Environmental Mutagens & Carcinogens 24-4 : 155-162 (2004)

PAH가 송어 RTH-149세포에서 CYP1A1유전자 발현에 미치는 영향

김지선 · 신윤용*
이화여자대학교 약학대학

Effects of PAH on CYP1A1 Gene Expression in Trout RTH-149 Cells

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

(Received November 10, 2004 / Accepted December 15, 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 : **PTH-149, CYP1A1, TCDD, PHF, EROD**

서 론

다환성 탄화수소 수용체 기질의 특징을 살펴보면, 소수성이고 평면상이거나 여러 개의 고리가 평면상에 있는 유사한 구조를 갖는다. 그 예로는 TCDD, 3-MC, PAHs, α-naphthoflavon 등이 있다. 이러한 물질에 노출되는 것은 동물에서 다양한 생화학적, 면역학적, 생식학적, 피부과적인 영향들과 종양 등을 나타낸다 (Hankinson, 1995; Schmidt and Bradfield, 1996; Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Mimura *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 2000). 그러나 평면상이 아니거나 여러 개의 고리가 평면상에 있지 않은 구조를 갖는 omeprazol, thiabendazole, carotenoid canthaxanthin 도 *CYP1A1* 유전자를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 물질들은 매우 약한 다환성 탄화수소 수용체 기질이다 (Delescluse *et al.*, 2000). PAHs는 음식, 물, 토양 등에서 쉽게 검출되고, 화석연료와 나무 등의 불완전한 연소시에 발생하며, 콜타르, 그을음, 자동차 배기가스, 담배 등에서 나오는 환경오염물질이다 (Menzie *et al.*, 1992; International Agency for Reaearch on Cancer, 1983). PAHs는 2개 이상의 벤젠 고리가 융합되어 있는 구조이다 (Bosveld *et al.*, 2002). PAHs는 사람에서 암을 유발한다고 알려져 있는데, Benzo(a)pyrene의 경우 cytochrome P450와 epoxide hydrolase에 의하여 대사되어 화학적으로 반응성이 큰 diol epoxide 형태인 (+)-(7R,8S)-dihydroxy-(9S,10R)-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene을 형성하게 되고 이것이 암을 유발하게 된다 (Buening *et al.*, 1978; Chou *et al.*, 1986). 여러 가지 PAHs 대사체의 돌연변이성 (mutagenic)과 발암원성 (carcinogenic) 잠재력은 설치류 생체 내(in vivo) 실험과 생체 외 (in vitro) 단기간 실험에서 밝혀졌다(Hecht *et al.*, 1994).

핵 내 수용체 초과 (Nuclear Receptors superfamily : NRs superfamily)는 핵 내 수용체 표적 유전자의 전사를 유도함으로서 세포 안 · 밖의 신호를 세포의 반응으로 바꾸는 전사 조절 인자를 가리킨다. 핵 내 수용체의 반응 부위는 AGGTCA hexamer의 half site 두개로 구성되어 있다. 핵 내 수용체들은 전통적인 steroid-hormone 수용체와 thyroid-hormone 수용체들의 DNA 결합 부위 (DNA-binding domain : DBD)와 기질 결합 부위 (ligand-binding domain : LBD)

*To whom correspondence should be addressed

에 있어서 유사성을 갖는다 (Mangelsdorf *et al.*, 1995). 핵 내 수용체 초과에는 retinoid 수용체, prostaglandin 수용체, fatty acid 수용체와 아직 생리학적인 활성체나 기질이 알려지지 않은 orphan 수용체와 같은 non-steroid hormone 수용체 또한 포함된다 (Kastner *et al.*, 1995; Enmark and Gustafsson, 1996). 현재까지 약 70개의 핵 내 수용체가 알려져 있다 (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). 핵 내 수용체 초과는 3개의 아강 (subclass)으로 나뉘어 진다. Class I은 progesterone, androgen, estrogen, glucocorticoid와 같은 steroid hormone의 수용체이다. 기질이 없을 때에 수용체들은 hsp와 같은 chaperone 단백질과 결합되어 있다. 기질인 hormone과 결합한 class I 수용체들은 구조적, 기능적 변화를 일으켜 hsp이 유리되고, 동종중합체 (homodimer)를 형성하여 인산화 과정을 거친 뒤 핵 내로 이동한다. 그 후 표적 유전자의 promoter에 존재하는 hormone 반응 부위에 결합하여 기초적인 전사 유도에 필요한 coactivator들을 끌어 들인다 (Lee *et al.*, 2001). Class II는 thyroid hormone, vitamin D3, retinoid 수용체이다. 이 수용체는 기질이 없을 경우, 핵 내의 RXR (retinoid X receptor)과 이종중합체를 이루어 표적 유전자의 promoter에 존재하는 반응 부위에 결합하여 있다가 기질이 들어와서 수용체와 결합하면, 구조적 변화를 일으켜 corepressor를 유리하고 coactivator를 끌어들인다. Class III는 orphan 수용체로 아직 기질이나 생리학적인 활성체가 알려지지 않았다 (Tsai and O'Malley, 1994; Pascussi *et al.*, 2003). 핵 내 수용체 초과의 활성은 다양한 coactivator 및 corepressor와 같은 전사조절인자와의 결합에 의존적이다 (Misiti *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 1999). 기질이 결합하지 않은 RAR (retinoic acid receptor)은 N-CoR (nuclear receptor corepressor) 혹은 SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) 같은 corepressor들과 결합할 수 있다 (Park *et al.*, 1999). 그리고 RAR·corepressor 결합체는 히스톤 탈 아세틸화효소 (histone deacetylase : HDAC)와 단백질 중합체를 형성하여, 전사조절인자의 접근과 기능을 조절하여, 표적 유전자의 발현을 저해한다 (Jepsen and Rosenfeld, 2002).

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 rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) hepatoma 세포인 RTH-149 세포에서 PAHs의 Cyp1a1 유도 능력을 살펴보기 위하여 생물학적 정량 (bioassay) 방법을 이용하였고, 다환성 탄화수소 수용체의 활성을 통한 유전자 활성을 측정하여 정량하였다. RTH-149 세포에 *pmCyp1a1-Luc*을 transfection하고, PAHs를 처치하여, 이들에 의한 *Cyp1a1* 유전자 발현 정도를 측정하였다. 또한 각각의 세포에서 TCDD와 PAHs에 의해 유도된 Cyp1a1 효소활성 측정을 위해 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) 활성을 측정하였고, Cyp1a1 mRNA level의 변화를 살펴보았다.

실험 재료 및 방법

세포 배양

RTH-149 rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) hepatoma cell은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다. RTH-149 세포는 10% FBS-MEM 배지를 사용하여 6일에 1회 1 : 3의 비율로 계대 배양하였다. RTH-149 세포는 21 incubator 내에서 배양하였다. RTH-149 세포는 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

약물 처치

DMSO에 용해한 약물을 각각의 배양조건과 같은 medium으로 희석하여 세포에 처치하고 RTH-149 세포는 21 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.

Competent cell 준비

E. coli TG1나 E. coli DH5a 세포를 minimal plate에 도포

한 뒤, 37°C 배양기에서 16시간 동안 배양하여 얻은 단일 세포 집락을 20 mL LB 배지에 접종하여 660 nm에서의 흡광도가 약 0.3~0.5가 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양액을 얼음에 15분간 방치한 다음 4°C에서 원심 분리하여 얻은 세포 침전물의 1/3 용량에 해당하는 RF1 용액 (0.1 M RbCl, 50 mM $MgCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 mM KAc pH 7.5, 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 (w/v)% glycerol, pH 5.8)에 세포 침전물을 현탁한 뒤 얼음에 2시간 방치하였다. 이 액을 다시 4°C에서 원심 분리하여 얻은 세포 침전물을 RF2 용액 (10 mM MOPS pH 6.8, 10 mM RbCl, 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 (w/v)% glyerol, pH 6.8)로 현탁한 뒤 얼음에 15분간 방치하였다. 이 액을 분주하여 액체 질소로 급냉 시킨 뒤 -70°C에 보관하고 사용할 때마다 얼음 위에 녹여 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

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 plasmid의 3배양의 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/ 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 RTH-149 세포는 상온에서 10분간 안정화시켰다. β-NADPH 18.8 μL를 가해 반응을 개시한 후 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.

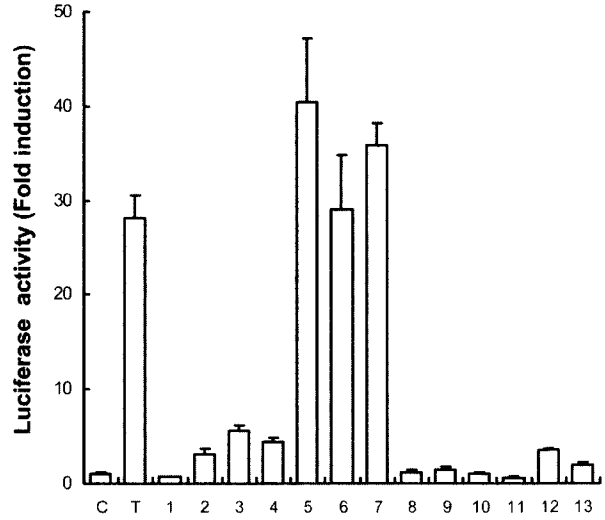

Fig. 1. The effect of PAHs on the *pmCyp1a1* transcription in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or 1 μM PAHs for 72 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. The data represent mean ± S.E.M. (n=4) (C:Control, T:TCDD, 1:Acenaphthene, 2:Anthracene, 3:Benz(a)anthracene, 4:Benzo(b)fluoroanthene, 5:Benzo(k)fluoroanthene, 6:Chrysene, 7:Dibenzo(a,h)-anthracene, 8:Fluorene, 9:Fluoranthene, 10:Naphthalene, 11:Pyrene, 12:Phenanthrene, 13:Carbazole).

결 과

PAHs가 luciferase 활성에 미치는 영향

RTH-149 세포에 *pmCyp1a1-Luc*을 transfection 한 후, 1 μM 농도로 PAHs를 72시간 처치한 후 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 anthracene은 3배, benz(a)anthracene은 5.6배, benzo(b)fluoroanthene은 4.3배, benzo(k)fluoroanthene은 40.3배, chrysene은 29.1배, dibenzo(a,h)anthracene은 35.8배, phenanthrene은 3.4배의 증가를 보였고 acenaphthene, fluorene, fluoranthene, naphthalene, pyrene, carbazole은 약한 반응을 보였다 (Fig. 1). 높은 활성을 보인 benz(a)anthracene, benzo(k)fluoroanthene, chrysene, dibenzo(a,h)anthracene을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μM 농도로 72시간 처치하였을 때, benz(a)anthracene은 3.3, 3.5, 3.8, 8.1, 8.5배, benzo(k)fluoroanthene은 26.5, 29.7, 34.6,

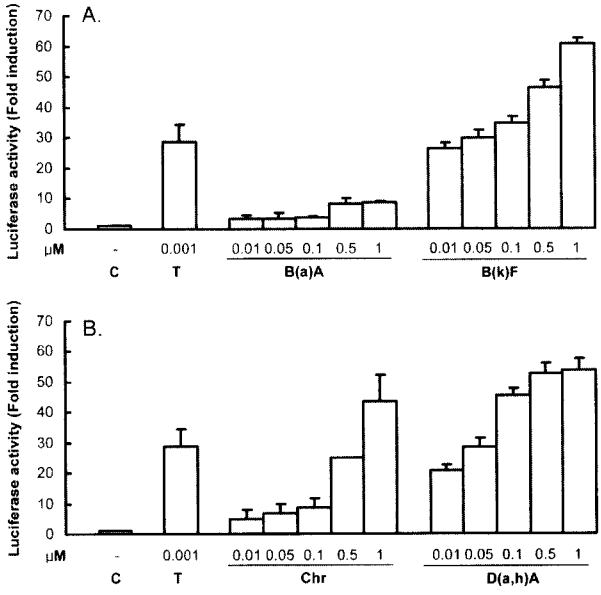

Fig. 2. The dose effect of PAHs on the *pmCyp1a1* transcription in RTH-149 cells. Cells were transfected with *pmCyp1a1-Luc* plasmid. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μM PAHs for 72 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control, T:TCDD, B(a)A:Benz(a)anthracene, B(k)F: Benzo(k)fluoroanthene, Chr:Chrysene, D(a,h)A:Dibenzo (a,h) anthracene).

46.2, 60.6배 (Fig. 2A), chrysene은 5.0, 6.8, 8.7, 24.9, 43.6배, dibenzo(a,h)anthracene은 20.8, 28.2, 45.6, 52.6, 53.8배로 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 2B).

PAHs가 EROD 활성에 미치는 영향

RTH-149 세포에 0.1, 1 μM 농도로 PAHs를 48시간 처치한 후 EROD 활성 변화를 측정하였다. 그 결과 0.1 μM PAHs 처치 시 benz(a)anthracene은 6.9 pmol/mg/min, benzo (b)fluoroanthene은 5.1 pmol/mg/min, benzo(k)fluoroanthene 은 8.0 pmol/mg/min, chrysene은 9.8 pmol/mg/min, dibenzo (a,h)anthracene은 11.6 pmol/mg/min의 EROD 활성을 보였고, acenaphthene, anthracene, fluorene, fluoranthene, naphthalene, pyrene, phenanthrene, carbazole은 낮은 EROD 활성을 나타내었다. 1 μM PAHs 처치 시 benz(a) anthracene은 7.9 pmol/mg/min, benzo(b)fluoroanthene은 8.3 pmol/mg/min, chrysene은 10.9 pmol/mg/min, dibenzo (a,h)anthracene은 6.1 pmol/mg/min, fluorene 6.8 pmol/mg/min, naphthalene 5.9 pmol/mg/min의 EROD 활성을 보였고, acenaphthene, anthracene, benzo(k)fluoroanthene, fluoranthene, pyrene, phenanthrene, carbazole은 낮은 EROD

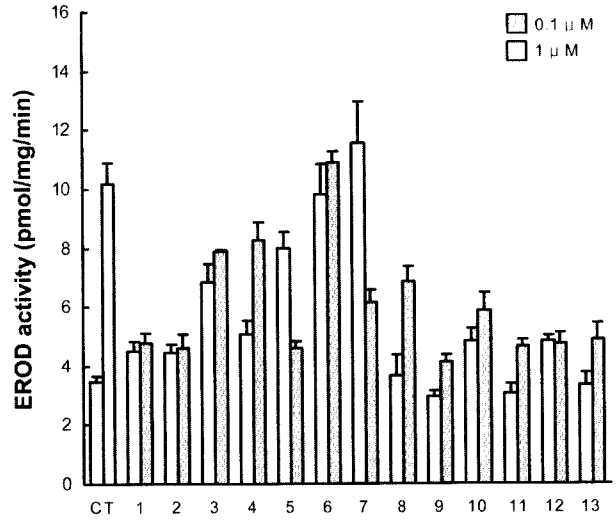

Fig. 3. The effect of PAHs on the EROD activity in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or 0.1, 1 μM PAHs for 48 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control, T:TCDD, 1:Acenaphthene, 2:Anthracene, 3:Benz(a)anthracene, 4:Benzo(b) fluoroanthene, 5:Benzo(k)fluoroanthene, 6:Chrysene, 7:Dibenzo (a,h)anthracene, 8:Fluorene, 9:Fluoranthene, 10:Naphthalene, 11:Pyrene, 12:Phenanthrene, 13:Carbazole).

활성을 나타내었다 (Fig. 3). 높은 활성을 보인 benz(a) anthracene, chrysene을 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μM 농도로 48시간 처치하였을 때, benz(a)anthracene은 3.0, 4.5, 5.1, 6.3, 5.8 pmol/mg/min, chrysene은 4.2, 5.4, 7.3, 8.0, 8.1 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었다. 역시 높은 활성을 보인 benzo(k)fluoroanthene, dibenzo(a,h)anthracene을 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μM 농도로 48시간 처치하였을 때 benzo(k)fluoroanthene은 3.5, 5.4, 9.6, 8.0, 6.8, 3.9, 3.4 pmol/mg/min, dibenzo(a,h)anthracene은 0.2, 2.2, 6.2, 7.8, 8.6, 5.8, 4.6 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었다. benz(a)anthracene은 0.5 μM, benzo(k)fluoroanthene은 0.01 μM, chrysene은 1 μM, dibenzo(a,h) anthracene은 0.1 μM에서 최대 활성을 나타내었다 (Fig. 4A, B).

PAHs가 mRNA 발현에 미치는 영향

RTH-149 세포에 luciferase와 EROD 활성이 높게 나타난 benz(a)anthracene, benzo(k)fluoroanthene, chrysene, dibenzo (a,h)anthracene을 0.01, 0.1, 1 μM 농도로 48시간 처치한 후, trout Cyp1a1 mRNA 발현을 역전사연쇄중폭반응으로 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 benz(a)anthracene은 7.3, 10.7, 5.6배, benzo(k)fluoroanthene은 18.3, 20.9, 32.0배, chrysene은 6.8, 8.5, 10.3배, dibenzo(a,h)anthracene은

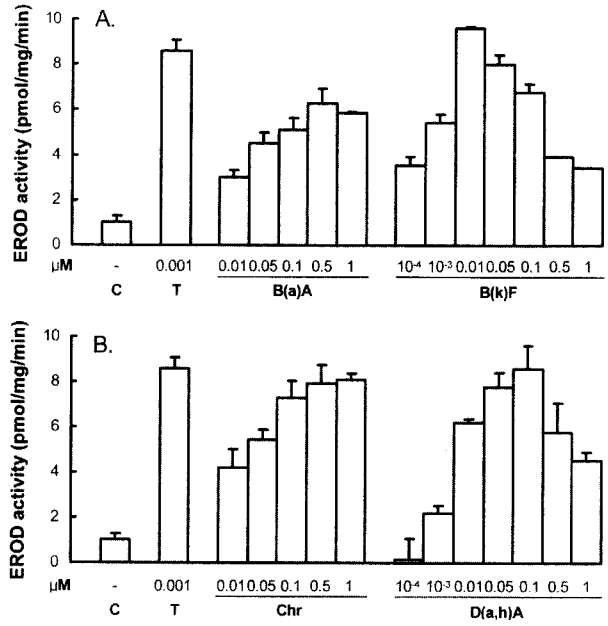

Fig. 4. The dose effect of PAHs on the EROD activity in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or 0.0001, 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 μM PAHs for 48 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.E.M. (n = 4) (C:Control, T:TCDD, B(a)A:Benz(a)anthracene, B(k)F: Benzo(k)fluoroanthene, Chr:Chrysene, D(a,h)A:Dibenzo(a,h) anthracene).

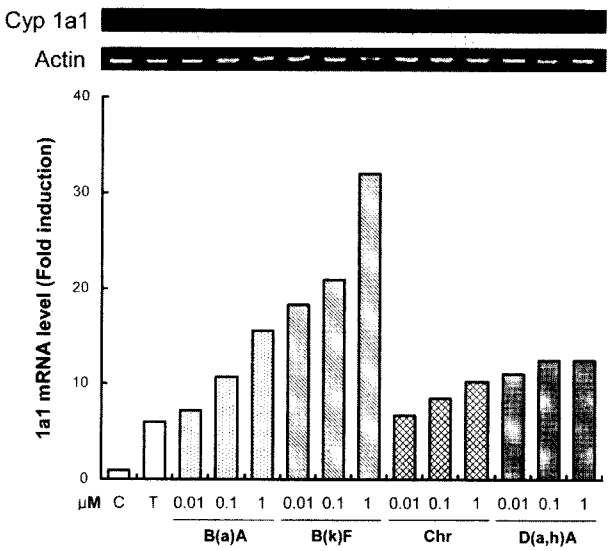

Fig. 5. The dose effect of PAHs on the trout Cyp1a1 mRNA expression in RTH-149 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or 0.01, 0.1, 1 μM PAHs for 48 hrs. Cyp1a1 mRNA was determined by RT-PCR. (C:Control, T:TCDD, B(a)A:Benz(a)anthracene, B(k)F: Benzo(k)fluoroanthene, Chr:Chrysene, D(a,h)A:Dibenzo (a,h) anthracene).

11.4, 12.5, 12.5배로 mRNA 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다 (Fig. 5).

고 찰

Topminnow (*Poeciliopsis lucida*)의 hepatocellular carcinoma 세포인 PLHC-1 세포에서 1~6개의 benzene ring을 갖고 있는 PAHs를 처치하여 EROD 활성을 측정한 결과 benzene, naphthalene, anthracene, acenaphthene, benzo (g,h,i) perylene, fluorene은 Cyp1a 유도작용이 없었고, fluoranthene, phenanthrene은 아주 약한 유도 작용이 있었다. 3개 이상의 benzene ring을 가진 dibenz(a,h)anthracene, dibenz(a,i) anthracene, benzo(k)fluoroanthene, 3-methylcholanthrene, chrysene, benzo(a)pyrene, benzo(e)pyrene, dimetylbenz(a)anthracene, benz(a)anthracene, pyrene은 농도 의존적으로 Cyp1a를 유도하였고, 고농도에서는 다시 감소하여 bell shape의 EROD 활성을 나타낸다고 보고되었다 (Fent and Bätscher, 2000). HepG2 세포에 PAHs를 처치한 EROD 결과를 보면, dibenzo(a,h)anthracene과 benzo(k)fluoroanthene이 강한 효과를 나타냈고, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene, benz(a) anthracene은 효과가 약하였다고 보고되었다 (Vakharia *et al.*, 2001). Rat hepatocyte에 PAHs를 처치한 후 EROD 활성을 통하여 CYP1A 유도 능력을 검색하였을 때, benzo(k)fluoroanthene, dibenzo(a,h)anthracene, indeno (1,2,3,c,d,) pyrene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene, chrysene, benzo (a)anthracene은 강한 반응을 보였고, benzo(g,h,i)perylene, fluoranthene, acenaphthene은 약한 반응을 보였으며 anthracene, pyrene, phenanthrene, fluorene, acenaphthylene, naphthalene은 효과가 없는 것으로 나타났다 (Till *et al.*, 1999). H4IIE 세포에서 PAHs를 처치한 후 EROD 활성을 통하여 검색하였을 때, benzo(k)fluoroanthene, chrysene, benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene은 강한 반응을 보였고, indeno(1,2,3,c,d,)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, naphthalene, fluoranthene은 약한 반응을 보였고, phenanthrene과 anthracene은 반응이 거의 나타나지 않았다고 보고되었다 (Bosveld *et al.*, 2002). 본 논문에서는 RTH-149 세포와 Hepa-I 세포에 13종의 PAHs를 처치한 후 *Cyp1a1* 유전자 발현과 EROD 활성을 통해 검색하였고, 두 세포 모두에서 benz(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoroanthene, chrysene, dibenzo(a,h)anthracene은 강한 반응을 보였으나, acenaphthene, anthracene, fluorene, fluoranthene, naphthalene, pyrene, phenanthrene, carbazole은 약한 반응을 보이거나 거의 반응을 나타내지 않았다. 본 논문의 결과와 이전의 연구 결과를 비교하여 보면 결과가 잘 상응함을 알 수 있다.

이는 RTH-149 세포와 Hepa-I 세포가 PAHs 검색을 위한 생물학적 정량에 적합한 세포주 임을 나타낸다. RTH-149 세포와 Hepa-I 세포에 강한 반응을 보인 benz(a)anthracene, benzo(k)fluoroanthene, chrysene, dibenzo(a,h)anthracene은 *Cyp1a1* 유전자 발현 및 mRNA 발현을 농도 의존적으로 증가 시켰으나, EROD 활성은 농도 의존적으로 증가하다가 고농도에서는 다시 감소하는 bell shape을 나타내었다. RTH-149 세포와 Hepa-I 세포의 PAHs에 대한 EROD 활성을 비교 해보면, Hepa-I 세포보다 RTH-149 세포가 더 낮은 농도에서 최대 활성을 나타낸다. 그 결과 Hepa-I 세포보다 RTH-149 세포에 고농도의 PAHs를 처치하였을 때 *Cyp1a1* 유전자 발현 측정보다 EROD 활성 측정이 훨씬 둔감하다. Till *et al.* (1999)의 *CYP1A1* promoter 활성이 EROD의 활성보다 민감하다는 보고는 이를 뒷받침해 준다. 그리고 *Cyp1a1* 유전자 발현은 농도 의존적으로 증가를 보였으나, EROD 활성은 bell shape을 나타내는 것으로 보아, 유전자 발현 이후 단계에서 Cyp1a1 효소 활성이 비정상적으로 높아지는 것을 막는 조절 단계 (autoregulation)가 존재하는 것으로 생각된다. RTH-149 세포가 Hepa-I 세포보다 더 낮은 농도에서 EROD 최대 활성을 나타내는 것은 어류 세포의 다환성 탄화수소 수용체 혹은 ARNT의 양이 적어서 낮은 농도에서 포화가 일어나기 때문이라고 생각된다.

본 논문에서는 어류에서의 Cyp1a1 작용을 조사하기 위하여, rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) hepatoma 세포인 RTH-149 세포를 이용하여 실험하였다. RTH-149 세포에서 PAHs를 처치한 후*Cyp1a1* 유전자 발현 정도, Cyp1a1 효소 활성, Cyp1a1 mRNA level 변화를 관찰함으로서 PAHs 검색을 위한 생물학적 정량에 적합한 세포주 임을 확인 하였다.

감사의 글

"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.

Bosveld, A.T., de Bie, P.A., van den Brink, N.W., Jongepier, H., and Klomp, A.V. (2002) In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* **49(1)**, 75-83.

Buening, M.K., Wislocki, P.G., Levin, W., Yagi, H., Thakker, D. R., Akagi, H., Koreeda, M., Jerina, D.M., Conney, A.H. (1978) Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice : exceptional activity of (+)-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha, 10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo [a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75(11)**, 5358-5361.

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.

Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa G. and Rahmani, R. (2000) Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* **153**, 73-82.

Enmark, E. and Gustafsson, J.Å. (1996) Orphan nuclear receptors-the first eight years. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1293-1307.

Fent, K. and Bätscher, R. (2000) Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line : demonstration of additive interactions. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 2047-2058.

Fernandez-Salguero, P.M., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* **268**, 722-726.

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.

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.

Hankinson, O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 307-340.

Hecht, S.S., Isaacs, S., and Trushin, N. (1994) Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone benzo[a]pyrene : a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis* **15(12)**, 2721-2725.

Jepsen, K. and Rosenfeld, M.G. (2002) Biological roles and mechanistic actions of corepressor complexes. *J. Cell Sci.* **115**, 689-698.

Jurima-Romet, M., Neigh, S. and Casley, W.L. (1997) Induction of cytochrome P4503A by retinoids in rat hepatocyte culture. *Hum. Exp. Toxicol.* **16**, 198-203.

Kastner, P., Mark, M. and Chambon, P. (1995) Nonsteroid nuclear receptors : what are genetic studies telling us about

their role in real life? *Cell* **83**, 859-869.

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.

Lee, J.W., Lee, Y.C., Na, S.Y., Jung, D.J. and Lee, S.K. (2001) Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily : coactivators and corepressors. *Cell Mol. Life Sci.* **58(2)**, 289-297.

Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850.

Menzie, C.A., Potocki, B.B. and Santodonato, J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1278-1284.

Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T. N., Nakao, K., Ema, M. Sogawa, K., Yasuda, M. and Katsuki, M. (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* **2**, 645-654.

Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P.M. and Chin, W.W. (1998) Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* **139**, 2493-2500.

Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y. and Dalton, T.P. (2000) Role of the Aromatic Hydrocarbon Receptor and [Ah] Gene Battery in the Oxidative Stress Response, Cell Cycle Control, and Apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 65-85.

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

Nguyen, T.A., Hoivik, D., Lee, J.E. and Safe, S. (1999) Interactions of nuclear receptor coactivator/corepressor proteins with the aryl hydrocarbon receptor complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 250-257.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163 (1999).

Park, E.J., Shroen, D.J., Yang, M., Li, H. and Chen, J.D.(1999) SMRTs, a silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptorsextended isoform that is more related to the nuclear receptor corepressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 3519-3524.

Pascussi, J.M., Gerbal-Chaloin, S., Drocourt, L., Maurel, P., Vilarem, M.J. (2003) The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes : a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1619(3)**, 243-253.

Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **12**, 55-89.

Shimizu, Y., Nakatsuru, Y., Ichinoise, M., Takahashi, Y., Kume, H., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Ishikawa T. (2000) Benzo(a)pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6731-6736.

Till, M., Riebniger, D., Schmitz, H.J. and Schrenk, D. (1999) Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem. Biol. Interact.* **117(2)**, 135-150.

Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451-486.

Vakharia, D.D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.Y. and Kaminsky, L.S. (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures : effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metab. Dispos.* **29(7)**, 999-1006.

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.