

2,3,7,8-TCDD의 세포형질전환 및 내성획득에 관여하는 세포내 인자에 관한 연구

염태경 · 최영실¹ · 김옥희 · 강호일*
국립독성연구원
¹국립보건연구원

Studies on Cellular Factors Responsible for 2,3,7,8-TCDD Resistency and Cellular Transformation

Tai Kyung Ryeom, Young Sill Choi¹, Ok Hee Kim, and Hoil Kang*
National Institute of Toxicological Research
¹Korean National Institute of Health

(Received February 1, 2006 / March 10, 2006)

ABSTRACT : To enhance our understanding of toxicity mediated through the pathway by which TCDD stimulates gene expression, we have investigated genes whose expressions are changed after treatment with TCDD and/or MNNG in human Chang liver cell. First, we treated with MNNG and TCDD for two weeks to transform human Chang liver cell. We obtained cell looks like to be transformed and compared the differential gene expression by using cDNA chip (MacroGen) which carries genes related with signal transduction pathways, oncogenes and tumor suppressor genes, etc. We found that TCDD up- or down-regulated 203 and 111 genes including oncogenes and tumor suppressor genes in human Chang liver cell two fold or more, respectively. Second, we compared the differential gene expression after treatment with TCDD only by using cDNA chip (Superarray) which carries genes related with cell cycle regulations, and found that TCDD up regulated genes related with cell proliferation as well as cell growth inhibition in human Chang liver cell two fold or more, respectively. These results suggest that toxicity induced by TCDD may reflect sustained alterations in the expression of many genes and that the changes reflect both direct and indirect effects of TCDD.

Key words : TCDD, cDNA microarray, gene expression, dioxin

서 론

내분비계장애물질은 동물개체 또는 후세대에 악영향을 끼치면서 내분비계작용을 방해하는 외인성 물질로서 내분비 조절인자들과 작용하여 호르몬에 민감한 조직과 생식기에 암과 같은 퇴행성질환을 일으킬 수 있다는 점에서 사회적으로 안전성 문제가 제기되고 있다. 다이옥신의 일종인 TCDD는 대표적인 내분비계장애물질로서 면역, 내분비, 생식기계 기능을 파괴하고, 간기능과 지질대사 이상을 초래하며 실험동물에서는 간장을 비롯한 여러 장기에 대한 발암물질로 알려져 있다. 또한 TCDD는 국제암연구기구가 규정한 제1급의 강력한 발암물질로 분류되어 발암성에 관한 연구가 진행되고 있음에도 불구하고, TCDD에 의한 정상세포 증식 제어 및

특정장기에 대한 암화기구에 대한 구체적인 증거가 아직 불분명한 상태이다. 일반적으로 TCDD는 aryl hydrocarbon receptor (AhR)를 통하여 세포내 cytochrome P450s (CYP1A1, CYP1A2)을 유도하여 최종적으로 발암물질의 활성화를 유도하며 EGF 및 estrogen 수용체와 상호작용을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Whitelock, 1999; Bowes 등, 1996). TCDD는 세포 내에서 AhR에 결합하게 되고, TCDD-AhR 복합체는 다시 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)라는 단백질과 결합한 후 핵내로 이동하여 dioxin-response element 부위에 결합하여 여러 가지 2차 반응을 유도한다 (Hoffman 등, 1991; Reyes 등, 1992). 최근 TCDD에 의한 AhR 활성화는 cyclin dependent kinase (cdk2, cdk4, cdk7)들의 활성을 억제하고 Rb의 hyperphosphorylation을 유도하여 estrogen에 의해 유도되는 MCF-7세포의 proliferation을 억제하며 (Safe 등, 1998),

*To whom correspondence should be addressed

AhR에 결합해서 성장호르몬처럼 암이 유발되는 것을 돕고 apoptosis를 억제하는 것이 보고되었다 (Davis 등, 2000). 한편 TCDD는 AhR를 통하지 않고도 apoptosis를 유도하며 (Heimler 등, 1998), 특히 estrogen에 의해 유도되는 bcl-2 유전자의 발현을 down regulation 시켜서 apoptosis를 촉진시키는 것이 알려져 있다 (Kharat와 Saatcioglu, 1996).

TCDD는 세포주기에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Weiss 등, 1996; Gottlicher와 Cikryt, 1987). 예를 들면, TCDD에 의해 활성화된 AhR는 p27^{kip1}의 transcription을 유도하며 rat hepatoma 5L 세포와 태아 thymocytes (Kolluri 등, 1999)의 증식을 억제하고, mouse liver (Rininger와 Babish, 1995; Ma와 Babish, 1993)내의 cdc2, cdk2와 P21^{Waf1}을 유도하기도하며, hypophosphorylated RB (Ge와 Elferink 1998, Puga 등, 2000)에 결합하여 E2F-dependent transcription을 유도하여 세포가 S-phase (Puga 등, 2000)로 진행할 수 있도록 유도하는 것이 알려져 있다.

그러나, 현재까지의 TCDD의 발암기구는 세포수준에서의 형질전환 성립을 설명하기에는 매우 불충분할 뿐만 아니라 지금까지 밝혀지지 않은 발암경로 또는 방어시스템이 존재할 가능성이 제기되어지고 있다. 또한 사람 세포에 있어서 TCDD의 발암기구는 거의 알려져 있지 않으며, 형질전환시험 역시 대부분 설치류를 대상으로 한 시험들이었다.

따라서 본 연구에서는 사람 정상세포 유래의 세포주에 대한 TCDD의 영향을 연구하고자 정상 간세포 유래의 Chang liver 세포를 사용하여 TCDD 처리 후 세포주기와 관련된 유전자 발현의 변화를 조사하였고, 세포형질전환시험법을 통하여 얻은 형질전환 후보주를 대상으로 DNA microarray를 실시하였다.

재료 및 방법

시약

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)은 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Austin, TX, USA)에서, *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidine (MNNG), dimethyl sulfoxide (DMSO)은 Sigma (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다. 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 구입하였으며, cDNA microarray용 chip은 Nonrad-GEArray Kit (Super-Array, U.S.A) 및 MagicTM signal profiler version 1.0 (Macrogen, Korea)를 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 이상

의 것을 사용하였다.

세포주 및 배양조건

본 실험에 사용한 세포주는 사람의 정상 간조직 유래의 Chang liver 세포로서 fetal bovine serum (FBS)을 10% 함유하는 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였다.

세포형질전환시험

가. TCDD 단독처리에 의한 세포형질전환시험
세포를 1×10⁵cells/T25-flask로 파종하여 24시간 배양한 다음 attach가 확인되면 신선한 배지로 교환 한 후 TCDD (100 nM) 처리를 개시하였다. 주 2회 신선한 배지와 TCDD를 교환하며 2주간 세포형태와 성장양상을 관찰하였다.

나. 2 단계 세포형질전환시험

각각의 세포를 1×10⁵cells/T25-flask로 파종하여 24시간 배양한 다음 attach가 확인되면 세포 암화 개시 물질로서 MNNG (0.1 µg/ml)를 24시간 처리한 후 신선한 배지로 교환하였다. 배지교환 후 100 nM의 TCDD 처리하여 주 2회, 2주간 배지를 교환해 주며 처리하였다. 시험물질 처리 후엔 신선한 배지로 교환하여 배양하면서 세포의 형태와 성장양상을 관찰하였다.

유전자발현 해석을 위한 RNA 분리 및 정제

RNA isolation system kit (Promega, U.S.A) 시험법에 따라 total RNA를 분리하였으며, total RNA의 순도가 약 1.7 이상 되는 것을 시험에 사용하였다.

유전자 발현 해석

가. cDNA Microarray (Superarray)

TCDD 단독처리에 의해 발현변화를 보이는 세포주기 관련 유전자를 분석하기 위해 Nonrad-GEArray Kit를 이용하였다. Probe의 합성은 total RNA를 template로 하고 GEArray kits 내에 포함되어 있는 GEA primer mix를 이용하여 annealing한 후, Annealing된 혼합물을 biotin-16-dUTP로 표지시킨 cDNA probes를 합성하였다. cDNA probe 합성 후 human cell cycle regulation genes가 표지 되어있는 membrane에 hybridization 시켰다. Wash solution으로 membrane을 세척후, alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (AP-streptavidin, 1:5000비율)과 CDP-Star chemiluminescent substrate를 결합시킨 후 X-ray film에 노출시켜 membrane상에 나타나는 spot의 양상을 Bio-Rad사의 Quantity one (version 4.2.0) 프로그램으로 분석하였다.

나. cDNA Microarray (Macrogen)

MNNG 및 TCDD로 2단계 처리된 Chang liver 형질전환 후보주로부터 total RNA를 추출하였으며, MNNG 및 TCDD를 처리하지 않은 세포에서 추출된 RNA에는 Cy3-dUTP를 표지하였고, 형질전환 후보주에서 추출한 RNA에는 Cy5-dUTP를 표지 시킨 reverse transcribed cDNA probe를 각각 합성하였다. 합성된 probe를 400개의 유전자가 결합되어있는 cDNA chip에 hybridization시키고 고속형광 scanning 장치인 GMS 418 Array Scanner로 검출하여 그 결과를 ImaGene™ (BioDiscovery, Inc.)로 분석하였다.

결과 및 고찰

세포형질전환여부 관찰

사람 정상 세포 유래 세포주에 대한 TCDD의 작용을 연구하기 위하여 *in vitro* 세포형질전환시험을 TCDD 단독처리와 암화 개시 물질인 MNNG 처리 후 암화 촉진 물질인 TCDD를 처리하는 2단계의 방법을 사용했다. 그 결과, TCDD 단독처리 경우에는 형질전환 또는 TCDD 내성을 획득한 것으로 추정되는 foci를 관찰할 수 없었으나 MNNG 처리 후 TCDD를 2단계로 2주간 처리한 다음 신선한 배지에서 다시 2주간 추가 배양한 경우 또는 TCDD 내성을 획득

한 것으로 추정되는 foci를 관찰할 수 있었고, 몇 개의 foci를 선택하여 3회 계대 배양하여 유전적으로 순화된 세포를 얻었다 (Fig. 1 참조).

TCDD 처리에 의한 유전자 발현 분석

지금까지의 연구보고에 의하면 형질전환세포나 암세포의 경우, p53의 발현이 감소하면서 cdk2/cyclinA의 inhibitor로 작용하는 p21이 제거되며, cdk2/cyclinA는 새로운 단백질인 skp1과 skp2와 복합체를 형성하여 G1에서 S phase로 진행하게 된다는 것이 알려져 있다.

본 연구에서 TCDD 단독 처리에 의한 세포주기 관련 유전자의 변화를 분석하고자, 세포주기 관련 유전자만 표지되어 있는 미국 Superarray 회사 cDNA membrane을 사용하여 DNA microarray를 실시하였다. 그 결과, Chang liver 세포에서 TCDD 처리에 의해 발현이 증가된 유전자는 cdk1, cdk6, cyclin B, cyclin E, c-myc 등 11개의 유전자였으며 나머지 p53, E2F 등의 12개의 유전자는 발현차이가 크지 않게 나타났다 (Table 1).

이중 세포주기 G2/M기에 나타나는 것으로 알려져 있는 cdk1과 cyclin B 유전자가 높은 발현을 나타냈고 G1기에 restriction point를 통과하는 역할을 하는 것으로 알려진 cdk6, cyclin D 유전자 역시 발현이 높게 나타났으나, p53

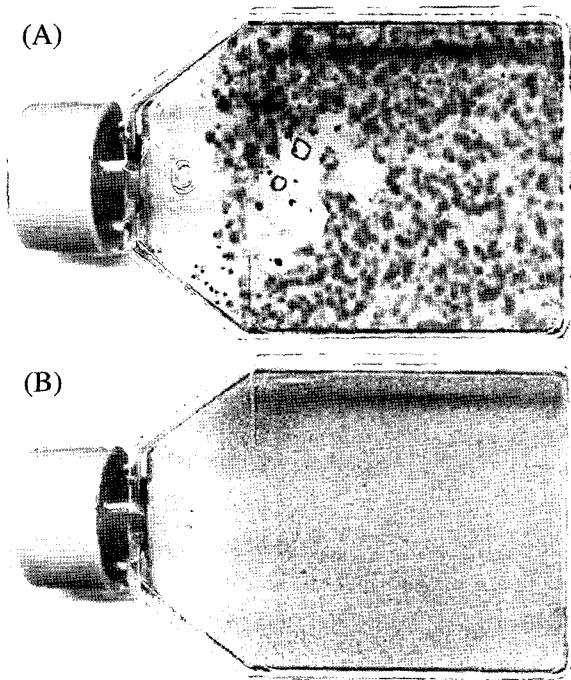


Fig. 1. Transformed foci of Chang liver cells after 2,3,7,8-TCDD exposure for 2 weeks (A) and Chang liver cells without TCDD treatment (B).

Table 1. List of genes that respond to TCDD in Chang-liver cells

Fold induction	Unigene ID	Gene description
(A) List of genes induced (> two-fold) by TCDD		
101.7	Hs.106070	p57Kip2
101.4	Hs.184572	cdk1 (cdc2)
99.4	Hs.23960	cyclin B
90.5	Hs.29656	p19INK4d
87.4	Hs.80409	gadd45
80.9	Hs.738	egr-1
79.0	Hs.9700	cyclin E
67.3	Hs.79070	c-myc
47.3	Hs.38481	cdk6
33.9	Hs.118442	cyclin C
17.5	Hs.170027	mdm2
9.0	Hs.83173	cyclin D3
7.7	Hs.179665	p21 Waf1 (p21Cip1)
5.5	Hs.78996	PCNA
4.2	Hs.159269	skp2
3.8	Hs.19192	cdk2
2.2	Hs.95577	cdk4
(B) List of genes repressed (> two fold) by TCDD		
11.8	Hs.1846	p53

Table 2. List of genes that respond to TCDD in Chang-liver cells

Unigene ID	Gene description	Increased	Decreased	Function
Hs.78713	solute carrier family 7	5.31		anion transporter
	bladder cancer overexpressed protein	4.48		tumor protein p53
	absent in melanoma 1	4.37		Chromosome alterations in malignant melanoma
	intercellular adhesion molecule 3	4.14		
	SET binding factor 1	3.53		
Hs.274494	RBP1-like protein	3.46		retinoblastoma-binding proteins
	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan	2.95		components of the extracellular matrix
	endothelial differentiation	2.58		
	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	2.22		antigenic agglomerate
Hs.603644	SCO (cytochrome oxidase deficient, yeast) homolog	22.13		synthesis of cytochromic oxidase
	histone deacetylase 5	2.12		chromosome structure and affects transcription factor
Hs..17639	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	2.05		a subgroup of the carcinoembryonic antigen (CEA) family
	transcriptional repressor	2.03		human MYC (190080) oncogenes
	mutated in colorectal cancers		7.76	suppressed tumor activity
	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4		5.34	
	filamin A, alpha (actin-binding protein-280)		5.17	Human actin-binding protein
Hs.48915	chorionic gonadotropin, beta polypeptide		5.16	intestinal cell stimulating hormone,
	mitogen-activated protein kinase 6		4.18	serine-threonine protein kinases
Hs.118893	p53 inducible protein		4.14	cancer
	centromere protein F (350/400kD, mitosis)		3.19	onset of mitosis to metaphase
	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1		3.06	macrophage capping protein
	protein phosphatase 2, regulatory subunit B		2.96	calcineurin A is created by alternative splicing of mRNAs.
	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha		2.86	calmodulin-regulated protein phosphatase
	discs, large (Drosophila) homolog 5		2.75	tumor suppressor protein
	NADH dehydrogenase (ubiquinone)		2.69	electron transport chain of mitochondrial
	glutathione S-transferase pi		2.68	
Hs.226795	nuclear receptor coactivator 3		2.65	nuclear hormone receptor subfamily of transcription factors
	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog		2.51	protooncogene homologous
Hs.79070	melanoma adhesion molecule		2.49	tumor progression and the development of metastasis
	tumor differentially expressed 1		2.31	
	TATA box binding protein (TBP)-associated factor,		2.18	initiate RNA synthesis
Hs.32935	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit		2.16	plasma protein that inhibits blood clotting
	glutathione S-transferase M4		2.12	

유전자의 발현은 완전히 억제 된 것으로 나타났다.

한편 MNNG와 TCDD를 병용 처리한 Chang liver 세포에서는 총 400개 유전자 중, 2배 이상 발현증가를 보인 유전자는 37개였으며 2배 이상 감소를 보인 유전자는 74개로

나타났다.

유의성 있게 발현변화를 보인 유전자들을 살펴보면 (Table 2), 발현이 증가된 유전자들은 종양관련 단백질들을 code하는 것으로 알려져 있는 bladder cancer overexpressed

protein 유전자와 oncogene과 관련이 있는 것으로 알려진 absent in melanoma 1 유전자, carcinoembryonic antigen (CEA) family로 알려져 있는 pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4 (Olsen 등, 1994) 유전자들을 비롯하여 약 14개의 유전자만이 발현이 증가되었다. 그러나 tumor suppressor 유전자로 알려져 있는 mutated in colorectal cancers 유전자, p53 inducible protein coding 유전자, discs large homolog 5 유전자들을 포함한 24개의 유전자들이 유의성 있게 감소되었다. 따라서 이들 결과를 종합해 볼 때 p53 inducible protein coding 유전자의 감소나 p53의 변이에 의해 유도되는 유전자 (Sidransky 등, 1991)인 bladder cancer overexpressed protein 유전자의 발현 증가 등이 형질전환후보주가 만들어지는데 있어서 부분적으로 기여했을 것으로 사료된다.

결론적으로 유전자 발현 분석 결과를 모두 종합하여 볼 때 Chang liver 세포에서 MNNG로 개시되고 TCDD로 촉진된 형질전환 후보주들은 세포증식과 관련된 각종 유전자들의 발현을 유도할 뿐만 아니라 암 유전자 및 암 억제유전자 등의 발현도 조절되는 것으로 나타나 이들 유전자들의 발현 변화가 TCDD의 발암성과 적어도 부분적으로 관련이 있을 것으로 추정된다. 따라서 향후 이들 각각의 유전자의 발현과 TCDD의 발암성과의 상관관계에 대한 좀더 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의글

본 연구는 식품의약품안전청의 내분비계장애물질 연구사업비로 수행되었음.

참 고 문 헌

- Bowes, R.C., Parrish, A.R., Steinberg, M.A., Willett, K.L., Zhao, W., Savas, U., Jefcoate, C.R., Safe, S.H., and Ramos, K.S. (1996) Atypical cytochrome P450 induction profiles in glomerular mesangial cells at the mRNA and enzyme level. Evidence for CYP1A1 and CYP1B1 expression and their involvement in benzo[a]pyrene metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **52**, 587-595.
- Davis, J.W. 2nd, Melendez, K., Salas, V.M., Lauer, F.T., Burchiel, S.W. (2000) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits growth factor withdrawal-induced apoptosis in the human mammary epithelial cell line, MCF-10A. *Carcinogenesis*. **21**, 881-6.
- Ge, N-L. and Elferink, J.A. (1998) direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **273**, 22708-22713.
- Gottlicher, M. and Cikryt, P. (1987) Induction of the aromatic hydrocarbon receptor by *trans*-4-acetylaminostilbene in rat liver. Comparison with other aromatic amines. *Carcinogenesis* **8**, 1021-1023.
- Heimler, I, Rawlins, R.G., Owen, H., Hutz, R.J. (1998) Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Endocrinology*. **139**, 4373-9.
- Herschman, H.R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 281-319.
- Hoffman, R.E., Stehr-Green, P.A., Webb, K.B., Evans, R.G., Knutsen, A.P., Schramm, W.R.F., Staake, J.L., Gibson, B.B., and Steinberg, K.K. (1986) Health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *JAMA*, **255**, 2031-2038.
- Kharat, I. and Saatcioglu, 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**, 10533-7.
- Kolluri, S.K., Weiss, C., Koff, A. and Gottlicher M, (1999) p27 kip1 induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes. Dev.* **13**, 1742-1753.
- Ma, X. and Babish, J.G. (1993) Acute 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure results in enhanced tyrosylphosphorylation and expression of murine hepatic cyclin dependent kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1070-1077.
- Olsen, A., Teglund, S., Nelson, D., Gordon, L., Copeland, A., Georgescu, A., Carrano, A., Hammarstrom, S. (1994) Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome assembly and analysis of a 700-kb cosmidcontig spanning the region. *Genomics* **23**, 659-668.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1992) Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science*, **256**, 1193-1195.
- Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C.y., Knudsen, E.S., Maier, M.A. (2000) Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **275**, 2943-50.
- Rininger, J., Ma, X. and Babish, J.G. (1995) Increased hepatic expression and phosphorylation of the murine p53 tumor suppressor protein and expression of p21^{WAF1} CDK-inhibitory protein following acute dosing of TCDD. *Proc 15th Int. Symp. Chlor. Dioxins* **25**, 367-372.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R. and McDougal, A. (1998) Ah receptor agonists as endocrine disruptors, Antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicol. Lett.* **102**, 343-347.
- Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y.C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S.R., Frost, P. and Vogelstein, B. (1991) Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. *Science*. **252**, 706-709.

Weiss, C., Kolluri, S.K., Kiefer, F. and Gottlicher, M. (1996)
Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells,
Negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah

receptor. *Exp. Cell. Res.* **226**, 154-163.

Whitelock, J.P., (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103-125.