

Mercuric Chloride에 의한 MDCK 세포의 세포사멸

이주형, 염정호, 권근상

전북대학교 의과대학 예방의학교실

Mercuric Chloride Induces Apoptosis in MDCK Cells

Ju Hyoung Lee, Jung Ho Youm, Keun Sang Kwon

Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine Chonbuk National University.

Objectives : Mercury is a hazardous organ-specific environmental contaminant. It exists in a wide variety of physical and chemical states, each of which has unique characteristics for the target organ specificity. Exposure to mercury vapor and to organic mercury compounds specifically affects the CNS, while the kidney is the target organ for inorganic Hg compounds.

Methods : In this study, mercury chloride (HgCl₂) was studied in a renal derived cell system, i.e., the tubular epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line, which has specific sensitivity to the toxic effect of mercury. MDCK cells were cultured for 6-24 hr in vitro in various concentrations (0.1-100 M) of HgCl₂, and the markers of apoptosis or cell death were assayed, including DNA fragmentation, caspase-3 activity and western blotting of cytochrome c. The influence of the metal on cell proliferation and viability were evaluated by the conventional MTT test.

Results : The cell viability was decreased in a time and concentration dependent fashion: decreases were noted at 6, 12 and 24 hr after HgCl₂ exposure. The increases of DNA fragmentation were also observed in the concentrations from

0.1 to 10 M of HgCl₂ at 6 hr after exposure. However, we could not observe DNA fragmentation in the concentrations more than 25 M because the cells rapidly proceeded to necrotic cell death. The activation of caspase-3 was also observed at 6 hr exposure in the HgCl₂ concentrations from 0.1 to 10 M. The release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol, which is an initiator of the activation of the caspase cascade, was also observed in the HgCl₂-treated MDCK cells.

Conclusions : These results suggest that the activation of caspase-3 was involved in HgCl₂-induced apoptosis. The release of cytochrome c from the mitochondria into the cytosol was also observed in the HgCl₂-treated MDCK cells. These findings indicate that in MDCK cells, HgCl₂ is a potent inducer of apoptosis via cytochrome c release from the mitochondria.

J Prev Med Public Health 2006;39(3):199-204

Key words : Mercuric chloride, Apoptosis, Caspase-3, Cytochrome C

서론

수은의 인체에 대한 유입은 작업환경에서의 노출뿐만 아니라 생물학적 먹이연쇄에 의해 수은이 축적된 식품의 섭취를 통해서도 이루어지며, 치과용 아말감의 사용에 따른 유해성이 보고되는 등 수은 중독은 여전히 보건학적 관심을 불러일으키고 있다 [1-3].

수은은 노출 경로, 용량, 뿐만 아니라 화학적 형태에 따라 그 독성이 다양하게 나타나는데, 간장, 신장 및 신경계 등에 걸쳐 광범위한 독성을 보이며 [3], 면역계에서는 면역활성 [4,5] 또는 면역억제 [6,7] 등의 양면성이 관찰된다.

이 중 수은의 신독성(nephrotoxicity) 기전에 대해서는 정확히 알려져 있지 않지만, 무기수은에 노출 후 수은이온이 글루타시온(glutathione), 시스테인(cysteine) 등의 단백질과 결합한 후, 근위세뇨관세포(renal proximal tubular epithelial cell)내로 공동수송(cotransport)에 의해 유입되고 [8], 일단 세포 내로 유입된 수은이온은 미토콘드리아 탈수소효소(mitochondria dehydrogenase)의 활성도 감소 [9] 및 세극결합(gap junction) 억제 [10], 단백질키나아제 C(protein kinase C)의 조절에 의한 Ca⁺⁺의 증가, 세포내 glutathione 감소 [11,12] 등을 유발한다.

한편, 급성신부전을 일으키는 원인은 허혈성 손상을 비롯하여 다양한 기전에 의

하여 초래되는 것으로 알려져 있으며 [13], 특히 독성손상(toxic injury)은 항생제, 항암제 등의 약물에 의한 손상 및 mercuric chloride(HgCl₂)를 포함한 각종 중금속에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다 [14]. 이러한 신독성 기전은 necrosis 뿐만 아니라 apoptosis(세포사멸)도 관여함이 확인되었고 [15-17], 세포 손상의 정도에 따라 그 반응이 다르게 나타남이 관찰되었다 [18,19]. 또한 여러 연구들에서 신장의 독성손상에 caspase가 관련되어 있음이 보고되는 등 [20-23] 신독성에서의 apoptosis에 대한 관심이 증가하고 있고, HgCl₂ 노출 후 농도에 따른 신장세포의 apoptosis 변화를 관찰한 연구 [19]와 저농도(15 uM)의 HgCl₂에 노출된 OK 세포에서 미세구조의 변화를 관찰한 연구 [24]등이 보고되는 등 HgCl₂에

의한 신독성에 대한 연구가 진행 중이나, nuclear factor-kB(NF-kB)의 역할, Bax/Bcl-2 단백질의 변화와 apoptosis 발생을 유도하는 미토콘드리아내의 cytochrome c 방출 유무 등에 대한 연구는 미비하다.

따라서 본 연구에서는 개(Canis familiaris)의 신세노관상피세포에서 기원한 Mardin Darby Canine Kidney(MDCK) 세포와 대표적인 무기수은인 HgCl₂를 사용하여 수은의 신독성 중 apoptosis와 관련된 기전을 연구하기 위해 세포독성의 정도, DNA 분절을 관찰하고, caspase-3의 활성화, 미토콘드리아로부터 세포질내로 cytochrome c의 방출을 측정하여 수은독성에 관한 분자생물학적 기전을 밝히고, 수은 독성에 대한 생체의 방어체계를 이해하는데 필요한 자료를 제공하고자 한다.

연구재료 및 방법

1. MDCK 세포의 배양

Mardin-Darby canine kidney(MDCK, 한국세포주은행) cells을 CO₂ 세포배양기에서(37 °C, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 DMEM(Sigma Chemical Co., USA) 배지를 2-3일 주기로 교체하며 배양하였다. 세포 생존은 배양이 끝난 후 trypan-blue dye exclusion 방법에 의해 관찰하였다. 각각의 실험에 사용된 시약들은 mercuric chloride(HgCl₂, Sigma Chemical Co., USA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma Chemical Co., USA), caspase-3 assay kit(BD Bioscience, USA) 등이다.

2. 세포생존을 측정

MDCK 세포(1×10⁵/ml)를 96-well plate에 200 µl씩 분주한 후, 세포가 잘 부착될 수 있도록 37 °C에서 24 시간동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. HgCl₂(0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µM)를 처리하여 6 시간, 12 시간, 12 시간 배양 후 수은을 제거하고 12 시간 배양, 24 시간동안 배양한 다음 MTT(5 mg/ml)를 전 well에 25 µl씩 넣어주고, 발색을 위해 37 °C에서 4 시간 동안 보관하였다. 그 후 PBS로 모든 well을 세척하고 살아있는 세포에

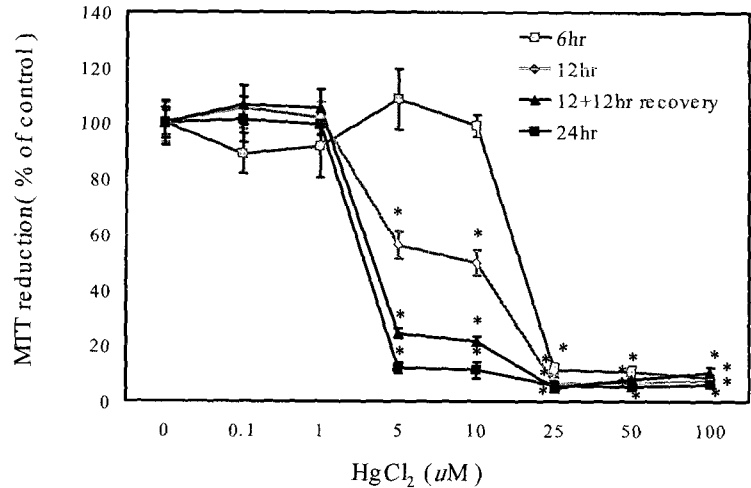


Figure 1. Effects of mercuric chloride(HgCl₂) expressed as MTT reduction(OD, 540 nm) in MDCK cells. Cells were incubated at 37 °C in a CO₂ incubator with various concentration of HgCl₂ for 6 hr, 12 hr, 12 hr and 12 hr recovery(total 24 hr) and 24 hr. The differences between the control(0 µM) and the HgCl₂ exposed groups were tested by unpaired t-test. * significantly different from the corresponding value of the control at p < 0.05.

의해 생성된 보라색 formazan의 용출을 위해 100 µl의 에탄올을 첨가한 후 균일하게 흔들어서 주고, 빛이 차단된 실온에서 15분간 보관한 후 ELISA reader(SpectraCount, Packard Instrument Co., USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험에서의 HgCl₂의 농도와 처리 시간은 0.1 µM - 100 µM의 HgCl₂를 15분 - 72 시간 동안 노출시킨 예비실험을 통하여 결정하였다.

3. DNA 분절 관찰

MDCK 세포 (1×10⁶/ml)를 6-Well plate에 분주하여 37 °C CO₂ incubator에서 24 시간 배양하였다. 그 후 HgCl₂(0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µM)을 처리하여 6, 12 시간 배양 후 DNA laddering 정도를 분석하였다. MDCK 세포를 trypsin-EDTA(10X)로 처리하여 수거한 후 4 °C에서 3,000 rpm 으로 5분간 원심분리하여 세포를 모았다. 상층액을 버리고 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 10% NP-40, 10% SDS)를 첨가하여 65 °C에서 2시간 반시킨 후, 8 M potassium acetate를 첨가하여 얼음에서 1시간동안 반응시켜 세포를 분해하였다. 이렇게 얻은 세포용해물(cell lysate)를 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액만 취해 동량의 phenol/chloroform(1/1)을 첨가하여 충분히 섞어 준 후 12,000 rpm에서 15분간 3회 원심분리하였고, 마지막 상층액에 3 M

Table 1. EC₅₀ values of mercuric chloride in MDCK cells

exposure time	EC ₅₀ [*]	95% CI [†]
6 hr	15.36	12.15 to 19.42
12 hr	6.13	5.53 to 6.78
12 hr +12 hr recovery	3.10	2.75 to 3.50
24 hr	2.63	2.26 to 3.06

^{*} EC₅₀: half effective concentration
[†] CI: confidence interval

sodium acetate와 2배의 에탄올을 첨가하여 -20 °C에서 2시간 이상 반응시킨 후 4 °C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 용액 내의 DNA를 침전시켰다. 얻어진 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 실온에서 건조시켜 TE buffer(pH 8.0)에 녹였다. Proteinase K(100 µg/µl)와 RNase A(10 µg/µl)를 첨가하여 37 °C에서 1시간 반응시킨 후 얻어진 genomic DNA를 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 관찰하였다.

4. Caspase-3 활성화 측정

Caspase-3 활성화를 측정하기 위해서 caspase-3 assay kit(BD Biosciences, USA)를 이용하였다. MDCK 세포(5×10⁵/ml)를 96-well plate에 200 µl씩 분주하고 37 °C에서 24 시간동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 각 농도의 HgCl₂에(0, 0.1, 1, 10, 100 µM) 3, 6, 12 시간 처리한 후, 배지를 버리고 세포가 떨어지지 않도록 조심스럽게 PBS로 빠르게 씻어준 다음 각 well에 4 °C의 cell lysis buffer(10 mM Tris-HCl, 10 mM

NaH₂PO₄/KH₂PO₄(pH 7.5), 130 mM NaCl, 1 % Triton-X-100, 10 mM NaPPi) 50 μ l를 첨가한 후 얼음에 30 분 동안 놓아두었다. 30 분 후 각 well에 HEPES buffer(40 mM HEPES(pH 7.5), 20% glycerol, 4 mM dithiothreitol(DTT)) 200 μ l와 caspase-3의 기질(substrate)인 Ac-DEVD-AMC(1.0 mg/ml in DMSO) 5 μ l를 첨가한 후 37 °C에 1시간동안 놓아두었다. 이 후 caspase-3에 의해 Ac-DEVD-AMC에서 분리된 AMC의 양을 excitation 파장 360 nm, emission 파장 460 nm 으로 Microplate Fluorescence Reader(FLX800, BIO-TEK Instruments, USA)를 사용하여 측정하였다.

5. Cytosol 단백질과 미토콘드리아 단백질 추출

미토콘드리아에 있는 cytochrome c가 세포질(cytosol)로 방출되는지의 여부를 확인하기 위해 HgCl₂에 6시간동안 노출된 MDCK 세포에서 세포질과 미토콘드리아 단백질을 각각 추출하였다.

MDCK 세포(2×10⁶)를 100 mm dish에서 20 시간 동안 배양한 후, HgCl₂(0, 0.1, 1, 10 μ M)에 각각 처리하여 6 시간 배양하였다. 각 조건으로 처리된 세포를 750 X g에서 10분 동안 원심분리하여 수확한 다음, PBS로 세척한 후 buffer A (250 mM Sucrose, 20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 ug/ml aprotinin, and 10 ug/ml leupeptin)에 resuspension 하여 30 분 동안 방치한 후 syringe(26G needle, 20 passages)를 통해 세포를 파쇄 하였다. 다시 750 X g에서 10 분 동안 원심분리하여 세포질인 상층액(cytosolic fraction)을 추출하였다. Pellet은 buffer A 와 cell lysis buffer에 다시 resuspension한 후 30 분 동안 얼음에 방치하였다. 그 후 10,000 X g에서 25 분 동안 원심분리하여 미토콘드리아가 포함된 상층액(mitochondrial fraction)을 얻었다. 추출된 세포질과 미토콘드리아는 냉동상태(-70 °C)에 보관하였다.

6. Western blot analysis

MDCK 세포에서 추출한 세포질과 미토콘

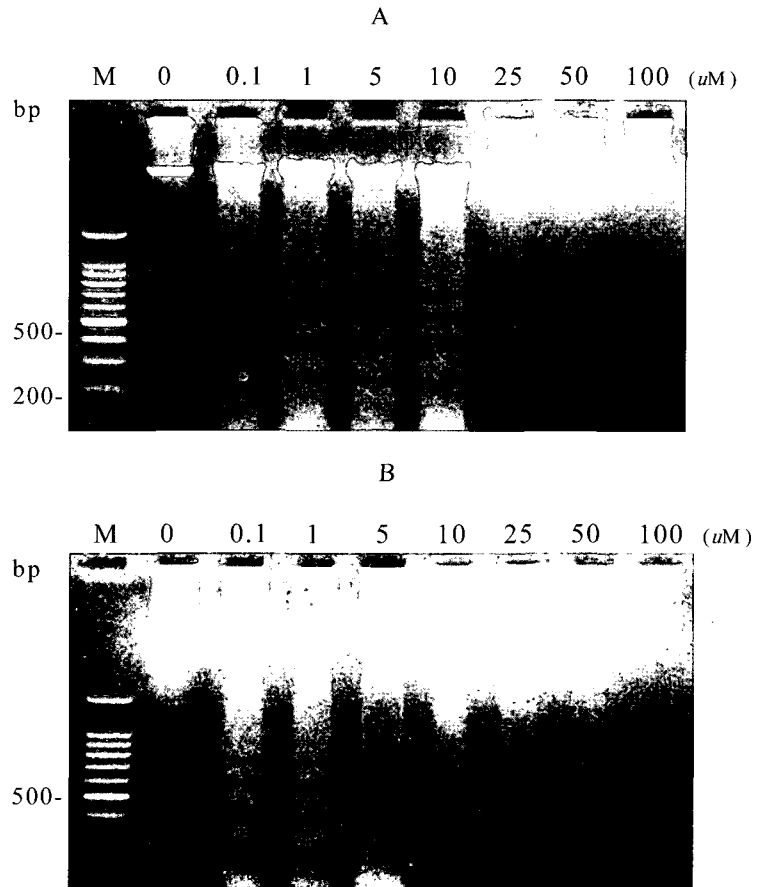


Figure 2. DNA fragmentation. Mercuric chloride induced apoptosis in MDCK cells for 6 hours(A) and 12 hours(B). Apoptosis were analysed of DNA fragmentation by 2 % agarose gel electrophoresis indicated the occurrence of apoptosis. : M; 1Kb DNA ladder.

드리아 단백질을 정량한 후 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (12% gel)를 시행하였다. nitrocellulose membrane에 100 V의 전압으로 3 시간 동안 전사하였다. 전사된 nitrocellulose membrane을 실온에서 5% non-fat dry milk/1.5 % bovine serum albumin/TBS-Tween20 용액으로 1시간동안 blocking하였으며, cytochrome c에 대한 1차 항체 cytochrome c Ab-2 (mouse monoclonal Ab, Neomarkers, Fremont, CA)를 1:1000으로 희석하여 4 °C에서 16 시간 반응시킨 다음 TBS(100mM Tris-Cl pH 7.4, 0.9% NaCl)-Tween20 용액으로 15분간 2회 세척하였다. Anti-mouse Ig G(Amersham Bioscience, UK)를 1:2,000의 배율로 희석하여 1 시간 동안 실온에서 반응시킨 후 TBS-Tween20 용액으로 15 분간 2회 세척하였다. 세척 후 Enhanced chemiluminescence kit(ECL plus Western Blotting Detection Reagents kit, Amersham Bioscience, UK)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

7. 자료처리 및 분석

대조군과 실험군간의 MTT assay 결과 및 caspase-3 활성도 차이는 SPSS 12.0을 이용하여 unpaired t-test로 비교하였고, 대조군(0 μ M HgCl₂)에 비해 MTT의 흡광도를 50% 감소시키는 농도인 EC₅₀(half effective concentration)은 Graphpad Prism 4.0을 이용하여 구하였다.

연구결과

1. Mercuric chloride에 의한 세포 독성

HgCl₂에 6 시간 노출시 세포의 viability를 반영하는 MTT의 흡광도는 25 μ M부터 현저히 감소되고, 12 시간 이상 노출시 5 μ M부터 현저히 감소되어 세포독성효과가 나타남을 알 수 있었다 (Figure 1)(p<0.05). 또한 각 노출 시간에 따른 EC₅₀은 6 시간

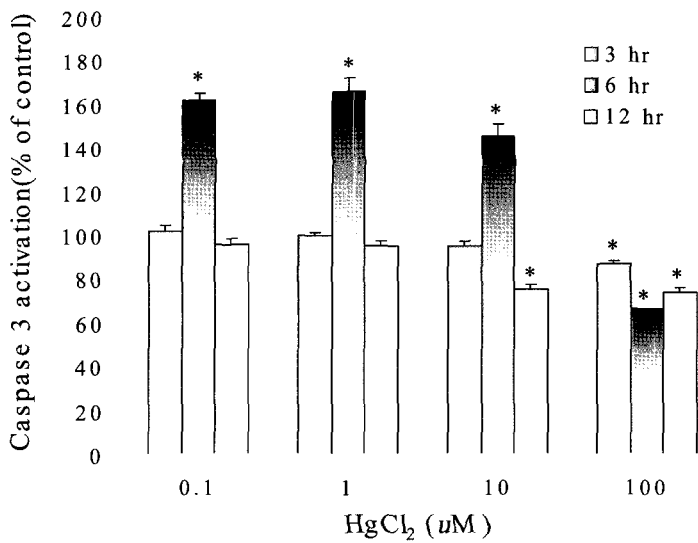


Figure 3. Activity of caspase-3 (% of control) after 3, 6, 12 hours exposure to mercuric chloride(0.1, 1, 10, 100 μM) in MDCK cells. The activity of caspase-3 is expressed as percentage of that of untreated controls. The difference between the control and the HgCl₂ exposed groups were tested by unpaired T test. : * significantly different from the corresponding value of the control at p < 0.05.

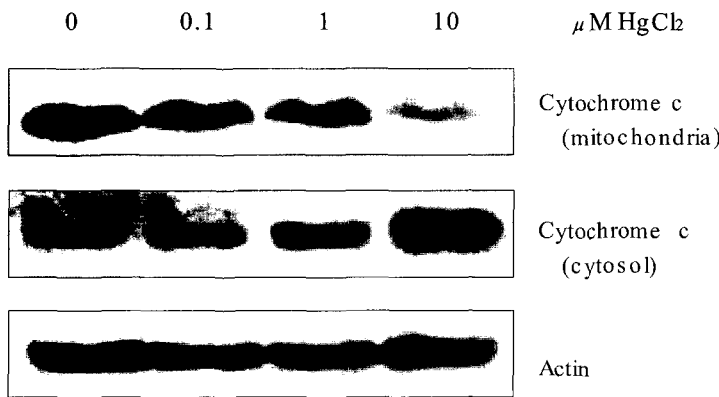


Figure 4. Western blot analysis of cytochrome c after exposure 6 hr of mercury chloride(0, 0.1, 1, 10 μM) in MDCK cells. HgCl₂ treatment caused a concentration-dependent decrease in mitochondrial cytochrome c and a concomitant increase in cytosolic cytochrome c.

15.36 μM, 12 시간 6.13 μM, 12 시간 노출 후 12 시간 회복 시 3.10 μM, 24 시간 노출 시 2.63 μM으로 노출 시간이 경과할수록 EC50은 감소하는 양상을 보였다 (Table 1)(p < 0.05). 즉, MDCK세포에 대한 HgCl₂의 독성은 노출 농도와 시간에 비례하여 세포 독성이 증가하는 양상을 보였다.

2. DNA 분절 관찰

MDCK세포에 HgCl₂를 0.1-100 μM의 농도로 6, 12시간 노출시킨 후 DNA 분절 여부를 확인한 결과 6시간 노출 후에는 0.1, 1, 5, 10 μM의 농도에서 DNA 분절이 확연히 관찰되었고, 25 μM 이상의 농도에서는 DNA 분절이 관찰할 수 없었다 (Figure 2A).

그리고 12시간동안 노출된 세포는 0.1, 1, 5 μM의 농도에서만 DNA 분절이 관찰되고, 10 μM 농도에서는 관찰되지 않았다 (Figure 2B). 같은 조건으로 HgCl₂에 24시간 노출시 모든 농도에서 DNA 분절분석은 관찰되지 않았다 (Data not shown).

3. Caspase-3 활성화

Caspase-3의 활성화 정도는 대조군(0 μM HgCl₂)의 관찰값에 대한 상대적 비율로 나타내었는데, DNA fragmentation이 관찰된 6시간동안 0.1, 1, 10 μM 농도의 HgCl₂에 노출된 세포에서 caspase-3의 활성화가 대조군과 비교하여 증가됨이 관찰되었다 (p < 0.05). 반면에 3시간과 12시간 동안 HgCl₂에 노출

된 세포에서는 caspase-3의 활성화가 관찰되지 않았다 (Figure 3).

4. Cytochrome c

Caspase-3 활성화가 관찰된 0.1, 1, 10 μM의 HgCl₂에 6 시간 동안 노출된 MDCK세포에서 미토콘드리아의 cytochrome c의 유출유무를 확인한 결과 HgCl₂의 농도가 증가할수록 미토콘드리아 내의 cytochrome c의 농도는 감소하고, 동시에 세포질의 cytochrome c의 농도는 증가하는 양상을 보이고 있어, 미토콘드리아의 cytochrome c가 HgCl₂에 노출시 세포질내로 유출됨을 확인하였다 (Figure 4).

고찰

Apoptosis는 necrosis와는 달리 독특한 형태와 생화학적인 특징을 동반하는 유전자 활성화에 의하여 조절받는 과정으로 [25], 이러한 apoptosis의 신호전달에서 중요한 기전 중 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 효소 활성화부위에 모두 cysteine을 가지고 있는 단백질 분해효소로서 지금까지 모두 14가지가 알려져 있으며 이중 caspase-3(CPP32, Yama)의 역할에 대한 관심이 집중되고 있다 [26-28]. 일단 caspase-3가 활성화되면 세포내 많은 주요 구조단백질과 기능단백질 등을 분해하여 [29,30] apoptosis를 일으키는 것으로 알려져 있으며, 특히 여러 신장질환에서는 caspase-3의 활성이 관찰되고 있음을 보고하고 있다 [21,23,31,32]. 이러한 caspase를 활성화하여 apoptosis를 유도하는 기전에는 mitochondrial pathway와 death-receptor pathway 등 적어도 2가지 이상의 기전이 알려져 있는데 [33,34], 특히, mitochondrial pathway에서는 caspase-9과 -3를 활성화시켜 apoptosis를 유도시키는 것으로 알려져 있다 [35-36]. 본 연구 결과 HgCl₂에 노출된 MDCK 세포가 농도와 시간에 의존적으로 세포독성이 증가됨이 관찰되었으며, 25 μM 이상의 고농도에서는 necrosis가 관찰된 반면에, 0.1, 1, 10 μM 등의 저농도에서는 DNA fragmentation, caspase-3 활성화 등이 확인되어 저농도 HgCl₂에 의한 신독성이

mitochondrial pathway를 통한 apoptosis와 관련 있음을 확인할 수 있었다.

한편 기존의 연구 [2,37]에서는 HgCl₂뿐만 아니라 methyl mercury chloride(MeHgCl)도 caspases를 활성화시켜 apoptosis를 유발함이 관찰되었으나, 그 기전에 있어서 MeHgCl에 노출시 cytochrome c의 방출이 관찰된 반면에 HgCl₂의 경우는 cytochrome c의 방출 없이 일어남을 보고하였으며, Araragi 등 [38]은 HgCl₂에 의해 cytochrome c 방출에 의한 apoptosis를 보고하였다. 이와 같이 cytochrome c 방출과 관련하여 상반된 결과가 제시되고 있는데, 이는 mitochondrial pathway가 cytochrome c-dependent pathway와 cytochrome c-independent pathway가 있다는 것과 [39], 연구에 사용된 세포의 종류가 다르다는 것 [37]이 가능한 이유가 될 수 있다. 그간의 연구 [2,37,38]에서는 human T-cell이나 HL-60 세포에서 관찰하였으나, 세포의 종류에 따라 apoptotic pathway가 상이할 수 있으며 [40,41], 급성신부전 [42,43] 특히 수은에 의한 신독성이 [8,19] 신세뇨관상피세포(renal tubular epithelial cell)의 apoptosis와 밀접한 관련이 있음을 고려하여 본 연구에서는 신세뇨관상피세포에서 기원한 MDCK 세포를 이용하였다. 더불어 신세뇨관상피세포에서 HgCl₂에 의한 apoptosis가 cytochrome c의 방출에 의한 것인지를 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. Caspase-3 활성이 관찰된 0.1, 1, 10 uM의 HgCl₂에 6시간 동안 노출 시 미토콘드리아 내의 cytochrome c가 세포질 내로의 방출됨이 확인되어, MDCK 세포에서 HgCl₂에 의해 유도되는 apoptosis는 cytochrome c-dependent pathway를 통해 일어남을 확인할 수 있었다. 그러나 HgCl₂에 의해 유도되는 apoptosis에서 cytochrome c의 방출의 기전에 대하여 어떠한 가설도 제시되고 있는 못하다. 다만 MeHgCl와 HgCl₂의 노출 시 Bcl-2 농도가 각기 다르게 관찰되고 [2], 기존의 연구에서 활성산소기(reactive oxygen species, ROS)와 미토콘드리아 막투과성 변화의 관련이 보고된 바 [44], Bcl-2 및 ROS가 미토콘드리아 내의 cytochrome c의 방출에 관련이 있음을 추정할 수 있다.

비록 본 연구에서는 MDCK 세포 내 Bcl-2 및 ROS의 농도변화를 측정하지 않아 보다 명확한 기전을 제시할 수는 없었으나, 이는 추후 연구에서 진행되어야 할 사항으로 생각된다.

이처럼 신장질환에서 apoptosis의 기전에 관심을 갖는 이유는 apoptosis는 necrosis때와는 달리 독자적인 단계를 거쳐 활성화되므로, 이 중 caspase 활성화 등의 특정 단계를 차단하면 치료적인 측면으로 활용할 수 있을 것으로 예측되기 때문이다. 실제 Daemen 등 [15], Gou 등 [23], Mueller 등 [45]의 caspase inhibitor를 이용하여 염증반응이나 apoptosis를 감소시킨 연구결과는 비록 제한적이나 pan-caspase inhibitor 또는 특이적 caspase-3 inhibitor 등을 이용하여 HgCl₂에 의한 신독성을 감소시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 비록 본 논문에서 HgCl₂에 의한 신세뇨관상피세포의 apoptosis 기전을 명확히 제시하지는 못하였으나, 본 결과를 토대로 수은 독성에 대한 생체의 방어체계를 이해하는데 필요한 자료를 제공하고자 한다.

요약 및 결론

수은은 다양한 형태의 물리적, 화학적 상태로 존재하는 환경유해 물질이다. 특히 수은 증기는 신경계에 주로 독성작용이 나타나고, 무기수은은 신독성이 주로 나타난다.

본 연구에서는 HgCl₂에 노출된 MDCK 세포의 독성작용과 기전에 대하여 연구하기 위해, MTT 분석, DNA 분절분석, caspase-3 활성도, western blot 분석 등을 시행하였다. 연구결과 HgCl₂에 노출된 MDCK 세포는 시간, 농도 의존적으로 독성작용을 나타내었고, 25 μM이상의 HgCl₂에 노출시 necrosis가 유발되는 반면에 상대적으로 저농도인 10 μM이하의 농도에 노출시 apoptosis가 발생됨을 확인하여, 손상정도에 따른 독성반응이 다르게 나타남을 확인하였다. 또한, MDCK 세포에서 HgCl₂에 의해 유도된 apoptosis는 미토콘드리아의 cytochrome c 방출에 의해 caspases cascade가 활성화되어 발생함을 확인하였다.

참고문헌

- Goyer RA, Clarkson TW. Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doull J, Klaassen CD(Eds.) Casarett and Doull's Toxicology. 6th Ed. Pergamon Press Inc., New York. 2001:834-837
- Shenker BJ, Guo TL, Insug O, Shapiro IM. Induction of apoptosis in human lymphoid cells: Evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent. *Environ Res Sec* 2000; 84: 89-99
- Clarkson TW, Magos M, Myers GJ. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *N Eng J Med* 2003; 349: 1731-1737
- Dantas DC, Queiroz ML. Immunoglobulin E and autoantibodies in mercury-exposed workers. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997; 19(3): 383-392
- Hansson M, Abedi-Valugerdi M. Mercuric chloride induces a strong immune activation, but does not accelerate the development of dermal fibrosis in tight skin 1 mice. *Scand J Immunol* 2004; 59(5): 469-477
- Shenker BJ, Berthold P, Decker S, Mayro J, Rooney C, Vitale L, Shapiro IM. Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. II. Alterations in cell viability. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14(3): 555-577
- Worth RG, Esper RM, Warra NS, Kindzelskii AL, Rosenspire AL, Todd RF 3rd, Petty HR. Mercury inhibition of neutrophil activity: Evidence of aberrant cellular signalling and incoherent cellular metabolism. *Scand J Immunol* 2001; 53(1): 49-55
- Zalups RK. Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev* 2000; 52(1): 113-143
- Bohets HH, Van Thielen MN, Van der Biest I, Van Landeghem GF, Dhaese PC, Nouwen EI, De Broe ME, Dierickx PJ. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK1, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney International* 1995; 47(2): 395-403
- Aleo MF, Morandini F, Bettoni F, Tanganelli S, Vezzola A, Giuliani R, Steimberg N, Apostoli P, Mazzoleni G. Antioxidant potential and gap junction-mediated intercellular communication as early biological markers of mercuric chloride toxicity in the MDCK cell line. *Toxicol In Vitro* 2002; 16(4): 457-465
- Yeh JH, Chung HM, Ho CM, Jan CR. Mercury-induced Ca²⁺ increase and cytotoxicity in renal tubular cells. *Life Sci* 2004; 74(16): 2075-2083
- Jeong JH, Kim JY, Koh DH. A study on the

- protective effects of glutathione on cytotoxicity of mercury and cadmium. *Korean J Prev Med* 1999; 32(2): 170-176 (Korean)
13. Ueda N, Kaushal GP, Shah SV. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med* 2000; 108(5): 403-415
 14. Duncan-Achanzar KB, Jones JT, Burke MF, Carter DE, Laird HE 2nd. Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLC-PK1. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277(3): 1726-1732
 15. Daemen MA, van 't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999; 104(5): 541-549
 16. Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC. Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest* 2001; 108(9): 1291-1298
 17. Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Koh JS, Valeri R, Levine JS. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F693-706
 18. Feldenberg LR, Thevananther S, del Rio M, de Leon M, Devarajan P. Partial ATP depletion induces Fas- and caspase-mediated apoptosis in MDCK cells. *Am J Physiol* 1999; 276: F837-846
 19. Stacchiotti A, Borsani E, Rodella L, Rezzani R, Bianchi R, Lavazza A. Dose-dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney. *Ultrastruct Pathol*. 2003; 27(4): 253-259
 20. Van De Water B, Tijdens IB, Verbrugge A, Huigsloot M, Dihal AA, Stevens JL, Jaken S, Mulder GJ. Cleavage of the actin-capping protein alpha-adducin at Asp-Asp-Ser-Asp633-Ala by caspase-3 is preceded by its phosphorylation on serine 726 in cisplatin-induced apoptosis of renal epithelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275(33): 25805-25813
 21. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF, Wagner B, Furness PN, El Nahas AM. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002; 62(4): 1301-1313
 22. Al-Ghamdi SS, Raftery MJ, Yaqoob MM. Organic solvent-induced proximal tubular cell toxicity via caspase-3 activation. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003; 41(7): 941-945
 23. Guo R, Wang Y, Minto AW, Quigg RJ, Cunningham PN. Acute renal failure in endotoxemia is dependent on caspase activation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(12): 3093-3102
 24. Carranza-Rosales P, Said-Fernandez S, Sepulveda-Saavedra J, Cruz-Vega DE, Gandolfi AJ. Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology* 2005; 210(2-3): 111-121.
 25. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14(3): 126-130
 26. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptor. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439-459
 27. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54(5): 427-445
 28. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381): 1312-1316
 29. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(29): 20049-2052
 30. Singh AB, Kaushal V, Megyesi JK, Shah SV, Kaushal GP. Cloning and expression of rat caspase-6 and its localization in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2002; 62(1): 106-115
 31. Yang B, El Nahas AM, Thomas GL, Haylor JL, Watson PF, Wagner B, Johnson TS. Caspase-3 and apoptosis in experimental chronic renal scarring. *Kidney Int* 2001; 60(5): 1765-1776
 32. Ecker T, Melnikov VY, Stanley M, Korular D, Lucia MS, Schrier RW, Edelstein CL. Caspases, Bcl-2 proteins and apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2002; 61(4): 1220-1230
 33. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805): 770-776
 34. Kaushal GP. Role of caspases in renal tubular epithelial cell injury. *Semin Nephrol* 2003; 23(5): 425-431
 35. Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a Xenopus cell-free apoptosis system. *EMBO J* 1997; 16(15): 4639-4649
 36. Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 1999; 274(32): 22686-22692
 37. Guo TL, Miller MA, Shapiro IM, Shenker BJ. Mercuric chloride induces apoptosis in human T lymphocytes: evidence of mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 153(2): 250-257
 38. Araragi S, Kondoh M, Kawase M, Saito S, Higashimoto M, Sato M. Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial-dependent pathway in human leukemia cells. *Toxicology* 2003; 184(1): 1-9
 39. Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, Miura Y, Nishihara T, Tohyama Y, Yoshida Y, Uchiyama T, Kawanishi S. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 2001; 61(7): 2878-2884
 40. Hishita T, Tada-Oikawa S, Tohyama K, Miura Y, Nishihara T, Tohyama Y, Yoshida Y, Uchiyama T, Kawanishi S. Caspase-3 activation by lysosomal enzymes in cytochrome c-independent apoptosis in myelodysplastic syndrome-derived cell line P39. *Cancer Res* 2001; 61(7): 2878-2884
 41. Perkins CL, Fang G, Kim CN, Bhalla KN. The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60(6): 1645-1653
 42. Olsen TS, Olsen HS, Hansen HE. Tubular ultrastructure in acute renal failure in man: epithelial necrosis and regeneration. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406(1): 75-89
 43. Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, Danoff TM, Yamasaki Y, Egidio J, Neilson EG. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* 2000; 57(3): 969-981
 44. Shenker BJ, Pankoski L, Zekavat A, Shapiro IM. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status. *Antioxid Redox Signal*. 2002; 4(3): 379-389
 45. Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78(9): 1267-1273