

## 세포 내 신호전달과정을 통한 카드뮴의 Apoptosis 유도

원광대학교 의과대학 예방의학교실, 전북대학교 의과대학 예방의학교실<sup>1)</sup>

김남송 · 오경재 · 조광호 · 현미선 · 김유창<sup>1)</sup> · 성태호<sup>1)</sup> · 염정호<sup>1)</sup> · 권근상<sup>1)</sup>

— Abstract —

### Cadmium-induced Apoptosis in HL-60 Cells Via Signal Transduction

Nam Song Kim, Gyung Jae Oh, Kwang Ho Cho, Mee Sun Hyun,  
Yoo Chang Kim<sup>1)</sup>, Tae Ho Sung<sup>1)</sup>, Jung Ho Youm<sup>1)</sup>, Keun Sang Kwon<sup>1)</sup>

*Department of Preventive Medicine and Public Health,  
School of Medicine Wonkwang National University,  
Department of Preventive Medicine and Public Health,  
School of Medicine Chonbuk National University<sup>1)</sup>*

**Objectives** : Apoptosis is a process of active cell death, distinct from necrosis and characterized by specific morphological and biochemical features. Apoptosis induced by metals and metal-related deleterious conditions has only recently been studied. Although the toxic effects of heavy metals are well described, little is known about the mechanism of apoptosis via cadmium toxicity. Therefore, this study is designed to define the induction mechanism of apoptosis by which cadmium exerts its cytotoxic effect on human promyelocytic leukemic HL-60 cells. The cytotoxic effects of cadmium on HL-60 cells are studied in regards to apoptotic signal transduction pathways.

**Methods** : The mode of cadmium-induced apoptosis was investigated in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with various concentrations of cadmium and antioxidants after which the viability of the cells were measured by MTT assay. The morphological features of cadmium-induced apoptosis were evaluated by fluoromicroscopy and the DNA fragmentation was analyzed using 1.5% agarose gel electrophoresis. Kinase activity was assayed by autoradiography and activity of NF- $\kappa$ B and nuclear proteins were measured by EMSA.

**Results** : Cadmium (125  $\mu$ M) induces the characteristic morphological features of apoptosis, which are characterized by a shrinkage of the cytoplasm and a condensation of chromatin. In addition, cadmium induced the ladder pattern of DNA fragmentation.

Antioxidants(Sodium nitroprusside, glutathione and N-acetylcysteine), which were not toxic to the cells, did not suppress apoptosis induced by cadmium.

Cadmium enhances the expression of several classes of genes at elevated cytotoxic concentrations. Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) was predominantly in the fragmented form when doses of 125  $\mu$ M were used. Since PARP is cleaved by CPP32 (caspase-3), we next determined if cadmium was capable of effecting changes in CPP32 activity. The results of these experiments showed that cadmium increased caspase-3 activity in a time dependent manner, corresponding to the time of appearance of fragmented PARP. Cadmium also increased the phosphotransferase activities of c-JUN N-terminal kinase (JNK). Furthermore, cadmium increased the activation of transcriptional factors including the activation of protein-1 (AP-1) and NF- $\kappa$ B.

**Conclusions** : These results suggest that cadmium induces the apoptotic death of HL-60 cells via the activation of a DEVD-specific caspase, JNK and transcriptional factors such as AP-1 and NF- $\kappa$ B.

**Key Words** : Apoptosis, Cadmium, Antioxidants, Caspase, JNK, AP-1, NF- $\kappa$ B

〈접수일 : 2001년 6월 27일, 채택일 : 2002년 1월 3일〉

교신저자 : 오 경 재(Tel : 063)850-6767) E-mail : pmokj@wonkwang.ac.kr

\* 이 논문은 2000년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨.

## 서 론

카드뮴은 인체에 대해 독성을 나타내는 대표적인 중금속으로 산업장에서의 광범위한 이용 및 환경오염의 심화로 인한 노출 증가와 식품 또는 흡연을 통한 생체내 유입의 증가는 인체의 만성적인 노출을 유발하고 있어 중금속에 대한 독성학 연구의 주요 대상이 되고 있다(Goyer, 1996).

카드뮴은 일반적으로 신기능장해, 간조직손상, 골연화증을 유발하며, 저농도의 카드뮴에 장기간 노출시킨 실험동물에서 고환조직손상, 생식독작용 및 발암작용이 있는 것으로 알려져 있다. 카드뮴 독성에 관한 초기 연구는 카드뮴에 급성 및 만성으로 노출되었을 때 표적장기인 신장과 간장 및 고환 등의 조직이나 세포에서의 카드뮴 축적, 카드뮴 유입과정 및 유입된 카드뮴의 세포내 대사과정에 참여하는 여러 효소와의 상호작용 등에 집중되어 왔다(Cherian 등, 1978; Eaton 등, 1980; Dudley 등, 1982; Agarwal, 1988; Goyer, 1996). 그간의 연구들은 주로 카드뮴이 과산화 연쇄반응(oxidative chain reaction)을 자극하여 지질과산화(lipid peroxidation)를 촉진하고 이로 인해 활성산소종(reactive oxygen species)이 활성화되어 세포독성을 유발하는 것으로 보고하고 있다(Fukuno 등, 1984; Halliwell and Gutteridge, 1985; Oteiza, 1999).

한편, 카드뮴을 비롯한 중금속의 인체에 미치는 영향 및 독성기전을 밝히기 위한 연구들은 여러 분야에서 활발히 진행되고 있는데, 최근에는 중금속의 급·만성 세포독성기전과 발암작용에 있어 endonuclease를 활성화하거나 활성산소종(reactive oxygen species)과 같은 reactive-free radical을 생성하거나(Nath 등, 1996; Hultberg와 Andersson, 1998) 세포신호전달체계를 경유하는 세포고사(apoptosis)가 중요한 역할을 담당한다는 여러 연구 결과들(Lohmann과 Beyersmann, 1993; Azzouri 등, 1994; Shenker 등, 1997; Habeebu 등, 1998; Hirata 등, 1998)이 보고되고 있다. 그러나 이러한 여러 연구보고에도 불구하고 카드뮴의 정확한 독성기전은 아직 밝혀지지 않고 있다.

세포고사는 외부적 환경의 변화에 급격히 일어나는 수동적 죽음인 괴사(necrosis)와는 달리 세포내

부에 존재하는 계획된 죽음의 프로그램이 신호에 의해 개시된 세포에서 여러 유전자들이 발현됨으로써 일어나는 능동적인 죽음이다. 세포고사는 괴사와는 다른 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절받는 생리과정이다(Wyllie, 1980; Cohen, 1993). 세포괴사가 세포의 심각한 상해로 세포막의 파괴, 세포의 팽창(swelling), 용해(lysis)를 동반하는 반면에 세포고사는 빠른 세포 탈수현상에 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).

한편, 세포고사가 발현되기까지는 세포내부의 복잡한 신호전달과정을 거치게 되는 데(Wyllie, 1980; Searle 등, 1982; Cohen, 1993; Klaus와 Davide, 1998) 이것은 종양치사인자(tumor necrosis factor)에 의한 세포사멸 연구와 함께 일부 신호 전달기전이 밝혀지면서 시작되었다(Amer 등, 1996; Daniel 등, 1996). 그간의 연구들에서 세포고사의 과정에는 caspase계 cysteine proteases(caspase family cysteine proteases)나 MAP kinase (mitogen activated protein kinase)와의 관련성이 제시되고 있으며(Blenis, 1993; Xia 등, 1995; Alnemri 등, 1996; Enari 등, 1996; Klaus와 Davide, 1998), 또한 AP-1(activator protein-1), NF- $\kappa$ B와 같은 초기 반응 유전자 (early immediate gene)등의 전사인자(transcriptional factor)와 많은 관련이 있음이 알려져 있다. 따라서 이러한 인자들의 활성화 여부 및 양상을 관찰한다면 정확한 세포고사 유도기전을 파악하는 데 중요한 자료를 얻을 수 있을 것이다.

카드뮴의 세포고사 유도에 대한 그간의 연구들은 드물며 이에 대한 정보 역시 매우 제한적이다(Corcoran 등, 1994). 현재까지의 in vivo, in vitro 연구는 조직 또는 세포가 중금속에 노출시 폭로량 및 시간적 변이에 따라 고사 또는 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있으나, 그 유도기전에 대해서는 확실히 밝혀진 바 없다(Beyersmann과 Hechtenberg, 1997; Wang과 Templeton, 1998). 따라서 본 연구에서

는 acute promyelocytic leukemia에서 기원한 HL-60 세포를 이용하여 카드뮴에 의한 세포의 형태학적·생화학적인 변화를 관찰함으로써 카드뮴이 세포고사 유도에 미치는 영향을 알아보고, 항산화 물질(antioxidants)이 세포고사 과정에 미치는 영향을 살펴보고 caspase cysteine protease, c-Jun N-terminal kinase(JNK) 및 전사인자(transcriptional activator)인 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 활성여부를 규명함으로써 카드뮴의 세포고사 및 유도기전 연구를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. HL-60 세포주 배양

사람 백혈구 암세포주인 HL-60 는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서(37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) 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, CdCl<sub>2</sub>, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 처리한 뒤 세포의 apoptosis 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 2. Hoechst staining

카드뮴 단독 또는 Sodium nitroprusside(SNP, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), glutathione(GSH, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 및 N-acetylcysteine(NAC, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)등의 항산화 물질과 동시처리된 세포들을 4 % formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 씻어주고 Hoechst 33342 (Sigma Biosciences, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 10  $\mu$ M이 되게 희석하여 10분간 염색한 후 다시 PBS에서 씻어서 형광현미경으로 관찰하였다.

### 3. 세포 활성도 측정

세포의 활성도는 MTT(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) assay를 이용하였다. 세포 배양판(96-well plate)에 세포를 200  $\mu$ l씩 분주한

후, 3시간이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기안에서 안정화시킨 카드뮴을 처리한 다음 MTT를 100  $\mu$ g/ml 씩 넣어주었다. 4시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 100  $\mu$ l의 10 % SDS가 포함된 0.01 N HCl 용액으로 24시간 동안 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 방치한 다음 ELISA reader로 565 nm의 흡광도에서 측정하였다.

### 4. Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HL-60 세포를( $2 \times 10^6$  cells) 4°C에서 15분 동안 lysing buffer(1 % TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 용해하고 20,000  $\times$  g 로 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  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광표지된 기질 (YVED-AMC 혹은 DEVD-AMC)(Nicholson DW와 Thornberry, 1997)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  $\mu$ M 을 ICE-like caspase는 7-amino-4-coumarin(AMC)-YVAD(Calbiochem, San Diego, CA, USA) 50  $\mu$ M을 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다.

### 5. DNA추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Co, Madison, WI, USA)를 이용하여 추출하였다. 먼저 카드뮴이 처리되어진 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거하여 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제

거한 후 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA 를 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 260와 280nm의 Spectrophotometer (Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA, USA)하에서 OD 값을 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5  $\mu$ g을 1.8 % agarose gel에서 전기영동 (50 V, 2 시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등(燈) 하에서 DNA 분절을 관찰하였다.

## 6. Western blotting

배양된 HL-60 세포에 카드뮴을 처리한 일정 시간 후에 채취하여, cold Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 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  $\mu$ g/ml aprotinin)으로 얼음에서 용해하였다. 용해 세포부유액에 2 $\times$ sample buffer와 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 끓인 후, 10 % sodium dodesyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질을 nitrocellulose membrane 으로 4 $^{\circ}$ C, 30 V에서 16시간 동안 transfer한 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 horse-radish peroxydase(TBS로 1:1,000으로 희석, Amersham, England)와 상온에서 1시간 반응시킨 후, Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit: Amersham, England)를 사용하여 필름에 노출시켰다.

## 7. In vitro kinase assay of JNK

배양된 HL-60세포에 카드뮴을 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 세포부유액에 anti-JNK(Santa Cruz CO.,

Santa Cruz, CA, USA) 항체를 1  $\mu$ g씩 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  $\mu$ l씩을 넣은 후 얼음에서 1시간 반응시켰으며 이때 20분 간격으로 흔들어주어 반응이 잘 진행되도록 해주었다. 이 반응액은 4,000 rpm에서 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  $\mu$ g GST-cJUN 단백질과 2  $\mu$ Ci의  $\gamma$ -32P ATP를 최종 20  $\mu$ l의 kinase reaction buffer(Tris-HCl pH 7.5, 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, DTT 2 mM, cold ATP 20 mM)에 넣고 진탕하여 재 현탁시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 10분 반응시켰다. 여기에 20  $\mu$ l의 SDS-PAGE sample buffer를 넣고 98 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 후 12.5 %의 SDS-PAGE에서 단백질을 분리 전개시켰다. 단백질이 분획된 gel은 gel drier (Bio-Rad Co, Hercules, CA, USA)를 이용하여 말린 후 autoradiography에 의해서 JNK의 phosphotransferase 활성정도를 측정하였다. JNK의 기질인 GST-cJUN 단백질은 full sequence cJUN cDNA의 아미노산 서열 1-79까지를 pGEX 2T vector에 삽입후에 E. coli BL-21(DE3)에서 발현시켰다. E. coli에서 발현된 GST-cJUN 단백질은 glutathione-conjugated Sepharose beads(Pharmacia Co, Sweden)를 이용하여 순수 분리한 후 정량하여 사용하였다.

## 8. 핵단백질의 추출

전사인자들의 활성을 측정하기 위해 먼저 약제(성향정기산)가 처리된 신경세포 PC 12로부터 다음과 같이 핵 추출물만을 분리하였다. 세포를 200  $\mu$ M PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 20  $\mu$ M pepstatin A, 100  $\mu$ M leupeptin 및 100  $\mu$ M antipain이 들어 있는 저삼투압 용해용액과 10분간 얼음에서 팽창시킨 후 Nonidet P-40를 0.1 % 되게 반응시키고 원심분리(2500 rpm)하여 세포질액만을 버린 후 pellet만을 모아서 저삼투압 용액과 고염완충용액을 넣은 후 핵막을 터뜨려 핵단백질만을 모아서 정량한 후 5-10  $\mu$ g만을 EMSA에 이용하였다. 단백질의 표

준농도는 BSA (bovine serum albumin)을 사용하였다.

### 9. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

NF- $\kappa$ B의 활성화 측정을 위한 NF- $\kappa$ B의 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 $\mu$ g의 핵단백질과 실온에서 30분간 반응시킨 후 냉온실에

서 4 % polyacrylamide gel에 걸어 0.5 $\times$ TBE buffer로 전기영동하였다. 이 gel은 건조 후 autoradiography 방법으로 X-ray 필름에 현상하여 NF- $\kappa$ B와 AP-1활성을 측정하였다.

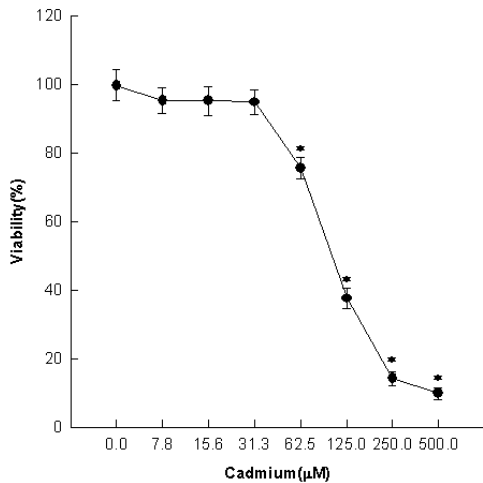
### 10. 통계 검정

측정자료들의 각 군간 차를 비교하기 위해서는 평균치의 경우 Student's t-test 및 일원배치 분산분석법을 이용하였으며, 분산분석의 결과에 따라 각 군간에 대한 post-hoc test는 Scheffe's test를 사용했다.

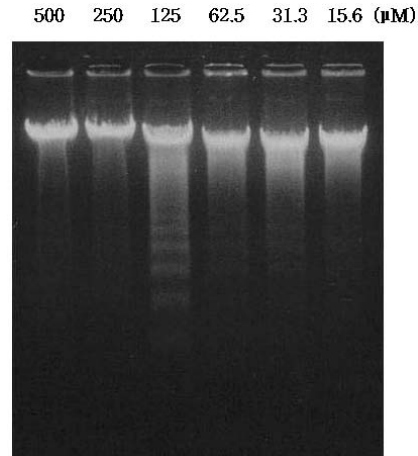
## 결 과

### 1. 세포의 생존에 미치는 영향

카드뮴이 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 여러 농도의 카드뮴을 첨가하며 18시간 후 생존율을 측정한 결과 31.3  $\mu$ M 이하의 농도에서는 HL-60 세포의 생존율에는 유의한 변화가 없었으나, 62.5  $\mu$ M 이상의 카드뮴 농도에서는 농도 의존적으



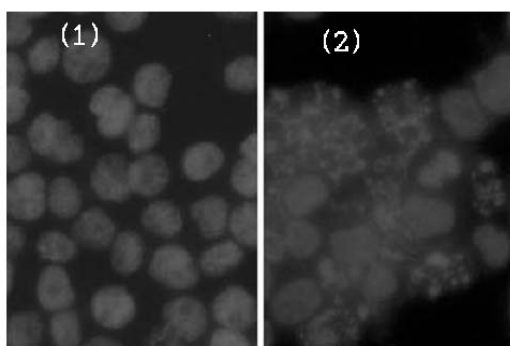
**Fig. 1.** The effects of cadmium on cell viability in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with various concentrations of cadmium for 18 hour and then viability of the cells were measured by MTT assay. Values are expressed as and S.D. \*Significantly different from the value of control value at p<0.05 by ANOVA using Tukey's multi-comparision procedures.



**Fig. 2A.** Cadmium induced the ladder pattern fragmentation of genomic DNA in HL-60 cells. The cells were treated with various concentrations of cadmium for 18 hours. DNA fragmentation was analyzed by 1.5 % agarose gel electrophoresis.

로 생존율이 지속적으로 감소하기 시작하여 125  $\mu$ M 이상의 농도에서는 현저하게 감소하였다(Fig. 1).

카드뮴을 여러 농도로 18시간 처리한 후 DNA 분절현상을 관찰한 결과, 세포생존률이 현저하게 감소되는 125  $\mu$ M 농도에서 사다리형의 DNA 분절이 관찰되었으나 그 이외의 어떠한 농도에서도 DNA 분절이 관찰되지 않았다(Fig. 2A). Hoechst 염색후 형광현미경으로 관찰한 결과 카드뮴을 처리하지 않은 HL-60 세포는 변화가 없었으나 125  $\mu$ M의 카드뮴을 처리한 경우 세포의 수축(shrinkage)과 염색질(chromatin)의 응축(condensation) 등 세포고



**Fig. 2B.** Morphological evaluation of cadmium induced apoptosis in HL-60 cells(photographs by fluoromicroscopy). (1), untreated HL-60 cells after 6 hours of incubation. (2), a representative view of HL-60 cells treated with 125  $\mu$ M cadmium for 10 hours.

사의 특징적인 현상이 관찰되었다(Fig. 2B).

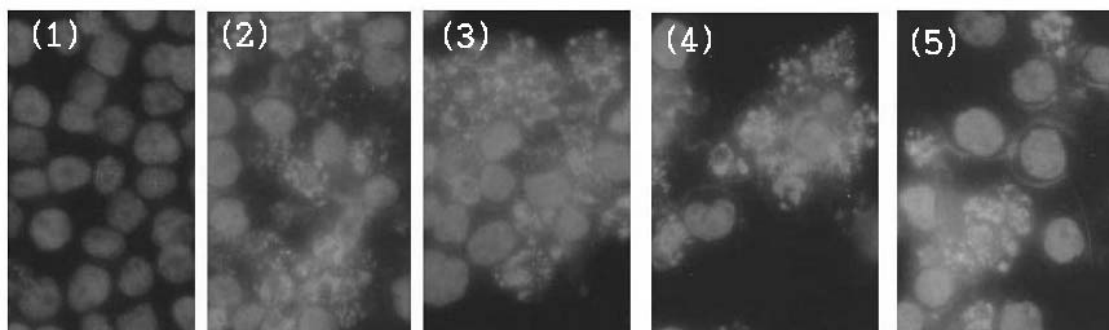
## 2. 항산화 물질(Antioxidant)이 카드뮴에 유도된 세포고사에 미치는 영향

카드뮴 처리에 의해 유도된 세포고사에 미치는 항산화 물질의 효과를 파악하기 위해 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도의 SNP, GSH, NAC(Fig. 3A)를 카드뮴 125  $\mu$ M과 동시에 처리한 결과 SNP, GSH, NAC 모두, 카드뮴 단독 처리로 감소하였던 세포생존율(Fig. 3A) 및 세포고사의 형태학적 변화를 회복시키지 못하고 세포고사가 유도되었다(Fig. 3B).

## 3. Caspase 활성화에 미치는 영향

카드뮴 처리에 의한 세포고사가 caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 시간의 경과에 따른 caspase-1과 caspase-3의 활성정도를 조사한 결과, 카드뮴 125  $\mu$ M 처리 후 caspase-1의 활성은 시간에 따른 유의한 변화를 보이지 않았으며, caspase-3의 활성은 시간의 경과에 따라 카드뮴 처리 18시간후 37.3 unit로 최고의 활성을 보인 후 ( $p < 0.05$ ) 24시간째 19.6 unit로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4A)

카드뮴 처리후 DNA의 손상에 대한 회복에 관여하기도 하고 반대로 DNA 파괴를 촉진하기도 하는 양면(兩面)성을 지닌 PARP의 절단이 6시간후 나타나기 시작하여 12시간째 현저하게 나타나 caspase-



**Fig. 3B.** The effects of antioxidants (SNP, GSH, NAC) on cadmium induced apoptosis in HL-60 cells(photographs by fluoromicroscopy) which were treated with cadmium with or without antioxidants for 10 hours. (1), nontreatment. (2), treated with 125  $\mu$ M cadmium. (3), treated with 100  $\mu$ M SNP and 125  $\mu$ M cadmium. (4), treated with 1 mM GSH and 125  $\mu$ M cadmium. (5), treated with 1 mM NAC and 125  $\mu$ M cadmium.

3 활성화의 근거를 제시하고 있다(Fig. 4B).

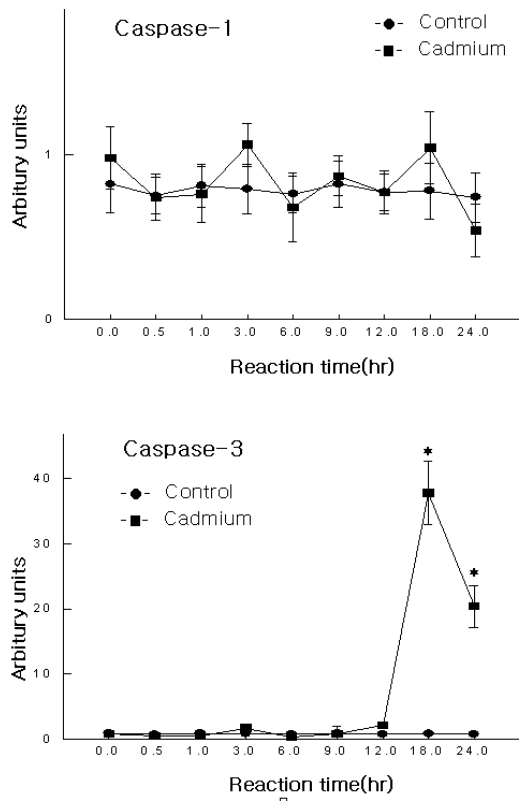
#### 4. NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향

카드뮴 62.5  $\mu$ M 처리후 NF- $\kappa$ B의 활성여부를 EMSA를 통해서 알아본 결과, 시간의 경과에 따라 지속적으로 증가하여 6시간째 최고의 활성을 보인 후 급격하게 감소하였으며(Fig. 5A), 카드뮴을 여

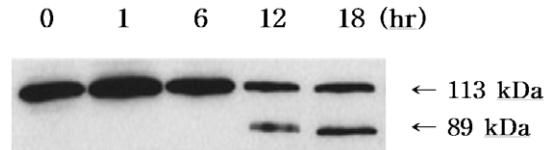
러 농도로 처리하여 6시간째 NF- $\kappa$ B의 활성을 조사한 결과 농도의 증가에 따라 저농도에서는 대체로 유지되었으나 31.3  $\mu$ M 이상의 카드뮴 농도에서는 감소하는 양상을 보였다(Fig. 5B).

#### 5. c-Jun N-terminal kinase 활성화에 미치는 영향

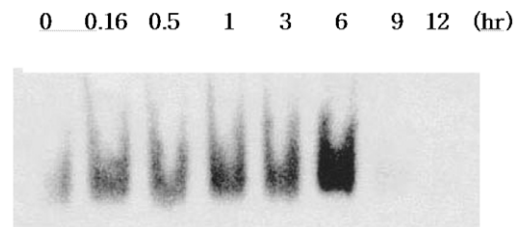
MAPK kinase중 세포고사의 신호전달을 담당하는 것으로 알려진 JNK의 활성을 조사한 결과, 시간의 경과에 따라 카드뮴 125  $\mu$ M 처리후 1시간부터 서서히 증가하기 시작하여 6시간째 최고의 활성을 보인후 서서히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6). 실



**Fig. 4A.** Cadmium increased the activity of caspase-3, whereas, did not increase the activity of caspase-1 in HL-60 cells. The cells were treated with cadmium (125  $\mu$ M) for 24 hours. The whole lysates (200  $\mu$ g protein) were subjected to the proteolytic cleavage of fluorogenic substrates including 200  $\mu$ M 7-amino-4-coumarin (AMC)-DEVD or YVAD motif-specific peptides and AMC as a standard. Values are expressed as mean and S.D. \*Significantly different from the values of control (0  $\mu$ M) at  $p < 0.05$  by t-test.

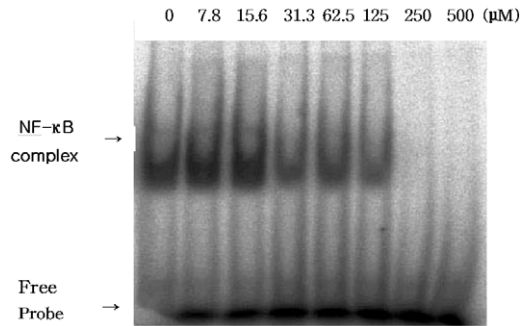


**Fig. 4B.** PARP cleft by caspase-3 occurred when the HL-60 cells were treated with 125  $\mu$ M cadmium for 18 hours. The same amount of protein (200  $\mu$ g/experiment) was resolved on 12 % SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane, and blotted for PARP. The membrane was then visualized by ECL detection system.

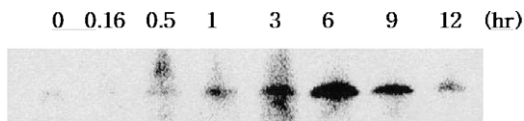


**Fig. 5A.** Cadmium induced NF- $\kappa$ B activation in HL-60 cells(time kinetics). HL-60 cells were treated with cadmium(62.5  $\mu$ M) for 12 hr and the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B was measured by electrophoresis mobility shift assay(EMSA). The oligonucleotide probe of NF- $\kappa$ B containing IgG chain binding site(NF- $\kappa$ B : 5'-CCG GTT AAC AGA GGG GGG TTT CCG AG-3') was annealed and labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTP using random primer labeling kit.

험에 사용된 단백질 상청액의 일부를 취하여 SDS-PAGE를 수행한 후 JNK1 blotting을 하였을 때, p46, p54의 위치에 동량으로 나타남을 확인하였다 (data not shown).



**Fig 5B.** Dose reponse of Cd-induced NF-κB activation in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with various concentrations of Cd (0, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, and 500 μM) for 6 hr. Their nuclear extracts were assayed for NF-κB activation as described in Fig 5A.

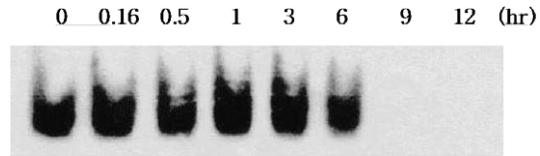


**Fig. 6.** Cadmium increased the phosphotransferase activity of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with cadmium (125 μM) for 12hr. The cell lysates (500 μg protein) were imm unoprecipitated with 1μg of anti-JNK antibody on ice for 1hr and then imm une complex was precipitated with 10 % formalin-fixed Staphylococcus aureus on ice for 1hr. JNK activity was detected by phosphorylation of GST-cJun N-terminus1-79 fusion proteins in an in vitro kinase assay and was assessed by incorporation of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (1 μCi/sample) with 1 μg of GST-cJun N-terminus protein as a substrate. The proteins were separated on 10 % SDS-PAGE and <sup>32</sup>P-labeled GST-cJun N-terminus was detected by autoradiography.

## 6. AP-1 활성화에 미치는 영향

전사인자인 AP-1의 활성화는 대조군에 비하여 6시간까지 시간의 경과에 따라 증가하였으며 이후 감소하는 경향을 보였다(Fig. 7).

**Fig 7.** Cadmium-induced AP-1 activation in HL-60 cells (time kinetics). HL-60 cells were



treated with cadmium (62.5 μM) for 12hr and the transcriptional activity of AP-1 was measured by electrophoresis mobility shift assay (EMSA). Two complementary strands of AP-1 oligonucleotide were annealed and labeled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP using terminal transferase labeling kit. Nuclear extracts (5 mg) were reacted with 2-5 ng of the radio-labeled or AP-1 probes (50,000-100,000 cpm/ng). The reaction products were subjected onto 4 % polyacrylamide gel electrophoresis and then the gels were dried under vacuum for 1 hr. DNA binding activity for AP-1 was measured by using PhosphorImager analyzer.

## 고 찰

세포고사는 다세포 생명체에서 정상적인 발달과정과 항상성을 유지해 주는 기본적인 생리현상이며 이 질적이거나 위해한 세포를 신속하게 제거하는 과정이다. 따라서 이 과정의 장애는 악성종양, 자가면역 질환, 퇴행성 신경질환, 독소에 의해 유발되는 질환의 발생과 밀접한 관련이 있다(Fadeel 등, 1999).

세포고사에 대한 연구를 통하여 카드뮴의 세포 독성기전을 밝히기 위한 연구가 시도되고 있으나 이에 대한 정보는 매우 제한적이다(Corcoran 등, 1994). 최근, 카드뮴을 포함한 일부 중금속에 의한 세포고사의 경우 몇 가지 공통된 기전이 제기되었는데, 그 기전은 중금속이 endonuclease를 유도 또는 활성을



유발하여 DNA 분절을 형성하거나 (Rao 등, 1993; Lu 등, 1994; Azzouri, 1994), 활성산소종(reactive oxygen species)과 같은 reactive-free radical을 생성하는 산화적 스트레스(oxidative stress)로서 세포고사를 유도하는 것 등이다(Nath 등, 1996; Hultberg와 Andersson, 1998). 그러나 카드뮴에 의한 세포고사의 유도기전이나 기전에 관여하는 물질 및 신호전달과정에 대해서는 확실히 밝혀진 바가 없다(Beyersmann과 Hechtenberg, 1997; Wang과 Templeton, 1998).

카드뮴이 세포고사를 일으키는데는 카드뮴의 종류와 농도가 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 카드뮴은 세포고사와 괴사를 모두 유발하는데, 일반적으로 소량폭로는 세포고사와, 과량폭로는 괴사와 관련이 있다(Buja 등, 1993).

본 연구에서 카드뮴 120  $\mu$ M을 세포에 처리했을 때 세포생존율의 감소와 함께 세포의 수축과 염색질의 응축 등 세포고사의 형태학적 특징이 관찰되었으며 세포고사의 특징중의 하나인 DNA 분절이 나타났다. 이러한 결과로부터 카드뮴이 HL-60 세포에서 세포고사를 유도한다는 사실을 알 수 있었다.

한편, 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성화를 통해 세포고사에 관여하는 것으로 알려진 활성산소종(Bowie와 O' Neill, 2000)은 본 실험에서 여러 항산화제(SNP, GSH, and NAC)가 카드뮴에 의한 세포생존율의 감소와 세포의 수축 및 염색질의 응축 등 세포고사의 형태학적 특징을 전혀 회복시키지 않는 결과로 볼 때, 카드뮴은 다른 중금속들에서 보고된 활성산소종에 의한 세포고사와는 상이한 유도과정을 경유하는 것으로 여겨진다.

따라서, 본 연구의 저농도의 카드뮴폭로에서 나타나는 세포고사는 카드뮴에 의한 직접적인 영향이나 활성산소종에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 결과이기 보다는 세포내의 신호전달체계를 통해 일어나는 간접적인 영향에 의한 것임을 유추할 수 있다.

세포고사를 유발시키는 세포내 신호전달기전에서 중요한 기전중 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 효소 활성부위에 모두 cysteine을 가지고 있는 단백질 분해효소로서 지금까지 14가지가 알려져 있으며 특히, caspase-3(CPP32, Yama)의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다(Allen 등, 1998; Widmann과 Gibson, 1998). Caspase

의 작용은 표적기질(substrate)에 따라 아미노산 배열중 DEVD를 인식해서 절단하는 CPP32-like caspase(caspase-3)와 YVAD를 인식해서 절단하는 ICE-like caspase로 대별된다(Nicholson DW와 Thornberry, 1997). 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 카드뮴을 HL-60 세포에 처리시 시간의 경과에 따라 caspase-1은 유의한 변화가 없었으나, caspase-3의 활성은 현저하게 증가함을 보여 카드뮴에 의한 세포고사 과정에는 CPP32-like cysteine protease가 관여함을 알 수 있으며, 이것으로 카드뮴에 의한 세포고사는 신호전달과정에 의해서 일어나고 있음을 유추할 수 있다.

JNK는 UV광선, interleukin-1, TNF- $\alpha$ , 및 CD28 등의 자극에 의해서 활성화된다(Reap 등, 1997). 특히 MAPK/ERK kinase(MEKK), JNK-activating kinase를 과발현시키면 섬유아세포(fibroblast)에서 치사효과가 있고, 강력한 세포고사 유발물질인 TNF- $\alpha$ 가 JNK를 활성화시키기 때문에, JNK의 신호전달 기전이 카드뮴에 의해 유도되는 세포고사에 대해서도 관여할 것으로 사료된다. JNK 활성화에는 MEK4/SEK에 의한 Thr-183, Tyr-185 위치에 2개의 인산화가 필요하다. 활성화된 JNK는 transcription 인자인 c-Jun, ATF-2, Elk-1등을 인산화시킴으로써 이들을 활성화시킨다(Hai와 Curran, 1991; Verheij 등, 1998). 따라서 HL-60 세포에서 카드뮴에 의해 JNK가 활성화되면 신호전달체계를 통해 새로운 단백질이 생성되어 생성된 새로운 단백질은 세포고사에 영향을 미칠 것이다(Matsuoka와 Igisu, 1998). 본 연구에서도 HL-60 세포는 카드뮴에 의해 JNK가 강하게 활성화됨이 관찰되었다. 이는 카드뮴을 신(腎)세포에 처리한 후 일시적인 JNK의 활성화를 보인 Matsuoka와 Igisu(1998)의 연구와도 일치하는 결과로 카드뮴에 의한 HL-60세포의 세포고사 현상은 MAP kinase중 JNK 활성화에 의하여 매개될 수 있음을 보여주고 있다.

전사활성인자인 AP-1은 c-JUN family의 homodimer 혹은 cJUN 및 cFOS families의 het-

erodimer에 의해서 구성되어 있다(Angel과 Karin, 1991). 또한 전사인자인 NF- $\kappa$ B는 p50/p65 두 개의 subunit으로 이루어진 단백질로, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, M-CSF등 염증반응에 관련된 유전자의 전사적 활성을 조절하는 역할을 한다. NF- $\kappa$ B는 자극이 없을 때에는 억제 단백질인 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 또는 I $\kappa$ B- $\beta$ 와 결합하고 있어, 핵 내부로 이동하지 못하지만, 적절한 신호가 전달되면 I $\kappa$ B- $\alpha$ 나 또는 I $\kappa$ B- $\beta$ 가 파괴되어 NF- $\kappa$ B가 활성화되어 핵 내부로 이동하여 표적유전자(target gene)에 영향을 준다(Bowie와 O' Neill, 2000). NF- $\kappa$ B의 p65 subunit가 결합된 형질전환된 쥐의 간에서 많은 세포고사 현상이 일어남은 이런 사실을 뒷받침해 준다(Beg와 Baltimore, 1996).

본 연구에서 카드뮴에 의해서 JNK의 활성화가 이루어졌기 때문에 전사활성인자인 AP-1과 NF- $\kappa$ B의 활성화여부를 조사한 결과 두 경우 모두 전사적 활성이 초기에 증가된 후 시간의 경과에 따라 감소하고 있어, 카드뮴에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화가 HL-60 세포의 세포고사를 유발시키는데 연관이 있는 것으로 사료된다.

이상의 연구결과에서, 카드뮴에 의한 세포고사는 직접적인 독성효과나 활성산소종에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 결과이기 보다는 세포 내 신호전달체계를 경유하여 간접적으로 유도됨을 알 수 있었다. 추후 caspase 계열중 전단계인 caspase 8, 9 등에 관한 연구, 세포내 칼슘의 역할, MAP kinase 경로중 JNK 이외의 단백질 등의 역할에 대한 연구가 지속된다면 카드뮴에 의한 세포고사 유도경로 및 기전을 밝히고 나아가 세포고사 조절을 통한 카드뮴 독성에 의한 질환의 예방 및 치료에도 응용할 수 있는 계기를 마련할 것으로 사료된다.

## 요 약

그 동안 카드뮴의 세포독성에 대한 기전에 대해 여러 주장들이 제기되어 왔으나 최근에는 카드뮴에 의한 직접적인 독성효과보다는 세포고사에 미치는 영향을 통한 간접적인 연구가 진행되고 있다. 그러나 이러한 연구들은 매우 제한적이어서 카드뮴이 세포고사에 미치는 영향이나 그 유도기전 및 기전에 관여하는 물질에 대해서는 확실히 설명하지 못하고

있다. 이에 본 연구는 일부 카드뮴이 세포독성에 미치는 영향을 apoptotic signaling pathway를 통하여 알아보고자, HL-60 세포를 이용하여 카드뮴 첨가시 세포생존율과 형태학적인 변화 및 caspase, JNK 및 전사 활성인자인 AP-1, NF- $\kappa$ B 등의 활성을 측정 조사하여 생화학적인 특성을 관찰하였다.

HL-60 세포에 카드뮴을 처리했을 때 세포생존율의 감소와 함께 세포고사를 나타내는 세포수축(shrinkage)과 염색질의 응축(condensation) 등의 형태학적 특징이 관찰되었으며 세포고사를 나타내는 또다른 특징인 DNA 분절이 관찰되었다.

HL-60 세포에 카드뮴에 의해 감소했던 세포생존율은 SNP, GSH 및 NAC 등의 항산화 물질들을 동시에 첨가하여도 회복되지 않았다.

HL-60 세포에 카드뮴 처리시 시간의 경과에 따라 세포 내 신호전달기전과 관련된 물질들의 생화학적 특성들을 관찰한 결과, 신호전달기전에서 중요한 역할을 담당하는 caspase-3가 현저하게 증가하고 있었으며, 세포고사에 관여하는 단백질의 유발물질인 JNK의 활성화도 현저하게 나타났다. 또한, 핵 전사인자인 AP-1과 NF- $\kappa$ B도 시간의 경과에 따라 활성화도가 증가하였다

이상의 연구결과에서 카드뮴에 의한 세포고사는 카드뮴에 의한 직접적인 독성효과나 활성산소종에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한 결과라기 보다는 세포 내 신호전달체계를 경유하여 간접적으로 유도되며 이러한 과정은 CPP32-like cysteine protease, JNK 및 전사인자인 AP-1과 NF- $\kappa$ B 등을 경유하여 유도됨을 알 수 있다. 추후 카드뮴에 의한 세포고사과정에서 세포 내 신호전달체계에 관여하는 여러 효소 및 단백질과 핵 내 전사과정에 관련된 물질들의 역할에 대한 연구가 추가된다면 향후 카드뮴에 의한 세포고사 유도경로 및 세포독성 기전을 밝히는 데 일조하리라 사료된다.

## 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 BEI, 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- $\kappa$ B in preventing TNF- $\alpha$ -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.
- Bowie A and O'Neill LAJ. Oxidative stress and nuclear Factor- $\kappa$ B activation. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13-23.
- Buja LM, Eigenbrodtml, 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.
- Fadell B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in Human Disease: A new skin for the old ceremony?. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;266:699-717.
- Fukuno H, Hirai M, Hsueh YM, Yamane Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984;73:395-401.
- 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.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Molec Aspects Med* 1985;8:89-193.
- 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 of cadmium ions. *Toxicology* 1998; 126:203-212.
- Jeong JY, Jue DM. Chlorokine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Immunol* 1997;158:4901-4907.
- 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 Ca<sup>2+</sup> dependent endonuclease in apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 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 NH<sub>2</sub>-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.
- Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997 ;22(8):299-306.
- Oteiza PI, Adonaylo VN and Keen CL. Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be

- influenced by dietary zinc intake. *Toxicology* 1999;137:13-22.
- 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, Johnson GL. 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.