

Cyanate Induces Apoptosis of Rat Glioma Cell Line

Hye-Jung Choi* and Sang-Hee Lee

Department of Emergency Medical Technology, Gyeongbuk Provincial College, Yecheon 36830, Korea

Received September 27, 2016 / Revised February 7, 2017 / Accepted February 17, 2017

The patient with end-stage renal disease show several nervous complications. The factors contributing to the nervous complications are still incompletely characterized. Cyanate, known as one of the uremic toxins, is derived spontaneously from urea. To investigate the mechanism of cyanate-induced effect on C6 glioma cells, the glioma cells were treated with 0, 1, 5, 10, 20 and 40 mM cyanate. There was a dose-dependent decrease in cell viability and the decreased number of cell was observed in glioma cells by treatment with cyanate. Western blot showed the down-regulation of procaspase-3, which means up-regulation of caspase-3, and the up-regulation of caspase-8, but the down-regulation by cyanate. In addition, cDNA microarray showed 934 down-regulated genes and 165 up-regulated genes on 1,099 genes in cyanate treated group. Treatment with cyanate led to 16 down-regulated genes and 6 up-regulated genes on apoptosis category, and especially heat shock 70 kD protein 1A gene on the category of apoptosis was significantly up-regulated. These results suggest that cyanate can induce apoptosis through caspase-8 and caspase-3 in glioma cells and decrease of gene expression including apoptosis category in glioma cells. These effects of cyanate may play a role in the nervous complications of patient with end-stage renal disease.

Key words : Apoptosis, cyanate, end-stage renal disease, glioma cell, nervous complications

서 론

시안산은 정상적으로 신장에서 물질이 대사되는 과정에서 생성되는 대사산물 중의 하나인 요소가 시안산과 암모니아로 전환되어 생성되는 물질로 알려져 있다[18]. 그러나 말기신부전 환자의 경우 요소, 구아니딘, 페놀, 유기산 및 중간 대사산물인 단백질과 아미노산의 분해산물이 체내에 요독 물질로 축적되어 각종 대사에 영향을 끼친다. 특히, 말기 신부전 환자의 요소 혈중 농도는 정상인에 비해 증가할 뿐만 아니라 요소에서 유도되는 시안산의 혈중 농도도 정상인에 비해 증가하는 것으로 알려져 있다[9]. 따라서 시안산과 말기 신부전 환자에서 나타나는 여러 합병증의 관련성이 다양한 관점에서 연구의 대상이 되고 있다. Park 등[17]은 시안산은 말기 신부전 환자에서 흔히 동반되는 합병증인 빈혈의 원인 물질로서 시안산에 의한 적혈구 생성인자의 활성이 억제된다고 하였고, Mun 등[16]은 시안산이 복막에 만성 염증을 유발하는 하나의 요소로 작용하여 투석 환자의 복막손상에 관여한다고 하였다. 시안산은 아미노산과 펩티드와 같은 단백질의 N-말단과 결합하여 조직의 기능과 형태를 비가역적으로 변화시키는 카르바밀화

반응이 일어나며[11], 이 반응은 만성 신부전 환자의 혈관내피 세포의 기능저하에 따른 심혈관질환[3] 및 직장암의 세포자멸화를 유도[23]한다고 한다. 세포자멸사는 다세포생물에서 프로그래밍된 세포의 사멸로 세포괴사와는 달리 세포성분이 밖으로 흘러나가지 않으므로 면역반응을 유발하지 않아 주위에 염증반응을 일으키지 않고 세포가 분해되어 소멸되는 과정을 거친다[8, 14]. 이러한 세포자멸사는 배아발생, 변태, 면역계와 신경계의 발달이나 조직 위축 및 종양의 퇴행과 같은 여러 생리학적 및 병리학적 과정에서 흔히 관찰할 수 있다[21]. 또한, 부적절한 세포자멸사는 면역결핍 질환, 자가면역 질환, 알츠하이머 질환, 심근경색 및 뇌졸중과 같은 허혈성 질환, 암질환과 여러 가지 종양 유발성, 과증식성 피부질환 등을 가져온다[2]. 현재까지 알려진 수많은 세포자멸사는 관련 유전자 중에서도 단백질 분해 효소의 활성과 관련 깊고, 특히 시스테인계 단백질분해 효소인 caspase가 세포자멸사의 중심적인 요소로 알려져 있다[7]. Caspase는 약 14종의 isoform이 알려져 있으며, 세포자멸사를 억제하고 있는 단백질들을 분해하여 세포자멸사를 진행시키는 역할을 한다. 이들 가운데, caspase-8은 Fas와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 수용체의 세포질 부위에 결합하는 것으로, 여러 caspase 중에서 세포막에 가장 가까이 위치한다[6]. Caspase-8이 세포자멸 유도신호복합체에 결합한 후 활성화되면 개시 caspase로 작용하여 procaspase-3를 caspase-3로 전환시킨다. Caspase-3가 활성화되면 기질 단백질을 분해를 일으키고 세포자멸사를 유발하게 된다[5].

한편, 만성 신부전 환자의 신경학적 합병증에 의한 증상은 단순한 감각이상 및 손의 진전과 같은 경미한 것에서부터 의

*Corresponding author

Tel : +82-54-650-0286, Fax : +82-54-650-0259

E-mail : irisrei@naver.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

식혼탁, 발작, 요독성 뇌증 혼수 및 치매 등이 나타난다[20]. 특히, 요독성 뇌병증의 전형적인 증상인 간질발작이 발생될 수 있으며, 이는 요독증에 의한 신경근육 요소계의 불안정에 의해 경련의 역치가 낮아짐으로써 나타나는 증상이다[22]. Kimanil 등[10]에 의하면 시안산은 실험동물의 뇌 인지기능을 손상시킴으로써 업무기억력을 저하시킨다고 하였으며, 시상하부의 학습능력과 기억력에 관여하는 장기 기억력에도 악영향을 미칠 수 있다고 한다. 그러나 아직까지 시안산이 요독성 뇌병증의 원인물질로써 신경아교종 세포 자멸화와 관련한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 시안산이 요독성 뇌병증의 원인 물질로 작용하는지 확인하고자 신경아교종 세포와 시안산을 반응시켜 세포자멸사와 관련한 인자들의 변화를 알아보려고 한다.

재료 및 방법

시약

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), trypsin-EDTA 및 fetal bovine serum (FBS)은 WelGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였고 penicillin-streptomycin은 Hyclone (Logan, UT, USA) 제품을 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 및 시안산나트륨은 Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을, caspase-8, procaspase-3, Bax, Bcl-2, inhibitor of apoptosis protein (IAP) 및 이차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) kit는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) 제품을, 단백질 정량은 Bio-Rad DC kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하였다. 그의 일반시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

시안산의 제조

시안산은 1 M 농도가 되도록 phosphate buffered saline (PBS)에 녹여 원액으로 사용하였으며, 실험에서는 DMEM 배지로 희석하여 필요한 농도로 세포에 처리하였다.

세포배양

신경아교종 세포주(rat, glial cell)인 C6 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구매하여 사용하였고 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. 세포는 3일 간격으로 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 계대배양 하였다.

세포 독성 검사

시안산에 의한 세포독성은 MTT의 대사 환원에 근거한 MTT 분석법으로 측정하였다. 신경아교종 세포는 96-well plate에

10,000 cells/well의 밀도로 접종한 후, 세포가 plate 바닥에 부착하면 2%의 FBS가 함유된 배지에 시안산을 0-40 mM의 농도로 24시간 동안 처리하고, 마지막 4시간 동안 20 µl의 MTT 용액(5 mg/ml)을 각 well에 첨가하여 37°C에서 반응시켰다. MTT에 의해 형성된 보라빛의 침전물인 formazan 결정은 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 µl를 첨가하여 녹인 후, microplate reader 550 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)으로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot

시안산을 처리한 세포를 회수한 후, 세포 용해 완충액(10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 130 mM NaCl, 1% Triton X-100)과 단백질 분해효소 억제제 혼합액(0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml leupeptin, 20 U/ml aprotinin, 1 mM NaF)을 넣고 4°C에서 30분간 방치하였다. 다음 1,000× g로 4°C에서 15분간 원심한 후 상청액을 취하였고, 단백질 정량 kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분리한 단백질의 농도를 정량하였다. 얻어진 단백질 분획의 일정량을 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후에 immobilon-PVDF transfer membrane (Milipore, Bedford, MA, USA)으로 전기이동을 실시하였다. 그 membrane을 5% skim milk가 함유된 TBS-T 용액(20 mM Tris (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.05% Triton X-100)으로 상온에서 1시간 blocking한다. 그리고 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후 ECL kit를 이용하여 발광시키고, autoradiography를 실시하였다. 일차항체로는 caspase-8, procaspase-3, Bax, Bcl-2 및 IAP에 대한 항체를 사용하였다.

RNA 분리

20 mM의 시안산을 처리한 세포를 회수한 후, 1 ml의 TRIzol 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 균질화시킨 후, 0.2 ml의 chloroform을 가하여 실온에 5분간 방치한 다음 15초간 혼합하여 실온에서 10분간 방치하였다. 균질액은 4°C에서 1,000× g로 15분간 원심분리하여 유기용매층의 DNA와 변성된 단백질을 제거하고, 수용액층의 RNA를 얻었다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후, 4°C에서 1,000× g로 8분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA에 75% ethanol 1 ml을 가한 뒤, 4°C에서 500× g로 5분간 원심분리하여 RNA를 세척한 다음 5분간 자연건조 시켰다. 건조된 RNA를 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 처리된 물로 녹인 후, 정량하여 시료로 사용하였다.

cDNA 유전자 미세배열 분석

cDNA 유전자 미세배열 분석(microarray)는 (주)디지털지노믹스사(Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 즉, 20 µg의 RNA에 2 µl의 oligo (dT) primer (0.5 µg/µl)를 첨가하고 DEPC가 처리

된 물로 최종 31 μ l로 맞추어 잘 혼합한 뒤 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, 얼음으로 1분간 식히고 7,500 \times g로 5분간 원심 분리하여 RNA 혼합액을 얻었다. RNA 혼합액에 5 \times first strand buffer 10 μ l, 0.1 M DTT 5 μ l, Rnasin 1 μ l, 50 \times amino-allyl-dNTP mix 1 μ l, SuperScript II (200 U/ μ l) 2 μ l를 첨가하여 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. RNA 혼합액에 1 M NaOH 16.5 μ l와 0.5 M EDTA 16.5 μ l를 첨가하여 잘 섞은 다음 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 RNA를 가수분해하고, 1 M HCl 16.5 μ l를 가하여 중화시켰다. cDNA 반응액을 Microcon YM-30 (Millipore, Bedford, MA, USA)로 정제하여 cDNA를 얻고 곧 진공으로 건조하였다. cDNA는 증류수와 1 M sodium carbonate buffer로 녹인 후, NHS-ester Cy dye 2 μ l를 첨가하여 실온의 암실에서 1시간동안 반응시켰다. 반응액을 QIAquick PCR purification kit로 정제한 다음 진공으로 건조하였다. 건조된 시료를 hybridization buffer 220 μ l로 녹인 후, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓은 다음 30초 동안 침강시켰다. Hybridization chamber에 slide를 놓고 slide 표면위의 표식된 지점에 시료를 점적한 후, coverslip으로 덮어 42 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. Hybridization된 slide는 세척한 다음 건조시켜 Scanarray Lite (PerkinElmer Life Science, Boston, MA, USA) 장치와 GenePix Pro 3.0 프로그램(Axon Instruments, Union city, CA, USA)을 이용하여 스캔하였다.

통계학적 분석

모든 실험결과를 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 대조군과 실험군 사이의 비교는 SPSS 19.0 프로그램을 이용하여 t-test 방법으로 검증하였다. 통계학적 유의수준은 *p*값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

시안산이 신경아교종 세포의 생존에 미치는 영향

시안산이 신경아교종 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mM 농도의 시안산을 24시간 처리한 후, MTT 분석법으로 세포 생존능을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 1 mM 농도의 시안산은 대조군과 유의적인 차이가 없었으나, 5 mM 이상의 농도에서는 세포 생존능이 유의하게 (*p*<0.001) 감소하였으며 세포 생존능은 시안산의 처리 농도가 높을수록 농도 의존적으로 감소하였다.

시안산이 caspase-8 발현에 미치는 영향

시안산이 caspase-8 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mM 농도의 시안산을 신경아교종 세포에 24시간 동안 처리한 후, 세포로부터 단백질을 추출하고 western blot을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 시안산의 처리 농도에 비례하여 세포자멸사를 유발 및 진행시키는데 추가 되는 caspase-8의 발현은 증가하였다.

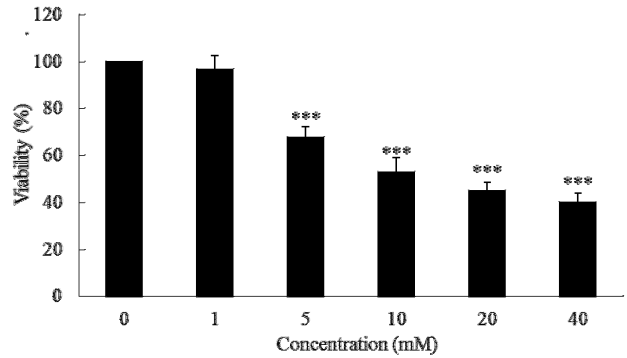


Fig. 1. Effect of cyanate on the growth of glioma cells. Glioma cells (1×10^4 cells/well) were treated with 0, 1, 5, 10, 20 and 40 mM cyanate in DMEM medium containing 2% FBS for 24hr. The growth inhibition was measured by the MTT assay. Values are expressed as mean \pm SD. ***: *p*<0.001, compared with control.

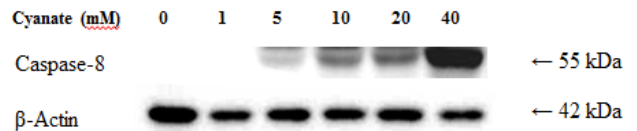


Fig. 2. Effect of cyanate on caspase-8 expression in glioma cells. Glioma cells were treated with cyanate (0, 1, 5, 10, 20 and 40 mM) for 24 hr. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and blots were probed with antibodies against caspase-8, and β -actin. The presented results are representative of three independent experiments.

시안산이 procaspase-3 발현에 미치는 영향

시안산이 procaspase-3 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mM 농도의 시안산을 신경아교종 세포에 24시간 동안 처리한 후, 세포로부터 단백질을 추출하고 western blot을 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 시안산의 처리 농도에 비례하여 세포자멸사에 관여하는 procaspase-3의 발현은 감소하였다.

시안산이 Bax, Bcl-2 및 IAP 발현에 미치는 영향

시안산이 Bax, Bcl-2 및 IAP 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0, 1, 5, 10, 20 및 40 mM 농도의 시안산을 신경아교종

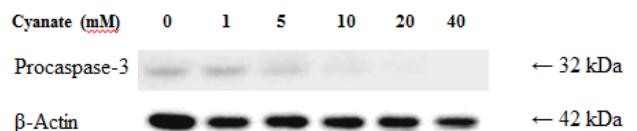


Fig. 3. Effect of cyanate on procaspase-3 expression in glioma cells. Glioma cells were treated with cyanate (0, 1, 5, 10, 20 and 40 mM) for 24 hr. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and blots were probed with antibodies against caspase-3, and β -actin. The presented results are representative of three independent experiments.

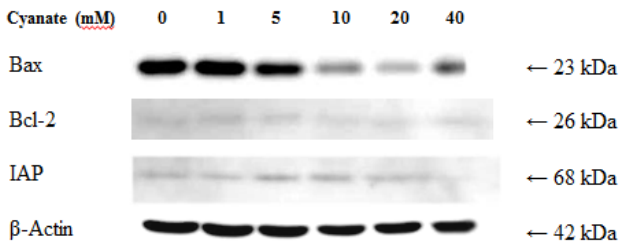


Fig. 4. Effect of cyanate on Bax, Bcl-2 and IAP expression in glioma cells. Glioma cells were treated with cyanate (0, 1, 5, 10, 20 and 40 mM) for 24 hr. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE, and blots were probed with antibodies against Bax, Bcl-2, IAP and β -actin. The presented results are representative of three independent experiments.

세포에 24시간 동안 처리한 후, 세포로부터 단백질을 추출하고 western blot을 실시한 결과는 Fig. 4와 같다. 시안산의 처리 농도에 비례하여 세포자멸사를 억제하는 인자인 Bax 발현은 감소하였으나, Bcl-2 및 IAP의 발현은 명확히 확인할 수 없었다.

시안산이 유전자 발현 변화에 미치는 영향

20 mM의 시안산을 처리한 후, 신경아교종 세포의 RNA를 추출하여 유전자 발현 변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다.

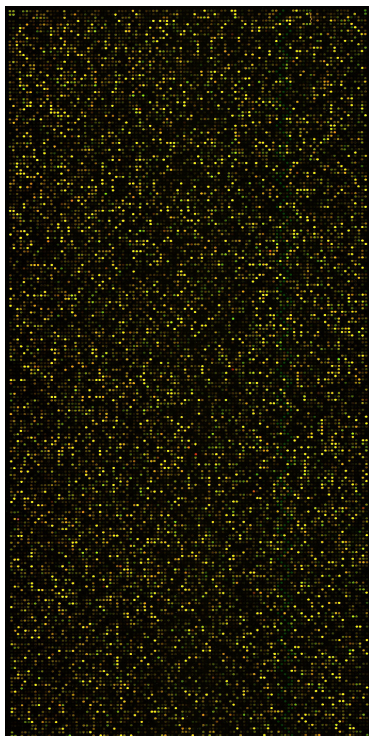


Fig. 5. The scanned images of cDNA microarray in 20 mM cyanate treated glioma cells. Glioma cells were treated with 0 and 20 mM cyanate for 24 hr. RNA was isolated from the cells. Up- or down-regulated genes were observed red or green color in cDNA microarray analysis.

즉, cy3 염색(대조군)에 의한 신호(녹색)와 cy5 염색(시안산 처리군)에 의한 신호(붉은색)를 중첩한 그림으로, 유전자 발현이 증가했을 때는 붉은색을, 유전자 발현이 감소했을 때는 녹색을 나타내었다. 노란색은 변화가 없음을 나타내며, 분석기의 값을 초과했을 때는 흰색을 나타내었다. 총 20,559 종의 유전자 발현을 조사하여 대조군에 비해 2배 이상 증가 및 0.5배 이하 감소의 변화를 나타내는 1,099 종의 유전자를 비교하였다. 유전자 발현이 증가된 유전자는 165 개이었으며, 감소된 유전자는 934 개이었다. Table 1은 발현이 증가 또는 감소된 유전자를 25 개의 기능적인 범주로 분류하였다. 세포 생리 과정 관련 유전자에서 증가된 유전자의 수는 33 개, 감소된 유전자의 수는 119 개로 가장 큰 변화를 나타내었다. 또한 세포자멸사 관련 유전자에서 증가된 유전자의 수는 6 개, 감소한 유전자의 수는 16 개이었고, 세포주기 관련 유전자에서 증가된 유전자의 수는 4 개, 감소한 유전자의 수는 11 개이었다.

특히 세포자멸사 관련 증가된 유전자 가운데 heat shock 70 kD protein 1A는 9.657배의 현저한 증가를 나타내었고, 그 다음으로 growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha가 2.736배, 그리고 heme oxygenase (decycling) 1이 2.699 배의 증가를 나타내었다(Table 2). 세포자멸사 관련 감소된 유전자 중에서는 Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3이 0.266배의 가장 큰 감소를 나타내었고, 그 다음으로 tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9가 0.280배, 그리고 caspase 6이 0.284배의 감소를 나타내었다 (Table 3).

세포주기 관련 증가된 유전자 가운데 polo-like kinase 2 (Drosophila)이 2.916배의 가장 큰 증가를 나타내었고, 그 다음으로 growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha가 2.736배, 그리고 prostaglandin-endoperoxide synthase 2가 2.311배의 증가를 나타내었다(Table 4). 세포주기 관련 감소된 유전자 중에서는 mitogen-activated protein kinase kinase 8이 0.293배의 가장 큰 감소를 나타내었고, 그 다음으로 B-cell translocation gene 3이 0.326배, 그리고 pre-B-cell colony enhancing factor 1이 0.422배의 감소를 나타내었다(Table 5).

고 찰

시안산이 요독성 뇌병증의 원인 물질로 작용하는지 확인하고자, 신경아교종 세포에 시안산 처리 농도를 0, 1, 5, 10, 20, 40 mM로 증가시킬수록 신경아교종 세포의 생존율이 유의하게 감소하였다(Fig. 1). 또한, 시안산이 신경아교종 세포의 세포자멸사에 영향을 미치는지 확인하기 위해 관련한 인자들의 변화를 확인한 결과 caspase-8의 증가 및 procaspase-3의 감소가 관찰되었다(Fig. 2, Fig. 3). Caspase-8의 증가는 caspase cascade에 의한 caspase-3의 활성화를 의미하며, 또한 procas-

Table 1. Functional classification of up- or down-regulated genes of 20 mM cyanate treated glioma cells

Category	Up-regulated genes	Down-regulated genes
Angiogenesis	2	6
Apoptosis	6	16
Cell Cycle	4	11
Cell Death	4	14
Cellular Physiological Process	33	119
Chemokines & Receptors	-	2
Common Cytokine	1	7
DNA Damage Signaling Pathway	2	-
Endothelial Cell Biology	3	10
Extracellular Matrix and Adhesion Molecules	-	5
Immune Response	-	7
Inflammatory Cytokines & Receptors	-	9
NFkB Signaling Pathway	3	8
p53 Signaling Pathway	1	10
Response To Stress	8	11
Signal Transduction	9	32
Signal Transduction PathwayFinder	2	13
TGFb BMP Signaling Pathway	3	9
Th1-Th2-Th3	1	5
Toll-Like Receptor Signaling Pathway	2	6
Toxicology & Drug Resistance	12	11
Transcription	7	26
Wnt Signaling Pathway	-	9
Others	62	588
Total (1,066)	165	934

The genes were selected as significant when the ratio of mRNA levels were more than 2.0 or less than 0.5 in cDNA microarray analysis.

Table 2. Up-regulated gene profiles of 20 mM cyanate treated glioma cells on apoptosis category

Gene name	Probe ID	Fold
Heat shock 70 kD protein 1A	A_42_P493162	9.657
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	A_43_P12397	2.736
Heme oxygenase (decycling) 1	A_43_P11472	2.699
Heme oxygenase (decycling) 1	A_42_P652275	2.484
Activating transcription factor 5	A_42_P665879	2.206
DNA-damage inducible transcript 3	A_43_P12400	2.174

pase-3의 감소는 caspase-3의 활성이 상대적으로 증가되었음을 보여주는 것이다. 이상의 결과로 신경아교종 세포는 시안산의 농도 의존적으로 세포자멸사를 일으키며, 이 과정은 caspase-8 및 caspase-3와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 이런 소견은 황[6]의 연구에서 시안산이 조골세포의 자멸사 과정 중 caspase-8 및 caspase-3가 관여하였다는 결과와 일치하였다. Bcl-2 유전자군은 다양한 생리학적, 병리학적인 상태에서 세포자멸사를 조절하는 특별한 단백질들을 전사하는데, 이들 중 Bax는 세포자멸사를 활성화시켜 세포의 사멸을 촉진시키며 Bcl-2는 이를 방해하는 역할을 하는 것[4]으로 알려져 있다. 따라서 이런 단백질들의 발현여부에 따라 신경세포들이 자멸하거나 살아남게 된다[1]고 한다. 그리고 세포 단위에서

세포자멸사를 조절하는 단백질인 IAP 유전자[15]의 발현 및 기능 증가는 세포 생존 능력과 항암제에 대한 저항성을 증가시키는 반면, IAP 유전자의 발현 감소는 여러 자극에 대한 세포자멸사의 증가를 유도한다[19]. 따라서, 시안산의 처리 농도가 증가할수록 caspase-8에 의해 활성화되는 Bax 단백질은 caspase-8의 증가에도 오히려 감소하였고(Fig. 4), Bcl-2 및 IAP은 명확히 관찰되기 어려우나 감소된 것으로 생각되며, 이는 Bcl-2와 IAP가 신경아교종 세포의 세포자멸사에 관여한 것으로 생각된다. 또한 여러 유전자의 발현을 알아보기 위해 비교적 간단하게 동일한 과정을 거쳐 알아볼 수 있는 방법인 cDNA 유전자 미세배열 분석을 하였다. cDNA 유전자 미세배열 분석은 한 번의 실험으로 특이한 환경에만 발현하는 유전

Table 3. Down-regulated gene profiles of 20 mM cyanate treated glioma cells on apoptosis category

Gene name	Probe ID	Fold
Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	A_43_P11619	0.500
Transformation related protein 63	A_43_P15281	0.492
Myeloid cell leukemia sequence 1	A_43_P11069	0.488
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	A_43_P15259	0.481
B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	A_43_P14062	0.470
Hormone-regulated proliferation associated protein 20	A_43_P21751	0.469
"Rattus norvegicus tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin) (Tnfrsf11b), mRNA [NM_012870]"	A_42_P777115	0.457
Caspase 1	A_43_P11551	0.403
Phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1	A_42_P835950	0.394
Inhibitor of apoptosis protein 1	A_43_P12384	0.387
Reticulon 4	A_42_P481213	0.372
Interleukin 6	A_43_P11475	0.362
TGFB inducible early growth response	A_43_P12535	0.361
Caspase 6	A_43_P12673	0.284
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	A_43_P17932	0.280
Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3	A_42_P611883	0.266

Table 4. Up-regulated gene profiles of 20 mM cyanate treated glioma cells on cell cycle category

Gene name	Probe ID	Fold
Polo-like kinase 2 (Drosophila)	A_43_P15327	2.916
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	A_43_P12397	2.736
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	A_43_P11872	2.311
DNA-damage inducible transcript 3	A_43_P12400	2.174

Table 5. Down-regulated gene profiles of 20 mM cyanate treated glioma cells on cell cycle category

Gene name	Probe ID	Fold
Phospholipase C, beta 1	A_42_P571216	0.500
Caspase 3, apoptosis related cysteine protease	A_43_P11619	0.500
Polo-like kinase 1 (Drosophila)	A_42_P643500	0.497
Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	A_42_P777177	0.494
Transformation related protein 63	A_43_P15281	0.492
Cyclin A2	A_43_P15962	0.491
Cyclin-dependent kinase 7 (homolog of Xenopus MO15 cdk-activating kinase)	A_43_P15773	0.449
Jun oncogene	A_42_P741027	0.447
Pre-B-cell colony enhancing factor 1	A_43_P18467	0.422
B-cell translocation gene 3	A_43_P12009	0.326
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	A_43_P15587	0.293

자를 찾을 수 있을 뿐만 아니라 발현 정도 까지도 쉽게 알 수 있어, 만성질환 또는 성인병을 유발하는 유전인자나 암 유발 유전자를 찾는데 매우 유용하게 사용된다[13]. 변화를 보인 총 1,099 종의 유전자 중에서 934 개의 유전자가 감소하였고 증가된 것은 165 개였다(Table 1). 가장 많은 수의 변화를 보인 세포 생리 과정 관련 유전자 중에서 증가된 유전자의 수는 33 개였으나, 감소된 유전자는 119 개로 나타났다(Table 1). 특히 세포자멸사 관련 유전자에서도 증가한 유전자는 6개였으나 감소한 유전자는 16 개로 나타났다(Table 1). 시안산은

신경아교종 세포의 유전자들의 발현을 감소시키는 것으로 생각되며, 이러한 점이 말기 신부전 환자의 뇌병증에도 영향을 줄 것으로 생각된다. 그러나 세포자멸사 관련되는 유전자 중 heat shock 70 kD protein 1A는 9.657배의 현저한 증가를 보이며 1,099 종의 유전자 중에서 가장 큰 폭의 변화를 나타내었다 (Table 2). Heat shock protein은 스트레스 단백질이라고도 불리는 샤페론(chaperone)으로 세포가 고온으로 자극되었을 때 다량으로 생성되는 세포질 내 단백질군으로 세포의 대사장애, 독성물질, 또는 물리적인 자극 등에 의해서도 생성이 증가된

다[12]. 그 중에서도 비교적 폭넓게 연구되어 온 heat shock 70 kD protein 1A은 세포의 내적 혹은 외적인 여러 종류의 자극에 의해서 세포내 합성이 증가되며 세포의 정상적인 형태 및 기능 유지에 중요한 역할을 한다[12]고 밝혀져 있다. 이와 같은 heat shock 70 kD protein 1A의 특성을 고려하면 세포자멸사에 대해 세포를 보호하기 위해 유전자 발현이 증가된 것으로 생각된다.

따라서, 시안산은 신경아교종 세포에서 caspase-8 및 caspase-3와 관련된 세포자멸사를 유발시킬 뿐만 아니라 신경아교종 세포의 유전자 발현을 억제시키는 것으로 생각된다. 또한, 말기 신부전 환자의 체내 증가된 시안산은 신경아교종 세포에 영향을 미쳐 요독성 뇌병증을 유발하는 원인 물질로 작용할 것으로 생각된다.

References

- Ahn, B. G., Kim, W. S. and Kwon, J. Y. 2006. The effects of propofol and sevoflurane on neuronal apoptosis and Bcl-2 family protein expression after transient forebrain ischemia in the rat. *Kor. J. Anesthesiology* **51**, 614-621.
- Arai, T. and Kino, I. 1995. Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J. Pathol.* **176**, 37-44.
- Dalia, E. G., Shailaja, P. R., Michael, H., Seth, H., Johannes, H., Martin, G., Christian, W., Aadrijana, K., Sasa, F., Rudolf, S., Rufina, S., Akos, H. and Gunther, M. 2014. The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction. *Kidney Int.* **86**, 923-931.
- Graham, S. H. and Chen, J. 2001. Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 99-109.
- Hengartner, M. O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Hwang, E. A. 2004. Apoptosis by cyanate in osteoblast. Ph.D. dissertation, Keimyung University, Daegu, Korea.
- Kamesaki, H. 1998. Mechanism involved in chemotherapy induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int. J. Hematol.* **68**, 29-43.
- Kerr, J. F. and Searle, J. 1972. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J. Pathol.* **107**, 41-44.
- Kim, J. Y., Kim, Y. S., Hong, K. Y., Eo, W. K. and Choi, Y. S. 2007. Apoptosis by cyanate in kidney mesangial cell. *Kosin Med. J.* **22**, 160-169.
- Kimani, S., Sinei, K., Bukachi, F., Tshala-Katumbay, D. and Maitai, C. 2014. Memory deficits associated with sublethal cyanide poisoning relative to cyanate toxicity in rodents. *Metab. Brain Dis.* **29**, 105-112.
- Kraus, L. M. and Kraus, A. P. 2001. Carbamylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int.* **78**, S102-S107.
- Lim, J. B., Kim, H. S., Park, Q., Lee, S. K., Park, Y. B. and Han, C. T. 1999. Clinical significance of anti-HSP 70 antibody in the patients with systemic lupus erythematosus. *Kor. J. Clin. Pathol.* **19**, 548-553.
- Liu, Q., Zhou, Y. H., Xuan, B., Chiou, G. C. and Okawara, T. 2000. Effect of interleukin-1 blocks on corneal fibroblast proliferation *in vitro* and ocular inflammation *in vivo*. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **16**, 81-96.
- Majno, G. and Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3-15.
- Miller, L. K. 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* **9**, 323-328.
- Mun, K. C., Yeo, M. Y., Kim, S. P., Kim, H. C. and Kwak, C. S. 2000. Chronic peritoneal inflammation by cyanate in rats. *Perit. Dial. Int.* **20**, 699-702.
- Park, K. D., Mun, K. C., Chang, E. J., Park, S. B. and Kim, H. C. 2004. Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand. J. Urol. Nephrol.* **38**, 69-72.
- Roxborough, H. E., Miller, C. A., McEneny, J. and Young, I. S. 1995. Carbamylation inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1073-1078.
- Sasaki, H., Sheng, Y., Kotsuji, F. and Tsang, B. K. 2000. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* **60**, 5659-5666.
- The Korean society of nephrology. 2001. Clinical nephrology, pp. 593-641, Kwangmoon Publisher, Korea.
- Williams, G. T. 1994. Apoptosis in the immune system. *J. Pathol.* **173**, 1-4.
- Yang, D. H. 2006. Dialysis therapy. Available from: URL: <http://www.yakup.com/pharminfo/pharminfo2006-10-01.php>
- Yang, E. J. and Chang, J. H. 2011. Potassium cyanate induces apoptosis of humans colorectal cancer cell via mitochondrial pathway. *J. Exp. Biomed. Sci.* **17**, 177-184.

초록 : 시안산에 의한 신경아교종세포의 자멸사

최혜정* · 이상희

(경북도립대학교 응급구조과)

본 연구는 말기 신부전 환자의 체내에서 증가되는 시안산이 신경학적 합병증의 원인으로 작용하는지 알아보고자 시안산 처리에 따른 신경아교종 세포인 C6 세포의 변화를 관찰하였다. 또한, 시안산에 의해 발현되는 세포자멸사 관련 인자를 알아보기 위하여 western blot 및 유전자 발현의 변화를 검색하기 위하여 cDNA 유전자 미세배열 분석을 하였다. 시안산의 처리 농도가 0, 1, 5, 10, 20, 40 mM 증가할수록 신경아교종 세포의 생존율이 유의하게 감소하였고 세포자멸사에 주된 역할을 하는 caspase-8는 증가되었고 procaspase-3는 감소하였다. 그러나 caspase-8에 의해 활성화되는 Bax 단백질은 시안산의 처리 농도가 증가할수록 caspase-8의 증가에도 감소하였고, 세포자멸사를 조절하는 단백질인 Bcl-2와 IAP은 명확히 확인할 수 없었다. cDNA 유전자 미세배열 분석 결과, 총 1,099 종의 유전자 중에서 934 개의 유전자가 감소하였고 증가된 것은 165 개였다. 세포자멸사 관련 유전자에서도 감소한 것은 16 개였고, 증가된 6 개 유전자 가운데 heat shock 70 kD protein 1A가 현저한 증가를 나타내었다. 이상의 결과로 보아, 시안산은 신경아교종 세포에서 caspase-8 및 caspase-3와 관련된 세포자멸사를 유발시키며, 신경아교종 세포의 유전자들의 발현을 감소시키는 것으로 생각된다. 따라서 체내에서 증가된 시안산이 신경아교종 세포에 영향을 미쳐 말기 신부전 환자의 뇌병증에도 영향을 주는 것이라 생각된다.