J. ENVIRON. TOXICOL.
Vol. 22, No. 2, 137~145 (2007)

카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서의 E-cadherin 발현에 미치는 영향

석선미, 이태구, 김영채, 문창현, 백은주, 정이숙, 이수환※

아주대학교 의과대학

Cadmium-induced E-cadherin Expression in Cerebrovascular Endothelial Cells

Sun Mi Seok, Tae Gu Lee, Young-Chae Kim, Chang-Hyun Moon, Eun Joo Baik, Yi-Sook Jung and Soo Hwan Lee※

Department of Physiology, Ajou University, School of Medicine, Suwon 443-749, Korea

ABSTRACT

The effect of cadmium chloride ($CdCl_2$) on the expression of E-cadherin was examined in bEnd.3 mouse brain endothelial cells. $CdCl_2$ induced PGE_2 release, which were blocked by non-steroidal antiinflamatory drugs (NSAIDs) such as indomethacin and NS398 indicating the expression of COX-2 might contribute to PGE_2 production. $CdCl_2$ decreased the expression of E-cadherin, but not VE-cadherin at levels of mRNA and protein. Reduced expression level of E-cadherin was restored by NSAIDs, which was reversed by the addition of PGE_2. $CdCl_2$-induced decrease of E-cadherin level was also recovered by antioxidants including N-acetyl-cyteine (NAC) and trolox. Together with previous report which showed $CdCl_2$ induced COX-2 expression in a cellular oxidative stress dependent manner, these data suggest that $CdCl_2$ decreases E-cadherin expression through induction of cellular oxidative stress and in turn COX-2 expression in brain endothelial cells.

Key words : cadmium, brain endothelial cell, E-cadherin, oxidative stress, cyclooxygenase-2

서 론

카드뮴은 산업적 활동의 부산물인 환경독성물질로 다양한 세포 독성을 가지고 있어 폐, 간, 신장 등의 다양한 조직에 영향을 줄 뿐만 아니라(Brightman, 1989) 기형을 발생시키고 발암성 물질을 생성하기도 한다(Degraeve, 1981). 카드뮴은 또한 뇌혈관 장벽(Blood-brain barrier, BBB)에 축적이 되어 장벽을 구성하는 세포에 변화를 일으키고 칼슘 의존적인 세포부착분자(cell adhesion molecules)의 기능을 저해함으로써 cell-cell junction을 파괴시켜 BBB의 기능 부전을 초래하는 것으로 알려져 있다(Shukla *et al.*, 1996). 카드뮴 노출은 파킨슨씨 병(Parkinson's disease) (Okuda *et al.*, 1997) 및 뇌졸중(Stroke) 등의 퇴행성뇌질환의 발현과도 관련이 있는 것으로 알려져 있지만 역학적인 조사 보고(Elliott *et al.*, 2000) 이외에 그 작용기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

※To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-31-219-5043, Fax: +82-31-219-5049
E-mail: shwanlee@ajou.ac.kr

Cadherin은 칼슘 의존적인 세포부착분자인 cadherin superfamily중 하나로서 상피 세포(epithelial cells) 등 대부분의 세포에서 발현되는 E-cadherin, 혈관내피세포에서 발현되는 VE-cadherin, 신경과 근육 그리고 수정체 세포에 있는 N-cadherin 그리고 태반과 세포 성 외피에 있는 P-cadherin 등으로 구별된다. 이 중 E-cadherin은 세포 내 actin cytoskeleton과 결합한 형태로 존재하며 epithelial cell의 양극성과 장벽으로서의 기능을 생성하고 유지하는데 중요한 역할을 하고 있다. E-cadherin은 BBB에서는 유일하게 뇌혈관 내피세포에서 발현되며(Rubin *et al.*, 1991), BBB의 세포막간 간극을 통한 물질수송(paracellular transport)을 조절하는 것으로 알려져 있다. VE-cadherin (Vascular endothelium cadherin)은 cadherin-5이라고도 하며 세포간 결합 뿐만 아니라 혈관 내 pericyte를 유지시키는 역할을 하기도 한다. VE-cadherin은 adherens junctions의 주요 구성단백으로 VE-cadherin의 손실은 내피 세포벽의 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Caveda *et al.*, 1996; Fukuhra *et al.*, 2006).

전술한 바와 같이 카드뮴은 퇴행성 뇌질환의 발병과 관련이 있는 것으로 추정되고 있으나, 그 관련성에 대해서는 명확한 증거가 제시되어 있지 않은 실정이다(Elliott *et al.*, 2000). 카드뮴은 E-cadherin 결합을 저해하며(Prozialeck *et al.*, 2000) 카드뮴에 노출된 생쥐의 폐에서 E-cadherin의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있으나(Heimark *et al.*, 1990; Dejana *et al.*, 1995) 뇌혈관 내피세포의 cadherin에 미치는 영향에 대해서는 아직 보고된 바 없다. 본 연구실에서는 최근 카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서의 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 및 프로스타글란딘 생성을 유도하며 이는 세포부착분자인 ICAM-1의 발현과 밀접한 상관 관계가 있음을 보고한 바 있다(Seok *et al.*, 2006). 또한 카드뮴에 의한 COX-2 발현은 산화적 스트레스의 증가에 기인함을 밝힌 바 있다(Park *et al.*, 2006). 본 연구에서는 카드뮴에 의해 유도되는 뇌 손상의 발현기전을 규명하기 위한 연구의 일환으로 카드뮴에 노출된 뇌혈관 내피세포의 E-cadherin과 VE-cadherin의 발현 변화를 COX-2/PGE_2 및 세포 내 산화적 스트레스의 관여 가능성을 중심으로 검토함으로써 카드뮴에 의해 유도되는 BBB기능 부전을 규명하기 위한 기초지견을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 처리

생쥐 뇌혈관세포주인 bEnd3 (CRL-2299)는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 4.5 g/L의 glucose와 1.5 g/L의 sodium bicarbonate가 포함된 DMEM (JBI, Seoul, Korea)에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (100 unit/mL-100 μg/mL, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 배지로 5% CO_2/95% air, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다. 세포는 70~80%의 confluent가 되도록 배양한 뒤 실험에 이용하였으며 카드뮴($CdCl_2$)에 의한 세포 부착분자 발현에 미치는 영향을 검토하였다.

2. Prostaglandin E_2 (PGE_2) 정량

bEnd3 세포를 24 well tissue culture plate에 70~80% confluent하도록 배양한 다음 24시간 동안 혈청을 제거한 상태에서 더 배양한 뒤, 카드뮴 또는 약물들을 처리하고 37°C, 5% CO_2 배양 조건하에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 취하여 생성된 PGE_2의 양을 Enzyme-linked immunoassay (EIA) 방법으로 측정하였다. EIA는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)의 EIA kit를 이용하여 행하였으며 assay 방법은 제조사에서 제공하는 protocol에 따랐다.

3. Total RNA 분리 및 Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA는 easy-BLUE® (Intron, Seoul, Korea) RNA isolation kit을 사용하여 분리하였으며, 분리된 RNA pellet을 DEPC 처리 증류수에 녹인 후 분광광도계 (Amersham, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 260 nm에서 total RNA 양을 측정하였고, 280 nm에서 측정한 값을 비교하여 순도를 측정하였다. AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 합성된 cDNA를 template로 하여 E-cadherin primer (sense: 5′-CGTGATGAAGGTCTCAGCC-3′, antisense: 5′-ATGGGGGCTTCATTCAC-3′) VE-

cadherin primer (sense: 5′-TTGCCCAGCCTACGA-ACCTAAAG-3′, antisense: 5′-ACCACCGCCCT CCTCATCGTAAGT-3′) 및 GAPDH primer (sense: 5′-GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTT-3′, antisense: 5′-CACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3′)를 이용하여 다음과 같은 조건 하에서 PCR을 행하였다. E-cadherin: 94°C 15초, 52.5°C 15초, 72°C 30초, 30cycle; VE-cadherin: 92°C 1분, 60.4°C 1분, 72°C 1분, 28cycle; GAPDH: 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분 30초, 25 cycle. PCR반응산물들은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 상대적 발현량을 비교하였다.

4. Western blotting

bEnd3 세포를 6 well tissue culture plate에 70~80% confluent하도록 배양한 다음 24시간 동안 혈청을 제거한 상태에서 더 배양한 뒤, 카드뮴 또는 약물들을 처리하고 37°C, 5% CO_2 배양 조건하에서 24시간 동안 배양한 후 cell lysate을 얻었다. 10% SDS-PAGE를 행한 뒤, PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 전기적으로 단백질을 이동시키고, E-cadherin 또는 VE-cadherin 항체 (1 : 500; BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 처리하였다. 이 후 Horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체 (1 : 1,000 ARGG)를 처리한 다음 ECL detection reagent (Amersham, Piscataway, NJ, USA)로 E-cadherin과 VE-cadherin을 발색시키고, LAS (Fuji, Japan)를 이용하여 이미지를 관찰하였다.

5. 형광면역조직화학검사 (immunocytochemistry)

bEnd3 세포를 cover glass가 놓인 24 well tissue culture plate에 70~80% confluent하도록 배양한 다음 24시간 동안 혈청을 제거한 상태에서 더 배양한 뒤, 카드뮴 또는 약물들을 처리하고 37°C, 5% CO_2 배양 조건하에서 배양하였다. 1×HCSS로 씻어 낸 후에 4% paraformaldehyde로 고정하고, E-cadherin 항체 (1 : 500; BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 실온에서 4시간 동안 반응시킨 후, 1×HCSS로 씻어내고 FITC가 표지된 이차 항체 (1 : 500; BD Bioscience)를 차광한 상태로 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 동일한 조건 하에 Hoechst 33258로 5분간 염색한 다음 다시 1×HCSS로 씻어내고 VECTA Shield (Vector laboratories, CA, USA)로 mounting하여 slide glass에 고정시키고 laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM510, Germany)을 이용하여 형광 염색된 E-cadherin의 발현 양상을 확인하였다.

6. Cell surface enzyme immunoassay (EIA)

bEnd3 세포를 96 well tissue culture plate에 70~80% confluent하도록 배양한 다음 24시간 동안 혈청을 제거한 상태에서 더 배양한 뒤, 카드뮴 또는 약물들을 처리하고 37°C, 5% CO_2 배양 조건하에서 배양한 후 2% paraformaldehyde로 10분간 고정시키고 5% BSA로 10분간 blocking하였다. E-cadherin과 VE-cadherin항체를 처리하여 37°C 세포 배양기에서 60분간 반응시킨 후 Horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 처리하고 45분간 다시 세포 배양기에서 반응시켰다. 30% H_2O_2가 포함되어 있는 O-phenylenediamine (Sigma, St Louis, MO, USA) 용액을 넣고 5분간 처리하고 2 M의 Sulfuric acid처리 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

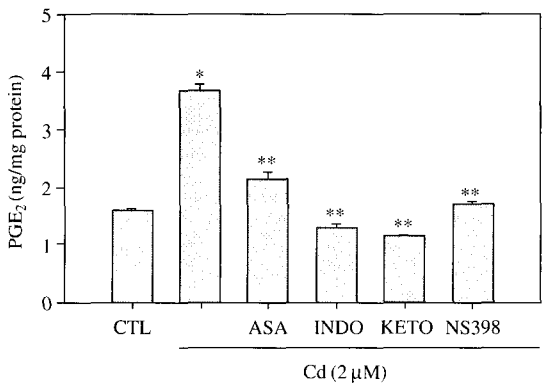

Fig. 1. Effects of COX inhibitors on cadmium-induced prostaglandin E_2 (PGE_2) production in bEnd3 cells. bEnd3 cells were preincubated with aspirin (ASA, 100 μM), indomethacin (INDO, 10 μM), Ketoprofen (KETO, 10 μM), NS398 (10 μM) for 30 min and further incubated with $CdCl_2$ (2 μM) for 24h. The amount of PGE_2 was measured by enzyme-linked immunoassay (EIA) as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean±S.E. (n=4). *$p<0.01$ vs control; ** $p<0.01$ vs cadmium control.

7. 통계분석

모든 자료는 평균±표준오차로 나타내었고 Students' t-test로 통계 분석하여 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 카드뮴 유도 PGE_2 생성에 미치는 COX 저해제의 영향

배양한 bEnd3 cell을 70~80% 정도 confluent할 때까지 배양한 후 24시간 동안 무혈청배지에서 유지한 뒤 새로운 배지로 교환하고 카드뮴 2 μM을 처리하여 24시간 동안 유지시킨 후 배양액을 취하여 PGE_2 양을 측정하였다. COX 저해제는 30분간 전처리 한 후 카드뮴을 처리하였다. 전보에서 보인 것과 같이 카드뮴은 PGE_2 생성을 유의적으로 증가시켰으며, 이는 각종 COX 저해제에 의해 효과적으로 차단됨을 확인하였다(Fig. 1). 특히 COX-2 선택적 저해제인 NS-398에 의해 카드뮴 유도 PGE_2 생성이 대조군 수준으로 감소하는 것으로 보아 카드뮴에 의한 PGE_2 생성 증가는 COX-2 발현 유도와 관련이 있을 것임을 재확인할 수 있었다.

2. 카드뮴이 세포부착분자 발현에 미치는 영향

카드뮴(2 μM) 처리 4시간 후 bEnd3 cell에서의 E-cadherin과 VE-cadherin의 mRNA 발현을 검토한 결과 VE-cadherin은 별다른 변화를 보이지 않았으

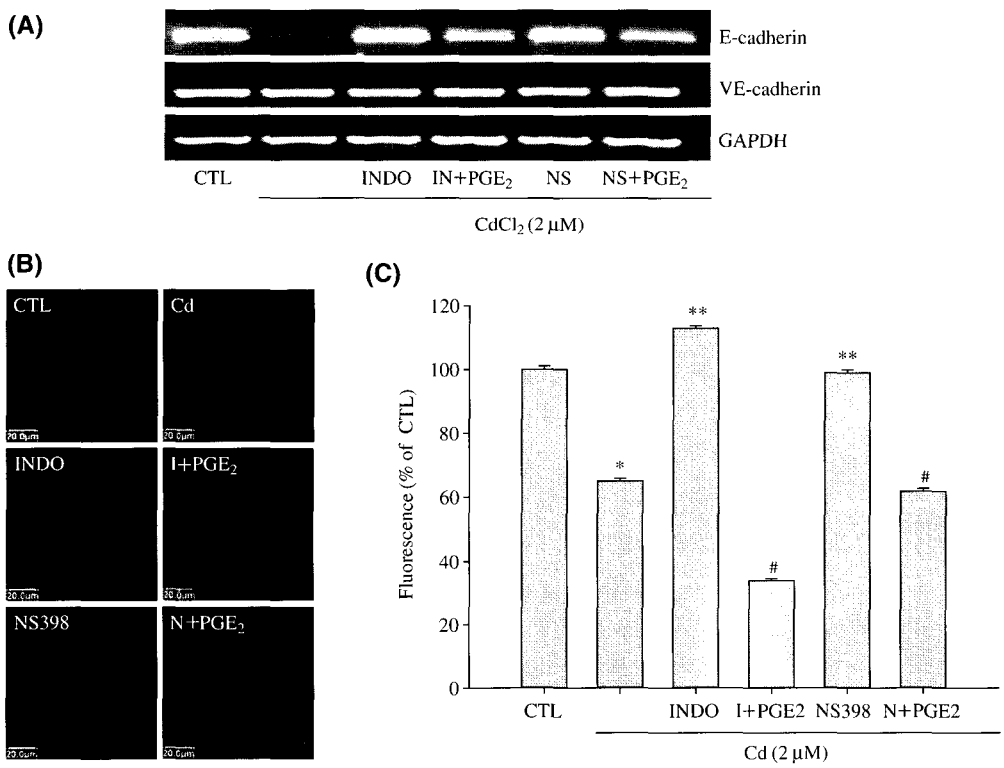

Fig. 2. Effects of COX inhibitors and PGE_2 on cadmium-induced adhesion molecule expression in bEnd3 cells. bEnd3 cells were preincubated with indomethacin (INDO, 10 μM), NS398 (NS, 10 μM) for 30 min. Cells were further incubated with $CdCl_2$ (2 μM) and PGE_2 (1 ng/mL) for 4h and the levels of E-cadherin and VE-cadherin mRNA and protein were determined by RT-PCR (A) and immunocytochemistry (B) as described in Materials and Method. Protein expression was expressed as a percent of control with densitometric analysis of confocal microscopic image (C). Data are expressed as mean±S.E (n=5). *$p<0.01$ vs control; **$p<0.01$ vs cadmium control, #$p<0.01$ vs Inomethacin or NS398

나 E-cadherin의 발현은 현저히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 카드뮴에 의한 E-cadherin 발현 감소는 indomethacin과 NS398 등의 COX 저해제에 의해 정상 수준으로 회복되었다. COX 저해제에 의해 회복되는 E-cadherin 발현은 PGE_2 처리에 의해 다시 감소되는 것을 확인하였다. 그러나 VE-cadherin은 COX 저해제 또는 PGE_2에 의해서 유의적인 영향을 받지 않음을 확인하였다. 형광면역조직화학검사법을 이용하여 단백질발현 변화를 확인한 결과 mRNA에서와 동일한 결과를 확인하였다(Fig. 2B, C). 이러한 결과들은 카드뮴에 의한 E-cadherin 발현 감소에 COX-2 발현 및 PGE_2 생성 증가가 관여하고 있음을 시사하고 있다.

3. 항산화제가 카드뮴에 의한 세포부착분자의 발현에 미치는 영향

카드뮴에 의해 유도되는 부착분자 발현에 있어 산화적 스트레스의 관여 가능성을 확인하기 위해 항산화제인 NAC (10 mM)과 Trolox (10 μM)를 30분 전처리한 후 카드뮴을 처리하여 E-cadherin과 VE-cadherin의 세포부착분자의 발현 양상을 RT-PCR, western blot 및 cell surface EIA로 검토한 결과, 수용성 항산화제인 NAC은 카드뮴에 의한 E-cadherin 발현 감소를 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 유의적으로 회복시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 지용성 항산화제인 Trolox 역시 E-cadherin 발현 감소를 유의적으로 회복시켰으나 NAC과 비교하여 비교적 적은 효과를 보였다. 그러나 VE-cadherin의 경우, 카드뮴 및 항산화제에 의한 mRNA와 단백질의 유의적 발현 변화가 관찰되지 않았다.

고 찰

카드뮴은 산업적 활동의 부산물로 환경 중에 배출되어 다양한 병리증상을 유발하는 대표적인 환경독성물질로서 폐(lung), 간(liver), 신장(kidney, 뼈(bone), 정소(testis), 태반(placenta)을 포함하는 다양한 기관의 손상을 일으킨다(Fassett *et al.*, 1975). 카드뮴은 노출 시 뇌혈관 장벽에 축적되고(Couraud *et al.*, 1998) 뇌신경 세포사멸(Elliott *et al.*, 2000)과 세포간 tight junction의 붕괴를 유발하여(Zimmerhackl *et al.*, 1998) 뇌기능 장애를 일으키는 것으로 알려져 있으며, 특히 역학 조사 결과 뇌졸중의 발병률을 높일 수 있음이 보고된 바 있으나(Elliott *et al.*, 2000) 아직 자세한 독성발현기전에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 연구진은 카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서 PGE_2 및 COX-2 생성을 유도하고, 이는 뇌혈관내피세포에서 ICAM-1의 발현조절과 상관성이 있음을 보고한 바 있다(Seok *et al.*, 2006). 또한, 카드뮴에 의한 PGE_2 생성 증가 및 COX-2 발현 유도는 세포 내 산화적 스트레스 증가와 밀접한 관련이 있음을 보고한 바 있다(Park *et al.*, 2006). 본 연구에서는 카드뮴이 세포부착분자 중 E-cadherin의 발현에 미치는 영향을 검토하고 이러한 영향이 세포 내 산화적 스트레스에 의해 조절되는지를 확인함으로써 뇌기능 장애 발현기전을 확인하기 위한 기초지견을 얻고자 하였다.

E-cadherin은 catenin을 통한 actin cytoskeleton에 결합된 intracellular domain과 extracellular domain 사이에 분자간 부착 및 칼슘 결합부위를 가지고 있는 단백질이다. 세포간 결합에 있어 칼슘의 역할은 매우 중요하며 카드뮴의 노출로 인해 칼슘으로 결합이 되어야 할 자리에 2가 양이온인 카드뮴이 치환되면 세포간 결합이 붕괴되어 뇌혈관장벽의 기능장애가 수반되는 것으로 알려져 있다(Geiger *et al.*, 1983). VE-cadherin은 모세혈관의 내피세포에서 발현되는 부착분자로 E-cadherin과 유사한 기능을 가지며 VE-cadherin의 손실은 투과도 증가를 유발하여 내피세포 장벽으로의 기능이 손상됨을 의미한다(Caveda *et al.*, 1996; Hordijk *et al.*, 1999; Corada *et al.*, 1999). 카드뮴은 생쥐의 폐에서 E-cadherin과 VE-cadherin의 발현을 감소시키는 것으로 보고된 바 있으며(Pearson *et al.*, 2003), VE-cadherin의 붕괴로 카드뮴이 여러 조직에서 내피세포 장벽으로의 투과도가 증가됨이 보고된 바 있다(Gabbiani *et al.*, 1974; Nolan *et al.*, 2000). 본 연구에서는 카드뮴에 의해 E-cadherin의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 결과는 카드뮴이 칼슘의 치환뿐만 아니라 세포부착분자의 발현 억제를 유도하여 뇌혈관 장벽에서의 세포간 결합 붕괴를 초래하고 있음을 시사하고 있다. 본 연구에서는 또한 카드뮴에 의한 뇌혈관내피세포 내 E-cadherin의 발현 감소가 COX-2 저해제와 항산화제에 의해 회복됨을 확인하였다. 이와는 달리 카드뮴에 의한 VE-cadherin 발현 변화는 확인할 수 없었으

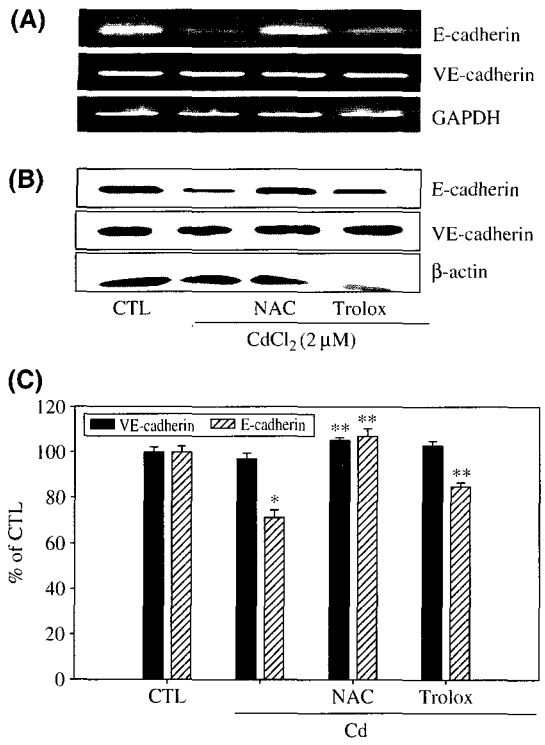

Fig. 3. Effects of ROS inhibitors cadmium-induced adhesion molecule expression in bEnd3 cells. bEnd3 cells were preincubated with NAC (10 mM) and trolox (10 μM) for 30 min and further incubated with $CdCl_2$ (2 μM) for 24 h. The levels of E-cadherin and VE-cadherin mRNA and protein were determined by RT-PCR (A), Western blot (B), and (C) cell surface ELISA as described in Materials and Method. Data are expressed as mean±S.E. (n=4). *$p<0.01$ vs control; **$p<0.01$ vs cadmium control.

며, COX-2 저해제 및 항산화제에 의한 영향도 확인할 수 없었다. E-cadherin과 VE-cadherin은 카드뮴에 의해 폐조직에서의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있어(Pearson *et al.*, 2003) 그 조절 기전이 유사할 것으로 추정되나, 이와는 상이한 연구 결과도 보고되어 있다. 즉, 신장 암을 대상으로 한 연구 결과 암종의 종류에 따라 E-cadheirn과 N-cadherin의 발현에는 차이가 있었지만 VE-cadherin의 발현에는 차이가 없었다는 보고(Markovic-Lipkovski *et al.*, 2001)와 혈관내피세포에서 histamine은 VE-cadherin만을 특이적으로 인산화시킨다는 보고(Andriopouplou *et al.*, 1999) 등은 cadherin 별로 서로 다른 조절 기전이 작동되고 있을 가능성을 시사하고 있다. 카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서 E-cadherin과 VE-cadherin의 발현에 상이하게 영향을 주는 작용기전은 아직 명확하지 않으며 향후 보다 진전된 연구를 통해 규명되어야할 과제이다.

카드뮴은 세포내 항산화 시스템을 교란시키거나(Xu *et al.*, 2003) 미토콘드리아의 기능에 영향을 줌으로써(Pouramad and O'Brien, 2000) 세포 내 ROS 생성을 증가시키며, 이로 인해 세포내 산화-환원 균형의 파괴, 칼슘대사 및 세포내 신호전달 시스템의 교란이 일어나게 된다(Ramirez and Gimenez, 2003). 따라서 카드뮴은 산화적 기전을 통해 세포 기능에 부정적인 영향을 주는 것으로 여겨지고 있으며, 실제 항산화제 처리에 의해 카드뮴의 독성이 완화되는 것으로 보고된 바 있다(Stohs *et al.*, 2000). 뇌혈관 내피세포에서의 ROS 생성 증가는 COX-2 발현과 PGE_2 생성을 유도하는 것으로 알려져 있으며(Fang *et al.*, 2000), 카드뮴 역시 뇌혈관 내피세포내 ROS 생성을 증가시키며 COX-2 발현과 PGE_2 생성을 증가시키는 것으로 확인된 바 있다(Park *et al.*, 2006). 또한 뇌혈관 내피세포에서 ROS 저해제인 NAC이 카드뮴에 의한 COX-2의 발현과 PGE_2 생성을 감소시키며 이 때 카드뮴 유도 ICAM-1의 발현이 동시에 저해되는 것으로 보아 카드뮴에 의한 ICAM-1 발현은 COX-2 발현 증가를 매개로 하여 조절될 것으로 추정된 바 있다(Seok *et al.*, 2006). 본 연구에서도 카드뮴에 의해 유도되는 E-cadherin 발현 감소현상이 항산화제 및 COX-2 저해제에 의해 회복되는 것으로 미루어 ICAM-1 발현에 미치는 영향과 마찬가지로 ROS 생성 증가에 이어 COX-2 발현 증가됨으로써 E-cadherin 발현이 감소되고 있음을 추정할 수 있다. 본 연구는 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴에 의한 E-cadherin 발현 감소를 산화적 스트레스 및 COX-2 발현과 관련지어 관찰한 첫 보고이며, 따라서 카드뮴에 의해 유도되는 뇌손상의 발생 기전에 대한 새로운 지견을 제시하고 있다.

E-cadherin은 카드뮴의 상피세포 독성유발에 있어 주요 표적분자로 잘 알려져 있다(Prozialeck, 2000). 카드뮴은 embryogenesis 과정 중 E-cadherin 단백질량을 증가시키거나(Chen and Hales, 1994) in vivo 처리한 폐조직에서는 오히려 감소시키는 것으로도 알려져 있다(Pearson *et al.*, 2003). 카드뮴은

또한 2가 이온으로 E-cadherin과의 직접적인 상호작용을 통해 permeability barrier 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며, 이외에 세포내 분포의 변화 및 이에 따른 E-cadherin/catenin complex의 붕괴를 통해서도 독성작용을 유발하는 것으로 알려져 있다(Prozialeck *et al.*, 2000; Weidner *et al.*, 2000). 세포내 산화적 스트레스 역시 뇌혈관 내피세포의 junctional protein에 영향을 줌으로써 BBB 기능을 저해하며(Krizbai *et al.*, 2005) 이는 E-cadherin의 발현에 영향을 주기보다는 주로 세포내 분포를 변화시킴에 기인하는 것으로 알려져 있다(Parrish AR *et al.*, 1999; Schmelz *et al.*, 2001; Rao *et al.*, 2002). E-cadherin과 마찬가지로 VE-cadherin 역시 산화적 스트레스에 의해 mRNA level에는 변화없이(Zhang *et al.*, 2003) 세포내 분포의 변화를 유도하여(Zhang *et al.*, 2003; Usatyuk *et al.*, 2006) adherens junction의 기능 부전에 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 산화적 스트레스가 E-cadherin의 발현에는 최소한의 영향을 미치며 주로 단백질 재분포에 영향을 준다는 이상의 보고들은 카드뮴이 ROS/COX-2 발현을 매개로 E-cadherin 발현 감소시킬 것이라는 본 연구에서 추정한 조절가설과는 차이점을 보이고 있어 향후 세포내 작용기전에 대한 보다 정밀한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서의 세포부착분자 발현에 미치는 영향과 프로스타글란딘 및 세포내 산화적 스트레스의 관여 가능성을 검토함으로써 카드뮴 유도 뇌손상 발생 기전을 알아보고자 하였다. 카드뮴은 뇌혈관 내피세포에서 프로스타글란딘 생성을 증가시켰으며 이는 COX-2 선택적 저해제에 의해 억제됨을 확인하였다. 카드뮴은 E-cadherin의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 감소시켰으며 이는 항산화제인 NAC과 COX-2 저해제들에 의해 회복됨을 알 수 있었다. 또한 COX 저해제의 작용은 PGE_2 처리에 의해 다시 회복이 감소됨을 확인하여 카드뮴은 COX-2/PGE_2 생성을 매개로 하여 E-cadherin 발현을 감소시킴을 알 수 있었다. 또한 카드뮴이 세포 내 ROS 생성 증가를 통해 COX-2를 유도한다는 이전의 연구를 바탕으로 카드뮴은 결국 세포내 산화적 스트레스를 증가시킴으로써 COX-2 발현 및 PGE_2 생성을 증가시키고 이로 인해 E-cadherin의 발현이 감소되는 것으로 추정할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project) 및 경기도 지역협력연구센터사업(아주대학교 세포사멸조절신약개발센터) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Andriopouplou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG and Dejana E. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999; 19: 2286-2297.

Brightman MW. The anatomic basis of the blood-barrier. In implications of the blood brain barrier and its manipulation. Vol. 1. Basic Sciences Aspects. Neuwelt E ed. Plenum Publishing Corp. New York 1989; 53-83.

Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, Breviario F, Corada M, Gulino D and Dejana E. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). J. Clin. Invest. 1996; 98(4): 886-893.

Chen B and Hales BF. Cadmium-induced rat embryotoxicity in vitro is associated with an increased abundance of E-cadherin protein in the yolk sac. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1994; 128(2): 293-301.

Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA and Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important of microvascular integrity in vivo. Proc. Natl. Sci. USA. 1999; 96(17): 9815-9820.

Couraud PO. Infiltration of inflammatory cells through brain endothelium. Pathol. Biol. (Paris) 1998; 46(3): 176-180.

Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mutat. Res. 1981; 86: 115-135.

Dejana E and Del Maschio A. Molecular organization and functional regulation of cell-cell junctions in the endothelium. Thromb. Haemost. 1995; 74(1): 309-312.

Elliott P, Arnold R, Cockings S, Eaton N, Jarup L, Jones J,

Jones J, Quinn M, Rosato M, Thornton I, Toledano M, Tristan E and Wakefield J. Risk of mortality, incidence, and stroke in a population potentially exposed to cadmium. Occup. Environ. Med. 2000; 57(2): 94-97.

Fang X, Moore AS, Nwankwo JO, Weintraub LN, Oberley WL, Snyder DG and Spector AA. Induction of cyclooxygenase-2 by overexpression of the human catalase gene in cerebral microvascular endothelial cells. J. Neurochem. 2000; 75(2): 614-623.

Fassett DW. Cadmium: Biological effects and occurrence in the environment. Annu. Rev. Pharmacol. 1975; 15: 425-435.

Fukuhra S, Sakurai A, Yamagishi A, Sako A and Mochizuki N. Vasucular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small TPase, Rap1. J. Biochem. Mol. Biol. 2006; 39(2): 132-139.

Gabbiani G, Badonnel M, Matthewson S and Ryan G. Acute cadmium in toxication: early selective lesions of endothelial clefts. Lab. Invest. 1974; 30(6): 686-695.

Geiger B. Membrane-cytoskeleton interaction. Biochim. Biophys. Acta. 1983; 737: 305-341.

Heimark RL, Degner M and Schwartz SM. Identification of a Ca^{2+}-dependent adhesion molecule in endothelial cells. J. Cell. Biol. 1990; 110(5): 1745-1756.

Hordijk PL, Anthony E, Mul FPJ, Rientsma R, Oomen LCJM and Roos D. Vascular endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. J. Cell. Sci. 1999; 112 (Pt 12): 1915-1923.

Krizbai IA, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmari E, Traweger A, Wejksza K and Bauer HC. Effect of oxidative stress on the junctional protein of cultured cerebroendothelial cells. Cell. Mol. Neurobiol. 2005; 25(1): 129-139.

Markovic-Lipkovski J, Brasanac D, Muller GA and Muller CA. Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. Tumori. 2001; 87: 173-178.

Nolan F, Kools P and van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. J. Mol. Biol. 2000; 299(3): 551-572.

Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H and Sugita M. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. Clin. Neurol. Neurosurg. 1997; 99(4): 263-265.

Park DH, Kim YC, Moon CK, Jung YS, Baik EJ, Moon CH and Lee SH. Cadmium-induced COX-2 expression in cerebrovascular endothelial cells. J. Environ. Toxicol. 2006; 21(3): 275-282.

Parrish AR, Catania JM, Orozco J and Gandolfi AJ. Chemically induced oxidative stress disrupts the E-cadherin/catenin cell adhesion complex. Toxicol. Sci. 1999; 51(1): 80-86.

Pearson CA, Lamar PC and Prozialeck WC. Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in mouse lung. Life Sci. 2003; 72: 1303-1320.

Pouramad J and O'Brien PJ. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu^{2+} and Cd^{2+}. Toxicology. 2000; 143: 263-273.

Prozialeck WC. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2000; 64: 231-249.

Ramirez DC and Gimenez MS. Induction of redox changes, inducible nitric synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure inperitoneal macrophages. Toxicol. Lett. 2003; 145(2): 121-132.

Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ and Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. J. Biochem. 2002; 368: 471-481.

Rubin L, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, Tanner LI, Tomaselli KF and Bard F. A cell culture model of the blood-brain barrier. J. Cell. Biol. 1991; 115: 1725-1735.

Schmelz M, Schmid VJ and Parrish AR. Selective disruption of cadherin/catenin complexes by oxidative stress in precision-cut mouse liver slices. Toxicol. Sci. 2001; 61(2): 389-394.

Seok SM, Park DH, Kim YC, Moon CH, Jung YS, Baik EJ, Moon CK and Lee SH. COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. Toxicol. Lett. 2006; 165: 212-220.

Shukla A, Shukla GS and Srimal RC. Cadmium-induced alterations in blood-brain barrier permeability and its possible correlation with decreased microvessel antioxidant potential in rat. Hum. Exp. Toxicol. 1996; 15: 400-405.

Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E and Bagchi M. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2000; 19: 201-213.

Usatyuk PV, Parinandi NL and Natarajan V. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens and tight junction proteins. J. Biol. Chem. 2006; 281: 35554-35566.

Weidner WJ, Waddell DS and Sillman AJ. Low levels of cadmium chloride alter the immunoprecipitation of

corneal cadherin-complex proteins. Arch. Toxicol. 2000; 4(10): 578-581.

Xu J, Maki D and Stapleton SR. Mediation of cadmium-induced oxidative damage and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression through glutathione depletion. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2003; 17: 67-75.

Zimmerhackl LB, Momn F, Wiegele G and Brandis M. Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherine-catenin complex. Am. J. Physiol. 1998; 275 (1 Pt 2): F143-54.

Zhang Y, Gu Y, Lucas MJ and Wang Y. Antioxidant superoxide dismutase attenuates increased endothelial permeability induced by platelet-activating factor. J. Soc. Gynecol. Investig. 2003; 10: 5-10.