

## 사람의 정상 피부세포 및 폐세포의 발암에 미치는 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin의 영향

강미경<sup>1,2</sup> · 엽태경<sup>1</sup> · 김강련<sup>2</sup> · 김옥희<sup>1</sup> · 강호일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전청

<sup>2</sup>고신대학교 의과대학연구소

## Tumorigenic Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin in Normal Human Skin and Lung Fibroblasts.

Mi Kyung Kang<sup>1,2</sup>, Tai Kyung Ryeom<sup>1</sup>, Kang Ryune Kim<sup>2</sup>, Ok Hee Kim<sup>1</sup>, and Hoil Kang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

<sup>2</sup>Institute for Medical Science, Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

(Received July 2, 2006 / Accepted July 27, 2006)

**ABSTRACT :** 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD) displays high toxicity in animals and has been implicated in human carcinogenesis. Although TCDD is recognized as potent carcinogens, relatively little is known about their role in the tumor promotion and carcinogenesis. It is known that TCDD can increase of cancer risk from various types of tissue by a mechanism possibly involving the aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation. In this study, effects of TCDD on cellular proliferation of normal human skin and lung fibroblasts, Detroit551 and WI38 cells were investigated. In addition, to enhance our understanding of TCDD-mediated carcinogenesis, we have investigated process in which expression of Erk1/2, cyclinD1, oncogene such as Ha-ras and c-myc, and their cognate signaling pathway. TCDD that are potent activators of AhR-mediated activity was found to induce significant increase of cytochrome P4501A1 mRNA expression, suggesting a presence of functional AhR. These results support that CYP1A1 enzyme may be involved in the generation of TCDD-induced toxicity. Moreover mitogen-activated protein kinases (MAPKs) phosphorylation and cyclin D1 overexpression are induced by TCDD, which corresponded with the progression of cellular proliferation. However, TCDD did not affected Ha-ras and c-myc mRNA expression. Taken together, it seems that TCDD are could be a part of cellular proliferation in non-tumorigenic normal human cells such as Detroit551 and WI38 cells through the upregulation of MAPKs signaling pathway regulating growth of cell population. Therefore, AhR-activating TCDD could potentially contribute to tumor promotion and Detroit551 and WI38 cells have been used as a detection system of tumorigenic effects of TCDD.

**Key words :** 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin, aryl hydrocarbon receptor, cytochrom P4501A1, Detroit551, WI38, mitogen-activated protein kinases

### 서 론

내분비계 장애 물질인 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD)은 방향족 할로겐 화합물 (Halogenated aromatic hydrocarbons, HAHs)중 국제암연구기관 (the International Agency for Research on Cancer, IARC)이 규정한 제1급의 발암물질로 (IARC, 1997), 각종 화합물 제조과정이나 폐기물 소각, 자동차 엔진과 같은 내연기관 연소 또는 흡연 등과 같은 과정에서 흔히 발생한다 (Safe, 1990; Van den

Berg *et al.*, 1998). 특히 TCDD는 인체에서의 반감기가 7.6년으로 (Michalek and Tripathi, 1999) 유입시 거의 배설되지 않고 강한 지용성 성질로 인하여 지방조직에 축적되는 것이 특징이다 (Byard, 1987). 또한 TCDD는 비유전독성 발암 촉진 물질로서 DNA와 결합하지 않으나 유전자 발현 변화를 초래하여 (Poland and Glover, 1979; Geiger and Neal, 1981), 실험동물에서 강력한 발암 촉진물질로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Poland and Kuntson, 1982; Tanaka *et al.*, 1989). TCDD는 설치류에서 흉선퇴행 (thymic involution), 면역기능저하 (immunosuppression), 간독성 (hepatotoxicity)을 나타내고 기형 (teratogenesis)을 유

\*To whom correspondence should be addressed

발하는 것으로 보고되어 있다 (Whitlock, 1993). 반면, 사람에서는 염소좌창 (chloracne)과 같은 피부염증을 수반하는 등 다양한 종 특이적, 조직 특이적인 독성을 나타내는 것으로 보고되어 있다 (Tyler, 1979).

TCDD의 독성 작용과 aryl hydrocarbon receptor (AhR)의 관계가 보고된 이래 (Poland and Glover, 1979), TCDD의 다양한 독성 및 발암 기전을 AhR/AhR에 의한 약물대사 효소 전사 증가에 의한 세포 기능 변화의 한 요인으로서 해석하는 연구가 진행되고 있다. 많은 연구에 의해서 TCDD는 세포질에 존재하는 수용체인 aromatic hydrocarbon receptor (AhR)와 결합하여 활성을 유도하고 핵으로 이동되어, 핵내의 AhR nuclear translocator (Arnt)와 AhR/Arnt heterodimer를 형성함으로써 cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)의 전사를 증가시킨다고 보고되었다 (Andersson *et al.*, 2002; Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). 이처럼 AhR을 통한 CYP1A1 등의 전사증가 기전이 분자수준에서 자세히 밝혀지기는 하였으나, 종양발생 기전을 설명하기에는 불충분하며 설치류를 대상으로 한 실험이 대부분이다. 또한 TCDD에 의한 CYP1A1 전사증가와 세포 증식 및 발암에 이르는 세포내 생물학적 기전 간의 직접적 인과성에 대한 연구는 빈약한 실정이다.

몇몇의 보고에 의하면 TCDD는 plasminogen activator inhibitors-2 (PAI-2), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )등의 성장조절에 관여하는 유전자 발현 변화를 유도하고 (Comer *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1999), Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)와 activator protein-1 (AP-1)과 같은 전사인자 활성을 초래하여 발암을 초래한다고 하였다 (Puga *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2002). 또한 AhR를 경유한 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 신호전달계의 활성화시켜 세포증식 및 사멸을 조절하는데 중요한 역할을 한다는 실험적 증거들이 보고되고 있다 (Enan and Matumura, 1993; Bombick and Matsu-muta, 1987). 그러나 AhR의 존재와 상관없이 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시키고 MAPKs 신호전달계의 활성화로 CYP1A1의 발현이 조절되어 암화가 촉진된다는 상반된 결과도 보고되고 있다 (Holsapple *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2002). 따라서 TCDD에 의한 세포 내 신호전달체계에 미치는 영향 및 대사 관련 효소의 발현에 있어 AhR를 제외한 다른 전사인자에 의한 조절 가능성을 분자 수준에서 규명함으로써 TCDD의 종양촉진 유도 작용을 다각적으로 확인하는 것이 필요하다.

본 연구에서는 TCDD의 발암 유도 기전을 연구하기 위하여, 사람의 정상 피부세포 유래의 Detroit551과 정상 폐세포 유래의 WI38 세포주를 대상으로 세포증식에 미치는 효과를

조사하고 대사활성화에 중요한 역할을 하는 CYP1A1 유도를 관찰하였다. 또한 종양촉진 과정을 매개하는 대표적 세포 내 신호전달과 관련된 MAPKs 인자와 세포주기조절인자 및 발암유전자 발현에 미치는 영향을 조사함으로써 TCDD에 의한 종양 촉진 과정의 작용기전을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)은 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Austin, TX, USA)에서, minimum essential medium (MEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin, sodium pyruvate solution, sodium bicarbonate solution은 Gibco BRL사 (Gland Island, NY, USA), Total RNA 분리용 키트는 Quiagen (Volencia, CA, USA)으로부터 구입하였다. 그 외의 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

### 세포주 및 배양조건

TCDD의 표적세포로 알려진 피부 및 폐세포를 대상으로 실험을 실시하였다. 사람 정상 피부세포 (Detroit551)와 정상 폐세포 (WI38)는 각각 ATCC사 (Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 두 세포는 10% FBS, 100  $\mu$ g/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 및 1.5 g/L sodium bicarbonate를 첨가한 minimum essential medium (MEM)에서 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 사람 정상세포의 세포독성에 미치는 TCDD의 영향 조사

사람의 정상 피부세포 Detroit551 및 정상 폐세포 WI38 세포의 세포독성효과는 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 방법으로 조사하였다. 96-well cell culture plate에 Detroit551 및 WI38 세포를  $2 \times 10^4$ 씩 seeding하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양조건에서 overnight하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 TCDD를 농도별 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)로 48시간 동안 처리하고 하였다. 이때 DMSO는 세포 배양액에 대하여 0.1% 미만으로 처리하였다. 배양 48시간 후 medium을 제거하고 인산완충용액으로 희석된 2 mg/ml의 MTT 용액을 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 150  $\mu$ l의 DMSO를 넣은 후 10분간 잘 혼합하여 formazan crystal을 용해시키고 microplate reader (E-max, Molecular Device, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 시험 결과는 세포를 배양하지 않은

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for gene expression analysis by RT-PCR.

Gene product	Sequence	Annealing (°C)	Cycles (No.)	Size (bp)
AhR	FP:TCCACAGCAAGACCCACAAC RP:AGGGTCAAAATTGGGCTTGG	55	30	578
Arnt	FP:CGGAACAAGATGACAGCCTAC RP:ACAGAAAGCCATCTGCTGCC	65	30	225
CYP1A1	FP:CGTCCCCTTACCATCCCC RP:CCAGGGTAGGGCAGGCAGG	57	30	340
c-myc	FP:AAGTCCAACCCCTCCAAGCGA RP:ACCAGAGCAAAGCCATTAAG	65	30	338
Ha-ras	FP:CAAGAGTGCGCTGACCATCC RP:CCGGATCTCACGCCAAC	64	28	450
GAPDH	FP:ACCACAGTCCATGCCATCAC RP:TCCACCACCCTGTTGCTGIA	65	28	518

FP, forward primers; RP, reverse primers.

well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정하였으며, TCDD에 대한 각 세포의 생존율은 시험물질이 처리되지 않은 대조군과 비교하여 백분율로 환산하였다 (OD of treated well/OD of control well ×100).

**사람 정상세포의 세포성장에 미치는 TCDD의 영향 조사**

사람 정상 세포의 성장에 미치는 TCDD의 효과를 조사하기 위하여 Detroit551 세포 및 WI38 세포를 24-well plate에 각각 5 × 10<sup>4</sup> cells/well로 seeding 하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양조건에서 overnight 하였다. 각각의 세포주에 10 nM의 TCDD를 처리하고 5일 동안 배양한 후 0.4% trypan blue 용액과 잘 혼합한 다음 광학현미경 하에서 생존 세포를 계수하였다.

**RT-PCR analysis**

Detroit551 및 WI38 세포에 TCDD를 농도 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM) 및 시간 (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 hr)에 따라 처리하고 배양하였다. TCDD 처리 세포로부터 RNeasy mini kit (Qiagen)을 사용하여 제공된 프로토콜에 따라 total RNA를 분리한 후 260/280 nm에서의 흡광도를 측정하고 agarose 전기영동으로 total RNA의 농도와 순도를 확인하였다. mRNA의 발현은 AccuPower RT PreMix (Bioneer)를 사용하여 RT-PCR로 조사하였다. Total RNA 1.0 µg과 3'primer를 70°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음에 방치하여 냉각하고 5'primer와 AccuPower RT PreMix (Bioneer) tube에 넣어 RT-PCR을 수행하였다. 사용한 primer 및 PCR 조건은 Table 1에 요약하였다. RT-PCR 산물의 확인은 1.5% agarose gel로 전기영동하여 Gel-Doc

(Bio-Rad) 및 Quantity one (Bio-Rad)으로 분석을 하였다.

**Western blot analysis**

Detroit551 및 WI38 세포에 10 nM의 TCDD를 시간 (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24, 48 hr)에 따라 처리한 후, 배양액을 버리고 PBS용액으로 세포를 세척한 후 스크래퍼로 세포를 떼어내어 1500 rpm에서 5분 동안 세포를 원심 분리하였다. 세포 pellet에 100 µl의 cell lysis buffer [20mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% Igapel 630, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml leupeptin]를 넣은 다음 얼음에서 40분간 방치 한 후 4°C, 15,000 rpm에서 20분간 원심분리를 하여 protein lysate를 얻었다. 단백질량은 Bio-Rad protein kit를 사용하여 측정하였고, 정량된 단백질 30 µg을 12% SDS-PAGE 방법으로 전기영동 하였다. 전개시킨 gel을 PVDF membrane에 옮긴 후 5% fat-free dry milk-TBST (Tris buffered saline with 0.05% Tween-20)로 1시간 동안 차단하였다. 5% fat-free dry milk-TBST에 primary antibody (phospho-Raf-1, 1:1000, Cell Signaling; phospho-MEK1/2, 1:1000, Cell Signaling; phospho-Erk, 1:1000, Cell Signaling; Cyclin D1, 1:1000, Pharmingen; actin, 1:1500, Sigma)를 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시키고 TBST용액으로 5분간 5회 세척 한 후 secondary antibody를 1시간 동안 처리한 다음 TBST용액으로 5분간 5회 세척하였다. Enhanced chemoluminescence (ECL) reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응시킨 뒤 ECL-hyper film에 노출시켜 단백질을 확인하였다.

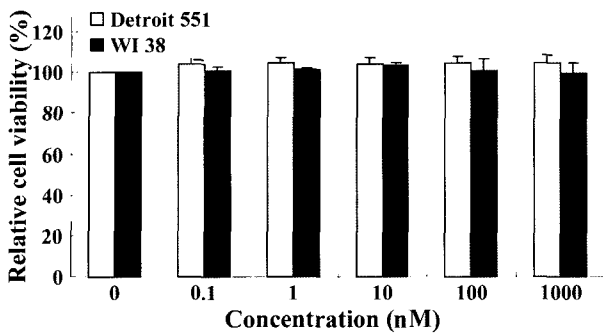


Fig. 1. Effects of TCDD on the cell viability of Detroit551 and WI38 cells. The cells were treated with various concentration of TCDD for 24 hrs and cell viabilities were determined by MTT assay as described in Materials and methods. Results of triplicate samples were expressed as mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.05$  vs none.

#### 통계학적 분석

본 연구에서 얻어진 자료의 통계학적 분석을 위하여 unpaired student t-test를 사용하였으며  $p < 0.05$  수준 이하에서 유의성을 결정하였다.

## 결 과

#### 사람 정상세포의 세포독성에 미치는 TCDD의 효과

TCDD의 표적기관 중 하나인 피부 세포와 폐세포에 미치는 TCDD의 영향을 알아보기 위하여, 사람의 정상 피부세포인 Detroit551 세포와 정상 폐 세포인 WI38 세포에 TCDD를 각각 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM의 농도로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 수행하였다 (Fig. 1). Fig. 1에서와 같이 Detroit551 및 WI38 세포주에서 TCDD의 처리농도가 높아짐에도 불구하고 TCDD에 의한 세포 독성에 의한 세포 사멸은 일어나지 않았다. 특히 고농도인 1000 nM의 TCDD를 24시간 동안 처리시, Detroit551 및 WI38 세포는 TCDD를 처리하지 않은 대조군과 비슷한 세포 성장을 나타내 TCDD에 의한 세포성장 저해 효과를 관찰할 수 없었다.

#### 사람 정상 세포에서 TCDD에 의한 AhR, Arnt 및 CYP1A1 mRNA 발현 변화

TCDD에 의한 Detroit551과 WI38 세포의 성장효과와 AhR과의 상호연관성이 있는지 알아보기 위하여, AhR 및 Arnt mRNA의 발현변화를 조사하였다. 두 종류의 세포주에 TCDD를 농도별 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nM)로 24시간 동안 처리하고 농도에 따른 AhR 및 Arnt mRNA의 발현 양상을 RT-PCR로 확인하였다. 또한 TCDD에 의해 유도되는 것으로 알려진 CYP1A1 mRNA의 전사 수준을 조사하였다. 그 결과 AhR 및 Arnt mRNA 발현 양상은 세포에

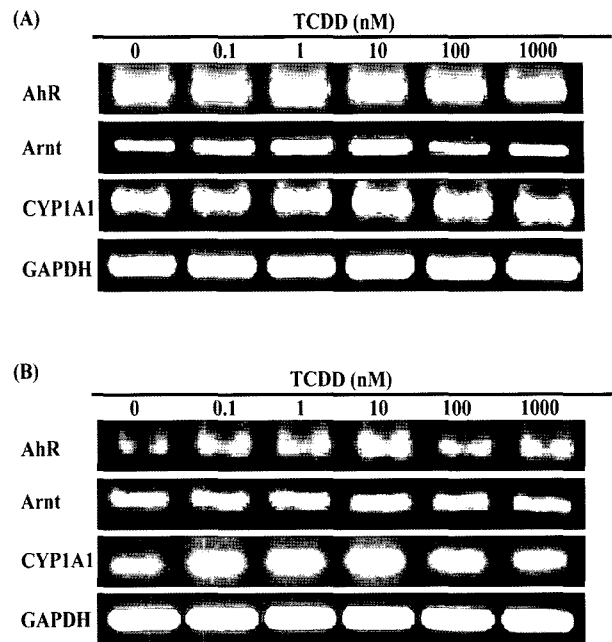


Fig. 2. RT-PCR analysis of AhR, Arnt and CYP1A1 mRNA expression induced by various concentration of TCDD in Detroit551 (A) and WI38 (B) cells. Total RNA was isolated from TCDD-stimulated cells at various concentration for 24 hr. AhR, Arnt and CYP1A1 mRNA were measured by RT-PCR as described in Materials and Methods. Expression of GAPDH was monitored as an internal control. The results shown are a representative for three independent experiments.

따라 다르게 나타났는데, Detroit551 세포에서 AhR mRNA가 TCDD 농도에 관계없이 일정하게 발현되었으나 Arnt mRNA는 농도 의존적으로 10nM까지 증가하다가 다시 감소되었다 (Fig. 2A). 반면 WI38 세포의 경우 AhR mRNA 및 Arnt mRNA 발현은 농도 의존적으로 증가되어 10nM에서 최대로 증가되었다가 다소 감소되었다 (Fig. 2B). 한편 CYP1A1 mRNA의 발현은 두 세포 모두에서 TCDD 농도 의존적으로 점점 증가하여 10nM에서 최대를 나타내며 그 이상의 농도에서는 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B). 따라서, 두 세포주에서 AhR, Arnt 및 CYP1A1 mRNA의 발현에 가장 효과적인 TCDD의 농도는 10 nM이었으며, AhR 및 Arnt mRNA의 발현이 증가됨에 따라 CYP1A1 약물대사효소의 발현 또한 증가되는 것으로 관찰되었다 (Fig. 2).

이와 아울러, Detroit551 및 WI38세포주에서 TCDD의 처리시간에 따른 AhR, Arnt 및 CYP1A1 mRNAs의 발현 양상을 알아보기 위하여, 각각의 세포주에 10 nM의 TCDD를 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 및 48시간 동안 처리한 후 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다 (Fig. 3). 두

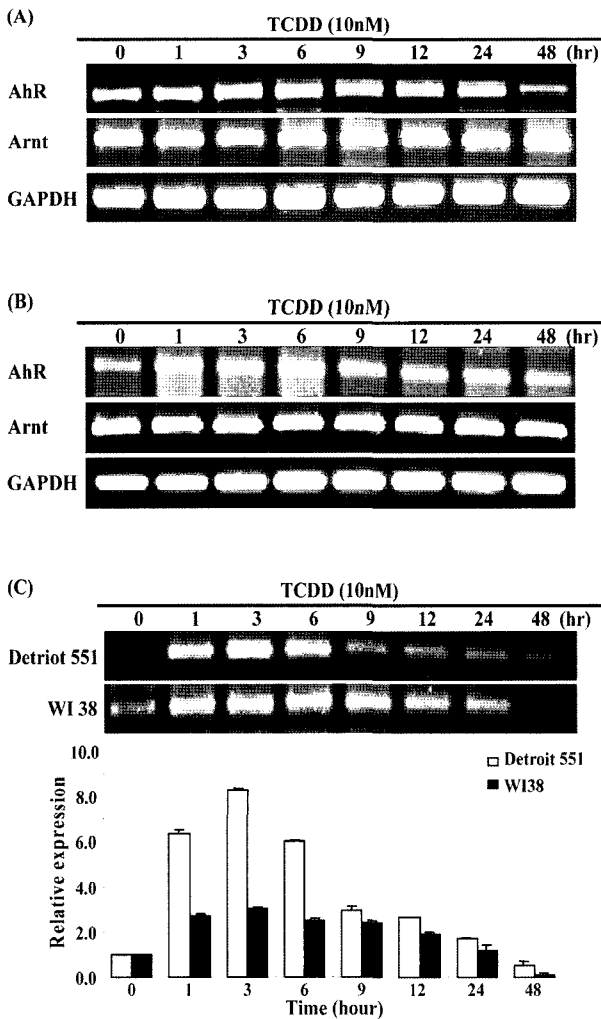


Fig. 3. RT-PCR analysis of AhR, Arnt and CYP1A1 mRNA expression induced by 10 nM of TCDD. Total RNA was isolated from TCDD-stimulated cells at various time intervals. AhR and Arnt mRNA were measured by RT-PCR in Detroit551 (A) and WI38 (B) cells as described in Materials and Methods. Expression of GAPDH was monitored as an internal control. CYP1A1 mRNA of Detroit551 and WI38 were measured by RT-PCR (C) and relative CYP1A1 mRNA values were normalized by untreated cells. The results shown are a representative for three independent experiments.

세포주의 경우 TCDD를 처리하지 않은 경우에도 AhR나 Arnt mRNA가 발현되는 것을 관찰할 수 있었으며, AhR mRNA는 TCDD 처리후 6시간까지 발현이 서서히 증가되다가 다시 감소되었으나 Arnt mRNA는 시간에 따른 발현 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 3A and B). 한편, TCDD의 CYP1A1 mRNA의 시간적 발현은 세포주에 따라 사소 상이한 결과를 보였다. Detroit551 세포의 CYP1A1 mRNA의 발현은 TCDD 처리 1시간 이내에 급격히 증가하여 3시

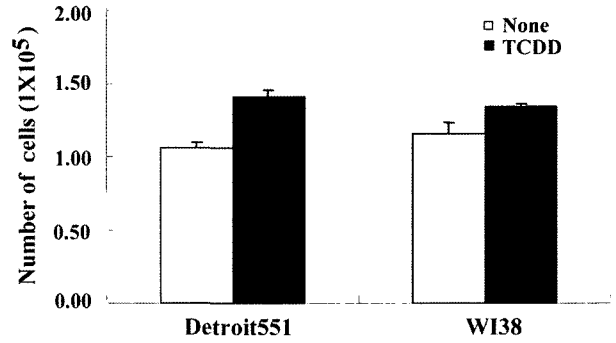


Fig. 4. Effects of TCDD on the cell proliferation of Detroit551 and WI38 cells. The cells were treated with 10 nM of TCDD for 5 days, and cell proliferation were determined by trypanblue exculsion method as described in Materials and Methods. Results of triplicate samples were expressed as mean  $\pm$  SD. \*\**p* < 0.05 vs none.

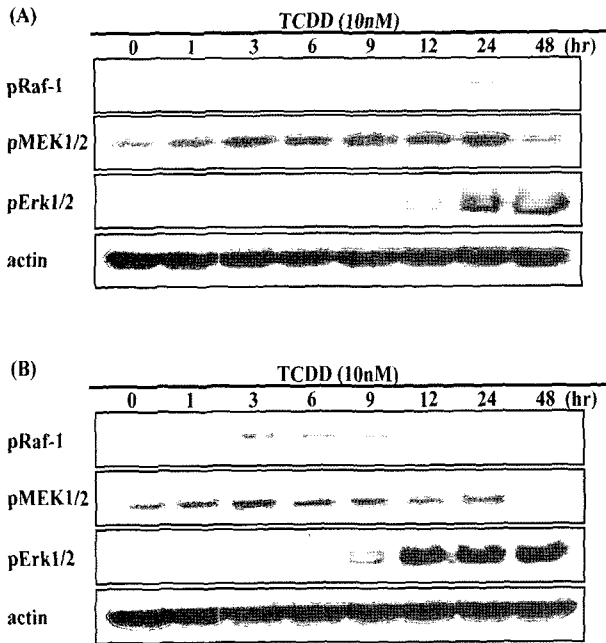
간 이후에 최대 발현되었으며 6시간 이후에 급격한 발현 감소 현상을 나타내며 24시간까지 발현되었다. 한편 WI38 세포에서는 TCDD 처리 1시간 이후에 증가되었다가 3시간대에 최대 발현되다가 24시간까지 서서히 감소되었다 (Fig. 3C). 사람의 정상 피부 세포인 Detroit551과 정상 폐 세포인 WI38 세포에서 TCDD에 의한 CYP1A1 mRNA의 최대 발현은 3시간대에 관찰되었으며, TCDD를 처리하지 않은 대조군과 비교시 각각  $8.28 \pm 0.12$ ,  $3.01 \pm 0.05$  배로 발현이 증가되는 것으로 조사되었다.

#### 사람 정상 세포의 세포 증식에 미치는 TCDD의 효과

Detroit551 세포와 WI38세포의 MTT assay에서 관찰된 TCDD에 의한 세포 성장 효과를 자세히 알아보기 위하여, 두 세포주에 10 nM의 TCDD를 처리하고 5일간 배양한 후 Trypan Blue 추출법으로 세포수를 계수하였다. 10 nM의 TCDD에 의해서 두 세포주의 세포 증식이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었는데, 두 세포주에서의 세포 증식 효과는 WI38세포에서보다 Detroit551 세포에서 더욱 효과적이었다 (Fig. 4). TCDD를 처리하지 않은 대조군과 비교시 Detroit551 세포와 WI38 세포는 각각  $33.23 \pm 7.71\%$ 와  $17.57 \pm 1.27\%$  정도의 세포 증식이 일어난 것으로 조사되었다 (Fig. 4).

#### 사람 정상 세포의 MAPKs 신호전달 과정 및 세포주기에 미치는 TCDD의 영향

TCDD에 의한 정상 피부 및 폐 세포의 세포 증식과 종양 촉진 과정에서 비정상적으로 증가하는 단백질들의 인산화와의 상호 관련 여부를 알아보기 위하여, 10 nM의 TCDD를 시간대별 (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 및 48시간)로 처리한

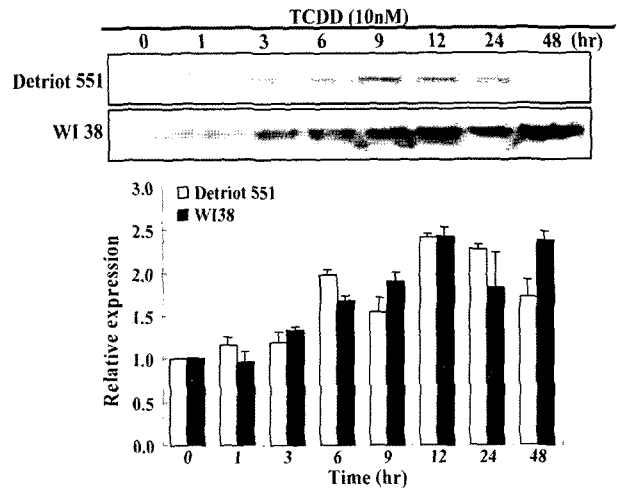


**Fig. 5.** Time course of TCDD-induced pRaf, pMEK1/2 and pErk1/2 protein expression in Detroit551 (A) and W138 (B) cells. The cells were stimulated with 10 nM TCDD for the indicated time periods. The expression level of each protein was measured by Western blot analysis as described in Materials and Methods. Actin protein was used as an equal loading control. The results shown are a representative for three independent experiments.

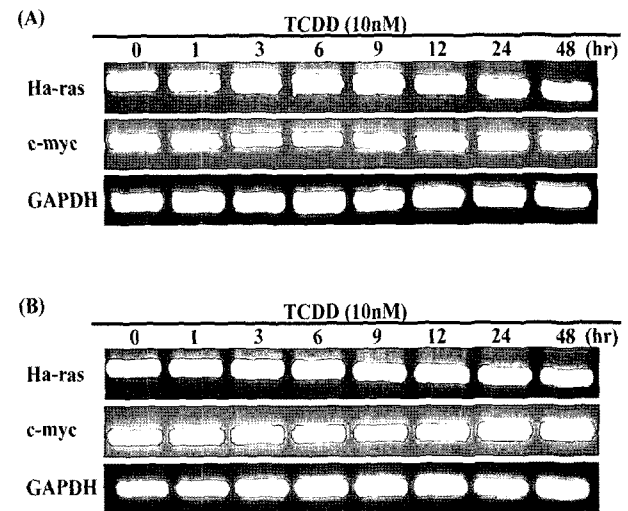
후 Detroit551과 W138세포에서 MAPKs 신호전달에 관여하는 단백질인 pRaf1, pMEK1/2 및 pErk1/2 단백질의 발현 변화를 조사하였다 (Fig. 5). 두 세포주 모두에서 시간에 따른 pRaf-1 및 pMEK1/2 단백질의 인산화 활성이 관찰되었다. Detroit551 세포의 경우 TCDD 처리 3시간 이후부터 증대되어 24시간까지 인산화 활성이 지속되다가 48시간 이후 감소되었다 (Fig. 5A). 반면, W138 세포는 TCDD 처리 3시간 이후에 최대의 활성을 보이다가 처리 시간이 경과함에 따라 서서히 감소되었다 (Fig. 5B). 한편 두 세포주에서의 Erk1/2 인산화 활성은 TCDD의 처리 시간에 따라 지속적으로 증가되었다 (Fig. 5).

이와 아울러 TCDD의 시간별 노출에 따른 cyclin D1 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. Cyclin D1 단백질의 발현은 Detroit551 세포에서 TCDD 처리 12시간 후에 약 2.41 배의 최대 발현 증가를 보이다가 서서히 감소되었다. 그러나 W138 세포에서는 3시간 이후부터 48시간까지 지속적인 발현 증가를 나타냈다 (Fig. 6).

사람 정상 세포의 발암유전자 발현에 미치는 TCDD의 영향 정상 피부세포 및 폐세포에서 TCDD가 세포내 MAPKs



**Fig. 6.** Time course of Cyclin D1 expression induced by TCDD in Detroit551 and W138 cells. The cells were treated with 10 nM TCDD for the indicated time periods and Western blot analysis was carried out using the cyclin D1 antibody. Relative Cyclin D1 protein expression values were normalized by untreated cells. The results shown are a representative for three independent experiments.



**Fig. 7.** Time course of Ha-ras and c-myc mRNA expression induced by 10 nM TCDD in Detroit551 (A) and W138 (B) cells. Total RNA was isolated from TCDD-stimulated cells at various time intervals. Ha-ras and c-myc mRNA were measured by RT-PCR as described in Materials and Methods. Expression of GAPDH was monitored as an internal control. The results shown are a representative for three independent experiments.

신호전달 및 세포주기에 관여하는 단백질뿐만 아니라 발암유전자에도 영향을 미치는지 알아보기 위하여, Detroit551과 W138 세포에 10 nM TCDD를 시간대별 (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 및 48시간)로 처리한 후 Ha-ras 및 c-myc의 mRNAs

발현 변화를 RT-PCR로 확인하였다 (Fig. 7). 두 세포주 모두에서 TCDD에 의한 Ha-ras 및 c-myc mRNA 발현 변화를 관찰할 수 없었다.

## 고찰

TCDD는 비 유전독성 물질 (Poland and Glover, 1979; Geiger and Neal, 1981)로 쉽게 분해되지 않고 환경 및 체내에 수년간 잔류하며 (Michalek *et al.*, 1999), 인체 등 생물체의 지방 및 조직에 농축되어 (Byard, 1987) 강력한 종양촉진물질로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Poland and Kuntson, 1982; Tanaka *et al.*, 1989). 또한 TCDD는 국제암연구기구 (IACR)가 규정한 제 1급의 강력한 발암물질로 분류되어 있으며 (IACR, 1997), 발암성에 관한 많은 연구 결과들이 지속적으로 발표되고 있다. 그러나 아직까지도 TCDD의 특정 장기에 대한 암화 기전을 설명하기에는 불충분하다.

TCDD의 주요 표적기관은 간 조직을 비롯하여 피부 및 폐 조직으로 알려져 있으나, 현재까지 TCDD의 암화기전에 관한 연구는 대부분 간을 대상으로 진행되고 있다. 일부 피부 조직을 이용한 TCDD의 다단계 발암 연구가 보고되어 있으나 (Herbert *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 2001), 이들 발암성에 관한 연구는 종양발생의 현상적 결과 보고에 불과하며 대부분 설치류를 대상으로 한 실험으로서 내성을 가진 사람 세포에 적용하기에는 한계를 가진다 (Talyer, 1979). 따라서 본 연구에서는 피부 및 폐 조직에서 종양촉진 효과가 있는 TCDD의 발암기전을 연구하기 위하여, 사람의 정상 피부 세포 유래의 Detroit551과 정상 폐 세포 유래의 WI38 세포주를 대상으로 세포증식에 미치는 효과를 조사하고 이에 관련된 인자들의 발현 변화를 조사하였다.

TCDD의 주요한 생리적인 효과는 세포질에 존재하는 AhR의 활성화에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 TCDD는 피부 및 폐의 정상 세포주에서 농도의존적으로 AhR 및 Arnt mRNA 발현을 증가시켰으며, 이들의 발현 증가에 따라 CYP1A1 mRNA의 발현이 유도하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 TCDD가 cytosolic AhR를 활성화시켜 ligand-activated transcription factor인 Arnt (HIF $\beta$ )와 heterodimer를 형성하여 xenobiotic response element (DREs)에 결합함으로써 CYP1A1 등의 dioxin related gene들의 전사를 촉진한다는 보고와 일치하고 있다 (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996; Andersson *et al.*, 2002). 또한 두 세포주에서의 CYP1A1 mRNA의 발현은 10 nM의 TCDD를 처리한 1시간 이후에 발현이 증가되어 6시간 이내에 최대 8배와 3배로 각각 증가되었으며, 24

시간까지 발현이 지속되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3C). 이는 TCDD가 de novo synthesis에 의하여 증가된 CYP1A1 약물대사효소의 활성화를 유도하고 내인성 estradiol의 대사 변화를 초래하여 간접적인 DNA 손상에 의한 발암과정에 관여한다는 기존의 보고를 뒷받침하는 것으로 (Tritscher *et al.*, 1996), 사람의 정상 피부 세포와 폐 세포에서도 TCDD가 AhR를 경유하여 CYP1A1 대사효소의 과발현을 유도함으로써 생체 독성 및 발암과정에 관여하는 것으로 사료된다.

일반적으로 TCDD는 성장인자 수용체 중 EGFR (epidermal growth factor receptor)의 ligand로 작용하며 AhR를 경유하여 tyrosin kinase를 활성화시키며 (Mashukar *et al.*, 1984; 1988), SHC, GRB2 및 SOS같은 EGFR adaptor protein의 결합을 유도하고 (Park *et al.*, 1998) small GTPase p21Ras를 활성화시킨다고 알려져 있다 (Enan and Matsumura, 1993; 1994). 이와 아울러 TCDD에 의한 MAPKs 활성화가 AhR-mediated CYP1A1 induction에 관여한다고 알려져 있다 (Bombick and Matsumura, 1987). 그러나 TCDD가 AhR를 경유하지 않고 Ca<sup>2+</sup>의 증가를 유발하여 세포의 기능을 조절하며 (Holsapple *et al.*, 1996), AhR-independent MAPKs의 활성화로 CYP1A1의 발현을 조절하는 상반된 결과도 보고되고 있다 (Tan *et al.*, 2002). 본 연구에서 두 종류의 사람 정상 세포의 경우 TCDD에 의해 AhR mRNA 발현이 증가되었으며 24시간까지 그 발현이 지속적이었다 (Fig. 3A and B). 이와 아울러 TCDD 처리 시간별 AhR mRNA 발현 양상은 MAPKs신호 전달 인자인 Raf-1 및 MEK1/2 단백질의 인산화 활성화 변화와 일치하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 이와 같은 결과는 Detroit551과 WI38 세포의 경우 TCDD에 의한 MAPKs signal pathway의 활성화가 AhR의 전사 활성화에 의해서 일어나는 것으로 사료된다.

MAPKs의 인산화 활성화는 암의 촉진과 진행에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (Porter and Vaillancourt, 1998). 본 연구에서 TCDD는 두 종류의 사람의 정상세포에서 시간 의존적으로 Erk1/2 단백질의 인산화 활성을 증가시키고 (Fig. 5), 세포주기 조절인자인 cyclin D1 단백질의 발현을 증가시켰다 (Fig. 6). 특히 TCDD에 의해서 두 종류의 사람 정상 세포의 사멸은 관찰되지 않았으며 (Fig. 1), 오히려 세포 증식 효과가 일어난 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4). 이와 같은 결과는 TCDD에 의한 설치류의 간 상피세포인 WB-F344의 발암에 Erk1/2 인산화가 관여하지 않는다는 Hoelper 등 (2005)의 보고와 상반된 결과이며, TCDD가 Raf-1 인산화 활성화로 Erk1/2의 발현을 증가시켜 마우스의 폐암 형성을 촉진시킨다는 기존의 보고와 일치하였

다 (Ramakrishna *et al.*, 2002). 또한 TCDD가 human keratinocytes의 apoptosis를 억제하여 세포증식을 유도하며 (Loerscher *et al.*, 2001), 16<sup>INK</sup>와 p53의 작용을 억제하여 사람의 정상 세포를 암세포로 전환시킨다는 기존의 보고를 뒷받침 한다 (Ray and Swanson, 2004). 따라서 TCDD는 Detroit551 세포 및 WI38 세포의 Raf-1, MEK1/2 및 Erk1/2로 이어지는 MAPKs를 활성화시키고 cyclin D1의 과발현을 유도하여 세포의 증식 및 발암과정에 관여하는 것으로 사료된다.

한편, TCDD는 Ha-ras oncogene 발현을 증가시켜 AhR function에 관여하는 MAPKs signal pathway를 조절하며 (Reiners *et al.*, 1997), Ha-ras와 c-myc이 활성화에 의한 cyclin D1의 발현 증가가 mouse skin papilloma를 형성시킨다고 보고하였다 (Rodriguez-Puebla *et al.*, 1999; Miliiani de Marval *et al.*, 2004). 그러나 본 연구 결과 정상 피부 세포 및 폐세포에서 TCDD에 의한 Ha-ras 및 c-myc 등 발암유전자의 mRNAs 발현 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 7). 이와 같은 결과는 TCDD의 조직 및 종 특이성에 기인한 것으로 (Bral and Ramos, 1997), Detroit551 및 WI38세포의 경우 TCDD의 단기간 노출은 Ha-ras 및 c-myc과 같은 발암유전자 활성화에 관여하지 않는 것으로 사료된다.

결론적으로 TCDD는 사람의 정상 피부세포 유래 Detroit551과 정상 폐세포 유래 WI38 세포의 세포질에 존재하는 AhR을 경유한 유전자의 전사 조절로 CYP1A1의 활성을 유도하였다. 특히 AhR을 경유한 Raf-1, MEK1/2 및 Erk1/2등의 MAPKs 신호전달계를 활성화시키고 cyclinD1 발현을 증가시킴으로써 세포주기를 조절하여 세포성장 및 발암 과정에 관여하는 것을 알 수 있었다. 본 연구로부터 정상세포에서 TCDD에 의한 AhR을 경유한 CYP1A1 효소 반응과 발암에 이르는 MAPKs 신호전달계의 직접적 인과성을 제시함으로써 TCDD의 실제적인 발암 과정의 분자생물학적 작용기전을 보다 명확하게 규명하는데 많은 도움이 되리라 생각한다. 그러나 TCDD는 종양촉진 과정을 매개하는 Ha-ras와 c-myc등의 발암유전자에는 영향을 나타내지 않는 것으로 관찰되어 지금까지 밝혀지지 않은 또 다른 발암경로가 존재할 가능성이 있으리라 사료되어지며 cDNA microarray나 proteomics 등을 이용한 유전자 발현 검색과 같은 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

## 감 사

본 연구는 2003년도 식품의약품안전청의 내분비계장애물질 연구사업에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M. L., Pettersson, S., Hanberg, A. and Poellinger, L. (2002) A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **99**, 990-9995.
- Bral, C.M. and Ramos, K.S. (1997) Identification of benzo[a]pyrene-inducible cis-acting elements within c-Ha-ras transcriptional regulatory sequences. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 947-982.
- Bombic, D.W. and Matsumura, F. (1987) TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin) causes an increase in protein tyrosin kinase activities at an early stage of poisoning in vivo in rat hepatocyte membranes. *Life Sci.*, **41**, 429-436.
- Byard, J.L. (1987) The toxicological significance of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin and related compounds in human adipose tissue. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **22**, 381-403.
- Conner, M.J., Nanthur, J. and Puhvel, M. (1994) Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD) on TNF- $\alpha$  levels in the skin of congenic haired and hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **129**, 12-15.
- Enan, E. and Matsumura, F. (1993) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin induced alterations in protein phosphorylation in guinea pig adipose tissue. *J. Biochem. Toxicol.*, **8**, 89-99.
- Fang, M.Z., Mar, W.C. and Cho, M.H. (2001) Cadmium-induced alterations of connexin expression in the promotion stage of in vitro two-stage transformation. *Toxicology*, **161**, 117-271.
- Fernandez-Salguero, P., Hilbert, D., Rudikoff, S., Ward, J. and Gonzalez, R. (1996) Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo- $\rho$ -dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **140**, 173-179.
- Geiger, E. and Neal, A. (1981) Mutagenicity testing of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin in histidine auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **59**, 125-129.
- Herbert, C.D., Harris, M.W., Elwell, M.R. and Birnbaum, L.S. (1990) Relative toxicity and tumor-promoting ability of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin (TCDD), 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran (PCDF), and 1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo furan (HCDF) in hairless mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **102**, 362-377.
- Hoelper, P., Faust, D., Oesch, F. and Dietrich, C. (2005) Evaluation of the role of c-Src and ERK in TCDD-dependent release from contact-inhibition in WB-F344 cells. *Arch. Toxicol.*, **79**, 201-207.
- Holsapple, M.P. Karras, J.G., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Burchiel, S.W., Davila, D.R., Schatz, A.R. and Kaminski, N.E. (1996) Molecular mechanisms of toxicant-induced immunosuppression: Role of second messengers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 131-159.
- IARC (1997) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol **69**, Polychlorinated Dibenzoparadioxins and Polychlorinated Dibenzofurans, Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Loertscher, J.A., Sadek, C.S. and Allen-Hoffmann, B.L. (2001) Treatment of normal human keratinocytes with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- $\rho$ -dioxin causes a reduction in cell number, but



- no increase in apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **175**, 114-120.
- Mashukar, B.V., Brewster, D.W. and Kawamoto, T. (1984) Effects of in vivo-administered 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on receptor binding of epidermal growth factor receptor in the hepatic plasma membrane of rat, guinea pig, mouse, and hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7407-7411.
- Michalek, J.E. and Tripathi, R.C. (1999) Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 15-year follow-up. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **57**, 639-378.
- Miliani de Marval, P.L., Macias, E., Rounbehler, R., Sicinski, P., Kiyokawa, H., Johnson, D.G., Conti, C.J. and Rodriguez-Puebla, M.L. (2004) Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 7538-7547.
- Park, R., Kim, D.H., Kim, M.S., So, H.S., Chung, H.T., Kwon, K.B., Ryu, D.G. and Kim, B.R. (1998) Association of Shc, Cbl, Grb2, and Sos following treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in primary rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 577-581.
- Poland, A. and Glover, E. (1979) An estimate of the maximum in vivo covalent binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to rat liver protein, ribosomal RNA, and DNA. *Cancer Res.*, **39**, 3341-3344.
- Poland, A. and Knutson, J.C. (1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554.
- Porter, A.C., and Vaillancourt, R.R. (1998) Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*, **17**, 1343-1352.
- Puga, A., Barnes, S., Chang, C., Zhu, H., Nephew, K., Khan, S. and Shertzer, H. (2000) Activation of transcription factors activator protein-1 and nuclear factor-kappaB by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 997-1005.
- Ramakrishna, G., Rerella, C., Birely, L., Diwan, B.A., Fornwald, L.W. and Anderson, L.M. (2002) Decrease in K-ras p21 and increase in raf-1 and activated Erk 1 and 2 in murine lung tumors initiated by *N*-nitrosodimethyl amine and promoted by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **179**, 21-34.
- Ray, S.S. and Swanson, H.I. (2004) Dioxin-induced immortalization of normal human keratinocytes and silencing of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *J. Biol. Chem.* **279**, 27187-27193.
- Reiners, J.J. Jr., Jones, C.L., Hong, N., Clift, R.E. and Elferink, C. (1997) Downregulation of aryl hydrocarbon receptor function and cytochrome P450 1A1 induction by expression of Ha-ras oncogenes. *Mol. Carcino.*, **19**, 91-100.
- Rodriguez-Puebla, M.L., Robles, A.I. and Conti, C.J. (1999) Ras activity and cyclin D1 expression: an essential mechanism of mouse skin tumor development. *Mol Carcino.*, **24**, 1-6.
- Safe, S. (1990) Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.*, **21**, 51-88.
- Tan, Z., Chang, X., Puga, A. and Xia, Y. (2002) Activation of mitogen-activated protein kinases (MARKs) by aromatic hydrocarbons; role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 771-780.
- Tanaka, N., Nettesheim, P., Grays, T., Nelson, K. and Barrett, J.C. (1989) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin enhancement of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine-induced transformation of rat tracheal epithelial cells in culture. *Cancer Res.*, **49**, 2703-2708.
- Taylor, J.S. (1979) Environmental chloracne: update and overview. *Ann. NY Acad. Sci.* **320**, 295-307.
- Tian, Y., Rabson, A. and Gallo, M. (2002) Ah receptor and NF- $\kappa$ B interactions-mechanisms and physiological implications. *Chem. Biol. Inter.*, **141**, 97-115.
- Tritscher, A.M., Seacat, A.M., Yager, J.M., Groopman, J.D., Miller, B.D., Bell, D., Sutter, T.R. and Lucier, G.W. (1996) Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin treated intact but not ovariectomized rats. *Cancer Lett.*, **98**, 219-225.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F. and Zacharewski, T. (1998) Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 775-792.
- Whitlock, J.P.Jr. (1993) Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 754-763.
- Yang, J.H., Vogel, C. and Abel, J. (1999) A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exhibits altered expression of growth regulatory factors. *Carcinogenesis*, **20**, 13-18.