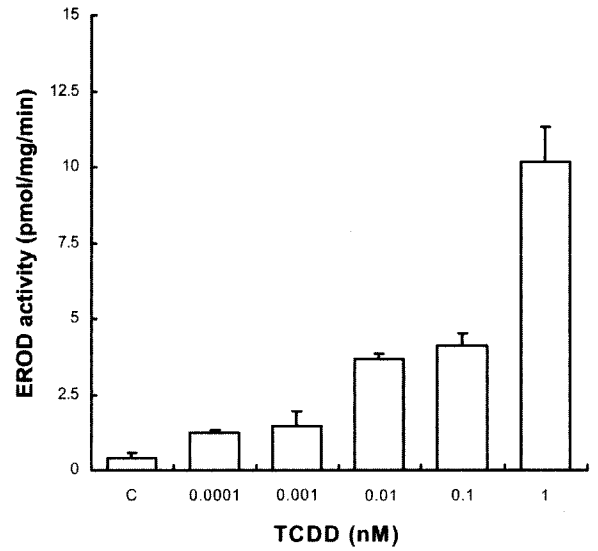

Fig. 2. The dose response of TCDD on the EROD activity in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 48 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control).

전사연쇄중폭반응으로 측정하였다. 그 결과 24시간부터 뚜렷한 증가 (7.8배)를 보이기 시작하여 48시간까지 처치시간이 증가함에 따라 mRNA 발현이 증가하였다 (19.9배). 그러나 48시간 이후에는 mRNA 발현이 감소하였다 (11.6배) (Fig. 3).

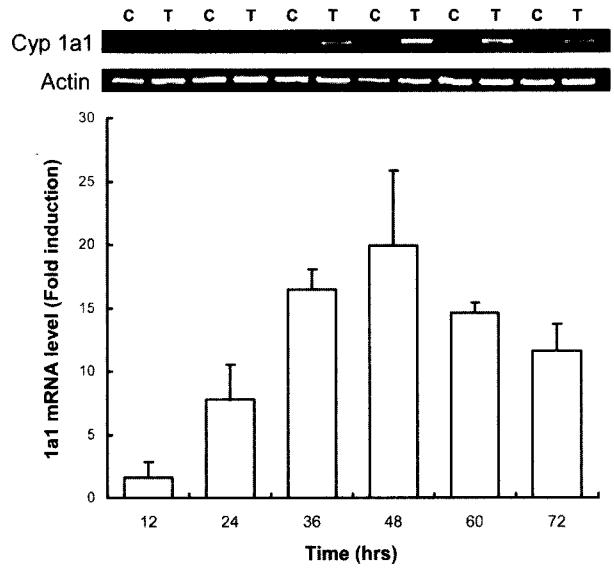

Fig. 3. The time course response of TCDD on the trout Cyp1a1 mRNA expression in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD for indicated time. Cyp1a1 mRNA was determined by RT-PCR. The data represent mean ± S.E.M. (n = 3) (C:Control, T:TCDD).

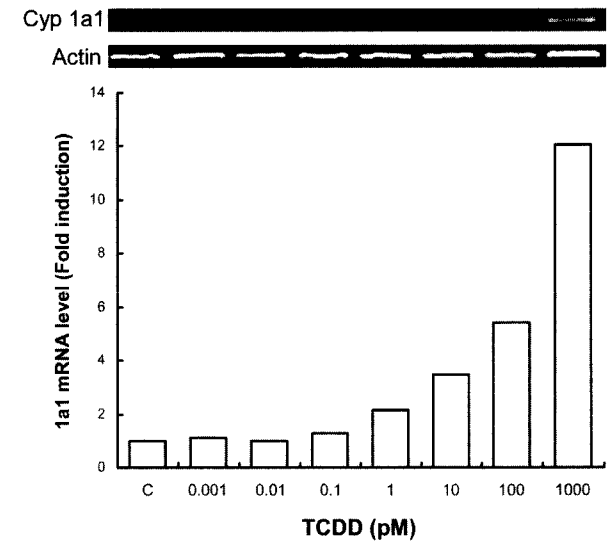

Fig. 4. The dose response of TCDD on the trout Cyp1a1 mRNA expression in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 48 hrs. Cyp1a1 mRNA was determined by RT-PCR.

RTH-149 세포에서 TCDD 처치 농도에 따른 mRNA 발현의 변화

RTH-149 세포에 1 fM부터 1 nM까지 농도의 TCDD를 48시간 처치한 후, trout Cyp1a1 mRNA 발현을 역전사연쇄중폭반응으로 측정하였다. 그 결과 0.1 pM부터 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, 1 nM TCDD 처치 시

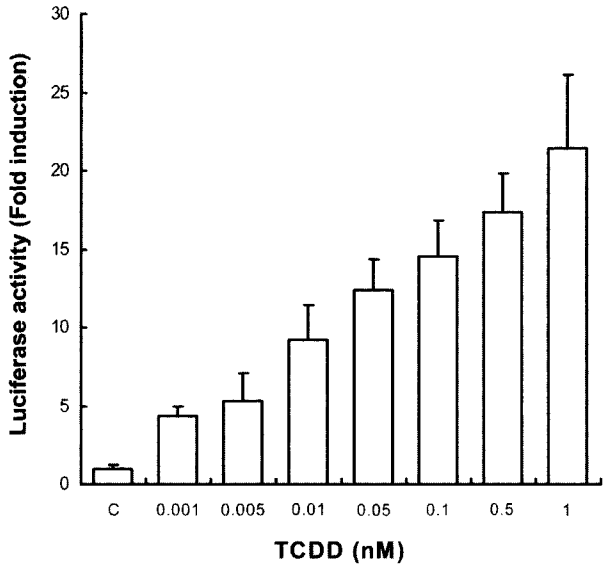

Fig. 5. The dose response of TCDD on the *pmCyp1a1* transcription in Hepa-I cells. Cells were transfected with *pmCyp1a1-Luc* plasmid. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control).

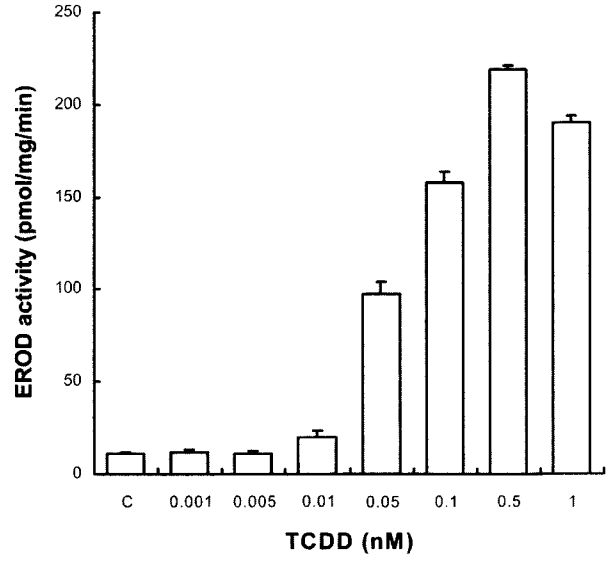

Fig. 6. The dose response of TCDD on the EROD activity in Hepa-I cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 24 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control).

mRNA 발현은 대조군에 비해 12.1배 증가하였다 (Fig. 4).

Hepa-I 세포에서 TCDD가 luciferase 활성에 미치는 영향

Hepa-I 세포에 *pmCyp1a1-Luc*을 transfection 한 후, 1 pM부터 1 nM까지 농도의 TCDD를 24시간 처치한 후 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 luciferase 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 1 nM TCDD 처치시 luciferase 활성은 대조군에 비해 21.4배 증가하였다 (Fig. 5).

Hepa-I 세포에서 TCDD가 EROD 활성에 미치는 영향

Hepa-I 세포에 1 pM부터 1 nM까지 농도의 TCDD를 24 시간 처치한 후 EROD 활성을 측정하였다. 그 결과 EROD 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 0.5 nM TCDD 처치 시 219.3 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었다 (Fig. 6).

Hepa-I 세포에서 TCDD가 mRNA 발현에 미치는 영향

Hepa-I 세포에 1 pM부터 1 nM까지 농도의 TCDD를 24 시간 처치한 후, Cyp1a1 mRNA 발현을 역전사연쇄중폭반응으로 측정하였다. 그 결과 mRNA 발현이 농도 의존적으로 증가하였고, 0.5 nM TCDD 처치 시 mRNA 발현은 대조군에 비해 20.3배 증가하였다 (Fig. 7).

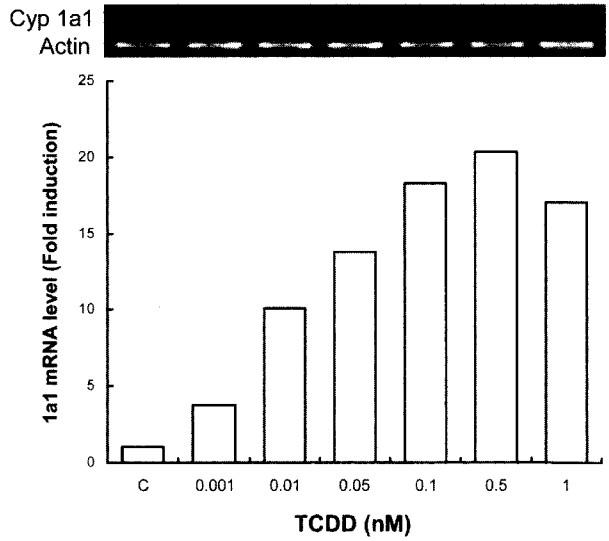

Fig. 7. The dose response of TCDD on the Cyp1a1 mRNA expression in Hepa-I cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 24 hrs. Cyp1a1 mRNA was determined by RT-PCR.

고 찰

포유류에서 CYP1A1은 PAHs와 heterocyclic amine과 같은 외인성 물질의 대사에 중요한 역할을 하며, PAHs, TCDD 또는 3-MC 등과 같은 환경오염 물질에 의해 발현

이 증가한다 (Denison and Whitlock, 1995; Chou *et al.*, 1986; Guengerich, 1988). 어류에서도 포유류와 마찬가지로 위와 같은 환경오염물질에 노출되었을 때 민감하고 특이적으로 CYP1A이 유도 된다 (Bucheli and Fent, 1996). 따라서 CYP1A 유도 작용은 포유류뿐만 아니라 어류와 어류 세포 체계에서 이러한 오염물질에 대한 노출의 생체 지표로 사용되고 있다 (Fent, 2001).

본 논문에서는 어류 세포인 rainbow trout hepatoma 세포 (RTH-149)와 포유류 세포인 mouse hepatocyte (Hepa-I)에서 대표적인 CYP1A 유도제인 TCDD에 의한 *Cyp1a1* 유전자 발현, EROD 활성, Cyp1a1 mRNA 발현 증가를 확인 하였다. RTH-149 세포에서는 *Cyp1a1* 유전자 발현을 확인하기 위해 여러 개의 DRE를 가진 mouse *Cyp1a1*의 promoter region을 포함하는 reporter 유전자 (*pmCyp1a1-Luc*)를 이용하였다. 그 결과, TCDD에 의해 luciferase 활성이 증가함을 확인 할 수 있었고, 본 결과로부터 어류의 다환성 탄화수소 수용체, ARNT와 포유류의 다환성 탄화수소 수용체, ARNT가 유사하게 작용함을 확인 할 수 있었다. 더 나아가 각각 세포에서 *Cyp1a1* 유전자 발현, EROD 활성, Cyp1a1 mRNA 발현에 대한 TCDD의 EC_{50}치를 구하여 비교한 결과, *Cyp1a1* 유전자 발현, EROD 활성, Cyp1a1 mRNA 발현 모두 Hepa-I 세포가 RTH-149 세포에 비하여 약 10배 정도 낮은 EC_{50}치를 나타내었다. 이 결과로부터 두 종의 다환성 탄화수소 수용체의 TCDD에 대한 affinity에 차이가 있으며, 이로 인해 Hepa-I 세포가 RTH-149 세포보다 민감하게 반응한다고 생각된다.

RTH-149 세포와 Hepa-I 세포에서 retinoids가 외인성 물질에 의해 유도된 Cyp1a1을 저해한 결과는 Normal human keratinocyte인 NHK 세포에서 TCDD에 의해 유도된 CYP1A1 mRNA를 all *trans* retinoic acid가 발현을 감소시켰다는 보고와 사람 colorectal adenocarcinoma 세포인 Caco-2 세포에서 3-MC와 all *trans* retinoic acid를 병용 처치하였을 때 *CYP1A1* 유전자 발현, mRNA 발현, EROD 활성을 저해한다는 보고와 상응하는 결과를 나타낸다 (Fallone *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2004). 이 때 all *trans* retinoic acid와 수용체 complex는 *CYP1A1* promoter의 XRE에 결합하지 않고, 또한 all *trans* retinoic acid는 다환성 탄화수소 수용체와 ARNT의 mRNA 발현에 영향을 미치지 않는다고 보고되었다. 그리고 all *trans* retinoic acid는 AhR/ARNT complex가 *CYP1A1* promoter의 XRE에 결합하는 것을 방해한다는 결과가 보고되었다 (Murphy *et al.*, 2004). 그리고 사람 colorectal adenocarcinoma 세포인 Caco-2 세포에서 retinoid가 다환성 탄화수소 수용체 단백질의 양을 감소시킨다. 그리고 기질과 결합하지 않은 RAR과 결합하고 있는 corepressor 단백질인 SMRT가 *CYP1A1* 유전자 발현을 저해하고, 3-MC와 all *trans* retinoic acid를 병용 처치하였을 때 다환성 탄화수소 수용체와 SMRT의 결합이 증가하고, *CYP1A1* 유전자 발현, mRNA 발현, EROD 활성을 저해한다는 보고가 있다 (Fallone *et al.*, 2004). CYP1A1 유전자 조절 메카니즘에 관한 지속적인 연구가 진행되면 CYP1A1 유전자 조절에 관한 분자수준의 작용기전이 알려질 수 있을 것이다.

감사의 글

"이 논문은 정부 (교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임" (R06-2002-011-01005-0).

참 고 문 헌

Berndtson, A. and Chen T.T. (1994) Two unique *CYP1* genes are expressed in response to 3-methylcholanthrene treatment in rainbow trout. *Arch, Biochem. Biophys.* **310**, 197-195.

Bucheli, T.D. and Fent K. (1996) Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **25**, 201-268.

Buhler, D.R. and Wang-Buhler, J.L. (1998) Rainbow trout cytochrome P450s : Purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. C* **121**, 107-137.

Chou, M.W., Heflich, R.H. and Fu P.P. (1986) Metabolism of 1-nitrobenzo[a]pyrene by rat liver microsomes to potent mutagenic metabolites. *Carcinogenesis* **7(11)**, 1837-1844.

Denison, M.S. and Whitlock, J.P. Jr. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* **270**, 18175-18178.

Fallone, F., Villard, P.H., Seree, E., Rimet O., Nguyen Q. B., Bourgarel-Rey V., Fouchier F., Barra Y., Durand A. and Lacarelle B. (2004) Retinoids repress Ah receptor CYP1A1 induction pathway through the SMRT corepressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 551-556.

Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology : assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro* **15**, 477-488.

Goksøyr, A. (1995) Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch. Toxicol. Suppl.* **17**, 80-95.

Goksøyr, A., Andersson, T., Buhler, D. R., Stegeman, J. J., Williams, D. E. and Förlin, L. (1991) Immunochemical cross-reactivity of β-naphthoflavone-inducible cytochrome P450 (P4501A) in liver microsomes from different fish species and rat. *Fish Physiol. Biochem.* **9**, 1-13.

Gonzalez, F.J. (1989) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* **40(4)**, 243-288.

Guengerich, F.P. (1988) Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **48**, 2946-1954.

Haasch, M.L., Wejksnora, P.J., Stegeman, J.J. and Lech, J.J. (1989) Cloned rainbow trout liver P1450 complementary DNA as a potential environmental monitor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **98**, 362-368.

Hahn, M.E., Karchner, S.I., Shapiro, M.A. and Perera, S.A. (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13743-13748.

Hahn, M.E., Poland, A., Glover, E. and Stegeman, J.J. (1994) Photoaffinity labeling of the Ah receptor : Phylogenetic survey of diverse vertebrate invertebrate species. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 218-228.

Heilmann, L.J., Sheen, Y.Y., Bigelow, S.W. and Nebert, D.W. (1988) The trout P4501A1, cDNA and deduced protein sequence, expression in liver and evolutionary significance. *DNA* **7**, 379-387.

Jimenez, B.D. and Stegeman, J.J. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. *Am. Fish. Soc. Symp.* **8**, 67-79.

Kennedy, S.W. and Jones, S.P. (1994) Stimultaneous Measurement of Cytochrome P4501A Catalytic Activity and Total Protein Concentration with a Fluorescence Plate *Reader. Anal. Biochem.* **222**, 217-233.

Leaver, M.J., Burke, M.D., George, S.G., Davies, J.M. and Raffaelli, D. (1988) Induction of cytochrome P-450 monooxygenase activities in plaice by model inducers and drilling muds. *Mar. Environ. Res.* **24**, 27-30.

Leaver, M.J., Pirrit, L. and George, S.G. (1993) Cytochrome P450 1A1 cDNA from plaice (Pleuronectes platessa). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**, 338-345.

Lewis D.F.V., Watson E. and Lake B.G. (1998) Evolution of the cytochrome P450 superfamily : sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res.* **410**, 245-270.

Mizukami, M., Okauchi, M., Ariyoshi, T. and Kito, H. (1994) The isolation and sequence of cDNA encoding a 3-methylcholanthrene-inducible cytochrome P450 from wild red sea bream, Pagrus major. *Mar. Biol.* **129**, 343-349.

Morrison, H.G., Oleksiak, M.F., Cornell, N.W., Sogin, M.L. and Stegeman, J.J. (1995) Identification of cytochrome P-450 1A (CYP1A) genes from two teleost fish, toadfish (Opsanus tau) and scup (Stenotomus chrysops), and phylogenetic analysis of CYP1A genes. *Biochem. J.* **308**, 97-104.

Morrison, H.G., Weil, E.J., Karchner, S.I., Sogin, M.L. and Stegeman, J.J. (1998) Molecular cloning of CYP1A from the estuarine fish Fundulus heteroclitus and phylogenetic analysis of CYP1 genes : Update with new sequences. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **121**, 231-240.

Murphy, K.A., Villano, C.M., Dorn, R. and White, L.A. (2004) Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic cid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **279(24)**, 25284-25293.

Nebert, D.W. and Gonzalez, F.J. (1987) P450 genes : Structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 945-993.

Porter, T.D. and Coon, M.J. (1991) Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472.

Rogers, J.F., Nafziger, A.N. and Bertino, J.S.. (2002) Pharmacogenetics Affects Dosing, Effi cacy, and Toxicity of Cytochrome P450.Metabolized Drugs. *Am J Med.* **113**, 746-750.

Roy, N.K., Kreamer, G.L., Konkle, B., Grunwald, C. and Wirgin, I. (1995) Characterization and prevalence of a polymorphism in the 39 untranslated region of cytochrome P4501A1 in cancer-prone Atlantic tomcod. *Arch. Biochem. Biophys.* **322**, 204-213.

Stegeman, J.J. and Hahn, M.E. (1994) Biochemistry and molecular biology of monooxygenases, current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. *In Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives.* 87-206.

Stegeman, J.J. (1989) Cytochrome P450 forms in fish, catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica* **19**, 1093-1110.

Stegeman, J.J. and Lech, J.J. (1991) Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species, carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Health Perspect.* **90**, 101-109.

Thummel, K.E. and Wilkinson G.R. (1998) In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 389-430.

Vrolijk, N.H. and Chen, T.T. (1995) Cloning and expression of CYP1A in butterfly fish, Chaetodon capistratus. *J. Mar. Biotechnol.* **3**, 228-231.

Wirgin, I., Kreamer, G.L. and Garte, S.J. (1991) Genetic polymorphism of cytochrome P-4501A in cancer-prone Hudson River tomcod. *Aquat. Toxicol.* **19**, 205-214.

Wolkers, J., Jorgensen, E.H., Nijmeijer, S.M., and Witkamp, R.F. (1996) Time-dependent induction of two distinct hepatic cytochrome P4501A catalytic activities at low temperatures in Arctic charr (Salvelinus alpinus) after oral exposure to benzo(a)pyrene. *Aquat. Toxicol.* **35**, 127-138.