

## Hepa1c1c7 세포에서 카드뮴에 의한 세포사멸 신호전달체계에 관한 연구

오경재\* · 염정호

전북대학교 의과대학 예방의학교실

### Apoptotic Signaling Pathway by Cadmium in Hepa1c1c7 cells

Gyung Jae Oh\* and Jung Ho Youm

Department of Preventive Medicine and Public Health,  
School of Medicine Chonbuk National University, Jeonju 561-180, Korea  
(Received July 3, 2001)  
(Accepted August 10, 2001)

**ABSTRACT :** Cadmium is an ubiquitous toxic metal and chronic exposure to cadmium results in the accumulation of cadmium in the liver and kidneys. In contrast, acute exposure leads to damage mainly in the liver. Apoptosis induced by cadmium has been shown in many tissues in vivo and in cultured cells in vitro. However, the molecular mechanism of cadmium-induced apoptosis is not clear in hepatocyte. To investigate the induction of apoptosis in the hepatocyte, we used mouse hepatoma cell line, Hepa1c1c7 cells, and analysed the molecules that involved in cadmium-induced apoptosis. Cadmium induced the genomic DNA fragmentation, PARP cleavage, and activation of caspase-3 like protease. Caspase-9 cysteine protease was activated in a time-dependent manner, but caspase-8 cysteine protease was not significantly activated in cadmium-treated Hepa1c1c7 cells. Cadmium also induced mitochondrial dysfunction including cytochrome c release from mitochondria, change of mitochondrial membrane potential transition, and translocation of Bax protein into mitochondria. These results strongly indicated that the signal pathway of apoptotic death in cadmium-treated Hepa1c1c7 cells is modulated by caspase cascade via mitochondria.

**Key Word :** Cadmium, Apoptosis, Hepa1c1c7 cell, caspase-3, caspase-9, Cytochrome c, Bax

#### I. 서 론

환경 내 주요 유해물질 중 하나인 카드뮴은 인체에 대해 독성을 나타내는 대표적인 중금속으로 인체 발암물질로서 인정되고 있으며(IARC, 1993) 체내 일차 방어작용과 함께 생명체의 면역체계에 미치는 영향이 그 간의 연구를 통해 알려지면서 카드뮴은 최근 중요한 면역학 및 독성학적 연구의 대상이 되고 있다(Snow, 1992; Waalkes와 Misra, 1996). 카드뮴은 아연 광석의 채광이나 제련 과정, 전기도금, 용접, 염화비닐의 안정제, 형광등, 반도체 제작, 자동차와 항공기제작 등의 산업에 광범위하게 사용되고 있어 작업환경에서 발생하는 분진이나 흡에 의한 직업적 폭로는 점차 증가하고 있는 추세로서 이러한 카드뮴의 산업장에서의 광범위한 이용으로 인한 폭로와 흡연 및 오염된 물이나 식품을 통한 생물학적 체내 농축에 따른 유해성은 여

전히 문제로 남아있다(Klassen 등, 1998).

일반적으로 생체로 유입된 카드뮴은 림프구의 항체기억 반응, 대식세포의 탐식 작용과 T 세포의 면역활성화 반응 억제와 같은 면역기능의 저하를 초래하는데, 이는 카드뮴에 의한 T 세포와 B 세포 증식 억제(Gaworski와 Sharma, 1978), T 세포에서 발현되는 여러 효소들의 활성 저하(Dieter 등, 1983), 면역세포의 DNA 합성 저해(Gaworski와 Sharma, 1978; Nakatsuru 등, 1985), 항체 형성능력과 반응력의 저하(Lawrence 등, 1987; Benko 등, 1990) 등에 의해서 유발되는 것으로 보고되고 있다.

최근에는 카드뮴에 의한 면역능력의 저하와 독성에 대한 연구의 축적으로 세포에 대한 독성기전에는 apoptosis(세포사멸)가 관여한다는 연구 결과들이(Lohmann와 Beyersmann, 1993; Azzouri 등, 1994; Shenker 등, 1997; Habeeb 등, 1998; Hirata 등, 1998) 보고되면서, 카드뮴의 세포독성에서 apoptosis의 관련성과 유도 기전에 대한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다.

\*To whom correspondence should be addressed

카드뮴은 인체에 만성적인 폭로시 간과 신장에 축적되는 반면(Shaikh와 Lucis, 1972; Kotsonis와 Klassen, 1977) 급성 폭로시에는 주로 간에 축적된다(Kotsonic와 Klaassen, 1977). 카드뮴에 의한 급성 폭로시 간독성은 간세포의 부종, 지방성 변화, 국소 또는 광범위한 괴사 등으로 나타나며(Dudley 등, 1982) 전자현미경 상(像)으로는 세포 내 리보솜의 확장 및 막에 부착된 리보솜의 손실, 핵 응축 등이 나타난다(Dudley 등, 1984). 또한 카드뮴은 분리된 소 또는 쥐의 간세포, 백혈구 세포 등에서 시간과 농도가 증가함에 따라 세포사멸을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Lohmann와 Beyersmann, 1994; EL-Azzouzi 등, 1994; Sultan 등, 1998). 그러나 이러한 그 간의 많은 연구에도 불구하고 카드뮴의 독성기전이나 세포 내 분자 수준의 신호전달경로에 대해서는 정확히 알려진 바가 없다.

이에 본 연구에서는 카드뮴의 주요한 표적장기(target organ)이며 카드뮴이 만성 및 급성 폭로시 축적되는 가장 중요한 장기인 간(liver)에 미치는 세포독성 기전을 밝히는 데 Hepal1c7 세포를 이용하여 세포사멸 과정에 관여하는 caspase cysteine protease 활성화와 Bax 단백질의 발현 여부, 미토콘드리아의 막전위차 변화 등을 관찰하여 카드뮴의 세포독성과 관련된 세포사멸 신호전달체계의 경로를 규명함으로써 카드뮴의 세포사멸 연구를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

실험에 필요한 minimum essential medium alpha medium(MEM- $\alpha$ ), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum : FBS)은 GIBCO BRL사(Grand와 Island, NY, U.S.A.)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, U.S.A.) JC-1은 Molecular probes(Pitchford Avenue, OR, U.S.A.) 제품을 사용하였다. Bcl-XL, Bax, Bak, 등의 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, U.S.A.), anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ECL kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England) 제품을 anti-cytochrome c 항체는 Pharmigen사(San Diego, CA, U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, VDAC은 Calbiochem(Darmstadt, Germany)으로부터 구입하였다. Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega사(Medison, WI)에서 구입하였

다. CdCl<sub>2</sub> 등은 Sigma(St. Louis, U.S.A.)사로부터 구입하여, phosphate buffered saline(PBS)으로 용해하였고 이 용액 모두를 0.2  $\mu$ m(Millipore, Bedford, MA)필터로 통과시켜서 사용하였다.

#### 2) 세포 배양

Hepal1c7 cell은 Mouse 간의 Hepatoma cell에서 유래한 세포주로서 배양이 용이하여, 카드뮴의 생체내 표적장기인 간에 대한 세포독성기전을 알아보는 데 유용하게 이용되고 있다. Hepal1c7 cell의 배양은 10% FBS가 포함된 MEM- $\alpha$  세포배양액을 이용하였으며 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37°C 세포배양기에서 실시하였다. 24시간 간격으로 trypsin을 이용하여 세포배양액을 교체하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포에서 CdCl<sub>2</sub>에 의한 세포사멸 현상과 이에 관련한 분자생물학적인 실험을 수행하였다.

## 2. 방법

#### 1) 세포 생존율 측정

세포 생존율 측정은 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1 $\times$ 10<sup>5</sup> 세포수/ml)를 1 ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, MTT 용액(5 mg/ml PBS)을 배양액 최종부피의 1/10 되게 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액 100  $\mu$ l/well을 첨가하여 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) DNA 분절 분석

DNA 분절현상을 조사하기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하여 추출하였다. 먼저 CdCl<sub>2</sub>가 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer(100 mM NaCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-Cl, pH 7.4, 20 mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가하여 세포를 파괴한 후 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260 nm와 280 nm의 파장에서 Spectrophotometer(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5  $\mu$ g을 1.5% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide

로 염색하여 UV 등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

### 3) Caspase계 cystein protease 활성도 측정

CdCl<sub>2</sub> 처리 후 포집된 Hepal1c7(1×10<sup>6</sup>)를 4°C에서 15분 lysis buffer(1% TritonX-100, 0.32 M sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin)로 용해하고 13,000 rpm으로 15분 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid(BCA, Sigma Co. MO, USA)법으로 단백질을 정량하고, 세포파쇄액을 분석 완충용액(100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% Chaps, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시킨 후 Fluorometer(Molecular Devices Co, USA)로 측정하였다. 먼저 caspase-3 protease의 효소 활성의 측정은 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC)(Calbiochem Co. CA, USA) 50 µM을 이용하였고, 이들 형광기질의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength(38 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다. Caspase-8 protease 효소활성은 Ac-IETD-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin(AFC)(Calbiochem Co. CA, USA) 50 µM을 기질로 사용하였으며 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 50 nm(emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다. Caspase-9 protease 효소활성은 Ac-LEHD-AFC(Calbiochem Co. Germany) 50 µM을 기질로 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 400 nm (excitation wavelength)와 505 nm(emission wavelength)의 파장 하에서 측정하였다.

### 4) Western blotting

배양된 세포에 CdCl<sub>2</sub>를 처리한 일정 시간 후에 포집하여, 차가운 HBSS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액(50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin)과 4°C에서 30분 처리하였다. 13,000 rpm에서 20분 원심분리하여 얻은 세포파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 200 µg)은 2xample buffer와 섞어 100°C에서 5분 끓인 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. Bcl-XL, Bax, Bak, Fas 그리고 cytochrome c에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim

milk/TBST에 1 : 1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 TBST로 10분씩 3번 세척하여 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBST로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

### 5) 세포질과 미토콘드리아 분획의 분리

CdCl<sub>2</sub>를 처리한 일정 시간 후에 배양세포를 포집하여, 냉 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 Buffer A(250 mM sucrose, 20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 17 µg/ml PMSF, 8 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin)로 4°C에서 20분 반응시킨후 homogenizer로 10회 파쇄하여 4°C, 750 g에서 10분 원심분리하였다. 원심분리한 상층액을 새 튜브에 이동시킨 후 다시 4°C, 20,000 g에서 10분간 원심 분리하였으며, 이때 상층액은 세포질로, 침사물은 미토콘드리아 분획으로 사용하였다.

### 6) 미토콘드리아 막전위 측정

세포내 소기관인 하나인 미토콘드리아의 막전위(membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 시행하였다. CdCl<sub>2</sub>를 처리한 세포들을 PBS로 2회 세척하였다. JC-1(10 µg/ml)을 MEM-α 배지에 희석하여 20분 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광 현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

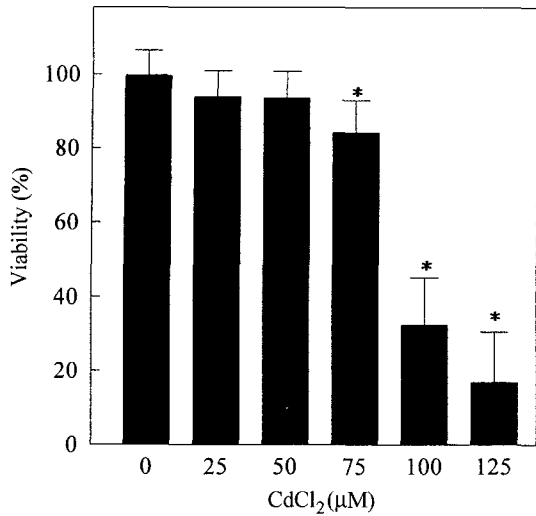
### 7) 자료분석

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 표시하였다. 측정자료들의 각 군간의 차이를 비교하기 위해서는 일원배치 분산분석법(one-way ANOVA)을 이용하여, 분산분석의 결과에 따라 post-hoc test (Scheffe's test)를 이용하였다.

## III. 결 과

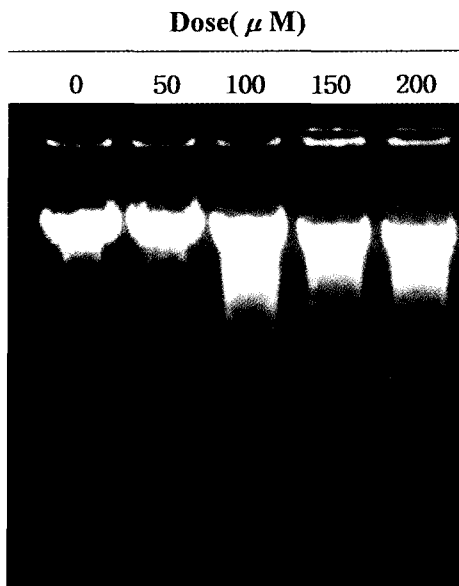
### 1. 카드뮴에 의한 세포독성 및 세포사멸의 유도

카드뮴이 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 카드뮴을 농도별로 24시간 처리한 후 생존율을 측정하고, 25 µM 이하의 농도에서는 Hepal1c7 세포의 생존율에 유의한 변화가 없었으나, 50 µM 이상의 카드뮴 농도에서는 농도가 증가함에 따라 생존율이 지속적으로 감소하기 시작하여 100 µM 이상의 농도에서는 현저하게 감소하였다(p < 0.05, Fig. 1). 세포사멸의 특징중의 하나인 DNA 분절 현상을 관찰하기 위하여 카드뮴을 농도별로 24

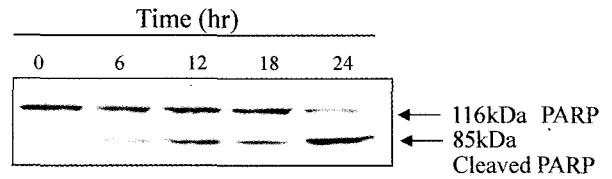


**Fig. 1.** Effect of cadmium on cell viability in Hepal1c7 cells. Hepal1c7 cells were treated with various concentrations for 24 hr and then viability of the cells were measured by MTT assay. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. \*Significantly different from the control (0 μM) at  $p < 0.05$  by the Sheffe's test.

시간 처리한 후 DNA를 추출하여 agarose 전기영동 한 결과 세포생존율이 현저하게 감소되는 100 μM 농도에서 DNA 분절이 관찰되었다(Fig. 2). 또한 100 μM 농도로 24 시간 처리한 Hepal1c7 세포에서 caspase 3의 기질물질인 PARP 단백질(116 kDa band)은 시간이 경과함에 따라 감소하는 반면 PARP 분해단백질(85 kDa band)은 증가하였



**Fig. 2.** Cadmium induced the ladder pattern fragmentation of genomic DNA in Hepal1c7 cells. Hepal1c7 cells were treated with various concentration of cadmium (0, 75, 100, 125, and 150 μM) for 24 hr. DNA fragmentation was analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.



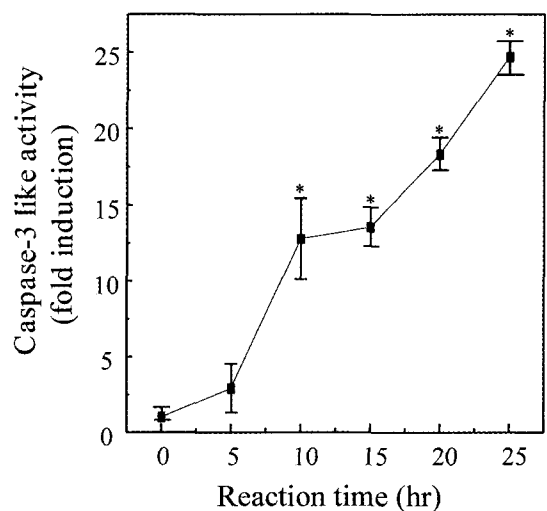
**Fig. 3.** Cadmium cleaved poly (ADP-ribose) polymerase in Hepal1c7 cells. The cells were treated with 100 μM cadmium for indicated time.

다(Fig. 3). 이상의 결과에서 카드뮴에 의한 Hepal1c7 세포에서의 세포죽음의 형태는 세포사멸임을 확인할 수 있다.

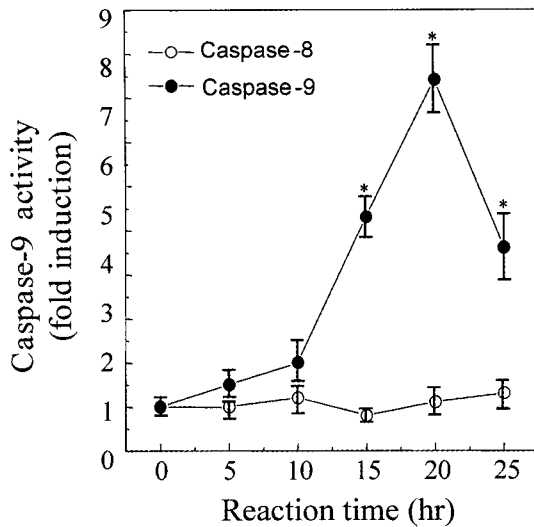
### 2. 카드뮴이 Caspase 활성화에 미치는 영향

카드뮴 처리에 의한 세포사멸이 세포내 신호전달체계에 서 중요한 기전중의 하나인 caspase의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 시간의 경과에 따른 caspase-3, 8, 9의 활성정도를 조사하였다. 카드뮴 100 μM 처리 후 caspase-3의 활성은 초기부터 증가하기 시작하여 25시간에는 대조군에 비해 25배 증가하였다( $p < 0.05$ , Fig. 4). caspase-9의 활성은 10시간 쯤 2배 정도 증가하였으며 시간의 경과에 따라 계속 증가하여 20시간 후 8배로 최고의 활성을 보이다가 이후 감소하는 경향을 보였다( $p < 0.05$ , Fig. 5). 그러나, caspase-8의 활성은 시간의 경과와 무관하여 변화가 없었다(Fig. 5).

세포사멸의 신호가 미토콘드리아에 전달되면 미토콘드리아에서 cytochrome c가 나와서 caspase-9을 활성화시키



**Fig. 4.** Cadmium induced the activity of caspase 9-like cysteine proteases in Hepal1c7 cells. Hepal1c7 cells were treated with cadmium (100 μM) for 25 hr. Values are expressed as mean±S.D. of three experiments. \*Significantly different from the control (0 hr) at  $p < 0.05$  by the Sheffe's test.



**Fig. 5.** Cadmium induced the activity of caspase-9 cysteine proteases in Hepal1c7 cells. Hepal1c7 cells were treated with cadmium (100  $\mu$ M) for indicated time. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. of three experiments. \*Significantly different from the corresponding controls (0 hr) at  $p < 0.05$  by the Sheffe's test.

고 활성화된 caspase-9은 caspase-3를 활성화시키는 과정을 고려하면, 이상의 실험결과는 카드뮴에 의한 Hepal1c7 세포의 세포사멸이 caspase-3 like cysteine protease와 caspase-9의 활성을 통하여 일어남을 보여주고 있다.

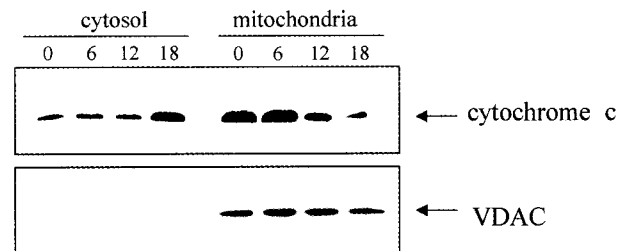
### 3. 카드뮴이 미토콘드리아의 cytochrom c 방출에 미치는 영향

카드뮴에 의해 caspase-9이 활성이 증가되는 것을 Fig. 5에서 확인하였다. 따라서 미토콘드리아에서 세포질내로 방출되어 세포질내 단백질인 Apaf-1 및 dATP와 함께 복합체를 형성하여 caspase-9 protease의 활성화를 유도하는 cytochrom c의 세포질내로의 이동을 Western blot으로 조사하였다. 100  $\mu$ M 농도의 카드뮴을 6, 12, 18시간 동안 Hepal1c7 세포에 처리한 후 세포를 포집, 파쇄하여 세포질과 미토콘드리아의 분획을 분리하였다. 이 때 세포질과 미토콘드리아 분획은 미토콘드리아에만 존재하는 단백질인 VDAC에 대한 Western blot을 통하여 정상 분리되었음을 확인한 후 시행하였다. 카드뮴 처리 12시간 후부터 세포질내의 cytochrom c의 양이 증가하였고, 18시간 후에는 현저히 증가하였다. 이 때 미토콘드리아내의 cytochrom c의 양이 현저하게 감소되어 미토콘드리아로부터 세포질내로 방출되고 있었다(Fig. 6). 이러한 결과는 카드뮴에 의한 Hepal1c7 세포의 세포사멸에서 미토콘드리아의 cytochrom c가 세포질내로 방출되어 이 cytochrom c가 caspase-9 protease의 활성에 기여하고 있음을 알 수 있다.

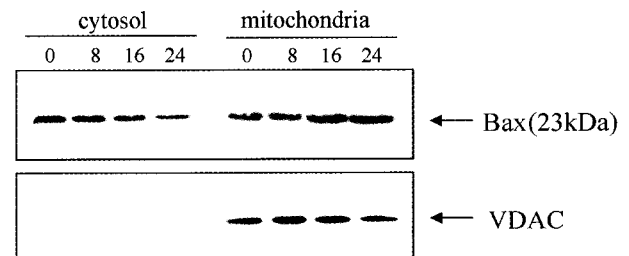
### 4. 카드뮴이 Bax의 발현에 미치는 영향

카드뮴 처리에 의하여 Hepal1c7 세포에서 유도된 세포사멸 현상의 과정에서 세포사멸 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl<sub>2</sub>-family 단백질군 중에서 Bax의 발현을 조사하였다. Bax는 세포사멸을 촉진시킨다고 알려져 있는데, 세포사멸 과정에서 세포질내의 Bax가 미토콘드리아로 이동하여 미토콘드리아가 세포질내로 cytochrom c 방출에 관여한다고 알려져 있다. 100  $\mu$ M 농도의 카드뮴을 8, 16, 24시간 동안 Hepal1c7 세포에 처리한 후 세포를 포집, 파쇄하여 세포질과 미토콘드리아의 분획을 분리한 후 Western blot으로 Bax의 양적 변화를 조사하였다. 세포질내에서 16시간부터 Bax의 양이 감소하였고 미토콘드리아에서는 16시간부터 Bax의 양이 증가하였다(Fig. 7). 이 결과로부터 미토콘드리아에서 Bax의 양이 증가하여 이 Bax가 cytochrom c의 세포질내로의 방출에 관련됨을 확인할 수 있었다.

### 5. 카드뮴이 미토콘드리아 막 전위차 변화에 미치는 영향



**Fig. 6.** Cadmium induced the cytosolic release of cytochrom c from mitochondria in Hepal1c7 cells. Cells were treated with cadmium (100  $\mu$ M). The cytochrom c release was increased in cadmium treated Hepal1c7 cells. Lysate was fractionated into cytosolic and mitochondrial portion by using the method detailed in Material and Methods. Two fractions were separated on 12.5% SDS-PAGE and immunoblotted for cytochrom c and VDAC.



**Fig. 7.** Cadmium induced the translocation of Bax into mitochondria. Cells were treated with cadmium (100  $\mu$ M). Lysate was fractionated into cytosolic and mitochondrial portion by using the method detailed in Material and Methods. Two fractions were separated on 12.5% SDS-PAGE and immunoblotted for cytochrom c and VDAC.

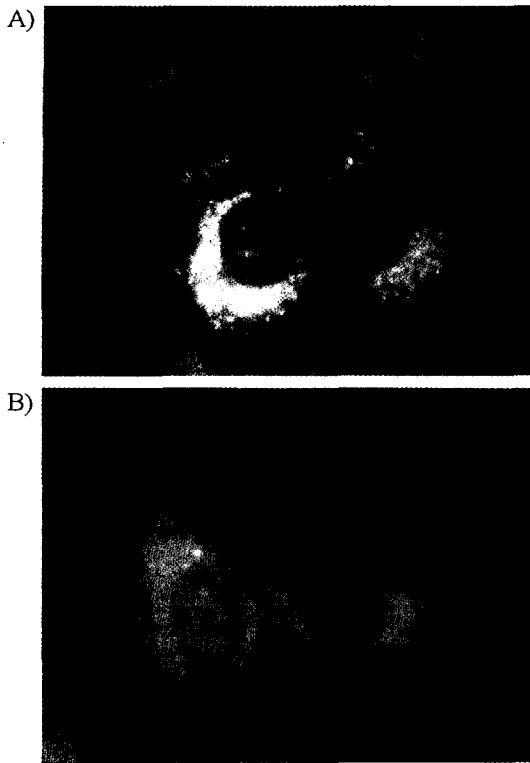


Fig. 8. Mitochondrial membrane potential transition (MPT) of 100  $\mu$ M cadmium treated Hepal1c7 cells for 12 hours. Cells were stained with 10  $\mu$ g/ml of JC-1 (A,  $\times$ 50) and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments. (A) No treatment (control). (B) Treatment of 100  $\mu$ M cadmium.

카드뮴을 처리한 Hepal1c7 세포의 세포사멸 과정에서 cytochrome c는 세포질내로 방출되고 있었으며(Fig. 6), Bax 또한 세포질에서 미토콘드리아로 이동하였다(Fig. 7). 이러한 현상들은 미토콘드리아의 기능변화 가능성을 간접적으로 시사하고 있어, 미토콘드리아의 막 전위차 변화를 확인하기 위하여 JC-1 형광염색을 시행하였다. 100  $\mu$ M 농도의 카드뮴을 12시간 동안 Hepal1c7 세포에 처리한 후 JC-1으로 염색하여 형광현미경하에서 관찰하였다. 그 결과 세포의 형태학적 변화와 함께 정상대조군의 옐로우 형광이 녹색형광으로 변화하였다(Fig. 8).

#### IV. 고 찰

카드뮴이 apoptosis에 미치는 영향에 대한 연구는 최근 여야 시작되었으며 따라서 이에 대한 정보 역시 매우 제한되어 있는 실정이다. 현재까지의 연구는 실험동물 또는 시험관내 실험에서 조직 또는 세포가 중금속에 노출시 폭로량에 따라 괴사 또는 세포사멸을 일으키는 것으로 알려져 있으나, 그 유도기전 및 기전에 관여하는 물질에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다(Beyersmann와

Hechtenberg, 1997; Wang와 Templeton, 1998).

카드뮴을 비롯한 중금속에 의한 apoptosis의 경우 일반적으로 몇 가지 공통된 기전이 제기되어 왔는데, 예를 들면 구리 결핍시 apoptosis와 관련된 endonuclease를 유도한다든지(Rao 등, 1993), 소량의 셀레늄에 폭로시  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  의존 endonuclease를 활성화시켜 apoptosis를 유도한다(Lu 등, 1994)는 등의 보고가 있다. 카드뮴은 칼슘 가동화를 통하여 endonuclease를 활성화시키는데, 세포내 칼슘 변화는 중금속 독성에 의해 유도되는 apoptosis와 관련된 endonuclease 활성화에 중요한 인자로 알려져 있다(Rao 등, 1993; Lu 등, 1994; Azzouri, 1994). 다른 공통기전은 산화적 스트레스(oxidative stress)로서 생물학적으로 생체에 필수적으로 필요한 금속이 부족한 경우나 독성 중금속에 폭로된 경우 모두 활성산소종(reactive oxygen species)과 같은 reactive-free radical을 생성하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려졌다(Nath 등, 1996; Kayanoki 등, 1996; Hultberg, 1998).

세포사멸은 괴사(necrosis)와는 다른 독특한 형태와 생화학적 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절받는 생리과정으로서(Wyllie, 1980; Cohen, 1993), 일반적으로 세포가 심각한 상해를 입었을 경우에 나타나는 세포괴사는 세포막의 파괴, 세포의 팽창(swelling), 용해(lysis)를 동반하지만 세포사멸 현상은 빠른 세포탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 수포화 현상(blebbing), 세포질내의 칼슘(calcium) 농도의 증가, 염색질(chromatin)의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성을 동반한다(Searle, 1982; Cohen, 1993; Klaus 등, 1998).

본 연구에서도 카드뮴 100  $\mu$ M을 세포에 처리했을 때 세포생존율의 감소와 함께 apoptosis의 특징 중의 하나인 DNA 분절이 나타나는 데 이것으로서 카드뮴에 의한 Hepal1c7 세포독성은 세포사멸에 의하여 일어남을 알 수 있었다. 카드뮴에 의한 직접적인 DNA 분절이 보고되는 예도 있지만, 일반적으로 카드뮴을 고농도로 처리한 상태에서는 세포사멸이 아닌 괴사를 일으키는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서 나타나는 DNA 분절은 카드뮴에 의한 직접적인 영향보다는 세포내의 다른 신호전달 체계를 통해 일어나는 세포사멸에 의해 나타난 것임을 알 수 있다.

세포사멸을 유발시키는 세포내 신호전달기전에서 중요한 기전중 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 효소 활성부위에 cysteine 을 가지고 있는 단백질 분해효소로서 지금까지 14 종류가 알려져 있으며, 특히 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 caspases 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달을 조절하는 것이다(Allen 등, 1998; Widmann과 Gibson, 1998). 본 연구에서도 카드뮴 처리로 caspase-3와 caspase-9의 활성화는 전반적으로 시간의 경과에 따라 증가하고 있는 데 caspase-8의 활성화는 시간경과와는 무관하게 변화가 없었다. 따라서 세포 내에서 세포사멸의 신호가 미토콘드리아에 전달되면 미토콘드리아에서 cytochrome c가 분비되어서 caspase-9를 활성화시키고, 활성화된 caspase-9는 caspase-3를 활성화시켜 나타나는 세포사멸의 과정상의 특성으로 볼 때 caspase의 시간의 경과에 따른 활성화와 세포생존율의 변화는 카드뮴에 의한 Hepal1c7 세포의 세포사멸이 caspase-3와 -9의 경로를 경유하여 발현됨을 증명하고 있다.

또한, protein kinase(PKC), lamin 및 PARP 등은 세포사멸 과정에서 caspase-3의 세포내 표적인자이며 세포사멸 유도에 중요한 endonuclease의 활성화는 caspase-3 protease의 자극에 기인한다(Allen 등, 1998)는 연구결과를 따르면, 본 연구 결과에서 caspase-3 protease가 카드뮴 처리 25시간 쯤에 최고 활성을 보이고 기질 단백질인 PARP의 절단과 고분자량(high molecular weight) DNA 절편의 smear 현상이 관찰되는 것은 카드뮴에 의한 Hepal1c7 세포에서의 세포사멸은 caspase-3의 활성화를 통해 유도됨을 보여주는 또 다른 연구결과이다.

Bcl-2 family 단백질은 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 밀접하게 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질(Bax)과 세포사멸 억제 단백질(Bcl-XL)의 두 종류가 존재하는 것으로 알려져 있다(Gross 등, 1999; Vander 등, 1999). 이중 Bcl-X<sub>L</sub> 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제 기능에 관여하고 있다. 한편, Bcl-2 family 단백질은 c-terminus에 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있는 특징이 있다. 따라서, Bcl-XL을 과발현시켰을 경우 산화환원반응의 조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase protease의 효소적 활성화, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절, 스트레스 관련 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 효소적 활성을 조절하므로써 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. 반대로 Bax 단백질을 과발현시켰을 경우에는 cytochrome c의 분비가 촉진되고, 미토콘드리아막의 탈전위(mitochondrial membrane depolarization)가 유도된다고 보고되고 있다(Herr 등, 1997; Lipf 등,

1999; Vander 등, 1997).

본 연구에서 카드뮴 처리로 Hepal1c7 세포의 세포질에서는 Bax의 양이 감소하고 미토콘드리아에서 증가하였는데 이러한 결과는 카드뮴에 의해 발현이 증가된 Bax 단백질이 미토콘드리아로 이동하였으며 이동된 Bax 단백질은 미토콘드리아 막전위(MPT) 변화와 cytochrome c의 세포질내로의 방출을 유도하였다고 판단된다. 그 간의 연구보고들에 따르면, 세포질내로의 분비된 cytochrome c는 세포질내에 존재하는 Apaf-1, dATP와 함께 caspase-9 protease의 활성을 유도한다고 한다(Vander 등, 1997). 또한 본 연구에서는 미토콘드리아 내의 증가된 Bax에 의한 MPT의 변화를 JC-1 형광염색을 통하여 관찰하였는 바, 상기한 결과들은 세포막 수용체에 의한 세포사멸현상에서 inner mitochondrial transmembrane potential의 상실에 의해 cytochrome c가 세포질로 방출되고 하부 caspase의 활성화를 통해 신호를 전달한다는 여러 연구 결과와 일치하고 있다.

이상의 연구결과를 종합하면, Hepal1c7 세포에서 카드뮴에 의한 세포사멸은 Bax의 미토콘드리아 내에서의 발현 증가에 따른 MPT의 감소로 인해 cytochrome c가 세포질내로 분비되었고, cytochrome c는 caspase-9 protease의 활성화를 유도하여 궁극적으로 caspase-3 protease의 활성화와 함께 endonuclease를 활성화시켜 세포사멸 현상을 유도하는 것으로 사료된다. 그러나 앞으로의 연구과제로서 세포내 신호전달체계에서 중요한 역할을 담당하는 p53, 세포내 칼슘, MAP kinase, NF- $\kappa$ B 및 I $\kappa$ B와의 관계 등에 대한 연구가 이루어진다면 카드뮴에 의한 세포사멸 유도 경로 및 기전을 밝힐 수 있을 것이고 나아가 세포사멸 조절을 통한 질병의 예방 및 치료에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

카드뮴의 주요한 표적장기이며 카드뮴이 만성 및 급성 폭로시 축적되는 가장 중요한 장기인 간의 세포독성을 Hepal1c7 세포에서 caspases 및 Bax 단백질의 활성화와 발현 그리고 미토콘드리아 세포막 전위 변화(MPT) 등을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 카드뮴은 농도 의존적으로 간세포인 Hepal1c7 세포의 생존율을 감소시켰다.
2. 카드뮴을 농도별로 처리하였을 때 100  $\mu$ M 이상의 농도에서 세포사멸의 특징중의 하나인 DNA 분절현상을 확인하였다.
3. 카드뮴 처리 후 caspase-3, caspase-8, caspase-9의 활성화변화를 조사한 결과 caspase-3, -9 protease 활성화가 시간이 경과함에 따라 증가하였다.

4. 카드뮴 처리 후 cytochrome c가 세포질내로 방출되었고 이는 caspase-9 protease의 활성화를 유도하였다.

5. 카드뮴 처리 후 Bax가 세포질에서 미토콘드리아로 이동하여 cytochrome c의 세포질내로의 방출에 관여하였다.

6. 카드뮴 처리시 미토콘드리아 세포막 전위차의 감소를 JC-1 형광염색을 통하여 확인하였다.

이상의 결과는 카드뮴에 의한 HepalC1c7 세포사멸의 신호전달기전은 세포질내에 있는 Bax가 미토콘드리아로 이동, cytochrome c의 세포질내로의 방출, 그리고 caspase-3, 9 protease 활성화를 의해서 매개되는 것으로 판단된다. 또한 Bax 단백질의 발현변화가 미토콘드리아의 기능변화에 기여하였으리라 사료된다.

### 참고문헌

- Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Hedge, R., Mukattash, R., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. (1998): Identification and characterization of murine caspase-14, a new member of the caspase family, *Cancer Res.*, **58**, 5201-5205.
- Allen, R.T., Cluck, M.W. and Agrawal, D.K. (1998): Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases, *CMLS*, **54**, 427-445.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996): Human ICE CED-3 protease nomenclature, *Cell*, **87**, 171.
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L. and Korsmeyer, S.J. (1985): Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphoma: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18, *Cell*, **41**, 899-906.
- Cleary, M.L. and Sklar, J. (1985): Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7439-7443.
- Dudley, R.E., Svoboda, D.J. and Klaassen, C.D. (1982): Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **65**, 302-313.
- Dudley, R.E., Svoboda, D.J. and Klaassen, C.D. (1984): Time-course of cadmium-induced ultrastructural changes in rat liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **76**, 150-160.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999): Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis, *Genes Dev.*, **13**, 1899-1911.
- Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P. and Debatin, K.M. (1997): Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis, *EMBO J.*, **16**, 6200-6208.
- Hockenbery, D.M., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. and Korsmeyer, S.J. (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death, *Nature*, **348**, 334-336.
- Klassen, C.D., Amdur, M.O. and Doull, J. (1998): Casarett and Doull's Toxicology, Macmillan Publishing Company, New York, 592-596.
- Korsmeyer, S.J. (1995): Regulators of cell death, *Trends Genet.*, **11**, 101-105.
- Kotsonis, F.N. and Klaassen, C.D. (1977): Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 667-680.
- LiPF, Dietz R. and Von Harsdorf, R. (1999): 53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2, *EMBO J.*, **18**(21), 6027-36.
- Lu, J., Kaeck, M., Jiang, C., Wilson, A.C. and Tompson, H.J. (1994): Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells, *Biochem Pharmacol.*, **47**(9), 1531-1535.
- Rao, M.S., Yelandandi, A.V., Subbarao, V. and Reddy, J.K. (1993): Role of apoptosis in copper deficiency-induced pancreatic involution in the rat, *Am. J. Pathol.*, **142**(6), 1952-1957.
- Reed, J.C. (1994): Bcl-2 and the regulation of programmed cell death, *J. Cell Biol.*, **124**, 1-6.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors, *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439-459.
- Shaikh, Z.A. and Lucis, O.J. (1972): Biological differences in cadmium and zinc turnover, *Arch. Environ. Environ. Health*, **24**, 410-418.
- Shenker, B.J., Datar, S., Mansfield, K. and Shapiro, I.M. (1997): Induction of apoptosis in human T-cells by organomercuric compounds: a flow cytometric analysis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 397-406.
- Sunderman, Jr., F.W. (1995): The influence of zinc on apoptosis, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **25**(2), 134-142.
- Tsujimoto, Y., Crossman, J., Jaffe, E. and Croce, C.M. (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma, *Science*, **228**, 1440-1443.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. and Thompson, C.B. (1997): Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria, *Cell*, **28**, 91(5), 627-37.
- Vander Heiden, M.G. and Thompson, C.B. (1999): Bcl-2 proteins: inhibitors of apoptosis or regulators of mitochondrial homeostasis? *Nat. Cell Biol.*, **1**, E209-E216.
- Vaux, D.L., Cory, S. and Adams, J. (1988): Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates



- with c-myc to immortalize pre-B cells, *Nature*, **335**, 440-442.
- Verheij, M., Ruiter, G.A., Zerp, S.F., van Blitterswijk, W.J., Fuks, J., Haimovitz-Freiderman, A. and Bartelink, H. (1998): The role of the stress-activated kinase signaling pathway in radiation-induced apoptosis, *Radioth Oncol.*, **47**, 225-232.
- Wang, Z. and Templeton, D.M. (1998): Induction of c-fos proto-oncogene in mesangial cells by cadmium, *JBC*, **273**(1), 73-79.
- Widmann, C. and Gibson, S. (1998): Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **273**(12), 7141-7147.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie, A.R. (1980): Cell death: The significance of cell death, *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995): Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science*, **270**, 1326-1331.