# 시안산에 의한 조골세포의 손상에서 아미노산과 알부민의 효과

새천년 병원 내과<sup>1</sup>, 계명대학교 의과대학 내과학교실<sup>2</sup>, 생화학교실<sup>3</sup>

박경대 $^{1} \cdot$ 박성배 $^{2} \cdot$ 최혜정 $^{3} \cdot 문교철^{3} \cdot 김현철^{2}$ 

# Effect of Amino Acids and Albumin on Damage Induced by Cyanate in Osteoblast

Kyung-Dae Park, M.D.<sup>1</sup>, Sung-Bae Park, M.D.<sup>2</sup>, Hye-Jung Choi, M.S.<sup>3</sup> Kyo-Cheol Mun, M.D.<sup>3</sup> and Hyun-Chul Kim, M.D.<sup>2</sup>

Sae-Chun Yeon Hospital<sup>1</sup>, Gyeongjoo, Korea, Department of Internal Medicine<sup>2</sup> and Department of Biochemistry<sup>3</sup>, Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea

**Purpose**: Cyanate, known as one of the uremic toxins and derived spontaneously from urea, has several effects on the biologic substances including erythropoietin, antioxidant and ceruloplasmin. To find out the protective materials from the hazardous effect of cyanate in osteoblast, we added twenty amino acids, albumin globulin and hemoglobin in the culture media containing osteoblastic cells with cyanate.

**Methods**: Osteoblastic ROS 17/2.8 cells, exposed to various concentrations of sodium cyanate, were used to analyze for the cytotoxicity. The cyanate-induced cytotoxicity was assessed by the methylthiazolyldiphenyl -tetrazolium bromide (MTT) assay by measuring the absorbance of the reaction solution at 570 nm. Viability of the treated cells was expressed as A570 of sample/A570 of control. The degree of the carbamylation was measured using trinitrobenzenesulphonic acid. The degree of the carbamylation in amino acid was about 50% in average.

**Results :** The degree of the carbamylation in albumin was increased depending on the incubation time with cyanate and the concentration of the cyanate. The degree of the carbamylation in globulin and hemoglobin was nearly zero. Asp, Glu, Leu, Trp and Tyr among the twenty amino acids revealed the protective effect against the damage induced by cyanate. And only albumin among the three proteins revealed the protective effect.

**Conclusion :** On the basis of these results, Asp, Glu, Leu, Trp, Tyr and albumin are useful tools for the protection against damages by cyanate carbamylation.

Key Words: Amino acids, Albumins, Cyanates, Osteoblasts

#### 서 론

당뇨병, 만성사구체신염, 고혈압, 다발성 낭종신 등의 다양 한 원인에 의한 신질환 환자들에서 사구체 여과율이 정상인 의 15 mL/min 이하로 감소되면 그 원인 질환에 관계없이

접수: 2007년 3월 16일, 승인:2007년 6월 20일 책임저자:문교철, 대구 중구 동산동 194 동산의료원 계명의대 생화학교실 Tel:053)250-7789, Fax:053)250-7461 E-mail:mun@dsmc.or.kr 신기능이 저하되어 말기 신부전이 된다<sup>1)</sup>. 말기신부전이 되면 pH를 유지하고 칼슘, 인산염, 마그네슘 등의 균형에 관여하 고 mineral homeostasis에 관여하는 신장 기능의 변화가 초래되어 대사성 골질환을 유발하게 된다. 따라서 말기신부전 환자에서는 섬유성 골염, 골연화증, 골다공증, 골경화증 및 투 석 연관 아밀로이드증 등의 신성골이영양증 (renal osteodystrophy)이 초래된다<sup>1)</sup>. 신성 골이영양증은 투석 환자는 물론 투석 전 및 신장 이식 환자에서도 흔히 합병되는데, 신성 골 이영양증의 병인으로는 고인산혈증 및 저칼슘혈증으로 인한 부갑상선 호르몬의 과다 생성, 비타민 D 대사 장애가 주로 거론되어 왔으나<sup>2-5)</sup> 이들 호르몬 이상만으로는 신부전 환자 에서 동반되는 다양한 형태의 골질환들을 설명할 수 없는 부 분이 지적되어 왔다<sup>6)</sup>. 최근 골기질의 생성 및 골석회화에 관 여하는 조골세포와 골흡수에 관여하는 파골세포의 밀접한 상 호작용으로 이루어지는 골재형성의 이상이 신성 골이영양증 의 하나의 병인으로 제시되고 있다<sup>7, 8)</sup>. 특히 요독증에 의한 조골세포의 기능 이상이나 수적 감소가 신성 골이영양증의 원인으로 지목된 바 있으며<sup>9)</sup>, 최근에는 요독 중에서 시안산 이 그 원인 물질 중의 하나로 제시된 바 있다<sup>10)</sup>.

요독 물질이란 말기 신부전환자의 체내에 축적되어 각종 대사에 영향을 미치는 단백질과 아미노산의 분해산물인 요소, 구아니딘, 페놀, 유기산 및 중간 대사산물들이 알려져 왔다<sup>11,</sup> <sup>12)</sup>. 이러한 요독 가운데 요소 (urea)는 말기 신부전 환자의 혈액 내에 약 50 mmol/L 정도의 고농도로 존재하며 체내에 서 자연발생적으로 요소의 0.8%가 시안산 (cyanate)과 암모 니아로 전환되는데<sup>11-13)</sup>, 시안산은 친전자성을 띠기 때문에 아미노산, 펩티드 및 각종 단백질 등의 아미노 말단과 카르바 밀화라는 반응을 하며, 아미노군과 sulfhydryl군의 카르바밀 화 물질로써 연구되어 왔다<sup>11, 12, 14, 15)</sup>. 이러한 카르바밀화 반 응은 체내 조직 단백질의 불활성화를 초래하여, 조직 단백의 구조와 기능을 변화시킨다. 그외 활성산소종을 생산하는 동시 에 각종 사이토카인과 성장인자의 생산을 증가시켜 광범위한 세포 반응과 조직 손상을 유발하는 것으로 밝혀지고 있으며 16), 최근에는 시안산이 조골세포에서 세포자멸사를 유발하는 것으로 생각되고 있다<sup>10)</sup>.

따라서 이 연구에서는 시안산이 음전하를 가지고 있음으로 아미노 군을 가진 아미노산 및 각종 약물 및 독소들과 결합 능력을 가진 알부민 등의 일부 단백질을 이용하여 시안산에 의한 조골세포 손상을 방지할 수 있는지를 알아보고자 하였 으며 이를 통해 신성 골이영양증을 방지하는 방법을 제시하 고자 하였다.

#### 대상 및 방법

## 1. 시 약

아미노산 중 L-alanine (Ala), L-asparagine (Asn), Lcysteine (Cys), L-glutamine (Gln), L-histidine (His), L-isoleucine (Ile), L-lysine (Lys), L-methionine (Met), L-phenylalanine (Phe), L-proline (Pro), L-serine (Ser), L-threonine (Thr), L-tryptophan (Trp), L-valine (Val) 과 단백질 중 bovine hemoglobin, bovine serum albumin, r-globulin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국) 제품을 사용하였다. Glycine aminoacetic acid (Gly), Larginine (Arg), L-tyrosine (Tyr)는 Junsei사 (Tokyo, 일본) 제품을, DL-isoleucine (Ile)과 L-leucine (Leu)은 Kanto사 (Tokyo, 일본) 제품을, L-aspartic acid (Asp)는 Katavama사 제품을, L(+)-glutamic acid (Glu)는 Riedelde Haen사 (Seezle, 독일) 제품을 사용하였다. Dulbecoo's Modified Eagles Medium (DMEM), Antibiotic-antimycotic (10 U/mL penicillin 및 10 µg/mL streptomycin), trypsin-EDTA 및 fetal bovine serum (FBS)는 Invitrogen Co. (GIBCOTM, Grand Island, NY, 미국)에서 구입하였 다. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolin bromide (MTT), phosphate buffered saline (PBS) 및 sodium cyanate는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, 미국) 제품을 사용하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad DC kit (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, 미국)를 사용하였으며 그 외 일반시약은 시판되는 특급 또는 일급품 을 사용하였다.

## 2. 시안산의 제조

시안산은 1 mol/L 농도가 되도록 PBS에 녹여 원액으로 사용하였으며, 실험에서는 DMEM 배지로 희석하여 필요한 농도로 세포에 처리하였다.

#### 3. 세포 배양

골육종 세포주인 ROS 17/2.8 세포는 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic이 함유된 DMEM배지로 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 세포는 3일 간격으로 0.05% trypsin-EDTA를 처리하여 계대하였다.

#### 4. 아미노산 및 단백질 농도

아미노산은 0.110 mmol/L가 되도록 가하여 시안산에 의 한 세포 독성 감소 효과를 관찰하였으며, 알부민 및 각종 단 백질들은 50 mg/mL의 농도가 되도록 첨가하여 시안산에 의 한 독성을 방지하는 정도를 관찰 하였다.

아미노산과 단백질이 카르바밀화 되는 정도를 측정하기 위

해 아미노산을 1 mmol/L가 되도록 PBS에 녹여 사용하였으 며, 알부민 및 각종 단백질들은 50 mg/mL의 농도가 되도록 녹여 사용하였다.

# 5. 세포 독성 검사

시안산에 의한 세포독성은 MTT의 대사 환원에 근거한 MTT 분석법 (assay)으로 측정하였다. ROS 17/2.8 세포는 96-well plate에 5,000 cells/well의 밀도로 접종한 후, 세포 가 plate 바닥에 부착하면 FBS-free DMEM 배지로 교체 하여 24시간 동안 세포의 증식을 정지시켰다. 2%의 FBS가 함유된 배지에 시안산을 0.0140 mmol/L의 농도로 48시간 동안 처리하고, 마지막 4시간 동안 10 µL의 MTT 용액(5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 37℃에서 반응시켰다. MTT 에 의해 형성된 보랏빛의 침전물인 formazan결정은 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 µL를 첨가하여 녹인 후, Model 550 microplate reader (Bio-Rad Lab. Inc., Hercules, CA, 미국)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시안 산에 의한 세포독성은 다음의 식으로 나타내었다.

 $Cytotoxi \ city \ (\%) = \left(1 - \frac{A_{570nm} \ of \ sample - A_{570nm} \ of \ blank}{A_{570nm} \ of \ control - A_{570nm} \ of \ blank}\right) \times 100$ 

#### 6. 카르바밀화 정도

시안산에 의한 아미노산과 단백질의 카르바밀화는 Horkko 등<sup>17)</sup>의 방법을 약간 수정하여 시행하였다. 즉, 각각 의 아미노산을 1 mmol/L가 되도록 PBS에 녹여 100 mmol/ L의 시안산과 혼합하여 phosphate buffer (pH 6.5)에 혼합 하여 37℃에서 48시간 반응시켰다. 각각의 단백질은 50 mg/mL가 되도록 PBS에 녹여 30 mmol/L의 시안산과 혼 합하여 phosphate buffer (pH 6.5)에 혼합하여 37℃에서 48시간 반응시켰다. 아미노산과 단백질을 각각 반응 후, PBS (pH 7.4)으로 4℃에서 투석하여 잔존하는 시안산을 제거한 다음 동결건조하였다. 카르바밀화 정도는 TNBS를 이용하여 유리 아미노기의 소실을 측정하였다. 아미노산 혹은 단백질액 1 mL과 4% NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4) 1 mL의 혼합액에 0.1%의 TNBS액 50 µL을 가한 다음 37℃에서 1시간 반응시켰다. 각 시료에 대한 흡광도를 340 nm에서 측정하여 TNBS 반 응성을 카르바밀화 되지 않은 각각의 아미노산 혹은 단백질 에 대한 흡광도의 백분율로 나타내었다.

#### 7. 성적 검정

자료는 평균±표준편차로 표시하였고, 대조군과 실험군 사 이의 비교는 Student's t-test로 하였으며 통계학적 유의수 준은 p값이 0.05 미만인 것으로 하였다.

#### 과

곀

# 1. 시안산이 ROS 17/2.8 세포의 사멸에 미치는 영향

시안산이 ROS 17/2.8 세포주의 사멸에 미치는 영향을 알 아보기 위해 well 당 5×10<sup>3</sup> cells/100 µL 농도로 넣고 시안 산을 0.1-40 mmol/L 농도로 24시간 처리한 후 MTT 방법 으로 세포 사멸 정도를 측정하였을 때, 0.1 mmol/L 농도에 서는 시안산을 처리하지 않은 군과 별다른 차이가 없었으나, 1 mmol/L 이상의 농도에서는 세포 사멸이 유의하게 증가하 여 40 mmol/L에서는 약 90%가 사멸되었다 (Fig. 1).



Fig. 1. Cytotoxicity of cyanate on the ROS 17/2.8 cells.



Fig. 2. Morphological changes by cyanate in the ROS 17/2.8 cells. 0.1 mM to 20 mM means the concentration of cyanate applied to the ROS 17/2.8. Osteoblasts were detached and floated to the top of the culture dish, and a monolayer was not formed in 20 mM of cyanate.

## 2. 시안산이 세포의 형태적 변화에 미치는 영향

대조군에서는 배양 플라스크에 부착하여 일정한 형태의 단 층을 유지한 반면, 시안산을 처리한 경우에는 농도가 증가함 에 따라 부유하기 시작하여 20 mmol/L의 시안산을 처리한 경우에는 대부분의 세포가 배양 플라스크에 부착되지 못하고 부유 상태로 존재하며, 단층을 형성하지 못하였다 (Fig. 2).

#### 3. 극성 아미노산의 카르바밀화 정도

국성 아미노산인 Cys, Asn, Gln, Ser, Thr 및 Tyr을 TNBS 반응을 통해 자유 아미노기의 소실을 측정하였을 때, Cys이 가장 적은 19%의 자유기 소실을 나타내었고, Asn 54%, Gln 45%, Ser 51%, Thr 55%, Tyr 51%로 모두 50% 내외의 비슷한 정도의 자유기 소실을 나타내었다 (Fig. 3).



Fig. 3. The degree of carbamylation in polar amino acids. One mM amino acids was carbamylated by incubation at 37°C with the 100 mM cyanate solution for 48 hours. The solution was followed exhaustive dialysis at 4°C against phosphate buffered saline, pH 7.4, to remove excess cyanate. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino groups using trinitrobenzenesulphonic acid. Fifty  $\mu$ L of 0.1 % trinitrobenzenesulphonic acid was added to 1 mL of dialvzed amino acid solution and 1 mL of 4% sodium hydrogen carbonate, pH 8.4, and this was incubated for one hour at 37°C. Absorbance was then measured at 340 nm against a sample blank, and the trinitrobenzenesulphonic acid reactivity was expressed as a percentage of the absorbance obtained for the non carbamylated amino acid. Abbreviations: C, cysteine; N, aspargine; Q, glutamine; S, serine; T, threonine; Y, tyrosine.

## 4. 비극성 아미노산의 카르바밀화 정도

비극성 아미노산인 Ala, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val 및 Trp을 TNBS 반응을 통해 자유 아미노기의 소실을 측정하였을 때, Pro이 0%, Trp 32.4%의 자유기 소실을 나 타내었고, Ala 51%, Phe 54%, Gly 61%, Ile 44%, Leu 51%, Met 51%, Val 50%로 모두 50% 내외의 비슷한 정도 의 자유기 소실을 나타내었다. Pro의 자유기 소실이 없는 것 은 Pro이 이미노산이기 때문에 TNBS 반응을 할 아미노군 이 없는 결과라 생각된다 (Fig. 4).

#### 5. 산성 및 염기성 아미노산의 카르바밀화 정도

산성 아미노산인 Asp와 Glu 그리고 염기성 아미노산인 His, Lys 및 Asn을 TNBS 반응을 통해 자유 아미노기의 소실을 측정하였을 때, 염기성 아미노산인 Asn이 35%의 자 유기 소실을 나타내었고, 나머지 아미노산 및 산성 아미노산



Fig. 4. The degree of carbamylation in nonpolar amino acids. One mM amino acids was carbamylated by incubation at 37°C with the 100 mM cvanate solution for 48 hours. The solution was followed exhaustive dialysis at 4°C against phosphate buffered saline, pH 7.4, to remove excess cyanate. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino groups using trinitrobenzenesulphonic acid. Fifty µL of 0.1 % trinitrobenzenesulphonic acid was added to 1 mL of dialyzed amino acid solution and 1 mL of 4% sodium hydrogen carbonate, pH 8.4, and this was incubated for one hour at 37°C. Absorbance was then measured at 340 nm against a sample blank, and the trinitrobenzenesulphonic acid reactivity was expressed as a percentage of the absorbance obtained for the non carbamylated amino acid. Abbreviations: A, alanine; F, phenylalanine; G, glycine; I, isoleucine; L, leucine; M, methionine; P, proline; V, valine; W, tryptophan.

들은 각각 Asp 48%, Glu 47%, His 42% 및 Lys 45%로 약 50%의 비슷한 정도의 자유기 소실을 나타내었다 (Fig. 5).

## 6. 단백질의 카르바밀화 정도

단백질로는 알부민, 글로불린 및 혈색소를 사용하여 TNBS 반응을 통해 자유 아미노기의 소실을 측정하였을 때, 알부민이 19%의 자유기 소실을 나타내었고, -globulin 0%, 혈색소는 1.7%의 자유기 소실을 나타내어, 단백질 중에서는 알부민만이 상당량의 자유기 소실을 나타내었다 (Fig. 6).

단백질 중 상당량의 자유 아미노시 소실을 보인 알부민을 대상으로 농도 및 시안산과의 배양 시간별로 자유 아미노기 의 소실을 TNBS 반응을 총하여 측정하였을 때 농도에 따라 자유 아미노기의 소실의 증가를 보였으며 (Fig. 7), 시안산과 의 배양 시간의 증가에 따라 역시 자유 아미노기의 증가를 나타내었다 (Fig. 8).



Fig. 5. The degree of carbamylation in acidic and basic amino acids. One mM amino acids was carbamvlated by incubation at 37°C with the 100 mM cyanate solution for 48 hours. The solution was followed exhaustive dialysis at  $4^{\circ}$  against phosphate buffered saline, pH 7.4, to remove excess cyanate. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino groups using trinitrobenzenesulphonic acid. Fifty µL of 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid was added to 1 mL of dialyzed amino acid solution and 1 mL of 4% sodium hydrogen carbonate, pH 8.4, and this was incubated for one hour at 37°C. Absorbance was then measured at 340 nm against a sample blank, and the trinitrobenzenesulphonic acid reactivity was expressed as a percentage of the absorbance obtained for the non carbamylated amino acid. Abbreviations: D, aspartic acid; E, glutamic acid; H, histidine; K, lysine; R, arginine.

## 7. 조골세포의 생존율에 대한 극성 아미노산의 영향

극성 아미노산인 Cys, Asn, Glu, Ser, Thr 및 Tyr이 조 골세포의 생존율에 미치는 영향을 보면, 이들 극성 아미노산 의 농도가 증가하면 세포의 생존율은 대체로 이들 아미노산 을 첨가하기 전 보다는 생존율이 증가하나 아미노산의 농도 가 증가함에 따라 감소하는 경향이었다 (Table 1). 조골 세 포에 시안산만을 첨가하면 세포의 생존율은 유의하게 감소하 였으며, 시안산에 의해 세포 생존율이 감소할 때 대부분의 극 성 아미노산은 세포 생존율을 증가시키지 않았으나, Tyr 만 이 시안산에 의해 감소되는 세포생존율을 증가시켰다 (Table 1). 또한 Tyr을 제외한 극성 아미노산 모두가 카르바밀화 정 도에 관계없이 생존율 변화는 비슷한 양상을 보여 카르바밀 화 반응과 방어 효과는 비례적인 관계를 나타내지는 않았으 며 특히, 가장 카르바밀화가 적게 일어나는 Cys도 같은 양상 을 보였다 (Table 1).



Fig. 6. The degree of carbamylation in proteins. One mM amino acids was carbamylated by incubation at 37 °C with the 100 mM cyanate solution for 48 hours. The solution was followed exhaustive dialysis at 4°C against phosphate buffered saline, pH 7.4, to remove excess cyanate. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino groups using trinitrobenzenesulphonic acid. Fifty  $\mu$ L of 0.1 % trinitrobenzenesulphonic acid was added to 1 mL of dialyzed amino acid solution and 1 mL of 4% sodium hydrogen carbonate, pH 8.4, and this was incubated for one hour at 37°C. Absorbance was then measured at 340 nm against a sample blank, and the trinitrobenzenesulphonic acid reactivity was expressed as a percentage of the absorbance obtained for the non carbamylated amino acid. Abbreviations : A, albumin; G, globulin; Hb, hemoglobin.

## 8. 조골세포의 생존율에 대한 비극성 아미노산의 영향

비극성 아미노산인 Ala, Phe, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Val 및 Trp이 조골세포의 생존율에 미치는 영향을 보면, 이 들 비극성 아미노산의 농도가 증가하면 세포의 생존율은 대 체로 이들 아미노산을 첨가하기 전 보다는 생존율이 증가하 나 아미노산의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향이었다 (Table 1). 또한 비극성 아미노산들도 극성 아미노산들과 같 은 양상을 나타내었다. 즉, 조골 세포에 단순히 시안산만을 첨가하면 세포의 생존율은 유의하게 감소하였으며, 시안산에 의해 세포 생존율이 감소할 때 대부분의 비극성 아미노산은 세포 생존율을 증가시키지 않았으나, Leu과 Trp 만이 시안 산에 의해 감소되는 세포생존율을 증가시켰다 (Table 1). 또 한 Trp 및 Pro 등의 카르바밀화가 적게 일어나는 아미노산 도 생존율 변화는 비슷한 양상을 보여 카르바밀화 반응과 방 어 효과는 비례적인 관계를 나타내지는 않았다 (Table 1).



Fig. 7. The degree of carbamylation in albumin depends on concentration of cyanate. One mM amino acids was carbamylated by incubation at 37°C with the 100 mM cyanate solution for 48 hours. The solution was followed exhaustive dialysis at 4°C against phosphate buffered saline, pH 7.4, to remove excess cyanate. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino groups using trinitrobenzenesulphonic acid. Fifty  $\mu$ L of 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid was added to 1 mL of dialyzed amino acid solution and 1 mL of 4% sodium hydrogen carbonate, pH 8.4, and this was incubated for one hour at 37°C. Absorbance was then measured at 340 nm against a sample blank, and the trinitrobenzenesulphonic acid reactivity was expressed as a percentage of the absorbance obtained for the non carbamylated amino acid.

# 조골세포의 생존율에 대한 산성 및 염기성 아미노산 아미노산의 영향

산성 아미노산인 Asp와 Glu 그리고 염기성 아미노산인 His, Lys 및 Arg이 조골세포의 생존율에 미치는 영향을 보 면, 이들 아미노산의 농도가 증가하면 세포의 생존율은 대체 로 이들 아미노산을 첨가하기 전 보다는 생존율이 증가하나 아미노산의 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향이었다 (Table 1). 또한 산성 및 염기성 아미노산들도 비극성 및 극 성 아미노산들과 비슷한 양상을 나타내었다. 즉, 조골 세포에 단순히 시안산만을 첨가하면 세포의 생존율은 유의하게 감소 하였으며, 시안산에 의해 세포 생존율이 감소할 때 염기성 아 미노산은 세포 생존율을 증가시키지 않았으나, 산성 아미노산 인 Asp와 Glu는 시안산에 의해 감소되는 세포생존율을 증가 시켰다 (Table 1). 또한 카르바밀화가 적게 일어나는 Arg도 생존율 변화는 다른 염기성 아미노산들과 비슷한 양상을 보 여 카르바밀화 반응과 방어 효과는 비례적인 관계를 나타내 지는 않았다. 즉, 아미노산의 방어 효과에 일반적인 아미노군



Fig. 8. The degree of carbamylation in albumin depends on incubation time. One mM amino acids was carbamylated by incubation at 37°C with the 100 mM cyanate solution for 48 hours. The solution was followed exhaustive dialysis at  $4\,{}^\circ\!\!{\rm C}$  against phosphate buffered saline, pH 7.4, to remove excess cvanate. The extent of carbamylation was monitored by following the loss of free amino groups using trinitrobenzenesulphonic acid. Fifty  $\mu L$  of 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid was added to 1 mL of dialyzed amino acid solution and 1 mL of 4% sodium hydrogen carbonate, pH 8.4, and this was incubated for one hour at 37°C. Absorbance was then measured at 340 nm against a sample blank, and the trinitrobenzenesulphonic acid reactivity was expressed as a percentage of the absorbance obtained for the non carbamylated amino acid.

The Korean Journal of Nephrology 2007;26:404 $\sim\!413$ 

	Cyanate free			Cyanate (10 mmol/L) treated		
_	A1	A2	A3	A1	A2	A3
Control	$100 \pm 1.0$	$100 \pm 1.2$	$100 \pm 0.9$	$62 \pm 4.2^{\dagger}$	$62 \pm 4.1^{\dagger}$	$62 \pm 4.5^{\dagger}$
Ala	$134 \pm 8.5^{*}$	$131 \pm 5.6^{*}$	$142\pm\!6.2^{*}$	$61 \pm 2.5^{\dagger}$	$62 \pm 5.1^{\dagger}$	$59 \pm 8.8^{+}$
Arg	$118 \pm 12.7^{*}$	$145 \pm 4.4^{*}$	$85 \pm 1.0^{*}$	$63 \pm 5.3^{\dagger}$	$60\pm4.9^{\dagger}$	$51 \pm 4.1^{+, +}$
Asp	$119 \pm 6.2^{*}$	$100 \pm 2.0$	$52 \pm 1.2^{*}$	$68 \pm 4.2^{\dagger}$	$70\pm4.6^{\dagger}$	$89 \pm 4.6^{+, +}$
Asn	$119 \pm 6.2$	$100 \pm 2.0$	$52 \pm 1.2$	$68 \pm 4.2^{\dagger}$	$70\pm4.6^{\dagger}$	$89 \pm 4.6^{+, +}$
Cys	$176 \pm 7.0^{*}$	$173 \pm 2.5^{*}$	$158 \pm 5.0^{*}$	$63 \pm 1.7^{\dagger}$	$57\pm2.0^{\dagger}$	$46 \pm 2.0^{+, +}$
Gln	$109 \pm 0.6^{*}$	$108 \pm 4.2^{*}$	$106 \pm 1.0^{*}$	$95 \pm 5.6^{+, +}$	$100 \pm 3.5^+$	$69 \pm 4.5^{\dagger}$
Glu	$107 \pm 1.5^{*}$	$104 \pm 6.7$	$101 \pm 6.7$	$68 \pm 2.1^{\dagger}$	$79 \pm 15.0$	$118 \pm 6.2^{+, +}$
Gly	$163 \pm 15.9^{*}$	$139 \pm 4.9^{*}$	$117 \pm 10.2^{*}$	$58 \pm 2.3^{\dagger}$	$59 \pm 2.1^{+}$	$61\!\pm\!10.2^{\dagger}$
His	$177 \pm 6.4^{*}$	$170 \pm 5.5^{*}$	$124 \pm 5.1^{*}$	$58 \pm 1.8^{\dagger}$	$58 \pm 0.9^{+}$	$51 \pm 0.5^{+, +}$
Ile	$87 \pm 2.1^{*}$	$96 \pm 4.6$	$97 \pm 2.5$	$51 \pm 3.6^{+, +}$	$53 \pm 2.4^{+, +}$	$60 \pm 2.6^{+}$
Leu	$105 \pm 1.2^{*}$	$90 \pm 1.5^{*}$	$64 \pm 2.1^{*}$	$73\pm1.3^{+,+}$	$75\pm2.2^{+,+}$	$89 \pm 3.6^{+, +}$
Lys	$91 \pm 6.6$	93±6.0	$85 \pm 8.3$	$56 \pm 0.7^{+}$	$53 \pm 1.9^{+, +}$	$42\pm1.1^{+,+}$
Met	$160 \pm 9.2^{*}$	$174 \pm 5.1^{*}$	$64 \pm 6.9^{*}$	$62\pm1.3^{+,+}$	$62 \pm 0.6^{+}$	$50 \pm 1.9^{+, +}$
Phe	$93 \pm 3.5^{*}$	$89 \pm 3.8^{*}$	$73 \pm 4.0^{*}$	$56 \pm 1.2^{\dagger}$	$50\pm2.8^{+,+}$	$39 \pm 1.3^{+, +}$
Pro	$87 \pm 4.0^{*}$	$86 \pm 5.7^{*}$	$81 \pm 6.0^{*}$	$60 \pm 6.1^{+}$	$55 \pm 1.2^{\dagger}$	$54 \pm 0.9^{+, +}$
Ser	$94 \pm 6.0$	$93 \pm 3.8$	$98 \pm 0.6$	$50\pm1.3^{+,+}$	$51 \pm 1.1^{+, +}$	44±1.3 <sup>+, †</sup>
Thr	$88 \pm 4.0^{*}$	$90 \pm 4.9^{*}$	$89 \pm 5.1^{*}$	$59 \pm 4.4^{\dagger}$	$55 \pm 4.5^{++}$	$74 \pm 7.3^{\dagger}$
Trp	$102 \pm 5.8$	$86 \pm 2.6^{*}$	$60 \pm 1.0^{*}$	$72 \pm 4.1^{+, +}$	$74 \pm 9.6$	$91 \pm 5.5^{+, +}$
Tyr	$163 \pm 1.7^{*}$	$115 \pm 18.5$	$52 \pm 3.8^{*}$	$68 \pm 1.8^{\dagger}$	$71\pm4.2^{\dagger}$	$72 \pm 4.4^{\dagger}$
Val	$89 \pm 1.5^{*}$	$93 \pm 2.1^{*}$	$95 \pm 3.2^{*}$	$46 \pm 2.0^{+, +}$	$59\pm3.0^{\dagger}$	$57 \pm 1.7^{+}$
Albumin	$182 \pm 12.7$	$145 \pm 4.4$	$85 \pm 1.0$	$63 \pm 5.3^{+, +}$	$60 \pm 4.9^{+, +}$	$51 \pm 4.1^{+, +}$
Globulin	$103 \pm 2.3$	$99 \pm 3.2$	$104 \pm 1.5^{*}$	$72\pm1.5^{+,+}$	$71\pm3.7$ <sup>†</sup>	$80 \pm 1.0^{+, +}$
Hemoglobin	$100\!\pm\!1.0$	$91 \pm 2.1^{*}$	$117 \!\pm\! 0.6^{*}$	$74 \pm 4.3^{+, +}$	$73\pm1.4^{+,+}$	$83 \pm 3.6^{+, +}$

Table 1. Effect of Amino Acids and Proteins on Cell Viability

A1: 0.1 mmol/L amino acid or 0.5 mg/mL of protein; A2: 1 mmol/L amino acid or 5mg/mL protein; A3: 10 mmol/L amino acid or 50 mg/mL protein.  $p^{0.05}$  vs. control group without cyanate treatment;  $p^{0.05}$  vs. control group with cyanate treatment;  $p^{0.05}$  vs. control group with cyanate treatment;  $p^{0.05}$  vs. the cyanate non-treated group (cyanate free group) in the same amino acid or protein concentration.

에 의한 영향만을 보여주었고 아미노산의 분류에 의한 방어 효과의 변화는 나타내지 않았다 (Table 1).

## 고 찰

#### 10. 조골세포의 생존율에 대한 단백질의 영향

알부민 0.5, 5 및 50 mg/mL을 첨가하였을 때 세포 생존 율은 알부민을 첨가하지 않은 대조군과 별다른 차이를 보이 지 않았다. 시안산만을 첨가하면 세포의 생존율은 시안산을 첨가하지 않은 군에 비해 38%의 생존율 감소를 보였으나, 시안산과 알부민을 동시에 첨가하면 생존율은 대조군에 비해 155% 정도의 증가를 보였다. 이러한 증가는 알부민을 0.5 mg/mL에서 50 mg/mL로 증가함에 따라 증가하였다 (Table 1).

글로불린과 혈색소는 시안산과 동시에 세포배양액에 첨가 하도 생존율은 시안산 첨가 군에 비해 약간의 생존율 증가를 보였을 뿐 알부민과 같은 방어 효과는 나타내지 않았다 (Table 1). 말기 신부전 환자에서 신성 골이영양증은 이들 환자의 이 병율을 증가시키고 삶의 질을 떨어뜨리는 중요한 원인으로 부갑상선 호르몬과 비타민 D의 조절 장애가 주요 병인기전으 로 알려져 왔다<sup>2-5)</sup>. 그러나 최근의 연구들에서 이러한 호르몬 의 장애와 더불어 골재형성과정이 신성 골이영양증의 발병에 관여함이 알려져 있으며 골재형성에 주요 기능을 담당하고 있는 파골세포 및 조골세포의 수적 이상, 기능 이상 및 이들 세포에 영향을 주는 다양한 사이토카인 및 성장인자에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>7, 8)</sup>. 특히 조골세포는 골기질 의 생산과 무기질화에 관여하는 세포로써 여러 단계의 분화 과정을 거쳐 활성화되며 부갑상선호르몬, 인슐린양 성장인자 (insulin-like growth factor, IGF), 골형성단백 (bone morphogenetic proteins), 섬유아세포 성장인자 (fibroblast growth factor), transforming growth factor-β (TGF- β) 등 다양한 사이토카인의 영향을 받아 골형성에 관여하는 것으로 알려져 있으며<sup>18)</sup>, 조골세포는 요독 물질에 의해서도 그 활성이 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 요독 중 특히 시 안산은 요소로부터 전환되어 생성되며<sup>19)</sup> 신장 기능이 감소함 에 따라 요소의 증가와 함께 증가한다. 시안산은 단백질의 아 미노기와 결합하는 카르바밀화 반응을 일으키는 데 이러한 카르바밀화 반응은 효소<sup>19)</sup>, 호르몬<sup>20-22)</sup> 및 구조 단백질<sup>23,24)</sup>
의 기능과 구조적인 변형을 초래하며, 조골세포에서 세포자멸 사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 즉, 시안산은 조골세포에 서 활성세포 생성, 비활성형의 caspase-8 단백질 발현의 감소와 활성형의 caspase-8의 발현 증가 유도, caspase-3의 발현 증가, 활성화된 caspase-3를 통한 poly-(ADP-ribose) -polymerase와 retinoblastoma (Rb) 단백질 등의 기질 절 다 유발, nuclear factor- κ B 발현 감소 등을 통해 세포자멸 사를 유발하는 것으로 알려져 있다<sup>10)</sup>.

본 연구를 통해 시안산에 의한 조골세포의 생존율의 감소 를 유의하게 방지한 아미노산은 Asp, Glu, Leu, Trp 및 Tyr이었다. Leu, Trp 및 Tyr은 모두 비극성 아미노산이며 Glu 및 Asp는 극성 아미노산으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 또한 극성 아미노산 중 많은 아미노산과 비극성 아미노산의 많은 수가 방어 효과를 나타내지 않았다. 따라서 극성 혹은 비극성이란 특징이 방지 효과에 영향을 미친 것으로는 생각되지 않는다.

Leu 및 Trp은 영양상 필수 아미노산으로 알려져 있으므 로<sup>26)</sup> 이들이 조골세포 성장에 특히 영향을 주는 물질이기 때 문에 조골세포의 생장에 충분한 영양 공급원이 되었을 가능 성은 있으나, 필수 아미노산으로 알려진 Arg, His, Ile, Lys, Met, Phe, Thr 및 Val<sup>26)</sup>은 Leu 및 Trp과 같은 효과를 나 타내지 않았다. 따라서 필수 아미노산 혹은 비필수 아미노산 이란 특징이 시안산에 의한 손상에 대한 방어 효과를 나타낸 것으로 생각되지는 않으며, 이에 대한 연구는 추후 시행되어 야 할 것으로 생각된다.

한편, Glu 및 Asp는 비필수 아미노산인지만 시안산에 의 한 조골세포 생존율 감소를 방지하였다. 이는 Glu 및 Asp는 산성 아미노산으로 β-carboxyl 군의 pK값이 4.0내외로 생 리적 pH에서는 다른 아미노산에 비해 carboxyl 이온은 하나 더 가지고 있는 것으로 알려져 있다<sup>25)</sup>. 따라서 이들이 시안산 에 의한 조골세포의 생존 억제를 줄인 것은 시안산과 같은 음 이온을 하나 더 가지고 있음으로 해서 시안산의 음이온의 작용을 방해한 것으로 생각된다. 즉, 시안산의 작용이 강한 음이온의 작용에 의한 것인데 산성 아미노산들이 음이온을 가지고 있음으로 이로 인해 시안산과 경쟁적인 작용을 하게 되고 이로 인해 Glu 및 Asp가 조골세포의 생존율을 향상시 킨 것으로 생각된다.

염기성 아미노산인 Arg 및 Lys은 전혀 시안산에 의한 조 골세포 억제를 방지하지 못하였다. 이는 이들 아미노산들의 아미노 군의 pK값이 9.0 이상<sup>25)</sup>이기 때문으로 생리적 pH에 서는 전혀 그 기능을 수행하지 못함을 나타낸다고 생각된다.

Tyr은 비필수 아미노산이며, 산성 아미노산도 아니지만 시안산에 의한 조골세포 생존율 감소를 방지하였다. 이는 Tyr이 수산화기를 가지고 있어서<sup>25)</sup>이것이 해리되어 OH-기 로 됨으로서 Glu 및 Asp와 같은 효과를 나타낸 것으로 생각 되나 보다 자세한 이유는 추후 연구해 보아야할 것으로 생각 된다.

단백질 중 알부민 만이 시안산에 의한 조골세포 생존율 감 소를 방지하였다. 이는 알부민이 각종 약물 및 독소들과 결합 하는 능력이 있음<sup>27)</sup>으로 시안산과 결합하여 시안산의 효과를 감소시킨 결과로 생각된다. 특히 알부민 순수 정제 액에 시안 산을 넣고 알부민 자신이 카르바밀화되는 정도를 관찰하였을 때 알부민의 농도에 따라, 시안산과의 배양 시간이 경과함에 따라 증가되는 양상을 나타내었다. 따라서 이는 알부민이 시 안산과 쉽게 결합하여 시안산에 의한 손상을 줄여주는 물질 로 작용할 수 있음을 나타내는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과로부터 Asp, Glu, Leu, Trp, Tyr 및 알 부민이 시안산에 의한 조골세포 생존율 감소를 방지하는 것 으로 생각된다.

# 요 약

**목 적**: 신성 골이영양증은 말기 신부전 환자의 이병율을 증가시키고 삶의 질을 떨어뜨리는 중요한 원인으로, 부갑상선 호르몬과 비타민 D의 조절 장애가 주요 병인으로 알려져 왔 으며, 조골세포에 대한 요독의 억제 작용도 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 요독 중 시안산은 요소로부터 전환되어 생성되며 신장 기능이 감소함에 따라 요소의 증가와 함께 증 가하는데, 특히 조골세포에서 세포자멸사를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이 연구에서는 시안산이 음전하를 가지고 있음 으로, 아미노 군을 가진 아미노산 및 각종 약물 및 독소들과 결합 능력을 가진 알부민 등의 일부 단백질을 이용하여 시안 산에 의한 조골세포 손상을 방지할 수 있는지를 알아보고자 하였으며 이를 통해 신성 골이영양증을 방지하는 방법을 제 시하고자 하였다.

방법: 골육종 세포주인 ROS 17/2.8 세포를 사용하여 시

안산을 0-40 mmol/L 첨가한 후 MTT 측정법으로 세포에 대한 독성을 측정하였다. 아미노산은 0.1-10 mmol/L가 되 도록 가하여 시안산에 의한 세포 독성 감소 효과를 관찰하였 으며, 알부민 및 각종 단백질들은 50 mg/mL의 농도가 되도 록 첨가하여 그 결과를 관찰 하였다. 또한 아미노산과 알부민 을 비롯한 각종 단백질의 카르바밀화 정도는 TNBS 반응으 로 자유 아미노기의 양을 측정하여 계산하였다.

**결 과**: 연구 결과 20종의 아미노산은 50% 내외의 자유기 소실을 나타내었으나 각 아미노산 별 자유기 소실 정도 아미 노산 특성에 따른 차이를 나타내지 않았다. 단백질 중에서 알 부민은 약 20%의 자유기 소실을 나타내었으나 혈색소와 면 역 글로불린은 자유기 소실을 나타내지 않았다. 또한 특히 알 부민 순수 정제 액에 시안산을 넣고 알부민 자신이 카르바밀 화되는 정도를 관찰하였을 때 알부민의 농도에 따라, 시안산 과의 배양 시간에 따라 증가되는 양상을 나타내었다. 세포 생 존율에 미치는 실험에서 Asp, Glu, Leu, Trp 및 Tyr이 시 안산에 의한 조골세포의 생존율의 감소를 유의하게 방지하였 다. 또한 단백질 중에서는 알부민 만이 시안산에 의한 조골세 포 생존율 감소를 방지하였다.

**결 론**: 이상의 실험 결과로부터 Asp, Glu, Leu, Trp, Tyr 및 알부민이 시안산과 반응하여 자신이 카르바밀화 됨 으로써 시안산 의한 조골세포 생존율 감소를 방지하는 것으 로 생각된다.

# 참 고 문 헌

- Park SB: Chronic renal failure, in Nephrology for Block Lecture, edited by Kim HC, Park SB, Park WK, Ahn GS, Ihm H, ed, Seoul, e-Public, 2006, 199–220
- 2) Coen G, Mantella D, Manni M, Balducci A, Nofroni I, Sardella D, Ballanti P, Bonucci E: 25-hydroxyvitamin D levels and bone histomorphometry in hemodialysis renal osteodystrophy. *Kidney Int* 68:1840–1848, 2005
- 3) Greenbaum LA, Grenda R, Qiu P, Restaino I, Wojtak A, Paredes A, Benador N, Melnick JZ, Williams LA, Salusky IB: Intravenous calcitriol for treatment of hyperparathyroidism in children on hemodialysis. *Pediatr Nephrol* 20:622–630, 2005
- Salusky IB: Are new vitamin D analogues in renal bone disease superior to calcitriol? *Pediatr Nephrol* 20:393–398, 2005
- 5) Tasic V: Management of renal osteodystrophy in children. *Turk J Pediatr* 47(Suppl):13-18, 2005
- Wang M, Hercz G, Sherrard DJ, Maloney NA, Segre GV, Pei Y: Relationship between intact 1-84 parathy-

roid hormone and bone histomorphometric parameters in dialysis patients without aluminum toxicity. *Am J Kidney Dis* 26:836-844, 1995

- Disthabanchong S, Gonzalez EA: Regulation of bone cell development and function: implication for renal osteodystrophy. J Investig Med 49:240–249, 2001
- Disthabanchong S, Gonzalez EA, Martin KJ: Soluble IL-6 receptor levels in patients on chronic hemodialysis. *Clin Nephrol* 58:289–295, 2002
- 9) Marcus R: Normal and abnormal bone remodeling in man. *Annu Rev Med* 38:129-141, 1987
- Hwang EA: Apoptosis by cyanate in osteoblast: A Doctoral Thesis of Keimyung University, Daegu, Keimyung university, p1–35, 2004
- Apostolov EO, Shah SV, Ok E, Basnakian AG: Quantification of carbamylated LDL in human sera by a new sandwich ELISA. *Clin Chem* 51:719-728, 2005
- 12) Ok E, Basnakian AG, Apostolov EO, Barri YM, Shah SV: Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease. *Kidney Int* 68:173–178, 2005
- 13) Hagel P, Gerding JJ, Fieggen W, Bloemendal H: Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim Biophys Acta* 243:366–373, 1971
- 14) Stark GR: On the reversible reaction of cyanate with sulfhydryl groups and the determination of NH2-terminal cysteine and cystine in proteins. J Biol Chem 239:1411-1414, 1964
- 15) Stark GR: Modification of proteins with cyanate, in Methods in Enzymology (vol 11), edited by Hirs CHW, ed, New York, Academic Press, 1967, p590–594
- 16) Kraus LM, Kraus AP Jr: The search for the uremic toxin: the case for carbamoylation of amino acids and proteins. *Wien Klin Wochenschr* 110:521–530, 1998
- Horkko S, Savolainen MJ. Kervinen K. Kesaniemi YA: Carbamylation-induced alterations in low-density lipoprotein metabolism. *Kidney Int* 41:1175-1181, 1992
- 18) Lian JB, Stein GS, Canalis E, Gehron RP, Boskey AL: Bone formation: Osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process, in Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (4th ed), edited by Favous MJ, ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1999, p14–29
- Roxborough HE, Millar CA, McEneny J, Young IS: Carbamylation inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1073–1078, 1995
- 20) Oimomi M, Hatanaka H, Yoshimura Y, Yokono K, Baba S, Taketomi Y: Carbamylation of insulin and its

biological activity. Nephron 46:63-66, 1987

- 21) Satake R, Kozutsumi H, Takeuchi M, Asano K: Chemical modification of erythropoietin: an increase in in vitro activity by guanidination. *Biochim Biophys Acta* 1038:125–129, 1990
- 22) Mun KC, Golper TA: Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif* 18:13–17, 2000
- 23) Ramponi G, Leaver JL, Grisolia S: Homocitrulline formation following carbamylation of histones with carbamyl phosphate. *FEBS Lett* 16:311–314, 1971
- 24) Kuckel CL, Lubit BW, Lambooy PK, Farnsworth PN: Methylisocyanate and actin polymerization: the in vitro effects of carbamylation. *Biochim Biophys Acta* 1162:

143-148, 1993

- 25) Rodwell VW, Kennelly PJ: Amino acids and peptides, in Harper's illustrated biochemistry (26th ed), edited by Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, ed, New York, McGraw-Hill, 2003, p14-20
- 26) Rodwell VW: Biosynthesis of the nutritionally nonessential amino acids, in Harper's illustrated biochemistry (26th ed), edited by Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, ed, New York, McGraw-Hill, 2003, p237-241
- 27) Murray RK: Plasma proteins immunoglobulins, in Harper's illustrated biochemistry (26th ed), edited by Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, ed, New York, McGraw-Hill, 2003, p580-597