[UCI]I804:24011-200000241389

2011년 2월
석사학위논문

카드뮴 내성에 있어서 자가포식현상 :Multidrug Resistance-Associated Protein-Akt 신호전달체계의 조절

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 송 희

카드뮴 내성에 있어서 자가포식현상
:Multidrug Resistance-Associated Protein-Akt 신호전달체계의 조절

Involvement of autophagy-mediated Multidrug Resistance-Associated Protein-Akt signaling pathway in cadmium resistance

2011년 2월 25일

이 송 희

카드뮴 내성에 있어서 자가포식현상
:Multidrug Resistance-Associated Protein-Akt 신호전달체계의 조절

지도교수 임 성 철

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2010년 10월

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 송 희

이송희의 석사학위논문을 인준함

위원장　　조선대학교 교수　　신 성 희　　(인)

위　원　　조선대학교 교수　　오 선 희　　(인)

위　원　　조선대학교 교수　　임 성 철　　(인)

2010년　　11월

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

LIST OF CONTENTS····· I
LIST OF FIGURES····· III
ABSTRACT·····IV

1. 서 론 ·····1

2. 재료 및 실험방법·····3
(1) 세포배양과 내성세포주 확립·····3
(2) 세포 독성 분석·····3
(3) Western blot 분석·····4
(4) RNA 추출 및 중합효소 연쇄반응 분석·····4
(5) MRP의 기능 분석·····5
(6) Transfection·····5

3. 실험 결과
(1) WI38 세포와 RWI38 세포의 카드뮴에 대한 독성·····6
(2) RWI38 세포에서 Methalothionine의 유도와 세포 생존율과의 관계·····6

(3) RWI38 세포에서 카드뮴에 의한 MRP의 발현 ……6
(4) RWI38 세포에서 카드뮴 처리에 의한 Akt 활성화와 MRP와의 관계 ……7
(5) RWI38 세포에서 카드뮴에 의해 유도되는 자가포식현상 ……8
(6) 카드뮴에 의해 유도된 자가포식현상은 MRP를 조절한다 ……9

4. 고 찰……11

5. 결 론……14

6. 감사의 글……15

7. 참고 문헌……16

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Cellular sensitivity to cadmium in parental WI38 and cadmium-adapted RWI38 cells. ····· 21

Fig. 2. MT expression in response to cadmium in RWI38 cells. ····· 22

Fig. 3. Expression and functional activity of MRP in WI38 and cadmium-resistant RWI38 cells. ····· 23

Fig. 4. Cadmium induced MRP regulates Akt phosphorylation. ····· 25

Fig. 5. Induction of autophagy and expression of autophagy-related proteins in RWI38 cells. ····· 29

Fig. 6. The effects of cadmium-induced autophagy on MRP expression or on cell death. ····· 31

ABSTRACT

Involvement of autophagy-mediated Multidrug Resistance-Associated Protein-Akt signaling pathway in cadmium resistance

Song-Hee Lee

Advisor : Prof. Sung-Chul Lim, M.D., Ph.D.
Department of Bio New Drug Development
Graduate School of Chosun University.

To elucidate the mechanisms involved in resistance of lung epithelial cells to cadmium, we established a cell line that exhibits cadmium-resistance (RWI38). RWI38 cells showed 5-fold greater cadmium-resistance than WI38 cells, and upregulated multidrug resistance-associated protein (MRP) and metallothionein in respond to cadmium. Cadmium induced Akt phosphorylation in RWI38 cells but not in WI38 cells; this was prevented by using of pharmacological MRP inhibitor, probenecid, or siRNA for MRP, both of which enhanced cell death and capsase-3 activation. Cadmium-treated RWI38 cells induced autophagy, as demonstrated by Atg5 induction, LC3 conversion, and formation of GFP-LC3 dots. A pharmacological autophagy inhibitor,

3-methyladenine, or silencing of *atg5* gene downregulated the cadmium-induced Akt phosphorylation and MRP, and further enhanced procaspase-3 clevage. However, pharmacological or genetic inhibition of *mrp-1* had no effect on cadmium-induced LC3 II induction. These data indicate that cadmium-induced autophagy is involved in cell protection by blocking of apoptosis through MRP-Akt signaling pathway.

1. 서 론

카드뮴 (cadmium)은 자연계의 많은 부분을 오염시키고 있는 심각한 환경 독성물질로써, 공업과 농업용 폐수의 축적이 카드뮴 독성의 원인이 되고 있다. 카드뮴은 국제 암 연구기관 (International Agency for Cancer Research, IACR, 1993)에 의해 발암물질 type I 으로 지정되어 있으며, 20년 이상의 긴 생물학적 반감기로 인해, 체내로 흡수된 후 계속 축적됨으로 인체에 더욱 심각한 질병의 원인이 된다. 인체 내로 카드뮴의 유입경로는 흙과 물의 오염, 그리고 오염된 음식물의 섭취로 우리가 직접적으로 피할 수는 없다. 장기적인 카드뮴 노출은 폐, 전립선, 신장, 그리고 간과 같은 다양한 기관에서 발암의 원인이 되며 (Waalkes et al., 2003), 시험관내 실험 결과 카드뮴은 악성 세포로 전환시킬 수 있는 주요 원인이 되는 것으로 나타났다 (Achanzar et al., 2001; Qu et al., 2005). 오염된 공기와 흡연으로 인해 일차적으로 호흡기관인 폐를 통해 카드뮴이 인체 내로 유입된다. 카드뮴에 노출되게 되면 세포에서는 독성을 약화시킬 수 있는 방어기전이 유도 되는데, 가장 잘 알려진 카드뮴에 대한 세포의 방어기전 중 하나는 metallothionein (MT)의 유도이다 (Klaassen et al., 1999). 또 다른 기전으로는 카드뮴의 세포내 축적을 감소시키는 기전인, P-glycoprotein (P-gp)와 MRP (multidrug-resistance protein)와 같은 ATP-binding cassette transporter의 유도이다 (Bodo et al., 2003; Thevenod et al., 2000; Huynh-Delerme et al., 2005; Broeks et al., 1996; Tommasini et al., 1996). 이러한 결과들은 카드뮴의 내성에 P-gp 또는 MRP가 관련될 가능성을 시사하지만 이에 대한 보고는 미비한 상태이다.

유전자조절에 의한 세포사에는 세포사멸 (apoptosis)과 자가포식현상 (autophagy)의 두 가지 형태가 있다. 세포사멸에 대한 분자생물학적 특징은, protease family 인 caspase의 활성화가 중요한 역할을 한다. 세포사멸의 형태적인 특징은 세포질과 핵의 수축, membrane blebbing, 핵의 분절, apoptotic body 형성 등을 들 수 있다 (Wolf and Green., 1999; Wyllie et al., 1980).

세포사멸은 돌연변이나 손상된 세포를 제거하여 발암을 억제하는데 중요한 역할을 한다 (Shivapurkar et al., 2003). 따라서, 카드뮴에 대한 내성은 세포사멸의 억제를 통해 세포를 종양세포로 전환시킬 수 있다고 제시되어 왔다 (Qu et al., 2002). 암세포 생존에 대한 중요한 조절자로 알려진 Akt는 (Datta et al., 2008) 세포사멸에서 중요한 역할을 하는 Bcl2 family의 조절을 통해 세포사를 억제하는 것으로 알려졌다 (Datta et al., 1997; Yune et al., 2008; Cardone et al., 1998). 그러나, 카드뮴에 대한 내성에 있어서 Akt의 관련성에 대한 보고는 없다.

자가포식현상은 오래된 단백질이나, 또는 노쇠한 세포기관의 분해에 관여 한다. 자가포식현상의 형태적 특징은 이중막구조 (double-membrane)로 된 포식소체가 출현 하는 것 인데, 세포 내용물을 포식하게 되어 자가포식소체 (autophagosome)가 된다. 자가포식소체의 외막이 단일막구조 (sigle-membrane)로 된 리소좀(lysosome)과 융합하여 내용물이 분해되며, 이러한 구조물을 자가포식용해소체(autolysosomes)라고 한다. 분해된 내용물로부터 아미노산과 지방산을 얻게 됨으로써 결국 생존에 필요한 단백질과 에너지를 합성하게 된다. 따라서, 자가포식현상은 세포의 생존과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 지금까지의 많은 연구결과에서 자가포식현상은 세포사를 유도하는 것으로 보고되어 왔으며, 이는 type 1 programmed cell death (PCD)인 세포사멸과 대별하여 type II PCD로 알려져 있다 (Galluzzi et al., 2008; Turcotte and Giaccia., 2010). 최근에 카드뮴에 의해서 사람의 제대 정맥 내피세포 (HUVEXs)와 쥐의 신장세포 (MES-13)에서 자가포식현상이 보고 된 바 있다 (Dong et al., 2009; Wang et al., 2009; Yang et al., 2009). 그러나 카드뮴 내성에 있어서 자가포식현상의 관련성에 대해서는 보고 된 바가 없다.

본 연구에서는 폐상피 섬유모세포 (WI38)에 카드뮴을 처리하여 내성세포주를 확립한 후 (RWI38), 카드뮴 내성에 있어서 자가포식현상의 관련성과, 세포사멸 기전과의 연관성을 연구하였다.

2. 재료 및 실험방법

(1) 세포배양과 내성세포주 확립

카드뮴에 내성을 가진 세포를 확립하기 위해 사람의 폐상피 섬유모세포인 WI38 세포에 농도 상승순으로 카드뮴을 처리하여 카드뮴에 내성을 갖은 RWI38 세포를 확립하였다. WI38 세포와 RWI38 세포를 10% fetal bovine serum과 50 μg 4/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin이 함유된 RPMI1640 배지에 부유하여 37°C, 그리고 5% CO_2 -95% O_2 로 조성된 배양기내에서 배양하였다. 3-methyladenine (3MA), BafilomycinA1 (BaF1), MTT [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]는 Sigma에서 구입하였으며, Ly294002는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA) 에서 구입하였다.

(2) 세포 독성 분석

카드뮴에 대한 독성을 분석하기 위해 $1x10^5$ 로 조성된 세포 부유액을 48 well plate에 240 μl 씩 각각 분주한 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포들의 생존율을 알아보기 위해 0.1 μg/ml 으로 조성된 MTT 용액을 각 well에 200 μl 씩 분주하여 4 시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고, 300 μl DMSO를 분주하여 formazan crystal을 녹인 후, 540 nm의 파장에서 ELISA microplate reader (Perkin-Elmer)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. trypan blue 염색은 세포에 0.4% trypan blue를 첨가하여 실온에서 5 분간 방치한 후, hemacytometer를 이용하여 trypan blue에 염색된 세포 (죽은 세포)와 염색되지 않은 세포 (살아있는 세포)를 현미경으로 관찰하고 각각의 세포의 수를 세었다.

(3) Western Blot

수확한 세포를 차가운 PBS로 수세하고, 원심분리를 하여 cell pellet을 얻었다. 얻어진 cell pellet은 Ripa buffer (Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 세포를 용해시킨 후, 12000 rpm 에서 10 분간 원심분리 하여 단백질이 포함된 상층액을 얻었다. 상층액의 단백질을 정량한 후 일정양의 단백질을 6-15% Sodium Dodecy1 Sulfate (SDS) Polyacrylamide gel 에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 transfer 하고, 5% 탈지분유 (0.1% Tween-20 Tris buffer)로 blocking 한 다음 적당한 항체를 붙였다. anti-MRP, anti-MT, procaspase-3, β-actin, Atg5, goat-anti-mouse IgG와 goat-anti-rabbit IgG는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였고, anti-LC3는 Absent (SanDiego, CA)에서 구입하였으며, anti-P-gp는 Signet에서, phosphorylated-Akt와 Akt, cleaved caspase-3는 Cell Signaling Technology 에서 구입하였다.

(4) RNA 추출 및 중합효소연쇄반응 (RT-PCR) 분석

TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 제조사의 권고된 방법에 따라 총 RNA를 분리 추출 하였다. cDNA는 polypropylene tube에 first-strand Monopoly murine leukemia virus (M-MLV) 역전사효소 (reverse transcriptase-Promega Co.)와 oligo (dT) primer가 포함된 용액에 총 RNA 1 μg 을 혼합하여 1 시간 동안 37°C 에서 합성하였다. MDR-1 / P-gp와 MRP, β-actin에 대한 PCR 조건은 약간 변형을 주어 이전의 실험 방법에 따라 수행하였다. 간단하게, 50 ng 의 cDNA를 Takara premix Taq (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)을 사용하여 증폭시켰다. MDR1과 MRP1을 위하여 5 μCi 의 [^{32}P]dCTP를 첨가하여 PCR을 하였다. PCR product는 7% nondenaturing polyacrylamide gel에 분리한 후 건조시키고 autoradiography를 하였다.

(5) MRP의 기능 분석

MRP 활성도는 calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) (Molecular Proves)을 이용하였으며, 제조회사의 설명 방법에 따라 분석하였다. calcein-AM은 세포내부로 들어가서 esterase에 의해 AM이 분리되고, calcein은 MRP에 의해 세포 외부로 유출된다. 세포를 0.5 μM calcein-AM과 함께 37°C 에서 30 분간 배양한 후, 0.5 mM probenecid (Sigma)를 처리 하거나 또는 처리하지 않은 대조군을 분석하였다. 세포내에서 AM의 분리로 인해 형광을 발현하는 calcein을 형광 분광계 (Tricon, Italy)를 통해 측정하였다. Excitation / emission 파장은 각각 488 / 538 nm 를 사용하였다.

(6) Transfections

세포를 OPTI-MEM (Invitrogen) 배지에서 배양한 후, 사람 *mrp-1* 유전자에 대한 siRNA를 이입 하였다. MRP-1 siRNA 에 대한 유전자 서열은 (5"-GGAGUGGAACCC CUCUCU-3")이였으며, control siRNA는 EGFP (Ambion)을 사용하였다. 유전자 이입은 RNAiMAX (Invitrogen)를 사용하였으며, 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 4 시간 후 혈청과 항생제가 함유된 배지로 치환한 후 48 시간 배양하였다.

3. 실험 결과

(1) WI38 세포와 RWI38 세포의 카드뮴에 대한 독성

RWI38 (WI38세포로부터 확립한 카드뮴에 대한 내성세포) 세포는 WI38 폐상피 세포에 카드뮴을 농도 상승순으로 처리하여 카드뮴에 대한 내성이 유도된 세포이다. RWI38 세포의 카드뮴에 대한 내성 정도를 분석하기 위해 WI38 세포와 함께 카드뮴을 처리한 후 24 시간 후에 MTT 분석을 수행 하였다. 그 결과 WI38 세포의 IC_{50} 농도는 48.2 μM, 그리고 RWI38 세포에서는 180.9 μM 을 나타냄으로써, RWI38 세포가 WI38 세포에 비하여 카드뮴 독성에 5배 이상의 내성을 보였다 (Fig. 1).

(2) RWI38 세포에서 methalothionine (MT) 의 유도와 세포 생존율과의 관계

카드뮴의 독성에 있어서 MT의 효과를 규명하기 위해 WI38 세포와 RWI38 세포에 40 μM 카드뮴을 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. trypan blue 염색을 한 후 살아있는 세포의 수를 측정한 결과, 카드뮴 처리 후에 살아있는 세포는 대조군 세포와 비교했을 때 WI38 세포는 50.6%, RWI38 세포는 93% 생존율을 보였다 (Fig. 2A).

위에서 설명한 것과 같은 방법으로 WI38 세포와 RWI38 세포에 카드뮴을 처리 하고 MT 단백질의 발현을 전기영동을 통해 분석하였다. WI38 세포에서와는 달리, RWI38 세포에서 카드뮴을 처리 후에 MT의 발현이 현저히 증가하였다. 그러므로, 카드뮴 처리 후 RWI38 세포의 높은 생존율은 MT의 발현과 관련이 있을 것으로 생각되어진다 (Fig. 2B). 이 결과들은 MT의 유도와 카드뮴 세포독성 억제와의 관련성을 보여주고 있다.

(3) RWI38 세포에서 카드뮴에 의한 MRP의 발현

ATP-binding cassette transporter는 여러가지 약물의 내성기전에 관련이 있는 것으로 보고되었다. 따라서, 카드뮴의 내성에 P-gp와 MRP와 같은 tansporter 들의 관련성을 연구하기 위해, WI38 세포와 RWI38 세포에서 MRP 단백질의 발현정도를

전기영동을 통해 분석하였다. MRP의 발현은 WI38 세포에서는 매우 낮으나, RWI38 세포에서 현저히 증가되었다 (Fig. 3A). 이러한 결과는 RT-PCR에 의해 확인하였으며, RWI38 세포에서 *mrp-1* mRNA의 level이 현저히 증가 됨을 나타내었다. 그러나 *MDR-1* / P-gp mRNA는 WI38 세포와 RWI38 세포에서 발현되지 않음으로써 카드뮴의 내성에 MRP의 관련성을 보여주고 있다 (Fig. 3B).

RWI38 세포에서 증가된 MRP의 발현이 카드뮴에 의한 결과인지를 확인하기 위해서, MRP의 활성화 (functional activity)를 calcein과 MRP 억제제인 probenecid를 이용해서 측정하였다. WI38 세포와 RWI38 세포에 0.5 mM probenecid를 전처리 한 후 0.5 μM calcein-AM을 30 분간 처리 하였다. RWI38 세포에서 calcein에 의해 나타나는 형광강도 (fluorescence intensity)는 probenecid 처리에 의해 유의성 있는 증가를 보였다. 그러나 WI38 세포와 비교했을 때 RWI38 세포에서 현저히 감소하였다 (Fig. 3C). 이러한 결과는 RWI38 세포에서 증가된 MRP의 발현은 카드뮴의 내성에 직접적인 영향을 미칠 수 있음을 시사해 준다.

(4) RWI38 세포에서 카드뮴 처리에 의한 Akt 활성화와 MRP와의 관계

Akt는 세포의 생존에 대한 신호전달체계에 있어서 중요한 조절자로 알려져 있다 (Datta et al., 1997; Yune et al., 2008). RWI38 세포와 WI38 세포에 카드뮴을 농도 상승순으로 처리했을 때, WI38 세포는 카드뮴의 농도에 반응하여 IC_{50} 농도 이하에서만 Akt 활성화를 나타내었고, 반면에 RWI38 세포에서는 Akt의 활성도가 카드뮴의 농도에 따라 증가를 보였다 (Fig. 4A). 또한 180.9 μM 카드뮴 처리 후 여러 시간 간격으로 MRP 발현을 분석한 결과 시간 의존적 증가를 보였다 (Fig. 4B). 따라서, MRP와 Akt의 관련성을 확인하기 위하여 RWI38 세포에 MRP 억제제인 probenecid를 1 시간 동안 전처리 한 후 160 μM 카드뮴을 12 시간 동안 처리하였다. probenecid 처리는 카드뮴에 의해 유도된 MRP 단백질 발현에 영향을 주지 않았지만, 인산화된 Akt의 단백질 발현을 현저히 감소시키는 원인이 되었다. 또한, MRP-Akt 신호전달체계와 세포사와의 관련성을 연구하였다. 카드뮴 처리는 procaspase-3에 거의 변화를 주지 않았다. 그러나, procaspase-3는 probenecid 자체에 의해 적은 양으로 감소되

었으며, 이는 probenecid와 카드뮴의 처리에 의해 현저한 감소를 보였고, 유의성 있는 세포사의 원인이 되었다 (Fig. 4C, D). 이러한 결과는 MRP 유전자에 대한 siRNA를 사용하여, MRP의 발현억제를 통해 확인하였다. MRP 유전자의 발현 억제는 카드뮴 처리에 의해 유도된 인산화된 Akt를 억제하였으며, caspase-3 활성화를 유도하였다 (Fig. 4E). 이러한 결과는 MRP가 카드뮴에 의해 유도된 Akt의 인산화 억제를 통해 caspase-3를 활성화시킴으로써 세포사를 일으킨다는 것을 보여주는 결과이다.

위의 결과에서 MRP-Akt 경로가 세포 생존과 관련이 있는 것으로 나타났기 때문에, 이를 확인하기 위하여 PI3K 억제제인 Ly294002와 wortmannin을 이용하여 Akt 활성화를 억제하였다. Ly294002와 wortmannin 처리는 Akt의 인산화를 거의 완전히 억제하였으며, 이는 증가된 caspase-3 활성화를 유도함으로써, 현저한 세포사를 일으켰다 (Fig. 4F, G). 위의 결과들은 RWI38 세포에서 MRP는 Akt 활성화를 통해 세포 생존경로를 조절한다는 것을 시사한다.

(5) RWI38 세포에서 카드뮴에 의해 유도되는 자가포식현상

WI38 세포와 RWI38 세포에서 카드뮴에 반응하여 자가포식현상을 유도하는지를 연구하기 위해, WI38 세포와 RWI38 세포에 농도 상승순으로 카드뮴을 12 시간 동안 처리하였다. RWI38 세포에 카드뮴의 처리는 자가포식소체의 확장과 관련 있는 Atg5를 농도 의존적으로 유도하였다. 또한 자가포식현상의 지표로 사용되고 있는 LC3II 단백질도 농도 의존적 증가를 보였으나, WI38 세포에서는 대조군 수준의 Atg5와 LC3II 단백질을 보였다 (Fig. 5A). RWI38 세포에서 카드뮴에 의해 자가포식현상의 유도를 확인하기 위해 160 μM 의 카드뮴을 처리하고, 여러 시간 간격으로 세포를 수확하였다. 카드뮴 처리 후 3 시간 에서 Atg5가 현저히 유도되었으며, 또한 LC3I에서 LC3II 형태로의 전환이 확인되었고, 이는 시간에 따라 더욱 증가하였다 (Fig. 5B).

RWI38 세포에서 자가포식현상은 Green Fluorescence Protein(GFP)-LC3B plasmid DNA를 이입하여 확인하였다. GFP-LC3B plasmid DNA가 이입된 세포에 160 μM 카드뮴을 9 시간 처리한 후 형광현미경으로 관찰하였다. 대조군의 세포는 GFP-LC3B의 고른 세포질내의 발현으로 전체적으로 균질한 녹색 형광을 띠었다.

반면에 카드뮴을 처리한 세포에서는 GFP-LC3II의 자가포식소체 막으로의 이동으로 인하여 녹색의 점으로 관찰되었다 (Fig. 5C). 자가포식소체와 리소좀과의 융합을 억제시키는 Bafilomycin A1 (BaF1)의 전처리는 자가포식소체 막으로 이동된 GFP-LC3I의 분해를 억제함으로써 자가포식소체 막에서의 LC3II의 축적을 유도하여 LC3II 단백질이 현저한 증가를 나타내었고 (Fig. 5D), 또한 자가포식현상의 억제제인 3-methyladenine는 카드뮴에 의해 유도된 LC3II 단백질의 양을 현저히 감소시켰다 (Fig. 5E). Atg5에 대한 siRNA를 이입시킬 경우, 카드뮴에 의해 유도된 Atg5와 LC3II 단백질이 현저히 감소되었다 (Fig. 5F). 이 실험결과는 RWI38 세포에서 카드뮴 처리로 인해 자가포식현상이 유도됨을 증명 하였다.

(6) 카드뮴에 의해 유도된 자가포식현상은 MRP를 조절한다

카드뮴에 의해 유도된 MRP와 자가포식현상의 관련성을 규명하기 위해, 먼저 MRP의 억제제인 probenecid (100 μM)를 1 시간 동안 전처리 한 후 160 μM 카드뮴을 9 시간 처리하였다. probenecid는 활성화 억제제이기 때문에 MRP의 단백질 발현에 영향을 주지 못했으며, 또한 카드뮴에 의해 유도된 LC3II의 단백질 양에도 영향을 주지 못하였다 (Fig. 6A). 따라서, MRP의 영향을 더욱 확인하기 위해서, MRP siRNA 이입을 통해 *mrp-1* 유전자의 발현이 억제된 세포에 160 μM 카드뮴을 9 시간 처리하였다. Fig. 6B 에서 보는 바와 같이 *mrp-1* 유전자의 발현 억제는 카드뮴에 의해 유도된 LC3II 단백질에 영향을 주지 못했다 (Fig. 6B). 그러나 자가포식현상의 화학적 억제제인 3MA를 2 시간 동안 전처리 한 후 160 μM 카드뮴을 9 시간 처리할 경우. 카드뮴에 의해 유도된 MRP 단백질을 현저히 감소 시켰으며, 이는 Akt 인산화를 억제하였다. 또한 3MA 처리는 카드뮴에 의해 유도된 caspase-3의 활성화를 증가시켰다 (Fig. 6C). 3MA 처리에 의한 caspase-3 활성화와 세포 생존율과의 관련성을 확인하기 위하여, RWI38 세포에 2 시간 동안 3MA를 전처리 한 후 카드뮴으로 24 시간 동안 처리하고 MTT 분석 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 3MA 처리는 카드뮴에 의해 감소된 세포 생존율을 더욱더 감소시켰다 (Fig. 6D). 이는 카드뮴에 의해 유도된 자가포식현상이 세포사멸을 억제함으로써 세포를 보호하는데 관여한다는

것을 시사해 준다. 따라서 자가포식현상의 억제에 대한 결과를 자가포식소체 형성에 관련된 *atg5* 유전자 발현의 억제를 통해 확인하였다. Fig. 5F 에서와 같이 *atg5* 유전자를 RWI38 세포에 이입 했을 때, MRP와 MRP의 표적단백질인 Akt의 단백질 발현을 현저하게 감소시켰다. 이는 또한 카드뮴에 의해 유도된 pro-caspase-3의 단백질 양을 현저히 감소시키는 원인이 되었다 (Fig. 6E). 이 결과는 카드뮴에 의해 유도된 MRP 신호전달 체계가 자가포식현상에 의해서 조절된다는 것을 나타낸다. 위의 결과에서 Akt가 MRP의 표적단백질임을 증명하기 위하여 PI3K 억제제인 Ly294002를 사용하였다. RWI38 세포에 Ly294002를 2 시간 동안 전처리 한 후 9 시간 동안 160 μM 카드뮴을 처리하였다. Ly294002의 처리는 카드뮴에 의해 유도된 MRP의 단백질의 양에 영향을 주지 않았으므로 Akt는 MRP의 표적단백질임을 확인하였다 (Fig. 6F). 따라서 위의 결과는 자가포식현상이 MRP의 조절을 통해 카드뮴에 의해 유도되는 세포사멸을 억제한다는 것을 시사해준다.

4. 고 찰

카드뮴은 체내에서 오랜 기간 동안 축적되는 중금속으로 폐, 간, 신장, 콩팥, 생식기관등 여러 기관에서 독성을 일으킴으로써 (Achanzar et al.. 2001), 발암의 중요한 원인이 됨에도 불구하고, 그 작용기전에 대해서는 연구가 미흡하다. 본 연구에서 내성유전자인 MRP가 자가포식현상에 의해 조절됨으로서 카드뮴에 대한 내성원인이 됨을 폐 상피세포인 WI38 세포에 증명하였다.

MT는 중금속을 해독하는데 중요한 역할을 하고, 여러 종의 카드뮴에 대한 내성세포주에서 카드뮴의 내성기전에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어 왔다 (Klaassen et al., 1999). 또한 MT는 카드뮴으로 인한 세포독성에 대해 세포를 보호하는 것으로 보고 되었는데, 실제로 MT는 세포사멸을 억제함으로써 카드뮴 독성에 대해 세포를 보호하는 것으로 알려졌다 (McAleer and Tuan., 2001; Shimoda et al., 2003). 본 연구에서도 RWI38 세포는 WI38 세포보다 5 배 이상 내성을 지니고 있었으며, 이때 MT level의 상승을 동반하였고, 카드뮴에 대한 세포사가 억제된 것으로 나타났다.

다제약물 내성 단백질 (multidrug resistant proteins-MRP)은 세포의 해독과 암의 치료를 방해하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 세포막에 존재하는 P-gp는 MRP와 같은 transporter이므로, 배출 펌프로써 항암제를 배출시켜 종양세포의 항암제에 대한 내성에 관여한다 (Deeley et al., 2006). HTB-546 renal adenocarcinoma cell line, proximal tubule cells, 그리고 Caco-2 TC7 cells에서 카드뮴 처리는 P-gp 단백질 또는 *mdr-1* mRNA level을 상승시켰다 (Thévenod et al., 2000; Huynh-Delerme et al., 2005). 사람의 MRP1 유전자 서열과 기능 모두가 밀접하게 관련되어 있는, 카드뮴 · 납 내성 유전자 1 (Yeast cadmium resistance factor 1-*YCF 1*)의 분포는 카드뮴에 대한 독성과 밀접한 관련성을 나타냈다 (Tommasini et al., 1996). 선충류의 일종인 *Caenorhabditis elegans*는 4 종류의 MRP homologue를 발현하는데 그 중 MRP1이 카드뮴 또는 비소의 독성과 밀접한 관련이 있었다 (Broeks

et al., 1996). 위의 연구들은 포유류에 대한 연구는 아니지만, 카드뮴 내성에 있어서 MRP1의 관련성을 시사해준다. 현재의 연구에서 카드뮴 내성을 갖는 RWI38 세포에서 MRP 활성화는 카드뮴 내성에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

Akt는 PI3K의 표적단백질로, 세포 생존경로에 있어서 중요한 역할을 수행하는 조절자로 알려져 있다 (Datta et al., 1997; Yune et al., 2008). 또한, 선행의 연구 보고에 의하면 카드뮴은 MCF-7 유방암 세포에서 Akt의 활성화를 유도하였다 (Brama et al., 2007; Liu et al., 2008). 본 연구에서도 RWI38 세포에서 카드뮴에 의해 Akt의 활성화가 확인 되었다. MRP의 기능에 비추어 볼 때, RWI38 세포에서 MRP 발현과 Akt 사이에 상관관계가 있을 것으로 생각되었다. 이 가설을 MRP의 화학적 억제제인 probenecid 또는 MRP 유전자의 발현을 억제시키는 실험을 통하여 확인하였으며, 카드뮴에 의해 인산화된 Akt의 감소와 함께 caspase-3의 활성화가 증가함을 발견하였다. 이러한 결과는 MRP가 Akt의 활성화를 통해 카드뮴 독성으로부터 세포를 보호한다는 것을 나타내주고 있다.

자가포식현상은 오래된 단백질이나 또는 노쇠한 세포소기관이 분해되는 과정이다. 선행의 연구에서는 WI38 세포에 카드뮴을 처리하면 Bid와 Bax의 활성화를 통해 세포사멸이 유도되었다 (Oh et al., 2004). 그러나 본 연구에서는 RWI38 세포는 카드뮴에 대해서 미토콘드리아에 의한 세포사멸 경로는 나타나지 않았다. 세포사멸의 억제는 세포생존에 중요한 역할을 하며, 이는 종양이나 암으로 발전하는데 원인으로 작용하기도 한다. 또한, 자가포식현상은 세포사멸을 억제 할 수 있다 (Gozuacik and Kimchi., 2004). 카드뮴으로부터 유도된 자가포식현상이 세포사멸을 억제 할 수 있는지 실험한 결과, RWI38 세포에서 카드뮴의 처리로 인해 자가포식소체의 형성과 관련된 유전자인 Atg5와 LC3II가 증가 되었다. 또한 자가포식현상의 억제제인 BaF1과 3MA에 의해 LC3I과 LC3II의 flux를 증명함으로써 카드뮴에 의해 유도된 자가포식현상이 기능적임을 증명하였다. 또한 자가포식현상의 억제는 caspase-3의 활성화를 증가시켜 카드뮴에 대한 독성에 자가포식현상이 관련되어 있음을 시사한다.

따라서 본 연구의 결과, 자가포식현상은 카드뮴에 반응하여 MRP-Akt 신호전달 체계를 유도함으로써 세포를 보호한다는 것을 증명하였다. 화학적 억제제나 유전자의

감소로 인해 자가포식현상이 억제되면 카드뮴에 의한 MRP의 발현이 감소되고, 이는 세포사멸을 증가시켰다. 따라서 본 연구는 카드뮴의 내성을 증가시키는 MRP가 세포의 생존 신호전달체계 경로에서 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다.

5. 결 론

카드뮴에 대한 내성과 관련된 기전을 연구하기 위하여, 사람의 폐상피 세포인 WI38 세포로부터 5 배 이상의 카드뮴에 저항성을 갖는 RWI38 세포를 확립하였다. RWI38 세포는 카드뮴에 반응하여 다제약물 내성 단백질 (MRP-1)과 metallothionen 높은 발현을 보였으며, 이는 RT-PCR과 Western blotting을 통하여 확인하였다. 카드뮴은 RWI38 세포에서 인산화된 Akt를 활성화시켰고, 화학적 MRP의 억제제인 probenecid 나 MRP-1에 대한 siRNA는 세포사와 caspase-3 활성화를 증가시켰다.

카드뮴 처리는 RWI38 세포에서 자가포식현상을 유도하였으며, 이는 Atg5 유도, LC3II 증가 그리고 GFP-LC3 dot 형성을 통해 증명하였다. 화학적 자가포식현상의 억제제인 3-methyladenine 나 Atg5 유전자의 발현억제는 카드뮴에 의해 유도된 인산화된 Akt와 MRP-1을 감소 시켰으며, 또한 capase-3의 활성화를 증가시켰다. 그러나 MRP-1에 대한 화학적 억제제나 유전자 발현 억제는 카드뮴에 의한 LC3II의 유도에 영향을 주지 않았다. 따라서, 본 연구는 카드뮴에 의해 유도된 자가포식현상은 MRP-Akt 신호전달체계를 통해 세포사멸을 억제함으로서 세포를 보호하는 역할을 한다는 것을 밝혔다.

6. 감사의 글

가을 추수가 끝난 황량한 논을 보니 일 년 농사를 끝내고 뿌듯해 할 농군들의 마음이 헤아려져 포만감도 느껴지지만 한 편으론 이상기후로 인해 예상했던 수확량을 얻지 못해 아쉬움도 클 거란 생각에 논문을 어렵게 마무리한 지금 공감이 되어 집니다. 어느 새 12월.. 마무리 하는 달에다 저에게는 철없이 집을 떠났던 6년간의 세월을 갈무리하는 시점에 서 있습니다. 좀 더 열심히 할 걸 하는 아쉬움을 뒤로 하며 그동안 저에게 이 한 편의 논문이 결실을 맺기까지 음으로 양으로 혼을 불어넣어주셨던 모든 분들께 머리 조아려 감사 인사드립니다.

조선대학교 내성세포 연구센터에 인연의 끈을 이어주셨던 호남대학교 임 동옥 교수님, 또 여러 가지로 도움을 주신 임 성철 교수님, 최 철희 교수님, 그리고 신 성희 교수님께도 깊은 감사 드립니다. 힘들 때나 외로울 때 친구가 되어 주어 지난 6년간 타지에서의 고충을 함께 나눌 수 있었던 선영 언니와의 추억은 이곳을 떠나도 잊지 못할 겁니다. 이 논문이 완성되기까지 조석으로 눈길을 주고 받으며, 힘을 주셨던 센터의 모든 식구들에게도 감사드립니다.

아무것도 모르는 철부지 였던 저를 친부모처럼 달래고 보살펴 주시며 지금의 이 자리에 서있게 해주신 오 선희 교수님, 평생의 은인으로 생각하며 살겠습니다. 휴일과 사계의 변화와도 상관없이 불철주야 연구에만 몰두하시는 교수님의 모습을 보며 학자의 길이 얼마나 어려운지 두려움도 많이 느꼈습니다. 노력 없이는 그 어떤 결과도 얻어낼 수 없다는 진리도 깨달았습니다. 이제 실험실에서 교수님과 함께 한 지도 어언 두 해가 지났습니다. 교수님의 사랑과 정은 가슴에 묻고 교수님의 열정과 노력은 머리에 남겨 앞으로 부끄럽지 않은 교수님의 제자가 되도록 노력하며 살겠습니다.

끝으로 평생을 저만 바라보시고 철없는 제가 원하는 건 무엇이든 들어주신 우리 부모님, 세상에서 제일 재미있는 놀이가 공부라며 지금의 연세에도 몸소 공부에 대한 열정을 보여주시는 친할아버지, 친할머니, 아침 잠 많은 큰손녀 학교에 지각할까 매일 아침마다 모닝콜 해주신 외할아버지, 자신 몸은 힘들고 아파도 큰손녀가 몸이 아플까 밥을 굶지 않을까 제 걱정만 해주시는 외할머니께. 이 논문을 드립니다.

7. 참고 문헌

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM and Waalkes MP. Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. *Can. Res.* 61: 445-458, 2001.

Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A and Sarkadi B. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity. *Toxicol. Let.* 11: 140-141, 133-143, 2003.

Brama M, Gnessi L, Basciani S, Cerulli N, Politi L, Spera G, Mariani S, Cherubini S, d'Abusco AS, Scandurra R and Migliaccio S. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an Eradependent mechanism. *Mole. Cell. Endocrin.* 264: 102-108, 2007.

Broeks A, Gerrard B, Allikmets R, Dean M and Plasterk RH. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans. EMBO J.* 15: 6132-6143, 1996.

Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S and Reed JC Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321, 1998.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death

machinery. *Cell* 91: 231-241, 1997.

Datta SR, Brunet A and Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts, *Genes Develo.* 13: 2905-2927, 2008.

Deeley RG, Westlake C and Cole SPC. Transmembrane transport of endo-and Xenobioticsby mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* 86: 849-899, 2006.

Dong Z, Wang L, Xu J, Li Y, Zhang Y, Zhang S and Miao J. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. *Toxicology* 23: 105-110, 2009.

Galluzzi JM, Vicencio O, Kepp E, Tasdemir MC, Maiuri and G Kroemer. To die or not to die: that is the autophagic question. *Curr. Mol. Med.* 8: 78-91, 2008.

Gozuacik D and Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23: 2891-2906, 2004.

Huynh-Delerme C, Huet H, Noël L, Frigieri A and Kolf-Clauw M. Increased functional expression of Pglycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. *Toxicology* 19: 439-447, 2005.

IARC. Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans 58: IARC, Lyon 1993.

Klaassen CD, Liu J and Choudhuri S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 267-294, 1999.

Liu Z, Yu X and Shaikh ZA. Rapid activation of ERK1/2 and Akt in human breast cancer cells by cadmium. *Toxicol. Appl. Pharm.* 228: 286-294, 2008.

McAleer MF and Tuan RS. Metallothionine overexpression in human trophoblastic cellsprotecrs against cadmium-induced apoptosis. *Toxicology* 14: 25-42, 2001.

Oh SH, Lee BH and Lim SC. Cadmium induces apoptotic cell death in WI 38 cells via caspase-dependent Bid cleavage and calpain-mediated mitochondrial Bax cleavage by Bcl-2-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 68: 1845-1855, 2004.

Qu W, Bortner CD, Sakurai T, Hobson MJ and Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in arsenic-induced malignant transformation: Role of the JNK signal transduction pathway. *Carcinigenesis* 23: 151-159, 2002.

Qu W, Diwan BA, Reece JM, Bortner CD, Pi J, Liu J and Waalkes MP. Cadmium-induced malignant transformation in rat liver cells: Role of aberrant oncogene expression and minimal role of dxidative stress. *Int. J. Cancer.* 114: 436-355, 2005.

Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi T, Mori M and Waalkes MP. Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis, *Toxicol.*

Sci. 73: 294-300, 2003.

Shivapurkar N, Reddy J, Chaudhary PM and Gazdar AF. Apoptosis and lung cancer: A review. *J. Cell Biochem.* 88: 885-898, 2003.

Thévenod F, Friedmann JM, Katsen AD and Hauser IA. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kB activation protects kidney proximal tubules cells from cadmium and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 1887-1896, 2000.

Tommasini R, Evers R, Vogt E, Mornet C, Zaman GJ, R, Schinkel AH, Borst P and Martinoia E. The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1. *PNAS* 93: 6743-6748, 1996.

Turcotte S and Giaccia AJ. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2: 246-251, 2010.

Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* 53: 2003.

Wang SH, Shih YL, Lee CC, Chen WL, Lin CJ, Lin YS, Wu KH and Shih CM. The role of endoplasmic reticulum in cadmium-induced mesangial cell apoptosis. *Chem. Biol.* 181: 45-51, 2009.

Wolf BB and Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 274: 20049-20052, 1999.

Wyllie AH, Ker JF and Currye AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251-306, 1980.

Yang LY, Wu KH, Chiu WT, Wang SH and Shih CM. The cadmium-induced death of mesangial cells results in nephrotoxicity. *Autophagy* 5: 571-572, 2009.

Yune TY, Park HG, Lee JY and Oh TH. Estrogen-induced Bcl-2 expression after spinal cord injury is mediated through phosphoinositide-3-kinase/ Akt-dependent CREB activation. *J. Neurotrauma,* 25: 1121-1131, 2008.

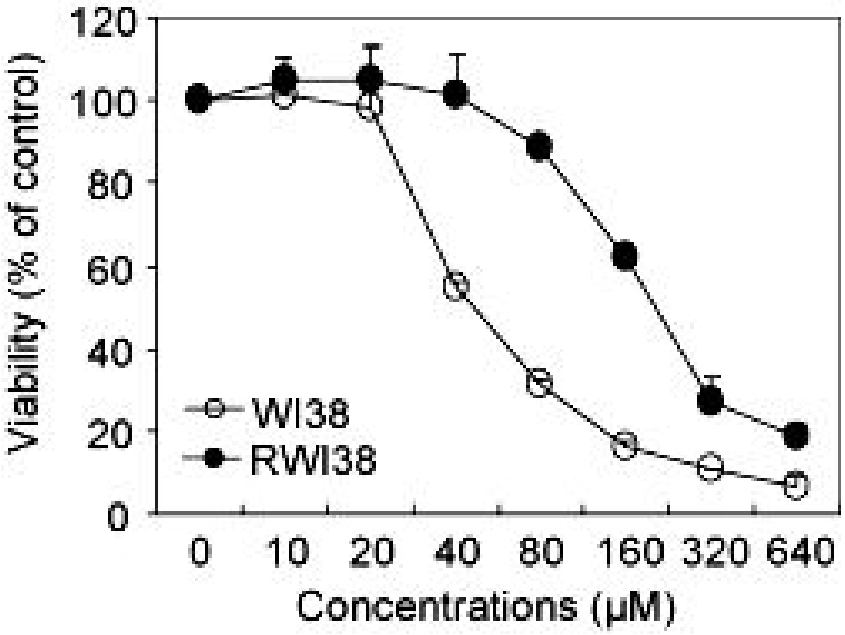


Fig. 1. Effects of cadmium on viability in WI38 and RWI38 cells. Cells were treated with the indicated concentrations of cadmium for 24 h, and viability was determined using an MTT assay. The values represent percent survival relative to the untreated control from three independent experiment performed in triplicate.

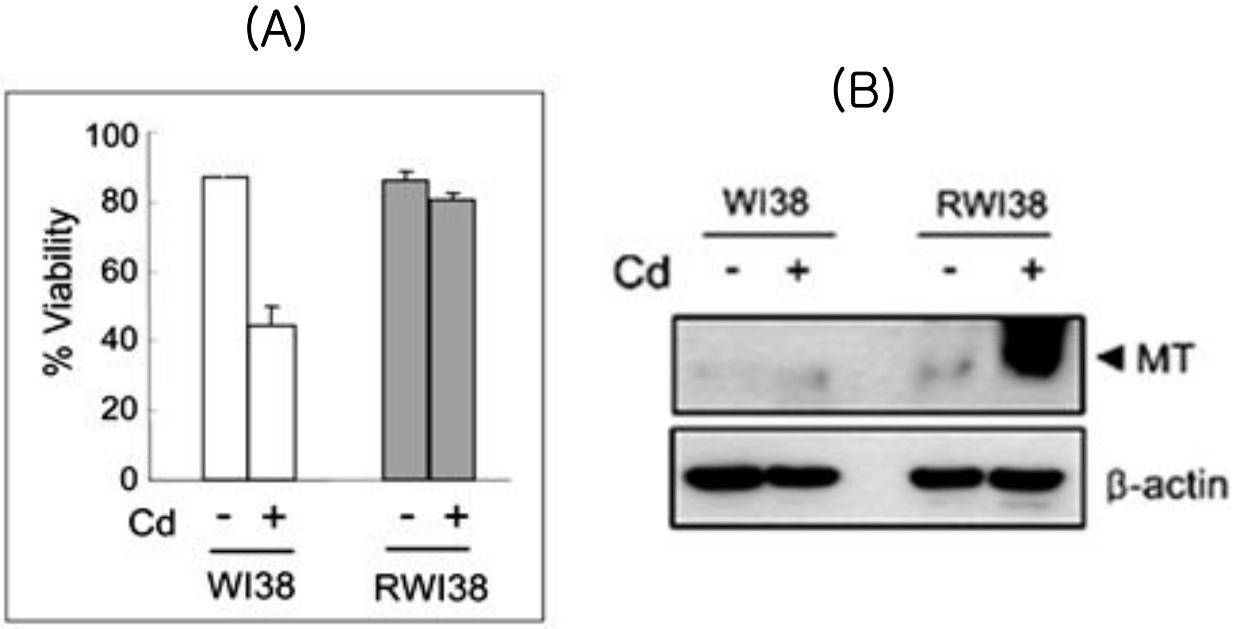


Fig. 2. MT expression in response to cadmium in RWI38 cells.

(A) Parental WI38 and cadmium-resistant RWI38 cells were exposed to 40 μM cadmium for 24 h, and cell viability was measure using Trypan blue exclusion as described in the Materials and Methods section. Values are expressed as the mean ± S.D. of the percentage of live cells determined in three independent experiments. (B) Cells were treated with cadmium for as described in the A, and MT expression level was analyzed by immunoblotting. Cd, cadmium; MT, metallothionein.

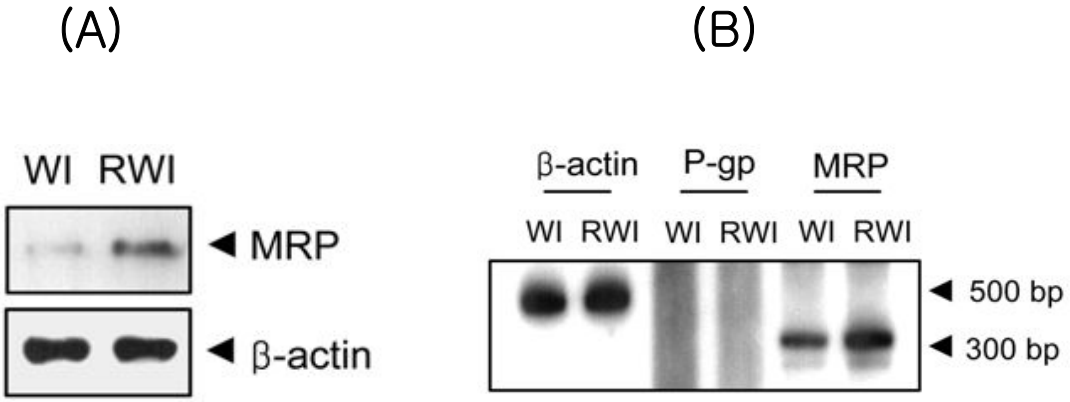
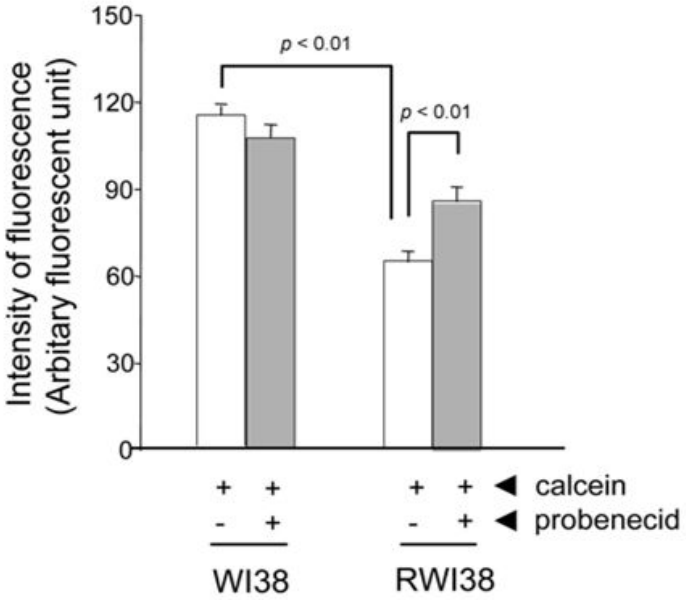


Fig. 3. Expression and functional activity of MRP in WI38 and cadmium -resistant RWI38 cells.

(A) Western blot analysis for MRP. WI38 and RWI38 cells were lysed, quantified, and equal proteins were separated using 7% SDS-PAGE, and then immunoblotted with anti-MRP antibody. β-actin was used as the loading control.

(B) RT-PCR analysis for P-gp and MRP1. Total RNA isolated from the cells was reversetranscribed, and the resulting cDNAs were subjected to PCR amplification using primers specific for MRP1 (355 bp), P-gp (296 bp), and β-actin (501 bp). The PCR products were then electrophoresed on 7% non-denaturing polyacrylamide gels. The gels were dried and autoradiographed.

(C)



(C) Functional activity of MRP in RWI38 cells. The cells were incubated with 0.5 μM calcein-AM for 30 min at 37°C in the absence or presence of 0.5 mM probenecid. The fluorescence intensity of the intracellular calcein was then analyzed via spectrofluorimetry as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean ± S.D. of three independent experiments.

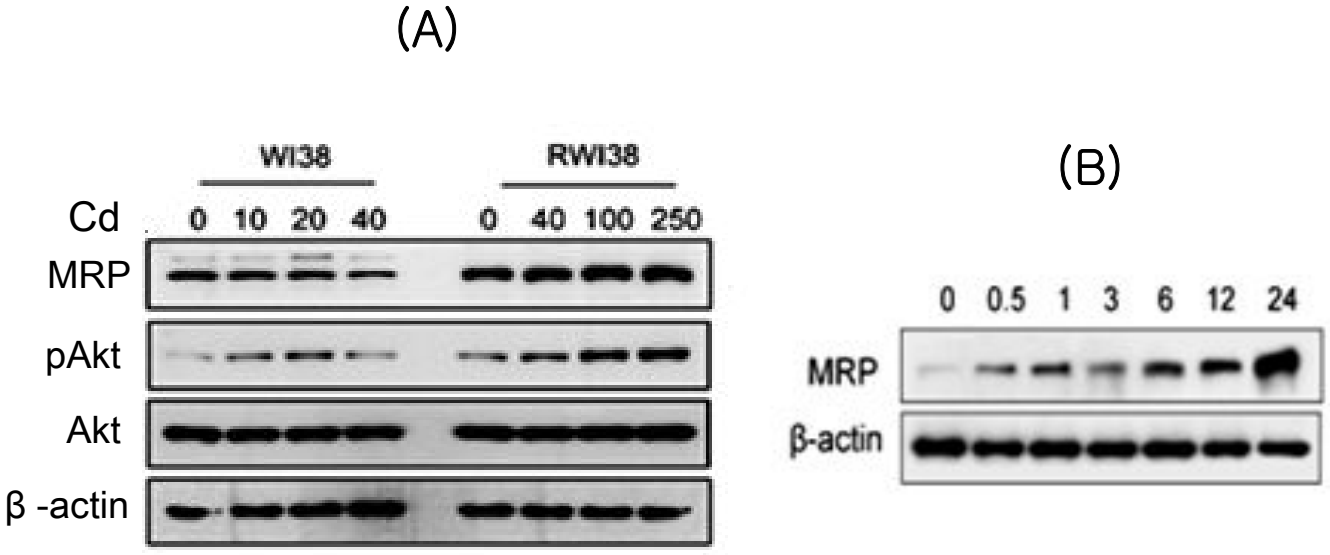
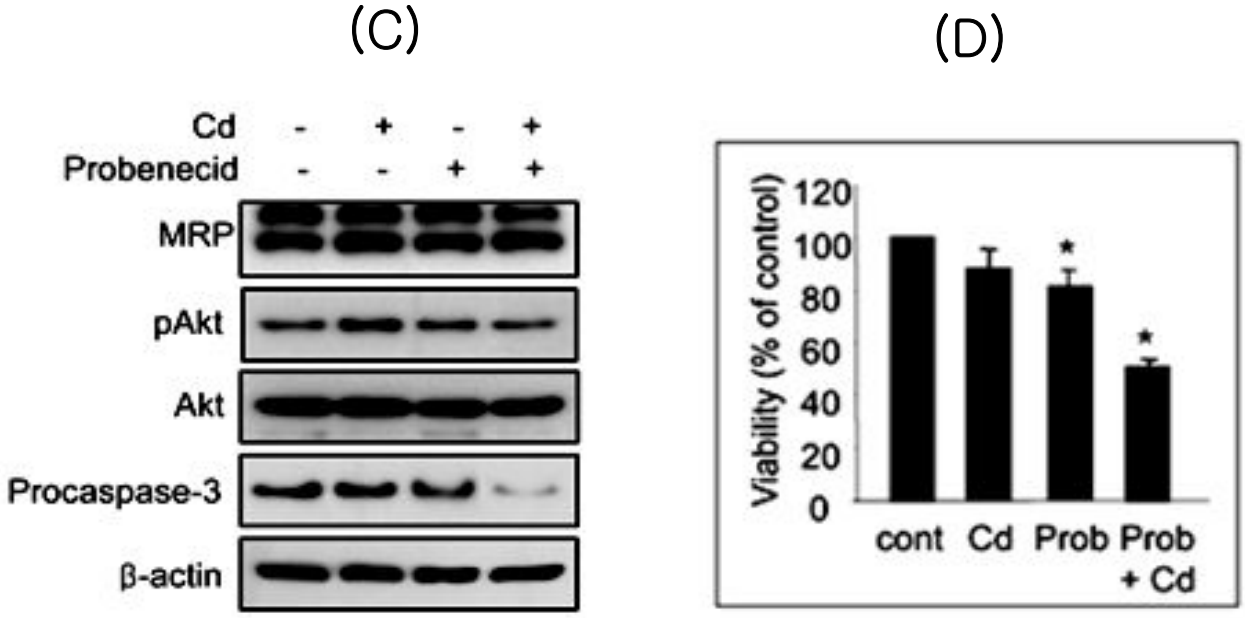


Fig. 4. Cadmium induced MRP regulates Akt phosphorylation.

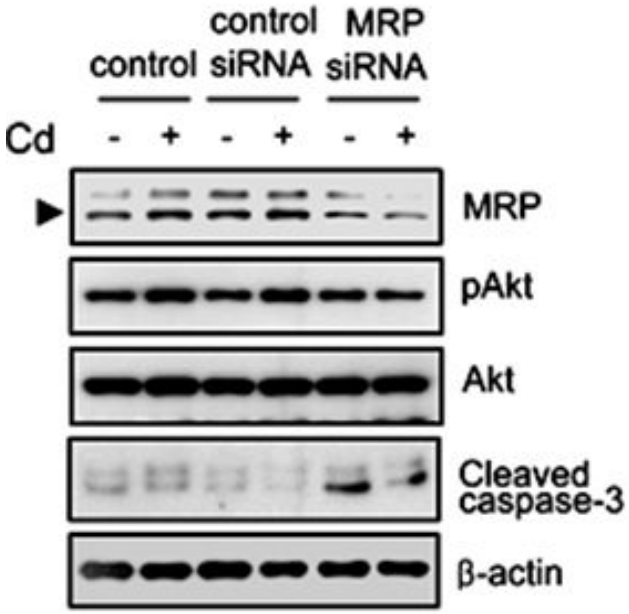
(A) WI38 and RWI38 cells were treated with increasing concentrations of cadmium as indicated in the figure for 12 h, and were harvested and lysed. The lysates were analyzed for MRP, phosphorylated-Akt, and Akt by immunoblotting.

(B) Kinetics for MRP expression in RWI38 cells. cells were treated with 160 μM cadmium in RWI38 cells for up to 24 h , harvested, and lysed. levels of MRP and β-actin were determined by immunoblotting.



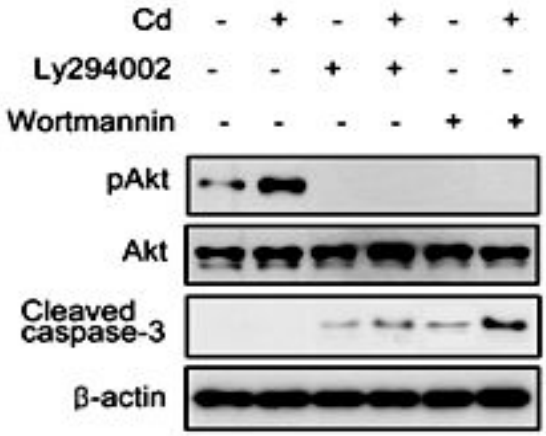
(C-D) RWI38 cells were pre-treated with 0.5 mM probenecid for 1 h and then further treated with 160 mM cadmium for 12 h. The lysates were analyzed for MRP, phosphorylated-Akt, Akt, and procaspase-3 by imunoblotting using the corresponding antibodies. Cell viability was measured by MTT assay. Cd, cadmium; Prob, probenecid.

(E)

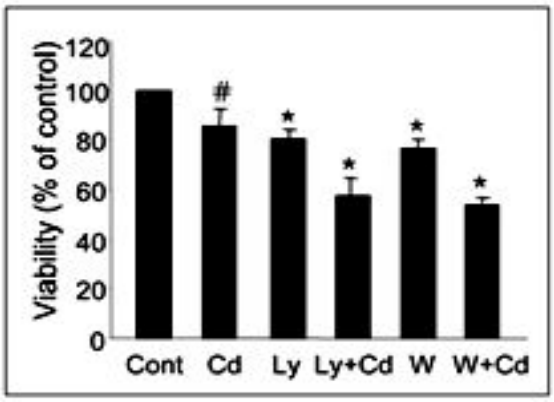


(E) Silencing of the MRP gene downregulated the level of phosphorylated Akt, and led to caspase-3 activation. Cells transfected with control or MRP-specific siRNA were treated with 160 μM cadmium for 12 h. The lysates were analyzed for MRP, phosphorylated-Akt, Akt, procaspase-3, and the active form of caspase-3 by immunoblotting. Transfection with nonspecific siRNA did not affect on the expression of MRP as compared to the control cells, whereas knockdown of the MRP gene markedly attenuated the level of MRP protein. Cd, cadmium.

(F)



(G)



(F-G). Inhibition of Akt phosphorylation using PI3K inhibitors activated caspase-3 and enhanced cell death. RWI38 cells were pre-treated with Ly294002 (20 μM) and wortmannin (200 nM) and then further treated with cadmium for 12 h. Cell viability was measured using the MTT assay. The data are expressed as mean ± S.D. from three independent experiments each done in triplicate. Values were compared between the non-treated control and the treated group. Cd, cadmium; Ly, Ly294002,; W, wortmannin.

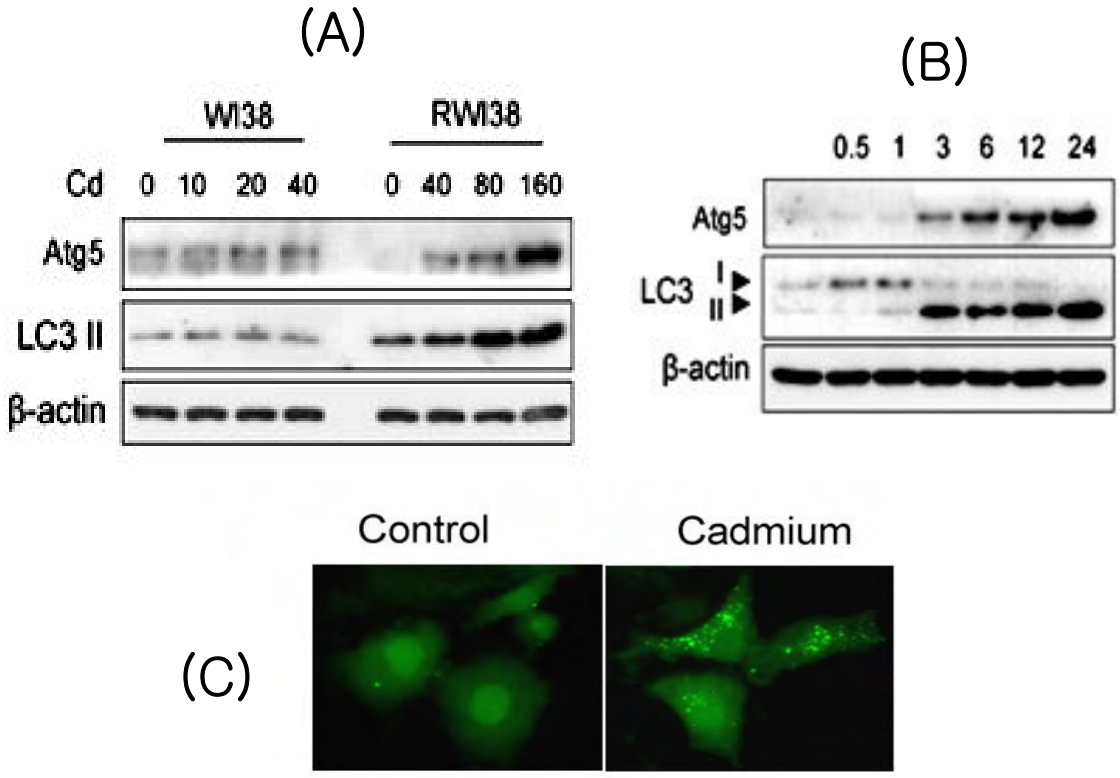
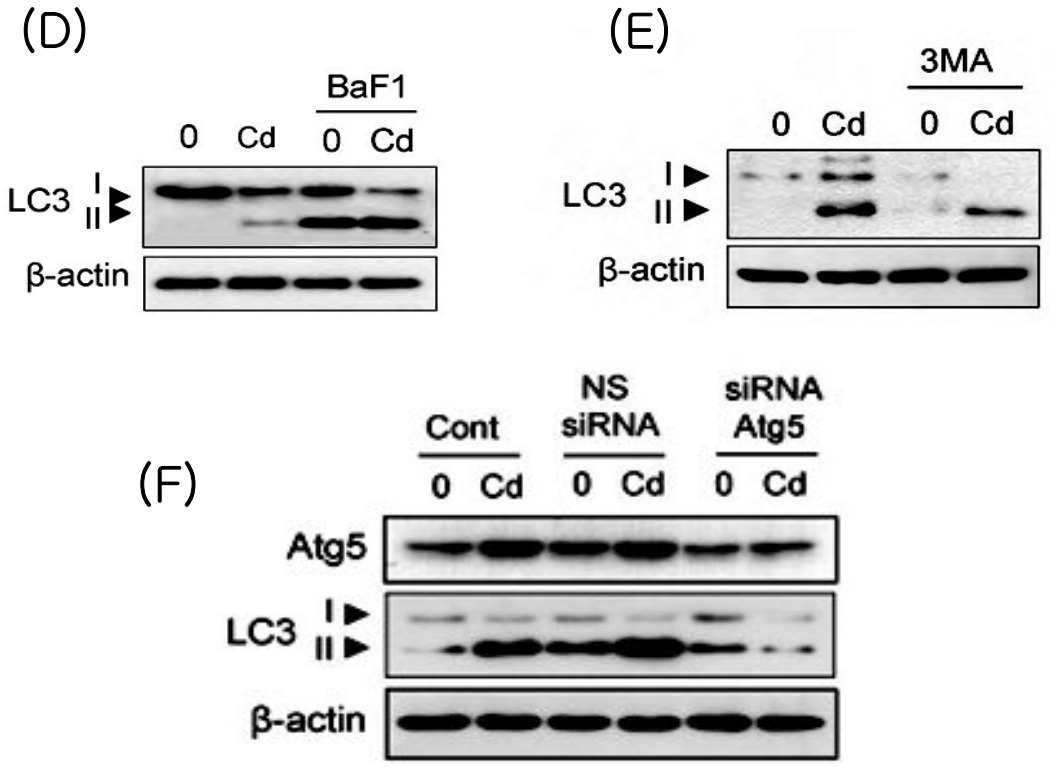


Fig.5. Induction of autophagy and expression of autophagy-related proteins in RWI38 cells.

(A) WI38 and RWI38 cells were treated with various concentrations of cadmium for 12 h, and LC3 II and β-actin were determined by immunoblot analysis.

(B) Cells were treated with 160 μM cadmium for up to 24 h, and then analyzed for Atg5, LC3, and β-actin by immunoblot analysis.

(C) Cadmium treatment induced GFP-LC3B fluorescence punctate in RWI38 cells. Cells were transiently transfected with GFP-LC3B, and then treated with 160 μM cadmium for 9 h. Fluorescence microscopy images (200×) show diffuse green staining in non-treated control cells; however, the staining is relocalized as GFP-LC3 dots after treatment of RWI38 cells with cadmium.



(D) Autophagy flux by cadmium treatment in RWI38 cells. Cells were treated with 160 μM cadmium for 9 h after pretreatment with 100 nM BaF1 for 1 h. LC3II showed marked accumulation in the presence of BaF1.

(E) Cells were pretreated with 5 mM 3MA for 2 h before the addition of 160 μM of cadmium for 9 h. LC3 conversion markedly decreased by 3MA.

(F) Knockdown of the Atg5 gene decreased cadmium-induced LC3 conversion. Cells transfected with nonspecific siRNA or Atg5 specific siRNA were treated with 160 μM cadmium for 9 h, and the lysates were analyzed for LC3. β-actin was used as a loading control. Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments. Cd, cadmium; BaF1, bafilomycin A1; 3MA, 3-methyladenine.

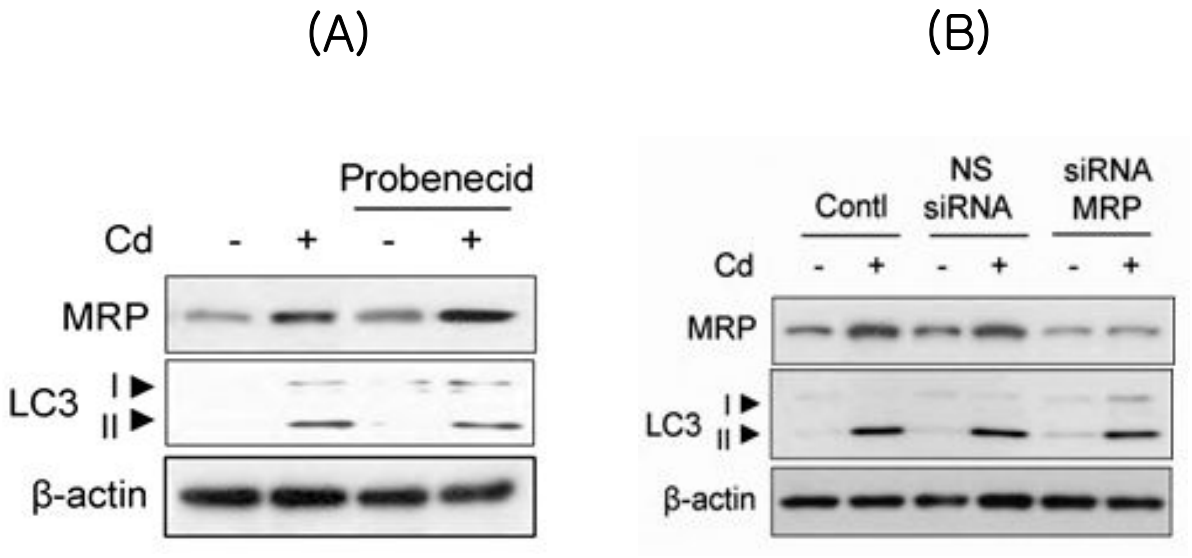
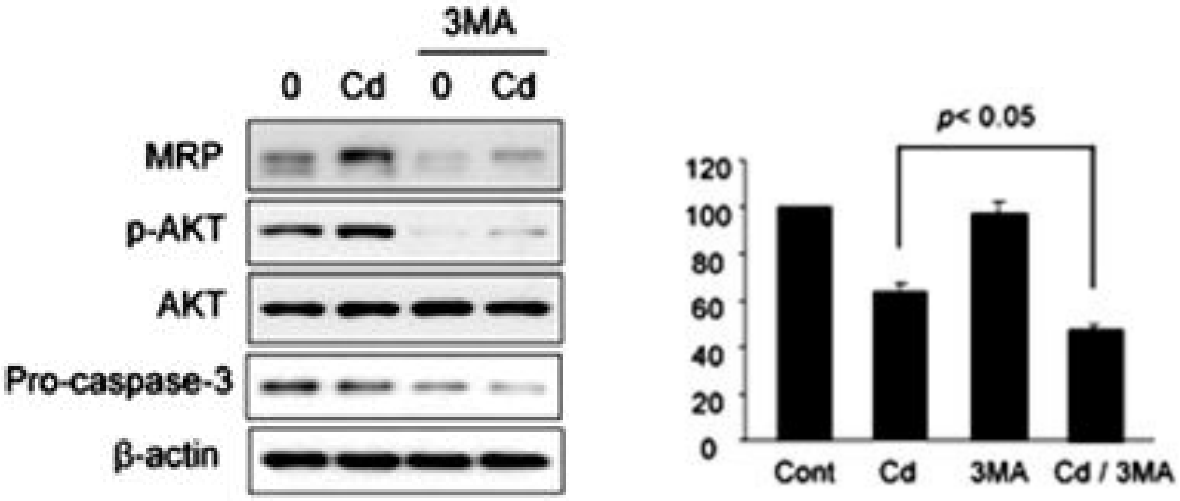


Fig. 6 The effects of cadmium-induced autophagy on MRP expression or on cell death.

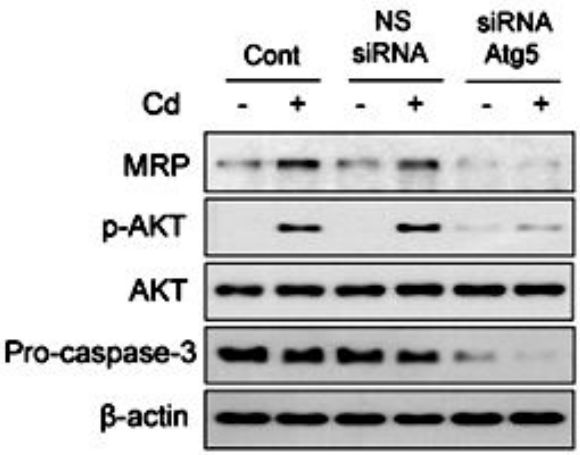
(A) Effects of probenecid on cadmium-induced autophagy. RWI38 cells were pretreated with 0.5 mM probenecid for 1 h before 160 μM cadmium was added for 9 h. Cells were then harvested and lysed, and the lysates were analyzed for MRP, LC3 and β-actin by immunoblotting. (B) Knockdown of the *mrp-1* gene did not affect on cadmium-induced autophagy. Cells transfected with nonspecific siRNA or MRP-specific siRNA were treated with 160 μM cadmium for 9 h, and the lysates were analyzed for MRP, LC3, and β-actin by immunoblotting. The immunoblots shown are representative of at least three independent experiments.

(C) (D)

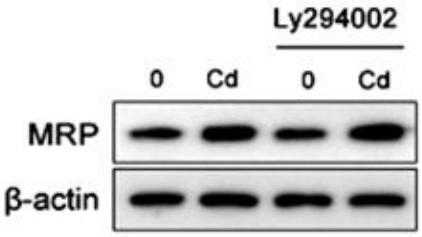


(C) Cells were pretreated with 5 mM 3MA for 2 h before the addition of 160 μM of cadmium for 9 h, harvested, and MRP, Akt, phosphorylated-Akt, procaspase-3 and β-actin were determined by Western blotting. (D) Cells were treated as described in A for 24 h, and cell viabilities were determined by MTT assay. The values represent percent survival relative to the untreated control from three independent experiments performed in triplicate. Cd, cadmium; 3MA, 3- methyladenine.

(E)



(F)



(E) Knockdown of the Atg5 gene downregulated MRP, Akt, phosphorylated-Akt, and procaspase-3. Cells transfected with nonspecific siRNA or Atg5 specific siRNA were treated with 160 μM cadmium for 9 h, and the lysates were analyzed for MRP, Akt, phosphorylated-Akt, procaspase-3, and β-actin by immunoblotting.
(F) MRP regulates Akt. Cells were treated with 50 μM Ly294002 for 30 min, followed by the addition of 160 μM cadmium for 9 h. Lysates were analyzed for MRP and β-actin by immunoblotting.

저작물 이용 허락서

학 과	바이오신약개발	학 번	20097156	과 정	석사
성 명	한글: 이 송 희 한문 : 李 松 熙 영문 : Lee Song-Hee				
주 소	인천광역시 연수구 선학동 태산아파트 4동 605호				
연락처	E-MAIL : godlshshy@nate.com				
논문제목	한글 : 카드뮴 내성에 있어서 세포자가포식현상(Autophagy)의 관련성:MRP-Akt 신호전달체계의 조절 영어 : Involvement of autophagy-mediated MRP-Akt signaling pathway in cadmium resistance.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2011 년 12 월 일

저작자: 이 송 희 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하