

## 뱀장어 배양 간세포에서의 Cytochrome P4501A (CYP1A) 유전자 발현에 대한 중금속들의 억제효과

권혁추 · 맹준호 · 최성희\*†

선문대학교 수산생명의학과, \*식품과학과

### Inhibitory effects of heavy metals on CYP1A expression in eel hepatocyte cultures

Hyuk Chu Kwon, Joon Ho Maeng and Seong Hee Choi\*†

Department of Aquatic Life Medical Science, Sun Moon University, Asan 336-708, Korea

\*Department of Food Science, Sun Moon University, Asan 336-708, Korea

Effects of heavy metal ions on the gene expression of cytochrome P4501A (CYP1A) were examined in cultured eel hepatocytes. When the expression of CYP1A mRNA was measured by RT-PCR after incubation of eel hepatocytes with benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) at concentrations of 10<sup>-8</sup>~10<sup>-5</sup> M, the CYP1A expression increased with B[*a*]P treatment in a dose dependent manner, showing significant increase at concentrations more than 10<sup>-7</sup> M. When the eel hepatocyte was treated with cadmium (10<sup>-6</sup> and 10<sup>-5</sup> M), the expression of CYP1A was inhibited and especially at higher concentration (10<sup>-5</sup> M). The inhibition of CYP1A expression by cadmium was also observed in cells treated with B[*a*]P. In another study, effects of heavy metal ions on the expression of CYP1A were examined in cultured hepatocytes isolated from eel which was treated previously with B[*a*]P *in vivo*. Hepatocytes isolated from the liver of eel taken at 48 hours after injection of B[*a*]P (10 mg/kg) were cultured for 2 days with cadmium, copper, lead or zinc (10<sup>-6</sup> and 10<sup>-5</sup> M). The expression of CYP1A was found to be suppressed by the metal ions compared with the control in which CYP1A was induced with previous treatment of B[*a*]P *in vivo*. The present results may provide an important basic information for studying the effects of heavy metal ions on CYP1A expression in other species of fish and studying toxicological mechanisms of heavy metal ions in aquatic livings.

*Key words* : CYP1A, Eel, Hepatocyte culture, Benzo[*a*]pyrene, Heavy metal ions

산업생산 활동에 의해 발생하는 수많은 환경오염 물질들이 수서환경으로 흘러들어 어패류에 축적되고 먹이사슬에 의해 이동되어 결국 인간의 건강을 위협한다. 이들 중 비소, 납, 수은 및 카드뮴 등의 중금속들과 benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), benzo[*β*]fluoranthene, benzo[*a*]anthracene 등의 다환방향족 탄화수

소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 계열의 화학물질들은 인간의 생활환경에 빈번하게 발생하고, 독성을 가지며, 인간에 잠재적으로 노출될 가능성이 높다는 이유로 가장 위험한 환경오염물질들로 분류되어 있다 (ATSDR, 1997).

Cytochrome P4501A (CYP1A)는 대부분의 척추동물에서 발견되는 약물대사 효소로서 PAHs계열의 환경오염물질들에 매우 특이적으로 반응하여 유도된다. 따라

†Corresponding Author: Seong Hee Choi, TEL: 041-530-2281,

Fax : 041-530-2917, E-mail : choish@sunmoon.ac.kr

서 PAHs와 같은 환경오염물질들에 민감하게 반응하는 *CYP1A* 유전자 및 단백질은 수서환경오염의 생체지표 (biomarker)로서 어류에 많이 이용되고 있으며, 이를 이용한 검정법은 주로 송어류를 중심으로 간과 아카미 조직의 EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) 활성을 측정하는 방법과 *CYP1A* 항체를 이용한 immunoassay 법과 *CYP1A* 유전자의 발현량을 조사하는 연구가 주로 이루어지고 있다 (Levine and Oris, 1999; Maier *et al.*, 2000; Arukwe *et al.*, 2001; Bonacci, 2003; Jönsson, *et al.*, 2006).

한편 물에 녹은 이온 상태의 중금속들은 체내에 축적되면 잘 배설되지 않고 우리 몸속에 쌓여 체내 효소 활성 및 항상성 유지를 저해 한다(Henczová *et al.*, 2008). 카드뮴, 납, 크롬, 구리, 아연, 비소, 주석 등의 중금속들은 각 제련공정에서 폐수 및 농약 등에 의해 수서환경으로 흘러들어 수서생물에 축적된다. 이러한 중금속들은 주로 신장을 비롯한 각 조직에서의 부작용이 밝혀져 있고 미나미타병, 이따이 이따이 병 등 인체에서의 중독 증상을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Greim and Snyder, 2007).

*CYP1A* 활성과 중금속들과의 상호관계에 관한 연구는 주로 설치류를 중심으로 한 고등동물에서 행해져 왔다. 포유류의 경우, 쥐와 guinea pig의 간세포에서 카드뮴, 구리, 수은 및 납 등에 의해 *CYP1A* 활성 저하가 관찰되었다 (Falkner *et al.*, 1993; Iscan *et al.*, 1993; Iscan *et al.*, 1995; Jacobs *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000; Tully *et al.*, 2000). 그러나 쥐의 세포 실험에서 수은, 납, 구리 등이 *CYP1A* mRNA를 증가시키는 것으로 보고되었다 (Korashy and El-Kadi, 2004). 또한 쥐에서 납에 의해 *CYP1A* 활성은 간세포배양에서는 증가하지만 (Canepa *et al.*, 1985), *in vivo* 실험에서는 감소하는 것으로 나타났다 (Degawa *et al.*, 1993). 또한 인간 간세포 배양 및 hepatoma cell line에서 비소에 의해 *CYP1A* mRNA가 감소하고 (Ho and Lee, 2002),

쥐 및 마우스에서 세포실험에서는 증가한다고 보고했다 (Maier *et al.*, 2002; Seubert *et al.*, 2002).

어류는 환경의 변화에 가장 민감하게 반응하기 때문에 수질 오염을 모니터링하는데 중요한 역할을 한다. 중금속 및 *CYP1A*의 주된 대사 부위가 간이다. 따라서 어류 간세포 배양계는 어류 *CYP1A*와 중금속의 대사 조절 메커니즘을 연구하는데 매우 유용한 도구가 되고 있다(Zhou, 2006). 그럼에도 불구하고 어류 간세포 배양계를 이용한 *CYP1A*와 중금속간의 상호관계에 관한 연구는 많지 않다. 따라서 본 연구는 뱀장어의 간세포배양계를 이용하여 *CYP1A* 유전자 발현에 대한 중금속의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 시약

체중 250~300g의 뱀장어, *Anguilla japonica*를 약 25°C의 담수에서 사육하였다. 실험기간 동안 사료를 급여하지 않았으며, 생식선은 실험 후 해부를 통해 미성숙 상태임을 확인하였다. 실험에 사용된 중금속들, benzo[a]pyrene (B[a]P), cadmium chloride, copper chloride, zinc sulfate, lead nitrate는 Sigma(USA)로부터 구입하였다. B[a]P는 DMSO에 용해시켰고, 중금속들은 3차 증류수에 용해시켜 최종 농도가 10<sup>-6</sup>과 10<sup>-5</sup> M 되도록 배양액에 첨가하였다.

Benzo[a]pyrene 주사에 의한 *in vivo* *CYP1A* 유도

DMSO에 녹인 benzo[a]pyrene을 뱀장어에 10 mg/kg의 농도로 주사하여 25°C의 담수에 수용하였다. 주사 48시간 후에 간을 적출하여 간세포배양에 이용하였다.

### 간세포분리 및 배양

뱀장어 간세포는 Kwon and Mugiya (1994)의 방법

에 따라 준비하였다. 뱀장어를 2-phenoxyethanol (Sigma)로 마취시켜 외부를 에탄올로 잘 소독한 후 복부를 절개하여 간을 채취하였다. 간 문맥을 통해 Ca<sup>++</sup>-free ringer 액(120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 23 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.4)을 10분간 관류하여 혈액 등의 불순물을 제거하였다. Collagenase(0.5 mg/ml, Sigma Type IV)를 포함하는 Ca<sup>++</sup>-free Ringer 액으로 약 30분간 관류하여 간을 소화시킨 후, 최종적으로 Ca<sup>++</sup>과 Mg<sup>++</sup>-free의 Ringer 액을 주입하여 효소의 활성을 억제하였다. 소화된 간을 Ca<sup>++</sup>-free Ringer 액에 넣어 피펫팅에 의해 세포현탁액으로 만들었다. 플라크톤 망을 통해 여과된 세포 현탁액을 800 × g로 2분간 원심분리 시켰다. 이러한 절차를 3번 반복하여 얻어진 펠렛화 된 세포에 배양액을 첨가하여 10 ml의 현탁액으로 만들었다. 세포의 생존율은 trypan blue를 이용하여 판별하고, 세포 수는 혈구 계산 판을 이용하여 계산하였다.

Dish 당 3 × 10<sup>5</sup> 개의 간세포를 3 ml의 배양액과 함께 60 mm petridish (Falcon)에서 배양하였다. 배양액은 0.2 μM bovine insulin, streptomycin (100 μg/ml)과 penicillin (70 μg/ml)을 포함하는 L-15 배지 (Sigma)를 이용하였으며, 25°C에서 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 세포를 배양하였다. 실험시작 전 2일 동안 전배양하여 세포를 부착시켰다. 모든 배양은 세 번 이상 반복하였다.

#### RNA 추출 및 RT-PCR

간세포를 수거한 후 Trizol (MRC Inc.) 0.7 ml를 넣고 얼음위에서 homogenizer로 균질화시킨 후, 140

μl의 chloroform을 첨가하고 잘 섞어준 다음 15분간 안정시켜서 원심분리하였다 (4°C, 12,000×g, 15분). 원심분리 후 RNA를 포함하고 있는 상층액을 뽑아내고, 상층액과 동량의 isopropanol을 첨가하여 잘 섞은 후 -20°C에서 하룻밤 둔 다음 원심분리하였다 (4°C, 12,000×g, 15분). 원심분리 후 상층액을 모두 버리고 얻어진 RNA pellet을 75% 에탄올을 이용하여 3회에 걸쳐 세정한 후 건조시켰다. 얻어진 RNA pellet을 nuclease free water에 녹여 분석에 사용하였다. 추출된 RNA의 농도는 GeneQuant (Biochrom Ltd., Cambridge, England)를 이용해 측정하였으며, 분석시까지 -70°C에 보관하였다.

추출한 total RNA를 Oligo(dT)<sub>15</sub> primer (Promega)와 M-MLV Reverse transcription (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다.

CYP1A와 GAPDH 각각의 primer의 염기배열은 Table 1과 같다. PCR에는 Go Taq Green Master Mix (Promega)를 사용하였고, Thermocycler (Biometra)을 사용하여 유전자를 증폭시켰다. PCR 조건은 다음과 같다. 각 반응물을 94°C에서 5분간 pre-denaturation시켰고, 총 30 cycles을 94°C에서 1분, 58°C에서 2분, 72°C에서 2분간 반응시킨 후, 72°C에서 6분간 post-elongation시켰다. PCR 증폭 산물은 1% agarose gel (in TBE buffer, 30 μg/ml ethidium bromide solution)을 사용하여 전기영동한 후 Image analysis system (Kodak)을 이용하여 분석하였으며 데이터는 student t-test를 사용하여 대조군 (vehicle)과 비교 분석하였다 (P<0.05).

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

		Primer sequences	Annealing temp.(°C)	Product size(bp)
GAPDH	forward	5'-CCCTGAAGGTTGTCAGCAAT-3'	54	405
	reverse	5'-GTATCCCAGAATGCCCTTCA-3'		
CYPIA	forward	5'-GTCTTGAATGGGAGCGAAAAC-3'	53	519
	reverse	5'-AGCGAGCATTGATATCCATG-3'		

## 결 과

### *In vitro* CYPIA 유전자 발현에 대한 Benzo[a]pyrene의 영향

미성숙 배양어의 간을 분리하여 무혈청으로 2일간 배양하였다. 배양 3일째에 benzo[a]pyrene (B[a]P)을  $10^{-8}$ ~ $10^{-5}$  M의 농도로 배양액에 첨가하여 2일간

더 배양한 후 간세포를 수거하여 total RNA를 추출, RT-PCR 방법으로 CYPIA mRNA 발현을 조사하였다. Fig. 1에서와 같이 용매 (DMSO)만 첨가된 대조구 (vehicle)에서 이미 내인성에 의해 CYPIA 유전자의 발현이 관찰되었다. CYPIA mRNA 발현은 B[a]P 농도 의존적으로 유도되었으며,  $10^{-7}$  M 농도부터 통계적으로 유의적으로 증가하였다 ( $p < 0.05$ ).

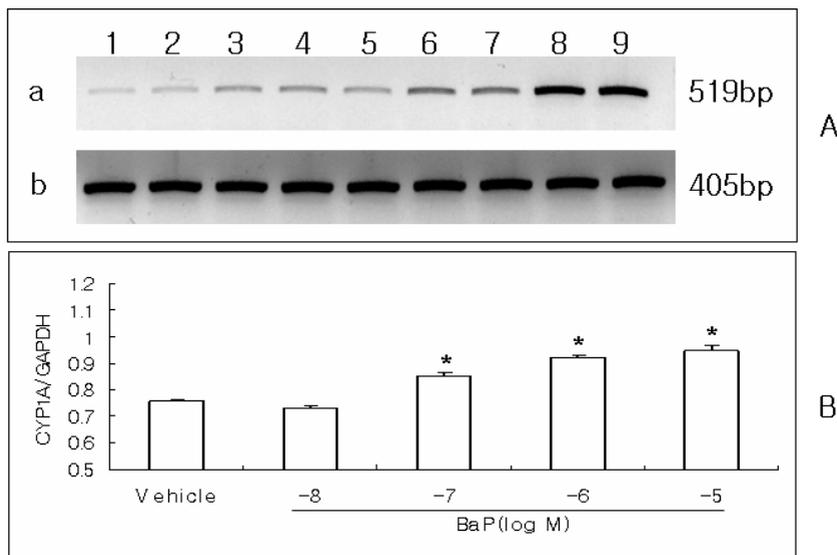


Fig. 1. Effects of benzo[a]pyrene (B[a]P) on CYPIA gene expression in cultured eel hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 2 days with B[a]P. Difference in the mRNA level after each treatment was estimated by RT-PCR, and visualized on 1% agarose gels (A). The optical density of each band was quantified in a Bio Image System (Kodak) and normalized to the GAPDH (B). Lanes 1: vehicle (DMSO), 2, 3: B[a]P  $10^{-8}$  M, 4, 5: B[a]P  $10^{-7}$  M, 6, 7: B[a]P  $10^{-6}$  M, 8, 9: B[a]P  $10^{-5}$  M. a: CYPIA, b: GAPDH. Values are mean $\pm$ SD (n=3). Asterisk (\*) indicates significant difference with respect to the vehicle ( $p < 0.05$ ).

*In vitro* CYP1A 유전자 발현에 대한 카드뮴의 영향  
 뱀장어 간세포를 2일간 배양한 후 B[a]P ( $10^{-5}$  M)와 카드뮴 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M)을 각각 또는 함께 첨가하여 2일후에 간세포를 수거하여 CYP1A mRNA 발현을 조사하였다. Fig. 2에서와 같이 카드뮴을 첨가한 그룹은 대조구 (vehicle)에 비해 CYP1A mRNA 발현량의 억제가 관찰되었다. 고농도 ( $10^{-5}$  M)의 카드뮴에서 더 많이 억제되었다 ( $p<0.05$ ). 또한 B[a]P와 카드뮴을 함께 첨가하였을 때 CYP1A 유전자 발현은 B[a]P 단독 처리에 비해 현저한 감소가 관찰되었다 ( $p<0.05$ ).

B[a]P 주사한 뱀장어 간세포 배양에서의 CYP1A 유전자 발현에 대한 중금속들의 영향  
 미성숙 뱀장어에 10mg/kg의 B[a]P를 주사한 후, 48시간 후에 간을 채취하여 간세포 배양하였다. 배양 3일째에 카드뮴, 구리, 납 및 아연 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ M) 등을 각각 배양액에 첨가하여 2일간 더 배양한 후, 간세포를 수거하여 CYP1A mRNA 발현량을 조사하였다. Fig. 3 에서와 같이 *in vivo*에서 이미 B[a]P 처리에 의해 CYP1A 발현이 유도된 대조구에 비해 중금속들이 첨가된 모든 그룹에서 CYP1A 유전자 발현 억제가 관찰되었으며, 고농도의 중금속 첨가에서 CYP1A 유전자 발현은 더 많이 억제되었다 ( $p<0.05$ ).

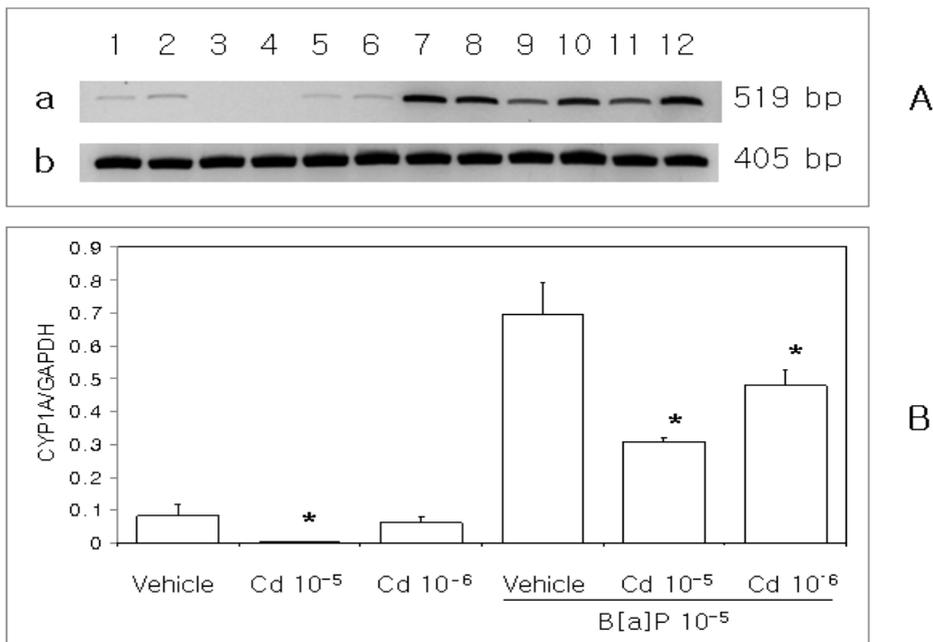


Fig. 2. Effects of cadmium (Cd) on CYP1A gene expression in cultured eel hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 2 days with cadmium alone or along with B[a]P. Difference in the mRNA level after each treatment was estimated by RT-PCR, and visualized on 1% agarose gels (A). The optical density of each band was quantified in a Bio Image System (Kodak) and normalized to the GAPDH (B). Lanes 1, 2; vehicle, 3, 4; Cd  $10^{-5}$  M, 5, 6; Cd  $10^{-6}$  M, 7, 8; B[a]P  $10^{-5}$  M, 9, 10; B[a]P  $10^{-5}$  M + Cd  $10^{-5}$  M, 11, 12; B[a]P  $10^{-5}$  M + Cd  $10^{-6}$  M. a, CYP1A, b, GAPDH. Values are mean±SD (n=3). Asterisk (\*) indicates significant difference with respect to the vehicle ( $p<0.05$ ).

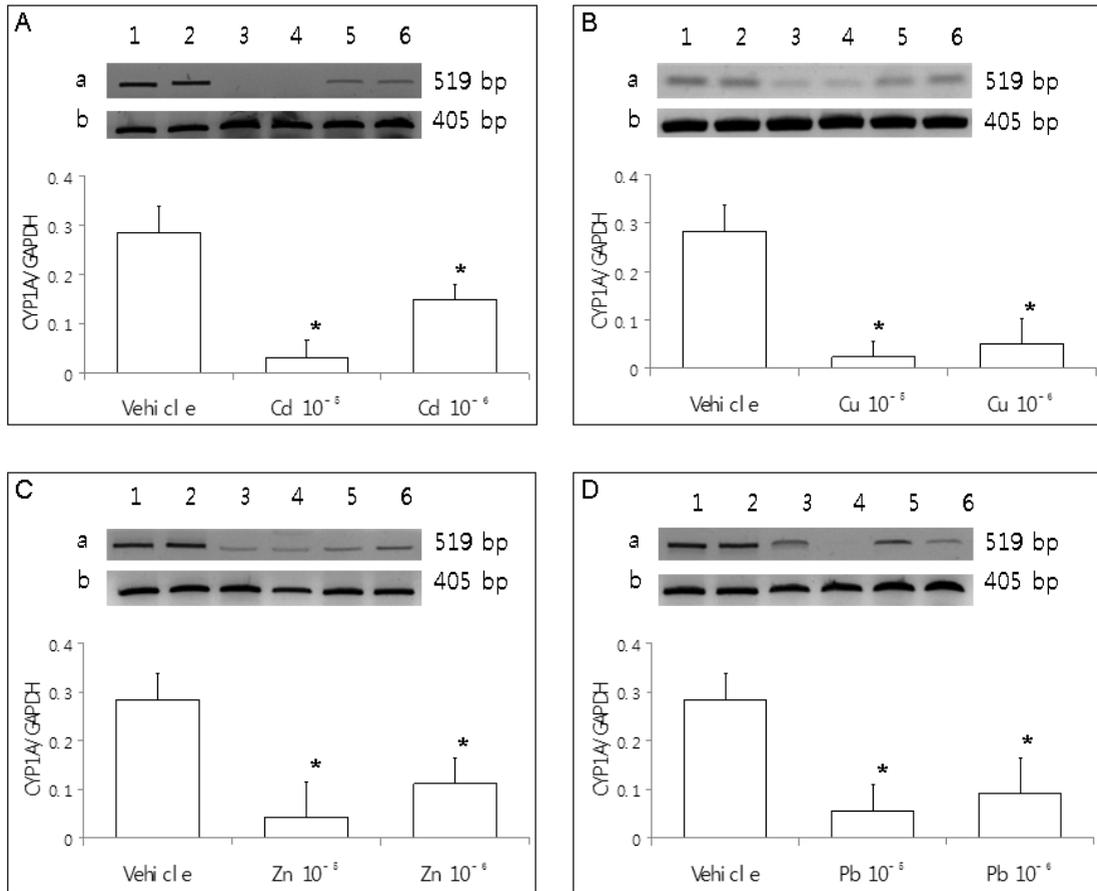


Fig. 3. Effects of heavy metal ions on *CYP1A* gene expression in cultured hepatocytes prepared from eel which was treated *in vivo* with B[a]P. Hepatocytes were cultured for 2 days with Cd (A), Cu (B), Zn (C) and Pb (D). The expression of *CYP1A* mRNA levels were estimated by RT-PCR, followed by visualizing on 1% agarose gels. The optical density of each band was quantified in a Bio Image System (Kodak) and normalized to the GAPDH. Lanes 1, 2; vehicle (DMSO), 3, 4; 10<sup>-5</sup> M, 5, 6; 10<sup>-6</sup> M. Values are mean±SD (n=3). Asterisk (\*) indicates significant difference with respect to the vehicle (p<0.05).

## 고찰

PAHs 계열의 화학물질에 의해 특이적으로 유도되는 *CYP1A* 유전자 발현에 대한 연구는 주로 어류 간과 아가미를 대상으로 행해져 왔다. 간은 *CYP1A* 유전자 발현은 물론 각종 중금속들의 해독 장소이기 때문에, 어류 간세포배양계는 PAHs에 의한 *CYP1A* 유전자의 발현 메커니즘 연구 외에 *CYP1A* 유전자 발현과 중금

속과의 상호관계에 대한 연구에 최적의 도구이다. 지금까지 어류 *CYP1A* 유전자 발현과 중금속과의 상호관계에 대해 어류에서도 활발하게 연구되고 있지만, 간세포배양을 이용한 연구는 무지개 송어, 인도산 메기 등 소수의 어종에서 관찰되어 왔다. 본 연구에 사용된 뱀장어의 간은 단엽으로 되어 있어 collagenase 관류에 의해 간세포를 분리하기에 적합하여 다른 어종에 비해 간세포 배양시스템 확립이

용이하여 *in vitro* 실험의 재현성이 높다고 생각된다.

CYP1A는 세포질 내에 존재하는 aryl hydrocarbon receptor (AhR) 를 매개하여 유도되어 지는데, 이 수용체의 ligand로는 다이옥신, PAHs, PHHs 계열 등이 알려져 있다. 어류와 쥐 등에서 B[a]P, 3-methylcholanthrene, prochloraz,  $\beta$ -naphthoflavon (BNF), TCDD 등은 AhR ligand 또는 agonist 로서 알려져 있다 (Navas and Segner, 2000). 뱀장어 배양 간세포를 이용한 본 연구에서 PAHs의 대표적 물질인 B[a]P에 의한 CYP1A 유전자 발현량의 증가를 농도별 실험을 통해 확인하였다.

쥐, 마우스, guinea pig 및 인간 등 여러 동물에서 CYP1A 유전자 발현 및 활성이 카드뮴, 수은, 납, 아연, 비소, 크롬 및 구리 등의 중금속들에 의해 대체로 억제되는 것으로 보고되고 있으나, 거꾸로 CYP1A 유전자발현을 유도하는 결과도 보고되고 있다 (Iscan and Coban., 1992; Falkner *et al.*, 1993; Iscan *et al.*, 1993; Iscan *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1997; Jacobs *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000; Maier *et al.*, 2002). 이것은 중금속의 종류, 실험에 이용된 동물 종, 또는 *in vivo*인지 *in vitro* 실험 인지에 따라 다른 결과로 나타났다. 어류에 있어서도 포유류와 유사한 결과가 얻어지고 있는데, 어종에 따라, 또는 같은 어종이라도 서식하는 곳에 따라 다르게 나타나고 있어 실험방법의 표준화가 요구되며, 간세포를 이용한 *in vitro* 실험은 높은 재현성을 기대할 수 있다 (Sandvik *et al.*, 1997; RISSO-de FAVERNEY *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2001; Sorrentino *et al.*, 2005).

본 연구에서는 CYP1A 유전자 발현에 대한 카드뮴의 영향을 2가지 방법으로 행하였다. 즉, *in vivo*에서 미리 B[a]P를 주사한 뱀장어와 주사하지 않은 뱀장어의 간을 각각 세포배양하여 CYP1A 발현과 중금속간의 상호관계를 조사하였다. B[a]P를 주사하지 않은

뱀장어의 간세포 배양실험에서 카드뮴에 의한 CYP1A mRNA 발현억제는 카드뮴 단독 또는 B[a]P+카드뮴 모두에서 관찰되었으며, B[a]P를 주사한 뱀장어의 간세포 배양에서도 카드뮴에 의한 CYP1A의 억제효과가 관찰되었다. 배양 간세포에 첨가된 중금속들에 의한 CYP1A 억제효과는  $10^{-5}$  M의 고농도에서는 70% 이상,  $10^{-6}$  M에서는 50% 이상 각각 감소하였다. 4가지 (카드뮴, 구리, 아연, 납) 중금속들 간의 억제 효과의 강도는 유사한 것으로 관찰되었다. 유럽산 넙치, 무지개 송어, 조피볼락의 배양 간세포와 무지개 송어 아가미에서도 카드뮴, 구리, 납, 아연에 의한 CYP1A의 활성저하가 관찰되었다 (Sandvik *et al.*, 1997; RISSO-de FAVERNEY *et al.*, 2000; RISSO-de FAVERNEY *et al.*, 2001; Jönsson *et al.*, 2006). 대서양 대구류의 *in vivo* 실험에서 카드뮴, 크롬, 니켈 등에 의해 CYP1A mRNA이 감소되었으나, 비소의 경우 같은 어종이라도 서식장소에 따라 상반된 결과가 나타났다 (Sorrentino *et al.*, 2005). 본 연구에 사용된 대부분의 중금속들도  $10^{-6}$ 과  $10^{-5}$ M에서 CYP1A 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났으나, 추 후 2종 이상의 중금속이 혼재할 때 CYP1A 발현에 미치는 영향을 조사할 필요가 있다고 생각된다.

중금속이 CYP1A 발현을 억제시키는 정확한 원인은 밝혀지지 않았으나, CYP1A 유전자 활성 메커니즘에서 외인성 오염물질이 체내에 침투했을 때, PAHs 계열의 오염물질과 결합하는 Aryl hydrocarbon 수용체 (AhR)의 활성을 중금속이 억제시키거나, AhR 생산 메커니즘을 중금속이 방해하거나, 기타의 원인에 의해 중금속에 의한 CYP1A 활성화에 영향을 준다고 추정하고 있다 (Risso-de Faverney *et al.*, 2000; Vakharia *et al.*, 2001; Elbekai and El-Kadi, 2004; Sorrentino *et al.*, 2005; Henzová *et al.*, 2008). 이처럼 중금속의 CYP1A 발현 억제작용에 관한 정확한 원인

을 밝히는 것이 필요하다.

결론적으로 간세포배양계와 RT-PCR을 이용한 *CYP1A* 유전자발현은 PAHs, PHHs 및 PCB와 같은 환경오염물질을 검색하는데 매우 유용한 지표로 활용 가능하며, 또한 본 연구 결과는 다른 어종에서 *CYP1A* 유전자 발현에 대한 중금속들의 영향 및 중금속 독성을 연구하는데 매우 중요한 기초 자료를 제공한다고 사료된다.

## 요 약

뱀장어 간세포 배양을 이용하여 cytochrome P4501A (*CYP1A*) 유전자 발현에 대한 중금속들의 영향에 대해 조사하였다. 첫째, *CYP1A* mRNA 발현에 대한 benzo[a]pyrene (B[a]P)의 농도별 조사에서, B[a]P  $10^{-8}$  ~  $10^{-5}$  M의 농도로 배양액에 첨가하여 배양한 후 세포를 수거하여 RT-PCR 방법으로 *CYP1A* mRNA 발현량을 조사하였다. *CYP1A* mRNA 발현은 B[a]P 농도 의존적으로 유도되었으며,  $10^{-7}$  M 농도부터 통계적으로 유의차를 나타냈다 ( $p < 0.05$ ). 둘째로 뱀장어 간세포에 B[a]P ( $10^{-5}$  M)와 카드뮴 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M)을 각각 또는 함께 첨가하여 *CYP1A* mRNA 발현을 조사하였다. 카드뮴을 첨가한 그룹은 vehicle에 비해 *CYP1A* 발현의 억제가 관찰되었으며, 고농도( $10^{-5}$  M)의 카드뮴에서 더 많이 억제되었다. 또한 B[a]P와 카드뮴을 함께 처리한 그룹에서도 *CYP1A* 유전자 발현은 B[a]P 단독 처리에 비해 현저한 억제가 관찰되었다. 셋째로, *in vivo*에서 B[a]P를 주사한 뱀장어의 배양 간세포를 이용하여 *CYP1A* 유전자 발현에 대한 중금속들의 영향을 조사하였는데, 뱀장어에 10mg/kg의 B[a]P를 주사한 후, 48시간 후에 간을 채취하여 간세포 배양을 하였다. 카드뮴, 구리, 납 및 아연 ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M) 등을 각각 배양액에 첨가하여 2일간 배양한

후 *CYP1A* mRNA 발현량을 조사하였다. 이미 B[a]P 처리에 의해 *CYP1A* 발현이 유도된 대조구 (vehicle)에 비해 중금속들이 첨가된 모든 그룹에서 *CYP1A* 유전자 발현 억제가 관찰되었다. 본 연구는 여러 어종에서 *CYP1A* 유전자 발현에 대한 중금속들의 영향 및 중금속 독성을 연구하는데 매우 중요한 기초 자료로 활용되어질 것이다.

## 참고문헌

- Arukwe, A., Kullman, S.W. and Hinton, D.E.: Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17 $\beta$  treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem and Physiol.*, 129:1-10, 2001.
- ATSDR: [www.atsdr.cdc.gov/97list.html](http://www.atsdr.cdc.gov/97list.html), 1997.
- Bonacci, S.: Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally exposed to benzo[a]pyrene and  $\beta$ -naphthoflavone. *Environ. Int.*, 29:467-473, 2003.
- Canepa, E.T., Llambias, E.B. and Grinstein, M.: Effect of glucose on induction of delta aminolevulinic acid synthase, ferrochelatase and cytochrome P450 hemoproteins in isolated rat hepatocytes by phenobarbital and lead. *Biochim. Biophys. Acta.*, 841:186-194, 1985.
- Degawa, M., Arai, H., Miura, S. and Hashimoto, Y.: Preferential inhibitions of hepatic P4501A2 expression and induction by lead nitrate in the rat. *Carcinogenesis*, 14:1091-1094, 1993.
- Falkner, K.C., McCallum, G.P., Cherian, M.G. and Bend, J.R.: Effects of acute sodium arsenite administration

- on the pulmonary chemical metabolizing enzymes, cytochrome P450 monooxygenase, NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase and glutathione S-transferase in guinea pig: comparison with effects in liver and kidney. *Chem. Biol. Interact.*, 86:51-68, 1993.
- Ghosh, M.C., Ghosh, R. and Ray, A.K.: Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufin-O-deethylase in cultured catfish hepatocytes. *Environmental Research Section A*, 86:167-171, 2001.
- Greim, H. and Snyder, R.: *Toxicology and risk assessment: A comprehensive introduction*. John Wiley and Sons, 534-564, 2007.
- Henczová, M., Deér, A.K., Filla, A., Komlósi, V. and Mink, J.: Effects of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  on different fish species: Liver cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and FTIR spectra. *Comp. Biochem and Physiol, Part C*, 148:53-60, 2008.
- Ho, I.C. and Lee, T.C.: Arsenite pretreatment attenuates benzo[a]pyrene cytotoxicity in a human lung adenocarcinoma cell line by decreasing cyclooxygenase-2 levels. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 65:245-263, 2002.
- Iscan, M. and Coban, T.: Combined effect of cadmium and nickel on rat hepatic monooxygenases possible stimulation of certain cytochrome P450 isozymes. *Toxicol. Lett.*, 62:191-199, 1992.
- Iscan, M., Coban, R. and Eke, B.C.: The responses of hepatic monooxygenases of guinea pig to cadmium and nickel. *Biol. Trace Elem. Res.*, 38:129-137, 1993.
- Iscan, M., Coban, T. and Eke, B.C.: Differential responses of hepatic monooxygenases and glutathione S-transferases of mice to a combination of cadmium and nickel. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 111:61-68, 1995.
- Jacobs, J.M., Nichols, C.E., Andrew, A.S., Marek, D.E., Wood, S.G., Sinclair, P.R., Wrighton, S.A., Kostrubsky, V.E. and Sinclair, J.F.: Effect of arsenite on induction of *CYP1A*, *CYP2B*, and in primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 157:51-59, 1999.
- Jönsson, M.E., Carlsson, C., Smith, R.W. and Pärt, P.: Effects of copper on CYP1A activity and epithelial barrier properties in the rainbow trout gill. *Aquat. Toxicol.*, 79:78-86, 2006.
- Korashy, H.M. and El-Kadi, A.O.: Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) regulated genes in cultured hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Toxicology*, 211:153-172, 2004.
- Kwon, H.C. and Mugiya, Y.: Involvement of growth hormone and prolactin in the induction of vitellogenin synthesis in primary hepatocyte culture in the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 93:51-60, 1994.
- Levine, S.L. and Oris, J.T.: *CYP1A* expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination. *Aquat. Toxicol.*, 46:279-287, 1999.
- Maier, A., Dalton, T.P. and Puga, A.: Disruption of dioxin-inducible phase I and phase II gene expression patterns by cadmium, chromium and arsenic. *Mol. Carcinog.*, 28:225-235, 2000.
- Maier, A., Schumann, B.L., Chang, X., Talaska, G. and Puga, A.: Arsenic co-exposure potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutation Research*, 517:101-111, 2002.

- Navas, J. M. and Segner, H.: Antiestrogenicity of  $\beta$ -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the aryl hydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.*, 51:79-92, 2000.
- Risso-de Favernay, C.: The nitroxide stable radical tempo prevents metal-induced inhibition of *CYP1A1* expression and induction. *Toxicol. Lett.*, 111:219-227, 2000.
- Risso-de Favernay, C.: Inhibitory effects of heavy metals on *CYP1A* induction in black seabream (*Spondylisoma cantharus*) hepatocyte cultures. Elsevier Science, 2001.
- Sandvik, M., Beyer, J., Goksøy, A., Hylland, K., Egaas, E. and Skaare, J.U.: Interactions of benzo[a]pyrene, 2,3,3',4,4',5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium on biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus L.*). *Biomarkers*, 2:153-160, 1997.
- Seubert, J.M., Sinal, C.J. and Bend, J.R.: Acute sodium arsenite administration induces pulmonary *CYP1A* mRNA, protein, and activity in rat. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 16:84-95, 2002.
- Sorrentino, C.: Co-exposure to metals modulates *CYP1A* mRNA inducibility in Atlantic tomcod *Microgadus tomcod* from two populations. *Aquat. Toxicol.*, 75:238-252, 2005.
- Tully, D.B.: Effects of arsenic, cadmium, chromium and lead on gene expression regulated by a battery of 13 different promoters in recombinant HepG2 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168:79-90, 2000.
- Vakharia, D.D.: Effects of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of *CYP1A1* and *CYP1A2* in human hepatocyte cultures. *Toxicol and Pharmacol.*, 170:93-103, 2001.
- Zhou, B.: Primary cultured cells as sensitive *in vitro* model for assessment of toxicants-comparison to hepatocytes and gill epithelia. *Aquat. Toxicol.*, 80:109-118, 2006.

---

Manuscript Received : June 18, 2010

Revised : August 13, 2010

Accepted : August 20, 2010