

여천공단 일부지역의 대기오염물질이 WBF-344간 상피세포의 Gap Junctional Intercellular Communication에 미치는 영향

Effects of Airborne Samples Collected in Yeochun on Gap Junctional Inter cellular Communication in WBF-344 Rat Liver Epithelial Cells

양재만 · 박재학¹⁾ · 김윤신²⁾ · 이영순

서울대학교 수의과대학 공중보건학실

¹⁾서울대학교 수의과대학 실험동물학실

²⁾한양대학교 의과대학 계량학교실

(1996년 12월 1일 접수, 1997년 6월 20일 채택)

Jae-Man Yang, Jae-Hak Park¹⁾, Yoon-Shin Kim²⁾, Yong-Soon Lee

Department of Public Health, Veterinary College, Seoul Natl. Univ.

¹⁾*Department of Laboratory Animal Science, Veterinary College, Seoul Natl. Univ.*

²⁾*Department of Medical Information & Management, College of Medicine, Hanyang Univ.*

(Received 1 December 1996; accepted 20 June 1997)

Abstract

We collected airborne complex mixtures in an industrial area of Yeochun, and examined whether these complex mixtures could affect gap junctional intercellular communication (GJIC) in a cultured WBF-344 rat liver epithelial cells (LEC). Since the reduction of GJIC plays an important role in chemical carcinogenesis, measurement of changes of GJIC is a meaningful method to screen carcinogenicity of these mixtures. High and low volume samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and tested. Blank filter extractions were also examined for excluding possible toxicity of filter itself, and TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) and DMSO were used as positive and negative control, respectively. When the cells were exposed to samples at concentration below that required to maintain rather than 85% cell viability based on the result of neutral red uptake assay, maximal inhibition of GJIC was observed at 1hr after treatment with both high and low volume samples by scrape-loading dye transfer assay. In fluorescence recovery after photobleaching assay, recovery rates via gap junctions were 33%/min in high volume sample and 62%/min in low volume sample. In together, airborne samples collected in Yeochun inhibited GJIC in a cultured WBF-344 rat LEC. These results suggest airborne samples tested in this experiment may attribute to cause a certain type and degree of cancers in in vivo when exposed for some periods.

Key words : airborne complex mixture, gap junctional intercellular communication, carcinogenesis, Yeochun

1. 서 론

산업사회의 발달과 더불어 그로부터 방출되는 물질은 대기를 포함한 환경의 주된 오염원 중의 하나로 인식되고 있다(Rall, 1990). 특히, 그러한 환경의 대기가 인체를 통하여 흡입되었을 경우의 위해성을 고려한다면, 대기의 정기적인 검사뿐 아니라 그 성분 중 특별히 문제시 되는 요인을 밝혀 대처하도록 하는 것은 상당히 중요한 문제이다(Pershagen, 1990).

이에 대기물질을 검사하는 방법으로 *Salmonella typhimurium* 등을 이용한 변이원성 검사가 많이 실시되어 왔었다(Crebellii *et al.*, 1995). 그러나, 이는 사용된 물질의 변이원성을 평가할 수 있어도 그 기전을 밝히는 데에는 미흡하며, 나아가 변이원성을 발암 원성에 직접적으로 연결시키는 것이 어렵다는 점을 고려할 때, 다른 방법의 사용이 필요하게 되었다. 그러한 방법중에는 시험물질이 배양세포의 gap junctional intercellular communication (GJIC*)에 미치는 영향을 관찰하여 그 물질의 발암원성과 관련된 위해성을 평가하는 방법이 있다(Mesnil *et al.*, 1993).

Gap junction이란, 세포막표면에 존재하는 여러 통로(transmembrane channel) 중의 하나로서 두 세포 간의 세포질을 직접적으로 연결하여 준다. 따라서, 세포간의 대사산물이나 신호물질(signal molecules)들을 교환함으로써, 세포의 성장 및 분화, 발생(embryogenesis) 조절에 관여한다(Zhang *et al.*, 1994). 그리고, gap junction이 세포간의 신호전달 통로 역할을 하는 만큼, 여러 가지 요인에 의해 그 기능이 영향을 받게 된다(Esinduy *et al.*, 1995). 특히 많은 발암촉진제들이 GJIC를 억제한다고 알려져 있어 세포성장, 분화에 있어 그 기능의 중요성을 암시해 주고 있다(Kang *et al.*, 1996; Ruch *et al.*, 1994).

본 실험에서는 여천 공단 지역에서 포집한 대기 오염물질을 하이볼륨시료와 로우볼륨시료로 구분하여 WB-F344 랫드 간상피 세포의 GJIC에 미치는 영향을 조사하여 대기오염물질의 세포독성을 평가해 보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 세포 배양

WBF-344 랫드간상피 세포주(미국 Michigan 주립대 학교에서 분양)를 RPMI 1640배지에 10% 우래아혈청과 항생제(50 ng/ml penicillin, 50 ng/ml streptomycin)을 첨가하여 5%CO₂ 환경하에서 배양하였다.

2.2 시료의 채취

시료의 채취는 1996년 4월 23일부터 24일까지 실시하였으며, 온도는 12.5°C, 습도는 52%였다. 하이볼륨시료는 filter가 25×20 cm인 quarts filter이며, 유량 1.2 m³/min이었고, 로우볼륨시료는 filter가 직경 47 mm의 원형 filter로 유량 5 m³/min이었으며, 총 포집 시간은 24시간이었다. 이는 총 유량이 각각 약 1,728 m³, 7,200 m³이 되는 양이다.

2.3 유기물질의 추출

각 시료를 채취한 filter 전체 및 공여지(laboratory blank filter)를 잘게 자른 후, 추출용매인 diethylether/cyclohexane (8/2, v/v)을 10 ml씩 가해, 초음파 추출기에서 20분동안 3회 반복 추출하였다. 추출된 유기물은 기체질소로 건조시킨 후 DMSO를 3 ml가 하여 최종 볼륨 3 ml이 되도록 하였다.

2.4 시험물질의 용량

각 시험물질은 추출하여 DMSO에 용해시킨 것이 최대용량이 되며, 배지에 혼합하여 세포에 적용시, 배지 2 ml에 시험물질 5 μl가 투여되므로 최종적으로 400배가 희석되게 된다. 따라서 400배를 농축하여 실험을 시작할 수 없기 때문에 실제로 시험에 사용되는 최고용량은 추출물의 400배 희석용량에서부터 시작하게 된다. 양성대조물질로 사용한 TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)는 기존에 세포독성이 없다고 알려진 대로 10 ng/ml의 농도로 시험에 적용하였다(Asamoto *et al.*, 1991). 음성대조군인 DMSO도 다른 물질과 같이 배지 2 ml에 5 μl을 투여하였다.

*약어 : GJIC, gap junctional intercellular communication; DMSO, dimethyl sulfoxide; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; SL/DT assay, scrape-loading dye transfer assay; FRAP assay, fluorescence recovery after photobleaching assay.

2.5 Neutral Red Uptake Assay

96-well 조직배양 용기에 세포를 1×10^4 /well의 농도로 0.2 ml씩 분주하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 각 시험물질을 공비 $\times 0.5$ 로 희석하여 첨가한 배지 0.2 ml/well씩으로 교체하였다. 다시 24시간 배양 후, 따뜻한 phosphate buffered saline (PBS)으로 3번 세척하고, 배지 1 ml 당 neutral red 50 µg의 농도가 되는 배지 0.2 ml/well로 교체하였다. 37°C에서 2~3시간 배양 후, neutral red 함유 배지를 버리고, 1% CaCl₂/0.5% formaldehyde 용액으로 세척하였다. 1% acetic acid/50% ethanol 용액 0.2 ml/well씩을 첨가하여 실온에서 10분 방치한 후 shaker로 몇 초간 빠르게 진동시킨 다음, 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 물질에 사용된 용매 단독의 흡광도에 대한 물질의 흡광도의 백분율을 이용하여 85% 이상의 생존율을 무독성용량으로 간주하고 그때의 최대 용량을 다음의 시험에 적용하였다(Doyle *et al.*, 1993).

2.6 Scrape-loading Dye Transfer (SL/DT) Assay

35 mm petri dish에 세포를 분주하여 90~100% 단층세포배양(confluency)을 이루게 한 다음, Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS로 세척한 후 각 시험물질을 함유하는 배지 2 ml/plate씩으로 교체하였다. 각각 10, 20, 30, 60, 90분, 2, 4, 6시간 배양 후에 Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS로 세척하고, PBS에 녹인 0.05% Lucifer Yellow CH 2 ml씩으로 처리한 상태에서 외과용 칼날로 scrape line을 3개씩 만들었다. 차광하여 실온에서 3분간 방치한 후 Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS로 여러 번 세척하고, 1% glutaldehyde용액으로 고정하여 blue filter의 형광현미경(Olympus)하에서 관찰하였다. 배율 100배의 임의의 시야에서 형광염료를 함유하고 있는 세포의 수를 세어 대조군에 대한 백분율로 계산하였다(El-Fouly *et al.*, 1987).

2.7 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) Assay

세포를 35 mm petri dish에 분주하여 90~100% confluency를 이룰 때까지 배양한 후, Hank's balanced solution(GibcoBRL)으로 여러 번 세척하였다. 각 시험물질을 함유하는 배지 2 ml씩으로 60분간 처치

한 후 Hank's balanced solution로 여러 번 세척한 후 Hank's balanced solution에 7 µg/ml 농도로 녹인 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) 2 ml씩을 처리하고 차광하여 실온에서 10분간 방치하였다. Hank's balanced solution으로 여러 번 세척한 후, laser cytometry (ULTIMA, Meridian Instruments, USA)으로 임의의 세포를 결정해 레이저로 광표백한 후 3분간격으로 9분동안 형광의 회복을 관찰하였다. Laser cytometer의 자체 program인 ULTIMA에서 측정된 결과에 대하여 음성대조군에 대한 각 시료의 백분율을 계산하였다(Wade *et al.*, 1986).

2.8 Statistics

각 실험은 이중으로 2번 이상씩 실시하였으며, 모든 결과들의 통계적 처리는 ANOVA로 검정한 후, F값이 유의한 경우 Dunnett's t-test를 실시하여 유의수준 $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

3. 결 과

3.1 Neutral Red Assay

각 시험물질 모두 시험에 적용한 최고 농도('재

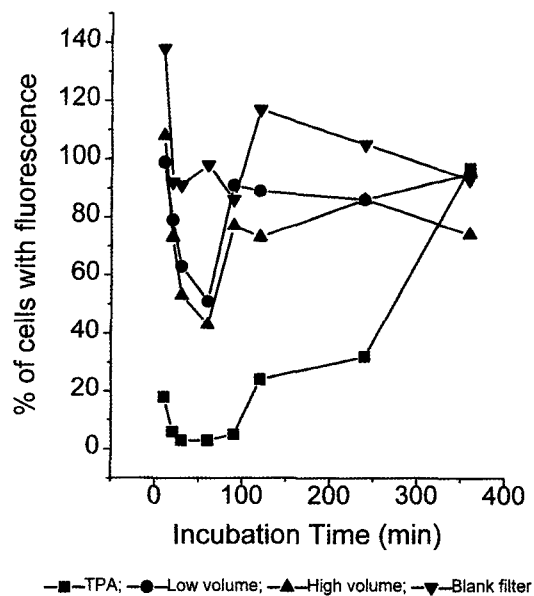


Fig. 1. Changes in percentage of cells with fluorescence according to incubation time.

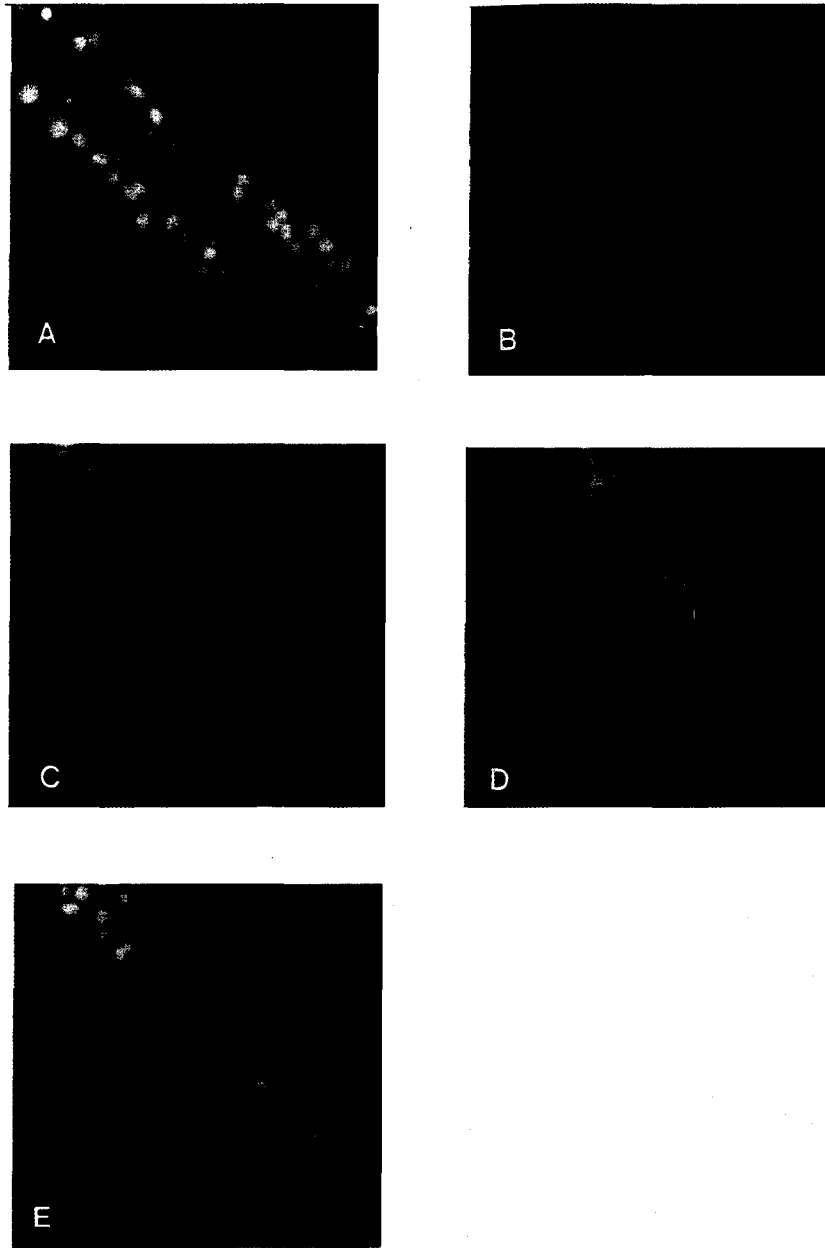


Fig. 2. Changes of gap junctional intercellular communication in WBF-344 cells treated with different samples for 1 hour using scrape-loading dye transfer assay. (A) DMSO (B) TPA (C) Blank filter (D) Low volume (E) High volume

료 및 방법' 참조)에서 세포독성이 없는 것으로 나타나, 하이 및 로우볼륨 시료 원액을 아무런 희석없이 다음 시험에 이용하였다(표 1).

3.2 Scrape-loading Dye Transfer Assay

양성대조물질인 TPA는 10분에서부터 gap junction이 억제되기 시작하여 60분째에 거의 억제되었

Table 1. Percentage of viability from absorbances in neutral red assay for air pollutants.

Dilution Sample	Rate of Dilution of Samples									
	1) ²⁰	2 ⁻¹	2 ⁻²	2 ⁻³	2 ⁻⁴	2 ⁻⁵	2 ⁻⁶	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹
Low Volume	105	104	104	106	107	94	105	101	93	98
High Volume	106	112	109	97	95	108	96	100	102	105
Blank Filter	94	93	97	96	95	94	101	111	92	108
TPA ²⁾	97									
DMSO ³⁾	100									

¹⁾ It was used as 400 time-diluted samples.

²⁾ Concentration of TPA was 10 ng/ml.

³⁾ DMSO 5 µl/2 ml media, i.e. 0.25%

Table 2. Recovery rate in FRAP assay of air pollutants.

Time	% of Recovery (%/min)				
	DMSO (n=4)	TPA (n=9)	Low-Volume (n=20)	High-Volume (n=16)	Blank Filter (n=4)
1 hr	10.91 ± 2.93 (100)	0.00* (0)	6.71 ± 2.00* (62)	3.61 ± 1.18* (33)	9.89 ± 2.40 (91)

Values were expressed as mean ± S.D.

n, sample size

Values in parentheses were percentage for control (DMSO).

* significantly different from control (DMSO) (p<0.05).

는데 (97%), 공여지는 전 시험 기간동안 거의 억제되지 않아 90분에 14%로 최고억제율을 보인 것을 제외하고는 대부분 10% 이하의 억제를 나타내었다.

그러나, 로우볼륨시료와 하이볼륨시료는 20분에서부터 억제되기 시작하여 (21%, 27%), 60분째에 최고로 억제되었다 (49%, 57%). 그러나, 로우볼륨시료가 점차 회복되어 가는 것에 비하여 하이볼륨시료는 전 배양시간에 걸쳐 대조군에 비하여 유의한 감소를 유지하였다(그림 1, 2).

3.3 Fluorescence Recovery after Photobleaching Assay

음성대조군인 DMSO와 공여지 추출물로 처치한 후 60분 배양한 결과, 두 경우 모두 9분내에 형광을 거의 회복한 반면 (10.91, 9.89%/min), 양성대조군인 TPA 및 로우볼륨시료와 하이볼륨시료는 각각 0.00, 6.71, 3.61%/min의 회복율을 보였다(표 2, 그림 3).

4. 고찰 및 결론

Gap junction이란, 세포막표면에 존재하는 여러 통로(transmembrane channel) 중의 하나로서 이온이나 분자량 1,000 Da 이하의 물질을 통과시킨다(Bennett *et al.*, 1991). 이 gap junction이란 용어는 전자현미경하의 형태학적 연구결과, tight junction에 비해 약 2 nm의 간격(gap)이 존재한다하여 붙여진 것으로, 그 기본 구조는 connexin이라 불리는 단백질로 이루어져 있는데, 다시 이 단백질 여섯 개가 모여 hexamer를 이루며 반통로(hemichannel)를 형성한 것을 connexon이라 한다(Dermietzel *et al.*, 1990). 한 세포의 connexon이 인접 세포의 connexon과 대칭적으로 접촉하여 형성된 통로가 gap junction으로, 두 세포간의 세포질을 직접적으로 연결하여 준다. 따라서, 세포간의 대사산물이나 신호물질(signal molecules)들을 교환함으로써, 세포의 성장 및 분화, 발생(embryogenesis) 조절에 관여한다(Zhang *et al.*,

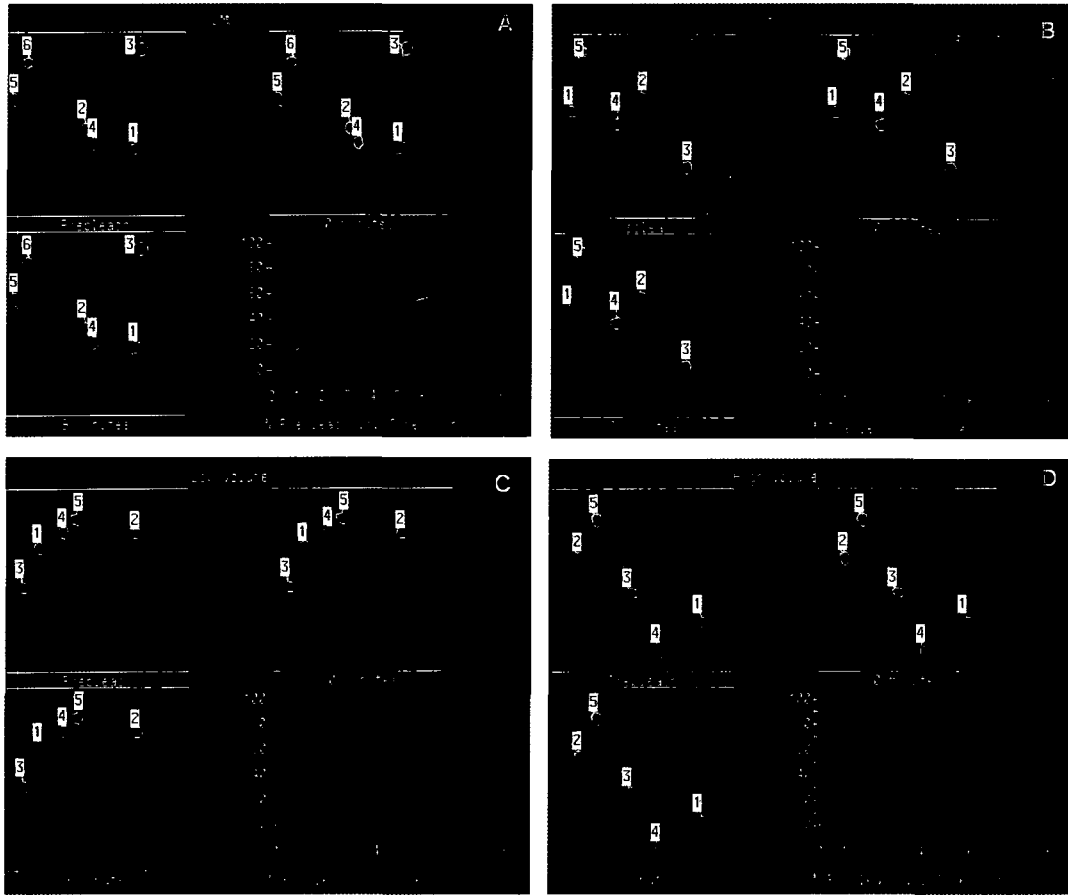


Fig. 3. Recovery rates of fluorescent dye after 9 minutes in WBF-344 cells treated with different agents for 1 hour using fluorescence recovery after photobleaching assay. (A) DMSO (B) TPA (C) Low Volume (D) High Volume

1994). Connexin은 종(species)이나 세포 type에 따라서 다양한데, 예를들어 랫드의 경우, 심장에서는 connexin 43이 발현되는 반면, 간세포(hepatocyte)에서는 connexin 32와 26이 주로 발현된다(Kren *et al.*, 1993). 또한 같은 간 유래일지라도 hepatocyte가 connexin 32나 connexin 26을 발현하는 것과는 달리, WB-F344 세포 등을 비롯한 대부분의 랫드 간상피세포에서는 connexin 43이 발현된다. 그리고, gap junction이 세포간의 신호전달 통로 역할을 하는 만큼, 여러 가지 요인에 의해 그 기능이 영향을 받게 된다(Esinduy *et al.*, 1995). 특히 많은 발암촉진제들이 GJIC*를 억제한다고 알려져 있어 세포성장, 분화에 있어 그 기능의 중요성을 암시해 주고 있다

(Kang *et al.*, 1996; Ruch *et al.*, 1994).

따라서, GJIC의 변화를 관찰하여 물질의 위해도를 평가하는 방법으로 활용할 수 있는데, 본 연구에서는 여천 공단지역에서 대기물질을 포집하여 유기용매로 추출한 다음 그 복합물질을 평가하였다.

여천 공단지역에서 채취한 대기오염물질을 유기용매로 추출하여 얻은 시료를 추출액의 400배로 희석한 농도를 최고 용량으로 하여 WBF-344 랫드 간상피세포에 적용한 결과, neutral red uptake 면에서 최고용량까지 세포독성이 없었다. 또한 scrape-loading dye transfer (SL/DT) assay 결과, 로우볼륨과 하이볼륨시료는 60분 배양시간에 gap junction이 최고로 억제되는 반면, 공여지는 gap junction에 영향이 없

는 것으로 나타나 물질의 영향이 포집 filter에 의한 것이 아니라 포집물질 자체독성에 의한 것이라는 것을 알 수 있었다. 이에 60분을 최고 억제시간으로 설정하여 FRAP assay를 실시한 결과, 일정 시간 후의 형광회복율이 음성대조군 100% 비하여 로우블롭시료 62%, 하이블롭시료 33%로 GJIC가 통계적으로 유의하게 억제되는 것을 알 수가 있었다. GJIC의 억제율은 SL/DT assay와 차이가 있는데 이는 실험 방법이 다른데서 오는 차이라 할 수 있으나, 그 경향은 다르지 않았으며, 로우블롭시료가 하이블롭시료보다 억제효과가 적었다. 즉, 하이블롭시료에 gap junction을 억제하는데 관여하는 물질이 더 많이 함유되어 있거나 더 강력한 억제물질이 함유되어 있음을 의미하는 것이다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 여천 공단지역에서 채취한 대기오염물질은 복합물질을 함유한 유기추출물 상태로 세포에 투여하였을 때, gap junction을 억제시켰으며, 이는 시료 중의 성분들이 gap junction을 매개로 하는 생체의 기능을 저하시켜 독성을 일으킬 수 있음을 암시하는 것이다.

참 고 문 헌

- Asamoto M., M. Oyamada, A. El Aoumari, D. Gros, and H. Yamasaki (1991) Molecular mechanisms of TPA-mediated inhibition of gap-junctional intercellular communication: Evidence for action on the assembly or function but not the expression of connexin43 in rat liver epithelial cells, *Mol. Carcinogenesis*, 4, 322-327.
- Bennett, M.V.L., L.C. Barrio, T.A. Bargiello, D.C. Spray, E. Hertzberg, and J.C. Saez (1991) Gap junctions: New tools, new answers, new question, *Neuron*, 6, 305-320.
- Crebelli, R., S. Fuselli, T. Baldassarri, G. Ziemacki, A. Carere, and Benigni, R.(1995) Genotoxicity of urban air particulate matter: Correlations between mutagenicity data, airborne micropollutants, and meteorological parameters, *Int. J. Environ. Health Res.*, 5(1), 19-34.
- Dermietzel, R., T.K. Hwang, and D.S. Spray (1990) The gap junction family: Structure, function, and chemistry, *Anat. Embryol.*, 182, 517-528.
- Doyle, A., J.B. Griffiths, D.G. Newell (1993) *Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John & Sons Ltd. Salisbury, UK.
- EI-Fouly, M.H., J.E. Trosko, and C.C. Chang (1987) Scrape-loading and dye transfer, *Exp. Cell Res.*, 168, 422-430.
- Esinduy, C.B., C.C. Chang, J.E. Trosko, and R.J. Ruch (1995) *In vitro* growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: Requirement for gap junctional intercellular communication, *Carcinogenesis*, 16(4), 915-921.
- Kang, K.S., M.R. Wilson, T. Hayashi, C.C. Chang, and J.E. Trosko (1996) Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone for in mixture, *Environmental Health Perspectives*, 104(2), 192-200.
- Kren, B.T., N.M. Kumar, S. Wang, N.B. Gilula, and C.J. Steer (1993) Differential regulation of multiple gap junction transcripts and proteins during rat liver regeneration, *J. Cell Biol.*, 123(3), 707-718.
- Mesnil, M. and H. Yamasaki (1993) Cell-cell communication and growth control of normal and cancer cells: Evidence and hypothesis, *Mol. Carcinogenesis*, 7, 14-17.
- Pershagen, G.(1990) Air pollution and cancer in *Complex Mixtures and Cancer Risk*. Edited by H. vainio, M. Sorsa, and A.J. McMichael, Oxford University Press, New York, 240-251.
- Rall, D.P.(1990): *Carcinogens in Our Environment in Complex Mixtures and Cancer Risk*. Edited by H. vainio, M. Sorsa, and A.J. McMichael, Oxford University Press, New York, 233-239.
- Ruch, R.J., W.J. Bonney, K. Sigler, X. Guan, D. Matesic, L.D. Schafer, E. Dupont, and J.E. Trosko (1994) Loss of gap junctions from DDT-treated rat liver epithelial cells, *Carcinogenesis*, 5(2), 301-306.
- Wade, M.H., J.E. Trosko, M. Schindler (1986) Fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells, *Science*, 232, 525-528.
- Zhang, M. and S.S. Thorgeirsson (1994) Modulation of connexins during differentiation of oval cells into hepatocytes, *Experimental Cell Res.*, 213, 37-42.

별표 1. Number of cells with fluorescence in scrape-loading dye transfer assay for air pollutants.

	Duration of Treatment (min)							
	10	20	30	60	90	120	240	360
DMSO	48.67 ±11.24 (100)	102.00 ±4.58 (100)	123.67 ±8.33 (100)	110.67 ±11.02 (100)	154.67 ±15.37 (100)	132.67 ±5.51 (100)	192.00 ±25.51 (100)	208.67 ±3.51 (100)
TPA	9.67 ±1.53* (18)	5.67 ±2.08* (6)	3.33 ±1.53* (3)	3.67 ±1.53* (3)	7.33 ±5.13* (5)	31.33 ±6.03* (24)	60.67 ±10.02* (32)	202.33 ±8.74 (97)
Low -volume	48.33 ±2.31 (99)	81.00 ±7.55* (79)	77.33 ±4.73* (63)	56.67 ±10.69* (51)	140.33 ±10.21 (91)	117.67 ±5.13 (89)	166.00 ±11.53 (86)	198.67 ±7.51 (95)
High -volume	52.67 ±12.74 (108)	74.00 ±8.89* (73)	65.00 ±10.54* (53)	47.67 ±9.07* (43)	119.67 ±7.02* (77)	97.33 ±13.87* (73)	164.67 ±6.43 (86)	153.67 ±22.37* (74)
Blank Filter	67.33 ±13.43 (138)	94.00 ±5.00 (92)	112.00 ±3.61 (91)	109.00 ±9.17 (98)	132.33 ±5.86 (86)	155.33 ±20.63 (117)	201.33 ±8.50 (105)	194.67 ±6.11 (93)

Values were expressed as mean ± S.D.

Values in parentheses were percentage for control in each time.

*, significantly different from control (DMSO) (p<0.05)