

HepG2 세포에서 지속적인 활성 산소 노출이 γ -Glutamyltranspeptidase 발현과 활성에 미치는 영향

김영환 · 최달웅[†]

고려대학교 병설 보건대학 환경보건과

Effect of Continuous Exposure to Reactive Oxygen Species on γ -Glutamyltranspeptidase Expression and Activity in HepG2 Cells

Youngwhan Kim · Dalung Choe[†]

Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University, Seoul 136-703, Korea

(Received May 9, 2004; Accepted August 10, 2004)

ABSTRACT

The adverse health effects of a number of environment pollutions are related to the formation of free radicals. Induction of antioxidant defensive system in the response to an oxidative attack is an essential element of the cell to survive. CYP2E1 is easily induced by organic solvents and induces continuous formation of reactive oxygen species (ROS). γ -Glutamyltranspeptidase (γ GT) plays an important role in glutathione metabolism and xenobiotic detoxification. To evaluate the characteristic of oxidative stress which induces GGT expression and to understand human antioxidant defensive response against oxidative stress induced by CYP2E1, we studied regulation of γ GT enzyme expression in response to various oxidative stresses in human HepG2 cells. The γ GT activity was not modified after exposure of acute oxidative stress inducing agents (ferric nitrilotriacetate, cumene hydroperoxide, ADP-Fe, O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, tumor necrosis factor-alpha). To induce continuous exposure of cells to ROS, HepG2 cells were transfected by human CYP2E1 gene transiently. The CYP2E1 activity was verified with chlorzoxazone hydroxylation. Transfection of CYP2E1 showed continuous 60% increase in intracellular ROS and 240 % increase in microsomal ROS. CYP2E1 over-expressing cells showed increased γ GT activity (2.5-fold). The observed enhancement of γ GT activity correlated with a significant increase of γ GT mRNA (2.1-fold). Treatment with antioxidant strongly prevented the increase in γ GT activity. The CYP2E1 overexpression did not modify toxicity index and increased glutathione levels. These results show that continuous exposure of cells to ROS produced by CYP2E1 up-regulates γ GT; This may be one of the adaptive antioxidant responses of cells to oxidative insult. Present study also suggests that the induction of γ GT could be used as a marker of oxidative stress induced by exposure to organic solvents.

Keywords: γ -Glutamyltranspeptidase, Reactive oxygen species, mRNA, organic solvent

I. 서 론

활성 산소의 발생은 환경 오염에 의해 영향을 받으며 환경 오염이 심해 질수록 인간은 산화적 스트레스에 더 쉽게 노출된다. 활성 산소의 발생 증가는 또한 직업상의 위해 요소와도 깊은 관련성을 가진다.^{1,3)} 새로이 합

성되는 많은 화학물질과 기존의 여러 산업 용제는 생체에 흡수되어 대사과정에서 활성산소를 생성시킨다.^{3,4)} 중금속, 방사선, 자외선, 오존, 흡연 등에 노출에 의해서도 활성산소가 발생되어 암 등 여러 가지 질병을 유발하며 대기 오염 물질인 질소 산화물과 디젤 배기 가스도 활성산소를 생성시켜 호흡기 질환을 초래하는 것으로 알려져 있다. 이에 반해 생체는 여러 종류의 항산화 방어 시스템을 가동시켜 체내 활성 산소 노출에 대해 대항하게 된다. 생체 주요 항산화 물질 중 하나인 글루타치온(GSH)은 생리적으로 중요한 여러 가지 해독

[†]Corresponding author : Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University
Tel: 82-2-940-2861, Fax: 82-2-943-5304
E-mail : ttllll@empal.com

반응에 작용하는데 특히 직접 활성 산소 소거 반응에 관여하기 때문에 이들의 세포독성을 증하시킬 수 있다.⁵⁾ 이렇게 활성 산소 노출에 대한 생체 방어 기전에 대한 이해는 환경 독성학적 관점에서 중요한 의의를 가진다.

γ -glutamyltranspeptidase (γ GT)는 GSH 대사와 xenobiotics의 무독화 반응에 관여하는 효소이다.⁶⁾ 이 효소는 여러 종류의 세포의 표면에 존재하면서 peptid 공여체로부터 γ -glutamyl 기를 peptid 또는 아미노산 같은 다양한 acceptors에 전달하는 역할을 한다. GSH 대사에서 γ GT는 세포 밖에 있는 GSH와 그 유도체를 사용하여 세포 내 GSH 합성에 중요한 원료인 시스테인을 세포 내로 공급하는 역할을 수행한다. 이렇게 γ GT를 발현하는 세포는 세포 밖의 GSH를 시스테인의 지속적인 공급원으로 사용하여 세포의 thiol redox와 무독화 능력을 유지시킨다. 따라서 세포가 산화적 공격에 노출되었을 때 이 γ GT 효소의 유도는 항산화 세포 방어 시스템에서 중요한 요소로 작용하여 세포를 보호한다. γ GT 발현 조절은 조직 특이적이고 세포 유형 특이적으로 이루어지며 분화와 발암 과정과 같은 여러 생리적 병리적 조건에 따라 변화한다고 알려져 있다.⁷⁾ 이 효소는 화학물질에 의해 유발된 암에서 그 발현의 증가가 관찰되었으며 독성 화학 물질 섭취로 인한 간질 환의 지표로도 이용되어 왔다.⁸⁾ γ GT는 신장 발달과 분화하는 과정에서는 증가하며 성숙기 간에서는 태생기 간에서 보다 그 활성이 감소한다고 보고 되어 있으나⁸⁾ 아직도 생체 내에서의 이 효소의 기능은 완전히 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

싸이토크롬 P450 2E1(CYP2E1)은 간에 주로 존재하는 효소로서 다른 동종 싸이토크롬 P450보다 더욱 활발한 활성 산소 발생 능력을 가지고 있기 때문에 많은 연구자들의 관심을 받아왔다.⁹⁾ CYP2E1은 높은 NADPH oxidase 활성을 가지고 있으므로 외부에서 넣어준 기질이 없는 상태에서도 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)과 hydrogen peroxide(H_2O_2)와 같은 활성 산소를 지속적으로 발생시키는 능력이 있다. 이 $O_2^{\cdot-}$ 과 H_2O_2 는 세포 내 미량 존재하는 non-heme Fe과 반응하여 반응성이 큰 hydroxyl 라디칼($OH\cdot$)로 전환될 수 있다. 이 CYP2E1효소의 특징 중 하나가 ethanol, acetone, benzene, toluene, ethylbenzene, dimethylsulfoxide, glycerol, pyridine 등과 같은 방향족 탄화수소를 포함하는 다양한 유기 용제에 의해 쉽게 생체에서 유도되는 것이다.⁹⁻¹²⁾ 이러한 유기 용제에 노출되는 그룹은 노출되지 않은 그룹에 비해 체내 CYP2E1 효소량이

증가하게 된다. 따라서 만성적 유기 용제 노출은 CYP2E1 활성의 증가를 유도하여 생체를 지속적으로 더욱 많은 활성 산소에 노출시키게 된다. Serron 등¹²⁾은 ethylbenzene과 같은 방향족 탄화수소 처리는 싸이토크롬 P450을 유도하며 이렇게 유도된 P4502E1 등이 마이크로솜의 활성 산소 발생을 증가시킴을 보고하였으며 이러한 활성 산소 발생 증가가 방향족 탄화수소류에 의한 독성 작용에 기여할 것이라고 제시하였다. 이외에 다른 많은 연구들에서도 유기 용제류에 의한 CYP2E1의 유도와 활성 산소 발생 증가가 보고되었다.⁹⁻¹¹⁾ 이렇게 CYP2E1에 의한 활성 산소 생성 증가는 환경 독성학적으로 중요한 의의를 가진다.

실제 연구에 있어서, 일반 간 세포주의 경우는 CYP2E1 발현 능력을 상실했기 때문에 유기 용제 노출에 의한 CYP2E1 유도 효과를 *in vitro*로 연구하기에는 많은 제한이 따랐다. 따라서 본 실험에서는 유기 용제류 만성적인 노출시에 흔히 나타나는 CYP2E1 유도 현상에 대한 인체 항산화 방어 반응을 연구하기 위해 간 세포 주에 CYP2E1 유전자를 transfection하고 이 CYP2E1발현에 의한 활성 산소 생성이 사람 간 세포주의 항산화 적응 반응에 미치는 영향을 γ GT 효소 발현과 활성을 중심으로 관찰하였다. 이와 함께 γ GT의 활성에 변화를 유발할 수 있는 산화적 스트레스의 경향을 알아내기 위하여 HepG2 세포를 다양한 종류의 활성 산소 발생 시스템에 노출시키고 이러한 처리가 γ GT의 활성에 변화를 유발하는지도 함께 알아보았다.

II. 연구방법

1. 시약

Fetal Bovine Serum (FBS)는 GibcoBRL사에서, M-MLV reverse transcriptase는 Promega사에서 LDH kit는 Roche사에서 구입하였다. 그 외의 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다.

2. 세포배양

실험에 사용한 사람 간 세포주인 HepG2 세포는 10% fetal calf serum, 100 units/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin과 2 mM glutamine을 포함하는 MEM 배지로 5% CO_2 , 37°C에서 배양하였다. CYP2E1을 발현하는 HepG2 세포는 사람 CYP2E1 cDNA가 삽입된 pSI expression vector를 transient transfection시켰고, transfection 대조군 세포는 pSI vector만을 transfection 시켰다.

3. 마이크로솜 분획 분리

세포들이 plates에 거의 차게 되면 PBS에 취하여 소니케이션한 후 10,000 g에서 15분간 원심분리하고 그 상등액을 60분 동안 100,000 g에서 초원심분리하여 마이크로솜 분획을 얻었다.

4. 단백질 양 측정

단백질의 양은 Lowry 등의 방법¹³⁾을 사용하여 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

5. γ GT 활성 측정

γ GT 활성은 Szasz의 방법¹⁴⁾을 사용하여 측정하였다. 세포를 차가운 PBS로 씻어주고 0.1% Triton X-100 (Sigma)가 포함된 25 mM Tris HCl 완충액을 사용하여 세포를 취하였다. 차가운 얼음에서 세포 현탁액을 소니케이션한 후, 6 mM L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide를 기질로 사용하여 즉시 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 8.6)에서 활성을 측정하였다. 20분간 배양한 후 acetic acid로 반응을 종료시킨 후 10,000 g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상등액을 취해 405 nm에서 흡광도를 측정하고 활성을 유리된 4-nitrobenzoate/min/mg protein로 표시하였다.

6. 활성 산소 측정

마이크로솜과 세포의 활성 산소는 널리 사용되는 형광전구물질인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 사용하여 측정하였다.¹²⁾ 활성 산소 류인 O_2^- , H_2O_2 , OH \cdot 등에 의해 2',7'-디클로로플루오레신(2',7'-dichlorofluorescein, DCFH)이 2',7'-디클로로플루오레세인(2',7'-dichlorofluorescein, DCF)으로 산화되는 원리를 이용하였다. 50 mM phosphate 완충액(pH 7.4)을 포함하는 반응계에서 세포의 마이크로솜을 DCFHDA와 함께 37°C에서 15분간 배양하여 내인성 에스테라제(endogenous esterase)에 의해 DCFHDA를 DCF로 탈에스테르화 시켰다. 여기에 NADPH를 가한 후 30분간 배양하였고 배양 종료 후, 485 nm의 여기파장 및 585 nm의 방출파장에서 마이크로플레이트 형광측정기(Microplate fluorimeter, Cytofluor 2350; Millipore사, Bedford, MA, 미국)를 사용하여 DCF 형성을 측정하였다. DCFH-DA 산화속도는 배양 기간 동안 선형이었으며, 0.01~0.10 μ M DCF를 사용하여 표준곡선을 작성하였다. 결과는 picomole/min/mg protein으로 표시하였다. 세포에서의 활성 산소 측정은 약 500,000개의 세포를 6 well-plate에 하루 배양하고 측정하였다. 배지를 제거한 후에 PBS로 씻어주고 DCFH-DA를 포함하는

PBS를 넣어주었다. 빛을 차단하고 37°C에서 40분간 배양한 다음 세포를 취한 후 마이크로플레이트 형광측정기를 사용하여 위와 동일한 방법으로 DCF 형성을 측정하였다.

7. CYP2E1 활성 측정

CYP2E1 활성은 plate에 부착되어 있는 세포를 가지고 직접 측정하였다. 기질은 사람 CYP2E1 활성 측정에 매우 민감한 지표로 알려진 chlorzoxazone(CHZ)을 사용하였다.¹⁵⁾ 세포가 plate에 부착되어 있는 상태에서 배지를 제거하고 배양 완충액으로 바꾸어준 다음 CYP2E1 활성을 측정하였다. 이 배양 완충액에 CHZ을 넣어주고 37°C에서 100분간 배양시킨 후 세포가 배양 완충액으로 유리시킨 대사체인 6-hydroxyl chlorzoxazone(OH-CHZ)을 측정하였다. OH-CHZ는 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 사용하여 정량하였다. HPLC 시스템에서 이동상은 22% acetonitrile과 0.5% acetic acid로 구성되었고 유속은 1.2 ml/min이었다. Column은 Spherisorb ODS column(125 \times 4 mm, 5 μ m)을 사용하였다. OH-CHZ는 UV 검출기를 사용하여 287 nm에서 측정하였고 내부표준물질과 표준곡선을 사용하여 정량하였다. 전체 세포의 단백질양은 Lowry 등의 방법¹⁶⁾으로 측정하였고 세포의 CYP2E1 활성은 pmol/min/mg protein으로 표시하였다.

8. γ GT reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR).

HepG2 세포에서의 γ GT mRNA의 발현 정도는 RT-PCR 방법을 이용하여 분석하였다. RNA를 Gene Elute™ Mammalian Total RNA kit(Sigma)를 사용하여 세포로부터 분리하고 분리한 RNA 샘플을 실험에 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. RT buffer(50 mM Tris/HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 200 U M-MLV reverse transcriptase (Promega), 0.5 μ g oligo(dT)₁₆₋₁₈, 그리고 4 μ g의 total RNA로 구성된 반응액을 37°C에서 2시간 동안 처리하여 cDNA를 얻었다. 제작한 cDNA로부터 PCR 방법을 이용하여 γ GT 유전자만을 특이적으로 증폭시켰다. cDNA를 미리 준비된 PCR mixture(2.5 units Taq DNA polymerase, 250 μ M dNTP, 1 μ M primer)에 첨가한 후, 26 cycle의 PCR 반응(94°C 30초, 54°C 30초, 72°C 45초)을 시행하였다. 이때 특이적으로 γ GT 유전자를 증폭시키기 위하여 다음과 같은 primer(sense primer: 5'-AATGGACGGACTTCAGCTCTCC-3', antisense primer: 5'-AGCCGAACCAGAGGTTGTAGA-3')를 사

용하였다. GGT 유전자의 발현 정도를 표준화하기 위하여 β_2 -microglobulin (sense primer: 5'-ACCCCACTG AAAAAGATGA-3'와 antisense primer: 5'-ATCTTCAA ACCTCCATGATG-3)를 internal standard로 사용하였다. PCR 결과 얻은 증폭된 DNA는 2% agarose gel 전기 영동과 ethidium bromide 염색을 거친 후 Kodak DC120 digital camera와 Image analysis system을 사용하여 정량화하였다.

9. LDH 유리 측정

Lactate dehydrogenase(LDH) 유리는 Roche사의 LDH assay kit를 사용하여 측정하였다. 약 20,000개의 세포를 24 well-plate에서 48시간 동안 배양하고 배지에서 LDH 값을 측정하여 LDH_{out}이라고 정하였다. 2% Triton X 100 처리로 총 세포 lysate를 만들어 세포에서의 LDH 값을 측정하여 LDH_{in}이라고 정하였다. LDH 유리 정도는 세포 내 LDH 값에 대한 배지의 LDH 값으로 LDH_{out}/LDH_{in} 표시하여 나타내었다.

10. MTT assay

세포의 viability는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide(MTT)를 사용하여 측정하였다.¹⁶⁾ 약 20,000개의 세포를 24 well-plate에서 48시간 동안 배양하고 0.5%가 되게 MTT를 넣고 1시간 동안 계속 37°C에서 배양하였다. 배지를 제거한 다음 각 well에 DMSO를 넣어 생성된 blue formazan를 녹이고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

11. GSH 함량 측정

세포내의 GSH 함량의 변화는 다음과 같은 방법을 사용하여 측정하였다. 약 500,000개의 세포를 6 well-plate에 하루 배양하였다. 배지를 제거한 후 PBS로 씻어준 후 3.3% HClO₄를 사용하여 세포를 취하였다. 10,000 g, 4°C에서 5분 동안 원심분리시킨 후 침전물은 단백질 정량에 사용하고 상등액을 취해 GSH 함량을 측정하였다. 상등액의 GSH를 orthophthalaldehyde로 유도체화한 다음 Spherisorb ODS II column(125 × 4 mm, 5 μ m)을 사용하여 HPLC로 분리하고 형광 검출기(여기 파장: 340 nm ; 방출파장: 440 nm)를 사용하여 정량화 하였다.

12. 통계처리

실험 결과를 two-tailed Student's t-test에 의해 분석하였다. *p* value가 0.05 이하인 경우에 각 군간의 유의적인 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Fe-NTA, CuOOH, ADP-Fe, TPA, TNF- α 노출이 γ GT 활성에 미치는 영향

GGT의 활성에 변화를 유발할 수 있는 산화적 스트레스의 경향을 알아내기 위하여 HepG2 세포를 활성 산소를 발생시키는 물질들에 노출시키고 γ GT의 활성에 변화를 일으키는지를 알아보았다. 본 연구에서는 활성 산소를 유발한다고 기존에 잘 알려진 Fe-NTA(ferri nitrilotriacetate), CuOOH(cumene hydroperoxide), ADP-Fe, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA) 및 tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)와 같은 화학물질^{17,21)}을 사용하여 세포를 급성적 산화적 스트레스에 노출시켰다. 각 물질의 처리 농도는 LDH 유리를 유발하지 않는 농도 범위에서 정하였으며 처리하고 48시간 후에 γ GT 활성의 변화를 알아보았다(Table 1). 산화적 스트레스에 노출시키지 않은 대조군 HepG2 세포는 약 95 nmol/min/mg 정도의 γ GT 활성을 나타내었다. Fe-NTA 처리군에서 γ GT 활성이 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성 있는 증가를 나타내지 못하였고 (Student's t-test, *p* < 0.05) 다른 처리군에도 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 활성 차이를 나타내지 않았다.

2. CYP2E1에 의한 효소 활성과 지속적인 활성 산소 발생

급성적 산화적 스트레스에 대해 세포의 반응이 없었으므로 이번에는 다른 방법으로 세포를 산화적 스트레스에 노출시켰다. 지속적인 활성 산소 노출에 대한 γ GT 활성 변화를 알아보았다. 지속적인 산화적 스트레스를 유발시키기 위해서는 세포에 활성 산소를 발생시

Table 1. Effect of various oxidative stress inducing agents on γ GT activity of HepG2 cells

	γ GT activity (nmol/min/mg)
Control	95 \pm 11
Fe-NTA 10 μ M	115 \pm 14
CuOOH 100 μ M	102 \pm 10
ADP-Fe 100 μ M-10 μ M	92 \pm 6
TPA 1 μ M	110 \pm 11
TNF- α 100 U/ml	106 \pm 12

After 48 h of treatment with acute oxidative stress inducing agents, the γ GT enzyme activity was determined as described under Materials and Methods. Values are the mean \pm S.D. of 3 individual determinations.

키는 효소의 발현을 유도하는 방법이 있다. 활성 산소를 발생 시키는 효소 중 CYP2E1은 사이토크롬 P450의 동종 효소로 외부에서 넣어준 기질이 없이도 H₂O₂와 O₂⁻와 같은 활성 산소를 지속적으로 발생시킨다고 알려져 있다. 그러나 일반 간세포주는 CYP2E1활성을 잃어버렸으므로 CYP2E1에 의한 활성 산소 발생을 유도할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 사람 CYP2E1 유전자를 transfection시켜 HepG2 세포가 지속적으로 활성산소에 노출되게 하였다. Transfection 자체에 의한 영향을 배제하기 위해 본 실험에서는 CYP2E1 유전자가 transfection된 HepG2 세포에 대한 대조군은 pSI vector만을 transfection시킨 HepG2 세포로 정하였다.

먼저 Transfection이 잘 되었는지 확인하기 위해 transfection된 세포에서 CYP2E1 활성을 측정하였다. 사람 CYP2E1의 선택적인 기질인 chlorzoxazone을 사용하여¹⁵⁾ 6-hydroxyl chlorzoxazone이 생성되는 양을 측정하여 CYP2E1 활성으로 나타내었다. 대조군 HepG2 세포에서는 6-hydroxyl chlorzoxazone이 측정되지 않았지만 CYP2E1을 transfection시킨 HepG2 세포에서는 명백한 CYP2E1 활성이 관찰되었다(Table 2).

CYP2E1 transfection에 의해서 세포 내의 활성 산소 발생이 증가하였는지 알아보기 위해 DCF를 사용하여 대조군 HepG2 세포와 transfection된 HepG2 세포 내의 활성산소를 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 CYP2E1이 transfection된 세포에서 활성 산소 생성이 대조군 HepG2 세포에 비해 1.6배 유의성 있게 증가되었다. CYP2E1을 overexpression하는 세포에서의 이러한 활성 산소 발생의 증가는 세포 배양 기간 동안 커다란 변화 없이 계속 유지되었다. CYP2E1은 주로

마이크로솜에 존재하기 때문에 세포에서 마이크로솜을 따로 분리하여 활성 산소 발생을 측정해 보았다. 분리된 마이크로솜에서의 활성 산소 발생량도 CYP2E1을 overexpression하는 세포에서 약 2.4배 증가하였다.

3. CYP2E1이 γ GT 활성과 γ GT mRNA 발현에 미치는 영향

이번에는 CYP2E1을 overexpression하는 HepG2 세포와 대조군 HepG2 세포에서 GGT 활성을 측정해 보았다. γ GT의 활성은 CYP2E1 overexpressing 세포에서 대조군 세포에 비해 2.5배 유의성 있게 증가되었다(Table 2). CYP2E1 overexpressing 세포에서의 이러한 γ GT 활성의 증가는 세포 배양 기간 동안 커다란 변화 없이 계속 유지되었다.

이러한 CYP2E1 overexpression에 의한 γ GT 활성 증가가 γ GT mRNA 수준의 변화에 의해 유발되었는지

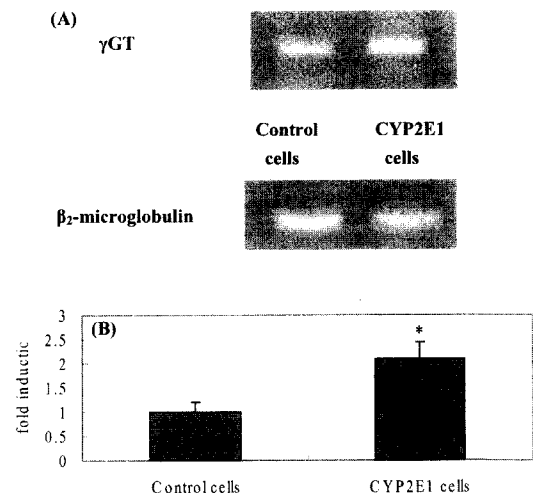


Fig. 1. Comparison of γ GT mRNA expression in control cells and CYP2E1 cells. 4 μ g of total mRNA isolated from each HepG2 cells was reverse transcribed and 1 μ l of the reaction products were submitted to specific PCR permitting amplification of γ GT mRNA as described in Materials and Methods. β_2 -microglobulin and γ GT signal were quantified for each sample after separation of PCR products on agarose gel containing ethidium bromide. The relative amount of γ GT mRNA was calculated as the ratio γ GT signal/ β_2 -microglobulin signal and expression of γ GT mRNA between the two cells was compared. Photographs (A) of corresponding agarose gel used for quantification (B) of γ GT and β_2 -microglobulin signals. Values are the mean \pm S.D. of 3 individual determinations. Asterisk indicates a significant difference from the control (Student' t-test, $p < 0.05$).

Table 2. Modification of biological parameters by CYP2E1

	Control cells	CYP2E1 cells
CYP2E1 activity (pmol/min/mg)	ND	12 \pm 2*
Cellular ROS production (pmol/min/mg)	0.16 \pm 0.04	0.25 \pm 0.02*
Microsomal ROS production (pmol/min/mg)	10.3 \pm 1.6	24.5 \pm 4.6*
γ GT activity (nmol/min/mg)	91.6 \pm 12.8	232.1 \pm 25.1*

After 48 h of subcell culture, the CYP2E1 enzyme activity, ROS production and γ GT activity were determined as described under Materials and Methods. ND; undetectable. Values are the mean \pm S.D. of 3 individual determinations. Asterisk indicates a significant difference from the control cells (Student's t-test, $p < 0.05$).

알아보기 위하여 총 γ GT mRNA의 발현 정도를 RT-PCR로 측정하였다. 본 실험에서는 β_2 -microglobulin mRNA 양을 internal standard로 사용하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 β_2 -microglobulin의 발현 정도는 대조군과 CYP2E1 overexpressing 세포에서 유의성 있는 차이를 나타내지 않았지만 총 γ GT mRNA의 발현 정도는 Image analysis system을 통하여 밴드 세기를 정량화하였을 때 CYP2E1 overexpressing 세포에서 유의성 있게 약 2.1배 증가하였다. γ GT의 활성과 총 γ GT mRNA의 발현 정도가 CYP2E1 overexpressing 세포에서 상관관계를 나타내었으므로 CYP2E1의 transfection에 의한 변화가 HepG2 세포에서 γ GT 발현을 mRNA 수준에서 조절하여 γ GT 활성 증가를 유발함을 알 수 있었다.

4. 항산화제 처리가 γ GT 활성에 미치는 영향

CYP2E1 overexpressing 세포에서의 γ GT 활성 증가가 CYP2E1에 의해 발생하는 활성 산소에 의해 매개되었는지를 알아보기 위해서 항산화제인 GSH ethyl ester(GSH-EE)를 처리하고 γ GT 활성의 변화를 알아보았다. GSH-EE는 사람 세포 안으로 효율적으로 운반되며 세포 안에서 GSH로 전환되므로²²⁾ GSH 처리보다 더욱 효율적으로 활성 산소를 제거할 수 있는 항산화제 처리이다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 GSH-EE는 대조군 세포에서는 γ GT 활성의 변화를 유발하지 않았지만 CYP2E1 overexpressing 세포에서는 γ GT 활성을 강하게 억제하여 CYP2E1에 의해 발생하는 활성 산소에 의해 γ GT가 유도됨을 알 수 있었다.

5. 세포 독성 유발 정도와 GSH 함량에 미치는 영향

CYP2E1 overexpression에 의한 지속적인 활성 산소

의 발생에 의해 세포에서 독성이 유발되었는지 알아보기 위해 LDH 유리와 MTT assay를 수행하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 본 실험 조건에서 CYP2E1 overexpressing 세포에서 viability의 감소와 LDH 효소의 세포 밖으로의 유리가 관찰되지 않아 CYP2E1에 의한 활성 산소에 의해 세포 독성이 유발되지는 않았음을 알 수 있었다.

GSH 농도의 조절은 세포 항산화 반응의 중요한 요소 중 하나이다. γ GT 활성의 증가가 GSH 함량에 영향을 줄 수 있으므로 CYP2E1 overexpressing 세포에서 GSH 농도의 변화를 관찰하였다. 본 실험 조건에서 CYP2E1 overexpressing 세포에서 약 37%의 GSH 농도 증가가 관찰되었다(Table 3). CYP2E1 overexpressing 세포에서 세포내의 활성 산소 농도가 더 높았지만 더 높은 GSH 농도를 나타내었다. 이는 CYP2E1 overexpressing 세포에서 GSH의 turnover가 더 빠르게 일어나기 때문이라고 사료된다.

산화적 스트레스가 매우 강력하게 작용하면 세포는 사멸하게 되지만 미약하게 작용하면 세포는 살아남기 위해 그 산화적 스트레스에 대항하는 항산화 방어 시

Table 3. Effect of CYP2E1 on LDH release, cell viability and GSH level

	Control cells	CYP2E1 cells
LDH (ex/in)	0.32 \pm 0.08	0.29 \pm 0.07
MTT (% viability)	100 \pm 4	97 \pm 6
GSH (nmol/mg)	39.2 \pm 2.1	53.7 \pm 3.1*

After 48 h of subcell culture, LDH release, cell viability and GSH level were determined as described under Materials and Methods. Values are the mean \pm S.D. of 3 individual determinations. Asterisk indicates a significant difference from the control cells (Student's t-test, $p < 0.05$).

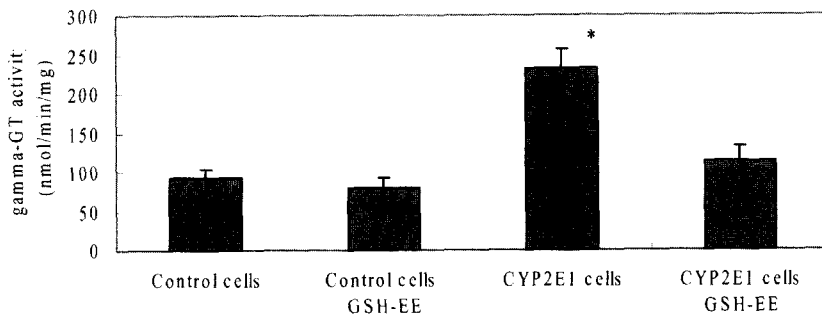


Fig. 2. Effect of GSH-EE on γ GT activity of control and CYP2E1 cells. Cells were treated with 2.5 mM GSH-EE. After 48 h of incubation with GSH-EE, γ GT activity was determined under Materials and Methods. The results are expressed as means \pm S.D. of three cell preparation. Asterisk indicates a significant difference from the control (Student' t-test, $p < 0.05$ versus control HepG2 cells).

시스템을 작동시킨다. 이처럼 세포가 산화적 공격에 노출 되었을 때 산화적 공격에 대한 적응 반응은 세포의 생명 유지에 있어서 매우 중요하다. γ GT는 일반적으로 γ -glutamyl cycle을 통해 세포 외 GSH 사용을 증가시켜 세포 내 GSH 합성을 도와주므로, 증가된 γ GT 활성은 여러 세포에서 산화적 공격에 대해 강한 저항력을 제공할 수 있다. γ GT 활성이 큰 간세포는 γ GT 활성이 낮은 간세포보다 산화적 스트레스를 유발하는 화학물질에 대해 더 강한 저항력을 가진다고 알려졌다.²³⁾ 세포가 방사능 환경에 노출되었을 때 γ GT 활성이 증가되었고 이 증가된 활성에 의해 GSH 농도가 증가됨이 보고 되었다.²⁴⁾ 이렇게 γ GT 효소는 GSH 의존 해독화 및 항산화 과정에서 중요한 역할을 하므로 이 효소의 활성증가는 어떤 산화적 자극에 대해 세포의 방어 시스템이 가동되었다고 해석할 수 있다. 본 실험 조건에서 CYP2E1에 의한 활성 산소 발생은 세포 항산화 방어 시스템을 완전히 파괴시킬 정도로 강력한 산화적 스트레스를 유발하지 않았고 항산화제(GSH-EE) 처리에 의해 γ GT 활성 감소를 나타냈다. 따라서 본 연구에서 나타난 γ GT 발현과 활성 증가는 CYP2E1 의해 유발된 산화적 스트레스에 대항하는 세포 항산화 방어 작용들 중 하나라고 사료된다.

CYP2E1의 transfection에 의한 지속적인 활성 산소 노출 모델은 Fe-NTA, CuOOH, ADP-Fe, TPA, TNF- α 등과 같이 시간이 지남에 따라 활성 산소 발생능이 떨어지는 화학물질을 사용한 급성적 산화적 스트레스 유발 모델과 다른 차별성을 가진다. 본 연구에서는 화학물질처리에 의한 급성적 산화적 스트레스 유발은 γ GT 활성에 영향을 미치지 못했지만 CYP2E1의 transfection에 의한 지속적인 활성 산소 노출 모델은 유의적으로 γ GT의 발현과 활성에 변화를 유발하여 차별성 있는 결과를 나타내었다. 산화적 스트레스도 그 성격이나 기간에 따라 세포의 항산화 방어 시스템에 미치는 영향이 다르게 나타날 수 있음을 보여준다. 실제 인간이 환경 오염에 의한 산화적 스트레스에 노출될 때는 만성적인 경우가 많다. 만성적 산화적 스트레스에 대해 신체는 살아남기 위해 적응 반응을 유도하여 지속적인 산화적 스트레스에 대한 세포 손상을 최소화하게 된다. 본 실험에 사용한 CYP2E1 유전자의 transfection에 의한 지속적인 활성 산소 노출 모델은 화학물질처리 급성 산화적 스트레스 모델보다 더 실제의 생리적 산화적 스트레스 상황과 유사하며 적응 반응이 일어난 만성적인 상태를 잘 반영한다. CYP2E1 transfection은 세포에 지속적인 활성 산소 노출이 가능하다는 장점 외에도 이 CYP2E1 효소는 ethanol, acetone,

benzene, toluene, ethylbenzene, dimethylsulfoxide, glycerol, pyridine 등 방향족 탄화수소를 포함하는 여러 종류의 유기 용제류 노출에 의해 쉽게 생체에서 유도되므로 만성적인 산업 용매 노출에 의한 산화적 스트레스 유발을 잘 반영할 수 있다.^{9,12)}

몇몇 연구에서 증가된 γ GT 활성은 화학물질에 의한 간 손상의 지표로서도 이용되어 왔다. 그러나 본 실험 조건에서 CYP2E1이 transfection된 세포는 대조군과 비교하였을 때 viability 감소와 LDH 유리와 같은 독성 지표의 변화를 유발하지 않았다. 이러한 결과는 γ GT 발현의 증가가 세포 독성 유발과 함께 나타나는 현상이라기 보다는 CYP2E1에 의한 활성 산소에 대한 세포 적응 반응이라는 것을 제시한다. 따라서 본 연구에서는 γ GT가 독성 지표라기보다는 오히려 유기 용제류 노출에 대한 체내 산화적 스트레스를 잘 반영하는 지표로 사용될 수 있는 가능성을 제시하여 준다.

IV. 결 론

활성 산소의 발생은 환경 오염에 의해 영향을 받으며 많은 환경 오염 물질들은 자유 라디칼을 발생시킴으로써 생명체에 유해한 작용을 유발할 수 있다. 이러한 환경의 산화적 공격에 대항하여 항산화 방어 시스템을 유도하는 것은 세포의 생존에 있어서 매우 중요한 요소이다. CYP2E1은 방향족 탄화수소를 포함하는 다양한 유기 용제류에 의해 쉽게 유도되며 기질이 없는 상태에서도 지속적으로 활성 산소를 발생시킬 수 있는 특징을 가진 효소이다. γ GT는 GSH 대사와 xenobiotic의 해독화에서 중요한 역할을 하는 효소이다. 본 연구에서는 γ GT의 발현을 유도하는 산화적 스트레스의 경향을 알아보기 위해 그리고 유기 용제류 만성적인 노출 시에 흔히 나타나는 CYP2E1 유도 현상에 대한 인체 항산화 방어 반응을 연구하기 위해 사람 간 세포주인 HepG2 세포를 다양한 종류의 산화적 스트레스에 노출시키고 γ GT 발현과 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 세포를 Fe-NTA, CuOOH, ADP-Fe, TPA 또는 TNF- α 와 같이 급성적으로 활성 산소를 발생시키는 화학물질에 노출시킨 후에는 γ GT 활성에 변화가 없었다. 세포를 활성 산소에 지속적으로 노출시키기 위해, HepG2 세포에 사람 CYP2E1 유전자를 transient transfection시켰다. 선택적인 기질인 chlorzoxazone이 hydroxylation이 되는 정도로 CYP2E1 활성을 확인하였으며 transfection된 세포에서는 대조군 세포에 비해 60%의 지속적인 세포 내 활성산소의 발생 증가와 240%의 마이크로솜의 활성 산소 발생 증가가

관찰되었다. CYP2E1 overexpressing 세포는 2.5배의 γ GT 활성 증가를 나타내었고 2.1배의 γ GT mRNA 발현 증가를 나타내었다. 항산화제 처리는 CYP2E1 overexpressing 세포에서 γ GT 활성을 강하게 억제하여 CYP2E1에 의한 활성산소에 의해 γ GT를 유도함을 알 수 있었다. CYP2E1 overexpression에 의한 지속적인 활성산소 노출은 세포에서 viability 감소와 LDH 유리와 같은 독성 지표에 변화를 유발하지 않았으며 GSH 농도 증가를 유도하였다. 본 연구는 CYP2E1에 의해 유발된 지속적인 활성 산소 노출이 세포에서 γ GT의 발현과 활성을 증가시킴을 보여준다. 이러한 γ GT의 발현 증가는 산화적 공격에 대항하는 세포 항산화 적응 반응 중 하나로 여겨진다. 본 연구는 또한 γ GT가 독성 지표라기보다는 오히려 유기 용제류 노출에 대한 체내 산화적 스트레스를 잘 반영하는 지표로 사용될 수 있는 가능성을 보여준다.

참고문헌

- Wasowicz, W., Gromadzinska, J., Rydzinski, K. and Skoldowska, M. : Glutathione peroxidase, selenium content and TBARS concentration in the blood of workers of a petrochemical plant. *Medichem International Congress*, Varna, Bulgaria, 1997.
- 김현희, 조현성, 윤종국 : 급성 간손상 실험동물에 Cyclohexanone 투여가 Oxygen Free Radical 대사효소 활성에 미치는 영향. *한국환경위생학회지*, **28**, 81-88, 2002.
- Cavalieri, E. L. and Rogan, E. G. : Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica*, **25**, 677-688, 1995.
- 채순님, 이상희, 조현국, 윤종국, 이상일 : 간손상 유발 실험동물에서 Toluene의 피부독성. *한국환경위생학회지*, **27**, 22-29, 2001.
- Meister, A. and Anderson, M. E. : Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 711-760, 1983.
- Hanigan, M. H. and Pitot, H. C. : Gamma-glutamyl transpeptidase. *Carcinogenesis*, **6**, 165-172, 1985.
- Tsutsumi, M., Sakamuro, D., Takada, A., Zang, S. C., Furukawa, T. and Taniguchi, N. : Detection of a unique gamma-glutamyl transpeptidase messenger RNA species closely related to the development of hepatocellular carcinoma in humans: a new candidate for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **23**, 1093-1097, 1996.
- Albert, Z., Rzcidlo, Z. and Starzyk, H. : Biochemical and histochemical investigations of the gamma glutamyl transpeptidase in embryonal and adult organs of man. *Acta Histochemica*, **37**, 74-79, 1970.
- Lieber, C. S. : Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiological Review*, **77**, 517-544, 1997.
- Ingelman-Sundberg, M. and Hagbjork, A. L. : On the significance of the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica*, **12**, 673-686, 1982.
- Park, D. V. : Personal reflections on 50 years of study of benzene toxicology. *Environmental Health Perspectives*, **104**, Suppl 6, 1123-1128, 1996.
- Serron, S. C., Dwivedi, N. and Backes, W. L. : Ethylbenzene induces microsomal oxygen free radical generation: antibody-directed characterization of the responsible cytochrome P450 enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **164**, 305-311, 2000.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, 1951.
- Szasz, G. : A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clinical Chemistry*, **15**, 124-136, 1969.
- Peter, R., Bocker, R., Beaune, P. H., Iwasaki, M., Guengerich, F. P. and Yang, C. S. : Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chemical Research in Toxicology*, **3**, 566-573, 1990.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. : Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, **119**, 203-210, 1989.
- Pu, H., Sakaguchi, M., Kondo, T., Kondo, A., Kawabata, T. and Namba, M. : Effects of oxygen concentrations on human fibroblasts treated with Fe(3+)-NTA. *International Journal of Molecular Medicine*, **7**, 295-300, 2001.
- Tang, X. L., Takano, H., Rizvi, A., Turrens, J. F., Qiu, Y., Wu, W. J., Zhang, Q. and Bolli, R. : Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **282**, H281-H291, 2002.
- Niederer, C., Schulz, H. U. and Klonowski, H. : Lazaroids protect isolated rat pancreatic acinar cells against damage induced by free radicals. *Pancreas*, **11**, 107-121, 1995.
- Park, K. K., Park, J. H., Jung, Y. J. and Chung, W. Y. : Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis (4-benzoic acid)porphyrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism. *Mutation Research*, **542**, 89-97, 2003.
- Yamagishi, S., Inagaki, Y., Nakamura, K. and Imaizumi, T. : Azelnidipine A newly developed long-acting calcium antagonist, inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 expression in endothelial cells through its anti-oxidative properties. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **43**, 724-730, 2004.

22. Levy, E. J., Anderson, M. E. and Meister, A. : Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 9171-9175, 1993.
23. Hanigan, M. H. and Pitot, H. C. : Gamma-glutamyl transpeptidase--its role in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, **6**, 165-172, 1985.
24. Sierra-Rivera, E., Meredith, M. J., Summar, M. L., Smith, M. D., Voorhees, G. J., Stoffel, C. M. and Freeman, M. L. : Genes regulating glutathione concentrations in X-ray-transformed rat embryo fibroblasts: changes in gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyltranspeptidase expression. *Carcinogenesis*, **15**, 1301-1307, 1994.