

## 테스토스테론생성 레이디히세포 (Leydig)에서의 메탈로치오닌 유전자 발현특성연구

박 광 식

동덕여자대학교 약학대학

## Expression of Metallothionein mRNA in Cadmium Treated Leydig Cells

Kwangsik Park

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

### ABSTRACT

Although the biological functions of metallothioneins (MTs) are still being investigated, they have been suggested to be involved in detoxification of heavy metals, scavenging of free radicals, and protection against alkylating agents. MTs have been reported to be induced in most of animal tissues by heavy metals such as zinc, copper, mercury and cadmium, and the proteins have binding affinities to the metals. However, the presence or induction of MTs was reported not to be clear in leydig cells, which produce testosterone for the maturation of spermatozoa in male testes. In this study, we investigated the inducibility of metallothionein isomers by cadmium in cultured mouse leydig cells. Total RNA was extracted from the near confluent grown leydig cells and RT-PCR was performed using the primers which were synthesized on the basis of MT-1, 2, 3 and 4 cDNA from GenBank database. As results, MT-1 and MT-2 mRNA were found to be expressed in cadmium non-treated control cells and MT 1 mRNA expression was dose-dependent when leydig cells were treated with cadmium chloride. But MT-3 which is known to be brain specific and MT-4 which is another isoform of metallothionein, were not expressed. Other genes induced or depressed in cadmium treated leydig cells were also identified by microarray techniques.

**Key words :** Cadmium, metallothionein mRNA, leydig cells

### 서 론

정소(精巢)는 남성의 2차 성징을 발현하는 생식 기관으로서 정자를 생성하고 남성호르몬인 테스토스테론을 분비하는 기관이다. 이 기능은 정소를 구

※ To whom correspondence should be addressed.

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

성하는 주요 세포인 정원세포(Spermatogonium), 지주세포(Sertoli cell) 및 레이디히세포(Leydig cell)에 의해 이루어지는 데 이때 정원세포는 정자로 발달하게 되며 지주세포는 레이디히세포에서 생성된 테스토스테론을 정자발달장소에 운반시켜 정자 발생을 돕게 된다. 레이디히세포는 황체호르몬(LH)의 자극을 받아 콜레스테롤로부터 테스토스테론을 합성하는 세포로서 남성의 2차 성징을 발현하는

데 매우 중요한 역할을 한다. 따라서 유해물질로 인한 레이디히세포의 손상은 내분비계장애의 중요한 원인이 될 수 있어 최근 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다(Nikula *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2002; Haider, 2004). 본 연구에서는 정자생성에 필요한 테스토스테론을 생산하는 레이디히세포에 카드뮴을 처리하였을 때 나타나는 생물학적 독성을 평가하고 독성발현농도에서의 카드뮴 노출을 평가할 수 있는 분자생물학적 지표를 발굴하고자 우선 중금속에 의해 유도되는 것으로 알려진 메탈로치오닌 유전자 발현특성을 조사하였다.

메탈로치오닌(Metallothionein, MT)은 분자량 약 7KDa 이하의 저분자 단백질로서 Zn, Cu, Cd 등 중금속과 쉽게 결합하며 구성아미노산중 cystein의 함량이 매우 높아 포유류의 경우 약 61~68여 개의 구성 아미노산중 18~23개 정도가 cystein으로 구성되어 있으며 또한 방향족환 아미노산이나 히스티딘을 함유하지 않는 특징이 알려져 있다. 현재까지 MT는 여러 종류의 isoform이 발견되었는데 포유류중에 가장 널리 분포하는 MT-1과 MT-2는 여러 종류의 중금속, 약물, 염증반응 매개체 등에 의해 유도되는 것으로 보고된 바 있다(Schmidt *et al.*, 1985, Lambert *et al.*, 1996; Coyle *et al.*, 2002). MT-3는 주로 뇌에서 발견되므로 뇌특이성 MT로 알려져 있으며 신경세포의 성장을 억제하는 성질을 발현하는 것으로 보고된 바 있다(Palmiter *et al.*, 1992). MT-4에 대해서는 아직 그 기능이나 특성에 대해 알려진 바가 많지 않다. MT는 중금속에 의해 유도되는 단백질이면서도 중금속과 결합하여 본질적으로 중금속의 독성을 완화하는 기능을 갖고 있으므로 MT자체가 생체내 기능에 어떤 부정적인 작용을 나타낼 것으로는 사료되지 않으며 따라서 본 연구에서는 카드뮴에 의한 독성작용으로서의 MT 발현보다는 중금속 바이오키네틱으로서의 역할에 대해 연구하고자 하며 이에 초점을 맞추었다.

레이디히 세포에서의 메탈로치오닌 유전자 발현에 관한 연구는 그간 몇 가지 관점에서 논란이 있어 왔는데 가장 큰 논란거리의 하나가 바로 레이디히세포에서 메탈로치오닌이 발현되는가에 대한 것이었다. 일부 연구자들은 흰쥐에 카드뮴을 처리한 후 고환조직에서의 MT 발현을 조사하였는데 고환조직에서는 메탈로치오닌에 비해 cystein의 함량은 적고 glutamate 함량이 높은 testicular Cd-

binding protein이 존재한다고 보고 한 바 있으며 일부 다른 연구자들은 고환의 전체조직 또는 일부 특정 고환세포에서는 간에서보다도 높은 농도의 메탈로치오닌이 발현되는 것으로 보고하기도 하였다. 이러한 논란의 원인은 대개 고환조직의 특정세포만을 분리하여 측정할 경우와 고환조직전체를 사용할 경우 서로 다른 결과가 나타났기 때문으로 생각되었으며 따라서 최근에는 고환조직의 특정세포만을 분리하여 메탈로치오닌의 발현을 평가하고자 하는 연구가 진행된 바 있다.(Abel *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1994; Shiraishi *et al.*, 1995; Ren *et al.*, 2003).

본 연구에서는 생쥐의 고환에서 유래된 레이디히세포를 *in vitro* 상에서 배양하면서 카드뮴을 처리하고 이때 메탈로치오닌 유전자의 발현여부를 평가함으로써 고환조직에서의 메탈로치오닌 유전자 발현에 대한 지견을 얻고자 하였으며 아울러 환경오염물질로서의 중금속에 대한 생체지표를 발굴하고 이를 이용한 위해성평가를 수행할 수 있는 기초 자료를 획득하고자 연구를 시작하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

마우스 고환에서 유래된 레이디히세포(TM3)는 KCLB(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>와 충분한 습도가 유지되는 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 모든 실험은 세포계대 배양중 성장기의 세포를 사용하였으며 세포는 직경 6cm의 dish type 배양용기를 사용하였다.

### 2. 카드뮴처리

배양용기의 바닥을 거의 채울 정도의 일정 세포수가 되면 2% FBS 함유 RPMI-1640 배지에 카드뮴(CdCl<sub>2</sub>) 농도가 0, 5, 10, 20, 40 μM 되도록 표준용액을 첨가하고 6 시간 동안 배양하였다. 카드뮴은 CdCl<sub>2</sub>를 사용하였으며 사용한 농도에서는 배양기간 동안 세포의 형태학적 변화나 사멸세포는 나타나지 않았다. 각 농도별 카드뮴은 동일 농도에 대해 공히 3개 배양용기에 대해 처리하였다.

### 3. RNA 정제, Primer 선정 및 유전자 증폭

카드뮴을 처리한 후 6시간 후에 4°C의 Phosphate buffered saline으로 3회 세척하고 guanidine thiocyanate 용액을 처리하여 세포를 완전용해 시켰다. 추출된 세포액에 sodium acetate를 넣고 phenol:chloroform:isoamylalcohol 혼합액을 넣어 잘 섞은 후 원심분리한 상등액에 대해 isopropanol 침전으로 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 A260/A280은 1.8 이상이었다. PCR에 사용한 메탈로치오닌의 isoform MT-1, MT-2, MT-3, MT-4에 해당하는 프라이머는 기존의 문헌과 미국국립의학도서관에서 제공하는 GenBank 데이터베이스에서 제공한 사람의 메탈로치오닌 유전자 cDNA 염기서열을 기초로 하여 제작하였으며, 각각의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

역전사반응(reverse transcription)은 RNA 주형 1 µg에 oligo dT primer, reverse transcriptase 및 각 nucleotide가 함유된 반응액 20 µl에 대해 42°C로 60분간 실시한 후 94°C에서 5분간 가열함으로써 반응을 종료하였다. 생성된 각 MT isoform의 유전자증폭(PCR)은 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 2 µl와 위에서 기술한 각 프라이머쌍, Taq polimerase 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 반응 이후에는 최종적으로 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 각각의 primer 쌍을 이용하여 MT 유전자를 증폭시킨 후 얻은 생성물에 대해서는 1.5% agarose gel상에서 TAE 완충용액을 사용하여 전기영동하였다(Lee *et al.*,

2002; Ryu *et al.*, 2004).

### 4. Microarray hybridization과 판독

카드뮴 10 µM 처리군의 배양세포와 대조군의 세포를 무균 인산생리식염액(phosphate buffered saline)으로 세척하고 RNAsagents(Promega, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. cDNA probe는 CyScribe First-Strand cDNA labelled kit(Amersham Biosciences, NJ, USA)를 사용하여 제작하였다. 간단히 기술하면 total RNA에 anchored oligo dT primer를 넣어 총 10 µl로 조절한 후 70°C에서 5분간 방치한 후 10분간 식혀 primer와 RNA의 결합반응을 실시하였다. 이후 dUTP Cydye-labelled nucleotide를 대조군과 처리군에 각각 구분하여 첨가하고 Cyscript reverse transcriptase로 역전사시켜 형광표지 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 cyscribeGFX kit를 사용하여 Cy3-labelled cDNA 및 Cy5-labelled cDNA를 각각 정제하였다(Burczynski *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2002).

각각의 Cy3- 및 Cy5-labelled cDNA는 하나의 튜브에 합쳐 speed-vac에 건조시킨 후 핵산분해효소가 존재하지 않는 정제된 물로 이를 녹이고 95°C에서 2분간 가온하고 얼음에 식힌 후 hybridization buffer에 녹여 마우스유전자 6,000개가 printing된 microarray(Digital Genomics, USA)에 loading 하고 42°C에서 14~18시간동안 incubation시켰다. 이후 0.2% SDS함유 1X SSC 용액으로 세척하고 테시케이터에서 30분간 방치한 후 Array WoRx e Biochip Reader(Applied Precision Inc., Washing-

**Table 1.** Sequences of primers used in the amplification of metallothionein cDNA

| Gene (GenBank accession No) | Primer sequence                              | Product size (bp) |
|-----------------------------|--|-------------------|
| MT-1(MN_013602)             | TCCTGAGTACCTTCTCCTCA<br>GGGTTGGTCCGATACTATTT | 289               |
| MT-2(NM_008630)             | CGCTCCTAGAACTCTTCAAA<br>TACATTTGCATTGTTTGCAT | 139               |
| MT-3(NM_013603)             | ACTGGATATGGACCCTGAG<br>ATTTACATAGGCTGTGTGGG  | 250               |
| MT-4(NM_008631)             | AGATAATTGCAAATGCACAA<br>CAGCTGCACTTGTCTGAAC  | 129               |
| β-actin(NM_007393)          | GGACCTGACAGACTACCTCA<br>AATGTAGTTTCATGGATGCC | 288               |

ton, USA)를 이용하여 판독하였다. 판독은 Image 5 (BioDiscovery Inc, LA, USA)를 사용하였으며 Gene Sight 3.2 프로그램 (BioDiscovery Inc., LA, USA)을 사용하여 exel화일 및 scatter plot를 작성하였다 (Afshari *et al.*, 1999; Nuwaysir *et al.*, 1999; Cardmo *et al.*, 2002).

## 결과 및 고찰

카드뎴은 사람과 설치류에서 이미 발암성을 갖는다는 사실이 보고된 바 있으며 IARC는 카드뎴이 호흡을 통하여 인체로 유입되는 경우 폐 조직에서 발암성을 갖는 것으로 인정하고 있다. (IARC, 1993) 또한 체내 노출경로에 따라 다양한 독성을 발현하며 신장기능, 중추신경계, 골연화증, 근육통, 고혈압, 호흡곤란 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 카드뎴은 대개 호흡경로를 통하여 유입되는데 카드뎴 단일 화학물질형태로 유입되는 경우보다는 미세먼지나 디젤분진 등 부유물질에 부착되어 폐포로 유입되거나 식품이나 음용수를 통해 경구로 유입되는 경우가 많다 (Bunger *et al.*, 2000; Carero *et al.*, 2001; Pohjola *et al.*, 2003). 본 연구는 카드뎴에 노출될 경우 생식기관에 나타나는 독성을 평가할 수 있는 생물학적 지표에 대한 지견을 바탕으로 환경오염물질에 대한 위해성평가 수단을 확보하는데 필요한 기초연구를 수행하였다.

카드뎴이 세포에 고농도로 처리되면 세포괴사를 촉진하는 데 세포가 사멸되는 수준의 고농도는 실제 대기오염이나 식품오염을 통해 인체에 유입되는 농도와는 거리가 멀다고 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). 마우스 고환세포유래 Leydig 세포에 카드뎴을 5, 10, 20, 40  $\mu\text{M}$  농도로 처리하고 6시간동안 배양한 후 이로부터 total RNA를 추출하고 메탈로치오닌 유전자의 발현여부를 평가하였다. 카드뎴 노출된 세포는 사용한 전 농도에서 세포의 부착능력이 손상을 받아 부유되거나 또는 membrane bubble의 생성, 세포의 위축, 세포

질의 형태 변화 등이 관찰되지는 않았다. 연구보고에 의하면 흰쥐의 고환에서 유래된 레이디히세포 (R2C)의 경우 다른 일반세포에 비해 카드뎴의 독성에 대한 감수성이 매우 높은 것으로 보고되는데 레이디히 세포는 타 세포에 비해 genotoxic level이 10분의 1 정도로 낮은 것으로 알려졌다 (Shiraishi *et al.*, 1995). 또한 동 연구에서는 카드뎴 농도 25~50  $\mu\text{M}$  수준에서 genotoxicity가 나타나지만 MTT assay에 의한 cytotoxicity는 나타나지 않았다고 하였는데 이는 본 연구에서 처리한 카드뎴 농도에서는 세포의 특기할 만한 형태학적 변화가 나타나지 않는 것과 일치한다고 할 수 있겠다.

우선 마우스의 메탈로치오닌 cDNA를 근거로 합성한 각 프라이머쌍이 본 연구에서 수행하고자 하는 레이디히 세포에서의 메탈로치오닌 유전자 발현을 측정하는 데 적정하게 작용하는 지 알아 보았으며 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. MT-1, MT-2의 경우 예상 크기의 DNA단편 289 bp 및 139 bp가 증폭되는 것을 확인할 수 있었으며 MT-2의 경우 MT-1에 비해 그 발현량이 상대적으로 적은 특징을 보여주고 있다. 그러나 뇌조직에 특이적으로 존재하는 것으로 알려진 MT-3와 메탈로치오닌의 또 다른 isoform인 MT-4의 경우에는 대조군과 카드뎴 처리군에서 모두 유전자 증폭산물을 확인할 수 없었다. MT-3의 증폭산물의 예상크기는 250 bp였으며 MT-4의 경우는 129 bp였다. MT-3와 MT-4가 레이디히세포에서는 작용하지 않는 것이 이들 isomer가 정상세포에서는 그 발현량이 매우 미약하기 때문인지 확인하기 위해 PCR에 필요한 RNA량을 증가시키거나, 카드뎴을 처리한 레이디히세포로부터 RNA를 추출하여 증폭시켜 보아도 동일한 결과가 얻어졌으므로 MT-3와

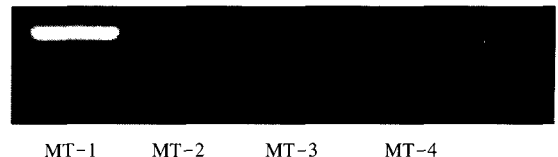
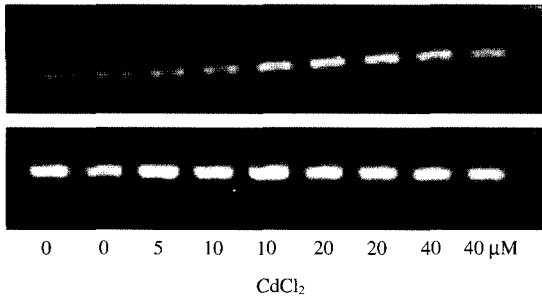


Fig. 1. mRNA expressions of metallothionein isoforms MT-1, MT-2, MT-3, MT-4 in cadmium non-treated leydig cells by RT-PCR. MT-1 (lane 1) and MT-2 (lane 2) were expressed but no band was shown in MT-3 (lane 3) and MT-4 (lane 4).

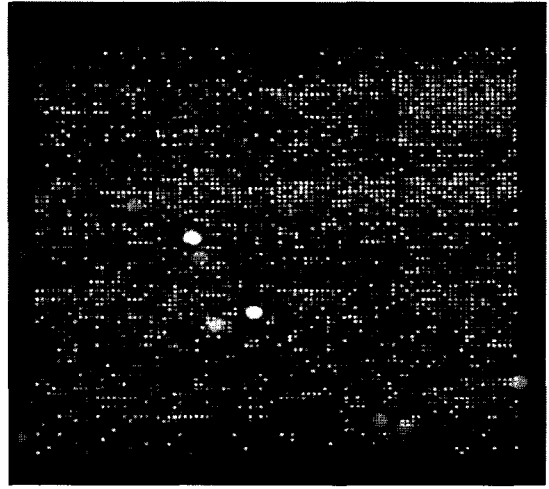


**Fig. 2.** Expression of MT-1 in cadmium chloride-treated leydig cells by RT-PCR. control was shown in lane 1 and 2, cadmium 5  $\mu$ M in lane 3, 10  $\mu$ M in lane 4 and 5, 20  $\mu$ M in lane 5 and 6, 40  $\mu$ M in lane 7 and 8. MT-1 mRNA and  $\beta$ -actin mRNA were shown in upper and lower panel, respectively.

MT-4는 레이디히세포에서는 발현되지 않는 것으로 생각되었다. 이와 같은 결과는 Park 등이 수행한 인간폐포세포 유래인 A549 세포에서도 유사한 결과가 제시된바 있다(Park K. *et al.*, 2003, Park K. *et al.*, 2004).  $\beta$ -actin의 경우 정상대조군이나 카드뮴 처리 양성대조군이나 관계없이 288 bp 크기의 밴드가 일정하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 2는 레이디히세포에 카드뮴( $\text{CdCl}_2$ )을 5, 10, 20, 40  $\mu$ M로 6시간 처리한 경우의 MT-1 유전자 발현을 나타낸 것이다. 그림에서 나타난 바와 같이 카드뮴 처리농도가 높아질수록 MT-1의 유전자 발현은 증가하는 것을 볼 수 있었다. 40  $\mu$ M 고농도로 처리한 경우 MT-1의 발현량이 오히려 약간 감소하는 듯이 보이는데 이는 Shiraishi 등이 언급한 바와 같이 25~50  $\mu$ M 수준에서 genotoxicity가 나타날 수 있기 때문인 것으로 사료된다. MT-2의 경우 카드뮴에 의해 유전자 발현이 증가되는 것으로 보이나 본 실험에서는 아직 그 정확한 발현패턴을 확인할 수 없었다. 레이디히세포에서의 메탈로치오닌 isoform의 유전자 발현특성이 이렇게 서로 다른 것에 대한 정확한 이유는 아직 알 수 없으며 생식 세포의 보호작용과 메탈로치오닌의 라디칼소거 능력이 서로 관련되어 이러한 발현기전이 존재하는 지에 대해서는 추후 연구가 더 필요하다.

한편, RT-PCR은 적은 양의 유전자를 증폭하여 발현양상을 확인할 수 있는 방법으로서 여러 연구에서 널리 이용되고 있으나 최근에는 DNA chip을



**Fig. 3.** A scanned microarray image contains 6,000 mouse genes. The array was hybridized with fluorescent labelled cDNA mixtures of control and cadmium (10  $\mu$ M  $\text{CdCl}_2$ ) treated cells. Red spots mean the up-regulation of mRNA in leydig cells by cadmium treatment and green spots mean down-regulation of mRNA.

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  $\mu$ M 농도를 처리한 처리군에 대해 microarray 분석을 실시함으로써 레이디히세포에서의 메탈로치오닌 유전자 발현의 정도와 메탈로치오닌의 다른 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 특성을 상호비교하였다. Fig. 3은 레이디히세포에 카드뮴을 처리한 후 발현이 변화된 유전자를 microarray를 이용하여 hybridization시키고 나타난 결과를 스캐닝한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 대부분의 유전자는 카드뮴에 대해 그 발현이 유도되거나 억제되지 않았다. 그림에도 불구하고 붉은 색 및 녹색을 띄는 다수의 스폿이 보이고 있다. 이는 카드뮴에 의해 레이디히에서 다양한 유전자의 발현이 영향을 받고 있음을 의미한다. 최근 Tsangaris 등(2002)은 T-cell line을 이용하여 카드뮴의 유전자 발현패턴을 연구한 결과 메탈로치오닌 등 다수의 유전자가 up-regulation 되고 있다는 사실을 발표한 바 있다(Tsangaris *et al.*, 2002). 또한 Yamada 등은 Hela

**Table 2.** Genes which are induced by cadmium-treatment in leydig cells

| Genes  | GenBank No | Induction rate to control |
|--|------------|---------------------------|
| Myd116, myeloid differentiation primary response gene 116              | AI528708   | 13.5                      |
| Inpp5d, inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145 kDa                  | AI323613   | 12.8                      |
| Serpinb2, serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B, member 2 | AI847983   | 10.4                      |
| Dnajb1, DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1                    | AI465465   | 8.9                       |
| Fos11, fos-like antigen 1  | AI225491   | 8.7                       |
| Myef2, myelin basic protein expression factor 2, repressor             | AI323617   | 8.1                       |
| AA407930, expressed sequence AA407930                                  | AW321053   | 7.1                       |
| Sqstm1, sequestosome 1   | AI839114   | 6.9                       |
| Hsp105, heat shock protein, 105 kDa                                    | AI838486   | 6.9                       |
| Ptprb, protein tyrosine phosphatase, receptor type, B                  | AI664182   | 5.6                       |
| Prkg2, protein kinase, cGMP-dependent, type II                         | AA793588   | 5.3                       |
| Ddit3, DNA-damage inducible transcript 3                               | AI323295   | 5.0                       |
| Txnrd1, thioredoxin reductase 1  | AI854159   | 4.5                       |
| Abcg1, ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1            | AI323653   | 4.2                       |
| Ovgpl, oviductal glycoprotein 1, 120 kD                                | AI226220   | 3.9                       |
| tsg101, tumor susceptibility gene 101                                  | AI573429   | 3.9                       |
| Pld3, phospholipase D3   | AI839365   | 3.7                       |
| Eif4a2, eukaryotic translation initiation factor 4A2                   | AI852357   | 3.7                       |
| Cth, cystathionase (cystathionine gamma-lyase)                         | AI427530   | 3.6                       |
| Wasbp, Wiskott-Aldrich syndrome homolog (human) binding protein        | AI839378   | 3.6                       |
| Gclm, glutamate-cysteine ligase, modifier subunit                      | AA008956   | 3.5                       |
| Rps25, ribosomal protein S25   | AI573593   | 3.4                       |
| Abca1, ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1             | AI323676   | 3.3                       |
| Mt1, metallothionein 1   | AI427514   | 3.3                       |
| Btg1, B-cell translocation gene 1, anti-proliferative                  | AI848411   | 3.2                       |
| Ndr1, N-myc downstream regulated 1                                     | AI852317   | 3.2                       |
| Ube2g2, ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2                             | AI413443   | 3.1                       |

cell에 카드뮴을 10  $\mu$ M 농도로 처리하고 유전자칩을 이용하여 유전자의 발현 패턴을 조사하였다. 동 연구에서는 metallothionein을 비롯하여 heat shock protein 등 그 발현이 증가하는 46종 유전자를 발표하였으며 아울러 high mobility group protein isoform I-C 등 down-regulation 되는 10 종의 유전자를 보고하였다(Yamada *et al.*, 2002). 또한 Shin 등은(Toxicology 2003) 사람 말초혈액세포에 카드뮴을 처리하고 그 발현이 증가되는 유전자를 suppression subtractive hybridization 방법에 의해 확인하였다. 본 연구에서는 레이디히세포에서 카드뮴 노출에 의해 그 발현이 증가되는 유전자와 그 발현이 감소되는 유전자를 정리하여 제시하고 기존의 다른 세포에서의 유전자 발현패턴과 비교함으로써 레이디히세포에서의 카드뮴에 의한 유전자 발현특성을 알아보고자 하였다. Table 2는 카드뮴 처리에 의해 그 발현이 증가되는 유전자중 일부를

정리한 것으로서 표에서 보는 바와 같이 heat shock protein, metallothionein-1, protein kinase, DNA damage inducible transcript 3 등 다양한 유전자가 증가되는 것을 알 수 있었으며 이 가운데 본 연구에서 관심이 집중된 MT-1은 카드뮴처리에 의해 약 300% 증가하는 것으로 나타났다. 또한 thioredoxin reductase가 450% 증가함을 알 수 있는데 thioredoxin reductase는 산화적 스트레스 저감기전으로서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이는 DNA-damage inducible gene, metallothionein과 함께 Leydig cell에 카드뮴을 처리하였을 경우 산화적 스트레스가 증가되었음을 보여주는 또다른 중요한 지표라고 생각된다. 카드뮴에 의해 그 발현이 억제되는 유전자는 Table 3에 나타내었는데 interferon gamma receptor, interleukin 11 receptor 등 세포내 면역능과 관련된 수용체의 발현이 억제되었으며 또한 transcription 및 신호전달과

**Table 3.** Genes which are suppressed by cadmium-treatment in leydig cells

| Genes  | GenBank No | Suppression rate to control |
|--|------------|-----------------------------|
| Ifngr, interferon gamma receptor   | AI467250   | 0.29                        |
| Ivd, isovaleryl coenzyme A dehydrogenase                                       | AI463340   | 0.29                        |
| Ubl3, ubiquitin-like 3   | AI661166   | 0.29                        |
| Sgk2, serum/glucocorticoid regulated kinase 2                                  | AI428788   | 0.29                        |
| Il11ra2, interleukin 11 receptor, alpha chain 2                                | AA980775   | 0.28                        |
| Pcdh7, protocadherin 7   | AI449381   | 0.28                        |
| Araf, raf-related oncogene   | AI155246   | 0.27                        |
| Stat5a, signal transducer and activator of transcription 5A                    | AA763337   | 0.27                        |
| Tcf3, transcription factor 3   | AI324130   | 0.27                        |
| Cyp2c40, cytochrome P450, 2c40   | AI662104   | 0.26                        |
| Stat1, signal transducer and activator of transcription 1                      | AI449540   | 0.26                        |
| Ghitm, growth hormone inducible transmembrane protein                          | AI662243   | 0.25                        |
| Cnot7, CCR4-NOT transcription complex, subunit 7                               | AI851633   | 0.25                        |
| Cdkn2d, cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)              | AA674780   | 0.24                        |
| Crsp6, cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 6 (77 kD) | AI449497   | 0.23                        |
| Pf4, platelet factor 4   | AI120986   | 0.23                        |
| Prodh, proline dehydrogenase   | AI854587   | 0.22                        |
| Hyal2, hyaluronidase 2   | W83533     | 0.22                        |
| Gjb5, gap junction membrane channel protein beta 5                             | AI323309   | 0.20                        |
| Trex1, three prime repair exonuclease 1  | AI414450   | 0.18                        |
| Taf4a, TAF4A RNA polymerase II, TBP-associated factor 135 kDa                  | AI324162   | 0.18                        |
| Tceb3, transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kD)         | AW227601   | 0.16                        |
| Man1b, mannosidase 1, beta   | AA874421   | 0.15                        |
| Stk32, serine threonine kinase 32  | AI413502   | 0.15                        |
| Irf1, interferon regulatory factor 1   | AW213282   | 0.12                        |

관련된 유전자의 발현이 억제되는 것으로 판단되었다. 현재 다양한 유전자의 발현과 그 변화가 카드뮴에 의한 레이디히세포의 기능에 미치는 영향과 어떠한 관계를 갖는지 이에 대한 정확한 해석이나 판단은 내리지 못하고 있다. 향후에는 Table 2와 Table 3에 제시된 유전자를 포함하여 microarray의 결과에 따라 다양하게 반응을 보인 각각의 유전자를 apoptosis, cell signaling, metabolism, growth control 등 다양한 기능영역으로 분류하고 이들 영역에 관여하는 유전자들의 발현이 카드뮴에 의해 어떻게 영향을 받고 있는가에 대해 실험할 계획이다. MT에 비해 보다 강한 발현증가를 보이는 유전자도 매우 많은 것으로 나타났는데 다만 이들이 중금속에 특이적으로 반응하는 유전자로서 바이오마커로 활용될 수 있을 것인지는 현재로서는 판단할 수 없으나 이들 유전자의 발현과 MT 유전자의 변화가 어떻게 상호 연관되는지에 대한 부분도 향후 관심을 가지고 수행될 연구분야라고 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-003-E00280)

## 참고 문헌

- Abel J, Ruiter N and Kuhn-Velten W. Comparative study on metallothionein induction in whole testicular tissue and isolated leydig cells. 1991; 65: 228-234
- Afshari CA, Nuwaysir EF and Barrett JC. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. *Can. Res.* 1999; 59: 4759-4760
- Baker TK, Carfagna MA, Gao H, Dow ER, Li Q, Searfoss GH and TP. Ryan, Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 2001; 14: 1218-1231

- Bunger J, Muller MM, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E and Schulz TG. Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 2000; 15(5): 391–397
- Burczynski ME, McMillian M, Ciervo J, Li L, Parker JB, Dunn RT, Hicken S, Farr S and Johnson MD. Toxicogenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicological Sci.* 2000; 58: 399–415
- Carero A, Hoet PH, Cerschaee L, Schoeters G and Nemery B. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line(A549) and a human monocytic cell line(THP-1). *Environ Mol. Mutagen.* 2001; 37(2): 155–163
- Coyle P, Philcox, JC, Carey LC and Rofe AM. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Science.* 2002; 59: 627–647
- Gardmo C, H Swedlow and A Mode. Growth hormone regulation of rat liver gene expression assessed by SSH and microarray. *Mol Cell. Endocrinol.* 2002; 190: 125–133
- Gong, Q and 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
- Haider SG. Cell biology of leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.* 2004; 233: 181–241
- IARC. Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposure in the glass manufacturing Industry. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 1993; Vol 58, pp. 119–238
- Koike ES, Hirano N, Shimojo and K Takahiro. cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol. Sci.* 2002; 67: 241–246
- Lambert E, Kille P and Swaminathan R. Cloning and sequencing a novel metallothionein I isoform expressed in human reticulocytes. *FEBS Letters* 1996; 389: 210–212
- Lee C, Jeon SH, Na JG and Park K. Sequence analysis of choriogenin H gene of medaka (*Oryzias latipes*) and mRNA expression. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002; 21(8): 1709–1714
- 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
- Nikuka H, Talonpoika T, Kaleva M and Toppari J. Inhibition of hCG-stimulated steroidogenesis in cultured leydig tumor cells by bisphenol A and octylphenols. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999; 157(3): 166–173
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barret JC and Afshari CA. Microarrays Toxicology. The advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinogenesis*, 1999; 24: 153–159
- Park K and Moon CK. Expression of metallothionein mRNA by diesel exhaust particles treated A549 cells. *Kor. J. Env. Toxicol.* 2004; 19(1): 59–64
- Park K and Koo JM. Expression of metallothionein in cadmium treated A549 cell line derived from human lung epithelial cells, *Kor. J. Env. Toxicol.* 2003; 18(1): 15–19
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE and Durnam DM. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 6333–6337
- Pohjola SK, Lappi M, Honkanen M and Savela K. Comparison of mutagenicity and calf thymus DNA adducts formed by the particulate and semivolatile fractions of vehicle exhausts. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003; 42(1): 26–36
- Ren X, Zhou Y, Zhang J, Feng W and Jiao B. Metallothionein gene expression under different time in testicular sertoli and spermatogenic cells of rats treated with cadmium. *Reproductive Toxicol.* 2003; 17: 219–227
- Ryu J, Lee MS, Na JG, Chung K, Song BJ and Park K. Molecular cloning of cytochrome P4501A cDNA of medaka (*Oryzias latipes*) and messenger ribonucleic acid regulation by environmental pollutants, *Env. Toxicol and Chem* 2004; 23(4): 1004–1011
- Schmidt CJ, Jubier MF and Harmer DH. Structure and expression of two human metallothionein-I isoform genes and a related pseudogene. *J Biol. Chem.* 1985; 260(12): 7731–7737
- Shin HJ, Park KK, Lee BH, Moon CK and Lee MO. Identification of genes that are induced after cadmium exposure by suppression subtractive hybridization. *Toxicol.* 2003; 191: 121–131.
- Shiraishi N, Hochadel JF, Coogan TP, Koropatnick J and Waalkes MP. Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of the metallothionein gene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995; 130: 229–236,
- Song KH, Lee K and Choi HS. Endocrine disrupter bisphenol A induces orphan nuclear receptor Nur 77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular leydig cells, 2002; 143(6): 2208–2215



Tsangaris GT, A Botsonis, I Politis and F Tzorlatou -  
Stathopoulou. Evaluation of cadmium-induced transcrip-  
tome alterations by three color cDNA labeling microar-  
ray analysis on a T-cell line. *Toxicology*, 2002; 178:  
135-160

Wang S, Chen J and Lin L. Functional integrity of meta-

lliothionein genes in testicular cell lines, *J. Cellular  
Biochem.* 1994; 55: 486-496

Yamada H and S. Koizum. DNA microarray analysis of  
human gene expression induced by a non-lethal dose of  
cadmium. *Industrial Health*, 2002; 40: 159-166