



간세포에서 PAH의 구조 의존적 작용기전

김선영 · 홍성범 · 양재호
대구가톨릭대학교

Structure-dependent Mechanism of Action of Poly Aromatic Hydrocarbons in Cultured Primary Hepatocytes

Sun-Young Kim, Sung-Bum Hong and Jae-Ho Yang

Division of Medicine, The Graduate School, Catholic University of Daegu, Korea

Received January 18, 2006; Accepted March 21, 2006

ABSTRACT. Among poly aromatic hydrocarbons, dioxin and PCBs are the most controversial environmental pollutants in our modern life. These pollutants are known as human carcinogens, and liver is the most sensitive target in animal cancer models. Specific aims of the study were focused on the mechanism of carcinogenesis in hepatocytes and the structure-activity relation among these diverse environmental chemicals. Because key mechanisms of dioxin-induced carcinogenesis in human epithelial cell model are the alteration of signal transduction pathway and PKC isoforms, the alteration of the signal transduction pathways and other factors associated with carcinogenesis were studied. Rat hepatocytes cultured under the sandwich protocols were exposed with the various concentration of dioxins and PCBs, and signal transduction pathway, protein kinase C isoforms, oxidant stress, and apoptotic nuclei were evaluated. Since it is important to understand the structure-activity relation among these chemicals to properly assess the carcinogenic potentials, the study analyzed the parameters associated with carcinogenic processes, based on their structural characteristics. In addition, signal transduction pathways and PKC isoforms involved in inhibition of UV-induced apoptosis were also analyzed to elaborate the tumor promotion mechanism of these chemicals. Induction of apoptosis by UV irradiation was optimal at 60 J/m² in primary hepatocyte in culture. Compared to non coplanar PCBs such as PCB 114 and PCB 153, coplanar PCBs such as PCB 77 and PCB126 showed a stronger inhibition of apoptosis induced by UV irradiation. Production of reactive oxygen species (ROS) was more stimulated by non-coplanar PCBs than coplanar PCBs with the most potent induction of ROS by chlorinated non-coplanar PCB. As compared to the level of induction by PCB126, non-coplanar PCB153 showed a higher increase of intracellular concentrations. Besides the alteration of intracellular calcium concentration, translocation of PKC from cytosolic fraction to membrane fraction was clearly observed upon the exposure of non-coplanar PCB. Taken together, the present study demonstrated that there is a potent structure-activity relationship among PCB congeners and the mechanism of PAH-induced carcinogenesis is structure-specific. The study suggested that more diverse pathways of PAH-induced carcinogenesis should be taken into account beyond the boundary of Ah receptor dogma to assess the health impact of PAH with more accuracy.

Keywords: PCB, PKC, Hepatocyte.

서 론

우리 주변 환경에 널리 퍼져 있으며 인체에 가장 심각한 영향을 미치는 대표적인 환경오염물질로 다환성 방향족 탄화수소(poly aromatic hydrocarbon)를 들 수 있다. 이들 중 가장 많은 관심의 대상이 되는 물질로서 다이옥신과(polychlorinated bipheyls)를 들 수 있다(Safe, 1994). 다이옥신은 소각로를 비롯한 여러 가지 산업현장에서 발생하고 있으며 PCB는 변압기, 절삭유, 절연제 등 산업용으로 널리 사용되어 오면서 우리 주변 환경을 광범위하게 오염시키는 물질이다.

다이옥신 및 PCB의 생식독성, 면역독성, 내분비교란 작용 등 여러 독성 중 발암성은 인체독성과 매우 높은 관련성이 있어 지금까지 가장 많이 연구되어 온 과제이다(Yang, 1995). 특히 이들 물질은 구조의 특성에 따라 설치류의 간암모델에서 서로 상이한 발암 강도를 나타내며 작용기전의 차이도 높은 것으로 알려져 있다(Dragan, 2000). 다이옥신의 발암기전은 인체상피세포의 경우 신호 전달 기작의 변화가 중요한 발암기전으로 알려져 있으며 이러한 기전은 aromatic hydrocarbon 수용체(AhR)와도 밀접한 관계가 있을 것으로 추정된다(Yang, 1998, 1999b). 다이옥신 유사구조 PCB의 경우 발암의 강도는 다이옥신에 비해 낮으나 AhR을 매개하는 형태를 가지고 있어 발암기전은 다이옥신과 유사한 양상을 보일 것으로 추정되고 있다. 그러나 AhR과 결합하지 않는 구조를 가진 non-dioxin-like PCBs(non-coplanar PCBs)의 발암화 과정은 AhR을 매개하지 않아 다른 발암화기전이 있을 것으로 추정되어왔다(Bohnenberger, 2002). Cytochrome P450효소의 경우 다이옥신 및 다이옥신 유사구조 PCB(coplanar PCBs)는 AhR을 경유하여 CYP1A1을 강력하게 촉진시키는 반면 AhR과 결합하지 않는 non-coplanar PCB(non-dioxin-like PCB)는 phenobarbital에 의해 촉진되는 형태인 CYP2B1/2B2를 촉진시킨다(Cornor, 1995). 최근 독일의 Schrenk 등은 non-coplanar PCB에 의한 간암 발생기전이 apoptosis의 억제에 기인함을 보고하여 non-coplanar PCB에 대한 연구의 중요성을 제시한 바 있다(Bohnenberger, 2002). 이들은 간세포에 자외선을 주사하여 apoptosis를 유발시킨 후 apoptosis의 진행이 non-coplanar PCB에 의해 억제되고 이러한 억제작용은 phenobarbital-induced P450인 CYP2B1의 활성화와 관련성이 있음을 확인하였다. 지금까지 주목받고 있는 발암과정에서 대한 학설은 initiator에 의해 손상을 받은 세포가 발암촉진제에 의해 clonal expansion하여 악성 종양을 이루는 과정이다. 손상세포의 clonal expansion

에 관여하는 중요 기전으로 apoptosis의 억제가 tumor-promotion에 관여할 것으로 추정하고 있어 Schrenk 등의 연구결과는 지금까지 잘 알려지지 않은 non-dioxin-like PCB의 발암과정을 이해하는데 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

다이옥신과 PCB는 구조에 관계없이 그 강도에 차이는 있으나 발암을 촉진시키는 promoter로 알려져 있다. 이러한 발암촉진현상은 화학적인 구조특성에 따라 많은 차이를 나타냄에도 불구하고 구조적 특성에 따른 간암 발생과 관련한 신호 전달 기작의 특성은 잘 알려져 있지 않다. 특히 AhR과의 반응 여부는 이들 물질의 위해성 평가를 하는 기준인 TEF 설정에 핵심적 사항이므로 AhR 친화성에 따른 신호 전달 기작의 영향을 이해하는 일은 인체 위해성 평가에 중요한 과제이다(Van, 2000).

국제 암 연구기구(IARC)는 다이옥신을 인체발암물질로 공포한 바 있다(IARC, 1997). 더욱이 최근에는 우리나라 모유에서도 다량의 다이옥신 및 PCB가 검출되어 상대적으로 신생아들의 노출이 높은 것으로 알려져 있다. 이들 물질의 여러 가지 독성 중 발암성은 인체의 위해성과 높은 연관성이 있으며 특히 간에 축적이 높아 실험동물 모델의 경우 간에서 가장 예민한 발암성을 나타낸다(Till, 1999). 간암을 일으키는 여러 기작 중 최근 많은 관심을 모으고 있는 것은 apoptosis의 억제에 의해 손상된 세포의 clonal expansion에 따른 암 발생과정이다. 다이옥신 및 PCB는 손상된 세포의 apoptosis를 억제시키는 것으로 알려져 있으며, 이러한 발암작용은 오염물질의 화학적 구조 특성과 밀접한 관계를 가지고 있다. 특히 non-dioxin-like PCB의 경우 실질적으로 우리 체내에 가장 많은 양이 축적되지만(Abraham, 1999), AhR과의 친화성이 낮아 인체 위해성 평가에서 제외되고 있어 이들 물질의 구조적 특성에 대한 명확한 발암기전의 연구가 절실히 요구된다. 그러나 지금까지의 많은 간암 기전 연구에도 불구하고 이들 환경오염물질의 구조적 특성에 따른 암 발생 관련인자의 연구는 미흡한 형편이며 발암과정에 관여하는 신호 전달 기작도 잘 알려져 있지 않다.

본 연구는 female SD rat에서 추출된 간세포를 모델로 하여 다이옥신(2,3,7,8-TCDD), 다이옥신 유사구조(coplanar PCB)인 PCB77(3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl), PCB126(3,4,5,3',4'-pentachlorobiphenyl), 비 다이옥신 유사구조(non-coplanar PCB)인 PCB114(2,3,4,4',5-pentachlorobiphenyl), PCB153(2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl)을 노출시키고 이에 따른 세포내 칼슘 농도, oxidant stress, protein kinase C isoforms의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

Collagen 추출 및 간세포 배양

SD-rat의 간세포를 seglen 방법으로 perfusion하고 collagen sandwich 방법으로 배양한다. Collagen을 쥐의 꼬리에서 분리하고 3% acetic acid에 녹인 후 녹지 않는 부분은 원심분리로 제거한 후 상층액에서 1/5 용량의 30% NaCl 용액을 넣고 다시 원심분리하여 pellet 부분의 collagen을 얻는다. Pellet은 다시 6% acetic acid에 녹이고 전체 용량이 400 ml이 되게 한다. 48시간 동안 1 mM HCl에서 dialysis를 한 후 collagen 용액을 lyophilize한다. 사용할 때마다 1.5 mg collagen을 1 mM HCl에 녹여 stock 용액으로 쓴다. 이 용액을 DMEM으로 10배 희석시킨 후 70 μ l씩 배양용기에 도포한 후 37°C incubator에 1시간 정도 둔다. 간세포를 60,000/cm² 밀도로 심은 후 12시간 후 배양액을 교체하고 15시간 후 세포를 UV(90~150 J/m²)로 주사한다. UV 주사 30분 이후 다이옥신 또는 PCB를 용량별로 폭로시킨다(Seglen, 1976).

Apoptotic nuclei 측정

Apoptotic nuclei 수의 변화를 측정하기 위해 고정시킨 후 8 μ M DAPI와 10 μ M sulphorhodamine으로 염색한다. 형광 광학현미경 하에서(450~490 nm excitation, 520 nm emission) 농축되었거나 반달 형태 또는 산란된 형태의 핵을 apoptotic nuclei로 규정하여 계산한다(Woener, 1996).

ROS assay

DCFH-DA는 지질 친화성 물질로서 세포 내에 잘 침투되며 침투된 화학물은 세포 내에서 hydrogen peroxide, peroxidase 등에 의해 형광물질인 DCF로 변화된다. 따라서 DCF의 측정을 통해 세포 내 ROS의 활동을 측정하는 방법으로 널리 사용되고 있다. 12-well culture plate에 간세포를 배양한 후 조사대상 물질에 노출시키고 Lock's buffer로 세척하고 형광물질인 DCFH-DA를 15분간 암실에서 처리한 후 다시 세척하고 NaOH를 넣어 세포를 lysis한 다음 luminescence spectrometer를 사용하여 excitation 488 nm, emission 525 nm에서 측정한다. 그 밖의 자세한 절차는 Fonnum의 방법을 따른다(Fonnum, 2000).

Cell fractionation

Cytosol과 membrane fraction사이의 PKC isozyme을 분리하기 위해 환경오염물질에 노출된 배양세포에

buffer A(protease inhibitor 포함; PMSF, leupeptin, pepstatin)를 처리한다. Sonication 후 100,000 g에서 1시간 동안 원심 분리하여 상층은 cytosol fraction으로 분리하고 침전물은 buffer B로 30분간 추출한 후 원심분리하고 상층액을 detergent-soluble membrane fraction으로 분리한다.

Western blot

PKC isozyme의 변화를 측정하기 위하여 cellular fraction 또는 extract에 대해 Western blot을 실시한다. Cellular fraction의 시료를 12.5% gel에서 전기영동한 후 Bio-rad의 transfer chamber를 사용하여 nitrocellulose paper에 400 mA로 4시간에 걸쳐 blotting하고 blocking buffer로 1시간 동안 반응시킨 후 각각의 monoclonal 혹은 polyclonal antibody를 적당한 비율로 희석한 후 1시간 동안 반응시킨다. 2회 세척 후 secondary IgG로 1시간 동안 반응시키고 ECL system을 사용하여 반응시키고 X-ray film에 최적의 시간 동안 노출시킨 후 현상한다(Yang, 2001).

세포내 칼슘농도 측정

세포내의 칼슘이온 농도 변화를 측정하기 위하여 배양한 간세포에 2~5 μ M의 fura/AM을 처리하여 37°C에서 30~60분 배양한 후 Locke's 용액으로 잘 세척하고 250 μ M의 sulfinpyrazone을 첨가함으로써 세포로부터 fura 2 형광지시약의 누출을 막는다. 그리고 세포를 quartz cuvette에 넣고 stirring 하면서 excitation wavelength를 337 nm로 dual excitation 시키며 510 nm에서 형광의 세기를 비교하여 세포 내 Ca²⁺의 농도를 계산한다(Grynkiwicz, 1985).

Data analysis

실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 유의성 검증은 Student's *t*-test로 실시하였으며 유의도는 $p < 0.05$ 로 하였다.

연구 결과

PCB에 의한 Apoptosis 억제 효과

Ultra violet(UV)에 의한 apoptosis는 phenobarbital-inducible cytochrome P450에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다. 적정량의 UV 조사량을 설정하기 위하여 primary cultured hepatocyte에 UV를 60에서 150 J/m²까지 노출시켰다. 60 J/m²에서 가장 많은 apoptosis가 관찰되었으며 조사량이 증가 할수록 apoptosis는 오히려 다소 감소

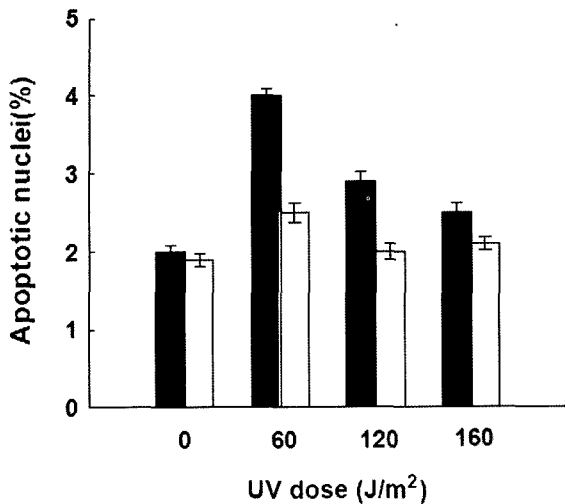


Fig. 1. Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes in primary culture. Culture were treated with saline (black bar) or 2 mM Phenobarbital (hatched bars) 30 min after UV irradiation. Twelve hours after irradiation the number of apoptotic nuclei was determined. Values are presented as means \pm S.D. of three separate experiments.

하는 경향을 보였다(Fig. 1). Phenobarbital치리에 따른 apoptosis의 억제 현상도 60 J/m²에서 가장 뚜렷하게 나타났다. PCB의 구조에 따른 apoptosis 억제효과를 관찰하기 위해 coplanar 구조(PCB77, PCB126) 및 non-coplanar 구조(PCB114, PCB153)에 대해 apoptosis 억제제의 용량-반응 관계를 관찰하였다. PCB77은 0.1 nM에서는 apoptosis의 변화를 보이지 않았으나 1 nM부터 apoptosis의 억제현상을 나타내었다. 반면 non-coplanar 구조인 PCB 114 경우, 0.1 μ M부터 apoptosis의 억제현

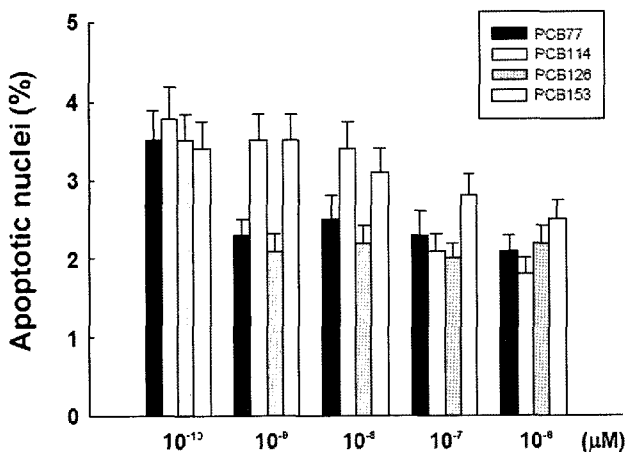


Fig. 2. Effects of PCBs on apoptosis in rat hepatocytes 12 hr after irradiation with UV-light (60 J/m²). Values are presented as means \pm S.D. of three separate experiments.

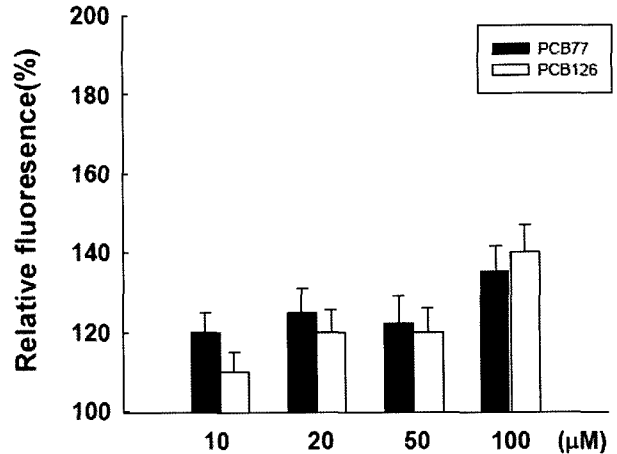


Fig. 3. Relative fluorescence as measured for formation of ROS in rat hepatocytes treated with coplanar PCBs. Values are presented as means \pm S.D. of three separate experiments.

상을 나타내어 구조에 따른 반응의 차이가 뚜렷함을 보였다. 염소의 수가 더 많은 PCB congener의 경우를 관찰하기 위해 PCB126을 노출시킨 결과 1 nM부터 apoptosis의 억제현상이 나타난 반면, non-coplanar 구조인 PCB153의 경우는 PCB 114와 유사하게 0.1 μ M에서 억제현상을 나타내었다(Fig. 2~5).

PCB 구조별 oxidant stress의 영향

PCB에 의한 oxidant stress를 평가하기 위해 reactive oxygen species(ROS)를 DCFH-DA 발생 측정법으로 관찰한 결과 non-coplanar PCB에서 더 많은 oxidant stress

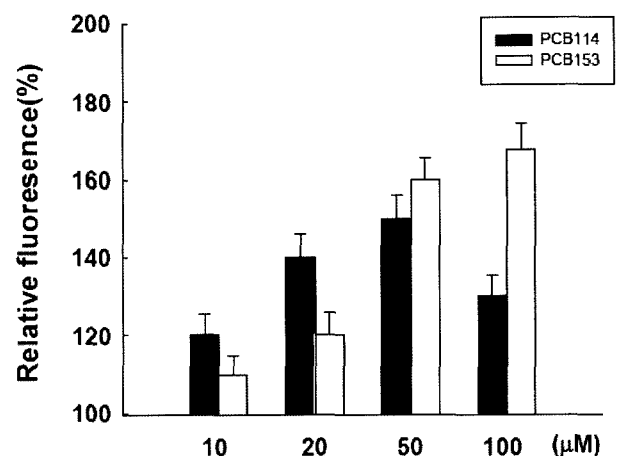


Fig. 4. Relative fluorescence as measured for formation of ROS in rat hepatocytes treated with non-coplanar PCBs. Values are presented as means \pm S.D. of three separate experiments.

를 유발함이 관찰되었다. PCB77의 경우 100 μM 에서 가장 높은 ROS를 방출하였으며(135 unit) PCB126에서는 100 μM 에서 140 unit를 방출하여 PCB77보다는 다소 높은 ROS를 방출하였다(Fig. 3). 염소의 치환 숫자와의 관련성은 좀 더 많은 연구가 필요한 부분이다. non-coplanar PCB인 PCB 114의 경우 20 μM 에서부터 증가를 나타내었으며 50 μM 에서는 150 unit를 나타내어 PCB77이나 PCB 126보다 훨씬 높은 oxidant stress를 주고 있음이 관찰되었다. 염소수가 많은 non-coplanar PCB인 PCB153의 경우는 50 μM 및 100 μM 에서 가장 높은 ROS 수치를 나타내었다(Fig. 4). 따라서 non-coplanar 구조일수록, 염소의 치환수가 높을수록 PCB의 간세포에 대한 oxidant stress는 증가하는 것을 알 수 있다.

PCB 및 TCDD의 세포내 칼슘 농도에 대한 영향

Highly chlorinated coplanar PCB인 PCB126을 노출시킨 후 세포내 칼슘의 용량을 측정할 결과, 100 μM 에서 220 nM을 나타내었으나 10 μM 및 50 μM 에서 유의한 차이의 변화를 나타내지 않았다. 반면 highly chlorinated non-coplanar PCB인 PCB 153을 노출시킨 결과 50 μM 및 100 μM 에서 유의한 증가를 나타내었으며 특히 100 μM 에서는 380 nM을 기록하여 coplanar 구조의 PCB보다 세포내 칼슘의 증가에 높은 영향을 미치는 것으로 나타났다. Coplanar 구조를 가진 대표적인 물질인 TCDD의 경우 10 μM 에서부터 세포 내 칼슘의 농도 증가가 관찰되었다(Fig. 5). 따라서 세포내 칼슘의 변화에는 PCB의 경우 non-coplanar 구조가 더욱 효율적으로 영향을 주는 반면 TCDD의 경우는 coplanar 구조를 가지고 있어도 세포내 칼슘의 강력한 효현제임을 알 수 있다. 따라서 coplanar 구조와 non-coplanar 구조의 영향은 화학물질

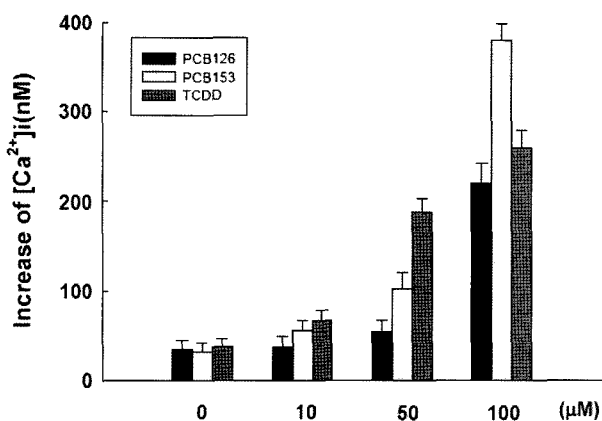


Fig. 5. Effects of PCB126, PCB153 and TCDD on intracellular calcium concentration in rat hepatocytes. Values are presented as means \pm S.D. of three separate experiments.

이 가지고 있는 구조적인 특성으로만 평가할 수 없으며 화학물질이 가지고 있는 다양한 특성이 고려되어야 함을 나타내고 있다.

PKC isoforms의 영향

Protein Kinase C(PKC)는 12개의 이성질체를 가지고 있으며 간암을 비롯한 여러 암의 발생기전 및 신호전달 체계에 중요한 역할을 한다. 본 연구실의 사전 연구에 따르면 PKC 이성질체 중 PKC- α 와 PKC- ϵ 은 PCB 및 dioxin에 대해 민감하게 반응하는 이성질체임을 확인한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 PKC- α 와 ϵ 에 대한 PCB 및 TCDD의 영향을 간세포에서 관찰하여 polyaromatic hydro-

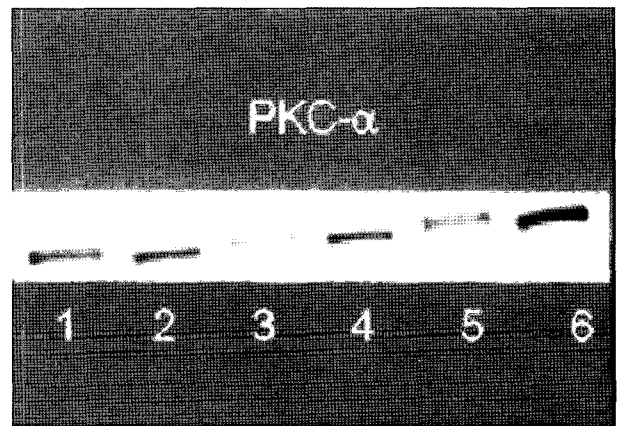


Fig. 6. Immunoblot analysis of PKC- α in primary hepatocyte with exposure to PCB 153. Translocation of PKC- α from cytosol to membrane was detected with monoclonal antibody. Cytosol; 1) control, 3) 50 μM , 5) 100 μM . Membrane; 2) control, 4) 50 μM , 6) 100 μM .

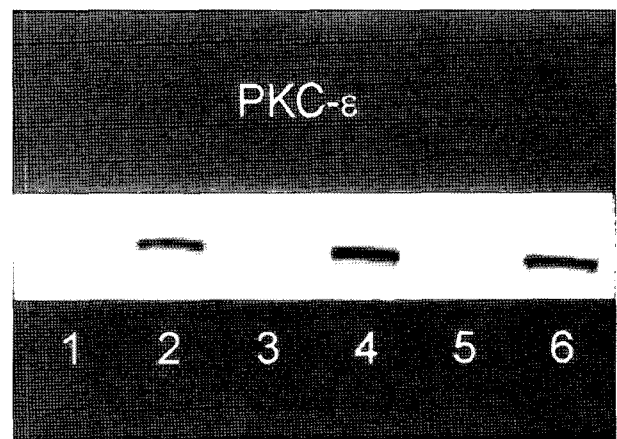


Fig. 7. Immunoblot analysis of PKC- ϵ in primary hepatocyte with exposure to PCB 153. Translocation of PKC- ϵ from cytosol to membrane was detected with monoclonal antibody. Cytosol; 1) control, 3) 50 μM , 5) 100 μM . Membrane; 2) control, 4) 50 μM , 6) 100 μM .

carbon에 의한 발암 및 세포 신호 전달에 관여하는 기전을 이해하고자 하였다. cPKC는 세포 내 칼슘에 매우 민감하게 반응함으로 세포 내 칼슘변화에 가장 높은 효력을 나타낸 PCB 153을 농도 별로 노출하여 PKC- α 와 ϵ 에 대한 PKC 활성을 분석하기 위해 cytosol에서 membrane으로 translocation되는 정도를 Western blot으로 측정 한 결과 PKC- α 의 경우 50 μ M 및 100 μ M에서 뚜렷한 translocation이 관찰되었다(Fig. 6). 그러나 PKC- ϵ 의 경우는 cytosol에서 membrane으로의 이동이 나타나지 않았다(Fig. 7).

고 찰

다이옥신과 PCB는 다환성 방향족 탄화수소의 대표적인 환경오염물질이며 우리 주변에 광범위하게 널려 있어 먹이사슬을 통한 체내 축적 등이 우려되는 물질이다. 다이옥신은 DNA에 직접적인 영향을 주어 암을 일으키는 inhibitor로 분류되기도 하며 실험 모델에 따라서는 발암을 촉진시키는 promoter의 역할도 한다(Yang, 1995). PCB는 크게 다이옥신 유사구조인 coplanar 구조와 다이옥신과 유사하지 않은 구조인 non-coplanar 구조로 분류된다. 이들 중 coplanar PCB는 다이옥신과 유사한 작용기전을 가지고 있어 Toxic Equivalent Factor(TEF)를 산정하는데 직접적으로 관여하고 있으나 non-coplanar의 경우는 TEF값 자체가 설정되어 있지 않고 존재한다 하더라도 매우 낮아 독성 자체가 매우 미미할 것으로 추정하고 있다. 그러나 최근 연구에 따르면 non-coplanar PCB의 경우 신경세포의 독작용은 coplanar보다 오히려 심각하여 non-coplanar 구조에 대한 독성 평가 개념의 수정이 요구되고 있다.

다이옥신에 의한 발암기전 및 발암측정 모델은 매우 다양하며 많은 자료가 발표되어 있다. 또한 다이옥신 유사구조를 가진 PCB의 발암성도 강도의 차이는 있으나 다이옥신과 유사한 양상을 나타내는 것으로 알려져 있다(Dragan, 2000). 그러나 두 종류 PCB 모두에서 GGT양성을 보이는 hepatic foci가 나타나 이들 두 구조 모두가 간암 발생에 관여할 것으로 추정되고 있다. 따라서 본 연구에서는 발암성 물질로 이미 잘 알려진 TCDD와 구조의 차이로 인해 발암성의 기전에 많은 관심이 집중되는 PCB 이성질체를 대상으로 간암의 발생기전과 관련된 연구를 실시하였다.

Phenobarbital, PCB와 TCDD는 약물대사 효소인 cytochrome P450을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Cornor, 1995). 또한 이들 물질의 공통적인 특징은 설치류의 간에서 강력한 발암 촉진효과를 나타내는 것이다. 이들 물질

의 발암촉진 기전은 initiator에 의해 손상을 입은 유전체를 함유하고 있는 세포의 분화를 돕고 이러한 과정에서 만들어진 동종 세포군의 clonal expansion을 발암기전으로 하는 모델은 여러 가지가 존재한다. 그러나 최근 가장 많은 관심을 받고 있는 기전 중에 하나는 세포의 사멸 프로그램(apoptosis)을 억제하여 손상된 세포의 증식을 초래해 암에 이르게 하는 기전이다(Bohnenberger, 2002). Apoptosis 억제에 관여하는 발암기전의 연구를 위하여 본 연구에서는 자외선(UV)을 사용하여 apoptosis를 유발시킨 후 apoptosis의 진행에 조사 대상 물질이 어떻게 반응하는 지를 측정하였다. 일차 배양한 간세포에 UV를 주사 후 apoptosis의 억제 역할로 잘 알려진 phenobarbital을 투여하여 적절한 UV 주사량을 설정하였다.

60 J/m²에서apoptosis의 최적 주사 조건을 확인한 후 PCB의 구조별 apoptosis 억제효과를 관찰한 결과 PCB77, PCB126과 같은 coplanar 구조 보다는 PCB114, PCB153과 같은 non-coplanar 구조에 의한 apoptosis의 억제 현상이 다소 낮았다. 이러한 결과는 지금까지 알려진 다이옥신 유사구조의 coplanar PCB 보다는 상대적으로 발암 효과가 낮을 것으로 추정되는 non-coplanar PCB가 apoptosis에 대한 억제 효과도 더 낮음을 나타낸다. 그러나 non-coplanar PCB에 의한 발암기전은 비록 발암성은 낮다고 할지라도 apoptosis의 억제기전을 통하여 나타날 수 있음을 암시하고 있다. Non-coplanar PCB의 경우 coplanar PCB와 달리 AhR을 경유하고 있지 않다는 사실은 non-coplanar PCB의 발암성을 평가하는데 AhR의 관련성이 재평가되어야 함을 암시한다. 따라서 지금까지 발암성을 포함한 독성평가에서 AhR의 관련성 위주로 활용되고 있는 TEF개념을 재검립할 필요성을 제시하고 있다.

본 연구 결과는 Schrenk 등이 발표한 non-coplanar PCB에 의한 apoptosis 억제 효과와 상이한 결과를 나타내었다. Schrenk 등은 non-coplanar PCB에 의한 apoptosis 억제효과가 coplanar PCB 보다 높은 것으로 보고한 바 있다(Bohnenberger, 2002). 본 연구에서 사용한 PCB와는 다른 종류의 이성질체가 사용되었으므로 앞으로 PCB의 apoptosis 억제 효과는 coplanar vs non-coplanar 구조 이상의 어떤 화학 구조 특성이 영향을 미칠 것으로 사료된다.

다이옥신 및 PCB와 같은 polyaromatic hydrocarbon의 주요 발암기전으로 활성기 산소(Reactive Oxygen Species)가 주목을 받고 있다(Fonnum, 2000). ROS는 세포내의 DNA염기를 파괴하거나 이합체를 구성하는 데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 과산화 과정 등 세포내 활성 및 독성 기전과 밀접한 관계를 가지고있다. 다이옥신이나 PCB에 의한 AhR 을 매개로 하는 작용기전의 중요

한 통로로 ROS를 들 수 있다. 그러나 지금까지 PCB의 구조적 특성에 대한 ROS의 발생을 간세포에서 관찰한 보고는 매우 제한적이다. 본 연구결과 PCB77와 PCB126은 ROS 발생에 큰 변화가 없어 염소기의 숫자와는 관련성이 높지 않은 것으로 추정된다.

Non-coplanar 구조인 PCB114는 coplanar 구조에 비해 ROS의 발생이 더욱 민감하여 50 μM 에서 150%의 증가를 보였다. 또한 PCB153은 50 μM 과 100 μM 에서 가장 높은 증가폭을 보였다. 이러한 결과는 간세포에서 ROS의 발생은 non-coplanar 구조를 가질수록, 염소의 치환수가 높을수록 증가함을 암시한다. 따라서 ROS 발생에는 구조-반응관계가 성립함을 알 수 있다. 특이한 점은 AhR과 친화력이 매우 낮아 AhR과 결합하지 않거나 결합하여도 AhR의 역할이 매우 미미할 것으로 추정되는 non-coplanar PCB 구조에서 ROS를 많이 방출한다는 의미는 ROS가 AhR을 매개로 하지 않는 polyaromatic hydrocarbon의 주요 발암기전이 될 수 있음을 의미한다.

발암화기전의 주요 현상으로 세포의 신호전달기작의 변화를 들 수 있다. 제2전령물질의 변화에 따른 세포의 증식과 사멸의 변화는 정상세포를 발암세포로 진행시키는 데 중요한 역할을 하고 있다(Yang, 1998). 이러한 제2전령물질 중 세포내 칼슘 농도의 변화는 세포의 여러 대사 과정 및 활성 통로에 많은 영향을 미친다. 본 연구에서는 PCB와 TCDD에 의한 간 세포내 칼슘 농도 변화를 측정함으로써 polyaromatic hydrocarbon에 의한 신호전달기작에 미치는 영향을 분석하였다. Coplanar 구조인 PCB126에 비해 non-coplanar 구조인 PCB153에 의한 세포내 칼슘 농도의 증가가 높았다. 이러한 결과는 간세포의 증식과 사멸에 관여하는 통로뿐만 아니라 세포 내 각종 효소의 활성화 등에 미치는 영향이 non-coplanar PCB에서 더욱 강력함을 입증하는 것이다. Coplanar PCB에 의한 간암 발생 기전은 지금까지 잘 알려져 있으며 제2전령물질의 변화도 중요한 기전으로 자리잡고 있다. 그러나 본 연구결과 특정 non-coplanar PCB 이성질체의 경우 오히려 칼슘 농도의 교란을 더욱 많이 일으킬 수 있음이 증명되었다. 따라서 제2전령물질에 대한 PCB의 구조-활성관계를 명확히 하기 위해 앞으로 더 많은 연구가 요구된다. 다이옥신의 경우 PCB보다 칼슘 농도를 변화시키는데 약 1000배의 높은 potency를 보였다. 이러한 다이옥신에 의한 강력한 칼슘 농도 교란 효과는 non-coplanar의 효능보다 훨씬 높은 것이어서 PCB의 구조-활성 관계를 판단하는데 다이옥신 구조와의 유사성 여부가 구조-활성 관계의 모든 척도가 아님을 암시하고 있다.

Protein Kinase C(PKC)는 11개 이상의 이성질체를 가

진 인산화 효소이며 발암기전과도 매우 밀접한 관계를 가지고 있다. PKC는 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화 시키는 역할을 하며 세포 성장 및 분화와 같은 세포의 필수적인 기능을 조절하고 세포간 신호전달체계에 중요한 역할을 한다. PKC는 활성특성에 따라 크게 3가지로 분류하는 데 classic PKC, new PKC 및 atypical PKC이다. Classic PKC는 α , β , β II, γ isoform으로서 Ca^{2+} 과 diacylglycerol(DAG)에 의존적이며 new PKC는 δ , ϵ , η , θ isoform이 이에 속하며 Ca^{2+} 에는 의존적이지 아니며 DAG에 의존적이다. Atypical PKC는 λ , μ , ζ isoform이며 Ca^{2+} , DAG 모두에 의존적이지 않다(Nishizaka, 1995). PKC isoform들은 이러한 특성 이외에도 세포 내에 존재하는 분포도 서로 다르다. PKC는 세포의 성장조절 이외에도 hormone이나 신경전달물질의 분비, 유전자 발현, 세포의 대사 등에 관여하며 신경조직 내에 풍부하게 존재한다(Saito, 1993). 따라서 뇌와 같은 신경조직 내의 PKC의 역할은 매우 중요할 것으로 추정되어 왔다. 특히 뇌종양인 astrocytoma의 경우 PKC의 활성도가 1000배 이상 증가한다고 보고된 바 있다. 또한 이러한 PKC의 높은 활성도는 암세포의 성장과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다(Sharif, 1999). 본 연구에서는 PKC- α 와 ϵ 에 대한 PKC 활성을 측정하였다. cPKC는 세포내 칼슘에 매우 민감하게 반응하므로 세포내 칼슘변화에 가장 높은 효력을 나타낸 PCB153을 농도별로 노출하여 cytosol에서 membrane으로 translocation되는 정도를 Western blot으로 측정한 결과 PKC- α 의 경우 50 μM 및 100 μM 에서 뚜렷한 translocation이 관찰되었다. 그러나 PKC- ϵ 의 경우는 cytosol에서 membrane으로의 이동이 나타나지 않아 PKC- ϵ 이 칼슘 농도와 관계없이 활성을 일으키는 nPKC class임을 입증하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 간세포에서의 Poly Aromatic Hydrocarbon(PAH) 영향은 구조적 특성과 밀접한 관계를 가지고 있으며 간암을 일으키는 기작도 매우 다양할 수 있음을 반증하고 있다. 특히 본 연구 결과는 AhR과 친화력이 낮아 TEF의 설정 개념에서 제외된 non-coplanar PCB 구조가 세포내 칼슘 농도 변화, ROS의 발생, PKC 활성 등에서 강력한 효력을 나타내었으므로 앞으로 PAH류 화합물의 발암기전 연구 및 발암성 평가에서 AhR을 매개로 하지 않는 다양한 통로에 바탕을 둔 위해성 평가 모델의 개발 필요성을 제시하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 산업자원부 지정 대구가톨릭대학교 해양바이오산업연구센터의 지원에 의한 것입니다.

참고문헌

- Abraham, K., Papke, O. and Wahn, H. (1999): Changes of Biological parameter in breast-fed infants due to PCDD/PCDF/PCB background exposure. *Organohalogen Comp.*, **44**, 59-61.
- Bohnenberger, S., Wagner, B., Schmitz, H.J. and Schrenk, D. (2002): Inhibition of apoptosis in rat hepatocytes treated with 'non-dioxin-like' polychlorinated biphenyls. *Carcinogenesis*, **22**, 1601-1606.
- Comor, K., Safe, S., Jefcoate, CR. and Larsen, M. (1995): Structure-dependent induction of CYP2B by PCB congeners in female SD rats. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1913-1920.
- Dragan, Y.P. and Schrenk, D. (2000): Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Addit. Contam.*, **17**, 289-302.
- Fonnum, Zero. (2000): Effects of polychlorinated biphenyls on production of ROS in rat synaptosomes. *Arch. Toxicol.*, **73**, 588-593.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Calcium indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440-3450.
- IARC, PCDD. and PCDF. (1997): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol., 69.
- Nishizuka, Y. (1995): Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. *FASEB. J.*, **9**, 484-496.
- Safe, S. (1994): PCBs; Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.*, **24**, 87-149.
- Saito, N., Itouji, A., Totani, Y., Osawa, I., Koide, H., Fujisawa, N., Ogita, K. and Tanaka, C. (1993): Cellular and intercellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain: presynaptic localization of epsilon-subspecies. *Brain. Res.*, **607**, 214-248.
- Seglen, P.O. (1976): Preparation of isolated liver cells. *Methods Cell Biol.*, **13**, 29-83.
- Sharif, T.R. and Sharif, M. (1999): Overexpression of protein kinase epsilon in astroglial brain tumor derived cell lines and primary tumor samples. *Int. J. Oncol.*, **15**, 237-243.
- Till, M., Riebinger, D., Schmitz, H.J., Schrenk, D. (1999): Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem. Biol. Interact.*, **117**, 135-150.
- Van der Berg, M., Peterson, R.E., Schrenk, D. (2000): Human risk assessment and TEFs, *Food. Addit. Contam.*, **17**, 347-58.
- Woener, W., Schrenk, D. (1996): Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, UV or transforming growth factor-b1. *Cancer. Res.*, **56**, 1272-1278.
- Yang, J.H. and Rhim, J.S. (1995): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; molecular mechanism of carcinogenesis and implication of human *in vitro* model. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **18**, 111-127.
- Yang, J.H., Kodavanti P.R.S. (2001): Possible molecular targets of halogenated aromatic hydrocarbons in neuronal cells; structure-activity relationship. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 1372-1377.
- Yang, J.H., Vogel, C. and Abel, J. (1999b): A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin exhibits altered expression of growth regulatory factors. *Carcinogenesis*, **21**, 13-18.
- Yang, J.H. (1998): Alteration of signal transduction pathway involved on 2,3,7,8-tetrachloro di benzo-p-dioxin-induced malignant transformation of human cells in culture. *Chemosphere*, **36**, 3015-3031.