

## CYP1A1 유전자발현과 소아천식의 상관

양 미 희\*

숙명여자대학교 약학대학 독성학교실

### Association between CYP1A1 Expression and Childhood Asthma

Mihi Yang\*

Department of Toxicology, Sookmyung Women's University College of Pharmacy

#### ABSTRACT

Due to steady increase of childhood asthma, exposures to air toxics including PAHs have been thought as an etiology for the asthma. PAHs-involvement in airway inflammation, such as IgE production, is the potential mechanism of the PAHs-induced asthma. Cytochrome P450s (CYPs), particularly, CYP1A1 is a known enzyme to metabolize PAHs and to be induced by PAHs. The CYP1A1 expression has been emphasized as an biomarker for PAHs-exposure. The present study was performed to clarify the etiology of childhood asthma with PAHs-exposure using mRNA expression of CYP1A1. The study subjects were Korean children who were asthma patients (cases) or other hospital controls (N = 20; age, 3~16; boys, 56%). As results, we detected expression of the CYP1A1 in all peripheral blood specimens which were collected from the subjects. Moreover, we found approx. 300 fold-higher expression of the CYP1A1 in the cases than that in the controls ( $p < 0.01$ ). When we considered age which was related to asthma, the above significant trend was somewhat diluted, however, the relation between asthma and the CYP1A1 expression was stronger than that between asthma and age (chi square, 7.99 vs. 3.34). Therefore, our study supports that PAHs induce or worsen childhood asthma and suggests application of expression of the CYP1A1 as an initiation or progress biomarker for PAHs-induced childhood asthma.

**Key words :** CYP1A1, expression, Childhood asthma, allergy, Korean, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons)

#### 서 론

인류의 위생환경이 개선되고 산업화와 더불어 환경오염, 패스트 푸드(fast food)의 범람 등으로 인해 인체는 다양한 신종 알레르기原(알레르겐, allergen)에 노출되고 있는 실정이다. 우리나라의 경우, 우리나라의 10%, 약 600만명이 알레르기환자

로 추정되고, 소아알레르기학회 통계에 따르면 초등학교 1~5학년 어린이의 20~25%가 천식, 아토피, 비염 등 알레르기 관련 질환으로 고생하고 있는 것으로 추정된다(국민건강보험공단 web site). 그 중 기관지 천식은 기관지에서 일어난 알레르기 반응으로 인해 기관지 내부에 알레르기성 염증 반응이 일어나 기관지가 매우 좁아지게 되어 천명(喘鳴), 호흡곤란, 기침의 전형적인 증상이 발작적으로 나타나게 되는데 비전형적인 경우에는 단순한 만성적인 기침, 혹은 흉부 압박감, 혹은 원인을

\* To whom correspondence should be addressed.

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

알 수 없는 호흡곤란의 증상만 있는 경우도 적지 않다. 치료를 받게 되면 일시적으로 이런 증상이 없어지지만 원인되는 물질이 다시 몸 안에 들어오면 같은 현상이 반복되어 나타날 수 있으므로 원인 제거가 매우 중요하다.

우리인구에서 천식 유병률은 1963년 3.2%, 1983년, 5.7%, 2000년 12.8%로 약 40년 전에 비해 무려 4배의 발병증가를 보였고, 특히 소아에서 기관지 천식은 가장 중요한 만성 질환 중의 하나가 되었다(Lee *et al.*, 2001; 국민건강보험공단 web site): 최근 국민건강보험공단통계에 따르면 소아 천식 유병률은 2000년 3.58%에서 2003년 4.19%로 증가했고, 연령별 유병률에서는 1~4세에서 23.7%, 5~9세는 10.9%로 다른 연령층보다 월등히 높았다. 또한, 1~4세 사이의 소아 천식 유병률이 전체 연령대별 평균 천식 유병률의 6배에 달하는 등 소아 천식 환자가 급증하고 있는 것으로 보고 되었다. 이러한 소아천식의 증가는 소아나 가족들의 삶의 질을 저하시킬 뿐만 아니라 사회 경제적으로 큰 짐이 되고 있다. 따라서 소아인구에서 천식의 병인을 정확히 파악하여 그 발생을 막기 위한 다양한 노력이 필요한 실정이다.

소아천식에서 흡연, 집먼지, 진드기는 대표적인 알레르겐으로 알려져 있는데 (Gold, 2000), 최근에는 알레르겐 뿐만 아니라 앞서 서술한 서구화된 생활패턴과 비례하여 대기오염, 화학물질의 노출, 식이 등 천식유발인자들을 천식의 병인으로 주목하고 있다.

대기오염물질 중 대표적인 독성물질인 다환족방향성탄화수소류 (PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons)의 노출과 소아천식과의 관련은 역학적 연구 및 천식기전에 관여를 중심한 실험실적 연구로 증명되고 있다. 우선, 천식의 특징은 크게 3가지로 대별하면, 간헐적 또는 가역적 기도 폐쇄; 자극에 대한 기도반응(수축)증가; 기도염증을 들 수 있다. 그 중, 천식성 염증은 크게 immunoglobulin E (IgE)- 매개성, 신경성, 자극 등 3가지 기전에 의해 유도 되는 것으로 알려져 있다(Delfino, 2002). 대기 중 독성물질의 천식관련 기전은 주로 기도염증 증가에 의한 것으로 추정되어 더 구체적인 PAH 관련 천식의 기전을 구명하기 위하여 실험실적 방법을 통하여 연구자들은 디젤배기물(diesel exhaust) 등 검댕이(black smoke 또는 soot) 유래 PAH추출

물을 B세포에 첨가한 결과, IgE 발현 및 기도 내 생산 증가를 발견, PAH류의 천식 관련성을 증명하였다(Takenaka *et al.*, 1995; Tsien *et al.*, 1997; Nel *et al.*, 1998).

PAH류의 주 경로인 흡연의 경우, 역학연구를 통하여 혈청 IgE 수준이 비흡연자보다 흡연자 혹은 간접흡연량이 높은 인구에서 높게 보고 되어 IgE 반응성의 증가와 천식과의 관련을 제공하였다(Oryszczyn *et al.*, 2000). 그러나, 실내흡연으로 인한 알레르기성 감작 개시에 대하여 아직도 상반되는 보고가 있다. 예를 들면, 약 6,000명의 학령기 어린이에서 임신 중 어머니의 흡연과 천식발생과는 유의적 상관이 발견되었으나, 출생 후 흡연에 노출된 것은 천식과 유의적 상관이 없었다(Gilliland *et al.*, 2001).

또한, PAHs의 생체노출지표인 뇨 중 1-hydroxypyrene 농도를 이용하여 비교한 결과, 천식환자에서 유의적으로 높게 보고 되었다(Kim *et al.*, 2005). 이상의 보고를 종합해 볼 때 '천식과 PAH류의 관련'은 대기 중 독성물질, 특히 PAH류가 천식을 유발시키고 악화시키는 기전은 주로 IgE 유도 등 면역기구를 통한 과민반응에 기인하므로 실험적 또는 역학적 증거로부터 PAH류가 소아천식 유발 및 악화에 생물학적기전을 통하여 관여한다고 여겨진다.

한편, 각종 독성물질에 대한 현재 규제농도는 성인 일반인구를 대상으로 만들어진 맹점을 극복하기 위하여 소아 및 감수성 인구를 포함한 규제가 규제독성학의 새로운 이슈로 등장하고 있다(Lobdell *et al.*, 2005). 그러므로 본 연구는 PAHs와 소아천식의 기전을 구명하고 나아가 소아천식과 관련한 선택적이며 특이적이며 비침해인 PAHs 생체지표를 개발하여 향후 PAHs의 올바른 규제에 기여하기 위하여, PAHs에 의해 유도되는 유전자 cytochrome P450 (CYP)1A1 발현을 중심으로 소아천식과의 관련을 중심으로 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상군

서울대학교병원과 인하대학교병원에 온 천식 및 다른 질환 소아환자 중, 본인과 보호자가 담당의사와의 인터뷰에 자원자로 응한 20명(천식환자 10

명, 대조군 10명; 연령, 3~16세; 남아, 56%; 여아, 44%)을 대상으로 하였다. 각 지원자로부터 EDTA 처리 말초혈 1 mL를 채집하여 실험 전까지 -80도에 보관하였다.

**2. 말초혈로부터 RNA 분리**

본 연구진의 방법 (Yang *et al.*, 2005)에 따라 유전자발현에 영향을 줄 수 있는 일체의 조작을 가하지 않기 위하여 phytohemagglutinin 등 세포분열 촉진인자를 가하지 않고 순수 말초혈액 0.9 mL에 3배 용적의 Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2.7 mL에 적용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA는 DNase (GibcoBRL, Gaithersburg, MD)을 처리하여 genomic DNA를 제거한 후, Taqman RT reagent Kit (ABI, Foster City, CA)를 이용하여 cDNA로 전환·합성하였다.

**3. CYP1A1 발현량 정량**

합성된 cDNA 3 µL에 2x syber green PCR master mix (ABI) 10 µL, CYP1A1 forward primer, 5'-GCTGACTTCATCCCTATTCTTCG-3', 1 pmole; CYP1A1 reverse primer, 5'-TTTTGTAGTGCTCC-TTGACCAT-CT-3', 6 pmol를 가하여 반응액 총 20 µL를 조제, ABI Prism 7500 Sequence Detection System으로 Taqman fluorogenic real time PCR을 실시하였다 또한, reference gene으로 18S rRNA를 선택하여 18S rRNA kit (ABI)를 사용하여 그 발현을 제작사의 방법을 따라 정량하였다. Standard curve를 작성하여 CYP1A1과 18S rRNA, 이 두 유전자 발현이 각 cDNA농도에 따라 일정한 효율 (efficiency)을 나타냄을 확인한 뒤 ( $\Delta Ct$  vs.  $\log$  RNA concentration:  $|\text{slope}| < 0.1$ ), 가장 큰  $\Delta Ct$  (CYP1A1 Ct-18S rRNA의 Ct)를 보인 대조군의 일정 시료값을 기준으로 하여  $\Delta\Delta Ct$ 법에 의해 제작사의 방법에 따라 상대정량하였다. Well to well 및 plate to plate error를 극복하기 위하여 각 각 3회씩 한 시료 당 총 9회의 반복실험 후, CV (coefficient of variation) 10% 이하인 값만을 data로 취하였다.

**4. 통계분석**

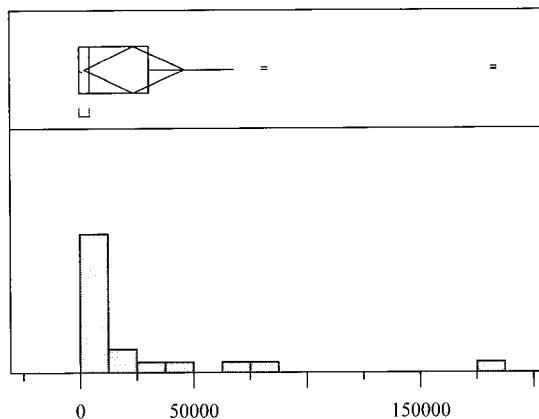
천식환자와 대조군에서 나이 및 성별의 분포차

이는 각각 nominal logistic regression, contingency table analysis (the Pearson Chi Square test)를 사용하였다. CYP1A1 발현량에 대한 정규분포 판정은 Shapiro-Wilk W test에 따랐다. 두집단, 천식군과 대조군에서 CYP1A1 발현량의 비교분석은 Mann-Whitney test로 수행하였다. 천식발생에 대한 '나이'와 'CYP1A1 발현'의 영향을 함께 고려하기 위하여 multiple nominal logistic regression을 수행하였다. 모든 통계는 JMP software (version 4; SAS institute, Cary, NC)를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**1. 대상군의 특징**

성별에서는 천식환자와 대조군에서 유의적 차이가 없었으나 ( $p=0.17$ ) 나이에서는 천식환자군이 대조군보다 평균 약 4세가 어렸다 (3~13세 [ $6.5 \pm 3.3$  세] vs. 6~16세 [ $11.1 \pm 3.5$  세];  $p=0.02$ ). 본 연구는 대상군의 크기를 고려할 때 예비연구 (pilot study)에 속하지만 통계적으로 알려진 소아천식의 분포가 주로 9세 이하 어린 소아 인구에서 호발하므로 본 천식환자군은 이러한 연령분포를 잘 반영하였다. 따라서, 환자와 대조군에서 차후 CYP1A1 발현량 비교 시 나이를 고려하였다.



**Fig. 1.** Distribution of CYP1A1 expression in peripheral blood: upper part, an outlier box plot with the square in the box showing the interquartile range; lower part, histogram of expression levels of CYP 1A1; Shapiro -Wilk W test,  $p < 0.0001$ .

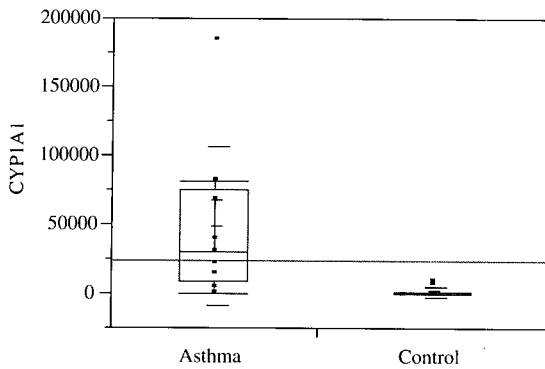


Fig. 2. Differences of CYP1A1 expression in control and asthma.

Table 1. Effects of age and CYP1A1 expression on childhood asthma

Term	Nominal logistic regression			Likelihood ratio test
	Estimation	Std error	Chi square (p)	Chi square (p)
CYP1A1	0.0004	0.0003	1.86 (0.1728)	7.99 (0.004)
Age	-0.6498	0.5452	1.42 (0.2333)	3.34 (0.067)
Intercept	2.7675	3.2789	0.71 (0.3987)	-
R <sup>2</sup>	0.6215	-	14.3 (0.0008)	-

## 2. CYP1A1 발현량의 분포

전체 말초혈 시료에서 CYP1A1 발현을 검출할 수 있었다(범위, 1-184083; 중간값, 4451). CYP1A1 발현량의 분포는 Fig. 1과 같이 왼쪽으로 치우친 양상으로 Shapiro-Wilk W test 결과에서 정규분포를 따르지 않으므로 이 후 모든 통계분석에서는 비모수적 통계법을 따랐다.

## 3. CYP1A1 유전자발현과 소아천식과의 상관

CYP1A1 유전자발현량은 환자군과 대조군에서 비교하면 Fig. 2와 같이 중간값에서 천식군이 대조군보다 약 300배 높았다(31216 vs. 93;  $p=0.002$ ). 앞서 서술한 'CYP1A1 발현' 이외 환자군과 대조군에 상관을 보인 인자, '나이'를 함께 고려하여 Table 1과 같이 Likelihood Ratio Test를 수행한 결과, CYP1A1 발현이 천식에 미치는 영향은 유의적이었으나 나이는 유의적이지 않았다. 한편, multiple

nominal logistic regression에서는 두 인자 모두 천식과 상관성이 희석되어 유의적 상관성이 없었다.

## 고찰

### 1. CYP1A1 발현과 소아천식의 관련

천식, 만성폐쇄성폐질환, 폐암 등은 흡연이나 매연으로 인한 실내 및 실외오염과 관련한 기관지의 대표적인 병변으로, 오염물질원의 입자크기 등 물리적인 요인과 그 오염물질에 들어있는 성분들, 즉 다양한 직·간접적 독성물질이 이러한 질병의 원인으로 의심되고 있다. 이런 독성물질 중, PAH류의 경우, C, H, O 화합물의 불완전연소에 의하여 생성되기 때문에 흡연, 매연, 조리과정 등을 통하여 benzo(a)pyrene 등 발암물질을 발생하므로 질병 예방적 측면에서 환경 중 노출모니터링이 필요한 물질이다.

한편, CYP1A1은 PAH류에 노출 시 arylhydrocarbon (Ah) receptor가 매개하는 기전에 의해 유도되기 때문에 환경 중 PAH류의 노출모니터링을 위한 생체지표로서 주목받고 있다. 또한 CYP1A1은 다른 CYP isozyme류와 달리 간조직에 국재하지 않고 폐 등 간의외의 조직에 존재가 확인되었고, 인체 폐조직에서 특히 흡연자 혹은 과거 흡연자(ex-smoker)의 폐조직에서 CYP1A1 발현량은 비흡연자의 것보다 높은 것이 관찰되었다(Kim *et al.*, 2004). 폐조직은 PAH류에 대한 표적장기로서 결정적인 병인학 정보를 갖고 있지만 PAH류에 대한 노출을 규제하기 위한 모니터링을 위하여, 혈액, 또는 소변 등과 같이 보다 비침해적인 조직이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 혈액에서 CYP1A1 발현량을 정량하여 CYP1A1과 천식과의 상관을 통하여 천식의 병인학으로써 PAH류의 관여를 구명하려 하였다.

현재 CYP1A1 발현과 천식과의 관련 혹은 PAH류가 천식유발에 미치는 역할 또는 그 작용기전에 대하여 아직 많은 보고는 없으나, 대표적 직업성 천식인 toluene diisocyanate-유래 천식의 경우, 동물모델에서 CYP1A1의 mRNA 및 단백질 발현의 증가가 관찰되었다(Haag *et al.*, 2002). 본 연구에서는 PAHs 노출을 반영하는 CYP1A1 mRNA 발현이 소아천식환자에서 대조군에 비하여 약 300배 가량

높아 천식의 병인학으로 PAH류의 노출을 제시하였다. 나아가, 본 연구결과로부터 비침해적인 조직인 말초혈유래 CYP1A1발현은 PAHs노출지표로써 뿐만 아니라, 소아천식의 발생(발작) 및 악화의 지표로써 효용성이 제안되었다. 향후, 비침해적인 말초혈유래 CYP1A1발현이 기도(air way, respiratory tract) 등 천식관련조직 내 CYP1A1발현과 일치하는지 확인을 통하여 말초혈유래 CYP1A1발현이 소아천식 생체지표로써 실용화가 가능할 것으로 예상된다. 또한, CYP1A1발현과 IgE발현의 상관연구 등 천식기전에 있어서 유전적 정보전달체계(signal pathway system)에서 CYP1A1의 역할에 관한 연구가 필요하다.

## 결 론

본 연구결과로부터 PAHs노출을 반영하는 말초혈 유래 CYP1A1-mRNA 발현이 소아천식환자에서 대조군에 비하여 약 300배가 높아 천식의 병인학으로 PAH류의 노출을 제시하였다. 나아가, 비침해적인 조직인 말초혈유래 CYP1A1발현은 PAHs노출지표로써 뿐만 아니라, 소아천식의 발생(발작) 및 악화의 지표로써 효용성이 제안되었다.

## 감사의 글

치료채집에 도움을 주신 서울대병원 신충호 선생님, 인하대 임중환 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

국민건강보험공단, <http://www.nhic.or.kr/wbs/search.jsp>  
 Delfino RJ. Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research, *Environ. Health Perspect.* 2002; 110 Suppl 4: 573-589.  
 Gilliland FD, Li YF and Peters JM. Effects of maternal smoking during pregnancy and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001; 163: 429-436.  
 Gold DR. Environmental tobacco smoke, indoor allergens,

and childhood asthma, *Environ Health Perspect.* 2000; 108 Suppl 4: 643-651.  
 Haag M, Leusink-Muis T, Le Bouquin R, Nijkamp FP, Lugnier A, Frossard N, Folkerts G and Pons F. Increased expression and decreased activity of cytochrome P450 1A1 in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma, *Arch. Toxicol.* 2002; 76: 621-627.  
 Kim JH, Sherman ME, Curriero FC, Guengerich FP, Strickland PT and Sutter TR. Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers, *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199: 210-219.  
 Kim JH, Kim JK, Son BK, Oh JE, Lim DH, Lee KH, Hong YC and Cho SI. Effects of Air Pollutants on Childhood Asthma, *Yonsei Med J* 2005; 46: 239-244.  
 Lee SI, Shin MH, Lee HB, Lee JS, Son BK, Koh YY, Kim KE and Ahn YO. Prevalences of symptoms of asthma and other allergic diseases in Korean children: a nationwide questionnaire survey, *J Korean Med Sci* 2001; 16 (2): 155-164.  
 Lodbell DT and Mendola P. Development of a biomarkers database for the National Children's Study, *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 269-273.  
 Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T and Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system, *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102: 539-554.  
 Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Paty E, Maccario J and Kauffmann F. Relationships of active and passive smoking to total IgE in adults of the Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA), *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 1241-1246.  
 Takenaka H, Zhang K, Diaz-Sanchez D, Tsien A and Saxon A. Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production, *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95: 103-115.  
 Tsien A, Diaz-Sanchez D, Ma J and Saxon A. The organic component of diesel exhaust particles and phenanthrene, a major polyaromatic hydrocarbon constituent, enhances IgE production by IgE-secreting EBV-transformed human B cells in vitro, *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 256-263.  
 Yang M, Kang MJ, Choi Y, Kim CS, Lee SM, Park CW, Lee HS and Tae K. Associations between XPC expression, genotype, and the risk of head and neck cancer, *Environ Mol Mutagen* 2005; 45: 374-379.