

번호 10-1

제 목	국문	카드뮴 노출에 의해 발현이 증가하는 유전자의 검출에 관한 연구			
	영문	A study for the detection of genes expressed by cadmium exposure			
저 자 및 소 속	국문	이명진, 西尾久英, 住野公昭, 김준연 ¹ 일본 고베대학 의학부 공중보건학교실 ¹ 동아대학교 의과대학 예방의학교실 및 산업의학연구소			
	영문	Myeong Jin Lee, Hisahide Nishio, Kimiaki Sumino, Joon Youn Kim ¹ Department of Public Health, Kobe University School of Medicine, Japan ¹ Department of Preventive Medicine, College of Medicine and Industrial Medicine Research Institute, Dong-A University			
분 야	보건관리 () 역 학 () 환 경 (○)	발 표 자	일반회원 (○) 전 공 의 ()	발표 형식	구 연 (○) 포스터 ()
진행 상황	연구완료(○), 연구중() → 완료 예정 시기 : 년 월				

1. 목적

카드뮴은 폐, 신장, 고환등을 표적장기로 하는 강한 독성을 가진 환경오염물질로, 만성폭로에 의한 폐색성 폐질환, 신기능장애, 폐암, 전립선암등의 발생이 보고되어 있으나 그 독성 발현기전은 아직 밝혀지지 않고 있다. 카드뮴에 폭로되면 세포내에 방어단백질, 수복단백질 및 signal 전달에 관여하는 다양한 유전자의 발현이 변동되는 것으로 알려져있으나, 현재까지 보고되어 있는 유전자의 수는 예상되는 수에는 미치지 못하고 있다. 따라서, 카드뮴 폭로에 의해 발현이 촉진되는 유전자를 다수 검출에 그중 카드뮴의 유해작용과 밀접한 관계를 갖는 유전자를 특정하여 검토하는 것은 카드뮴의 독성발현기전을 해명하는 데 있어서 필요한 작업이라도 생각된다. 본 연구에서는 COS-7 세포를 사용에 카드뮴 폭로에 의해 발현이 촉진되는 유전자를 검출하였다.

2. 연구대상 및 방법

COS-7세포에 $10^{-10} \sim 10^{-5}M$ 의 염화카드뮴을 6시간 폭로시킨 후 mRNA를 추출하고, 카드뮴에 의한 발현 증가가 보고되어있는 metallothionein II (MTII) mRNA의 발현 정도를 Northern blot analysis로 확인했다. 그 결과, MTII mRNA를 발현시키는 카드뮴의 최소 농도는 $10^{-7}M$ 이었다. 이 $10^{-7}M$ 의 카드뮴을 폭로시킨 세포와 대조 세포의 mRNA를 가지고, subtractive suppressive hybridization (SSH)법을 시행하여 카드뮴 폭로에 의해 발현이 증가된 유전자 산물을 검출했다. 검출된 유전자 산물은 TA cloning한 후 염기배열을 확인해, GenBank검색에 의해 유전자를 특정하고, 정량 RT-PCR 및 Northern blot analysis 또는 reverse Northern dot blot analysis로 카드뮴에 의한 발현증가를 확인했다.

3. 결과

SSH법을 이용한 실험의 결과 1차적으로 76개의 clone이 검출되었다. 그중 20 clone의 염기배열을 확인한 결과 zeta-crystallin, cytochrome C oxidase subunit IV, glutathione synthetase, serine/threonine protein kinase, heat shock protein 10, transducin beta-1 subunit, lipocortin II의 mRNA가 판명되었다. heat shock protein 10 mRNA에 대해서는 RT-PCR과 Northern blot analysis로 카드뮴 폭로에 의한 발현 증가를 확인했으며, 그 외의 유전자 산물에 대해서는 대조세포와 $10^{-6}M$ 카드뮴 폭로세포의 cDNA를 probe로 한 reverse Northern dot blot analysis로 발현 증가를 확인했다.

본 실험에서 카드뮴 폭로에 의해 발현이 증가된 유전자의 검출에 사용한 SSH법은 종래 사용되어온 differential display법보다 위양성의 결과가 나오는 비율이 적다고 알려진 방법으로, 비교적 단시간에 많은 수의 발현변동 유전자가 검출 가능할 것으로 기대하고 있다. 또한 reverse Northern dot blot analysis는 본 실험에서와 같이 다수의 유전자의 발현변동을 확인하는데 적합한 방법이라고 생각된다.

이들 방법에 의해 검출되고 발현증가가 확인된 유전자중 glutathione synthetase mRNA는 카드뮴에 의한 발현이 보고되어 있으나, 그외의 유전자에 대한 카드뮴과 관련된 보고는 아직 없다. 이들 중에는 signal전달에 관여하는 serine/threonine protein kinase, transducin beta-1 subunit, lipocortin II의 유전자도 포함되어 있어 이들 유전자가 어떠한 경로로 발현하게 되었는가, 그리고 이들의 발현에 따른 영향은 무엇인가에 대한 보다 자세한 검토가 필요하며, 그 성과는 카드뮴의 독성발현기전 해명에 도움이 될 것으로 생각된다.

4. 결론

1. COS-7세포와 SSH법을 사용하여 카드뮴 폭로에 의해 발현이 증가하는 7종의 mRNA를 검출했다. 이들의 발현 경로 및 그에 따른 영향에 대해 보다 자세한 검토가 필요하다.
2. SSH법과 reverse Northern dot blot analysis의 병용은 다수의 유전자의 발현변동을 확인하는데 적합한 방법이라고 생각된다.