

Diethylnitrosamine에 의하여 유발된 마우스 간 종양의 CYP1A2 메틸화와 발현

진보환 · 오새진 · 류덕영*
서울대학교 수의과대학

Promoter Methylation and Expression of CYP1A2 in Diethylnitrosamine-induced Mice Liver Tumors

Bohwan Jin, Saejin Oh, and Doug-Young Ryu*
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

(Received July 4, 2006 / Accepted August 23, 2006)

ABSTRACT : Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) is a xenobiotic metabolizing enzyme that is tissue-specifically expressed in the mammalian liver. In this study, the extent of CYP1A2 promoter methylation was analyzed to determine its potential role in the regulation of CYP1A2 in diethylnitrosamine (DEN)-induced mouse liver tumors. CYP1A2 mRNA was under-expressed about three fold in DEN-induced liver tumors compared to age-matched control livers. The CYP1A2 promoter was hypermethylated in DEN-induced liver tumors compared to controls, especially in a promoter domain close to the coding region. These results suggest that promoter methylation is involved in the regulation of CYP1A2 in mouse liver tumors.

Key words : CYP1A2, Methylation, Diethylnitrosamine, Mouse, Liver

서 론

포유동물 세포 chromosomal DNA의 CpG는 시토신 염기에서 약 2~7% 메틸화 되어 있고, CpG 메틸화는 해당 유전자의 크로마틴 구조 및 발현에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다. (Robertson KD, 2002). CpG가 밀집되어 있는 유전자의 promoter에 메틸화가 증가하게 되면 해당 유전자의 발현이 억제된다 (Jaenisch and Bird, 2003).

Cytochrome P450 (CYP) 효소군은 외부에서 유입되는 화학 물질 및 내인성 물질의 대사에 중요한 역할을 가지고 있다. 이 중, CYP1A2는 간조직에서 조직 특이적으로 발현되며, 발암성물질인 arylamine 혹은 heterocyclic amine의 대사와 관련이 있다 (Guengerich and Shimada, 1991). 또한 CYP1A2는 스테로이드 호르몬 7β-estradiol을 2-hydroxyestradiol로 대사한다.

마우스의 간 조직에서 CYP1A2 promoter는, 폐와 신장 등 타 조직과 비교하여, domain 특이적으로 저메틸화 되어 있다 (Jin *et al.*, 2004). 마우스 간조직에서 분리된 primary hepatocyte는 분리 후 시간이 지남에 따라

CYP1A2 발현이 감소하고, promoter 메틸화는 증가한다 (Jin *et al.*, 2004). 또한, 마우스의 primary hepatocyte에 히스톤 아세틸화 억제제인 trichostatin A나 sodium butyrate를 처리하였을 때, CYP1A2 mRNA 발현이 증가된다 (Jin and Ryu, 2004).

Diethylnitrosamine (DEN)은 담배연기에서 발견되고, 식품 첨가물인 아초산나트륨이 2급 아민과 반응하여 생성되는 강력한 발암물질로서 위암, 간암, 췌장암 등 소화기계 종양을 유발한다. 본 연구에서는 DEN에 의하여 종양이 발생한 간 조직에서 CYP1A2 promoter 메틸화와 CYP1A2 mRNA 발현의 관계를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

생후 12일의 수컷 C3H/He 마우스에 PBS로 희석한 DEN (20 mg/kg)을 복강 투여하고, 6-8 개월의 정상 사육 후 간 조직에 형성된 종양을 육안 및 현미경적 소견으로 확인 후, 액체질소에 보관하였다.

*To whom correspondence should be addressed

Table 1. Primers designed to specifically amplify DNA stands modified with bisulfite

		Sense	Antisense
R1	First round	CCA CTT CTA ACC CCA AAT AAA AAA TAA AAC	TGG AAA GAA AGA ATT GAT TTT TGA AAG TTG
	Second round	AAA TTA ATC CTT TCA ACT TTA TAC AAC ATC	GAT TTT TTA GAT TTT TTT TAT TTT TTA TAG G
R2	First round	TCC CTT TTA TCA AAT AAA TTA TTA ATT CCA	TTT TTG AAA GAA TAT ATT TTT TTT AAA
	Second round	CAA CTA AAT TAT TAA TTC CAA AAA AAT CA	AAT AGA TAT AAT TTT TTT TTT ATT TAT
R3	First round	CAC AAA AAA AAA AAT ACA AAA AAA ACC TC	TTT TTT TAG TTA TTT TTT AGG AAA GGT ATG
	Second round	TTA AAC CTA AAT CAA TAA TAA AAT CCT CAC	TGG AGA TTA ATT ATG ATA TGT ATG TTG TAG

(Three domains within the 5' flanking region located upstream of exon1 of the *Cyp1a2* gene were separately amplified using two rounds of nested PCR)

Real-time RT- PCR

간 조직에서 추출한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 ABI SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster city, CA) 와 제작된 primers (sense: 5'-ATC CCC GAG GAG AAG AAT GT-3', antisense: 5'-TTG GTA AGA AAC CGC TCT GG-3')를 이용하여 real-time PCR을 실시하였다.

DNA 메틸화 분석

간조직에서 genomic DNA 분리하고, NaOH (최종농도 : 0.3 M)을 이용하여 40°C에서 30분간 반응을 시킨 후, 2.5 M의 sodium bisulfite와 20 mM의 hydroquinone으로 구성된 용액을 첨가하여 55°C에서 16시간 동안 반응하였다. 반응 후, sodium bisulfite 처리가 된 DNA를 분리하고, CYP1A2 promoter의 세 domains에 특이적인 primers (Table 1)를 이용하여 각각 PCR로 증폭한 후 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

DEN에 의하여 유발된 간 종양 조직과 같은 주령의 control 마우스의 간 조직에서 CYP1A2 mRNA의 발현을 측정하기 위하여 real-time RT-PCR을 실시한 결과 DEN에 의하여 유발된 간 종양 조직의 CYP1A2 mRNA 발현은 control보다 약 3배 낮게 나타났다 (Fig. 1A, $P < 0.05$).

DEN에 의하여 유발된 간 종양 조직과 같은 주령의 control 마우스의 간 조직내 CYP1A2 promoter 메틸화의 수준을 R1, R2와 R3의 3 domains으로 나누어 분석하였다 (Fig. 1B). R1 domain의 메틸화를 살펴본 결과, control은 25 CpG sites 중에서 3 CpG sites가 메틸화 (12.0%) 되어 있었고, DEN에 의하여 종양이 유발된 간 조직에서는 이 중 17 CpG sites가 메틸화 (68.0%) 되어 있었다. R2 domain은 DEN에 의하여 유발된 간 종양 조직과 control

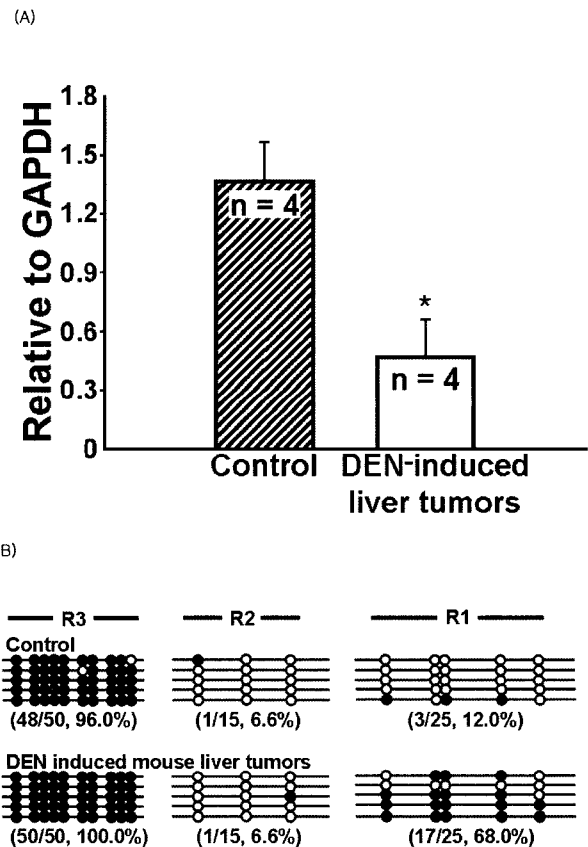


Fig. 1. (A) Real-time RT-PCR assay for CYP1A2 mRNA expression in DEN-induced mouse liver tumor tissues and age-matched controls. *: Significantly different from control. (B) CpG methylation of the CYP1A2 promoter in DEN-induced mouse liver tumor tissues and age-matched controls, as analyzed by bisulfite sequencing. PCR primers (Table 1) specific for bisulfite-modified DNA were designed for three separate domains, R1, R2 and R3, within the 5'-flanking region of the CYP1A2 gene. Each row of circles represents cytosine methylation from individual clones of the CYP1A2 promoter, as well as the position of each CpG site relative to the transcription start. Filled circles indicate methylated cytosines; open circles indicate unmethylated cytosine. Numbers in parentheses indicate the proportion of methylated CpG sites relative to total CpG sites examined.

마우스 간 조직 모두 15 CpG sites 중에서 1 CpG site가 메틸화 (6.6%) 되어 있었다. 반면, R3 domain은 control은 50 CpG sites 중에서 48 CpG sites가 메틸화 (96.0%) 되어 있었고, DEN에 의하여 종양이 유발된 간 조직에서는 50 CpG 모두 메틸화 (100.0%) 되어 있었다.

CYP1A2 mRNA는 간에서 조직 특이적 발현되고, 간에서 CYP1A2 promoter 메틸화 수준은 타장기에 비하여 promoter domain 특이적으로 현저히 낮게 나타난다 (Jin *et al.*, 2004). 마우스 간암 유래 세포인 Hepal1c7 세포주에서 CYP1A2 mRNA는 발현되지 않고, CYP1A2 promoter 메틸화의 수준은 정상의 마우스 간 조직 보다 높게 나타난다. 마우스 간 조직의 CYP1A2 promoter 메틸화 수준 및 CYP1A2 mRNA의 발현은 developmental stages에 따라서 다르게 나타나는데, 0.5일령의 마우스가 4주령의 마우스보다 R1 domain과 R2 domain의 메틸화 수준이 높게 나타난다. R3 domain의 메틸화 수준은 Hepal1c7 세포주 (98.3%), 간 종양 조직, control 마우스 간 조직에서 모두 매우 높게 나타난다 (95% 이상). 본 연구에서 R2 domain은 간 종양 조직과 control 마우스 간 조직 모두 메틸화 수준이 낮았다. 반면, R1 domain에서 간 종양 조직은 control 마우스 간 조직보다 메틸화 수준이 높게 나타났다 (Jin *et al.*, 2004).

CYP 유전자의 발현은 epigenetic modification과 관련이 있음이 여러연구에서 보고된 바 있다 (Botto *et al.*, 1994; Carrier *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 2003). 또 사람 간 조직의 CYP1A2 발현과 DNA 메틸화의 관련성이 제시된 바도 있다 (Hammons *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 1986). 이러한 일련의 연구와 본 연구의 결과는 마우스 간조직의 CYP1A2 발현 조절에 있어 DNA 메틸화가 관여하고 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술 개발사업 (Ecotechnopia 21 project)”의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Botto, F., Seree, E., el Khyari, S., de Sousa, G., Massacrier, A., Placidi, M., Cau, P., Pellet, W., Rahmani, R. and Barra, Y. (1994). Tissue-specific expression and methylation of the human CYP2E1 gene. *Biochem Pharmacol* **48**, 1095-103.
- Carrier, F., Chang, C.Y., Duh, J.L., Nebert, D.W. and 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**, 1767-78.
- Guengerich, F.P. and Shimada, T. (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* **4**, 391-407.
- Hammons, G.J., Yan-Sanders, Y., Jin, B., Blann, E., Kadlubar, F. F. and Lyn-Cook, B.D. (2001). Specific site methylation in the 5'-flanking region of CYP1A2 interindividual differences in human livers. *Life Sci* **69**, 839-45.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33** Suppl, 245-54.
- Jin, B., Park, D.W., Nam, K.W., Oh, G.T., Lee, Y.S. and Ryu, D.Y. (2004). CpG methylation of the mouse CYP1A2 promoter. *Toxicol Lett* **152**, 11-8.
- Jin, B. and Ryu, D.Y. (2004). Regulation of CYP1A2 by histone deacetylase inhibitors in mouse hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol* **18**, 131-2.
- Nakajima, M., Iwanari, M. and Yokoi, T. (2003). Effects of histone deacetylation and DNA methylation on the constitutive and TCDD-inducible expressions of the human CYP1 family in MCF-7 and HeLa cells. *Toxicol Lett* **144**, 247-56.
- Peterson, T.C., Gonzalez, F.J. and Nebert, D.W. (1986). Methylation differences in the murine P1450 and P3450 genes in wild-type and mutant hepatoma cell culture. *Biochem Pharmacol* **35**, 2107-14.
- Robertson, K.D. (2002). DNA methylation and chromatin-unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**, 5361-79.