

U-937 세포에서 방사선 및 H₂O₂에 의한 ceruloplasmin의 mRNA 유전자 발현

오연경¹ · 박선영² · 김인규² · 윤병수^{1,*}

¹경기도 수원시 팔달구 이의동 산 94-6 경기대학교 생물학과

²대전광역시 유성구 덕진동 150번지 한국원자력연구소 방사선생체해석분야

Ceruloplasmin Gene Expression in U-937 Cells exposed to γ -Irradiation and H₂O₂

Youn Kyoung Oh¹, Seon Young Park², In Gyu Kim² and ByoungSu Yoon^{1,*}

¹Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Kyonggido, Korea

²Department of Radiation Biology, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600, Korea

(Received February 25, 2002 / Accepted April 20, 2002)

ABSTRACT: In human U-937 cell exposed to γ -irradiation and H₂O₂, the level of mRNA expression in ceruloplasmin gene was measured by using comparative RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction). At the normal growth condition, the level of ceruloplasmin transcript was estimated as 8.2% and 0.0068% of *hprt* (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) transcript and of β -actin transcript, respectively. In U-937 cells exposed to a dose of 100 rad γ -irradiation, the level of ceruloplasmin transcript was increased about 2.7 and 1.6 fold compared to un-treated cell by using compensation with the levels of *hprt* and β -actin transcript. By contrast, the expression of ceruloplasmin gene in U-937 cells exposed to H₂O₂ (50 μ M, 24 h), was shown no significant difference compared to un-treated cell. These results indicated that the expression system of ceruloplasmin gene may react only some specific oxygen species, such as reactive oxygen species induced by γ -irradiation.

Key words : ceruloplasmin, gene expression, gamma irradiation, H₂O₂, U-937 cell, RT-PCR

서 론

Ceruloplasmin은 1046개의 아미노산으로 이루어진 혈액단백질이며, 혈액에 존재하는 대부분(95%)의 구리 이온과 결합함으로써 구리운반기능을 가지며, 이는 Fenton 반응에 의한 라디칼의 형성을 억제하는 기능을 가진다(Ortel *et al.*, 1984). Ceruloplasmin은 방사선 조사 · 조직손상 · 세균감염 · 염증 등에 의해 혈액 내 그 농도가 빠르게 증가하는 급성 반응단백질 중 하나이다(Ikawa and Shozen, 1990; Magic *et al.*, 1995). 또한 ceruloplasmin은 amine oxidase(Feiden and Hsieh, 1976), ferroxidase(Osaki *et al.*, 1996) 및 peroxidase (Kim *et al.*, 1998; Kim and Park, 1998)와 같은 항산화 기능이 있으며, 최근 myeloperoxidase와 결합하여 HOCl의 형성을 억제하는 것으로 보고되었다(Park, *et al.*, 2000). 이

와는 대조적으로 ceruloplasmin에 결합된 구리가 low density lipoprotein을 산화시키고(Biemon *et al.*, 1984), DNA를 손상시키는(Kim *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001) pro-oxidant의 기능도 보고되고 있다. 이와 같이 ceruloplasmin의 기능은 명확히 설명되지 않으며, antioxidant와 pro-oxidant와 같은 대립 기능을 가진 것으로 파악되고 있다.

Ceruloplasmin이 외부 자극에 의해 빠르게 농도가 증가하는 것은 antioxidant의 기능으로 생체를 방어하기 위한 작용일 것이다. Turpentine에 의해 염증을 유발시킨 흰쥐의 간 조직에서 ceruloplasmin의 전사체의 양은 크게 증가되었고(Aldred *et al.*, 1987), 또한 방사선에 조사된 흰쥐의 혈액에서 ceruloplasmin의 농도가 크게 증가되었음이 보고되어 있다(Kim *et al.*, 1997). 일반적으로 사람의 혈액 내 ceruloplasmin 농도는 300~400 μ g/ml으로 알려져 있다. 그러나 Wilson 환자의 혈액 내 ceruloplasmin 농도는 정상인

*To whom correspondence should be addressed

보다 매우 낮으며(Shiono *et al.*, 2001), 방사선 치료를 받는 환자의 ceruloplasmin 농도는 크게 증가한다(Agrovannis *et al.*, 1994; Onizuka *et al.*, 1999). 이런 연구결과들로 ceruloplasmin 전사체와 단백질 농도의 증가는 *in vivo*에서 염증유발이나 방사선조사 등 일부 제한된 자극에 대해서 생물학적 지표로 사용되고 있다.

Ceruloplasmin은 주로 간 조직에서 합성되며(Magic *et al.*, 1995), 난황난, 태반 및 정소(Aldred *et al.*, 1987), 임파구(Pan *et al.*, 1996), 자궁(Thomas *et al.*, 1995) 및 폐(Fleming *et al.*, 1991) 등 여러 조직에서도 유전자 발현이 확인되었다. 그러나 *in vitro* 실험에 사용되는 여러 종양 세포 가운데 ceruloplasmin 단백질 합성은 HepG2 세포에서만 확인되었고(Mazumder *et al.*, 1997) Jurkat 세포에서 ceruloplasmin mRNA의 농도는 HepG2 세포의 0.2%로 면역세포에서 ceruloplasmin의 유전자 발현은 상대적으로 매우 낮은 것으로 보고된 바 있다(Pan *et al.*, 1996). 급성반응단백질의 합성 분비는 활성화된 대식세포에서 분비되는 interleukin-1, interleukin-2 및 tumor necrosis factor- α 등의 cytokine에 의해 간세포부터의 단백질 유전자 발현이 조절된다 (Baumann and Gaudie, 1994; Koj, 1996). 여러 종양세포에 IFN- γ 의 cytokine을 처리한 결과는, 우선 U-937 세포에서 ceruloplasmin 단백질의 합성이 20배 이상 증가하였고 HepG2의 경우 약 2-3배 정도 증가하였다는 보고가 있으나, U-937 세포보다 분화초기의 세포인 HL-60 세포와 U-937 세포보다 분화가 많이 이루어진 THP-1 세포, 그 외 HeLa 세포에서는 IFN- γ 의한 ceruloplasmin 단백질 합성을 확인할 수 없었다(Mazumder *et al.*, 1997). 본 연구에 사용된 U-937 세포는 37세의 남성으로부터 얻은 macrophage의 림프종으로 Sundstrom과 Nilsson(1976)에 의해 명명되고 기제된 후 *in vitro* 실험에 많이 사용되어 왔다.

본 연구는 다양한 외부 독성 물질로부터 생체방어 작용에 대한 기초 자료를 얻기 위하여 cytokine에 의해 ceruloplasmin의 단백질 합성이 크게 증가하는 U-937 세포를 선택하여 *in vitro*에서 comparative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 ceruloplasmin mRNA의 미세 정량 방법을 확립하고 방사선 조사 및 H₂O₂ 처리에 따른 mRNA 유전자 발현 양상을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료

RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS) 및 TRIzol Reagent는 GIBCO사(미국)에서, HEPES, Sodium bicarbonate, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)은 Sigma사(미국)

에서 구입하였다. PCR kit와 M-MLV reverse transcriptase는 Geneclone사 (한국) 제품을 사용하였다.

세포배양

사람 U-937 세포(Korean Type Culture Collection)는 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에서 5% CO₂와 37°C가 유지되는 세포배양기에서 배양되었다. 모든 실험은 세포 계대 배양 중 성장기의 세포를 사용하였으며, 세포 수는 trypan blue에 의해 염색하여 생세포수를 측정하였다.

방사선 조사 및 H₂O₂ 처리

방사선 조사 및 H₂O₂ 처리를 위한 U-937 세포는 세포 배양액에 4×10⁵ cells/ml로 준비하였다. 방사선 조사는 ¹³⁷Cs로 100 rad(882 rad/min) 조사하였고, H₂O₂는 50 μ M을 처리하였다. 각 세포는 조사 또는 처리 후 24 시간 배양하고 세포를 수거하여 RNA를 순수분리하였다.

RNA 정제

방사선 조사 및 H₂O₂ 처리한 24 시간 후, 세포 (1×10⁷ cells)를 수거하여 DPBS 용액으로 1000 rpm, 10분씩 2회 세척하였다. 세포 침전물에 1 μ l TRIzol 용액을 첨가하고 상온에서 5분, 그리고 chloroform 200 μ l를 넣은 후 상온에서 2-3분 동안 정치하였다. 15000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 얻은 450 μ l 상등액에 450 μ l isopropanol을 넣은 후 상온에서 10분 동안 정치하였다. 원심분리하여 침전물을 얻은 후 75% ethanol로 세척하고 DEPC가 처리된 40 μ l 증류수에 부유시켰다. 정제된 RNA는 A260nm대 A280 nm의 비율이 1.7 이상이었다.

Reverse Transcriptase-Polymerase chain Reaction (RT-PCR)

PCR을 위한 primer는 미국 국립 의학 도서관에서 제공하는 GenBank 데이터베이스에서 얻은 염기서열을 기초로 하여 제작되었다(Table 1). Ceruloplasmin의 1차 PCR를 위한 primer는 CP-C와 CP-B로 명명하였으며, 2차 PCR(nested PCR)를 위한 primer는 CP-C와 CP-D를 사용하였다. Reverse transcription은 1xRT-buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 30 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 0.25 mM dNTPs, 4 units RNasin, 0.1 pmol random hexa oligonucleotide, 100 units M-MLV reverse transcriptase, 0.05~5 μ g RNA로 조성된 10 μ l의 반응액을 사용하였으며, 이를 45°C에서 45분 간 처리하여 반응을 실행하였다. 반응 후 1.5 mM MgCl₂, 100 pmol primers, 25 μ M dNTPs 그리고 1xPCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500

Table 1.

Gene (GenBank accession)	Primer	Primer Sequence (5' → 3')
Ceruloplasmin (NM_000096)	CP-C CP-B CP-D	GCTGGTACCTAGAAGACAAC TGAGGGGATATGCTCCTTTG GGTACTCTGATGGTGTCTC
HPRT (NM_000194)	RTHP-3 RTHP-B RTHP-A RTHP-4	CTGCTCCGCCACCGGCTTCC CCTGAGCAGTCAGCCCCGCGC CAATAGGACTCCAGATGTT GATAATTTTACTGGCGATGT
β -actin (NM_001101)	β -actin(as) β -actin(s)	GAGCTGCGTGTGGCTCCCCGAGG CGCAGGATGGCATGGGGGAGGG CATACCCC

mM KCl, 15mM MgCl₂, 1% Triton X-100)의 혼합액 90 μ l을 첨가하고 94°C에서 3분 동안 변성시켰다. PCR은 5 units Taq polymerase를 첨가한 후 94°C에서 30초, 55°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분을 30회 반복하여 증폭시킨 후, 72°C에서 5분 동안 반응시켰다(Perkin Elmer 9600). 2차 PCR은 1차 PCR 생성물 1 μ l와 2차 PCR primer를 사용하여 1차 PCR과 동일하게 수행하였다.

HPRT의 1차 PCR은 RTHP-3와 RTHP-4 primer, 2차 PCR은 RTHP-A와 RTHP-B primer를 사용하였다. β -actin은 β -actin(as)와 β -actin(s) primer를 1차와 2차 PCR에 사용하였다. HPRT와 β -actin의 RT-PCR은 반응 온도를 제외한 모든 조건이 ceruloplasmin과 동일하다. HPRT는 94°C에서 30초, 50°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분을, β -actin은 94°C에서 30초, 59°C에서 30초 그리고 72°C에서 1분을 30회 반복하여 증폭시켰다. β -actin의 2차 PCR은 1차 PCR 산물을 1000배 또는 10000배 희석한 후 1 μ l를 취하여 증폭하였다.

PCR product 및 전사체양의 계산

반응이 끝난 PCR산물은 2%의 agarose gel에서 TAE buffer(8 mM acetate, 2 mM EDTA, 80 mM Tris, pH 8.0)를 사용하여 전기영동하였다. Ceruloplasmin RT-PCR 산물의 확인은 증폭된 유전자 내에 존재하는 KpnI절단자리를 동일 제한효소로 절단시킴으로써 확인하였으며, 클론화하여 염기서열분석을 통하여도 확인하였다. 전개된 gel은 ethidium bromide로 염색하여 Image Analysis System (Vilber Lourmat, France)으로 각 밴드(산물)의 상대적 밀도를 측정하였다.

Ceruloplasmin RT-PCR 산물의 양은, 0.05~5 μ g total RNA를 사용한 각 역전사반응 중 total RNA양의 증가에 상응하게 Image Analyser의 측정값(밀도)으로 나타낸 PCR 산물의 양이 증가되는 반응들만을 모아, 동시에 실시한

hprt, β -actin의 밀도의 값과 비교, 계산한, 즉 상대 정량값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

생물체는 다양한 외부 환경과 여러 종류의 독성물질에 노출되어 이에 적응하거나 방어하기 위해 면역계를 작동시킴으로써 생체 내에서는 다양한 생리적 변화가 일어난다. 대부분 합성된 단백질은 효소활성의 생화학적 측정 그리고 ELISA나 western blot 등의 면역학적 측정이 이들의 역학조사에 많이 사용되며 mRNA 유전자 발현은 Northern blot과 RT-PCR에 의해 측정된다. Ceruloplasmin은 급성반응단백질 및 항산화 단백질로 방사선 등의 reactive oxygen species (ROS)에 의해 mRNA의 발현이 증가하는 대표적인 단백질 중 하나로 본 연구에서는 ceruloplasmin의 RT-PCR에 의한 정량 방법을 확립하고 방사선 및 H₂O₂에 의한 mRNA 유전자 발현을 측정하였다.

Ceruloplasmin 유전자의 전사체로부터 RT-PCR로 증폭된 cDNA의 크기는 본 연구의 1차 PCR산물의 경우 736 bp이고 2차 PCR산물의 경우 707 bp로 예측되었다. 또한 증폭된 cDNA 염기서열(RT-PCR산물) 내에 제한효소 KpnI의 절단자리가 3곳에 존재하여, 이 절단반응으로 인하여 7, 155, 159 및 386 bp 크기의 염기 절편이 생성될 것으로 예측하였다. 증폭된 RT-PCR의 산물을 KpnI 제한효소 처리 후 전기영동한 결과 KpnI 제한 효소에 의한 절단이 정확하게 이루어졌음을 확인하여 707bp ceruloplasmin의 cDNA임을 확인하였다(Fig. 1). 이와 별도로 이 PCR산물을 클론화하여 염기서열 결정을 수행하였으며 역시 동일한 결과를 얻었다(결과 미제시).

U-937 세포를 4×10⁵ cells/ml로 배양을 시작하면 24시간 후 1×10⁶ cells/ml이 되며 방사선(100 rad) 조사된 세포는 6×10⁵ cells/ml, H₂O₂ (50 μ M) 처리된 세포는 2.9×10⁵

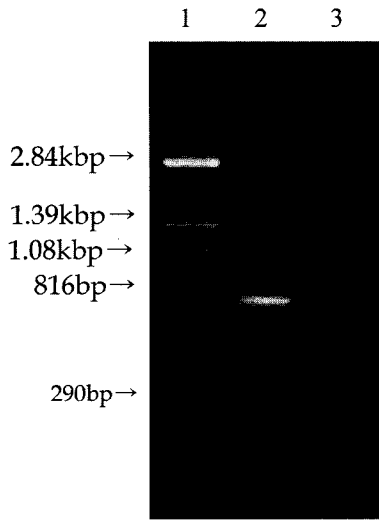


Fig. 1. Electrophoretic analysis on 2% agarose gel for RT-PCR products of ceruloplasmin in U-937 cells. Lane 1, DNA marker; Lane 2, RT-PCR products; Lane 3, KpnI digestion pattern of RT-PCR products.

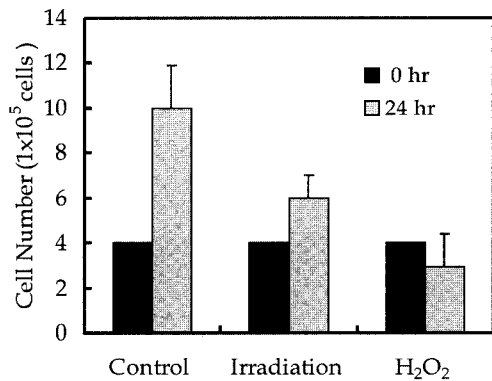


Fig. 2. The survival of U-937 cells exposed to γ -radiation (100 rad) and H₂O₂ (50 μ M).

cells/ml가 되었다(Fig. 2). 일반적으로 방사선 조사된 세포는 손상된 DNA를 복구하기 위하여 G1/G0와 G2/M phase에서 cell arrest가 일어나 세포의 증식이 지연되는 것으로 보고되었다(Kimura *et al.*, 2001; Ristic-Fira *et al.*, 2001). 따라서 본 실험에서 방사선 조사 후 대조군보다 세포수가 적은 것은 cell cycle이 지연되기 때문인 것으로 사료된다.

Actin, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase 및 hypoxanthine phosphoribosyl transferase(HPRT) 등의 소위 house-keeping gene은 외부 환경에 대해 일정한 유전자 발현을 보이므로 Northern blot과 PCR 등에 의한 mRNA 유전자 발현의 정성 분석에서 표준 유전자로 사용된다. 본 연구에서는 ceruloplasmin 유전자의 발현을 살펴보기 위한 표

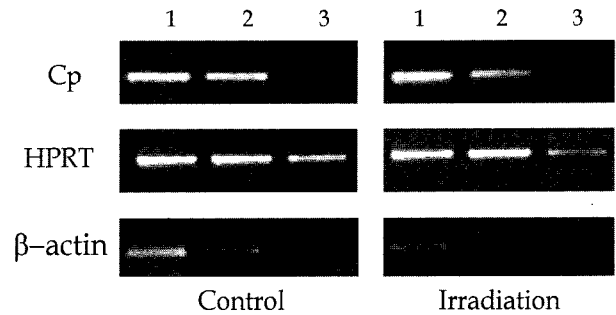


Fig. 3. Ceruloplasmin gene expression in U-937 cells irradiated with 100 rad.

cDNA of each gene was reversed-amplified by RT-PCR using specific primer pairs. Cp, ceruloplasmin; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; Lane 1, 1 μ g total RNA; Lane 2, 0.1 μ g RNA; Lane 3, 0.05 μ g RNA.

준 유전자로 *hprt*와 β -actin을 사용하였다. β -actin의 경우 1차 PCR 산물을 확인할 수 있었으나, ceruloplasmin과 HPRT의 경우 1차 PCR로는 그 산물이 확인되지 않았고 1차 PCR 산물을 사용하여 2차 PCR을 수행하였을 때 mRNA의 증폭된 산물을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 ceruloplasmin, *hprt* 및 β -actin의 mRNA를 1차 PCR로 증폭한 후 다시 그 산물을 1 μ l 사용하여 2차 PCR로 증폭하였고, β -actin의 경우 1차 PCR 산물을 1000배 및 10000배 희석하여 2차 PCR을 수행하였다. 0.05, 0.1, 1.0 및 5.0 μ g, RNA의 농도로 PCR를 수행하여 전기영동한 후 image analysis system으로 밀도를 측정하였다. 각 유전자의 발현은 전기영동상의 밀도가 RNA의 농도에 의존적으로 linear하게 나오는 부분을 선택하여 각 유전자의 발현량을 계산하였다(Fig. 3).

즉 Total RNA 1 μ g을 사용하여 각 유전자의 특이 primer쌍을 사용하여 RT-PCR로 증폭하였을 때 ceruloplasmin RT-PCR산물의 전기영동상 밀도는 2404, *hprt*는 29,164, 그리고 β -actin은 35,249,947로 측정 및 계산되었다. 이 값들 중 ceruloplasmin의 경우는 2차 PCR산물의 측정값이며, *hprt* 및 β -actin의 경우 동일시료의 동일한 RT반응에서 1차 PCR을 수행하고, 이 PCR반응액을 희석하여 수행한 2차 PCR산물의 양을 측정한 것이다(1차 및 2차 PCR산물의 비를 보정하기 위하여 각 희석비를 곱함). 이 값들은 각 유전자의 특이 primer쌍이 동일한 양의 PCR산물을 만든다고만 가정하면, 각 유전자의 전사체의 양을 대변할 수 있는 상대정량값으로 제시될 수 있다. 이 계산하에 ceruloplasmin 전사체의 양은 *hprt* 전사체의 8.2%의 수준이고 β -actin의 0.0068%의 수준으로 계산된다. 즉 U-937 세포에서 ceruloplasmin의 mRNA유전자 발현은 *hprt*, β -actin에 비해

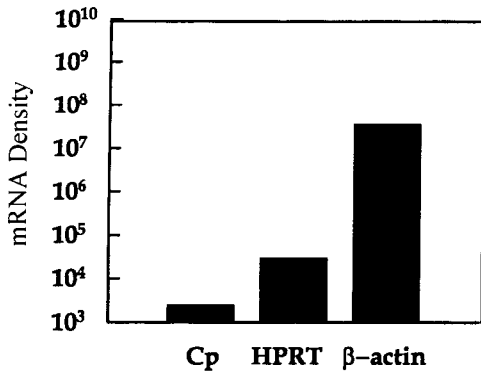


Fig. 4. Densities of RT-PCR products from transcripts of ceruloplasmin (Cp), *hprt* and β -actin mRNA.

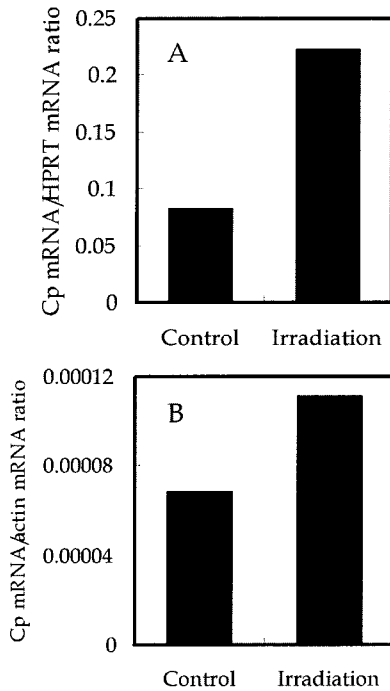


Fig. 5. Comparative quantity of ceruloplasmin mRNA in U-937 cells irradiated with 100rad. cDNA of each gene was reversed-amplified from 1 μ g total RNA. After electrophoresis, each band of RT-PCR products was quantified by densitometry. Comparative quantity of ceruloplasmin mRNA was expressed as ratio of densitometric units of ceruloplasmin/*hprt* (A) and β -actin (B).

상대적으로 매우 낮은 수준임을 보여주었다(Fig. 4).

U-937 cell에 ¹³⁷Cs의 방사선광원으로 100 rad(882 rad/min) 조사하고 24시간 배양 후, Ceruloplasmin의 mRNA 유전자 발현을 *hprt*와 β -actin에 대한 상대적 밀도로 측정하였다. 100 rad 방사선 조사 후 U-937세포에서 Ceruloplasmin 유전자의 발현양(전사체의 양)의 변화는 표준유전자 *hprt*와

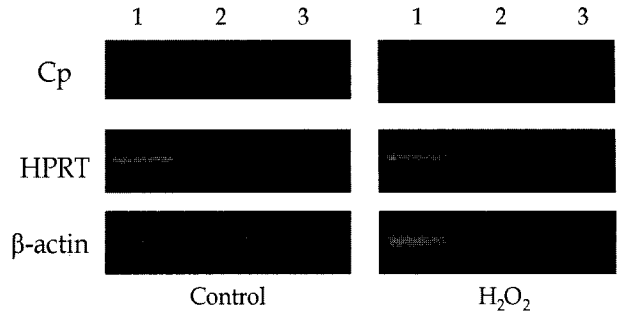


Fig. 6. Ceruloplasmin gene expression in U-937 cells exposed with 50 μ M H₂O₂. cDNA of each gene was reversed-amplified by RT-PCR using specific primer pairs. Cp, ceruloplasmin; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; Lane 1, 5 μ g total RNA; Lane 2, 1 μ g RNA; Lane 3, 0.1 μ g RNA.

비교하여 2.7배, β -actin과 비교하여 1.6배 증가한 것으로 나타났다. 이는 표준유전자 *hprt*, β -actin 측정치와의 비교값으로 방사선 처리 후 ceruloplasmin 유전자의 유의성 있는 발현 증가를 확인한 것이라 하겠다(Fig. 5; $p < 0.05$).

한편, U-937 cell을 H₂O₂로 처리한 실험군을 같은 방법으로 *hprt*, β -actin 측정치와 비교값을 구한 결과는 각각 1.22배, 0.98배로 변화된 것으로 나타나, 유의성을 인정할 수 없었기에, U-937 cell에서 H₂O₂의 처리는 ceruloplasmin 유전자의 발현에 영향을 주지 않는 것으로 판단하였다(Fig. 6, 7).

방사선이 조사된 흰쥐의 급성반응단백질들, 즉 haptoglobin, fibrinogen, α_2 -macroglobulin과 그 mRNA의 농도는 조사 후 3~7일에 최대로 증가하였으나, α_1 -acid glycoprotein 급성반응단백질의 경우 mRNA의 농도 증가율은 단백질 합성율보다 매우 낮게 나타난 것으로 보고되었다(Magic *et al.*, 1995). 또한 0.1 Gy 전신조사 후 24시간에서 흰쥐의 혈액 내 ceruloplasmin의 농도는 약 2배 증가하였고 48~96시간에서 가장 높았다는 보고(Kim *et al.*, 1997)는 본 실험결과에서 보여준 방사선 조사 24시간에서 세포내 ceruloplasmin의 mRNA 유전자 발현은 HPRT와 β -actin에 대하여 약 2.7배와 1.6배 증가된다는 사실과 방사선에 의한 ceruloplasmin의 유전자발현의 면에서 일치되는 결과로 사료된다. 그러나 U-937 세포에서 cytokine에 의한 ceruloplasmin의 단백질 농도와 mRNA 유전자 발현의 증가율과 큰 차이가 있다. Ceruloplasmin mRNA의 농도는 IFN- γ 처리 후 8~16시간에서 가장 높았지만 ceruloplasmin의 농도는 4시간에서 가장 높았고 8시간에서는 다시 초기의 ceruloplasmin의 농도로 회복되었다. 이는 cytokine에 의해 ceruloplasmin 단백질이 합성될 때 억제제가 ceruloplasmin mRNA의 3' untranslated region에 결합하여 translation을 지연시키기 때문인 것으로 보고된 바 있다(Mazmder and Fox, 1999).

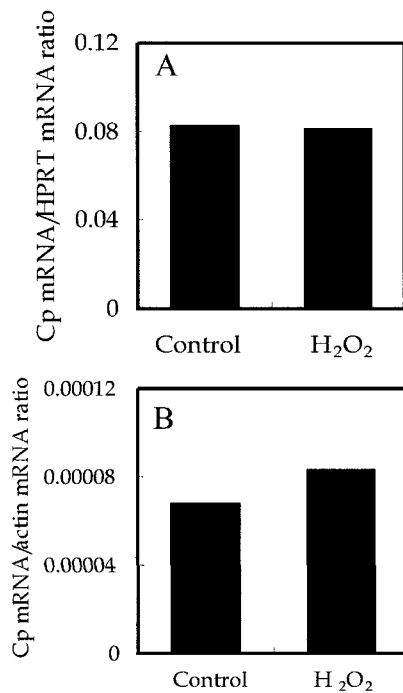


Fig. 7. Comparative quantity of ceruloplasmin mRNA in U-937 cells exposed with 50 μ M H₂O₂. cDNA of each gene was reversed-amplified from 5 μ g total RNA. After electrophoresis, each band of RT-PCR products was quantified by densitometry. Comparative quantity of ceruloplasmin mRNA was expressed as ratio of densitometric units of ceruloplasmin/hprt (A) and β -actin (B).

면역세포에서 항산화 단백질의 유전자 발현은 면역세포의 종류에 따라 차이가 있다. CuZn-SOD의 mRNA는 모든 phagocytic cell에서 거의 유사하지만 monocyte에서 glutathione peroxidase는 neutrophils보다 3배, neutrophil에서 catalase는 monocyte 보다 50배 그리고 Mn-SOD는 neutrophil에서 매우 높다. 면역세포에 H₂O₂를 처리시 catalase의 유전자 발현이 큰 neutrophil에서 H₂O₂에 대한 저항력이 가장 높았다. 따라서 면역세포들은 외부의 자극으로부터 방어하기 위해 서로 다른 항산화 단백질을 지니고 있음을 암시해 주었다(Pietarinen *et al.*, 2000). Ceruloplasmin은 GSH 존재 하에 H₂O₂를 제거하는 peroxidase 활성과 Fenton 반응에 의한 DNA 손상을 억제하는 항산화 기능이 있는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 1998; Kim and Park, 1998). 그러나 본 실험결과에서 ceruloplasmin은 H₂O₂에 대한 mRNA 유전자 발현은 확인할 수 없었고, 이는 U-937 세포에서 H₂O₂와 친화력이 큰 catalase 또는 glutathione peroxidase의 유전자가 발현되기 때문일 것으로 추론할 수 밖에 없을 것이다.

상기의 결과로 U-937 세포는 외부의 독성물질로부터 방어하기 위하여 ceruloplasmin의 mRNA 유전자 발현을 증가시키지만, 이는 γ -irradiation에 의한 reactive oxygen species (ROS)에 한정된 결과이고, 결국 독성물질의 종류에 따라 유전자의 발현양상이 다른 것으로 나타났다. 따라서 여러 종류의 독성물질을 사용한 연구가 진행되어야 하며, 이들에 대한 ceruloplasmin의 유전자 발현 양상을 개별적으로 살펴보아야 할 것이다.

RT-PCR은 적은 양의 유전자를 증폭하여 발현양상을 확인할 수 있는 방법으로 많은 연구에서 사용되었으나 최근에는 DNA chip을 이용하여 짧은 시간에 적은 양의 시료로부터 수많은 유전자의 발현을 분석할 수 있는 microarray방법이 개발되었다. 따라서 ceruloplasmin의 RT-PCR에 의한 mRNA 유전자 발현의 정성적 분석과 함께 DNA chip을 이용한 대용량 유전자분석을 병행하면, ceruloplasmin 외 여러 급성반응단백질에 대한 보다 많은 이해가 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 과기처 국가 원자력 중장기 연구개발사업의 연구비(과제번호 M20104000033-01A0400-01521) 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Agroyannis, B., Dardoufas, C., Vitoratos, N., Tzanatos, H., Kouvaris J., Datopoulou, A., Koutsikos, D., Dalamangas, A. and Papavasiliou, C. (1994): Changes of serum transferrin and ceruloplasmin after radiation therapy in women with cervical or uterine carcinoma. *Clin Exp Obstet Gynecol.*, **21**(1), 4-27.
- Aldred, A.R., Grimes, A., Schreiber, G. and Mercer, F.B. (1987): Rat ceruloplasmin (Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis). *J. Biol. Chem.*, **262**(2), 2875-2878.
- Baumann, H. and Gauldie, J. (1994): The acute phase response. *Immunol. Today*, **15**(2), 74-80.
- Frieden, E. and Hsieh, H.S. (1976): The biological role of ceruloplasmin and its oxidase activity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **74**, 505-529.
- Fleming, R.E., Whitman, I.P. and Gitlin, J.D. (1991): Induction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxia. *Am. J. Physiol.*, **260**, L67-L74.
- Ikawa, M. and Shozen, Y. (1990): Quantification of acute phase proteins in rat serum and in the supernatants of a cultured rat hepatoma cell line and cultured primary hepatocytes by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, **134**, 101-106.
- Osaki, S., Johnson, D.A. and Frieden, E. (1966): The possible

- significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum. *J. Biol. Chem.*, **241**, 2746-2751.
- Kim, I.G., Park, S.Y., Kim, P.C. and Lee, K.S. (1997): Quantification of ceruloplasmin in male rats exposed to γ -radiation by enzyme linked immunosorbent assay. *J. Korean Asso. Radiat. Prot.*, **22**(2), 103-109.
- Kim, I.G., Park, S.Y., Kim, K.C. and Yum, J.J. (1998): Thiol-linked peroxidase activity of ceruloplasmin. *FEBS Lett.*, **431**, 473-475.
- Kim, I.G. and Park, S.Y. (1998): Requirement of intact human ceruloplasmin for the glutathione-linked peroxidase activity. *FEBS Lett.*, **437**, 293-296.
- Kim, R.H., Kwon, I.J. and Park, J. (2001): Ceruloplasmin enhances DNA damage induced by cysteine/iron *in vitro*. *Biochimie.*, **83**(6), 487-95.
- Kim, R.H., Park, J.E. and Park, J.W. (2000): Ceruloplasmin enhances DNA damage induced by hydrogen peroxide *in vitro*. *Free Radic. Res.*, **33**(1), 81-89.
- Kimura, S.H., Ikawa, M., Ito, A., Okabe, M. and Nojima, H. (2001): Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene*, **20**(25), 3290-3300.
- Koj, A. (1996): Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim. Biophys. Acta*, **1317**, 74-94.
- Magic, Z., Matic-Ivanic, S., Savic, J. and Poznanovic, G. (1995): Ionizing radiation-induced expression of the genes associated with the acute response to injury in the rat. *Radiat. Res.*, **143**, 187-193.
- Mazumder, B., Mukhopadhyay, C.K., Prok, A., Cathcart, M.K. and Fox, P.L. (1997): Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN- γ in human monocytic cells. *J. Immunol.*, **159**, 1938-1944.
- Mazumder, B. and Fox, P.L. (1999): Delayed translational silencing of ceruloplasmin transcript in gamma interferon-activated U-937 monocytic cells: role of the 3' untranslated region. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(10), 6898-6905.
- Onizuka, K., Migita, S., Yamada, H. and Matsumoto, I. (1999): Serum protein fractions in patients with laryngeal cancer undergoing radiation therapy. Possibility as a prognostic factor. *Fukuoka Igaku Zasshi.*, **90**(2), 46-58.
- Ortel, T., Takahashi, L. and Putnam, F.W. (1984): Structural model of human ceruloplasmin based on internal triplication, hydrophilic/hydrophobic character, and secondary structure of domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4761-4765.
- Pan, Y., Katula, K. and Failla, M.L. (1996): Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1307**, 223-238.
- Park, Y.S., Suzuki, K., Mumby, S., Taniguchi, N. and Gutteridge, J.M. (2000): Antioxidant binding of ceruloplasmin to myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and immunoreactive properties of ceruloplasmin remain intact. *Free Radic. Res.*, **330**(3), 261-265.
- Pietarinen, P., Lakari, E., Raivio, K.O. and Kinnula, V.L. (2000): Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells.
- Ristic-Fira, A., Nikolic, D., Petrovic, I., Ruzdijic, S., Raffaele, L., Sabini, M.G., Cirrone, G., Farruggia, G., Masotti, L. and Kanazir, D.T. (2001): The late effects of proton irradiation on cell growth, cell cycle arrest and apoptosis in a human melanoma cell line. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **20**(1), 135-143.
- Shiono, Y.S., Wakusawa, H., Hayashi, H., Takikawa, T., Yano, M., Okada, T., Abuchi, H., Kono, S. and Miyajima, H. (2001): Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **96**(11), 3417-3451.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer*, **17**, 565-577.
- Thomas, T., Macpherson, A. and Rogers, P. (1995): Ceruloplasmin gene expression in the rat uterus. *Biochim. Biophys. Acta*, **1261**, 77-82.