

사람 유방암 세포 MCF-7에서 Benzo(k)fluoroanthene과 genistein이 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향

양소연 · 민경난 · 신윤용*
이화여자대학교 약학대학

Effects of Benzo(k)fluoroanthene and Genistein on CYP1A1 Gene Expression in Human Breast Cancer MCF-7 Cells

So-Yeun Yang, Kyung-Nan Min, and Yhun-Yhong Sheen*
College of Pharmacy, Ewha Womans Univ, Seoul, Korea
#11-1, Daehyun-dong, sudaemunku, seoul 120-750, Korea

(Received September 9, 2004 / Accepted September 28, 2004)

ABSTRACT : CYP1A1 is known to be inducible by xenobiotic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). These chemicals have been identified worldwide and can have a significant impact on the human health and well being of human and wildlife. Given these issues, the detection and quantification of these chemicals in biological, environmental and food samples is important. First, we investigated the effect of on CYP1A1 promoter activity, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity and CYP1A1 mRNA expression induced by benzo(k)fluoroanthene(B(k)F) in MCF-7 cells. We found that B(k)F significantly up-regulates the level of CYP1A1 promoter activity, EROD and CYP1A1 mRNA. When cells were treated with genistein, it was not changed that EROD and CYP1A1 mRNA, compared to that of control. However, genistein inhibited the B(k)F-induced CYP1A1 promoter activity and mRNA level at high concentration. Furthermore, in this study, effects of HDAC (histone deacetylase) inhibitors on human prostate cancer cells proliferation were examined. HC-toxin, SAHA and TSA inhibited cell proliferation in PC3 cells. A novel HDAC inhibitor, IN2001 also suppressed the growth of PC3 cells. And IN2001 and SAHA increased S phase and G2/M phase at 12 hrs treatment but cells were arrested G0/G1 phase at 48 hrs treatment. The HC-toxin treatment for 24 hrs and 48 hrs increased G0/G1 at low concentration(0.1 μ M) but increased G2/M at more than concentration of 1 μ M. TSA increased G2/M phase. These findings height the possibility of developing HDAC inhibitors as potential anticancer therapeutic agents for the treatment of prostate cancer.

Key words : Benzo(k)fluoroanthene, Genistein, CYP1A1, HDAC, EROD

서 론

사람 유방암 세포에서 방향족 탄화수소 (aryl hydrocarbon)에 대한 반응성에는 에스트로젠 수용체 (estrogen receptor : ER)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 양성 유방암 세포주인 MCF-7, ER-75B, T-47D 등에서는 방향족탄화수소에 대한 반응이 나타나지만 ER 음성 유방암 세포주인 MDA-MB-231, Hs578T 등의 세포는 AhR과 Arnt가 존재함에도 불구하고 방향족 탄화수소에 대해 반응성이 없는 것으로 나타났다 (Moore *et al.*, 1993, 1994; Wang *et al.*, 1995).

PAHs는 음식, 물, 토양과 토사에서 자주 검출되고, 화석연

료, 나무와 같은 유기체의 불완전 연소 시에 생기며, 콜타르, 그을음, 자동차 배기가스, 담배 등에서 나오는 환경 오염물이다 (Menzie *et al.*, 1992; IARC, 1983). PAHs는 2개 이상의 벤젠 고리가 융합되어 있는 구조의 물질이다 (Menzie *et al.*, 1992). 여러 가지 PAHs 대사체의 돌연변이성 (mutagenic)과 발암원성 (carcinogenic) 잠재력은 생체 내 설치류 실험과 생체 외 단기간 실험에서 밝혀졌다 (Hecht *et al.*, 1994). PAHs는 TCDD와 마찬가지로 AhR에 결합하여 CYP1 아과의 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1의 발현을 유도시키고, 이 효소들은 PAHs나 아민류와 같은 외인성 물질의 대사에 중요한 역할을 한다 (Bigelow *et al.*, 1982). 식물에서 유래한 flavonoid는 polyphenol 유도체로, 이들은 식물 내에서 곤충이나 동물에 대해 phytoalexin으로 작용하

*To whom correspondence should be addressed

기도 하며, 식물 호르몬을 조절하거나 UV 보호작용이 있는 것으로 보고되어 있다 (Harbone, 1986). 그리고 다양한 생화학적, 약리학적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Flavonoid의 항산화 작용, 암세포 증식 억제 작용, 여러 가지 효소 (protein kinase C, tyrosine protein kinase, topoisomerase II) 활성 저해 작용 등은 anticarcinogen과 cardioprotective agent로서의 이용 가능성을 제시하고 있다 (Noroozi *et al.*, 1998; Prior *et al.*, 1999; Connvey *et al.*, 1999; Komori *et al.*, 1993; Akiyama *et al.*, 1987; Austin *et al.*, 1992; Costantinou *et al.*, 1995). 그러나 flavonoid의 위해성을 간과해서는 안된다는 견해도 제시되고 있다. 실제로 bacterial, mammalian experimental system에서 flavonoid의 돌연변이유발성 (mutagenicity)과 유전독성 (genotoxicity)이 관찰 되었다 (Suzuki *et al.*, 1991; Popp *et al.*, 1991; Jurado *et al.*, 1991). Flavonoid의 이러한 작용은 활성 산소종을 생성하여 유전자에 손상을 유발하는 pro-oxidant로서의 작용과 topoisomerase 활성 저해 작용 때문인 것으로 추측되고 있다. 뿐만 아니라 flavonoid를 과잉 섭취할 경우 대사 효소의 활성을 변화시켜 유전 독성 물질의 대사에 이상을 초래할 가능성도 제시되고 있다. Flavonoid 중에는 그 구조적 특성상 에스트로젠 활성을 나타내는 것이 있는데 genistein, daidzein 등을 비롯하여 그 종류가 다양하다 (Farmakalidis *et al.*, 1984, 1985; Martin *et al.*, 1978; Verdeal *et al.*, 1980). 또한 flavonoid에 의해 사람의 EROD 활성이 감소되었으며 (Siess *et al.*, 1995), TCDD가 AhR에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해하여 CYP1A1 유전자 전사를 감소시키고, gel-shift assay를 통해 TCDD에 의해 유도된 XRE 결합을 억제하는 것으로 보아 (Austin *et al.*, 1992; Ciolino *et al.*, 1999; Han and Sheen, 1996; Merchant *et al.*, 1992), flavonoid는 에스트로젠으로서의 활성 뿐 아니라 cytochrome P450 효소 작용에도 영향을 미치는 것으로 추측되나 그 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 따라서 flavonoid의 다양한 생리활성에 대한 더 많은 연구가 선행되어야 할 것이다.

본 논문에서는 PAHs 중 CYP1A1 유도에 강한 반응을 보이는 B(k)F와 flavonoids가 CYP1A1 유도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 생물학적 정량 (bioassay) 방법을 이용하였다. 사람 유방암 세포인 MCF-7 세포에 *phCYP1A1-Luc*를 transfection 하여 genistein이 B(k)F에 의해 유도되는 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 또한 genistein가 B(k)F에 유도되는 CYP1A1 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 EROD 활성 측정을 수행하였고, 더불어 CYP1A1 mRNA level의 변화도 측정하였다. 아울러 도양 시료중의 CYP1A1 유전자 발현을 유도하는 물질의 존재 여부도 살펴보았다.

재료 및 방법

세포주

MCF-7 human breast cancer cell과 PC3 human prostate cancer cell은 한국 세포주 은행 (KCLB)에서 분양받아 본 실험실에 저장해 두었던 세포를 녹여 배양하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

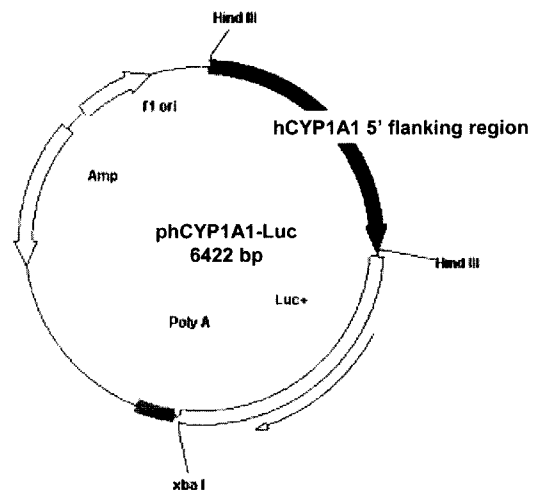
MCF-7 세포는 Table 2의 5% FBS-MEM 배지를 사용하여 5일에 1회 1:4의 비율로 계대 배양하였다. PC3 세포는 Table 2의 10% FBS-RPMI 1640 배지를 사용하여 3일에 1회 1:5의 비율로 계대 배양하였다. PC3 세포와 MCF-7 세포는 37°C humidified 5% CO₂ incubator 내에서 배양하였고 trypsin-EDTA (0.05%)를 사용하여 계대 배양하였다.

약물 처치

DMSO에 녹인 약물을 medium으로 희석하여 세포에 처리하고 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 약물을 용해시킨 용매만을 처리한 것으로, 이때 용매로 사용한 DMSO의 최종농도가 0.2%를 넘지 않도록 하였다.

Cytochrome P4501A1-Luc plasmid

Human cytochrome P4501A1 gene의 5' flanking 부위 1.6 Kb DNA를 포함하는 luciferase plasmid (*phCYP1A1-Luc*)를 사용하였다.



Scheme 1. Construct of *phCYP1A1-Luc*

Transformation

*phCYPIA1-Luc*를 100 ng정도 취하여 전체량이 10 μ l가 되게 한 뒤, *E. coli* TG1 세포 15 μ l를 넣어준 후 얼음에서 45분 이상 방치하였다. 이를 42°C에서 90초간 열처리한 뒤에 얼음에서 1~2분 동안 급냉시킨 후, SOC 배지 150 μ l를 넣어 37°C에서 2~3시간 진탕 배양하였다. 배양액 50~100 μ l를 50 μ g/mL ampicillin을 포함하는 LB agar 평판 배지에 도포하고 37°C 배양기에서 16시간 동안 배양하여 단일 세포 집락을 얻었다.

Plasmid preparation

Transformation하여 얻어진 단일 세포 집락을 50 μ g/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지 500 μ l에 접종하여 37°C에서 약 2시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 50 μ g/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지 600 mL에 500~1,000배 희석하여 37°C에서 12~16시간 진탕 배양하였다. 그 배양액을 4°C에서 세포 침전물을 모은 뒤 Modified alkaline lysis 방법으로 plasmid를 분리하였다. 완전히 건조시킨 뒤 멸균된 증류수에 녹이고 희석하여 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정해 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

MCF-7 세포는 24 well plate에 seeding하고 60% 정도 찰 때까지 배양하였다. TfxTM-50 1.2 μ l와 *phCYPIA1-Luc* 0.4 μ g을 serum, antibiotics free medium (MEM without phenol red) 200 μ l에 넣고 잘 섞은 후 15분간 방치하였다. 세포가 포함된 각 well을 PBS로 2번 세척하고 여기에 반응시킨 혼합액을 각 well당 200 μ l씩 가했다. 37°C humidified 5% CO₂ incubator에서 1시간 배양한 뒤 2X serum, antibiotics medium (MEM without phenol red) 200 μ l를 넣어주었다.

Luciferase 활성 측정

Gene construct를 transfection시키고 24시간 약물처리한 뒤 luciferase 활성을 측정하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 뒤, reporter lysis buffer 50 μ l를 가하고 15분 동안 상온에서 incubation하여 lysis시켰다. 그 후 well에 물을 150 μ l를 가하고 바닥을 긁은 후 cell lysate에 luciferase assay reagent (luciferin)를 가하여, Berthold luminometer로 relative luminescence를 측정하였다. 수치는 단백질 정량에서 얻어진 단백질 양을 기준으로 RLU (relative

luminescence unit/ μ g protein)로 환산하여, 대조군에 대한 fold induction으로 나타내었다. Reporter lysis buffer (Promega)는 5X를 멸균 증류수로 1X로 희석하여 사용하였으며, luciferase assay reagent는 luciferase assay buffer (10 mL)를 luciferase assay substrate에 넣어 reconstitution 시키고 microtube에 분주하여 -20°C에서 보관한 것을 상온에서 녹인 뒤 사용하였다.

단백질 정량

Bovine serum albumin (2 mg/mL)을 standard로 하여 micro BCA protein assay reagent kit를 사용하여 cell lysate의 supernatant protein 양을 ELISA reader로 측정하였다. microtest III flexible assay 96 well plate에 cell lysate 20 μ l를 넣고 멸균된 증류수를 가하여 총량이 50 μ l가 되게 하였다. 다음 micro BCA reagent A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, tetrates를 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 μ l씩 가한 뒤 60°C에서 1시간 반응시키고 그 후에 570 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

EROD (Ethoxyresorufin-O-deethylase) 활성 측정

EROD 활성은 Kennedy 등의 방법 (Kennedy *et al.*, 1994)에 따라 세포가 배양된 48 well plate에서 fluorescent product인 resorufin과 total protein을 fluorescence plate reader를 이용해 동시에 측정하였다. 일정량의 세포가 배양된 48 well plate에 sodium phosphate buffer (80 mM) 82 μ l를 가하였다. 그 후 7-ethoxyresorufin (MeOH에 녹인 1 mM 용액을 사용직전 sodium phosphate buffer로 10배 희석한 액) 11.2 μ l를 가한 후 37°C에서 10분간 안정화시켰다. β -NADPH (sodium phosphate buffer에 녹인 1.489 mM액) 18.8 μ l를 가해 반응을 개시한 후 37°C, 15분간 반응을 시키고, 그 후 fluorescamine (300 μ g/mL in acetonitrile) 48 μ l를 가해 반응을 종결시켰다. 15분 후 excitation 530 nm로 emission 590 nm로 fluorescence를 측정한 후 standard curve를 이용해 resorufin 양을 정량 하였다. 이 때 standard로 10 μ M resorufin을 사용하였다. 같은 plate에서 excitation 360 nm로 emission 460 nm로 fluorescence를 측정한 후 standard curve를 이용해 총 단백질양을 정량 하였다. 이 때 standard로 BSA을 사용하였다

mRNA 측정

분리한 total RNA 0.5 μ g에 해당하는 양에 0.1% DEPC

를 가해 10.5 μg가 되게 한 다음, 여기에 random primer 0.1 μg을 넣고 70°C에서 10분간 반응시키고 얼음에서 급냉시켰다. 여기에 1 mM dNTPs 1 μl, 100 mM DTT 2 μl, 5X first strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 4 μl와 M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase 200 units, RNasin 20 units를 넣은 후 23°C에서 10분간 방치시킨 후, 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 95°C에서 10분간 가열한 후 얼음에 박아 반응을 종결시켰다. RT product 1 μl에 forward/reverse primer를 각각 10 pmol씩 넣고 10X reaction buffer 1 μl, 25 mM MgCl₂ 1 μl, 2.5 mM dNTPs 0.5 μl, Taq polymerase 0.5 units을 가하고 총량이 10 μl가 되게 한 후 Table 4의 조건으로 minicycler에서 반응시켰다. PCR product는 ethidium bromide로 염색한 2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 확인한 뒤, image analyzer를 사용하여 상대적인 양을 정량하였다.

결 과

Benzo(k)fluoranthene이 CYP1A1 유전자에 미치는 영향

MCF-7 세포에 *phCYP1A15'-Luc*을 transfection한 후, 0.01 nM부터 10 μM까지 농도의 Benzo(k)fluoranthene (B(k)F)를 24시간 처리하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 활성이 농도 의존적으로 증가하였고, 1 μM B(k)F 처리시 luciferase 활성은 대조군에 비해 77배 증가하였다 (Fig. 1).

Benzo(k)fluoranthene이 EROD 활성에 미치는 영향

MCF-7 세포에 1 nM부터 10 μM까지 다양한 농도의 B(k)F를 24시간 처리하여 EROD 활성을 측정하였다. 그 결과 EROD 활성은 0.25 μM에서 증가하기 시작하여 1 μM B(k)F까지 농도 의존적으로 증가하였고, 1 μM B(k)F 처리시 77 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었다. 10 μM B(k)F 처리시 그 활성이 감소하였는데 이러한 감소 효과는 고농도 약물 처리로 세포 독성이 나타났기 때문인 것으로 추측된다 (Fig. 2).

Genistein이 luciferase 활성에 미치는 영향

Genistein이 *CYP1A1* 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 다음의 실험을 행하였다. MCF-7 세포에 *phCYP1A15'-Luc*를 transfection 하여 Genistein를 24시간 동안 다양한 농도로 단독 처리 후 CALUX activity를 측정하였다. Genistein은 콩류에 고농도로 존재하는 phytoestrogen

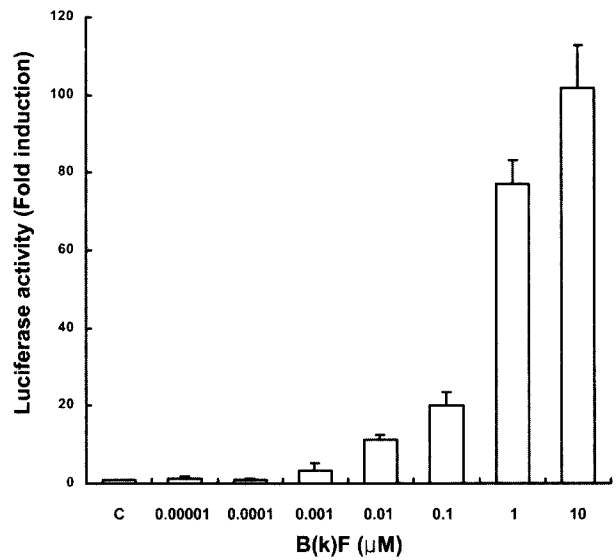


Fig. 1. The dose response of B(k)F on the luciferase activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with *phCYP1A1-Luc* plasmid. After transfection, cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.D. (n = 3) (C : Control).

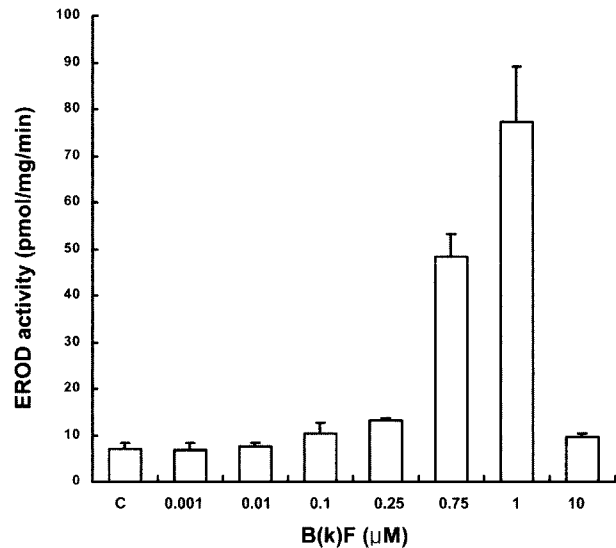


Fig. 2. The dose response of B(k)F on the EROD activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with 0.1% DMSO or indicated concentrations of B(k)F for 24 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.D. (n = 3) (C:Control).

으로 위와 같은 방법으로 다양한 농도 (10 nM-100 μM)로 24시간 처리 후 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 1 μM B(k)F를 단독 처리시 *CYP1A1* 유전자 발현은 대조군에 비해 136배 증가하였다. Genistein을 실험농도에서

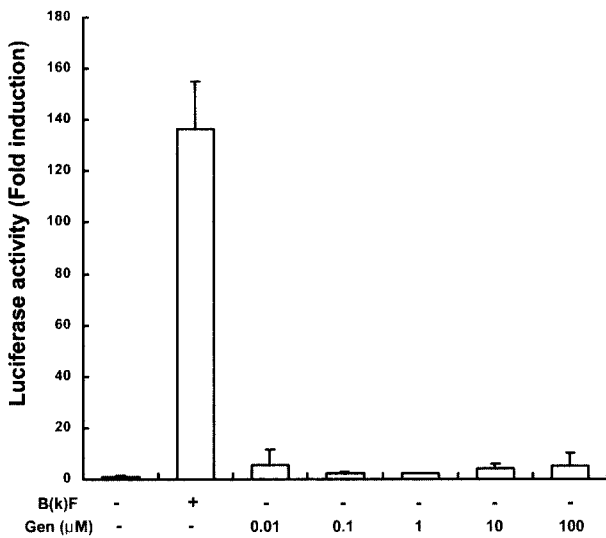


Fig. 3. The effect of genistein (Gen) on the luciferase activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with *phCYPIA1-Luc* plasmid. After transfection, cells were treated with indicated concentrations of genistein or 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean \pm S.D. (n = 3).

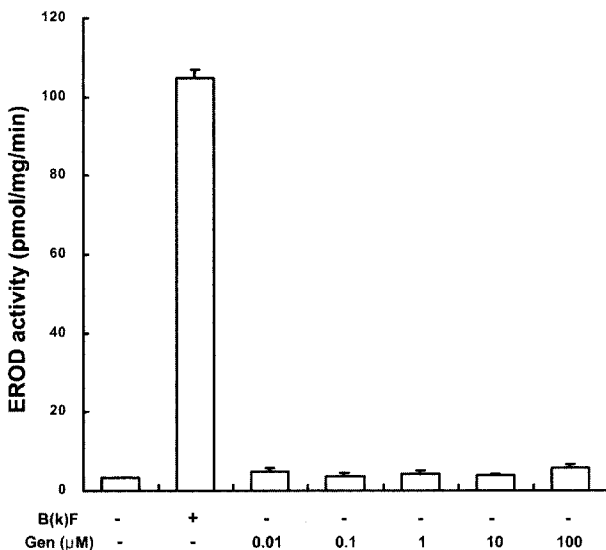


Fig. 4. The effect of genistein (Gen) on the EROD activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with indicated concentrations of genistein or 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. The data represent mean \pm S.D. (n = 4).

단독 처치하였을 때, *CYP1A1* 유전자 발현은 대조군과 비교하여 큰 차이는 없었으나 AHR의 약한 기질로 작용하여 활성을 약간 증가시켰다 (Fig. 3).

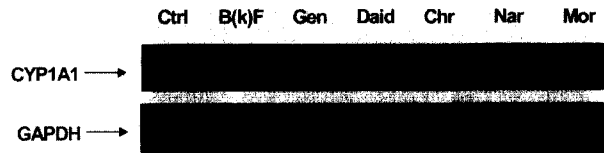


Fig. 5. The effects of flavonoids on the *CYP1A1* mRNA expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells were treated with 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F or 1 μM of genistein (Gen), daidzein (Daid), chrysin (Chr), naringenin (Nar) and morin (Mor) for 24 hrs. *CYP1A1* mRNA was determined by RT-PCR.

Genistein이 EROD 활성에 미치는 영향

Genistein을 다양한 농도 (10 nM-100 μM)로 24시간 처치 후 EROD 활성 변화를 측정하였다. 그 결과 EROD 활성은 1 μM B(k)F에 의해서는 104.6 pmol/mg/min의 EROD 활성을 나타내었으나 genistein 처치군에서는 대조군과 비교하여 차이가 없었다 (Fig. 4).

Flavonoids가 *CYP1A1* mRNA에 미치는 영향

MCF-7 세포에 1 μM B(k)F와 1 μM의 genistein, daidzein, chrysin, naringenin, morin을 각각 24시간 처치한 후, 발현되는 *CYP1A1* mRNA 발현을 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)로 측정하였다. 그 결과 B(k)F은 *CYP1A1* mRNA 발현을 대조군과 비교하여 크게 증가시키는 반면 genistein, daidzein, chrysin, naringenin, morin 처치군에서는 대조군과 비교하여 차이가 없었다 (Fig. 5).

Genistein과 Benzo(k)fluoranthene 혼합시료가 *CYP1A1* 유전자 발현에 미치는 영향

발암 의심 화학 물질인 PAHs 중에서 가장 강력하게 *CYP1A1* 유전자 발현을 유도하는 B(k)F과 다양한 flavonoids 혼합 처치에 의한 CALUX activity를 측정하였다. Flavonoids가 *CYP1A1* 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 다음의 실험을 행하였다. MCF-7 세포에 *phCYP1A15'-Luc*를 transfection하여 genistein을 다양한 농도로 4시간 전처치 후 1 μM B(k)F를 24시간 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다.

MCF-7 세포에 위의 방법으로 genistein을 다양한 농도 (10 nM-100 μM)로 전처치 후, B(k)F을 처치하여 발현되는 luciferase 활성을 측정하였다. 그 결과 1 μM B(k)F을 단독 처치한 경우, 대조군에 비해 101배의 luciferase 활성 증가를 나타내었다. Genistein을 B(k)F와 병용 처치한 경우, B(k)F 단독 처치로 유도 발현된 luciferase 활성을 100%로 봤을 때, genistein은 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM,

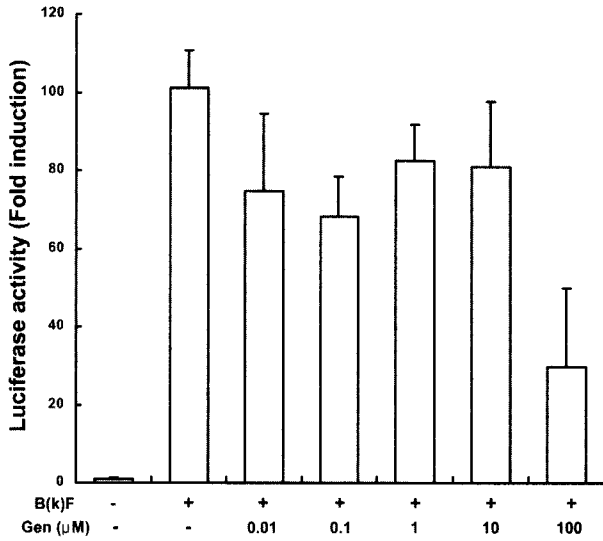


Fig. 6. The effect of genistein (Gen) on the B(k)F-induced luciferase activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were transfected with *phCYP1A1-Luc* plasmid. After transfection, cells were pretreated with indicated concentrations of genistein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. Luciferase activity was determined as described in Methods. Data represent the mean ± S.D. (n = 3).

100 μM의 농도에서 각각 74.12%, 67.48%, 81.72%, 80.16%, 29.43% 활성을 나타내었다 (Fig. 6). 이 결과에 의하면, MCF-7 세포에서 genistein이 B(k)F에 의한 *CYP1A1* 유전자 발현을 감소시킴을 알 수 있었다.

Genistein과 Benzo(k)fluorantheneol 혼합 시료가 EROD 활성에 미치는 영향

MCF-7 세포에 다양한 농도 (10 nM-100 μM)의 genistein을 4시간 전처리 후 1 μM B(k)F를 24시간 병용처리하여 EROD 활성 변화를 측정하였다. 그 결과 B(k)F는 70.6 pmol/mg/min의 EROD 활성 증가를 보였다. Genistein을 0.01 μM, 0.1 μM 농도로 전처리하였을 때, B(k)F에 의해 증가된 EROD 활성을 각각 71.0 pmol/mg/min, 82.2 pmol/mg/min로 약간 증가시켰다. 1 μM, 10 μM, 100 μM 농도에서는 B(k)F에 의해 증가된 EROD 활성을 각각 61.9 pmol/mg/min, 57.1 pmol/mg/min, 28.1 pmol/mg/min로 감소시켰다 (Fig. 7).

Genistein과 Benzo(k)fluorantheneol 혼합 시료가 CYP1A1 mRNA에 미치는 영향

MCF-7 세포에 다양한 농도 (10 nM-100 μM)의 genistein을 4시간 전 처리하고 B(k)F를 24시간 처리한 후, 발현되는 *CYP1A1* mRNA 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 그 결

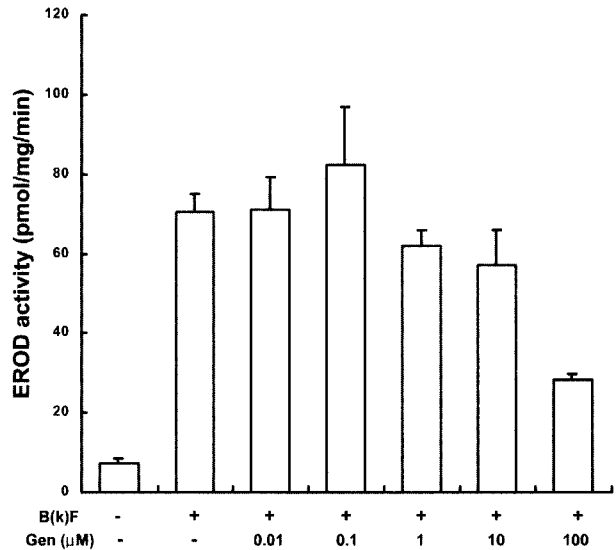


Fig. 7. The effect of genistein (Gen) on the B(k)F-induced EROD activity in MCF-7 cells. MCF-7 cells were pretreated with indicated concentrations of genistein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. EROD activity was determined as described in Methods. The data represent mean ± S.D. (n = 4).

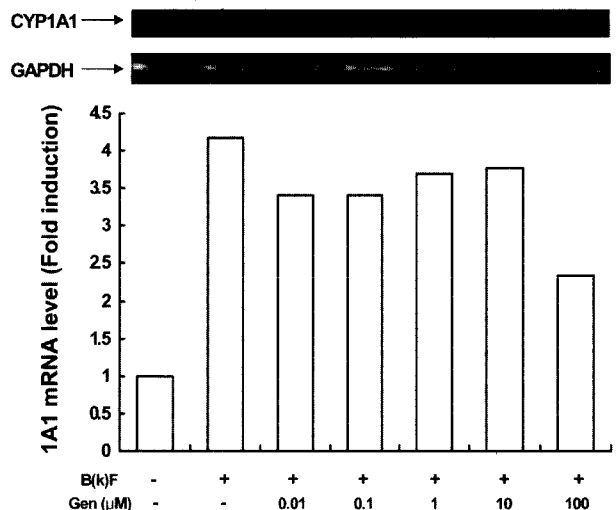


Fig. 8. The effect of genistein (Gen) on the B(k)F-induced *CYP1A1* mRNA expression in MCF-7 cells. MCF-7 cells were pretreated with indicated concentrations of genistein for 4 hrs, followed by the addition of 0.1% DMSO or 1 μM B(k)F for 24 hrs. *CYP1A1* mRNA was determined by RT-PCR.

과 1 μM B(k)F을 단독 처리시 *CYP1A1* mRNA 발현은 대조군에 비해 4.2배 증가하였다. Genistein을 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM 농도로 전처리하였을 때, *CYP1A1* mRNA 발현은 각각 3.4배, 3.4배, 3.7배, 3.8배, 2.3배로 B(k)F 단독 처리시보다 감소하였다 (Fig. 8).

고찰

PAHs는 환경 중에 널리 존재하는 위해물질이다 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999). CYP1A1은 PAHs와 heterocyclic amines 등의 외인성 물질에 의해 발현이 증가한다 (Chou *et al.*, 1986; Gonzalez, 1989; Denison *et al.*, 1995). PAHs중 B(k)F는 HepG2 세포와 H4IIE 세포에서 CYP1A1 유도 능력을 검색하였을 때 강한 EROD 활성을 보였고 (Vakharia *et al.*, 2001; Bosveld *et al.*, 2002), rat hepatocyte에서도 강한 EROD 활성을 나타내었다 (Till *et al.*, 1999). 이는 PAHs중 B(k)F가 CYP1A1에 강한 반응을 보이는 본 논문의 결과와 잘 상응하는 것을 볼 수 있다. 본 논문에서는 사람 세포 중 AhR이 많이 존재하는 유방암 세포인 MCF-7 세포를 선택하여 실험을 하였다. B(k)F는 MCF-7 세포에서 CYP1A1 promoter 활성, EROD 활성, CYP1A1 mRNA의 발현을 증가시켰다.

B(k)F는 TCDD 등의 다이옥신성 물질과 마찬가지로 AhR을 매개로 CYP1A1 유전자 발현을 유도하는 것으로 밝혀졌다. Ligand와 결합한 AhR은 hsp 90 중합체로부터 유리되어 Arnt와 결합하여 이중 중합체를 형성하며, 핵 내로 이동한다. 이 중합체가 CYP1A1의 upstream에 존재하는 DRE를 인식, 결합하여 유전자 전사를 활성화시키게 된다 (Whitlock *et al.*, 1996). 최근 ER과 AhR 신호 전달 체계 사이의 상호교신 (cross-talk)에 관한 많은 연구가 수행되고 있는데, TCDD가 에스트로젠에 의해 유도되는 여러 반응들을 억제시키는 anti-estrogen effect가 있음이 밝혀졌다 (Nodland *et al.*, 1997; Zacharewski *et al.*, 1994; Kharat *et al.*, 1996). 그러나 에스트로젠이 방향족 탄화수소의 반응성에 미치는 영향에 대해서는 상반된 연구 결과들이 보고되고 있다. MCF-7, Hepa 1c1c7, ECC-1세포에서 에스트로젠이 TCDD에 의해 유도된 CYP1A1 유전자 발현 및 EROD 효소 활성을 감소시킨다고 보고하였다 (Ricci *et al.*, 1999; Kharat *et al.*, 1996; Jeoung and Lee, 1998). 이전에 본 실험실에서 MCF-7에 *phCYP1A1-Luc* construct를 transfection시킨 다음 17 β -estradiol을 비롯한 에스트로젠 활성을 지닌 화합물들이 CYP1A1 유전자 발현에 미치는 영향을 살펴보았을 때, 17 β -estradiol 및 그 대사체 그리고 고농도의 flavonoid가 TCDD에 의해 유도되는 CYP1A1 유전자 발현을 저해하는 것으로 나타났다.

식품 중에 널리 존재하는 flavonoid는 대표적인 phytoestrogen으로 최근 이들의 다양한 생리 활성에 대한 관심이 높아지고 있다. 콩류의 소비가 많은 아시아 지역에서 유방암이나 전립선암과 같은 hormone-dependent cancer의 발병률

이 낮다는 조사 결과를 비롯해서 flavonoid의 항암 작용, 항산화 작용, 각종 효소 활성 저해 작용에 관한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. Flavonoid들은 estrogen 활성을 띤 화합물로서의 기능과 더불어 CYP1A1 유전자 발현에 대한 작용에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다 (Siess *et al.*, 1990). 또한 CYP1A1 효소에 대하여 B(k)F와 17 β -estradiol이 경쟁한다는 보고도 있다 (Arcaro *et al.*, 1999). 그러나 resveratrol 같은 poly phenolic compound 경우에는 TCDD와 결합한 AhR·Arnt 이중 중합체가 DRE에 결합하는 것을 저해함으로써 TCDD의 작용을 저해하는 것으로 나타났다 (Ciolino *et al.*, 1998). 즉, 고농도의 flavonoid들은 AhR 길항체로서 AhR에 대해 B(k)F와 경쟁적으로 결합함으로써 B(k)F의 작용을 억제하는 것으로 보인다. 그 기전은 flavonoid가 AhR과 ligand의 결합을 방해하거나 AhR·Arnt 복합체의 XRE 결합을 억제하는 방식으로 CYP1A1 유전자 발현을 조절할 것으로 추측되고 있으나 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

감사의 글

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

참고 문헌

- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Wantanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-5595.
- Arcaro, K.F., Yang, Y. and Gierthy, J.F. Benzo(k)fluoranthene enhancement and suppression of 17 β -estradiol catabolism in MCF-7 breast cancer cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **58(7)**, 413-26.
- Austin, C.A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H. and Fisher, L.M. (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochemistry*, **282**, 883-889.
- Bigelow, S.W. and Nebert, D.W. (1982) The Ah regulatory gene product. Survey of nineteen polycyclic aromatic compounds' and fifteen benzo[a]pyrene metabolites' capacity to bind to the cytosolic receptor. *Toxicol. Lett.* **10(1)**, 109-118.
- Bosveld, A.T., de Bie, P.A., van den Brink, N.W., Jongepier, H. and Klomp, A.V. (2002) In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* **49(1)**, 75-83.
- Chou, M.W., Heflich, R.H. and Fu, P.P. (1986) Metabolism of 1-nitrobenzo[a]pyrene by rat liver microsomes to potent mutagenic metabolites. *Carcinogenesis* **7(11)**, 1837-1844.

- Ciolino, H.P., Daschner, P.J., Wang, T.T.Y. and Yeh, G.C. (1998) Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 197-206.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J. and Yeh, G.C. (1999) Dietary flavonols quercetin and kaempferol are ligands of the aryl hydrocarbon receptor that affect CYP1A1 transcription differentially. *Biochem. J.*, **340**, 715-722.
- Connvey, A.H., Lu, Y., Xie, J. and Huang, M. (1999) Inhibitory effect of green and black tea on tumor growth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 229-233.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Cao, K., Vaughan, A., and Moon, R. (1995) Flavonoid as DNA topoisomerase antagonists and poisons : structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* **58**, 217-225.
- Denison, M.S. and Whitlock, J.P. Jr. (1995) Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem.* **270(31)**, 18175-18178.
- Farmakalidis, E., Hathcock, J.N. and Murphy, P.A. (1985) Oestrogenic potency of genistein and daidzein in mice. *Food Chem. Toxicol.*, **23**, 741-745.
- Gonzalez, F.J. (1989) The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol. Rev.* **40(4)**, 243-288.
- Han, S.H. and Sheen, Y.Y. (1996) Effects of hydroxylated flavonoid on the ethoxyresorufin-o-deethylase and benzo[a]pyrene hydroxylase. *Arch. Phar. Res.*, **19**, 514-519.
- Harborne, J.B. (1986) Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **213**, 15-24.
- Hecht, S.S., Isaacs, S. and Trushin N. (1994) Lung tumor induction in A/J mice by the tobacco smoke carcinogens 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and benzo[a]pyrene : a potentially useful model for evaluation of chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, **15(12)**, 2721-5.
- International Agency for Research on Cancer, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental, and Experimental Data, IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, IARC, Lyon, 62-66 (1983).
- Jeoung, H.G. and Lee, S.S. (1998) Suppressive effects of estradiol on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated transcriptional activation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Lett.*, **133**, 177-184.
- Jurado, J., Alejandro-Duran, E., Alonso-Morgan, A. and Pueyo, C. (1991) Study on mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the salmonella Ara test. *Mutagenesis*, **6**, 289-295.
- Kharat, I. and Saarcioglu, F. (1996) Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon-and estrogen-mediated signaling *J. Biol. Chem.*, **271**, 10533-10537.
- Komori, A., Yatsunami, J., Okabe, S., Abe, S., Hara, K., Suganuma, M., Kim, S.J. and Fujiki, H. (1993) Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 186-190.
- Martin, P.M., Horwitz, K.B., Ryan, D.S. and McGuire, W.L. (1978) Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*, **103**, 1860-1867.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B. and Santodonato J. (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1278-1284.
- Merchant, M., Morrison, V., Santostefano, M.S. and Safe, S. (1992) Mechanism of action of aryl hydrocarbon receptor antagonists : inhibition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 389-394.
- Moore, M., Narasimhan, T.R., Steinberg, M.A., Wang, X. and Safe, S. (1993) Potentiation of CYP1A1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells cotreated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 12-o-tetradecanoylhorbor-13 acetate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 483-488.
- Nodland, K.I., Wormke, M. and Safe, S. (1997) Inhibition of estrogen-induced activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 human breast cancer and other cell lines transfected with vitellogenin A2 gene promoter constructs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **338**, 67-72.
- Noroozi, M., Angerson, W.J. and Lean, M.E. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1210-1218.
- Popp, R. and Schimmer, O. (1991) Induction of sister-chromatid exchanges (SCE), polyploidy and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. *Mutat. Res.*, **246**, 205-213.
- Prior, R.L. and Cao, G. (1999) Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 255-261.
- Ricci, M.S., Toscano, D.G., Mattingly, C.J. and Toscano, W.A. Jr. (1999) Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3430-3438.
- Siess, M.H., Le Bon, A.M., Suschetet, M. and Rat, P. (1990) Inhibition of ethoxyresorufin deethylase activity by natural flavonoids in human and rat liver microsomes. *Food Addit. Contam.*, **7**, 178-181.
- Siess, M.H., Leclerc, J., Canivenc-Lavier, M.C., Rat, P. and Suschetet, M. (1995) Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **130**, 73-78.
- Suzuki S., Takada, T., Sugawara, Y., Muto, T. and Kominami, R. (1991) Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1061-1064.
- Till, M., Riebinger, D., Schmitz, H.J. and Schrenk, D. (1999) Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem. Biol. Interact.* **117(2)**, 135-150.
- Vakharia, D.D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.Y., and Kaminsky, L.S. (2001) Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures : effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metab. Dispos.* **29(7)**, 999-1006.
- Verdeal, K., Brown, P.R., Richardson, T. and Ryan, D.S. (1980) Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and

- effect of coumestrol on growth of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**, 285-290.
- Wang, X., Thomsen, J.S., Santostefano, M., Rosengren, R., Safe, S. and Perdew, G.H. (1995) Comparative properties of the nuclear aryl hydrocarbon (AH) receptor complex from several human cell lines. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **293**, 191-205.
- Whitlock, J.P. Jr., Okino, S.T., Dong, L., Ko, H.P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q. and Li, H. (1996) Cytochromes P450 : induction of cytochrome P4501A1 : a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB J.* **10(8)**, 809-818.
- Zachraewski, T.R., Bondy, K.L. McDonell, P. and Wu, Z.F. (1994) Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on 17 β -estradiol-induced pS2 expression. *Cancer Res.*, **54**, 2707-2713.