

마우스 대식세포에서 스테로이드 호르몬과 세포내 Ca^{++} 이 타우린수송체의 활성화에 미치는 영향

김하원^{1*} · 안혜숙¹ · 이선민¹ · 이은진⁵ · 현진원² · 박건구³ · 박태선⁴ · 김병각⁵
¹서울시립대학교 생명과학과, ²서울대학교 의과대학 약리학교실, ³(주)파마코제네칩스,
⁴연세대학교 식품영양학과, ⁵서울대학교 약학대학

Effects of Steroid Hormones and Intracellular Ca^{++} on Taurine Transporter Activity in Murine Macrophage Cell Line

Ha Won KIM^{1*}, Hye Suk AN¹, Sun Min LEE¹, Jin Won HYUN²,
Kun Koo PARK³, Tae Sun PARK⁴ and Byong Kak KIM⁵

¹Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743,

²Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799,

³Pharmacogenechips Inc., Chunchon 200-160,

⁴Department of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749 and

⁵College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received March 3, 2001; Accepted March 3, 2001)

Abstract – The activity of taurine transporter is affected by various extracellular stimuli such as ion, hormone and stress. To assess effects of steroid hormones and cyclosporin A (CsA) on the taurine transporter activity, murine monocytic RAW264.7 cell line was stimulated with dexamethasone (DM), triamcinolone (TA), cortisone (CS), hydrocortisone (HCS), prednisone (PSN), prednisolone (PSL) and methylprednisolone (MPSL) in the presence of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Treatment of TPA on the cell line led to significant reduction of taurine transporter activity. However, in case of stimulation of the cells with steroid hormones in the presence of TPA, all of them recovered TPA-induced reduction of the taurine transporter activity. Treatment of the cells with CsA led to significant reduction of the taurine transporter activity. Ionomycin (IM) recovered the reduced taurine transporter activity by CsA, but failed in the presence of EDTA, a calcium chelating agent. These results showed that glucocorticoid hormone recovered TPA-induced reduction of taurine transporter activity and that IM recovered CsA-induced reduction of the transporter activity by increasing intracellular free Ca^{++} concentration.

Key words □ Taurine Transporter, Steroid Hormone, Cyclosporin A, Protein Kinase C, Ionomycin

타우린을 세포내로 이동시키는 단백질이 생체내에 존재한다는 간접적인 보고는 지난 10년간 꾸준히 제기되어 왔다. 실제로 뇌세포에서는 세포외부에 비하여 뇌세포 내부에 400배로 많이 존재하며, Ehrlich 세포에서는 세포내부에 2,000배나 높으며, HeLa 세포에서는 7,000배 정도의 높은 농도로 세포질에 존재한다. 이러한 사실은 외부의 타우린을 세포내부로 운반시키는 단백질이 세포막에 존재한다는 것을 뜻한다. 최초로 타우린수송체의 유전자가 클로닝된 것은 1992년에 마우스와 랫트에서 이루어졌다. 마우스의 뇌세포에서 클로닝된 타우린수송체 유전자는 β -alanine수송체의

cDNA probe를 사용하여 가능하게 되었다. 마우스의 타우린수송체는 590개의 아미노산을 가진 단백질이며, Na^+ 의존적인 신경전달물질의 다른 수송체와 아미노산서열의 유사성이 클 뿐만 아니라 입체구조도 유사하다(Liu *et al.*, 1992). 랫트의 뇌에서 클로닝된 타우린수송체의 유전자는 621개의 아미노산을 가진 단백질을 생성시키며 막을 12회 통과하는 영역을 가지고 있다(Smith *et al.*, 1992). 개의 신장세포인 Madin-Darby canine kidney(MDCK)세포에서 클로닝된 타우린수송체 유전자의 단백질은 Na^+ 와 Cl^- 이온 의존성을 나타내며, 655개의 아미노산으로 되어있다. 각 장기에 대한 타우린수송체의 mRNA의 분포는 신장, 장막, 뇌, 간, 심장 등에 많이 존재함이 밝혀졌다(Uchida *et al.*, 1992). 사람의

*To whom correspondence should be addressed.

타우린수송체 유전자는 1993년에 갑상선세포에서 분리되었는데, 619개의 아미노산을 가진 단백질을 생성시키며, 계산상의 분자량은 69.6 kDa이다. 이 수송체는 개 또는 랫트의 타우린수송체와 아미노산 서열이 매우 유사하다(Jhiang *et al.*, 1993). 사람의 태반에서 클로닝된 타우린수송체의 유전자는 3번 염색체의 p25 부근에 존재하며 (Ramamoorthy *et al.*, 1994) 사람의 망막상피세포에도 타우린수송체가 존재하는데 이 수송체에서 GABA 보다는 타우린의 수송속도가 훨씬 크기 때문에 연구에서 필요로 하는 타우린을 특이적으로 이동시킬 수 있다(Leibach *et al.*, 1993). 음식물로 섭취한 타우린은 장을 통하여 체내로 이동하는데 고양이의 장막에서는 타우린흡수가 수송체에 의존하지 않기 때문에 고양이는 식이로 타우린을 다량 섭취하여야한다.

타우린수송체는 신경전달물질의 다른 수송체와 아미노산의 서열상 일치하는 부분이 많지만 동일한 것은 아니다. 즉, 타우린수송체는 β -alanine수송체와 다르며, GABA수송체와도 서로 다르다. GABA수송체에서 $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{GABA}$ 의 이동 비율은 2:1:1 또는 3:1:1로 알려져 있으며, 타우린은 GABA수송체에 영향을 미칠수 있지만, GABA는 타우린수송체에 영향을 미치지 못한다는 것은 서로 친화력이 다를 뿐만 아니라 상이한 수송체임을 나타낸다(Quinn and Miller, 1992; Sivakami *et al.*, 1992).

타우린수송체에 영향을 미치는 인자에 관한 연구도 많이 진척되어 있으며, 타우린수송은 calmodulin의 활성화에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 면역억제제인 cyclosporine A에 의하여 타우린수송체의 기능이 억제되는데, 이러한 억제 현상은 calmodulin antagonist인 W-7이나 calmidazolium에 의하여 회복되기 때문이다. 그러나 다른 면역억제제인 FK-506에 의해서는 타우린수송체의 기능이 억제되지 않는다(Ramamoorthy *et al.*, 1992). 또한 사람의 대장암세포주인 HT-29세포주에서 PMA는 타우린수송체의 기능을 억제시킴이 보고되었다. 이러한 억제효과는 PKC억제제로 알려진 staurosporine에 의하여 차단되며 단백질합성 억제제인 cycloheximide, actinomycin D, colchicine, cytochalasin D 등에 의해서 영향을 받지 않는다(Brandsch *et al.*, 1993). 타우린수송체가 타수송체와 별개의 것임을 나타내는 또 다른 근거로는 타우린수송체가 타우린을 세포내로 이동시킬 때 다른 신경전달물질의 agonist 또는 antagonist의 영향을 전혀 받지 않는다는 것이다.

Dexamethasone은 억제된 타우린수송체의 활성을 회복시킨다는 사실을 본 저자 등은 이미 보고한 바가 있다(Kim 등, 1995). 본 연구에서는 dexamethasone 이외의 각종 steroid 호르몬이 타우린수송체의 기능에 미치는 영향을 검토하였으며, 면역억제제인 cyclosporin A와 ionomycin이 타우린수송체의 활성화에 미치는 영향을 연구하였기에 보고하고자 한다.

실험방법

세포주 및 시약

마우스 대식세포 암세포주인 RAW264.7은 American Type Culture Collection(Rockville, USA)으로 부터 구입하여 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지와 fetal calf serum(FCS)은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, [$^3\text{H}(\text{N})$]-taurine (21.9 Ci/mmol)은 NEN(Boston, MA, USA)에서 구입하였다. 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA), dexamethasone(Dex), cortisone(CS), hydrocortisone(HCS), prednisone(PNS), prednisolone(PSL), methylprednisolone (MPSL), triamcinolone(TA), EDTA, NaOH, ionomycin(IM), trypsin-EDTA, HEPES, cyclosporin A(CsA) 등은 Sigma 회사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

세포 배양

RAW264.7 세포배양용 배지는 DMEM 배지에 10% 열처리 fetal calf serum(FCS), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 첨가하여 0.22 μm membrane filter로 여과 후 사용하였다. FCS를 heat inactivation시키기 위해서는 FCS를 실온에서 녹인 후 56°C water bath에서 30분간 가열하여 잔존하는 보체성분을 불활성화시켰다. 다시 실온으로 만든 후 50 ml 원심분리 시험관에 50 ml 씩 분주하여 -20°C에 냉동 보관하면서 필요시 사용하였다. RAW264.7 세포주 배양은 T-25 culture flask에서 5 ml 이하의 배지에서 수행하였으며, culture flask에 부착되어 자라는 성질이 있으므로, 다량의 세포가 필요할 경우에는 지름 9 cm의 세포배양용 dish에서 배양하였다. 부착세포의 배양은 9 cm의 dish에 0.5×10^6 세포와 배지 10 ml를 가하여 배양하였다. 세포를 회수할 때는 FCS이 함유되지 않은 5 ml의 DMEM 배지에 0.5 ml의 trypsin-EDTA(100 \times)를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킴으로써 부착된 세포를 분리시켜 단일세포로 만든 후 trypsin을 불활성화시키기 위하여 10% FCS이 함유된 DMEM 배지 10 ml를 가하였다. 1000 rpm에서 원심분리(2회)하여 세포를 세척해서 실험에 사용하였으며 필요에 따라서는 세포를 냉동보관시켰다. 세포는 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

타우린수송체의 기능 조사

타우린수송체를 발현하고있는 세포주에 대하여 실험을 진행하였다. 타우린수송체는 Na^+ 와 Cl^- 의존성이 있으므로, Na^+ 함유배지와 Na^+ 비함유배지를 사용하여 타우린이 세포내로 이동한 것을 비교함으로써 판정하였다. Na^+ 함유배지는 25 mM HEPES/Tris(pH 7.5), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 , 5 mM D-glucose를 함

유하고 있는 것을 사용하며, Na⁺비함유배지는 25 mM HEPES/Tris(pH 7.5), 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5 mM D-glucose, 140 mM sucrose를 함유하고 있는 buffer를 사용하였다.

Monolayer로 성장시킨 세포에 ³H-aurine을 가하여 37°C에서 30분간 배양하여 세포내로 ³H-aurine이 이동하도록 하며, 30분 후에 상등액을 버리고 DMEM으로 2회 세척한 후 세포를 lysis시켜 세포내의 ³H-aurine을 β-scintillation counter(Hewlett-Packard, 2500TR, USA)로 정량하였다. 세포를 lysis시키는 방법은 0.01 mM NaOH와 1 mM EDTA를 가하여 분해시켰다. Scintillation cocktail 용액(수용성) 2 ml에 1 ml의 세포 용해액을 가하여 잘 섞은 후 β-counter 용 vial에 넣어서 3분간 β-count를 측정하였다. 한가지 시료당 3개를 사용하여 측정후 평균값을 사용하였다.

각종 스테로이드 호르몬과 면역억제제의 영향

Protein kinase C(PKC)는 세포내에서 신호전달에 중요한 기능을 담당하고 있다. PKC를 활성화시키는 약물인 TPA와 각종 스테로이드 호르몬이 타우린수송체의 기능에 미치는 영향을 검토하기 위하여 RAW264.7 세포를 96 well plate에 1×10⁵ cells/well의 농도로 가한 후에 10 ng/ml의 TPA 존재하에 100 nM의 dexamethasone(Dex), cortisone(CS), hydrocortisone(HCS), prednisone(P SN), prednisolone(PSL), methylprednisolone(MPSL), triamcinolone(TA) 등을 가하여 30분간 반응시켰다. 그 후 각 well 당 1 μCi의 ³H-aurine을 가하여 30초, 5분, 30분간 배양한 후에 상등액을 버리고 냉각시킨 Na⁺비함유배지로 3회 세척한 후에 세포 용해액을 가하여 세포내로 수송된 타우린을 β-counter로 측정하였다.

면역억제제인 CsA는 신호전달 차단제로 널리 연구된 바가 있다. 따라서 CsA가 타우린수송체의 활성화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 1×10⁶ cells/well의 농도로 96-well plate에 RAW264.7 세포주를 가한 후에 24시간 동안 DMEM 배지로 배양하였다. Na⁺함유배지로 교환하여 20분간 안정화시킨 후에 5, 50, 500 nM의 CsA를 각각 가하여 30분간 반응시켰다. 그 후 각 well에 1 μCi의 ³H-aurine을 가하여 30분간 반응시킨 후에 세포내로 유입된 타우린을 β-counter로 측정하였다. 타우린수송체의 활성화에 Ca²⁺가 관여하는지를 연구하기 위하여 500 ng/ml의 IM과 0.8 μM의 EDTA를 사용하였으며 실험과정은 상기의 실험과정에 준하였다.

실험결과

스테로이드 호르몬의 영향

마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에 ³H-aurine을 가하

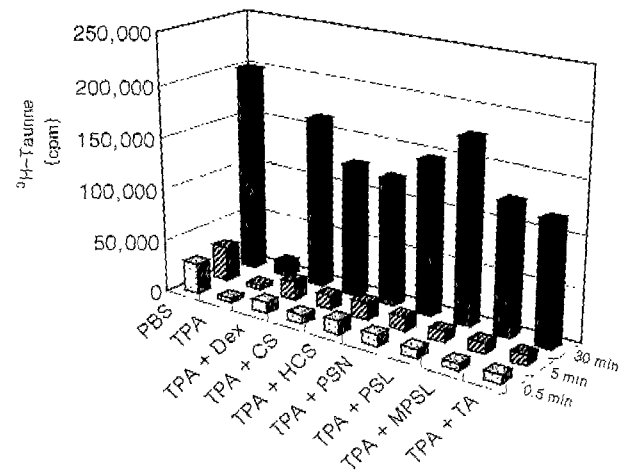


Fig. 1. Effect of TPA and glucocorticoids on taurine transporter activity. RAW264.7 cells (1×10⁵ cells/well) were maintained in DMEM and replaced with Na⁺-containing buffer and stabilized for 20 min. Then stimulated with each stimulator for 30 min. And added 1 μCi ³H-aurine for 0.5, 5 and 30 min. Final concentrations of each stimulator was as follows: TPA (10 ng/ml), all glucocorticoids (100 nM). TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; Dex: dexamethasone; CS: cortisone; HCS: hydrocortisone; PSN: prednisone; PSL: prednisolone; MPSL: methylprednisolone; TA: triamcinolone.

여 타우린수송체의 활성을 관찰하였다. 대조군에서는 0.5분과 5분후에는 각각 29,506과 33,227 cpm으로 타우린 수송 능력이 약하였으나, 30분 후에는 200,475 cpm으로 활성이 크게 증가하였다. 여기에 protein kinase C의 자극제인 TPA(10 ng/ml)를 가하였을 때는 30분 후에는 대조군의 7.2%로 저하되었다. TPA의 존재하에 glucocorticoid 호르몬을 100 nM의 농도로 가하였을 때 타우린수송체의 활성은 prednisolone에 의하여 30분후에 대조군의 87%로 가장 강하게 회복되었으며, dexamethasone에 의해서도 대조군의 82% 까지 회복되었다. 그러나 triamcinolone에 의해서는 30분후에 대조군의 59% 까지 회복되어 가장 약한 활성을 나타내었다(Fig. 1).

Cyclosporin A와 ionomycin의 영향

CsA는 강력한 면역억제제로서 세포내 신호전달을 차단하는 약물이다. RAW264.7 세포에서 대조군의 타우린수송체의 활성은 416,576±65 cpm인 반면에, CsA를 5, 50, 500 nM을 30분간 처리하였을 때 타우린수송체의 활성은 각각 153,108±1,959, 161,556±2,266, 156,483±7,897 cpm이었다. 따라서 5 nM의 CsA에 의해서도 타우린수송체의 활성은 최대로 억제되었다(Table I). CsA의 처리시간이 타우린수송체의 활성화에 미치는 영향을 연구하기 위하여 RAW264.7 세포를 Na⁺-함유배지에서 5 nM의 CsA를 가하여 5, 30, 60, 300분간 반응시켰을 때 대조군의 타우린수송

Table I. Effect of cyclosporin A on taurine transporter activity

Concentration	³ H-taurine transported (cpm)	% of control
PBS	416,576 ± 65	100.0
5 nM CsA	153,108 ± 1,959	36.8
50 nM CsA	161,556 ± 2,266	38.8
500 nM CsA	156,483 ± 7,897	37.6

Cells (1×10^6 cells/well) were maintained in DMEM and replaced with Na⁺-containing buffer and stabilized for 20 min. Then stimulated with each concentration of CsA for 30 min. And added ³H-taurine for 30 min. After washing, cells were lysed with NaOH-SDS for 30 min. The lysate was counted by liquid scintillation counter (LSC).

체의 활성은 421,002 ± 401 cpm인 반면에 5분 후에는 29,406 ± 443 cpm으로써 대조군의 7%로 저하되었으며, 30분 후에는 대조군의 43%로 회복되었다(Table II). 따라서 마우스 대식세포인 RAW264.7 세포에서는 면역억제제인 CsA에 의해 5분 이내에 신속히 타우린수송체의 활성이 억제되며, 그 이후에는 서서히 회복되는 것으로 나타났다.

Ionomycin과 세포내 Ca⁺⁺ 농도의 영향

상기의 실험에서 RAW264.7 세포에서 5 nM의 CsA는 타우린 수송체의 활성을 최대로 억제함을 확인하였다. RAW264.7 세포에 ³H-taurine을 가하여 타우린 수송체의 활성을 측정하였을 때 대조군은 403,609 ± 2,074 cpm인 반면에 CsA의 존재하에 IM을 가한 후 0.5, 5, 30분 후에는 타우린 수송체의 활성이 각각 64,863 ± 1,088(16%), 223,005 ± 622(55.3%), 294,113 ± 264(72.9%)로 시간이 경과함에 따라

Table II. Effect of cyclosporin A stimulation time on taurine transporter activity

CsA stimulation time	³ H-taurine transported (cpm)	% of control
PBS	421,002 ± 401	100.0
5 min	29,406 ± 443	7.0
30 min	180,050 ± 5,446	42.8
60 min	172,454 ± 6,839	41.0
300 min	149,672 ± 7,738	35.6

Cells (1×10^6 cells/well) were maintained in DMEM and replaced with Na⁺ buffer and stabilized for 20 min. Then stimulated with each concentration of 5 nM CsA for 5, 30, 60 and 300 min. And added ³H-taurine for 30 min. After washing, cells were lysed with NaOH-SDS for 30 min. The lysate was counted by LSC.

CsA에 의해 억제되었던 타우린 수송체의 활성이 IM에 의하여 회복되었다(Table III).

이러한 결과는 Ca⁺⁺ ionopore인 IM에 의하여 배지중의 Ca⁺⁺이 세포내로 유입되어 세포내 Ca⁺⁺의 농도가 증가함으로 인하여 타우린 수송체의 활성이 증가된 것으로 여겨졌다. 따라서 Ca⁺⁺ 킬레이트제인 EDTA(0.8 μM)를 가하여 Ca⁺⁺의 영향을 차단하는 실험을 수행하였다. RAW264.7 세포에 5 nM의 CsA와 0.8 μM의 EDTA 존재하에 IM의 농도를 20, 200, 2,000 ng/ml로 증가시켜 타우린 수송체의 활성을 측정한 결과 각각 대조군의 12.0%, 13.7%, 14.9%로써 타우린 수송체의 활성이 회복되지 못하였다(Table IV). 따라서 CsA에 의해서 저하된 타우린 수송체의 활성이 IM에 의해 회복되는 기전에는 세포내 Ca⁺⁺의 농도가 중요한 기능을 함을 알 수 있었다.

Table III. Effects of ionomycin and cyclosporin A on taurine transporter activity

Stimulation	Stimulation time (min)	³ H-taurine transported (cpm)	% of control
PBS		403,609 ± 2,074	100.0
5 nM CsA	5	32,527 ± 562	8.1
5 nM CsA + 500 ng/ml IM	0.5	64,863 ± 1,088	16.0
5 nM CsA + 500 ng/ml IM	5	223,005 ± 662	55.3
5 nM CsA + 500 ng/ml IM	30	294,113 ± 264	72.9

Cells (1×10^6 cells/well) were stimulated with each stimulator and added ³H-taurine for 30 min.

Table IV. Implication of [Ca⁺⁺]_i for the recovery of taurine transporter activity that was reduced by CsA

Stimulation transported (cpm)	³ H-taurine	% of control
PBS	137,761 ± 1,249	100.0
5 nM CsA + 0.8 uM EDTA	13,092 ± 1,757	9.5
5 nM CsA + 0.8 uM EDTA+20 ng/ml IM	16,580 ± 1,788	12.0
5 nM CsA + 0.8 uM EDTA+200 ng/ml IM	18,887 ± 2,342	13.7
5 nM CsA + 0.8 uM EDTA+2,000 ng/ml IM	20,469 ± 5,799	14.9

RAW264.7 cells (1×10^6 cells/well) were pretreated with EDTA, a Ca⁺⁺ chelator, to be Ca⁺⁺ free medium. Then was stimulated with each stimulator for 5 min. And added ³H-taurine for 30 min.

고 찰

세포내로의 타우린 수송은 여러 가지 세포의 작용 조절에 중요한 과정이라 할 수 있다. 타우린이나 β -아미노산의 세포내 uptake를 담당하는 타우린 수송체의 존재는 이미 알려져 그 gene이 cloning된 상태이다. 그러나 대식세포 내에서, 타우린 수송체에 의해 타우린의 세포내 수송시 관여되는 다양한 요소에 관한 연구는 아직 미진한 형편이다. 본 연구에서는 마우스 대식세포주를 사용하여, 타우린 수송체의 활성을 조절하는 인자 중 스테로이드 호르몬, 면역억제제, 세포내 Ca^{++} 의 농도 등에 의한 신호전달 체계를 규명해 보고자 하였다.

Protein kinase C(PKC)가 세포 내 신호 전달 체계에 있어서 매우 중요한 역할을 수행한다는 점은 익히 알려진 바이다. 타우린수송체내에도 PKC에 의한 인산화 부위가 6군데 존재하는 것으로 알려졌으며, 실제로 PKC의 활성화는 세포내로의 타우린 수송을 억제하는데 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Kim 등, 1995). TPA에 의해 PKC가 활성화되면 PKC는 cytosol에서 membrane으로 이동한다. TPA는 RAW264.7 cell에서 특히 10 ng/ml의 농도에서 타우린 수송을 가장 잘 억제한다는 사실이 보고된 바 있다(Uchida 등, 1991). TPA 처리에 의해 30분 후에는 세포 내로의 3H -taurine 수송이 대조군에 비해 17.2%로 억제되었으며, 이때 Fig. 1에 있는 Dex, CS, HCS, PSN, PSL, MPSL, TA 등의 여러 가지 스테로이드 호르몬을 동시 처리시 타우린 수송체의 활성이 대부분 대조군의 50% 이상으로 회복되었다. 그러나 각 스테로이드 호르몬의 구조와 작용사이의 상관관계는 보여지지 않았다. 즉, 각종 스테로이드 호르몬은 PKC의 활성화에 의하여 억제된 타우린 수송체의 활성을 회복시킬 수 있는 것으로 나타났으며 그 중에서 PSL, Dex, PSN의 활성이 가장 강력하였다. TPA의 작용은 세포내 $[Ca^{++}]_i$ 에 의하여 크게 증가되며 신호전달에도 관여한다. 그러나 본 연구에서는 TPA에 의해서는 타우린수송체의 활성이 감소되었으며, 세포내 $[Ca^{++}]_i$ 에 의해서는 타우린수송체의 활성이 회복되었다.

Cyclic undecapeptide에 속하는 CsA는 방선균의 일종인 *Streptomyces tsukubaensis*의 대사산물로서 장기이식 후 가장 많이 사용되는 면역 억제제중의 하나이다(Borel 등, 1976). 이는 세포 내에서 전구약물로 작용한다. 즉, immunophilin의 superfamily 중 cyclophilin을 수용체로 인식해 결합에 의존성을 지니는 효소인 calcineurin의 작용을 억제해 면역억제 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Handschumacher 등, 1984; Harding 등, 1986). CsA는 주로 T 세포의 초기 활성화 단계시 IL-2 유전자의 promotor인 cytoplasmic NF-AT(nuclear factor of activated T cells)가 핵내부로 이동(Ca^{++} -dependent translocation)하는 것을

차단해 IL-2 생성을 억제함이 밝혀졌다(Emmel 등, 1989; Blabletz 등, 1991; Granelli-Piperno 등, 1990). CsA의 부작용으로는 신우염을 유발시킬 수 있는 등의 신독성이 대표적으로 알려져 있으며 기타 두통, 혼수 등의 신경 독성이 알려져 왔다.

본 연구에서는 mouse macrophage cell을 사용하여, inflammation 등의 중요한 면역반응을 담당하는 대식세포내에 존재하는 타우린 수송체에 면역억제제 처리시 미치는 영향을 검토해 보았다. 또한 CsA의 작용기전은 결국 Ca^{++} 와 연관된 세포내 신호전달과정을 차단함에 기인하므로, 세포막의 Ca^{++} channel을 차단해 세포 내로 Ca^{++} 를 유입시키는 Ca^{++} ionophore인 IM을 처리해 그 영향을 살펴보았다. CsA는 5분동안 처리 시에 가장 큰 활성 억제 효과를 보임으로써, 대식세포 내에서 아주 빠른 시간 내에 작용함이 밝혀졌다. IM을 면역억제제와 동시에 처리했을 때, 수송체의 활성이 time-dependent하게 유의성 있는 회복 효과를 보였다(Table III). 여기서 CsA의 작용기전이 Ca^{++} -calmodulin 복합체 형성을 저해하는 것임에 착안하여, Ca^{++} chelator인 EDTA를 가하였을 때는 IM에 의해 세포내로 Ca^{++} 의 유입이 일어나지 못하여 타우린 수송체의 활성이 회복되지 못하였다(Table IV).

이상에서 antiinflammatory steroid hormone과 면역억제제가 대식세포내의 타우린 수송체의 활성에 영향을 미칠 수 있는 중요한 인자중의 하나임을 확인할 수 있었다. 흥미있는 사실은 스테로이드 호르몬은 그 자체로는 수송체의 활성에 영향을 미치지 못했지만, PKC에 의해 억제되었던 타우린수송체의 활성을 유의성있게 회복시킬 수 있었다. 또한 면역억제제중, 작용기전이 calmodulin- Ca^{++} complex 형성 저해와 관련이 있는 CsA에 의해 억제되었던 타우린 수송체의 활성은 Ca^{++} ionophore인 IM에 의해 현저히 회복되었다. 즉, 스테로이드 호르몬은 일반적으로 대식세포 등의 임파구를 감소시켜 면역 억제작용을 하는 것으로 알려져 있으나, 대식세포내의 stress 상태에서는 혈액 내 수요증가가 요구되는 타우린의 세포내 유입을 충족시키기 위해 타우린 수송체의 활성을 증가시킨 것으로 여겨진다.

타우린은 생체내 많은 기관에서 중요한 역할을 수행하는 물질이며, 세포외부에 비해 내부에 고농도로 존재하는 상태를 유지하기 위해 세포내로의 타우린 수송을 담당하는 수송체의 활성을 최대화하는 일은 매우 중요하다. 이러한 점에서 본 연구는 PKC의 활성이나 세포내 Ca^{++} 농도를 측정하여 더욱 보강할 필요가 있다. 더욱이 생체내 중요한 면역기능을 담당하고 있는 대식세포내에서의 타우린 수송체 활성에 영향을 미치는 여러 가지 요인들이나 세포내 신호전달 체계에 관한 더욱 정확한 기전을 밝히기 위해 더 많은 연구가 필요할 것이다. 또한 면역억제제 처리로 초래된 세포내

타우린 결핍 상태에서, 저하된 수송체의 활성을 회복시켜 생체내 항상성 유지를 가능하게 할 IM의 작용기전에 관한 상세한 연구가 필요하리라 본다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단의 연구비(Grant No. 1999-2-209-013-5 from the Interdisciplinary Research Program of the KOSEF)로 이루어 졌으며, 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., Stahelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**, 468-475.
- Brabletz, T., Pietrowski, I., Serfling, E. (1991) The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res.* **19**, 61-67.
- Brandsch, M., Miyamoto, Y., Ganapathy, V. and Leibach, F. H. (1993) Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C. *Am. J. Physiol.* **264**, G939-946.
- Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B., Higgins, K. M., Lacy, E., Crabtree, G. R. (1989) Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* **246**, 1617-1620.
- Granelli-Piperno, A., Nolan, P., Inaba, K., Steinman, R. M. (1990) The effect of immunosuppressive agents on the induction of nuclear factors that bind to sites on the interleukin 2 promoter. *J. Exp. Med.* **172**, 1869-1872.
- Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., Speicher, D. W. (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544-547.
- Harding, M. W., Handschumacher, R. E., Speicher, D. W. (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *J. Biol. Chem.* **261**, 8547-8555.
- Jiang, S. M., Fithian, L., Smanik, P., McGill, J., Tong, Q. and Mazzaferri, E. L. (1993) Cloning of the human taurine transporter and characterization of taurine uptake in thyroid cells. *FEBS Letters* **318**, 139-144.
- Kim, H. W., Shim, M. J., Kim, W. B. and Kim, B. K. (1995). Regulation of taurine transporter activity by glucocorticoid hormone. *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**, 527-532.
- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Nelson, H., Mandiyan, S. and Nelson, N. (1992) Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and beta-alanine in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 12145-12149.
- Quinn, M. R. and Miller, C. L. (1992) Taurine allosterically modulates flunitrazepam binding to synaptic membranes. *J. Neurosci. Res.* **33**, 136-141.
- Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Mahesh, V. B., Han, H., Yang-Feng, T., Blakely, R. D., and Ganapathy, V. (1994) Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochem. J.* **300**, 893-900.
- Ramamoorthy, S., Leibach, F. H., Mahesh, V. B. and Ganapathy, V. (1992) Selective impairment of taurine transport by cyclosporin A in a human placental cell line. *Pediatric Res.* **32**, 125-127.
- Sivakami, S., Ganapathy, V., Leibach, F. H. and Miyamoto, Y. (1992) The gamma-aminobutyric acid transporter and its interaction with taurine in the apical membrane of the bovine retinal pigment epithelium. *Biochem. J.* **283**, 391-397.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Wang, C. H., Hartig, P. R. and Branchek, T. A., Weinshank, R. L. (1992) Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **42**, 563-569.
- Uchida, S., Kwon, H. M., Preston, A. S. and Handler, J. S. (1991) Expression of Mardin-Darby canine kidney cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 9605-9609.
- Uchida, S., Kwon, H. M., Yamauchi, A., Preston, A. S., Marumo, F. and Handler, J. S. (1992) Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 8230-8234.