

환경오염물질 폭로에 따른 인체세포에서의 rpt-1 발현 및 역할의 분석

김선영 · 양재호

대구가톨릭대학교 의과대학 약리학교실

Analysis of biological functions of rpt-1 in human cells with exposure to environmental pollutants

Sun-Young Kim, and Jae-Ho Yang

Dept. of Pharmacology, Catholic university of Daegu, School of Medicine
3056-6 Taemyung 4 dong Namgu Taegu 705-718 Rep. Korea

(Received December 15, 2001 / Accepted December 30, 2001)

ABSTRACT : Abel *et al.* in Germany discovered a new dioxin-responsive gene, which has later been identified as rpt-1 (regulatory protein T-lymphocyte 1). While it is speculated that rpt-1 may play a role in signal transduction and carcinogenesis, its roles and functions remain unknown. The present study attempted to analyze functions of rpt-1 in human epithelial cells following the xenobiotic exposures. While German counterpart analyzed expression of rpt-1 in spleen and thymus cells from mouse and rat and characterizes molecular properties of the gene, our work mainly focused on analyzing function of rpt-1 in human skin cells. Expression of rpt-1 in human cells were analyzed by western and northern blot, RT-PCR analysis. Expression of rpt-1 as well as Staf-50 in human cells with or without exposure to environmental pollutants were also analyzed by northern blot analysis, since Staf-50 is homologous with rpt-1 and found in human cells. To help study roles of rpt-1 in human cell system, retroviral vector system carrying rpt-1 gene under the CMV promoter were constructed and transfected. Cells over-expressing the gene after the transfection showed an increase of cell density and soft agar colony formations, as compared to the control cells, suggesting that rpt-1 may play a certain role in the transformation processes of human cells. While the expression of rpt-1 in spleen and thymus is known to be strong in the laboratory animals, both the basal and TCDD-induced expression of rpt-1 in the current cellular system remained insignificant. It is speculated that the expression pattern of rpt-1 may be tissue- and species-specific. The present study demonstrated a strong expression of rpt-1 protein in the brain of SD rat model. Since there is no previous report on the expression of rpt-1 in the brain tissue, the result may play a significant role in understanding dioxin-induced neurotoxicities in the future. The present study provides an opportunity to understand a role of rpt-1 in human cell system and suggest a possible lead and basis for the future study of dioxin-induced neurotoxicities.

Keywords : Regulatory protein T-lymphocyte 1 (rpt-1), Carcinogenesis, Human cells, Dioxin, Neurotoxicity

서 론

다이옥신은 인류가 만들어낸 화학물질 중 가장 발암성이 강하고 맹독성인 물질로 알려져 있다(Poland, 1982). 다이옥신은 발암성뿐만 아니라 생식독성, 태아독성, 면역독성 등 매우 다양한 독성을 나타내며 최근의 많은 관심이 집중되는 환경호르몬(endocrine disrupter) 효과도 강력한 물질이다(Safe, 1995). 최근 소각장 시설에서 배출되는 다이옥신으로

일반인의 관심이 높아지고 있는 이 물질은 화력발전소, 자동차 매연, 철강, 제지산업 등에서도 배출되며 산업이 발달한 국가일수록 오염의 심각성이 높다. 또한 최근에는 다이옥신이 food chain을 통하여 인체 내에 축적됨이 밝혀지고 있고 모유를 섭취하는 아기들의 위해성 여부가 논란이 되고 있다. 최근 WHO의 국제 암연구기구인 IARC가 다이옥신을 인체 발암물질로 규정함에 따라 다이옥신에 대한 인체위해성에 대한 관심이 고조되고 있는 실정이다(IARC, 1997). 그러나 다이옥신의 독성은 실험동물에 따라 매우 차이가 크고 또한 표적장기에 따라 독성반응이 달라 인체독성을 정확히 평가할

*To whom correspondence should be addressed

수 있는 실험모델을 확보하기 힘들며 또한 독성의 기전도 명확히 알려져 있지 않다(Yang, 1995). 다이옥신의 정확한 인체위해성평가를 위하여 독성 기전의 이해는 필수적이다. 따라서 독성기전을 이해하기 위한 많은 연구가 진행되어 왔으며 약물대사와 관련된 phase I 및 phase II 효소와 성장 조절관련인자들이 독작용의 발현과 관련성이 있는 것으로 알려져 있다(Schmidt, 1996). 특히 성장조절인자와 관련된 분자생물학적 기전에 많은 연구가 집중되고 있는 데 최근에는 Sutter 등에 의해 다이옥신에 의해 특이적으로 반응하는 유전자가 발견되었으며 이들 유전자는 plasminogen activator inhibitor(PAI-2) 및 interleukin-1(IL-1)인 것으로 알려졌다(Sutter, 1991). 또한 다이옥신의 독성기전에는 신호전달기작의 변화도 관련되어있다. Puga등은 설치류 세포에서 다이옥신에 의해 세포내 칼슘농도가 증가함을 보고하였으며 (Puga, 1992) Yang은 다이옥신의 인체세포발암화에 제2신경전달물질이 관여함을 보였다(Yang, 1998). 다이옥신의 독성은 장기에 따라 매우 다양한 반응을 나타내는 데 이들 중 설치류의 thymus에 대한 반응은 가장 민감한 것으로 나타나왔다. 따라서 thymus의 반응에 따른 면역체계의 변화는 중요한 독성작용기전으로 생각되어 다이옥신의 면역체계작용에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(Holsapple, 1991). 그러나 많은 연구에도 불구하고 지금까지 다이옥신의 면역체계에 대한 작용기전은 명확하지 않다. 따라서 다이옥신에 특이적으로 반응하는 유전자를 발견하는 일은 다이옥신의 분자생물학적 기전을 이해하는 데 중대한 일로 사료된다. 최근 뒤셀도르프 대학 연구진은 생쥐의 thymus에서 다이옥신에 특이적으로 민감하게 반응하는 유전자를 DD RT-PCR 방법으로 분리하는 데 성공하였다(Donat, 1998). 이는 Sutter 등에 의한 다이옥신 반응 유전자 발견이후 획기적인 성과로서 특히 다이옥신에 의한 면역체계영향을 이해하는 데 크게 기여할 것으로 생각된다. 유전자 은행을 통한 유전자 검색결과 이 유전자는 Regulatory protein T-lymphocyte-1(rpt-1) 유전자와 98% homology를 가지고 있는 것으로 나타났다. rpt-1은 HIV-1과 interleukin-2 receptor α chain(IL-2R α)을 조절하는 helper/inducer T cell에서 발현되는 단백질로서 HIV-1의 증식과 CD4+ T cell의 활성화에 역비례하는 것으로 알려져 있다(Patarca, 1988). rpt-1은 ring finger family에 속하는 motif로서 기존의 zinc finger motif와 다른 구조를 가지고 있으며 cysteine이 풍부한 서열을 가지고 있다. ring finger는 PML, RFP, BRCA1과 같은 인체 proto-oncogene에서 발견되며 종양화, 바이러스 증식, 신호전달체계 및 peroxisome의 결함 등에 관여하는 것으로 추정된다(Saurin, 1996). 그러나 지금까지 ring finger motif에 대한 정확한 기능 및 역할은 알려져 있지 않다. ring finger family 중에

서 rpt-1은 신호전달체계 기작에 관여하는 것으로 추정되며 세포의 핵내에 존재한다. rpt-1과 70% 이상 homology를 가지고 있는 ring finger motif는 STAF-50으로 알려져 있는데 interferon에 의해 증가되는 단백질이다(Tissot, 1995). 특히 STAF-50은 인체세포에서 발견되며 rpt-1과 높은 homology를 나타내므로 rpt-1의 역할을 인체세포에서 탐색하는 데 중요한 probe로 사용될 수 있는 물질이다.

본 실험은 인체피부세포에서의 rpt-1 발현을 분석하고 rpt-1의 기능을 파악하기 위해 retroviral vector system으로 rpt-1의 과다발현을 조작하여 세포의 성장에 미치는 역할을 확인하고자 하였다. 또한 rpt-1은 human proto-oncogene과도 관련성이 있을 것으로 추정되므로(Rivero-Lezcano, 1994) rpt-1 발현에 따른 인체세포의 발암화 현상을 분석하여 다이옥신과 같은 환경유해물질의 발암기전을 이해하는 데 기여하고자 하였다.

특히 rpt-1은 지금까지 그 역할이 잘 알려져있지 않은 새로운 물질이라는 점에서 생명과학의 지식을 향상시키는 계기가 될 뿐 아니라 rpt-1과 세포발암화의 관련성을 분석함으로써 다이옥신 등에 의한 발암 기전을 이해하는 데 크게 기여할 것이라는 기대로 본 연구를 시작하였다.

다이옥신에 반응하는 유전자의 발견은 이 분야의 연구에 획기적인 일이며 또한 이 유전자의 기능 및 역할을 인체세포에서 규명하는 일은 인체에 미칠 수 있는 다이옥신의 독성기전을 이해하는 데 크게 기여할 수 있는 계기가 된다. 또한 rpt-1이 속하는 ring finger motif는 아직 그 기능 및 역할이 잘 알려져 있지 않은 물질로서 이 물질의 역할을 분석하는 일은 신호전달기작이나 발암화 등과 같은 세포성장조절에 관여하는 중요한 생화학적 지식을 획득하는 계기가 될 수 있다. 따라서 본 연구는 다이옥신 반응 유전자인 rpt-1의 유전자 발현 및 역할을 인체세포에서 분석하므로써 다이옥신에 의한 독성기전을 세포 및 분자생물학적 측면에서 이해하고자 하였다.

연구방법

세포배양

세포 배양 조건은 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하고 배양액을 DMEM에 Fetal Bovine Serum 10%, hydrocortisone(5 ug/ml), antibiotics 등을 넣어 배양하였다. 세포가 confluency를 이루는 시점에서 1:3으로 subculture하였다.

Cell density 측정

세포의 contact inhibition의 변화를 측정하기 위해 5×10^3

cells/cm²를 용기에 넣고 배양한다. 배양액은 3일마다 새롭게 갈아주고 세포가 confluent한 상태에 도달하였을 때 단위 면적당 세포 수를 계산하였다.

Soft-agar colony formation

rpt-1의 세포발암성 잠재력을 측정하기 위해 각각의 장기세포에 대하여 anchorage independence의 획득 여부를 평가한다. Noble agar 1.2 g에 dH₂O 35 ml을 넣고 30분간 autoclave한 다음 15 ml의 dH₂O와 FBS 25 ml, 2X EMEM 50 ml을 넣어 0.9% agar base를 만든다. 5 ml의 agar base를 petri dish에 넣은 다음 밤새 37°C incubator에 둔다. 0.9g Noble agar에 dH₂O 50 ml을 넣어 30분간 autoclave한 다음 dH₂O 7.2 ml, FBS 7.2 ml, 2X EMEM 14.4 ml을 넣어 0.36% top agar를 만든다. 준비된 base agar에 1 × 10⁴ cells/dish를 포함하는 top agar용액을 2 ml씩 petri dish에 넣는다. 그후 colony형성의 크기가 0.3 mm이상인 colony수를 측정한다(Yang, 1995).

Cell aggregation assay

rpt-1이 발암화 세포의 특성인 접착력(adhesiveness)의 증가에 기여하는 지를 평가한다. Soft-agar와 같은 방법으로 base agar를 만들어 5 ml씩 Petri dish에 넣는다. 밤새 37°C incubator에 둔 다음, 10% FBS를 포함한 배양액에 10⁵ cells/dish로 세포를 접종한 후 4일이 지난 시점에서 배양액 상에 성장하는 1 mm이상 크기의 colony의 크기 및 숫자를 측정한다(Rhim, 1989).

RT-PCR analysis

rpt-1의 발현에 따른 growth regulatory factor의 mRNA 발현변화를 측정한다. 세포에서 total RNA를 추출한 다음 1 µg의 total RNA에 oligo d(T) primer를 넣고 60°C에서 5분간 두어 poly A+를 얻는다. 30 µl RT mix(0.1M DTT, RNA guard, RT-buffer, dNTP, dH₂O, RT)를 각 sample에 넣은 다음 37°C에서 60분, 70°C에서 10분 둔 다음 얼음위에 놓는다. cDNA과정이 끝나면 2.5 µl의 cDNA에 47.5 µl의 PCR mix [PCR-buffer, dH₂O, Taq.pol, 5'-primer, 3'-primer, dNTP-mix(³²P-labelled)]를 넣은 다음 primer에 따라 annealing temp 및 cycle 수를 최적정 수준으로 정한다. 10% PAGE에 전기영동하고 gel dryer로 말린후 X-ray cassette에 넣어 영하 75°C 보관 후 현상한다(Dohr, 1995).

Western blot

rpt-1의 세포내 단백질 수준을 측정하기 위해 rpt-1 polyclonal antibody를 사용한다. Cell lysate(20 g)를 전기

영동한 다음 Nitrocellulose paper에 400 mA로 4시간 동안 blotting한다. blot이 끝난 paper에 rpt-1 polyclonal antibody를 1:3000으로 희석한 용액으로 반응시킨 후 2nd antibody로 anti-mouse Ig G를 처리한 후 Amersham사의 ECL system으로 측정한다(Yang, 1998).

Retroviral vector system 건립

rpt-1을 함유하는 plasmid pT7T3을 ECOR I 제한효소로 처리하여 rpt-1 fragment를 분리한 후 plasmid pCx 속의 hCMV(human cytomegalovirus) promoter하의 ECOR I site에 ligation시킨다. hCMV promoter는 현재 사용되고 있는 여러 가지 promoter 중 expression 정도가 매우 강력한 것으로 알려져 있어서 이 promoter의 사용은 인체세포 내의 rpt-1의 expression을 극대화시킬 수 있다. rpt-1을 함유하는 pLNC-rpt-1의 건립방법은 Fig. 1과 같다.

retroviral vector는 PG13 packaging cell line에 transfection 시켜 사용하였다(Fig. 1)

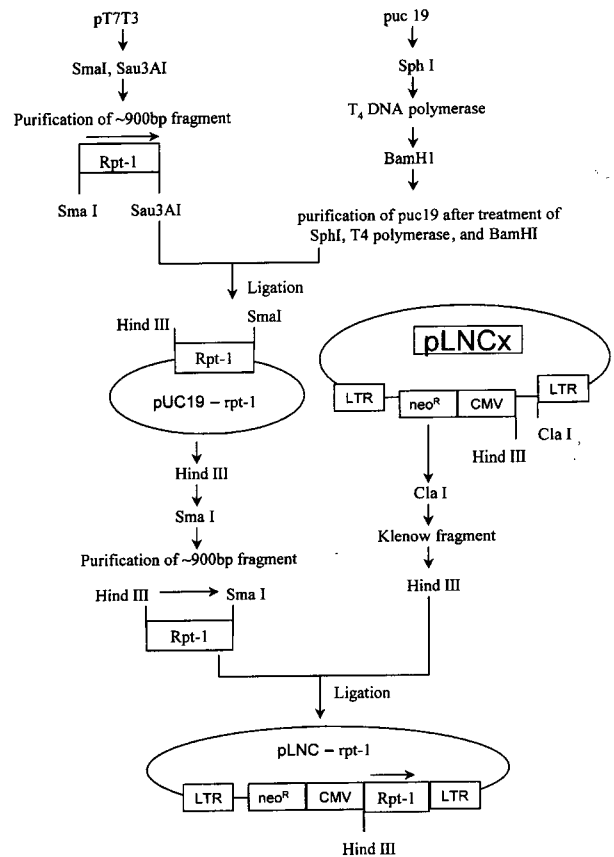


Fig. 1. Construction of retroviral vector containing rpt-1.

결 과

인체세포 발암화에 미치는 영향:

CMV promoter 하에 rpt-1을 넣은 retroviral vector system을 만들어 rpt-1을 overexpression하는 clonal cell을 선별한 다음 rpt-1이 세포의 발암화 지표에 미치는 영향을 분석한 결과 clone-2를 제외 한 모든 세포군에서 변화를 나타내지 않았으며 clone-2의 경우 saturation density, soft agar colony formation, cell aggregation등에서 발암화 지표의 증가 현상을 나타내었다(Table 1).

인체세포에서의 rpt-1 mRNA의 발현 분석

rpt-1 probe를 이용하여 인체피부세포에서 TCDD, PCB126, PCB153을 2 hr동안 각각 처리 후 northern blot을 실시한 결과 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2).

인체세포에서의 STAF-50의 반응 분석

rpt-1과 70%이상의 homology를 가지며 인체세포에서도 존재하여 rpt-1의 인체 counterpart로 추정되는 STAF-50의 mRNA 변화를 RT-PCR을 이용하여 분석한 결과 rpt-1에서 마찬가지로 10 nM TCDD를 처리한 인체세포의 경우 mRNA level의 증가를 나타내지 않았다(Fig. 3).

Table 1. Properties of human epithelial cells after retroviral transfection of rpt-1 and 7 subsequent subcultures

Dose (ug/ml)	Saturation density ($\times 10^5/cm$)	Soft-agar colony formation (%)	cell aggregation** (>1 mm)
control	3.5 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05	-
clone-1	4.0 \pm 0.12	0.31 \pm 0.09	-
clone-2	5.1 \pm 0.15	0.45 \pm 0.11*	+
clone-3	3.2 \pm 0.10	0.25 \pm 0.18	-
clone-4	2.9 \pm 0.05	0.38 \pm 0.08	-

*: p<0.05 as compared to control cells.
 **: -, \leq 5 colonies, +; > 5 colonies, ++; > 10 colonies.
 The data are mean \pm SD with 3 different counts.

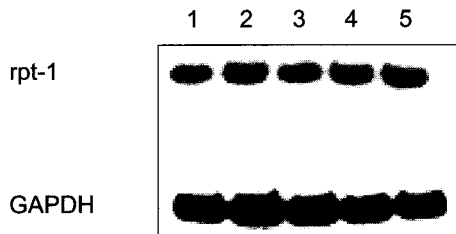


Fig. 2. Expression of rpt-1 in human epithelial cells following exposure of environmental pollutants: 1) control, 2) TCDD (1 nM), 3) TCDD (10 nM), 4) PCB126 (50 uM), 5) PCB153 (50 uM).

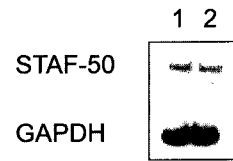


Fig. 3. Expression of STAF-50 in human epithelial cells following TCDD (10 nM) exposure.

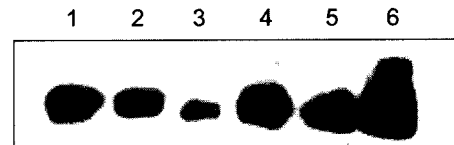


Fig. 4. Immunoblot analysis of rpt-1 in organs of SD rat: 1) brain, 2) heart, 3) kidney, 4) liver, 5) lung, 6) spleen.

장기별 rpt-1의 발현 분석

rpt-1의 발현을 SD rat의 뇌, 심장, 신장, 간, 비장, 폐에서 각각 western blot으로 분석한 결과 비장에서의 발현이 가장 높았으며 간 및 폐에서도 높은 발현을 나타내었다(Fig. 4).

고 찰

최근 독일 뒤셀도르프대학 연구진은 다이옥신 반응유전자인 rpt-1(regulatory protein T-lymphocyte-1)을 발견하였다. rpt-1은 ring finger motif로서 신호전달체계 및 종양화에 관계할 것으로 추정되나 그 역할 및 기능은 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구는 인체에서 다이옥신과 같은 환경유해물질에 의한 rpt-1 유전자의 발현 및 역할을 분석하고자 하였다. 이를 위하여 독일측에서는 rpt-1의 cDNA full sequencing, promoter cloning, protein interaction 등의 기능을 측정하고 본 연구진은 주로 인체세포에서의 역할을 분석하고자 하였다. 세포수준에서의 rpt-1 역할을 용이하게 평가하기 위하여 retroviral vector system을 사용하여 rpt-1을 overexpression시킨 후 발암화에 미치는 영향을 분석하였다. retroviral transfection에서 얻어진 clonal cell은 clone에 따라 많은 차이를 보였으며 대부분의 세포군에서는 발암화 지표의 변화에 영향을 주지않았다. 그러나 clone-2의 경우 contact inhibition의 소실을 나타내는 cell density의 증가가 나타났으며, anchorage independence를 측정하는 soft agar colony formation 및 cell adhesion을 측정하는 cell aggregation분석에서도 다소 증가된 수치를 나타내었다. 따라서 본연구 결과 rpt-1이 세포의 발암성에 얼마나 직접 관여하는 지 또한 어떤 역할을 하는지 알 수 없으나 rpt-1의 overexpression이 인체세포에서 발암화의 과정에 관여 할 가

능성을 제시하고 있다. rpt-1은 ring finger family에 속하는 motif로서 기존의 zinc finger motif와 다른 구조를 가지고 있으며 cysteine이 풍부한 서열을 가지고 있다. ring finger는 PML, RFP, BRCA1과 같은 인체 proto-oncogene에서 발견되며 종양화, 바이러스 증식, 신호전달체계 및 peroxisome의 결합 등에 관여하는 것으로 추정된다(Borden, 1996). 그러나 지금까지 ring finger motif에 대한 정확한 기능 및 역할은 알려져 있지 않다. ring finger family 중에서 rpt-1은 신호전달체계 기작에 관여하는 것으로 추정되며 세포의 핵내에 존재한다. rpt-1과 70% 이상 homology를 가지고 있는 ring finger motif는 STAF-50으로 알려져 있는데 interferon에 의해 증가되는 단백질이다(Tissot, 1995). 특히 STAF-50은 인체세포에서 발견되며 rpt-1과 높은 homology를 나타내므로 rpt-1의 역할을 인체세포에서 탐색하는 데 중요한 probe로 사용될 수 있는 물질이다. 따라서 본 연구는 STAF-50의 발현을 인체세포 모델에서 검색하였으나 발현이 나타나지 않았으며 이는 STAF-50이 가지고 있는 세포특이성 때문으로 추정된다. Western blot에 의한 rpt-1의 측정치는 측정 한계 이하의 발현으로 basal level의 발현 검색이 불가능하였고 다이옥신 노출 이후에도 증가하는 양상을 보이지 않았다. 따라서 rpt-1은 spleen, thymus와 같은 특정장기의 발현특이성을 가진 유전자로 사료되어 장기 특성에 따른 연구의 필요성을 제시하였다. 이와같은 인체상피세포의 발현 부족현상을 극복하고 새로운 연구 방향을 탐색하기 위하여 동물의 장기별 rpt-1의 발현을 western blot을 이용하여 측정된 결과 여러 장기에서 높은 발현을 보였다. 특히 흥미로운 것은 지금까지 알려지지 않은 rpt-1의 뇌 조직내의 발현이다. 간, 비장등의 발현은 잘 알려져 왔으나 뇌 조직에서의 높은 발현은 본 연구에서 처음으로 발견된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 앞으로 rpt-1에 대한 뇌 세포내의 역할 및 기능에 많은 연구가 필요함을 제시하는 중요한 자료로 생각된다. 특히 뇌에 대한 다이옥신의 영향은 지금까지 잘 알려져 있지 않으며 최근 들어 뇌 조직내에도 다이옥신에 검출되는 보고가 있어 rpt-1에 대한 연구는 앞으로의 다이옥신에 대한 신경독성을 연구하는 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 rpt-1에 대한 세포모델 내의 발현 부족 등으로 rpt-1의 역할을 규명하는데 부족한 점이 많으나 rpt-1의 overexpression이 인체세포의 발암화에 관여할 가능성을 제시하였으며 동물조직 중 특히 뇌에서의 높은 발현을 발견함으로써 앞으로 다이옥신에 의한 신경 독성 등을 이해하는데 필요한 기초 자료를 제공한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Borden, K.L.B. and Freemont, P.S. (1996): The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 395-401.
- Donat, S., Bachle, C., and Abel, J. (1999): Identification of regulatory protein, T-lymphocyte-1, as a TCDD responsive gene. *Organohalogen Comp.* **37**, 215-219.
- Patarca et al. (1988): rpt-1, an intracellular protein from helper/inducer T cells that regulates gene expression of interleukin-2 receptor and human immunodeficiency virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 2733-2737.
- Poland, A. and Knuston, J.C. (1982): TCDD and related halogenated aromatic carbons: examination of mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 517-554.
- Puga A, Nebert DW, Carrier F. *DNA Cell Biol.* **11**, 269-281.
- Rhim JS. (1989): *Anticancer Res.* **9**, 1345-1366.
- Rivero-Lezcano O., Sameshima, J.H. (1994): *J. Biol. Chem.* **269**, 17363-17366.
- Safe, S., Wang, F., Porter, W., and Duan, R. (1998): Ah receptor agonists as endocrine disruptors. *Toxicol Lett.* **102-103**, 343-347.
- Saurin, A.J. and Borden, K.L.B. (1996) *TIPS* **21**, 201-214.
- Schmist, J. and Bradfield, C. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 55-59.
- Sutter, T.R., Guzman, K., Dold, K.M. and Greenlee, W.F. (1991): Regulation of dioxin-responsive genes. *Science*, **254**, 415-418.
- Tissot, C. and Mechti, N. (1995): Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long-term terminal repeat expression. *J. Biol. Chem.* **270**, 14891-14898.
- Yang, J.H. and Rhim, J.S. (1995): TCDD; molecular Mechanism of carcinogenesis and its implication of human *in vitro* model. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **18**, 111-127.
- Yang, J.H. (1998) *Chemosphere* **36**(4), 3015-3031.