

중금속에 의한 HL-60 세포의 Apoptosis 유도

원광대학교 의과대학 예방의학교실, 신경과*, 전북대학교 의과대학 예방의학교실**

김남송 · 성태호 · 조광호* · 염정호** · 고대하**

— Abstract —

Induction of Apoptosis by Heavy Metals in HL-60 Cells

Nam Song Kim, Tae Ho Seong, Kwang Ho Cho*,
Jung Ho Youm**, Dai Ha Koh**

*Department of Preventive Medicine, College of Medicine, Wonkwang University,
Department of Neurology, Wonkwang University Hospital*, Department of Preventive Medicine,
College of Medicine, Chonbuk National University***

Objectives : Apoptosis induced by metals and metal-related deleterious conditions has only recently been studied. Although the toxic effects of heavy metal are well described, little is known about the mechanism of apoptosis by heavy metal toxicity. This study is designed to define the induction of apoptosis by which heavy metals exert the cytotoxic effect on human promyelocytic leukemic HL-60 cells.

Methods : After the incubation with CdCl₂, Na₂SeO₃ and HgCl₂, viability of the cells were measured by MTT assay. DNA fragmentation was analyzed by electrophoresis. For measurement of caspase 1 and 3-like proteases activity, the whole lysates were subjected to the proteolytic cleavage and then measured by using fluorospectrometry. c-JUN N-terminal kinase (JNK) activity was detected by an in vitro kinase assay. Transcriptional activities of activating protein-1 (AP-1) and nuclear factor-kB (NF-kB) were measured by electrophoresis mobility shift assay (EMSA).

Results : Cadmium (120μM) and selenium (30μM) induce the apoptosis of HL-60 cells which is characterized by the ladder pattern of DNA fragmentation. Cadmium and selenium induce the activation of caspase-3 in a time dependent manner. They also increase the phosphotransferase activities of c-JUN N-terminal kinase (JNK) in cadmium and selenium treated HL-60 cells. Furthermore, cadmium and selenium increase the activation of transcriptional factors including AP-1 and NF-kB.

Conclusions : These results suggest that cadmium and selenium induce the apoptotic death of HL-60 cells via activation of DEVD-specific caspase, JNK and transcriptional factors such as AP-1 and NF-kB.

Key Words : Apoptosis, Cadmium, Selenium, Caspase, JNK, AP-1, NF-kB

〈접수일 : 1999년 9월 20일, 채택일 : 1999년 11월 10일〉

교신저자 : 김 남 송 (Tel : 0653-850-6782) E-mail : knsong@wonms.wonkwang.ac.kr

* 이 논문은 1998년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨.

서 론

중금속 독성에 관한 초기 연구는 중금속에 급성 및 만성으로 노출되었을 때 표적장기인 신장과 간장 및 고환 등의 조직이나 세포에서의 중금속 축적, 중금속 유입과정 및 유입된 중금속의 세포내 대사과정에 참여하는 여러 효소와의 상호작용 및 독성에 관한 것들로 요약된다(Agarwal, 1988; Goyer, 1996).

최근 산업사회의 발달로 생물학적 농축을 거친 중금속들에 대한 체내 독성 및 반응에 관심이 모아지고 있는데, 특히 체내 일차 방어작용과 함께 총체적인 조절작용을 수행하는 면역체계에서의 중금속의 효과는 중요한 면역학적 및 독성학적 연구의 대상이 된다. 한편, 카드뮴 및 수은을 포함한 중금속의 독성 및 인체에 미치는 영향에 대한 현재까지의 연구와 함께 아직 밝혀지지 않은 중금속의 독성 기전에 관한 연구들이 여러 방면에서 활발히 진행되고 있는데, 중금속의 세포독성기전과 발암작용에 있어 세포사 및 세포신호전달체계가 관여한다는 여러 연구 결과들(Azzouri 등, 1994; Beyersmann과 Hechtenberg, 1997; Wang과 Templeton, 1998)이 보고되면서, 카드뮴 및 수은을 포함한 중금속의 세포독성 발현과 세포사와의 관련성에 대한 관심이 점차 높아지고 있다.

최근 중금속의 세포에 대한 독성기전에 세포고사(apoptosis)가 관여한다는 연구 결과들이(Lohmann과 Beyersmann, 1993; Azzouri 등, 1994; Shenker 등, 1997; Habeebu 등, 1998) 제시되면서, 중금속이 세포고사에 미치는 영향과 동시에 세포고사 유도 기전에 대한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다. 세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 기관의 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 세포의 계획된 죽음(programmed cell death)을 말한다(Wyllie, 1980). 세포고사는 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절받는 생리과정으로, 세포질 응축(cellular shrinkage), chromatin의 응축, 세포막의 수포화 현상 및 DNA의 분절(internucleosomal DNA fragmentation) 등이 수반되는데, 이러한 현상을 일으키기까지는 세포내부의 복잡한 신호전달과정을

거치게 된다(Wyllie, 1980; Cohen, 1993; Klaus와 Davide, 1998).

세포고사의 유도 기전은 종양치사인자(tumor necrosis factor)에 의한 세포사멸 연구와 함께 일부 신호전달기전이 밝혀지면서 시작되었는데, 이 과정에 caspase계 cysteine proteases(caspase family cysteine proteases)나 MAP kinase(mitogen activated protein kinase)와의 관련성이 제시되고 있다(Xia 등, 1995; Alnemri 등, 1996; Klaus와 Davide, 1998). 또한 세포고사에 관한 많은 분자생물학적 지식이 축적되어지면서, 세포고사의 기전이 AP-1(activator protein-1), NF-kB와 같은 초기 반응 유전자(early immediate gene) 등의 전사인자(transcriptional factor)와 많은 관련이 있음이 알려졌다. 그러므로 이러한 인자들의 활성화 여부는 중금속의 세포고사 연구에 중요한 단서가 될 수 있을 것이다.

중금속이 세포고사에 미치는 영향에 대한 연구는 최근이야 시작되었으며 따라서 이에 대한 정보 역시 매우 제한되어 있는 실정이다(Corcoran 등, 1994). 현재까지의 연구는 실험동물 또는 시험관내 실험에서 조직 또는 세포가 중금속에 노출시 폭로량과 시간의 경과에 따라 괴사 또는 세포고사를 일으키는 것으로 알려져 있으나, 그 유도기전 및 기전에 관여하는 물질에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다(Beyersmann과 Hechtenberg, 1997; Wang과 Templeton, 1998). 따라서 본 연구에서는 중금속의 종류, 농도 및 노출시간을 고려하여 중금속에 의한 세포고사의 현상과, 세포고사 과정에 관여하는 caspase cysteine protease, c-Jun N-terminal kinase(JNK) 및 전사인자(transcriptional activator)인 AP-1과 NF-kB 활성화여부를 규명함으로써 중금속의 세포고사 연구를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

Abbreviations used: JNK, c-JUN N-terminal kinase; AP-1, activating protein-1; NF-kB, nuclear factor kappa-B; EMSA, electrophoretic mobility shift assay.

대상 및 방법

1. HL-60 세포주 배양

사람 백혈구 암세포주인 HL-60 는 CO₂ 세포배양

기에서(37 °C, 5 % CO₂) 10 % fetal bovine serum(PAA Laboratories, Austria)이 포함된 RPMI 1640(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 배양하였다. 약 48시간 주기로 RPMI 1640 배양액을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 카드뮴(cadmium chloride, CdCl₂, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 셀레늄(sodium selenite, Na₂SeO₃, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 및 수은(HgCl₂, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 처리한 뒤 세포의 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2. 세포 활성도 측정

세포의 활성도는 MTT(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) assay를 이용하였다. 간단히 하면 세포배양판(96-well plate)에 세포를 200 µl씩 분주한 후, 3시간이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 중금속을 처리한 다음 MTT를 100 µg/ml씩 넣어주었다. 4시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 100 µl의 10 % SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 동안 37 °C 5 % CO₂ 세포배양기에서 방치한 다음 ELISA reader로 565 nm의 흡광도에서 측정하였다.

3. Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포를(2×10⁶ cells) 4 °C에서 15분 lysing buffer(1 % TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 20,000 x g로 15분 동안 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻은 상층액은 BCA (Bicinchoninic acid, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA)법으로 정량하여 assay buffer(100 mM Hepes, 10 % sucrose, 0.1 % Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광표지된 기질 (YVED-AMC 혹은 DEVD-AMC)과 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 Fluorometer (Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다. 이때의 파장은

excitation wavelength(380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다. 기질은 CPP32-like caspase의 경우 fluorogenic substrate 인 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD(Calbiochem Co, San Diego, CA, USA) 50 µM을 ICE-like caspase는 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD(Calbiochem, San Diego, CA, USA) 50 µM을 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다.

4. DNA추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Madison, WI, USA)를 이용하여 추출하였다. 먼저 중금속이 처리되었던 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37 °C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거한 후 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70 % 에탄올에 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 Spectrophotometer(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)하에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 µg을 1.8 % agarose gel에서 전기영동 (50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 하에서 DNA 분절을 관찰하였다.

5. Western blotting

배양된 HL-60 세포에 중금속을 처리한 일정 시간 후에 채취하여, cold Hank's balanced salt solution(HBSS)로 2회 세척하였다. 얻은 세포는 RIPA 용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포부유액에 2 x sample buffer와 섞어 100 °C에서 3분간 끓인 후, 10 % sodium dodesyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose mem-

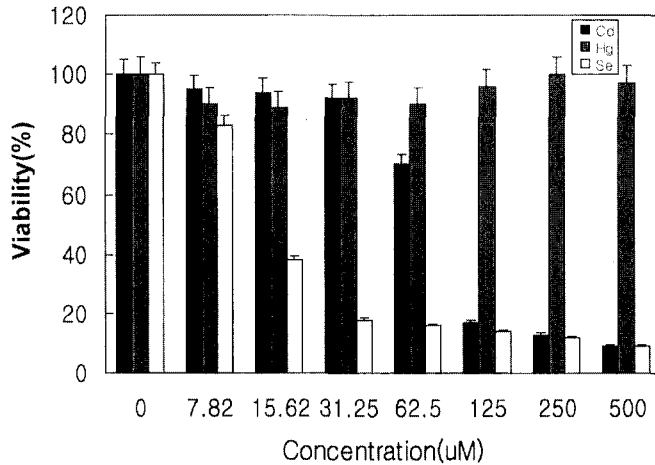


Fig. 1. Cadmium and selenium decreased the viability of HL-60 cells in a dose-dependent manner.

brane으로 4 °C, 30 V에서 16시간 동안 transfer 한 후 blocking buffer(10 % skim milk)로 상온에서 2시간 반응시켰다. Phospho-p38(NEB Co, Beverly, MA)에 대한 항체를 Tris-buffered sample saline에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. 이차항체인 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase(TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

6. In vitro kinase assay of JNK

배양된 HL-60세포에 중금속을 처리한 일정 시간 후에 세포를 모아서 이를 cold HBSS로 2회 원심세척하였다. 세포 침전체에 1 ml의 Extraction buffer(EB buffer)를 가하여 30분 용해시킨 후, 30분 원심분리(12,000 rpm)하여 세포부유액을 얻었다. 이 상청액을 BCA(Bicinchoninic acid, Sigma) 방법으로 정량하였다. 이 세포부유액(500 µg 단백질)에 anti-JNK(Santa Cruz CO., Santa Cruz, CA, USA) 항체를 1 µg씩 넣고 얼음에서 1시간 30분 반응시켰다. 이때 20~30분 간격으로 잘 흔들어주었다. 여기에 10 % (v/v)의 Pansorbin (Calbiochem Co, San Diego, CA,

USA) 용액 100 µl씩을 넣은 후 얼음에서 1시간 반응시켰으며 이때 20분 간격으로 흔들어주어 반응이 잘 진행되도록 해준다. 이 반응액은 4,000 rpm 에서 5분 원심세척하여 상층액은 버리고 침전체는 다시 동일 EB buffer로 한번 세척 후, PAN buffer(10 mM Pipes, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1 % aprotinin)를 사용하여 2회 더 세척하였다. 여기에 1 µg GST-cJUN 단백질과 2 µCi의 γ-32P ATP 를 최종 20 µl의 kinase reaction buffer (Tris-HCl pH 7.5, 20 mM, MgCl2 20 mM, DTT 2 mM, cold ATP 20 mM)에 넣고 진탕하여 재 현탁시킨 후 37 °C 에서 10분 반응시켰다. 여기에 20 µl의 SDS-PAGE sample buffer를 넣고 98 °C 에서 5분 간 끓인 후 12.5 %의 SDS-PAGE 에서 단백질을 분리 전개시켰다. 단백질이 분획된 gel은 gel drier(Bio-Rad Co, Hercules, CA, USA)를 이용하여 말린 후 auto-radiography에 의해서 JNK의 phosphotransferase 활성정도를 측정하였다. JNK 의 기질인 GST-cJUN 단백질은 full sequence cJUN cDNA의 아미노산 서열 1~79까지 만을 pGEX 2T vector에 삽입후에 E. coli BL~21(DE3)에서 발현시켰다. E. coli에서 발현된 GST-cJUN 단백질은 glutathione-conjugated Sepharose beads (Pharmacia Co, Sweden)을 이용하여 순수분리한 후 정량하여 사용하였다.

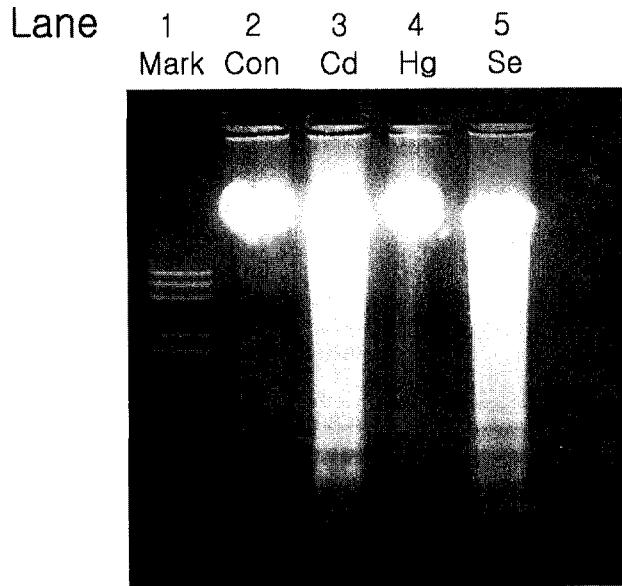


Fig. 2. Cadmium and selenium induced the ladder pattern fragmentation of genomic DNA in HL-60 cells.

7. 핵단백질의 추출

세포를 200 μ M PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 20 μ M pepstatin A, 100 μ M leupeptin 및 100 μ M antipain이 들어 있는 저삼투압 용해용액과 10 분간 얼음에서 팽창시킨 후 Nonidet P-40를 0.1 %되게 반응시키고 2500 RPM에서 원심분리하여 세포질액만을 버린 후 pellet만을 모아 저삼투압 용액과 고염완충용액을 넣은 후 핵막을 터뜨려 핵단백질만을 모아 정량한 후 5-10 μ g만을 EMSA에 이용하였다. 단백질의 표준농도는 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF-kB의 활성도 측정을 위한 NF-kB의 consensus binding site을 가진 oligonucleotide probe는 5'-ccg gCC GGT TAA CAG AGG GGG CTT TCC GAG; 5'-ccg gCT CGG AAA GCC CCC TCT GTT AAC CGG이며 AP-1는 5'-AAG GCG CTT GAT GAC TCA GCC GGA A; 5'-AAG GTT CCG GCT GAG TCA TCA AGC G를 합성하여 10 mM Tris-HCl 용액

(pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT 함유)에 희석한 후 85 °C에서 5분간 변성시킨 후 실온에서 annealing한 후 100 ng을 Rediprime kit(Amersham, England)을 이용하여 32P를 부착시켰다. 방사선 동위원소가 부착된 probe는 5-10 μ g의 핵단백질과 실온에서 30분간 반응시킨 후 냉운실에서 4 % polyacrylamide gel에 걸어 0.5 X TBE buffer로 전기영동하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF-kB 와 AP-1활성을 측정하였다.

9. 통계학적 검정

결과는 3회의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균과 표준편차를 산출하여 표시하였다. 통계검정은 반복된 일원분산분석(repeated one-way ANOVA)을 이용하였다.

결 과

1. 중금속이 세포의 생존에 미치는 영향

중금속이 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 중금속의 농도를 변화시키며 18시간 후 치사도를 MTT 방법으로 측정하였다. 카드뮴은 62.5

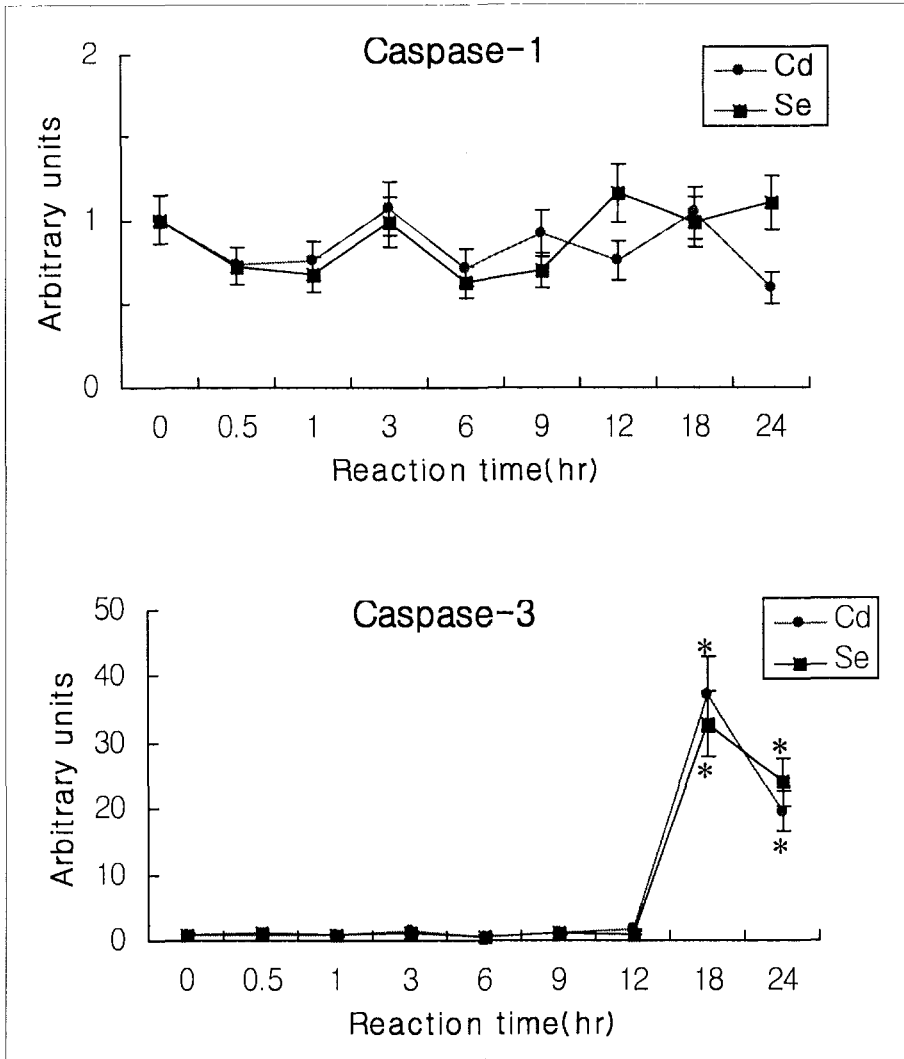


Fig. 3. Cadmium and selenium increased the activity of caspase 3-like cysteine proteases in HL-60 cells.

μM 이하의 농도에서는 HL-60 세포의 생존율에는 유의한 변화가 없었으나, $125 \mu\text{M}$ 이상의 카드뮴 농도에서는 생존율이 지속적으로 감소하여 $500 \mu\text{M}$ 의 농도에서 9 %로 감소하였다. 셀레늄은 $7.82 \mu\text{M}$ 이하의 농도에서 세포생존율의 유의한 변화가 없었으나, $15.62 \mu\text{M}$ 의 농도에서 38 %로 감소하였으며, 이후 농도 의존적으로 지속적으로 감소하여 $500 \mu\text{M}$ 의 농도에서 9 %로 감소하였다. 수은은 실험농도 조건하에서 농도의 증가에 따른 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 1).

중금속을 처리했을 때 세포죽음의 기전이 세포포

사 과정에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기에, DNA를 추출하여 1.5 % agarose gel에 전기영동 후 DNA 분절현상을 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, 카드뮴 $120 \mu\text{M}$, 셀레늄 $30 \mu\text{M}$ 농도로 각각 처리 18시간 후 사다리형의 DNA 분절이 관찰되었으나, 수은은 $60 \mu\text{M}$ 전후의 어떠한 농도에서도 DNA 분절이 관찰되지 않았다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서 수은과 Caspase, JNK, AP-1 및 NF- κB 와의 관련성에 대한 실험은 제외하였다.

2. 중금속이 Caspase 활성화에 미치는 영향

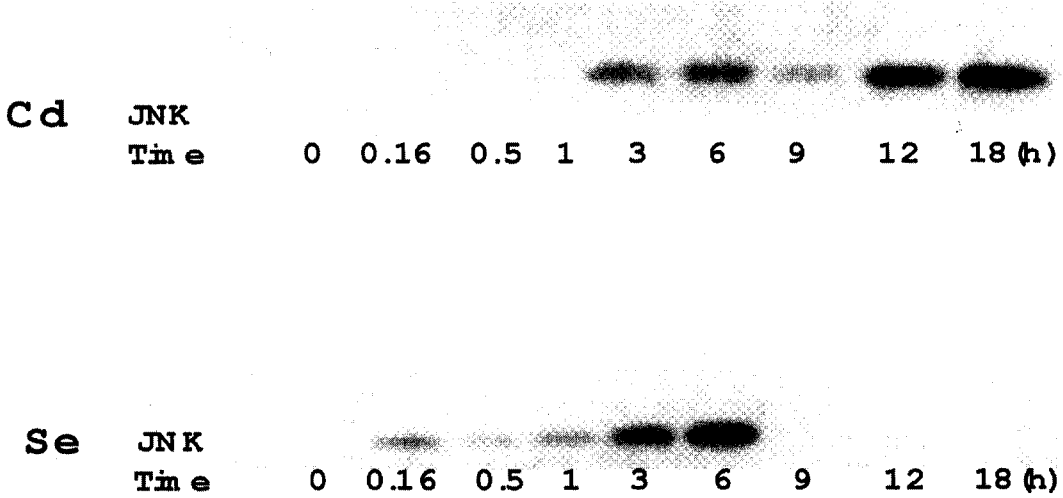


Fig. 4. Cadmium and selenium increased the phosphotransferase activity of c-Jun N-terminal kinase(JNK) in HL-60 cells.

중금속 처리에 의한 세포고사가 caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 caspase계 cysteine proteases 중에서 ICE-like cysteine protease (YVED-specific protease) 및 CPP32-like cysteine protease(DEVD-specific cysteine protease)의 활성 정도를 조사하였다(Fig. 3). 카드뮴 120 μ M, 셀레늄 30 μ M의 농도로 처리시 caspase-1의 활성은 시간의 경과에 따라 유의한 변화를 보이지 않았으나, caspase-3의 활성은 카드뮴과 셀레늄 처리시 공히 18시간째 각각 37.3 unit, 32.8 unit로 최고의 활성을 보인 후($p < 0.05$) 24시간째 19.6 unit와 24.1 unit로 감소하였으나 대조값에 비하여 높은 활성을 보였다(Fig. 3, $p < 0.05$).

3. 중금속이 c-Jun N-terminal kinase 활성화에 미치는 영향

MAP kinase 중 세포고사의 신호전달을 담당하는 것으로 알려진 c-JUN N-terminal kinase(JNK)의 중금속에 의한 영향을 조사하였다. 중금속 처리후 시간별로 HL-60 세포로부터 JNK1의 항체를 이용하여 침전시킨 후 그 기질인 cJUN N-terminal(cJUN N-terminal, 1-79 아미노산) 단백질과 반응시켜서 기질의 phosphotransferase

활성을 측정하였다. 카드뮴 120 μ M 처리후 JNK1 활성은 1 시간 후부터 점차 증가하기 시작하여 12시간째 반응초기에 비하여 8배 정도의 현저한 증가를 보이다가 18시간째 반응초기 보다 11.5배 정도 높은 최고치 효소활성을 보였다(Fig. 4). 셀레늄 30 μ M 처리후 JNK 활성은 15분 후에 활성이 시작되어 6시간째 반응초기에 비하여 최고치 효소활성을 보이다가 이후 급격하게 활성이 저하되었다(Fig. 4).

실험에 사용된 단백질 상청액의 일부를 취하여 SDS-PAGE를 수행한 후 JNK1 blotting을 하였을 때, p46, p54의 위치에 동량으로 나타남을 확인하였다(그림으로 제시하지 않았음).

4. 중금속이 전사인자 AP-1 및 NF-kB 활성화에 미치는 영향

전사활성인자인 AP-1 및 NF-kB는 세포의 일반적인 기능과 세포고사와 연관되어 있다. 중금속 처리후 핵추출물에서 AP-1 및 NF-kB의 활성여부를 electroporetic mobility shift assay(EMSA) 방법을 통하여 조사하였다(Geong과 Jue, 1997). 카드뮴 120 μ M 처리 후 HL-60세포의 AP-1의 활성은 초기반응에 비하여 반응 30분에 증가된 활성을 보이다가 이후 감소하였으며, 셀레늄 30 μ M 처리후

AP-1 활성은 초기반응에 비하여 시간의 경과에 따라 증가하다가 반응 6시간 부터는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5)

중금속 처리 후 NF- κ B의 활성여부를 EMSA를 통해서 알아본 결과, 카드뮴 처리후 NF- κ B의 활성은 반응초기에 비하여 6시간까지 대체로 증가된 활성을 보이다가 이후 급격한 감소를 보였으며, 셀레늄 처리후 NF- κ B의 활성은 반응초기에 비하여 1시간 까지 증가된 활성을 보이다가 이후 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6).

고 찰

세포고사에 대한 연구를 통하여 중금속의 세포 독성기전을 밝히기 위한 연구가 시도되고 있으나 이에 대한 정보는 매우 제한되어 있으며 (Corcoran 등, 1994), 그 유도기전 및 기전에 관여하는 물질에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다(Beyersmann과 Hechtenberg, 1997; Wang과 Templeton, 1998). 중금속이 세포고사를 일으키는 데는 중금속의 종류와 농도가 중요하게 작용한다. 구리, 철, 아연과 같은 생물학적 필수금속 부족시 세포고사를 유발하나 과량 축적시 세포고사가 아닌 괴사를 유발하게 된다(Buja 등, 1993; Haq 등, 1995). 카드뮴, 크롬 및 셀레늄과 같은 중금속은 세포고사와 괴사를 모두 유발하는데, 일반적으로 소량에 폭로시 세포고사를 과량 폭로시 괴사와 관련이 있다(Buja 등, 1993). 또한 중금속의 종류에 따라 세포고사의 유도에 특이한 기전을 나타내는데, 아연은 세포고사를 억제하는데 중요한 역할을 하는 중금속으로, endonucleosomal 분절과 연속적으로 세포용해(cytolysis)를 방지하여 세포고사를 억제하므로 아연 결핍시 방어인자의 제거로 세포고사가 일어나게 된다(Sunderman, 1995). 발암성 크롬은 DNA와 직접 작용하여 DNA-크롬 복합체를 형성함으로써 중금속에 의한 또 다른 가능성의 세포고사 유도기전을 제시하고 있다(Blankenship 등, 1994).

중금속에 의한 세포고사의 경우 몇 가지 공통된 기전이 제기되어 왔는데, 예를 들면 구리 결핍시 세포고사와 관련된 endonuclease를 유도한다든지 (Rao 등, 1993), 소량의 셀레늄에 폭로시 Ca^{2+} ,

Mg^{2+} 의존 endonuclease를 활성화시켜 세포고사를 유도한다(Lu 등, 1994). 카드뮴은 칼슘 가동화를 통하여 endonuclease를 활성화시키는데(Azzouri, 1994), 세포내 칼슘 변화가 중금속 독성에 의해 유도되는 세포고사와 관련한 endonuclease 활성화에 중요한 인자가 된다. 다른 공통기전은 산화적 스트레스(oxidative stress)로서 생물학적 필수 금속이 부족한 경우나 독성중금속에 폭로된 경우 모두 활성 산소종(reactive oxygen species)과 같은 reactive-free radical을 생성하여 세포고사를 유도하는 것으로 설명된다(Nath 등, 1996; Hultberg와 Andersson, 1998).

세포고사는 괴사와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절되는 생리과정이다(Wyllie, 1980; Cohen, 1993). 일반적으로 세포가 심각한 상해를 입었을 경우에 나타나는 괴사는 세포막의 파괴, 세포의 팽창(swelling), 용해(lysis)를 동반한다. 반면에 세포고사 현상은 빠른 세포탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 수포화 현상(blebbing), 세포질내의 칼슘(calcium) 농도의 증가, chromatin의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절 형성, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다(Cohen, 1993; Klaus와 Davide, 1998). 본 연구에서도 중금속에 의해서 acute promyelocytic leukemia에서 유래한 HL-60 세포에서 세포고사가 일어남을 알 수 있었다. 카드뮴 120 μ M과 셀레늄 30 μ M을 세포에 처리했을 때 세포생존률의 감소와 함께 세포고사의 특징중의 하나인 DNA 분절이 관찰되었다(Fig. 2). 중금속에 의한 직접적인 DNA 분절이 보고되는 예도 있지만, 일반적으로 중금속을 고농도로 처리한 상태에서는 세포고사가 아닌 괴사를 일으키게 된다. 그러므로 본 실험에서 나타나는 DNA 분절은 중금속에 의한 직접적인 영향보다는 세포내의 다른 신호전달체계를 통해 일어나는 것임을 알 수 있다. 본 실험에서 수은은 60 μ M 전후의 어떠한 농도에서도 사다리형의 DNA 분절이 관찰되지 않았다. 그러나 무기수은 35 μ M을 신장세포에 처리시 세포생존률의 감소와 DNA 분절이 관찰된 Duncan-Achanzer 등 (1996)의 연구와 유기수은을 T 세포에 처리시 세포

고사의 증가를 보인 Shenker 등(1997)의 연구와는 상이한 차이를 보여, 수은이 HL-60 세포에 세포고사가 아닌 세포괴사를 일으켰을 가능성을 제시하며 추후 다른 세포를 이용한 연구가 요구될 것으로 사료된다.

세포고사를 유발시키는 신호전달기전에서 중요한 기전중 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 효소 활성부위에 모두 cysteine 을 가지고 있는 단백질 분해효소로서 지금까지 14가지가 알려져 있으며 이중 caspase-3(CPP32, Yama)의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다(Allen 등, 1998; Widmann과 Gibson, 1998). Caspase의 작용은 표적기질(substrate)에 따라 아미노산 배열중 DEVD를 인식해서 절단하는 CPP32-like caspase(caspase-3)와 YVAD를 인식해서 절단하는 ICE-like caspase로 대별된다. 일단 caspase-3가 활성화가 되면 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), lamin, MAPK/ERK kinase kinase (MEKK), 및 다른 caspases등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달을 조절한다(Allen 등, 1998; Widmann과 Gibson, 1998). 본 연구에서도 카드뮴과 셀레늄을 HL-60 세포에 처리시 시간의 경과에 따라 caspase-1은 유의한 변화가 없었으나, caspase-3의 활성화는 처리후 18시간째 현저하게 증가함을 보여(Fig. 3) 중금속에 의한 세포고사 과정에 CPP32-like cysteine protease가 관여함을 알 수 있다.

JNK는 UV광선, interleukin-1, TNF- α , 및 CD28 등의 자극에 의해서 활성화된다(Reap 등, 1997). 특히 MAPK/ERK kinase kinase (MEKK), JNK-activating kinase를 과발현 시키면 fibroblast에서 치사효과가 있고, 강력한 세포고사 유발물질인 TNF- α 가 JNK를 활성화시키기 때문에, 본 연구에서도 JNK의 신호전달 기전이 중금속에 의해 유도되는 세포고사에 관여할 수도 있다고 추측된다. JNK 활성화에는 MEK4/SEK에 의한 Thr-183, Tyr-185위치에 2개의 인산화가 필요하다. 활성화된 JNK는 transcription 인자인 c-Jun, ATF-2, Elk-1등을 인산화시킴으로써 이들을 활성화시킨다(Hai와 Curran, 1991; Verheij 등, 1998). 만약 HL-60 세포에서 중금속에 의해

JNK가 활성화 된다면 이 신호전달에 의해 다른 단백질이 생성되어 이 새로운 단백질이 세포고사에 영향을 미칠 수 있다고 가정할 수 있다(Matsuoka와 Igisu, 1998). 본 연구에서는 HL-60 세포에 카드뮴과 셀레늄을 처리했을 때 카드뮴은 약 12시간 후, 셀레늄은 3시간 후 JNK가 강하게 활성화됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이는 카드뮴을 신세포에 처리한 후 30분에서 8시간까지 일시적인 JNK의 활성화를 보인 Matsuoka와 Igisu(1998)의 연구와도 일치하여 중금속 처리시 HL-60세포의 세포고사 현상은 MAP kinase중 JNK 활성화에 의하여 매개됨을 알 수 있다.

전사활성인자인 AP-1은 c-JUN family의 homodimer 혹은 cJUN 및 cFOS families의 heterodimer에 의해서 구성되어 있다(Angel과 Karin, 1991). 본 연구의 Fig. 4에서 중금속에 의해서 JNK의 활성화가 이루어졌기 때문에 전사활성인자인 AP-1의 활성여부를 조사하였다(Fig. 5). 본 연구에서 카드뮴과 셀레늄 처리시 AP-1은 초기에 활성을 보인후 시간의 경과에 따라 감소하였다. 역시 전사인자인 NF-kB는 p50/p65 두 개의 subunit으로 이루어진 단백질로, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, M-CSF등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하는 역할을 한다. 또한 NF-kB는 각기 다른 자극에 의해서 발생하는 세포고사에 저항성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. NF-kB는 자극이 없을 때에는 억제 단백질인 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 와 결합하고 있어, 핵안으로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I κ B- α 나 또는 I κ B- β 가 파괴되어 NF-kB가 활성화가 된다. NF-kB의 p65 subunit가 검출된 형질전환된 쥐의 간에서 많은 세포고사 현상이 일어났은 이런 사실을 뒷받침해 준다(Beg와 Baltimore, 1996). 본 실험에서도 HL-60 세포에 중금속을 처리할 경우 NF-kB의 전사적 활성이 초기에 증가된 후 시간의 경과에 따라 감소함을 관찰할 수 있어(Fig. 6), 중금속에 의한 NF-kB의 활성화가 HL-60 세포의 세포고사를 유발시키는데 연관이 있을 것으로 생각된다.

이상의 연구결과를 종합하면, 중금속에 의한 세포고사는 CPP32-like cysteine protease, JNK 및 전사인자인 AP-1과 NF-kB 등을 매개로 한 신호전

달체계를 경위하여 유도됨을 알 수 있다. 그러나 앞으로의 연구과제로서 caspase 계열 중 전단계인 caspase 8, 9 등에 관한 연구, 세포내 칼슘의 역할, MAP kinase 경로중 JNK 이외의 단백질, NF-kB와 IκB와의 관계 등에 대한 연구가 이루어진다면 중금속에 의한 세포고사 유도경로 및 기전을 밝히고 나아가 세포고사 조절을 통한 질병의 예방 및 치료에도 응용할 수 있는 전기를 마련할 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : 중금속이 세포고사에 미치는 영향에 대한 정보와 연구는 매우 제한되어 있는 실정이며, 그 유도기전 및 기전에 관여하는 물질에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다. 이에 본 연구는 일부 중금속이 세포독성에 미치는 영향을 apoptotic signaling pathway를 통하여 알아보고자 caspase, JNK 및 전사 활성인자인 AP-1, NF-kB 등의 활성을 측정 조사하였다.

방 법 : 배양한 세포에 카드뮴, 셀레늄 및 수은을 처리한 후 MTT assay를 이용하여 세포의 활성도를 측정하였으며, DNA 분절은 전기영동 실시후 염색하여 UV등 하에서 관찰하였으며, Caspase의 활성도는 fluorometer로 proteolytic cleavage를 측정하여 결정하였다. JNK 활성도는 in vitro kinase assay of JNK를 이용하였으며, AP-1 및 NF-kB의 활성도는 EMSA를 이용하여 측정하였다.

결 과 : 카드뮴 120 μM과 셀레늄 30 μM을 HL-60 세포에 처리했을 때 세포생존률의 감소와 함께 세포고사의 특징중의 하나인 DNA 분절이 관찰되었는데, 이는 중금속에 의한 직접적인 세포독성이라기 보다는 신호전달체계를 경유한 결과로 생각된다. 카드뮴과 셀레늄을 HL-60세포에 처리시 시간의 경과에 따라 caspase-3가 현저하게 증가하여 중금속에 의한 세포고사 과정에 CPP32-like cysteine protease가 관여함을 알 수 있었다. 세포에 카드뮴과 셀레늄 처리로 JNK의 강한 활성화를 관찰할 수 있어 중금속 처리시 HL-60세포의 세포고사 현상은 MAP kinase중 JNK 활성화에 의하여 매개됨을 알 수 있었다. 또한 전사인자인 AP-1과 NF-kB도 일정시간 활성화를 유지함으로써, 중금속에 의한 AP-

1 및 NF-kB의 활성화가 HL-60 세포의 세포고사를 유발시키는데 연관이 있을 것으로 생각된다.

결 론 : 이상의 연구결과에서 중금속에 의한 세포고사는 CPP32-like cysteine protease (caspase-3), JNK 및 전사인자인 AP-1과 NF-kB 등을 경유하여 유도됨을 알 수 있어, 본 연구결과를 토대로 향후 세포고사 유도경로 및 기전을 밝히고 세포고사 조절을 통한 질병의 예방 및 치료에 응용할 수 있는 일차적인 자료로서 그 의의를 삼고자 한다.

참고문헌

Agarwal AK. Metabolic alterations in liver and testes of adult and new born rats following cadmium administration. Bull Environ Contam Toxicol 1988;40:569-575.

Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. CMLS 1998;54:427-445.

Alnemri ES, Livingstone DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 1996;87:171.

Angel P, Karin M. The role of jun, fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. Biochem Biophys Acta 1991;1072:129-157.

Azzouri BE1, Tsanaris GT, Pellegrini O, Manuel Y, Benveniste J, Thomas Y. Cadmium induces apoptosis in human T cell line. Toxicol 1994; 88(1-3):127-139.

Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kB in preventing TNF-α-induced cell death. Science 1996;274(1):782-784.

Beyersmann D and Hechtenberg S. Cadmium gene regulation and cellular signalling in mammalian cells, Toxicol Appl Pharmacol 1997;144: 247-261.

Blankenship LJ, Manning FC, Orenstein JM, Patierno SR. Apoptosis is the mode of cell death caused by carcinogenic chromium. Toxicol Appl Pharmacol 1994;126(1):75-83.

Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis: basic types and mechanism of cell death, Arch Pathol Lab Med 1993;117:1208-1214.

Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today 1993; 14:126-130.

- Corcoran GB, Fix I, Jones DP, Treinen-Mosen M, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R. Apoptosis: molecular control point in toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128:169-181.
- Duncan-Achanzer K, Jones JT, Burke MF, Carter DE, Laird HE. Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277:1726-1732.
- Jeong JY, Jue DM. Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 1997;158:4901-4907.
- Goyer, R.A. Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(Eds.), Casarett and Doull's Toxicology. 5th Ed., Pergamon Press Inc., New York, 1996:646-651.
- Habeebu SSM, Liu J, Klaassen CD. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;149(2):203-209.
- Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:3720-3724.
- Haq RU, Wereley JP, Chitambar CR. Induction of apoptosis by iron deprivation in human leukemic CCRF-CEM cells. *Exp Hematol* 1995;23(5):428-432.
- Hultberg B, Andersson A, Isalsson A. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology* 1998; 126:203-212.
- Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254: 439-459
- Lohmann RD, Beyersmann D. Cadmium and zinc mediated changes of the Ca²⁺ dependent endonuclease in apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 190(3):1097-1103.
- Lu J, Kaeck M, Jiang C, Wilson AC, Tompson HJ. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 1994;47(9): 1531-1535.
- Matsuoka M, Igisu H. Activation of c-Jun NH₂-Terminal(JNK/SAPK) in LLC-PK1 cells by cadmium. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;251: 527-32.
- Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden David, Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *J Kidney international* 1996;50:1032-1043.
- Rao MS, Yelandandi AV, Subbarao V, Reddy JK. Role of apoptosis in copper deficiency-induced pancreatic involution in the rat. *Am J Pathol* 1993;142(6):1952-1957.
- Reap EA, Roof K, Maynor K, Borrero M, Booker J, Cohen P. Radiation and stress-induced apoptosis: a role for Fas/Fas ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:5750-5755.
- Shenker BJ, Datar S, Mansfield K, Shapiro IM. Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;143:397-406.
- Sunderman Jr FW. The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci* 1995;25(2): 134-142.
- Verheij M, Ruiter GA, Zerp SF, van Blitterswijk WJ, Fuks J, Haimovitz-Freiderman A, Bartelink H. The role of the stress-activated kinase signaling pathway in radiation-induced apoptosis. *Radioth Oncol* 1998;47:225-232.
- Wang Z, Templeton DM. Induction of c-fos proto-oncogene in mesangial cells by cadmium. *JBC*, 1998;273(1):73-79.
- Widmann C, Gibson S. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273(12):7141-7147.
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: The significance of cell death. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
- Xia Z, Dickens M, Raingaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995;270:1326-1331.