

## Daidzein이 Benzo(k)fluoroanthene에 의한 CYP1B1 유전자조절 작용에 미치는 영향

서미정 · 김여운 · 신윤용\*  
이화여자대학교 약학대학

## Effect of Daidzein on the Benzo(k)fluoroanthene Regulated CYP1B1 Gene Expression

Mi-Jung Seo, Yeo Woon Kim, and Yhun-Yhong Sheen\*

College of Pharmacy, Ewha Womans Univ, Seoul, Korea  
#11-1, Daehyun-dong, sudaemunku, seoul 120-750, Korea

(Received November 29, 2004 / Accepted December 23, 2004)

**ABSTRACT :** Cytochrome P4501B1 (CYP1B1) is known to be inducible by xenobiotic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and dioxins such as 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). And these induction of CYP1B1 is also regulated by many categories of chemicals. In order to investigate the effects of several chemicals on CYP1B1 gene expression in Hepa-I and MCF-7 cells, 5' flanking DNA of human CYP1B1 was cloned into pGL3 basic vector containing luciferase gene, and then transfected into these cells. After treatment of chemicals, the luciferase activity was measured. CYP1B1 enzyme metabolize PAHs and estradiol. CYP1B1 metabolize estradiol to 4-hydroxyestradiol that is considered as carcinogenic metabolite. Recent industrialized society, human has been widely been exposed to widespread environmental contaminants such as PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbon) that are originated from the incomplete combustion of hydrocarbons. PAHs are known to be ligands of the AhR (aryl hydrocarbon receptor). Induction of cytochrome P4501B1 (CYP1B1) in cell culture is widely used as a biomarker for PAHs. Therefore we have studied the effect of PAHs in the human breast cancer cells MCF-7 to evaluate bioactivity of PAHs. We have used the United State of America EPA selected 13 different PAHs, PAHs mixtures and extracts from environmental samples to evaluate the bioassay system. We examined effects of PAHs on the CYP1B1-luciferase reporter gene and CYP1B1 mRNA level. Benzo(k)fluoroanthene showed strong response to CYP1B1 promoter activity stimulation, and also CYP1B1 mRNAs increase in MCF-7 cells in a concentration-dependent manner. RT-PCR analysis indicated that PAHs significantly up-regulate the level of CYP1B1 mRNA. Some flavonoids such as genistein, daidzein, chrysin, naringenin and morin were also investigated. These flavonoids decreased B(k)F induced luciferase activity at low concentration. But, these flavonoids exhibited stimulatory effect at high concentration.

Key words : Daidzein, CYP1B1, Benzo(k)fluoroanthene, PAIT, MCF-7

### 서 론

Cytochrome P450 (CYP) 효소계는 산화 과정을 촉매한다. CYP 기질은 대부분의 임상약물과 steroids, fatty acids, eicosanoids, retinoids와 prostaglandins 등의 내인성 물질 등 200,000개가 넘는다 (Lewis *et al.*, 1998). CYP의 명칭은 아미노산 서열의 유사성에 근거한다 (Rogers J.F. *et al.*, 2002). 사람에게 있어서 CYP superfamily는 4종의 효소계인 CYP1, CYP2, CYP3와 CYP4를 포함한다 (Gonzales *et al.*,

1998). 일부 CYP는 외인성 물질에 의해 유도되어 세포내 특정한 수용체와 결합해 유전자의 발현을 조절한다. 이러한 효소는 다양한 조직에서 발현되나, 간에서 가장 많이 발현된다. 세포내에서 CYP는 소포체의 세포질 부분에 위치한다.

CYP1B1은 비교적 최근에 유전자 염기 서열이 밝혀졌고 (Sutter *et al.*, 1994), 간 이외의 신장, 유방, 전립선과 같은 여러 가지 조직들에서 다르게 발현된다 (Sutter *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1996). Benzo(a)pyrene과 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)와 같은 다환상 방향족 탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)를 대사해 활성화시키고, estrogene과 catechol estrogene의 대사에 관

\*To whom correspondence should be addressed

여한다고 알려져 있다. CYP1 효소들 가운데 CYP1B1이 새로운 약물 개발의 표적으로 각광받고 있는 이유는 다양한 종류의 암 조직에서 CYP1B1이 많은 빈도로 발견되고 정상 조직에서는 발견되지 않기 때문이다 (Murray G.I. *et al.*, 1997). 또한 17 $\beta$ -estradiol은 CYP1A1과 CYP1B1에 의하여 각각 2-hydroxyestradiol과 4-hydroxyestradiol로 대사 되는데, CYP1B1의 대사 산물인 4-hydroxyestradiol이 발암과 관련된 것으로 보고되고 있다 (Hayes *et al.*, 1996; Shimada *et al.*, 1999). 2-Hydroxyestradiol을 투여한 경우 암이 발생하지 않는 반면, 4-hydroxyestradiol을 Syrian hamster에 투여하였을 때 신장암이 발생하였다 (Li *et al.*, 1987; Liehr *et al.*, 1986). CYP1B1의 이러한 발암 작용은 CYP1B1의 특이적인 저해제가 항암제 (antimutagenic agent)로 개발될 수 있다는 것을 보여준다. 사람의 CYP1B1의 5'-flanking-2.3kb 부분에는 여덟 개의 XRE가 존재한다 (Tang *et al.*, 1996). CYP1B1 유전자의 전사조절 부위 (promotor region)에는 CYP1A1과 CYP1A2의 전사조절 부위와는 구조적으로 다른 몇 가지의 전사유도 부위와 전사억제 부위가 존재한다는 것이 밝혀졌다 (Wo *et al.*, 1997). AhR (aryl hydrocarbon receptor)을 매개로 한 CYP1B1의 발현 기전은 잘 알려져 있으나, AhR을 통하지 않는 다른 전사 조절 경로나 전사 후 (post-transcriptional) 조절 기전이 존재한다고 추측하고 있다. 사람 CYP1B1 유전자의 mRNA는 여러 개의 polyadenylation 부위를 가지고 있는데, 이것이 세포 특이적으로 작용하여, 최종적인 발현 정도를 조절한다 (Shehin *et al.*, 2000).

AhR은 리간드와 결합하기 전에 두개의 hsp 90 chaperones, small protein (p23)과 번역관련 단백질인 XAP, AIP 혹은 ARA9과 복합체를 이뤄 세포질에 존재한다. Hsp 90은 리간드가 결합하기 용이한 구조로 AhR의 전사 활성화를 막는 chaperone 단백질 시스템이다 (Scheme 1). 리간드가 결합하면 chaperone 단백질은 분리되어 나가고 AhR은 핵 내로 이동하여 hypoxia inducible factor-1 $\beta$  (HIF-1 $\beta$ )로 알려진 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)와 180-220 kDa (Matsumura *et al.*, 2003)의 이종중합체 (heterodimer)를 형성한다 (Safe *et al.*, 2001). 이 이종중합체는 DNA의 특정 부위인 dioxin 또는 xenobiotics responsive element (DRE 또는 XRE)에 결합하며, DRE의 핵심 서열은 5'-TNGCGTG-3'로 유전자 발현을 활성화시킨다 (Mimuraa *et al.*, 2003).

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)는 전사 인자인 PAS (Per-ARNT-Sim) family에 속하며, II 상 대사 효소 뿐 아니라 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1의 발현을 조절한다 (Mimuraa *et al.*, 2003; Nebert *et al.*, 2000). PAS family는 basic helix-loop-helix (bHLH)의 특징적인 구조적 단위를 가

지고 있다. AhR, ARNT, AhRR (aryl hydrocarbon receptor repressor) 등이 PAS family에 속한다. bHLH 단위는 세포 증식과 분화, 신경계와 B-cell 분화와 성별 결정에 관여하는 단백질의 특징적인 구조이다 (Hahn *et al.*, 1998).

사람의 AhR 유전자는 7번 염색체에 위치하며 12개의 exon으로 되어있다 (Hahn *et al.*, 2002; Harper *et al.*, 2002). 848개의 단백질로 구성되어 있고 분자량은 96,147 Da이다. 대표적인 AhR 리간드는 다환상 방향족 탄화수소류 (polycyclic aromatic hydrocarbon)와 TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)가 있다. 이러한 물질은 설치류에서 발암과 면역 억제, 내분비계 교란 등의 유해한 반응들을 유도하며 (Barouki *et al.*, 2001), 그 중 TCDD는 가장 강력한 AhR 리간드로 알려져 있다.

식품에 널리 분포하는 황색계통의 색소인 flavonoid는 비타민 P 또는 비타민 C2 라고 부르기도 하며 고등식물의 잎, 꽃 등에 들어 있다. 넓은 의미의 flavonoid는 anthoxanthin류와 anthocyanin류, catechin류를 포함하지만 좁은 의미에서의 flavonoid는 anthoxanthin류만을 의미한다 (Chan *et al.*, 2003).

Phytochemicals 중 가장 주목을 받고 있는 생리활성물질의 하나로서 항산화 작용을 비롯한 항암, 항혈전, 항염증, 항알레르기 및 항균작용 등의 여러 생리적 작용을 지니고 있다. 특히, 항산화성 활성이 있는 flavonoid는 자외선을 흡수하거나 2가 금속이온 (Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>) 과 착염을 형성하며, 수소공여체로서 활성산소종을 포착하여 지질 과산화반응 (lipid peroxidation)을 억제함으로써 암뿐만 아니라 고혈압, 협심증 및 노화 억제에 중요한 역할을 한다 (Jeffy *et al.*, 2002). Flavonoid는 방향족 아미노산 (phenylalanine, tyrosine) 과 malonate로부터 식물에서 형성된다. Flavonoid 구조의 기본은 flavan nucleus이다. 이것은 15개의 탄소 원소가 세 개의 고리구조 (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)로 배열되어 있다. 이 고리는 A, B, C로 표시한다. 천연의 flavonoid 화합물 중 가장 많이 존재하는 것이 flavonol 및 flavone 화합물로서 그 주된 aglycone은 quercetin, kaempferol, luteolin과 apigenin이다. 이들 flavonoid는 사람의 식이 중에 과일, 야채에 다량 함유되어 있다. 오렌지주스는 다량의 hesperidin을 포함하고 있으며, 포도주에는 naringin, 녹차에는 catechin이 함유되어 있다 (Wang *et al.*, 1989).

Flavonoid는 일반적으로 식물에서 glycosylated된 형태의 파생물이며, 잎, 꽃, 과실에서 orange, scarlet, blue 색을 띠게 하는데 관여한다. 다양한 과실과 야채 이외에도 flavonoid는 포도주 (특히 적포도주), 차, 맥주와 같은 음료와 씨앗, 땅콩, 곡류, 향신료, 약용 식물에서 발견된다. Flavonoid의 많은 종 가운데 특별히 관심을 가지는 것은 flavones,

flavanones, isoflavones, flavonols, flavanonols, flavan-3-ols, anthocyanidins이며, biflavones, chalcones, aurones, coumarins, hydrolyzable tannins, proanthocyanidins (flavan-3-ol oligomers), caffeates, lignans을 포함한 다른 flavonoid는 모두 plant phenol이며, 이들은 구조에 따라 분류된다 (Babich *et al.*, 1988).

본 논문에서는 human CYP1B1의 5' flanking 부분을 pGL3 vector에 clone한 *phCYP1B1-Luc*을 사람 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 환경 유해물질인 다환상 방향족 탄화수소류를 처리하여 CYP1B1의 유전자 발현 및 mRNA level에 미치는 영향을 연구하였고, 임상 약물 대사효소인 CYP1B1 유전자 발현에 대한 유도제들의 영향과 daidzein이 억제 효과가 있음을 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

Hepa-I 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다. MCF-7 세포는 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다. Hepa-I 세포는 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 3일에 1회 1:5의 비율로 계대 배양하였다. MCF-7 세포는 Table 1의 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 5일에 1회 1:4의 비율로 계대 배양하였다. *ph1B1-Luc*을 포함하는 영구세포주인 Hepa-I-1B1-luc stable cell은 Table 1-E의 5% FBS-MEM with G418을 배지로 사용하여 3일에 1회 정도 1:4의 비율로 계대 배양하였다. Hepa-I, MCF-7 세포와 Hepa-I-1B1-luc 영구세포주는 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator 내에서 배양하였고 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

### 약물처리

세포에 DMSO에 현탁시킨 각 농도의 약물을 포함한 medium으로 전처치를 시행한 후, 10<sup>-9</sup>M 혹은 10<sup>-10</sup>M TCDD를 처리하고 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간을 배양하였다. 대조군은 약물을 용해시킨 용매만을 처리한 것으로, 이때 용매로 사용한 DMSO의 최종농도가 0.2%를 넘지 않도록 하였다.

### Plasmids

본 실험실에 보관 중인 Human cytochrome *P4501B1* gene의 5' flanking 부분을 포함한 luciferase plasmid (*ph1B1-Luc*)를 사용하였다.

### Transformation

*phCYP1B1-Luc*를 100 ng정도 취하여 전체량이 10 µl가 되게 한 뒤, competent cell (*E. coli DH5a cell*) 15 µl를 넣어준 후 얼음 위에서 45분 이상 방치하였다. 이를 42°C에서 90초간 열 처리한 뒤에 얼음 위에서 1~2분 동안 급냉시킨 후, SOC 배지 150 µl를 넣어 37°C에서 2~3시간 진탕 배양하였다. 그 배양액 50~100 µl를 50 µg/ml ampicillin을 포함하는 LB agar 평판 배지에 도포하고 37°C incubator에서 하룻밤 동안 배양하여 단일 세포 집락을 얻었다.

### Plasmid preparation

Transformation하여 얻어진 단일 세포 집락을 50 µg/ml ampicillin을 포함하는 LB 배지 500 µl에 접종하여 37°C에서 약 2시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 50 µg/ml ampicillin을 포함하는 LB 배지 100 µl에 500~1,000 배 희석하여 37°C에서 12~16시간 진탕 배양하였다. 그 배양액을 4°C에서 2,500 rpm으로 15분간 원심 분리 하여 세포 침전물을 모은 뒤 PBS buffer를 넣고 덩어리가 남지 않도록 현탁시켰다. 이를 4°C에서 2500 rpm으로 5분간 원심 분리하여 세포 침전물을 모았다. 여기에 lysis buffer (solution I ; 50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) 0.5 ml을 넣고 vortex로 충분히 섞어준 후, lysozyme solution (lysozyme 10 mg/ml in 10 mM Tris-Cl pH 8.0) 21 µl를 가하고 얼음 위에서 20분 방치하였다. 그 후 이것을 상온으로 한 뒤 10% SDS 100 µl, 2 N NaOH 100 µl, ddH<sub>2</sub>O 800 µl가 혼합된 액 1 mL을 넣어준 뒤 rotator로 섞어주다가 액이 투명한 노란색이 되면 얼음 위에서 10분간 방치하고, 3 N NaAC (pH 4.6) 750 µl를 넣어 중화시킨 후, 얼음 위에서 20분 방치하였다. 그 후 4°C에서 15,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액에 RNase를 5.6 µl넣고 37°C water bath에서 20분간 반응시킨 뒤, 상온에서 phenol extraction을 했다. 계면에 불순물이 없어질 때까지 동량의 PCl<sub>4</sub>로 추 출을 반복했다. 얻어진 수층에 액의 2 volume absolute ethanol을 가하여 -70°C에서 1시간 방치한 다음 4, 10,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 얻어진 pellet을 400 µl의 dd H<sub>2</sub>O에 녹이고, 4 N NaCl 100 µl와 13% PEG 500 µl를 가한 뒤 얼음 위에서 정확히 45분 방치하였다. 이를 11,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 뒤 얻 어지는 pellet을 70% ethanol로 반복 세척하고 남아있는 ethanol을 speed vac으로 완전 건조시킨 뒤 멸균된 ddH<sub>2</sub>O에 녹이고 적당히 희석하여 260 nm, 280 nm에서 흡광 도를 측정해 그 양을 정량하였다. 이 중 260 nm, 280 nm에서의 흡광도 비가 1.8 이상인 DNA를 실험에 사용했으며, 0.8% agarose gel에서 전기영동으로 plasmid의 상태 및 크기를 확인했다.

### Transfection

Hepa-I 세포를 48 well plate에 seeding하고 60% 정도 잘 때까지 배양하였다. Lipofectamin 2.5 $\mu$ g을 포함하는 serum, antibiotics free MEM medium (without phenol red) 25  $\mu$ l 용액과, *pmCyp1a1 5'-Luc* construct 150 ng을 포함하는 serum free medium 25  $\mu$ l 용액을 섞고 상온에서 45분간 반응시킨 다음 200  $\mu$ l의 serum free medium을 더 가해 섞어주었다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척하고 여기에 위에서 반응시킨 혼합액을 각 well당 125  $\mu$ l씩 가했다. 이를 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 5시간 배양하고 2 $\times$ serum, antibiotics medium (MEM without phenol red) 125  $\mu$ l를 넣어주었다.

MCF-7 세포는 24 well plate에 seeding하고 60% 정도 잘 때까지 배양하였다. Tfx<sup>TM</sup>-50 1.2  $\mu$ l와 *phCYP1B1-luc* 0.4  $\mu$ g을 serum, antibiotics free medium (MEM without phenol red) 200  $\mu$ l에 넣고 잘 섞은 후 15분간 방치하였다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척하고 여기에 위에서 반응시킨 혼합액을 각 well당 200  $\mu$ l씩 가했다. 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 배양한 뒤 2 $\times$  serum, antibiotics medium (MEM without phenol red) 200  $\mu$ l를 넣어주었다.

### Luciferase 활성 측정

Gene construct를 세포에 transfection 시키고 전처리 약물들과 TCDD를 처리한 뒤 24시간 후에 luciferase 활성을 측정하였다. 각 세포가 포함된 well을 PBS로 2회 세척한 뒤, Hepa-I 세포일 때 reporter lysis buffer 30  $\mu$ l, MCF-7 세포일 때 reporter lysis buffer 50  $\mu$ l를 가하고 15분 동안 상온에서 incubation하여 lysis시켰다. 그 후 well에 물 100  $\mu$ l를 가하고 바닥을 scraper로 scrapping한 후 cell lysate에 luciferase assay reagent (Luciferin)를 가한 뒤, Berthold luminometer로 relative luminescence를 측정하였다. 수치는 단백질 정량에서 얻어진 단백질 양을 기준으로 RLU (relative luminescence unit/ $\mu$ g protein)로 환산하여, 대조군에 대한 fold induction으로 나타내었다. reporter lysis buffer (Promega)는 5 $\times$ 를 평균 증류수로 1 $\times$ 로 희석하여 사용하였으며, luciferase assay reagent는 luciferase assay buffer (10 ml)를 luciferase assay substrate에 넣어 reconstitution시키고 microcentrifuge tube에 aliquot해서 -20°C에서 보관한 것을 20~25°C에서 녹인 뒤 사용하였다.

### 단백질 정량

Bovine serum albumin (2 mg/ml)을 standard로하여 micro

BCA protein assay reagent kit를 사용하여 cell lysate의 supernatant protein 양을 ELISA reader로 측정했다. microtest III flexible assay 96 well plate에 cell lysate 25  $\mu$ l를 넣고 평균증류수를 가하여 총량이 50 $\mu$ l가 되게 하였다. 다음 micro BCA reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, tetrane를 0.2 N sodium hydroxide에 포함한 것), micro BCA reagent B (BCA detection reagent), micro BCA reagent C (4% cupric sulfate pentahydrate)를 50 : 48 : 2의 비율로 섞은 혼합액을 각 well에 50  $\mu$ l씩 가한 뒤 60°C에서 1시간 반응시키고 그 후에 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

### mRNA 측정

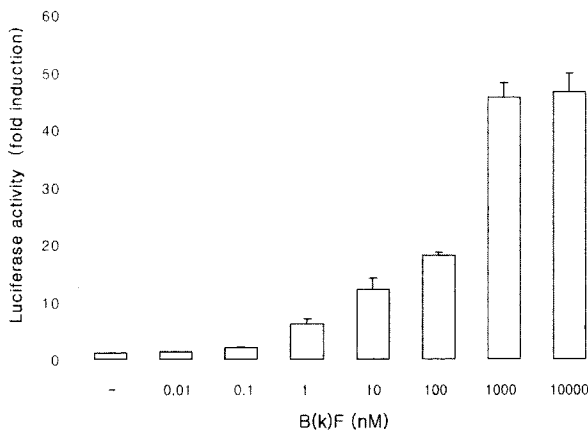
약물 처리한 세포를 모아서 PBS를 가하고 vortex하여 single cell로 만든 다음 1000 rpm에서 10초간 원심 분리시켜 얻은 세포 침전물에 0.1% DEPC를 가하고 10분간 끓여서 세포를 lysis시켰다. 이를 다시 10,000 rpm으로 1분간 원심분리하고 상정액을 취해 260 nm 파장에서 흡광도를 측정 한 뒤 다음의 식에 따라 농도를 구하였다.

분리한 total RNA 0.6  $\mu$ g에 해당하는 양에 0.1% DEPC를 가해 10.5  $\mu$ g가 되게 한 다음, 여기에 random primer 0.1  $\mu$ g을 넣고 70°C에서 10분간 incubation 시키고 얼음에서 급냉시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1  $\mu$ l, 100 mM DTT 2  $\mu$ l, 5 $\times$ first strand buffer (250 mM Tris-HCL (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 4  $\mu$ l와 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase 200 units, RNasin 20 units를 넣은 후 23°C에서 10분간 방치시켰다. 이후 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 박아 반응을 종결시켰다. RT product 1  $\mu$ l에 forward/reverse primer를 각각 20 pmol씩 넣고 10 $\times$  reaction buffer 1  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ l, 2.5 mM dNTPs 0.5  $\mu$ l, Taq polymerase 0.5 units을 가하고, 평균증류수를 넣어서 전체량이 10  $\mu$ l가 되도록 한 후에 Table 3의 조건으로 Minicycler (MJ research)에서 반응시켰다. PCR product는 ethidium bromide로 염색한 2% agarose gel상에서 전기영동하여 확인한 뒤, image analyzer를 사용하여 상대적인 양을 정량하였다.

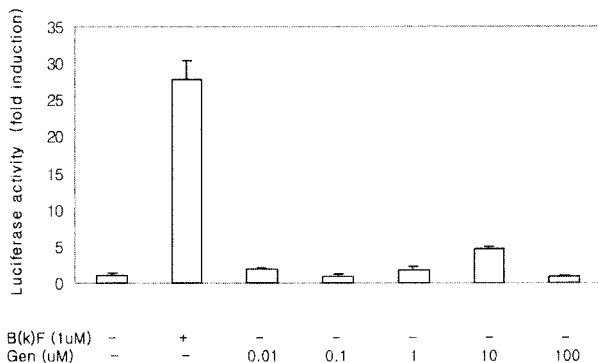
## 결 과

### MCF-7 세포에서 B(k)F가 CYP1B1 유전자 발현에 미치는 영향

MCF-7 세포에 *phCYP1B1-Luc*를 transfection한 후, PAHs 중에서 CYP1B1의 유전자 발현을 가장 많이 유도하는 B(k)F를 10<sup>-11</sup> M~10<sup>-5</sup> M 농도로 24시간 처리하여 발현



**Fig. 1.** The dose response of B(k)F on the luciferase activity in MCF-7 cells transfected with *phCYP1B1-Luc*. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

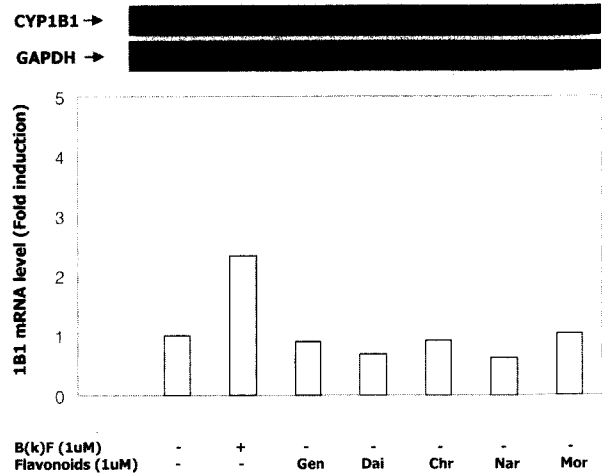


**Fig. 2.** The effect of daidzein on luciferase activity in MCF-7 cells transfected with *phCYP1B1-Luc*. After transfection, cells were treated with indicated concentrations of daidzein or 0.1% DMSO for 24 hrs. Luciferase activity was measured by Luminometer as described in Methods. The data represent mean  $\pm$  S.D. (n = 3).

되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 luciferase 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 1  $\mu$ M B(k)F 처치시 luciferase 활성은 대조군에 비해 45.6배 증가하였다 (Fig. 1).

#### Daidzein이 CYP1B1 유전자 발현에 미치는 영향

Flavonoids가 CYP1B1 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 위와 같은 방법으로 daidzein을 다양한 농도 ( $10^{-8}$  M~ $10^{-4}$  M)로 24시간 처치 후 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 1  $\mu$ M B(k)F를 단독 처치시 CYP1B1 유전자 발현은 대조군에 비해 40배 증가하였다. Daidzein을 실험농도에서 단독 처치하였을 때, CYP1B1 유



**Fig. 3.** The effects of genistein, daidzein, chrysin, naringenin and morin on the CYP1B1 mRNA expression in MCF-7 cells. Cells were treated with 0.1% DMSO or 1  $\mu$ M B(k)F or 1  $\mu$ M flavonoids for 24 hrs. CYP1B1 mRNA was determined by RT-PCR.

전자 발현은 대조군에 비해 큰 변화가 없었다 (Fig. 2).

#### Flavonoids가 CYP1B1 mRNA에 미치는 영향

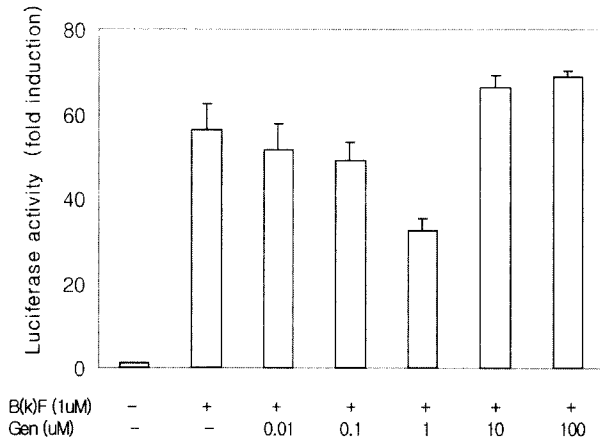
MCF-7 세포에 1  $\mu$ M B(k)F와 1  $\mu$ M의 genistein, daidzein, chrysin, naringenin, morin을 24 시간 처치한 후, 발현되는 CYP1B1 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 B(k)F은 CYP1B1 mRNA 발현을 증가시키는 반면 flavonoids는 대조군과 비교하여 차이가 없었다 (Fig. 3).

#### Daidzein이 B(k)F에 의한 CYP1B1 유전자 발현에 미치는 영향

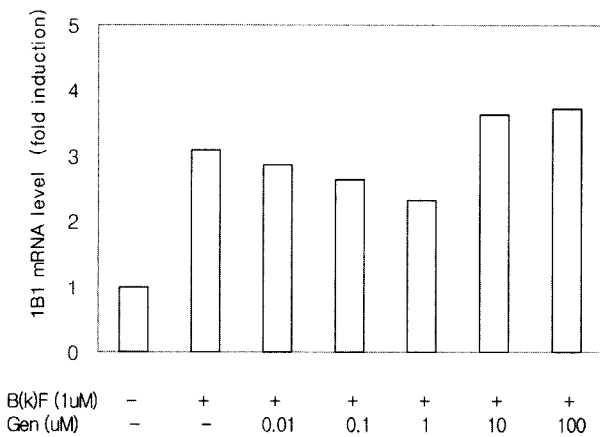
발암 의심 화학 물질인 PAHs 중에서 가장 강력하게 CYP1B1 유전자 발현을 유도하는 Benzo(k)fluoroanthene (B(k)F)과 다양한 농도 ( $10^{-8}$  M~ $10^{-4}$  M) daidzein 혼합 처치에 의한 CALUX activity를 측정하였다. 양성 대조군으로는 B(k)F 1  $\mu$ M을 처치하였다. 그 결과 1  $\mu$ M B(k)F를 단독 처치시 CYP1B1 유전자 발현은 대조군에 비해 55배 증가하였다. B(k)F에 의해 유도된 CYP1B1 유전자 발현은 daidzein을 10 nM~1  $\mu$ M 전처치 시 감소되었으나 10  $\mu$ M 이상의 고농도에서는 증가되었다 (Fig. 22).

#### Daidzein이 B(k)F에 의한 CYP1B1 mRNA에 미치는 영향

발암 의심 화학 물질인 Benzo(k)fluoroanthene (B(k)F)과 daidzein을 다양한 농도 ( $10^{-8}$  M~ $10^{-4}$  M)로 혼합 처치한 후 CYP1B1 mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 양성 대조군으로는 B(k)F 1  $\mu$ M을 처치하였다. 그 결과 1  $\mu$ M B(k)F



**Fig. 4.** The effect of daidzein on the B(k)F-induced luciferase activity in MCF-7 cells transfected with *phCYP1B1-Luc*. After transfection, cells were pretreated with indicated concentrations of daidzein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 µM B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was measured by Luminometer as described in Methods. The data represent mean  $\pm$  S.D. (n=3).



**Fig. 5.** The effect of daidzein on the B(k)F-induced CYP1B1 mRNA expression in MCF-7 cells. Cells were pretreated with indicated concentrations of daidzein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 µM B(k)F for 24 hrs. CYP1B1 mRNA was determined by RT-PCR.

을 단독 처치시 CYP1B1 mRNA 발현은 대조군에 비해 5.8배 증가하였다. B(k)F에 의해 유도된 CYP1B1 mRNA 발현은 daidzein을 10 nM~1 µM 전처리 시 감소되었으나 10 µM 이상의 고농도에서는 증가되었다 (Fig. 5).

## 고 찰

TCDD와 같은 리간드가 AhR에 결합하면, hsp 90 중합체로부터 유리되어 Arnt와 결합함으로써 핵 내로 이동하여 DNA에 결합할 수 있는 형태로 전환되어 CYP1B1과 같은

유전자의 upstream에 존재하는 DRE를 인식, 결합하여 chromatin과 nucleosome 구조를 느슨하게 하여 promoter로의 접근 및 유전자 전사를 활성화시키게 된다 (Denison *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1992; Okino *et al.*, 1995; Whitlock *et al.*, 1996). TCDD는 AhR에 강한 친화력을 가지고 있어 다른 화합물들의 AhR에 대한 결합력 실험에 좋은 도구로 사용되고 있다. 그러나, 친화력이 매우 낮은 리간드의 경우, AhR이 TCDD에 의해 완전히 포화되면 이와 경쟁할 수 없으므로 (Denison *et al.*, 1998), 본 논문에서는 CYP1B1 유전자 발현이 최대로 이루어지지 않게 TCDD 농도를  $2.5 \times 10^{-10}$  M로 조절하여 실험을 수행하였다.

Aryl hydrocarbon에 대한 반응성은 AhR 뿐만 아니라 estrogen receptor (ER)의 발현도 관련될 것으로 알려져 있다 (Dohr *et al.*, 1995; Thomsen *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993; Zacharewski *et al.*, 1991). ER이 존재하는 MCF-7 세포에서는 TCDD에 의해 CYP1A1 유전자 발현 및 EROD 효소 활성이 증가하나 ER이 존재하지 않는 MDA-MB-231 세포에서는 이러한 반응이 관찰되지 않았다 (Dohr *et al.*, 1995). AhR과 ER의 신호 전달 체계 사이의 상호교신 가능성이 제기되면서, TCDD가 estrogen에 의해 유도되는 여러 반응들을 억제하는 anti-estrogenic effect가 있음이 밝혀졌다 (Safe *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993; Zacharewski *et al.*, 1998). 그 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, gel mobility shift assay를 통해 TCDD에 의해 활성화된 AhR의 DRE 결합을 17β-estradiol이 방해함으로써 CYP1B1 유전자 발현을 억제한다는 보고가 있으며, 기본 전사 조절 인자인 nuclear factor-1 (NF-1)이 AhR 및 ER에 의한 유전자 전사에 동시에 관여하여, ER의 squelching 작용으로 인해 억제 효과가 나타날 가능성도 제시되고 있다 (Corthesy *et al.*, 1989; Indira *et al.*, 1996; Jeong *et al.*, 1998; Kharat *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1991; Ricci *et al.*, 1999).

Flavonoids는 estrogen 활성을 띠는 화합물로서의 기능과 더불어 CYP450 효소계의 유전자 발현에 대한 작용에 대해서도 꾸준히 연구되고 있다 (Balaguer *et al.*, 1995; Gehm *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1998; Siess *et al.*, 1990). 본 실험에서는 MCF-7 세포에 *phCYP1B1-luc*를 transient transfection하여 1 µM 농도로 PAHs를 24시간 동안 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. MCF-7 세포에 1 µM 농도로 PAHs를 24시간 동안 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정된 결과 대조군에 비해 Benz(a)anthracene은 5배, Benzo(k)fluoroanthene은 35배, Chrysene은 7배, Dibenzo(a,h)anthracene은 14배의 증가를 보였고 Acenaphthene, Anthracene, Benzo(b)fluoroanthene, Fluorene, Fluora-

nthene, Naphthalene, Pyrene, Phenanthrene, Carbazole은 약한 반응을 보였다. 높은 활성을 보인 PAHs를 0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  농도로 24시간 처치하였을 때, Benz(a)anthracene은 0.8배, 2.7배, 5.3배, Benzo(k)fluoranthene은 12배, 18배, 45.6배, Chrysene은 1.1배, 2.8배, 7.4배, Dibenz(a,h)anthracene은 8.9배, 17.5배, 18배로 농도 의존적으로 증가하였다. Flavonoids가 *CYP1B1* 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 MCF-7 세포에 *phCYP1B1-Luc*를 transfection하여 genistein, daidzein, chrysin, naringenin, morin을 다양한 농도 ( $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-4}\text{M}$ )로 24시간 단독 처치에 의한 CALUX activity를 측정하였다. 그 결과 5종의 flavonoids 모두 실험농도에서 대조군에 비해 *CYP1B1* 유전자 발현에 큰 영향을 미치지 않았다. 또한 MCF-7 세포에 B(k)F와 5종의 flavonoids를 1  $\mu\text{M}$  농도로 24시간 처치한 후, *CYP1B1* mRNA의 발현을 RT-PCR로 측정하였을 때도 B(k)F은 *CYP1B1* mRNA 발현을 증가시키는 반면 flavonoids는 대조군과 비교하여 큰 차이가 없었다. 그러나, 발암 의심 화학 물질인 PAHs류 중에서 가장 강력하게 *CYP1B1* 유전자 발현을 유도하는 Benzo(k)fluoroanthene (B(k)F)과 flavonoids 혼합 처치에 의한 CALUX activity를 측정된 결과, 1  $\mu\text{M}$  B(k)F을 단독 처치시 *CYP1B1* 유전자 발현은 대조군에 비해 약 51배 증가하였고, flavonoids를 10 nM~1  $\mu\text{M}$  로 전처리 시 농도 의존적으로 감소되었으나 10  $\mu\text{M}$  이상의 고농도에서는 B(k)F에 의한 luciferase 활성이 증가되었다. 또 MCF-7 세포에 다양한 농도 ( $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-4}\text{M}$ )의 daidzein을 4시간 전처리하고 B(k)F를 24시간 처치한 후, 발현되는 *CYP1B1* mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과 1  $\mu\text{M}$  B(k)F을 단독 처치시 *CYP1B1* mRNA 발현은 대조군에 비해 약 4.3배 증가하였고, B(k)F에 의해 유도된 *CYP1B1* mRNA 발현은 daidzein을 10 nM~1  $\mu\text{M}$  전처리 시 농도 의존적으로 감소되었으나 10  $\mu\text{M}$  이상의 농도에서는 증가되었다. Ciolino 등에 의하면 quercetin과 kaempferol과 같은 flavonoids가 AhR의 리간드로 작용함으로써 AhR을 경유하여 *CYP1B1* 유전자 발현을 조절할 것으로 보고 있다 (Ciolino *et al.*, 1999). 즉, TCDD에 대한 flavonoids의 이러한 억제 효과가 일종의 AhR 길항체로서 AhR에 대해 TCDD와 경쟁적으로 결합함으로써 나타나는 것으로 보여지며, resveratrol의 경우에는 TCDD에 의해 유도된 AhR 복합체가 DRE에 결합하는 것을 저해함으로써 억제 효과가 나타나는 것으로 보고되고 있다 (Ciolino *et al.*, 1999; Gehm *et al.*, 1997; Henry *et al.*, 1999).

최근 유전자 전사 조절에 대한 연구가 많이 진행되면서 핵단백질 (nuclear protein)인 히스톤 (histone)의 아세틸화

(acetylation)가 여러 유전자 전사 조절에 중요한 역할을 한다고 알려지고 있다. 과거에는 히스톤이 chromatin을 싸고 있는 물질로만 여겨졌으나, 지금은 많은 유전자들의 활성화와 억제 모두에 관여하는 것으로 추측되고 있다 (Grunstein *et al.*, 1992). 히스톤은 H1, H2A, H2B, H3, H4의 5가지 class로 구성되어 있고, nucleosome의 주요 구성 성분은 H2A, H2B, H3, H4와 DNA 150 bps로 DNA가 히스톤을 1.75번 nucleosomal core 주위를 단단히 싸고 있다 (Marks *et al.*, 2000). 그러나 core histone의  $\text{NH}_2$ -terminal tails의 lysine 잔기에 아세틸기 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ -)가 붙으면 양전하를 띤 tail은 중성화가 되고 음전하를 띤 DNA와의 상호결합이 느슨해져 DNA 가닥이 열리게 되고 전사가 시작된다. 따라서, 히스톤의 아세틸화와 탈아세틸화는 유전자 전사 조절에 있어서 매우 중요하며 이들 사이의 균형은 히스톤의 아세틸화 효소 (histone acetyltransferase : HAT)와 히스톤 탈아세틸화 효소 (histone deacetylase complex : HDAC)라는 두개의 특이적 효소에 의해 조절된다 (Grunstein *et al.*, 1992). 히스톤 아세틸 전이효소의 작용은 핵 내에 존재하는 유전자 전사 활성화 작용과 관련되어 있는 반면, 히스톤 탈아세틸화 효소는 NcoR, SMRT와 같은 유전자 전사 억제 인자들과 복합체를 형성하여 유전자 발현 억제작용과 연관되어 있다 (Alland *et al.*, 1997; Hassig *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). HAT 역할을 하는 것에는 효모 HAT GCN5와 관련이 있는 GCN5와 P/CAF, coactivator인 CBP (cyclic adenosine monophosphate response element binding protein)과 p300, TATA box에 붙는 복합체의 일부분인 TAF250, SRC-1과 ACTR, 전사 복합체의 일부분인 BRCA2가 있다 (Ogryzko *et al.*, 1995; Mizzen *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 1997; Siddique *et al.*, 1998). 히스톤 탈아세틸화 효소는 mSin3 단백질과 결합체를 형성하여 발암억제 유전자의 발현을 억제함으로써 세포가 암화되는 과정에 기여한다 (McArthur *et al.*, 1998; Dang *et al.*, 1999). 또한 최근 연구에서 암세포에서 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제가 세포 성장을 억제하는 것으로 나타났다 (McBain *et al.*, 1997). DNA 가닥이 느슨해지면 세포 주기 저해 물질이 증가하는 것으로 설명할 수 있다 (Grey *et al.*, 1999). 또한 과도한 아세틸화 (hyperacetylation)는 chromatin의 internucleosome 부분에 변형을 유발하여 효소 분해에 훨씬 민감하게 된다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 지원 (과제고유번호 : NTP238)으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Barouki, R. and Morel, Y. (2001) Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol.* **61**, 511-6.
- Dohr, O., Vogel, C. and Abel, J. (1995) Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch Biochem Biophys.* **321**, 405-12.
- Frye, R.F., Schneider, V.M., Frye, C.S. and Feldman A.M. (2002) Plasma levels of TNF-alpha and IL-6 are inversely related to cytochrome P450-dependent drug metabolism in patients with congestive heart failure. *J Card Fail.* **8**, 315-9.
- Gonzalez, F.J. (1998) The study of xenobiotic-metabolizing enzymes and their role in toxicity in vivo using targeted gene disruption. *Toxicol Lett.* 102-103, 161-6.
- Grunstein, M. (1990) Histone function in transcription. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 643-678.
- Hahn, M.E. (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact.* **141**, 131-60.
- Hahn, M.E. (1998) The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C.* **121**, 23-53.
- Harper, P.A., Wong, J.Y., Lam, M.S. and Okey, A.B. (2002) Polymorphisms in the human AH receptor. *Chem Biol Interact.* **141**, 161-87.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**, 43-8.
- Lewis, D.F., Watson, E. and Lake, B.G. (1998) Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res.* **410**, 245-70.
- Matsumura, F. (2003) On the significance of the role of cellular stress response reactions in the toxic actions of dioxin. *Biochem Pharmacol.* **66**, 527-40.
- Mimura, J. and Fujii-Kuriyama, Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* **1619**, 263-8.
- Murray, G.I., Taylor, M.C., McFadyen, M.C., McKay, J.A., Greenlee, W.F., Burke, M.D. and Melvin, W.T. (1997) Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res.* **57**, 3026-3031.
- Nebert, D.W., Roe, A.L., Dieter, M.Z., Solis, W.A., Yang, Y. and Dalton, T.P. (2000) Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* **59**, 65-85.
- Rogers, J.F., Nafziger, A.N. and Bertino, J.S. Jr. (2002) Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med.* **113**, 746-50.
- Safe, S. (2001) Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicol Lett.* **120**, 1-7.
- Schmidt, J.V. and Bradfield C.A. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **12**, 55-89.
- Shehin, S.E., Stephenson, R.O. and Greenlee, W.F. (2000) Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 6770-6776.
- Thomsen, J.S., Wang, X., Hines, R.N. and Safe S. (1994) Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carcinogenesis* **15**, 933-937.
- Wang, G.L. and Semenza, G.L. (1993) General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 4304-4308.
- Whitlock, J.P., Jr. (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103-125.