J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 14, No. 4, pp. 577-585, 1998

랫드간장상피세포에서 카드뮴에 의한 산화적 스트레스 및 cytoskeleton 손상 유발에 관한 연구

정상희* · 조명행[1] · 조준형
농림부 수의과학검역원, [1]서울대학교 수의과대학 독성학교실

Induction of Oxidative Stress and Cytoskeleton Damage by Cadmium in WB-F344 Rat Liver Epithelial Cells

Sang-Hee Jeong*, Myung-Haing Cho[1] and Joon-Hyoung Cho
National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF
[1]Department of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
(Received October 8, 1998)
(Accepted November 14, 1998)

***ABSTRACT** : Cadmium is an important industrial and environmental pollutant and has adverse effects on cell growth and metabolism, although the mechanisms of its cellular toxicity are still unclear. This study was performed to elucidate the cytotoxic mechanism of cadmium in the viewpoint of oxidative stress and cytoskeleton alterations in WB-F344 rat liver epithelial cells. 200 μM $CdCl_2$ caused a severe disassembling of microtubule and microfilament and an apparent cell retraction under an observation with fluorescence micoscope. ∝-tubulin and F-actin protein were highly thiolated at 20 min and then disappeared from 1 hour after the treatment of 200 μM $CdCl_2$ in the immunoblot analysis. Intracellular GSH was decreased from 1hr to 24 hrs by 66.6 or 200 μM of $CdCl_2$. Intracellular protein thiol was also decreased by 22.2, 66.6 and 200 μM of $CdCl_2$ at 1 hour after its treatment. The product of lipid peroxidation (malondialdehyde) was increased from 4 hrs by 66.6 and 200 μM of $CdCl_2$. These data indicate that cadmium induces oxidative stress involving disassembling of microtubule and microfilament, thiolation of ∝-tubulin and actin protein, depletion of GSH and protein thiol , and increase of lipid peroxidation.*

***Key Words** : Cadmium, Oxidative stress, GSH, Protein thiol, Malondialdehyde, Cytoskeleton.*

I. 서 론

산화적 스트레스(oxidative stress)란 외인성 또는 내인성 요인에 의해 생체 내의 산화촉진/항산화 균형 메커니즘이 깨지면서 산화촉진 쪽으로 진행되어 있는 상태를 의미하며 이때 핵산 및 핵산염의 변형, 세포의 산화.환원계의 이상, superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 불활화, 체내 필수단백질의 손상, 세포내 각종 수용체의 변형 및 지질의 과산화에 의한 세포막의 손상 등으로 인하여 관절염, 동맥경화증, 광감작 및 각종 심장질환이 발생하고 노화가 촉진되며 암도 유발시키는 것으로 알려져 있다(Cerutti, 1985; Slater, 1989; Lindahl, 1993). 이러한 산화적 스트레스는 free radical에 대한 세포의 반응에 의해 유발되는데 free radical은 하나 또는 둘 이상의 공유결합하지 않은 전자를 가진 분자로서 외부로부터 유래하는 화학물질에 의해서 뿐만 아니라 산소를 소비하는 정상적인 대사과정 중에서도 다량 생산된다. 즉, 산소가 종국적으로 물로 되는 일련의 환원과정의 결과 매우 활성이 높고 고독성인 superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$), hydroxyl($OH^{\cdot}$), peroxyl($RO_2^{\cdot}$), alkoxyl($RO^{\cdot}$) 및 hydrogen peroxide(H_2O_2) 등의 활성산소종과 같은 free radical이 형성되게 된다(Cerutti, 1985; Slater, 1989). 생체 내에는 이들 free radical에 의한 산화적 스트레스에 대한 방어체계가 고도로 발달되어 있는데 이러한 방어체계로는 catalase, glutathione peroxidase, cytochrome C peroxidase와 NADH peroxidase 및 oxidase 등에 의한 hydrogen peroxide의 제거, superoxide dismutase에

*To whom correspondence should be addressed

의한 superoxide radical의 제거와 ascorbic acid 및 glutathione 등과 같은 저분자 물질에 의한 hydroxy radical과 산소의 제거 그리고 Fe^{2+}, Cu^{2+}와 같은 금속류에 의한 활성산소종의 불활화와 endonuclease에 의한 DNA 수복 및 비정상 단백질의 파괴에 의한 단백질 수복 등이 있다(Halliwell과 Gutteridge, 1989).

최근에는 free radical에 의한 산화적 스트레스에 의해 암이 발생하며 다단계 발암과정 중 유발단계뿐만 아니라 촉진단계 및 진행단계에도 모두 관여하는 것으로 알려져 있다(Cerutti, 1985). 즉, 인체세포에서 DNA를 손상시키는 주요 내인성 요인을 조사한 결과 free radical에 의한 세포당 DNA 손상의 유발빈도는 시간당 약 120회나 된다는 것이 보고된 바 있으며, 암 유발단계에서 이들 활성산소종은 DNA와 반응하여 base-pair mutation, rearrangement, deletion, insertion 및 염색체의 치환에 의한 point mutation 등을 야기시킨다고 알려져 있다(Klaassen, 1996). 또한 암 촉진단계에서는 세포질 및 핵내의 신호전달기전에 영향을 주고 세포의 증식, 분화 및 apoptosis와 관련된 유전자의 활성에 관여하며, 암의 진행단계에서는 이들 활성산소종은 protease 활성을 증가시켜 암세포의 전이를 촉진시킨다고 한다(Wisemman과 Halliwell, 1996).

활성산소종에 의해 생체는 prooxidant 상태가 되는데 이로 인해 NADPH, GSH 등 생체 내 방어물질의 함량이 감소하고 mitochondria 내의 Ca^{2+}이 세포질 내로 유출되며 이로 인하여 cytoskeleton의 기능 및 구조가 변화된다고 한다(Cerutti, 1985). Cytoskeleton은 매우 유기화된 구조로서 microtubule, microfilament 및 intermediate filament의 3가지 단백질로 구성되어 있으며 세포의 모양, 운동성, 증식 및 분화 등을 조절한다. 이들은 다량의 sulfhydryl기를 함유하므로 GSH는 이들을 조절하는 주요물질이 된다(Kuriyama와 Sakai, 1974; Li와 Chou, 1992). 그런데 산화적 스트레스에 의해 cytoskeleton 단백질이 손상되면 세포의 기본구조 및 분화 · 성장이 정상적으로 조절되지 않아 암 발현을 유도할 수 있으며 실제로 phorbol agent와 같은 강력한 발암물질은 cytoskeleton을 손상시킨다는 것이 보고된 바 있다(Ojakian, 1981; Zhao, 1987). 또한 free radical에 의하여 산화적 스트레스가 유도되었을 때에는 GSH와 같은 저분자 thiol과 반응하여 가역적인 protein mixed disulfide가 형성되는데 Rokutan 등(1989, 1994)은 이를 protein S-thiolation이라 명명하고 세포의 기본적인 방어기전으로 인식하였으며, hydrogen peroxide와 diamide와 같은 강력한 산화촉진물질들에 대한 방어체계로서 위점막 세포에서는 actin 단백질의 가역적인 thiolation이 유발된다고 하였다. 그리고 산화적 스트레스 발현시 세포 내 GSH 등 thiol group 함유물질들이 감소하므로 Ca^{2+}-ATPase의 활성이 저하되고 Ca^{2+} mobilization이 유발되어 gap junction의 기능이 차단되므로 산화적 스트레스는 암 촉진단계의 한 과정으로 인식될 수 있다(Reed, 1990; Yamasaki, 1990).

대부분의 금속류는 짝을 이루지 않은 전자를 함유하고 있어 radical로서의 성질을 띠며 free radical 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Halliwell과 Gutteridge, 1989). 또한 카드뮴은 매우 높은 전자친화성을 띠며 세포 내에서 free radical을 생성하여 DNA의 손상을 야기하고 sulfhydryl기와 높은 반응성을 가지므로 sulfhydryl기 함유 단백질의 기능을 저하시키는 것으로 보고되어 있다(Sato 등, 1978; Coogan 등, 1992).

본 실험에서는 세포 내에서 free radical을 형성하고, 발암물질로 알려져 있는 카드뮴에 의한 산화적 스트레스 및 이에 의한 microtubule과 microfilament 등 cytoskeleton의 손상에 대하여 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시세포

WB-F344 랫드 간장 상피세포(미국 미시간주립대학교의 Trosko 교수로부터 분양받음)는 10% fetal bovine serum과 50 μg/m*l*의 gentamicin sulfate가 첨가된 Dulbeco's modified Eagle's medium(Gibco, USA)을 사용하여 37°C의 5% 탄산가스 부란기에서 배양하였으며 계대수가 12~25대인 것을 사용하였다. 세포는 6 well 디쉬(직경, 35 mm)에 분주하여 95% 정도 차도록 배양한 후 $CdCl_2$를 처리하기 하루 전에 새로운 배지로 교환해 주었다.

2. $CdCl_2$ 용액제조 및 투여

$CdCl_2$(100% 순도, Sigma)는 5% HNO_3에 녹인 후 여과 멸균하여 이 용액을 배양액 1 m*l*당 1 μ*l*의 용량으로 투여하였다. Actin filament와 microtubule의 형태학적 관찰 및 protein thiolation에 관여하는 단백질의 경시별 변화 검색시험에서는 배양액 중 $CdCl_2$의 최종농도가 200 μM이 되도록 제조하였고, 세포 내의 glutathione, protein thiol 및 malondialdehyde 함량 측정시험에서는 배양액중 최종농도가 7.4, 22.2, 66.6 및 200 μM이 되도록 제조하였다.

3. Microtubule의 형태학적 관찰

$CdCl_2$ 투여에 의한 microtubule의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 Graff 등(1993)에 의한 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 즉, 세포를 glass coverslip 위에서 충분히 배양한 후 $CdCl_2$를 200 μM의 용량으로 30분, 1, 2 및 4시간 동안 처리하였다. PBS로 세척한 후 세포의 고정과 함께 염색액의 침투를 용이하게 하기 위해 0.25% glutaraldehyde 및 0.5% Triton X-100을 순서대로 각각 10분씩 처리하였다. PBS로 세척한 후 0.3% Triton X-100 에 1시간 동안 방치하고 다시 PBS로 세척한 다음 PBS를 사용하여 1 : 100으로 희석한 monoclonal tyrosinated α-tubulin antibody(Biogenesis, USA)를 45분간 처리한 후 PBS로 충분히 세척하였다. 이후 PBS로 1 : 100 희석한 fluorescence isothiocyanate conjugated goat anti-mouse IgG 2nd antibody를 45분간 처리한 후 PBS로 충분히 세척한 다음 slow fade mounting medium (Molecular Probes, USA)으로 봉입한 후 형광현미경 (Nikon, Japan) 하에서 B2 filter를 장착하여 관찰하였다.

4. Actin filament의 형태학적 관찰

$CdCl_2$에 의한 actin filament의 형태변화를 관찰하고자 Mills와 Ferm(1989)의 방법에 준하여 actin을 염색하여 형광현미경하에서 관찰하였다. 간략히 기술하면, 세포를 glass coverslip위에 분주하여 약 95%까지 덮을 정도로 배양한 다음 $CdCl_2$를 200 μM로 처리한 후 30분, 1, 2, 및 4시간 후에 Ca^{2+}, Mg^{2+} free PBS(PBS, pH 7.4)로 3번 세척하고 10% phosphate buffered formalin으로 10분간 고정한 다음에 PBS로 다시 3번 세척하고 0.02% Triton X-100을 10분간 처리한 후 PBS로 3번 세척하였다. 실온에서 세포에 165 nM로 PBS에 녹인 rhodamin phalloidin(Molecular Probes, USA)을 10분간 처리한 후 PBS로 충분히 세척하였다. 세포를 slow fade mounting medium(Molecular Probes, USA)으로 봉입한 후 rhodamin filter를 사용하여 형광현미경(Nikon, Japan)하에서 관찰하였다.

5. ∝-tubulin 및 F-actin 단백질의 thiolation 등 경시별 변화 관찰

$CdCl_2$에 의해 ∝-tubulin 및 F-actin 단백질의 thiolation 등 경시별 변화를 검색하기 위해 Rokutan 등(1994)에 의한 방법을 변형하여 수행하였다. 즉, 직경 35 mm 배양 디쉬에 배지 m*l*당 1×10^5개의 세포를 분주하여 2일간 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세포를 닦은 후 5 μg/m*l*의 cycloheximide로 37°C에서 20분간 처리하여 전처리과정 중에 단백질이 생성되는 것을 차단하였다. 이후 50 μM의 L-cystine 및 5 μg/m*l*의 cycloheximide를 함유하는 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH 7.4)에서 4시간 더 배양하였다. 배지를 제거한 후 세포를 충분히 닦아주고 200 μM의 $CdCl_2$를 함유한 HBSS를 넣어 37°C에서 배양하면서 5분, 20분, 1시간 및 4시간째에 배양디쉬를 재빨리 얼음 위에 놓고 배양액을 제거하여 반응을 정지시켰다. 이후 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF), 0.33 mM leupeptin, 0.24 mg/m*l* chymostatin, 0.35 mM pepstatin 및 4.8 TIU/m*l* aprotinin과 단백질 추출과정 중에 S-thiolation되는 것을 막기 위한 50 mM N-ethylmaleimide를 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4) 200 μ*l*를 세포에 재빨리 첨가한 후 rubber policeman으로 세포를 긁어내어 모은 후 pestle type homogenizer (Jaeil Co., Korea)로 균질화하여 4°C에서 11,300 g로 20분간 원심분리하여 상청을 분리해냈다. 환원제가 없는 12% SDS-PAGE에 세포액을 loading하여 전기영동한 후 coomassie brilliant blue R-250 염색액으로 염색하였다. 이후 thiolation된 단백질을 동정하기 위하여 SDS-PAGE gel상에 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하여 3% BSA를 1시간 처리하여 비특이 단백질을 제거한 후 mouse monoclonal anti-∝-tubulin IgG1 (1 : 100, Biogenesis, USA) 또는 rabbit polyclonal anti-actin IgG(1 : 50, Zymed, USA)를 넣어 37°C에서 1시간 처리한 후 affinity purified goat-anti-mouse 또는 rabbit IgG coupled with peroxidase를 37°C에서 1시간 처리하고 HRP color development solution을 사용하여 결합된 antibody를 발색하였다.

6. 세포 내의 glutathione(GSH) 함량측정

$CdCl_2$에 의한 세포내 GSH 함량의 변화를 조사하기 위해 Wan 등(1993)의 방법에 준하여 세포내 GSH 함량을 측정하였다. 즉, 세포에 $CdCl_2$를 7.4, 22.2, 66.6 및 200 μM의 농도로 처리한 후 30분, 1, 2, 4 및 24시간 후에 배지를 제거하고 1% collagenase(type I, Sigma)와 0.2% trypsin inhibitor를 함유한 혈청이 없는 배지를 넣고 37°C에서 30분간 처리하였다. 이후 세포를 수거하여 원심분리한 후 상청액은 버리고 세포층에 5 mM EDTA를 함유한 1 m*l*의 0.1 M PBS(pH 8.0)를 넣어 세포를 재부유하였다. 재부유액 0.1 m*l*를 채취하여 단백질함량을 측정하였고 나머지 재부유액을 얼음위에서

30초간 sonication한 후 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상청액을 채취하였다. 상청액에 metaphosphoric acid를 최종농도가 5%가 되도록 첨가한 후 100 μl의 *o*-phthalaldehyde 액(1 mg/ml)을 처리하여 형광분광광도계(Shimazu, Japan)로 여기 및 방사 파장을 각각 350 및 420 nm로 하여 측정하였으며 세포 내 GSH 함량은 protein mg당 nmol로 표시하였다.

7. 세포 내 protein thiol 함량 측정

$CdCl_2$에 의한 세포 내 protein thiol 함량의 변화를 조사하고자 Ellman's reagent를 사용하여 Nagelkerke 등(1989)에 의한 방법에 준하여 protein thiol 함량을 측정하였다. 즉, 세포에 $CdCl_2$를 7.4, 22.2, 66.6 및 200 M의 농도로 처리한 후 30분, 1, 2, 4 및 24시간 후에 배지를 제거한 후 rubber policeman으로 세포를 긁어내어 6.5% trichloroacetic acid로 2번 닦아주었다. 이후 세포를 2 ml의 0.5 M Tris/HCl buffer(pH 7.6)액에 부유시킨 후 10 mM의 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid를 함유하는 methanol액인 Ellman's reagent 0.1 ml를 넣어 혼합한 후 20분간 방치한 다음 3,000 g에서 3분간 원심분리한 후 분광광도계(Beckman, USA)로 상층액의 흡광도(A_{412} 값)를 측정하였다. 세포 내 protein thiol 함량은 protein mg당 protein thiol을 nmol로 산출하였으며, GSH 표준품(Sigma)을 사용하여 검량선을 작성하였다.

8. Lipid peroxidation 측정

세포 내 지질 과산화물인 malondialdehyde(MDA) 함량은 개량된 thiobarbituric acid(TBA) fluorometric 법(Zhang 등, 1991)에 의하여 측정하였다. 즉, 35 mmΦ 디쉬에 배양된 세포에 $CdCl_2$를 7.4, 22.2, 66.6 및 200 μM의 농도로 처리한 후 30분, 1, 2, 4 및 24시간 후에 PBS로 세척한 후 1 ml의 0.08 N H_2SO_4와 0.125 ml의 10% phosphotungstic acid 용액을 넣어 세포를 긁어서 부유시킨 후 세포부유액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후 세포층에 4 ml의 증류수와 1 ml의 TBA reagent(15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid in 0.25 N HCl)를 넣은 후 96°C의 항온수조에서 60분간 반응시켰다. 이 액을 차게 한 후 3 ml의 n-butanol을 첨가하여 n-butanol층으로 TBA 반응물질을 추출 · 분리하여 여기 및 방사 파장을 각각 515 및 535 nm로 맞추어서 형광광도계(Shimazu, Japan)로 형광광도를 측정하였다. 이때 표준물질로서는 1,1,3,3-tetramethoxy propane을 사용하였으며 protein mg당 MDA의 pmol 값을 산출하였다.

9. 단백질 함량 측정

세포 내 단백질함량은 Coomassie brilliant blue G-250을 사용한 micro assay법으로 측정하였다(Harris와 Angal, 1989). 즉, Coomassie brilliant blue G-250 100 μg을 5 ml의 95% ethanol에 완전히 녹인 후 이 액을 10 ml의 85%(w/v) phosphoric acid와 혼합하여 총량이 100 ml가 되도록 증류수로 희석한 다음 0.45 μm 여과지로 여과하여 염색액으로 사용하였다. 이 염색액은 실온에서 보관하였으며 2주 간격으로 새로 제조하였다. 세포액 0.1 ml에 염색액 0.9 ml를 혼합하여 실온에서 15분간 정치한 후 파장 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 bovine serum albumin(5~100 μg/ml)을 표준물질로 하여 만든 검량선에 대입하여 단백질 함량을 산출하였다.

III. 결 과

1. Cytoskeleton의 형태학적 변화

$CdCl_2$를 200 μM의 농도로 세포에 30분, 1, 2 및 4시간 동안 처리한 후 cytoskeleton의 형태학적 변화를 관찰한 결과 대조군의 세포에서는 물결모양으로 조밀하게 얽혀 있는 microtubule이 관찰되었는데 이들은 밝게 발광하였고 핵주위 및 세포주변부까지 고르게 분포되어 있었다. 또한 대조군에서의 actin(microfilament)은 두껍고 긴 cable과 함께 얇은 filament들이 불규칙적인 모양으로 관찰되었다. 그러나 $CdCl_2$ 200 μM을 투여한 결과 30분부터 microtubule 및 microfilament가 현저히 감소하였고 microfilament는 대조군에 비해 현저히 짧고 얇았으며 이러한 형태학적 변화는 4시간까지 지속되었고 세포는 시간이 경과할수록 더욱 작아지고 원형으로 변하였다(Fig. 1).

2. ∝-tubulin 및 F-actin 단백질의 경시별 변화

$CdCl_2$에 의해 thiolation되는 단백질을 동정하기 위해 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 결과, 주로 49 kDa 단백질과 20, 29 및 43 kDa 단백질 band가 분리되었으며 이들 단백질은 ∝-tubulin과 actin 항체로 Western-blotting한 결과 ∝-tubulin은 강하게 thiolation되었고 actin은 약하게 thiolation되었다. 즉, ∝-tubulin은 분자량이 약 49 kDa인 단백질로서 $CdCl_2$ 200 μM 투여에 의해 5분부터 thiolation 정도가 투여전보다 강해지기

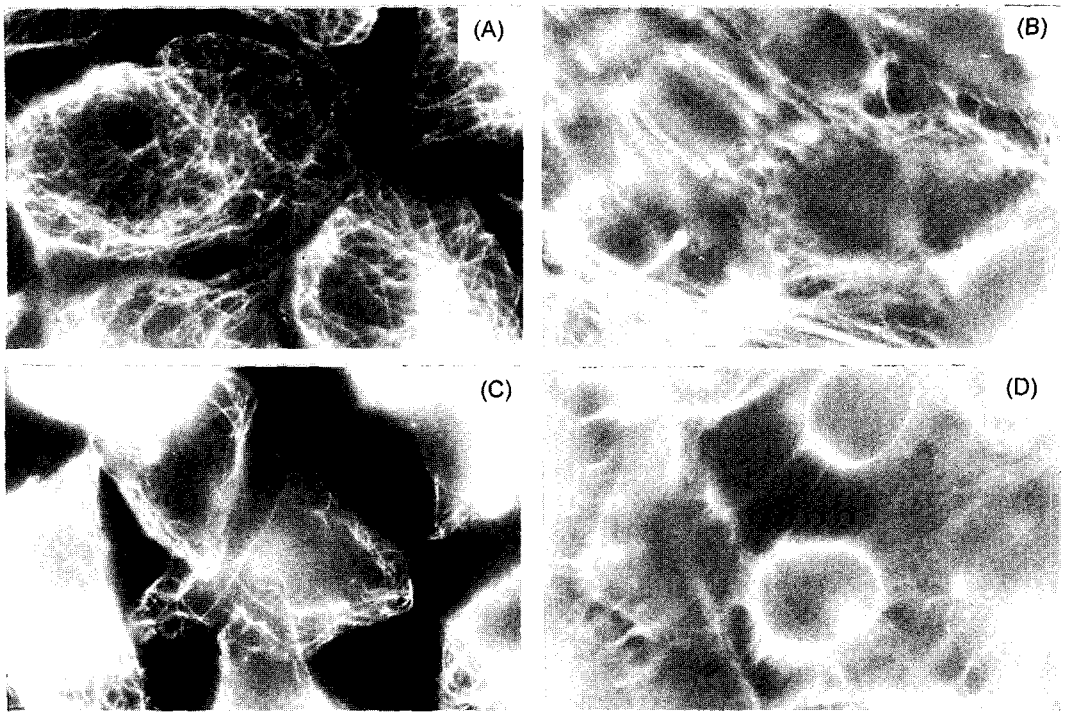

Fig. 1. $CdCl_2$-induced morphological changes of cytoskeleton in WB-F344 rat liver epithelial cells. Figures are microtubules (A, C) and microfilaments (B, D) of control cells (A, B) and those treated with 200 μM $CdCl_2$ for 4 hrs (C, D), respectively. ×1,000.

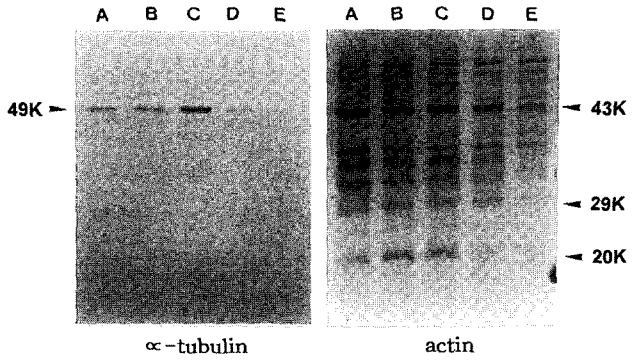

Fig. 2. Immunochemical identification of S-thiolated proteins. Immunochemical detection of ∝-tubulin and actin was carried out as described in materials and methods. Lane A, B, C, D and E were 0, 5 min, 20 min, 1 hr and 4 hrs exposure time to 200 μM of $CdCl_2$, respectively.

시작하여 20분째 가장 강하게 thiolation되었으며 이후 1시간째에는 특이 band가 사라져 단백질이 파괴되었음을 알 수 있었으며, actin은 분자량이 20, 29 및 43 kDa인 단백질로서 20 kDa의 단백질 band가 $CdCl_2$에 의해 5분부터 약하게 thiolation되어 20분까지 유지되다가, 이후 1 또는 4시간째에는 특이 band가 사라져 단백질이 파괴되었다(Fig. 2).

3. 세포 내 GSH 함량변화

$CdCl_2$를 7.4, 22.2, 66.6 및 200 μM의 농도로 투여한

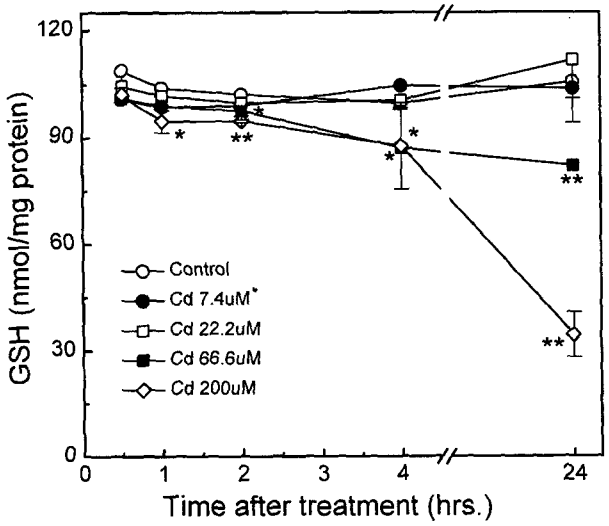

Fig. 3. Change of GSH content in WB-F344 rat liver epithelial cells after the treatment of $CdCl_2$. HNO_3 (0.005%) solution was used as a vehicle control. Results presented are mean±S.D. (n=5). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

후 세포 내 GSH 함량을 측정한 결과 1시간째에는 $CdCl_2$ 200 μM 투여군에서($p<0.05$), 이후 2시간부터 24시간까지는 $CdCl_2$ 66.6 및 200 μM 투여군에서 대조군에 비하여 현저히 감소하였다($p<0.05$; $p<0.01$, Fig. 3).

4. 세포 내 protein thiol 함량변화

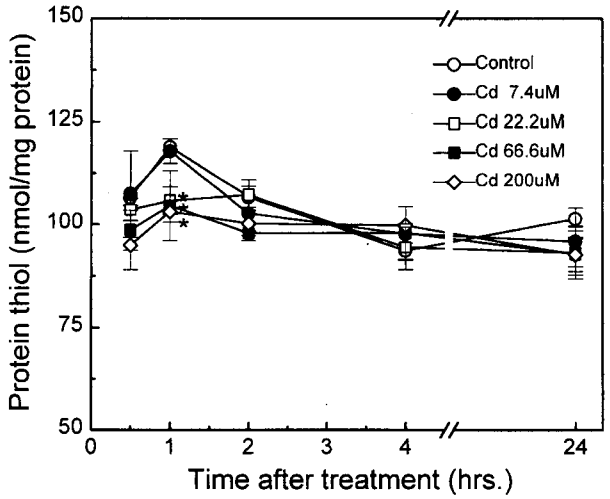

Fig. 4. Change of protein thiol content in WB-F344 rat liver epithelial cells after the treatment of $CdCl_2$. HNO_3 (0.005%) solution was used as a vehicle control. Results presented are mean±S.D. (n=5). *, $p<0.05$.

$CdCl_2$를 7.4, 22.2, 66.6 및 200 μM의 농도로 투여한 후 세포 내 protein thiol의 함량변화를 조사한 결과 22.2, 66.6 및 200 μM 투여군에서는 1시간째에 대조군에 비해 유의하게 낮았으며($p<0.05$) 기타 다른 용량군 및 시간대에서도 전반적으로 대조군에 비하여 낮았으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

5. 세포 내 지질 과산화물의 함량변화

$CdCl_2$를 7.4, 22.2, 66.6 및 200 μM의 농도로 투여한 후 세포내 지질 과산화물인 malondialdehyde의 함량변화를 조사한 결과 1시간째에는 모든 용량군에서 유의하게 낮았으나($p<0.01$), 이후 2시간째에는 큰 차이가 없다가 4시간째에는 200 μM, 24시간째에는 66.6 및 200 μM의 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다($p<0.01$, Fig. 5).

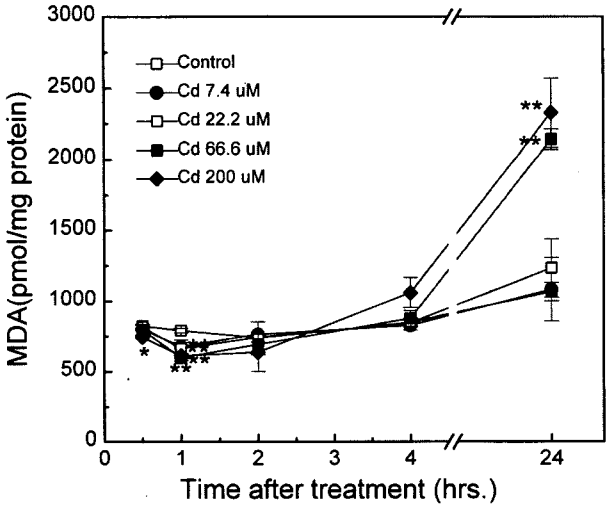

Fig. 5. Changes of MDA content in WB-F344 rat liver epithelial cells after the treatment of $CdCl_2$. HNO_3 (0.005%) solution was used as a vehicle control. Results presented are mean±S.D. (n=5), *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

IV. 고 찰

산화적 스트레스는 하나이상의 공유결합하지 않은 전자를 갖는 free radical에 대한 일련의 생체반응에 의해 유도되는 현상으로서 막지질의 polyunsaturated fatty acyl group으로의 전환에 의한 lipid peroxidation, 단백질의 산화에 의한 효소활성의 저하, 핵산의 구조적 손상에 의한 변이원성 유발, 세포방어체계인 glutathione 등의 고갈 및 탄수화물의 산화에 의한 hyaluronic acid 등 면역계 관여물질의 변형을 유발시켜 다양한 세포독성 및 사멸을 일으킨다(Fraga 등, 1990; Hodgson과 Levi, 1994). 또한 산화적 스트레스로 인하여 세포 내 thiol 들은 disulfide 형태로 전환되며 이는 NAD(P)H의 $NAD(P)^+$로의 산화를 유도하고 아울러 protein mixed disulfide를 형성하는 protein thiolation을 일으켜 mitochondria, 원형질 및 세망내피질 막에 분포되어 있는 Ca^{2+} 운반체계가 불활화됨으로써 세포 내 Ca^{2+}의 함량이 증가하고 이에 따른 각종 세포독성이 발현된다(Zieger, 1985; Collison 등, 1986; Deneke와 Fanburg, 1989).

대부분의 금속류는 짝을 이루지 않은 전자를 함유하고 있어 radical로서의 성질을 띠며 아울러 free radical 형성을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Halliwell과 Gutteridge, 1989). 카드뮴은 전자친화성을 띠며 세포내에서 free radical을 형성하여 DNA와 결합함으로써 DNA를 손상시키는 물질로 알려져 있다(Jeong 등, 1998; Sato 등, 1978; Burkart와 Ogorek, 1986). 또한 카드뮴은 sulfhydryl기와 높은 반응성을 가지며 이러한 성질에 의하여 mitochondrial membrane의 Ca^{2+}-ATPase를 억압하여 세포 내 Ca^{2+} 함량을 증가시키고 이로 인해 세포독성을 유발한다(Sato 등, 1978; Zieger, 1985).

Free radical에 의한 산화적 스트레스는 DNA 손상, 세포간 신호전달체계의 변화 및 protease의 활성화 등을 유발하므로 암 발생에 있어 유발, 촉진 및 진행단계의 모든 과정에 영향을 미치는 강력한 발암원으로 인식되고 있다(Fraga 등, 1990; Collison, 1986). 본 실험에서는 카드뮴의 발암기전을 구명하고자하는 일련의 실험으로서 카드뮴에 의한 산화적 스트레스와 이로 인한 세포의 구조적 변화를 조사하였다.

Cytoskeleton은 고도로 유기화된 구조로서 microtubule,

microfilament 및 intermediate filament의 3가지 단백질로 구성되어 있으며 세포의 모양, 운동성, 증식 및 분화 등을 조절하는 기능을 가지며 다량의 sulfhydryl기를 함유하는 것으로 보고되어 있다(Li와 Chou, 1992). Phorbol ester와 같은 강력한 종양촉진물질들은 microtubule 및 microfilament 등 cytoskeleton에 변화를 초래한다고 보고되어 있으며(Ojakian, 1981; Zhao, 1987), Li 등(1994)에 의하면 카드뮴은 microtubule과 microfilament의 감소를 유발하며 카드뮴에 덜 민감한 세포에는 민감한 세포에 비해 cytoskeletal의 cytosolic fraction에 protein sulfhydryl 양이 많으며 아울러 metallothionein, GSH, protein thiol 함량이 많다고 하였다.

본 실험에서는 카드뮴에 의해 microtubule과 microfilament가 심하게 소실되는 것을 알 수 있었으며 이는 카드뮴에 의한 protein thiolation에 의한 것임을 immunoblotting을 통해 알 수 있었다. 즉, 충분한 량(50 μM)의 L-cystine을 첨가해준 배지에 200 μM의 $CdCl_2$를 투여한 후 immunoblotting한 결과, 5분부터 ∝-tubulin 및 actin 단백질의 thiolation 정도가 높아지기 시작하여 20분째에 가장 높다가 이후 1시간 및 4시간째에는 단백질의 소실이 관찰되었으며 이때에 microtubule 및 actin의 형태학적 이상도 관찰되었다. 그러나 microtubule 및 actin단백질의 손상이 S-tiolation에 의한 것인지를 명확히 확인하기 위해는 radio-labeled cystine을 이용하여 immunoblotting하는 단계가 추가적으로 요구된다. 또한 본 실험에서 카드뮴에 의해 세포 내 GSH 함량이 감소하였고 protein thiol 함량은 전체적으로 낮았으며 지질 과산화물인 malondialdehyde 함량이 증가되었는데 이는 카드뮴에 의해 지질 과산화가 유발되었다는 Stacey 등(1980)의 보고와도 일치한다. 그러나 카드뮴은 세포막의 지질 과산화를 유발하나 이것이 세포독성을 유발하는 직접적인 원인은 아니며 오히려 카드뮴이 세포 및 세포소기관의 sulfhydryl기와 강력하게 결합하여 막구조에 산화적 스트레스를 유발하고 Ca^{2+} 통로에 변화를 일으켜 세포내 Ca^{2+}의 항상성을 깨뜨리고 아울러 카드뮴이 Ca^{2+} 대신 calmodulin에 결합하여 이에 따른 반응을 야기하는 것이 카드뮴에 의한 세포독성의 직접적인 원인이 된다는 보고(Stacey 등, 1980; Perrino와 Chou, 1986; Hinkle과 Osborne, 1994)가 있는 것으로 보아 카드뮴의 세포독성 발현기전의 구명을 위해서는 Ca^{2+}과 calmodulin의 상관관계에 대한 연구가 보완되어야 할 것으로 사료된다. 아울러 본 실험에서 카드뮴 투여 후 1시간째에는 지질과산화물의 함량이 오히려 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였는데 이는 카드뮴이 용량 및 노출시간에 따라 항산화성 및 산화성에 있어서 상반된 성질을 갖는다는 보고(Waalkes 등, 1991)와 일치하며 이는 세포의 방어기전에 의한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 카드뮴은 GSH 함량저하 등 산화적 스트레스 유발물질로서 세포골격 단백질의 protein thiolation을 일으키며 세포 형태의 변화를 유발하며 이는 카드뮴의 세포독성 및 발암기전과 관련성이 높을 것으로 생각된다.

V. 요 약

카드뮴의 발암기전을 구명하기 위한 일련의 실험으로서 카드뮴에 의한 WB-F344 랫드 간장 상피세포에서의 cytoskeleton의 변화, protein thiolation과 cytoskeleton과의 관련성, GSH, protein thiol 및 MDA 함량의 변화 등을 측정하여 카드뮴이 산화적 스트레스를 유발하는지 여부를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. $CdCl_2$를 200 μM의 농도로 세포에 4시간 동안 투여한 결과 세포는 형태학적으로 원형의 모양으로 변하면서 다소 작아졌고 microtubule은 감소하였으며, actin은 굵기도 얇아지고 수도 감소하였다.

2. $CdCl_2$를 200 μM의 농도로 세포에 4시간 동안 투여한 결과 ∝-tubulin 및 actin 단백질은 5분부터 thiolation이 유발되기 시작하여 20분째에 가장 높게 유발되다가 1시간 및 4시간째에는 이들 단백질이 소실되었다.

3. $CdCl_2$를 세포에 30분~24시간 동안 투여한 결과 세포 내의 glutathione(GSH) 함량은 투여 후 1시간째에는 200 μM 투여군에서($p<0.05$), 이후 2~24시간까지는 66.6 및 200 μM 투여군에서 현저히 감소하였다($p<0.05$; $p<0.01$).

4. 7.4~200 μM의 카드뮴 투여군에서의 세포 내 protein thiol의 함량은 투여후 30분~24시간 동안 전반적으로 대조군에 비해 낮았으며 특히 22.2, 66.6 및 200 μM 투여군에서는 투여후 1시간째에 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($p<0.05$).

5. 카드뮴 투여 후 지질 과산화물인 malondialdehyde (MDA)의 세포 내 함량은 투여후 1시간째에는 대조군에 비해 오히려 감소하는 경향을 보였으나 이후 4시간째에는 200 μM 투여군에서, 24시간째에는 66.6 및 200 μM 투여군에서 유의하게 증가하였다($p<0.05$; $p<0.01$).

이상의 결과로 볼 때 카드뮴에 의한 microtubule 및 actin의 형태학적 이상은 이들 단백질이 카드뮴에 의해 thiolation되었기 때문인 것으로 생각되며 세포 내 GSH 및 protein thiol이 감소하고 MDA가 증가한 것으로 보아 $CdCl_2$는 산화적 스트레스 유발물질임을 알 수 있었

고 이러한 현상들이 카드뮴의 암 유발 및 촉진에 관여할 것으로 사료된다.

참고문헌

Burkart, W. and Ogorek, B. (1986): Genotoxic action of cadmium and mercury in cell cultures and modulation of radiation effects. *Toxicol. Environ. Chem.*, **12**, 173-183.

Cerutti, P.A. (1985): Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**, 375-381.

Collison, M.W., Beidler, D., Grimm, L.M. and Thomas, J.A. (1986): A comparison of protein S-thiolation (protein mixed-disulfide formation) in heart cells treated with t-butyl hydroperoxide or diamide. *Biochem. Biophys., Acta.* **885**, 58-67.

Coogan, T.P., Bare, R.M. and Waalkes, M.P. (1992): Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: Reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113**, 227-233.

Deneke, S.M. and Fanburg, B.L. (1989): Regulation of cellular glutathione, Invited review. *Am. J. Physiol.*, **257**, L163-L173.

Fraga, C.G., Shigenaga, M.K., Park, J.W., Dega, P. and Ames, B.N. (1990): Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2-deoxy-guanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4533-4537.

Graff, R.D., Philbert, M.A., Lowndes, H.E. and Reuhl, K.R. (1993): The effect of glutathione depletion on methyl mercury-induced microtubule disassembly in cultured embryonal carcinoma cell. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **120**, 20-28.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989): Protection against oxidants in biological systems. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press Co., Oxford. pp. 86-179.

Harris, E.L.V. and Angal, S. (1989): Protein purification methods. A practical approach. IRL Press Co., p. 16.

Hinkle, P.M. and Osborne, M.E. (1994): Cadmium toxicity in rat pheochromocytoma cells: Studies on the mechanism of uptake. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **124**, 91-98.

Hodgson, E. and Levi, P.E. (1994): Mechanism of chemically induced cell injury and cellular protection mechanism in Introduction to biochemical toxicology 2nd ed., Appleton and Lange Press Co., London, pp. 266-287.

Jeong, S.-H., Cho, M.H. and Cho, J.H. (1998): Genotoxicity of Cadmium chloride in *Salmoneller typhimurium* and rat liver epithelial *Cells. Korean J. Vet. Res.*, **38**(3), 606-613.

Klaassen, C.D. (1996): Chemical carcinogenesis in Toxicology the basic science of poisons. 5th ed., McGraw-Hill Press Co., USA pp. 201-226.

Kuriyama, R. and Sakai, H. (1974): Role of tubulin-SH groups in polymerization to microtubules. *J. Biochem.*, **76**, 651-654.

Li, W. and Chou, I.N. (1992): Effects of sodium arsenite on the cytoskeleton and cellular glutathione levels in cultured cell. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **114**, 132-139.

Li, W., Kagan, H.M. and Chou, I.N. (1994): Alterations in cytoskeletal organization and homeostasis of cellular thiols in cadmium resistant cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **126**, 114-123.

Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709-715.

Mills, J.W. and Ferm, V.H. (1989): Effect of cadmium on F-actin and microtubules of maolin-darby canine kidney cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **101**, 245-254.

Nagelkerke, J.F., Dogterom, D., De Bont, H.J.G.M. and Mulder, G.J. (1989): Prolonged high intracellular free calcium concentrations induced by ATP are not immediately cytotoxic in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **263**, 347-353.

Ojakian, G.K. (1981): Tumor promoter induced changes in the permeability of epithelial cell tight junctions. *Cell*, **23**, 95-103.

Perrino, B.A. and Chou, I.N. (1986): Role of calmodulin in cadmium-induced microtubule disassembly. *Cell Biol. Intl. Reports.*, **10**, 565-573.

Reed, D.J. (1990): Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 495-502.

Rokutan, K., Johnston, JR. R.B. and Kawai, K. (1994): Oxidative stress induces S-thiolation of specific proteins in cultured gastric mucosal cell. *Am. J. Physiol.*, **266**, G247-G254.

Rokutan, K., Thomas, J.A. and Sies, H. (1989): Specific S-thiolation of a 30 kDa cytosolic protein from rat liver under oxidative stress. *Eur. J. Biochem.*, **179**, 233-239.

Sato, N., Kamada, T., Suematsu, T., Abe, H., Furuyama, F. and Hagihara, B. (1978): Cadmium toxicity and liver mitochondria II. Protective effect of hepatic soluble fraction against cadmium-induced mitochondria dysfunction. *J. Biochem.*, **84**, 127-133.

Slater, T.F (1989): Disturbances of free radical reactions: A cause or consequence of cell injury? in Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals. Elsevier Science publishers, B.V.,

Amsterdam. pp. 1-9.

Stacey, N.H., Cantilena, J_R., L.R. and Klaassen, C.D. (1980): Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 470-480.

Waalkes, M.P., Diwan, B.A., Weghorst, C.M., Bare, R. M., Ward, J.M. and Rice, J.M. (1991): Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **110**, 327-335.

Wan, X., Lachapelle, M., Marion, M., Fournier, M. and Dnizeau, F. (1993): Recovery potential of hepatocytes from inhibition of albumin secretion by cadmium. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **38**, 381-392.

Wisemman, H. and Halliwell. B. (1996): Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, **313**, 17-29.

Yamasaki, H. (1990): Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11 (7)**, 1051-1058.

Zhang, L.X., Cooney, R.V. and Bertan, J.S. (1991): Carotinoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: Relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, **12**, 2109-2114.

Zhao, Y., Li, W. and Chou, I.N. (1987): Cytoskeletal perturbation induced by herbicides, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T). *J. Toxicol. Environ. Health*, **20**, 11-26

Zieger, D.M. (1985): Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiol-disulfide in metabolic regulation. *Annu. Review Biochem.*, **54**, 305-329.