

## 카드뮴이 뇌혈관 내피세포에서의 PGE<sub>2</sub> 및 COX-2 발현에 미치는 영향

박동현, 김영채, 문창규<sup>1</sup>, 정이숙, 백은주, 문창현, 이수환\*

아주대학교 의과대학, <sup>1</sup>서울대학교 약학대학

### Cadmium-induced COX-2 Expression in Cerebrovascular Endothelial Cells

Dong Hyun Park, Young-Chae Kim, <sup>1</sup>Chang-Kiu Moon, Yi-Sook Jung,  
Eun Joo Baik, Chang Hyun Moon and Soo Hwan Lee\*

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

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### ABSTRACT

In order to get insight into the mechanism of cadmium (Cd)-induced brain injury, we investigated the effects of Cd on the induction of COX-2 in bEnd.3 mouse brain endothelial cells. Cd induced COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> release, which were attenuated by thiol-reducing antioxidant N-acetylcysteine (NAC) indicating oxidative components might contribute to these events. Indeed, Cd increased cellular reactive oxygen species (ROS) level and DNA binding activity of nuclear factor-κB (NF-κB), an oxidative stress sensitive transcription factor. Cd-induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression were significantly attenuated by Bay 11 7082, a specific inhibitor of NF-κB and by SB203580, a specific inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase (MAPK). These data suggest that Cd induces COX-2 expression through activation of NF-κB and p38 MAPK, the oxidative stress-sensitive signaling molecules, in brain endothelial cells.

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

#### 서 론

카드뮴은 산업적 부산물로 환경중에 배출되어 다양한 병리증상을 유발하는 대표적인 환경독성물질이다. 카드뮴은 골연화증과 신장장애 등의 대표적인 증상이외에도 퇴행성뇌질환(Okuda *et al.*, 1997; Elliott *et al.*, 2000), 신경성 기능실조(Hart *et al.*,

1989) 및 행동장애(Andersson *et al.*, 1997) 등 과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다. 카드뮴은 또한 뇌신경세포와 뇌아교세포의 사멸을 유도하며(Figueiredo-Pereira *et al.*, 2002) 뇌혈관장벽(Blood-brain barrier, BBB)의 투과성을 증가시킴으로써 중추신경계 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다(Shukla *et al.*, 1996). BBB의 손상은 뇌염증 반응과 밀접하게 연관되어 있으며 중추신경계의 염증반응 진행과정중 생성되는 PGE<sub>2</sub> 또는 PGF<sub>2α</sub>와 같은 프로스타글란딘류는 BBB 기능 부전을 일으키는 원인 중의 하나로 알려져 있다. 최근 카드뮴

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

은 여러 세포에서 Cyclooxygenase-2 (COX-2)와 프로스타글란딘 생성을 증가시키며, 지질과산화물 유도하는 것으로 보고된 바 있다 (Romare and Lundholm, 1999; Ramirez and Gimenez, 2003).

COX-2는 프로스타글란딘 합성속도를 규율하는 주요 효소로서 뇌질환의 진행과정에 있어 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다 (Iadecola and Alexander, 2001; Wyss-Coray and Mucke, 2003). COX-2는 뇌신경세포, 뇌아교세포, 뇌혈관세포 등의 뇌세포에서 다양한 자극에 의해 유도되는데 (Minghetti, 2004), 뇌혈허 또는 신경 흥분 독성 및 염증과 관련된 세포독성 발현 등에 있어 COX-2를 억제하거나 COX-2를 유전적으로 제거하는 경우 손상 정도가 크게 악화되는 것으로 알려져 있다 (Nogawa *et al.*, 1997; Iadecola *et al.*, 2001). 즉, COX-2의 발현은 뇌손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다.

전술한 바와 같이 카드뮴은 뇌졸중 등의 뇌질환의 발병과 연관이 있는 것으로 추정되고 있으나 뇌졸중을 일으키는 작용기전 등 그 원인 상관관계에 대해서는 아직 확실한 증거가 제시되고 있지 않다 (Elliott *et al.*, 2000). 뇌혈관 질환에 있어서 COX-2와 PG 등의 염증인자들의 역할은 매우 잘 알려져 있으며 또한 카드뮴이 다양한 세포에서 염증인자인 COX-2 발현을 유도하는 것으로 보고된 바 있다. 그러나 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴이 염증인자에 미치는 영향에 대해서는 아직 많은 연구가 이루어져 있지 않은 실정이다. 본 연구실에서는 최근 카드뮴이 뇌혈관세포에서의 COX-2 발현을 유도하며 이는 세포부착분자 발현과 밀접한 상관성이 있음을 보고한 바 있다 (Seok *et al.*, 2006). 본 연구에서는 카드뮴에 의한 COX-2 발현 유도과 관련된 세포내 작용기전을 산화적 스트레스에 의해 조절되는 신호전달계를 중심으로 검토함으로써 카드뮴에 의해 유도되는 뇌졸중 등의 뇌혈관 질환에 있어 그 원인 상관관계를 규명하기 위한 기초지견을 얻고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 처리

생쥐 뇌혈관세포주인 bEnd.3 (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<sub>2</sub>/95% air, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다. 세포는 70~80%의 confluent가 되도록 배양한 뒤 실험에 이용하였으며 카드뮴 (CdCl<sub>2</sub>)을 농도 별로 가하여 세포 생존율, COX-2 발현, 프로스타글란딘 생성 등에 미치는 영향을 검토하였다. 이 때 시간별 반응을 같이 살펴봄으로써, 전반적인 카드뮴에 대한 영향을 비교, 검토하여 실험 조건을 확립하였다.

### 2. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium) assay로 측정하였다. 배지에 MTT (5 mg/mL) 용액을 최종 농도가 0.5 mg/mL이 되도록 가하고, 2시간 동안 배양한 후, solubilization buffer (0.5N HCl 10 mL, acetic acid 6 mL, 증류수 84 mL, dimethylformamide 100 mL, SDS 40 g pH 4.7)를 100 µL씩 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에 8시간 이상 반응시킨 후, 595 nm에서의 흡광도를 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다.

### 3. Reactive oxygen species (ROS) 정량

세포 내의 활성 산소 측정은 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 활성 산소에 의해 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)을 형성하는 반응을 이용하였으며 이 때 형광 흡광도를 fluorescence plate reader (Luminescence spectrometer-55, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)로 측정하였다. 본 실험에서는 HUVEC 세포에 20 µM의 DCFH-DA와 비 이온성 세제인 20% Pluronic F-127을 같이 첨가하여 세포 내에 DCFH가 충분히 들어가도록 30분간 유지시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 새로운 배지로 갈아준 후에 카드뮴을 처리 후 시간별로 1% triton X-100을 처리하여 세포를 용해시켰다. 용해 물을 원심 분리를 하여 얻은 상층을 검체로 하여 excitation 450 nm, emission 530 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

#### 4. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)정량

일정 시간 동안 배양한 후 배지를 취하여 생성된 PGE<sub>2</sub>의 양은 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)의 Enzyme-linked immunoassay (EIA) kit를 이용하여 정량하였으며, assay 방법은 제조사에서 제공한 protocol에 따랐다.

#### 5. Western blotting

bEnd.3 세포를 6 well tissue culture plate에 90% confluent하도록 배양한 다음 24시간 동안 serum starvation을 행한 뒤, 카드뮴 또는 약물들을 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양 조건하에서 24시간 동안 배양한 후 cell lysate을 얻었다. 10% SDS-PAGE를 행한 뒤, PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 전기적으로 단백질을 이동시키고, COX-2 항체 (1 : 600; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 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 COX-2 단백질을 발색시키고, LAS (Fuji, Japan)를 이용하여 이미지를 관찰하였다.

#### 6. Total RNA분리 및 RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)

Total RNA는 easy BLUE<sup>®</sup> (Intron, Seoul Korea) RNA isolation kit을 사용하여 분리하였으며 분리된 RNA pellet을 DEPC water에 녹인 후 분광광도계 (Amersham, Piscataway, NJ, USA)를 이용하여 260 nm에서 total RNA 양을 측정하였고, 280 nm에서 측정된 값을 비교하여 순도를 측정하였다. AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 합성된 cDNA를 template로 하여 COX-2 primer (sense: 5'-ACTCACTCAGTTTGTGAGTCATTC-3'; antisense: 5'-TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3') 및 GAPDH primer (sense: 5'-GTGAA-GGTCGGTGTGAACGGATTT-3'; antisense: 5'-CACAGTCTTCTGAGTGGCAGAGAT-3')를 이용하여 다음과 같은 조건하에서 PCR을 행하였다.

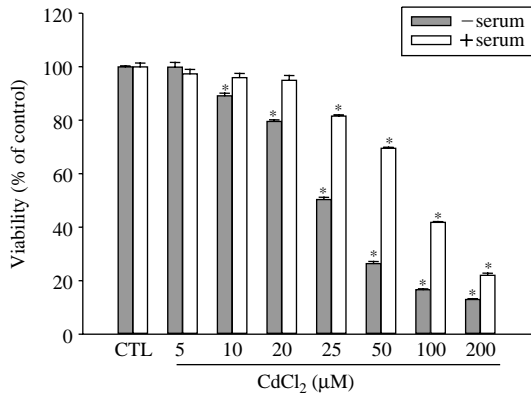
COX-2: 94°C 1분, 60°C 30초, 72°C 1분, 28cycle; GAPDH: 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분 30초, 25cycle. PCR 반응산물들은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 상대적 발현량을 비교하였다.

#### 7. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

NF-κB binding을 위해 사용된 oligonucleotide probe는 NF-1: 5'-AGCTTGGGGACTTTCC-3'; NF-2: 5'-GGAAAGTCCCCAAGCT-3'이었으며 이 두 개의 oligonucleotide를 1 : 1로 annealing 한 후, [<sup>α</sup>-<sup>32</sup>P] dCTP (3,000 Ci/mol, 25 μCi/25 μL), dNTPs, Klenow buffer 등과 혼합하여 표지했다. 표지된 probe는 Quick Spin<sup>®</sup> Column (Boehringer Mannheim, G-25 Sephadex Column, Bedford, MA, USA)으로 정제하였다. 세포를 cold PBS로 2회 세척한 후 Buffer A (10 mM Hepes-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 PMSF, 10 μM Leupeptin)에 재현탁하고 15분 동안 유지 후 NP-40 Lysis buffer (10% NP-40, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 μL protein inhibitor cocktail)를 25 μL 첨가해 4°C, 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 핵 (nuclei) pellet을 얻었다. 핵 pellet에 Buffer C (20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 10% glycerol, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 μM Leupeptin)를 가하고 40분 동안 방치한 후 14,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하였다. 얻어진 nuclear extracts의 단백질량은 BCA protein assay kit을 이용하여 정량하고 NF-κB 와 probe를 결합시켰다. 8% acrylamide native gel을 90분간 pre-run을 한 뒤, NF-κB와 probe의 반응액을 전기 영동하였으며 얻어진 gel은 80°C에서 2시간 동안 건조시키고 -70°C에서 하루 동안 flim (X-OMAT<sup>®</sup>, Kodak, Rochester, NY, USA)을 노출시킨 뒤 현상하였다.

#### 8. 통계분석

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



**Fig. 1.** Effect of cadmium on the viability of bEnd.3 cells. Cells were incubated in serum free (-serum) or serum contained media (+serum) with varying concentration of CdCl<sub>2</sub> for 24 hours. Cell viability was assessed by MTT assay as described in the text. Data represent the mean  $\pm$  SE of at least triplicate determinations. CTL: medium only. \* $p < 0.01$  vs CTL

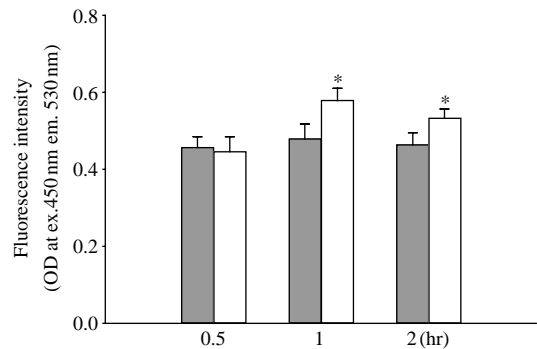
## 결 과

### 1. 카드뮴이 뇌혈관내피세포 생존율에 미치는 영향

배양한 bEnd.3 cell을 80~90% 정도 confluent 할 때까지 배양한 후 24시간 동안 무혈청배지에서 유지한 뒤 새로운 배지로 교환하고 카드뮴을 농도별로 24시간 처리한 다음 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 측정된 결과, 카드뮴 5  $\mu$ M 처리시 99%, 20  $\mu$ M 처리군에서는 79.6%, 25  $\mu$ M 처리군에서는 50.4%로 대조군에 비하여 생존율이 감소하였다 (Fig. 1). 그러나 2% 혈청이 함유된 배지에서는 동일한 농도에서의 생존율은 각각 97.4, 95, 81.6%로 카드뮴에 의한 세포 독성이 현저히 감소하였다. 이 결과를 바탕으로 이후의 실험은 2% 혈청이 함유된 배지에서 20  $\mu$ M의 카드뮴을 처리하는 조건하에서 행하였다.

### 2. 카드뮴이 세포내 ROS 생성에 미치는 영향

DCF-DA 형광 측정법을 이용하여 세포내 ROS 양을 측정된 결과, 카드뮴 처리 후 1시간에 최대값을 보이고 이후 감소하는 양상을 보였으며 2시간

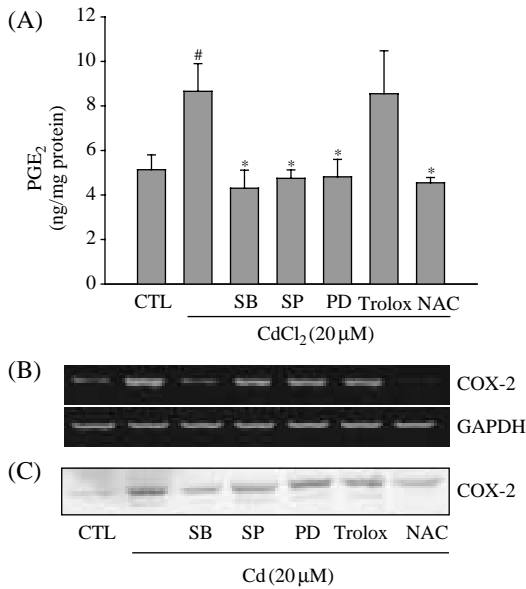


**Fig. 2.** Cadmium increases cellular ROS level in bEnd.3 cells. Fluorescence intensity of converted DCF was measured at excitation 530 nm and emission 540 nm. Data represent the mean  $\pm$  SE of triplicate determinations. \* $p < 0.05$  vs CTL

이후에는 대조군과의 차이를 확인할 수 없었다 (Fig. 2). 카드뮴처리군은 대조군에 비해 1시간에는  $120.8 \pm 6.3\%$ , 2시간에는  $115.2 \pm 4.98\%$ 로 각각 유의성 있는 증가를 보였다.

### 3. 항산화제 및 MAPK 저해제가 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현에 미치는 영향

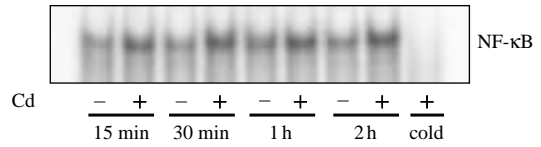
카드뮴에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성 유도에 있어서 산화적 스트레스의 역할을 확인하기 위해 항산화제인 NAC (10mM)과 Trolox (10  $\mu$ M)를 30분 전처리 한 후 카드뮴을 처리하여 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현 양상을 검토한 결과, 수용성 항산화제인 NAC은 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였으며 COX-2의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서 저해함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 지용성 항산화제인 Trolox는 카드뮴에 의해 유도되는 PGE<sub>2</sub> 생성은 물론, COX-2 발현에 유의적인 영향을 주지 못하였다. 산화적 스트레스에 의해 조절되는 세포내 신호 전달 물질인 MAP kinase의 저해제들은 카드뮴 유도 PGE<sub>2</sub> 생성을 강하게 억제하였으나 (Fig. 3A), COX-2 발현에는 서로 다른 영향을 주었다. 즉, p38 저해제인 SB203580은 COX-2 발현을 강하게 억제하였으나 ERK 저해제인 PD98059 및 JNK 저해제인 SP 600125는 상대적으로 큰 영향을 주지 못하였다 (Fig. 3B, C). 본 실험조건하에서 MAPK 저해제에 의한 세포독성은 관찰되지 않았다.



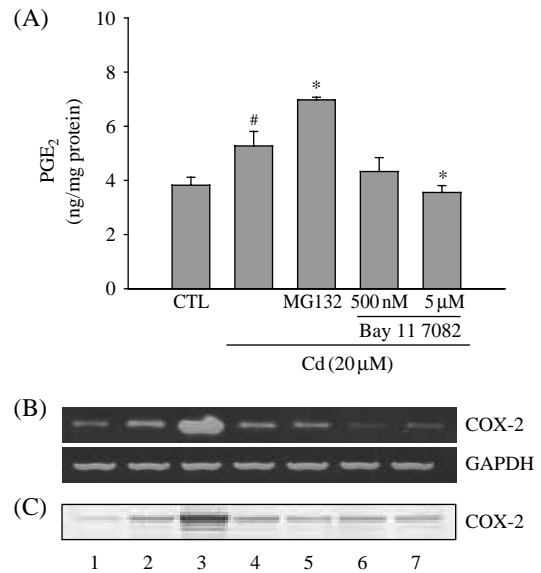
**Fig. 3.** Cadmium-induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression was inhibited by antioxidant NAC and p38 MAPK inhibitor. The levels of COX-2 mRNA and protein were determined by RT-PCR (B) and Western blotting (C). SB (20 μM): SB203580, a p38 inhibitor; SP (3 μM): SP600125, a JNK inhibitor; PD (20 μM): PD98059, a ERK inhibitor; trolox (10 μM); NAC (10 mM). Data represent the mean ± SE of triplicate determinations. #p < 0.05 vs control; \*p < 0.05 vs cadmium control.

#### 4. 카드뮴 유도 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현에 있어서 NF-κB의 관련성

산화적 스트레스에 의해 조절되는 대표적인 전사인자인 NF-κB의 활성을 EMSA를 이용해 측정 한 결과, 카드뮴 처리 15분 후부터 NF-κB binding이 증가되었으며 이는 2시간 까지 유지되고 있음을 확인하였다(Fig. 4). 카드뮴에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성은 NF-κB 저해제인 Bay11 7082의 전처리에 의해 현저히 감소하였으나 또 다른 저해제인 MG132는 오히려 카드뮴 유도 PGE<sub>2</sub> 생성을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 5A). 카드뮴 유도 COX-2 발현은 NF-κB 저해제인 Bay11 7082 및 PGA<sub>1</sub>에 의해 억제되었으나 MG132는 역시 COX-2 발현을 증가시킴을 확인할 수 있었다(Fig. 5B, C) 본 실험에서 사용된 NF-κB 저해제들에 의한 세포독성은 관찰되지 않았으며 결국 NF-κB 저해제가 카드뮴 유도 PGE<sub>2</sub> 생성



**Fig. 4.** Cadmium increases NF-κB activity. The activity of NF-κB was determined by EMSA as described in the text



**Fig. 5.** Effects of NF-κB inhibitors on cadmium-induced PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression. The levels of COX-2 mRNA and protein were determined by RT-PCR (B) and Western blotting (C). Lane 1: control; Lane 2: Cd (20 μM); Lane 3: Cd+MG132; Lane 4: Cd+PGA<sub>1</sub>; Lane 5: Cd+Bay 11 7082 (0.25 μM); Lane 6: Cd+Bay 11 7082 (0.50 μM); Lane 7: Cd+Bay 11 7082 (5 μM) Data represent the mean ± SE of triplicate determinations. #p < 0.05 vs control; \*p < 0.05 vs cadmium control.

에 미치는 영향은 COX-2 발현과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

#### 고 찰

카드뮴은 안료제조와 전기도금, 합금 또는 플라스틱과 알칼리 건전지의 제조시에 부산물로 생성

되며 환경중에 배출되어 다양한 병리증상을 유발하는 대표적인 환경독성물질이다. 카드뮴독성에 의한 병리증상으로는 골연화증과 신장장애가 가장 잘 알려져 있고 이외에도 폐기종, 심부전증, 고혈압 등의 발현과 밀접한 관련이 있으며 장기 미량 축적에 의해 이따이 이따이 병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Berglund *et al.*, 2000). 카드뮴은 또한 뇌졸중의 유병율을 증가시키는 것으로 보고된 바 있으며 (Elliott *et al.*, 2000), 카드뮴에 의한 뇌신경 세포 사멸과 세포간 tight junction의 붕괴 유발 (Zimmerhackl *et al.*, 1998) 등이 이를 뒷받침하는 실험적 증거로서 제시된 바 있다. 그러나 뇌졸중 유발과 관련된 카드뮴의 작용기전에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 본 연구진은 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴이 PGE<sub>2</sub> 및 COX-2 생성을 유도하며, 이는 뇌혈관내피세포에서의 부착분자 발현조절과 상관성이 있음을 보고한 바 있다 (Seok *et al.*, 2006). 본 연구에서는 카드뮴이 PGE<sub>2</sub> 및 COX-2 발현에 미치는 영향을 세포내 산화적 스트레스와 관련된 신호전달 시스템을 중심으로 검토함으로써 뇌졸중 발현기전의 일단을 확인코자 하였다.

카드뮴은 Haber-Weiss 반응에 참여하지 않아 그 자신이 직접 ROS를 생성하지는 못하지만 세포내 ROS 생성을 증가시킨다는 여러 증거가 제시되어 왔다 (Stohs *et al.*, 2000). 카드뮴에 의한 ROS 생성은 미토콘드리아 기능을 변화시키거나 (Pourahmad and O'Brien, 2000) 세포내 항산화 시스템의 교란 (Ramirez and Gimenez, 2003; Xu *et al.*, 2003)에 기인하는 것으로 보고된 바 있다. 결과적으로 카드뮴은 세포내 산화-환원 균형의 파괴를 유도하여 칼슘 항상성 및 세포내 신호전달시스템의 교란을 일으키게 된다 (Ramirez and Gimenez, 2003). 실제 항산화제 투여에 의해 카드뮴 독성을 완화시킨다는 보고도 있으며 따라서 카드뮴은 산화적 기전을 통해 세포기능에 영향을 줄 것이라고 추정되고 있다 (Stohs *et al.*, 2000). 본 연구에서 카드뮴은 뇌혈관 내피세포내 ROS를 증가시켰으며 이전의 보고에서와 같이 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현을 유도하였다. 이 작용은 항산화제인 NAC에 의해 감소되었으나, 수용성 vit E인 trolox에 의해서는 영향을 받지 않았다. Trolox에 의한 영향이 관찰되지 않은 이유는 아직 확실하지는 않으나 NAC과 trolox가 작용상의

차이를 보이는 예는 종종 보고되고 있으며 (Qanungo *et al.*, 2004), 이는 두 물질의 세포내 작용점의 차이에 기인하는 것으로 추정되고 있다. 뇌혈관 세포에서의 산화적 스트레스의 증가는 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성을 유도한다는 이전의 보고 (Fang *et al.*, 2000)를 고려해 볼 때 이 결과들은 카드뮴에 의한 PGE<sub>2</sub> 생성과 COX-2 발현에 있어 세포내 산화적 스트레스가 관여하고 있음을 강하게 시사하고 있다.

카드뮴은 산화적 스트레스에 민감한 세포내 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 여러 유전자의 발현에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Xu *et al.*, 2003; Rockwell *et al.*, 2004). 본 연구진도 카드뮴이 뇌혈관 세포내의 p38 MAPK를 활성화시키며 p38 MAPK 저해제에 의해 PGE<sub>2</sub> 생성 및 COX-2 발현이 억제됨을 확인한 바 있고 이 때 ERK 및 JNK에는 별다른 영향을 주지 않아 카드뮴에 의한 COX-2 발현 유도는 p38 MAPK에 특이적임을 보고한 바 있다 (Seok *et al.*, 2006). 본 연구에서는 ERK 및 JNK 저해제가 카드뮴 유도 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였으나 COX-2 발현에는 유의적인 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었는데, 이는 카드뮴 유도 COX-2 발현이나 PGE<sub>2</sub> 생성이 ERK, JNK를 경유하고 있다가 보다는 이들 MAPK의 저해제인 PD98059 또는 SP600125가 COX 활성을 직접적으로 억제함에 기인할 것으로 추정되었다. 카드뮴은 또한 산화적 스트레스에 민감한 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 것으로 알려져 있으며 (Jeong *et al.*, 2004), 본 연구에서도 카드뮴 처리 15분 후부터 NF- $\kappa$ B의 활성도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 3  $\mu$ M 카드뮴 처리시 1시간 이후에 NF- $\kappa$ B binding이 증가한다는 이전의 보고와 약간의 차이가 있는데 (Jeong *et al.*, 2004), 이는 사용한 카드뮴의 농도차이에 기인하는 것으로 추정된다. 카드뮴에 의한 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성에 있어서 NF- $\kappa$ B의 관여 여부를 확인하고자 NF- $\kappa$ B 저해제를 처리한 결과 NF- $\kappa$ B의 인산화를 저해하는 Bay 117082는 COX-2 mRNA와 단백질 발현 그리고 PGE<sub>2</sub> 생성을 모두 감소시켰으나 I $\kappa$ B의 분해를 억제하는 MG132는 오히려 카드뮴 유도 COX-2의 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성을 현저히 증폭시켰다. MG132는 세포종에 따라 COX-2 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있으며 (Gallois *et al.*, 1998; Laporte *et al.*,

2000; Kim *et al.*, 2002), 이는 MG132가 NF- $\kappa$ B proteasome 저해제임을 고려하면 ubiquitination-proteasome 경로의 차단에 의해 COX-2가 유도되고 PGE<sub>2</sub> 생성이 증가한다는 이전의 보고와 일치하는 결과라 할 수 있다. 또한 MG132는 proteasome 저해를 통해 COX-2 발현을 증가시키는 HSP70의 발현을 증가시키는 것으로 알려져있다(Bush *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2003). 따라서 이상의 보고들을 미루어 볼 때 뇌혈관 내피세포에서 MG132에 의한 COX-2 발현 증가는 약물 특성에 기인하며 NF- $\kappa$ B 저해작용과는 관련이 없을 것으로 추론할 수 있다. 결과적으로 카드뮴에 의해 뇌혈관 내피세포에서 산화적 스트레스가 증가되고 이 영향으로 p38 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 경로가 활성화되며 PGE<sub>2</sub> 및 COX-2 등의 염증인자 생성을 증가시키는 것으로 추론할 수 있다. 이 두 경로의 상관관계에 대해서는 아직 확실하지 않으며 앞으로 진전된 연구를 통해 규명되어야 할 과제이다.

이상의 결과들은 카드뮴이 뇌혈관세포에서 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성을 증가시킴으로써 뇌혈관 염증반응을 일으키고 이를 통해 뇌혈관 장벽기능 손상을 유발할 가능성을 제시하고 있으며, 따라서 카드뮴에 의해 유발되는 뇌질환의 유발기전, 치료법 연구에 있어서 새로운 방향성을 시사하고 있다.

## 결 론

뇌혈관 내피세포 세포사멸에서 카드뮴에 의한 프로스타글란딘 생성과 COX-2 발현 및 그 세포내 신호전달에 관한 연구를 수행한 결과 카드뮴은 뇌혈관 내피세포에서 농도 의존적으로 세포사멸을 일으키고, 세포사멸을 유발하지 않는 저농도에서는 염증반응을 일으키는 것으로 확인되었다. 카드뮴은 세포내 ROS 생성을 증가시켰으며 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성을 유도하였고 이는 항산화제인 NAC에 의해 유의적으로 억제되었다. MAP Kinase 저해제 처리 후 카드뮴에 의해 유도되는 COX-2 발현 및 PGE<sub>2</sub> 생성을 관찰한 결과 p38이 관여하고 있음을 알 수 있었다. 카드뮴은 NF- $\kappa$ B를 활성화시켰으며 NF- $\kappa$ B의 활성화는 15분 후부터 2시간 까지 유지되었다. NF- $\kappa$ B 저해제인 Bay 11 7082는 카드뮴에 의

한 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였다. 따라서 뇌혈관 내피세포에서 카드뮴에 의해 유도되는 COX-2 발현과 PGE<sub>2</sub> 생성은 세포내 산화적 스트레스의 증가, p38 MAP Kinase 및 NF- $\kappa$ B의 활성화를 매개로 일어남을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

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

## 참 고 문 헌

- Andersson H, Petersson-Grawe K, Lindqvist E, Luthman J, Oskarsson A and Olson L. Low level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997; 19: 105-115.
- Berglund M, Akesson A, Bjellerup P and Vahter M. Metal-bone interactions. *Toxicol. Lett.* 2000; 15: 112-113:219-225.
- Bush KT, Goldberg AL and Nigam SK. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(14): 9086-9092.
- Elliott P, Arnold R, Cockings S, Eaton N, Jarup L, Jones J, Quinn M, Rosato M, Thornton I, Toledano M, Tristan E and Wakefield J. Risk of mortality, cancer 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.
- Figueiredo-Pereira ME, Li Z, Jasen M and Rockwell P. N-acetylcysteine and celecoxib lessen cadmium cytotoxicity which is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation in mouse neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 25283-25289.
- Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A and Lotersztajn S. Role of NF- $\kappa$ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in

- human hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273 (36): 23183-23190.
- Hart RP, Rose CS and Hamer RM. Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 1989; 11: 933-943.
- Iadecola C and Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Curr. Opin. Neurol.* 2001; 14: 89-94.
- Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S and Ross ME. Reduced susceptibility to ischemic brain injury and NMDA-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 1294-1299.
- Jeong EM, Moon CH, Kim CS, Lee SH, Baik E.J, Moon CK and Jung YS. Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-B activation in cerebrovascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320: 887-892.
- Kim SJ, Im DS, Kim SH, Ryu JH, Hwang SG, Seong JK, Shun CH and Chun JS. Beta-catenin regulates expression of cyclooxygenase-2 in articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 2002; 296(1): 221-226.
- Laporte JD, Moore PE, Lahiri T, Schwartzman IN, Panettieri RA Jr and Shore SA. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 279(5): L932-941.
- Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 901-910.
- Nogawa S, Zhang F, Ross ME and Iadecola C. Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J. Neurosci.* 1997; 17: 2746-2755.
- Okuda B, Iwamoto Y, Tachibana H and Sugita M. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 1997; 99: 263-265.
- Pourahmad J and O'Brien PJ. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. *Toxicology* 2000; 143: 263-273.
- Qanungo S, Wang M and Nieminen AL. N-Acetyl-L-cysteine enhances apoptosis through inhibition of nuclear factor -κB in hypoxic murine embryonic fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(48): 50455-50464.
- Ramirez DC and Gimenez MS. Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol. Lett.* 2003; 145: 121-132.
- Rockwell P, Martinez J, Papa L and Gomes E. Redox regulates COX-2 upregulation and cell death in the neuronal response to cadmium. *Cell Signal.* 2004; 16: 343-353.
- Romare A and Lundholm CE. 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.* 1999; 73: 223-228.
- 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.
- Wyss-Coray T and Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease—a double-edged sword. *Neuron* 2002; 35: 419-432.
- 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.
- Zhang F, Hackett NR, Lam G, Cheng J, Pergolizzi R, Luo L, Shmelkov SV, Edelberg J, Crystal RG and Rafii S. Green fluorescent protein selectively induces HSP70-mediated up-regulation of COX-2 expression in endothelial cells. *Blood* 2003; 102(6): 2115-2121.
- 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. Physiology* 1998; 275 (1 Pt 2): F143-154.