

PAH가 CYP1B1 유전자 발현에 미치는 영향

서미정 · 민경난 · 신윤용*

이화여자대학교 약학대학

Effect of PAHs on CYP1B1 Gene Expression

Mi-Jung Seo, Kyung-Nan Min, and Yhun-Yhong Sheen*

College of Pharmacy, Ewha Womans Univ, Seoul, Korea

#11-1, Daehyun-dong, sudaemunku, seoul 120-750, Korea

(Received September 16, 2004 / Accepted September 29, 2004)

ABSTRACT : Cytochrome P4501B1 (CYP1B1) is known to be inducible by xenobiotic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and dioxins such as 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). And these induction of CYP1B1 is also regulated by many categories of chemicals. In order to investigate the effects of several chemicals on CYP1B1 gene expression in Hepa-I and MCF-7 cells, 5' flanking DNA of human CYP1B1 was cloned into pGL3 basic vector containing luciferase gene, and then transfected into these cells. After treatment of chemicals, the luciferase activity was measured. CYP1B1 enzyme metabolize PAHs and estradiol. CYP1B1 metabolize estradiol to 4-hydroxyestradiol that is considered as carcinogenic metabolite. Luciferase activity was induced about 20 folds over that control by 1 nM TCDD (2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin). Recent industrialized society, human has been widely exposed to widespread environmental contaminants such as PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbon) that are originated from the incomplete combustion of hydrocarbons. PAHs are known to be ligands of the AhR (aryl hydrocarbon receptor). Induction of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in cell culture is widely used as a biomarker for PAHs. Therefore we have studied the effect of PAHs in the human breast cancer cells MCF-7 to evaluate bioactivity of PAHs. We have used the United State of America EPA selected 13 different PAHs, PAHs mixtures and extracts from environmental samples to evaluate the bioassay system. We examined effects of PAHs on the CYP1B1-luciferase reporter gene and CYP1B1 mRNA level. Benzo(k)fluoranthene and dibenzo(a,h)anthracene showed strong response to CYP1B1 promoter activity stimulation, and also CYP1B1 mRNAs increase in MCF-7 cells in a concentration-dependent manner. Acenaphthene, anthracene, benzo(b)fluoranthene, fluorene, fluoranthene, naphthalene, pyrene, phenanthrene and carbazole were weak responders in MCF-7 cells. RT-PCR analysis indicated that PAHs significantly up-regulate the level of CYP1B1 mRNA.

Key words : PAH, MCF-7, CYP1B1, TCDD, AhR

서 론

인류는 천연물 또는 수많은 합성물질에 노출되어 왔고, 이것은 인체에 외부물질로 인식되며 외인성 물질 (xenobiotics)로 불린다. 여기에는 식품 첨가물, 환경오염물질, 약물등이 포함된다. 진화 과정을 거치면서 인체는 외인성 물질을 외부로 배설하는 해독 시스템도 발전시켜 많은 종류의 효소, 특히 배설에 관여하는 효소가 많은 발전을 보였다. 이러한 배설은 외인성 물질의 구조를 소수성에서 친수성 형태로 변환시켜 배설을 쉽게 하는 두개의 단계로 분류된다.

외인성 물질의 생체 내 전환은 크게 세 단계로 나뉜다.

I 상 대사 (phase I)에서는 외인성 물질에 친수성 관능기를 도입시킨다. I 상 대사의 주요 효소계는 cytochrome P450 (CYP) superfamily이다. 많은 종류의 CYP isoform, 예를 들면 CYP3A4, CYP2B6, CYP1A1/2는 외인성 물질에 의해 유도되고 핵 수용체인 PXR (pregnane X receptor), CAR (constitutive androstane receptor)와 AhR (aryl hydrocarbon receptor)에 의해 전사 조절을 받는다. 개인간 CYP 효소 활성의 차이는 유전적 다형성, 연령, 성별, 질병 상태, 약물 투여, 흡연이나 음주를 포함한 식이 등 다양한 조절 인자에서 비롯된다 (Frye *et al.*, 2002).

II 상 대사 (phase II)에서는 I 상 대사로 산화된 대사체에 분자량이 작고 친수성의 내인성 물질, 예를 들면 glucuronic acid, glutathione, sulfate, cysteine 혹은 acetate등을

*To whom correspondence should be addressed

포함시켜 수용성이 더 증가된 대사체로 배설을 용이하게 한다. II 상 대사 효소계에는 glutathione transferases, UDP-glucuronosyl-transferases와 N-acetyltransferases가 있다. III 상 대사 (phase III)는 최근에 밝혀졌으며 세포막 배설 과정으로 P-glycoprotein이 대표적이다. 여기에 관여하는 것은 펌프와 같은 역할을 하는 세포막 단백질로 대사 전 외인성 물질이나 II 상 대사로 형성된 포함체를 세포 밖으로 배설하여 외인성 물질의 세포 내 농도를 낮춘다.

Cytochrome P450 (CYP) 효소계는 산화 과정을 촉매한다. CYP 기질은 대부분의 임상약물과 steroids, fatty acids, eicosanoids, retinoids와 prostaglandins 등의 내인성 물질 등 200,000개가 넘는다 (Lewis *et al.*, 1998). CYP의 명칭은 아미노산 서열의 유사성에 근거한다 (Rogers J.F. *et al.*, 2002). 사람에 있어서 CYP superfamily는 4종의 효소계인 CYP1, CYP2, CYP3와 CYP4를 포함한다 (Gonzales *et al.*, 1998). 일부 CYP는 외인성 물질에 의해 유도되어 세포내 특정한 수용체와 결합해 유전자의 발현을 조절한다. 이러한 효소는 다양한 조직에서 발현되나, 간에서 가장 많이 발현된다. 세포내에서 CYP는 소포체의 세포질 부분에 위치한다.

CYP1B1은 비교적 최근에 유전자 염기 서열이 밝혀졌고 (Sutter *et al.*, 1994), 간 이외의 신장, 유방, 전립선과 같은 여러 가지 조직들에서 다르게 발현된다 (Sutter *et al.*, 1994; Schimada *et al.*, 1996). Benzo(a)pyrene과 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)와 같은 다환상 방향족 탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)를 대사해 활성화시키고, estrogene과 catechol estrogene의 대사에 관여한다고 알려져 있다. 사람의 CYP1B1의 5'-flanking-2.3kb 부분에는 여덟 개의 XRE가 존재한다 (Tang *et al.*, 1996). CYP1B1 유전자의 전사조절 부위 (promotor region)에는 CYP1A1과 CYP1A2의 전사조절 부위와는 구조적으로 다른 몇 가지의 전사유도 부위와 전사억제 부위가 존재한다는 것이 밝혀졌다 (Wo *et al.*, 1997). AhR (aryl hydrocarbon receptor)을 매개로 한 CYP1B1의 발현 기전은 잘 알려져 있으나, AhR을 통하지 않는 다른 전사 조절 경로나 전사 후 (post-transcriptional) 조절 기전이 존재한다고 추측하고 있다. 사람 CYP1B1 유전자의 mRNA는 여러 개의 polyadenylation 부위를 가지고 있는데, 이것이 세포 특이적으로 작용하여, 최종적인 발현 정도를 조절한다 (Shehin *et al.*, 2000).

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)는 전사 인자인 PAS (Per-ARNT-Sim) family에 속하며, II 상 대사 효소 뿐 아니라 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1의 발현을 조절한다 (Mimuraa *et al.*, 2003; Nebert *et al.*, 2000). PAS family

는 basic helix-loop-helix (bHLH)의 특징적인 구조적 단위를 가지고 있다. AhR, ARNT, AhRR (aryl hydrocarbon receptor repressor) 등이 PAS family에 속한다. bHLH 단위는 세포 증식과 분화, 신경계와 B-cell 분화와 성별 결정에 관여하는 단백질의 특징적인 구조이다 (Hahn *et al.*, 1998).

사람의 AhR 유전자는 7번 염색체에 위치하며 12개의 exon으로 되어있다 (Hahn *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 2002). 848개의 단백질로 구성되어 있고 분자량은 96,147 Da이다. 대표적인 AhR 리간드는 다환상 방향족 탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbon)와 TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)가 있다. 이러한 물질은 설치류에서 발암과 면역 억제, 내분비계 교란 등의 유해한 반응들을 유도하며 (Barouki *et al.*, 2001), 그 중 TCDD는 가장 강력한 AhR 리간드로 알려져 있다.

AhR은 리간드와 결합하기 전에 두개의 hsp 90 chaperones, small protein (p23)과 면역관련 단백질인 XAP, AIP 혹은 ARA9과 복합체를 이뤄 세포질에 존재한다. Hsp 90은 리간드가 결합하기 용이한 구조로 AhR의 전사 활성화를 막는 chaperone 단백질 시스템이다 (Scheme 1). 리간드가 결합하면 chaperone 단백질은 분리되어 나가고 AhR은 핵 내로 이동하여 hypoxia inducible factor-1 β (HIF-1 β)로 알려진 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)와 180-220 kDa (Matsumura *et al.*, 2003)의 이종중합체 (heterodimer)를 형성한다 (Safe *et al.*, 2001). 이 이종중합체는 DNA의 특정 부위인 dioxin 또는 xenobiotics responsive element (DRE 또는 XRE)에 결합하며, DRE의 핵심 서열은 5'-TNGCGTG-3'로 유전자 발현을 활성화시킨다 (Mimuraa *et al.*, 2003).

MCF-7 세포에 *phCYP1B1-Luc*를 transient transfection하여 1 μ M 농도로 PAHs를 24시간 동안 처리하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Benz(a)anthracene은 5배, Benzo(k)fluoranthene은 35배, Chrysene은 7배, Dibenzo(a,h)anthracene은 14배의 증가를 보였고 Acenaphthene, Anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Fluorene, Fluoranthene, Naphthalene, Pyrene, Phenanthrene, Carbazole은 약한 반응을 보였다. 높은 활성을 보인 PAHs를 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M 농도로 24시간 처리하였을 때, Benz(a)anthracene은 0.8배, 2.7배, 5.3배, Benzo(k)fluoranthene은 12배, 18배, 45.6배, Chrysene은 1.1배, 2.8배, 7.4배, Dibenzo(a,h)anthracene은 8.9배, 17.5배, 18배로 농도 의존적으로 luciferase 활성이 증가하였다. MCF-7 세포에 1 μ M PAHs를 24시간 처리한 후, 발현되는 CYP1B1 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Benzo(k)fluoranthene은 2.8배, Dibenzo(a,h)anthracene은

3.1배, Benz(a)anthracene은 2.5배로 유의하게 증가하였고, Benzo(b)fluoranthene은 1.9배, Chrysene은 1.3배, Fluoranthene은 1.6배의 증가 경향을 보였고, Acenaphthene, Anthracene, Fluorene, Naphthalene, Pyrene, Phenanthrene, Carbazole은 약한 증가를 나타내었다.

재료 및 방법

세포 배양

Hepa-I 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다. MCF-7 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다.

Hepa-I 세포는 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 3일에 1회 1:5의 비율로 계대 배양하였다. MCF-7 세포는 Table 1의 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 5일에 1회 1:4의 비율로 계대 배양하였다. *ph1B1-Luc*을 포함하는 영구세포주인 Hepa-I-1B1-luc stable cell은 Table 1-E의 5% FBS-MEM with G418을 배지로 사용하여 3일에 1회 정도 1:4의 비율로 계대 배양하였다. Hepa-I, MCF-7 세포와 Hepa-I-1B1-luc 영구세포주는 37°C humidified 5% CO₂ incubator 내에서 배양하였고 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

약물처리

세포에 DMSO에 현탁시킨 각 농도의 약물을 포함한 medium으로 전처치를 시행한 후, 10⁻⁹M 혹은 10⁻¹⁰M TCDD를 처리하고 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 24시간을 배양하였다. 대조군은 약물을 용해시킨 용매만을 처리한 것으로, 이때 용매로 사용한 DMSO의 최종농도가 0.2%를 넘지 않도록 하였다.

Plasmids

본 실험실에 보관 중인 Human cytochrome *P4501B1* gene의 5' flanking 부분을 포함한 luciferase plasmid (*ph1B1-Luc*)를 사용하였다.

Transformation

*phCYP1B1-Luc*를 100 ng정도 취하여 전체량이 10 µl가 되게 한 뒤, *E. coli DH5a cell* 15 µl를 넣어준 후 얼음 위에서 45분 이상 방치하였다. 이를 42°C에서 90초간 열 처리한 뒤에 얼음 위에서 1~2분 동안 급냉시킨 후, SOC 배지 150 µl를 넣어 37°C에서 2~3시간 진탕 배양하였다.

그 배양액 50~100 µl를 50 µg/ml ampicillin을 포함하는 LB agar 평판 배지에 도포하고 37°C incubator에서 하룻밤 동안 배양하여 단일 세포 집락을 얻었다.

Plasmid preparation

Transformation하여 얻어진 단일 세포 집락에 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 100 ml에 500~1,000배 희석하여 37°C에서 12~16시간 진탕 배양하였다. 그 배양액을 4°C에서 2,500 rpm으로 15분간 원심 분리하여 세포 침전물을 모은 뒤 PBS buffer를 넣고 덩어리가 남지 않도록 현탁시켰다. 이를 4°C에서 2500 rpm으로 5분간 원심 분리하여 세포 침전물을 모았다. 여기에 lysis buffer 0.5 ml을 넣고 vortex로 충분히 섞어준 후, lysozyme solution 21 µl를 가하고 얼음 위에서 20분 방치하였다. 그 후 이것을 상온으로 한 뒤 10% SDS 100 µl, 2 N NaOH 100 µl, ddH₂O 800 µl가 혼합된 액 1 ml을 넣어준 뒤 rotator로 섞어주다가 액이 투명한 노란색이 되면 얼음 위에서 10분간 방치하고, 3 N NaAC (pH 4.6) 750 µl를 넣어 중화시킨 후, 얼음 위에서 20분 방치하였다. 그 후 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액에 RNase를 5.6 µl 넣고 37°C water bath에서 20분간 반응시킨 뒤, 상온에서 phenol extraction을 했다. 계면에 불순물이 없어질 때까지 동량의 PCI로 추출을 반복했다. 얻어진 수층에 액의 2 volume absolute ethanol을 가하여 -70°C에서 1시간 방치한 다음 4°C, 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 얻어진 pellet을 400 µl의 dd H₂O에 녹이고, 4 N NaCl 100 µl와 13% PEG 500 µl를 가한 뒤 얼음위에서 정확히 45분 방치하였다. 이를 11,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 뒤 얻어지는 pellet을 70% ethanol로 반복 세척하고 남아있는 ethanol을 speed vac으로 완전 건조시킨 뒤 멸균된 ddH₂O에 녹이고 적당히 희석하여 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정해 그 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

Hepa-I 세포를 48 well plate에 seeding하고 60% 정도 찰때까지 배양하였다. Lipofectamin 2.5 µg을 포함하는 serum, antibiotics free MEM medium (without phenol red) 25 µl 용액과, *pmCyp1a1 5'-Luc* construct 150 ng을 포함하는 serum free medium 25 µl 용액을 섞고 상온에서

45분간 반응시킨 다음 200 μ l의 serum free medium을 더 가해 섞어주었다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척하고 여기에 위에서 반응시킨 혼합액을 각 well당 125 μ l씩 가했다. 이를 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 5시간 배양하고 2 \times serum, antibiotics medium (MEM without phenol red) 125 μ l를 넣어주었다. MCF-7 세포는 24 well plate에 seeding하고 60% 정도 찰 때까지 배양하였다. TfxTM-50 1.2 μ l와 *phCYP1B1-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 위에서 반응시킨 혼합액을 각 well당 200 μ l씩 가했다. 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 뒤 2 \times serum, antibiotics medium (MEM without phenol red) 200 μ l를 넣어주었다.

Luciferase 활성 측정

Gene construct를 세포에 transfection 시키고 전처리 약물들과 TCDD를 처리한 뒤 24시간 후에 luciferase 활성을 측정하였다. 각 세포가 포함된 well을 PBS로 2회 세척한 뒤, Hepa-I 세포일 때 reporter lysis buffer 30 μ l, MCF-7 세포일 때 reporter lysis buffer 50 μ l를 가하고 15분 동안 상온에서 incubation하여 lysis시켰다. 그 후 well에 물 100 μ l를 가하고 바닥을 scraper로 scrapping한 후 cell lysate에 luciferase assay reagent (luciferin)를 가한 뒤, 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 buffer (Promega)는 5 \times 를 평균 증류수로 1 \times 로 희석하여 사용하였으며, luciferase assay reagent는 luciferase assay buffer (10 ml)를 luciferase assay substrate에 넣어 reconstitution시키고 microcentrifuge tube에 aliquot해서 -20°C에서 보관한 것을 20~25°C에서 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 측정했다. microtest III flexible assay 96 well plate에 cell lysate 25 μ l를 넣고 평균증류수를 가하여 총량이 50 μ l가 되게 하였다. 다음 micro BCA reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, tetrates)를 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 측정 하였다.

mRNA 측정

약물 처리한 세포를 모아서 PBS를 가하고 vortex하여 single cell로 만든 다음 1000 rpm에서 10초간 원심 분리시켜 얻은 세포 침전물에 0.1% DEPC를 가하고 10분간 끓여서 세포를 lysis시켰다. 이를 다시 10,000 rpm으로 1분간 원심분리하고 상정액을 취해 260 nm 파장에서 흡광도를 측정한 뒤 다음의 식에 따라 농도를 구하였다. 분리한 total RNA 0.6 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 incubation 시키고 얼음에서 급냉시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1 μ l, 100 mM DTT 2 μ l, 5 \times first strand buffer (250 mM Tris-HCL (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 4 μ l와 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase 200 units, RNasin 20 units를 넣은 후 23°C에서 10분간 방치시켰다. 이후 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 박아 반응을 종결시켰다. RT product 1 μ l에 forward/reverse primer를 각각 20 pmol씩 넣고 10 \times reaction buffer 1 μ l, 25 mM MgCl₂ 1 μ l, 2.5 mM dNTPs 0.5 μ l, Taq polymerase 0.5 units을 가하고, 평균증류수를 넣어서 전체량이 10 μ l가 되도록 한 후에 Table 3의 조건으로 Minicycler (MJ research)에서 반응시켰다. PCR product는 ethidium bromide로 염색한 2% agarose gel상에서 전기영동하여 확인한 뒤, image analyzer를 사용하여 상대적인 양을 정량하였다.

결 과

TCDD에 의한 Hepa-I-ph1B1-Luc 유전자 발현 조절

*CYP1B1*의 유전자를 포함하고 있는 luciferase 활성 plasmid를 이용해 *CYP1B1* 유전자의 발현조절에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. Hepa-I 세포에 *ph1B1-Luc*를 stably transfection 한 뒤, 이 plasmid가 제대로 작용하는지를 알아보기 위하여 10⁻¹¹ M~10⁻⁸ M 범위의 TCDD를 처리하고 24시간 후 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과, 0.1% DMSO 대조군에 비해 1.04배에서 6.03배의 luciferase 활성 증가를 보였다 (Fig. 1). 즉 넣어준 *ph1B1-Luc* plasmid가 Hepa-I 세포에서 TCDD에 농도 의존적으로 반응한다는 것을 알 수 있었다.

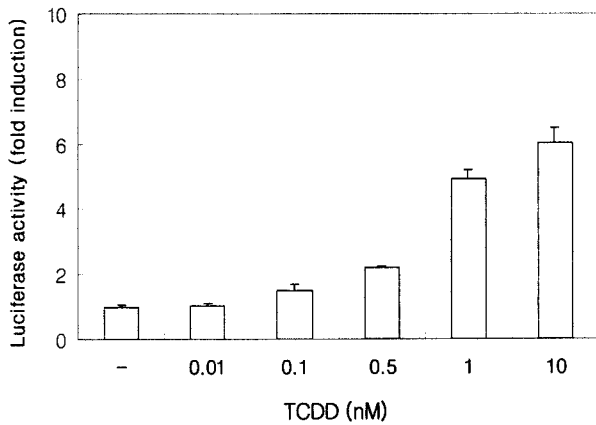


Fig. 1. The dose response of TCDD on luciferase activity in Hepa-I-ph1B1-Luc cell. Cells were maintained in 5% FBS-MEM with G418 for three days before the plating in 48 well plate. Cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 24 hrs. Luciferase activity was measured by luminometer as described in methods. The data represent mean \pm S.D. (n = 4).

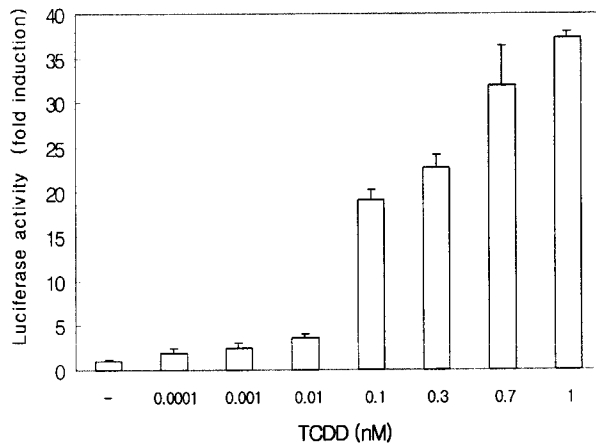


Fig. 2. The dose response of TCDD on the luciferase activity in MCF-7 cells transfected with *phCYP1B1-Luc*. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of TCDD for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

PAHs가 MCF-7 세포에서 CYP450 1B1 유전자 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에 *phCYP1B1-Luc*를 transfection 한 후, 10^{-13} M~ 10^{-9} M 농도의 TCDD를 24시간 처리하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 10^{-9} M TCDD 처리시 luciferase 활성은 대조군에 비해 37 배 증가하였다 (Fig. 2).

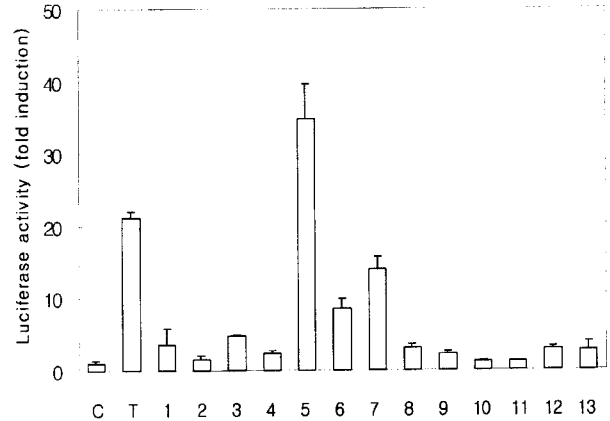


Fig. 3. The effect of PAHs on the luciferase activity in MCF-7 cells transfected with *phCYP1B1-Luc*. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or 1 μ M of PAHs for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3). (C:Control, T:TCDD, 1:Acenaphthene, 2:Anthracene, 3:Benzo(a)anthracene, 4:Benzo(b)fluoranthene, 5:Benzo(k)fluoranthene, 6:Chrysene, 7:Dibenzo(a,h)anthracene, 8:Fluorene, 9:Fluoranthene, 10:Naphthalene, 11:Pyrene, 12:Phenanthrene, 13:Carbazole).

MCF-7 세포에서 PAHs가 CYP1B1 유전자 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에 *phCYP1B1-Luc*를 transient transfection 한 후, 1 μ M PAHs를 24시간 동안 처리하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Benz(a)anthracene은 5배, Benzo(k)fluoranthene은 35배, Chrysene은 7배, Dibenzo(a,h)anthracene은 14배의 증가를 보였고 Acenaphthene, Anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Fluorene, Fluoranthene, Naphthalene, Pyrene, Phenanthrene, Carbazole은 약한 반응을 보였다 (Fig. 3). 높은 활성을 보이는 PAHs를 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M 농도로 24시간 처리하였을 때, Benz(a)anthracene은 0.8배, 2.7배, 5.3배, Benzo(k)fluoranthene은 12배, 18배, 45.6배, Chrysene은 1.1배, 2.8배, 7.4배, Dibenzo(a,h)anthracene은 8.9배, 17.5배, 18배로 농도 의존적으로 luciferase 활성이 증가하였다 (Fig. 4).

MCF-7 세포에서 PAHs가 CYP1B1 mRNA에 미치는 영향

MCF-7 세포에 1 μ M PAHs를 24시간 처리한 후, 발현되는 CYP1B1 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 Benzo(k)fluoranthene은 2.8배, Dibenzo(a,h)anthracene은 3.1배, Benz(a)anthracene은 2.5배로 유의하게 증가하였고, Benzo(b)fluoranthene은 1.9배, Chrysene

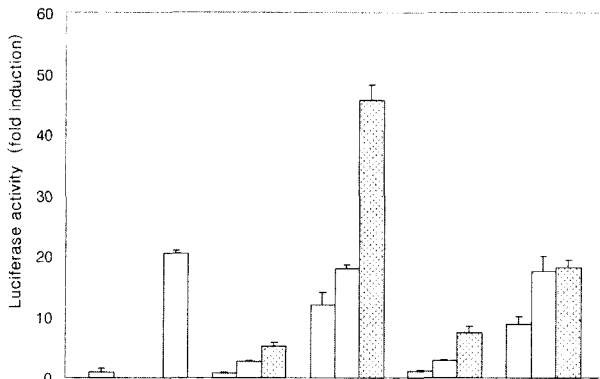


Fig. 4. The dose response of PAHs on the luciferase activity in MCF-7 cells transfected with *phCYP1B1-Luc*. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or 1 nM TCDD or indicated concentrations of PAHs for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean \pm S.D. ($n=3$). (C:Control, T:TCDD, 3:Benzo(a)anthracene, 5:Benzo(k)fluoranthene, 6:Chrysene, 7:Dibenzo(a,h)anthracene).

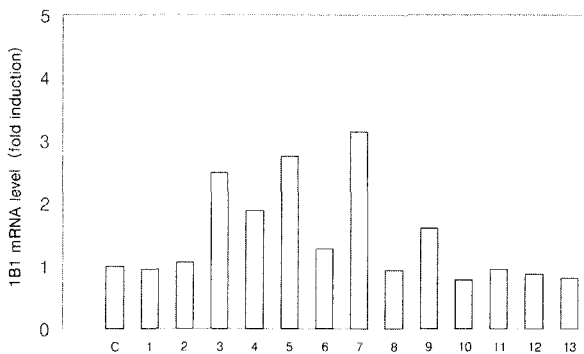


Fig. 5. The effect of PAHs on the CYP1B1 mRNA expression in MCF-7 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1 μ M of PAHs for 24 hrs. *CYP1B1* mRNA was determined by RT-PCR. (C:Control, 1:Acenaphthene, 2:Anthracene, 3:Benzo(a)anthracene, 4:Benzo(b)fluoranthene, 5:Benzo(k)fluoranthene, 6:Chrysene, 7:Dibenzo(a,h)anthracene, 8:Fluorene, 9:Fluoranthene, 10:Naphthalene, 11:Pyrene, 12:Phenanthrene, 13:Carbazole).

은 1.3배, Fluoranthene은 1.6배의 증가 경향을 보였고, Acenaphthene, Anthracene, Fluorene, Naphthalene, Pyrene, Phenanthrene, Carbazole은 약한 증가를 나타내었다 (Fig. 5).

고 찰

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)는 전사 인자인 PAS (Per-ARNT-Sim) family에 속하며, II 상 대사 효소 뿐 아

니라, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1의 발현을 조절한다. 대표적인 AhR 리간드는 PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)와 TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)가 있다. 이러한 물질은 설치류에서 발암과 면역 억제, 내분비계 교란 등의 유해한 반응들을 유도한다. PAHs는 유기체들의 불완전 연소로 생기며, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin), 3-MC (3-methylchloro anthracene)와 함께 cytochrome P450 1B1의 강력한 유도물질이다. 이러한 반응들은 대부분 AhR을 매개로 하여 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Devito *et al.*, 1994; Poland *et al.*, 1982; Safe *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1996). TCDD와 같은 리간드가 AhR에 결합하면, hsp 90 중합체로부터 유리되어 Arnt와 결합함으로써 핵 내로 이동하여 DNA에 결합할 수 있는 형태로 전환되어 *CYP1B1*과 같은 유전자의 upstream에 존재하는 DRE를 인식, 결합하여 chromatin과 nucleosome 구조를 느슨하게 하여 promoter로의 접근 및 유전자 전사를 활성화 시키게 된다 (Denison *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1992; Okino *et al.*, 1995; Whitlock *et al.*, 1996). TCDD는 AhR에 강한 친화력을 가지고 있어 다른 화합물들의 AhR에 대한 결합력 실험에 좋은 도구로 사용되고 있다. 그러나, 친화력이 매우 낮은 리간드의 경우, AhR이 TCDD에 의해 완전히 포화되면 이와 경쟁할 수 없으므로 (Denison *et al.*, 1998), 본 논문에서는 *CYP1B1* 유전자 발현이 최대로 이루어지지 않게 TCDD 농도를 2.5×10^{-10} M로 조절하여 실험을 수행하였다.

Aryl hydrocarbon에 대한 반응성은 AhR 뿐만 아니라 estrogen receptor (ER)의 발현도 관련될 것으로 알려져 있다 (Dohr *et al.*, 1995; Thomsen *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993; Zacharewski *et al.*, 1991). ER이 존재하는 MCF-7 세포에서는 TCDD에 의해 *CYP1A1* 유전자 발현 및 EROD 효소 활성이 증가하나 ER이 존재하지 않는 MDA-MB-231 세포에서는 이러한 반응이 관찰되지 않았다 (Dohr *et al.*, 1995). AhR과 ER의 신호 전달 체계 사이의 상호교신 가능성이 제기되면서, TCDD가 estrogen에 의해 유도되는 여러 반응들을 억제하는 anti-estrogenic effect가 있음이 밝혀졌다 (Safe *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993; Zacharewski *et al.*, 1998). 본 실험에서는 MCF-7 세포에 *phCYP1B1-luc*를 transient transfection하여 1 μ M 농도로 PAHs를 24시간 동안 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. MCF-7 세포에 1 μ M 농도로 PAHs를 24시간 동안 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정한 결과 대조군에 비해 Benzo(a)anthracene은 5배, Benzo(k)fluoranthene은 35배, Chrysene은 7배, Dibenzo(a,h)anthracene은 14배의 증가를 보였고 Acenaphthene, Anthracene, Benzo(b)

fluoranthene, Fluorene, Fluoranthene, Naphthalene, Pyrene, Phenanthrene, Carbazole은 약한 반응을 보였다. 높은 활성을 보인 PAHs를 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M 농도로 24시간 처치하였을 때, Benz(a)anthracene은 0.8배, 2.7배, 5.3배, Benzo(k)fluoranthene은 12배, 18배, 45.6배, Chrysene은 1.1배, 2.8배, 7.4배, Dibenzo(a,h)anthracene은 8.9배, 17.5배, 18배로 농도 의존적으로 증가하였다.

본 논문에서는 MCF-7 세포에서 환경 중에 존재하는 PAHs가 CYP1B1 유전자 발현 및 mRNA에 미치는 영향을 연구하였고, genistin의 억제 효과에 대해서 알아보았다.

감사의 글

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

참고 문헌

- Barouki, R. and Morel, Y. (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol.* **61**, 511-6.
- Dohr, O., Vogel, C. and Abel, J. (1995) Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch Biochem Biophys.* **321**, 405-12.
- Frye, R.F., Schneider, V.M., Frye, C.S. and Feldman, A.M. (2002) Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. *J Card Fail.* **8**, 315-9.
- Gonzalez, F.J. (1998) The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol Lett.* **102-103**, 161-6.
- Hahn, M.E. (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact.* **141**, 131-60.
- Hahn, M.E. (1998) The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C.* **121**, 23-53.
- Harper, P.A., Wong, J.Y., Lam, M.S. and Okey, A.B. (2002): Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact.* **141**, 161-87.
- Lewis, D.F., Watson, E. and Lake, B.G. (1998) Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res.* **410**, 245-70.
- Mimura, J. and Fujii-Kuriyama, Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* **1619**, 263-8.
- 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.
- Rogers, J.F., Nafziger, A.N. and Bertino, J.S. Jr. (2002): Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med.* **113**, 746-50.
- Safe, S. (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* **120**, 1-7.
- Schmidt, J.V. and Bradfield, C.A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **12**, 55-89.
- Shehin, S.E., Stephenson, R.O. and Greenlee, W.F. (2000) Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 6770-6776.
- Thomsen, J.S., Wang, X., Hines, R.N. and Safe, S. (1994) Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carcinogenesis* **15**, 933-937.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4304-4308.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix/PAS heterodimer regulated by cellular oxygen tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5510-5514.
- Whitlock, J.P., Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103-125.