

다이옥신으로 유발된 생쥐의 조혈모세포 증식장애에서 Oligonucleotide-Microarray를 이용한 유전자표식자의 발굴*

이화여자대학교 의과대학 생화학교실
이은주 · 정인혜 · 김형래

= Abstract =

Marker-Genes for Dioxin-Induced Hematopoietic Stem Cell Dysfunction using the Oligonucleotide-Microarray in Mice*

Eun-Ju Lee · In Hye Jung · Hyung-Lae Kim

Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University

To develop the biomarkers for the immune dysfunction induced by dioxin, 2, 3, 7, 8-TCDD was administered C57BL/6N mice 0.1ug TCDD/kg body weight. Colony forming assay showed that the proliferation potential of hematopoietic progenitor cells in bone marrow was reduced 35-55% more by earlier exposure. The microarray experiments were duplicated, and the candidates were restricted for the genes expressed greater than 121-fold. Resulting candidates were 55 genes. The expression patterns of the whole genes were analyzed by self-organizing maps (SOM). From these results, we selected the stage-specific genes : one genes (SOM c21 : nadh dehydrogenase subunit 5 gene) for gestational 13.5day, 13 genes (c0 : sialoporphin ; spn gene, etc) for postnatal 3 week. The above genes are proposed to be a potential use of biomarker for dioxin exposure in the case of immune dysfunctions.

KEY WORDS : Dioxin · Hematopoietic stem cells · DNA microarray · Gene expression.

서 론

2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)는 가장 잘 알려진 환경성 내분비 장애물질로서 76종의 dioxin의 독성을 대표하는 물질이다. 다이옥신(dioxin)은 자연계에서 합성되지 않는, 인위적으로 생성된 합성화학물

*이 연구는 2003년도 식품의약품안전청 연구비 지원(KFDA 03132-endo-410-12)에 의한 연구임.

질 중 가장 독성이 강한 화학물질로, 여러 장기와 수준에서 장애를 가져오며 주 기전은 Ah수용체를 통해 이루어진다고 알려지고 있다¹⁻³⁾. 면역계도 손상을 받는 기관 중의 하나로 특히 흉선의 위축(atrophy)과 세포매개성 면역기능을 저하시킨다⁴⁾. 실험동물에서 TCDD에 의한 면역기능의 저하는 성체 때 폭로되었을 때보다 출생을 전후로 하여 폭로되었을 때 보다 심하고 오래 지속되며 이는 면역기능이 성숙되는 과정이 다이옥신 보다 더 취약하다⁵⁻⁷⁾.

면역기능의 획득을 위해서는 조혈모세포의 자가재생산과 림프구 모세포로 분화 증식 및 전구세포로 분화 및 증식 그리고 흉선에서 림프구세포로 분화 및 교육의 과정을 거쳐 성숙된 T림프구는 혈액으로 이동한다. TCDD에 의한 면역장애는 마지막 단계에서의 성숙한 T-림프구의 장애뿐 아니라 최근 보고로는 그 전 단계에서 자기 증식능력의 감소 없이 T 림프구의 생산이 저해될 수 있음이 최근 보고되었다⁸⁾. 이는 줄기세포 혹은 전구세포의 증식능력으로 인해 세포 독성(장애)이 상당기간(십이여는 일회 폭로로도 생존기간 동안) 지속할 수 있음을 뒷받침하는 증거로서 세포주위에 급성독성을 일으킬 수 있는 TCDD가 존재하지 않아도 면역기능이 작용하지 못함을 의미한다. 즉 역으로 얘기하면 면역기능이 손상되어 있는 현 시점의 경우, 그 원인인 TCDD가 대사되어 잔존하지 않더라도 면역장애가 가능하다.

치사농도는 동물 중간에 매우 커서, 낮은 농도(pgTCDD/g조직)로도 장애 유발이 가능한 TCDD의 검출에 대해서 최상의 방법으로 고성능 가스크로마토그래피-질량분석기(HR GC-MS) 방법이 있으나, 기술적으로도 어렵고 고가인 단점이 있다. 환경 및 인체시료 중에서의 오염에 대한 국내보고도 계속되고 있다⁹⁾¹⁰⁾. 생물학적인 면역장애가 있는 경우 미량의 TCDD를 검출하기 위해 고가 고기술력의 HR GC-MS 방법보다는 혈액줄기세포에서 림프구로 분화중간 단계의 전구세포의 유전자 발현 이상을 검출하여 지표로 사용하는 것이 이상적이라 할 수 있다¹¹⁾¹²⁾. 2001년 human genome project의 완료, 2003년 mouse genome project가 완료되었고, 이에 따라 고밀도 microarray의 상용화로 전체 유전자 수준에서 생물학적 기능적 변화를 반영할 수 있는 기반이 구축되었다. 유전자 발현을 통해 dioxin 노출의 과정과 생물학적 영향을 평가 예측이 가능하게 되었다. 면역계 같은 경우 대사물이 잔존하지 않더라도 그 영향이 줄기세포에 영향을 미쳐 지속되기 때문에, 환경호르몬 오염문제는 오염원의 직접분석 외에도 임상양상을 예측하는 biomarker의 개발이 실제적으로 매우 중요하다. 최근 생쥐계능지도가 발표되고 고밀도 유전자 칩이 상용화되어 다이옥신에 의해 발현이 변화된 유전자에 대한 몇몇 보고가 있다¹³⁾¹⁴⁾. 체계적으로 검정할 수 있게 되어 유전자 biomarker를 발굴할 수 있으며 이로써 다이옥신에 의한 급성독성 상태(질환)뿐 아니라 면역장애를 일으킨다고 추정되는 면역질환에 손쉽게 적용할 수 있는 유전자칩(biochip)을 개

발 가능성을 찾는데 있다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 처리

수컷 C57BL/6 생쥐 6마리를 한 군으로 하여 올리브 오일에 녹인 TCDD를 0.1 µg/kg 체중의 용량으로 복강 내 주사한다. 태령 6.5일, 13.5일 18.5일(암컷에 주사함), 생후 3주, 생후 6주에 각기 복강 내 주사하였고, 생후 10주째에 이산화탄소 질식으로 희생하였다.

2. 골수세포의 분리

심장천자로 채혈한 후 근육과 결합조직이 제거된 대퇴골과 경골을 분리하여 사용한다. 뼈를 메스를 이용하여 절단 후, 5% FBS를 함유한 MEM 배지로 주사기를 이용하여 골수강을 씻어내어 골수 세포들을 분리하였다. 분리된 뼈조각과 골수 세포들은 80 gauge 나일론 체를 이용하여 거른 후 원심 분리하여 사용하였다. 적혈구 용혈 완충액을 이용하여 적혈구를 제거한 후 실험에 사용하였다.

3. 조혈줄기세포의 집락형성률 측정(colony assay)

분리된 골수세포를 2% FBS가 첨가된 IMDM 배지에 1.0×10^4 cells/ml로 희석한 후 0.2ml를 Methocult (Stem-cell Technologies ; Vancouver, BC, Canada) 3ml에 섞은 후 35mm 배양접시에 1.1ml씩 도포한 후 incubator에서 12일간 배양 후 CFU-GEMM을 관찰 한 후 각각의 그룹간의 수를 비교하였다.

4. RNA의 분리 및 형광표지

발초혈액에서 Trizol(GibcoBRL ; NY USA)용액을 이용하여 RNA를 분리하여 microarray 분석에 사용하였다. 분리된 total RNA에서 cDNA synthesis kit(GibcoBRL ; NY USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 Megascript T7 kit(Ambion ; Austin, USA)와 Cy3-CTP 또는 Cy5-CTP(APB ; Uppsala, Sweden)을 사용하여 cRNA의 증폭 및 표지하였다. Cy3와 Cy5로 표지된 각각의 cRNA는 fragmentation후 동결 건조하였다.

5. Hybridization, scanning 및 유전자 발현 자료 처리

Hybridization 완충액(100mm MES, 1m NaCl, 20mm EDTA 및 0.01% Tween 20)에 부유하여 MAGIC Oligo-Mouse 11K oligonucleotide-microarray (Macro

gen Inc ; Seoul, Korea)에 hybridization 후 스캐너로 hybridization된 형광에 대한 영상은 스캐닝하여 이미지를 읽었다. 읽혀진 이미지는 Imagen v4.1 software를 사용하여 수치화하여 통계학적으로 분석하였다. 전체 결과는 생물학적 변이를 제외하기 위해 global normalization/scaling을 하였다. 각각의 칩은 전체 11,376개의 50mer의 올리고뉴클레오티드가 부착되어 있고, 그 중 10,108개가 단일 유전자 또는 클러스터(cluster)이다. log Cy3/Cy5비율이 >|2| 경우에만 수학적으로 유의하게 발현 차이를 보인다고 가정하였다.

결과 및 고찰

1. Dioxin에 의한 생체 계측치의 변화

Dioxin의 대사 일반 및 면역 장기에 대한 영향을 알아보기 위하여 dioxin의 투여량에 따라, 그리고 발달과정에 따라 10주된 시점에서 생쥐의 무게 및 비장의 무게를 측정하였다(Table 1). 각 처치 군에서 체중의 변화는 크게 나타나지 않았으나, 체중대비 비장 무게의 변화는 태생 전에 노출된 군에서 21~26%의 감소를 보였으며, 특히 임신 중기 이전에 더욱 감소하였다.

Dioxin에 의한 생체계측치의 변화에서 비장의 무게를 체중의 비로서 변동을 관찰한 결과 태생전의 폭로에 의한 변동 값이 생후의 폭로 값보다 큰 사실은 그간의 연구보고들과 잘 일치하는 소견이었다. 생후 3주의 변화

값이 생후 6주의 변화 값보다 작은 것은 생쥐를 희생시킨 시점인 10주까지 dioxin의 손상에 대해 시간적으로 회복이 가능했기 때문으로 생각된다.

2. 골수세포의 증식력을 통한 면역세포의 줄기세포 기능 분석(CFC assay)

줄기세포에 대한 dioxin의 영향을 평가하기 위해 각 군을 5마리로 하여 0.1ug/kg의 농도로 TCDD를 처리하여 줄기세포 특징을 측정하는 colony forming assay를 해본 결과 임신기간 중 노출된 군에서의 콜로니의 감소율이 생후에 노출된 군보다 2배 가까이 컸다(Fig. 1). 즉 6주에 노출된 경우에서 보던 0.1 μg/kg에서 84%로 감소한 것이 노출 시기가 점점 빨라짐에 따라 더욱 감소하였고, 태령 6,5일에는 65%로 뚜렷이 감소하였다. 이상의 결과로 보아 dioxin은 발달에 있어 태생 후 보다는 태아 시기에 조혈모세포의 면역세포로 분화에 관여하는 초기 줄기세포단계에 영향을 주어 면역기능을 더욱 저하시킨다는 것을 알 수 있었다.비장의 무게저하와 대해 면역기능의 저하에 대해 세포의 증식력으로 검증해본 결과 그 양상은 생체계측치의 결과와 유사하였다. 이는 태생 전에 면역세포로 분화하는데 필요한 혈액줄기세포(조혈모세포)가 어느 한 시점에 모두 분화되어 다음단계로 넘어가는 과정이 아니라, 여러 단계의 분화능력을 갖는 과정을 통해 이루어지며, 이 여러 세포들이 dioxin의 독성을 나타내는 목표세포가 되어 나타남을 제시한다.

3. Oligonucleotide-microarray 상에서 말초혈액 세포 유전자 발현의 변화에 대한 self-organizing map (SOM) 분석

TCDD를 0.1ug/kg 용량으로 처리한 군의 말초혈액에

Table 1. Changes of body weights and spleen weight/body weight

	Body weight	Spleen wt/ Body Wt	% changes of SW/BW
G6.5D			
Control	25.10±0.91	3.70±0.43	-23.0
0.1ug/kg	28.73±1.04	2.85±0.16	
G13.5D			
Control	25.10±0.91	3.71±0.33	-26.1
0.1ug/kg	24.39±0.73	2.74±0.32	
G18.5D			
Control	31.00±1.20	3.41±0.16	-21.1
0.1ug/kg	24.85±0.25	2.69±0.08	
P3W			
Control	24.02±2.06	4.54±0.37	- 7.3
0.1ug/kg	22.03±0.48	4.21±0.28	
P6W			
Control	22.07±1.61	3.25±0.12	-12.9
0.1ug/kg	23.37±1.15	2.83±0.24	

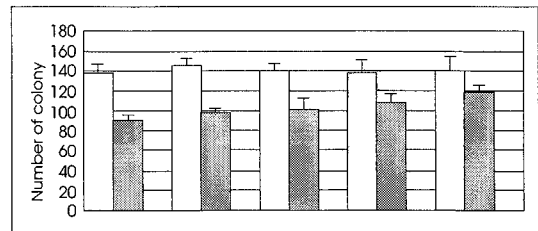


Fig. 1. Changes of the proliferation activity of bone marrow stem cells by using colony forming assay. TCDD concentration-dependent reduction of colony forming activity at various time intervals : gestational 6.5, 13.5, 18.5 days(G6.5D, G13.5D, 18.5D), and postnatal 3, 6 weeks(P3W, P6W). The yellow bars are control, and the orange bars are the group exposed with 0.1ug/kg TCDD. The numbers of animals were five for each group.

서 RNA를 추출하였고, cRNA를 만들면서 cy5와 cy3 형광을 삽입하였고, 50-mer oligonucleotide probe가 11,376개 spot되어있는 생쥐용 oligonucleotide-microarray 상에서 유전자의 발현변화를 측정 분석하였다. 각 군에서 3개의 실험을 반복하였고 비생물학적 요소를 최소화하기 위해 global normalization, scaling normalization 그리고 microarray 간 normalization을 시행하였다(그림 생략). 다이옥신의 폭로에 대해 시기별 유전자의 변동양상을 Self-organization maps(SOM)을 통하여 관찰한 결과 태령 18.5일에서 변동양상이 가장 두드러졌다(Fig. 2. C11, C12, C14, C19) 이는 조혈모세포의 조혈작용이 간에서 골수에서 교체되어 왕성히 일어날

시점에서 영향을 받은 유전자들에 기인한 것으로 생각된다. 또한 다이옥신의 작용이 발생시기에 따라 영향을 주는 경로가 많이 다르며 생체 여러 경로에 걸쳐 폭넓게 작용하고 있음을 시사한다.

전체 유전자 들에 대해 clustering을 self-organizing map(SOM)을 통하여 분석한 결과 각 시기별로 특이한 유전자 발현의 변동을 관찰 할 수 있었다. 0.1ug/kgTCDD 고용량으로 처리한 군에 대해 시기별 노출을 대변할 수 있는 SOM은 G13.5D(C2, C3, C7, C21, C22), G18.5D(C11, C12), P3W(C0, C1, C16), P6W(C13)이었다 (Fig. 2).

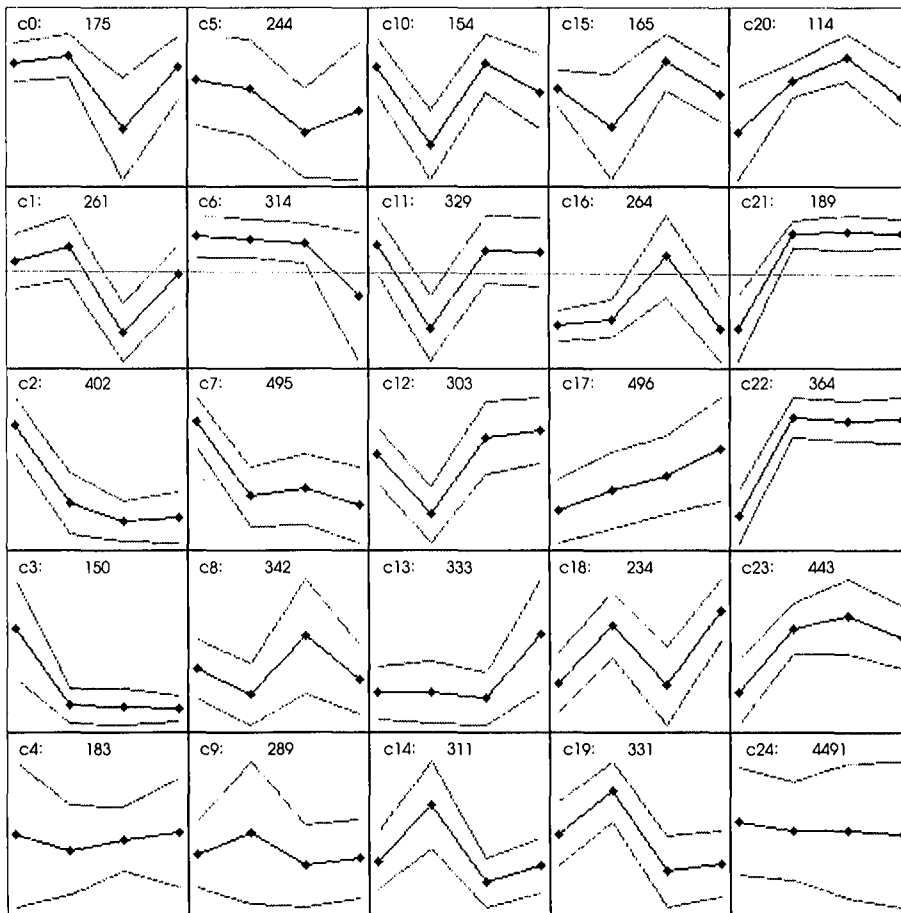


Fig. 2. Self-organizing maps(SOM) of the transcripts in the peripheral blood cells on the exposure of 0.1 μ g/kg of TCDD at various developing stages. Experimental procedures for microarray were followed as described on Material and Methods. AcquiredImages were processed and analyzed statistically for interpretation of spot intensity results using Imagen version 4.1 software (Roche). Nonbiological factors that might contribute to the variability of data were minimized using global normalization/scalingwith data from all probe sets. Each chip contains a total of 10,368 elements, of which 10,108 genes/clusters. The global expressions of bone marrow cells were analyzed by self organizing maps(SOM).

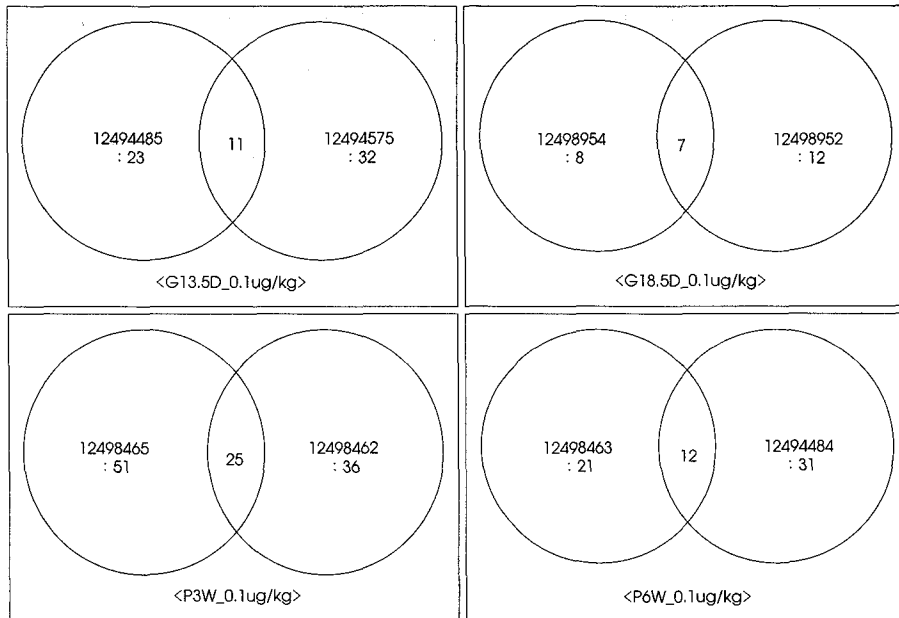


Fig. 3. The common transcripts expressed over 2-fold more or less than the control value in each oligonucleotide microarray.

4. 표적유전자의 탐색

생체탐색분자(Biomarker)를 개발하는데 있어 실험의 재현성이 중요하고, 또한 microarray 실험의 비생물학적 변동(biological variation)을 최소화하기 위하여 microarray 실험을 2회 반복 실험에 공통적으로 나타나는 유전자와, biomarker로서의 편이성과 대표성을 위해 유전자 발현 증감의 폭이 2배 이상인 유전자를 선별한 결과 총 55개의 유전자를 선정할 수 있었다(Fig. 3). G13.5D 군에서는 11개의 유전자, G18.5D(에서는 7개의 유전자, P3W군에서는 25개의 유전자 및 P6W군에서는 12개의 유전자가 중복되어 발현되어 이들을 재현성이 있는 유전자 후보군으로 선택하였다. 다이옥신의 생쥐 생체 내 반감기가 3~4주인 점을 감안할 때, 태령 6.5일, 13.5일, 16.5일, 생후 3주, 그리고 생후 6주 등 각기 다이옥신을 1회만 노출하였고 희생기가 생후 10주인 실험조건에서 유전자의 발현의 변화가(특히 태아시기에 노출된 경우) 그다지 크지 않을 것임을 추측할 수 있었는데, 예상과는 달리 변화된 유전자들은 서로 많이 달랐고, 유사하게 변화한 유전자는 별로 관찰되지 않았다. 그 결과 각 시기마다 얻은 유전자에 대해 특성을 gene ontology로 알아보았으며, 특히 세포의 증식에 관여하는 유전자 군 및 면역기능에 관여하는 유전자 들 중에서 변화가 많았다(Table 2).

대부분의 유전자는 physiological processes에 해당하는 유전자였으며, 태생 중의 기관발육의 중요한 시기에 노출된 군(태령 13.5일)에서는 bindng에 관여하는 유전자, 생후 발육의 중요한 시기에서 노출된 군(생후 3주)에서는 cell function에 관여하는 유전자의 변화가 많이 남아있다.

시기별 노출에 대한 biomarker로서 대표성은 그 시기에만 특별히 증가하거나 저하된 유전자를 발굴하는 것으로서 노출시기별 SOM으로는 태령 13.5일(c21), 생후 3주(c0, c16)와 같다. biomarker로서 재현성을 위해 공통적으로 발현되는 유전자가 이 범주에 속하는 것을 탐색한 결과 태령 6.5일, 태령 18.5일과 생후 6주군에서는 발견할 수 없었고 시기별 대변이 가능한 SOM과, 재현성이 있는 유전자 55개 중에서 그 결과가 서로 일치하는 유전자는 다음과 같다. 태령 13.5일에서 c21인 유전자 1개(nadh dehydrogenase subunit 5), 생후 3주에서 c0유전자 10개와 c16유전자 3개(c0 : sialoporphin ; spn9의 9개, c16 : ribosomal protein l13a ; rpl13a의 2개)가 있었다(Table 3).

결론적으로 다이옥신 노출을 검출할 수 있는 특이적 biomarker로서 임신중반기에 노출에는 ferritin heavy chain gene의 발현증가로, 임신 후반기의 노출에는 eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 gene의 발

Table 2. Characteristics of the overlapping genes in duplicated microarray on the gene ontology gene ontology

Gene ontology	G6.5D	G13.5D	G18.5D	P3W	P6W
Behavior	0	0	0	0	0
Binding	0	0	1	3	1
Catalytic activity	0	0	0	1	0
Cell	0	0	0	2	1
Cellular process	0	4	0	4	0
Chaperone activity	0	0	0	0	0
Defense/immunity protein activity	0	0	0	0	0
Development	0	0	0	0	0
Enzyme regulator activity	0	0	0	0	0
Extracellular	0	0	0	0	0
Motor activity	0	0	0	0	0
Obsolete biological process	0	0	0	0	0
Physiological processes	0	7	3	14	6
Signal transducer activity	0	0	0	0	0
Structural molecule activity	0	0	0	0	0
Transcription regulator activity	0	0	0	0	0
Translation regulator activity	0	0	0	0	0
Transporter activity	0	0	0	0	0
Viral life cycle	0	0	0	0	0
Unclassified	0	0	3	1	4
Total	0	11	7	25	12

Table 3. Summary of the common transcripts expressed over 2-fold more or less than the control value in each oligonucleotide microarray

Exposure time	Type of SOM	Gen bank access No/description	Log ₂ changes
G13.5D	c21	AB049357/nadh dehydrogenase subunit 5	-1.05
		NM_009259/sialophorin : spn	-2.17
		M81022/carbonic anhydrase ii	-1.57
P3W	c0	AJ006215/cmp-n-acetylneuraminic acid synthetase	-1.45
		NM_021384/viral hemorrhagic septicemia virus (vhsv) induced gene 1 : vig1- pending	-1.43
		c16	NM_009438/ribosomal protein l13a : rpl13a

현감소로, 그리고 생후 성장초반기에 노출에는 platelet factor 4 gene의 발현 증가로서 이용할 수 있음을 제안 하며, 이들에 대한 검정이 더욱 필요하다고 본다. 또한 다이옥신의 노출이 일회성일 수도 있지만, 보통 장기간 노출이거나 여러 회의 반복 노출인 경우가 많으므로 반복노출 실험모델에서 biomarker의 개발에 대한 연구도 계속되어야 한다고 생각한다.

요 약

내분비교란물질로 가장 잘 알려진 다이옥신에 의한 면

역장애는 면역기관이 성숙된 후에 나타나므로 다이옥신의 노출에 의한 것인지 인과관계의 평가가 매우 어렵다. Dioxin(2, 3, 7, 8-TCDD)에 의한 면역기능의 저하 및 그 지표 유전자를 발굴하기 위해, C57BL/6 생쥐에서 임신 및 발생 성장 시기별로 dioxin을 노출하였다. 면역지표로서 골수 혈액줄기세포의 집락 형성이 현저하게(35~55%) 감소하였다. 말초혈액에서 유전자 발현의 변화를 생쥐용 고밀도(11K) oligonucleotide microarray로 측정하였고, 각 시기별로 대변이 가능한 유전자는 Self-organization maps(SOM) clustering으로 분석하였다. Biomarker로서 유용성을 위해 2회 반복하여 공통된 유

전자를 선택하였고, 이 중 유전자 발현의 변동 폭이 2 이상 되는 유전자를 선택한 결과 55개를 고를 수 있었다. 시기별 대변이 가능한 SOM과 그 결과가 서로 일치하는 유전자는 임신 13.5일에서 SOM c21인 1개(nadh dehydrogenase subunit 5), 생후 3주에서 c0 유전자 10개와 c16 유전자 3개(c0 : sialoporphin ; spn 외 9개, c16 : ribosomal protein 113a ; rpl13a 외 2개)를 발굴할 수 있었다. 다이옥신에 의한 면역 장애 및 노출 영향을 평가하는 biomarker로 사용할 수 있음을 알았다.

중심 단어 : 다이옥신 · 면역 · 혈액줄기세포 · 핵산칩 · 유전자발현.

References

- 1) World Health Organization (WHO) : *Dioxins and their effects on human health. Fact sheet No 225 (www.who.int/inf-fs/en/fact225.html). June 1999*
- 2) Whitlock JP Jr : *Mechnistic action of dioxine action. Chem Res Toxicol 1993 ; 6 : 754-763*
- 3) Bank PA, Yao EF, Phelps CL, Harper PA, Denison MS : *Species-specific binding of transformed Ah receptor to a dioxin responsive transcrip-tional enhancer. Eur J Pharmacol 1992 ; 228 : 85-94*
- 4) Luster MI, Boorman GA, Dean JH, Harris MW, Luebke RW, Padarathsingh ML, Moore JA : *Examination of bone marrow, immunologic parameters and host susceptibility following pre- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Int J Immunopharmacol 1980 ; 2 : 301-310*
- 5) Fine JS, Gasiewicz TA, Silverstone AE : *Lymphocyte stem cell alterations following perinatal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo- p- dioxin Mol. Pharmacol 1989 ; 35 : 18-25*
- 6) Hollyday S, Lindstrom P, Blaylock B, Comment CE, Germolec Dr, Heindell J, Luster M : *Perinatal thymocyte antigen expression and postnatal immune development altered by gestational exposure to TCDD. Teratology 1991 ; 44 : 385-393*
- 7) Gehrs BC, Riddle MM, Williams WC, Smialowicz RJ : *Alteration in the deveoling immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2, 3, 7, 8-TCDD. Effect on the fetus and the neonate. Toxicology 1997 ; 122 : 219-228*
- 8) Murante FG, Gasiewicz TA : *Hemopoietic progenitor cells are sensitive targets of 2, 3, 7, 8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in C57BL/6J mice. Toxicol Sci 2000 ; 54 : 374-383*
- 9) Kim GB, Anderson JW, Bothner K, Lee JH, Koh CH, Tanabe S : *Application of P450RGS (reporter gene system) as a bioindicator of sediment PAH contamination in the vicinity of Incheon Harbor, Korea. Bio-markers 1997 ; 2 : 181-188*
- 10) Khim JS, Villeneuve DL, Kannan K, Koh CH, Giesy JP : *Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea : 2. In vitro gene expression assays. Environ Sci Technol 1999 ; 33 : 4206-4211*
- 11) Behnisch PA, Hosoe K, Sakai SI : *Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassay/biomarker technology. Environ Int 2001 ; 27 : 413-439*
- 12) Behnisch PA, Hosoe K, Sakai SI : *Combinatorial bio/chemical analysis of dioxin and dioxin-like compounds in waste recycling, feed/food, humans/wildlife and the environment. Environ Int 2001 ; 27 : 495-519*
- 13) Puga A, Maier A, Medvedovic M : *The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. Biochem Pharmacol 2000 ; 60 : 1129-1142*
- 14) Martinez JM, Afshari CA, Bushel PR, Masuda A, Takahashi T, Walker NJ : *Differential toxicogenomic response to 2, 3, 7, 8-TCDD in malignant and nonmalignant human airway epithelial cells. Toxicol Sci 2002 ; 69 : 409-423*