

# Keratinocyte모델에서 발암성 이환방향족 아민의 종(species)간 독성 감수성

전            향            속  
 식품기능연구팀

## 요 약

조리가공 중 생성되는 주요 발암성 이환방향족 아민(heterocyclic aromatic amine)인 Trp-P-1 및 Trp-P-2가 human 및 rat keratinocytes에 대해 나타내는 세포 독성을 colony expansion 법에 의해 조사, 비교하였다. 특히 Trp-P-2는 human keratinocytes에 대해서는 독성을 나타내지 않는데 반해 rat keratinocytes(계대수 2-5)에 대해서는 독성을 나타내는 선택성을 나타내었다. 이러한 Trp-P-2의 종(species)간 독성감수성 차이가 대사 효소계 활성화이나 mutagenic activation상의 차이에 기인되는지를 살펴본 결과, CYP4501As 및 CYP1B1의 지표활성으로 측정된 EROD활성은 독성감수성 차이가 크게 나타났던 human 및 rat keratinocytes의 microsome에서 거의 같았다. 이와 같은 결과는 CYP4501A1 및 CYP1B1의 mRNA의 발현 정도를 northern blot에 의해 살펴보았던 결과에서도 일치하였다.

반면 Trp-P-2의 대사활성화 및 해독화에 관여하는 효소인 N,O-acetyltransferase(NAT)활성은 rat keratinocytes보다 human kera-

tinocytes에서 높았다. 일반적으로 독성 물질의 해독화에 관여하는 glutathione S-transferase (GST) 또한 rat keratinocytes보다 human keratinocytes에서 높게 나타났다. Trp-P-2가 mutagenic metabolite로 활성화되는 정도를 *Salmonella* microsome microsuspension assay로 살펴본 결과, 독성 감수성 차이가 크게 나타났던 human 및 rat keratinocytes간의 활성화는 비슷한 것으로 나타났다.

DNA 및 단백질 adduct형성능의 경우, human 및 rat keratinocytes간 DNA adduct형성능에는 차이가 없었고, 단백질 adduct형성능의 경우만 Trp-P-2에 대한 독성감수성 정도가 컸던 rat keratinocytes가 다른 세포들에 비해 크게 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, CYP1A- 또는 CYP1B1- 관련 마이크로솜 효소활성이나 mutagenic activation은 human 및 rat keratinocytes간에 나타났던 독성 감수성의 차이를 설명할 수 없으며, 해독화에 관여하는 효소 활성이 중간 관찰되었던 독성 감수성의 차이에 더 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

# 1. 서론

산업화와 더불어 식품저장 및 유통 과정 중의 미생물 오염에 기인하는 피해는 물론 식품성분 중에 함유된 물질이나 가공, 저장 및 조리 과정에서 2차적으로 생성되는 발암 및 변이원성 물질에 의한 인체의 발암성 문제가 심각하게 대두되고 있다. 미국인의 경우 하루 식사에서 약 22,500 revertant의 변이원을 섭취하고 있다는 보고에서도 나타나듯이, 현재 암의 발생 원인은 80-90%가 화학물질 및 식이 요인을 포함한 환경적 요인에 기인되며 특히 식이 발암환경 중 30% 이상을 제공하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

식품의 조리가공중 생성되는 이환방향족 아민(heterocyclic aromatic amines)은 1970년대

Sugimura박사에 의해 식품 자체 또는 아미노산, 단백질을 가열할 때 얻어지는 열분해산물로부터 분리된 발암성 물질이다<sup>2)</sup>. 이중 tryptophan의 열분해산물인 Trp-P-1(3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) 및 Trp-P-2(3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole)는 조리된 음식<sup>3)</sup>, 공중 부유물질<sup>4)</sup>, 빗물<sup>4)</sup>, 담배연기로 오염된 실내<sup>5)</sup>에서 발견되는 대표적인 이환방향족 아민이다. 이들 물질들에 의한 발암 메커니즘은 정확하게 밝혀지고 있지는 않으나 이들 물질이 먼저 생체 내에서 cytochrome P450에 의해 3-amino기가 N-hydroxylation된 다음 아세틸화 반응에 의해 아세틸화됨으로써 전자친화성 발암인자로 활성화된다<sup>6-14)</sup>. 이러한 전자친화성 중간 대사산물이 유전자의 핵산에 비가역적으로 결합함으로써

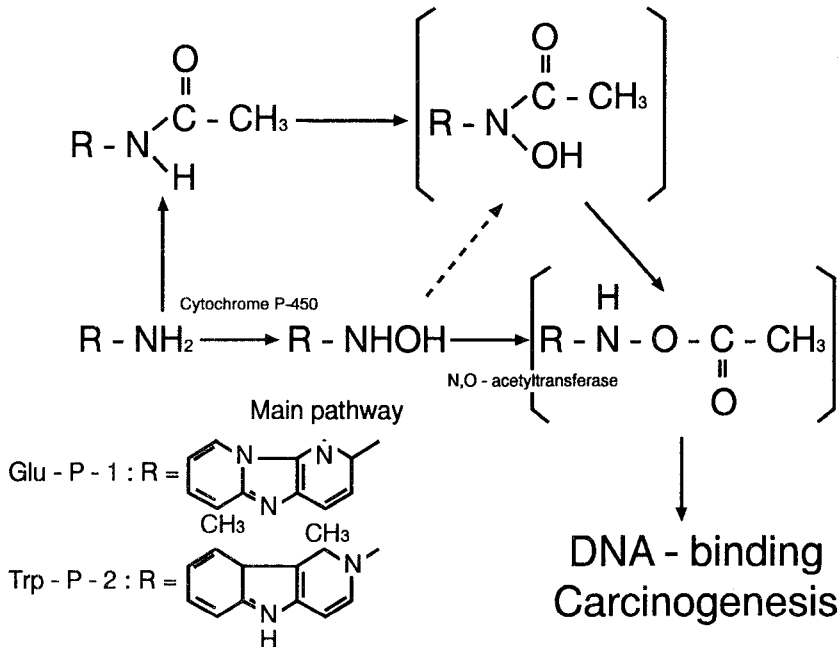


그림 1. Proposed pathway for metabolic activation and carcinogenesis of heterocyclic aromatic amine in mammalian cell.

암을 형성하는 것으로 알려져 있다(그림1. <sup>15-17</sup>).

이환방향족 아민의 주 대사기관은 간(liver)이지만 간 이외의(extrahepatic) 대사도 전체 대사에서 간과될 수 없다. 간 이외의 기관 중 피부는 독성물질의 첫 관문으로, 표면적이 넓어 독성물질의 대사에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 이러한 피부를 구성하고 있는 keratinocyte는 피부 뿐만 아니라 esophagus, oropharynx, exocervix, vagina 및 conjunctiva 등에서 체세포 벽을 이루는 구성 세포<sup>18</sup>)로써 이환방향족 아민 노출에 표적이 되고 있는 세포이다.

독성 물질의 위해도 평가시 독성 뿐만 아니라 종(species)간 독성 감수성의 차이는 인간의 허용량을 결정하는데 있어 중요한 요소로 작용한다. Trp-P-1 및 Trp-P-2의 독성에 대한 선행 연구에서, 이들 물질은 독성에 있어 종간 차이를 나타낼 가능성이 높은 것으로 보고되었다<sup>19</sup>). Aflatoxin을 비롯한 많은 독성 물질들이 다른 종간 독성 감수성을 나타내며, 이에 대한 원인을 구명하는 연구 시도는 주로 cytochrome P450 매개 반응에만 국한되어 이루어졌다<sup>20</sup>). 그러나 최근의 연구결과에 의하면 종간의 독성 감수성은 해독화 효소계에 의한 독성물질과의 conjugate형성능과 상관성이 더 높은 것으로 알려지고 있다<sup>21</sup>).

본 연구는 human 및 rat epidermal keratinocyte를 모델로 하여 대표적인 이환방향족 아민인 Trp-P-1 및 Trp-P-2의 세포독성을 colony expansion법으로 살펴봄에 의해 종(species)간 독성 감수성 차이가 나타나는지 살펴보았다. 그런 다음 나타난 독성 감수성이 대사 효소계 활성이나 mutagenic activation상의 차이에 기인되는지를 cytochrome p450 관련 효소, N,O-acetyltransferase(NAT) 및 glutathione S-transferase(GST) 등의 대사 관련 효소 활성의 측정, 대사 물질의 분석, 단백질 및 DNA adduct의 측정과 *Salmonella* microsome microsuspension assay에 의한 변이원성 대사산물의 분석 등으로 조사하였다. 따라서 독성 감수성의 종간(human vs.

rat) 차이에 관한 생화학적 근거를 제시함으로써 이들 물질들의 위해 평가를 위한 기초자료로 활용되게 하고자 시도되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 세포주 및 세포독성

세포주는 SIK(spontaneously immortalized human keratinocyte, 계대수 33-40), 정상 인간 epidermal keratinocytes(계대수 3-5) 및 rat epidermal keratinocytes(계대수 3-5)를 실험에 이용하였다. 이들 세포주들은 Dulbecco-Vogt Eagle's 및 Ham's F-12의 3:1 혼합액에 5% fetal bovine serum, 0.4 g/ml hydrocortisone, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10 ng/ml cholera toxin, 5 g/ml insulin, 5 g/ml transferrin, 20 pM triiodothyronine, 0.18 mM adenine 및 antibiotics를 첨가한 배지를 이용하여 방사선을 조사한 3T3 feeder layer 상에서 배양되었다. 세포 독성은 rhodanile blue염색 시약을 이용하여 염색한 다음 colony expansion법에 의해 측정하였다<sup>22,23</sup>).

### 2.2 세포 분획의 제조<sup>24</sup>)

EDTA로 3T3 feeder 세포를 제거한 다음 confluent 직전의 세포를 회수한 다음 차가운 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세척하였다. 세척한 세포를 1,850 × g에서 10분간 원심분리한 다음 균질용 buffer(10 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM MgCl, 10 mM KCl and 0.5 mM dithiothreitol)에 현탁한 후 Potter-Elvehjem형 균질기를 사용하여 균질화하였다. 이를 3,300 × g에서 15분, 12,000 × g에서 5분 및 100,000 × g에서 60분 원심분리한 상등액을 cytosol 분획으로, 침전물을 microsome 분획으로 하였다. Cytosol 및 microsome 분획의

단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)를 표준물질로 하여 bicinchoninic acid (BCA)법<sup>25)</sup>으로 측정하였다.

### 2.3 효소활성

CYP4501A1, 1A2 and 1B1 활성의 지표로서 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)활성을 Reiners 등의 방법<sup>26)</sup>에 따라 측정하였다. N-Acetyltransferase (NAT) 활성은 acetyl-CoA regenerating system을 활용하여 0.8mM p-aminobenzoic acid (PABA) 및 sulfamethazine (SMZ)을 기질로 하여 측정하였다<sup>27)</sup>. Glutathione S-transferase (GST) 활성은 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 기질로 하여 Habig 등의 방법<sup>28)</sup>에 따라 측정하였다.

### 2.4 Northern blot<sup>29)</sup>

Confluent한 세포에 5nM 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) 또는 0.1% DMSO를 처리한 후, 24시간이 경과한 다음 차가운 PBS로 2회 세척하고 Trizol 시약을 처리하여 세포중 총 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 0.66M formaldehyde를 함유한 1.5% agarose gel 상에서 전기영동한(30µg/lane) 다음 nitrocellulose membrane으로 이행시켰다. Membrane은 50% formamide, 5x SSC, 5x Denhardt's solution, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.5), 0.1% SDS 및 0.1 mg/ml salmon sperm DNA를 함유하고 있는 용액 중에서 42℃로 4시간 pre-hybridize시켰다. cDNA probes는 Klenow polymerase를 사용한 random priming에 의해 [<sup>32</sup>P]dCTP로 표지한 다음 hybridization mixture에 첨가한 후 42℃에서 24시간 반응시켰다. 그런 다음 membrane을 62℃에서 2x SSC (0.1% SDS)로 2회 세척, 0.1x SSC (0.1% SDS)로 1회 세척하였다. Autoradiography에 의해 특이적인 hybridization signal을 가시화 한

후 scanning densitometry로 정량하였다. 각 시료 중 총 RNA의 양은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA로 보정하였다.

### 2.5 Adduct 측정<sup>19)</sup>

[<sup>14</sup>C]Trp-P-2 (1µg/ml, 10 Ci/mol)를 4일 동안 배양 세포에 처리한 후, 세포가 거의 confluent에 달하였을 때 세포를 serum-free medium으로 2회 세척하고 3T3 feeder layer를 제거한 다음 DNA 및 단백질 adduct를 측정하였다. 즉, 세포를 20µg/ml pancreatic ribonuclease A를 함유한 0.5% SDS를 사용하여 37℃에서 15분 동안 반응시켰다. 그런 다음 buffer-saturated phenol (pH 8.0)로 추출하고, 형성된 수층 및 phenol층에 각각 0.02 M sodium acetate를 가한 후 2.5배 100% ice-cold 에탄올을 첨가하여 침전 생성을 유도하였다. 단백질 adduct의 경우, 70% 에탄올로 세척하고 0.1N NaOH에 용해한 다음 liquid scintillation counter(LSC)로 단백질에 결합된 [<sup>14</sup>C]Trp-P-2의 양을 측정하고 단백질 농도는 BCA assay에 의해 측정하였다. DNA adduct의 경우, 수층으로부터 얻은 DNA를 물에 용해시킨 다음 에탄올로 재침전시켰다. 260nm에서 DNA 농도를 측정하고 A260/A280비에 의해 DNA 순도를 확인한 다음 LSC로 DNA에 결합된 Trp-P-2의 방사능을 측정하였다.

### 2.6 돌연변이원성 시험

Ames 시험의 변법인 microsuspension assay<sup>30)</sup>를 사용하여 Trp-P-2 및 Trp-P-1이 mutagenic metabolite로 활성화되는 정도를 측정하였다. 즉, S9 cofactors를 함유하고 있는 microsome 0.1 ml, *Salmonella typhimurium* TA 98 (1 × 10<sup>10</sup>cells/ml PBS) 0.1 ml, DMSO에 용해시킨 Trp-P-1 및 Trp-P-2 용액 0.005 ml를 37℃에서 90 분간 preincubation 시켰다. 그런

다음 top agar를 minimal glucose plate에 가하고 37°C에서 48 시간 동안 배양하였다. MiniCount colony counter (Imaging Products International, Chantilly, VA)로 배양한 plate의 histidine revertant를 계수하였고, 모든 실험은 2개의 평판으로 2회 반복하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 Rat 및 human keratinocyte에서 Trp-P-1 및 Trp-P-2 toxicity

식품의 조리 및 가공과정에서 생성되는 대표적인 식품 유래 발암원이자 변이원인 Trp-P-1 및 Trp-P-2를 0.5 g/ml의 농도로 첨가하여 세포를 배양한

다음 colony expansion법에 의해 세포독성을 살펴 보았다. 그 결과, 그림 2.와 같이 Trp-P-1의 경우는 뚜렷하게 rat 및 human keratinocytes(SIK)에 대해 세포독성을 보였다. 반면 일반적으로 Trp-P-1에 비해 유전독성이 높은 것으로 알려진 Trp-P-2는 rat keratinocyte에 대해서는 세포독성을 나타내나 human keratinocyte에 대해서는 세포독성을 나타내지 않은 선택성을 보였다.

Rat 및 human keratinocytes(SIK, hEp)에 대해 Trp-P-2를 0.001 - 0.5 g/ml의 농도 범위로 첨가하고 cytochrome p450 유도인자인 TCDD가 세포독성에 영향을 미치는지를 살펴본 결과는 표 1과 같다. Trp-P-2는 0.001-0.5 µg/ml의 농도에서 SIK에 세포독성을 나타내지 않아 기존 알려진 것과 반대 경향을 보였으며, TCDD는 Trp-P-2의

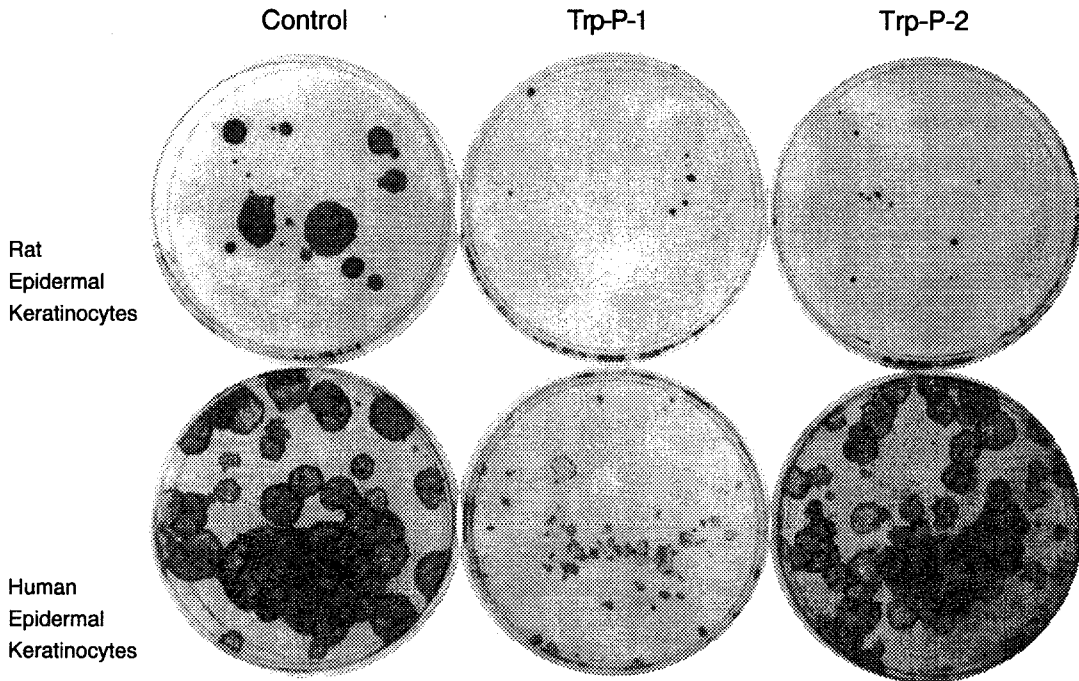


그림 2. Trp-P-1 and Trp-P-2-induced toxicity toward cultured human and rat epidermal keratinocytes.

The cultures were seeded with 200-500 cells and treated with 5 l of DMSO containing 0 (-) or 2.5 g (+) of Trp-P-2 and Trp-P-1. The cultures were fixed and stained after 10 days of treatment.

표 1. Trp-P-2 toxicity toward cultured human and rat keratinocytes

Cells <sup>a</sup>	Trp-P-2( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) <sup>b</sup>							
	-TCDD				+TCDD			
	0.01	0.05	0.1	0.5	0.01	0.05	0.1	0.5
Sik	-	-	-	-	-	-	-	±
hEp	-	-	-	-	-	-	-	±
rEp	-	-	+	+++	-	-	+	+++

<sup>a</sup>Cultures were treated for 10days with Trp-P-2 in the presence or absence of TCDD(5nM) at indicated concentrations.

<sup>b</sup>The degree of colony growth inhibition was examined in comparison with parallel solvent-treated controls (<0.1% DMSO) and is reported as not toxic (-), marginally toxic(±), slightly toxic(+), moderately toxic(++) or highly toxic(+++).

세포독성에 미미한 영향을 주는 것으로 나타났다. 또한 Trp-P-2는 정상인의 진피에서 분리한 세포인 hEp에 대해서도 SIK과 유사한 세포독성 경향을 나타내었다.

이상의 세포독성 결과에서 Trp-P-2는 human keratinocyte에 대해서는 독성을 나타내지 않은 데 반해 rat keratinocyte에 대해서는 독성을 나타내는 중간 선택성을 나타내었다.

이와 같은 중간 선택성은 cytochrome p450 유도인자인 TCDD를 첨가한 경우에도 거의 영향을 받지 않은 것으로 보아 cytochrome p450의 유도가 독성에 미치는 영향은 크지 않다고 생각된다. 또한 정상인의 진피에서 분리한 세포인 hEp와 immortalization이 일어난 인간 유래 세포인 SIK에 대해 비슷한 세포독성이 관찰된 것으로 보아 중간 독성 감수성 차이가 SIK의 immortalization 과정에서 야기된 염색체 이상에서 기인된 것은 아니라고 판단된다.

### 3.2 Rat 및 human keratinocyte에서의 Trp-P-2 대사 관련 효소활성 측정

인간 유래 세포주인 SIK과 rat epidermal keratinocyte간의 독성 감수성 차이가 N-

hydroxylation에 관여하는 CYP1A1 및 1B1 등의 제1상계 효소의 차이인지 해독화에 주로 관여하는 제2상계 효소의 차이인지를 알아보기 위하여 Trp-P-2의 대사 관련 효소활성을 측정하였다. 대상 효소로는 Trp-P-2의 대사활성화에 관여하는 것으로 알려진 CYP1A1<sup>31)</sup>, CYP1A2<sup>11)</sup>, 1B1<sup>13)</sup> 및 N-acetyltransferase(NAT)<sup>32)</sup>와 일반적으로 독성물질의 해독화 관련 효소로 알려진 glutathione-S-transferase(GST)<sup>33,34)</sup>를 선택하여 활성을 측정하였다.

Human 및 rat keratinocytes로 부터 얻은 microsomes에서 CYP1A1, CYP1A2 및 1B1의 지표활성으로 EROD활성을 측정한 결과는 그림3과 같으며, 그림 4에 CYP1A1 및 1B1의 mRNA 발현 정도를 northern blot에 의해 측정한 결과를 나타내었다.

즉, 독성 감수성 차이가 크게 나타났던 human 및 2-5 계대수의 rat epidermal keratinocyte간의 EROD활성은 차이가 없었고 이는 CYP1A1 및 1B1의 mRNA 발현 정도와 같은 경향이었다.

Human 및 rat keratinocytes로부터 얻은 cytosol 분획에서 NAT 및 GST 활성을 측정한 결과는 표2 및 3과 같다. 제 1상계 효소인 CYP1A1 및 1B1이외에 Trp-P-2의 대사활성화

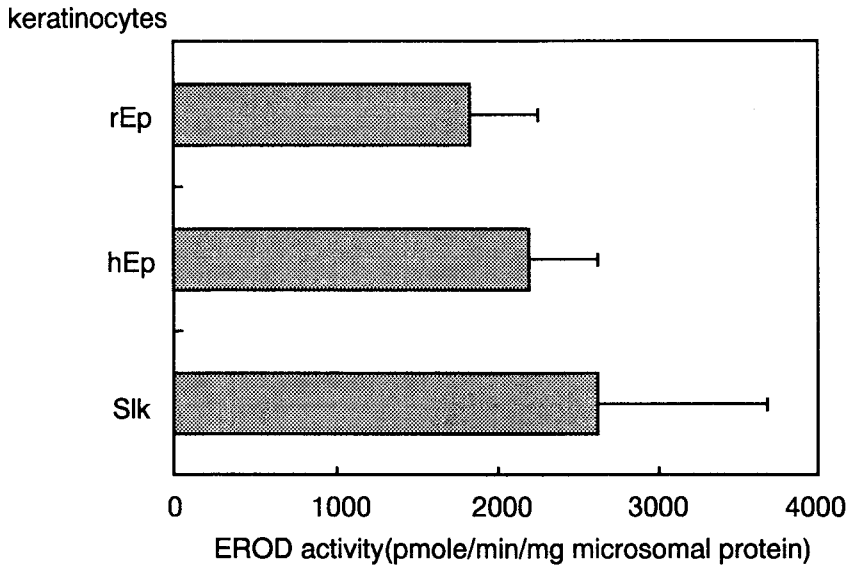


그림 3. TCDD inducible EROD activity of microsomes from human and rat keratinocytes. Activities are expressed in pmole product formed mg<sup>-1</sup> microsomal protein min<sup>-1</sup> and each point represents the mean value of triplicate determination.

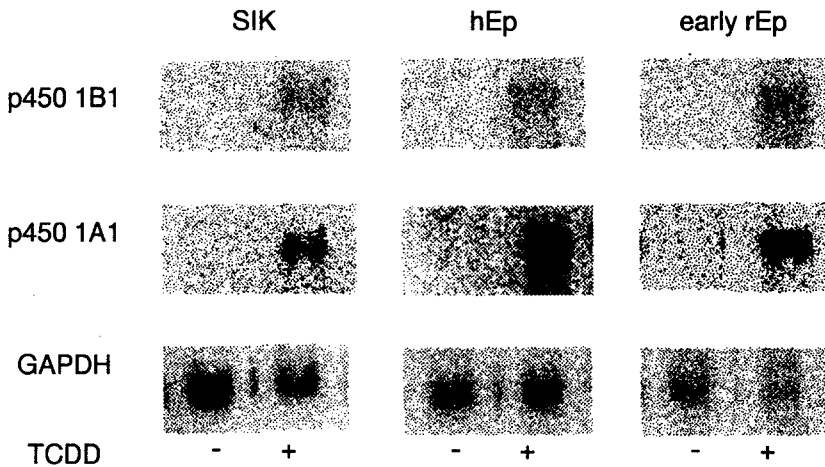


그림 4. Northern blots of TCDD-inducible P4501A1 and P4501B1 mRNA expression in rat and human keratinocytes.

RNA of newly confluent cultures were prepared after 12 h treatment with or without 5nM TCDD, electrophoresed, blotted and probed with rat P4501A1 and P4501B1 cDNA fragments. GAPDH was probed as an internal control for loading variation.

에 관여하여 NAT 활성은 Trp-P-2에 대해 독성을 나타내지 않았던 human keratinocytes에서 오히려 높게 나타났다.

독성물질의 해독에 주로 관여하는 GST 활성 또한 rat에 비해 human keratinocytes의 활성이 높았다.

이상의 Trp-P-2 대사와 관련된 효소활성 측정 결과를 살펴볼 때, CYP1A- 또는 CYP1B1- 관련 microsome 효소활성은 human 및 rat keratinocytes간에 나타났던 독성감수성의 차이를 설명할 수 없으며, 해독화에 관여하는 cytosol 효소 활성이 종(species)간 관찰되었던 독성감수

성의 차이와 상관성이 더 높은 것으로 보인다.

그러나 NAT는 Trp-P-2의 대사활성화와 해독화 양쪽에 관여하며, 특히 O-acetylation 반응이 대사활성화에 관계하는 것으로 알려져 있는 비<sup>35,36)</sup> 본 연구에서 측정된 NAT활성은 N-acetylation과 O-acetylation을 함께 측정한 것으로 human keratinocyte가 특이적으로 해독화에 관여하는 NAT활성만이 높다고 볼 수는 없다. GST 또한 Trp-P-2 대사에 있어 분명한 역할이 밝혀지지 않고 있어 향후 Trp-P-2의 대사경로와 관련된 해독화 기작에 대한 자세한 연구가 이루어져야 할 것이다.

표 2. N-acetyltransferase activity in cytosols from human and not keratinocytes

Cells	N-acetyltransferase(nmole/min/mg cytosolic protein)			
	PABA		SMZ	
	-TCDD	+TCDD	-TCDD	+TCDD
SIk	2.0±0.11	2.1±0.09	ND	ND
hEp	3.2±0.25	3.2±0.31	ND	NDrEp
rEp	1.6±0.08	1.7±0.10	ND	NDrEp

ND, not detectable

Each value represents the mean±SD of three determination.

표 3. GST activity in cytosols from rat and human keratinocytes

Keratinocytes	Glutathione S-transferase activity*	
	-TCDD	+TCDD
SIk	16.2±8.34	33.9±0.64
hEp	20.2±7.78	30.4±2.26
rEp	1.2±0.07	3.8±2.90

\*nmole/min/mg cytosolic protein

100,000 x g supernatant fraction from rat and human keratinocytes was prepared as described in "Materials and Methods" and GST activity with CDNB as a substrate was measured. Each value represents the mean±SD of three determination.



### 3.3 Rat 및 human keratinocyte에서 Trp-P-2의 Mutagenic activation

*Salmonella* microsuspension assay를 이용하여 human 및 rat keratinocytes로부터 얻은 microsome에 의해 Trp-P-2가 mutagenic metabolite로의 활성화되는 정도를 측정하였다. 그 결과는 그림 5에 나타나듯이 human 및 rat epidermal keratinocyte에서 Trp-P-2의 용량 증가에 따라 mutagenic metabolite도 비례적으로 증가하였다. 또한 microsome의 양을 증가시키기에 따라 Trp-P-2의 mutagenic metabolite도 증가하였다. 그러나 독성 감수성 차이가 크게 나타났던 human 및 rat epidermal keratinocyte간의 mutagenic metabolite로 활성화되는 정도는 조사한 모든 Trp-P-2 농도에서 유의적인 차이가 없

었다 ( $p>0.05$ ). 일반적으로 mutagenic metabolite로 활성화되는 정도는 cytochrome P450관련 효소활성과 비례하는 것으로 알려져 있으나 세포독성과 반드시 정비례하지는 않은 것으로 생각된다.

Trp-P-2가 mutagenic metabolite로의 활성화되는 정도를 *Salmonella* microsuspension assay를 이용하여 살펴본 데 이어서 Trp-P-2의 대사산물을 분석하였다. 방사선 동위원소로 표지된 Trp-P-2를 이용하여 HPLC분석을 실시한 다음 시간별로 분취하여 방사능을 LSC로 측정하여 대사물질을 분석한 결과, TCDD 첨가에 따라 human 및 rat keratinocytes에서 Trp-P-2의 세포내 대사물질은 첨가하지 않은 것에 비해 증가하였으나 rat 및 human keratinocyte간 대사물질 양에는 유의적인 차이가 없었다.

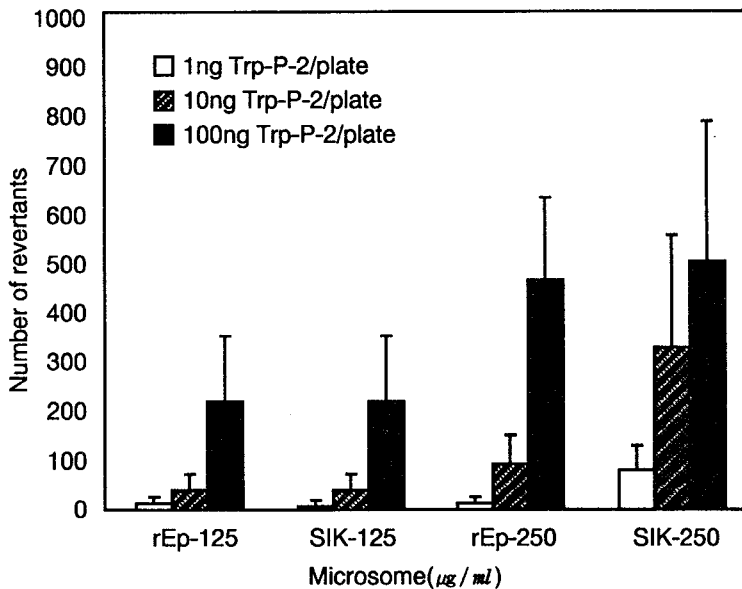


그림 5. Mutagenic activation of Trp-P-2 by microsomes from human and rat keratinocytes in the *Salmonella*/microsome mutation assay system.

Results are expressed as means  $\pm$  SD of two independent experiments. Duplicate plates were tested per dose per experiment. Positive control microsomes (125 g microsomal protein/ml) obtained from rat liver treated with aroclor 1254 was used and revertants of control microsomes at 1, 10 and 100 ng Trp-P-2/plate were  $1054 \pm 352$ ,  $2246 \pm 520$  and  $2313 \pm 25$ , respectively.

### 3.4 Rat 및 human keratinocyte에서 Trp-P-2의 단백질 및 DNA adduct 함량

Trp-P-2는 생체 내에서 cytochrome P450에 의해 3-amino기가 N-hydroxylation된 다음 아세틸화반응에 의해 아세틸화됨으로써 전자친화성 발암인자로 활성화된 후 유전자의 핵산이나 생체 고분자 물질에 비가역적으로 결합함으로써 세포독성을 나타내거나 암을 형성하는 것으로 알려져 있다<sup>15-17)</sup>.

따라서 human 및 rat keratinocytes 배양액에 방사선 동위원소로 표시된 Trp-P-2를 첨가한 후 DNA 및 단백질 adduct를 측정된 결과는 표4와 같다. 그 결과, 독성 감수성 차이가 크게 나타났던 human 및 rat keratinocyte간에 DNA adduct함량은 차이가 없었고 단백질 adduct 함량은 2 - 5 계대수의 rat keratinocyte에서 높은 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, CYP1A- 또는 CYP1B1- 관련 microsomal 효소활성이나 mutagenic activation, 대사산물 및 adduct는 human 및 rat keratinocytes간에 나타났던 독성 감수성의 차이를 설명할 수 없으며, 해독화에 관여하는 효소 활성이 종(species)간 관찰되었던 독성 감수성의 차이에 더 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 그러나 본 연구는 이환방향족 아민 화합물군

가운데 Trp-P-2를 중심으로 keratinocyte 모델에서 살펴본 제한된 것이기 때문, 앞으로 중간 독성 감수성의 생화학적 원인을 구명하는 시도가 다양한 화합물 및 모델을 대상으로 이루어져야 할 것이다. 또한 중간 독성 감수성을 나타내는 기작에 대한 세포 분자생물학적인 연구가 지속적으로 이루어져야 된다고 생각된다.

이와 병행하여 이환방향족 아민류의 지속적인 모니터링과 함께 노출량 평가가 체계적으로 이루어지고 이들 물질들의 인간의 건강에 대한 위해평가가 국내에도 빠른 시일 내에 이루어져야 할 것이다.

### 참고문헌

1. Hathcock, J.N. (1987) Mutagens in cooked foods. In Nutritional toxicology, Vol II, Academic Press, Inc., Orlando, pp 157-165
2. Sugimura, T., Kawachi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Okamoto, T., Shudo, K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Itaki, Y. and Itai, A. (1977) Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.*, 53, 58-61.
3. Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Kasai, H.,

표 4. Trp-P-2 adducts of total protein and DNA in cultured human and rat keratinocytes in the presence and absence of TCDD

Cell types	DNA		Protein	
	-TCDD	+TCDD	-TCDD	+TCDD
Sik	1±0.4	4±1.4	17±4.3	23±5.7
hEp	2±0.6	7±4.7	25±7.1	37±4.8
rEp	2±0.9	6±3.3	19±1.7	25±3.0

Values (ng Trp-P-2/mg) are the mean±SD of three independent experiments run in triplicate or duplicate. Nonspecific background values of DNA and protein add-ucts were 0.4 and 3, respectively.

- Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M. and Sugimura, T. (1980) Detection of potent mutagens, Trp-P-1 and Trp-P-2, in broiled fish. *Cancer Lett.*, 9, 75-83.
4. Manabe, S., Uchino, E. and Wada, O. (1989) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in airborne particles and rain water. *Mutat. Res.*, 226, 215-221.
  5. Manabe, S. and Wada, O. (1990) Carcinogenic tryptophan pyrolysis products in cigarette smoke condensate and cigarette smoke-polluted indoor air. *Environ. Pollut.*, 64, 121-132.
  6. Nagao, M., Takabashi, Y., Yahagi, T., Sugimura, T., Takeda, K., Shudo, K. and Okamoto, T. (1980) Mutagenicities of -carboline derivatives related to potent mutagens found in tryptophan pyrolyzates. *Carcinogenesis*, 1, 451-454.
  7. Brookman, K.W., Salazar, Z.P. and Thompson, L.H. (1985) Comparative mutagenic efficiencies of the DNA adducts from the cooked-food-related mutagens Trp-P-2 and IQ in CHO cells. *Mutat. Res.*, 149, 249-255.
  8. Matsukura, N., Kaachi, T., Morino, K., Ohgaki, H., Sugimura, T. and Takayama, S. (1981) Carcinogenicity in mice of mutagenic compounds from a tryptophan pyrolysate. *Science*, 213, 346-347.
  9. Fujii, K. (1991) Evaluation of the newborn mouse model for chemical tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 12, 1409-1415.
  10. Mita, S., Yamazoe, Y., Kamataki, T. and Kato, R. (1983) Metabolic activation of Trp-P-2, a tryptophan-pyrolysis mutagen, by isolated rat hepatocytes. *Biochem, Pharmacol.*, 32, 1179-1182.
  11. Aoyama, T., Gonzalez, F.J. and Gelboin, H.V. (1989) Human cDNA-expressed cytochrome P4501A2: Mutagen activation and substrate specificity. *Mol. Carcinog.*, 2, 192-198.
  12. McManus, M.E., Burgess, W.M., Veronese, M.E., Huggett, A., Quattrochi, L.C. and Tukey, R.H. (1990) Metabolism of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and activation of food-derived heterocyclic amine mutagens by human cytochrome P-450. *Cancer Res.*, 50, 3367-3376.
  13. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. and Sutter, T.R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.*, 56, 2979-2984.
  14. Wild, D., Feser, W., Michel, S., Lord, H.L. and Josephy, P.D. (1995) Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed human arylamine N-acetyltransferase isoenzymes (NAT1 and NAT2) expressed in *Salmonella typhimurium*. 16, 643-648.
  15. Hashimoto, Y., Shudo, K. and Okamoto, Y. (1980) Activation of a mutagen, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole. Identification of 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole and its reaction with DNA. *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, 96, 355-362.
  16. Shinohara, A., Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T. and Kato, R. (1986) Acetyl-coenzyme A-dependent activation

- of N-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines. Mechanism of activation, species difference, tissue distribution, acetyl donor specificity. *Cancer Res.*, 46, 4362-4367.
17. Hashimoto, Y. and Shudo, K. (1985) Chemical modification of DNA with muta-carcinogens. I. 3-Amino-1-methyl-5H-pyrido(4,3-b)indole and 2-amino-6-methyldipyrido(1,2-a:3',2-d)imidazole: Metabolic activation and structure of the DNA adducts. *Environ. Health Perspect.*, 62, 209-214.
  18. Navsaria, H.A., Sexton, C., Bouvard, V. and Leigh, I.M. (1994) Human Epidermal keratinocytes. In Leigh, I.M. and Watt, F.M. (eds), *Keratinocytes methods*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 5-12
  19. Walsh, A.A., deGraffenried, L.A. and Rice, R.H. (1995) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin sensitization of cultured human epidermal cells to carcinogenic heterocyclic amine toxicity. *Carcinogenesis*, 16, 2187-2191.
  20. Ramsdell, H.S. and Eaton, D.L. (1990) Species Susceptibility to Aflatoxin B1 Carcinogenesis: Comparative Kinetics of Microsomal Biotransformation. *Cancer Res.*, 50, 615-620.
  21. Degen, G.H. and Neumann, H.G. (1981) Differences in aflatoxin B1-susceptibility of rat and mouse are correlated with the capability in vitro to inactivate aflatoxin B1-epoxide. *Carcinogenesis*, 2, 299-306.
  22. Allen-Hoffman, B.L. and Rheinwald, J.G. (1984) Polycyclic aromatic hydrocarbon mutagenesis of human epidermal cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7802-7806.
  23. Rheinwald, J.G. and Green, H. (1975) Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma, *Cell*, 6, 317-330.
  24. Ausubel, F.H., Brent, R., Kingston, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, I.A. and Struhl, K. (1993) DNA protein interaction. Vol. 2. In: *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York, pp 12.1.1-12.1.9.
  25. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K. and Gartner, F.H. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, 150, 76-85.
  26. Reiners, J.J., Cantu, A.R. and Pavone, A. (1990) Modulation of constitutive cytochrome P-450 expression in vivo and in vitro in murine keratinocytes as a function of differentiation and extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, 1825-1829.
  27. Andres, H.H., Klem, A.J., Szabo, S.M. and Weber, W.W. (1985) New spectrophotometric and radiochemical assays for acetyl-CoA arylamine N-acetyltransferase applicable to a variety of arylamines. *Anal. Biochem.*, 145, 367-375.
  28. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jacoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.

29. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) Analysis of RAN. In: Molecular cloning-A Laboratory Manual, Vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 7.39-7.48.
30. Kado, N.Y., Langley, D. and Eisenstadt, E. (1983) A simple modification of the Salmonella liquid incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutation Res.*, 121, 25-32.
31. Shimada, T., Yun, C-H., Yamazaki, H., Gautier, J-C., Beaune, P.H. and Guengerich, F.P. (1992) Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol. Pharmacol.*, 41, 856-864.
32. Shinohara, A., Yamazoe, Y., Saito, K., Kamataki, T. and Kato, R. (1984) Species differences in the N-acetylation by liver cytosol of mutagenic heterocyclic aromatic amines in protein pyrolysates. *Carcinogenesis*, 5, 683-686.
33. Raza, H., Awasthi, Y.C., Zaim, M.T., Eckert, R.L. and Mukhtar, H. (1991) Glutathione S-transferases in human and rodent skin: Multiple forms and species-specific expression. *J. Invest. Dermatol.*, 463-467.
34. Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T. and Kato, R. (1984) Glutathione transferase-mediated and non-enzymatic activation and detoxification of the N-hydroxy derivative of Trp-P-2, a potent pyrolysate promutagen. *Xenobiotica*, 14, 545-548.
35. Weber, W. and Hein, D.W. (1985) N-Acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. Rev.*, 37, 25-79.
36. Jones, R.F., Land, S.J. and King, C.M. (1996) Recombinant rat and hamster N-acetyltransferase-1 and -2: relative rates of N-acetylation of arylamines and N,O-acyltransfer with arylhydroxamic acids. *Carcinogenesis*, 17, 1729-1733.
- 
- 
-