

2005 년 8 월

석사학위 논문

흰쥐 교세포 및 교세포종 C6 세포주에서
아미노산 수송계 L의 발현 차이

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 인 진

흰쥐 교세포 및 교세포종 C6 세포주에서
아미노산 수송계 L의 발현 차이

Differential expression of system L amino acid transporters
in rat glial and C6 glioma cells

2005년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 인 진

흰쥐 교세포 및 교세포종 C6 세포주에서
아미노산 수송계 L의 발현 차이

지도교수 김 도 경

이 논문을 석사학위신청 논문으로 제출함

2005년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 인 진

김인진의 석사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 윤 정 훈 인

위 원 조선대학교 교수 국 중 기 인

위 원 조선대학교 교수 김 도 경 인

2005년 5월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차 -----	ii
도목차 -----	iii
ABSTRACT -----	iv
I. 서 론 -----	1
II. 재료 및 방법 -----	4
1. 실험재료 -----	4
2. 세포주와 세포배양 -----	4
3. Total RNA 추출과 역전사-증합효소 연쇄반응(RT-PCR) -----	4
4. Western blot analysis -----	5
5. 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 [¹⁴ C]L-leucine 수송에 미치는 BCH의 효과 -----	6
6. 세포사 측정(lactate dehydrogenase)-----	7
7. 통계분석 -----	7
III. 실험결과 -----	8
1. 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 아미노산 수송계 L의 발현-----	8
2. 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 L-leucine 수송에 영향을 미치는 BCH의 효과 --	10
3. 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 세포성장에 영향을 미치는 BCH의 효과 --	11
IV. 고 찰 -----	13
V. 결 론 -----	16
참고문헌 -----	17

표 목 차

Table 1. Primer sequences for PCR of LAT1, LAT2 and 4F2hc-----5

도 목 차

Fig. 1. Detection of LAT1, LAT2 and 4F2hc by RT-PCR in rat glial and C6 glioma cells -----	8
Fig. 2. Western blot analysis of LAT1, LAT2 and 4F2hc in the rat glial and C6 glioma cells -----	9
Fig. 3. Concentration-dependent inhibition of [¹⁴ C]L-leucine uptake by BCH in the rat glial and C6 glioma cells -----	10
Fig. 4. Time-dependent effect of BCH on the cell viability in the rat glial and C6 glioma cells -----	11
Fig. 5. Concentration-dependent effect of BCH on the cell viability in the rat glial and C6 glioma cells -----	12

ABSTRACT

Differential expression of system L amino acid transporters in rat glial and C6 glioma cells

Kim, In Jin

Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, Ph.D.

Department of Dentistry, Graduate School of Chosun University

Amino acids are required for protein synthesis and energy sources in all living cells. System L amino acid transporters neutral amino acids in a Na⁺-independent manner. In malignant tumors the L-type amino acid transporter 1 (LAT1), the first isoform of system L, is highly expressed to support tumor cell growth. In the present study, the expression of the system L amino acid transporter and BCH cytotoxicity were examined and compared in both rat glial and C6 glioma cells.

The rat glial cells expressed the L-type amino acid transporter 2 (LAT2), the second isoform of system L, with its subunit 4F2hc, whereas the LAT1 was not expressed. The C6 glioma cells expressed LAT1 with 4F2hc but not LAT2. The [¹⁴C]L-leucine uptakes by the glial and C6 glioma cells were inhibited by BCH in a concentration-dependant manner with the IC_{50} values of $270.0 \pm 13.7 \mu\text{M}$ and $73.1 \pm 4.5 \mu\text{M}$, respectively. The cell growth was inhibited by BCH in the time, concentration-dependant manner in the glial and C6 glioma cells. The rate of cell growth inhibition induced by BCH in the C6 glioma cells was higher than that in the glial cells. These results suggest that the transports of neutral amino acids including several essential amino acids into rat glial and C6 glioma cells are for the most part mediated by LAT2 and LAT1, respectively. Therefore, the rat glial

and C6 glioma cells are excellent tools for examining the properties of LAT2 and LAT1, respectively. Moreover, the specific inhibition of LAT1 in cancer cells might be a new rationale for anti-cancer therapy.

I. 서론

아미노산은 단백질, 효소, 호르몬 및 신경전달물질들의 합성에 필수적이다. 세포 안에서 필요한 아미노산은 세포막에 위치하고 있는 아미노산 수송체(amino acid transporter)를 통해 세포안으로 들어올 수 있다(1). 아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산의 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성아미노산 수송체로 분류되며, 세포 외액의 Na^+ 에 대한 의존성에 따라 Na^+ -의존성 및 Na^+ -비의존성 수송체로 분류된다(1). 아미노산 수송체 L은 Na^+ -비의존적으로 중성아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 종양세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송체로 알려져 있으며(1,2), 상피세포의 기저막 측에 존재하여 소장과 신세뇨관의 상피세포를 통한 중성아미노산의 흡수에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다(1). 아미노산 수송체 L은 중성아미노산 뿐만 아니라 L-dopa, melphalan 및 gabapentin 같은 아미노산 구조를 가진 약물들도 수송할 수 있으므로 약물 수송체로 간주되기도 한다(1,3-7).

1998년 Kanai 등에 의해 아미노산 수송체 L의 첫 번째 아형인 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 C6 glioma cell에서 동정되었다(8). LAT1은 세포막 단백질로서 Na^+ -비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, methionine, tryptophan과 histidine 같은 구조가 큰 중성아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다(8-10). LAT1은 4F2 heavy chain(4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide bond로 결합되어진 heterodimer형 단백질이며, LAT1이 기능을 수행하기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이라는 것이 보고 되었다(8,9,11-14). 보조인자 4F2hc가 모든 정상 조직에서 발현 되는 것과 대조적으로 LAT1은 뇌, 비장, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 제한되어 있다(10,16). 또한 LAT1은 종양세포에서 과발현되며, 종양세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 보고 되었다(8,9,15,16).

한편, LAT1의 분자적 동정 후에 LAT1과 구조적으로 관련이 있는 아미노산 수송체 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정 되었다(17-19). LAT2는 구조적으로 LAT1과 매우 유사하며, Na^+ -비의존적으로 다수의 필수

아미노산을 포함하는 중성 아미노산을 수송한다(1). LAT1이 구조가 큰 중성 아미노산만을 수송하는 특징을 보이는 반면, LAT2는 구조에 관계없이 중성아미노산을 모두 수송하는 넓은 기질특이성을 지니고 있다(19-20). 아미노산 수송체 LAT1과 LAT2의 특성을 살펴보면, 이들 아미노산 수송체 L, 특히 종양세포에 과발현 되는 LAT1의 조절을 통해 종양세포 성장억제를 위한 하나의 방법을 제시 할 수 있다. 종양세포에서 LAT1의 활성을 억제하는 억제제를 이용하여 세포내 중성 아미노산의 고갈을 유도한다면 종양세포 성장의 억제를 유도할 수 있을 것이다.

2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid(BCH)는 아미노산 수송체 연구에 주로 이용되는 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제이다(8-10,16,18). 아미노산 수송체 L이 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, threonine, methionine 및 histidine과 같은 필수아미노산을 포함한 중성아미노산을 수송하기 때문에, 만약 세포에서 아미노산 수송체 L이 BCH 같은 억제제에 의해 차단된다면 세포는 세포성장과 증식에 필수적인 필수아미노산이 고갈됨으로 큰 손상을 입을 것이다. 그러나 이러한 아미노산 수송억제에 의한 세포성장 억제 기전에 관한 실험적 자료는 거의 없다.

지금까지 아미노산 수송체의 수송특성에 관한 연구는 *Xenopus* oocyte 내에 아미노산 수송체의 cRNA를 미세주입하여 발현된 단백질을 이용하여 시행되어져 왔다. 그러나 이 실험 방법은 *Xenopus* oocyte가 chemical compound에 손상을 입기 쉬워 다양한 chemical compound의 실험이 어렵고, 시간과 금전적으로 많은 손실을 동반하며, 또 진정한 포유동물에서의 실험적 결과를 얻기가 어려우므로 아미노산 수송체 연구를 위한 *Xenopus* oocyte 실험계를 대체할 수 있는 포유동물 세포 실험계의 개발이 필수적이다.

뇌에 발생하는 원발성 뇌종양 중에서 신경교에서 발생하는 신경교세포 종양이 가장 빈번하게 발생된다. 그럼에도 불구하고 외과적 수술, 방사선 치료와 화학요법 등의 치료방법이 만족할 만한 수준은 아니다. 또한 정상 신경교세포와 교세포종에서 세포내 필수 영양물질인 아미노산을 수송할 수 있는 수송체 연구 또한 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 흰쥐 정상 교세포(rat glial cell)와 교세포종(C6 glioma cells)에서 아미노산 수송체 L의 발현 및 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH에 의한 세포

성장 억제 효과를 비교분석 하고자 하였으며, 그 결과를 통해 아미노산 수송체 LAT1의 억제를 통한 중앙치료의 효용성을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

[¹⁴C]L-leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc.(Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였고, BCH는 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 아미노산 및 기타 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다. Affinity-purified anti-LAT1, LAT2 및 4F2hc는 Kumamoto Immunochemical Laboratory, Transgenic Inc.(Kumamoto, Japan)으로부터 제공받아 사용하였다.

2. 세포주와 세포배양

흰쥐 정상 교세포는 생후 1-2일된 흰쥐(Wistar rat, Daehan Biolink, Choongbuk, Korea)에서 뇌 조직을 적출하여 24 well plate에 seed(2.5×10^4 /well)한 후 배양배지(MEM; Earles salts, bicarbonate glutamine free)에 21 mM glucose, 2 mM glutamine, 26.5 mM bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 10 % horse serum 및 10 ng/ml의 epidermal growth factor를 첨가하여 5% CO₂하에서 배양하였다. 13-15일 후 교세포의 증식상태를 보아 실험에 사용하였으며, 배양액 교체는 2주 후부터 1주일에 한번씩 시행하였다. 교세포종 C6 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여, 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100 u/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 성장배지 하에서 배양하면서 사용하였다.

3. Total RNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

교세포와 교세포종 C6 세포주로부터 TRI REAGENT kit(Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. cDNA 합성을 위하여 5 μg의 total RNA를 reverse transcriptase(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와

oligo(dT) primer를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA와 각 primer(Table 1)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 12분, 변성반응을 94°C에서 30초, 결합반응을 60°C에서 30초, 중합반응은 72°C에서 45초간 35주기를 반복하였고 마지막 중합반응은 72°C에서 30분간 연장하여 반응시켰다. RT-PCR 반응 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

Table 1. Primer sequences for PCR of LAT1, LAT2 and 4F2hc

Primer	Sequence (5'→3')	PCR product (bp)
LAT1 (sense)	CAATGGTGTGGCCATCATAG	527
LAT1 (antisense)	GATGCATCCCCTTGTCTAT	
LAT2 (sense)	TCATTGGCTCCGGAATCTTC	509
LAT2 (antisense)	ATGCATTCTTTGGCTCCAGC	
4F2hc (sense)	TCACAGGCTTATCCAAGGAG	499
4F2hc (antisense)	TACAATGTCAGCCTGAGGAG	

4. Western blot analysis

Western blot analysis를 시행하기 위해 단백질을 교세포와 C6 세포주로부터 추출하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후 cell scraper로 긁어 eppendorf tube에 옮기고 1,000 X g에서 5분간 원심분리 하여 얻은 세포에 9 volume의 homogenization buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 250 mM sucrose)를 넣고 혼합한 후, Dounce homogenizer에 옮겨 15회 stroke하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 8,000 X g에서 10분간 원심분리하고, 상층액을 회수하여 다시 100,000 X g에서 1시간 원심분리 한 후 단백질 침전물을 resuspend buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 250 mM sucrose)에 녹여 정량하였다.

단백질 10 μg을 2배의 SDS sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 넣고 100°C에

서 5분간 변성 시킨 후, SDS-polyacrylamide gel에 2시간 전기영동한 다음 semi-dry transfer에서 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking하였고, PBST buffer로 15분간 3회 세척하였다. Affinity-purified anti-LAT1, LAT2 및 4F2hc는 5% fat-free dry milk-PBS buffer를 1,000배 희석하였으며, 이 용액에 membrane을 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, PBST 용액을 이용하여 5분 간격으로 10회 세척하였다. Membrane을 다시 anti-rabbit-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBST 용액을 이용하여 5분 간격으로 10회 세척하고 ECL detection kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-ray 필름에 감광하여 현상하였다.

5. 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 [¹⁴C]L-leucine 수송에 미치는 BCH의 효과

각 세포에서 중성아미노산 수송에 영향을 미치는 BCH의 특성을 조사하기 위해, 아미노산 uptake 실험을 시행하였다. 성장배지 하에서 배양된 C6 세포주를 수집하여 24 well plate에 seed(1×10^5 cells/well)한 후, 85-95% confluence 되었을 때 uptake를 시행하였다. 교세포는 plating 13-15일 후 85-95% confluence 되었을 때 uptake를 시행하였다. 성장배지를 흡수기를 이용하여 제거한 뒤, 세포를 또는 Na^+ -free uptake 용액(125 mM choline-Cl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 25 mM HEPES, 1.2 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM glucose, pH 7.4)을 이용하여 3회 세척한 후, 37°C의 동일용액에서 10분간 전배양 하였다. 그 후, 용액을 [¹⁴C]L-leucine이 존재하는 uptake 용액으로 교체하여 1분 배양하였으며, 반응의 정지를 위해 4°C의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 세포를 0.1 N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake 되어진 [¹⁴C]L-leucine을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 [¹⁴C]L-leucine을 pmol/mg protein/min으로 산출하였다. 각 세포에서 L-leucine의 수송을 억제하는 BCH의 IC_{50} 은 [¹⁴C]L-leucine 1 μM 존재 하에서 BCH 0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 μM 에서 uptake를 수행하여 측정하였다.

6. 세포사 측정(*lactate dehydrogenase*)

교세포와 C6 세포주의 세포성장에 영향을 미치는 BCH의 효과를 측정하기 위하여, BCH 투여 후 세포막 파괴시 배양액 내로 유출된 lactate dehydrogenase(LDH) 양을 측정하였다. 96 well plate의 각 well에 배양액(25 μ l)을 넣고 buffer(125 μ l), 0.3 mg/ml NADH(100 μ l) 및 22.7 mM pyruvate(30 μ l)를 넣은 후, microplate reader(Molecular Device, sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 340 nm에서 흡광도 변동을 3분간 측정하였다. 이때 standard enzyme으로는 control enzyme(Sigma, St Louis, MO, USA)을 사용하였다. 측정치는 sham wash 군과 full kill 군의 차이를 100으로 하여 각 약물 투여군의 값과 sham wash 군과 차이를 상대적 백분률로 환산하여 mean \pm SEM으로 나타내었다.

7. 통계분석

모든 실험성적은 mean \pm SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05미만($p < 0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 아미노산 수송체 L의 발현

교세포와 C6 세포주에서 아미노산 수송체 LAT1, LAT2 및 그 보조인자 4F2hc mRNA의 발현을 확인하기 위하여, 각각의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 교세포에서 LAT2 및 그 보조인자 4F2hc mRNA 발현은 관찰할 수 있었으나 LAT1 mRNA 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 대조적으로 C6 세포주에서는 LAT1 및 4F2hc mRNA 발현을 관찰할 수 있었으나, LAT2 mRNA 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

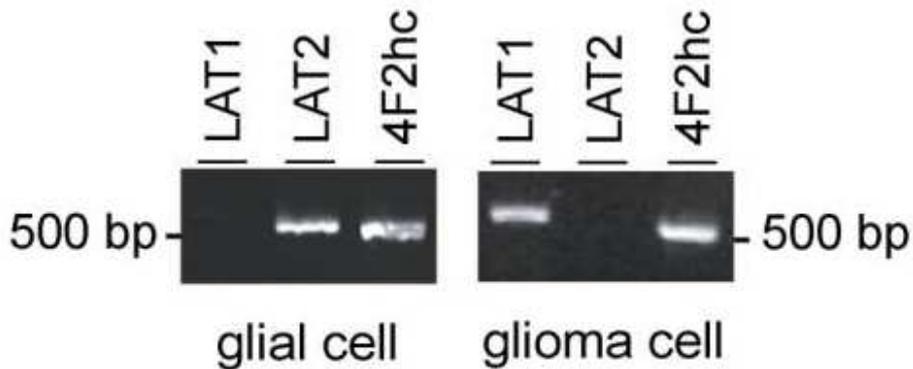


Fig. 1. Detection of LAT1, LAT2 and 4F2hc by RT-PCR in rat glial and C6 glioma cells. The first strand cDNAs prepared from the rat glial cells (glial cell) and C6 glioma cells (glioma cell) poly (A)⁺RNAs were used as templates for PCR amplification. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.2 % agarose gel and visualizes with ethidium bromide. The LAT2-specific PCR product (509 bp) and the 4F2hc-specific PCR product (499 bp) were obtained from the rat glial cells. The LAT1-specific PCR product (527 bp) and 4F2hc-specific PCR product (499 bp) were obtained from the C6 glioma cells.

교세포와 C6 세포주에서 아미노산 수송체 LAT1, LAT2 및 4F2hc 단백질의 발현을 확인하기 위하여, 각각의 항체를 이용하여 western blot analysis를 수행하였다. 교세포에서 LAT2에 대한 특이 band를 47 kDa에서, 4F2hc에 대한 특이 band는 85 kDa에서 확인할 수 있었으나 LAT1의 특이 band는 확인 할 수 없었다(Fig. 2). C6 세포주에서 LAT1과 4F2hc에 대한 특이 band를 40 kDa과 85 kDa에서 각각 확인 할 수 있었으나, LAT2에 대한 특이 band는 확인 할 수 없었다(Fig. 2).

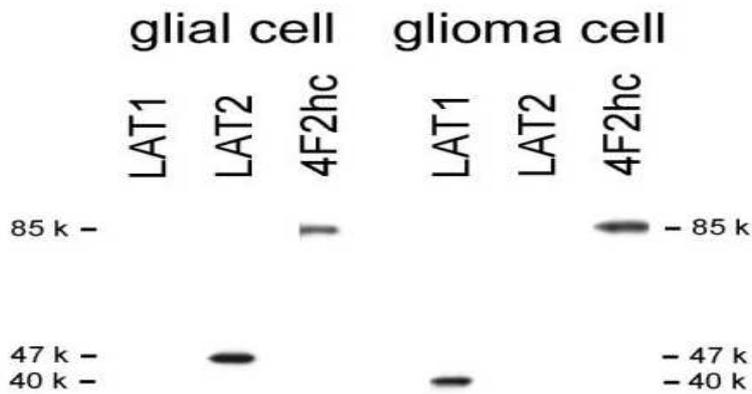


Fig. 2. Western blot analysis of LAT1, LAT2 and 4F2hc in the rat glial and C6 glioma cells. Western blot analyses were performed on the membrane fractions prepared from the rat glial cells (glial cell) and C6 glioma cells (glioma cell) in the presence 2-mercaptoethanol, using anti-LAT1, anti-LAT2 and anti-4F2hc antibodies. In the rat glial cells, for LAT2, the 47 kDa protein band detected in the presence of 2-mercaptoethanol. For 4F2hc, the 85 kDa protein band detected in the presence of 2-mercaptoethanol. For LAT1, no protein band was detected. In the C6 glioma cells, for LAT1 and 4F2hc, the 40 kDa protein band and the 85 kDa protein band detected in the presence of 2-mercaptoethanol, respectively. For LAT2, no protein band was detected.

2. 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 L-leucine 수송에 영향을 미치는 BCH의 효과

교세포와 C6 세포주에서 L-leucine의 수송에 영향을 미치는 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH의 효과를 관찰하기 위해, [^{14}C]L-leucine uptake를 BCH 0, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 μM 존재 하에서 시행하였다. 교세포와 C6 세포주에서 BCH는 [^{14}C]L-leucine 1 μM uptake를 농도 의존적으로 억제 하였다(Fig. 3). IC_{50} 은 교세포에서 $270.0 \pm 13.7 \mu\text{M}(\text{mean} \pm \text{SEM})$, C6 세포주에서는 $73.1 \pm 4.5 \mu\text{M}(\text{mean} \pm \text{SEM})$ 로 산출되었다(Fig. 3).

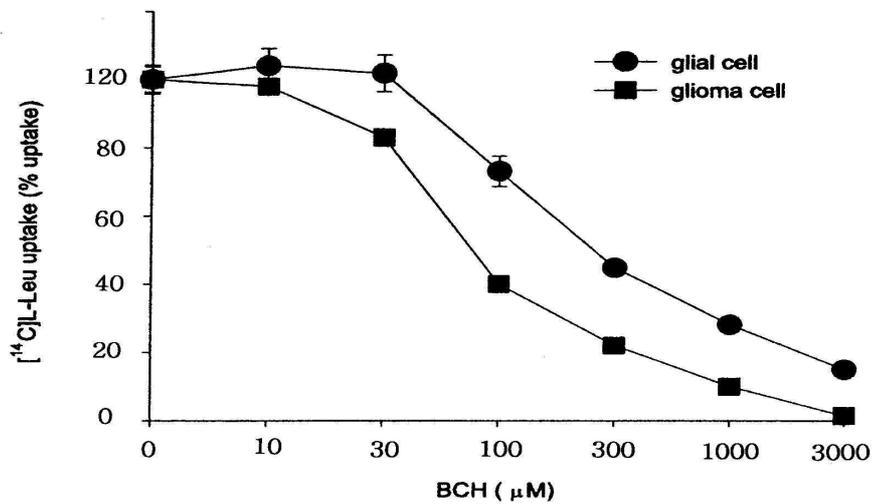


Fig. 3. Concentration-dependant inhibition of [^{14}C]L-leucine uptake by BCH in the rat glial and C6 glioma cells. The [^{14}C]L-leucine uptake (1 μM) was measured for 1 min in the presence of various BCH concentration in the rat glial cells (glial cell, filled circle) and C6 glioma cells (glioma cell, filled square), and was expressed as a percentage of the control L-leucine uptake in the absence of BCH.

3. 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 세포성장에 영향을 미치는 BCH의 효과

교세포와 C6 세포주에서 BCH에 의한 세포성장 억제 효과를 조사하기 위해, 각 세포에 BCH를 투여한 후 LDH assay를 시행하였다. 교세포와 C6 세포주에 BCH 20 mM과 50 mM을 각각 5일동안 처리한 결과, 교세포는 5일째 BCH 20 mM에서 54%의 생존율을 보였고, BCH 50 mM에서는 23% 생존율을 보인 반면, C6 세포주는 5일째 BCH 20 mM에서 생존율 17%, BCH 50 mM에서는 1% 로 세포성장이 완전히 억제됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

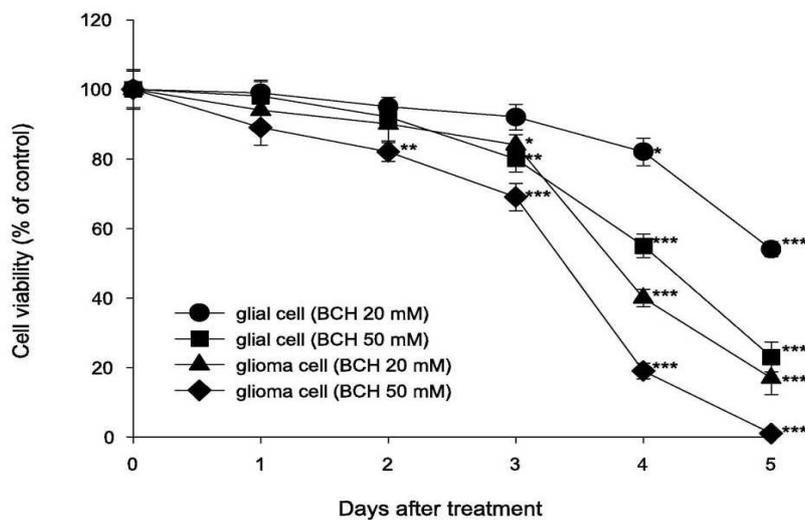


Fig. 4. Time-dependant effect of BCH on the cell viability in the rat glial and C6 glioma cells. The glial and C6 glioma cells were treated with 0, 20 (glial cell, filled circle; glioma cell, filled triangle) and 50 mM (glial cell, filled square; glioma cell, filled diamond) BCH for 0-5 days. The cell viabilities were determined by LDH assays. Each data point represents the mean±SEM of three experiments. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control and *** $P < 0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of BCH).

BCH 0, 0.3, 1, 3, 10, 20 및 50 mM의 다양한 농도를 4일과 5일 동안 각 세포에 투여한 후 LDH assay를 시행하였다. 교세포는 5일째 10, 20, 50 mM에서 각각 75, 54 및 23%의 생존율을 보였고, C6 세포주에서는 5일째 10, 20 및 50 mM에서 생존율이 각각 33, 17 및 1%로 교세포에서 보다 세포성장 억제 효과가 뚜렷하였다 (Fig. 5).

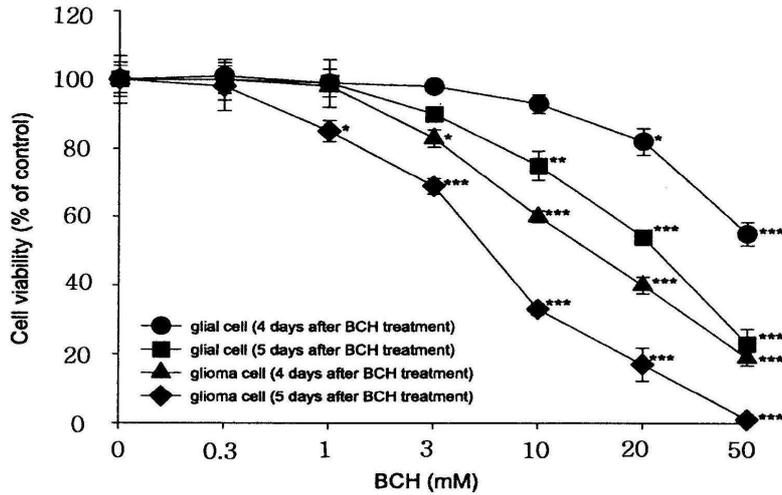


Fig. 5. Concentration-dependant effect of BCH on the cell viability in the rat glial and C6 glioma cells. The glial cells (4 days after BCH treatment, filled circle; 5 days after BCH treatment, filled square) and C6 glioma cells (4 days after BCH treatment, filled triangle; 5 days after BCH treatment, filled diamond) were treated with various concentrations (0, 0.3, 1, 3, 10, 20 and 50 mM) of BCH for 4 and 5 days. The cell viabilities were determined by LDH assays. Each data point represents the mean \pm SEM of three experiments. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control and *** $P < 0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of BCH).

IV. 고찰

본 연구에서 흰쥐의 정상 교세포(rat glial cells)와 교세포종(C6 glioma cells)를 이용하여 아미노산 수송계 L의 발현과 아미노산 수송계 L 억제제인 BCH가 세포성장 억제에 미치는 효과를 조사하였다. 교세포와 C6 세포주의 mRNA를 이용한 RT-PCR 분석을 통해, 교세포에서 LAT2 및 그 보조인자 4F2hc mRNA 발현은 관찰할 수 있었으나 LAT1 mRNA 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 대조적으로 C6 세포주에서는 LAT1 및 4F2hc mRNA 발현을 관찰할 수 있었으나 LAT2 mRNA 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 교세포와 C6 세포주의 단백을 이용한 western blot analysis를 통해 교세포에서 LAT2와 그 보조인자 4F2hc 단백질의 발현을 확인할 수 있었으나 LAT1 단백질의 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 2). C6 세포주에서는 LAT1과 그 보조인자 4F2hc 단백질의 발현을 확인할 수 있었지만 LAT2 단백질의 발현은 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 이 실험결과는 암세포인 T24 사람 방광암 세포(21)와 Hep2 사람 후두암 세포(22)에서 LAT1과 4F2hc는 발현 하지만 LAT2는 발현하지 않는다는 것을 확인한 다른 문헌들의 결과와 일치하는 것이다. 따라서 본 연구의 결과와 LAT1이 종양세포에서 과발현되고 종양세포의 성장에 중요한 역할을 한다고 보고 한 이전 문헌(8,9,15,16)의 결과를 함께 고찰하여 볼 때, 정상 교세포는 아미노산 수송계 L중에서 LAT2와 4F2hc는 발현 하지만 아미노산 수송계 L의 또 다른 isoform인 LAT1은 발현 하지 않으며, 교세포종 세포인 C6 세포주에서는 LAT1과 4F2hc는 발현 하지만 LAT2는 발현하지 않는다고 볼 수 있다.

교세포와 C6 세포주에서 L-leucine uptake는 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제인 BCH(8,10,18-21)에 의해 농도 의존적으로 차단되었다(Fig. 3). IC_{50} 은 교세포에서 약 270.0 μ M, C6 세포주에서는 약 73.1 μ M로 산출되었다(Fig. 3). 이는 *Xenopus* oocyte expression system 방법에 의한 *Xenopus* oocyte에서 rat LAT1(8), human LAT1(9), rat LAT2(18) 및 human LAT2(19)의 cDNA를 미세주입하여 얻은 K_m 과 거의 유사한 결과이다. 본 연구에서 교세포의 IC_{50} 은 약 270.0 μ M로 *Xenopus* oocyte에서 human LAT2의 K_m 치는 약 220 μ M과 비슷한 결과가 나왔지만 rat LAT2의 K_m 값

은 약 120 μM 보다는 높았다. 이런 경미한 차이를 보이는 것은 세포 및 실험조건이 다른 데에서 기인하는 차이 때문이라 사료된다(18,19). 또한 본 연구에서 C6 세포주의 IC_{50} 은 약 73.1 μM 로 *Xenopus* oocyte에서 human LAT1의 K_m 값은 약 19.7 μM (9)과 rat LAT1의 K_m 값은 약 18.1 μM (8,10)보다 약간 높게 나타났으며, 이 역시 세포 및 실험 조건의 차이 때문이라 사료된다(8,9,10). 비록 작은 차이가 존재할 지라도 교세포의 IC_{50} 은 *Xenopus* oocyte에서의 rat LAT2(18) 및 human LAT2(19)의 K_m 과 비슷하였고, C6 세포주의 IC_{50} 은 *Xenopus* oocyte의 human LAT1(9) 및 rat LAT1(8,10)의 K_m 과 유사함을 확인할 수 있었다. 따라서 정상 교세포에서 L-leucine의 수송에는 LAT2가 중요한 기능을 하며, 교세포종인 C6 세포주에서는 L-leucine 수송에 LAT1이 중요한 기능을 하고 있다고 말할 수 있다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 LDH 실험에서, 시간과 농도에 의존적으로 교세포와 C6 세포주의 성장을 억제시켰다(Fig. 4, 5). 이는 시간과 농도에 의존적으로 종양세포 성장을 억제시키는 항암효과를 갖는 화합물들(pingyangmycin, norcantharidin 등)에서의 연구결과(23,24)와 일치하는 것이다. BCH 처리 후, 교세포와 C6 세포주의 세포성장 억제의 정도에는 차이가 있었다. BCH 처리 5일째, 50 mM 농도에서 정상 교세포는 약 23%의 생존율을 나타낸 반면 C6 세포주는 생존율 약 1%로 성장이 완전히 억제되었다(Fig. 4, 5). 이 결과는 C6 세포주에서 발현하는 LAT1을 통한 중성아미노산의 이동친화력이 정상 교세포에서 발현하는 LAT2를 통한 중성아미노산의 이동친화력이 보다 높게 일어나는 결과라 사료된다. 정상 교세포는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT2만 존재하고, C6 세포주는 LAT1만 존재하여 이를 통해 중성아미노산이 수송된다. 따라서 본 연구에서 교세포종 C6 세포주에서 BCH에 의한 세포성장의 억제는 중성아미노산을 수송하는 LAT1에 BCH와 중성아미노산들이 서로 경쟁적으로 작용하여 세포성장에 필수적인 중성아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 C6 세포주의 성장의 억제를 유도하는 것으로 사료된다.

결론적으로, 흰쥐 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 각각 LAT2와 LAT1을 통해 중성아미노산의 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었으며 BCH는 C6 세포주에서 높게 발현하는 LAT1을 차단하여 세포성장에 필수적인 L-leucine 등

중성아미노산들의 수송을 억제하여 세포성장을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 LAT1만의 기능을 선택적으로 차단하는 억제제를 이용하여 뇌종양 세포 등 암세포 성장억제에 관한 또 하나의 방향성을 제시 할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

흰쥐의 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주를 이용하여 아미노산 수송체 L의 발현 및 아미노산 수송체 L 억제제인 BCH가 세포성장 억제에 미치는 효과를 밝히기 위해, 흰쥐의 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주에서 RT-PCR, western blot analysis, uptake 실험 및 LDH 분석 등을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 정상 교세포에서 아미노산 수송체 LAT2 및 그 보조인자 4F2hc의 발현은 확인 할 수 있었으나, LAT1의 발현은 관찰할 수 없었다. 교세포종 C6 세포주에서는 아미노산 수송체 LAT1 및 그 보조인자 4F2hc의 발현은 확인 할 수 있었으나 LAT2의 발현은 관찰할 수 없었다.
2. 정상 교세포에서는 LAT2를 통해 중성아미노산들이 수송되었으며, 교세포종 C6 세포주에서는 LAT1을 통해 중성아미노산들이 수송되었다.
3. BCH는 시간과 농도에 의존적으로 정상 교세포와 교세포종 C6 세포주의 성장을 억제 시켰으며, 그 효과는 교세포종 C6 세포주에서 더 뚜렷하였다.

본 연구의 결과로서 흰쥐의 정상 교세포는 LAT2를 통해 교세포종 C6 세포주는 LAT1을 통해 중성아미노산의 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었으며, BCH는 이 LAT1 및 LAT2를 차단하여 중성아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 C6 세포주와 정상교세포의 성장 억제를 유도하는 것으로 사료된다. 또한 LAT1만의 기능을 억제할 수 있는 특이적 억제제 개발은 새로운 항암치료의 방향성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990 ; 70 : 43-77.
2. Silbernagl S. Renal transport of amino acids. *Klin Wochenschr* 1979 ; 57 : 1009-19.
3. Gomes P, Soares-da-Silva P. L-Dopa transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. *Brain Res* 1999 ; 829 : 143-50.
4. Goldenberg GJ, Lam HY, Begleiter A. Active carrier-mediated transport of melphalan by two separate amino acid transport systems in LPC-1 plasmacytoma cells in vitro. *J Biol Chem* 1979 ; 254 : 1057-64.
5. Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J. Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1993 ; 60 : 1407-13.
6. Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender DL. Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system 1 alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. *J Neurochem* 1995 ; 64 : 2125-31.
7. Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J. The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. *Endocrinol* 1990 ; 126 : 3245-50.
8. Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 23629-32.
9. Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al.

- Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001 ; 1514 : 291-302.
10. Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, et al. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanism of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 2002 ; 61 : 729-37.
 11. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Lofing J, Shoemaker CB, et al. Amino acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 1998 ; 395 : 288-91.
 12. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shpemaker CB, Verrey F. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 1998 ; 439 : 157-62.
 13. Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME. The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 1998 ; 439 : 157-62.
 14. Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 3009-16
 15. Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 1995 ; 55 : 1152-9.
 16. Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma*

- mansoni amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 5012-22.
17. Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 2000 ; 440 : 503-12.
 18. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 19745-51.
 19. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, et al. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transporter activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 19738-44.
 20. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, et al. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 34948-54.
 21. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, et al. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002 ; 1565 : 112-21.
 22. Kim DK, Yoon JH, Jeon JH, Lee SH. Expression and Functional Characterization of Neutral Amino Acid Transporter in Hep2 Human Head and neck Squamous cell Carcinoma. *Int J Oral Biol* 2004 ; 29 : 51-58.
 23. Kuo-wei Tai, Ming-Yung chou, Chao-chin Hu, Jaw-Ji Yang, Yu-chao chang. Induction of apoptosis in KB cells by pingyangmycin. *Oral*

Oncol 2000 ; 36(2) :242-7.

24. Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Lee CH, Lee JJ, Lou Iu, et al. Comparison of norcantharidin cytotoxic effects on oral cancer cells and normal buccal keratinocytes. Oral Oncol 2003 ; 39 : 19-26.

