

원숭이 소장 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 Intestine

Kyung W. Lee, Kazuo Asaoka^{1*}, and Yhun Y. Sheen

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Department of Cellular and

*Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University#11-1, Daehyun-dong, sudaemun-ku, Seoul 120-750, Korea

(Received February 24, 2004 / Accepted March 20, 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 intestine by 11-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 α was induced in intestine by 1.5-fold. GST π was slightly induced by the treatment with 3MC and DBP in intestine. 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 didn't significantly induce CYP1A1 mRNA in intestine. The levels of GST μ and GST π 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, GST π , GST μ , CYP1A1, DBP

서 론

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 참원숭이(참원숭이 아목, Anthropoidea)와 하등영장류인 원시원숭이(원시원숭이아목, Prosimii)로 나누어지고 참원숭이는 다시 원숭이와 유인원(Man-like Apes)로 나누어진다. 원숭이에는 꼬리감기원숭이과(Cebidae), 마모셋과(Callitrichidae), 긴꼬리원숭이과(Cercopithecidae) 등이 있

고 유인원에는 성성어과(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. Methoxy-, ethoxy-, penthoxy-, benzyloxyresorufin (MEPB)를 각각 기질로 사용하는 alkoxyresorufin O-dealkylation (AROD)의 활성측정 결과 필리핀원숭이의

*To whom correspondence should be addressed

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). 마모셋원숭이의 경우에는, 약물처치를 하지 않은 마모셋원숭이의 간에서 CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E, CYP3A 등의 발현이 northern blot과 immunoblot 분석을 통해 확인되었고 CYP1A도 작은 정도이지만 발현이 확인되었다. 또 CYP3A mRNA의 발현은 마모셋원숭이의 소장에서도 확인되었다. 마모셋원숭이에서는 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).

약물 대사 효소는 간에 가장 풍부하지만 소장과 같은 간의 외의 조직에서도 발현된다. CYP의 경우 백서의 소장에서는 CYP1A1, CYP2B1, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP3A4를 포함한 적어도 6 가지이상의 CYP 아목가 발현되며 CYP1A1, CYP2B1, CYP3A1은 유도가 가능하다는 보고가 있었으며 (Zhang *et al.*, 1996) 사람의 소장에서도 CYP1A1, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5 등이 발현된다는 보고가 있었다 (Zhang *et al.*, 1999). 또 뇌에서도 CYP1A1, CYP2B1, CYP2C11, CYP2C12, CYP3A, CYP2E1 등이 설치류와 사람에서 발현된다고 보고되었다 (Geng and strohel, 1997; Morse *et al.*, 1998). Phthalate는 플라스틱의 가스제로 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 소장에서 약물대사효소로서 CYP1A1, GST α , GST μ , GST π 등의 mRNA 발현 정도를 역전사 연쇄증폭반응 (RT-PCR)을 통하여 알아보고 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 CHCl_3 를 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 CHCl_3 을 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 1시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열하여 반응을 종결시켰다. RT product 1 µl에 forward primer와 reverse primer (Table 2)를 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 units를 가하고 삼차 증류수로 전체량이 10 µl이 되게 한 후에 다음의 조건으로 Minicycler(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

3-Methylcholanthrene)와 di-n-butyl phthalate가 원숭이 소장의 약물 대사 효소 CYP1A1 mRNA 발현에 미치는 영향

3-methylcholanthrene (3MC)와 di-n-butyl phthalate (DBP)가 원숭이 소장의 약물 대사 효소에 미치는 영향을 알아보기 위해 무처치 일본 원숭이, 3MC-처치 일본 원숭이, DBP-처치 일본 원숭이, DBP-처치 히말라야 원숭이 등의 소장에서의 CYP1A1과 GST의 mRNA 발현정도를 RT-PCR로 살펴보았다. 소장의 조직에서 분리해낸 total RNA를 사람의 CYP1A1 primer로 원숭이 소장의 RT product를 증폭시킨 후 1.5% agarose gel에 전기영동시켜 PCR product를 얻었다. 이것을 image analyzer를 사용해 정량하고 actin 양으로 보정한 후 무처치 성인 원숭이의 값을 기준(100%)

으로 환산하였다(Fig. 1). 그 결과, 임신한 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 310%로 임신하지 않은 성인 원숭이에 비해 매우 높게 나타났다. 3MC에 의해서 임신한 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현정도는 1135%로 크게 증가하였으며 DBP에 의해서도 임신하지 않은 원숭이는 190%, 임신한 원숭이는 335%의 발현정도를 보였다. DBP를 처치한 히말라야 원숭이는 200%로 임신한 일본원숭이보다는 낮았지만 무처치 성인 원숭이보다는 높게 나타났다. 태아 원숭이의 경우에는 무처치 태아 원숭이 130%, 3MC-처치 태아 원숭이 140%, DBP-처치 태아 원숭이 160%, DBP-처치 태아 히말라야원숭이 120%로 어미 원숭이에 비해서는 낮았지만 임신하지 않은 성인 원숭이와 본질적인 CYP1A1 mRNA 발현정도가 비슷하게 나타났다(Fig. 2).

3-Methylcholanthrene)와 di-n-butyl phthalate가 원숭이 소장의 약물 대사 효소 GST mRNA 발현에 미치는 영향

원숭이 소장의 RT product를 사람의 GST α, GST μ, GST π의 각각의 primer로 증폭시키고 1.8% agarose gel에 전기영동시켜 각각의 PCR product를 얻었다. 각각을 image analyzer로 정량한 후 actin 양으로 보정하고 무처치 성인 원숭이의 값을 기준(100%)로 환산하였다(Fig. 2). GST α의 mRNA 발현 정도는 무처치 임신한 원숭이에서 130%, 3MC-처치 임신한 원숭이에서 139%, DBP-처치 성인 원숭이에서 126%, DBP-처치 임신한 원숭이에서 85%, DBP-처치 임신한 히말라야원숭이에서는 72%로 나타났다.

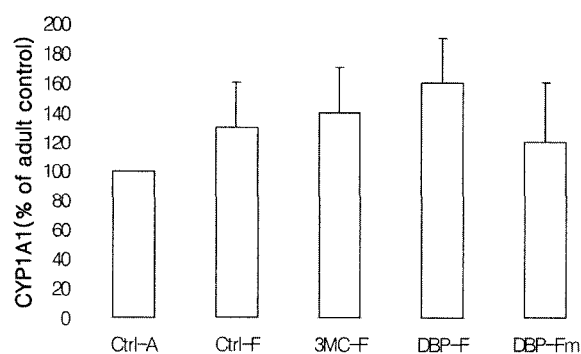


Fig. 1. The relative levels of CYP1A1 mRNA in adult monkey intestine after the treatment of 3MC and DBP: Each data of CYP1A1 mRNA level was normalized with β-actin mRNA level. Data are means±SD; lane 1, control Japanese monkey(Mff) mother (Ctrl-M); lane 2, control Mff adult (Ctrl-A); lane 3, 3MC treated Mff mother (3MC-M); lane 4, DBP treated Mff adult (DBP-A); lane 5, DBP treated Mff mother (DBP-M); lane 6, DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); lane 7, control Mff fetus (Ctrl-F); lane 8, 3MC treated Mff fetus (3MC-F); lane 9, DBP treated Mff fetus (DBP-F); lane 10, DBP treated Mm fetus (DBP-Fm)

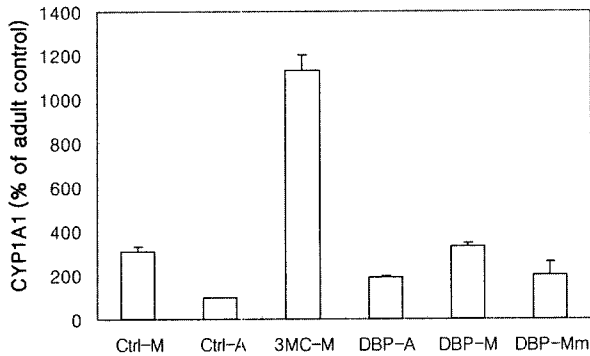


Fig. 2. The relative levels of CYP1A1 mRNA in fetal monkey intestine after the treatment of 3MC and DBP: Each data of CYP1A1 mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; lane 1, control Japanese monkey (Mff) mother (Ctrl-M); lane 2, control Mff adult (Ctrl-A); lane 3, 3MC treated Mff mother (3MC-M); lane 4, DBP treated Mff adult (DBP-A); lane 5, DBP treated Mff mother (DBP-M); lane 6, DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); lane 7, control Mff fetus (Ctrl-F); lane 8, 3MC treated Mff fetus (3MC-F); lane 9, DBP treated Mff fetus (DBP-F); lane 10, DBP treated Mm fetus (DBP-Fm)

태아 원숭이의 GST α 발현정도는 무처리 태아 원숭이는 77%, 3MC-처리 태아 원숭이는 84%, DBP-처리 태아 원숭이는 76%, DBP-처리 히말라야 원숭이는 83%로 성인 원숭이에 비해서는 20% 정도 낮은 것으로 나타났다. GST μ 의 mRNA 발현 정도는 무처리 임신한 원숭이에서 63%, 3MC-처리 임신한 원숭이에서 76%, DBP-처리 성인 원숭이에서 67%, DBP-처리 임신한 원숭이에서 61%, DBP-처리 임신한 히말라야원숭이에서는 86%로 나타났다. 태아 원숭이의 GST μ mRNA의 발현정도를 비교해보면 무처리 태아 원숭이는 53%, 3MC-처리 태아 원숭이는 50%, DBP-처리 태아 원숭이는 25%, DBP-처리 히말라야 원숭이는 48%로 성인 원숭이들에 비해서 낮은 발현정도를 보였다. GST π 의 mRNA 발현정도는 무처리 임신한 원숭이에서 117%, 3MC-처리 임신한 원숭이에서 206%, DBP-처리 성인 원숭이에서 121%, DBP-처리 임신한 원숭이에서 147%, DBP-처리 임신한 히말라야원숭이에서는 152%로 3MC에 의해서는 발현 정도가 약 2배 정도로 증가하였고 DBP에 의해서는 약간 증가를 보였다. 태아 원숭이의 경우에는 무처리 태아 원숭이는 103%, 3MC-처리 태아 원숭이는 94%, DBP-처리 태아 원숭이는 86%, DBP-처리 히말라야 원숭이는 123%로 3MC와 DBP에 의한 큰 변화는 나타나지 않았다(Figs. 3,4).

고 찰

소장에서는 랫트의 경우 CYP1A1, CYP2B1, CYP2C6,

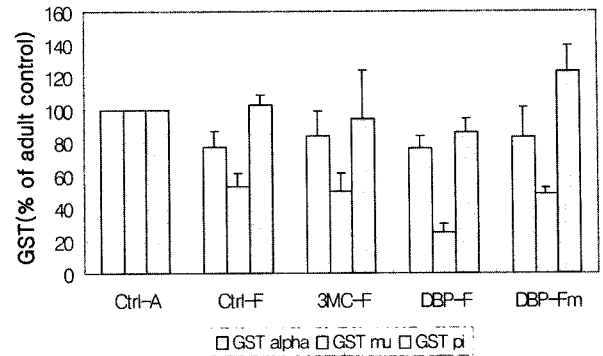


Fig. 3. The relative levels of GST mRNA in adult monkey intestine after the treatment of 3MC and DBP: Each data of GST mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; lane 1, control Japanese monkey (Mff) mother (Ctrl-M); lane 2, control Mff adult (Ctrl-A); lane 3, 3MC treated Mff mother (3MC-M); lane 4, DBP treated Mff adult (DBP-A); lane 5, DBP treated Mff mother (DBP-M); lane 6, DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); lane 7, control Mff fetus (Ctrl-F); lane 8, 3MC treated Mff fetus (3MC-F); lane 9, DBP treated Mff fetus (DBP-F); lane 10, DBP treated Mm fetus (DBP-Fm).

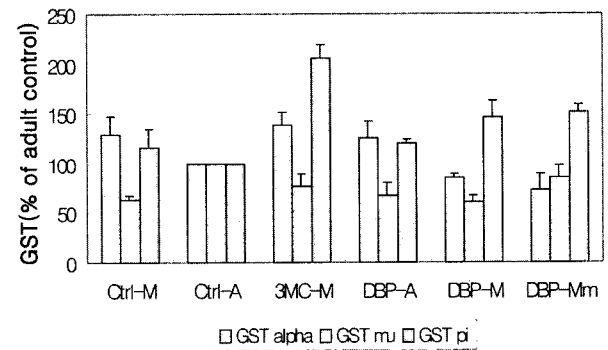


Fig. 4. The relative levels of GST mRNA in adult monkey intestine after the treatment of 3MC and DBP: Each data of GST mRNA level was normalized with β -actin mRNA level. Data are means+SD; lane 1, control Japanese monkey (Mff) mother (Ctrl-M); lane 2, control Mff adult (Ctrl-A); lane 3, 3MC treated Mff mother (3MC-M); lane 4, DBP treated Mff adult (DBP-A); lane 5, DBP treated Mff mother (DBP-M); lane 6, DBP treated rhesus monkey (Mm) mother (DBP-Mm); lane 7, control Mff fetus (Ctrl-F); lane 8, 3MC treated Mff fetus (3MC-F); lane 9, DBP treated Mff fetus (DBP-F); lane 10, DBP treated Mm fetus (DBP-Fm).

CYP2C11, CYP2D, CYP3A1를 비롯해 적어도 6가지의 CYP 아과가 존재한다고 알려져 있고, 사람의 경우도 CYP1A1, CYP2C, CYP3A4, CYP2D6, CYP2E1 등의 존재가 확인되었다(Anttila *et al.*, S., 1992; Austin *et al.*, 1992; Berghard *et al.*, 1993; Bullock *et al.* 1995). 장세포는 경구로 섭취되는 외인성 물질에 첫 번째 대사계를 제공

하는 세포로, 외인성 물질의 초회 통과 대사가 일어나는 곳이다. 장세포는 살아있는 시간이 짧아 DNA와 다른 거대분자에 미치는, CYP에 의해 활성화된 손상의 영향도 짧아, 섭취 후 발암물질이 생체 내에서 활성화되어 나타내는 결과가 감소하게 된다. 소장에서 가장 많이 유도될 수 있는 CYP의 아과는 CYP1A1이다. 많은 다환상 방향족 화합물이 CYP1A1에 의해 대사되는데, 다환상 방향족 화합물이 소장으로 들어가서 가능한 기전은 세 가지가 있다. 첫 번째는 생체내에서 활성화되어 장세포의 거대분자와 공유결합한 후 장세포와 함께 제거되는 것이고, 두 번째는 대사된 후 다시 내강으로 배설된 후 배설물과 함께 제거되는 것이다. 마지막으로 세 번째는 대사된 후 안정한 대사체로 전신적으로 흡수되는 것이다. 랫트의 경우 소장에서의 CYP1A1 유도시간 경과에 따른 결과는, 간에 비해 빠르게 유도되나 지속시간은 간에 비해 짧은 것으로 나타났다. 또 소장의 길이에 따라 유문 판막(pyrolic valve)에서 멀어질수록 CYP1A1의 유도능력이 감소하는 것으로 관찰되었는데, 이는 AhR의 발현 정도와 비슷한 양상으로 감소하는 것으로 보아 CYP1A1 유도의 첫단계가 유도제와 AhR과의 결합과 관련되기 때문일 것으로 생각할 수 있다. 사람의 경우도 전체적으로 십이지장에서 회장까지 거리에 따라 장세포와 장세포에서 얻어지는 microsome이 감소하며, 전체 CYP량과 CYP3A4 활성이 감소하는 것으로 관찰되었다(Zhang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1999). C57BL/6N 마우스에서 *in situ* hybridization으로 본질적인 CYP1A1 mRNA는 검출할 수는 없었으나, 3MC 복강처치로 간, 폐, 뇌, 소화관, 신장, 난소 등에서 CYP 1A1이 유도되는 것을 확인할 후 있었다고 한다. 또 CYP1A2 mRNA의 경우는 간에서 본질적으로 확인되었고 3MC에 의한 유도는 간, 폐, 십이지장에서만 확인되었다(Carrier *et al.*, 1992; Corton *et al.*, 1997; Daniel *et al.*, 1993; Delescluse *et al.* 2000; Dey *et al.*, 1999). Wister rat에서도 간과 소장의 CYP1A 활성에 관한 보고가 있었다. 간에서는 CYP1A2가 우세하고 존재하고 3-MC 처치에 의해 CYP1A1 단백질의 발현이 현저히 증가하는 반면, 소장에서는 CYP1A1만이 검출되고 3MC 처치에 의해 유도되었다고 한다(Dervel *et al.*, 1993; de Sousa *et al.*, 1996; de Waziers *et al.*, 1990; Dirr *et al.*, 1994; Spatzenegger *et al.*, 2000). 소장에서의 GST 발현 정도는 간의 약 80% 정도인 것으로 보고되었으며(Pacifici, 1988) GST α , GSTP1-1, GSTT1-1 등이 높은 발현을 보인다고 한다(de Bruin *et al.*, 2000). 소장표피에서의 GST 발현을 살펴본 결과, GST α , GST μ , GST π 등이 용모세포와 분비세포에서 발현된다는 것이 확인되었다(Dwivedi *et al.*, 1993; FitzGerald *et al.*, 1996; Giannone *et al.*, 1998; Gillesby *et al.*, 1997;

Gonzalez *et al.*, 1989; Hakkola *et al.*, 1996; Hines *et al.*, 1989; Hayes *et al.*, 1998). 본 실험을 통하여 일본원숭이와 히말라야원숭이의 소장에서 본질적인 CYP1A1 mRNA가 발현된다는 것을 확인할 수 있었다. 무처치 성인 원숭이의 소장으로부터 얻은 3/20 μ g의 total RNA의 RT product는 약 7.5×10^2 copies의 competitor에 해당하는 CYP1A1을 포함하고 있으며 이것은 3MC 처치에 의해 10배 이상 증가되었고 DBP에 의해서도 2~3배 증가되었다. 그러나 소장에서는 임신한 원숭이의 CYP1A1 mRNA 발현 정도가 임신하지 않은 원숭이보다 높게 나타났기 때문에 DBP의 경우 임신한 원숭이들끼리만을 비교하면 증가되었다고 볼 수 없다. 태아 원숭이에서는 3MC나 DBP가 큰 영향이 없었다. 소장에서도 역시 본질적인 GST α , GST μ , GST π mRNA가 검출되었으나 GST π 의 발현 정도는 간이나 뇌에 비해 낮았다. 3MC와 DBP의 처치에 의해 GST π 의 발현 정도가 증가하였고 GST μ 가 감소하였다. 그러나 태아원숭이의 GST에는 큰 변화가 없었고 성인 원숭이의 경우에도 임신한 원숭이끼리 비교하면 GST μ 는 변화가 없다고 볼 수 있다.

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. (1992): Expression and localization of CYP3A4 and CYP3A5 in human lung. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **16**, 242-249.
- Austin, C. A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H. and Fisher, L. M. (1992): Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochemistry*, **282**, 883-889.
- Berghard, A., Gradin, K., Pongratz, I., Whitelaw, M. and Poelinger, L. (1993): Cross-coupling of signal transduction pathways: The dioxin receptor mediates induction of cytochrome P-4501A1 expression via a protein C-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.*, **13**(1), 677-689.
- Bullock, P., Pearce, R., Draper, A., Podval, J., Bracken, W., Veltman, J., Thomas, P. and Parkinson, A. (1995): Induction of liver microsome cytochrome P450 in cynomolgus monkeys. *Drug. Metab. Dispos.*, **23**(7), 736-748.
- Carrier, F., Owens, R. A., Nebert, D. W. and Puga, A. (1992): Dioxin-dependent activation of murine CYP1A1 gene transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, **12**(4), 1856-1863.
- Corton, J. C., Bocos, C., Moreno, E. S., Merritt, A., Cattley, R. C. and Gustafsson, J. A. (1997): Peroxisome proliferators alter

- the expression of estrogen -metabolizing enzymes. *Biochemie*, **79**(2-3), 151-162.
- Daniel, V. (1993): Glutathion S-transferase: gene structure and regulation of expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **28**(3), 173-207.
- Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G. and Rahmani, R. (2000): Is CYP1A1 induction always related to AhR signaling pathway? *Toxicology*, **153**(1-3), 73-82.
- Dervel, M., Igarashi, T. and Satoh, T. (1993): 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.
- de Bruin, W. C., Wagenraans, M. J and Peters, W. H. (2000): Expression of glutathion S-transferase alpha, P1-1, T1-1 in the human gastrointestinal track. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **91**(3), 310-316.
- Dey, A., Jones, J. E. and Nebert, D. W. (1999): Tissue- and cell type-specific expression of cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 1A2 mRNA in the mouse localized in situ hybridization. *Biochem. Pharmacol.*, **58**(3), 525-537.
- de Sousa, G., Langouet, S., Nicolas, F., Lorenzon, G., Placidi, M., Rahmani, R. and Guillouzo, A. (1996): 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.
- de Waziers, I., Cugnenc, P. H., Yang, C. S., Leroux, J. P. and Beaune, P. H. (1990): Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathion transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253**, 387-394.
- Dirr, H., Reinemer, P. and Huber, R. (1994): X-ray crystal structures of cytosolic glutathion S-transferase: Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. *Eur. J. Biochem.*, **220**, 645-661.
- Dwivedi, R. S., Primiano, T. and Novak, R. F. (1993): Xenobiotic-modulated expression of glutathion S-transferase genes in primary rat hepatocyte culture. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1174**(1), 43-53.
- FitzGerald, C. T., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F. J., Nebert, D. W. and Puga, A. (1996): Differentiation regulation on mouse Ah receptor gene expression in cell lines of different tissue origins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 170-178.
- Geng, J. and Strobel, H. W. (1997): Expression and induction of cytochrome P-450 1A1 and P-250 2D subfamily in the rat glioma C6 cell line. *Brain Research*, **774**, 11-19.
- Giannone, J. V., Li, W., Probst, M. and Okey, A. B. (1998): Prolonged depletion of AH receptor without alteration of receptor mRNA levels after treatment of cells in culture with 2,3,7,8-tetrachlorocibenzo-p-dioxin. *Biochem. Pharmacol.*, **55**(4), 489-497.
- Gillesby, B. E., Stanostefano, M., Porger, W., Sare, S., Wu, Z. F. and Zacharewski, T. R. (1997): Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry*, **36**(20), 6080-6089.
- Gonzalez, F. J. The molecular biology of cytochrome P450 enzymes. *Pharmacol. Rev.*, **40**, 244-288.
- Hakkola, J., Pasanen, M., Hukkanen, J., Pelkonen, O., Maenpaa, J., Edwards, R. J., Boobis, A. R. and Raunio, H. (1996): Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 403-411.
- Hayes, P. C., Harrison, D. J., Bouchier, I. A., McLellan, L. I. and Hayes, J. D. (1989): Cytosolic and microsomal glutathion S-transferase isoenzymes in normal human liver and intestinal epithelium. *Gut.*, **30**(6), 854-859.
- Hines, R. N., Mathis, M. and Jacob, C. S. (1989): Identification of multiple regulatory element on the human cytochrome P4501A1 gene. *Carcinogenesis*, **9**, 1599-1605.
- Igarashi, T., Sacuma, T., Isogai, M., Nagata, R. and Kamiyaki, T. (1997): Marmoset liver cytochrome P450s: study for expression and molecular cloning of their cDNAs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**(1), 85-91.
- Morse, D. C., Stein, A. P., Thomas, P. E. and Lowndes, H. E. (1998): Distribution and induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 in rat brain. *Toxicology and applied pharmacology*, **152**, 232-239.
- Parcifici, G. M., Franchi, M., Cencini, C., Repetti, F., Di Lascio, N. and Muraro, G. B. (1988): Tissue distribution of drug-metabolizing enzymes in humans. *Xenobiotica*, **18**(7), 849-856.
- Spatzenegger, M., Horsmans, Y. and Verbeeck, R. K. (2000): Differential activities of CYP1A isozymes in hepatic and intestinal microsomes of control and 3-methylcholanthrene-induced rats. *Pharmacol. Toxicol.*, **86**(2), 71-77.
- Zhang, Q. Y., Dunbar, D., Ostrowska, A., Zeisloft, S., Yang, J. and Kaminsky, L. (1999): Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug. Metab. Dispos.*, **27**, 804-809.
- Zhang, Q. Y., Wokoff, J., Dunbar, D., Fasco, M. and Kaminsky, L. (1997): Regulation of cytochrome P4501A1 expression in rat small intestine. *Drug. Metab. Dispos.*, **25**, 21-26.