

카드뮴이 인간 단핵구 세포주(THP-1)에서 cytokine 유전자 발현에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 예방의학교실, 계명대학교 동산병원 산업의학과*, 계명대학교 의과대학 해부병리학교실**

강미정 · 양선희* · 정인성* · 신동훈 · 박관규** · 서석권

— Abstract —

Effect of Cadmium on Cytokine Gene Expression in a Human Monocytic Cell Line, THP-1

Mi-Jung Kang, Seon-Hee Yang*, In-Sung Chung*,
Dong-Hoon Shin, Kwan-Kyu Park**, Suk-Kwon Suh

*Department of Preventive Medicine and Public Health,
School of Medicine, Keimyung University*

*Department of Occupational and Environmental Medicine, Dongsan Hospital,
Keimyung University**

*Department of Pathology, School of Medicine, Keimyung University***

Cadmium, a potent toxic metal, poses a serious environmental threat but the mechanism of its toxicity remains unclear. Also, cadmium is a known immunotoxic agent in animal studies and induces pathophysiological effects by modulating components of immune system.

Cytokines are being increasingly recognized as essential mediators of normal and pathologic immune response. Cells of mononuclear phagocytic system are strategically located at portals of entry in humans and therefore may be particularly at risk for cadmium exposure through contaminated air, food, and drinking water.

In the present study, we investigated the effect of cadmium cytotoxicity for the monocyte and expression of cytokine gene in the control and cadmium treated human monocytic cell lines using RT-PCR method. The results showed that cadmium inhibited cell proliferation at 0.1mM cadmium treated cells for 24 hours. The TNF- α mRNA was expressed in both control and cadmium treated cells but not IL-6 and IL-1 β .

The mRNA levels of TNF- α were examined during 24 hours culture period, at different time points. The expression of TNF- α mRNA increased in both 0.01mM and 0.1mM cadmium treated cells, but did not show dose-response relationship. According to cadmium

treated duration, expression of TNF- α mRNA was more decreased in 24 hours than 6 hours. The decreased levels of mRNA of TNF- α suggest that cadmium suppresses its production at the transcription level.

Key Words : Cadmium, Cytokine, THP-1 cell

I. 서 론

카드뮴은 산업장에서의 직업적인 폭로 뿐만 아니라, 도시의 대기나 하천수, 토양 등의 환경오염으로 인해 인체에 만성 카드뮴 중독을 일으킨다(Rom, 1992; Zenz, 1994).

카드뮴에 의한 수질오염원은 구리 또는 아연 파이프 뿐만 아니라, 산업장, 광산, 도시의 토양, 살충제 등이고, 대기의 경우는 흡연, 석탄, 기름, 목재 연소, 광산, 비료, 제련, 산성비 등에 의해 오염되어지고, 배터리와 카드뮴을 포함한 다른 품목들의 산업폐기물 매몰지들은 토양을 오염시킬 수 있다(Commission of the European Communities, 1978). 하지만, 흡연이나 오염된 음식물이 가장 많은 카드뮴 폭로의 원인이므로(Friberg et al., 1985; Rosenstock and Cullen, 1994) 현대 산업사회에서 카드뮴에 노출되는 것은 불가피하다고 할 수 있다.

카드뮴은 인간에 있어 알려진 유익한 생리적 기능이 없으며 체액이나 조직에 정상적으로 존재하지 않으므로 인체에서 검출되면 어떤 경로를 통해 카드뮴에 오염되었다는 것을 의미한다(Chowdhury and Chandra, 1987).

카드뮴 급성 독성 작용은 주로 폐나 소화기에 국한되어 발생하고, 만성독작용은 전신적으로 나타나며, 신독성, 골격계, 폐의 기종성 변화, 심혈관 질환을 포함한다(Jones and Cherian, 1990; Zenz, 1994; Clayton and Clayton, 1995).

카드뮴이 면역독성물질이라는 것은 동물실험에서는 다양하게 보고되고 있으나(Koller, 1980; Loose, 1985; Borgman et al., 1986; Stacey, 1986; Chowdhury et al., 1987; Schulte et al., 1994) 인체 면역체계에 대한 영향은 거의 알려져 있지 않다(Malave and DeRuffino, 1984; Vredevoe et al., 1985; Borgman et al., 1986; Levy et al., 1986; Palmer et al., 1987; Hernandez et al.,

1991). 카드뮴의 생체의 체액성 면역에 관한 조사에서는 항체 형성이 감소되어지며 killer 임파구의 기능이 감소되고 T 임파구의 증식을 억제시키는 효과가 있다는 보고가 있다(Stacey, 1986; Descotes, 1992; Daum, 1993).

또한 카드뮴은 설치류의 대식세포에서 탐식작용을 저해하며 세포형태를 변화시키고, 효소의 분비를 감소시키고 세포의 유착을 증가시킨다는 보고가 있다(Levy et al., 1986; Palmer et al., 1987; Hernandez et al., 1991).

카드뮴의 폭로는 용량, 경로, 기간에 따라 생체내에서 면역반응을 자극하거나 억제할 수 있으며(Horiguchi et al., 1987; Lawrence and McCabe, 1995) 생체의 실험에서 유사분열물질에 의해 유도된 임파구의 증식을 저해한다(Ciffone et al., 1989; Theocharis et al., 1991). 이러한 결과는 카드뮴의 면역독작용이 단핵구 탐식체계의 세포에 주로 작용할 것이라는 것을 암시하고 있다.

단핵구 탐식체계는 조혈간세포(hematopoietic stem cells)로 이루어지며 단핵구는 면역매개물질인 cytokine를 분비하는 주요 세포의 하나이다. cytokine는 정상적이거나 비정상적인 면역반응의 필수적 매개체로 알려져 있으며(Aggarwaw and Guttermun, 1990), 카드뮴은 면역계의 중간 조절 요소에 의해 병리 생리학적인 효과를 유도하고 인간 말초혈액의 단핵세포에서 Interleukin-1 β (이하 IL-1 β)와 Tumor necrotic factor- α (이하 TNF- α)의 분비를 저해하며 전사단계(transcription level)에서 이들의 분비를 억제한다고 보고하였다(Theocharis et al., 1994). 또한 카드뮴은 세포의 활성화에 영향을 미치지 않는 농도인 0.1mM 에서는 Interleukin-6(이하 IL-6) 분비를 감소시키며 고농도에서는 IL-6 mRNA 발현이 감소됨을 보고하여(Theocharis et al., 1994), 인체 세포에 면역독성이 있으며 다른 cytokine 분비에도 영향을 미칠 것이라고 하였다.

TNF- α 는 단핵구 계통에서 분비되는 면역매개물질의 하나로 생체내 종양세포의 괴사와 생체외에서 세포주들의 세포 증식 억제를 초래하는(Beutler and Cerami, 1989) 다양한 생리적 효과를 가지고 있다. 또한 내독소에 의한 속(shock)과 관련성이 있고, 만성 염증성 질환이나 악성 질환에서 분비가 증가됨으로써 악액질과 소모성 질환을 유발하는 인자로서 작용할 수 있기 때문에 최근에 관심이 증가되고 있다(Oliff et al., 1987).

IL-1은 많은 세포들에서 생성되나 특히, 단핵구나 탐식세포에서 많이 생성되며, 체내에서 2가지 형태로 존재하고, 면역반응과 항염증반응 모두에 관여하는 다른 표적세포들에 대해 다양한 기능을 한다(Dinarelo, 1988; Hamblin, 1989).

IL-6는 다형성의 기능을 가진 물질로서 주요 표적세포가 B세포, T세포, 그리고 간세포이며 급성 염증반응의 일차적 조절작용을 하는 것으로 알려져 있으며 단핵구와 대식세포가 주된 분비세포이므로 속주의 면역작용에 중심역할을 하는 것으로 알려져 있다(Navarro et al, 1989; Akira et al., 1990).

세포주는 동물실험 모델과 인체의 연구간의 중요한 연관성을 제공할 수 있는 것으로서, 본 실험에 이용되는 THP-1 세포는 급성 단핵구성 백혈병의 혈액으로부터 배양된 것으로 단핵구성 특이성이 있으며 다양한 면역학적인 기능과 cytokine을 분비할 수 있는 기능이 있으므로 인간 단핵구에서 카드뮴의 영향을 조사하는데 적합하다고 생각된다.

본 실험은 면역계에 있어서 카드뮴의 작용기전을 분자생물학적인 수준에서 규명하기 위하여 인간 단핵구 세포주에서의 면역반응매개물질 유전자의 발현 유무와 이들 유전자 발현에 카드뮴이 미치는 영향을 분석하였는데, 정상 및 카드뮴을 처리한 배양 인간 단핵구 세포주로부터 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α 의 mRNA 발현을 비교 관찰하고 카드뮴 농도에 따른 TNF- α mRNA 발현의 변화를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주 (인간 단핵구 세포주) :

한국세포주은행으로부터 분주받은 사람의 단핵구 세포주인 THP-1세포를 10% Fetal bovine serum 및 penicillin(100IU/ml), streptomycin(100 μ g

/ml)이 함유된 RPMI1640배양액(GIBCO-BRL)을 이용하여 5% CO₂, 36 $^{\circ}$ C 하에서 유지 배양하였다.

2. 카드뮴과 세포배양조건 :

각 계대배양시 trypan blue dye exclusion 방법으로 세포생존율을 산정하여 생존 세포수를 0.5 x 10⁶cell/ml이 되도록 하여 24시간 배양한 후 CdCl₂ (Sigma Chemical Co) 수용액이 최종농도 0.01-0.1mM이 되도록 처리하여 배양하였다.

3. 세포수와 생존율 :

카드뮴 처리후 6시간, 24시간에서 카드뮴 농도별 세포변화 형태를 광학 현미경하에서 관찰한 후 사진촬영을 하였고, hemacytometer chamber 및 trypan blue dye exclusion 방법을 이용하여 생존 세포수 및 세포활성도를 측정하였다. 각 실험은 3회씩 반복 측정하였다.

4. 투과현미경적 관찰 :

카드뮴 처리후 24시간 배양후 THP-1 세포를 원심 분리하여 시험관에 모은 후 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1M phosphate buffer, pH7.4)으로 1-4 $^{\circ}$ C에서 2시간 전고정을 하고 0.1M phosphate buffer로 세척한 후 1% OsO₄ 용액에 2시간 고정을 한 뒤 같은 buffer용액으로 세척하여 계열 ethanol로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 Luft(1961)방법에 의한 epoxy혼합물로 포맷하여 37 $^{\circ}$ C에 12시간, 60 $^{\circ}$ C에 48시간 동안 방치하여 열중합 시킨다. 포맷한 세포를 1 μ m두께로 박절한 후 toluidine blue염색을 실시하여 관찰 부위를 선택한 다음, Sorvall MT-5000형 ultramicrotome에 Dupont diamond knife를 부착하여 회백색(40-60nm)의 간접색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착시킨 뒤, Watson(1958) 및 Reynolds(1963)방법에 의한 uranyl acetate와 lead acetate로 이중 전자염색을 실시하여 Hitachi H-600형 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

5. RNA 분리와 분석 :

UltraspecTM-II RNA isolation system(Biotecx, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리 방법은 THP-1 세포주를 원심분리하여 모은 다음 5

x 10⁶ 세포당 Ultraspec™ RNA 용액을 1ml 넣은 후 여러 번 pipetting하여 용해시켰다. 4℃에 5분간 방치한 다음 Ultraspec™ RNA 용액 1ml당 chloroform 1/10부피를 넣은 후 15초간 섞은 후 얼음 또는 4℃에 10분간 방치한 후 12,000g에서 15분간 원심분리했다. 두층으로 나누어진 상층액을 40-50% 정도만 수거해 동량의 ice cold isopropanol을 첨가하여 영하 20℃에 1시간 이상 방치했다.

12,000g, 15분, 4℃에서 원심분리한 후 pellet을 잘 보면서 상층을 비워내고 냉동실에 넣어 둔 75% ethanol 500μl를 넣고 12,000g, 15분, 4℃에서 원심분리한 후 상층액을 버리고 speed vac으로 말린다. DEPC-treated water로 RNA를 분리한 다음 spectrophotometer 260nm에서 총 RNA 농도를 측정하고 영하 20℃에 보관하면서 사용하였다.

6. 역전사-중합효소연쇄반응 :

GeneAmp® RNA PCR kit (Perkin-Elmer Cetus, USA)를 이용하여, 분리된 RNA를 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하기 위한 역전사(reverse transcription) 반응을 실시하였고, 그 역전사 산물을 이용하여 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

역전사 반응은 oligo dT(16mer)를 사용하여 20μl 용량으로 시행하였으며 반응혼합액의 조성은 RNA 2μg, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 5mM MgCl₂, 1mM dATP, 1mM dTTP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 1U/μl RNase inhibitor, 2.5U/μl MuLV reverse transcriptase, 2.5μM Oligo d(T) 16 primer이며, 반응 조건은 42℃ 1시간, 99℃ 5분, 5℃ 5분으로 하였다.

중합효소연쇄반응은 10X reaction buffer(15mM

MgCl₂, 500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3) 5μl와 10mM dNTPs(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 각 1μl씩, 30μM IL-1β, IL-6 그리고 TNF-α의 sense 와 antisense(Table 1)를 각각 1μl 넣은 혼합액에 역전사반응시킨 cDNA반응 혼합액 1μl 와 2.5U Taq polymerase를 넣은 후 총 25μl 되도록 증류수를 첨가하여 용량을 맞추고 DNA thermal cycler(Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2000, USA)를 사용하여 실시하였다. PCR 반응에서 DNA denaturaion은 95℃ 1분, annealing은 56-62℃ 1분, elongation은 72℃ 1분으로 하여 35 cycles을 실시하였다.

7. 전기영동 및 유전자 발현도 측정 :

증폭된 PCR산물 10μl을 9% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide(5μg/ml)용액으로 염색하고 UV-transilluminator상에서 사진을 촬영한 후, gel documentation system(Gel Doc 100, BioRad)에서 유전자 발현 정도를 반정량적으로 측정했다.

8. 통계처리 :

세포생존수 측정치는 평균과 표준편차로 표시하였고 대조군과 각 카드뮴 농도별 비교는 t-test 를 시행하였으며 유의수준은 5%로 하였다.

III. 성 적

THP-1 세포주를 카드뮴 농도별로 처리후 세포생존율을 조사한 결과, 카드뮴 처리 후 6시간 배양에서는 카드뮴 농도에 따른 세포 생존율의 변화는 없었으나 카드뮴 처리 24시간 후에는 0.1 mM 이상에서

Table 1. PCR(Polymerase chain reaction) Oligoprimers

Gene		Sequence(5' -3')	Size of products(bp)
IL-1β	sense	CCATGGCAGAAGTACCTGATTCTGCC	1124
	antisense	TTAGGAAGACACAAATTGCATGGT	
IL-6	sense	TCATGAACTCCTTCTCCACACTCTCC	641
	antisense	CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAG	
TNF-α	sense	TCATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG	704
	antisense	TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGA	

세포생존율이 유의하게 감소했다($p < 0.05$) (Fig. 1).

카드뮴 농도 변화에 따른 세포 형태 변화 양상을 관찰하기 위해 Wright stain을 실시한 후 광학현미경으로 관찰한 결과 카드뮴 처리 6시간 후의 세포형태는 카드뮴 농도와 관계없이 카드뮴을 처리하지 않은 정상대조군과 비슷했으며, 카드뮴 처리 24시간 후는 0.06mM 이상에서 부분적으로 세포질내 공포가 나타나고 핵붕괴가 나타나기 시작했으며 카드뮴 농도가 증가할수록 세포 형태 변화가 심하게 나타났다(Fig. 2).

전자현미경(TEM)으로 THP-1 세포를 관찰한 결과, 카드뮴을 처리하지 않은 정상대조군에서는 핵과 세포질내 소기관들을 잘 관찰할 수 있었고(Fig. 3), 카드뮴 처리 24 시간후 카드뮴 농도 0.01mM에서는 세포질내에 공포가 나타나고 미토콘드리아 증창이 일어났으며(Fig. 4), 카드뮴 농도 0.1mM에서는 핵내의 염색질이 농축되고, 세포질내의 공포가 증가하였으며 미토콘드리아의 능선이 없어지는 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

카드뮴처리군과 정상대조군 사이에서의 cytokine

유전자 발현을 조사한 결과 본 실험에서는 TNF- α 는 양군 모두 발현되었으나 IL-1 β , IL-6는 발현되지 않

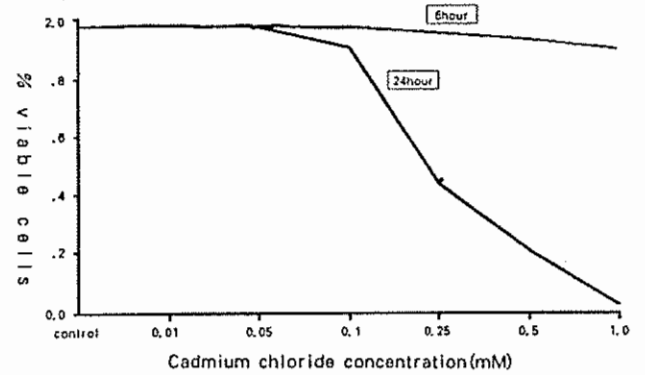


Fig. 1. The effect of cadmium chloride exposure on THP-1 cell viability. After 24hr, various concentrations of cadmium was treated. Cells were counted in hemacytometer chamber and viability was determined by trypan blue dye exclusion test. Significantly different from the corresponding control: * $P < 0.05$

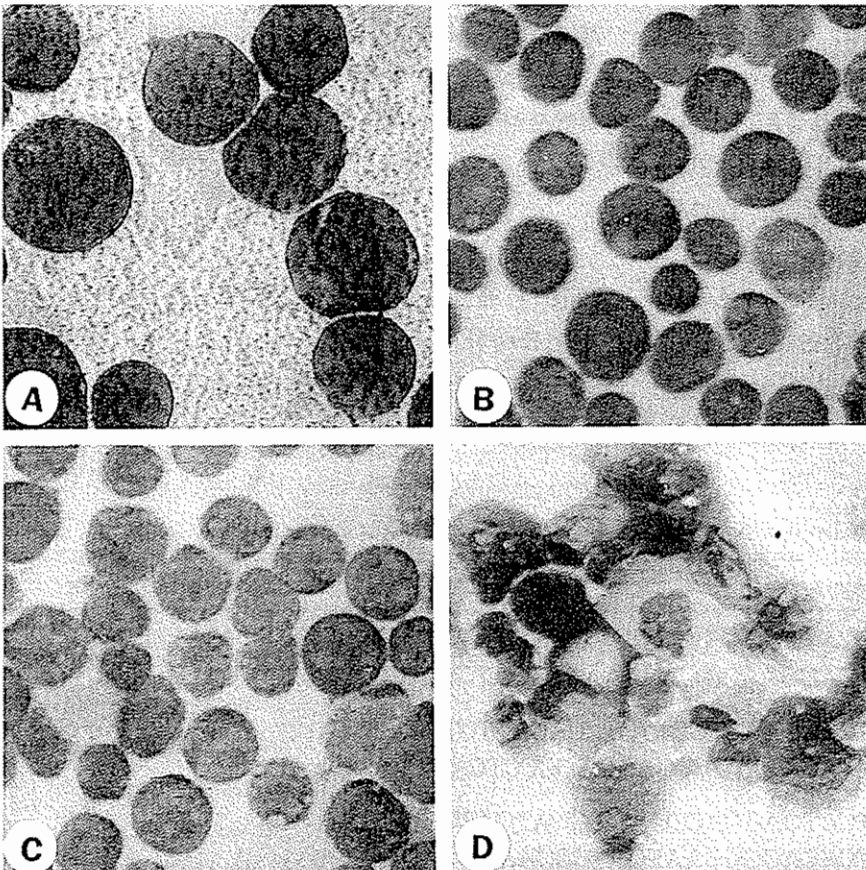


Fig. 2. Morphology of THP-1 cell after treatment of cadmium. Cells were photographed through a x20 objective. (A) control cells (B) 1.0mM cadmium treated cells for 2 hours (C) 0.06mM cadmium treated cells for 24 hours (D) 0.1mM cadmium treated cells for 24 hours.

았다(Table 2). Fig. 5는 역전사중합효소반응의 증폭산물로 전기영동을 실시한 사진으로 본 실험에 사용한 3종류의 cytokine 외에 RNA의 intactness와 농도의 정도를 알아볼 수 있는 GAPDH를 같이 실시하였다. 카드뮴 농도에 따른 TNF- α mRNA 발현의 변화 정도가 정상대조군에 비해 카드뮴 처리 6시간, 24시간 후 차이가 났으며, 전기영동을 실시한 agarose gel을 gel documentation system을 이용해 TNF- α mRNA 발현 정도를 측정된 결과 카드뮴 농도가 증가함에 따라 일정한 변화 양상은 보이지 않았으나 0.01mM 과 0.1 mM에서 모두 증가되었고,

Table 2. Expression of cytokines in control and Cd-treated THP-1 cell

cytokine	control	Cd-treated
IL-1 β	-	-
IL-6	-	-
TNF- α	+	+

+/- : indicate the expression of cytokine or not

시간의 경과에 따라 변화는 카드뮴처리 후 6시간에 비해 24시간에서 TNF- α 유전자 발현이 전체적으로 감소되는 경향을 보였다(Fig. 6, 7).

IV. 고 찰

본 실험은 인간 단핵구세포주인 THP-1을 이용하여 카드뮴의 면역독성을 관찰하고자 하였다. 카드뮴의 농도에 따른 세포생존율과 형태 변화를 관찰하고, 카드뮴 처리군 및 정상 대조군에서 IL-1 β , TNF- α 그리고 IL-6 mRNA 발현유무를 비교하였고, 카드뮴의 농도에 따른 TNF- α mRNA 발현의 변화를 조사했다.

카드뮴의 세포독성에 대한 연구결과를 살펴보면 카드뮴 농도가 0.1mM 이하에서는 세포 생존율이 감소하지 않고 24시간 후에는 세포 생존율이 유의하게 감소한다고 하였다 (Funkhauser et al., 1994). 카드뮴 처리 후 6시간이 경과했을 때는, 카드뮴 농도 1.0mM까지 세포생존율에 변화를 보이지 않았고, 카드뮴처리 24시간 후에는 카드뮴 농도가 0.08

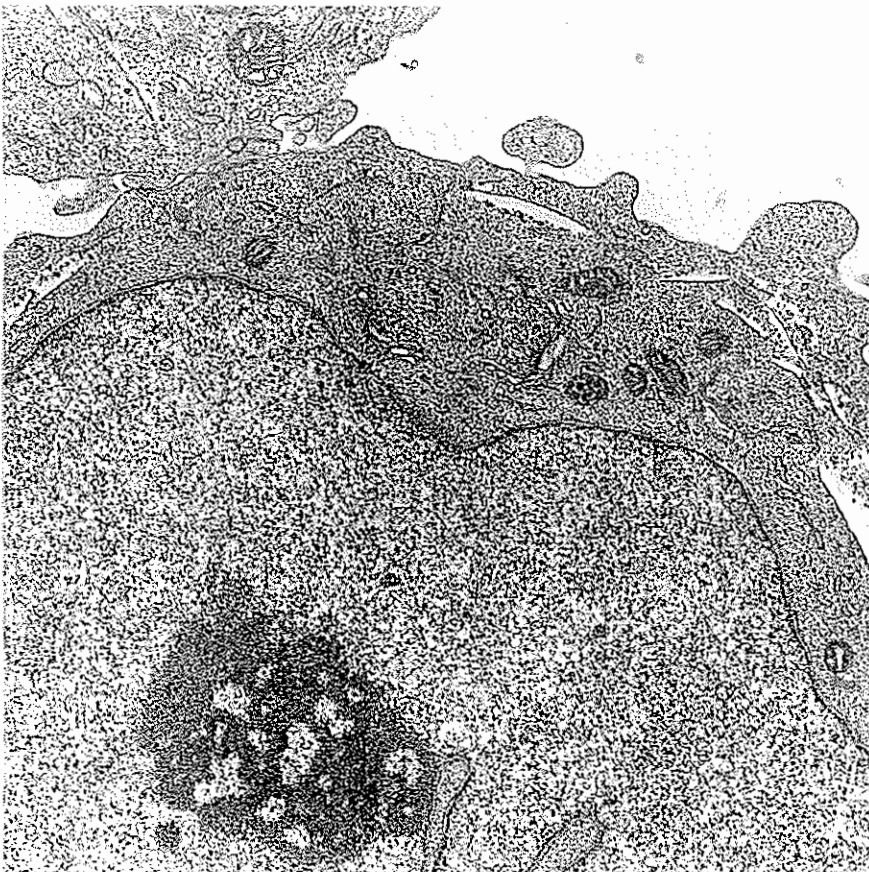


Fig. 3. The control THP-1 cell. The nucleus and intracytoplasmic organelles are well preserved (TEM, x13,600).

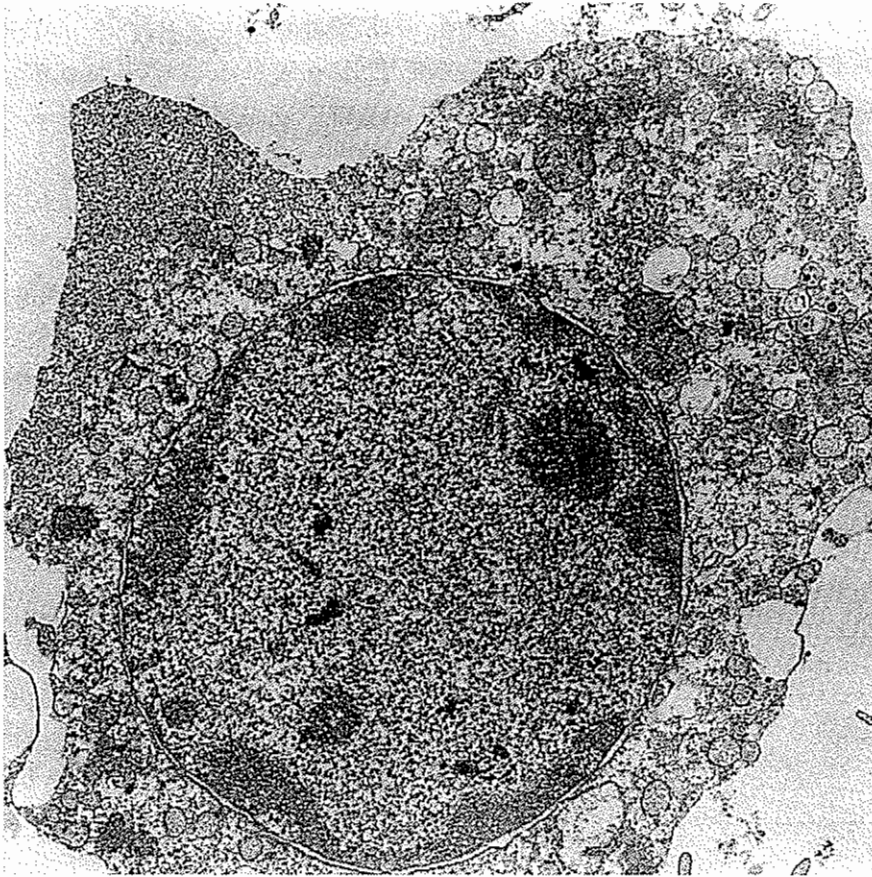


Fig. 4. The THP-1 cell after treatment of 0.01mM cadmium chloride for 24 hours shows intracytoplasmic vacuoles and mitochondrial swelling (TEM, x13,600).

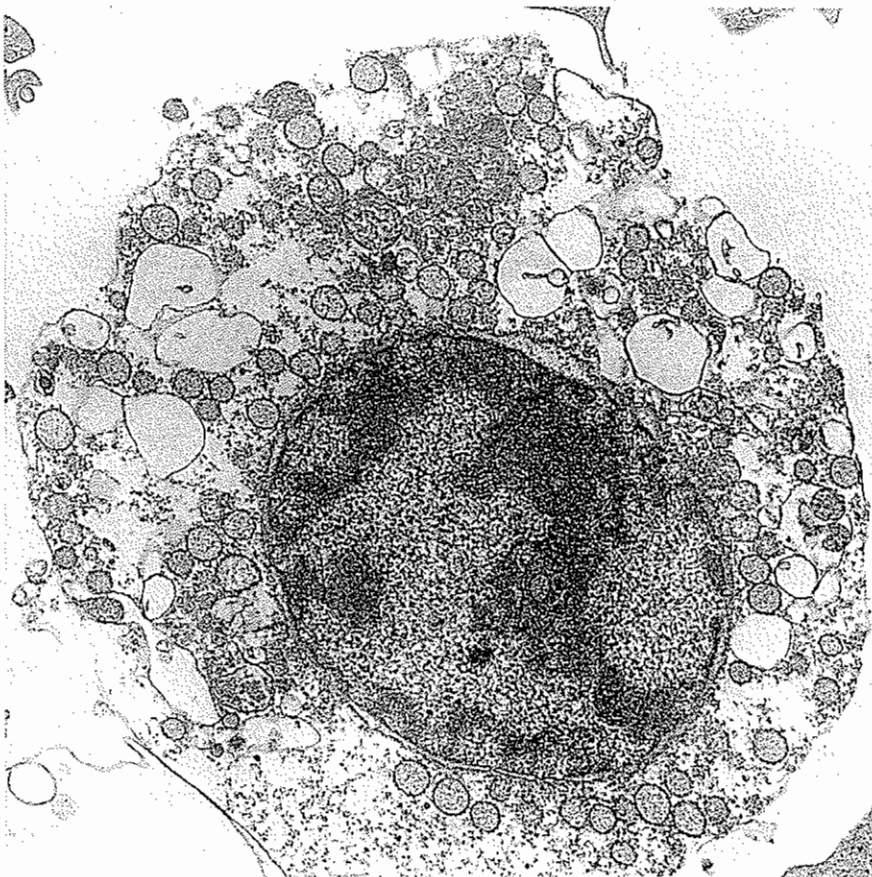


Fig. 5. The THP-1 cell after treatment of 0.1 mM cadmium chloride for 24 hours shows the intranuclear chromatin condensation, increased intracytoplasmic vacuoles and loss of cristae in the mitochondria (TEM, x13,600).

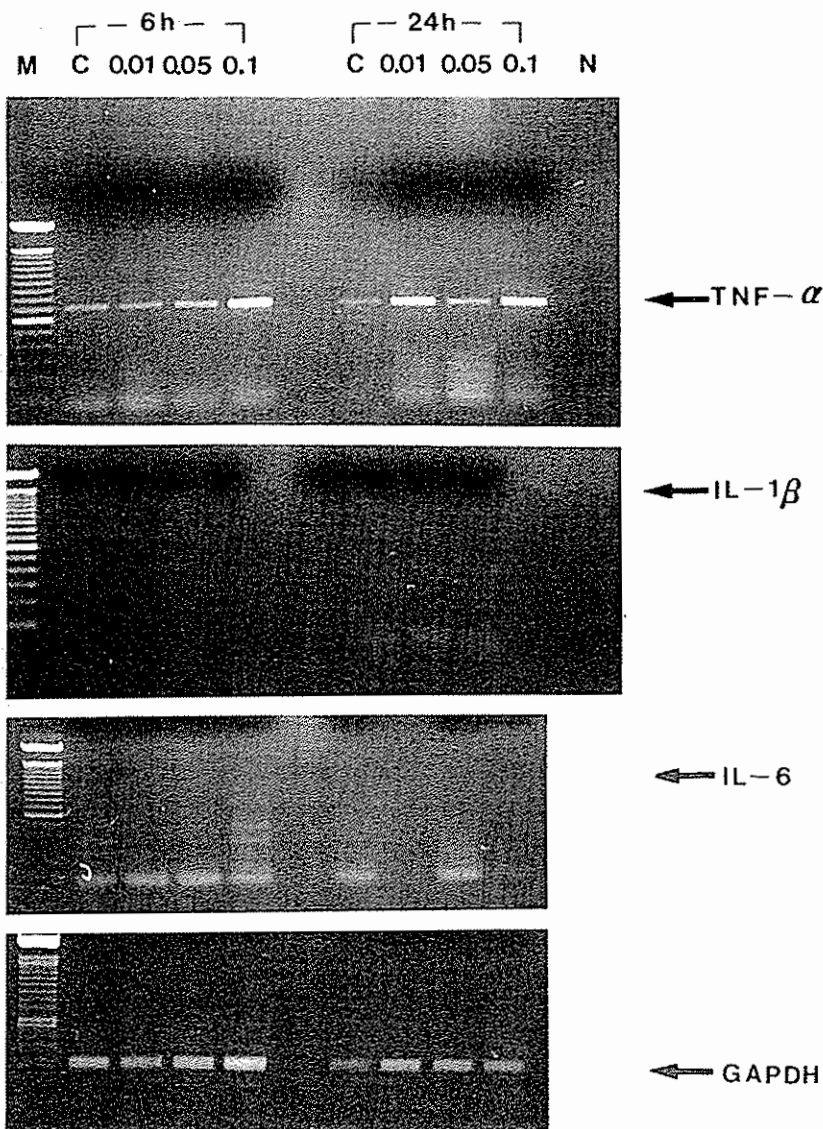


Fig. 6. Electrophoretic analysis of reverse transcription PCR amplification products from control and Cd-treated THP-1. C, N and M represent control, negative control and 100 base pair(bp) size marker for molecular weight, respectively. RT-products of GAPDH were used as a control for the amount and integrity of RNA.

mM까지는 세포생존율에서 큰 변화를 보이지 않았으나 0.1 mM 농도로 처리한 세포군에서는 세포생존율이 유의하게 감소되어 나타났다. 이것은 Funkhauser et al. (1994)이 카드뮴 농도 0.1mM 처리 후 24시간 배양에서 인간단핵구 세포의 생존율이 유의하게 감소한다는 연구 보고와 일치한다.

카드뮴으로 인한 독성은 인간과 동물들 모두에 있어서 주로 신 세뇨관에 손상이 일어난다고 알려져 있으나 Simon et al. (1947)와 Jacobs et al. (1956)의 연구 보고에 의하면, 카드뮴이온이 조직단백과 결합하여 불용성의 금속성 단백질(metal proteinates)과 안정된 금속성 메르카피드(sulfhydryl group)를 형성하고 구조의 변화를 초래하여 용해도를 감소시켜 효소활성의 저해를 초래한다고 한다.

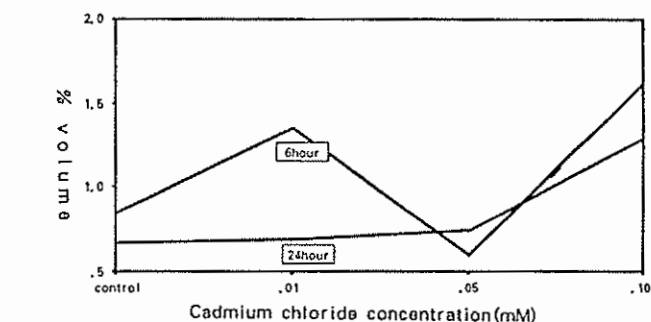


Fig. 7. Semi-quantitative analysis of TNF- α mRNA.

그러나 이러한 소견들은 광학현미경상에서는 손상 정도나 심지어 손상의 소견조차 명확하지 않으며 전

자현미경에 의한 관찰이라야 손상의 변화를 관찰할 수가 있다.

박관규(1993)의 카드뮴을 백서에 투여하여 전자현미경적 소견을 관찰한 연구 보고에 의하면, 신 손상의 초기에는 세포질의 소기관의 변화가 초래되는 가역성 변화가 일어나고, 후기에는 핵의 농축과 세포막의 파괴까지 초래되는 비가역성 변화가 일어난다고 하였다. 또한, 고농도의 카드뮴에 장시간 노출될 경우 신장 세뇨관 세포의 손상으로 인한 변화는 리소솜의 증가와 미토콘드리아의 종창이 주된 변화로 알려져 있으며, 미토콘드리아가 난원형으로 되거나 수포화되며, 미토콘드리아 능선이 주변부에 위치하게 되고 기질 전자밀도의 감소가 일어나고, 종창 혹은 외막의 파괴가 관찰된다는 보고가 있다(Nishizumi, 1972). 세포 에너지의 주된 공급원은 미토콘드리아로 알려져 있으므로 이러한 미토콘드리아의 변화는 역으로 세포기능의 장애를 초래한다고 유추해 볼 수 있다.

본 실험에서는 광학현미경상 카드뮴 처리 24시간 후 0.06mM이상에서 부분적으로 세포질내 공포가 생기고 핵붕괴가 나타나기 시작했으나, 전자현미경으로 검정한 결과, 카드뮴 0.01mM 처리에서 이미 세포질 내에는 공포가 나타나고, 미토콘드리아 종창이 나타났으며, 카드뮴농도 0.1mM에서는 핵내의 염색질의 농축과 미토콘드리아의 능선이 소실되는 등의 세포 핵과 세포질의 변화가 두드러져 핵이 붕괴되는 소견을 보임으로써 카드뮴 0.01mM 이상에서의 THP-1 세포손상은 아포프토시스보다는 괴사에 의한 것으로 생각된다. 일부 아포프토시스의 초기 변화인 염색질의 농축과 핵막의 변화 등의 소견이 본 실험 결과 나타났고, Azzouzi et al. (1994)은 인간 T-세포주에서 카드뮴은 저농도에서는 아포프토시스(apoptosis)를 일으키는데, 4 μ M이상에서 아포프토시스가 증가하여, 8-10 μ M에서 최대가 되고, 카드뮴 농도가 50 μ M이상일 때는 세포괴사를 일으킨다고 보고하였으므로, 카드뮴 0.01mM이하의 농도에서는 아포프토시스에 의한 세포사의 가능성을 보여주는 것으로 사료된다. 이러한 카드뮴의 아포프토시스 효과는 생체에서 저농도의 카드뮴에 노출된 후 림프구가 손상받는 기전의 하나로 생각된다. 따라서 추후 카드뮴으로 인해 유발되는 아포프토시스에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

카드뮴의 면역 독작용의 일부로, 카드뮴 처리군과 정상대조군 사이에서의 cytokine 유전자 발현을 조사한 결과, 본 실험에서는 TNF- α mRNA는 양군 모두 발현되었으나 IL-1 β , IL-6 mRNA는 발현되지 않았다.

IL-1 β , IL-6의 경우 LPS(lipopolysaccharide)나 PHA (phytohemagglutinin)같은 유사분열유도물질에 의해 자극되었을 때 단핵구에서 분비가 유도되는 것으로, 카드뮴이 이들 cytokine의 유전자의 발현과 분비를 감소시킨다는 보고(Funkhouser, 1994; Theocharis, 1994)가 있으나, 본 실험에서 IL-1 β , IL-6이 발현되지 않은 것은, 자극이 없는 상태에서 관찰했기 때문으로 추정된다. 따라서 앞으로 유사분열 유도물질이나 염증반응상태에서 TNF- α 뿐 아니라, IL-1 β , IL-6에 대한 카드뮴의 영향을 관찰할 수 있을 것으로 기대되므로, 추후 이에 대한 연구가 필요하다.

인간 단핵구 세포주에서 발현되는 cytokine 중 TNF- α mRNA의 카드뮴 농도에 따른 발현의 변화를 알아보기 위하여 실험한 결과, 카드뮴 농도에 따른 TNF- α mRNA 발현의 변화정도가 정상대조군에 비해 카드뮴 처리 후 6시간, 24시간에서 차이가 났으며, 전기영동을 실시한 agarose gel을 gel documentation system을 이용해 TNF- α mRNA 발현 정도를 반정량적으로 측정된 결과, 카드뮴 농도가 증가함에 따라 일정한 변화 양상은 보이지 않았으나, 카드뮴 농도 0.01mM과 0.1mM에서 모두 대조군에 비해 증가되어 나타났으나, 시간이 경과됨에 따라 6시간에 비해 24시간에서 TNF- α 유전자 발현이 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 카드뮴이 저농도에서는 자극효과를 나타낸다는 보고(Theocharis et al., 1994)를 볼 때, 0.1mM이하의 저농도에서는 카드뮴이 억제보다는 TNF- α mRNA의 발현을 자극하는 효과로 생각되며, 카드뮴의 농도와 폭로시간이 증가함에 따라 결국은 전사반응이 억제되어 TNF- α mRNA 발현이 억제되는 것으로 생각된다. 그러나 본 연구에서는 시간별로 6시간과 24시간만을 측정했기 때문에 시간별 증가 또는 감소에 대한 설명이 제한점이 될 수 있을 것으로 생각된다.

또한 카드뮴 농도 0.05mM 투여시 TNF- α mRNA가 대조군 수준으로 감소되어 나타난 것은

본 실험으로는 명확하게 설명하기 어려우며, gel documentation system을 이용한 mRNA의 반정량적 분석방법은 전반적인 현상을 관찰할 수 있을 뿐, 정확한 농도의 개념으로 설명하기에는 문제가 있을 것으로 생각된다. 그러므로 추후 연구에서는 비교적 정확하게 유전자의 발현 정도를 측정할 수 있는 방법을 이용해야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 요약하면 카드뮴은 단핵구 세포주인 THP-1에 대해 세포독성을 나타내며, 0.01mM 이상의 고농도에서는 괴사를 일으켜 세포사를 일으키며, TNF- α mRNA 발현은 카드뮴 처리시간에 따라 억제되는 효과가 있는 것으로 생각된다.

추후 카드뮴으로 유발되는 아포프토시스에 의한 세포사(cell death)에 대한 연구와 cytokine 유도 분비물질의 투여후 단핵구세포주에서의 카드뮴이 IL-1 β 와 IL-6 등의 cytokine mRNA의 발현에 미치는 영향을 비교 관찰하는 실험, 그리고 카드뮴의 면역 독성에서의 cytokine의 상호작용에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

V. 요약

본 실험에서는 인간 단핵구 (THP-1) 세포주를 10% FBS가 함유된 RPMI1640 배양액을 이용해 카드뮴을 최종농도 0.1mM이 되도록 첨가하고 배양한 후, 카드뮴의 단핵구 세포주(THP-1)에 대한 세포독성과 정상세포군과 카드뮴처리한 세포군에서 cytokine의 유전자 발현 유무를 비교하였고, 카드뮴의 농도에 따른 TNF- α mRNA 발현 정도의 변화를 조사했다.

단핵구 세포를 카드뮴 농도별로 처리한 후 배양한 결과 카드뮴의 세포독성으로 세포생존수 및 세포생존율은 6시간 후에는 카드뮴 농도에 관계없이 변화가 없었으나, 24시간 후에는 0.1mM 이상의 농도에서 유의하게 감소했다($p < 0.05$). RNA를 분리해 역전사 증합효소 연쇄반응을 실시해 그 증폭산물을 전기영동한 결과 단핵구 세포의 정상세포군과 카드뮴처리한 세포군 모두에서 TNF- α mRNA 발현을 관찰할 수 있었으나 IL-6와 IL-1 β 는 발현되지 않았다. TNF- α 의 mRNA 발현 정도를 비교 측정한 결과 카드뮴 농도가 증가함에 따라 일정한 변화양상을 보이지는 않았으나 카드뮴 농도 0.01mM과 0.1mM

에서 다소 증가되었고, 카드뮴 처리시간이 증가함에 따라 6시간에 비해 24시간에서 TNF- α mRNA 발현이 감소되는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 살펴보면 카드뮴은 THP-1 세포주에서 TNF- α mRNA의 발현을 시간의 경과에 따라 억제하는 효과가 있으며, 단핵구 탐식체계에 독성이 있는 것으로 생각된다.

* 이 논문을 위해 도와주신 계명대학교 의과대학 미생물학교실의 서민호, 서성일, 백원기 선생님께 감사드립니다.

REFERENCES

- 박관규. 카드뮴 신 손상에 관한 전자현미경적 연구. 대한신장학회지 1993;12(1):20-26.
- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules(IL-1 and TNF). FASEB J 1990;4:2860-67.
- Aggarwaw BB, Guttermun JU. Human cytokines-Handbook for basic and clinical users. USA: Blackwell scientific publication, 1990;46-281.
- Azzouzi BE, Tsangaris GT, Pellegrini O, Manuel Y, Benveniste J, Thomas Y. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. Toxicology 1994;88:127-39.
- Borgman R, Au B, Chandra R. Immunopathology of chronic cadmium administration in mice. Int J Immunopharmacol 1986;8(7):813-7.
- Bowen ID, Bowen SM. Programmed Cell Death in Tumours and Tissues. London : Chapman and Hill, 1990;15-68.
- Chowdhury B, Chandra R. Biological and health implications of toxic heavy metal and essential trace element interactions. Prog Food Nutr Sci 1987;11:57-113.
- Chowdhury B, Friel J, Chandra R. Cadmium induced immunopathology is prevented by zinc administration in mice. J Nutr 1987;117:1788-94.
- Ciffone MG, Alese E, Procopio A, Paolini R, Morrone S, Dieugenio R, Santoni G. An Effect of cadmium on lymphocyte activation. Biochim Biophys Acta 1989;1011:25-32.
- Clayton GD, Clayton FE. Patty's Industrial hygiene and toxicology, 4 ed. New York : John Wiley & Sons INC, 1995;1954-67.

- Commission of the European communities. Criteria (Dose/effect relationship) for cadmium. New York : Pergamon press, 1978:15-23.
- Daum JR, Sheperd DM, Noelle RJ. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocyte. *Int J Immunopharmacol* 1993;15(3):383-94.
- Descotes. Immunotoxicology of cadmium. *IARC Sci Publ* 1992;118:185-90.
- Dinarello CA. Interleukin-1. *Dig Dis Sci* 1988;33:255-355.
- Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, and Nordberg G. Cadmium and Health-A toxicological and epidemiological appraisal, Vol 1. Boca Raton, FL : CRC Press, 1985; 24-53
- Funkhouser SW, Martinez-Maza O, Vredevoe DL. Cadmium inhibits IL-6 production and IL-6 mRNA expression in a human monocytic cell line, THP-1. *Environ Res* 1994;66: 77-86.
- Hambin AS. Regulation of the immune system by pharmacological and biological mediators. In Miller K, Turk JL, Niklin S (eds) Principles and practices of immunotoxicology. Oxford : Blackwell, 1989;24-49.
- Hernandez M, Macia M, Conde J, Fuente M. Cadmium and nickel modulation of adherence capacity of murine peritoneal macrophages and lymphocytes. Intersexual comparisons. *Int J Biochem* 1991;62(1):S60-S65.
- Horiguchi H, Mukaida N, Kamoto S, Teranishi H, Kasuya M, Matsushima K. Cadmium induces interleukin-8 production in human peripheral blood mononuclear cells with the concomitant generation of superoxide radicals. *Lymphokine Cytokine Res* 1993;12:421-8
- Jacobs EE, Jacobs M. Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J Biol Chem* 1956;223:147-56.
- Jones MM, Cherian MG. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology* 1990;62:1-25.
- Koller LD. Immunotoxicology of heavy metals. *Int J Immunopharmacol* 1980;2: 269-79.
- Kossodo SD. Comparative polymerase chain reaction, In Balkwill FR, Cytokines, 2 ed. Oxford university press, USA, 1995;57-68.
- Levy L, Vredevoe D, Cook G. In vitro reversibility of cadmium-induced inhibition of phagocytosis. *Environ Res* 1986;41:361-71.
- Loose LD. Immunotoxicology--1985. *Year Immunol* 1996;2:365-70.
- Lawrence DA, McCabe MJ Jr. Immune modulation by toxic metals. In Goyer RA, Klaassen CD, Waalkes MP (Eds), Metal toxicology. Academic press, San Diego 1995;305-37.
- Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 1961;9: 409-14.
- Malave R, DeRuffino D. Altered immune response during cadmium administration in mice. *Toxicol Appl pharmacol* 1984;74:46-56.
- Navarro S, Debili N, Bernaudin JF. Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J Immunol* 1989;12:4339-45.
- Nishizumi. Electron microscopic study of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Arch Environ Health* 1972;24:215-25.
- Oliff A, Defeo-Jones D, Martinez D, Kiefel D, Vuocolo G, Wolfe E, Socher SH. Tumours secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* 1987;50:555-63.
- Palmer R, Butenhoff J, Stevens J. Cytotoxicity of the rare earth metals cerium, lanthanum, and neodymium *in vitro* : Comparisons with cadmium in a pulmonary macrophage primary culture system. *Environ Res* 1987;43:142-56 .
- Platzer C, Blankeinstein T. Polymerase chain reaction to quantitate cytokine mRNA, In Balkwill FR (eds), Cytokines, 2ed. Oxford university press, USA, 1995;57-68.
- Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963;17:208-12.
- Rom WN. Environmental and occupational medicine , 2ed. Boston : Little Brown and Company, 1992;767-72.
- Rosenstock L, Cullen MR. Textbook of Clinical Occupational and Environmental medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994; 736-8.
- Schulte S, Mengel K, Gatke U, Friedberg KD. No influence of cadmium on the production of specific antibodies in mice. *Toxicology* 1994;93:263-8.
- Simon FP, Potts AM, Gerald RW. Action of cadmium and thiols on tissue and enzymes. *Arch Biochem* 1947;12:283-91.
- Stacey N. Effects of cadmium and zinc on spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J Toxicol Environ Health* 1986;118: 203-300.

Theocharis SE, Margeli AP, Panayiotidis PG : Effects of various metals on DNA synthesis and lymphokines production by human peripheral blood lymphocytes *in vivo*. *Comp Biochem Physiol* 1991;99C:131-33.

Theocharis SE, Souliotis VL, Panayiotidis PG : Suppression of interleukin-1 β and tumor necrotic factor- α biosynthesis by cadmium in *in vitro* activated human peripheral blood mononuclear cells. *Arch Toxicol* 1994;69:132-6.

Vredevoe D, Levy D, Knutson D, Cook G, Cohen P. Recovery of the murine mononuclear phagocytic system following chronic exposure to cadmium. *Environ Res* 1985;37:373-2.

Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Biophysic Biochem Cytol* 1958;226:475-476.

Zenz C, Dickerson OB, Horvath JR. *Occupational Medicine*, 3ed. Chicago : Mosby-Year Book Inc. 1994; 481-6.