

Daidzein이 Benzo(k)fluoroanthene에 의한 사람 유방암 세포 MCF-7의 CYP1A1 유전자 발현 조절에 미치는 영향

양소연 · 신윤용*
이화여자대학교 약학대학

Effects of Daidzein on Benzo(k)fluoroanthene Regulated CYP1A1 Gene Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells

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

(Received December 7, 2004 / Accepted December 24, 2004)

ABSTRACT : CYP1A1 is known to be inducible by xenobiotic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). These chemicals have been identified worldwide and can have a significant impact on the human health and well being of human and wildlife. Given these issues, the detection and quantification of these chemicals in biological, environmental and food samples is important. We investigated the effect of dietary flavonoid, such as daidzein on CYP1A1 promoter activity, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and CYP1A1 mRNA expression induced by benzo(k)fluoroanthene(B(k)F) in MCF-7 cells. Based on the three criteria of frequency of occurrence in the environment, toxicity and potential exposure to humans, B(k)F is one of the top-listed PAHs. We found that B(k)F significantly up-regulates the level of CYP1A1 promoter activity, EROD and CYP1A1 mRNA. When cells were treated with daidzein alone, it was not changed that EROD and CYP1A1 mRNA, compared to that of control. However, daidzein inhibited the B(k)F-induced CYP1A1 promoter activity and mRNA level at high concentration. But daidzein exhibited stimulatory effects B(k)F-induced CYP1A1 promoter activity and mRNA level at low concentration. Overall, results from these studies demonstrate flavonoids might interfere the action of B(k)F with AhR system to stimulate CYP1A1 gene expression.

Key words : benzo(k)fluoroanthene, CYP1A1, MCF-7, EROD, TCDD

서 론

모든 생물체는 외인성 물질 (Xenobiotics)에 노출된다. 이러한 외인성 물질은 약물, 산업 화학 물질, 제초제, 오염물, 음식의 열 분해 산물, 알칼로이드, 대사체의 이차 산물, 식물체에결핍팡이에서 생기는 독소 등으로 천연물 또는 제조된 것들이다. 피부, 폐, 또는 위장관에서 흡수되는 외인성 물질은 지용성 (lipophilicity)을 띠고 있어 배설이 어렵다 (Curtis, 2001). 이들은 생체에 유입되면 유해 여부와 관계없이 생체에 어떤 방식으로든 영향을 미치게 된다. 생체는 이에 대하여 항상성 (homeostasis)을 유지하기 위한 방어기전을 갖게 되는데, 이러한 방어기전 중의 하나가 외인성 물질들을 대사하여 외부로 배설하는 생체 내 전환 (biotransformation)이

다. 생체 내 전환은 1 상(phase I)과 2 상(phase II)으로 나누어지는데 1 상 생체 내 전환은 주로 기질에 -OH, -SH, -NH₂, -COOH 등의 수용성 관능기를 붙이거나 노출시켜 2 상 생체 내 전환이 용이하게 일어나도록 하며, 2 상 생체 내 전환은 1 상 반응의 대사체나 관능기를 이미 가지고 있는 외인성 물질에 직접 amino acid, acetylation, glucuronic acid, glutathion, methylation, sulfate 등을 공유 결합시켜 포함체를 만들어 그 수용성을 증대시킨다 (Gonzalez, 1989; Porter *et al.*, 1991).

이러한 1 상 생체 내 전환에 중요한 효소계는 cytochrome P450 (CYP450)이다. Cytochrome P450은 heme을 포함하는 일산화탄소화 (monooxygenase) 효소로서 다양한 내인성 물질인 steroids, fatty acids, retinoids, bile acids와 외인성 물질의 대사과정에서 중요한 역할을 한다. CYP 효소계는 아미노산 서열의 상호 유사성을 분석하여 14개의 유전자 과

*To whom correspondence should be addressed

(gene family) 분류 체계가 확립되었다. 이 중에서 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1으로 구성되는 CYP1 family는 다환상 방향족 화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons : PAHs) 과 heterocyclic amine과 같은 외인성 물질의 대사에 중요한 역할을 하며 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 와 같은 PAHs에 의해서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Nelson *et al.*, 1996; Whitlock *et al.*, 1995). CYP1A1의 강력한 유도제인 TCDD는 주로 유전자 전사 단계에서 작용하는데 그 기전은 다음과 같다. TCDD의 세포 내 수용체는 세포질에 존재하는 다환상 탄화수소 수용체 (Aryl hydrocarbon Receptor : AhR)로서, TCDD가 세포 내로 확산되어 들어가면 세포질의 AhR과 결합하여 구조 변화를 일으켜 Hsp90이 AhR에서 유리되고 AhR과 Aryl hydrocarbon nuclear translocator (Arnt)의 이종 중합체 (heterodimer)를 형성한다. 이 이종 중합체가 핵 내로 이동하여 CYP1A1의 upstream에 존재하는 xenobiotic response element (XRE) 또는 dioxin response element (DRE)에 결합하여 CYP1A1 유전자의 전사를 활성화시키게 된다 (Carrier *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1995; Denison *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996; Whitelaw *et al.*, 1994; Whitlock *et al.*, 1996).

식물에서 유래한 flavonoid는 polyphenol 유도체로, 이들은 식물 내에서 곤충이나 동물에 대해 phytoalexin으로 작용하기도 하며, 식물 호르몬을 조절하거나 UV 보호작용이 있는 것으로 보고되어 있다 (Harbone, 1986). 그리고 다양한 생화학적, 약리학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Flavonoid의 항산화 작용, 암세포 증식 억제 작용, 여러 가지 효소 (protein kinase C, tyrosine protein kinase, topoisomerase II) 활성 저해 작용 등은 anticarcinogen과 cardioprotective agent로서의 이용 가능성을 제시하고 있다 (Noroozi *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 1999; Connvey *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 1993; Akiyama *et al.*, 1987; Austin *et al.*, 1992; Costantinou *et al.*, 1995). 또한 flavonoid에 의해 사람의 EROD 활성이 감소되었으며 (Siess *et al.*, 1995), TCDD가 AhR에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여 CYP1A1 유전자 전사를 감소시키고, gel-shift assay를 통해 TCDD에 의해 유도된 XRE 결합을 억제하는 것으로 보아 (Austin *et al.*, 1992; Ciolino *et al.*, 1999; Han and Sheen, 1996; Merchant *et al.*, 1992), flavonoid는 에스트로젠으로서의 활성 뿐 아니라 cytochrome P450 효소 작용에도 영향을 미치는 것으로 추측되나 그 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 따라서 flavonoid의 다양한 생리활성에 대한 더 많은 연구가 선행되어야 할 것이다.

본 논문에서는 PAHs 중 CYP1A1 유도에 강한 반응을

보인 B(k)F와 flavonoids가 CYP1A1 유도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 생물학적 정량 (bioassay) 방법을 이용하였다. 사람 유방암 세포인 MCF-7 세포에 *phCYP1A1-Luc*를 transfection 하여 daidzein, 과 morin이 B(k)F에 의해 유도되는 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 daidzein이 B(k)F에 유도되는 CYP1A1 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 EROD 활성 측정을 수행하였고, 더불어 CYP1A1 mRNA level의 변화도 측정하였다. 아울러 토양 시료중의 CYP1A1 유전자 발현을 유도하는 물질의 존재 여부도 살펴보았다.

실험 재료 및 방법

세포주

MCF-7 human breast cancer cell과 PC3 human prostate cancer cell은 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

MCF-7 세포는 Table 2의 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 5일에 1회 1:4의 비율로 계대 배양하였다. PC3 세포는 Table 2의 10% FBS-RPMI 1640 배지를 사용하여 3일에 1회 1:5의 비율로 계대 배양하였다. PC3 세포와 MCF-7 세포는 37°C humidified 5% CO₂ incubator 내에서 배양하였고 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

약물 처치

DMSO에 녹인 약물을 medium으로 희석하여 세포에 처리하고 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 약물을 용해시킨 용매만을 처리한 것으로, 이때 용매로 사용한 DMSO의 최종농도가 0.2%를 넘지 않도록 하였다.

Cytochrome P4501A1-Luc plasmid

Human cytochrome P4501A1 gene의 5' flanking 부위 1.6 Kb DNA를 포함하는 luciferase plasmid (*phCYP1A1-Luc*)를 사용하였다.

Transformation

*phCYP1A1-Luc*를 100 ng정도 취하여 전체량이 10 µl가 되게 한 뒤, *E. coli* TG1 세포 15 µl를 넣어준 후 얼음에서 45분 이상 방치하였다. 이를 42°C에서 90초간 열처리한

뒤에 얼음에서 1~2분 동안 급냉시킨 후, SOC 배지 150 μ l를 넣어 37°C에서 2~3시간 진탕 배양하였다. 배양액 50~100 μ l를 50 μ g/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 μ g/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지 500 μ l에 접종하여 37°C에서 약 2시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 50 μ g/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지 600 mL에 500~1,000배 희석하여 37°C에서 12~16시간 진탕 배양하였다. 그 배양액을 4°C에서 세포 침전물을 모은 뒤 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 사용했으며, 0.8% agarose gel에서 전기영동으로 plasmid의 상태 및 크기를 확인했다.

Transfection

MCF-7 세포는 24 well plate에 seeding하고 60% 정도 찰 때까지 배양하였다. Tfx™-50 1.2 μ l와 *phCYP1A1-Luc* 0.4 μ g을 serum, antibiotics free medium (MEM without phenol red) 200 μ l에 넣고 잘 섞은 후 15분간 방치하였다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척하고 여기에 반응시킨 혼합액을 각 well당 200 μ l씩 가했다. 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 뒤 2X serum, antibiotics medium (MEM without phenol red) 200 μ l를 넣어주었다.

Luciferase 활성 측정

Gene construct를 transfection시키고 24시간 약물처리한 뒤 luciferase 활성을 측정하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤, reporter lysis buffer 50 μ l를 가하고 15분 동안 상온에서 incubation하여 lysis시켰다. 그 후 well에 물을 150 μ l를 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/ μ g protein)로 환산하여, 대조군에 대한 fold induction으로 나타내었다. Reporter lysis buffer (Promega)는 5X를 멸균 증류수로 1X로 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 μ l를 넣고 멸균된 증류수를 가하여 총량이 50 μ l가 되게 하였다. 다음 micro BCA reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, tetrates를 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 μ l씩 가한 뒤 60°C에서 1시간 반응시키고 그 후에 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) 활성 측정

EROD 활성은 Kennedy 등의 방법 (Kennedy *et al.*, 1994)에 따라 세포가 배양된 48 well plate에서 fluorescent product인 resorufin과 total protein을 fluorescence plate reader를 이용해 동시에 측정하였다. 일정량의 세포가 배양된 48 well plate에 sodium phosphate buffer (80 mM) 82 μ l를 가하였다. 그 후 7-ethoxyresorufin (MeOH에 녹인 1 mM 용액을 사용직전 sodium phosphate buffer로 10배 희석한 액) 11.2 μ l를 가한 후 37°C에서 10분간 안정화시켰다. β -NADPH (sodium phosphate buffer에 녹인 1.489 mM액) 18.8 μ l를 가해 반응을 개시한 후 37°C, 15분간 반응을 시키고, 그 후 fluorescamine (300 μ g/mL in acetonitrile) 48 μ l를 가해 반응을 종결시켰다. 15분 후 excitation 530 nm로 emission 590 nm로 fluorescence를 측정한 후 standard curve를 이용해 resorufin양을 정량 하였다. 이 때 standard로 10 μ M resorufin을 사용하였다. 같은 plate에서 excitation 360 nm로 emission 460 nm로 fluorescence를 측정한 후 standard curve를 이용해 총 단백질을 정량 하였다. 이 때 standard로 BSA를 사용하였다.

mRNA 측정

분리한 total RNA 0.5 μ g에 해당하는 양에 0.1% DEPC를 가해 10.5 μ l가 되게 한 다음, 여기에 random primer 0.1 μ g을 넣고 70°C에서 10분간 반응시키고 얼음에서 급냉시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1 μ l, 100 mM DTT 2 μ l, 5X first strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375

mM KCl, 15 mM MgCl₂) 4 μl와 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) 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. RT product 1 μl에 forward/reverse primer를 각각 10 pmol씩 넣고 10X reaction buffer 1 μl, 25 mM MgCl₂ 1 μl, 2.5 mM dNTPs 0.5 μl, Taq polymerase 0.5 units을 가하고 총량이 10 μl가 되게 한 후 Table 4의 조건으로 minicycler에서 반응시켰다. PCR product는 ethidium bromide로 염색한 2% agarose gel상에서 전기영동 하여 확인한 뒤, image analyzer를 사용하여 상대적인 양을 정량하였다.

결 과

B(k)F가 luciferase 활성에 미치는 영향

MCF-7 세포에 *phCYP1A15'-Luc*을 transfection한 후, 0.01 nM부터 10 μM까지농도의 Benzo(k)fluoranthene (B(k)F)를 24시간 처리하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 1 μM B(k)F 처리시 luciferase 활성은 대조군에 비해 89배 증가하였다 (Fig. 1).

B(k)F가 EROD 활성에 미치는 영향

MCF-7 세포에 1 nM부터 10 μM까지 다양한 농도의 B(k)F를 24시간 처리하여 EROD 활성을 측정하였다. 그 결과 EROD 활성은 0.25 μM에서 증가하기 시작하여 1 μM B(k)F까지 농도 의존적으로 증가하였고, 1 μM B(k)F 처리시 77 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었다. 10 μM B(k)F 처리시 그 활성이 감소하였는데 이러한 감소 효과는 고농도 약물 처리로 세포 독성이 나타났기 때문인 것으로 추측된다 (Fig. 4).

Daidzein이 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향

Daidzein이 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향을 알아 보기 위해 MCF-7 세포에 *phCYP1A15'-Luc*를 transfection 하여 Daidzein을 24시간 동안 다양한 농도 (10 nM-100 μM)로 단독 처리 후 CALUX activity를 측정하였다. Daidzein을 실험농도에서 단독 처리하였을 때, CYP1A1 유전자 발현은 대조군과 비교하여 큰 차이는 없었으나 AhR의 약한 기질로 작용하여 활성을 약간 증가시켰다 (Fig. 1).

MCF-7 세포에서 daidzein이 EROD 활성에 미치는 영향

Daidzein을 다양한 농도 (10 nM-100 μM)로 24시간 처리

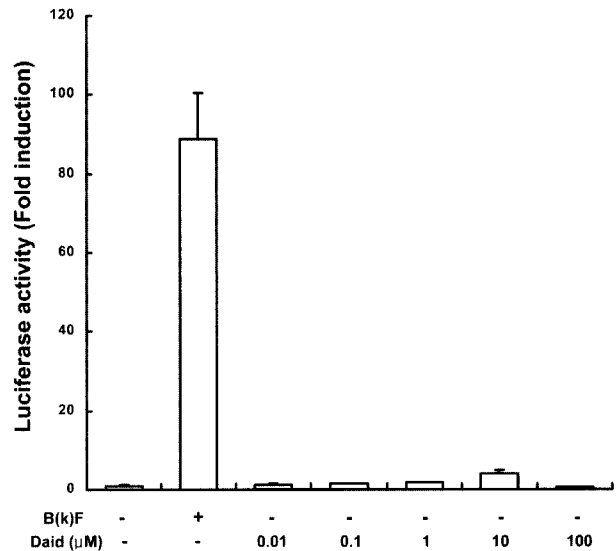


Fig. 1. The effect of daidzein (Daid) on the luciferase activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with *phCYP1A1-Luc* plasmid. After transfection, cells were treated with indicated concentrations of daidzein or 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.D. (n = 3).

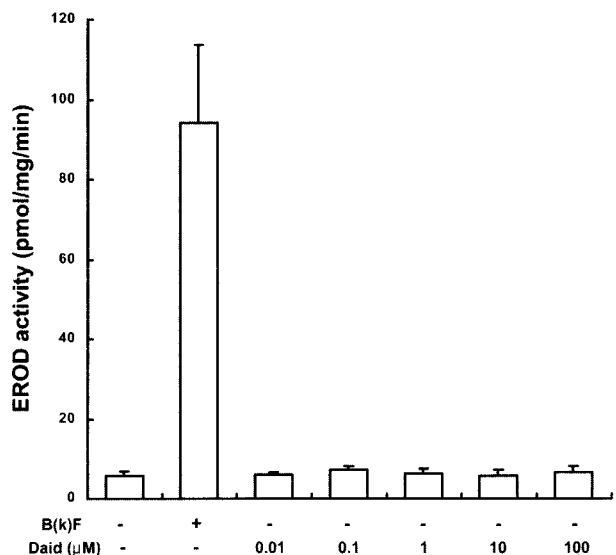


Fig. 2. The effect of daidzein (Daid) on the EROD activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with indicated concentrations of daidzein or 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. The data represent mean ± S.D. (n = 4).

후 EROD 활성 변화를 측정하였다. 그 결과 EROD 활성은 1 μM B(k)F에 의해서 94.2 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었으나, daidzein 처리군에서는 대조군과 비교하여 차이가 없었다 (Fig. 2).

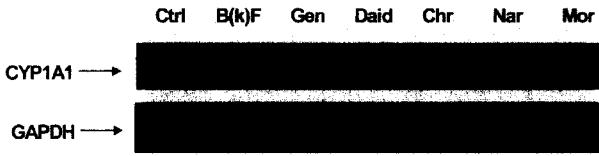


Fig. 3. The effects of flavonoids on the CYP1A1 mRNA expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with 0.1% DMSO or 1 μ M B(k)F or 1 μ M of genistein (Gen), daidzein (Daid), chrysin (Chr), naringenin (Nar) and morin (Mor) for 24 hrs. CYP1A1 mRNA was determined by RT-PCR.

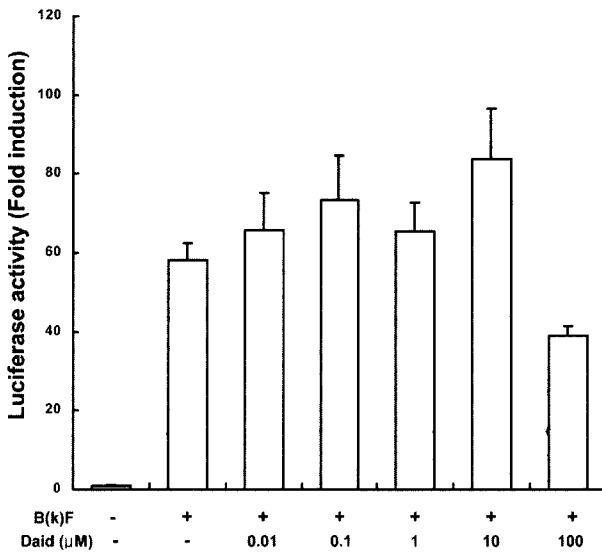


Fig. 4. The effect of daidzein (Daid) on the B(k)F-induced luciferase activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with *phCYP1A1-Luc* plasmid. After transfection, cells were pretreated with indicated concentrations of daidzein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 μ M B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

Flavonoids가 CYP1A1 mRNA에 미치는 영향

MCF-7 세포에 1 μ M B(k)F와 1 μ M의 genistein, daidzein, chrysin, naringenin, morin을 각각 24시간 처치한 후, 발현되는 CYP1A1 mRNA 발현을 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)로 측정하였다. 그 결과 B(k)F은 CYP1A1 mRNA 발현을 대조군과 비교하여 크게 증가시키는 반면 genistein, daidzein, chrysin, naringenin, morin 처치군에서는 대조군과 비교하여 차이가 없었다 (Fig. 3).

Daidzein과 B(k)F 혼합 시료가 luciferase 활성에 미치는 영향

위와 같은 방법으로 daidzein을 다양한 농도 (10 nM-

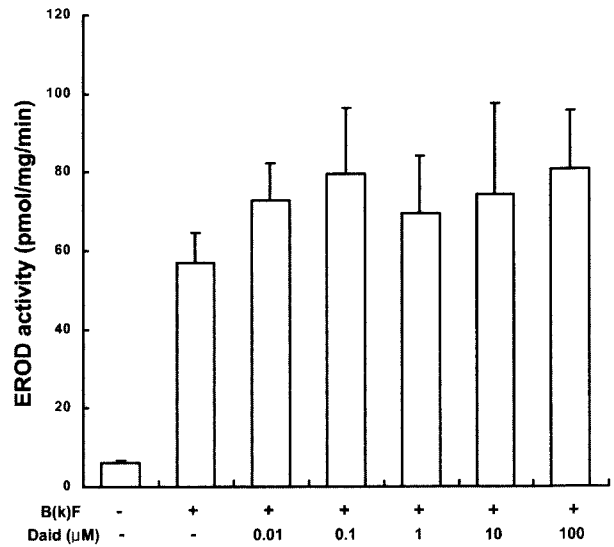


Fig. 5. The effect of daidzein (Daid) on the B(k)F-induced EROD activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were pretreated with indicated concentrations of daidzein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 μ M B(k)F for 24 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. The data represent mean \pm S.D. (n = 4).

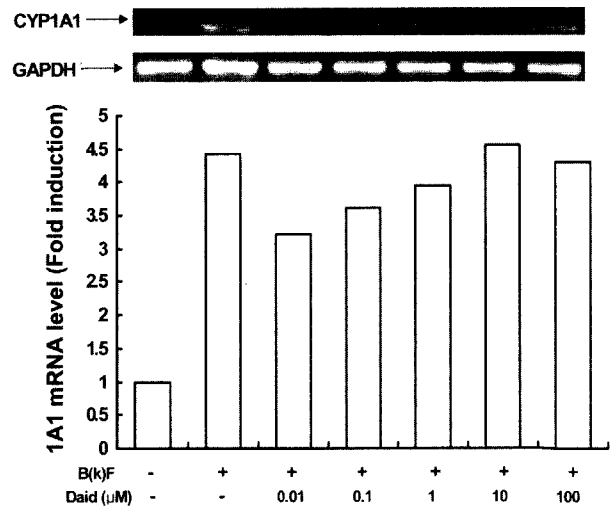


Fig. 6. The effect of daidzein (Daid) on the B(k)F-induced CYP1A1 mRNA expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells were pretreated with indicated concentrations of daidzein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 μ M B(k)F for 24 hrs. CYP1A1 mRNA was determined by RT-PCR.

100 μ M)로 전처리 후, B(k)F를 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 1 μ M B(k)F을 단독 처치한 경우, 대조군에 비해 76배의 luciferase 활성 증가를 나타내었다. Daidzein을 B(k)F와 병용 처치한 경우, B(k)F 단독 처치로 유도 발현된 luciferase 활성을 100%로 봤을 때, daidzein은 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M의 농

도에서 각각 112.93%, 126.21%, 109.19%, 143.70%, 67.06% 활성을 나타내었다 (Fig. 4). B(k)F에 의해 유도된 CYP1A1 유전자 발현은 daidzein 100 μ M의 고농도에서 감소되었다.

Daidzein과 B(k)F 혼합 시료가 CYP1A1 mRNA에 미치는 영향

MCF-7 세포에 다양한 농도 (10 nM-100 μ M)의 daidzein을 4시간 전처리하고 B(k)F를 24시간 처리 후, 발현되는 CYP1A1 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 1 μ M B(k)F를 단독 처리시 CYP1A1 mRNA 발현은 대조군에 비해 4.4배 증가하였다. Daidzein을 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 100 μ M 농도로 전처리하였을 때 CYP1A1 mRNA 발현은 3.2배, 3.6배, 3.9배, 4.3배로 B(k)F 단독 처리시보다 감소하였고 10 μ M에서는 4.5배로 약간 증가하였다 (Fig. 6).

고 찰

B(k)F는 TCDD 등의 다이옥신성 물질과 마찬가지로 AhR을 매개로 CYP1A1 유전자 발현을 유도하는 것으로 밝혀졌다. Ligand와 결합한 AhR은 hsp 90 중합체로부터 유리되어 Arnt와 결합하여 이종 중합체를 형성하며, 핵 내로 이동한다. 이 중합체가 CYP1A1의 upstream에 존재하는 DRE를 인식, 결합하여 유전자 전사를 활성화시키게 된다 (Whitlock *et al.*, 1996). 사람 유방암 세포에서의 방향족 탄화수소에 대한 반응성은 AhR 뿐만 아니라 에스트로젠 수용체 (ER)의 발현도 관련된 것으로 알려져 있다 (Dohr *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993). ER을 함유한 MCF-7 세포들은 TCDD에 의해 CYP1A1 유전자 발현 및 EROD 효소 활성의 증가를 나타내 보이나 ER이 존재하지 않는 MDA-MB 231 세포에서는 이러한 반응이 관찰되지 않는 것으로 나타났다 (Dohr *et al.*, 1995). 최근 ER과 AhR 신호 전달 체계 사이의 상호교신 (cross-talk)에 관한 많은 연구가 수행되고 있는데, TCDD가 에스트로젠에 의해 유도되는 여러 반응들을 억제시키는 anti-estrogen effect가 있음이 밝혀졌다 (Nodland *et al.*, 1997; Zacharewski *et al.*, 1994; Kharat *et al.*, 1996). 그러나 에스트로젠이 방향족 탄화수소의 반응성에 미치는 영향에 대해서는 상반된 연구 결과들이 보고되고 있다. MCF-7, Hepa 1c1c7, ECC-1세포에서 에스트로젠이 TCDD에 의해 유도된 CYP1A1 유전자 발현 및 EROD 효소 활성을 감소시킨다고 보고하였다 (Ricci *et al.*, 1999; Kharat *et al.*, 1996, Jeoung and Lee, 1998). 이전에 본 실험실에서 MCF-7에 *phCYP1A1-Luc* construct를 transfection

시킨 다음 17 β -estradiol을 비롯한 에스트로젠 활성을 지닌 화합물들이 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보았을 때, 17 β -estradiol 및 그 대사체 그리고 고농도의 flavonoid가 TCDD에 의해 유도되는 CYP1A1 유전자 발현을 저해하는 것으로 나타났다.

식품 중에 널리 존재하는 flavonoid는 대표적인 phytoestrogen으로 flavonoid의 항암 작용, 항산화 작용, 각종 효소 활성 저해 작용에 관한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. Flavonoid들은 estrogen 활성을 띤 화합물로서의 기능과 더불어 CYP1A1 유전자 발현에 대한 작용에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다 (Siess *et al.*, 1990). 본 논문에서 실험한 flavonoid들은 모두 고농도에서는 B(k)F에 의해 유도된 CYP1A1 유전자 발현과 CYP1A1 mRNA level을 억제하였으나 daidzein, chrysin, naringenin, morin 경우 저농도에서는 오히려 증가시키는 경향을 보였다. EROD 활성의 경우 고농도의 genistein, chrysin, naringenin은 B(k)F에 의해 유도된 EROD 활성을 억제하였으나 저농도에서는 오히려 증가시키는 경향이 보였다. 그러나 daidzein은 B(k)F에 의한 EROD 활성을 증가시켰고, morin은 B(k)F에 의한 EROD 활성을 유의적으로 변화시키지 못하였다. 또한 flavonoids 단독 처리시 CYP1A1 유전자 발현에서는 대조군과 비교하여 큰 차이는 없었으나 AhR의 약한 기질로 작용하여 활성을 약간 증가시켰다. 그러나 EROD 활성 및 CYP1A1 mRNA level은 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었다. Ciolino 등에 의하면 quercetin과 kaempferol과 같은 flavonoid들이 AhR의 ligand로 작용 함으로써 AhR를 매개한 CYP1A1 유전자 발현을 조절할 것으로 보고되어 있다 (Ciolino *et al.*, 1999). 또한 CYP1A1 효소에 대하여 B(k)F와 17 β -estradiol이 경쟁한다는 보고도 있다 (Arcaro *et al.*, 1999). 그러나 resveratrol같은 poly phenolic compound 경우에는 TCDD와 결합한 AhR:Arnt 이종 중합체가 DRE에 결합하는 것을 저해함으로써 TCDD의 작용을 저해하는 것으로 나타났다 (Ciolino *et al.*, 1998).

AhR을 매개로 한 CYP1A1 유전자 발현은 여러 가지 인자들에 의해 조절을 받게 되는데 그 중에 하나가 인산화이다. 실제로 몇몇 연구 결과들은 AhR과 protein kinase C (PKC) 신호 전달 체계 사이의 상호 교신 (cross-talk) 가능성을 제시하고 있다. TCDD 및 관련 화합물에 의해 *in vivo*와 *in vitro*에서 PKC 활성이 증가되는 것으로 나타났는데 이러한 현상은 AhR 의존적으로 세포내 Ca 이온의 농도가 증가하기 때문인 것으로 추측된다 (Bagchi *et al.*, 1997; Hanneman *et al.*, 1996; Zorn *et al.*, 1995; DePettillo *et al.*, 1993). 역으로 PKC에 의한 인산화는 AhR target gene의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 그 기전은 아직 명

확히 밝혀지지 않았으나 PKC가 AhR·Arnt 복합체의 DNA 결합 능력의 증가, Jun, Fos 등과 같은 AP-1 transcription factor의 활성화, AhR·Arnt 복합체의 coactivator 사이의 결합 유도 등의 기전을 통해 AhR target gene의 활성화를 유도하는 것으로 생각된다 (Long *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996). PKC 활성화는 N-terminal의 regulatory region과 C-terminal의 catalytic domain에 있는 cystein-rich motif를 통해 조절을 받는데 산화제들은 regulatory region에 작용하여 PKC 활성을 증가시킴으로써 세포 성장, tumor promotion을 유도하는 반면, 항산화제는 catalytic domain에 작용하여 PKC 활성을 억제함으로써 tumor promoter의 작용을 저해한다 (Gopalakrishna *et al.*, 2000). 항산화 작용 및 항종양 작용을 지닌 것으로 알려진 flavonoid류와 같은 polyphenolic compound들은 PKC 활성을 저해한다고 알려져 있는데, 이들 물질은 AhR을 매개로한 *CYP1A1* 유전자 발현을 억제하는 효과를 나타내기도 한다.

이상의 결과로 볼 때, TCDD 및 B(k)F에 의해 유도된 *CYP1A1* 유전자 발현이 여러 가지 화합물에 의해 다양하게 조절되고 있으며, 아직 밝혀지지 않은 기전에 대해서는 좀더 많은 연구가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

Human *CYP1A1* 5' flanking 부분과 luciferase reporter gene을 포함하는 *phCYP1A1-Luc* construct를 MCF-7 세포에 transfection 한 뒤 토양 시료에 대하여 luciferase 활성을 측정함으로써 *CYP1A1* 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴 보았다. 비료와 제초제 및 살충제 등의 농약을 비롯한 다양한 화학 물질에 의한 토양 오염의 정도를 *CYP1A1-Luc* reporter gene assay 방법을 이용한 생물학적 분석법으로 살펴 보았다. 토양 환경에 유입된 화학 물질은 오랜 시간에 걸쳐 미생물에 의한 분해 및 빛과 물에 의한 다양한 화학반응을 거쳐 본래의 구조와는 다른 화학 물질로 바뀌기 때문에 그 구조를 확인하는데 어려움이 많다. 본 실험에서 사용한 *CYP1A1-Luc* reporter gene assay 방법은 혼합물 형태로 존재하는 모든 다이옥신성 물질에 의한 *CYP1A1* 유전자 발현을 측정하는 방법이다. 또한 TEQ 계산법을 이용하여 총다이옥신성 물질의 양을 TCDD 양으로 환산함으로써 다이옥신성 물질에 의한 오염도를 비교할 수 있다는 장점이 있다. TEQ를 이용하여 토양 시료의 dioxin-like activity를 정량화 해보면 Table 5에서 보는 바와 같이 0.11 ng/g에서 5.95 ng/g까지로 나타났다.

히, 스톤의 아세틸화와 탈아세틸화는 유전자 전사 조절에 있어서 매우 중요하며 이들 사이의 균형은 히스톤 아세틸전이효소 (histone acetyltransferase)와 히스톤 탈아세틸화효소 (histone deacetylase)라는 두 개의 특이적 효소에 의해 조절된다 (Grunstein M. 1992). 현재 히스톤 탈아세틸화

저해 효과를 가진 것으로 알려진 물질로는 TSA, SAHA, HC-toxin 등이 있다. 기존의 연구 결과에 따르면 PC3와 LNCaP 전립선암 세포에서 TSA와 SAHA는 세포 증식 억제 작용이 나타났고, SAHA는 T/5 rat 전립선암 세포에서 증식 억제 작용이 있는 것으로 보고 되었다 (Lisa M. B. *et al.*, 2000, Mitsuhiro S. *et al.*, 2002). 그리고 TSA는 PC3 세포에서 24시간 처치에서 세포의 성장을 저해하고 G2/M arrest를 유발하는 것으로 보고되었다 (Mitsuhiro S. *et al.*, 2002). 히스톤 탈아세틸화 효소 저해제로 새롭게 합성된 IN2001도 HC-toxin, SAHA, TSA와 마찬가지로 PC3 세포의 증식을 억제하였다. 본 실험에서 IN2001과 SAHA에 12시간 노출 시켰을 때에는 S phase가 증가하면서 G2/M arrest가 일어나다가 48시간 노출 시켰을 때 G0/G1 arrest가 일어났다. 또한 HC-toxin은 저농도에서 약간의 G0/G1 arrest를 보였고 고농도에서는 G2/M arrest가 일어났다. TSA는 12시간, 24시간, 48시간 처치시 고농도에서 G2/M arrest가 일어남을 볼 수 있었다. 이는 히스톤 탈아세틸화 효소 저해제를 24시간 처치하였을 때 G2/M arrest를 유발한다는 Mitsuhiro 보고와 일치한다 (Mitsuhiro S. *et al.*, 2002). 히스톤 탈아세틸화 효소 저해제에 의한 세포 주기 조절 변화의 기전을 살펴보기 위해서는 세포 주기 발현에 관련된 단백질에 히스톤 탈아세틸화 효소 저해제가 미치는 영향에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 지원 (과제고유번호 : NTP238)으로 이루어진 것으로 이에 감사 드립니다.

참고 문헌

- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Wantanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-5595.
- Arcao, KF., Yang, Y. and Gierthy JF. Benzo(k)fluoranthene enhancement and suppression of 17 β -estradiol catabolism in MCF-7 breast cancer cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **58(7)**, 413-26.
- Austin, C.A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H. and Fisher, L.M. (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochemistry*, **282**, 883-889.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Tang, L. and Stohs, S.J. (1997) Comparative in vitro and in vivo protein kinase C activation by selected pesticides and transition metal salts. *Toxicol. Lett.*, **91**, 31-37.

- Carrier, F., Chang, C.Y., Duh, J.L., Nebert, D.W., Puga, A. (1994) Interaction of the regulatory domains of the murine Cyp1a1 gene with two DNA-binding proteins in addition to the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator (ARNT). *Biochem. Pharmacol.* **48**(9), 1767-1778.
- Chen, Y.H. and Tukey, R.H. (1996) Protein kinase C modulates regulation of the CYP1A1 gene by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26261-26266.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J. and Yeh, G.C. (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.*, **340**, 715-722.
- Connvey, A.H., Lu, Y., Xie, J. and Huang, M. (1999) Inhibitory effect of green and black tea on tumor growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 229-233.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Cao, K., Vaughan, A., and Moon, R. (1995) Flavonoid as DNA topoisomerase antagonists and poisons : structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* **58**, 217-225.
- Csordas, A. (1990) On the biological role of histone acetylation. *Biochem. J.* **265**(1), 23-38.
- Curtis D.K. (2001) Casarett & Doull's Toxicology : The basic science of poisons. 6th Edition 133-135.
- Denison, M.S. and Whitlock, J.P. Jr. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* **270**(31), 18175-18178.
- DePetrillo, P.B. and Kurl, R.N. (1993) Stimulation of protein kinase C by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rat thymocytes. *Toxicol. Lett.*, **69**, 31-36.
- Dohr, O., Vogel, C. and Abel, J. (1995) Different response of 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **321**, 405-412.
- Gonzalez, F.J. (1989) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* **40**(4), 243-288.
- Gopalakrishna, R. and Jaken, S. (2000) Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1349-1361.
- Grunstein, M. (1992) Histones as regulators of genes. *Sci. Am.* **267**(4), 68-74B.
- Han, S.H. and Sheen, Y.Y. (1996) Effects of hydroxylated flavonoid on the ethoxyresorufin-o-deethylase and benzo[a]pyrene hydroxylase. *Arch. Phar. Res.*, **19**, 514-519.
- Hanneman, W.H., Legare, M.E., Barhoumi, R., Burghardt, R.C., Safe, S. and Tiffany-Castiglioni, E. (1996) Stimulation of calcium uptake in cultured rat hippocampal neurons by TCDD. *Toxicology*, **112**, 19-28.
- Harborne, J.B. (1986) Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **213**, 15-24.
- Jeoung, H.G. and Lee, S.S. (1998) Suppressive effects of estradiol on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated transcriptional activation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett.*, **133**, 177-184.
- Kharat, I. and Saarcioglu, F. (1996) Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon-and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10533-10537.
- Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Abe, S., Hara, K., Suganuma, M., Kim, S.J. and Fujiki, H. (1993) Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 186-190.
- Lisa, M.B., David, B.A., Howard, I.S., Brian, H., Adam, R., Carlos, C.C., Howard, T.T., Richard, A.R., Rifkind, P.A.M. and Victoria, M.R. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research.* **60**, 5165-5170.
- Long, W.P., Pray-Grant, M., Tasi, J.C. and Perdew, G.H. (1998) Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction. *Mol. Pharmacol.*, **53**, 591-700.
- Merchant, M., Morrison, V., Santostefano, MS. and Safe, S. (1992) Mechanism of action of aryl hydrocarbon receptor antagonists : inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 389-394.
- Mitsuhiro, S., Hiroshi, S., Mikio, O., Akihiko, Y., Katsumi, N., Ken, S., Shigeru, K., Takashi, K., Yasuaki, Y., Shimeru, K., Chuwa, T. and Shigeru, K. Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer*, **97**, 621-625.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M. R. Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus. I.C. and Nebert, D.W. (1996) P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetic*, **6**, 1-42.
- Nodland, K.I., Wormke, M. and Safe, S. (1997) Inhibition of estrogen-induced activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 human breast cancer and other cell lines transfected with vitellogenin A2 gene promoter constructs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **338**, 67-72.
- Noroozi, M., Angerson, W.J. and Lean, M.E. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.*, **67**, 1210-1218.
- Porter, T.D., Coon, M.J. (1991) Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472.
- Prior, R.L. and Cao, G. (1999) Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 255-261.
- Ricci, M.S., Toscano, D.G., Mattingly, C.J. and Toscano, W.A. Jr. (1999) Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3430-3438.
- Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 55-89.
- Siess, M.H., Leclerc, J., Canivenc-Lavier, M.C., Rat, P. and Suschetet, M. (1995) Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **130**, 73-78.
- Swanson, H.I., Chan, W.K. and Bradfield, C.A. (1995) DNA

- binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J. Biol. Chem.* **270**(44), 26292-26302.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., Fuqua, S.A., Lopez, G.N., Kushner, P.J. and Pestell, R.G. (2001) Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J. Biol. Chem.* **276**, 18375-18383.
- Whitelaw, M.L., Gustafsson, J.A. and Poellinger, L. (1994) Identification of transactivation and repression functions of the dioxin receptor and its basic helix-loop-helix/PAS partner factor Arnt: inducible versus constitutive modes of regulation. *Mol. Cell Biol.* **14**(12), 8343-8355.
- Whitlock, J.P. Jr., Okino, S.T., Dong, L. and Ko, H.P. (1996) Clarke-Katzenberg R., Ma Q., Li H. Cytochromes P450 : induction of cytochrome P4501A1 : a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* **10**(8), 809-818.
- Zachraewski, T.R., Bondy, K.L. McDonell, P. and Wu, Z.F. (1994) Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on 17 β -estradiol-induced pS2 expression. *Cancer Res.*, **54**, 2707-2713.
- Zorn, N.E., Russell, D.H., Buckley, A.R. and Sauro, M.D. (1995) Stimulation of protein kinase C by TCDD in rat thymocytes. *Toxicol. Lett.*, **78**, 93-100.