

사람 폐암 세포주에서 포도당 운반 단백 유전자의 발현†

서울대학교 의과대학 내과학교실, 핵의학교실* 및 의학연구원 폐연구소

김우진, 임재준, 이재호, 유철규, 정희순, 한성구, 정준기*, 심영수, 김영환

= Abstract =

Glucose Transporter Gene Expression in Human Lung Cancer Cell Lines

Woo Jin Kim, M.D., Jae-Joon Yim, M.D., Jae Ho Lee, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D.,
Hee Soon Chung, M.D., Sung Koo Han, M.D., June-Key Chung, M.D.,*
Young-Soo Shim, M.D., Young Whan Kim, M.D.

Departments of Internal Medicine and Nuclear Medicine*, College of Medicine and Lung Institute,
Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea

Background : Glucose uptake has been found to be increased in cancer cells, and FDG-PET imaging is used for diagnosis of cancer using this phenomenon. However, the exact mechanism of increased glucose uptake in cancer cells has not been clarified. Recent studies demonstrated the presence of glucose transporter(GLUT) mRNA expression in gastrointestinal cancer and head and neck cancer, and suggested that GLUT may be associated with glucose uptake in cancer cells. In lung cancer cells, glucose metabolism is also known to be increased. We evaluated GLUT mRNA expression in human lung cancer cell lines in order to find out the mechanism of increased glucose uptake in lung cancer.

Method : Total RNA was isolated from 15 human lung cancer cell lines and immortalized bronchial epithelial cell line(BEAS-2B). After electrophoresis of 20 μ g total RNA, Northern blot analysis was done using GLUT1 cDNA and GLUT3 cDNA as probes.

Results : Thirteen of 14 human lung cancer cell lines expressed GLUT1 mRNA and 10 of 14 human lung cancer cell lines expressed GLUT3 mRNA. Eight human lung cancer cell lines expressed both GLUT mRNAs. BEAS-2B expressed GLUT1 mRNA and did not express detectable GLUT3 mRNA.

Conclusion : The increase of glucose metabolism in lung cancer may be associated with GLUT1 and GLUT3 expression. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1998, 45 : 760-765)

Key words : Glucose transporter(GLUT), Lung neoplasm

† 본 연구의 요지는 1997년도 결핵 및 호흡기학회 추계학술대회에서 발표되었음.

서 론

암세포에서 포도당 대사가 증가한다는 사실은 오래전부터 알려져 왔다. 포도당은 포도당 운반체에 의한 촉진확산(facilitated diffusion)과정을 거쳐 세포내로 유입되고 세포내에서 헥소키나제(hexokinase)에 의해 인산화된 후 세포내에서 에너지원으로 이용된다. 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose(FDG)는 포도당의 유사체로 포도당 운반체에 의해 세포내로 유입되고 그후 인산화되는 과정까지는 포도당과 같지만 인산화된 이후 더 이상의 대사과정을 거치지 못하고 세포내에 축적된다.

FDG를 주입하면 암조직에서 FDG의 유입이 증가하는데 이를 임상적으로 이용한 것이 FDG-PET 영상이다¹⁾. FDG의 유입이 폐암에서도 증가하는 것이 밝혀졌고²⁾ FDG-PET가 폐암의 진단에 유용하다는 연구들이 있었다. FDG의 유입이 증가하는 기전으로 암세포에서 포도당 운반체의 증가나 헥소키나제의 증가가 가능한 설명이다. 최근의 연구에 따르면 헥소키나제보다 포도당 운반체의 증가가 FDG의 유입과 좀더 연관성이 많은 것으로 보인다³⁾.

한편, 포도당 운반체는 다섯가지의 이소체가 밝혀져 있다. 소화기관의 악성종양과 두경부종양에서 포도당 운반체 1형과 3형의 mRNA 발현이 증가한다는 보고가 있었고^{4,5)}, 이후 여러 가지 정상조직과 악성조직에서 연구가 있었다. 정상 사람 폐에서는 포도당 운반체 1형이 blood-nerve barrier에서 발현되고 3형이 신경내분비 세포에서 발현이 되었으나 정상 사람 폐의 상피세포에서는 포도당 운반체의 발현을 확인할 수 없었다⁶⁾.

저자들은 폐암에서 포도당 유입이 증가하는 기전에 대해 알아보기 위하여 사람 폐암 세포주를 대상으로 현재 악성종양과 관련성이 많을 것으로 알려진 포도당 운반체 1형과 3형의 mRNA 발현을 알아보려고 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

15개의 사람 폐암세포주와 SV40로 불멸화(immortalized)시킨 기관지 상피세포주를 대상으로 guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform 법을 modify한 TRIzol[®] reagent(Gibco BRL)를 이용하여 total RNA를 추출하였다.

추출한 total RNA 20 µg 씩을 1% agarose-formaldehyde gel에 전기영동시킨후 Hybond Nylon membrane(Amersham)에 transfer하였다.

포도당 운반체 1형과 3형에 대한 cDNA를 probe로 Northern blot을 시행하였다. Prehybridization은 Oncor사의 Hybrisol I (50% formamide, 10% dextran sulfate, 1% SDS, blocking reagent)으로 42°C에서 1시간동안 시행하였고, Prime it II kit(Stratagene)와 32P-dCTP를 이용하여 random priming시킨 GLUT1과 GLUT3 cDNA를 첨가하여 overnight hybridization을 시행하였다. 세척은 1X SSC, 0.1% SDS 50ml로 50°C에서 30분간 시행한 뒤 membrane을 autoradiography 필름(Amersham)에 -70°C에서 48시간 expose한 후 현상하였다.

결 과

포도당 운반체 1형의 mRNA 발현은 2.8kb위치의 band로 확인하였다(Fig. 1). 14종의 사람 폐암 세포주 중에서 13종에서 포도당 운반체 1형의 mRNA 발현을 확인하였다(Table 1). 소세포암 5종중 4종과 비소세포암 9종 모두에서 mRNA 발현을 확인하였다. 포도당 운반체 3형의 mRNA 발현은 2.7kb와 4.1kb위치의 두개의 band로 확인하였다(Fig. 2). 14종의 사람 폐암 세포주 중에서 10종에서 3형의 mRNA 발현을 확인하였다. 발현을 확인한 세포주는 소세포암 5종중 3종과 비소세포암 9종중 7종이었다. 포도당 운반체 1형과 3형의 발현을 동시에 보인 세포

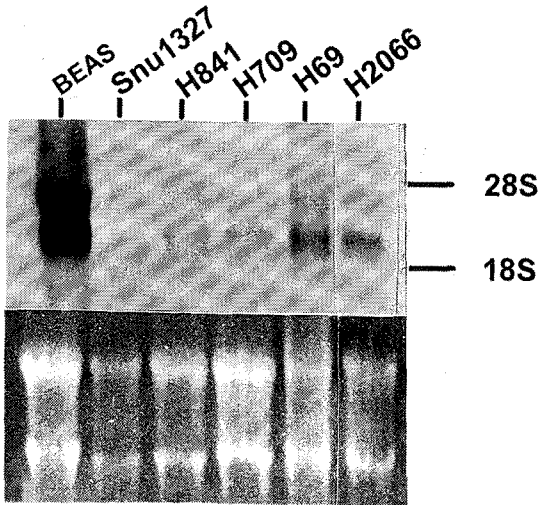


Fig. 1. GLUT1 mRNA expression in BEAS and human lung cancer cell lines. BEAS and all five lung cancer cell lines expressed GLUT1 mRNA.

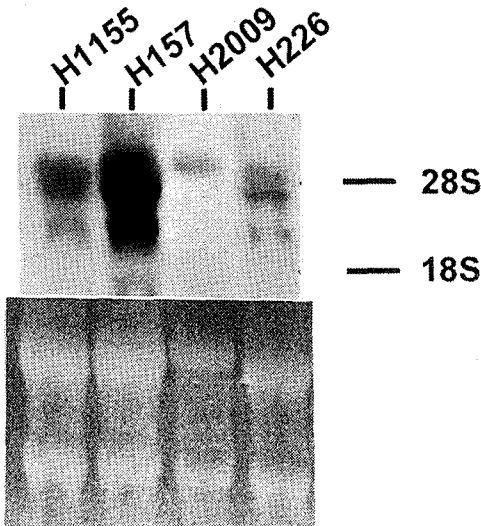


Fig. 2. GLUT3 mRNA expression in human lung cancer cell lines. Three lung cancer cell lines expressed GLUT3 mRNA, but NCI-H2009 did not express GLUT3 mRNA.

Table 1. GLUT expression in human lung cancer cell lines and BEAS

Cell line	GLUT1	GLUT3
SCLC		
NCI-H69	+	-
NCI-H709	+	+
NCI-H792	+	-
NCI-H841	+	+
NCI-H865	-	+
NSCLC		
NCI-H157	+	+
NCI-H226	+	+
NCI-H441	+	+
NCI-H460	+	+
NCI-H522	+	+
NCI-H1155	+	+
NCI-H1785		+
NCI-H2009	+	-
NCI-H2066	+	-
Snu1327	+	
BEAS	+	-

(SCLC ; small cell lung cancer, NSCLC ; non-small cell lung cancer BEAS ; bronchial epithelial cell line)

주는 8종이었다. 모든 세포주에서 포도당 운반체 1형과 3형중 최소한 하나 이상의 발현을 보였다.

불멸화시킨 기관지 상피세포주에서는 포도당 운반체 1형의 발현은 확인할 수 있었으나 3형의 band를 보이지 않아 발현이 없는 것으로 판단하였다.

고 찰

정상적으로 포도당 운반체는 포도당의 여러 조직에서 포도당의 축진확산에 중요한 역할을 하며 다섯가지의 이소체가 알려져 있다. 이들은 구조적, 기능적으로 연

관성이 있고, 아미노산 서열의 39-65%를 공유하고 있다⁷⁾. 이들은 조직에 따라 발현하는 정도가 다르고, 포도당의 운반에 대한 동력학적, 생화학적 특성이 조금씩 차이가 있다.

포도당 운반체 1형은 태반 조직, 뇌조직, 태아 조직에서 주로 발현되면서 혈관-조직 장벽에 높은 농도로 존재한다. 2형은 간조직과 췌장의 베타세포에서 주로 발현하면서 이들 조직으로의 포도당 유입에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 3형은 태아 근육 cDNA library 중에 있는 cDNA로 밝혀졌고, 뇌조직에 가장 많이 존재하고 태반, 신장 조직에서도 발현한다⁸⁾. 4형은 근육과 지방세포에서 발현되어 인슐린에 의해 자극되고 주로 식후에 이들 세포내로 포도당 유입에 관여하는 것으로 알려져 있다. 5형은 소장에서 주로 발현된다. 악성 종양과 연관이 있다고 알려져 있고, 본 연구에서도 대개의 폐암 세포주에서 mRNA 발현을 보인 1형과 3형의 포도당 운반체는 태반에 모두 존재하고 조직의 발달과 종양의 급속한 성장과 관련이 있을 것으로 보인다⁹⁾.

다른 조직에서의 연구에서 식도암, 위암, 췌장암, 대장암을 포함하는 소화기관의 악성종양에서 1형과 3형의 포도당 운반체의 과발현이 관찰되었다. 정상간과 간암에서는 2형의 과발현을 보였고 간암에서 정상간보다 더 많은 발현을 보였다. 뇌종양에서도 1형과 3형의 포도당 운반체가 증가하였고 특히 3형이 악성변화와 신생혈관의 생성과 관련이 있다는 보고가 있었다⁹⁾. 유방암에서 단백질 단계에서 1형 포도당 운반체가 정상 유방에 비해 증가하였고, 반면 3형의 발현은 증가하지 않았으며¹⁰⁾, 조직학적 등급이 좀더 악성일수록 포도당 운반체의 발현이 증가한다는 주장이 있었다¹¹⁾. 역시 단백질 단계에서 1형 포도당 운반체의 발현을 여러 조직에서 실험하였을 때 정상조직이나 양성종양에 비해 사람의 암종에서 포도당 운반체 1형의 발현이 증가하였고 이것이 암조직에서의 포도당 대사증가와 관련이 있을 것으로 보고된 바 있다¹²⁾. 그러나, 악성종양 모두에서 포도당 운반체의 발현을 보이지는 않았고, 본 연구에서도 포도당 운반체의 발현을 일부 보

이지 않은 세포주가 있는 점으로 보아, 악성 종양에서의 포도당 대사 증가에 또 다른 기전이 존재할 것으로 추정된다. 악성 종양에서 포도당 대사가 증가하는 현상을 이용해 FDG-PET를 악성 종양의 진단에 이용하고 있다. 그런데, 폐암의 진단에 있어서, 특히 국내에서는 결핵이나 진균 감염등에서 위양성을 보일 수 있다는 점을 고려해야 한다¹³⁾. 실험적으로 일으킨 염증 부위에서도 FDG의 유입이 증가하고 호중구나 대식세포와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁴⁾. 한편, 대식세포에서의 FDG의 유입은 빠르게 청소되므로 악성 종양과의 감별이 가능하다는 주장이 있으나¹⁵⁾, 모든 경우 감별이 가능한 것이 아니고, 시간이 많이 소요되는 문제가 있다.

암세포에서 포도당의 유입이 증가하는 기전과 염증세포에서 포도당의 유입이 증가하는 기전의 차이점에 밝혀진다면 좀더 특이도를 높일 수 있는 방법을 찾을 수 있을 것이다. 그러나, 포도당 운반체가 악성종양에서 증가하는 현상을 이용하여 포도당 운반체와 결합하는 forskolin과 cytochalasin B라는 물질을 이용하여 영상화하였을 때는 악성종양의 진단에 적합하지 않았다는 보고가 있어¹⁶⁾ 좀 더 연구가 필요하다.

본 연구에서 SV40에 의해 전환된, 불멸화된 기관지 상피세포주(BEAS-2B)에서 포도당 운반체 1형의 과발현이 보였다. BEAS-2B는 종양성 전환을 한 것은 아니지만 불멸화되는 과정이 종양성 전환의 전단계로 볼 수 있고¹⁷⁾, 정상 기관지 상피세포에서 단백질 단계의 포도당 운반체 1형의 발현이 없었다는 보고와 비교할 때 불멸화과정에서 포도당 운반체의 발현과 관련이 있을 가능성을 시사한다.

이상의 연구에서 폐암세포주의 포도당 운반체 1형과 3형 발현이 폐암에서의 포도당 유입의 증가와 관련이 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

암세포에서 포도당의 유입이 증가되어 있다는 사실이

오래 전부터 알려져 왔고 이런 현상을 이용하여 FDG-PET영상이 암의 진단에 이용되고 있다. 그러나, 암세포에서 포도당 유입이 증가하는 기전에 대해서는 모르고 있다. 최근, 여러 연구에서 소화기계의 악성종양과 두경부종양에서 포도당 운반체의 mRNA의 존재가 증명되었고, 포도당 운반체가 암세포에서의 포도당 유입 증가와 관련이 있을 가능성을 시사하였다.

폐암에서도 포도당대사가 항진되어 있다. 저자들은 폐암에서의 포도당 유입이 증가하는 기전에 대해 알아보기 위하여 사람 폐암세포주에서 포도당 mRNA의 발현여부를 확인하였다.

방 법 :

15종의 사람 폐암 세포주와 불멸화시킨 기관지 상피 세포주에서 total RNA를 추출하였다. 20 µg의 total RNA를 전기영동시킨후, 포도당 운반체 1형과 3형에대한 cDNA를 probe로 Northern blot analysis를 시행하였다.

결 과 :

14종의 사람 폐암 세포주중에서 13종에서 포도당 운반체 1형의 mRNA 발현을 확인하였고, 14종의 사람 폐암 세포주중에서 10종에서 포도당 운반체 3형의 mRNA 발현을 확인하였다. 불멸화시킨 기관지 상피 세포주의 포도당 운반체 1형의 mRNA 발현을 확인할 수 있었고 3형의 mRNA 발현은 확인할 수 없었다.

결 론 :

폐암에서 포도당 대사의 증가는 포도당 운반체 1형과 3형의 발현과 관련이 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Wahl RL, Hutchins GD, Buchsbaum DJ, Liebert M, Grossman HB, Fisher S : 18F-2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose Uptake into human tumor xenografts. *Cancer* 67 : 1544-1550, 1990
2. Nolop KB, Rhodes CG, Brudin LH, Beaney RP, Krausz T, Jones T, Hughes JMB : Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer* 60 : 2682-2689, 1987
3. Haberkorn U, Ziegler SI, Oberdorfer F, Trojan H, Haag D, Peschke P, Berger MR, Altmann A, Kaick GV : FDG uptake, tumor proliferation and expression of glycolysis associated genes in animal tumor models. *Nucl Med Biol* 21 : 827-834, 1994
4. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H : Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem biophys Res Comm* 170 : 223-230, 1990
5. Mellanen P, Minn H, Grenman R, Harkonen P : Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int J Cancer* 56 : 622-629, 1994
6. Devaskar SU, Demello DE : Cell-specific localization of glucose transporter proteins in mammalian lung. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 4373-4378, 1996
7. Persson JE, Bell GI : Mammalian facilitative glucose transporter family : structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol* 54 : 911-930, 1992
8. Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan YS, Byers MG, Shows TB, Bell GI : Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. *J Biol Chem* 263 : 15245-15248, 1988
9. Nishioka T, Oda Y, Seino Y, Yamamoto T, Inagaki N, Yano H, Imura H, Shigemoto R, Kikuchi H : Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res* 52 : 3972-3979, 1992
10. Brown RS, Wahl RL : Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. *Cancer* 72 : 2979-2985, 1993
11. Younes M, Brown RW, Mody DR, Fernandez L, Laucirica R : Glut1 expression in human breast carcinoma : correlation with known prognostic markers. *Anticancer Res* 15 : 2895-2898, 1995

12. Younes M, Lechago LV, Somoano JR, Mosharaf M, Lechgo J : Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res* 56 : 1164-1167, 1996
13. 김우진, 임재준, 유철규, 김영환, 심영수, 한성구 : 고립성폐결절에서 FDG-PET의 진단적 유용성. *결핵 및 호흡기 질환* 44 : 1263-1270, 1997
14. Yamada S, Kubota K, Kubota R, Ido T, Tamahashi N : High accumulation of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in turpentine-induced inflammatory tissue. *J Nuc Med* 36 : 1301-1306, 1995
15. Kubota R, Kubota K, Yamada S, Tada M, Ido T, Tamahashi N : Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nuc Med* 35 : 104-112, 1994
16. Nelson CA, Wang QJ, Bourque JP, Crane PD : Targeting of glucose transport proteins for tumor imaging. *J Nuc Med* 37 : 1031-1037, 1996
17. Amstad P, Reddel RR, Pfeifer A, Malan-Shibley L, Mark GE, Harris CC : Neoplastic transformation of a human bronchial epithelial cell line by a recombinant retrovirus encoding viral Harvey ras. *Mol Carcinog* 1 : 151-160, 1988