

사람 유래의 MCF10A, Chang liver 및 HaCaT 세포의 소핵형성 및 세포형질전환에 미치는 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin의 영향

엄미옥 · 박미영 · 김종원¹ · 박미선 · 한의식² · 오혜영 · 정해관*
식품의약품안전청 국립독성연구원, ¹생물의약품평가부, ²의약품평가부

(Received June 17, 2004 / Accepted June 20, 2004)

ABSTRACT : Although 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) is a powerful carcinogen in several species, limited model system exist to study carcinogenicity of this compound at cellular level. To enhance our understanding of carcinogenicity of TCDD at cellular level, we investigated micronucleus (MN) frequency as a index of genetic toxicity and whether TCDD can transform the human cells in culture. Normal human cell lines, skin keratinocyte HaCaT, Chang liver and breast MCF10A cells were used. TCDD did not affect the cell viability of the Chang liver, HaCaT and MCF10A cells. The frequency of micronucleus was increased after treatment of TCDD for 24hr in Chang liver and HaCaT cells, but not changed in MCF10A cells. And we observed putative transformed cells in Chang liver cells exposed to 1 μM TCDD for 2 weeks. The putative transformed cells were also observed in HaCaT cells with subsequent exposure to TCDD (0.1, 1, 10, 100 nM) for 2 weeks after initial exposure to MNNG, but not observed in MCF10A cells. Collectively, these results indicate that the ability of TCDD to induce micronuclei may be involved in cellular transformation of Chang liver and HaCaT cells. Our putative TCDD-transformed cells of Chang liver and HaCaT are expected to provide a clue to the elucidation of TCDD-induced transformation pathway.

Key words : TCDD, Micronucleus, human cell line, cellular transformation

서 론

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)은 방향족 할로겐 화합물 (Halogenated aromatic hydrocarbons, HAHs) 중 가장 위협적인 물질로 발암유도 (carcinogenesis), 간 독성 (hepatotoxicity), 약물 대사효소의 유도 (xenobiotic metabolizing enzyme induction), 면역기능저하 (immunosuppression), 기형유발 (teratogenesis), 염소좌창 (chloracne) 등 다양한 종 특이적, 조직 특이적 독성을 가지는 것으로 알려져 있다 (Fernadex-Salguero *et al.*, 1995; Whitlock, 1993). 실험동물에서의 다양한 결과 및 사람에 대한 역학연구결과들에 기초하여 국제암연구기관 (the International Agency for Research on Cancer, IARC)에서는 TCDD를 제1급의 발암 물질로 분류하고 있다 (McGregor *et al.*, 1998).

TCDD는 ICH가 권유하는 유전독성 battery 시험인 미생물을 이용한 복귀돌연변이시험 (Geiger *et al.*, 1981; Mortelamns *et al.*, 1984), 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 (Galloway *et al.*, 1987), 마우스 림포마 유전자 돌연변이시험 (McGregor *et al.*, 1991) 및 생체내 소핵시험

(Meyne *et al.*, 1985)에서 모두 음성의 결과를 보였으며, 랫드 간 및 피부를 이용한 발암성 시험결과에서는 종양축진 효과를 나타내었다 (Yoshida *et al.*, 2000; Poland *et al.*, 1979; Geiger *et al.*, 1981; Greenlee *et al.*, 1987; Gaido *et al.*, 1994). 최근의 역학연구에 의하면 장기간 과량으로 TCDD에 노출될 경우 사람에게 여러 종류의 암이 형성되는 것으로 알려졌다으며, 성장조절에 관여하는 유전자 (PAI-2, TGF-β1 혹은 TNF-α)를 변화시켜 형질 변환과정에 관여하는 것으로 알려졌다 (Yang *et al.*, 1999).

발암성 및 독성에 관한 많은 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 TCDD는 AhR을 통한 CYP1A1 등 전사증가 기전만이 분자수준에서 자세히 알려져 있다. TCDD에 노출되면 그 수용체인 aromatic hydrocarbon receptor (AhR)과 결합하여 핵으로 이동하며, 다시 AhR nuclear translocator (ARNT)와 이량체를 형성하여 세포내 P450s (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) 함량을 증가시키고, phase II enzymes (UDP-glucuronyl-S-transferase, cytosolic aldehyde dehydrogenase, sulfotransferase) 등 대사효소들, 여러 가지 성장인자들 및 관련 단백질들의 전사를 활성화한다는 것이 밝혀져 있다 (Rowlands *et al.*, 1997; Whitlock, 1990; Gonzale *et al.*, 1985; Kimura *et al.*, 1986; Nebert, 1989; Rowlands

*To whom correspondence should be addressed

et al., 1997). TCDD의 독성기전은 세포질에 존재하는 수용체 AhR의 결합을 통하여 Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) 등 약물대사효소의 발현 변화에 의한 다환계 방향족 (polyaromatic hydrocarbon) 계열의 외인성 발암물질이나 내인성 발암물질인 에스트로겐의 대사 양상의 변화와 EGF 수용체 및 estrogen 수용체와의 상호작용에 기인하는 것으로 생각되고 있다(Anreola *et al.*, 1997; Kohn, *et al.*, 1996; Spink *et al.*, 1990). 또한 TCDD에 의해 유도되는 cytochrome p450 효소에 의해 catechol estrogen이 형성되는 것 외에도 TCDD에 의해 산화적 스트레스가 유발된다는 보고되고 있다 (Geiger *et al.*, 1981; Slezak *et al.*, 1999). 따라서 TCDD는 직접 표적세포의 DNA나 염색체의 손상 및 돌연변이를 유발하지는 않는 epigenetic 기전에 의해 독성효과를 가지는 비유전독성 발암촉진물질로 생각하는 것이 일반적이다.

대부분의 비유전독성 발암물질들은 공통적으로 조직특이성, 종 특이성, 성특이성을 보이고 있어 본 연구에서는 TCDD의 주요 표적 조직으로 알려져 있는 간세포, 유방세포, 피부세포를 이용하여 생체의 소핵시험을 실시하였으며, 세포의 종류에 따른 TCDD의 소핵형성능을 관찰하였다. 또한 Yang 등 (1992)의 연구결과 사람 유래의 배양된 세포에서 TCDD의 발암성이 검증되었으나, 현재까지의 연구는 세포수준에서 암화기전을 설명하기에는 매우 불충분할 뿐만 아니라 지금까지 밝혀지지 않은 발암경로 또는 방어 시스템이 존재할 가능성이 제기되고 있어 세포형질전환시험법을 통하여 인간유래의 정상세포들에 대한 TCDD의 암화능력을 조사하여 TCDD의 형질전환 및 세포 내성 획득 기구를 이해하는데 필요한 단서를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

실험에 사용한 세포주는 사람 간조직 유래의 Chang liver 세포, 사람 피부조직 유래의 HaCaT 세포, 그리고 사람 유방조직 유래의 MCF10A 세포를 사용하였다. Chang liver 세포는 fetal bovine serum (FBS)을 10% 함유하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다. HaCaT 세포는 fetal bovine serum (FBS) 10%, L-glutamin (0.48 g/L), F-12 mixture (2.65 g/L)를 함유하는 DMEM 배지를 사용하였다. MCF10A 세포는 horse serum (5%), insulin (11.2 mg/L), cholera toxin (384.62 µg/L), hydrocortisone (525 µg/L), h-EGF (119.05 µg/L), penicilin streptomycin antifungizone (11 ml/L)과 L-glutamin (200mM)을 함유하는 DMEM 배지로 배양하였다. 주2회 배지를 교환해 주면

서 세포형태와 성장양상을 관찰하였다. 세포가 80%정도 자라면서 계대배양하여 세포주를 유지시켰다.

세포독성시험

Mitochondrial dehydrogenase의 활성지수를 나타내는 MTT [3(-4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5,-diphenyl-tetrazolium bromide] 비색환원분석법을 수행하였다. Mossman (Mossman, 1983)의 방법을 변형하여 96 well plate에 각 well (n=10) 당 1×10⁵개의 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양한 후 시험물질인 TCDD를 0.1, 1, 10, 100 nM의 농도로 24시간 처리하였다. 처리시간이 지나면 PBS로 충분히 씻어주고 배지를 교환하여 각 well당 50 µl의 MTT 용액 (2 mg/ml)을 첨가하여 37°C에서 4시간동안 추가 배양하였다. 상층액을 제거하고 DMSO 150 µl를 첨가하여 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 용매 대조군은 DMSO (0.1%)를 사용하였다. 모든 시험결과는 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, 흡광도는 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 생존율로 변환하였다.

생체의 소핵시험

세포를 파종하여 24시간 배양한 다음 TCDD를 0.1, 1, 10, 100 nM 농도로 24시간 처리한 후 생체의 소핵시험 (Fenech *et al.*, 1999)을 실시하였다. 소핵의 관찰은 사람 말초혈액 림프구를 이용한 소핵시험법을 근거로 하였다. 간략히 세포 수거 후 KCl (75 mM) 5 ml에 현탁시킨 다음 원심분리 (800rpm, 5분)하였다. KCl을 제거하고 여기에 고정액 (MeOH:Acetic acid=3:1) 5 ml를 가하여 세포를 고정시켰다. 이러한 고정과정을 2회 반복한 후 세포를 슬라이드에 도말하고, 5% Giemsa 염색액으로 30분간 염색한다. 슬라이드를 공기중에 건조시킨 후 광학현미경 (Karl Zeiss, ×400~×1,000)하에서 관찰하였다. 한 시험 농도당 1×10³개의 세포를 판독하였으며 이 중 생성된 소핵(MN)의 크기에 따라 small MN과 large MN을 구분하였고 1개 이상의 소핵이 관찰될 경우 multi MN으로 구별하였다 (Matsuoka *et al.*, 1999). 소핵의 출현빈도가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 1개 이상의 용량단계에서 재현성 있게 증가한 경우 소핵을 유발하는 것으로 하였다.

세포형질전환시험

가. 1단계 세포형질전환시험

T25 culture flask당 1×10⁵개의 세포를 파종하여 24시간 배양하고 TCDD를 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 농도로 처

리하여 주 2회 배지를 교환해 가며 2주 동안 처리하였다. 시험물질 처리 후엔 신선한 배지로 교환하며 세포의 세포형태와 성장양상을 관찰하였다.

나. 2단계 세포형질전환시험

T25 culture flask당 1×10^5 개의 세포를 파종하여 24시간 배양한 다음, 암 개시 물질로서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG, 0.1 $\mu\text{g/ml}$)을 24시간 처리한 후 신선한 배지로 교환하였다. 실험 시작 5일째 되는 날 0.1, 1, 10, 100 nM TCDD를 처리하였다. 주 2회 배지를 교환해 주며 2주간 처리하였고 시험물질 처리 후엔 신선한 배지로 교환하며 세포의 형태와 성장양상을 관찰하였다.

결 과

TCDD의 세포 독성

사람의 유방조직 유래의 MCF10A 세포, 간조직 유래의 Chang liver 세포, 그리고 피부조직 유래의 HaCaT 세포에 TCDD를 0.1, 1, 10, 100 nM의 농도로 24시간 처리하여 세포 독성시험을 실시하였다. Fig. 1에서와 같이 MCF10A (Fig. 1A), Chang liver (Fig. 1B) 및 HaCaT (Fig. 1C) 세포 모두에서 세포 증식 억제 효과는 관찰할 수 없었다. 오히려 Chang liver 세포주의 경우에는 2주동안 1 μM 의 TCDD를 처리하면 무처리대조군에 비해 약 2배에 이르는 세포증식촉진 효과를 관찰할 수 있었다 (data not shown). 또한 hemocytometer를 이용한 trypan blue exclusion 방법으로 세포 증식에 대한 TCDD의 영향을 조사하였으나 MTT 방법과 같은 결과를 얻었다 (data not shown). 따라서 이들 3개 세포들에 있어서 TCDD에 의한 세포성장 저해나 세포독성이 없는 것으로 보아 TCDD가 세포 성장에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

TCDD의 소핵형성능

최근 생체의 소핵시험은 염색체 수준에서 돌연변이를 검색할 수 있는 유용한 시험법으로 여겨지고 있으며, 주로 이용되는 말초혈액 림프구 이외에도 사람 유래 또는 포유동물 유래의 다양한 세포주에서도 사용할 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Kalweit *et al.*, 1999). 본 연구에서는 사람 유래의 MCF10A, Chang liver 및 HaCaT 세포에 24시간동안 TCDD를 처리하여 생체의 소핵시험을 실시하였다. MCF10A 세포는 0.1, 1, 10, 100 nM TCDD에 의해 소핵의 증가를 관찰할 수 없었다(Table 1). 그러나 Chang liver 및 HaCaT 세포는 TCDD에 의해 소핵이 증가되는 것을 관찰하였다. Table 2에서와 같이 Chang liver 세포의 경우 농도 의존성을 보이지는 않았지만 10 및 100 nM의 TCDD

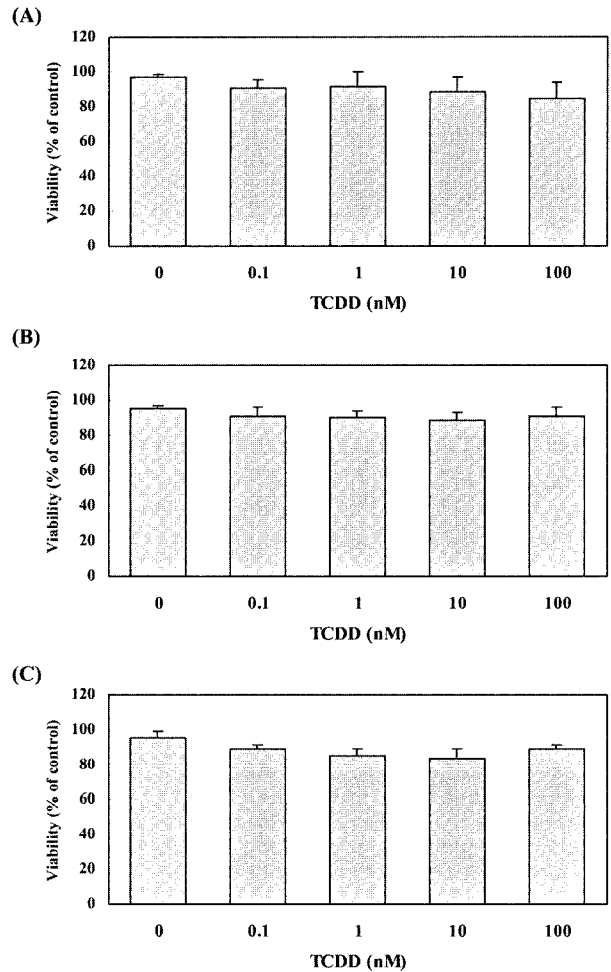


Fig. 1. Effects of TCDD on viability of MCF10A(A), Chang liver(B) and HaCaT(C) cells. Cells were treated with varying concentrations of TCDD at 37°C for 24h, and cell viability was determined by the MTT assays as described in Materials and Methods. Values are the mean±standard errors of three independent assays.

처리에 의해 재현성있고 통계학적으로 유의하게 소핵의 출현빈도가 증가되었다(용매대조군에 비해 2배이상). HaCaT 세포에 TCDD를 처리하면 소핵의 출현빈도가 10 nM에서 최고 5배이상 증가하였으나(Table 3), 100 nM의 고농도에서는 소핵의 출현빈도가 약간 감소됨을 관찰하였다.

TCDD에 의한 *in vitro* 세포형질전환

in vitro 세포형질전환시험은 2주동안 0~1 μM 의 TCDD를 처리한 후 신선한 배지를 교환해가며 형질전환세포집락의 생성유무를 관찰하였다. 1 μM TCDD를 2주동안 처리한 다음 신선한 배지에서 다시 2주동안 추가 배양하였을 때 Chang liver 세포에서 암세포화 또는 TCDD내성을 획득한 것으로

Table 1. Effect of TCDD on frequencies of micronuclei (MN) in MCF10A cells.

TCDD (nM)	No. of analyzed cells	Type of micronucleated cell			No. of cells with MN [‡]	M cells ^{‡‡}	apoptotic cells ^{‡‡‡}
		small MN	large MN	multi MN			
NC	3010	7	1	0	2.7±0.57	0.7±0.58	0.0±0.00
0	3023	6	0	0	2.0±0.01	0.3±0.58	0.7±0.57
0.1	3100	8	1	0	3.0±0.99	1.7±0.58	6.0±1.01**
1	3025	7	2	0	3.0±2.57	2.0±0.97	3.6±3.19
10	3026	10	0	0	3.3±0.56	2.0±0.01	4.6±0.59**
100	3088	13	5	0	4.2±2.42	2.9±0.96*	6.2±0.53**

[‡]Values represent the average frequency of MN per 1,000 cells.

^{‡‡}Values represent the average of mitotic cells per 1,000 cells.

^{‡‡‡}Values represent the average of apoptotic cells per 1,000 cells.

*Significantly different (p<0.05) from control (NC, no treat)

**Significantly different (p<0.01) from control (NC, no treat)

Table 2. Effect of TCDD on frequencies of micronuclei (MN) in Chang liver cells.

TCDD (nM)	No. of analyzed cells	Type of micronucleated cell			No. of cells with MN [‡]	M cells ^{‡‡}	apoptotic cells ^{‡‡‡}
		small MN	large MN	multi MN			
NC	3041	21	11	0	10.5±1.29	2.9±1.67	7.2±4.94
0	3076	23	4	0	8.8±3.35	2.0±0.98	7.8±2.54
0.1	3088	41	9	0	16.2±1.77	3.6±0.63	6.1±4.53
1	3118	66	20	1	27.9±4.93	2.0±1.76	3.2±0.53
10	3057	55	15	0	22.9±1.51*	1.3±1.53	3.6±2.24
100	3070	57	17	0	24.1±2.76*	2.0±1.75	1.9±0.95

[‡]Values represent the average frequency of MN per 1,000 cells.

^{‡‡}Values represent the average of mitotic cells per 1,000 cells.

^{‡‡‡}Values represent the average of apoptotic cells per 1,000 cells.

*Significantly different (p<0.05) from control (NC, no treat)

Table 3. Effect of TCDD on frequencies of micronuclei (MN) in HaCaT cells.

TCDD (nM)	No. of analyzed cells	Type of micronucleated cell			No. of cells with MN [‡]	M cells ^{‡‡}	apoptotic cells ^{‡‡‡}
		small MN	large MN	multi MN			
NC	3010	7	1	0	2.7±0.59	2.0±0.01	1.0±0.01
0	3067	8	0	0	2.6±0.58	2.3±0.54	1.3±0.56
0.1	3073	19	11	0	9.8±4.68	1.7±1.53	3.9±1.64
1	3127	26	4	1	9.9±1.59	1.6±1.12	3.0±0.04***
10	3060	35	8	0	14.1±0.92**	2.3±0.56	5.2±0.55**
100	3040	27	10	0	12.2±2.13*	2.3±1.48	5.9±0.97*

[‡]Values represent the average frequency of MN per 1,000 cells.

^{‡‡}Values represent the average of mitotic cells per 1,000 cells.

^{‡‡‡}Values represent the average of apoptotic cells per 1,000 cells.

*Significantly different (p<0.05) from control (NC, no treat)

**Significantly different (p<0.01) from control (NC, no treat)

***Significantly different (p<0.001) from control (NC, no treat)

보이는 형질전환세포집락을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B). 그러나 HaCaT 세포에 있어서는 암화개시인자로 MNNG (0.1 µg/ml)를 전처리하고 TCDD를 1주일 동안 처리한 후부터 형질전환세포집락을 관찰할 수 있었고 2주 동안 처리하였을 때는 이러한 형질전환세포집락 수가 무처리군 240개, DMSO 용매대조군 367개, 그리고 0.1, 1, 10, 100 nM

TCDD 처리군에서 각각 1232, 1552, 2048, 2352개로 계수 되어 농도의존적으로 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 3). 암 촉진인자로서 특히 마우스피부암의 발암촉진인자로 널리 알려져 있는 TPA (0.25 µg/ml)를 양성대조군으로 사용한 결과, 처리 4주후부터 세포형태의 이상이 관찰되었다(data not shown). 반면, MCF10A 세포에 있어서는 TCDD에 의한

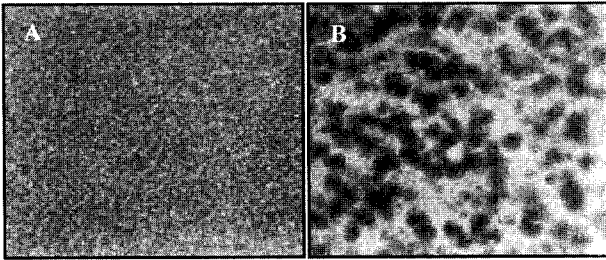


Fig. 2. Putative TCDD-transformed foci of Chang liver cells after TCDD treatment for 2 weeks (B) and Chang liver cells without TCDD treatment (A). The cells were visualized with Giemsa staining.

형질전환세포집락을 관찰할 수 없었다.

고 찰

TCDD는 국제암연구기관에서 제1급의 발암물질로 분류하고 있으나, ICH가 권유하는 유전독성 battery 시험인 미생

물을 이용한 복귀돌연변이시험 (Geiger *et al.*, 1981; Mortelamns *et al.*, 1984), 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 (Galloway *et al.*, 1987), 마우스 림포마 유전자 돌연변이시험 (McGregor *et al.*, 1991) 및 생체내 소핵시험 (Meyne *et al.*, 1985)에서 음성의 결과를 나타내었다. 또한 생체내 염색체이상시험 (Green *et al.*, 1977; Loprieno *et al.*, 1982), 자매염색분체교환시험 (Lamb *et al.*, 1981; Lim *et al.*, 1987), 초파리를 이용한 열성치사시험 (Zimmering *et al.*, 1985) 등의 OECD 가이드라인에서 제시하는 다양한 유전독성 연구에서도 음성의 결과가 보고되었다. 그러나 랫드 간 및 피부를 이용한 발암성 시험결과에서는 중앙축진 효과를 나타내었다 (Yoshida *et al.*, 2000; Poland *et al.*, 1979; Geiger *et al.*, 1981; Greenlee *et al.*, 1987; Gaido *et al.*, 1994). 따라서 TCDD는 비유전독성물질로 분류하는 epigenetic 기전에 의해 독성효과를 가지는 것으로 여겨지고 있다.

최근 세포질 분열억제 소핵시험 (Cytokinesis Blocked Micronucleus, CBMN) 등 생체의 소핵시험은 기존의 소핵

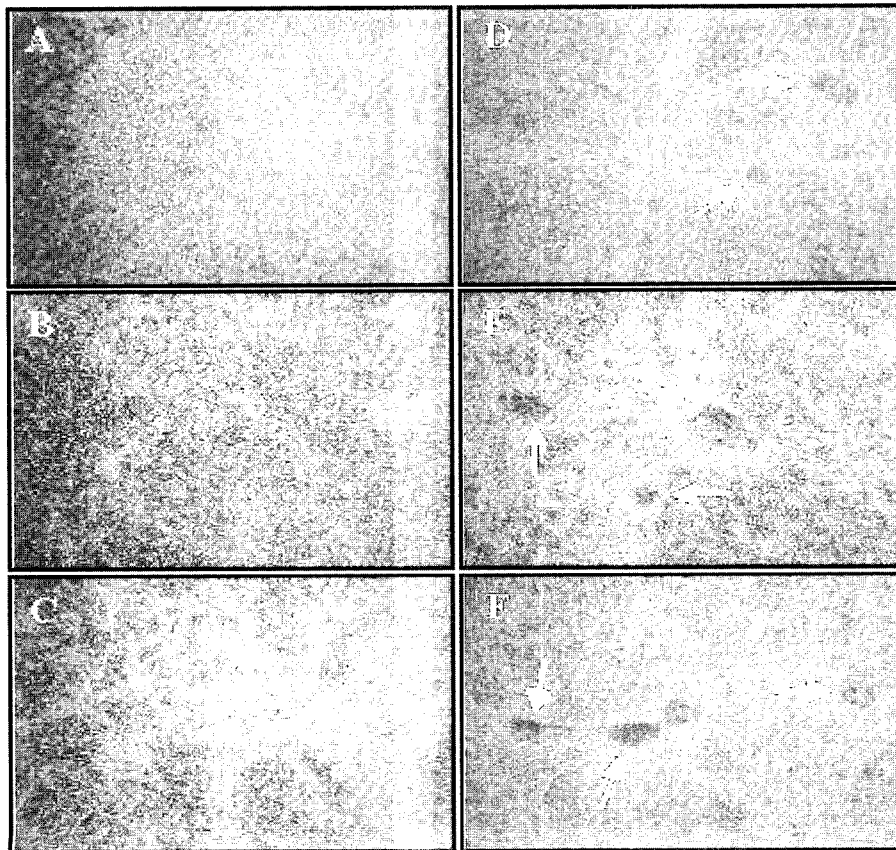


Fig. 3. HaCaT cells (×16). Cultures were incubated for 2 weeks as described in Materials and Methods. A; no treatment, B; vehicle only (0.1% DMSO) C, D, E, F ; 0.1, 1, 10, 100 nM TCDD.

시험이 가지는 세포분열기전 및 핵 분열상태에서의 소핵형성이 고려되지 않은 단점을 보완할 수 있는 유용한 시험법으로 알려지고 있으며 (Kalweit et al., 1999), 소핵의 증가는 발암과정의 중간단계를 반영하는 것으로 생각되어지고 있다 (DiPaolo et al., 1983; Barrett et al., 1985). 또한, 대부분의 epigenetic 기전을 가지는 발암물질들은 공통적으로 조직 특이성, 종 특이성, 성 특이성을 보이고 있어 본 연구에서는 TCDD의 주요 표적 조직으로 알려져 있는 간, 유방 및 피부 유래의 사람 정상세포주를 이용하여 소핵의 발생빈도를 관찰하여 발암성을 예측하고자 하였다. 실험에 사용된 MCF10A는 정상적인 유방상피세포의 특성을 가지고 있으며, HaCaT 및 Chang liver 세포는 각각 성인의 정상 피부 및 간 조직에서 유래한 세포주이다. 이들 세포의 증식에 어떠한 영향도 미치지 않는 TCDD 조건에서 생체의 소핵시험을 실시한 결과, HaCaT과 Chang liver 세포에서는 TCDD에 의해 소핵이 증가되는 것을 관찰하였다. 이러한 결과는 HaCaT과 Chang liver 세포에서 형질변환된 것으로 생각되어지는 세포집락이 관찰된 것과 일치하며, TCDD에 의한 소핵의 증가가 세포형질전환과정에 관여할 수 있음을 시사해 준다. 반면, MCF10A 세포는 TCDD에 의해 소핵형성이 유발되지 않았다. 이는 사람 유래 유방세포들인 MCF-7 (ER positive, 암세포주), MCF10A (ER negative, 정상세포주) 및 MDA-MB-231 (ER negative, 암세포주)에서 TCDD의 생체의 소핵시험을 실시한 결과, MCF-7 세포에서는 소핵형성을 유발하였으나 MCF-10A 및 MBA-MB-231세포에서는 음성의 결과를 나타낸 것과 일치한다 (Kim et al., 2001). 또한 TCDD는 마우스 간세포 유래의 Hepalclc7 (AhR positive) 세포를 이용한 생체의 소핵시험에서 그 자체로는 소핵형성을 유발하지 못했지만 B[a]P 또는 담배연기 농축물에 의한 AhR-의존성 소핵형성을 증진시킨다는 보고 (Bronzetti et al., 1983)를 고려할 때 TCDD의 소핵형성능은 AhR 및 ER의 상호작용으로 설명될 수 있을 것으로 생각되나 추후 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

다양한 물질들의 형질전환시험에는 설치류의 여러 정상조직 세포가 주로 이용되어지며, TCDD에 의한 세포형질전환 시험도 대부분 설치류를 대상으로 한 실험으로 사람세포를 대상으로 한 실험은 빈약한 실정이다. 장기간의 배양을 통해 자연발생적으로 형질전환이 일어날 수 있으나 사람세포의 경우는 이러한 관점에서 볼 때 내성이 있는 것으로 알려져 있다 (DiPaolo et al., 1983; Barrett et al., 1985). 사람과 설치류의 이러한 차이는 in vitro 실험에서 형질전환물질에 대한 그들의 감수성의 차이 즉 자연상태에서의 수명, 근친교배 빈도, 유전적 안전성 등과 같은 종과 관련된 인자들 때문인 것으로 여겨진다 (Sager et al., 1983). 현재까지 사람 각질

세포인 RHEK-1 세포 (Yang et al., 1992) 및 일차 배양된 SHE (Syrian hamster embryo) 세포 (Kerckaert et al., 1997)에서 TCDD에 의한 세포형질전환이 관찰되었다. 본 연구에서는 TCDD를 2주간 처리한 후 신선한 배지를 교환해 가며 형질전환세포집락의 생성유무를 관찰한 결과, Chang liver 세포주의 경우 2주동안 1 μ M의 TCDD를 처리하면 무처리대조군에 비해 약 2배에 이르는 세포증식촉진 효과를 관찰할 수 있었으며, 1 μ M TCDD를 2주간 처리한 다음 신선한 배지에서 다시 2주간 추가 배양하였을 때 Chang liver 세포에서 암세포화 또는 TCDD 내성을 획득한 것으로 보이는 세포집락을 관찰할 수 있었다. 이 중 몇 개의 세포 집락을 선택하여 순수배양한 다음 유전적으로 순화된 세포를 얻었다. 이들은 세포 형태에는 별다른 차이를 보이지 않았지만, 빠른 성장을 보이는 세포와 느린 성장을 보이는 세포로 나뉘어졌다. 정상 세포에 대한 TCDD의 연구를 살펴보면 TCDD가 산화적 신호전달경로를 통해 정상 간세포의 형질전환과정을 촉진하고 NF-kappaB와 AP-1과 같은 전사인자를 활성화시키며 이들의 활성화는 CYP1A1-dependent, AhR complex-dependent oxidative signal을 통해 암화과정에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Puga et al., 1992 and 2000). 따라서 본 실험에서 관찰된 형질전환세포집락의 경우에도 TCDD가 fos, jun, NF-kB와 AP-1과 같은 전사인자들을 포함한 유전자들의 활성을 변화시킴으로써 생성된 것으로 추측되어, 현재 본 연구에서 얻어진 형질전환세포에서 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현변화를 조사하고 있다.

HaCaT 세포는 암화개시인자로 MNNG (0.1 μ g/ml)를 전처리하고 TCDD를 1주일 처리한 후부터 형질전환세포집락을 관찰할 수 있었고, 농도의존적임을 알 수 있었다. 반면, 암 촉진인자로서 널리 알려진 물질로서 특히 마우스피부암의 발암촉진인자로 널리 알려져 있는 TPA (0.25 μ g/ml)는 처리 4주후부터 세포형태의 이상이 관찰되어 본 실험조건하에서는 TCDD가 TPA보다 강한 발암촉진인자로 작용하였다. 현재까지 TCDD는 HaCaT 세포의 분화단계에서 AhR과 ARNT 전사수준을 증가시키고 cytochrome P4501A1 (CYP1A1) mRNA 증가를 유도하였으며, 이들 AhR mRNA와 CYP1A1 mRNA의 수준은 retinoic acid에 의해서도 조절되는데, 10nM TCDD에서는 AhR의 전사수준이 바뀌지 않지만 여기에 retinoic acid 1 μ M을 첨가하게 되면 성장중인 keratinocyte에서와 같이 8배 정도 증가한 AhR mRNA를 관찰할 수 있었다고 한다 (Wanner et al., 1995). 따라서 AhR의 발현은 keratinocyte의 분화상태에 의존적이며 이는 retinoic acid의 영향을 받는 것으로 보인다. AhR의 전사수준은 ARNT와 관계가 있으며 이 또한 분화중인 HaCaT 세포에서 증가하게 된다고 한다 (Wanner et al., 1996). 따라서

본 연구에 있어서 타 세포들보다 HaCaT 세포에서 형질전환 세포집락 생성이 먼저 관찰되어지는 것은 분화중인 HaCaT 세포내 retinoic acid양의 증가로 TCDD 기전에 중요한 역할을 하는 AhR와 ARNT의 전사수준 증가에 기인하는 것으로 추측된다. 그러나 보다 명확히 설명하기 위하여 HaCaT 세포에서 얻어진 형질전환세포에서도 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현변화를 조사하고 있으며, 현재 세포증식과 관련된 유전자들의 변화가 관찰되고 있어 이들 유전자들을 분석하면 TCDD의 발암성을 좀 더 구체적으로 설명할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Anreola, F. (1997) : Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.* **57**, 2835-2838.
- Barrett, J., and Tennant, R. (1985) : Mammalian cell transformation: mechanisms of carcinogenesis and assays for carcinogens. *Carcinog. Compr. Surv.* **9**, 90-117.
- Bronzetti, G., Bauer, C., Corsi, C., Del Carratore, R., Nieri, R. and Paolini, M. (1983) : Mutagenicity study of TCDD and ashes from urban incinerator "in vitro" and "in vivo" using yeast D7 strain. *Chemosphere* **12**, 549-553
- DiPaolo, J. A. (1983) : Relative difficulties in transforming human and animal cells in vitro. *J. Natl Cancer. Inst.* **70**, 3-8.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W., Zeiger, E. and Bonassi, S. (1999) : The humans micronucleus project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* **428**, 271-283.
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D., Rudikoff, S., Ward, J. and Gonzalez, F. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**, 722-726.
- Galloway, S., Armstrong, M., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A., Nakanura, F., Ahmed, M. and Duk, S. (1987) : Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.* **10**, 1-175.
- Gaido, K. and Maness, S. (1994) : Regulation of gene expression and acceleration of differentiation in human keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **127**, 199-208.
- Geiger, E., and Neal, A. (1981) : Mutagenicity testing of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in histidine auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **59**, 125-129.
- Gonzalez, J., Kimura, S. and Nebert, W. (1985) : Comparison of the flanking regions and introns of the mouse 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P1-450 and P3-450 genes. *J. Biol. Chem.* **260**, 5040-5049.
- Green, S., Moreland, F. and Sheu, C. (1977) Cytogenetic evaluation of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on rat bone marrow cells. *FDA By-lines*, **6**, 292-294.
- Greenlee, F., Osborne, R., Dold, K., Hudson, G., Young, J., and Toscano, A. (1987) : Altered regulation of epidermal cell proliferation and differentiation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Rev. Biochem. Toxicol.* **8**, 1-35.
- Kalweit, S., Utesch, D., Hude, W. and Madle, S. (1999) : Chemically induced micronucleus formation in V79 cells - comparison of three different test approaches. *Mutat. Res.* **439**, 183-190.
- Kerckaert, G., Brauninger, R., LeBoeuf, R. and Isfort, R. (1997) : Use of the syrian hamster embryo cell transformation assay for carcinogenicity prediction of chemicals Currently being tested by the national toxicology program in rodent bioassays. *Environ. Health Perspect.* **104**, 1075-1084.
- Kim, J., Han, E., Jun, H., Eom, M., Park, M., Jung, H., Sim, W. and Oh, H. (2001) : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced micronuclei formation and inhibition effect of tamoxifen against TCDD-induced micronuclei formation in human breast estrogen receptor positive MCF-7 cells. *J. Kor. Assoc. Cancer Prevention.* **6**, 10-18.
- Kimura, S., Gonzalez, J. and Nebert, W. (1986) : Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P(1)450 and P(3)450 genes: Differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1471-1477.
- Kohn, C., Sewall, H., Lucier, W. and Portier, J. (1996) A mechanistic model of effects of dioxin on thyroid hormones in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **136**: 29-48.
- Loprieno, N., Sbrana, I., Tusciano, D., Lascialfari, D. and Lari, T. (1982) : In vivo cytogenetic studies on mice and rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Oxford, New York, Pergamon Press*, 419-428.
- Lamb, J., Marks, T., Gladen, B., Allen, J. and Moore, J. (1981) : Male fertility, sister chromatid exchange, and germ cell toxicity following exposure to mixtures of chlorinated phenoxy acids containing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Toxicol. Environ. Health* **8**, 825-834.
- Lim, M., Jacobson-Dran, D., Bowman, R. and Williams R. (1987) : Effect of chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on sister chromatid exchange levels in peripheral lymphocytes of the rhesus monkey. *Cell Biol. Toxicol.* **3**, 279-284.
- Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M. and Sofuni, T. (1999) : A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the *in vitro* micronucleus test. *Mutagenesis* **14**, 385-389.
- Meyne, J., Allison, D., Bose, K., Jordan, S., Ridolpho, P. and Smith, J. (1991) : Hepatotoxic doses of dioxin do not damage mouse bone marrow chromosomes. *Mutat. Res.* **157**, 63-69.
- McGregor, D., Brown, A., Howgate, S., McBride, D., Riach, C. and Caspary, W. (1991) : Responses of the L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay. *Environ. Mol. Mutagen.* **17**, 196-219.
- Mcgregor, D., Partensky, C., Wilbourn, J. and Rice, J. (1998) : An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, **106** (Suppl. 2): 755-

760.

- Mortelmans, K., Haworth, S., Speck, W. and Zeiger, E. (1984) : Mutagenicity testing of agent orange components and related chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **75**, 137-146.
- Mosmann, T. (1983) : Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63.
- Nebert, D. W. (1989) : The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Crit. Rev. Toxicol.* **20**, 153-174.
- Poland, A. and Glover, E. (1979) : An estimate of the maximum in vivo covalent binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to rat liver protein, ribosomal RNA, and DNA. *Cancer Res.* **39**, 3341-3344.
- Puga, A., Barnes, S., Chang, C., Zhu, H., Nephew, K., Khan, S. and Shertzer, H. (2000) : Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor-kappaB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 997-1005.
- Puga, A., Nebert, D. and Carrier, F. (1992) : Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell. Biol.* **11**, 269-281.
- Rowlands, J. and Gustafsson, J. (1997) : Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit. Rev. Toxicol.* **27**, 109-134.
- Sager, R., Tanaka, C., Lau, C., Ebina, Y. and Anisowicz, A. (1983) : Resistance of human cells to tumorigenesis induced by cloned transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7601-7605.
- Spink, D., Lincoln, D., Dickerman, H. and Gierthy, J. (1990) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 β -estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 6917-6921.
- Wanner, R., Panteleyev, A., Henz, B. and Rosenbach, T. (1996) : Retinoic acid affects the expression rate of the differentiation-related genes aryl hydrocarbon receptor, ARNT and keratin 4 in proliferative keratinocytes only. *Biochim. Biophys. Acta.* **1317**, 105-111.
- Wanner, R., Brommer, S., Czarnetzki, B. and Rosenbach, T. (1995) : The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript is suppressed by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **209**, 706-711.
- Whitlock, J. (1990) : Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 251-277.
- Whitlock, J. (1993) Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 754-763.
- Yang, J., Vogel, C. and Abel, J. (1999) : A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibits altered expressions of growth regulatory factors. *Carcinogenesis* **20**, 13-18.
- Yang, J., Thraves, P., Dritschilo, A. and Rhim, J. (1992) : Neoplastic transformation of immortalized human keratinocytes by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Research* **52**, 3478-3482.
- Yoshida, R. and Ogawa Y. (2000) : Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; An application of oxidative stress markers to cancer risk assessment of dioxins. *Industrial Health* **38**, 5-14.
- Zimmering, S., Mason, J., Valencia, R. and Woodruff, R. (1985) : Chemical mutagenesis testing in Drosophila. II. Results of 20 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mutagen* **7**, 87-100.