

인간 폐포세포 유래 A549세포주에서의 Cadmium 처리에 의한 메탈로치오닌 유전자 발현

박 광 식*, 구 자 민*

동덕여자대학교 약학대학, *성균관대학교 약학부

Expression of Metallothionein mRNA in Cadmium Treated A549 Cell Line Derived from Human Lung Epithelial Cell

Kwangsik Park* and Jamin Koo*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University
23-1, Wolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea

*College of Pharmacy, SungKyunKwan University, 300, Chunchun-dong, Suwon 440-746, Korea

ABSTRACT

Metallothionein gene expression activity of cadmium was investigated in a human lung epithelial cell line. Cells, grown to near confluence, were exposed to 0~10 μ M Cd metal for 6 hours. Cadmium did not cause morphological alteration in lung epithelial cells that are characteristic of cell damages such as cell shrinkage, detachment of the cell from its neighbors, cytoplasmic and chromatic condensation. However, metallothionein genes of MT-1 and MT-2 were rapidly induced in the treated cell measured by RT-PCR. Regarding the induction pattern of metallothionein mRNA, MT-1 mRNA was induced in a dependent manner. MT-2 mRNA induction, which was measured using oligo primers based on cDNA of human reticulocytes, seemed to be slightly increased in low doses but decreased at high concentration used in the experiment.

Key words : Cadmium, Metallothionein, Human lung epithelial cell

서 론

카드뮴은 대기오염물질로서 분진 등에 함유되어 폐포로 흡입될 경우 인체에 발암성을 갖는 물질로 알려져 있다(Thun *et al.*, 1985; IARC, 1993) 카드뮴은 주로 담배연기나, 배터리 제조과정, 페인트, 플라스틱 또는 비료산업의 여러 공정 중에 발생하여 대기중으로 확산되는데 흡입시 폐에서 기종, 섬유

증 등을 일으키며 만성적인 노출시 더욱 악화되어 궁극적으로 암을 발생시킨다(Page *et al.*, 1986). 카드뮴 독성의 심각성에 비해 아직 그 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않으나 최근에는 세포괴사와 사멸과정에 관한 연구가 보다 집중적으로 이루어지고 있다. 카드뮴에 의한 세포사멸과정에 관한 연구로서는 T lymphocytes를 비롯하여 신장, 고환, 간장 그리고 폐포 등 다양한 기원의 세포를 이용한 연구가 이루어지고 있으며 카드뮴에 의한 세포독성을 산화적 스트레스 또는 유전독성물질과의 상호작용에 의해 설명하고자 하는 연구도 다양하게 시

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-2-940-4522, E-mail: kspark@dongduk.ac.kr

행되고 있다 (Harmann *et al.*, 1996; Dally *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Eneman *et al.*, 2000). 한편, 중금속과 산화적 스트레스와 관련된 연구로서는 메탈로치오닌 단백질의 항산화 역할에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다 (Virengo *et al.*, 2000).

메탈로치오닌 (Metallothionein, MT)은 분자량 약 7kDa 이하의 저분자 단백질로서 Zn, Cu, Cd 등 중금속과 쉽게 결합하며 포유류의 경우 약 61~68여 개의 구성 아미노산 중 18~23개 정도가 cystein이 차지하고 있고 방향족환 아미노산이나 히스티딘을 함유하지 않는 특징을 갖고 있다. MT는 유전적으로 15개 그룹으로 구분될 수 있으며 포유류에 가장 널리 분포하는 MT-1과 MT-2는 여러 종류의 중금속, 약물, 염증반응 매개체 등에 의해 유도된다. MT-3는 주로 뇌에서 발견되는 MT로서 신경세포의 성장을 억제하는 특징을 갖고 있다. MT-4에 대해서는 아직 그 기능이나 특성에 대해 알려진 바가 많지 않다 (Coyle *et al.*, 2002). MT는 중금속에 의해 유도되는 단백질이면서도 중금속과 결합하여 본질적으로 중금속의 독성을 완화하는 기능을 갖고 있으므로 MT자체가 생체내 기능에 어떤 부정적인 작용을 갖거나 나타낼 것으로는 사료되지 않는다. 다만, 지금까지의 연구결과로 보아 중금속에 노출되지 않은 세포에 비해 중금속 노출 세포에선 MT가 신속하게 유도되므로 MT의 발현정도를 보아 카드뮴 등 중금속의 노출지표로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 중금속 단일 물질의 노출형태보다는 다매체에 의한 중금속 노출의 현황을 생체내에서 파악하는 데는 매우 유용할 것으로 판단된다 (Vallee, 1995; Klassen *et al.*, 1999).

본 연구는 미세먼지, 황사 또는 디젤분진 등의 환경시료에 노출된 인체세포의 중금속영향을 평가하기 위한 전단계 연구로서, 우선 카드뮴처리에 의해 인간 폐포 세포에서의 MT 유전자 발현 패턴을 파악함으로써 향후 중금속을 함유한 복합물질의 위해성평가에 활용될 기초자료를 생산하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양

사람 폐포 상피세포에서 유도된 A549 (Korean

Type Culture Collection)는 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 5% CO₂와 충분한 습도가 유지되는 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 모든 실험은 세포 계대 배양 중 성장기의 세포를 사용하였으며 세포는 25 cm² 크기의 bottle type 배양용기를 사용하였다.

2. 카드뮴처리

배양용기의 바닥을 거의 채울 정도의 일정 세포수가 되면 혈청을 넣지 않은 RPMI-1640 배지로 세척한 후 무혈청 배지에 카드뮴 농도가 1, 5, 10 μM 되도록 표준용액을 첨가하고 6시간 동안 배양하였다. 카드뮴은 Cd 금속 표준용액을 희석하여 사용하였으며 사용한 농도에서는 배양기간 동안 세포의 형태학적 변화나 사멸세포는 나타나지 않았다. 각 농도별 카드뮴은 동일 농도에 대해 공히 3 개씩 처리하였다.

3. RNA 정제

카드뮴 처리 6시간 후 카드뮴이 존재하지 않은 4°C의 배지로 3회 세척하고 1.5 ml guanidine thiocyanate 용액을 2회 처리하여 세포를 완전용해 시켰다. 추출된 세포액에 대해 sodium acetate를 넣고 phenol : chloroform : isoamylalcohol 용액을 넣고 잘 섞은 후 원심분리한 상등액에 대해 isopropanol 침전으로 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 A260nm 대 A280nm의 비율이 1.8 이상이었다.

4. RT-PCR과 메탈로치오닌 유전자 증폭

PCR을 위한 primer는 기존의 문헌과 미국국립 의학도서관에서 제공하는 GenBank 데이터베이스에서 얻은 염기서열을 기초로 하여 제작하였으며 (Lambert *et al.*, 1996) 각각의 염기서열은 Table 1에 나타내었다. 이 중 primer쌍 A는 사람의 reticulocytes (망상적혈구)의 MT-2 cDNA를 기초로 제작한 것이며, B와 C는 사람세포의 MT-1 cDNA를 기초로 각 생성물 크기가 다르도록 제작한 것이고 D는 사람세포의 MT-2 cDNA를 근거로 제작하였다. 역전사반응 (RT-PCR)은 RNA 주형 1 μg에 oligo dT primer, reverse transcriptase 및 각 nucleotide 가 함유된 반응액 20 μl에 대해 42°C로 60분간 실

Table 1. Sequences of primers used in the amplification of metallothioenin cDNA

Gene (Gene bank accession)	Primer Pair	Primer sequence
Human MT-2 (X97260)	A	5'-ATGGACCCCAACTGCTCGT-3' 5'-TCAGGCGCAGCAGCTGCACTT-3'
Human MT-1 (X76717)	B	5'-TCCTCCTTGCCTCGAAATGG-3' 5'-TGAATTTATTGCCATTCACA-3'
Human MT-1 (X76717)	C	5'-CAGCTGTGCTCTCAGATGTA-3' 5'-TGAATTTATTGCCATTCACA-3'
Human MT-2 (V00594)	D	5'-AATGCAAAGAGTGCAAATG-3' 5'-AGGAATATAGCAAACGGTCA-3'

시한 후 94°C에서 5분간 가열함으로써 반응을 종료하였다. MT 유전자증폭(PCR)은 역전사반응생성물 2µl, 위에서 기술한 각 primer쌍, Taq polymerase 및 각 nucleotide가 함유된 Bioneer™ Kit를 사용하여 총 20 µl의 반응액을 만든 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간씩 조절되도록 하여 25회 반응시켰다. 마지막 25회 반응이후에는 최종적으로 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 각각의 primer 쌍을 이용하여 MT 유전자를 증폭시킨 후 얻은 생성물에 대해서는 1.5% agarose gel 상에서 TAE 완충용액을 사용하여 전기영동하였다. PCR 생성물은 클론화하여 염기서열분석을 실시함으로써 증폭된 유전자가 해당 MT cDNA임을 재확인하였다.

결과 및 고찰

카드뮴은 체내 노출경로에 따라 다양한 독성을 발현하며 신장기능, 중추신경계, 골연화증, 근육통, 고혈압, 호흡곤란 등이 유발되는 것으로 보고되고 있다. 특히 IARC는 카드뮴이 호흡을 통하여 인체로 유입되는 경우 폐 조직에서 발암성을 갖는 것으로 인정하고 있다. 카드뮴은 대개 호흡경로를 통하여 유입되는 데 카드뮴 단일 화학물질형태로 유입되는 경우보다는 미세먼지나 디젤분진 등 부유물질에 부착되어 폐포로 유입되는 경우가 많다 (Kenaga *et al.*, 1996). 본 연구는 호흡경로로 유입시 발암물질로 알려진 카드뮴에 대한 특정인구집단의 노출수준을 평가할 수 있는 분자생물학적 지표를 찾고자 시도되었으며 아울러 이를 이용하면 미세

먼지나 디젤분진 등 복합매체에 의한 중금속 영향을 평가할 수 있는 수단으로 활용할 수 있을 것으로 기대되어 수행되었다. 카드뮴이 세포에 고농도로 처리되면 세포괴사를 촉진하는 데 세포가 사멸되는 수준의 고농도는 실제 대기오염수준에서의 카드뮴 농도와는 어느 정도 거리가 있다고 사료된다 (Gong *et al.*, 1997). 따라서 본 연구에서는 세포의 형태학적 변화를 일으키지 않는 저농도 수준에서의 영향을 평가하기 위한 방법이 시도되었으며 이러한 연구의 일환으로서 우선 중금속에 의해 유발되는 메탈로치오닌 유전자를 그 지표로 활용하고자 하였다 (McKenna *et al.*, 1996). Table 1에서 보는 바와 같이 인간의 폐 세포로부터 유도된 A549 세포주에 카드뮴을 1, 5, 10 µM 농도로 처리하고 6 시간 동안 배양하였을 때 세포에는 어떠한 형태학적 변화도 관찰되지 않았다. 세포가 손상될 경우 membrane bubble이나, 세포의 위축, 배양용기로 부터의 이탈, 세포질의 응축 등 여러 부정적인 소견이 나타나는데 본 실험에서 사용한 농도의 범위내에서는 어떠한 세포 손상징후도 관찰할 수 없었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 Hart 등이 발표한 카드뮴에 의한 세포사멸기전연구 결과와도 부합하는 것으로 사료된다 (Hart *et al.*, 1999).

인간 세포의 MT cDNA를 근거로 합성한 각 Primer쌍에 대한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 사용한 모든 primer쌍에서 예상 크기의 DNA 단편이 합성되었다. A는 사람의 혈액세포인 reticulocyte cDNA로부터 합성한 primer를 이용하여 증폭시킨 결과이며, B와 C는 사람의 MT-1 (GeneBank X76717)으로 부터, primer D는 사람의 MT-2 (GeneBank V00594)로부터 합성한 primer를 사용하여 증폭시

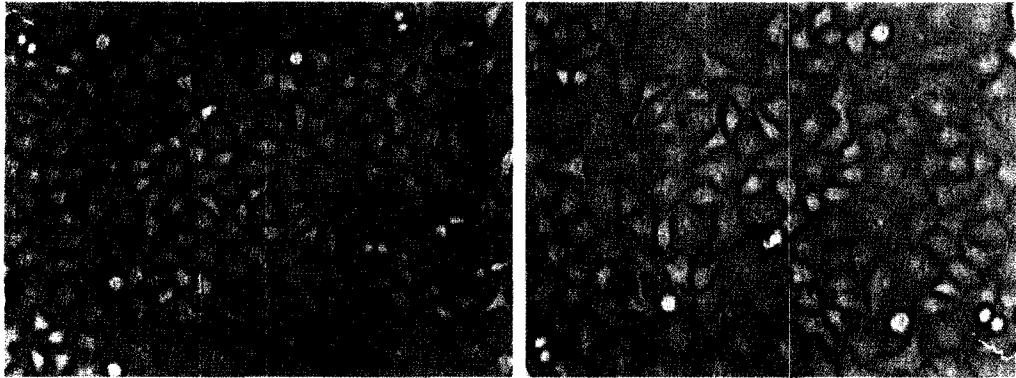


Fig. 1. Photograph of A-549 cell. Left panel is normal cell line and right panel is cadmium ($10\mu\text{M}$) treated cell for 6 hours. Any morphological difference was not shown between two groups.

킨 결과를 나타낸다. 처리한 카드뮴의 농도는 $5\mu\text{M}$ 이며 총 6시간 동안 노출시켰다. primer B와 C는 동일 cDNA로부터 합성한 primer를 사용한 것인데 예측한 대로 B의 경우 340 bp, C의 경우 127 bp의 생성물이 얻어졌다. 이 중 primer A와 B를 이용하여 카드뮴의 처리농도 증가에 따른 MT mRNA 발현양을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 마찬가지로 MT mRNA는 처리농도 증가에 따라 발현양도 증가하는 것을 알 수 있었다. 단, primer A를 이용하여 정량한 MT-2 mRNA의 경우 고농도 처리시 약간 감소하는 경향을 나타내었으며 이는 primer B를 이용하여 정량한 MT-1과는 달라 이러한 결과가 MT isoform에 따른 발현기전의 차이를 나타내는 것인지는 추후 연구가 필요하다 (Fig. 3). 한편, RT-PCR은 적은 양의 유전자를 증폭하여 발현양상을 확인할 수 있는 방법으로서 여러 연구에서 널리 이용되고 있으나 최근에는 DNA chip을 이용하여 짧은 시간에 적은 양의 시료로부터 수많은 유전자의 발현을 분석할 수 있는 microarray 방법이 개발되어 활용되고 있다. 본 연구에서도 카드뮴을 처리하지 않은 대조군과 카드뮴 $10\mu\text{M}$ 농도를 처리한 처리군에 대해 microarray 분석을 실시한 결과 MT-2를 비롯하여 여러 종의 MT-1 (e, g, h, l)이 발현되는 것을 확인하였는데 (미발표자료) 향후 이에 대한 보다 구체적인 조절기전 연구를 수행할 예정이다.

카드뮴에 의한 인체 폐포세포에서의 메탈로치오닌 유전자 발현을 이용하면 대기오염물질로서 중

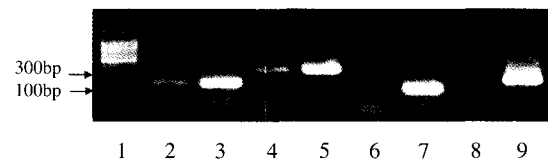


Fig. 2. RT-PCR products of metallothionein. lane 1; size marker, Lane 2, 3 are the products of metallothionein using primer A. Lane 4,5; primer B, lane 6,7; primer C, and lane 8, 9; primer C. RT-PCR was done with total RNA from control group (lane 2, 4, 6, 8) and $5\mu\text{M}$ cadmium treated group (lane 3, 5, 7, 9).

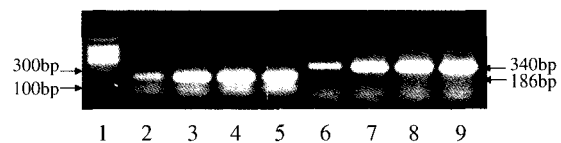


Fig. 3. Dose-response of metallothionein mRNA expression. Lane 2-5 shows the expression of MT-2 amplified by primer A and lane 6-9 shows the expression of MT-1 using by primer B. A-549 cells were treated with cadmium with the concentration of $0\mu\text{M}$ (lane 2, 6), $1\mu\text{M}$ (lane 3, 7), $5\mu\text{M}$ (lane 4, 8), $10\mu\text{M}$ (lane 5, 9) for 6 hours. Lane 1 is size marker.

금속의 인체노출을 평가할 수 있는 수단을 확보할 수 있게 된다. 즉, 미세먼지나 디젤분진 등 중금속의 오염이 예상되는 환경매체에 노출되는 인구집

단의 경우 청정지역에 거주하는 인구집단에 비해 메탈로치오닌의 발현이 증가되어 있을 것으로 예상된다. 물론 메탈로치오닌의 발현이 중금속의 독성을 발현하는 경로는 아니며 오히려 중금속과 결합함으로써 독성에 대한 방어수단으로 작용하는 것으로 생각되고 있지만 본질적으로 메탈로치오닌의 발현은 생체의 중금속 노출을 반영한다고 볼 수 있다. 따라서, 이러한 생체지표를 이용하면 대기 오염지역에 거주하는 주민과 청정지역에 거주하는 주민에 대한 중금속 영향을 평가하는 하나의 수단이 될 수 있다. 다만, 폐세포의 혈액세포 등 보다 다양한 세포를 이용한 메탈로치오닌 유전자 발현 연구가 수반된다면 보다 체계적인 위해성평가방법이 확립될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2002년 환경부의 “차세대 핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)”으로 지원받은 과제입니다.

참 고 문 헌

- Coyle P, Philcox JC, Carey LC and Rofe AM. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Science*. 2002; 59: 627-647.
- Dally H, Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1021-1026.
- Eneman JD, Potts RJ, Osier M, Shukla GS, Lee CH, Chiu J-F. Suppressed oxidant-induced apoptosis in cadmium adapted alveolar epithelial cells and its potential involvement in cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2000; 147: 215-228.
- Gong Q, Hart BA. Effect of thiols on cadmium-induced expression of metallothionein and other oxidant stress genes in rat lung epithelial cells, *Toxicology* 1997; 119: 179-191.
- Hart BA, Lee CH, Shukla GS, Shulka A, Osier M, Eneman JD, Chiu J-F. Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells: evidence for the participation of oxidant stress. *Toxicology* 1999; 133: 43-58.
- Hartmann A, Speit G. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells. *Environ. Mol. Mutat.* 1996; 27: 98-104.
- IARC, Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposure in the glass manufacturing industry. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 1993; 58: 119-238.
- Kenaga C, Cherian MG, Cox C and Oberdorster G. Metallothionein induction and pulmonary responses to inhaled cadmium chloride in rats and mice, *Fund. Appl. Toxicol.* 1996; 30: 204-212.
- Klassen CD, Liu J and Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 39: 267-294.
- Lambert E, Kille P and Swaminathan R. Cloning and sequencing a novel metallothionein I isoform expressed in human reticulocytes, *EEBS lett.* 1996; 389: 210-212.
- McKenna IM, Bare RM and Waalkes MP. Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium. *Toxicology* 1996; 107: 120-130.
- Page AL, El-Amamy MM, Chang AC. Cadmium in the environment and its entry into terrestrial food chain crops. In: Foulkes, E.C. (Ed), *Cadmium*. Springer-Verlag. New York, 1986; 33-74.
- Thun MJ, Schnoir TM, Smith AB, Halperin WE and Lemen RA. Mortality among a cohort of U.S. cadmium production workers-An update, *J. Natl. Cancer Inst.* 1985; 74(2): 325-333.
- Vallee BL. The function of metallothionein. *Neurochem. Int.*, 1995; 27: 23-33.
- Virengo A, Burlando B, Ceratto N and Panfili I. Antioxidant role of metallothionein: a comparative overview, *Cell Mol. Biol.* 2000; 46: 407-417.
- Yang C-F, Shen H-M, Shen Y, Zhung Z-X, Ong C-N. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells), *Environ. Health Perspect.* 1997; 105: 712-716.