

## 사람의 유방상피세포에서 TCDD에 의한 발암성 연구

김정환 · 나혜경 · 서영준\*  
서울대학교 약학대학

### Investigation of Carcinogenic Potential of TCDD in the Human Breast Epithelial Cell Line

Jung-Hwan Kim, Hye-Kyung Na and Young-Joon Surh  
Laboratory of Biochemistry and Molecular Toxicology, College of Pharmacy,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received December 14, 2002 / Accepted December 30, 2002)

**ABSTRACT** : Dioxin represents a group of halogenated aromatic hydrocarbons of which 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is well known for its extremely toxic properties as well as ubiquitous presence in our environment and ecosystems. In order to better assess the carcinogenic mechanism of dioxin, we should utilize the reliable biomarkers that can precisely and correctly reflect multi-stage carcinogenesis. When MCF10A cells were exposed to TCDD (10 nM), expression of both CYP1A1 and CYP1B1 was induced in a time-related manner. The expression as well as activity of ornithine decarboxylase was transiently induced by TCDD treatment. In contrast, the induction of COX-2 that is implicated in carcinogenesis as well as inflammation, was not induced by TCDD. In another study, gap-junctional intercellular communication (GJIC) was attenuated by TCDD treatment as revealed by the dye-transfer assay. Based on these findings, TCDD has both tumor initiating and promoting potential in human breast epithelial cells in culture. Also, treatment of MCF10A cells with the carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene plus TCDD resulted in malignant cell transformation as revealed by increased anchorage-independent growth of exposed cells. Additional studies may be necessary to assess the effects of TCDD on multi-stage carcinogenesis *in vivo*.

**Keywords** : TCDD, MCF10A cells, carcinogenesis, CYP1A1, CYP1B1

## 서 론

심각한 환경오염 및 생태계에 위협을 주고 있는 다이옥신은 방향족 할로겐 화합물(halogenated aromatic hydrocarbon)의 복합 이성체로 존재하며 그중 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(TCDD)은 가장 강력한 독성을 가진 물질로 잘 알려져 있다. Dioxin은 유기물질의 불완전 연소시나 제조제로 쓰이는 chlorinated phenol류 화합물들의 생성시 부산물로 생성되며 잘 분해되지 않아 생태계에 계속적으로 축적될 뿐 아니라 생체내 효소에 의해 대사되지 않아 인체내 지방조직에서의 반감기가 7년 내지 8년에 이르는 것으로 알려져 있다. 1976년 이태리 Seveso 농약제조 공장에서의 다이옥신 유출사건과 베트남 전쟁 당시 밀림에 살포된 제조제인 Agent Orange의 부산물인 TCDD에 노출된 참전용사들을 대상으로한 조사결과 그리고 실험실 연구를 통해 dioxin은

면역기능저하(immunosuppression), 발암유도(carcinogenesis), 간 독성(hepatotoxicity), 약물 대사효소의 유도(xenobiotic metabolizing enzyme induction), 기형유발(teratogenesis), 흉선퇴행(thymic involution), 불임(sterility), 에스트로젠 길항작용(antiestrogenic effect) 및 피부염증을 수반하는 염소좌창(chloracne)등의 다양한 종 특이적, 조직 특이적인 독성을 나타내는 것으로 확인되었다(Fernandez-Salguero, *et al.* 1995; Poland and Knudson, 1982; Safe, 1986; Whitlock, 1993). 다이옥신의 다양한 생체독성에 대한 메커니즘은 아직 확실히 규명되지 않았지만 대부분의 다이옥신 독성은 세포질에 존재하는 수용체인 aromatic hydrocarbon receptor (AhR)와의 결합을 통해 매개되는 것으로 생각된다. 다이옥신 이성질체간의 AhR에 대한 친화도와 그 독성의 정도가 비례 관계를 보이는 것으로 보아 다이옥신의 독성은 AhR을 활성화 화합물로서 나타난다고 생각되고 있다. AhR은 dioxin의 다른 polyaromatic hydrocarbon(PAH)들 즉 3-methylcholanthrene 나 benzo[a]pyrene 과도 높은 친화도를 보이며 소수성

\*To whom correspondence should be addressed

(hydrophobic) 화합물인 dioxin은 확산에 의해 세포막을 통과한 후 heat shock protein 90(Hsp90)와 complex를 이루고 있는 AhR과 결합한다. Dioxin과 결합한 AhR은 Hsp90와 분리된 후 핵으로 이동되어 핵 안에 존재하는 단백질인 AhR nuclear translocator(Arnt)라는 단백질과 결합하여 AhR/Arnt heterodimer를 이루며, AhR/Arnt heterodimer는 cytochrome P4501A1의 해당 유전자 CYP1A1의 enhancer 상의 dioxin responsive element(DRE)라고 불리는 특정 DNA sequence와 결합하여 CYP1A1 gene의 chromosome의 구조를 변화시킴으로 CYP1A1의 transcription을 증가시킨다고 알려졌다(Whitlock, 1996; Hankinson, 1995). AhR은 스테로이드 호르몬 수용체와 마찬가지로 ligand와 결합하여 핵으로 이동하여 transactivator 작용함으로써 특정 유전자들 예를 들면 glutathione S-transferase Ya, aldehyde dehydrogenase, NAD(P)H: quinone oxidoreductase 및 cytochrome P4501A1/2 및 P4501B1, P4503A4 등 약물대사효소의 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Dunn *et al.*, 1938; Whitlock, 1993). 최근 논의되고 있는 다이옥신의 생체독성은 de novo synthesis에 의하여 증가된 P4501A1/2 및 1B1 등의 대사효소의 활성화로 인한 그들 기질인 다환계 방향족(polyaromatic hydrocarbons) 계열의 외인성 발암물질이나 내인성 발암물질인 에스트로겐의 대사 양상의 변화와 관련 있는 것으로 생각된다(Andreola, *et al.*, 1997; Gierthy, *et al.*, 1988; Kohn, *et al.*, 1996; Spink *et al.*, 1990).

다이옥신의 AhR을 통한 CYP1A1등의 전사증가기전을 분자 수준에서 자세히 밝히기는 하였으나 다이옥신에 의한 다른 독성들 즉, 암 촉진, 면역기능 억제, 신경독성, 세포증식, 체중감소 등의 다양한 현상에 부합하는 특정 유전자의 전사증가는 아직 알려지지 않았다. 다이옥신의 다양한 독성기전을 전사수준의 조절에만 의존한다기보다 오히려 면역세포에서처럼 다이옥신이 AhR 비의존적 Ca<sup>++</sup>의 증가를 유발하여 세포의 기능을 간섭하는 경우나 ligand와 결합한 AhR/Arnt가 생체 내 다른 신호체계를 억제 혹은 촉진하는 경우를 생각할 수 있겠다(Holsapple *et al.*, 1996). 이러한 맥락에서 AhR과 Arnt 각기 immunophilin, Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ 등과 결합하여 다른 신호 전달계에 상호작용을 할 가능성이 높아지고 있다(Li *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1996).

International Agency for Research on Cancer(IARC)에서 보고한 역학 연구결과에 따르면 다이옥신은 Group I의 인체발암물질로 규정하고 있으며, 실험동물 및 배양된 세포를 이용한 연구에서도 다이옥신의 발암성은 검증되었지만 그 작용기전에 대해 분명히 규명된 바는 아직 없다. 다이옥신이 암화를 유도하는 것은 사실이지만, 실제 이 화합물이 직접 표적세포의 DNA를 공격하여 DNA에 구조적 변화를 일으켜

세포의 돌연변이를 유도한다는 실험적 증거는 충분하지 않다. 오히려 다이옥신이 발암물질의 대사 활성화를 유도하며 그로 인해 생성된 활성화된 최종발암물질이 DNA와 공유 결합하여 DNA의 돌연변이를 유발함으로써 암화과정을 간접적으로 개시시킬 가능성이 높다고 본다. 반면 다이옥신이 다단계 발암과정(multi-stage carcinogenesis)을 촉진하는 tumor promoter로 작용한다는 연구 결과도 보고된 바 있으나 다이옥신의 발암성에 대한 대부분의 선행연구는 종양발생의 현상적 결과를 보고하였을 뿐 실제 그 분자생물학적 기전을 제시한 경우는 드물다.

본 연구에서는 대표적 다이옥신계 화합물인 TCDD를 배양된 인체 유방상피세포에 처리하여 다이옥신이 발암물질의 대사활성화에 중요한 역할을 하는 cytochrome P-450 1A과 1B1의 발현 유도를 통해 암 개시화(initiation)을 유도할 수 있는지의 여부를 알아보고자 하였다. 또한 TCDD가 tumor promoter로 작용하는지를 알아보고자 7,12-dimethylbenz[a]anthracene을 인체유방상피세포에 처리하여 initiation을 유도한 후 TCDD를 처리하여 neoplastic transformation이 일어나는지를 알아보았다. 아울러 종양촉진 단계를 반영하는 생체지표 특히 세포증식 및 염증에 관련된 효소들의 발현 및 활성을 측정함으로써 TCDD의 종양촉진 유도작용을 다각적으로 확인코자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서는 사람의 유방 상피세포인 MCF10A 세포를 사용하였고, TCDD는 CerilliantTM(Austin, TX, USA) 제품을 사용하였다. Anti-COX-2는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA) 제품을, anti-ornithine decarboxylase는 Sigma에서 사용하였고, anti-CYP1B1은 Gentest(Woburn, MA, USA) 제품을 사용하였다.

### 세포배양

MCF-10A 세포는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F12, 10  $\mu$ g/ml insulin(bovine), 100 ng/ml Cholera toxin, 0.5  $\mu$ g/ml hydrocortison, 20 ng/ml recombinant human epidermal growth factor(EGF), 0.5  $\mu$ g/ml fungi zone, 2 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml penicillin/streptomycin mixture, 5% horse serum 이 함유된 배지 상에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### Northern blot에 의한 mRNA 발현 측정

TCDD에 의한 CYP1A1과 CYP1B1의 transcription level

을 확인하기 위해 TCDD를 2일간 처리한 MCF10A 세포로부터 total RNA를 분리, 정량하였다. 각 그룹의 정량한 total RNA 6 µg을 formaldehyde-agarose gel에서 분리한 후, turbo blotter(Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)에 20×SSC를 이용하여 90분 동안 nylon transfer membrane으로 transfer시켰다. 이 membrane은 UV-crosslinking (1200 millijoules/cm<sup>2</sup>) 후 완전히 건조하여 ExpressHyb hybridization buffer로 1시간 동안 65°C에서 prehybridization 하였다. Rediprime label kit (Amersham, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP로 labelling한 CYP1A1과 CYP1B1을 새로운 hybridization buffer와 혼합하여 30분 동안 동일 조건에서 hybridization시켰다. Washing solution (1×SSC, 1×SDS)으로 상온에서 30분 동안 2번 세척한 후, X-ray film에 노출시켰다.

#### Omithine decarboxylase (ODC), cyclooxygenase-2 (COX-2) 및 connexin 43 (Cx43)의 Western blot analysis

MCF10A 세포를 plate에 2×10<sup>6</sup>개씩 깔고 12시간 안정화시킨 후 TCDD(0-10 nM)를 처리한 후 적정시간동안 세포를 배양하였다. 배양액을 버리고 PBS용액으로 세포를 닦아준 다음 스크래퍼로 세포를 떼어내어 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 여기에 120 µl의 cell lysis buffer[150 mM NaCl, 0.5% Triton×100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaF, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, protease inhibitor cocktail tablet (Boehringer Mannheim, Germany)]를 넣은 다음 얼음에서 40분간 lysis시킨 후 12,000 rpm에서 25분간 원심분리를 하여 protein lysate를 얻었다. BCA 정량법(Pierce)을 이용하여 정량한 단백질 30 µg을 10% SDS-PAGE에 전기영동한 후 전개시킨 단백질을 PVDF membrane(Gelman Sciences)에 옮겼다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 blocking한 후 각각의 primary antibody를 포함한 3% fat-free dry milk-PBS로 2-3시간동안 붙였으며, PBST용액으로 5분간 3회 세척을 한 후 secondary antibody를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간동안 붙였다. PBST용액으로 5분간 3회 세척한 후 enhanced chemoluminescence(ECL) reagent(Amersham Pharmacia Biotech., Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 1분간 반응한 뒤 X-ray 필름에 노출하였다.

#### ODC 활성 측정

TCDD를 처리한 MCF10A 세포(2×10<sup>6</sup> cells/ml)를 적정 시간에 수확하여 0.5 ml 균질화액(50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.1 mM pyridoxal phosphate, 0.1 mM EDTA)에서

polytron을 사용하여 균질화하였다. 균질액은 12,000xg에서 30분 동안 원심분리하였으며 여기에서 얻은 상층액 100 µl에 반응액(40 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 8 mM dithiothreitol, 0.64 mM pyridoxal phosphate, 0.8 mM EDTA) 115 µl를 혼합하였다. 이 혼합용액에 0.2 mM DL-[1-<sup>14</sup>C]ornithine 25 µl을 가하고, CO<sub>2</sub> trapper인 solvable<sup>®</sup>이 들어있는 center well을 넣어 stopper을 이용해 밀폐시켜 놓은 상태로 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 1시간 후 citric acid 50 µl를 주사기를 이용하여 solvableR에 가하여 반응을 종결시켰다. <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>가 포집된 solvable에 LSC-cocktail인 aquazol-2와 혼합하여 radioactivity를 측정하였다. 측정된 값은 단백질 양으로 보정하였다.

#### Gap junctional intercellular communication (GJIC) 실험

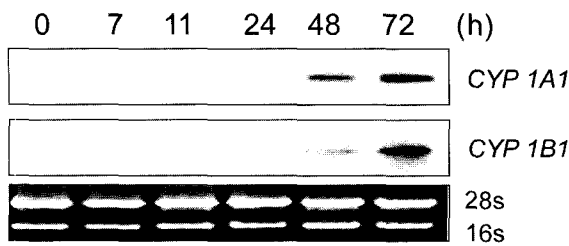
MCF10A 세포를 35 mm plate에 세포밀도가 80-100% 될 때 까지 배양시킨 다음 TCDD(10 nM)를 1시간 처리하였다. PBS 완충액으로 plate를 세 번 washing 후 2 ml (0.5 mg/ml) Lucifer yellow dye(Molecular probes, Eugene OR)를 넣은후 날카로운 칼을 이용하여 세포에 scrape하였다. 3-5분간 반응후 세포에서 Lucifer yellow dye를 제거하고 PBS로 세 번 washing 후 4% formalin/PBS를 이용하여 세포를 고정하였으며, 이를 fluorescence microscope를 이용하여 GJIC를 관찰하였다.

#### Two-stage transformation 실험

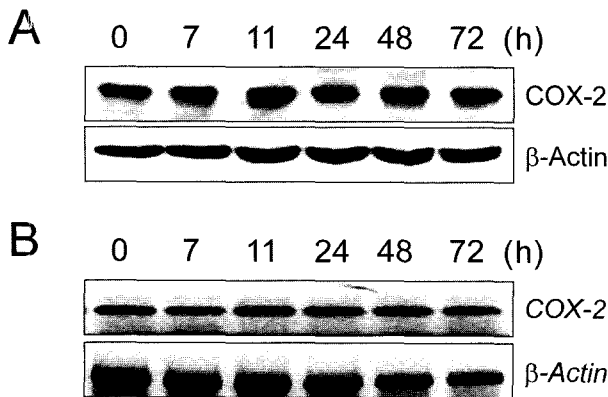
MCF10A 1.5×10<sup>5</sup> 세포를 0.26% agar medium에 섞은 후 미리 만들어 놓은 0.65% agar-coated 60 mm plate에 plating하였다. 24시간 후 initiating agent인 DMBA로 initiation 시킨 후 TCDD(10 nM)를 처리하거나 또는 TCDD만을 4일간 처리하였으며, 이후 TCDD를 제거하여 3주일간 배양하여 현미경으로 콜로니 형성을 관찰하였다.

## 결 과

강력한 독성을 가진 다이옥신계의 대표적인 화합물인 TCDD를 이용하여 다이옥신에 의한 암화과정인 대사활성화에 중요한 역할을 하는 cytochrome P450 1A1과 1B1의 발현 유도를 통해 이루어지는지를 알아보고자 Northern blotting을 실시한 결과 48시간부터 발현이 유도되어 72시간에서 CYP1A1과 CYP1B1의 mRNA의 발현이 최대를 이룸을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 위의 결과를 통해 인체유방상피세포에서 TCDD에 의해 CYP1A1/1B1의 발현이 유도됨을 확인할 수 있었으며, 이는 기존의 보고에서와 마찬가지로



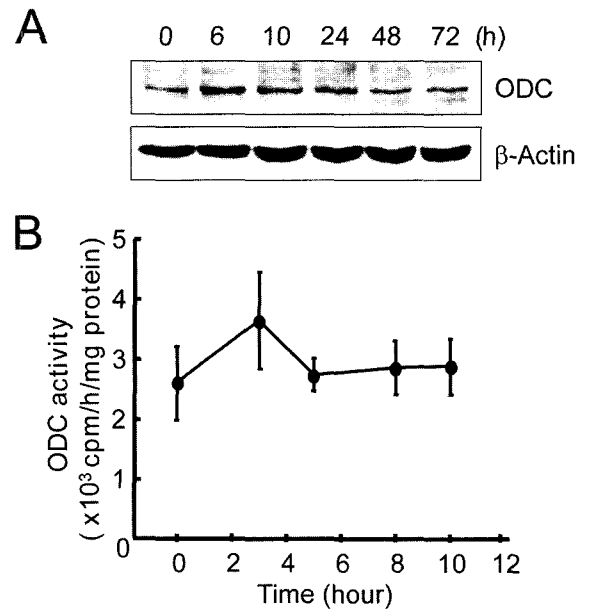
**Fig. 1.** Northern blot analysis of TCDD-induced CYP1A1 and CYP1B1 mRNA expression in MCF10A cells. Total RNA was isolated from TCDD (10 nM)-stimulated cells at various intervals. Six  $\mu$ g of total RNA was analyzed by Northern blot using the  $^{32}$ P-labeled CYP1A1 and CYP1B1 cDNA probes. Electrophoresed bands of 28S and 18S RNA of each sample are shown for normalization.



**Fig. 2.** Kinetics of TCDD on COX-2 expression in MCF10A cells. A) Western blot analysis of COX-2 expression. MCF10A cells were stimulated with 10 nM TCDD for the indicated periods. The level of COX-2 protein was measured by Western blot analysis as described in Materials and Methods. Actin protein was used as an equal loading control. B) RT-PCR analysis of COX-2 mRNA expression. Total RNA was isolated from TCDD-stimulated cells at various intervals. COX-2 mRNA was measured by RT-PCR as described in Materials and Methods. Expression of  $\beta$ -actin was monitored as an internal control.

로 다이옥신의 생체독성이 이들 대사효소의 유도과 관련있음을 시사해 준다.

다음으로는 archidonic acid로부터 다양한 프로스타글란딘을 합성하는데 있어 중요한 효소일 뿐만 아니라 다양한 cytokine, growth factor, reactive oxygen species, tumor promoter에 의해 유도되며, 여러 실험 및 역학조사로부터 암화과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료되는 COX-2의 발현 변화를 Western blot analysis와 RT-PCR을 통해 실시하였다. 실험결과 TCDD의 시간에 따른 COX-2의 단백질 발



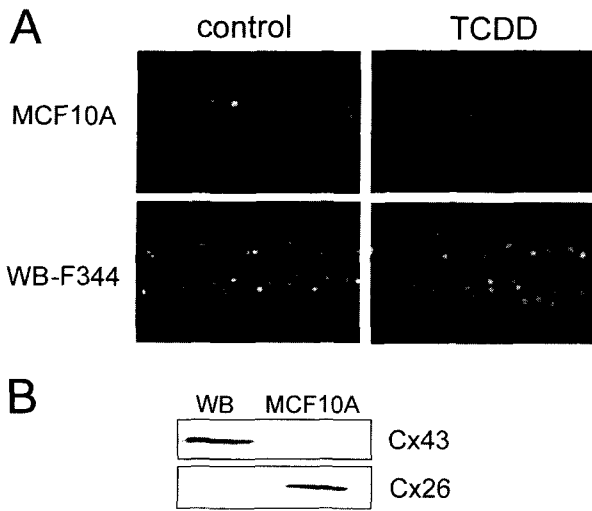
**Fig. 3.** Kinetics of TCDD-induced ODC expression and catalytic activity in MCF10A cells. A) Western blot analysis of TCDD-induced ODC expression. MCF10A cells were stimulated with 10 nM TCDD for the indicated periods. Actin protein was used as an equal loading control. B) The ODC activity was measured by a radiometric analysis based on the determination of  $^{14}$ CO $_2$  release from L-[1- $^{14}$ C]ornithine.

현(Fig. 2A) 및 mRNA 변화(Fig. 2B)를 관찰 할 수 없었다.

한편 세포증식(proliferation)에 중요한 역할을 하는 polyamine 생합성의 속도 조절 제한 효소이며, 종양촉진의 생화학적 지표로 널리 활용되는 오르니틴 탈탄산 효소(ODC)의 단백질 발현과 활성을 관찰한 결과, 단백질 발현은 6시간에서 약간 증가하였으며(Fig. 3A), 그 활성은 3시간에서 약간 증가한 후 정상으로 회복됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 3B).

세포의 항상성 유지에 중요한 gap junctional intercellular communication(GJIC)을 scrape/loading dye transfer assay를 이용해 MCF10A 세포와 positive control로서 GJIC이 잘 이루어지고 있는 랫드 간상피세포(WB-F344)를 사용하여 실시한 결과 TCDD가 MCF10A 세포 및 랫드 간상피세포의 GJIC를 현저히 억제함을 알 수 있었다(Fig. 4A). MCF10A 세포에서 GJIC에 관여하는 gap junction 단백질이 무엇인지를 알아보기 위해 랫드의 간상피세포(WB-F344 cells)의 주요한 gap junction 단백질인 Connexin 43에 대해 Western blotting을 실시한 결과 MCF10A cell에는 Connexin 43가 발현되지 않는 반면 다른 isoenzyme인 Connexin 26가 발현됨을 알 수 있었다(Fig. 4B).

또한 MCF10A세포를 이용하여 two-stage carcinogenesis

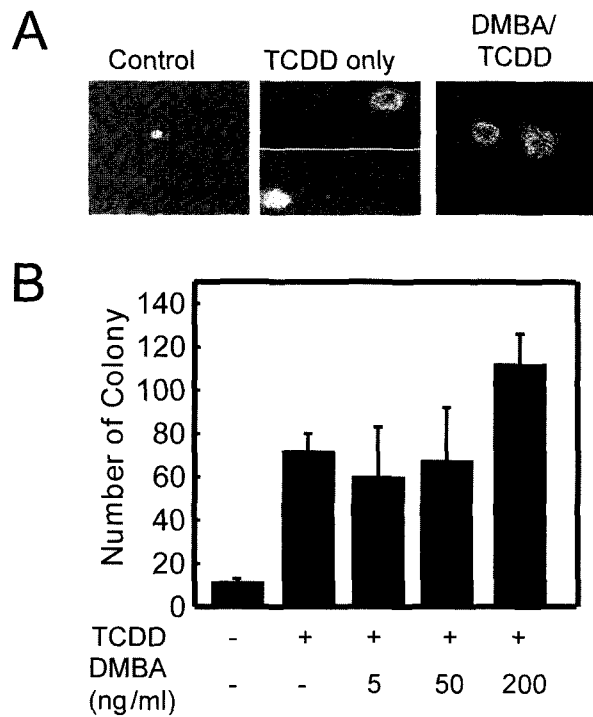


**Fig. 4.** A) Comparative effects of TCDD (10 nM) on gap junctional intercellular communication in MCF10A cells determined by the scrape/loading dye transfer method. B) Connexin (Cx) expression in the MCF10A cells by using Western blot analysis. Protein was isolated from MCF10A cells or WB-F344 cells, and Western blotting was carried out by using anti-Cx43 and anti-Cx26 as described in Materials and Methods.

model을 구축하고자 DMBA로 MCF10A 세포의 initiation을 유도한 후 TCDD로 MCF10A세포의 형질변화를 유도할 수 있는지를 anchorage-independent growth(AIG) assay를 통해 실시해 본 결과 아무것도 처리하지 않은 MCF10A 세포에서 AIG가 음성인 반면에 DMBA/TCDD 처리한 MCF10A 세포와 TCDD만 처리한 세포에서 AIG는 양성임을 알 수 있었다(Fig. 5A). 사용한 DMBA의 농도가 증가함에 따라 TCDD에 의한 콜로니 형성정도가 증가하였으며, TCDD가 MCF10A세포에서 control에 비해 7배에서 10배까지 콜로니 형성을 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

### 고찰

강력한 다이옥신계 화합물이 TCDD는 대기, 토양, 수중, 식품등 도처에 존재하는 환경오염물질로서 생체내에서 면역기능저하, 간 독성, 기형, 불임 및 암 유도 등 다양한 증 특이적, 조직 특이적인 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 지금까지 보고에 따르면 TCDD는 short term mutagenicity test에서 negative 한 결과를 보이고 직접 DNA에 결합하지 않는다는 보고로부터 암 개시 물질로 작용한다기 보다는 여러 실험동물 모델을 통해 강력한 종양촉진물질로 알려져 왔다. TCDD의 작용기작에 대해 완전하게 알려지지는 않았지만 *Ahr-null* mice에서 TCDD의 독성 및 병리적



**Fig. 5.** TCDD-induced transformation of MCF10A cells as determined by the anchorage independent growth assay. MCF10A cells were treated with indicated amount of DMBA and TCDD (10 nM) or TCDD alone. Colonies were visualized under microscope (A) or counted (B) 3 weeks after treatment.

인 효과에 저항성을 보인다는 보고 및 constitutively 활성화한 AhR를 가진 transgenic mice에서 위암이 발생했다는 보고로부터 TCDD의 주요한 생리적인 효과는 세포질에 존재하는 AhR의 활성화에 의해 유도되는 것으로 널리 받아들여지고 있다(Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 2002). 최근 보고된 바에 의하면 TCDD의 생체 독성은 de novo synthesis에 의하여 증가된 P4501A1/2 및 1B1 등의 대사효소의 활성화로 인한다고 한다. CYP1A1/A2는 17 $\beta$ -estradiol 2-hydroxylase activity를 CYP1B1은 17 $\beta$ -estradiol 4-hydroxylase activity를 가지고 있는데 이들이 내인성 17 $\beta$ -estradiol로부터 2-, 4-hydroxy estradiol을 형성하고 이들 catechols이 quinones으로 더욱 산화됨으로써 생성된 활성산소종에 의해 deoxyguanosine이 8-oxo-deoxy-guanosine (8-oxo-dG)을 형성한다고 본다(Tritscher *et al.*, 1996). 비록 TCDD에 의해 증가된 8-oxo-dG가 종양을 형성하는데 충분한것으로는 보여지진 않지만, 암화과정에 관여할 것으로 사료된다. 이들 보고를 바탕으로 TCDD가 CYP1A1과 CYP1B1을 유도하여 내인성 에스트로겐의 대사를 증가시켜 간접적으로 산화적 DNA손상을 야기함으로써 암 개시물질로

작용할 수 있음을 시사해 준다. 또한 TCDD는 세포내의 2차 신호전령물질(second messenger)로 작용하는 Ca<sup>2+</sup>농도를 증가시키는데 이로인한 protein kinase C의 활성화 및 세포내의 신호전달체계의 증폭으로 암화과정이 촉진된다는 보고가 있다(Tannheimer *et al.*, 1997). 아울러 AhR의 전사활성이 AhR자체 또는 AhR complex의 tyrosine 및 serine/theronine 인산화에 의해 결정되는 것으로 보아 세포의 증식 및 사멸을 조절하는데 중요한 역할을 하고 있는 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)가 AhR의 인산화에 관여할 것으로 보고 있으며, 최근 보고에 의하면 extracellular signal-regulated kinase(ERK)와 Jun-N-terminal kinase(JNK) 저해제가 TCDD에 의한 CYP1A1의 유도를 완전히 억제하였다는 실험적인 증거들이 보고 되고 있다 (Tan *et al.*, 2002).

본 연구에서는 대표적인 다이옥신계 화합물인 TCDD가 인체 유방상피세포에서 각종 외인성, 내인성 발암물질들의 대사활성화에 중요한 역할을 하는 cytochrome P450 1A1과 1B1을 유도함을 확인하였으며, 아울러 별도의 실험에서 세포 증식 및 염증에 관련된 효소중 ODC의 발현 및 활성화의 증가, GJC의 차단, 그리고 MCF10A 세포의 neoplastic transformation 유도등 다양한 생물학적 지표를 이용함으로써 TCDD가 발암 개시물질 뿐만 아니라 촉진물질로서 작용함을 확인할 수 있었다. 지금까지 다이옥신을 비롯한 다양한 다환계방향족 화합물의 발암성에 대한 분자생물학적 기전을 설명하는데 있어 AhR를 경유한 분자적 기전이 주를 이루었다. 따라서 다이옥신이 세포 내 신호전달체계에 미치는 영향 및 대사관련 효소의 발현에 있어 AhR를 제외한 다른 전사인자에 의한 조절 가능성을 분자 수준에서 규명함으로써 TCDD의 종양촉진 유도작용을 다각적으로 확인함이 필요하다고 본다. 이런 관점에서 다단계 발암과정에 미치는 TCDD의 작용을 개시(initiation) 및 촉진(promotion)과정으로 나누어 검토할 수 있는 시스템을 본 연구에서 구축함으로써 향후 연구에 많은 도움이 되리라 생각된다.

### 감사의 글

본 연구는 국립독성연구소 2002년도 용역연구비(ED-2002-29)에 의해 수행 되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M. L., Pettersson, S., Hanberg, A. and Poellinger, L. (2002): A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **99**, 9990-9995.  
 Ardreola, F., Fernandez-Salguero, P.M., Chiantore, M.V., Petkov-

ich, M.P., Gonzalez, F.J. and De Luca, L.M. (1997): Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR<sup>-/-</sup>) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.*, **57**, 2835-2838.  
 Dunn, T.J., Lindahl, R. and Pitot, H.C. (1988): Differential gene expression in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J. Biol. Chem.*, **263**, 10878-10886.  
 Fernandez-Salguero P., Pineau, T., Hilbert D.M., McPhail T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert D.W., Rudikoff, S., Ward J.M. and Gonzalez, F.J. (1995): Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, **268**, 722-726.  
 Gierthy, J.F., Lincoln, D.W. 2nd., Kampeik, S.J., Dickerman, H.W., Bradlow, H.L., Niwa, T. and Swanek, G.E. (1988): Enhancement of 2- and 16 $\alpha$ -estradiol hydroxylation in MCF-7 human breast cancer cell by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 515-520.  
 Hankinson, O. (1995): The Aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **35**, 307-340.  
 Holsapple, M.P. Karras, J.G., Ledbetter, J.A., Schieven, G.L., Burchiel, S.W., Davila, D.R., Schatz, A.R. and Kaminski, N.E. (1996): Molecular mechanisms of toxicant-induced immunosuppression: Role of second messengers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **36**, 131-159.  
 Kohn, M.C., Sewall, C.H., Lucier, G.W. and Portier, C.J. (1996): A mechanistic model of effects of dioxin on thyroid hormones in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **136**, 29-48.  
 Li, H, H.P. Ko, J.P. and Whitlock, Jr. (1996): Induction of phospholipase C gene expression by hypoxia: roles of Arnt and HIF1 $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, **271**, 21262-21267.  
 Ma, Q., Dong, L. and Whitlock, J.P. Jr. (1995): Transcriptional activation by the mouse Ah receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12697-12703.  
 Poland, A., and Knudson, J.C. (1982): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **22**, 517-554.  
 Safe, S.H. (1986): Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 371-399.  
 Spink, D.C., Lincoln, D.W. 2d, Dickerman, H.W. and Gierthy, J.F. (1990): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 $\beta$ -estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 6917-6921.  
 Tan, Z., Chang, X., Puga, A. and Xia, Y. (2002): Activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by aromatic hydrocarbons: role in the regulation of aryl hydrocarbon receptor (AHR) function. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 771-780.  
 Tannheimer, S. L., Barton S. L., Ethier, S. T. and Burchiel, S. W. (1997): Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons increase intracellular Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> and cell proliferation in primary human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis*, **18**, 1177-1182.  
 Tritscher, A. M., Seacat, A. M., Yager, J. M., Groopman J. D., Miller, B. D., Bell, D., Sutter, T. R. and Lucier, G. W. (1996): Increased oxidative DNA damage in livers of 2,3,7,8-tetrachlo-

- rodibenzo-p-dioxin treated intact but not ovariectomized rats. *Cancer Lett.*, **98**, 219-225.
- Whitlock, J.P., Jr. (1993): Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, 754-763.
- Whitlock, J.P. Jr., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q. and Li, H. (1996): Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FESEB J.*, **10**, 809-818.
- Wood, S.M., Gleadle, J.M., Pugh, C.W., Hankinson, O. and Ratcliffe, P.J. (1996): The roles of the Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) in hypoxia induction of gene expression. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15117-15123.