



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서 염증인자
생성에 미치는 영향

아주대학교 대학원

의학과

박동현

카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서 염증인자
생성에 미치는 영향

지도교수 이 수 환

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2004년 2월

아주대학교 대학원

의학과

박동현

박동현의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 문 창 현 인

심사위원 강 엽 인

심사위원 이 수 환 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2003년 12월 20일

카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서 염증인자 생성에 미치는 영향

목적 : 산업적 부산물로 생성되는 카드뮴은 공해병의 원인이 되는 등 환경 독성 물질로 잘 알려져 있다. 카드뮴은 심폐기능부전, 폐기능 저하를 수반하는 폐선유증을 유발하며 신장에는 세뇨관 장애, 골다공증, 고혈압 등 다양한 생리, 병리학적인 영향을 주고 있다. 카드뮴은 또한 뇌졸중 이환을 증가와 관련이 있으리라는 조사가 보고 되어 있으나 그 작용기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 뇌혈관 내피세포주인 bEnd3 세포에서 카드뮴에 의해 염증인자생성에 미치는 영향을 검토함으로써 작용기전 일단을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법 : American Type Culture Collection (USA)에서 구입한 생쥐 뇌혈관 내피세포주인 bEnd3 세포에 카드뮴을 처리 후 MTT assay로 세포 생존율을 확인하였고, EIA를 이용하여 prostaglandins(PGs) 생성을 측정하였고, cyclooxygenase-2(COX-2)의 발현은 RT-PCR과 western blot을 통해 확인하였다. 또한 세포내 신호 전달 경로를 확인하기 위해 ERK, p38, JNK의 저해제와 카드뮴을 함께 처리하여 COX-2 발현과 PGs 생성에 미치는 영향을 확인하였다. COX-2 발현조절 전사인자(transcription factor)인 nuclear factor kappa-B (NF- κ B)의 관련 가능성을 알아보기 위해 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)를 행하였다.

결과 : bEnd3에서 카드뮴을 처리 한 결과 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 광학현미경으로 세포 손상을 관찰할 수 있었다. 카드뮴은 PGs의 생성을 증가시켰고, COX-2의 발현을 증가시켰다. 이러한 PGs 생성과 COX-2 발현은 항산화제인 N-Acetyl-L-cystein (NAC)에 의해서 유의적으로 억제되었다. 또 카드뮴은 시간 의존적으로 pphospho-p38을 증가시켰으며, p38 저해제인 SB203580에 의해 카드뮴에 의해 유도되는 COX-2 발현 및 PGs 생성을 감소시켰다. Nuclear factor kappa-B (NF-kB)는 카드뮴 처리 시 30분에 증가하였고, NF-kB 인산화 저해제인 Bay 11 7082는 카드뮴에 의해 유도된 COX-2 발현 및 PGs 생성을 감소시켰다.

결론 : 본 연구 결과들은 환경 독성 인자인 카드뮴에 의해 ROS가 증가되고 이 영향으로 p38 MAP Kinase 및 NF-kB를 경유하여 COX-2 발현과 PGs 생성을 증가시키며, 생성된 PGs와 COX-2 발현은 뇌혈관 세포손상을 일으켜 뇌혈관 세포 기능에 영향을 줄 수 있는 가능성이 있음을 시사하고 있다.

핵심되는 말 : Cadmium(Cd), Cyclooxygenase-2(COX-2), Prostaglandins(PGs), nuclear factor kappa-B(NF-kB), Mitogen Activated Protein Kinase(MAPK), Brain endothelial cell(bEnd3)

사 용 약 어

Cd : cadmium

COX-2 : cyclooxygenase-2

EIA : enzyme-linked immunoassay

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

MAPK : mitogen activated phosphate kinase

MTT : 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium

NAC : N-Acetyl-L-cystein

NF- κ B : nuclear factor kappa-B

PGs : prostaglandins

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

PMSP : phenylmethylsulfonyl fluoride

ROS : reactive oxygen species

JNK : c-Jun N-terminal kinase

ERK : extracellular signal-related kinase

PGE₂ : prostaglandin E₂

SDS : sodium dodecyl sulfate

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PVDF : polyvinylidene difluoride

HRP : Horse radish peroxide

차 례

국문요약	1
사용약어	3
차례	4
그림차례	6
I. 서론	7
A. 카드뮴	7
B. Prostaglandin과 Cyclooxygenase	8
II. 연구 목적	11
III. 실험재료 및 방법	12
A. 시약 및 실험기기	12
1. 시약 및 재료	12
2. 실험 기기 및 기구	13
B. 연구 방법	14
1. 세포 배양	14
2. 세포의 처리	14
3. 세포 생존율 측정	14
4. Prostaglandin E ₂ 정량	15
5. Western blotting	15
6. Total RNA분리	16
7. RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)	16
8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	17

9. 통계처리	18
Ⅸ. 연구 결과	
A. 카드뮴이 세포 생존율에 미치는 영향	19
B. 카드뮴이 PGE ₂ 생성에 미치는 영향	19
C. 카드뮴이 COX-2 발현에 미치는 영향	20
D. 카드뮴이 MAP kinase 활성화에 미치는 영향과 PGE ₂ 생성과의 관련성 ..	20
E. 카드뮴에 의한 NF-κB 활성화에 미치는 영향과 COX-2 발현 및 PGE ₂ 생성과의 관련성	21
Ⅹ. 고찰	31
Ⅺ. 결론	34
참고문헌	37
영문요약	44

그림 차례

Fig 1. Effects of cadmium on the viability of bEnd3 cells	23
Fig 2. Effect of cadmium on Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) production in bEnd3 cell	24
Fig 3. Effects of cadmium on COX-2 gene expression in bEnd3 cell	25
Fig 4. Effects of cadmium on MAP Kinase activities in bEnd3 cells	26
Fig 5. Effects of MAP Kinase inhibitors on cadmium-induced COX-2 expression	27
Fig 6. Effects of MAP Kinase inhibitors on cadmium-induced prostaglandin E ₂ production	28
Fig 7. Effect of cadmium on NF-κB activity	29
Fig 8. Effects of NF-κB inhibitors on cadmium-induced COX-2 expression	30
Fig 9. Effects of NF-κB inhibitor on cadmium-induced prostaglandin E ₂ (PGE ₂) production in bEnd3 cell	31

1. 서 론

1. 카드뮴

산업적 환경 독성 인자로서 카드뮴(Cd)은 안료 제조와 다른 금속의 전기도금, 합금, 또는 플라스틱과 알칼리 건전지의 제조 시에 부산물로서 생성되며 공해병의 원인이 되고 있다. 카드뮴에 의해 야기되는 병리 증상으로는 골연화증과 신장 장애가 대표적으로 잘 알려져 있다. 카드뮴은 이외에도 폐기종, 심부전증, 고혈압의 발현과 밀접한 관련이 있으며 장기 미량 축적에 의한 특수한 결과로서 이따이이따이 병을 유발하는 등⁵ 여러 생물학적 기능에 영향이 있다고 보고 되고 있다. 카드뮴은 신장에서 세포증식의 감소와 ATP 감소,² 칼슘 농도의 변화, 세포 부착분자(adhesion molecule)의 붕괴,¹ ubiquitin proteasome 경로의 붕괴 등을 일으키며, 골세포(bone cell)에서도 칼슘 작용을 억제하고 골격근의 성장(skeletal growth)과 형성에 영향을 주며 간(liver), 폐(lung), 장(intestine)에서 세포사를 일으키는 등 여러 부정적인 생물학적 작용기전이 보고 되고 있다. 또한 카드뮴은 뇌졸중 증가와 관련이 있을 것이라는 역학 연구 결과가 보고 된 바 있으나 아직 그 생물학적 작용기전은 잘 알려져 있지 않다. 뇌졸중은 뇌에 혈액을 공급하고 있는 혈관이 막히거나 터짐으로써 그 부분의 조직이 손상되어 나타나는 신경학적 증상을 말하며, 괴사된 조직에 의해 혈관이 막히는 뇌전색, 뇌 속에 있는 작은 혈관들이 터져 뇌실질 속으로 들어가 뇌세포 기능을 잃게 하는 뇌출혈, 뇌동맥에 생긴 동맥류가 터지는 지주막하 출혈, 뇌의 혈압이 갑자기 올라가 순환 장애가 오는 고혈압성 뇌증 등이 있다. 카드뮴도 신경세포에서 산화적 스트레스에 의한 세포사와 염증인자 생성, ubiquitin proteasome 경로의 붕괴, 세포 부착분자

의 붕괴 등의 세포 손상작용이 보고 된 바 있으나, 뇌졸중에 중요한 인자인 뇌혈관 내피세포에서는 아직 정확한 작용기전이 보고 되어 있지 않다. 뇌혈관 내피세포는 blood-brain barrier (BBB)를 형성하는 주된 세포로서, 이것이 손상되면 BBB가 파괴되어 뇌혈관 투과도가 증가한다. 이러한 투과도의 증가는 뇌졸중 유발 인자들의 뇌내 유입 가능성을 높여 이로 인한 산화적 스트레스의 증가와, 다양한 염증 반응 발현 등으로 인해 뇌세포와 신경세포들의 손상을 일으키는 등 뇌졸중의 중요한 원인 중의 하나인 것으로 알려져 있다.

2. Prostaglandin과 Cyclooxygenase

Prostaglandins(PGs)은 정상적인 뇌의 기능 및 허혈성 뇌 질환이나 뇌졸중과 같은 신경 병리에 중요한 역할을 하며, 내·외부적 요인에 의한 뇌 세포의 손상에 의해 증가되는 것으로 알려져 있다. PGs는 phospholipase A₂ (PLA₂)에 의해 세포막의 인지질로부터 유리된 arachidonic acid (AA)가 cyclooxygenase (COX)에 의해 대사된 물질이다. 뇌 세포 손상은 AA를 증가 시키고 COX의 활성화를 초래하며 여러 종류의 prostanoid를 유리시키게 되는데, 뇌 세포 손상에 의해 증가된 AA는 우선 prostaglandin H₂ (PGH₂)로 대사되고, 연속적으로 각종 이성화효소 (isomerase)에 의해 PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, prostacyclin (PGI₂)등 여러 종류의 prostaglandin isomer로 변환된다. 이러한 PGs의 합성은 세포내 COX의 활성도에 따라 결정되는데, 현재까지 두 종류의 이성체(isoform), COX-1, COX-2이 알려져 있다.

COX-1은 거의 모든 생체 내 조직에서 발현되고 있으며 주로 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)에 분포하여 호르몬 작용과 혈관의 항상성을 유지하는 등 정상적인 생리활동에 기본적인 역할을 하게 되므로 COX-1의 발현 억제는

여러 가지 부작용을 낳게 된다. 반면, 유도형(inducible form)인 COX-2는 염증을 유발하는 IL-1 β 나 TNF- α 와 같은 cytokine류, 박테리아의 내독소, 성장 호르몬이나 기계적 및 온도에 의한 조직 손상에 의해 유도된다. COX-2는 세포 내 소포체(ER) 및 세포핵 내 등에 다량 분포하고 있으며, colorectal adenoma에서 발현이 증가되어 있는 것으로도 알려져 있다. 또한 비스테로이드성 항염증제(nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs)의 투여에 의해 암종의 발현이 현격히 감소하며, COX-2의 발현에 의해 정상적인 apoptosis 과정이 억제된다는 보고들로 미루어 COX-2가 발암과정에도 관여한다고 보고되고 있다.

이들 isoenzyme은 그 효소작용의 유사성에도 불구하고, COX-2의 아미노산 배열의 30번까지는 COX-1과 큰 차이를 보이며 효소 단백질의 아미노산 서열에는 75% 정도의 유사구조를 갖고 있다. 이로 인해 COX-1의 효소 작용을 나타내는 중요부위는 COX-2에도 그대로 보존되어 있음에도 불구하고 각 isoenzyme의 세포내 발현기전 및 생체 내 기능상에 서로 차이가 있음이 이미 보고된 바 있다. 전술한 바와 같이 COX-2의 각종 병리학적 기전에서의 역할을 미루어 볼 때 COX 저해제는 결국 COX-1이 아닌 COX-2를 선택적으로 차단 할 수 있어야 하며 수많은 연구들이 여기에 초점을 맞추어 수행 되어 오고 있으나 아직까지 COX가 뇌 세포 손상 기전에 있어 정확한 역할이 무엇인지 밝히는 것은 과제로 남아 있다.

전술한 바와 같이 뇌 조직에서의 PGs 생성과 COX-2의 발현 증가는 뇌졸중이나 Parkinson's disease, Alzheimer's disease를 포함한 다양한 범주의 각종 질환과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다. 최근 카드뎀은 신경세포에서 PGs 생성과 COX-2 발현을 증가시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 보고 되어 카드뎀에 의한 뇌졸중 발현 증가와의 관련성이 주목되고 있다. PGs은 또한 BBB

의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있어, 카드뮴에 의한 뇌혈관 내피세포에서의 PGs 생성기전을 밝히는 것은 카드뮴에 의한 뇌졸중 발현 기전을 규명함에 있어 중요한 의의를 지니고 있다.^{14,15}

II. 연구 목적

전술한 바와 같이 환경 독성 인자인 카드뮴이 뇌혈관 질환 중 뇌졸중 (stroke)을 일으킨다는 역학적 조사가 보고 되고 있지만, 뇌졸중을 일으키는 작용 기전등 그 원인 상관관계에 대해서는 아직 확실한 증거가 제시되지 않고 있다. 뇌혈관 질환에 있어서 COX와 PGs등 염증인자들의 역할은 매우 잘 알려져 있으며 또한 카드뮴이 다양한 세포에서 염증인자인 COX-2 생성을 유도하는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 뇌혈관 내피세포에 카드뮴이 염증인자에 미치는 영향은 아직 보고되어 있지는 않다.

따라서 본 연구에서는 카드뮴이 생쥐 뇌혈관 내피세포주에서 염증반응 (inflammation)매개 인자인 prostaglandin 생성과 COX-2 발현에 미치는 영향을 살펴보고, COX-2의 전사인자들의 활성화와 MAP Kinase 신호전달계의 영향 등 관련된 세포내 작용 기전을 검토함으로써 카드뮴에 의해 유도되는 뇌졸중 (stroke)등의 뇌혈관 질환에 있어 그 원인 상관관계를 규명하기 위한 기초 자료를 제시하고자 한다.

Ⅲ. 실험재료 및 방법

A. 시약 및 실험 기기

1. 시약 및 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)는 JBI(Seoul, Korea)에서 fetal bovine serum은 Hyclon (Logan, UT, USA), penicillin-streptomycin, 0.25% Trypsin-EDTA는 Gibco, BRL (Grand Island, NY, USA), cadmium chloride (CdCl₂), N-Acetyl-L-cystein (NAC), phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), triton X-100 등은 Sigma(St. Louis, MO, USA), SP600125 은 BIOMOL(PA, Plymouth Meeting, USA), MG 132, Bay 11 7082, Trolox, SB203580, PD98059는 Calbiochem(SanDiego, CA, USA)에서 구입하였다. Western blot을 위한 COX-2 polyclonal antibody는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38 polyclonal antibody는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, EMSA에 사용한 동위원소 (α -³²P) dCTP SBP-205는 IZOTOP(Konkoly Thege Miklo's, Budapest, Hungary)에서, easy-BLUE는 iNtRON (intron, Seoul, Korea), RT-PCR에 사용한 AMV reverse transcriptase 는 Boeringer Mannheim (Mannheim, BM Germany)에서, PCR에 사용한 pre-mix PCR(intron, Seoul, Korea)에서 구입하였고, GAPDH 및 COX-2 oligo

primer는 Bioneer (Bioneer, Seoul, Korea)에서 제작, 구입하였다.

2 실험 기기 및 기구

RNA 추출 후 total RNA를 정량하기 위해 분광 광도계(Amersham, Piscataway, NJ, USA)를, RT-PCR은 PCR machine 640 (Perkin Elmer, Willslay, MA, USA)를 사용하였다. Enzyme immunoassay, 단백질 정량은 precision microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이외에는 water-Jacketed CO₂ Incubator (NAPCO 6101-1, Winchester, VA, USA), LAS 1000 CH image analyzer (Fuji, JAPAN), Inverted microscope (Leica DMLS, Lilienthalstrasse, Bensheim, Germany), western kit (Bio Rad, Hercules, CA, USA)를 실험에 이용하였다.

B. 연구 방법

1. 세포배양

bEnd3(CRL-2299)는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 4.5g/L의 glucose와 1.5g/L의 sodium bicarbonate가 포함된 DMEM(JBL, Seoul, Korea)에 10% FBS, 1% penicilline-streptomycin (100unit/ml - 100ug/ml, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 배지로 5% CO₂ / 95% air, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다.

2. 세포의 처리

세포는 70-80%의 confluent가 되도록 배양한 뒤 실험에 이용하였다. 카드뮴(CdCl₂)을 농도 별로 가하여 세포 생존율, COX-2 발현, PGs 생성 등에 미치는 영향을 검토하였다. 이 때 시간별 반응을 그래프 변화 추이도를 같이 살펴봄으로써, 전반적인 카드뮴에 대한 영향을 비교, 검토하여 실험 조건을 확립하였다.

3. 세포 생존율 측정

세포 사멸을 양적으로 측정하기 위해 세포내에서 대사된 MTT의 양을 595nm의 흡광도에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 배지에 MTT(5mg/ml) 용액을 최종 농도가 0.5mg/ml이 되도록 25ul을 넣고, 2시간 동안 배양한 후, solubilization buffer(0.5N HCl 10ml, acetic acid 6ml, DW 84ml, DMP 100ml, SDS 40g pH 4.7)를 100ul씩 넣고 5% CO₂, 37°C 배양기에 8시간 이상 반응시킨 후, 595nm에서의 흡광도를 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA,

USA)로 측정하였다.

4 Prostaglandin E₂ 정량

일정 시간 동안 배양한 후 배지를 취하여 생성된 PGE₂의 양을 Enzyme-linked immunoassay(EIA) 방법으로 측정하였다. EIA는 다음과 같은 방법으로 시행하였다. PGE₂ antibody를 PBS(0.01M, pH 7.4)에 1:50,000으로 희석하여 maxisorp immunomodule(Nunc, Denmark)에 가하고 4℃에서 24시간 동안 방치하여 well의 기벽에 antibody를 붙인 후 PGE₂ acetylcholinesterase EIA tracer(Cayman Chem, Ann Arbor, Michigan, USA)를 well당 50ul을 가하고 측정하고자 하는 시료를 넣어 tracer와 경쟁적으로 antibody와 결합하도록 하였다. 12시간 후 Ellman's reagent를 150ul을 가해 발색하였으며, 405nm에서 흡광도를 측정하여 PGE₂의 양을 작성된 표준 곡선으로부터 산출하였다.

5. Western blotting

Culture dish에 150mM NaCl, 50mM Tris·Cl(pH 7.5), 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20uM leupeptin, 1mM PMSF, 2% aprotinin을 넣은 buffer를 200ul씩 넣고 세포를 긁어 취한 뒤 30분 동안 ice상에 방치한 다음 sonication으로 세포를 lysis, 14000rpm 30min 4℃로 원심분리를 하여 lysate를 얻었다. 10% SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리한 후, PVDF membrane에 transfer를 하였다. 이 membrane은 5% non-fat dried milk로 blocking하고 COX-2 antibody(1:600)는 6시간, MAP Kinase antibody(1:1,000)는 12시간 동안, 4℃에서 반응시키고 COX-2는 2차 antibody(1:1,000 ARGG)를 3시간 동안 실온에서 반응시킨 후, AP-conjugation kit을 이용해 발색하였다. MAP

Kinase는 2차 antibody인 HRP antibody(1:5,000)를 1시간 동안 반응시켜 Enhancer Chemiluminescent assay(ECL)로 발색시키고, LAS(Fuji, Japan)를 이용하여 이미지를 관찰하였다.

6. Total RNA분리

Total RNA는 easy BLUE(Intron, Seoul korea) RNA isolation kit을 사용하여 분리하였다. 60 ϕ plate에 배양한 세포를 PBS로 2번 씻고 easy BLUE 800ul씩 가하여 세포 균질액을 얻었다. Microtube에 세포 균질액을 옮긴 후 chloroform을 각 microtube에 200ul씩 넣고 10-20초 동안 잘 섞어주었다. 14,000 rpm(4 $^{\circ}$ C)에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 새 microtube에 400ul씩 옮겨 담은 뒤 isopropanol (2-propanol)을 400ul씩 가하고 2-3차례 tube를 inversion하여 혼합한 후 5-10초간 실온에서 잘 섞어주었다. 섞어준 tube를 13,000rpm(실온)에서 5분간 원심 분리하여 얻은 RNA pellet에 70% EtOH를 400ul를 가하여 혼합, 13,000rpm(실온)에서 2분간 원심분리 하여 RNA pellet을 상온에서 건조시켰다. RNA pellet을 DEPC water에 녹인 후 분광광도계(Amersham, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 260nm에서 total RNA 양을 측정하였고, 280nm에서 측정한 값을 비교하여 순도를 측정하였다.

7. RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

5X Reaction buffer 4ul/sample, Random primer p(dN)6 2ul/sample, Deoxynucleotide Mix 2ul/sample, RNase inhibitor 1ul/sample, AMV rever-transcriptase 0.3uL/sample, RNA sample 1ug을 넣은 후 DEPC water

로 total volume이 20ul가 되도록 맞춘 뒤 PCR machine(Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)으로 25℃에서 10분, 42℃에서 60분, 97℃에서 5분을 1 cycle로 돌린 후 cDNA를 얻었다. 얻은 cDNA 2ul, primer upstream 0.3ul, primer downstream 0.3ul, DEPC water 17.4ul를 I-PRE PCR Premix(Intron)와 혼합하였다. 각 시료에 대해 다음의 조건하에서 PCR을 행하여 COX-2 mRNA의 발현 정도를 비교하였다.

COX-2 primer

sense : 5'-ACTCACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'

antisense: 5'-TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3'

GAPDH

sense : 5'-GTGAAGGTCGGTGTGAACGGATTT-3'

antisense : 5'-CACAGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'

reaction cycle

COX-2 : 94℃ 1분, 60℃ 30초, 72℃ 1분 - 28cycle

GAPDH : 94℃ 30초, 60℃ 1분, 72℃ 1분 30초 - 25cycle

8. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

NF-κB binding을 위해 사용된 oligonucleotide probe는 다음과 같다.

NF-1 : 5' - AGCTTGGGGACTTTCC - 3'

NF-2 : 5' - GGAAAGTCCCCAAGCT - 3'

두 개의 oligonucleotide를 1:1로 annealing 한 후, (α - 32 P) dCTP(3,000Ci/mol, 25 uCi/25ul), dNTPs, Klenow buffer등과 혼합하여 표지했다. 표지된 probe는 Quick SpinTM Column(Boehringer Mannheim, G-25 Sephadex Column, Bedford MA, USA)으로 정제하였다. 세포를 cold PBS로 2회 세척한 후 전체 세포 추출물을 모아 1,500rpm, 4℃에서 3분간 원심분리 하였다. Buffer A(10mM Hepes-KOH, pH 7.9, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 10uM Leupeptin)를 400ul 첨가해 세포를 재현탁 하고 15분 동안 유지 후 NP-40 Lysis buffer(10% NP-40, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 0.1mM EDTA, 0.2mM NaF, 0.2mM Na₃VO₄, 10ul protein inhibitor cocktail)를 25ul 첨가해 4℃, 15,000rpm에서 15분 동안 핵(nuclei)을 가라 앉혔다. Buffer C(20mM Hepes-KOH(pH7.9), 10% glycerol, 420mM NaCl, 0.2mM EDTA, 1.5mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSF, 10uM Leupeptin)로 40분 동안 유지시킨 후 14,000rpm 20분 동안 원심분리 하였다. 얻어진 nuclear extracts의 단백질량은 BCA protein assay kit을 이용하여 정량하고 NF-kB 와 probe를 결합시켰다. 8% acrylamide native gel을 만들어 90분간 pre-run을 한 뒤, 전기 영동을 행하였다. 80℃에서 2시간 gel을 건조시킨 후, -70℃에서 하루 동안 film을 노출 시킨 뒤 현상하였다.

9. 통계처리

모든 자료는 평균 \pm S.E.M으로 나타내었고 students' t-test로 통계처리 하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

IV. 연구 결과

1. 카드뮴이 세포 생존율에 미치는 영향

배양한 bEnd3를 96plate (1×10^4 cells/ml)에 분주하고 confluent 해질 때까지 배양한 후 24시간 동안 starvation하였다. 카드뮴을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 MTT assay를 실시하여 세포 생존율을 측정된 결과, 카드뮴 5 μ M일 때 99%, 20 μ M 처리군에서는 79.6%, 25 μ M 처리군에서 50.4%로서 대조군에 비하여 세포 생존율이 감소하였다.(Fig. 1) 즉, 카드뮴에 의해 유도되는 세포사멸이 농도 의존적으로 변화한다는 것을 확인할 수 있었고, 이를 토대로 구한 LC₅₀ 값은 25 μ M이었다.

2. 카드뮴이 PGE₂ 생성에 미치는 영향

카드뮴이 PGE₂생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 먼저 bEnd3 cell에 카드뮴 (2 μ M)을 가한 뒤 시간별로 측정된 결과 카드뮴(2 μ M)에 의해 PGE₂생성이 48시간까지 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 2-A). 이 후 실험은 24h에서 행하였다. 또한 농도별로 카드뮴을 가한 뒤 PGE₂ 생성을 확인한 결과 카드뮴 2 μ M, 20 μ M 처리군에서 유의적으로 증가하였고, 카드뮴에 의해 PGE₂는 NAC (10mM) 처리에 의해 유의적으로 감소하였다(Fig. 2-B).

3. 카드뮴이 COX-2 발현에 미치는 영향

bEnd3 cell에 카드뮴을 농도별로 가한 뒤, 3시간 후에 COX-2 mRNA level을 측정된 결과 카드뮴 2 μ M과 20 μ M에서 유의적으로 증가하였고, 카드뮴 (20 μ M)에 의해 증가된 COX-2 mRNA는 NAC (10mM)에 의해 유의적으로 억제되었다 (Fig. 3-A). 동일한 방법으로 카드뮴을 처리하고, 24시간 후 western blot으로 COX-2 단백질 발현을 확인 한 결과 COX-2 단백질 생성이 카드뮴 처리에 의해 유의적으로 증가하였고, 카드뮴에 의해 증가된 COX-2 단백질 발현을 NAC (10mM) 처리에 의해 유의적으로 억제되었다(Fig. 3-B).

4. 카드뮴이 MAP Kinase 활성화에 미치는 영향과 PGE₂ 생성과의 관련성

카드뮴에 의한 COX-2 발현에 있어서 MAP kinase의 관여 여부를 확인 하기 위하여 먼저, 카드뮴 처리 후 ERK, p38, JNK의 변화 양상을 관찰한 결과, p-p38이 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.(Fig. 4-A) 카드뮴은 ERK, JNK의 활성화에는 유의적인 영향을 주지 않았다.(Fig. 4-B) 또, MAPK에 대한 저해제와 antioxidant인 NAC과 Trolox를 30분 전처리 한 후, 카드뮴을 처리하여 COX-2 mRNA 와 단백질 발현 양상을 관찰한 결과, 저해제인 SB203580에 의해 카드뮴 유도 COX-2 발현이 현저히 감소됨을 확인하였으나, ERK 저해제인 PD98059와 JNK 저해제인 SP600125는 상대적으로 큰 영향을 주지 못하였다.(Fig. 5) 또한 항산화제인 NAC도 카드뮴 유도 COX-2 발현을 유의적으로 억제하였다(Fig. 5). 카드뮴에 의한 PGE₂ 생성 역시 MAP Kinase 저해제 처리에

의해 유의적으로 억제 되었으며, 항산화제 중 Trolox는 카드뮴 유도 PGE₂ 생성에 유의한 영향을 주지 못하였다(Fig. 6)

6. 카드뮴에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향과 COX-2 발현 및 PGE₂ 생성과의 관련성

COX-2의 발현조절 전사인자(transcription factor)로 잘 알려진 nuclear factor kappa-B(NF- κ B)의 활성화에 미치는 카드뮴의 영향을 확인하기 위하여 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)를 실행하였다. 카드뮴을 30분, 1시간, 2시간, 3시간 시간별로 처리하여 NF- κ B의 활성화 시간을 확인한 결과 30분에서 유의적으로 활성화되었다.(Fig. 7) 카드뮴에 유도된 NF- κ B의 활성화가 COX-2의 mRNA 발현과 단백질 발현, PGE₂ 생성을 확인하기 위해 NF- κ B 저해제인 Bay 11 7082(I κ B phosphorylation 저해제)와 MG132(proteasome 저해제)를 30분 전 처리한 후, 카드뮴을 처리하여 COX-2 mRNA level은 3시간, 단백질 발현과 PGE₂ 생성은 24시간 동안 배양한 후 확인하였다. Bay 11 7082를 처리한 군에서 COX-2 mRNA와 단백질 발현(Fig. 8) 및 PGE₂ 생성(Fig. 9)이 유의적으로 감소하였으나, MG132 처리군에서는 증가하였다.

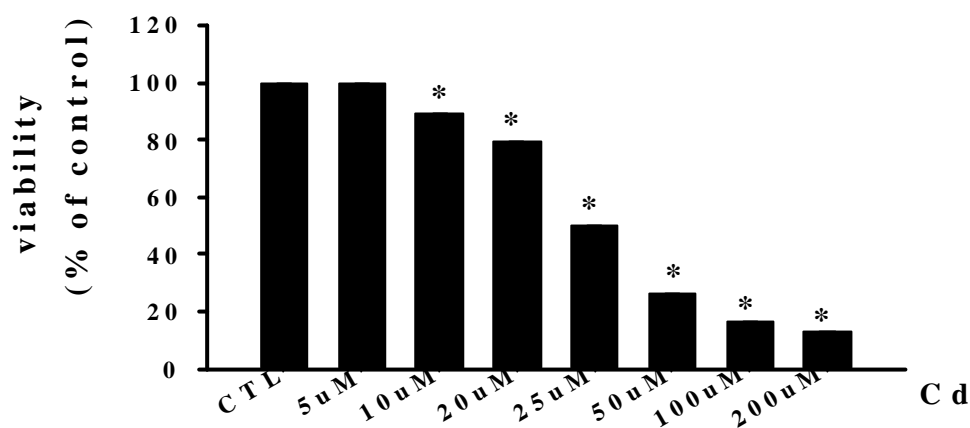


Fig. 1. Effect of cadmium on the viability of bEnd3 cells. bEnd3 cells were incubated at 37°C for 24h with various concentrations of CdCl₂ shown in the figure. Cell viability was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay as described in Materials and Methods. Data represent the mean ± S.E.M of at least three determinations. CTL: serum free medium only. * P (0.01 vs CTL

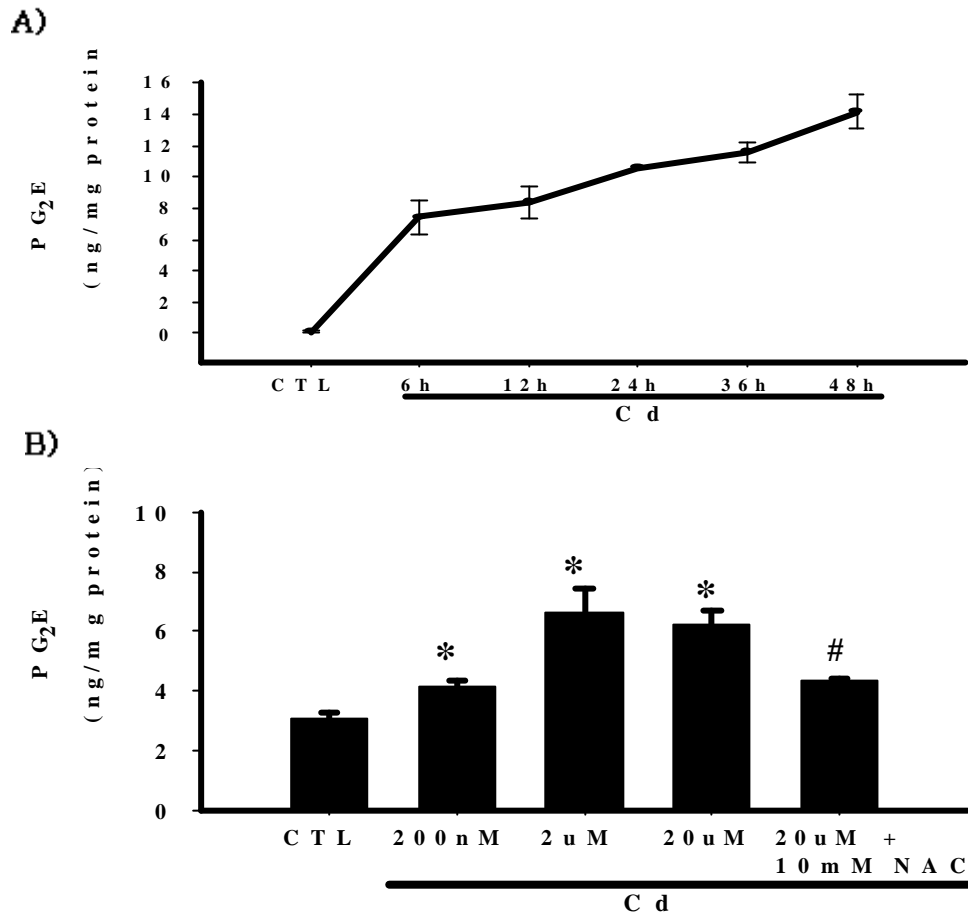
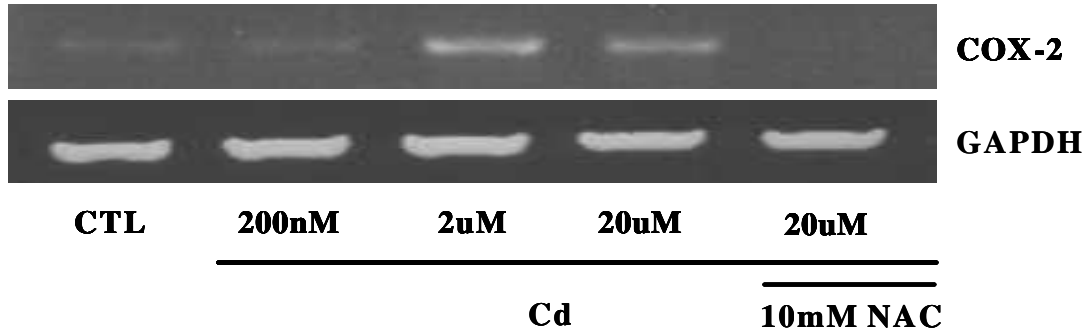


Fig. 2 Effect of cadmium on Prostaglandin E₂ (PGE₂) production in bEnd3 cell. A) bEnd3 cells were incubated with CdCl₂ (2uM) and PGE₂ production was determined at the indicated time. B) bEnd3 cells were incubated CdCl₂ (200nM, 2uM, 20uM) for 24h. NAC (10mM) was added to cultures treated with CdCl₂. The amount of PGE₂ was measured by enzyme immunoassay (EIA) as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean ±S.E.M (n=3). * P (0.01 vs CTL, # P (0.01 vs Cd 20uM.

A) m-RNA



B) Western blot

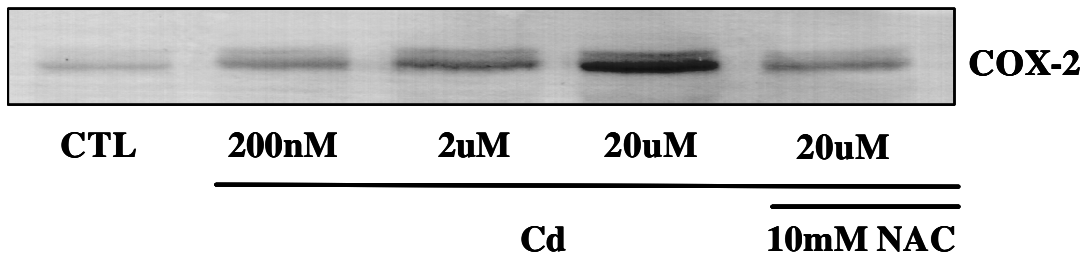


Fig. 3. Effects of cadmium on COX-2 gene expression in bEnd.3 cell.

A) bEnd.3 cells were incubated at 37°C for 3h with the various concentrations of CdCl₂ in the figure. Reverse transcription-PCR detection of COX-2 gene expression as described in Materials and Methods. B) bEnd.3 cells were incubated at 37°C for 24h with varying concentrations of CdCl₂ and levels of COX-2 protein were evaluated with western blot.

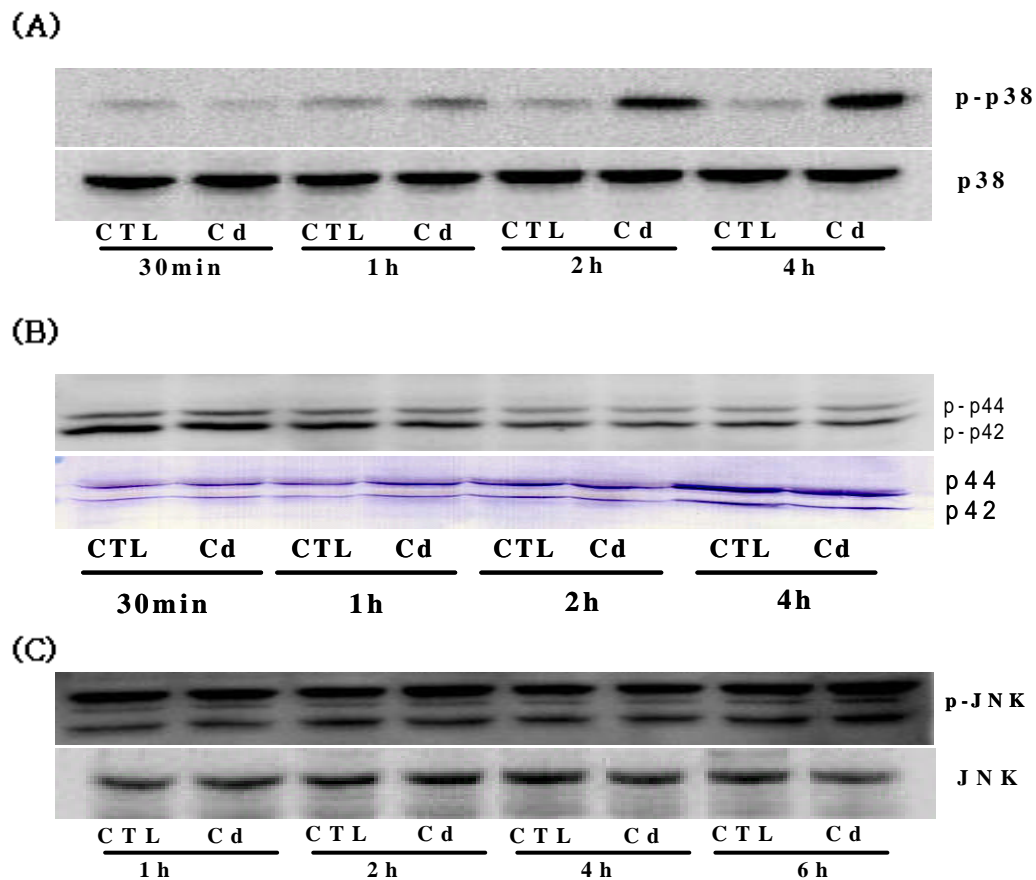


Fig. 4 Effects of cadmium of MAP Kinase activities in bEnd.3 cells.

A,B) bEnd.3 cells were treated with CdCl_2 (2 μM) in serum free media for 30 min, 1h, 2h or 4h. Cell extracts obtained from Cd-treated bEnd.3 cells were examined for amounts of phosphorylated p38 and ERK using phospho-specific p38 and phospho-specific ERK MAP kinase antibody. C) bEnd.3 cells were treated with Cd 20 μM in serum free media for 1h, 2h, 4h or 6h. Cell extracts obtained from Cd-treated bEnd.3 cells were examined for amounts of phosphorylated JNK using phospho-specific JNK MAP kinase antibody.

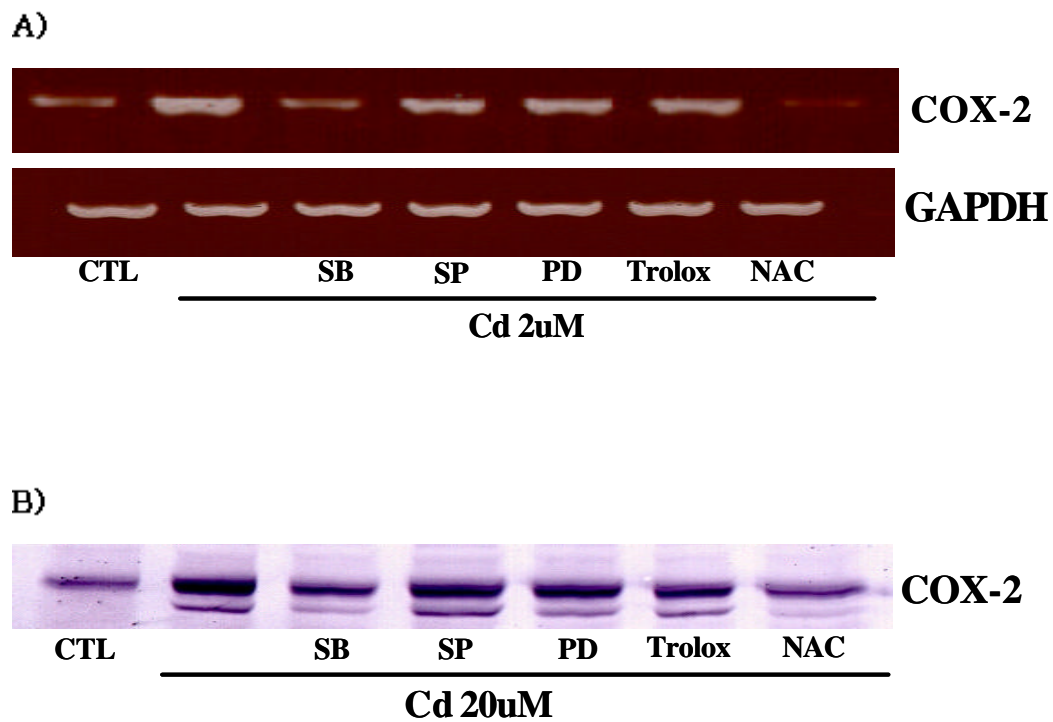


Fig. 5. Effects of MAP Kinase inhibitors on cadmium-induced COX-2 expression. bEnd3 cells were preincubated with SB203580 (20uM), SP600125 (3uM), PD98059 (20uM), Trolox (10uM), NAC (10mM) for 30min before 3h (A) or 24h (B) incubation with CdCl₂ (2uM, A; 20uM, B) and the levels of COX-2 mRNA and protein were determined by RT-PCR and western blotting as described in Materials and Methods.

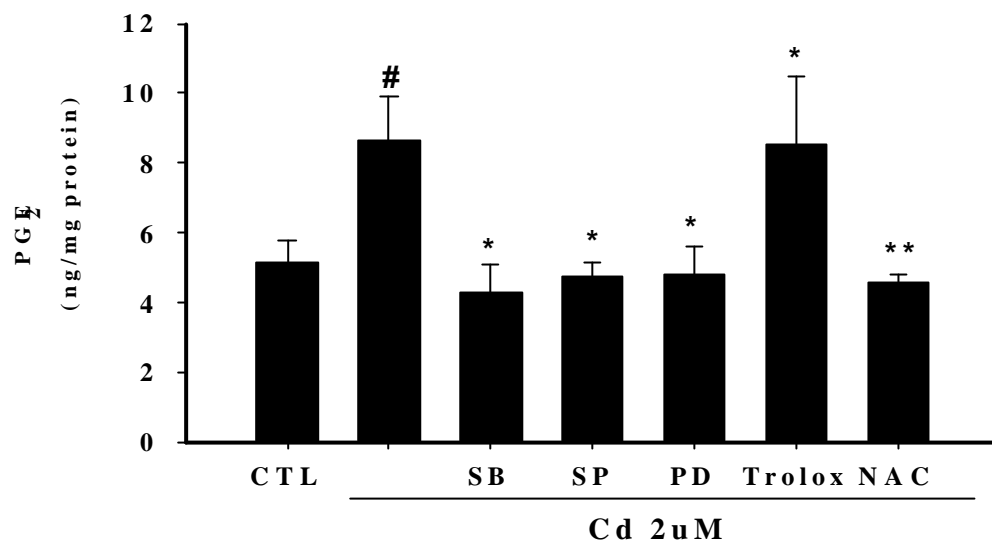


Fig. 6. Effects of MAP Kinase inhibitors on cadmium-induced prostaglandin E₂ production. bEnd.3 cells were preincubated with SB203580 (20 μ M), SP600125 (3 μ M), PD98059 (20 μ M), Trolox (10 μ M) and NAC (10mM) for 30min before CdCl₂ (2 μ M) treatment. Cells were incubated for further 24h and the amount of PGE₂ was measured by enzyme immunoassay (EIA) as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=3 wells per each group). ** P (0.01 vs Cd), * P (0.05 vs Cd), # P (0.05 vs CTL).

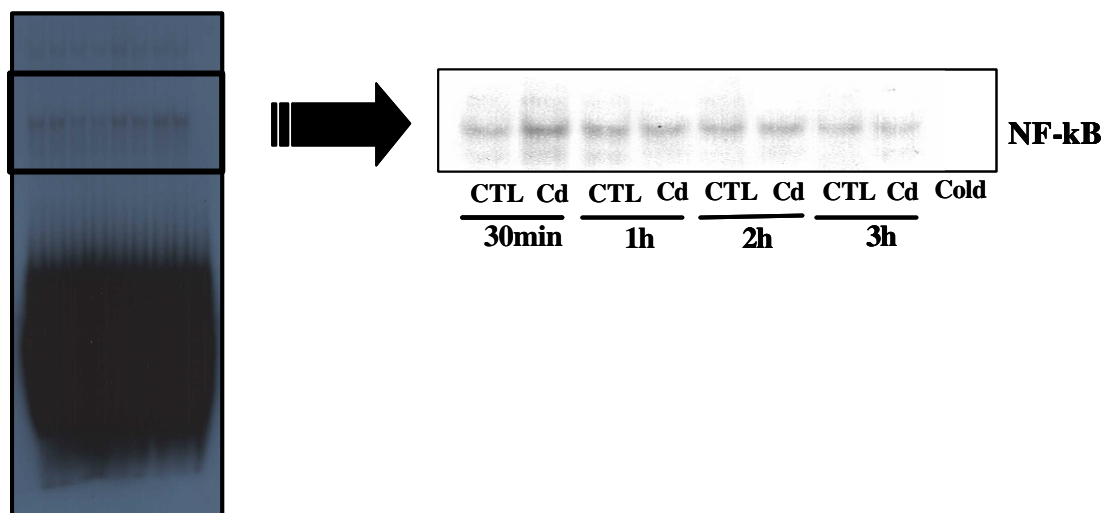


Fig. 7. Effect of cadmium on NF-kB activity. bEnd3 cells were incubated with CdCl₂ (2μM) for 30min, 1h, 2h, or 3h. The activity of NF-kB was determined by EMSA as described in Materials and Methods.

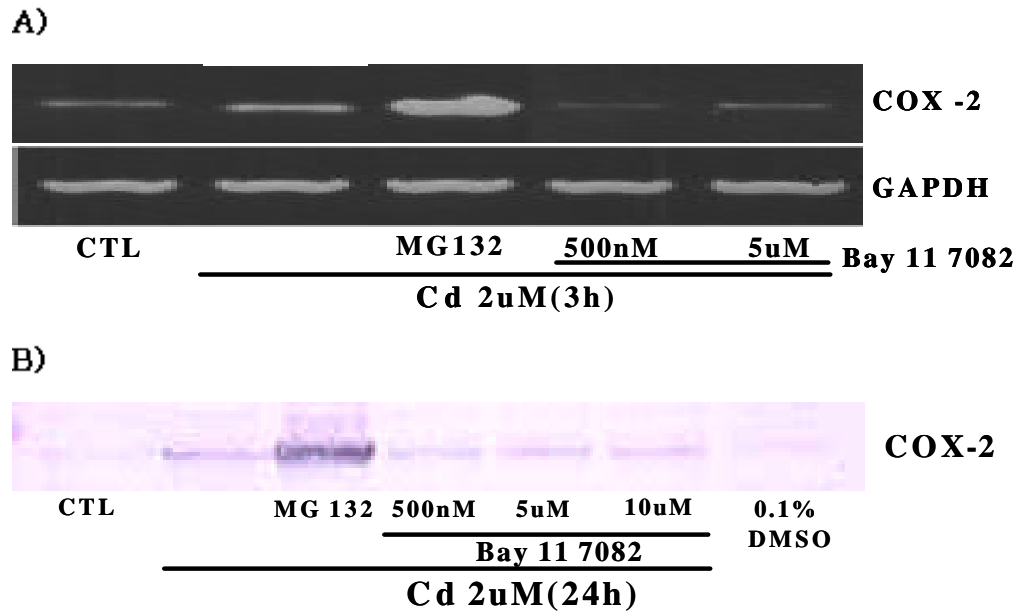


Fig. 8. Effects of NF- κ B inhibitors on cadmium-induced COX-2 expression. bEnd.3 cells were preincubated Bay 11 7082 (500 nM, 5 μ M) or MG132 (10 μ M) for 30min before 3h (A) or 24h (B) incubation with CdCl₂ (2 μ M) and the levels of COX-2 mRNA and protein were determined by RT-PCR and western blotting as described in Materials and Methods.

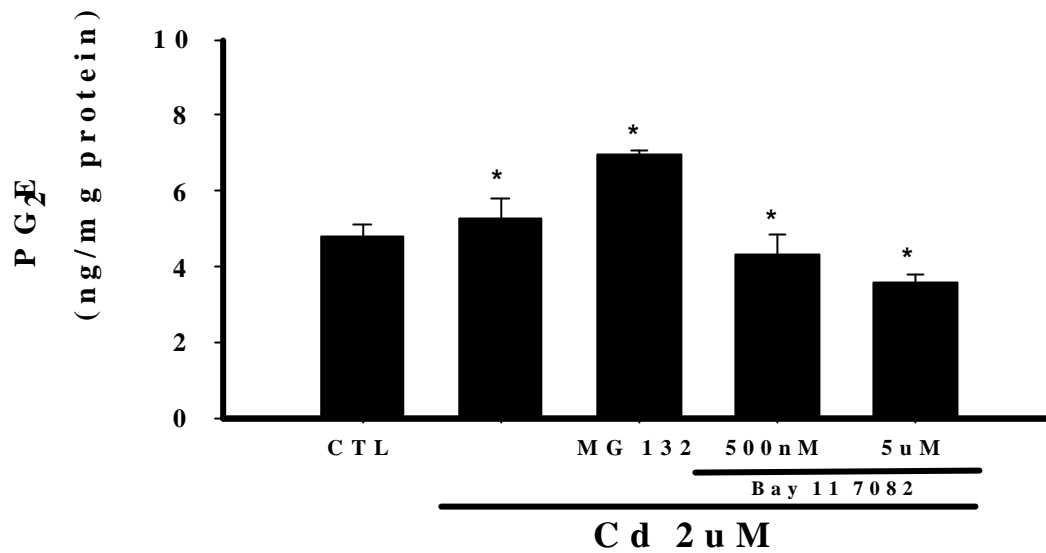


Fig. 9. Effects of NF- κ B inhibitors on cadmium-induced prostaglandin E₂ (PGE₂) production in bEnd3 cell. Cells were incubated with Bay 11 7082 (500 nM, 5 uM) or MG132 (10 uM) in presence of CdCl₂ (2uM) for 24h. The amount of PGE₂ was measured by enzyme immunoassay (EIA) as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean \pm S.E.M (n=4). * P < 0.05 vs Cd

V. 고찰

카드뮴은 산업적 부산물로 환경중에 배출되어 다양한 병리증상을 유발하는 대표적인 환경독성물질이다. 카드뮴 독성에 의한 병리 증상으로는 골연화증과 신장장애가 가장 잘 알려져 있고, 이외에도 폐기종, 심부전증, 고혈압등 여러 생물학적 기능에 영향을 주는 것으로 보고 되어 있다. 카드뮴은 또한 뇌졸중의 유병율을 증가시키는 것으로 보고된 바 있으며, 카드뮴에 의한 뇌신경 세포사멸³과 세포간 tight junction의 붕괴 유발¹ 등이 이를 뒷받침하는 실험적 증거로서 제시된 바 있다. 그러나 뇌졸중 질환에 관련된 카드뮴의 정확한 작용 기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

뇌내 모세혈관의 내피세포(endothelial cell)는 매우 견고한 tight junction으로 연결되어 있으며 이 내피세포 층 아래 위치한 반투막(basement membrane)을 사이에 두고 신경교 세포(glial cell) 또한 혈관벽을 따라서 층을 이루고 있어 물질 투과에 커다란 장벽이 되고 있는데 이러한 기능적 단위를 뇌혈관장벽(blood-brain barrier)이라 한다.^{14,15} 뇌혈관 장벽은 유해한 물질이 뇌세포로 들어가는 것을 막는 피동적 방호층의 역할을 할 뿐만 아니라, 혈구세포의 뇌내 이입을 차단하여 뇌를 소위 immune privileged tissue로 유지하는 데에 매우 중요한 역할을 하고 있다. 따라서 뇌혈관 장벽 기능의 이상은 뇌손상과 직접적으로 관련이 있는 것으로 여겨지고 있으며, 특히 뇌졸중과 같은 뇌손상에 있어서 뇌혈관장벽의 내피세포는 중요한 역할을 하고 있음이 잘 알려져 있다. 뇌혈관장벽 기능은 여러 인자들에 의해 조절되고 있으며 그 중 사이토카인⁴⁴, PGs 등의 염증 반응 인자들의 역할⁴⁵ 등에 대해서는 많은 보고가 되어 있다.^{46,47,48,49}

본 연구에서는 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴이 PGE₂ 생성에 미치는 영향을 검토함으로써 뇌졸중 발현 기전의 일단을 확인코자 하였다. 카드뮴은 뇌혈관 내피세포에서 PGE₂ 생성 및 COX-2 발현을 농도 의존적으로 유도하였으며, 이 작용은 항산화제인 NAC에 의해 감소되었다. 이 결과는 카드뮴에 의한 PGE₂ 생성과 COX-2 발현에 있어 세포내 산화적 스트레스가 관여하고 있음을 시사하고 있으며, 따라서 카드뮴이 ROS를 증가 시켜 세포사와 사이토카인의 변화, 염증반응

을 일으키며,^{31,35} 또한 뇌혈관 세포에서의 산화적 스트레스의 증가는 COX-2 발현과 PGE₂ 생성을 유도³⁶한다는 이전의 연구결과와 일치하고 있다. 본 연구 결과 최대 COX-2 발현을 유도하는 카드뮴의 농도는 mRNA 및 단백질의 경우가 각각 상이하였는데, COX-2 mRNA는 카드뮴 2 μ M에서, 단백질량은 카드뮴 20 μ M에서 가장 많이 발현되었다. 카드뮴은 ubiquitin proteasome 경로에서 ubiquitin-conjugating 효소를 불활성화 시켜 단백질 ubiquitination을 저해함으로써 단백질 분해를 저해시킨다는 보고⁵⁰와, ubiquitin proteasome 경로를 억제함으로써 COX-2 발현을 증가시킬 수 있다는 이전의 보고⁹로 미루어, 고농도 카드뮴에서의 단백질 발현 증가는 ubiquitin proteasome 경로와 상관성이 있을 것으로 추정된다.

COX-2 발현 증가는 뇌손상 반응과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있는데 Alzheimer병⁴⁰, 파킨슨병³⁹과 같은 퇴행성 뇌신경질환과 뇌졸중⁴²에서 COX-2의 발현이 증가되어 있으며 COX-2 저해제에 의해 뇌졸중에 의한 신경세포 사멸이 억제되는 것으로 보고된 바 있다. 카드뮴에 의해 유도되는 신경세포사멸 역시 COX-2 발현과 관련이 있으며, COX-2 저해제는 카드뮴 유도 신경세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다.⁹ 전술한 바와 같이 카드뮴은 세포내 산화적 스트레스를 증가시켜 COX-2와 iNOS의 발현을 증가시킴으로써 세포사를 유도하는 것으로 보고된 바 있다.³⁵ 세포내 산화적 스트레스의 증가는 MAPkinase 및 NF- κ B 등 세포내 신호 전달계의 변화를 일으키며 이를 통해 다양한 세포 기능 변화가 유도된다. 일례로, 카드뮴은 신장 근위세뇨관 세포에서 산화적 스트레스 증가를 일으켜 NF- κ B를 경유한 세포사를 일으키고,³⁴ U937 세포에서는 ERK 저해제가 카드뮴에 의한 세포 사멸에 영향을 미치지 못하는 반면 p38저해제는 특이적으로 강력하게 세포 사멸을 저해하였고³², LLC-PK cell에서는 카드뮴에 의해 JNK가 특이적으로 활성화되며,³³ 뇌 암세포에서는 카드뮴이 p38를 경유하여 세포사를 조절하는 것으로 보고된 바 있다.²⁸ 또한 HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial Cell)에서는 Phospho-ERK를 매개로 하여 COX-2가 발현되며³⁷ U937 세포에서도 MAPK를 매개로 하여 COX-2가 발현되는 것으로 알려져 있다.⁴¹ 이러한 선행 연구결과들을 근거로 본 연구에서도 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴에

의해 유발되는 COX-2 발현과 PGE₂ 생성에 있어서 MAP Kinase의 관여가능성을 검토하였다. 카드뮴은 p38의 인산화를 시간 의존적으로 증가시켰으나, ERK 및 JNK에는 별다른 영향을 주지 못하였다. 이들 MAP Kinase 활성 변화와 COX-2 발현 및 PGE₂ 생성과의 상관성을 알아보기 위하여 각각의 특이적 저해제를 처리해 본 결과 p38 저해제인 SB203580에 의해서만 COX-2 발현과 PGE₂ 생성이 유의적으로 감소하였다. 이는 카드뮴에 의해 p38 MAP Kinase가 활성화되고 이를 통해 PGE₂ 생성과 COX-2의 발현이 조절되고 있음을 시사하고 있다. 또한, 카드뮴 2 μ M을 처리 한 후 시간별로 전사인자인 nuclear factor kappa-B (NF- κ B)의 DNA 결합 활성도를 확인 한 결과 30분에 결합 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 카드뮴에 의한 COX-2의 발현과 PGE₂ 생성에 있어서 NF- κ B가 관여하는지에 대해 알아보고자 NF- κ B 저해제들 중에서 I κ B 분해를 억제하는 작용을 갖고 있는 MG132와 NF- κ B의 인산화를 억제하는 Bay 11 7082를 처리한 후 COX-2 mRNA와 단백질 발현, PGE₂ 생성에 대한 변화를 확인해 본 결과 Bay 11 7082에 의해서는 COX-2 발현, PGE₂ 생성이 모두 감소되었으나, MG132에 의해서는 오히려 증폭되었다. 이는 MG132가 NF- κ B proteasome 저해제임을 고려하면, ubiquitination-proteasome 경로의 차단에 의해 COX-2가 유도되며 따라서 PGE₂ 생성이 증가된다는 이전의 보고⁹가 있고 articular chondrocyte, human hepatic stellate, tracheal smooth muscle 등과 같이 세포 종류에 따라서 MG132에 의한 COX-2 발현이 증가한다는 보고^{51,52,53}가 있다. 또 MG132가 proteasome 저해제임에도 불구하고, HSP70(heat shock protein)을 발현⁵⁶시키고, HSP70이 COX-2 발현을 증가시킨다는 보고⁵⁴를 미루어 MG132의 약물 특성에 기인하여 NF- κ B 저해작용과는 관련이 없을 것으로 추론할 수 있다. 결과적으로 카드뮴은 세포내 산화적 스트레스 증가를 통해 p38 MAPK 및 NF- κ B 경로를 활성화함으로써 염증 인자 생성을 증가시키는 것으로 추론할 수 있고, 두 경로의 상관 관계가 있음을 확실히 규명해야 하는 것이 앞으로의 과제라 할 수 있다.

환경 독성 물질인 카드뮴이 뇌졸중 유병율의 증가와 관련이 있으리라는 역학 보고에도 불구하고, 뇌졸중에 관련된 카드뮴의 정확한 작용 기전에 대해서는

아직 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 본 연구 결과는 카드뮴이 뇌혈관세포에서 COX-2 발현과 PGs를 생성을 증가시킴으로써 뇌혈관 염증반응을 일으키고 이를 통해 뇌혈관장벽 기능 손상을 유발할 가능성을 제시하고 있으며, 따라서 카드뮴에 의해 유발되는 뇌질환의 유발 기전, 치료법 연구에 있어서 새로운 방향성을 시사해 주고 있다.

Ⅷ. 결 론

뇌혈관 내피세포에서 카드뮴에 의한 PGs 생성과 COX-2 발현 및 그 세포내 신호 전달에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 카드뮴은 뇌혈관 내피세포에서 농도 의존적으로 세포 사멸을 일으키고, 저농도에서는 세포사멸을 일으키지는 않으나, 염증반응에는 관여하는 것을 알 수 있었다.

2. 카드뮴에 의한 염증 반응으로 COX-2 유전자와 단백질 발현 PGE₂가 생성되었고, 이는 항산화제인 NAC (10mM)에 의해 감소하였다.

3. 카드뮴 처리 후 ERK, p38, JNK의 변화를 관찰한 결과 p38이 시간 의존적으로 활성화 되었고, 각각의 저해제 처리 후, MAP Kinase와 PGE₂ 생성과의 의존성을 관찰한 결과, p38이 COX-2 발현과 PGE₂ 생성을 매개하는 것을 알 수 있었다.

4. 카드뮴 처리 후 NF- κ B는 30분에 활성화 되었고, NF- κ B 저해제인 Bay 11 7082 처리에 의해 COX-2 발현과 PGE₂ 생성이 감소하였다.

따라서 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴에 의해 유도되는 COX-2 발현과 PGE₂ 생성은 세포내 산화적 스트레스의 증가, p38 MAP Kinase 및 NF- κ B의 활성화를 매개로 일어남을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

1. L. B. Zimmerhackl, F. Mornn, G. Wiegele, and M. Brandis: Cadmium is more toxic to LLC-PK1 cells than to MDCK cells acting on the cadherine-catenin complex, *Am J Physiology* 275(1 Pt 2):F143-54, 1998
2. Renata Swiergosz-kowalewska: Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents, *Microsc Res Tech* 55(3): 208-222, 2001
3. Elliott P, Arnold R, Cockings S, Eaton N, Jarup L, Jones J, Quinn M, Rosato M, Thornton I, Toledano M, Tristan E, Wakefield J: Risk of mortality, cancer incidence, and stroke in a population potentially exposed to cadmium, *Occup Environ Med*, 57(2):94-7, 2000
4. Cohen, R. A: Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus, *Circulation* 87:67-76, 1993
5. Marika Berglund, Agneta Akesson, Per Bjellerup, Marie Vahter: Metal - bone interactions, *Toxicol Lett* 15:112-113:219-25 2000
6. Michael P. Waalkes: Cadmium carcinogenesis in review, *J Inorg Biochem* 79(1-4):241-4, 2000

7. A.E. Panayi, N.M. Spyrou, B.S. Iversen, M.A. White, P. Part: Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Neurol Sci* 195(1):1-10, 2002
8. M.M. Brzoska, J. Moniuszko-Jakoniuk: Interaction between cadmium and zinc in the organism, *Food Chem Toxicol* 39(10):967-80, 2001
9. Maria E. Figueiredo-Pereira, Zongmin Li, Marlon Jansen, and Patricia Rockwel P: N-Acetylcysteine and celecoxib lessen cadmium cytotoxicity which is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation in mouse neuron cells, *J Biol chem* 277(28):25283-9, 2002
10. Chen N, Warner JL, Reiss CS: NSAID treatment suppresses VSV propagation in mouse CNS, *Virology*, 10:276(1):44-51, 2000
11. Anna Romare, C. E. Lundholm: Cadmium-induced calcium release and prostaglandin E₂ production in neonatal mouse calvaria are dependent on cox-2 induction and protein kinase C activation, *Arch Toxicol* 73(4-5): 223-8, 1999
12. Won SJ, Kim DY and Gawlk BJ: Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death, *J. Biochem. & Mol. Biol* 35:67-86, 2002

13. Kim EY, Koh JY, Kim YH, Sohn S, Joe E and Gwak BJ: Zn²⁺ entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures, *Eur. J. Neurosci* 11:327-334, 1999
14. Wolburg H, Neuhaus J, Kriesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W: Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes, *J Cell Sci* 107(Pt 5):1347-57, 1994
15. Zinke H, Mockel B, Frey A, Weiler-Guttler H, Meckelein B, Gassen HG: Blood-brain barrier: a molecular approach to its structural and functional characterization, *Prog Brain Res* 91:103-16, 1992
16. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS: Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease, *J Interferon Cytokine Res* 19(2):91-104, 1999
17. Mantovani A, Bussolino F, Introna M: Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside, *Immunol Today* 18(5):231-40, 1997
18. Maria E, Figueiredo-Pereira, Svetlana Yakushin, and Gerald Cohen:

Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells, *J Biol Chem*, 22:273(21):12703-9, 2002

19. Cohen, M., Lotta, D., Coogan, T and Costa M: Mechanism of metal carcinogenesis: the reactions of metals with nucleic acids. In biological effect of heavy metals (E.C.Foulkes, ed.), CRC, Boca Raton 19-75, 1991
20. Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C: Pathways of cadmium influx in mammalian neurons, *J Neurochem* 72(5):2154-61, 1999
21. Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA: Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium, *Crit Rev Toxicol* 22(3-4):175-201, 1992
22. Sirover MA, Loeb LA: Metal-induced infidelity during DNA synthesis, *Proc Natl Acad Sci USA* 73(7):2331-5, 1976
23. Hung JJ, Cheng TJ, Lai YK, Chang MD: Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinases confers cadmium-induced HSP70 expression in 9L rat brain tumor cells, *J Biol Chem* 273(48):31924-31, 1998

24. Davis RJ: Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103(2):239-52, 2000
25. Barr RK, Bogoyevitch MA: The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol* 33(11):1047-63, 2001
26. Adler V, Polotskaya A, Wagner F, Kraft AS: Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serin/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* 267:17001-5, 1992
27. Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR: phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinase. *Nature* 353(6345):670-4, 1991
28. Ip YT, Davis RJ: Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)-from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10(2):205-19, 1998
29. Kujubu DA, Flecher BS, Vrnnum BC, Lim RW, Herschman HR, TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol*

chem 266(20):12866-72, 1991

30. Eberhart C.E, Coffey R.J, Radhika A, Giardiello F.M, Ferrenbach S and Dubois R.N: UP-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4):1183-8, 1994
31. Gennari A, Cortese E, Boveri M, Casado J, Prieto P: Sensitive endpoints for evaluating cadmium-induced acute toxicity in LLC-PK1 cells. *Toxicology* 183(1-3):211-20, 2003
32. Galan A, Garcia-Bermejo ML, Troyano A, Vilaboa NE, de Blas E, Kazanietz MG, Aller P: Stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is an early regulatory event for the cadmium-induced apoptosis in human promonocytic cells. *J Biol Chem*, 275(15):11418-24, 2000
33. Matsuoka M, Igisu H: Activation of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK/SAPK) in LLC-PK1 cells by cadmium. *Biochem Biophys Res Commun*, 251(2):527-32, 1998
34. Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser IA: Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium and reactive oxygen

- species-induced apoptosis, *J Biol Chem* 275(3):1887-96, 2000
35. Ramirez DC, Gimenez MS: Induction of redox change, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages *Toxicol Lett* 145(2):121-32, 2003
36. Fang X, Moore AS, Nwankwo JO, Weintraub LN, Oberley WL, Snyder DG, Spector AA: Induction of cyclooxygenase-2 by overexpression of the human catalase gene in cerebral microvascular endothelial cells, *J Neurochem* 75(2):614-23, 2000
37. Gillian E, Cleland LG, Gamble JR, James MJ: Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets, *J Biol Chem* 276(41):37839-45, 2001
38. Singer CA, Baker KJ, McCaffrey A, AuCoin DP, Dechert MA, Gerthoffer WT: p38 MAPK and NF-kappaB mediate COX-2 expression human airway myocytes, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(5):L1087-98, 2003
39. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S: Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration *Proc Natl Acad Sci USA*

29:100(9):5473-8, 2003

40. Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Vannucchi MG, Rosi S, Pepeu G, Casamenti F: β -Amyloid-induced inflammation and cholinergic hypofunction in the Rat Brain in Vivo: Involvement of the p38 MAPK pathway. *Neurobiol Dis* 11(2):257-74, 2002
41. Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA: Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/ mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 274(11):7545-56, 1999
42. Iadecola C: Cyclooxygenase-2 and stroke: the long and short of it. *Ann Neurol* 54(2):141-2, 2003
43. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D: Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 5:192(2-3):95-117, 2003
44. Banks WA: Anorectic effects of circulating cytokines: role of the vascular blood-brain barrier. *Nutrition* 17(5):434-7, 2001
45. Pearse DD, Pereira FC, Chatzipanteli K, Dietrich WD, Bunge MB: The

- use of antisense-mediated inhibition to delineate the role of inflammatory agents in the pathophysiology of spinal cord injury, *Scientific World Journal* 2(1 Suppl 2):133-5, 2002
46. Zameer A, Hoffman SA: Increased ICAM-1 and VCAM-1 expression in the brains of autoimmune mice, *J Neuroimmunol* 142(1-2):67-74, 2003
47. Mark KS, Trickler WJ, Miller DW: Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells, *J Pharmacol Exp Ther* 297(3):1051-8, 2001
48. Ek M, Engblom D, Saha S, Blomqvist A, Jakobsson PJ, Ericsson-Dahlstrand A: Inflammatory response: pathway across the blood-brain barrier, *Nature* 22410(6827):430-1, 2001
49. Boje KM, Jaworowicz D Jr, Raybon JJ: Neuroinflammatory role of prostaglandins during experimental meningitis: evidence suggestive of an in vivo relationship between nitric oxide and prostaglandins, *J Pharmacol Exp Ther* 304(1):319-25, 2003
50. Jungmann J, Reins HA, Schobert C, Jentsch S: Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis, *Nature* 28:361(6410):369-71, 1999

51. Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A, Lotersztajn S: Role of NF- κ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor- α in human hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 4:273(36):23183-90, 1998
52. Laporte JD, Moore PE, Lahiri T, Schwartzman IN, Panettieri RA Jr, Shore SA: p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(5):L932-41 2000
53. Kim SJ, Im DS, Kim SH, Ryu JH, Hwang SG, Seong JK, Chun CH, Chun JS: Beta-catenin regulates expression of cyclooxygenase-2 in articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 9:296(1):221-6, 2002
54. Zhang F, Hackett NR, Lam G, Cheng J, Pergolizzi R, Luo L, Shmelkov SV, Edelberg J, Crystal RG, Rafii S: Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood* 15:102(6):2115-21, 2003
55. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK: Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* 4:272(14):9086-92, 1997

-ABSTRACT-

Cadmium increases prostaglandin E₂ release through induction of cyclooxygenase-2 in brain microvascular endothelial cell

Dong Hyun Park

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Soo Hwan Lee)

Purpose: Cadmium(CdCl₂) is an industrial and environmental pollutant that affects adversely a number of organs in humans and other mammals, such as brain, kidney, liver and lung. Exposure to cadmium is reported to be related with the increased incidence of neurodegenerative disorders including stroke, though underlying mechanism is not clearly understood. It is well known that inflammatory processes are critically involved in neurodegenerative diseases. Indeed, Cd-induced cytotoxicity is reported to be associated with up-regulation of prostaglandin production in neuronal cells. In this study, we investigated the effect of cadmium on prostaglandin production and explored the possible mechanism of action in mouse brain microvascular endothelial cells.

Result: Cadmium(CdCl₂) dose-dependently induced cytotoxicity and the LC₅₀ was estimated at 30uM in bEnd3 brain endothelial cells. Cadmium stimulated

PGE₂ release in a time and dose dependent manner and this was supported by increase in the expression of cyclooxygenase-2 at the levels of mRNA and protein. The thiol-reducing antioxidant NAC significantly attenuated the loss of cell viability, PGE₂ production and COX-2 expression induced by cadmium indicating oxidative components might contribute to these events. Phosphorylation of p38 MAPK was significantly increased in endothelial cells treated with CdCl₂. And also DNA binding activity of NF-κB was increased by Cd-treatment. Cd-induced PGE₂ production and COX-2 expression were significantly attenuated by SB 203580, a specific inhibitor of p38 MAPK or Bay 11 7082, a specific inhibitor of NF-κB.

Conclusion: These results suggest that CdCl₂ might elicit brain inflammation through induction of PGE₂ production, in which the activations of MAPK pathway and NF-κB are involved, in brain microvascular endothelial cell.

Key words : Brain endothelial cell, Cadmium, Cyclooxygenase-2 (COX-2), Prostaglandin E₂ (PGE₂), N-Acetyl-L-cystein (NAC)