

다이옥신이 미토콘드리아 내막의 전위차 변화 및 ROS 생성에 미치는 영향

조 일 영, 신 윤 용*

이화여자대학교 약학대학

Effect of Dioxin on the Change of Mitochondrial Inner Membrane Potential and the Induction of ROS

Il Young Cho and Yhun Yhong Sheen*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

Among the toxicants in the environment dioxin-like compounds, including TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin), are well known as carcinogen and teratogen. TCDD the most toxic of these compounds, may result in a wide variety of adverse health effects in humans and environment, including carcinogenesis, hepatotoxicity, teratogenesis, and immunotoxicity. Also TCDD increases superoxide, peroxide radicals and induces oxidative stress that leads to breakage of DNA single-strand and mitochondrial dysfunction. Recently, there have been reports that persistent organic pollutants (POPs) may be causing metabolic disease through mitochondrial toxicity. In order to examine if dioxin brings about toxicity on mitochondria directly, we measured the change of the mitochondrial membrane potential after exposure to TCDD using JC-1 dye. After short time exposure of dioxin, mitochondrial depolarization was observed but it recovered to the control level immediately. This TCDD effect on mitochondrial membrane potential was not correlated either to the production of reactive oxygen species (ROS) or extracellular Ca^{2+} by TCDD.

Less than 2 hours exposure of TCDD did not show any change in ROS production but 0.25 nM TCDD for 48 hours or 0.5 nM TCDD for 12 hours exposure did increase in ROS production. Under these conditions of ROS production by TCDD, no changes in the mitochondrial membrane potential by TCDD was observed.

Key words : TCDD, mitochondria, reactive oxygen species

서 론

환경 내 독성 물질 가운데 TCDD (2,3,7,8-Tetrachloro-

lorodibenzo-p-Dioxin)를 비롯한 dioxin-like compound들은 발암성, 최기형성 물질로 알려져 있다 (Biswas *et al.*, 2008). 그 중 독성이 가장 강한 TCDD는 사람은 물론 생태계에 해로운 영향을 미치며 발암 촉진, 간 독성, 발육 억제, 면역 억제 등과 같은 병리학적 작용을 갖는다 (Poland *et al.*, 1982; Davis *et al.*, 1990). Dioxin류는 종이와 펄프 표백, 쓰레기

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-3277-3028, Fax: +82-2-3277-2851
E-mail: yysheen@ewha.ac.kr

소각, 병원성 독성 물질 배출, PCB 소재의 변압기에서의 점화, 제련소에서의 소각, chlorophenoxy 제초제 생산 등의 과정에서 발생하는 환경 오염 물질로 우리 대부분의 체내에서 검출되며 대부분 지방 조직에 축적되어 있기 때문에 극소량만으로도 만성 독성 작용을 나타낼 수 있다(Tiernan *et al.*, 1985; Arisawa *et al.*, 2005). Dioxin류를 비롯한 할로젠화 방향족 탄화 수소류는 다양한 독성 작용과 생화학적 변화를 일으키기 때문에 최근 몇 년 동안 관심이 증가해 왔다(Mitrou *et al.*, 2001).

TCDD는 CYP 1 family를 유도하여 superoxide, peroxide radicals와 같은 활성 산소를 생성하고 산화적 스트레스를 일으키며 이로 인해 DNA 단일 가닥을 절단한다고 알려져 있다(Park *et al.*, 1996; Hassoun *et al.*, 2002; Senft *et al.*, 2002b; Shen *et al.*, 2005). 뿐만 아니라 TCDD는 mitochondria의 호흡계 사슬에도 작용하여 활성 산소 생성을 증가시킨다(Senft *et al.*, 2002a). 이러한 산화적 스트레스는 DNA, 단백질, 지질 등과 같은 biomolecules에 독성 효과를 일으킬 수 있고 산화 환원 반응성 대사 및 신호전달계와 병리학적인 상태의 조절을 방해한다. 또한 mitochondria DNA의 mutation/deletion을 일으키고 핵외의 스트레스 신호 전달을 유발하여 미토콘드리아의 기능 장애를 유발한다.

세포의 에너지 발전소인 미토콘드리아는 대부분의 ATP를 생산한다. 그래서 미토콘드리아에 손상이 생기면 ATP 감소는 물론 세포 사멸 및 괴사를 유발한다. 독성 물질에 의해 호흡계 사슬이 방해받거나 손상되면 미토콘드리아 막 전위차가 감소하게 되고 활성 산소가 생성되어 미토콘드리아 DNA를 손상하거나 돌연변이를 일으킨다. TCDD는 미토콘드리아 호흡 사슬 내에서 complex II와 III의 inhibitor로 작용하며 cytochrome oxidase의 활성을 감소시켜 전자 흐름을 방해하고 그로 인해 활성 산소는 더욱 증가하게 된다. 또한 TCDD에 의해 complex III가 감소하게 되면 liver ubiquinone (Q) level도 현저히 감소하게 되며 ATP 생산도 감소한다. TCDD에 의해 미토콘드리아의 glutathion redox state가 증가하면 미토콘드리아 내막의 전위차가 손실되어 탈분극이 일어난다(Shen *et al.*, 2005). 이러한 요인들에 의해 손상된 미토콘드리아 DNA는 호흡 사슬 내에 비정상적인 단백질을 생산하여 전자의 흐름을 방해하고 활성산소는 permeability tran-

sition pore (PTP)를 열어 미토콘드리아로부터 apoptotic 단백질을 내보내 세포 사멸을 유도한다. PTP는 미토콘드리아 외막과 내막 사이의 대사체 교환에 작용하는데 이 때 Ca^{2+} 가 중요한 조절자로 작용한다. 세포에 Ca^{2+} 가 과부하 되거나 intracellular Ca^{2+} 농도에 혼란이 일어나면 세포 독성을 유발하여 세포 사멸 및 괴사를 촉진한다는 사실은 잘 알려져 있다(Orrenius *et al.*, 2003). Ca^{2+} 와 산화적 스트레스는 PTP 조절자로서 “pore opening”을 유도하여 mitochondrial pro-apoptotic 단백질인 cytochrome c 및 다른 apoptotic 단백질들을 방출시키며 막 전위차 손실을 유발하게 된다. 이것은 더 많은 활성 산소의 생성과 caspase 활성화로 이어져 결국 PTP가 열리고 세포 사멸 및 괴사가 일어나게 된다. TCDD가 intracellular Ca^{2+} 농도를 증가 시켜 미토콘드리아 막을 탈분극화 시키고 나아가 세포 생존률을 감소시킨다는 결과가 보고된바 있다(Piaggi *et al.*, 2007). 따라서 위의 사실을 근거로 하여 본 실험에서는 TCDD에 의한 미토콘드리아 내막의 전위차 변화 및 활성 산소 생성을 연구하고자 하였다.

WHO (world health organization)에서 발표한 자료에 따르면 사람에게 허용된 TCDD의 Tolerable body burden range는 2.8~7.3 ng/kg으로 사람의 평균 체중이 70 kg이며 평균 혈액량이 5L인 점을 고려하면 이는 0.12 nM~0.32 nM에 해당하는 값이다. 또한 미국 FDA에서는 건강 장애를 일으키는 TCDD 최저용량을 14 ng/kg으로 정하고 있는데 이는 0.61 nM에 해당한다. 따라서 본 실험에서는 사람에게 허용된 TCDD의 Tolerable body burden range와 건강 장애를 일으키는 최저 용량을 고려하여 세포에 처치할 TCDD 농도를 0.25 nM과 0.5 nM로 정하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin은 NIH, U.S.A로부터 제공 받았고, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], dichloro-dihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA), ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), Vitamin. C, dimethyl sulfoxide (DMSO), tris-base, sodium chloride, d-

glucose, sucrose, fluorescamin, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, sodium bicarbonate, ampicillin-Na salt, potassium chloride, ethidium bromide, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES), Mitochondria Staining Kit 는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) 제품을 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 세포 배양

HepG2 (Hepatocellular carcinoma, human) 세포는 10% FBS-DMEM 배지를 사용하여 3일에 1회 1:3의 비율로 계대 배양하였다. HepG2 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였고 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

2) Cell growth assay (MTT assay)

96 well plate에 2,500 cells/well이 되도록 cell을 파종한 후 24시간 동안 배양하고 DMSO 0.1%, H₂O₂ 1 mM, 5 mM, TCDD 2.5 × 10⁻¹⁰ M, 5.0 × 10⁻¹⁰ M을 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 처리했다. 각각의 시험물질 처리가 끝나면 cell에 1 mg/mL MTT를 넣고 37°C 암소에서 4시간 배양했다. MTT 용액을 제거한 후 Solubilization solution (DMSO)를 각 well에 100 μL씩 넣고 30분간 암소에서 50 RPM으로 흔들어서 formazan crystal을 용해시켰다. 이 assay에서 MTT는 대사 활성화된 cell의 mitochondria dehydrogenase enzyme에 의해 dark blue formazan crystal로 분해된다. ELISA reader (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 570 nm에서 직접 dye를 정량했다. 세포 생존률은 음성 대조군 값에 대한 퍼센트로 구했다.

3) Mitochondria staining

(1) Chemical 처리

96 well plate에 2,500 cells/well이 되도록 cell을 파종한 후 24시간 동안 배양하고 DMSO 0.1%, H₂O₂ 1 mM, TCDD 2.5 × 10⁻¹⁰ M, 5.0 × 10⁻¹⁰ M을 처리하였다.

(2) Mitochondria staining

Mitochondria staining은 Mitochondria Staining Kit (Sigma)를 사용하여 수행하였다. 약물 처리가 끝난

cell의 배지를 버리고 염색 용액과 배지를 1:1로 혼합한 염색 혼합액 200 μL를 각 well에 넣어 주고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 cell을 20분간 배양하였다. 염색 혼합액을 제거하고 cell을 2번 씻어준 다음 새 배지를 넣어주고 Fluorescence microplate reader로 형광을 측정하였다. 이 때 JC-1 monomer의 excitation/emission 파장은 490/530 nm로, JC-1 aggregates의 excitation/emission 파장은 525/590 nm로 형광을 측정하였다.

4) Reactive Oxygen Species (ROS) assay

96 well plate에 2,500 cells/well이 되도록 cell을 파종한 후 24시간 동안 배양하여 DMSO 0.1%, H₂O₂ 1 mM, TCDD 2.5 × 10⁻¹⁰ M, 5.0 × 10⁻¹⁰ M을 처리하고 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) 10 μM을 처리한 후 시간별로 485/530 nm에서 형광을 측정하였다. 이 형광값은 MTT assay에서 구한 세포 생존률로 보정하였다.

5) 통계 분석

결과는 평균값 ± 표준편차로 나타내었고, 통계 분석은 t-test, One way ANOVA test, Two way ANOVA test를 이용하였다. 각 결과를 음성 대조군과 비교하여 평가하였고, P value가 0.05 이하인 경우 유의성 있는 변화로 인정하였다.

결 과

1. MTT assay

TCDD가 세포독성을 일으켜 세포의 생존 또는 증식에 영향을 미치는지 알아보기 위해 MTT assay를 수행했다. 음성 대조군은 DMSO 0.1% 및 멸균 증류수, 양성 대조군은 1 mM H₂O₂를 각각 처리한 것이며 TCDD는 2.5 × 10⁻¹⁰ M, 5.0 × 10⁻¹⁰ M로 처리하였다. 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 세포에 시험물질을 처리한 후 MTT assay를 수행하고 570 nm에서 formazan dye의 흡광도를 정량하였다.

양성 대조군인 1 mM H₂O₂의 경우 음성 대조군인 멸균 증류수에 비해 유의적으로 세포 독성이 일어나 살아있는 세포수가 감소하였다. 음성 대조군을 처리했을 때, 살아있는 세포 수를 100%라고

한다면 1 mM H₂O₂의 경우 세포에 처치하고 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간이 경과하였을 때 살아있는 세포 수는 42.0%, 24.9%, 20.4%, 33.5%, 8.1%로 음성 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한 H₂O₂를 처치했을 때 시간의 흐름에 따라 살아있는 세포 수가 어떤 차이를 보이는지 알아보려고 One way ANOVA test로 유의성 검사를 한 결과 1 mM H₂O₂의 경우 0 time으로부터 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 경과하였을 때 세포 수가 유의적으로 감소하였다. 따라서 양성 대조군인 H₂O₂의 경우 처치 시간에 따라 살아있는 세포 수가 유의적인 차이를 보였으며 두 요인 간에 유의적인 상관성이 성립함을 알 수 있었다. 이 사실을 통해 MTT assay를 통한 세포 독성 측정 실험이 제대로 이루어졌음을 알 수 있었다.

TCDD는 2.5×10^{-10} M, 5.0×10^{-10} M 두 농도 모두 모든 처치 시간에서 음성 대조군인 0.1% DMSO와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 TCDD를 각 농도 별로 처치했을 때 시간의 흐름에 따라 살아있는 세포 수의 차이 및 농도간의 차이를 보이는지 알아보려고 Two way ANOVA test로 유의성 검사를 한 결과 두 가지 요인 모두에 의해 살아있는 세포 수가 유의적으로 변하지 않고 음성 대조군 수준을 나타냈으며 또한 두 요인 사이에 유의적인 상관성도 성립되지 않았다(Fig. 1). 위 결과를 통해 저농도의 TCDD는 세포 독성을 일으키지 않으며 세포 성장 및 생존에 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

2. TCDD에 의한 미토콘드리아 내막 전위차 변화

HepG2 cell을 96 well plate에 2,500 cells/well이 되도록 seeding한 후 24시간 동안 배양하고 음성 대조군으로 DMSO 0.1%, 양성 대조군으로 1 mM H₂O₂를 처치하고 TCDD 2.5×10^{-10} M, 5.0×10^{-10} M을 각각 처치하였다. 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 동안 세포에 시험 물질을 처치한 후 미토콘드리아의 막 전위차(ψ) 변화를 알아보았다. 미토콘드리아의 내막 전위차 손실은 세포 사멸 초기 단계에서 나타나는 특징이다. 따라서 막 전위차 변화를 통해 세포 사멸이 일어난 정도를 추측할 수 있다. 미토콘

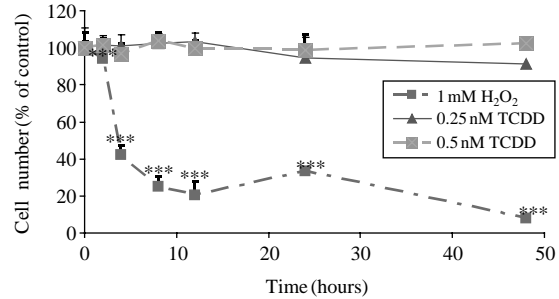


Fig. 1. Effects of TCDD on cytotoxicity. HepG2 cells were plated in 96 well plates at a density of 2,500 cells per well. The following day, HepG2 cells were treated without (0.1% DMSO) or with TCDD for 2 hrs, 4 hrs, 8 hrs, 12 hrs, 24 hrs, 48 hrs. Cell growth and viability was determined by absorbance at 570 nm. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=4). *** : Significantly different from 0 time ($p < 0.001$)

드리아의 내막 전위차(ψ)가 감소하는지 여부는 양이온성, 지용성 dye인 JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3-tetraethylbenzimidazolocarboyanine iodide)을 이용하여 알아보았다. 정상 세포에서는 막 전위차 때문에 JC-1 dye가 집합체 형태로 미토콘드리아의 matrix에 모여 있다가 막 전위차 손실이 일어나면 단량체 형태로 바뀌면서 미토콘드리아에만 모여 있지 못하고 세포 전체에 퍼지게 된다. 이 때 집합체와 단량체에서 발생하는 형광의 파장이 다르므로 그 차이를 이용하여 막 전위차 손실 여부 및 정상 세포와 apoptotic cell을 구별할 수 있다. 실험 결과 음성 대조군의 내막 전위차 변화를 100%라고 했을 때 1 mM H₂O₂를 처치한 경우 8시간 이후부터 25%, 20%, 14%, 23%로 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 유의적으로 증가하였다. 1 mM H₂O₂ 처치 시 처치 시간별 차이를 알아보려고 One way ANOVA test로 유의성 검사를 한 결과 0 time으로부터 모든 처치 시간에서 유의적인 차이를 보였다. 이를 통해 양성 대조군인 H₂O₂의 경우 시험 물질 처치 시간에 따라 유의적으로 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 증가하였음을 알 수 있었고 이를 통해 미토콘드리아 염색 시험법이 제대로 이루어졌음을 확인할 수 있었다. TCDD의 경우 세포에 처치한지 10분이 지났을 때 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 유의적으로 증가 하였다. 0.1% DMSO 대조군의 내막 전위차 변화를 100%라고

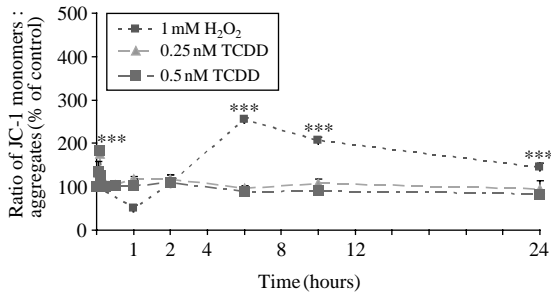


Fig. 2. Effect of TCDD on mitochondrial electrochemical potential gradient (ψ) in HepG2 cells. HepG2 cells were treated without (0.1% DMSO) or with TCDD for 5 mins, 10 mins, 15 mins, 30 mins, 1 hrs, 2 hrs, 4 hrs, 8 hrs, 12 hrs, 24 hrs. After staining with JC-1, green fluorescence (JC-1 monomers) and red fluorescence (JC-1 aggregates) were measured using a fluorescence microplate reader. Ratio of JC-1 monomers : aggregates are expressed as mean \pm S.D. (n=4). *** : Significantly different from 0 time ($p < 0.001$)

했을 때 2.5×10^{-10} M TCDD의 경우 176%, 5.0×10^{-10} M TCDD의 경우 183%로 내막 전위차 손실이 TCDD 농도에 의존적으로 증가하였다. 그런 다음 TCDD 처치 후 15분이 지났을 때 미토콘드리아 내막의 전위차는 음성 대조군 수준으로 회복되었다가 2.5×10^{-10} M TCDD를 2시간, 4시간 동안 세포에 처치했을 때 각각 118%, 117%로 전위차 손실이 약간 증가하였다. 그러나 5.0×10^{-10} M TCDD의 경우 미토콘드리아 내막의 전위차 변화가 음성대조군 수준을 보이며 손실이 일어나지 않았다(Fig. 2). 이 결과로 미루어 TCDD를 처치한 후 단시간 내에 미토콘드리아 손상이 일어나 미토콘드리아 내막의 전위차가 손실되었으나 이는 얼마 지나지 않아 회복되었음을 알 수 있었다.

3. TCDD에 의한 미토콘드리아 손상 시 Ca^{2+} 의 작용

TCDD가 intracellular Ca^{2+} 농도를 증가시켜 미토콘드리아 내막이 탈분극화 되고 세포 독성 및 세포 사멸이 발생하는 것은 아닌지 알아보기 위해 0.2 mM EDTA를 TCDD와 함께 병용 처치하고 위와 같은 처치 시간에 미토콘드리아 내막의 전위차 변화를 측정해 보았다. EDTA는 금속 이온의 킬레이트제로 세포 외 Ca^{2+} 가 세포 내로 들어가는 것을

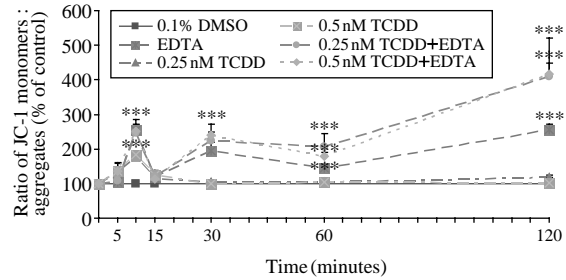


Fig. 3. Effect of Ca^{2+} on the change of mitochondrial electrochemical potential gradient (ψ) by TCDD in HepG2 cells. HepG2 cells were treated without (0.1 % DMSO, 0.2 mM EDTA) or with TCDD for 5 mins, 10 mins, 15 mins, 30 mins, 1 hr, 2 hrs. After staining with JC-1, green fluorescence (JC-1 monomers) and red fluorescence (JC-1 aggregates) were measured using a fluorescence microplate reader. Ratio of JC-1 monomers : aggregates are expressed as mean \pm S.D. (n=4). *** : Significantly different from 0 time ($p < 0.001$)

막아주는 역할을 한다. 2.5×10^{-10} M TCDD와 0.2 mM EDTA를 함께 처치하고 10분이 지났을 때 미토콘드리아 막 전위차 손실 정도를 측정해보니 오히려 TCDD 단독 처치 때보다 유의적으로 더 많이 증가하였다. 이는 5.0×10^{-10} M TCDD와 0.2 mM EDTA를 함께 처치하고 10분이 지난 후 측정했을 때에도 동일한 결과가 얻어졌다. 또한 2.5×10^{-10} M, 5.0×10^{-10} M TCDD 각각을 EDTA와 병용 처치한 후 15분까지 측정된 값의 변화와 EDTA를 단독 처치하고 15분 이내에 측정된 값의 변화 양상이 유사한 점으로 미루어 미토콘드리아 내막 전위차 손실이 증가한 것은 EDTA 자체의 영향이라고 판단된다. 그리고 2.5×10^{-10} M, 5.0×10^{-10} M TCDD 각각을 EDTA와 함께 병용 처치하고 30분, 1시간, 2시간이 경과한 후 측정된 값은 TCDD를 단독 처치했을 때와 달리 유의적으로 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 증가하였다(Fig. 3). 위의 결과를 통해 EDTA가 세포 외 Ca^{2+} 가 세포 내로 들어가는 것을 막아주어 미토콘드리아 손상을 감소시키기보다 그 자체로써 내막 전위차 손실을 증가시켰음을 알 수 있었다. 따라서 TCDD가 세포 외 Ca^{2+} 를 세포 내로 들여보내 intracellular Ca^{2+} 농도에 혼란을 일으켜 미토콘드리아 내막 전위차 손실을 일으키는 것은 아님을 추측할 수 있었다.

4. TCDD에 의한 미토콘드리아 손상 시 활성 산소의 작용

TCDD에 의한 미토콘드리아 내막 전위차 손실이 활성 산소 증가에 의한 것은 아닌지 알아보기 위해 TCDD와 항산화제로 널리 알려진 Vitamin C를 병용 처치하고 미토콘드리아 내막 전위차 변화를 측정해 보았다. Vitamin C는 활성 산소 생성을 억제한다고 널리 알려진 물질로 항산화제 역할을 한다. 먼저 2.5×10^{-10} M TCDD와 $1 \mu\text{M}$ Vitamin C를 병용 처치하고 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간 경과했을 때 미토콘드리아 내막의 전위차 변화를 측정해 보았다. 2.5×10^{-10} M TCDD를 단독 처치했을 때 10분이 지난 후 유의적으로 전위차 손실이 증가하였으나 Vitamin C와의 병용 처치 시 이 때의 전위차 손실은 기대와 달리 TCDD 단독 처치 때보다 더욱 유의적으로 증가하였다. 그리고 2.5×10^{-10} M TCDD를 단독 처치하고 15분이 지난 이후에는 내막의 전위차가 음성 대조군 수준으로 회복되었으나 Vitamin C와 병용 처치 한 경우에는 15분 이후에도 계속해서 유의적으로 전위차 손실이 증가하였다. 이 결과를 Vitamin C 단독 처치 결과와 ANOVA test를 통해 비교해보니 모든 처치 시간에서 차이가 없었다. 이는 활성 산소 생성 억제 작용보다 Vitamin C 자체의 다른 작용에 의한 미토콘드리아의 내막 전위차 손실이 증가하여 나타난 결과로 추측된다. 5.0×10^{-10} M TCDD와 Vitamin C를 병용 처치 한 경우에도 미토콘드리아 막 전위차 변화가 위와 비슷한 양상을 보였으며 Vitamin C 존재에 의해 전위차 손실이 감소하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4). 따라서 위의 결과를 통해 TCDD가 활성 산소를 매개로 하여 미토콘드리아 내막의 전위차 손실을 유발하는 것은 아니라고 판단할 수 있었다.

5. TCDD가 활성 산소 증가에 미치는 영향

앞의 실험 결과, TCDD가 활성 산소를 통해 미토콘드리아 내막의 전위차를 손실시켜 탈분극을 일으키지 않는다는 것을 알 수 있었는데 실제로 TCDD가 활성 산소의 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 위와 동일한 조건으로 세포에 처치한 후 각 시간마다 활성 산소가 얼마나 생성되는지 그 양을 측정해보았다. 활성 산소 생성은

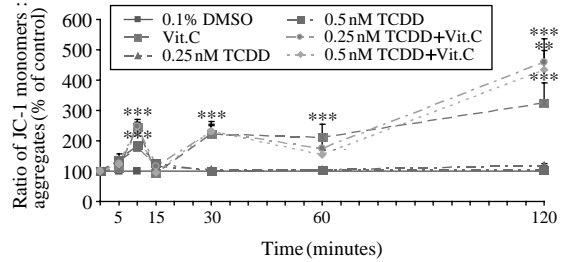


Fig. 4. Effect of ROS on the change of mitochondrial electrochemical potential gradient (ψ) by TCDD in HepG2 cells. HepG2 cells were treated without (0.1% DMSO, $1 \mu\text{M}$ Vitamin C) or with TCDD for 5 mins, 10 mins, 15 mins, 30 mins, 1 hr, 2 hrs. After staining with JC-1, green fluorescence (JC-1 monomers) and red fluorescence (JC-1 aggregates) were measured using a fluorescence microplate reader. Ratio of JC-1 monomers : aggregates are expressed as mean \pm S.D. (n=4). *** : Significantly different from 0 time ($p < 0.001$)

oxidative-sensitive fluorescent dye인 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$)를 이용해 분석하였다. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ 는 비극성의 세포투과가 가능한 화합물로 세포 내 esterase에 의해 acetyl group이 분해되면 미량의 형광을 갖는 H_2DCF 로 변한다. 활성 산소 존재시 H_2DCF 는 다량의 형광을 갖는 물질인 DCF로 빠르게 산화된다. 실험 결과 양성 대조군인 1mM H_2O_2 의 경우 세포에 처치한지 2시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 지났을 때 활성산소 생성이 11050%, 4488%, 3259%, 2925%, 1505%, 1642%로 음성 대조군인 멸균 증류수에 비해 유의적으로 크게 증가하였다(Fig. 5). 또한 H_2O_2 를 처치했을 때 시간의 흐름에 따른 활성산소 차이를 알아보려고 One way ANOVA test로 유의성 검사를 한 결과 0 time으로부터 모든 처치 시간에서 활성 산소 생성이 유의적으로 증가하였다. 양성 대조군인 H_2O_2 의 경우 모든 처치 시간에서 활성 산소 생성이 유의적으로 증가하였고 이 사실을 통해 활성 산소 측정 실험이 제대로 이루어졌음을 알 수 있었다.

0.1% DMSO의 활성 산소 생성을 100%로 봤을 때 2.5×10^{-10} M TCDD의 경우 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간 경과했을 때 활성 산소 생성이 92.5%, 91.6%, 94.7%, 95.1%, 96.8%, 94.0%였다. Two way ANOVA test를 통해 위 값들에 대한 유

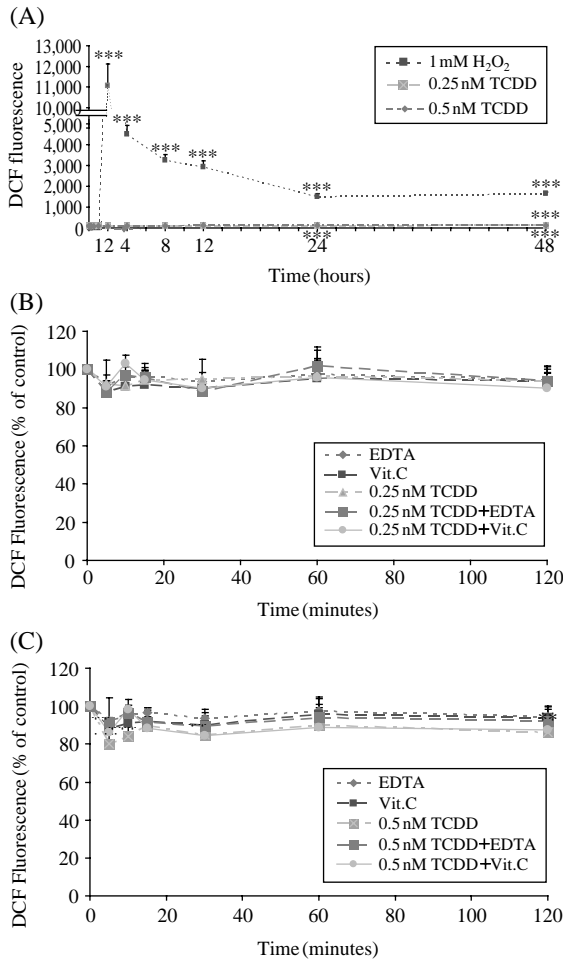


Fig. 5. Effect of TCDD on ROS production in HepG2 cells. HepG2 cells were treated without (0.1% DMSO) or with TCDD (A) for 5 mins, 10 mins, 15 mins, 30 mins, 1 hrs, 2 hrs, 4 hrs, 8 hrs, 12 hrs, 24 hrs, 48 hrs. And HepG2 cells were treated without (0.1% DMSO, 0.2 mM EDTA, 1 μ M Vitamin C) or with 0.25 nM TCDD (B) and 0.5 nM TCDD (C) for 5 mins, 10 mins, 15 mins, 30 mins, 1 hr, 2 hrs. DCF fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader. Upon the same cells, cell viability was determined. DCF fluorescence was normalized to cell content and expressed as percent of control. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=4). *** : Significantly different from 0 time ($p < 0.001$)

의성 검사를 한 결과 시간의 흐름에 따른 활성 산소 생성은 0 time일 때와 유의적 차이를 보이지 않았다. 또한 2.5×10^{-10} M TCDD를 단독 처치했을

때와 0.1 μ M Vitamin C를 병용 처치했을 때의 활성 산소도 유의적 차이를 보이지 않았다. 5.0×10^{-10} M TCDD를 단독 처치한 경우 5분, 10분, 15분, 30분, 1시간, 2시간 경과했을 때 활성 산소 생성은 80.1%, 83.9%, 89.5%, 84.9%, 90.0%, 86.1%로 10분, 30분, 2시간에서는 오히려 유의적인 감소를 보였다. 5.0×10^{-10} M TCDD와 0.1 μ M Vitamin C를 병용 처치했을 때의 활성 산소 생성은 세포에 처치 한 후 5분, 30분 경과했을 때 유의적으로 감소하였으나 Two way ANOVA test를 통해 5.0×10^{-10} M TCDD를 단독 처치했을 때와 유의성 검사를 한 결과 두 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 2.5×10^{-10} M TCDD의 경우 세포에 처치한지 2시간, 4시간, 8시간, 12시간 경과했을 때에는 음성 대조군 정도의 수준을 보였으나 24시간, 48시간 경과했을 때에는 활성 산소 생성이 108.9%, 114.4%로 각각 증가하였고 5.0×10^{-10} M TCDD의 경우 세포에 처치하고 4시간, 8시간, 12시간, 24시간, 48시간 경과했을 때 111%, 109%, 115%, 116%, 113%로 음성 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한 TCDD를 각 농도별로 처치했을 때 시간의 흐름에 따른 활성 산소 차이 및 농도 간의 차이를 알아보 고자 Two way ANOVA test로 유의성 검사를 한 결과 2.5×10^{-10} M TCDD의 경우 0 time으로부터 48시간일 때 유의적인 차이를 보였으며 5.0×10^{-10} M TCDD의 경우에는 0 time 으로부터 12시간, 24시간, 48시간 일 때 활성 산소 생성이 유의적으로 증가하였다. TCDD 두 농도 간의 활성 산소 생성을 비교해보면 TCDD를 세포에 처치한 후 4시간, 8시간, 12시간 경과했을 때 유의적인 차이를 보였다. 그 이유는 2.5×10^{-10} M TCDD에 의한 활성 산소 생성이 음성 대조군에 비해 유의적으로 증가하지 않은 반면 5.0×10^{-10} M TCDD의 경우 음성 대조군에 비해 유의적으로 증가하였기 때문이다(Fig. 5). 위의 실험 결과, TCDD에 의한 활성 산소 생성은 2시간 이상 세포에 처치했을 때 증가함을 알 수 있었고 이 때 TCDD 농도 의존적으로, 처치 시간 의존적으로 활성 산소 생성이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 미토콘드리아 내막의 전위차가 감소한 시점과 활성 산소가 생성된 시점이 서로 다른 점으로 미루어 TCDD에 의한 미토콘드리아 내막의 전위차 감소 활성 산소에 의한 것이 아님을 추측할 수 있었다. 또한 0.2 mM EDTA를 단독 처치

한 경우와 0.1 μM Vitamin C를 단독 처치했을 때 각각의 활성 산소 생성을 One way ANOVA test로 유의성 검사해 본 결과 시간의 흐름에 따라 활성 산소가 유의적으로 증가하거나 감소하지 않았다. 따라서 이 결과를 통해 EDTA와 Vitamin C 자체가 미토콘드리아 내막의 전위차를 감소시켜 미토콘드리아 손상을 일으키는 것은 활성 산소를 통한 기전이 아닌 다른 요인에 의한 것임을 추측할 수 있었다.

고 찰

이 연구에서는 TCDD가 미토콘드리아 손상을 유발하는지 알아보기 위해 그 지표로 미토콘드리아 내막의 전위차(ψ) 변화를 알아보았고 이 때 활성 산소의 생성 여부를 측정하였다. 먼저 세포에 TCDD를 처치하였을 때 농도 의존적으로 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 일시적으로 증가하였고 15분 후에는 다시 음성 대조군 수준으로 회복되었다. 이는 여러 농도의 TCDD를 10분 동안 처치하였을 때 농도 의존적으로 미토콘드리아 탈분극화가 증가한 기존의 보고와도 일치한다(Piggi *et al.*, 2007). 그 후 48시간이 경과할 때까지 유의적인 변화를 보이지 않았으므로 TCDD에 의한 미토콘드리아 손상은 처치 후 초기에 발생함을 알 수 있었다. TCDD에 의한 미토콘드리아 탈분극화가 실제로 활성 산소에 의한 것인지 알아보기 위해 강력한 항산화제로 알려진 Vitamin C를 병용 처치한 결과 오히려 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 증가하였다. 이는 Vitamin C를 세포에 처치했을 때 농도 의존적으로 Fe^{2+} 이 감소하여 세포 내 Fe^{2+} 유입이 감소하였기 때문이다. Fe^{2+} 은 미토콘드리아에서 에너지 대사가 일어나는데 중요한 역할을 하며 세포 호흡, DNA 합성 등에 관여하기 때문에 모든 살아있는 세포에 절대적으로 필요한 성분이다. 따라서 Fe^{2+} 농도의 균형이 무너지면 세포 사멸이 일어나게 된다(Carpasio *et al.*, 2007). 또한 Vitamin C는 세포의 endoplasmic reticulum으로부터 cytosol로 Ca^{2+} 를 방출시켜 cytoplasmic Ca^{2+} 의 농도를 증가시키고 이때 증가한 Ca^{2+} 가 미토콘드리아로 유입되어 미토콘드리아 내막의 전위차 변화를 일으킨다고 알려져 있다(Lin *et al.*, 2006). 이와 같은 요

인들에 의해 Vitamin C가 미토콘드리아 내막의 전위차를 감소시켰음을 알 수 있다. TCDD가 extracellular Ca^{2+} 를 세포 내로 유입시켜 intracellular Ca^{2+} 농도에 교란을 일으켰기 때문에 미토콘드리아 내막의 탈분극화가 발생하는 것은 아닌지 알아보기 위해 Ca^{2+} 킬레이트제인 EDTA를 병용 처치하였으나 이때에도 오히려 내막의 전위차 손실이 증가하였다. 이는 EDTA가 EGTA에 비해 효과적으로 Ca^{2+} 을 킬레이션 시키지 못했기 때문이며(Vergun *et al.*, 2004) 비 선택적으로 금속 이온들을 킬레이션 시켜 세포에 필수적인 금속 이온들의 세포 내 유입을 막아 미토콘드리아 손상을 유발하였음을 추측할 수 있다(Carosio *et al.*, 2007). 그러나 EDTA가 extracellular Ca^{2+} 의 세포 내 유입을 막을 수는 있으나 intracellular Ca^{2+} 가 세포 외로 방출되는 것은 막을 수 없다는 점으로 미루어 세포 내 Ca^{2+} 의 농도 변화가 미토콘드리아 손상을 유발하는지 여부를 판단하기 위해서는 세포 내 Ca^{2+} 가 세포 외로 방출되는지에 대해서도 알아볼 필요가 있다고 여겨진다. TCDD는 농도 의존적으로, TCDD 처치 시간이 길어질수록 활성 산소 생성이 증가함을 알 수 있었고 시험 물질 처치 시간과 농도 간에 유의적인 상관 관계가 성립함을 알 수 있었다. 이는 TCDD를 2시간 이상, 72시간까지 세포에 처치하였을 때 활성 산소가 TCDD 농도 의존적으로, 처치 시간 의존적으로 증가하였다는 기존의 보고와 일치한다(Knerr *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007). 위 결과를 통해 2시간 이상 세포에 TCDD를 처치했을 때 비로소 활성 산소가 증가함을 알 수 있었고 고농도일수록, 처치 시간이 길어질수록 활성 산소 생성이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 TCDD를 처치한 후 활성 산소가 증가한 시간에서 미토콘드리아 내막의 전위차는 변화하지 않고 음성 대조군 수준이었던 점으로 미루어 미토콘드리아 손상은 활성 산소에 의한 것이 아님을 판단할 수 있었다. 2.5×10^{-10} M TCDD 및 5.0×10^{-10} M TCDD는 유의적인 세포 사멸 유도를 보이지 않았고 세포 독성 효과도 일으키지 않아 세포 증식 및 생존을 크게 변화시키지는 않았지만 TCDD 농도가 증가할수록 살아있는 세포 수가 감소한다는 기존의 보고에 따라 세포 사멸을 일으킬 만큼의 충분한 농도에서는 살아있는 세포의 수가 감소할 것이라고 추측된다(Piaggi *et al.*, 2007).

위 결과를 통해 TCDD가 미토콘드리아 손상을 일으키는데 잠재적인 다른 요인들이 작용함을 추측할 수 있었고 이들의 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 TCDD에 의한 미토콘드리아 내막의 전위차 손실이 5분 이내에 빠르게 정상 수준으로 회복 되는데 어떤 요인이 작용하는지 연구할 필요가 있다고 여겨진다.

참 고 문 헌

- Arisawa K, Takeda H and Mikasa H. Background exposure to PCDDs/PCDFs/PCBs and its potential health effects: a review of epidemiologic studies, *J Med Invest* 2005; 52 (1-2): 10-21.
- Biswas G, Srinivasan S, Anandatheerthavarada HK and Avadhani NG. Dioxin-mediated tumor progression through activation of mitochondria-to-nucleus stress signaling, *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(1): 186-191.
- Carosio R, Zuccari G, Orienti I, Mangraviti S and Montaldo PG. Sodium ascorbate induces apoptosis in neuroblastoma cell lines by interfering with iron uptake, *Mol Cancer* 2007; 6: 55.
- Davis D and Safe S. Immunosuppressive activities of polychlorinated biphenyls in C57BL/6N mice: structure-activity relationships as Ah receptor agonists and partial antagonists, *Toxicology* 1990; 63(1): 97-111.
- Hassoun EA, Wang H, Abushaban A and Stohs SJ. Induction of oxidative stress in the tissues of rats after chronic exposure to TCDD, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl, *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65(12): 825-842.
- Knerr S, Schaefer J, Both S, Mally A, Dekant W and Schrenk D. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced cytochrome P450s alter the formation of reactive oxygen species in liver cells, *Mol Nutr Food Res* 2006; 50(4-5): 378-384.
- Lin PH, Lin CH, Huang CC, Chuang MC and Lin P. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines, *Toxicol Lett* 2007; 172(3): 146-158.
- Lin SY, Lai WW, Chou CC, Kuo HM, Li TM, Chung JG and Yang JH. Sodium ascorbate inhibits growth via the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human malignant melanoma A375.S2 cells, *Melanoma Res* 2006; 16: 509-519.
- Mitrou PI, Dimitriadis G and Raptis SA. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds, *Eur J Intern Med* 2001; 12(5): 406-411.
- Orrenius S, Zhivotovsky B and Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(7): 552-565.
- Park JY, Shigenaga MK and Ames BN. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo (3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(6): 2322-2327.
- Piaggi S, Novelli M, Martino L, Masini M, Raggi C, Orciolo E, Masiello P, Casini A and De Tata V. Cell death and impairment of glucose-stimulated insulin secretion induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the beta-cell line INS-1E, *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220(3): 333-340.
- Poland A and Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982; 22: 517-554.
- Senft AP, Dalton TP, Nebert DW, Genter MB, Hutchinson RJ and Shertzer HG. Dioxin increases reactive oxygen production in mouse liver mitochondria, *Toxicol Appl Pharmacol* 2002a; 178(1): 15-21.
- Senft AP, Dalton TP, Nebert DW, Genter MB, Puga A, Hutchinson RJ, Kerzee JK, Uno S and Shertzer HG. Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor, *Free Radic Biol Med* 2002b; 33(9): 1268-1278.
- Shen D, Dalton TP, Nebert DW and Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production, *J Biol Chem* 2005; 280(27): 25305-25312.
- Tiernan TO, Taylor ML, Garrett JH, VanNess GF, Solch JG, Wagel DJ, Ferguson GL and Schecter A. Sources and fate of polychlorinated dibenzodioxins, dibenzofurans and related compounds in human environments, *Environ Health Perspect* 1985; 59: 145-158.
- Vergun O and Reynolds IJ. Fluctuations in mitochondrial membrane potential in single isolated brain mitochondria: modulation by adenine nucleotides and Ca²⁺, *Biophys J* 2004; 87: 3585-3593.