

뇌신경세포에서 카드뮴이 아연의 항상성에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향

안성희 · 여은영 · 장봉기 · 박종안 · 이종화[‡] · 김완중¹⁾

순천향대학교 환경보건학과 · 생물학과¹⁾

Cadmium Alters Gene Expression Related to Zinc Homeostasis in Neuronal Cell

Sung Hee Ahn · Eun Young Yoe · Bong Ki Jang · Jong An Park · Jong Wha Lee[‡] · Wan Jong Kim¹⁾

*Dept. of Environmental Health Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University ·
Dept. of Biology, College of Natural Science¹⁾*

Numerous studies have shown that cadmium disturbs the normal biological processes in central nervous system but the mechanism of toxicity is not well understood. The present study has investigated the effect of cadmium on several key genes in zinc metabolism (MT-I, MT-II, MT-III and ZnT-1) in neuronal cell line (HT22 cell). Time and dose-dependent effect were examined using expression PCR and western blot analysis. LC₅₀ and LC₅₀ of cadmium for HT22 cell resulted from MTT assay was 4.7 μ M and 9.2 μ M, respectively. Exposure to 1 μ M cadmium increased the abundance of MT-I and MT-II transcripts in the neuronal cell at 8.0 hours after the administration. MT-I and MT-II

protein induction was confirmed by western blot analysis. To examine dose-response relationship, the experiment was repeated for cadmium exposure of 0.5, 1 and 2 μ M. The effect to MT-I and MT-II became significant at the 0.5 μ M dose level. But the expression of MT-III was not affected by cadmium. ZnT-1 expression was decreased in a dose-dependent manner by the treatment of 0.5 - 2 μ M cadmium. These results suggest that cadmium can alter the expression of several key genes in neuronal zinc homeostasis.

Key Words: Cadmium, Zinc, Metallothionein, Zinc Transporter, Gene Expression

I. 서 론

오늘날 산업문명의 발달로 산업장에서 배출되는 각종 화학물질과 다양한 폐기물에 의해 환경오염이 날로 심각해지고 있으며 이로 인해 인류 건강은 매일 위협받고 있다. 이러한 환경오염 중에서 중금속에 의한 오염은 더욱 심각한 건강 위협을

초래하고 있다(천기성과 김봉희, 1996). 자연계에서 카드뮴은 전기도금, 안료, 플라스틱, Cd-Ni 배터리 등 산업적으로 다양한 용도로 이용되고 있으며, 그 사용증가로 인하여 환경 및 식품에 광범하게 존재함으로써 독성잠재력에 대한 관심이 고조되고 있을 뿐만 아니라 체내에 축적되는 성질이 있어 체내에서 약 20~30년의

생물학적 반감기를 갖고 있는 독성이 높은 환경 오염원중의 하나로 알려져 있다(김주영, 1997).

카드뮴은 나이가 들수록 간, 신장 및 뇌에 축적되어 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 신장, 고환, 호흡기계에 대한 부작용을 나타낼 뿐만 아니라(Johnson, 2001) 어린이에 있어서도 학습능력저하 및 과도한 반응과 같은 중추신경계에 대한 독작용을 초래한다(Panayi et al., 2002; Lui et al., 1990). 카드뮴의 중추신경계에

접수일 : 2004년 2월 10일, 채택일 : 2004년 7월 23일

[‡] 교신저자 : 이종화(충남 아산시 신창면 읍내리 646 순천향대학교 환경보건학과

Tel : 041-530-1271, E-mail : leejong@sch.ac.kr)

대한 독성기전으로는 반응성 산소종(ROS, reactive oxygen species)의 생성 유발(Kumar et al., 1996; Risso-de et al., 2001; Szuster et al., 2000), 항산화 방어시스템(antioxidant defence systems)의 장애, 세포 내 Ca^{++} 농도의 증가(Wong & Klaassen, 1980) 및 metallothioneins (MTs)을 유도한다. MTs는 혈중에 존재하는 아연(Zn)의 섭취를 통한 아연결핍 유도작용(Wong & Klaassen, 1982) 등이 보고되고 있다.

카드뮴에 의하여 금속결합 단백질인 MT-I/II의 발현이 유도된다는 것은 오래 전부터 잘 알려진 사실이다. MTs는 중금속이 체내에 침입되었을 때 생리적 해독작용의 일환이며(정세영, 1988) 분자량이 작은 금속결합 단백질로, 61개의 아미노산으로 구성되어 있다. 또한 분자내에 cysteine 잔기가 풍부하며, 방향족 아미노산이나 소수성 아미노산 잔기가 적은 저분자성 단백질로서 그들의 특이한 화학적 구조로 인해 오랫동안 많은 생물학자들의 관심의 대상이 되어왔으나 아직 세포내의 기능에 대하여는 불분명한 부분이 많은 실정이다(김남송, 1997; 전수영과 이순재, 1993). MT-I과 MT-II는 대부분의 조직에서 발현되며, 다양한 화학물질(IL 6, IL 1, TNF, ROS, LPS, NO, 중금속 등)에 의하여 유도된다. MT-III는 처음에 GIF(growth inhibitory factor)로 밝혀져 중추신경계에서 특이하게 발현되는 것으로 알려졌다. 이자와 장에서도 발견되고 있다. MT-IV는 피부의 상피에 많이 존재한다(Coyle et al., 2002). 또한 MTs는 다기능성 단백질로 hydroxy radical 또는 NO와 같은 가스상 매개체의 방출, apoptosis(오경재와 염정호, 2001) 및 아연, 카드뮴, 구리 등과 같은 중금속의 결합 및 교환 등의 세가지 기본적인 과정을 조절하는 것으로 알려졌다. 또한 MTs는 암, 순환성 및 패혈성 속, 관상동맥 질환, 알츠하이머병 등을 포함한 다수의 질환에 관계가 있으며, 면역체계에도 영향을 미친다는 증거를 제시하고 있다(Cuthbert, 2000).

한편, 중추신경계에서는 MT-I, MT-II 및 MT-III (발현 정도: MT-I>MT-III>MT-II)이 발현되나 MT-III가 주된 관심의

대상이 되어왔다. 처음에 MT-III는 신경사멸을 일으키는 GIF로 발견되었으나 Palmiter 등(Palmiter et al., 1992)에 의해 MT군에 속하는 단백질임이 밝혀졌다. 뇌 중에서 hypothalamus와 olfactory bulb에서 MT-III가 가장 높게 발현된다. MT-III는 특히 뇌에서 아연이 풍부한 부분에서 높게 발현되며, 신경세포체로 아연을 섭취하는 신경(일명 Zn-ergic neuron)에서 주로 발현되는 것으로 밝혀졌다(Choudhuri et al., 1993). 이는 MT-III가 아연이 신경조절자로 이용되는 것에 관여할 수 있음을 의미하며 뇌에서 MT-III는 MT-I/II와는 다른 기능을 가지고 있는 것으로 알려지고 있다. 이 기능을 보면 첫째, MT-I/II는 다양한 화학물질에 의하여 유도되지만 MT-III는 유도성이 낮다. 둘째, 전사 조절 과정이 다르다. 셋째, 뇌내에서의 발현분포가 서로 다르다. 넷째, 다른 MTs와는 달리 MT-III만 neuroinhibitory activity를 지니고 있다(Coyle et al., 2002).

이상에서 언급된 바와 같이 카드뮴은 MTs를 유도하며, 이를 통하여 아연의 항상성에 영향을 미치나 MT의 이성체들에 대한 카드뮴의 유도성에 상반된 견해들이 있고, MTs의 생체내 기능에 대하여도 많은 부분이 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 뇌신경 세포(HT22 cell)에 카드뮴을 처리하여 아연의 항상성에 관여하는 수종의 유전자(MT-I, MT-II, MT-III 및 Zinc transporter)의 발현에 어떠한 영향을 주는지를 관찰함으로써 카드뮴의 독성과 아연의 항상성과의 관련성을 규명하고자 한다.

II. 실험방법

1. 실험대상 세포종의 선정

Cadmium의 중추신경계에 대한 독성기전으로는 reactive oxygen species (ROS)의 생성 유발, antioxidant defence systems의 장애 등이 보고되고 있어, 최근에 oxidative stress 연구에 많이 이용되고 있는 HT22 (hippocampal neuron cell line) 세

포를 대상 세포종으로 선정하였다. MT-III는 아연을 많이 함유하고 있는 hippocampus에서 많이 발현되는 것으로 보고되고 있기 때문에 본 연구를 진행함에 있어 HT22 세포가 합당한 것으로 판단되었다.

2. 세포배양 및 카드뮴 처리

1) 세포의 배양 및 계대배양

본 연구에 사용한 세포주 HT22는 아주대학교 생리학교실에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 DMEM배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액을 흡인 제거한 후 0.25% trypsin-EDTA 1mL를 가하여 배양기에서 3분간 방치시킨 후에 5mL의 배지가 든 원심분리용 튜브에 세포를 수확하였다. 1,500 rpm에서 5분간 원심분리한 후에 상등액을 제거하고 새로운 배지 5mL로 현탁하여 세포의 개수를 1×10^6 cells/10mL로 하여 배양플라스크에 분주하였다.

2) 세포의 동결 및 해동

세포가 배양용기에 80~90% 정도 가득 차졌을 때에 상기의 방법으로 세포를 수확하여 10% DMSO가 첨가된 배지에 1×10^6 cells/mL로 현탁한 후에 1.8mL 튜브(1×10^6 cells/튜브)에 옮기고, 1°C/분으로 온도가 내려가게 고안된 동결용기에 넣어 -70°C 냉동고에 8시간 방치한 후에 액체 질소탱크에서 보관하였다. 액체 질소에 보관되어 있는 동결세포를 배양기에서 녹인 후에 5mL 배지와 혼합하여 1,500 rpm에서 5분간 원심분리한 후에 상등액을 제거하고 새로운 배지 10mL로 현탁하여 세포를 해동하였다.

3) MTT Assay

카드뮴이 세포의 생존 및 성장에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay를 시행하였다. 96 well plate에 1×10^6 cells/plate (200 μ L/well)를 분주하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후에 카드뮴을 농도별로 처리하였다. 약물을 처리하고 24시간 후에 MTT assay를 시행하였다.

4) LC₅₀ LC₅₀ 산출

MTT assay 결과로부터 HT22 세포에 대한 카드뮴의 LC₅와 LC₅₀를 산출하기 위하여 미국 EPA에서 제공하는 Benchmark Dose Software (BMDS)를 이용하였다. 세포에 대한 LC₅₀를 기초로 하여 카드뮴의 처리농도를 결정하였다.

5) 카드뮴 처리

HT22 세포에서 카드뮴의 LC₅₀는 9.2 μ M로 평가되었기 때문에 카드뮴이 아연의 항상성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 HT22 세포에 LC₅₀의 약 1/20, 1/10 및 1/5배인 0.5, 1 및 2 μ M을 각각 처리하였다. 카드뮴이 시간대 별로 MT-I/II 단백질의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 카드뮴 처리 (1 μ M) 8, 12 및 24 시간 후에 세포를 수확하였다.

3. 총 RNA 추출

RNeasy kit (Qiagen)을 이용하여 HT22 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. UV-spectrophotometer로 260nm와 280nm에서의 흡광도를 측정하고, 그 비율로부터 RNA를 정량하였다.

4. 역전사효소 중합효소연쇄반응

(RT-PCR) 및 중합효소연쇄반응 (PCR)

1-3 μ g의 RNA를 dithiothreitol, random primers (MT-I, MT-II 및 ZnT-1의 경우에 사용) 및 0.2mM dNTPs 존재하에 Superscript II RT로 역전사시켜 cDNA를 조제하였다. MT-III의 경우에는 random primer 대신에 PCR용 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 행하였다.

표적유전자 (MT-I, MT-II, MT-III 및 ZnT-1) 및 대조 유전자 (β -actin)에 적합한 primer를 이용하여 cDNA를 증폭시켰다. PCR용 primer로는 MT-I의 경우에 5'-tctcggaatggaccccaactg-3' (sense), 5'-tttaccacgtgtggcagcgc-3' (antisense); MT-II의 경우에 5'-ccatggaccccaactgctc-3' (sense),

5'-gcactgtcggaagcctctt-3' (antisense); MT-III의 경우에 5'-ccggatccgacaacagttgtgccaccag-3' (sense), 5'-ccgaattcgtgtgccaaggac-tgtgtgtgc-3' (antisense); ZnT-1의 경우에 5'-tgacaatctggaagcgaagacaac-3' (sense), 5'-gggaagcgggtctcacattttatg-3' (antisense), β -actin 경우에 5'-aatagtgtgacgtggcgt-3' (sense), 5'-taccacaggcattgtgatgg-3' (antisense)를 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 Ready-to-go PCR bead (Amersham)를 이용하였으며, PCR cycles은 95°C (1 min), 64°C (2 min) 및 72°C (1 min)으로 β -actin, MT-I 및 MT-II는 24 cycles, zinc transporter는 30 cycles, MT-III는 32 cycles을 사용하였다.

PCR 생성물을 8% polyacrylamide gel 상에서 전기영동하였으며, gel을 ethidium bromide로 염색하였다. Kodak DC40 camera로 사진을 찍어 Kodak's 1D photo imaging software를 사용하여 이미지를 분석하였다.

5. 단백질 (MT-I/II) 분석 - Western blotting

카드뮴이 시간대 별로 MT-I/II 단백질의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 카드뮴 처리 8, 12 및 24 시간 후에 세포를 수확하였으며, 카드뮴의 용량의존적 영향을 관찰하기 위해서는 12 시간 후에 세포를 수확하였다.

수확한 세포를 protease inhibitor (1 mM AESBF, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 100 M Leupeptin, and 100 M Pepstatin in PBS) 용액으로 균질화하고, 4°C에서 10,000 x g로 원심분리하여 상등액을 단백질 분석용 시료로 사용하였다. 시료를 완충용액 (125 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 0.5% w/v SDS, 40 mmol/l dithiothreitol, 0.02% w/v bromophenol, and 20% v/v glycerol)으로 희석하고, 4-20% tris-glycine ready gels (Bio-RAD) 상에서 전기영동하였다.

분리한 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전위시킨 후 Scortegagna와 Hanbauer(1997)가 사용한 방법으로 차단

하였다. 블롯 (blot)을 anti-MT-I/II antibody (1:200; Dako) 및 anti-mouse IgG peroxidase antibody (1:2000; Amersham)으로 처리하고, chemiluminescence detection reagents (ECL plus; Amersham)로 발색시킨 후에 X-ray 필름에 표지시켰다. Kodak's 1D photo imaging software를 이용하여 밀도를 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 카드뮴이 HT22 세포의 생존 및 성장에 미치는 영향

1) MTT Assay

카드뮴이 세포의 생존 및 성장에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase에 의하여 tetrazolium 염이 보라색의 formazan으로 환원되는 성질을 이용하여 세포의 생존 및 성장을 측정하는 방법이다. Formazan을 microELISA reader로 595nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과는 그림 1과 같다.

2) LC₅와 LC₅₀ 산출

MTT assay 결과로부터 HT22 세포에 대한 카드뮴의 LC₅와 LC₅₀를 산출한 결과는 그림 2, 3과 같으며 LC₅ (BMD₅)와 LC₅₀ (BMD₅₀)는 각각 4.7 μ M, 9.2 μ M로 나타났다. 세포에 대한 LC₅₀를 기초하여 카드뮴의 처리농도를 결정하였다.

2. 카드뮴이 뇌신경세포에서 MT-I/II 단백질 발현에 미치는 영향

1) 시간대별 영향

HT22 세포에서 카드뮴 1 μ M을 처리한 후에 8, 12 및 24 시간에 MT-I/II 단백질 발현에 미치는 영향은 그림 4와 같다. 카드뮴은 8시간에 MT-I/II의 발현을 현저히 증가시켰으며, 이 작용은 12시간 후에 더욱 강하게 나타났다. 카드뮴의 발현 증가 작용은 24시간 후까지 지속되었다.

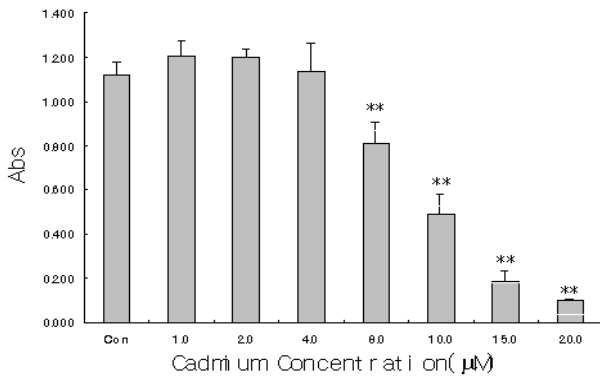


Fig 1. The effect of cadmium on the survival and proliferation of HT22 cell.

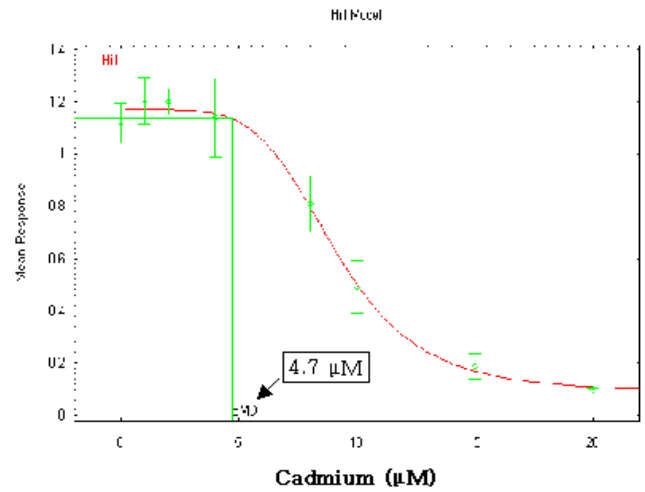


Fig 2. LC₅₀ of cadmium for HT22 cells calculated by BMDS using different continuous hill model.

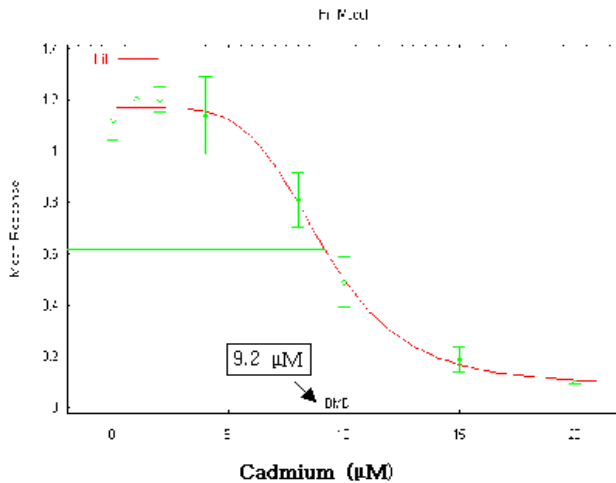


Fig 3. LC₅₀ of cadmium for HT22 cells calculated by BMDS using different continuous hill model.

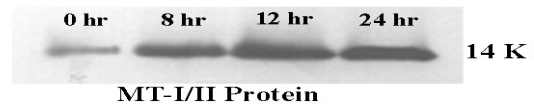


Fig 4. Time-course effect of cadmium on MT-I/II protein expression in HT22 cell.

Karin 등(Karin et al., 1981)은 HeLa 세포에서 Zn 또는 dexamethasone에 의한 MT 합성은 6~7 시간에 최고조에 이른다고 보고하였으며, 유도제가 계속적으로 존재하는 상황에서 MT의 발현증가는 지속된다고 하였다. 유도제를 제거하였을 때에 MT는 이중적 양상으로 분해된다. 첫 번째는 반감기가 12 시간이며, 두 번째는 반감기가 38 시간으로 밝혀졌다. 이와 같은 동력학적 결과로부터 MT는 아급성 질환에 관여하는 것으로 제안하였다.

을 처리하여 12 시간 후에 MT-I/II 단백질의 발현에 미치는 영향은 그림 5와 같다. 카드뮴은 HT22 세포에서 LC₅₀의 약 1/20의 농도인 0.5 μM에서 MT-I/II 단백질 발

현을 현저히 증가시켰다. 2 μM까지 용량 의존적으로 발현을 증가시켰으며, 본 논문에 결과로 나타내지는 않았지만 카드뮴 4 μM을 처리하였을 때에는 일부 세포가

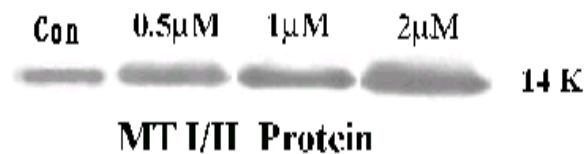


Fig 5. Dose-dependent effect of cadmium on MT-I/II protein expression in HT22 cell.

2) 용량의존적 영향

HT22 세포에서 카드뮴 0, 0.5, 1 및 2 μM

사멸되어 단백질의 양이 감소하는 것으로 조사되었다.

3. 카드뮴이 아연의 항상성에 관여하는 수종의 유전자 발현에 미치는 영향

1) MT-I MT-II 유전자의 발현에 미치는 영향

HT22 세포에서 카드뮴 0, 0.5, 1 및 2 μ M 을 처리하고 12 시간 후에 총 RNA를 분리하고, RT-PCR과 PCR로 MT-I 및 MT-II 유전자의 발현에 미치는 영향을 그림 6과 7 및 표 1에 나타냈다. 표적 유전자 (MT-I 및 MT-II)의 발현은 대조 유전자 (β -actin)의 발현 정도(밴드의 밀도를 분석)와 비교

하여 증감을 평가하였다. 카드뮴은 0.5 μ M부터 2 μ M까지 MT-I 및 MT-II 유전자의 발현을 전사단계에서 용량의존적으로 증가시켰다.

MT-I 및 MT-II는 카드뮴뿐만 아니라 다른 중금속 (Zn, Cu, Hg, Au 및 Bi)에 의해서도 유도된다. 이들 금속 중에서 Zn과 Cd의 유도작용이 강한 것으로 알려져 있다. 금속에 의한 MT 유전자의 조절은 metal transcription factor (MTF-1)를 매개로 일어난다. 아연이 MTF-1에 결합하면 이 단백질이 promotor region에 있는 metal response elements (MREs)에 결합함으로써 유전자의 전사가 개시된다. MTF-1은 Zn-transporter protein과 MTs의 발현을 조절함으로써 세포내 자

유 (free) 아연의 농도를 조정한다. MTs는 금속뿐만 아니라 다양한 인자에 의하여 유도될 수 있다. Glucocorticoids는 유전자의 glucocorticoid response elements (GREs)를 활성화함으로써, IL-6, IL-1, TNF 등은 signal transducer와 activator 단백질 (STATs)의 tyrosine 인산화를 통하여, 반응성 산소종 (ROSs)은 antioxidant response elements (AREs)와 반응함으로써 MTs를 유발한다(Coyle et al., 2002).

다양한 인자들에 의하여 유도된 MTs는 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 스트레스 반응에 관여하는 MTs의 기전에 대하여는 다양한 이론이 제안되고 있으나 아직 불분명한 실정이다. 일반적으로 MTs는 많은 질환에서 중요하다고 간주되는 세 가지의 생리적인 과정에 관여하는 것으로 보여진다. 이를 보면 첫째는 산소 자유라디칼 및 NO 조절이다. 둘째는 apoptosis 억제이고, 셋째는 아연, 카드뮴, 구리 등과 같은 전위금속에 대한 결합 및 교환이다.

2) MT-III 유전자의 발현에 미치는 영향

HT22 세포에서 카드뮴 0, 0.5, 1 및 2 μ M 을 처리하고 12 시간 후에 총 RNA를 분리하고, RT-PCR과 PCR로 MT-III 유전자의 발현에 미치는 영향을 그림 8 및 표 1에 나타냈다. 카드뮴은 0.5~2 μ M에서 MT-III 유전자 발현에 유의한 영향을 주지 않았다.

중추신경계에서 특이적으로 발현되는 MT-III는 다른 MT 이성체와 동일한 20개의 cysteine 잔기를 지니고 있으나 3개의 glutamic acid가 추가되어 있어 생리적 pH에서 MT-I과 MT-II 보다 산성이 강하다. MT-III는 뇌에서 MT-I 및 MT-II와는 다른 기능을 지니고 있다. MT-III는 MT-I/II의 유도제에 대한 반응성이 약하며, MT-I/II와는 다른 경로로 발현이 조절되는 것으로 여겨지고, MT-I/II와는 달리 신경억제 활성을 지니고 있다(Coyle et al., 2002). 사람의 MT-III 유전자는 MT-I/MT-II 유전자와 함께 16번 염색체에 위치하며, MT-III의 promotor region에 특징적인 metal

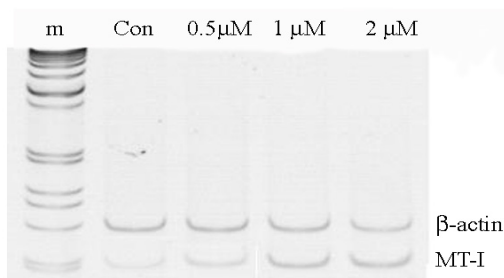


Fig 6. Effect of cadmium on genes expression(MT-I) related to zinc metabolism in HT22 cell. Representative gel (negative image) for targets (MT-I) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from HT22 cells: Con, control; 0.5, 1 and 2 exposed to 0.5, 1 and 2 μ M cadmium earlier.

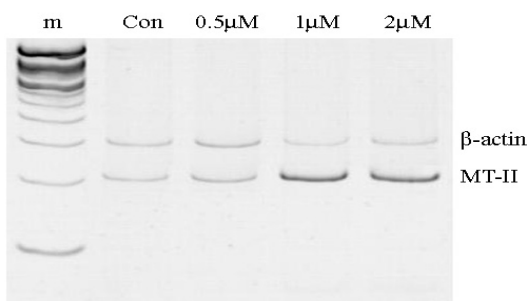


Fig 7. Effect of cadmium on genes expression(MT-II) related to zinc metabolism in HT22 cell. Representative gel (negative image) for targets (MT-II) and reference (β -actin) cDNA sequences after 24 cycles of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from HT22 cells: Con, control; 0.5, 1 and 2 exposed to 0.5, 1 and 2 μ M cadmium earlier.

Table 1. Effect of cadmium on MT-I, MT-II and MT-III mRNA levels in the neuronal cell

Conc. of Cd	n	Mean ¹	SD
Metallothionein I			
Control	6	0.94	0.09
0.5 μ M	5	1.43*	0.15
1.0 μ M	5	2.14**	0.13
2.0 μ M	5	2.51**	0.12
Metallothionein II			
Control	4	1.05	0.11
0.5 μ M	4	1.35*	0.13
1.0 μ M	4	3.35**	0.23
2.0 μ M	4	3.48**	0.17
Metallothionein III			
Control	4	0.98	0.17
0.5 μ M	4	1.08	0.18
1.0 μ M	4	1.15	0.12
2.0 μ M	4	1.20	0.17

¹ PCR signal for MT-I, MT-II and MT-III normalized to internal β -actin.

* Significantly different from control group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

response elements (MREs)가 있으나 MT-I/II와는 달리 아연에 대한 반응성이 없는 것으로 보고되었다(Andrews, 2000).

MT-III 유전자의 발현조절에 관한 다양한 연구결과들이 보고되었다. Zheng 등 (Zheng et al., 1995)은 마우스에서 MT-I/II 유도제인 Cd, Dex, EtOH 및 kainic acid가 MT-III mRNA의 발현을 30% 정도 감소시킨다고 하였으며, Kramer 등(Kramer et al.,

1996a)은 설치류 신경배양에서 Cd, Hg, Zn 및 Dex가 MT-III mRNA의 발현을 30~60% 감소시킨다고 보고하였다. 다른 연구(Kramer et al. 1996b)에서 KA, Dex와 LPS는 hippocampus에서 MT-III mRNA의 발현을 감소시키는 반면, cortical region에서는 증가시킨다고 발표했다. 이와 같은 결과는 화학물질에 의한 MT-III의 발현은 뇌 전반에서 동일하지 않음을 보여주고 있다.

한편, Chiharu 등(Choudhuri et al., 1993)은 마우스 glial cell line (VR-2g)에서 4-methylcatechol과 dopamine이 MT-III mRNA의 발현을 증가시킨다고 보고하였다.

본 연구의 결과는 Kramer 등(Kramer et al., 1996a)이 설치류 배양 astrocyte를 대상으로 한 연구결과와 동일하게 MT-III mRNA의 발현이 카드뮴에 의하여 영향을 받지 않는 것으로 조사되었다.

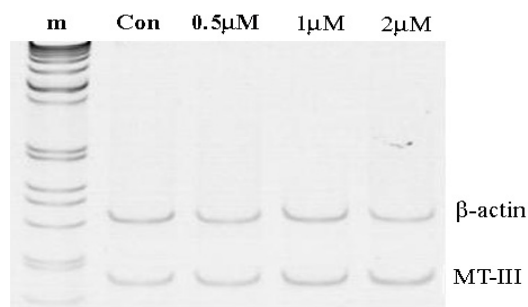


Fig 8. Effect of cadmium on genes expression(MT-III) related to zinc metabolism in HT22 cell. Representative gel (negative image) for targets (MT-III) and reference (β -actin) cDNA sequences of PCR; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from HT22 cells: Con, control; 0.5, 1 and 2 exposed to 0.5, 1 and 2 μ cadmium earlier.

3) Zinc-transporter (ZnT-1) 유전자의 발현에 미치는 영향

HT22 세포에서 카드뮴 0, 0.5, 1 및 2 μ M을 처리하고 12 시간 후에 총 RNA를 분리하고, RT-PCR과 PCR로 ZnT-1 유전자의 발현에 미치는 영향을 그림 9 및 표 2에 나타냈다. 표적 유전자 (ZnT-1)의 발현은 대조 유전자 (β -actin)의 발현 정도와 비교하여 증감을 평가하였다. 카드뮴은 0.5 μ M부터 2 μ M까지 ZnT-1 유전자의 발현을 용량의존적으로 감소시켰다.

ZnT는 MTs와 동일하게 MTF-1이 promotor region에 MREs에 작용함으로써 전사가 조절되는 단백질로서 mucosal-to-serosal surface 아연의 유출자 (effluxer) 역할을 하는 것으로 여겨지고 있다(McMahon & Cousins, 1998). 최근에 Lan-

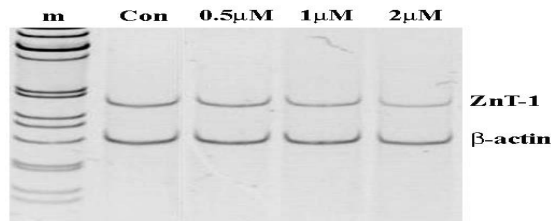


Fig 9. Effect of cadmium on genes expression(ZnT-1) related to zinc metabolism in HT22 cell. Representative gel(negative image) for target (zinc transporter) and reference (β actin) cDNA sequences after 24 or 30 cycles of PCR ; marker (m) = 100 bp DNA ladder. The cDNAs were derived from HT22 cells: Con, control; 0.5, 1 and 2 exposed to 0,0.5, 1 and 2 μ cadmium earlier.

gmade 등(Langmade et al., 2000)에 의하면 MTF-1은 MTs와 Zn 유출 단백질인 ZnT-1의 발현을 조절함으로써 세포내 아연의 농도를 조절한다고 밝혔다. 또한, 그들은 임신기간동안 식이 아연결핍은 visceral yolk sac에서 ZnT-1과 MT를 하향 조절한다고 보고하였다. 본 연구에서 카드뮴에 의하여 ZnT-1의 발현이 감소하는 것으로 보아 HT22 세포에서 카드뮴에 의하여 발현이 증가된 MT-I 및 MT-II가 아연을 섭취함으로써 세포내 자유 아연의 감소를 초래하고, 결국 아연 유출자인 ZnT-1의 발현이 감소되는 것으로 판단된다. 그러나 간, 신장 등에서 카드뮴은 아연을 대체한다고 보고되고 있기 때문에 세포내 아연의 감소 여부는 향후 연구되어야 할 부분이다.

한편, 아연은 산화적 스트레스를 감소시키고, nitric oxide synthase를 강력하게 억제하는 것으로 밝혀졌다(Math & Gordon,

1997). 또한 아연은 용해성 β -amyloid를 분해하는 APP (amyloid precursor protein)의 분해효소를 억제한다고 보고되고 있다 (Bush et al., 1994).

카드뮴은 뇌신경 세포에서 반응성 산소종의 생성유발로 인한 MTs의 유도작용, 세포내 아연 대체 등을 통하여 아연의 항상성을 교란함으로써 독성을 유발하며, 이러한 작용은 Alzheimer's disease(AD)의 촉발 및 진행과도 관련이 있을 것으로 생각된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 뇌신경 세포 (HT22 cell)에서 카드뮴이 아연의 항상성에 관여하는 수종의 유전자 (MT-I, MT-II, MT-III 및 Zinc transporter)의 발현에 미치는 영향을 관찰함으로써 Cd의 독성과 아연의 항상

성의 관련성을 규명하고자 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 카드뮴은 처리 후 8시간에 MT-I/II 단백질 발현을 현저히 증가시켰으며, 이 작용은 12시간 후에 더욱 강하게 나타났고, 24시간 후까지 지속되었다.

2. 카드뮴은 HT22 세포에서 LC₅₀의 약 1/20의 농도인 0.5 μ M부터 2 μ M까지 용량의존적으로 MT-I/II 단백질 발현을 현저히 증가시켰다.

3. 카드뮴은 0.5 μ M부터 2 μ M까지 MT-I 및 MT-II 유전자의 발현을 전사 단계에서 용량의존적으로 증가시켰다.

4. 카드뮴은 0.5~2 μ M에서 뇌에서 특이적으로 발현되는 MT-III 유전자 발현에 유의한 영향을 주지 않았다.

5. 카드뮴은 0.5 μ M부터 2 μ M까지 세포내 자유 아연의 유출에 관여하는 ZnT-1 유전자의 발현을 용량의존적으로 감소시켰다.

이상의 결과에서 카드뮴은 뇌신경 세포에서 MT-I 및 MT-II 유전자의 발현을 전사단계에서 증가시키나 뇌에서 특이적으로 발현되는 MT-III에 대하여는 영향이 없었다. 카드뮴은 세포내 아연의 유출자로 작용하는 ZnT의 발현을 감소시키는 것으로 보아 뇌신경세포에서 아연의 결핍을 유발할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 카드뮴은 뇌신경 세포에서 반응성 산소종의 생성유발로 인한 MTs의 유도작용, 세포내 아연 대체 등을 통하여 아연의 항상성을 교란함으로써 독성을 유발하는 것으로 보여진다.

Table 2. Effect of cadmium on ZnT-1 mRNA levels in the neuron cell

Con. of Cd	n	Mean ¹	SD
Control	4	0.95	0.08
0.5 μ M	4	0.87	0.12
1.0 μ M	4	0.49**	0.13
2.0 μ M	4	0.31**	0.13

¹ PCR signal for ZnT-1 normalized to internal β -actin, * Significantly different from control group; **p<0.01

감사의 글

본 연구는 차세대환경핵심기술개발 사업(과제번호 : 113010013) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- 김남승. 전처치 기간에 따른 흰쥐의 조직 내 카드뮴 및 metallothionein 생성에 관한 연구. *Korean J Toxicol* 1997; 13(1,2):103-110
- 김주영. 카드뮴 및 아연이 백서 혈장 ACTH 및 혈청 Cortisol에 미치는 영향. *대한위생학회지* 1997;12(2):37-42
- 오경재, 염정호. Hepalcl7 세포에서 카드뮴에 의한 세포사멸 신호전달체계에 관한 연구. *J Toxicol Pub Health* 2001;17(3):215-223
- 전수영, 이순재. 카드뮴으로 중독된 흰쥐의 간장 및 신장에서의 Metallothionein 합성에 관한 연구. *한국영양학회지* 1993;26(2):156-163
- 정세영. Metallothionein의 약물독성경감작용과 치료제로서의 작용. *경희약대는 문집*, 1988;16:189-199
- 천기성, 김봉희. 카드뮴 투여에 의한 흰쥐 조직 및 소변내 중금속 농도의 변화. *약학회지* 1996;40(5):501-506
- Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* 2000; 59:95-104
- Bush AI, Pettingel WH, Paradis MD, Tanzi RE. Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by zinc. *J Biol Chem* 1994;269:12152-12158
- Choudhuri S, McKim JM Jr, Klaassen CD. Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;119:1-10
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 2002;59: 627-647
- Cuthbert OS. Metallothionein in human disease. *Cellular and Molecular Biology* 2000; 46(2):465-488
- Johnson S. Gradual micronutrient accumulation and depletion in Alzheimer's disease. *Med Hypotheses* 2001;56(6) :595-597
- Karin M, Slater EP, Herschman HR. Regulation of metallothionein synthesis in HeLa cells by heavy metals and glucocorticoids. *J Cell Physiol* 1981; 106:63-74
- Kramer KK, Liu J, Choudhuri S, Klaassen CD. Induction of metallothionein mRNA and protein in murine astrocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;136:94-100
- Kramer KK, Zoelle JT, Klaassen CD. Induction of metallothionein mRNA and protein in primary murine neuron cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 141:1-7
- Kumar R, Agarwal A, Seth PK. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Letters* 1996;89: 65-69
- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem* 2000;275:34803-34809
- Lui E, Fisman M, Woung C, Diaz F. Metals and the liver in Alzheimer's disease. An investigation of hepatic zinc, copper, cadmium and metallothionein. *Am Geriatr Soc* 1990;38(6):633-639
- Math PC, Gordon JL. Zinc metabolism in the brain; Relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiology of Disease* 1997;4:137-169
- McMahon RJ, Cousins RJ. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95: 4841-4846
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM. MT-III a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6333-6337
- Panayi AE, Spyrounm, Iversen BS, White MA, Part P. Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Neurol Sci* 2002;195(1): 1-10
- Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B et al. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocyte through generation of reactive oxygen species. *Aquat Toxicol* 2001;53(1):65-76
- Scortegagna, M., Hanbauer, I. The effect of lead exposure and serum deprivation on mesencephalic primary cultures. *Neurotoxicol.* 1997;18:331-339
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwinska M, Kaminska T, Sniezko R et al. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species production in cell cultures. *Toxicology* 2000;145 (2-3):159-171
- Wong KL, Klaassen CD. Tissue retention of cadmium in rats during postnatal development. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;53:343-353
- Wong KL, Klaassen CD. Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;63:330-337
- Zheng H, Berman NE, Klaassen CD. Chemical modulation of metallothionein I and III mRNA in mouse brain. *Neurochem Int* 1995;27:43-58