

조골세포에서 시안산에 의한 유전자 발현

계명대학교 신장연구소

성정훈 · 하은영 · 손정남 · 황은아 · 박성배 · 문교철

Gene Expression by Cyanate in the Osteoblasts

Jung Hoon Seong, M.D., Eunyoung Ha, M.D., Son Jung Nam, M.S.,
Eun A Hwang, M.D., Sung Bae Park, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D.

*Dongsan Kidney Institute, Keimyung University,
Daegu, Korea*

Abstract : Renal osteodystrophy (ROD) contributes as a major long-term complication which is associated with high rate of morbidity. The factors contributing to ROD are still incompletely characterized. Cyanate, known as one of the uremic toxins, is derived spontaneously from urea. According to previous studies, cyanate appears to play a role as a trigger for apoptosis by activating proapoptotic signals in osteoblasts. The purpose of this study is to detect the gene expression by cyanate in osteoblasts. Microarray for 4,800 genes to detect gene expression was performed using ROS 17/2.8 cells incubated with 20 mmol/L cyanate. About twenty percent of the genes among 4,800 genes were expressed by cyanate, and most of the expressed genes except the genes which are related stress were inhibited by cyanate. According to these results, cyanate may play a role in the pathogenesis of ROD due to plays as one of the stress factors and the inhibitor for gene expression in osteoblasts.

Key Words : Cyanate, End-stage renal disease, Microarray, Osteoblast

서론

신성 골이영양증(renal osteodystrophy)은 말기 신부전 환자에서 흔히 동반되는 골격계 합병증으로 섬유성 골염, 골연화증, 골다공증 및 골경화증 등의 다양한 골질환이 포함된다. 신성 골이영양증은 투석 환자는 물론 투석 전 및 신장 이식 환자에서도 흔히 합병된다. 신성 골이영양증의 병인으로는 고인산혈증 및 저칼슘혈증으로 인한 부갑상선 호르몬의 과다 생성, 비타민 D 대사 장애가 주로 거론되어 왔으나[1] 이들 호르몬 이상만으로는 신부전 환자에서 동반되는 다양한 형태의 골질환들을 설명할 수 없는 부분이 지적되어 왔는데[2], 최근 골기질의 생성 및 골석회화에 관여하는 조골세포와 골흡수에 관여하는 파골세포의 밀접한 상호작용으로 이루어지는 골재형성의 이상이 신성 골이영양증의 하나의 병인으로 제시되고 있다[3]. 특히 요독증에 의한 조골세포의 기능 이상이나 수적 감소가 신성 골이영양증의 원인으로 지목된 바 있다[4]. 또한 시안산이 조골세포에서 세포자멸사를 유발하는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 말기신부전 환자의 조골세포에서 시안산에 의한 유전자 발현의 변화도 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 시안산을 조골세포 배양액에 투여하고 mRNA를 분리하여 microarray를 수행함으로써 어떤 유전자의 어떤 변화가 유발되는지를 보다 명확히 규명하여 요독물질 특히 시안산에 의한 유전자 발현 정도를 비교 검토하고자 하였다. 이 연구를 통하여 신장 기능이 손상된 환자에서 합병증 예방을 위해 그 발현이 차단되거나 활성화 되어야 할 유전자가 제시될 수 있을 것으로 생각된다.

재료 및 방법

1. 세포배양

골육종 세포주인 ROS 17/2.8 세포는 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)와 1% 항생제 및 항진균제(10 U/mL penicillin 및 10 μ L/mL

streptomycin)가 함유된 DMEM배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건하에 배양하였다. 세포는 3일 간격으로 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 계대하였다.

2. RNA 분리

20 mmol/L의 시안산을 처리한 세포를 회수한 후, 1 mL의 TRIzol 용액(Invitrogen사, Carlsbad, CA, 미국)으로 균질화시킨 후, 0.2 mL의 chloroform을 가하여 실온에 5분간 방치한 다음 15초간 혼합하여 실온에서 10분간 방치하였다. 균질액은 4°C에서 12,000 \times g (average relative centrifugal force)로 15분간 원심분리하여 유기용매층의 DNA와 변성된 단백질을 제거하고, 수용액층의 RNA를 얻었다. 동량의 isopropanol을 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 후 12,000 \times g로 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA에 75% ethanol 1 mL을 가한 뒤 7,500 \times g로 5분간 원심분리하여 RNA를 세척한 다음 5분간 자연건조시켰다. 건조된 RNA를 RNase-free water로 녹인 후, 정량하여 시료로 사용하였다.

3. 유전자 발현에 대한 microarray

cDNA microarray는 디지털지노믹스(서울, 한국)에 의뢰하였다. 즉, 20 μ g의 RNA에 2 μ L의 oligo (dT) primer (0.5 μ g/ μ L)를 첨가하고 RNase-free water로 최종 31 μ L로 맞추어 잘 혼합한 뒤 70°C에서 10분간 반응시킨 후, 얼음으로 1분간 식히고 7,500 \times g로 5분간 원심분리하여 RNA 혼합액을 얻었다. RNA 혼합액에 5 \times first strand buffer 10 μ L, 0.1 mol/L DTT 5 μ L, Rnasin 1 μ L, 50 \times aminoallyl-dNTP mix 1 μ L, SuperScripy II (200 U/ μ L) 2 μ L를 첨가하여 42°C에서 1시간 반응시켰다. RNA 혼합액에 1 mol/L NaOH 16.5 μ L와 0.5 mol/L EDTA 16.5 μ L를 첨가하여 잘 섞은 다음 65°C에서 15분간 RNA를 가수분해하고, 1 mol/L HCl 16.5 μ L를 가하여 중화시켰다. cDNA 반응액을 Microcon YM-30

(Millipore, Bedford, MA, 미국)로 정제하여 cDNA를 얻고 곧 진공으로 건조하였다. cDNA는 증류수와 1 mol/L 탄산나트륨 완충액(sodium carbonate buffer)으로 녹인 후, NHS-ester Cy dye 2 μ L를 첨가하여 실온의 암실에서 1시간동안 반응시켰다. 반응액을 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, 미국)로 정제한 다음 진공으로 건조하였다. 건조된 시료를 hybridization buffer 220 μ L로 녹인 후, 95°C에서 5분간 끓인 다음 30초 동안 침강시켰다. Hybridization chamber에 slide (GenePloer TwinChip Rat-5K, 디지털지노믹스㈜, 한국)를 놓고 slide 표면위의 표식된 지점에 시료를 점적한 후, coverslip으로 덮어 42°C에서 16시간 반응시켰다. Hybridization된 slide는 세척한 다음 건조시켜 Scanarray Lite (PerkinElmer Life Science, Billerica, MA, 미국) 장치와 GenePix Pro 3.0 프로그램(Axon Instruments, Union city, CA, 미

국)을 이용하여 주사(scan)하였다.

성 적

20 mM의 시안산을 처리한 조골세포에서의 유전자 발현 변화를 4,800개의 유전자가 집적된 칩을 사용하여 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, Cy5 염색(시안산 투여군)에 의한 붉은색과 Cy3 염색(대조군)에 의한 녹색을 중첩한 그림으로, 유전자 발현이 증가했을 때는 붉은색을, 유전자 발현 감소했을 때는 녹색을 나타내었다. 노란색은 변화가 없음을 나타내며, 주사기(scanner)의 값을 초과했을 때는 하얀색을 나타내었다.

유전자 발현 변화는 2배 이상 또는 0.5배 이하의 값을 나타내는 유전자를 선정한 결과는 Table 1과 같다. 시안산을 투여한 군과 대조군의 조골세포에서 발현된 유전자는 총 4,800개의 유전자가 점적

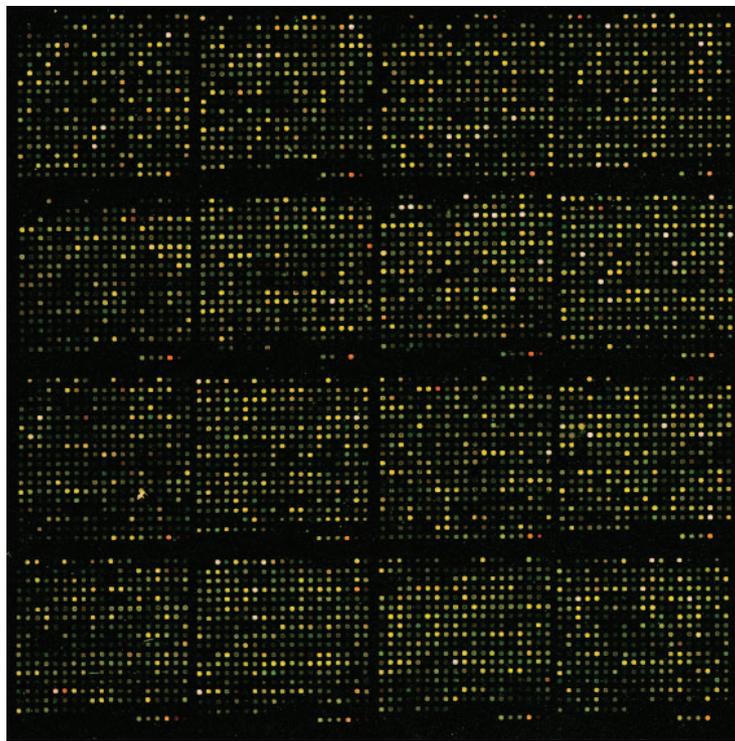


Fig. 1. The scanned image of cDNA microarray. Twenty mol/L cyanate was added to ROS 17/2.8 cells for microarray.

Table 1. Functional Classification of Up- or Down-Regulated Genes

	Up-regulated genes	Down-regulated genes
Metabolism	5	11
Cell differentiation	-	2
Cell growth and/or maintenance	2	4
Signal transduction	1	1
Morphogenesis	1	1
Response to stress	2	-
Others	12	13
Total	23	32

Twenty mol/L cysate was added to ROS 17/2.8 cells. The genes were defined as up-regulated genes when the ratio of mRNA levels were more than 2.0 than controls, and defined as down-regulated when those were less than 0.5 in the cDNA microarray analysis.

된 cDNA 칩에서 939개(19.6%)의 유전자가 발견되었다. 발견된 유전자 중 2배 또는 0.5배 이하로 발견된 유전자는 전체 발견된 유전자 939개 중 55개인 약 5.9%였으며, 55개의 유전자 중 약 41.8%인 23개의 유전자는 발현이 증가하였으며, 55개의 유전자 중 약 58.2%인 32개의 유전자는 발현이 감소하였다. 즉, 전체적으로 시안산은 조골세포의 유전자 발현을 감소시켰고, 조골세포의 대사, 세포의 분화, 성장 및 유지에 관여하는 유전자의 발현을 감소시켰으며, 스트레스에 반응에 관여하는 유전자의 발현은 증가시켰다.

Table 2와 3은 발현이 증가된 유전자와 감소된 유전자의 이름과 상대적인 발현 비율을 수치화하여 각각 나타내었는데 특히 대사 관련 유전자인 *Gstm2*는 4.45배, 세포 성장 및 유지 관련 유전자인 *Fxyd4*는 2.56배, 신호전달 유전자인 *Dtr*은 2.56배, 형태발생 관련 유전자인 *Cd44*는 2.19배, 스트레스 반응 유전자인 *Hmox1*과 *Cryab*는 각각 3.41배 7.59배의 발현 증가를 보였다. 그리고 대사 관련 유전자인 *Cyp1b1*과 *Fdps*의 발현이 각각 0.21배 및 0.22배였으며, 세포 분화 관련 유전자인 *Bmp4*는 0.37배로 감소하였고, 세포 성장 및 유지 관련 유전자인 *Trdn*은 0.37배, 신호전달 유전자인

*Madh4*는 0.43배, 형태발생 관련 유전자인 *Pthr1*은 0.48배로 감소하였다.

고 찰

신성 골이영양증(renal osteodystrophy)은 말기 신부전 환자에서 흔히 동반되는 골격계 합병증으로 섬유성 골염, 골연화증, 골다공증 및 골경화증 등의 다양한 골질환이 포함된다. 신성 골이영양증의 병인으로는 고인산혈증 및 저칼슘혈증으로 인한 부갑상선 호르몬의 과다 생성, 비타민 D 대사 장애가 주로 거론되어 왔으나[6] 이들 호르몬 이상만으로는 신부전 환자에서 동반되는 다양한 형태의 골질환들을 설명할 수 없는 부분이 지적되어 왔는데 [2], 특히 요독증에 의한 조골세포의 기능 이상이나 수적 감소가 신성 골이영양증의 원인으로 지목된 바 있다[7]. 조골세포는 골기질의 생산과 무기질화에 관여하는 세포로서 여러 단계의 분화과정을 거쳐 활성화되며, 부갑상선호르몬, 인슐린양 성장인자(insulin-like growth factor, IGF), 골형성단백(bone morphogenetic proteins), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor), TGF- β 등

Table 2. Genes Up-Regulated by Cyanate in ROS17/2.8 Cells

(Category) Gene name	Chromosomal position	GenBank. ACC. NO.	Fold
(Metabolism)			
5-Nucleotidase (Nt5)	8q31	AA858866	2.02
Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22 (Cyp2d22)	7q34	AA997886	2.07
Farensyl diphosphate synthase (Fdps)	2q34	AA818832	2.29
Glutamate oxaloacetate transaminase 1 (Got1)	1q54	AA900928	2.61
Glutathion S-transferase, mu 2 (Gstm2)	2q34	AA875380	4.45
(Cell growth and/or maintenance)			
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha (Gadd45 α)	4q31-q33	AI070295	2.17
FXYD domain-containing ion transport regulator 4 (Fxyd4)	4q42	AA875655	2.56
(Signal transduction)			
Diphtheria toxin receptor (Dtr)	18p11	AI059540	2.19
(Morphogenesis)			
DC44 antigen (Cd44)	3q31	AA817820	2.74
(Response to stress)			
Heme oxygenase (decycling) 1 (Hmox1)	19p11	AA874884	3.41
Crystallin, alpha B (Cry α b)	8q23	AA818795	7.59
(Others)			
FK506-binding protein 1a (Fkbp1a)	3q41	AA819703	2.01
Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase 1 (Hsd3 β 1)	2q34	AA923963	2.09
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 16 kDa (Atp6l)	10q12	AA858959	2.17
Unknown (protein for MGC:72638) (MGC72638)	1q21	AA925225	2.22
SH2-B PH domain containing signaling mediator 1 (Sh2bpsm1)	-	AA963098	2.31
Striatin, calmodulin binding protein 3 (Strn3)	6q22	AA900392	2.34
PMF32 protein (Pmf32)	2q34	AA964295	2.47
Kangai 1 (Kai1)	3q24	AI043632	2.56
Monoglyceride lipase (Mgl1)	4q34	AA899964	3.01
Complement component 4a (Ppt2)	20p12	AA965125	3.42
Inositol hexaphosphate kinase 1 (Ihpk1)	8q32	AA924682	4.78
Myeloid differentiation primary response gene 116 (Myd116)	1q22	AA818647	12.65

GenBank Acc. No.: Accession number of GenBank[®] which is the NIH genetic sequence database.

Table 3. Genes Down-Regulated by Cyanate in ROS17/2.8 Cells

(Category) Gene name	Chromosomal position	GenBank. ACC. NO.	Fold
(Metabolism)			
Cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1 (Cyp1b1)	6q11	AI060107	0.21
Farensyl diphosphate synthase (Fdps)			
3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1 (Hmgcs1)	2q34	AA859192	0.22
	2q16	AA924800	0.24
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6 (Acsl6)	10q22	AA900433	0.28
SECIS binding protein 2 (Secisbp2)	17p14	AA819531	0.41
Expressed in non-metastatic cells 1 (Nme1)	10q26	AI030088	0.44
GATA binding protein 2 (Gata2)	4q32-q41	AA899775	0.45
Membrane metallo endopeptidase (Mme)	2q31	AI136717	0.45
S-adenosylmethionine decarboxylase 1 (Amd1)	20q12	AA818513	0.46
Kruppel-like factor 3 (basic) (Klf3)	14p11	AA819845	0.46
Mevalonate (diphospho) decarboxylase (Mvd)	19q12	AI058569	0.49
(Cell differentiation)			
Bone morphogenetic protein 4 (Bmp4)	15p14	AI136500	0.37
Testis lipid binding protein (Tlbp)	2q23	AI145277	0.47
(Cell growth and/or maintenance)			
Triadin (Trdn)	1p11	AA859043	0.38
Synaptotagmin 5 (Syt5)	1q12	AA998567	0.40
UDP-glucose dehydrogenase (Ugdh)	14p11	AI045500	0.42
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain (Acadvl)	10q24	AI137407	0.45
(Signal transduction)			
MAD homolog 4 (Drosophila) (Madh4)	-	AA997371	0.43
(Morphogenesis)			
Parathyroid hormone receptor 1 (Pthr1)	8q32	AI059504	0.48

GenBank Acc. No.: Accession number of GenBank[®] which is the NIH genetic sequence database.

Table 3. Genes Down-Regulated by Cyanate in ROS17/2.8 Cells (continued)

(Category) Gene name	Chromosomal position	GenBank. ACC. NO.	Fold
(Others)			
A kinase (PRKA) anchor protein 8 (Akap8)	7q11	AA998213	0.27
Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta (Idh3B)	3q36	AA900150	0.32
Inositol polyphosphate multikinase (Impk)	20p11	AA955187	0.33
Ribosomal protein S24 (Rps24)	16p16	AA997138	0.35
Hematological and neurological expressed sequence 1 (Hn1)	10q32.3	AA875240	0.37
Similar to Igh-6 protein (LOC299357)	6q32	AI137992	0.40
Phospholipase C, beta 4 (Plcb4)	3q36	AI045980	0.40
Synaptosomal-associated protein, 23 kDa (Snap23)	-	AA858838	0.44
Iron-responsive element-binding protein (Ratireb)	5q22	AI045830	0.45
Nuclear protein E3-3 (LOC56769)	8q32	AA874973	0.45
General transcription factor II-I repeat domain-containing 1 (Gtf2ird1)	12q12	AA900046	0.45
Synaptojanin 2 binding protein (Synj2bp)	6q24	AA924552	0.48
Voltage-dependent anion channel 1 (Vdac1)	10q22	AA875489	0.48

GenBank Acc. No.: Accession number of GenBank[®] which is the NIH genetic sequence database.

다양한 사이토카인의 영향을 받아 골형성에 관여하는 것으로 알려져 있다[8]. 따라서 요독증 상태에서는 이들 사이토카인의 생성 및 기능 장애가 조골세포의 수적 감소 또는 기능 이상을 초래하며 이것이 신성 골이영양증을 유발하는 하나의 인자로 작용할 것으로 추측되고 있다[9]. 조골세포에 대한 시안산의 영향을 평가한 최근의 연구[5]에 의하면, 조골 세포인 ROS 17/2.8 세포에 시안산을 첨가한 후 세포독성을 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolin bromide (MTT)

법으로 측정된 결과, 시안산의 농도에 비례하여 세포독성이 유의하게 증가함이 밝혀졌다. 시안산에 의한 ROS 17/2.8 세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과, 시안산을 처리하였을 때, 세포는 배양 플라스크에 부착되지 않은 부유상태로 존재하며, 단층을 형성하지 못하였다고 한다. 시안산에 의한 ROS 17/2.8 세포의 세포자멸사 관련 인자의 발현을 조사한 결과, 시안산의 농도에 따라 DNA 단편화가 증가하였으며 시안산의 처리에 의해 세포자멸사의 주범인 caspase-3과 caspase-8의 발현이

증가하였고, caspase-3의 활성 증가를 확인하였다고 한다. Caspase-3의 기질인 retinoblastoma (Rb)와 poly-(ADP-ribose)-polymerase (PARP)는 시안산의 처리에 의해 절단되는 양이 증가하였으며, cytochrome c의 발현도 증가하였다. 세포자멸사를 억제하는 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 발현은 시안산의 농도에 비례하여 감소하였다고 한다. 이러한 연구결과에 따라, 시안산이 조골세포 내에 caspase cascade를 통한 세포자멸사를 유도하는 것으로 추론하였다 [5].

본 연구에서 신장 손상의 원인 물질이며 복막에서 만성 염증을 유발하고 조골세포에서 자멸사를 유발하며, 적혈구 생성인자의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있는 시안산을 사용하여 4,800개의 유전자에 대한 유전자 발현을 조사하였을 때 대부분의 유전자는 요독인 시안산에 의해 그 발현이 감소하나 스트레스 관련 유전자만이 그 유전자 발현이 증가하였다. 즉, 요독물질인 시안산은 말기신부전 환자에서 각종 유전 발현을 억제하면서 스트레스를 유발하여 신부전 환자의 각종 합병증을 유발하는 원인의 하나로 생각된다.

따라서 시안산은 말기신부전 환자에서 각종 유전 발현을 억제하면서 스트레스를 유발하여 신부전 환자의 각종 합병증을 유발하는 원인의 하나로 생각된다.

요 약

조골세포에서 요독물질의 하나인 시안산을 사용하여 유전자에 대한 microarray를 수행하였다. 4,800개의 유전자에 대한 유전자 발현을 조사하였을 때 대부분의 유전자는 요독물질인 시안산에 의해 그 발현이 감소하나 스트레스 관련 유전자만이 그 유전자 발현이 감소하였다. 따라서 본 연구로 볼 때 시안산은 말기신부전 환자에서 각종 유전 발현을 억제하면서 스트레스를 유발하여 각종 합병증을 유발하는 원인의 하나로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med* 1995;**333**:166-75.
2. Wang M, Hercz G, Sherrard DJ, Maloney NA, Segre GV, Pei Y. Relationship between intact 1-84 parathyroid hormone and bone histomorphometric parameters in dialysis patients without aluminum toxicity. *Am J Kidney Dis* 1995;**26**:836-44.
3. Disthabanchong S, Gonzalez EA. Regulation of bone cell development and function: implication for renal osteodystrophy. *J Investig Med* 2001;**49**:240-9.
4. Marcus R. Normal and abnormal bone remodeling in man. *Ann Rev Med* 1987;**38**:129-41.
5. 황은아. 시안산에 의한 조골세포의 자멸사. *계명대학교 박사학위 논문* 2004, pp. 1-35.
6. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med* 1995;**333**:166-75.
7. Marcus R. Normal and abnormal bone remodeling in man. *Ann Rev Med* 1987;**38**:129-41.
8. Lian JB, Stein GS, Canalis E, Gehron Robey P, Boskey AL. Bone formation: Osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In Favous MJ (ed). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999, pp. 14-29.
9. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med* 1995;**333**:166-75.