

시안산에 의한 신장 혈관간세포의 자멸사

김지열, 김양수, 홍기연, 어완규, 최영식

아시아대학교 한약자원학과, 내과학 교실, 원광대학교 의과대학 산부인과학 교실, 경희대학교 의과대학 내과학 교실

Apoptosis by Cyanate in Kidney Mesangial Cell

Ji Yeol Kim, Yang Soo Kim, Ki Yeon Hong, Wan Kyu Eo, Young Sik Choi

Department of Oriental Medicine Resources, Asia University, Kyungsan, Korea, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kosin University, Busan Korea, Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea, Department of Internal Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Abstract

To investigate the mechanism of cyanate-induced apoptosis in kidney mesangial cells, mesangial cells were treated with 0.01–40 mmol/L cyanate. There was a dose-dependent decrease in cell viability by cyanate. Substantial morphological changes were observed in mesangial cells when they were treated with cyanate. Mesangial cells were detached and floated to the top of the culture dish and monolayer was not formed. Although cyanate had no effect on the DNA fragmentation, cyanate induced PARB fragmentation, and activation of caspase-3 and caspase-8. And cyanate induced the decrease of Bcl-2 and cIAP expression under the Western blot analysis. These results suggest that cyanate can induce apoptosis by activating pro-apoptotic signals. Apoptosis in kidney mesangial cells induced by cyanate may play a role pathogenesis of renal diseases.

According to these results, cyanate form urea must be viewed as a strong uremic toxin, rather than a surrogate. Early targeting dialysis doses specifically to cyanate and urea concentrations may be more important in patients with renal diseases.

Key Words : apoptosis, cyanate, kidney mesangial cell

서론

이 연구는 신장 혈관간세포(kidney mesangial cell)에 미치는 영향을 평가하여 요독에 의한 신장 손상의 기전을 일부 파악하고자, 신장 혈관간세포에 요독 중의 하나로 알려진 시안산(cyanate) 시안산을 첨가하여 세포자멸사 여부를 관찰하였다.

말기 신부전 환자에서는 신장의 배설, 분비, 조절 기능의 장애로 인해 식욕부진, 오심, 구토, 쇠약감, 소양증, 근 경련, 빈혈 및 출혈 경향 등의 요독증(uremia)이 초래되는데,¹⁾ 이러한 말기 신부전 환자의

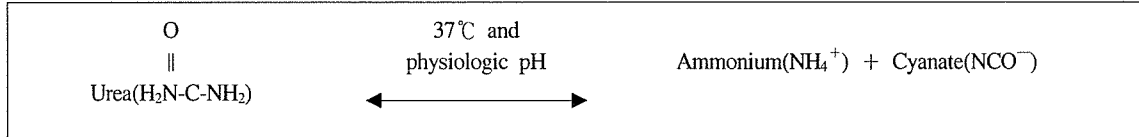
체내에 축적되어 각종 대사에 영향을 미치는 요독 물질로는 물, 나트륨, 칼륨, 수소이온, 무기 인산, β 2-마이크로글로부린(β 2-microglobulin), 단백질과 아미노산의 분해산물인 요소(urea), 구아니딘(guanidin), 페놀(phenol), 유기산 및 중간 대사산물들이 지목되어져 왔다.^{2,3)} 이러한 물질 중 특히 요독증의 원인 중 제일 중요한 원인중의 하나가 요소(urea)로 생각되고 있으며,⁴⁾ 혈중의 요소의 농도는 요독증의 중증도와 치료반응에 유용한 임상 지표로 사용되고 있다.¹⁾

말기 신부전 환자의 혈액 내에는 요소가 약 50 mmol/L 정도의 고농도로 존재하며 체내에서 자연발생적으로 시안산(cyanate)과 암모니아(ammonia)로 전환되며, 수용액 중에서 요소는 부분적으로 그리고 자연적으로 분해되어 암모니아와 탄산염 및 시안산으로 전환된다.⁵⁻⁷⁾ 체내, 즉 생리적 pH와 37℃에서

교신저자 : 최 영 식
주소 : 602-702, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신의료원
TEL : 051-990-6460
E-mail : yschoi@ns.kosinmed.or.kr

시안산에 의한 신장 혈관간세포의 자멸사

(A) Cyanate formation from urea.



(B) Reaction with amino groups.

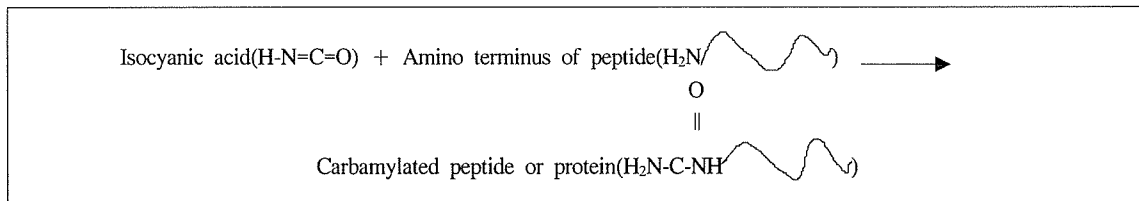


Fig. 1. Cyanate formation and its reaction with proteins.

요소는 몰농도(molarity)로 0.8%가 자연적으로 시안산으로 전환되어 요소와 평형 상태를 이루게 된다.⁵⁻⁷⁾

시안산은 생체활성물질, 특히 단백질에 결합함으로써 단백질을 카르바모일화(carbamoylation)시키며, 단백질의 여러 잔기들 중에서 자유 아미노(free amino)기와 가장 쉽게 반응하여 카르바모일화 시키는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹²⁾ 생성된 시안산은 친전자성(electrophilic)을 띠기 때문에 아미노산, 펩티드 및 단백질의 아미노 말단을 비롯한 양전하를 가진 기들과 비가역적 반응을 하여 카르바모일화이라는 반응을 하게 된다.^{3,13-16)}(Fig. 1)

시안산은 이러한 카르바모일화 반응을 통해 단백질의 구조와 기능을 변화시켜 환자의 체내에서 단백질 및 생리적 활성화 물질의 불활성화를 초래할 뿐만 아니라, 활성산소종(reactive oxygen species)을 생산하는 동시에 각종 사이토카인(cytokine)과 성장인자(growth factor)의 생산을 증가시켜 광범위한 세포 반응과 조직 손상을 유발하는 것으로 밝혀지고 있으며,^{7-9,17)} 조골세포 등에서 세포자멸사도 유발하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾(Fig. 2)

현재는 이로 인한 각종 합병증이 연구의 대상이 되고 있는데,^{8,19-20)} Mun과 Golper²¹⁾ 및 Park 등²²⁾은 요독으로부터 전환된 시안산에 의해 적혈구 생성 인자의 활성이 억제되는 것을 추론하였으며, Mun 등²³⁾은 시안산이 직접적으로 적혈구 막의 단백질을 변형시켜 용혈을 유발함을 추론하였다. 또한, Mun 등²⁴⁾

은 시안산이 복막의 단백질을 카르바모일화 시킬 수 있을 것이며 이는 형태학적 변화로 이어진다는 것을 증명하였으며, 최근에는 수정체내의 시안산이 백내장 형성에 관여할 것이라는 보고⁹⁾도 있다.

말기신부전 환자는 요소의 혈중 농도가 정상인 보다 높으며, 따라서 혈중 시안산의 농도도 정상인에 비해 높은 것으로 알려져 있으므로,²⁵⁾ 시안산이 신장 기능 저해를 유발하는 원인 물질로 작용할 수 있을 것으로 생각되나, 아직까지 시안산에 의한 신장 기능 저해에 관한 연구는 없다.

본 연구에서는 시안산이 세포자멸사 관련 인자의 발현을 유도하여 신장 혈관간세포에서 세포 자멸사를 유발함으로써 신장의 기능을 저해할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

Dulbeco's Modified Eagles Medium (DMEM), Antibiotic-antimycotic (10 U/mL penicillin 및 10 μ g/mL streptomycin), trypsin-EDTA 및 fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen Co. (GIBCO™, Grand Island, NY, 미국)에서 구입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolin bromide (MTT), phosphate buffered saline (PBS) 및 sodium cyanate는

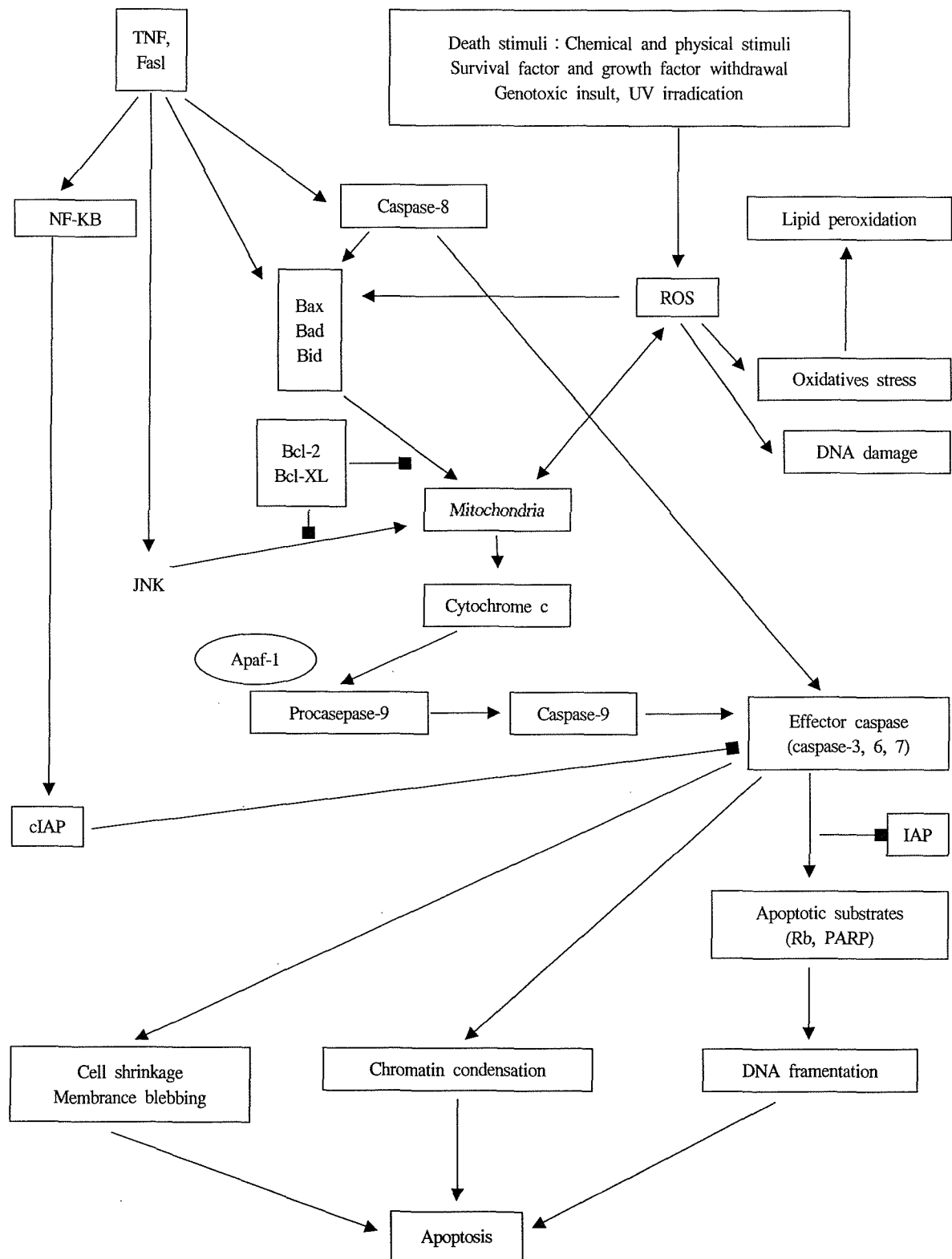


Fig. 2. Regulation pathway of apoptosis. $\rightarrow$: Stimulatory modification ; $\blacksquare$: Inhibitory modification.

Sigma Chemical Co. (ST, Louis, MO, 미국) 제품을, Monoclonal anti-poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP), anti-caspase-3, anti-procaspase-8, anti-caspase-8, anti-nuclear factor-KB (NF-KB), anti-retinoblastoma (Rb), anti-cytochrome c 및 이차항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, 미국) 제품을 사용하였다. Enhanced Chemiluminescence (ECL) kit는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, 미국) 제품을, 단백질 정량은 Bio-Rad DC kit (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, 미국)를 사용하였다. Caspase-3의 기질인 Ac-DEVD-pNA는 Calbiochem (EMD Biosciences, Inc., Darmstadt, 독일) 제품을 사용하였다. 그 외 일반시약은 시판되는 특급 또는 일급품을 사용하였다.

2. 신장 혈관간세포(kidney mesangial cell)의 배양

신장 혈관간세포(American Type Culture Collection, Manassas, 미국)를 배양하여 실험에 사용하였다. 배지로는 10% fetal bovine serum(FBS), 그리고 penicillin과 streptomycin이 1% 첨가된 Dulbecco's minimal essential medium(DMEM, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, 미국)을 사용하였고, 배경을 줄이기 위해 각각의 실험 전에 FBS 0.5%만을 첨가하였다.

계대배양은 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 이탈시킨 후, 3일에 한번씩 계대하였다.

3. 시안산의 제조

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

4. 생존세포수 산정

회수한 세포에 대하여 trypan blue로 염색하여 역상 현미경(ECLIPSE TS 100, Nikon, Tokyo, 일본)으로 생존세포수를 산정하였다.

5. 세포 독성 검사

시안산에 의한 세포독성은 MTT의 대사 환원에 근거한 MTT assay로 측정하였다. ROS 17/2.8 세포는

96-well plate에 5,000 cells/well의 밀도로 접종한 후, 세포가 plate 바닥에 부착하면 FBS-free DMEM 배지로 교체하여 24 시간 동안 세포의 증식을 정지시켰다. 2%의 FBS가 함유된 배지에 시안산을 0.01—40 mmol/L의 농도로 48 시간 동안 처리하고, 마지막 4 시간 동안 10μL의 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 37 °C에서 반응시켰다. MTT에 의해 보랏빛의 침전물인 formazan결정은 dimethylsulfoxid (DMSO) 150μL를 첨가하여 녹인 후, Model 550 microplate reader (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, 미국)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시안산에 의한 세포독성은 다음의 식으로 나타내었다.

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \left(1 - \frac{\text{A535 nm of sample} - \text{A535 nm of blank}}{\text{A535 nm of control} - \text{A535 nm of blank}}\right) \times 100$$

6. 세포자멸사(apoptosis)의 형태학적 관찰

시안산에 의한 신장 혈관간세포의 형태학적 변화를 역상 현미경(ECLIPSE TS 100, Nikon, Tokyo, 일본)으로 관찰하였다.

7. DNA 단편화 분석(Analysis of DNA fragmentation)

세포를 회수한 다음, DNA isolation 완충액(5 mmol/L Tris(pH 7.4), 20 mmol/L EDTA, 0.5% TritonX-100, 1 mmol/L PMSF)를 106세포당 500 μL을 넣고, 얼음에서 30분간 두었다. 그런 다음 15,000 rpm에서 20분간 원심분리한 다음, 상층액을 취한 후, phenol-chloroform-isoamylalcohol(25 : 24 : 1 v : v : v)로 1회 처리한 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리 하였다. 그런 다음, 상층액에 1/10 용량의 sodium acetate와 2배 용량의 ethanol를 가하여 DNA를 침전시킨 후 세척하고 건조하였다. 그 후 RNase(20 μg/mL)가 함유된 TE 완충액(10 mmol/L Tris(pH 8.0), 0.1 mmol/L EDTA)로 DNA를 녹인 후 UV 분광광도계를 사용하여 DNA를 정량한 후, 2% agarose gel에서 영동하였다.

8. Western blot

시안산을 처리한 혈관간세포를 회수한 후, 세포 용해 완충액(10 mmol/L Tris-Cl(pH 7.4), 5 mmol/L EDTA,

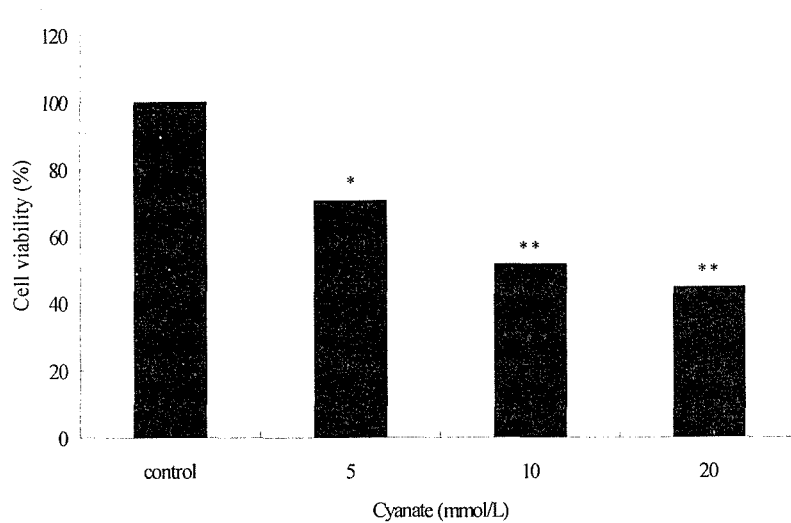


Fig. 3. Effect of cyanate on the growth of mesangial cells. Cells were treated with the indicated concentrations of cyanate for 24 h. Values are expressed as mean $\pm$ SD. * : $P < 0.05$ vs. control ; ** : $P < 0.001$ vs. control.

130 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100)과 단백질 분해 효소 억제제 혼합액(0.2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL leupeptin, 20 U/mL aprotinin, 1 mmol/L NaF)을 넣고 4°C에서 30분간 방치하였다. 그런 다음 12,000 rpm으로 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 따로 구한 다음, 단백질 정량 kit를 사용하여 분리한 단백질의 농도를 정량하였다. 얻어진 단백질 분획의 일정량을 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동한 후에, Immobilon-PVDF transfer membrane (Millipore Co, Bedford, MA, 미국)로 전기이동을 실시한 후, filter를 5%의 skim milk가 함유된 TBS-T 용액(20 mmol/L Tris(pH 7.5), 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100)으로 상온에서 1시간 blocking 한 후, 일차항체 및 이차항체와 반응시킨 후, Enhanced Chemiluminescence kit를 이용하여 특정 단백질의 발광을 유도하였다. 일차항체로는 procaspase-3, caspase-8, cytochrome c, NF-KB, Rb 및 PARP에 대한 항체를 사용하였다.

9. 성적 검정

자료는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 대조군과 실험군 사이의 비교는 Student's t-test로 하였으며, 통계학적 유의수준은 P값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 시안산이 신장 혈관간세포의 생존에 미치는 영향
시안산이 신장 혈관간세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 0, 5, 10, 20 mmol/L 농도의 시안산을 24시간 처리한 후 MTT 방법으로 세포 생존능을 측정하였을 때, 5 mmol/L 이상의 농도에서는 세포 생존능이 유의하게 감소하였으며, 세포 생존능은 시안산의 농도가 높을수록 농도 의존성으로 감소하였다.(Fig. 3.)

2. 시안산이 세포의 형태적 변화에 미치는 영향

시안산이 신장 혈관간세포의 형태적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 시안산을 24시간 처리한 후 형태적 변화를 관찰한 결과, 세포는 배양 플라스크에 부착되지 못하고 부유상태로 존재하며, 단층을 형성하지 못하였다.(Fig. 4.)

3. 시안산이 DNA 단편화에 미치는 영향

세포사멸의 특징인 internucleosomal DNA 절편화를 확인하기 위해 2% agarose gel을 이용하여 DNA 전기영동을 실시하였을 때, DNA 절편화 증가를 확인할 수 없었다.(Fig. 5.)

시아나산에 의한 신장 혈관간세포의 자멸사

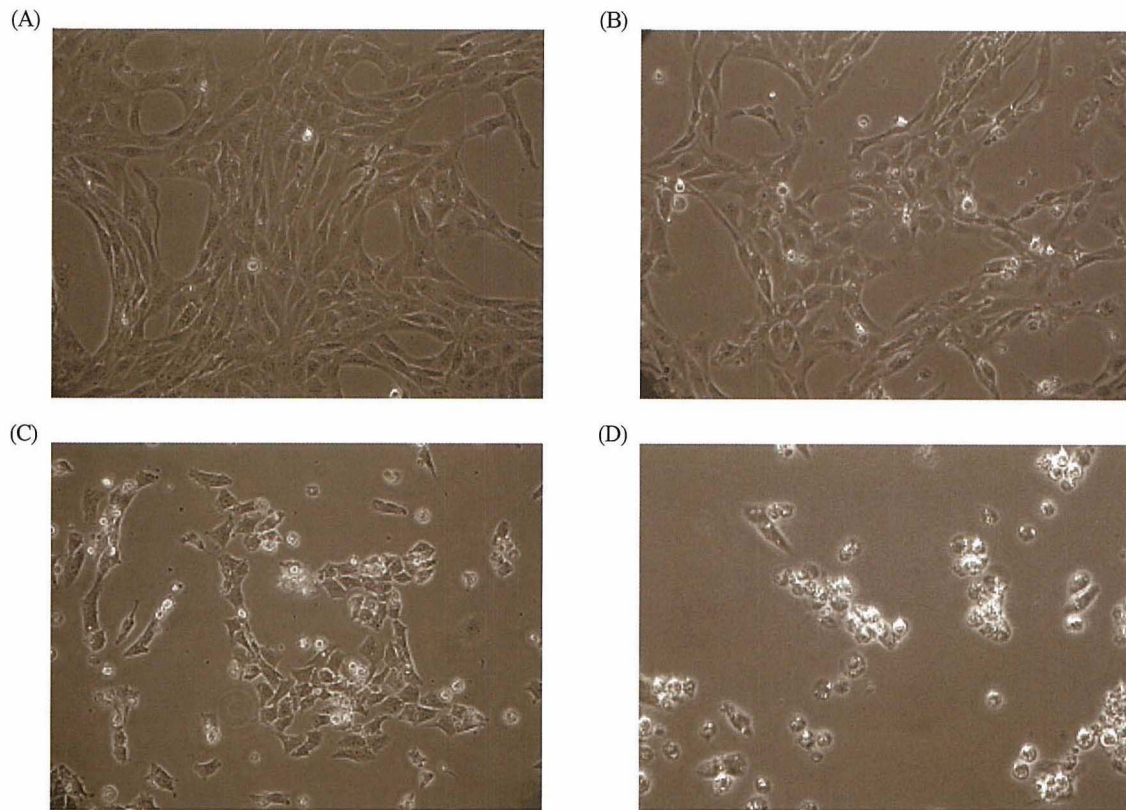


Fig. 4. Cyanate induced morphological changes. A : control ; B : 5 mmol/L cyanate-treated cells ; C : 10 mmol/L cyanate-treated cells ; D : 20 mmol/L cyanate-treated cells.

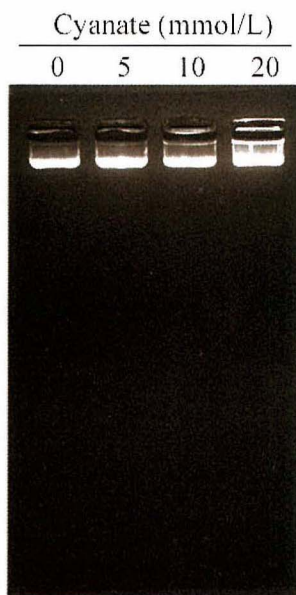


Fig. 5. Analysis of DNA integrity in cyanate-treated cells. DNA was extracted and electrophoresed through a 2% agarose gel and visualize by staining with ethidium bromide.

4. 시아나산에 의한 세포사멸과 caspase-3 변화

시아나산이 caspase-3 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시아나산을 신장 혈관간세포에 24시간 동안 처리하였다. 세포로부터 단백질을 추출한 후 Western blot을 실시하였을 때, 처리 농도에 비례하여 비활성 형태의 caspase-3 단백질의 양적 감소가 관찰되었다. 즉, 활성형 caspase-3의 활성이 증가하였다.(Fig. 6)

5. 시아나산에 의한 세포사멸과 caspase-8 변화

시아나산이 caspase-8 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 시아나산을 신장 혈관간세포에 24시간 동안 처리하였다. 세포로부터 단백질을 추출한 후 Western blot을 실시하였을 때, 처리 농도에 비례하여 활성 형태의 caspase-8 단백질의 양적 증가가 관찰되었다. 즉, 활성형 caspase-8의 활성이 증가하였다.(Fig. 7)

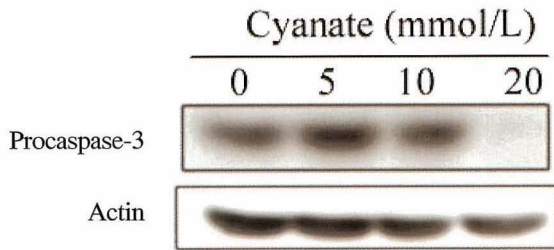


Fig. 6. Effect of cyanate on procaspase-3 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyanate for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

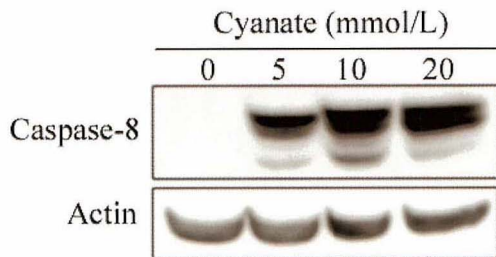


Fig. 7. Effect of cyanate on caspase-8 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyanate for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

6. 시안산에 의한 PABP 단백질의 변화

Caspase-3의 활성화에 따른 caspase-3의 기질인 PABP 단백질의 절단 양상을 조사하기 위하여 시안산을 혈관간세포에 24시간 처리하였다. 세포로부터 단백질을 추출한 후 PABP 단백질에 대한 Western blot을 실시 하였을 때, 시안산에 의해 PABP 단백질의 절단을 확인하였다.(Fig. 8.)

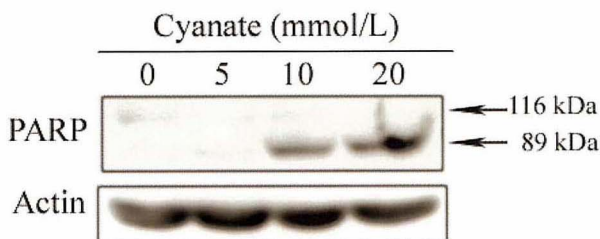


Fig. 8. Effect of cyanate on PABP expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyanate for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

7. 시안산에 의한 Bcl-2의 변화

시안산에 의한 혈관간세포 사멸과 Bcl-2와의 관계를 확인하기 위해 Western blot을 실시하였을 때, 시안산의 농도에 비례하여 Bcl-2 단백질 발현이 감소하였다.(Fig. 9.)

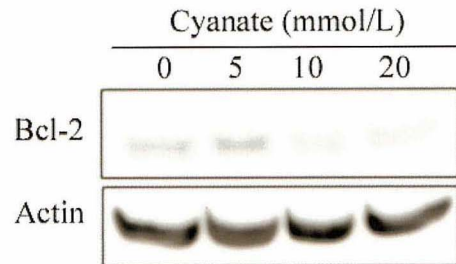


Fig. 9. Effect of cyanate on Bcl-2 expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyanate for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

8. 시안산에 의한 cIAP의 변화

시안산에 의한 혈관간세포 사멸과 cIAP와의 관계를 확인하기 위해 Western blot을 실시하였을 때, 시안산의 농도에 비례하여 cIAP 단백질 발현이 감소하였다.(Fig. 10.)

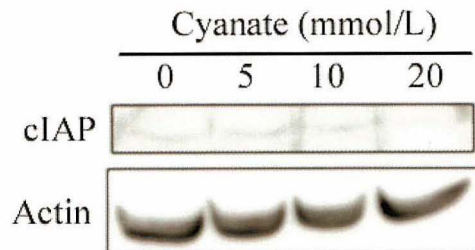


Fig. 10. Effect of cyanate on cIAP expression. Cells were treated with the indicated concentrations of cyanate for 24 h. The protein expression was determined by Western blot in cell lysates.

고 찰

말기 신부전 환자에서는 신장의 배설, 분비, 조절 기능의 장애로 인해 식욕부진, 오심, 구토, 쇠약감, 소양증, 근 경련, 빈혈 및 출혈 경향 등의 요독증(uremia)이 초래되는데,¹⁾ 이러한 말기 신부전 환자의

체내에 축적되어 각종 대사에 영향을 미치는 요독 물질로는 물, 나트륨, 칼륨, 수소이온, 무기 인산, β 2-마이크로글로부린(β 2-microglobulin), 단백질과 아미노산의 분해산물인 요소(urea), 구아니딘(guanidin), 페놀(phenol), 유기산 및 중간 대사산물들이 지목되어져 왔다.^{2,3)} 이러한 물질 중 특히 요독증의 원인 중 제일 중요한 원인중의 하나가 요소(urea)로 생각되고 있으며,⁴⁾ 혈중의 요소의 농도는 요독증의 중증도와 치료반응에 유용한 임상 지표로 사용되고 있다.¹⁾ 요소는 약 0.8%가 시안산으로 전환되는데,^{5,7)} 신장 기능이 감소함에 따라 요소의 증가와 함께 시안산의 농도도 증가한다. 시안산은 단백질의 아미노기와 결합하는 카르바모일화를 일으키는 데 이러한 반응은 효소,⁷⁾ 호르몬^{20,26-27)} 및 구조 단백질²⁸⁻²⁹⁾의 기능과 구조적인 변형을 초래한다. 또한 활성산소종을 생산하며 이는 다양한 경로를 통하여 간접적으로 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 시안산이 어떠한 기전으로 세포 및 조직 손상을 일으키는지는 명확히 밝혀져 있지 않지만 말기 신부전 환자에서는 시안산이 고농도로 존재하므로²⁵⁾ 요독증의 원인 물질로 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

세포의 사멸에는 괴사와 세포자멸사가 있다. 세포자멸사는 세포가 죽을 때 사전에 이미 준비된 상태에서 사멸 프로그램을 가동시키는, 즉 세포 분해를 위해 세포 내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음 기전이다. 이 과정은 형태적으로 세포의 비중 감소, 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포 내부의 물질들이 사멸체(apoptotic body)라는 포낭을 형성하면서 식세포 작용과 함께 일어난다.³⁰⁾ 세포자멸사는 세포 외부로부터 세포 표면에 존재하는 수용체를 통해 전달된 화학적·물리적 자극, 미토콘드리아에서 분비되는 세포자멸사 신호 등에 의해 조절된다.³¹⁻³³⁾ 또한 성장인자 또는 호르몬의 결핍, 산화물질 및 화학치료제 등과 같은 여러 가지 자극 물질에 의해 세포자멸사가 일어나는데,³⁴⁻³⁵⁾ 이는 자극 물질에 의한 직접적인 반응에 의한 세포 손상이 아니라, 이들 물질에 의한 세포자멸사 신호물질의 활성화에 의해 일어난다.³⁶⁾

본 실험에서 시안산으로 처리한 세포에서 DNA의 단편화를 명확히 확인 할 수 없었다. 최근의 연구보고에 의하면 세포괴사에 의한 세포사멸에서도 DNA

절편화가 관찰됨이 알려져 있어,³⁷⁻³⁸⁾ DNA단편화는 모든 세포사에서 공통적으로 나타날 수 있는 현상으로 여겨지고 있으나, 본 연구에서 DNA 절편화가 명확하지 않은 것은 향후 조건을 달리하여 연구해 보아야 할 과제라 생각된다.

세포자멸사는 다양한 종류의 단백질들의 상호작용에 의해 조절되는데, caspase, Fas, cytochrome c 및 inhibitor of apoptosis protein(IAP) 등의 유전자군이 그 기전을 담당하고 있으며, 특히 시스테인계의 단백질 분해 효소인 caspase가 발견되면서 caspase가 세포자멸사의 중심적인 요소로 작용하는 것으로 간주되고 있다.³⁹⁾ Caspase는 현재까지 14 종의 isoform이 알려져 있으며, 이들 가운데, 세포사멸에서 가장 보편적으로 알려진 caspase-3는 세포사멸신호에 의해 활성화되면 기질 단백질 분해를 일으킨다. 그리고, caspase-8은 Fas와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 수용체의 세포질 부위에 결합하는 효소로, 여러 caspase 중에서 세포막에 가장 가까이 위치한다. Caspase-8 효소가 세포사멸 유도신호복합체에 결합한 후 활성화되어 세포사멸경로를 통하게 되는데, 활성화형 caspase-8은 caspase-3, -6 및 -7과 같은 caspase의 활성을 촉진시킨다. 본 실험에서 혈관간세포에 시안산을 처리한 결과, 시안산의 농도에 따라 활성화형의 caspase-8의 발현증가와 비활성형의 caspase-3 단백질 발현의 감소가 관찰되었다. 이는 활성화형의 caspase-3가 상대적으로 증가하였음을 의미하며, caspase-8의 활성화는 caspase cascade에 의해 caspase-3를 활성화시켜 세포자멸사가 일어나게 된다. 이상의 결과로 시안산에 의한 혈관간세포의 세포자멸사는 caspase-3와 caspase-8과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

Caspase에 의해 선택적으로 절단되는 여러 기질이 있음이 알려져 있는데, 특히 활성화된 caspase-3는 PARP와 Rb등의 기질을 절단한다. 핵에 존재하는 효소 PARP는 DNA 손상에 대한 회복에 관여하며 PARP의 촉매부위는 세포자멸사를 거치는 여러 세포에서 caspase-3를 포함한 여러 caspase에 의하여 절단되어 분리된다.⁴⁰⁾ 절단된 PARP는 많은 고등세포에서 세포자멸사의 신호로 작용하게 된다.⁴¹⁾ 본 연구에서 PARP의 절단을 확인 할 수 있었으며, 이는 세포 자멸사에 관여한 것으로 생각된다, 또한, 본 연구에서 세포자멸사를 억제한다고 알려진 Bcl-2 및

cIAP의 발현이 감소하였음을 확인 할 수 있었다.

이상의 실험 결과로부터 시안산은 혈관간세포의 세포자멸사를 유발한다고 생각되며, 시안산은 신장 기능의 손상을 유발 할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

이 연구는 신장 혈관간세포(kidney mesangial cell)에 미치는 영향을 평가하여 요독에 의한 신장 손상의 기전을 일부 파악하고자, 신장 혈관간세포에 요독 중의 하나로 알려진 시안산(cyanate) 시안산을 첨가하여 세포자멸사 여부를 관찰하였다.

이 연구에서는 요독 중의 하나로 알려진 시안산이 신장 혈관간세포에 미치는 영향을 평가하여 요독에 의한 신장 손상의 기전을 일부 파악하고자, 신장 혈관간세포에 시안산을 첨가하여 세포자멸사 여부를 관찰하였다. 즉, 신장 세포인 mesangial 세포에 0.01 - 40 mmol/L 농도의 시안산을 처리하여 세포독성과 형태학적 변화를 관찰하였으며, 또한 시안산에 의한 세포자멸사 관련 인자의 발현을 Western blot으로 확인하였다. 본 연구에서 시안산이 신장 혈관간세포의 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 0, 5, 10, 20 mmol/L 농도의 시안산을 24시간 처리한 후 MTT 방법으로 세포 생존능을 측정하였을 때, 5 mmol/L 이상의 농도에서는 세포생존능이 유의하게 감소하였으며, 세포 생존능은 시안산의 농도가 높을 수록 농도 의존성으로 감소하였다. 형태적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해, 시안산을 24시간 처리한 후 형태적 변화를 관찰한 결과, 세포는 배양 플라스크에 부착되지 못하고 부유상태로 존재하며, 단층을 형성하지 못하였다. 시안산에 의한 세포자멸사 관련 인자의 발현을 조사한 결과, 시안산에 의한 DNA 단편화는 관찰되지 않았으나, 시안산에 의해 세포자멸사의 주요 인자인 활성화형 caspase-3와 caspase-8의 활성이 증가하였으며, caspase-3의 기질인 PAPR가 시안산에 의해 절단되었음을 확인하였다. 또한 세포자멸사를 억제하는 Bcl-2, cIAP 단백질 발현이 시안산의 농도에 비례하여 감소하였다.

이상의 실험 결과로부터 시안산은 혈관간세포의 세포자멸사를 유발한다고 생각된다. 따라서, 시안산

은 신장 자체 손상을 초래 할 수 있을 것으로 생각되며, 신기능 손상이 있는 환자에게 조기 제거가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 김현철, 박성배 : 만성신부전, in 김현철, 박성배(eds) : 임상신장학 : 대구, 계명대학교 출판부 : 195-220, 1997
2. Bernner BM, Rector FC : Brenner & Rector's the Kidney, 7th ed. pennsylvania, saunders, 2004
3. Bailey JL, Mitch WE : Pathophysiology of uremia. In Brenner BM (ed) : Brenner & Rector's The kidney. 7th ed. Philadelphia : Sauners : 2139-2164, 2004
4. Mun KC, Joo I, Kin YH, Park SB, Kim HC : Effect of hemodialysis on levels of malondialdehyde and antioxidant enzymes in erythrocytes from patients with end stage renal disease, Korean J Nephrol 17 : 591-596, 1998
5. Hagel P, Gerding JJ, Fiegggen W, Bloemendal H : Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. Biochim Biophys Acta 28 : 366-373, 1971
6. Marier JR, Rose D : Determination of cyanate, a study of its accumulation in aqueous solutions of urea. Anal Biochem 7 : 304-34, 1964
7. Roxborough HE, Millar CA, McEneny J, Young IS : Carbamylation inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. Biochem Biophys Res Commun 214 : 1073-1078, 1995
8. Roxborough HE, Young IC : Carbamylation of proteins and atherogenesis in renal failure. Med Hypothesis 45 : 125-128, 1995
9. Ganea E, Harding JJ : Inhibition of 6-phos-phogluconate dehydrogenase by carbamylation and protection by α -crystallin, a chaperonelike protein, Biochem Biophys Res Commun 222 : 625-631, 1996
10. Beswick HT, Harding JJ : Conformational changes induced in bovine lens alpha-crystallin by carbamylation, Relevance to cataract, Biochem J 223 : 221-227, 1984
11. Crompton M, Rixon KC, Harding JJ : Aspirin prevents carbamylation of soluble lens proteins and prevents cyanate-induced phase separation opacities in vitro : a possible mechanism by which aspirin could prevent cataract. Exp Eye Res 40 : 297-311, 1985

12. Beswick HT, Harding JJ : High-molecular-weight crystallin aggregate formation resulting from non-enzymic carbamylation of lens crystallins : relevance to cataract formation. *Exp Eye Res* 45 : 569-578, 1987
13. Stark GR : Modification of proteins with cyanate. In Hirs CHW(Ed) : *Methods in Enzymology*. New York : Academic Press : 590-594, 1967
14. Fluckiger R, Harmon W, Meier W, Gabbay KH : Hemoglobin carbamylation in uremia. *N Engl J Med* 304 : 823-827, 1981
15. Kraus LM, Jones MR, Kraus AP Jr : Essential carbamoyl-amino acids formed in vivo in patients with end-stage renal disease managed by continuous ambulatory peritoneal dialysis : isolation, identification, and quantitation. *J Lab Clin Med* 131 : 425-431, 1998
16. Stark GB : On the reversible reaction with sulfhydryl groups and the determination of the NH₂-terminal cysteine and cystine in proteins. *J Biol Chem* 239 : 1411-1414, 1964
17. Kraus LM, Kraus AP Jr : The search for the uremic toxin : the case for carbamylation of amino acids and proteins. *Wien Klin Wochenschr* 110 : 521-530, 1998
18. 황은아, 시안산에 의한 조골세포의 자멸사, 계명대학교 박사학위 논문 : 1-35, 2004
19. Stim J, Shaykh M, Anwar F, Ansari A, Arruda JA, Dunnea G : Factors determining hemoglobin carbamylation in renal failure. *Kidney Int* 48 : 1605-1610, 1995
20. Trepanier DJ, Thibert RJ, Draisey TF, Caines PS : Carbamylation of erythrocyte membrane proteins : an in vitro and in vivo study. *Clin Biochem* 29 : 347-355, 1996
21. Mun KC, Golper TA. Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif* 18 : 13-17, 2000
22. Park KD, Mun KC, Chang EJ, Park SB, Kim HC : Inhibition of erythropoietin activity by cyanate. *Scand J Urol Nephrol* 38 : 69-72, 2004
23. Mun KC, Kim HC, Kwak CS : Cyanate as a hemolytic factor. *Ren Fail* 22 : 809-814, 2000
24. Mun KC, Yeo MY, Kim SP, Kim HC, Kwak CS : Chronic peritoneal inflammation by cyanate in rats. *Perit Dial Int* 20 : 699-702, 2000
25. Nilsson L, Lundquist P, Kagedal B, Larsson R : Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure. *Clin Chem* 42 : 482-483, 1996
27. Oimomi M, Hatanka H, Yoshimura Y, Yokono K, Baba S, Taketomi Y : Carbamylation of insulin and its biological activity. *Nephron* 46 : 63-66, 1987
27. Satake R, Kozutsumi H, Takeuchi M, Asano K : Chemical modification of erythropoietin : an increase in vivo activity by guanidination. *Biochem Biophys Acta* 1038 : 125-129, 1990
28. Ramponi G, Leaver JL, Grisolia S : Homocitrulline formation following carbamylation of histones with carbamyl phosphate [letter]. *FEBS* 16 : 311-314, 1971
29. Kuckel CL, Lubit BW, Lambooy PK, Farnsworth PN : Methylisocyanate and actin polymerization : the in vitro effects of carbamylation. *Biochem Biophys Acta* 1162 : 143-148, 1993
30. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR : Cell death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68 : 251-305, 1980
31. Vaux DL, Korsmeyer SJ : Cell death in development. *Cell* 96 : 245-254, 1999
32. Evan GI, Vousden KH : Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411 : 342-348, 2001
33. Green DR and Reed JC : Mitochondria and apoptosis. *Science* 281 : 1309-1312, 1998
34. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Millman CL, Korsmeyer SJ : Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75 : 241-251, 1993
35. Bojes HK, Datta K, Xu J, Chin A, Simonian P, Nunez G, Kehrer JP : Bcl-xL overexpression attenuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal. *Biochem J* 325 : 115-119, 1997
36. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY : Role of Hsp70 in regulation of stresskinase JNK : implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 434 : 1-4, 1998
37. Gwag BJ, Koh JY, DeMaro JA, Ying HS, Jacquin M, Choi DW : Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neuroscience* 77 : 393-401, 1997.
38. Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn SH, Koh JY : Zinc-induced cortical neuronal death with features for apoptosis and necrosis : mediation by free radicals. *Neuroscience* 89 : 175-182, 1999
39. Kamesaki H : Mechanism involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. *Int J Hematol* 68 : 29-43, 1998
40. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC : Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371 : 346-347, 1994
41. Cohen GM. Caspase : the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 : 16, 1997