

다환성방향족탄화수소 노출에 대한 감수성에 미치는 CYP2E1의 작용

강혁준⁺, 박장환⁺, 강진선, 동미숙¹, 양미희^{2*}

한양대학교 의과대학, ¹고려대학교 생명공학원, ²숙명여자대학교 약학대학

Action-mechanisms of Genetic Polymorphism in the CYP2E1 on Susceptibility to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Hyuck-Joon Kang⁺, Chang-Hwan Park⁺, Jin Sun Kang,
Mi-Sook Dong¹ and Mihi Yang^{2*}

Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791,

¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701 and

²Department of Toxicology, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

ABSTRACT

Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are formed during incomplete combustion of fossil fuels, are widely distributed in our environment. Human exposure to PAHs may occur through smoking, polluted air, food consumption and occupational contact. Urinary naphthols, 1- and 2-naphthol, have been suggested as route-specific biomarkers for exposure to airborne PAHs. Cytochrome p450 2E1 (CYP2E1) is known to be a great importance for the metabolism of organic solvents, which is a precarcinogen with small molecular weight. This study describes the metabolic differences between *PstI* and *RsaI* polymorphisms (c1 allele: *PstI*-, *RsaI*+; c2 allele: *PstI*+, *RsaI*-) of CYP2E1 5'-flanking region by genetically modified HepG2 cells, which overexpress the polymorphic regions. The results of CAT assay and western blot in the c2 allele overexpressed cells have higher activities than the c1 allele over-expressing cells. However, the metabolism of naphthalene to 2-naphthol has no difference due to the two genotypes. In this study, we established the CYP2E1 polymorphic allele transduced HepG2 cells to screen susceptibility-differences in PAH exposure. In conclusion, the CYP2E1 polymorphism may hardly induce susceptibility differences in PAH exposure monitoring with urinary naphthols.

Key words : CYP2E1, Polymorphism, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), Naphthalene

서 론

다환방향족탄화수소 (polycyclic aromatic hydrocar-

bons, PAHs)는 탄 음식, 흡연, 자동차 배기가스 등 탄소연료의 연소에서 유래하여 암 유발 등 건강을 위협하는 환경독성물질로서, 그 자체보다 대사산물이 발암전구물질 등으로 작용하기 때문에 PAHs의 대사에 관여하는 효소의 활성개인차가 PAHs에 대한 노출 감수성차를 유발하는 감수성지표로서 주목되고 있다 (Schulte and Perera, 1993; Kawamoto

⁺Both authors contributed equally to this work

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-2077-7179, E-mail: myang@sookmyung.ac.kr

and Yang, 1999). 본 연구진은 뇨 중 2-나프톨(naphthol)이 PAHs의 노출원인 흡연량과 유의적인 상관관계(positive correlation)가 있고 대기 중 PAHs의 노출을 선택적으로 반영하며 측정이 용이한 적절한 노출지표임을 제시하였고, 그 정량분석법을 확립하였으며, 나아가 나프톨 대사에 관여하는 효소 중 cytochrome P450 2E1 (CYP2E1)의 유전자다형에 근거한 mutant CYP2E1 allele (c2)群에서 뇨 중 나프톨량이 유의적으로 높은 것을 발견하였다 (Yang *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001). 이러한 역학적 결과의 기전으로는 CYP2E1의 5'-flanking 부위의 C→T point mutation에 근거한 *Rsa*I 유전자다형에 따라 PAHs 등의 독성물질에 대한 감수성에 영향을 미쳐 암 발생의 개인차를 초래함이 시사되어 왔다 (Watanabe *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 1997). 그러나 아직 CYP2E1의 유전자다형과 표현형의 관계가 불확실하며 PAHs 노출시 CYP2E1의 유전자다형으로 인한 독성 민감도 차에 관하여는 연구된 바가 없는 실정이다. 또한 효소활성은 기질에 따른 차를 초래할 것으로 추정되었다 (Coles *et al.*, 2000), 실제 나프톨의 parent chemical인 나프탈렌(naphthalene)에 노출 후 나프톨 생성까지, CYP2E1의 관여 및

그 유전자다형의 영향이 연구되어야 하므로, 본 연구에서는 나프탈렌 투여 후 CYP2E1 *Rsa*I 유전자다형에 따른 2-naphthol 생성 여부를 세포수준에서 관찰하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 한국인에서 CYP2E1 *Rsa*I 유전자다형진단

한국인 자원자로부터 말초혈을 채취하여 genomic DNA를 분리하여 Kawamoto 등(1995)의 방법을 따라, CYP2E1 *Rsa*I 유전자다형을 진단하였다. 즉 사람 CYP2E1 (HCYP2E1) 유전자의 -1019번째 위치의 C→T point mutation에 근거하여 HCYP2E1 promoter region을 forward primer (5'-CCAGTC-GAGTCTACATTGTCA)와 reverse primer (3'-TTCAT TCTGTCTTCTAACTGG) oligonucleotide를 이용하여 PCR을 시행하였고, 제한효소 *Rsa*I를 이용한 RFLP (restriction fragment length polymorphism)법으로 *Rsa*I 인식서열이 있는 c1 allele와 *Rsa*I 인식서열이 없는 c2 allele을 감별하였다(Fig. 1).

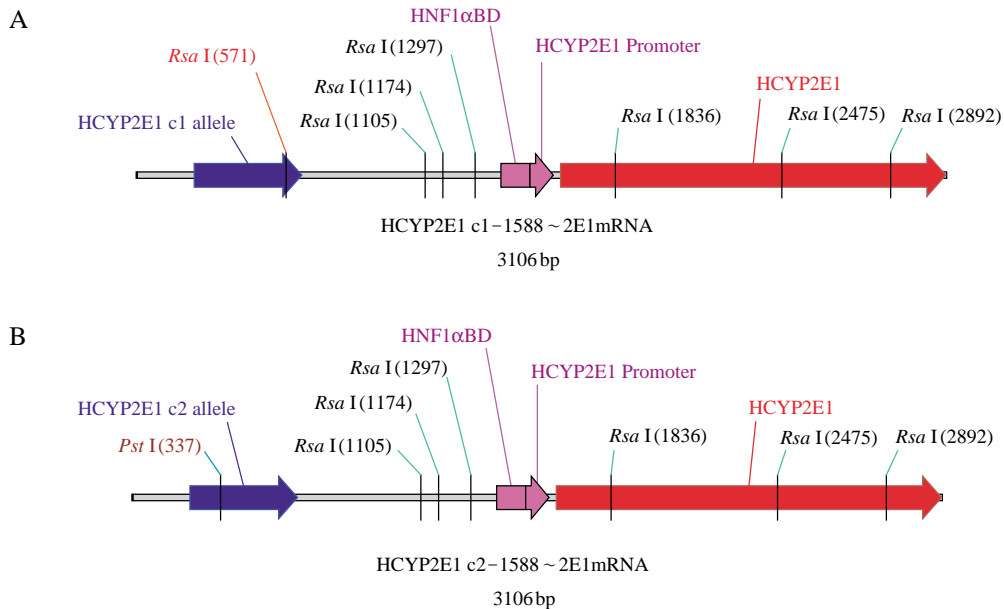


Fig. 1. Genetic polymorphism of human cytochrome p450 2E1 (HCYP2E1) 5'-flanking region. A, c1 allele: *Pst*I⁻, *Rsa*I⁺; B, c2 allele: *Pst*I⁺, *Rsa*I⁻.

2. 플라스미드의 제조

CYP2E1 RsaI 유전자다형진단결과에 따라 CYP2E1-c1/c1, c2/c2 allele로 진단된 두 사람의 PCR product를 pSTBlue-1 벡터에 blunt end ligation으로 cloning 하였다(Watanabe *et al.*, 1994). 제한효소를 이용하여 기존의 CAT 유전자가 cloning 되어 있는 pLHXBC/CAT 레트로바이러스 플라스미드 및 HCYP2E1 유전자가 cloning 되어 있는 HCYP2E1F-LHXBN 레트로바이러스 플라스미드에 삽입하여, 각각 HCYP2E1F c1P-LHXBC, HCYP2E1F c2P-LHXBC 및 HCYP2E1F c1P-LHXBN, HCYP2E1F c2P-LHXBN 레트로바이러스 플라스미드를 제조하였다(Fig. 2).

3. Stable cell line 제조

1) 배양 세포주

실험에 사용한 세포주는 HepG2 세포주(ATCC

HB-8065)에 사람 NADPH dependent cytochrome p450 reductase (HCYPR) 유전자를 pRSV3.1 (+) 벡터에 삽입시켜 유전자전이시킨 세포주(HepG2.HCYPR-LNCX2)로서, 10% 우태아혈청, 100 unit/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin 함유 DMEM 배지에 1 mg/mL G418 (geneticin HCl, Calbiochem)을 첨가하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다. 양성대조군으로 HCYP1A2 및 HCYPR 유전자가 동시에 발현되는 HepG2.1A2BC3-LNCX2 세포주를 이용하였다.

2) 유전자전이 세포주

상기의 방법에 의해 제작된 플라스미드를 정제한 후 lipofectamine을 이용하여 293GPG 바이러스 제조세포에 유전자전이 시켰다(Ory *et al.*, 1996). 유전자 전이 3일 후부터 세포배양액을 수거한 후 100,000×g로 원심 침전하여(Beckman) 바이러스를 농축시켰다. 농축된 바이러스를 HepG2.HCYPR-LNCX2세포에 polybrene 8 µg/mL을 첨가한 후 하

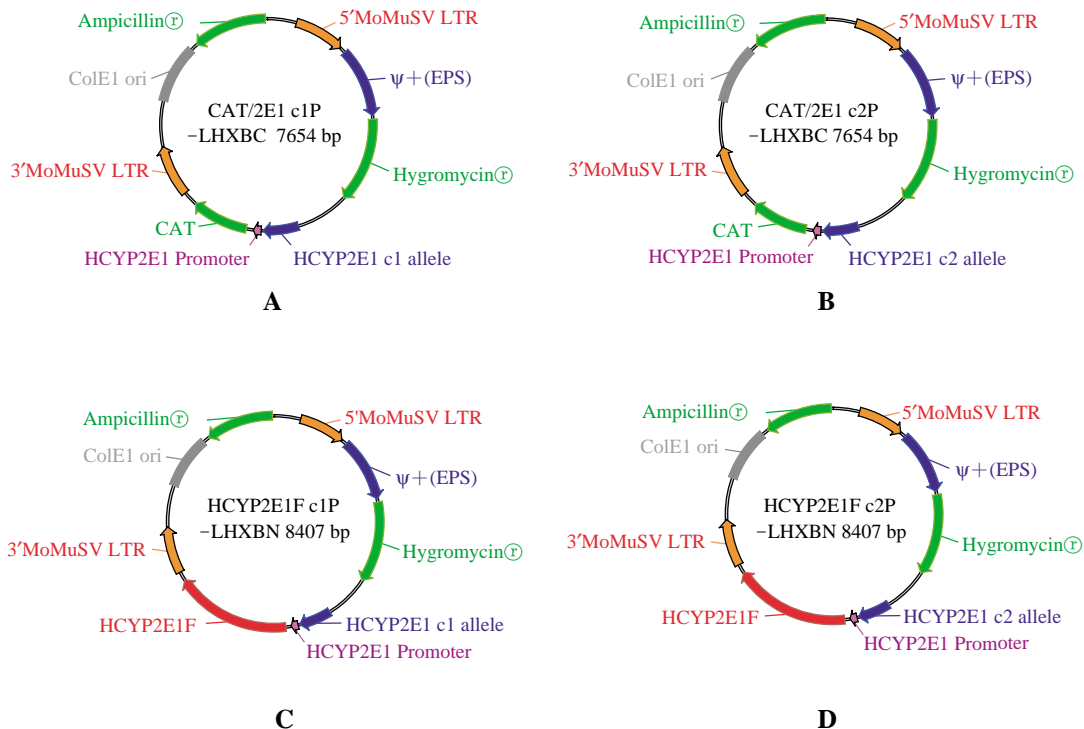


Fig. 2. Schematic drawing of Retroviral constructs. A and B, CAT expressing plasmids; C and D, human cytochrome p450 2E1 (HCYP2E1) expressing plasmids.

룻밤 동안 감염시켰다. 배양 이틀 후 hygromycin 500 µg/mL을 첨가하여 유전자 전이된 세포를 선택하였다.

4. CAT assay

Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay는 Promgea E1000 키트 (Madison, WI)를 이용하여 ELISA reader (model 550, BioRad, Hercules, CA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다

5. Western blot

1) Microsome 제조

Spector DL 등의 방법을 기준으로 microsome을 제조하였다 (Morimoto and Sabatini, 1998). 즉, 유전자전이 세포주를 직경 150 mm dish에 단층배양시킨 후, 세포수거 10분전에 cycloheximide를 최종농도 10 µM로 넣어 주고 세포를 수거하여 10 mM HEPES, pKa7.55, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 4 U/mL Rnase-IN 함유 완충액 상태로 초음파파쇄한 후 glycerol을 1/20 (v/v) 넣고 700 g로 3분간, 그리고 6,500 g로 10분간 원심 침전하였다. 상청액을 100,000 × g로 1시간 원심분리 (Beckman TL-100, Fullerton, CA)한 후 침전물을 10 mM HEPES, 20% glycerol 용액으로 풀어 다음 실험 때까지 -70°C에 보관하였다.

2) Western blot

전기영동은 NuPAGE 전기영동기구를 사용하며 NuPAGE 4~12% Bis-Tris젤을 사용하여 2-mercaptoethanol로 시료를 환원시킨 후 50 mM MOPS-3.5 mM SDS 조건으로 200볼트에서 1시간동안 실시하였다. 전기영동 후 젤을 0.45 µm의 나이트로셀룰로스막으로 전기전이하고 5% 탈지분유 및 100 mM NaCl, 0.1% Tween20 함유 10 mM Tris (pH 7.6)에 anti-CYP2E1 항체 및 anti-β-actin 항체를 1:3,000으로 첨가하여 하룻밤 반응시킨 후 과산화효소 기질 키트를 이용하여 발색반응을 실시하였다.

6. 세포독성시험

HCYP2E1 유전자전이 세포주에 미치는 naphthalene의 독성을 측정하기 위하여 MTS 시험을 시

행하였다 (Park *et al.*, 1998). 즉, 96 well plate에 유전자전이 세포를 well당 10,000개씩 접종하여 24시간 배양후, naphthalene을 투여하고 20시간 더 배양한 다음 3-[4, 5-dimethyl thiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxy phenyl]-2-[4-sulfophenyl]-2H-tetrazolium (MTS)/phenazine methosulfate (PMS) 혼합액을 처리하고 4시간 후에 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. Naphthalene 대사능력 측정

HCYP2E1 유전자전이 세포주에 의한 naphthalene 대사능을 측정하기 위하여 HPLC를 이용하여 naphthalene이 naphthol로 대사되는 양을 측정하였다. HCYP2E1F 유전자전이 세포주를 24 well plate에 well당 1×10^5 세포를 접종하여 24시간 배양한 다음, naphthalene을 2시간 투여하고 배양여액을 수거하여 원심분리 후 상등액 100 µL를 HPLC에 주입하여 naphthol의 양을 측정하였다 (Kim *et al.*, 1999). HPLC system 및 분석 조건은 다음과 같다: Waters 515 HPLC Pump, Waters Automated Gradient Controller, Waters 717 plus Autosampler, Waters TM 474 Scanning Fluorescence Detector: column, TOSOH TSK-gel ODS-80 TM (4.5 mm × 150 mm); mobile phase, 60% acetonitrile in water; flow rate, 1.0 mL/min; Fluorescence Excitation 227 nm and Emission 355 nm.

8. 통계분석

CYP2E1 유전자다형에 따른 유전자전이 세포에 naphthalene 처리 후 생성되는 2-naphthol량, 독성 등 표현형의 변화를 Mann Whitney U test 또는 Kruskal-Wallis 등 비모수적 통계법 (JMP, SAS Institute, Inc., Cary, NC)으로 분석하였다.

결 과

1. CYP2E1 유전자형에 따른 CAT 활성차이

HCYP2E1F c1P-LHXBC, HCYP2E1F c2P-LHXBC 유전자전이 세포주의 CAT 활성을 측정된 결과, HCYP2E1F c1P-LHXBC 유전자전이 세포주

는 0.154 ± 0.026 , HCYP2E1F c2P-LHXBC 유전자 전이 세포주는 0.275 ± 0.045 흡광도를 나타내어, c2 allele에서 c1 allele보다 약 1.8배 높은 활성을 보였다 ($p < 0.05$, Fig. 3).

2. CYP2E1 유전자형에 따른 CYP2E1 단백질 발현차이

HCYP2E1F c1P-LHXBN, HCYP2E1F c2P-LHXBN 유전자 전이 세포주에서 microsomes을 제조하여 Western blot을 시행한 결과, HCYP2E1F c2P-LHXBN 유전자 전이 세포주가 HCYP2E1 단백질의 발현이 HCYP2E1F c1P-LHXBN 유전자 전이 세포주에 비하여 2.7 ± 0.9 배 높게 나타났다 ($p < 0.05$, Fig. 4).

3. CYP2E1 유전자형에 따른 Naphthalene 대사능력차이

나프탈렌 처리 농도를 결정하기 위하여 나프탈렌이 유전자 전이 세포주에 미치는 세포독성을 측정 한 결과, 나프탈렌 용해 최대농도에서도 세포독성이 나타나지 않아, 나프탈렌 처리 농도를 최종 $10 \mu\text{M}$ 로 결정하였다. 나프탈렌 $10 \mu\text{M}$ 을 두시간 동안 유전자 전이 세포주에 처리하고 상청액을 수거하여 HPLC로 2-naphthol의 생성량을 측정 한 결과, HCYP2E1F c1P-LHXBN 유전자 전이 세포주와

HCYP2E1F c2P-LHXBN 유전자 전이 세포주 사이의 2-나프톨 생성량의 유의적 변화는 관찰되지 않았다 (6.99 ± 0.87 vs. 6.56 ± 0.63).

고 찰

CYPs는 다양한 isozyme으로 구성되어 외부이물질의 대표적인 대사를 통해, 생체방어 뿐만 아니라 발암화 개시, 즉 발암전구물질을 생체 내 변환시켜 암화의 개시에 관여하기 때문에 PAH 등 환경유래 발암물질에 대한 노출모니터링 시 감수성차이를 초래할 우려가 있어 생물학적 모니터링 분야에서 지속적 관심이 큰 효소이다. 노 중 naphthol류가 공기 중 PAH 노출지표로 개발되기 전, 노 중 1-hydroxypyrene은 PAH 노출지표로 광범위하게 사용되었다. 최근 시판중인 CYP유전자 전이 세포를 통하여 CYP1A1 및 1B1, 1A2의 관여가 보고되어 (Kim *et al.*, 2005), 역학적으로 특히 의심되어온 'CYP1A1 유전자 다형과 PAH노출, 또는 PAH 관련 암의 감수성' 간의 상관을 지지하는 상황이다.

한편, CYP2E1은 alcohol 등 작은 분자의 다환성 방향족탄화수소나 니트로자민 대사에 관여하므로 발암물질의 개시에 관련하여 폐암 등의 위험인자로 의심되었고, 그 유전자 다형은 다환성 방향족탄화수소 등 독성물질에 대한 감수성에 영향을 미쳐, 암 발생 등의 개인차에 영향을 미치는 것이 예상되어 최근 수년간 의학 연구 분야에서 주목되어 왔다 (Yang *et al.* 2001; Yang *et al.* 2001; Kim *et al.*, 2003). 서구의 경우, Ingelman-Sundberg 등은 CYP2E1의 새로운 유전자 다형 모색 및 그 표현형 발현 등에 대한 연구 (Hu *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1999), 일본 연구진은 CYP2E1 유전자 다형과 폐암의 관련 등에 관한 연구를 보고 하였다 (Watanabe *et al.*, 1994; Uematsu *et al.*, 1994). 본 연구진은 백인의 폐조직에서 CYP2E1의 존재를 확인하여 간뿐만 아니라 폐를 통해서도 CYP2E1이 작용하므로 공기를 통한 다환방향족탄화수소의 노출에 CYP2E1의 관여를 예견하였다. 구체적으로, 백인에서는 아시아인보다 mutant type인 c2 allele의 빈도가 낮고 p-nitrophenol을 이용한 CYP2E1 효소활성 연구에서 소수의 c2 allele 보유자에서 효소활성이 높음을 보고하였다 (Yang *et al.*, 2002). 그러나, 아직

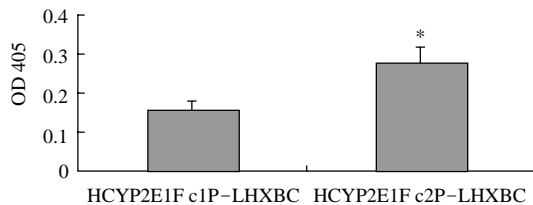


Fig. 3. Optical density of CAT assay. * $p < 0.05$

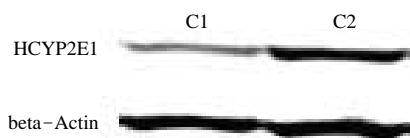


Fig. 4. Western blot analysis of microsomes of human cytochrome p450 2E1 (HCYP2E1) c1 and c2 allele expressing Hep2G cell lines.

CYP2E1의 유전자다형과 발암감수성차에 대한 확실한 관련 기전은 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 분자역학연구에서 인구집단을 근거로 발견한 결과인 CYP2E1 유전자다형의 다환방향족탄화수소 노출지표에 미치는 영향에 관하여 (Yang *et al.*, 1999), 그 기전으로 예상되는 CYP2E1 유전자다형과 표현형의 연관성, CYP2E1 유전자다형으로 인한 독성 감수성차를 세포수준에서 관찰하기 위하여 유전자전이 세포주를 제조, 확립하였다.

유전자전이 세포주를 이용하여 CAT assay를 시행한 결과 c2 allele 전이 세포주에서 c1 allele에 비해 높은 활성도를 나타내었으며, HCYP2E1에 대한 Western blot 결과에서도 같은 결과를 나타내었다. 이것은 Watanabe 등이 발표한 내용과 (Watanabe *et al.*, 1994) 일치하는 결과이지만, 활성도 차이는 두 배 내외로 나타나 Watanabe 등이 발표한 10배 이상의 활성도 증가는 발견하지 못하였다. 그러나, 유전자전이 세포주에 naphthalene을 투여한 후 대사물질인 2-naphthol의 양을 측정된 결과에서는 유전자다형성에 따른 유의적 차이는 관찰할 수가 없었다.

본 세포주를 이용하여 인구집단에서 보일 수 없는 실험을 실제 세포수준에서 실시하여 역학연구 결과의 기전을 제공하므로, 개인차를 고려한 PAHs의 효과적 노출예방 및 독성 최소화를 위한 예방정책 결정에 유용한 자료로 활용 될 것이다.

결 론

역학적 보고, 'CYP2E1의 유전자다형의 나프탈렌 대사관여'는 유전자전이 세포주를 이용한 본 연구를 통하여 *in vitro* 연구에서는 확인할 수 없었다. 그러나, CYP2E1-RsaI 유전자 다형에 따른 발현량의 차이가 관찰되어 향후 CYP2E1 관련 발암물질에 대한 감수성 연구에 좋은 자료로 활용될 것이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 신진교수연구지원사업 (과제번호, E00044)으로 학술진흥재단의 지원으로 수행되었음

에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Coles B, Yang M, Lang NP and Kadlubar FF. Expression of hGSTP1 alleles in human lung and catalytic activity of the native protein variants towards 1-chloro-2,4-dinitro benzene, 4-vinylpyridine and (+)-anti benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-oxide, *Cancer Lett* 2000; 156 (2): 167-175.
- Hu Y, Oscarson M, Johansson I, Yue QY, Dahl ML, Tabone M, Arinco S, Albano E and Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles, *Mol Pharmacol* 1997; 51 (3): 370-376.
- Hu Y, Hakkola J, Oscarson M and Ingelman-Sundberg M. Structural and functional characterization of the 5'-flanking region of the rat and human cytochrome P450 2E1 genes: identification of a polymorphic repeat in the human gene, *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 286-293.
- Kawamoto T, Koga M, Murata K, Matsuda S and Kodama Y. Effects of ALDH2, CYP1A1, and CYP-2E1 genetic polymorphisms and smoking and drinking habits on toluene metabolism in humans, *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, 133(2): 295-304.
- Kawamoto T and Yang M. Genetic polymorphisms in metabolic enzymes and metabolism of carcinogens. In Hanaoka, T. (ed.) Search for black boxes of environment-induced cancers: Challenge of molecular epidemiology in occupational medicine. Institute of Occupational Science Press, Human science-frontier series 2000 [III], Japan, 1999; 137-152.
- Kim H, Kim YD, Lee H, Kawamoto T, Yang M and Katoh T. Assay of 2-naphthol in human urine by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 734: 211-217.
- Kim YD, Lee CH, Nan HM, Kang JW and Kim H. Effects of genetic polymorphisms in metabolic enzymes on the relationships between 8-hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocytes and urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentration, *J Occup Health* 2003; 45: 160-167.
- Kim YD, Todoroki H, Oyama T, Isse T, Matsumoto A, Yamaguchi T, Kim H, Uchiyama I and Kawamoto T. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene, *Environ Res* 2004; 94: 262-

- 266.
- Morimoto T and Sabatini DD: Subcellular fractionation of rough microsomes. In Spector DL, Goldman RD and Leinwand LA (eds.) Cells: a laboratory manual, pp 37.1-37.22, USA: CSHL Press, 1998.
- Ory DS, Neugeboren BA and Mulligan RC. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes, Proc Natl Acad Sci. USA 1996; 93: 11400-11406.
- Park CH, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han ES, Kim JW, Eom MO, Kim SH, Kim JS and Ha KW. Genetic Toxicity of Ochratoxin A in Chinese hamster lung and VERO cells, ddy mice, and *Drosophila melanogaster*, J Korean Soc Microbiol 1998; 33: 441-450.
- Schulte P and Perera FP. Molecular Epidemiology principles and practices, Academic press, London, UK, 1993.
- Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi H, Sagami I, Kanamaru R, Abe T, Satoh K, Motomiya M and Watanabe M. Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure, Pharmacogenetics 1994; 4: 58-63.
- Watanabe J, Hayashi S and Kawajiri K. Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region, J Biochem (Tokyo) 1994; 116(2): 321-326.
- Yang M, Koga M, Katoh T and Kawamoto T. A study for the proper application of urinary naphthols, new biomarkers for airborne polycyclic aromatic hydrocarbons, Arch Environ Contam Toxicol 1999; 36(1): 99-108.
- Yang M, Kunugita N, Kitagawa K, Kang SH, Coles B, Kadlubar FF, Katoh T, Matsuno K and Kawamoto T. Individual differences in urinary cotinine levels in Japanese smokers: relation to genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; 10(6): 589-93.
- Yang M, Coles BF, Delongchamp R, Lang NP and Kadlubar FF. Effects of the ADH3, CYP2E1, and GSTP1 genetic polymorphisms on their expressions in Caucasian lung tissue, Lung Cancer 2002; 38: 315-321.