

Chinese Hamster Ovary 세포에서 Double Promoter를 이용한 시토크롬 p450 1A2 및 시토크롬 환원효소 동시발현

한양대학교 의과대학 미생물학교실 및 의과학연구소, ¹마취과학교실

박 장 환 · 김 동 원¹

Metabolic Activation of Human Cytochrome P450 1A2 and Cytochrome P450 Reductase in Chinese Hamster Ovary Cell Using the Double Promoter System

Chang-Hwan Park and Dong-Won Kim¹

*Departments of Microbiology and ¹Anesthesiology, College of Medicine and Institute of
Biomedical Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea*

For the *in vitro* metabolic activation using cytochrome p450 (CYP) and NADPH-cytochrome p450 reductase (CYPR), dicistronic construct (CYP1A2DC-DCMV) was made by double cytomegalovirus promoters. As for mammalian cell expression plasmid transfer was achieved in Chinese hamster ovary (CHO) cells by lipofectamine. Using neomycin and limiting dilution method, the CHO cells for protein expression were established (CHO.1A2DC-DCMV). Western blotting was carried out with the microsomes obtained after the process with sonication and ultracentrifugation. The molecular weight of recombinant human CYP1A2 was determined to be 57 kDa and that of CYPR, 76 kDa, respectively. Results of MTS assay to measure the cytotoxicity of 2-aminoanthracene (2-AA) on CHO.1A2DC-DCMV treated with 250 μ M of 2-AA showed significant increase of cytotoxicity compared to the negative control ($p < 0.05$); *In vitro* micronucleus test in CHO.1A2DC-DCMV cells treated with 10 μ M of 2-AA showed significant increase of micronucleus formation against dimethyl sulfoxide (DMSO) treated group ($p < 0.05$). And single cell gel electrophoresis in CHO.1A2DC-DCMV cells treated with 5 μ M of 2-AA showed significant increase of Olive tail moment against DMSO treated group ($p < 0.01$). With these results single cell gel electrophoresis is most sensitive method for detect the toxicity of 2-AA using CHO.1A2DC-DCMV cell line.

Key Words: CYP 1A2, Metabolic activation, Double promoter, CHO cell

서 론

Cytochrome P450 (CYP)는 약물 대사과정에 관여하는 중요한 효소로서 약물의 대사, 분포, 배설 및 독성을 연구하는 데 필수적인 효소이다. CYP는 종에 따라서 isozyme의 분포가 각각 다르며, 같은 isozyme이라도 종에 따라 기질 특이성이 조금씩 다르므로 신약개발시 필수적인 약물대사 및 활성화 경로에 관한 연구는 사람 CYP를 이용하여 이루어지고 있다.^{1,2)} 그런데 대부분의 독성시험법에서는 *in vitro* 대사활성계로서 맹독성 환경공해 물질인 aroclor 1254로 효소 유도된 수컷 랫드의 간균질 물질, 즉 S9을 사용한다.^{3,4)} 그러나 랫드를 사용한 대사활성계의 실험 결과를 사람의 약물 동태 및 독성평가에 그대로 반영하는 데는 문제가 많을 뿐만 아니라 사람 S9을 만드는 것도 용이하지 않으므로, 사람 CYP의 cDNA를 이용한 *in vitro* 단백질 발현 시스템을 이용하는 방법이 시도되고 있다.⁵⁻⁷⁾

사람 CYP1A2는 간에서만 발견되는 효소로서 체내에서의 카페인 산화, carcinogenic aryl amine과 heterocyclic amine의 hydroxylation 반응에 관여하고 있다.⁸⁾ 그런데 CYP는 NADPH-cytochrome P450 reductase (CYPR)와 유기적인 협동체계에 하에서만 효소활성을 나타낼 수 있다. 그러므로 CYP는 *in vitro*에서 단독으로 발현되었을 때에는 효소활성도가 극히 낮아 전자를 공급할 수 있는 CYPR을 외부에서 공급해 주어야만 한다. 본 연구에서는 두개의 cytomegalovirus promoter를 이용하여 CYP 및 CYPR을 하나의 플라스미드에 클로닝한 후 Chinese hamster ovary (CHO) 세포에 발현시켜 CYP1A2에 의한 대사활성화를 유도하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 플라스미드 제조

(1) 사용 벡터: CYP유전자와 CYPR유전자는 미국 Vanderbilt 대학에 있는 F. Peter Guengerich 박사로부터 제공 받은 1A1BC-pCW 및 1A2BC-pCW 플라스미드에서 취했으며, 포유동물발현 벡터인

pZeoSV (V850-01, Invitrogen, USA) 및 pcDNA3.1 (+)(V790-20, Invitrogen, USA)를 사용하였다.

(2) 플라스미드 생산 및 정제: 1A1BC-pCW, 1A2BC-pCW, pcDNA3.1(+), 및 pZeoSV 플라스미드를 rubidium chloride (US21280, USB, USA)를 이용한 heat shock법으로 *Escherichia coli* DH5 α 에 형질전환시킨 후 1A1BC-pCW, 1A2BC-pCW, pcDNA3.1(+)^는 50 μ g/ml ampicillin (IB02040, IBI Kodak, USA) 함유 LB broth (USB)에서, pZeoSV는 800 μ g/ml zeocin (R-250-01, Invitrogen, USA) 함유 LB broth에서 15시간 흔들기 배양하였다. 배양이 끝난 대장균을 원심침전 시키고 plasmid spin kit (27106, Qiagen, Germany)으로 플라스미드를 분리 정제하여 Genequant (Pharmacia Biotech, England)로 순도를 확인한 후 사용하였다.

(3) CYP1A2DC-DCMV의 제조(Fig. 1)

① CYP1A1-CMV (6,935 bp)의 제조: 1A1BC-pCW 및 pcDNA3.1(+)^를 제한효소 BamHI으로 30°C에서 2시간, XbaI으로 37°C에서 2시간 절단한 후, 각각 1,565 bp 및 5,370 bp 절편을 gel extraction kit (28704, Qiagen, Germany)을 사용하여 정제하고 DNA ligation kit (6022, Takara-Korea)로 30분간 ligation하여 *E. coli* DH5 α 에서 클로닝하였다.

② CYPR-ZeoSV (5,537 bp)의 제조: 1A2BC-pCW 및 pZeoSV를 제한효소 HindIII로 37°C에서 2시간 절단한 후, 절단된 pZeoSV를 calf intestine alkaline phosphatase (CIAP, 2250A, Takara, Japan)로 50°C에서 30분간 처리하고, 각각 2,086 bp 및 3,451 bp 절편을 ligation하여 클로닝하였다.

③ CYP1A1DC-ZeoSV-CMV (10,898 bp)의 제조: CYP1A1-CMV 및 CYPR-ZeoSV를 제한효소 BglII로 37°C에서 2시간 절단한 후, 절단된 CYP1A1-CMV를 CIAP로 50°C에서 30분간 처리하고, 각각 6,935 bp 및 3,963 bp 절편을 ligation하여 클로닝하였다.

④ CYP1A2-CMV (6,921 bp)의 제조: 1A2BC-pCW 및 pcDNA3.1(+)^를 제한효소 BamHI으로 30°C에서 2시간, XbaI으로 37°C에서 2시간 절단한 후, 각각 1,551 bp 및 5,370 bp 절편을 ligation하여 클로닝 하였다.

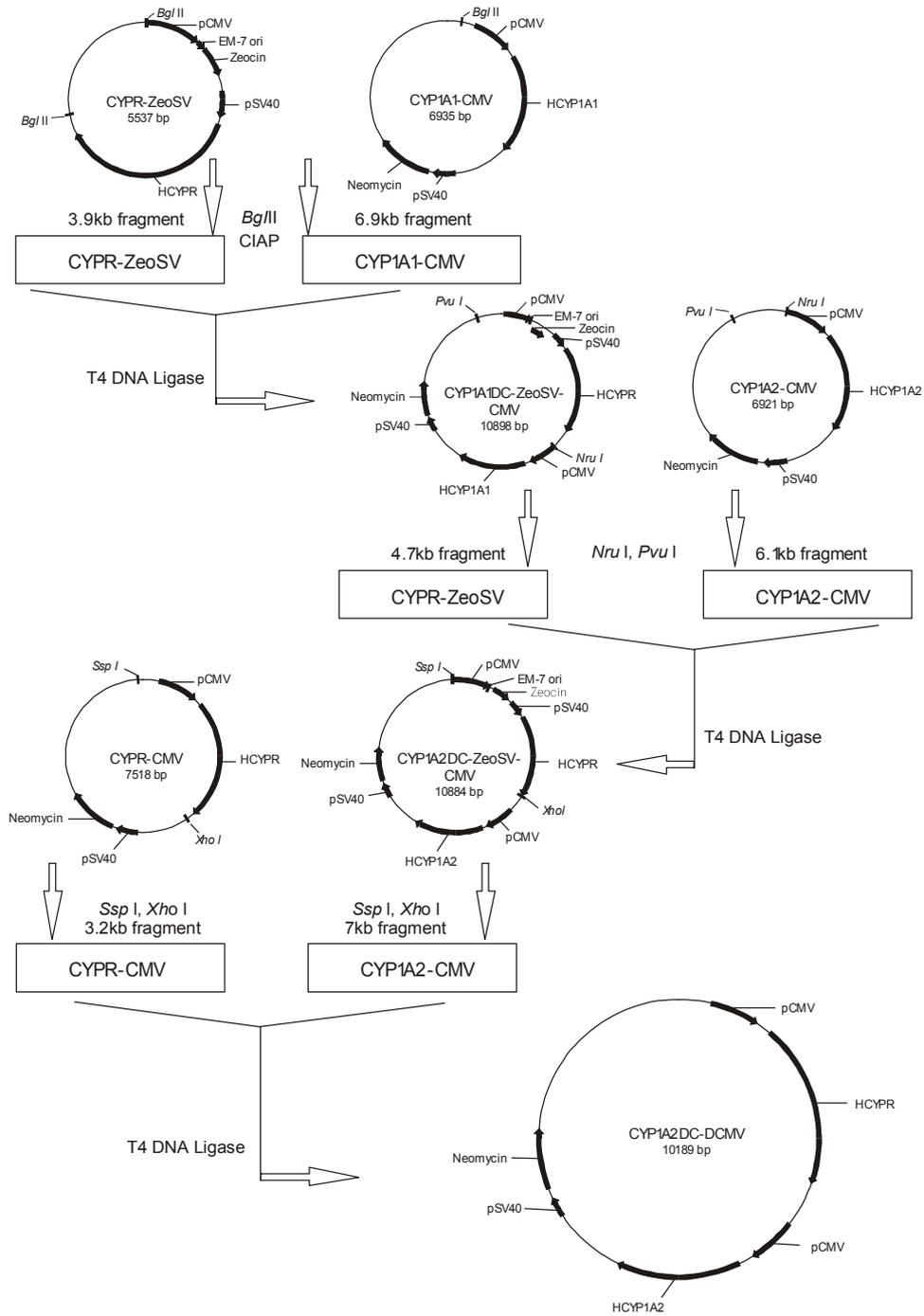


Fig. 1. Construction of CYP1A2DC-DCMV, carrying CYP1A2 and CYPR that regulated with two CMV promoters each other. Constructed by ligation of the *SspI* and *XhoI* fragment of CYPR-CMV into *SspI* and *XhoI* treated CYP1A2DC-ZeoSV-CMV.

⑤ CYP1A2DC-ZeoSV-CMV (10,884 bp)의 제조; CYP1A2-CMV 및 CYP1A1DC-ZeoSV-CMV를 제한효소 *NruI*과 *PvuI*으로 37°C에서 2시간 절단한 후, 각각 6,160 bp 및 4,724 bp 절편을 ligation하여 클로닝하였다

⑥ CYPR-CMV (7,518 bp)의 제조; 1A2BC-pCW 및 pcDNA3.1(+)를 제한효소 *HindIII*로 37°C에서 2시간 절단한 후, 절단된 pcDNA3.1(+)를 CIAP로 50°C에서 30분간 처리하고, 각각 2,086 bp 및 5,432 bp 절편을 ligation하여 클로닝하였다.

⑦ CYP1A2DC-DCMV (10,189 bp)의 제조; CYP1A2DC-ZeoSV-CMV 및 CYPR-CMV를 제한효소 *SspI*과 *XhoI*으로 37°C에서 2시간 절단한 후, 각각 6,999 bp 및 3,190 bp 절편을 ligation하여 클로닝하였다.

2) Stable cell line 제조

(1) 배양 세포주: 실험에 사용한 세포주는 Chinese hamster ovary (CHO)세포 (KCBB 10061)로 한국세포주은행으로부터 분양 받아 사용하였다. CHO세포는 10% 우태아혈청 (SH30088.04, Hyclone, USA), 100 unit/ml penicillin 및 100µg/ml streptomycin (B-3001, Hyclone, USA) 함유 DMEM (23700-040, GibcoBRL, USA) 배지에서 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온기에서 배양하였다.

(2) 유전자전이 세포주: 상기의 방법에 의해 제작된 플라스미드를 정제한 후 Lipofectamin™ (10964-013, GibcoBRL, USA)을 이용하여 lipid trasfection하였다. Transfection 전일 CHO 세포를 6 well plate에 1×10⁵/ml로 접종한 후 DNA 1µg과 Lipofectamine 6µl를 30분 동안 반응시킨 다음 4시간 동안 유전자전이 시켰다. 유전자전이 48시간 후 G418 (geneticin HCl, 345810, Calbiochem, USA) 1 mg/ml 함유 배지로 교체하여 2일간 배양한 다음 하기의 Western blot법으로 해당 단백질의 발현 여부를 확인하였다. 단백질 발현이 확인되면 직경 150 mm dish (Nunc, Denmark)에 500개 정도의 세포가 들어가도록 선택배지로 접종하고 약 2주 후 콜로니가 형성되면 콜로니를 수거하여 24 well plate (Falcon, USA)에서 배양하였다. 세포가 자라나면 Western blot을 반복하고 양성 세포를 limiting dilution법으로 클로닝하였다.

3) Microsome 제조

Spector DL 등의 방법⁹⁾ 기준으로 microsome을 제조하였다. 즉, 확립된 세포주를 직경 150 mm dish에 단층 배양시킨 후 세포수거 10분 전에 cycloheximide를 최종농도 10µM로 넣어 주고, cold phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 3회 세척한 후 rubber policeman으로 세포를 긁어내어 1,500 rpm으로 5분간 원심침전하였다. 초음파파쇄기로 세포를 파괴하기 위하여 10 mM HEPES, pKa 7.55 (15630-015, GibcoBRL, USA), 10 mM KCl (P 5405, Sigma, Germany), 1 mM MgCl₂ (M1028, Sigma, Germany), 1 mM DTT (D5545, Sigma, Germany), 1 mM PMSF (P7626, Sigma, Germany), 4 U/ml Rnase-IN (N2511, Promega, USA) 함유 완충액으로 세포를 풀었다. 수거된 세포를 5초씩 3회 초음파파쇄한 후 즉시 glycerol을 1/20 (v/v) 넣고 700 g로 3분간, 그리고 6,500 g로 10분간 원심침전하였다. 상청액을 파스투르 파이펫으로 초원심분리용 tube로 옮긴 후 100,000 g로 1시간 원심침전(Beckman TL-100, USA)하였다. 침전물을 10 mM HEPES, 20% glycerol 용액으로 풀어 다음 실험 때까지 -70°C에 보관하였다.

4) Western blot

전기영동은 Novex 전기영동기구(Novex, USA)를 사용하였으며 NuPAGE 4~12% Bis-Tris젤 (NP0323, Novex, USA)을 사용하여 2-mercaptoethanol (1170208, IBI-Kodak, USA)로 시료를 환원시킨 후 50 mM MOPS-3.5 mM SDS 조건으로 200볼트에서 실시하였다. 나이트로셀룰로스막 전이 후 5% 탈지분유 및 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20 함유 10 mM Tris (pH 7.6, 이하 분유완충액)으로 비특이반응을 억제시킨 후 분유완충액에 anti-CYP1A2 항체는 1 : 3,000으로, anti-CYPR항체는 1 : 20,000으로 넣고 하룻밤 반응시킨 다음 과산화효소 기질 키트 (diaminobenzidine, SK-4100, Vector, USA)를 이용하여 발색반응을 실시하였다. 이 연구에 사용한 anti-CYP1A2 rabbit polyclonal antiserum 및 anti-CYPR rabbit polyclonal IgG는 미국 Vanderbilt 대학에 있는 F. Peter Guengerich 박사로부터 제공 받아 사용하였다.

5) 세포독성시험

유전자전이 세포주에 미치는 2-aminoanthracene (2-AA, Sigma)의 세포독성을 측정하기 위하여 MTS 시험을 시행하였다.¹⁰⁾ 96 well plate에 CHO.pcDNA3.1(+)와 CHO.1A2DC-DCMV세포를 well 당 1,000개씩 접종하여 24시간 배양하였다. 2-AA 최고농도를 500 μ M로 하여 두배씩 계단희석한 후 투여하여 3일간 배양한 다음 배양 종료 4시간 전에 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, G1112, Promega, USA)와 PMS (phenazine methosulfate, P9625, Sigma, Germany) 혼합액을 각각 최종 농도 333 μ g/ml 및 25 μ M되게 투여한 후 4시간 배양하여 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기의 시험은 한 농도당 세 개의 well을 할당하여 시행하였다.

6) 소핵시험

유전자전이 세포주에 미치는 2-AA의 소핵유발성을 측정하기 위하여 *in vitro* micronucleus test를 Hayashi의 방법을 변형하여 실시하였다.¹¹⁾ 즉, CHO.pcDNA3.1(+) 및 CHO.1A2DC-DCMV 세포를 24 well plate에 5 \times 10⁴/well로 접종하여 하룻밤 배양하였다. 2-AA를 처리한 후 24시간 배양하여 1.5 ml tube에 세포를 수거한 다음, 100 mM KCl용액 1ml로 세포를 풀고 즉시 고정액(methanol : acetic acid=3 : 1) 200 μ l를 넣어 섞어준 후 5,000 rpm으로 2분간 원심침전 하였다. 세포를 조심스럽게 풀어준 다음 고정액으로 2회 고정하여 증류수에 담가 둔 슬라이드에 도말하고 5% Giemsa 용액으로 30분간 염색하여 광학현미경으로 400배에서 관찰하였다. 양성대조군으로 mitomycin C를 0.1 μ g/ml로 투여하였으며 음성대조군으로 DMSO를 최종 농도 0.5%되게 처리하였다.

7) 단세포 겔 전기영동법(SCGE, Comet assay)

유전자전이 세포주에 미치는 2-AA의 DNA 손상도를 측정하기 위하여 Singh의 방법을 변형하여 Comet assay를 시행하였다.¹²⁾ CHO.pcDNA3.1(+) 및 CHO.1A2DC-DCMV 세포를 24 well plate에 3 \times 10⁴/well로 접종하여 하룻밤 배양하였다. 2-AA

를 처리한 후 2시간 배양하여 1.5 ml tube에 세포를 수거한 다음, 0.5% low melting agarose (A-0701, Sigma, Germany) 75 μ l로 잘 혼합하였다. 미리 1% agarose (A-0169, Sigma, Germany)를 깔아 놓은 슬라이드(fully frosted, 125485M, Fisher, USA) 위에 세포와 혼합된 low melting agarose를 깔고 덮개유리를 덮어 응고시켰다. 덮개유리를 벗긴 후 그 위에 0.5% low melting agarose 75 μ l를 깔고 덮개유리를 덮어 건조시켰다. 세포를 용해하기 위하여 2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Sodium lauroyl sarcosinate (L-9150, Sigma, Germany), 1% Triton X-100 함유 용액(pH 10)에 슬라이드를 넣어 4°C에서 1시간 동안 처리하였다. 슬라이드를 세척한 후 1 mM EDTA, 0.3 M NaOH (pH 13.5)용액으로 15분간 unwinding하고, 동일한 용액으로 전기영동 chamber에 넣어 300 mA, 25 volt 조건으로 20분간 전기영동 하였다. 전기영동 후 0.4 M Tris (pH 7.5)로 10분간씩 3회 중화하였다. 세포용해 단계부터 중화단계까지는 자외선에 의한 DNA 손상을 방지하기 위하여 빛을 차단하며 실시하였다. 건조된 슬라이드를 20 μ g/ml ethidium bromide 용액으로 염색하고 515~560 nm 파장의 형광현미경으로 DNA 손상을 관찰하였다. 양성대조군으로 H₂O₂ 5 \times 10⁻⁶ M을 사용하였으며 음성대조군으로 DMSO 0.5%를 사용하였다. DNA 손상은 comet 형성 여부를 Komet 4.0TM (Hamington, USA) 프로그램을 이용하여 50개의 세포를 계수하여 측정하였다. 통계처리는 Student's T-test로 판정하였다.

결 과

1) CYP1A2 및 CYPR 단백질 발현

Western blot으로 측정된 CHO 세포에서 발현된 CYP1A2 및 CYPR 단백질의 분자량은 환원상태에서 각각 57 kD, 76 kD이었으며, CHO.pcDNA3.1(+) 및 CHO.1A2DC-DCMV microsome의 Western blot 사진은 Fig. 2와 같다.

2) 세포독성시험

2-aminoanthracene (2-AA)이 유전자전이 세포주에 미치는 세포독성을 측정된 결과 CHO.1A2DC-DCMV

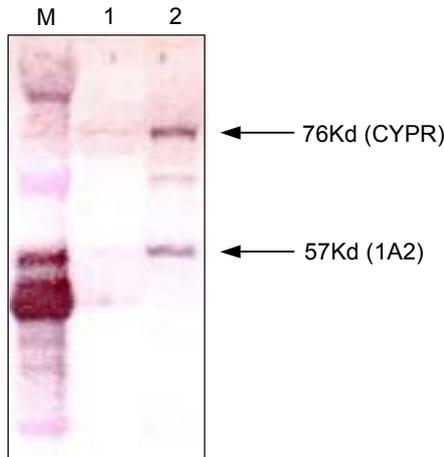


Fig. 2. Western blot analysis of human cytochrome P450 1A2 (1A2) and NADPH dependent cytochrome reductase (CYPR) from microsomes of Chinese hamster ovary cell in reducing condition. The molecular weights of 1A2 was 57 kDa and CYPR was 76 kDa, respectively. Lane 1, CHO.pcDNA3.1(+); lane 2, CHO.1A2DC-DCMV; lane M, molecular weight rainbow markers (Pharmacia, high range).

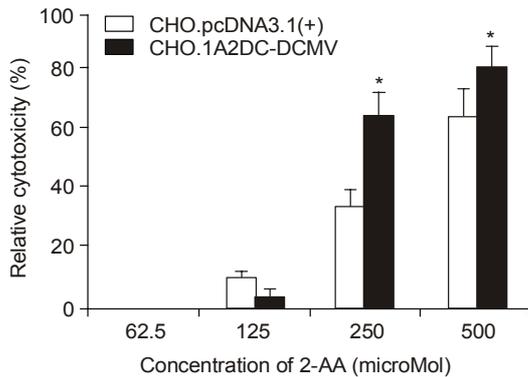


Fig. 3. Cytotoxicity test with MTS assay. Transfected Chinese hamster ovary cells were seeded in 96 well plate and treated with 2-aminoanthracene (2-AA) during 3 days. Relative cytotoxicity was calculated against dimethyl sulfoxide treated group. *, $p < 0.05$ with Student's T-test, $n=3$.

세포주가 백터대조군에 비하여 2-AA 250 μ M 이상에서 세포독성의 증가를 보였다($p < 0.05$, Fig. 3).

3) 소핵시험

유전자전이 세포주에 미치는 2-AA의 소핵유발성을 측정하기 위하여 2-AA 40 μ M을 최고농도로

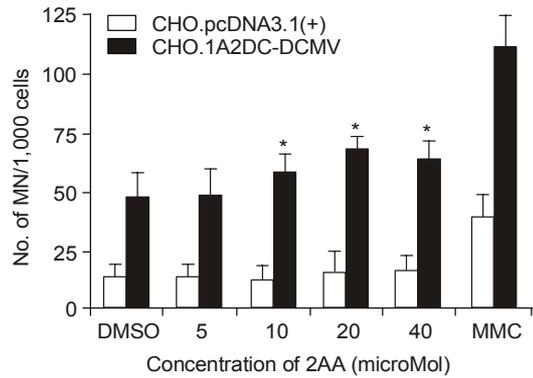


Fig. 4. Mean number of micronuclei of CHO.pcDNA3.1(+) and CHO.1A2DC-DCMV cells treated with 2-aminoanthracene during 24 hours. The concentration of mitomycin C (MMC) was 0.1 μ g/ml. *, $p < 0.05$ Student's T-test, $n=3$.

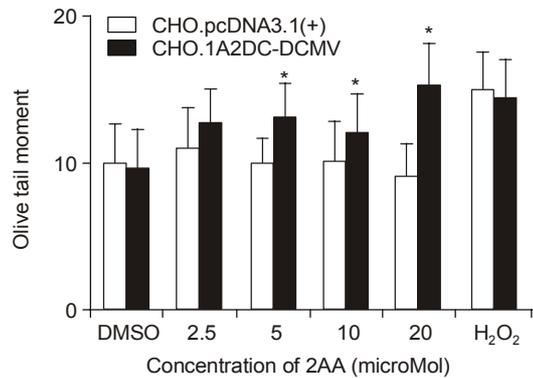


Fig. 5. Comparison of Olive tail moment in single cell gel electrophoresis between CHO.pcDNA3.1(+) and CHO.1A2DC-DCMV cells were treated with 2-aminoanthracene during 2 hours. The concentration of H₂O₂ was 5 $\times 10^{-6}$ M. *, $p < 0.01$ with Student's T-test, $n=50$.

하여 두배씩 계단희석하여 투여한 결과 10 μ M 농도 이상에서 소핵이 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 4).

4) 단세포 겔 전기영동법

2-AA가 유전자전이 세포주에 미치는 DNA 손상을 측정하기 위하여 2-AA 20 μ M부터 2배씩 계단희석하여 투여한 후 ethidium-bromide로 염색된 슬라이드를 Komet 4TM 프로그램으로 DNA 손상도를 측정할 결과, CHO.1A2DC-DCMV 세포주에서

2-AA 5 μ M 농도까지 DNA 손상에 의한 Olive tail moment가 용매대조군에 비하여 증가하였다($p < 0.01$, Fig. 5).

고 찰

일반적으로 독성물질의 대사가 간에서 일어나는 사실에 입각하여 *in vitro* 대사활성화를 위하여 랫드 간분획(이하 S9)을 이용한 방법이 사용되고 있다. 하지만 수많은 종류의 CYP isozyme이 밝혀지고 있으며 독성물질에 대하여 각각의 isozyme에 따라 해독작용 혹은 대사활성화 작용이 다르게 나타나고 있는 것으로 보고되고 있으므로,^{13,14)} 현재의 S9분획 만으로는 CYP isozyme에 따른 독성물질의 대사작용을 정확히 반영할 수가 없었으며, CYP isozyme의 작용기전에 대한 연구도 이루어질 수 없었다. 최근 분자생물학적 기법의 발달로 phase I 대사와 phase II 대사에 관여하는 유전자들이 클로닝되어 염기서열이 알려짐으로써 각각의 CYP isozyme에 따른 대사활성화법의 필요성이 대두되었다.^{15,16)} 또한 대사활성계에 랫드 간을 사용하게 되면 그 결과를 사람의 약물 동태 및 독성평가에 그대로 반영하는데 어려움이 따르게 된다. 그 이유는 첫째, 인체효소의 촉매 특이성이 실험동물의 촉매 특이성과는 상호 다르기 때문이며, 둘째, 설치류는 사람에서는 나타나지 않는 CYP 효소의 sexual dimorphism을 나타내기 때문이다.¹⁷⁾ 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에는 사람 S9을 이용한 *in vitro* 대사활성계가 도입되어 랫드 S9을 사용한 경우에 비해 높은 활성도 및 사람에게 직접 적용할 수 있는 결과를 발표하는 보고가 늘고 있는 실정이다.^{18,19)} 그러므로 사람 CYP 효소가 전이된 새로운 시험균주를 사용하는 유전독성 시험법이 확립된다면 실험동물조직으로부터 대사 활성화계를 제조할 필요가 없어 시간적, 경제적 손실을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 물질의 대사기전 연구에도 크게 기여할 것으로 사료된다. 즉, 이러한 시스템은 실험동물의 사용을 많이 줄일 수 있게 되고, 효소분리에 필요한 많은 시간과 경비를 절감할 수 있게 된다. 이러한 면에서 볼 때 cDNA로부터 CYP 효소들을 heterologous expression시키는 시스템은 여러 장점이 있기 때문

에 본 연구에서도 CYP450 cDNA를 이용하였다.

이 연구에서 유전자전이 세포주의 대사활성능을 측정하기 위하여 처리한 발암물질인 2-aminoanthracene (2-AA)은 염료를 합성하는데 쓰이는 산업용 물질로, 사람에게 원발성 간세포암과 피부암을 일으키는 물질이다.²⁰⁾ 2-AA는 대사활성화 후 돌연변이성과 발암성을 나타내며 사람 adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 유전자좌에 frameshift mutation을 일으키는 물질로 알려져 있다.²¹⁾

이 연구에서는 현재 알려진 강력한 포유동물세포 단백질 발현 promoter인 사람 cytomegalovirus immediate-early promoter/enhancer (pCMV)를 이용하여 CYPR 유전자와 CYP1A2 유전자가 각각의 promoter에 의해 지배받는 CYP1A2DC dicistronic construct를 제조하여 유전자 전이시킨 세포주 (CHO.1A2DC-DCMV)를 확립하였다.

유전자전이 세포주의 소핵발생을 측정된 결과, 벡터대조군에서는 평균 10개 내외의 소핵이 형성되었는데 반하여, CYP 단백을 발현하는 세포주는 용매대조군에서도 40개 이상의 소핵이 형성되었다. 이는 단백질 발현을 유도하는 플라스미드에 의해 세포에 인위적으로 과도한 단백질 발현을 야기하면 핵의 불안정성을 가져오기 때문일 것으로 사료된다. 그러나 2-AA를 투여한 경우 벡터대조군에서는 유의한 소핵발생의 증가를 관찰할 수 없었으나, CHO.1A2DC-DCMV 세포주에서는 2-AA 10 μ M 농도까지 유의성 있게 소핵이 증가하여 CHO.1A2DC-DCMV 세포주의 대사활성능을 측정할 수 있었다.

Single cell gel electrophoresis (SCGE)는 분자독성학을 비롯한 유전자 손상에 관련된 연구에 광범위하게 응용되는 연구기법으로서, 염색된 DNA의 전기영동상이 혜성의 모습을 닮아 통상 Comet assay라고 불린다.²²⁾ SCGE는 1984년 Ostling과 Johanson에 의해 세포수준에서의 DNA 손상을 직접 확인하기 위하여 도입된 microgel electrophoresis 방법을 근원으로 하여,²³⁾ Singh에 의해 보다 민감하게 DNA 손상을 감지해낼 수 있는 방법으로 발전되었다.¹²⁾ 본 SCGE는 세포의 분열주기에 영향을 받지 않으며, 처리 시간이 짧아 빠른 시간 내에 간편하게 세포수준에서 실험결과를 얻을 수 있고, 다양한 종류의 세포에 응용이 가능하며, 또한 적

은 수의 세포에서 DNA 손상을 감지할 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만 고가의 장비가 필요하며 데이터를 분석하기 위한 응용프로그램의 가격이 지나치게 비싼 단점이 있으며, 현재까지 축적된 자료가 많지 않은 실정이다.

그럼에도 불구하고 SCGE의 실험적용 범위는 매우 다양하여, 산화작용에 의한 독성, 자외선에 의한 독성, 그리고 방사성 물질에 의한 손상 등을 대량으로 screening하는데 적용할 수 있으며,^{24,25)} 최근 중요성이 부각되고 있는 환경오염에 대한 screening으로서 동물을 채취하여 SCGE를 시행하면 환경오염물질에 대한 유전독성 유무를 판단하는 좋은 방법이 될 수도 있다.²⁶⁾ 이 연구에서는 낮은 DNA 손상을 민감하게 측정할 수 있는 Singh version을 이용하였으며, 이 방법은 알칼리 상태로 실험을 진행함으로써 단일 가닥 DNA 손상을 반영하여, 두 가닥 DNA 손상을 감지할 수 있는 중성 pH 방법보다 더 민감한 결과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있다.

SCGE의 실험 결과에 대한 분석으로는 미국 Hamington사의 Komet 4TM을 이용하여 분석하였다. Komet 4TM에서 측정하는 DNA 손상도는 ethidium bromide로 염색된 핵의 head 부위와 DNA 손상으로 파괴되어 전기영동에 따라 이동된 tail부분의 길이 및 DNA 양에 따라 결정되며, 한 표본에서 50개의 DNA를 측정하여 tail moment로 나타내고 있다.²⁷⁾ 이때 tail의 길이는 처리 물질의 농도에 비례하여 길이가 길어지지 않고 일정길이 이상에서는 더 이상 진행되지 않으므로, tail에 존재하는 DNA 양을 측정하는 것이 필수적인데 이것을 Olive tail moment라고 일컫는다.²⁵⁾

이 연구에서 유전자전이 된 CHO.1A2DC-DCMV 세포주에 2-AA를 2시간 투여한 결과 Olive tail moment는 2-AA에 농도의존적으로 증가하여 2-AA 20 μ M에서는 양성대조군으로 사용한 H₂O₂ 처리군과 차이가 없었으며 2-AA 5 μ M까지 증가하였다. 하지만 벡터대조군은 2-AA 농도와 관계없이 Olive tail moment가 증가하지 않아 CHO.1A2DC-DCMV 세포주의 대사활성능을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 이 연구에서 수립된 CYP1A2 및 CYP1B1 동시발현 CHO.1A2DC-DCMV 세포주를 이용한 2AA 대한 독성 측정은 SCGE 방법이 가장

민감하였으며, 이 세포주는 앞으로 *in vitro* 대사 활성화를 위한 독성검사 모델 및 시토크롬 작용 기전 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 추정된다. 또한 여러 가지 단백을 동시에 발현시키고자 할 때 선택배지로 사용되는 항생제의 종류가 제한되어 있으므로, 하나의 플라스미드 내에서 여러 가지 단백을 발현시킬 수 있으면 multiple protein expression system을 만들기가 용이해 진다. 따라서 이러한 취약점을 극복하기 위한 방법으로 이 연구에서 제조된 플라스미드가 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1998~2000 보건 의료기술연구개발사업(HMP-98-D-5-0046)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- 1) Montellano, Paul R. Ortiz de: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. New York, Plenum Press, 1995.
- 2) Turesky RJ, Constable A, Richoz J, Varga N, Markovic J, Martin MV, Guengerich FP. Activation of heterocyclic aromatic amine by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 925-936.
- 3) Buetler TM, Gallagher EP, Wang C, Stahl DL, Hayes JD, Eaton DL. Induction of phase I and Phase II drug-metabolizing enzyme mRNA protein, and activity by BHA, ethoxyquin, oltipraz. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 135: 45-57.
- 4) Zeiger E, Chhabra RS, Margolin BH. Effects of the hepatic S9 fraction from aroclor-1254-treated rats on the mutagenicity of benzo[alpha]pyrene and 2-aminoanthracene in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat Res* 1979; 64(6): 379-389.
- 5) Josephy PD, Evans DH, Williamson V, Henry T, Guengerich FP. Plasmid-mediated expression of the UmuDC mutagenesis proteins in an *Escherichia coli* strain engineered for human cytochrome P450 1A2-catalyzed activation of aromatic amines. *Mutat Res* 1999; 429: 199-208.
- 6) Chun YJ. Expression of recombinant human cytochrome

- P450 1A2 in *Escherichia coli* bacterial mutagenicity tester strain. *Arch Pharm Res* 1998; 21: 305-309.
- 7) Josephy PD, Evans DH, Parikh A, Guengerich FP. Metabolic activation of aromatic amine mutagens by simultaneous expression of human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and *N*-acetyltransferase in *Escherichia coli*. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 70-74.
 - 8) Kawajiri K, Hayachi S-I. The CYP I family. In Costas Ioannides (eds.), *Cytochrome p450, metabolic and toxicologic aspects*, pp 77-98, CRC Press, 1996.
 - 9) Morimoto T, Sabatini DD. Subcellular fractionation of rough microsomes. In: Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA (eds.). *Cells: a laboratory manual*, pp 37.1-37.22, USA: CSHL Press, 1998.
 - 10) Park CH, Oh HY, Heo OS, Sohn SJ, Han EH, Kim JW, Eom MO, Kim SH, Kim JS, Ha KW. Genetic toxicity of ochratoxin A in Chinese hamster lung and VERO cells, ddY mice, and *Drosophila melanogaster*. *J Kor Soc Microbiol* 1998; 33: 441-450.
 - 11) Hayashi M, Yoshimura I, Sofuni T, Ishidate M Jr. A procedure for data analysis of the rodent micronucleus test involving a historical control. *Environ Mol Mutagen* 1989; 13: 347-356.
 - 12) Singh PN, Michael TM, Raymond RT, Edward LS. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175: 184-191.
 - 13) Kranendonk M, Carreira F, Theisen P, Laires A, Fisher CW, Rueff J, Estabrook RW, Vermeulen NP. *Escherichia coli* MTC, a human NADPH P450 reductase competent mutagenicity tester strain for the expression of human cytochrome P450 isoforms 1A1, 1A2, 2A6, 3A4, or 3A5: catalytic activities and mutagenicity studies. *Mutat Res* 1999; 441: 73-83.
 - 14) Yamazaki H, Mimura M, Oda Y, Inui Y, Shiraga T, Iwasaki K, Guengerich FP, Shimada T. Roles of different forms of cytochrome P450 in the activation of the promutagen 6-aminochrysene to genotoxic metabolites in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1993; 14(7): 1271-1278.
 - 15) Jaiswal AK, Gonzalez FJ, Nebert DW. Human dioxin-Inducible cytochrome P₁-450: Complementary DNA and amino acid sequence. *Science* 1985; 228: 80-83.
 - 16) Shiota N, Kodama S, Inui H, Ohkawa H. Expression of human cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 as fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in transgenic tobacco plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 2025-2033.
 - 17) Bandiern S, Ryan DE, Levin W, Thomas PE. Age- and sex-related expression of cytochromes P-450f and P-450g in rat liver. *Arch Biochem Biophys* 1986; 248: 658-676.
 - 18) Goeger DE, Hsie AW, Anderson KE. Co-mutagenicity of coumarin (1,2-benzopyrone) with aflatoxin B1 and human liver S9 in mammalian cells. *Food Chem Toxicol* 1999; 37(6): 581-589.
 - 19) Hakura A, Suzuki S, Satoh T. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. *Mutat Res* 1999; 438(1): 29-36.
 - 20) Mitchell CE, Henderson RF, McClellan RO. Distribution, retention, and fate of 2-aminoanthracene in rats after inhalation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 75(1): 52-59.
 - 21) Zhu Y, Bye S, Stambrook PJ, Tischfield JA. Aflatoxin B1, 2-aminoanthracene, and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced frameshift mutations in human APRT. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26(3): 234-239.
 - 22) Ryu JC, Kim HJ, Seo YR, Kim KR. Single cell gel electrophoresis (comet assay) to detect DNA damage and apoptosis in cell level. *Environ Mutagen Carcinogens* 1997; 17: 71-77.
 - 23) Ostling O, Johanson KJ. Microgel electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 345-356.
 - 24) Mckelvey-Martin VJ, Green MHL, Schemerzer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collons A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993; 288: 47-63.
 - 25) Olive PL, Garnet F, Judit PB. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphocyte cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993; 136: 130-136.
 - 26) Ralph SM, Peters M, Pandrang R, Vrzoc M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 112-120.
 - 27) Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 1995; 336: 123-131.