

마우스 Collectin-Placenta 1 유전자의 발현 연구

김근호¹, 김연옥^{1,2*}

¹선문대학교 대학원 생명공학과, ²선문대학교 제약생명공학과

Expression Study of The Mouse Collectin-Placenta 1 Gene

Geun Ho Kim¹, Youn Uck Kim^{1,2*}

¹Division of Life Science and Biochemical Engineering, Sun Moon University

²Division of Pharmaceutical Engineering and Biotechnology, Sun Moon University

요약 포유류에 존재하는 Collectin-Placenta 1 (CL-P1)을 포함한 여러 종류의 scavenger 수용체는 주로 내피 세포, 대식 세포 및 평활근 세포 표면에 발현되는 분자이다. 이들 분자는 산화 된 저밀도 지질 단백질 (oxLDL)에 결합하여 처리 할 수 있는 세포 표면 당 단백질이다. 이들 분자 중 케르세틴이 CL-P1 활성화에 어떤 영향을 미치는가를 확인하였다. 케르세틴은 산화 반응을 담당하는 자유 라디칼의 제거제 역할을 하여 산화를 중지시키는 항산화제로 알려져 있다. 본 논문에서는 마우스 CL-P1 유전자 promoter 부분의 전사 시작 점부터 -500 번째 염기까지의 단편을 DNA 중합효소를 이용하여 클로닝 하였다. 그 후에 대식세포 계열인 RAW264.7 및 섬유아세포계열의 NIH3T3 세포에 도입하여 케르세틴이 CL-P1 유전자 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구를 하였다. 이 부위에는 세포주기 조절 인자인 E2F 결합부위를 비롯해서 여러 종류의 전사 인자가 결합하는 염기서열이 다수 위치하고 있다. 이러한 500염기 단편을 pGL4.10 기본 벡터 및 프로모터에 연결시킨 후 세포에 도입시켰다. 그리고 배양 중에 케르세틴을 처리하여 유전자 발현 양을 형광 색소 발현기법으로 측정하였다. 그 결과 유전자 발현이 시작되는 앞쪽 부분의 -250에서 -350사이의 염기들이 CL-P1 단백질을 만드는데 중요하다는 것을 확인하였다. 그 중에서도 E2F결합 부위가 결정적인 것 이라는 것을 DNA 돌연변이 실험을 통해 확인 하였다. 또한 부착 세포인 RAW264.7 배양액에 케르세틴을 첨가 한 결과, 배양용기 표면에서 탈락하는 현상을 확인하였다. 즉 발현된 CL-P1단백질이 케르세틴에 의해 세포 표면의 부착 분자에도 영향을 주는 것을 확인하였다.

Abstract Several types of scavenger receptors, including the Collectin-Placenta 1 (CL-P1) receptor that is present in mammals, are molecules that are expressed on the surfaces of endothelial cells, macrophages and smooth muscle cells. These molecules are cell surface glycoproteins that can be conjugated to oxidized low density lipoprotein (oxLDL). Among these molecules, the effect of quercetin on CL-P1 activation has been confirmed. Quercetin is known as an antioxidant that stops oxidation because it acts to remove free radicals that are responsible for the oxidation reaction. In this study, fragments from the transcription start site of the mouse CL-P1 gene promoter to the -500th base were cloned using DNA polymerase. These fragments were then introduced into macrophage like RAW264.7 cells and fibroblast-like NIH3T3 cells to study the effect of quercetin on the CL-P1 gene expression. As a result, we found that bases ranging from -250 to -350 in the anterior part where gene expression starts are important for producing CL-P1 protein. Among them, the DNA mutation experiments we performed confirmed that the E2F binding sites are critical for producing the CL-P1 protein? In addition, when quercetin was added to the RAW264.7 culture medium, which was a culture of adherent cells, observed the phenomenon of the cells falling off from the surface of the culture container.

Keywords : Scavenger Receptor, Collectin Placenta 1, Quercetin, RAW264.7, NIH3T3, Promoter

*Corresponding Author : Youn Uck Kim(Sun Moon Univ.)

email: kimyu@sunmoon.ac.kr

Received July 2, 2019

Accepted August 2, 2019

Revised July 31, 2019

Published August 31, 2019

1. 서론

Scavenger 수용체는 자기 자신의 분자 중에 노후화 되었거나 변형되어 쓸모가 없는 분자를 제거하는 일명 쓰레기 수용체로 알려져 있다[1, 2, 3]. 최근에는 허혈성 심장질환 및 당뇨병환자의 심장외막조직에서의 Scavenger 수용체에 대한 연구 등이 이루어져 있다[4]. CL-P1 유전자는 Scavenger 수용체의 일종으로 파괴된 세균의 세포벽 성분 등을 혈액으로부터 제거하는 역할뿐만 아니라 산화된 저밀도 단백지질과 결합하는 단백질을 만드는 등의 다양한 기능을 하는 유전자로 알려져 있다[5, 6]. 주로 혈관 내피세포, 대식세포, 민 근육세포에서 발현되어 처리해야 할 쓰레기 단백지질을 세포가 식음하게끔 하여 처리하는 역할을 하는 유전자로 밝혀져 있지만, 그 외에도 다른 기능이 있을 것이라 추측이 많다.

CL-P1 분자량은 140kDa로 알려져 있으며, 구조적으로 몇 가지 특징이 알려져 있다. 즉, 콜라겐 유사 구조인 콜렉틴 (CL)과 탄수화물 인식 구조인 (CRD) 로 구분되고[7, 8], CL 부분의 역할은 만난 (Mannan)과 결합하는 단백질 복합체로 알려져 있다[7]. 만난 구조는 동물에는 존재하지 않고 주로 세균이나 효모의 외곽 구조를 이루는 물질이다. 즉, CL-P1이라는 것은 세균이나 효모 등과 결합해서 파괴할 수 있는 동물 세포에 존재하는 막 수용체 단백질이라 할 수 있다.

콜렉틴은 다양한 그룹으로 분류된다. MBP-A 및 MBP-C를 포함하는 만난 결합 단백질 (MBP) 그룹[7], 계면 활성제 단백질 A (SP-A) 그룹[9], 계면 활성제 단백질 D (SP-D) 그룹[10], Collectin Liver 1 (CL-L1) 그룹[11] 및 Collectin Kidney 1 (CL-K1) 그룹[12] 등이 있다.

이들 종류 중에 Ohtani 등에 의해 보고된 막 유형 CL-P1 콜렉틴 분자의 cDNA는 태반 RNA로부터 처음 합성 되었으며 주로 혈관 내피 세포에 존재하는 것으로 보고되었다[5]. CL-P1의 분자구조에서 세포질에 위치하는 N 말단은 핵에 신호를 전달하는 역할을 하고, 트랜스 멤브레인 영역인 α 나선형 코일 영역, 콜라겐 -유사 영역 및 C-말단 탄수화물 인식 도메인 (CRD) 으로 구성 되어 있다. 또한 인간 CL-P1을 안정적으로 발현하는 Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포와 인간 혈관 내피 세포(Human Umbilical Vascular Endothelial Cells, HUVECs) 에 CL-P1을 발현 시켜서 효모 유래의 자이모산 (Zymosan) 에 대해 결합 및 섭취를 보고하였다[13]. 이외의 여러 연구 결과는 패혈증과 균혈증에 원

인이 되는 혈관 내의 여러 가지 미생물에 대한 식음 및 파괴에 직접적으로 관련이 있는 것으로 확인되고 있다 [14].

그러나 인간 및 마우스의 CL-P1 유전자의 전사 조절 또는 그 발현을 규제하는 조절 기전에 대한 연구는 없었다. 본 논문에서는 이전에 인간 CL-P1 유전자의 전사 조절 기전에 대한 연구에 이어서, 마우스에서의 전사조절 기전에 대해 연구를 진행하여 인간의 경우와 차별 점에 대해 연구하기로 하였다. 인간 CL-P1을 인간혈관내피세포에 발현 시켜 연구한 결과로는, 3 개의 Sp1 전사 인자의 결합 부위 (-98 / -90, -68 / -56, -28 / -20)가 인간의 CL-P1 활성화에 필수적이라는 것을 확인 하였다[15].

본 논문에서는 CL-P1의 기본적인 역할로 알려진 산화된 저밀도의 단백지질에 관여하는 점에 착안하여, 세포 내 산화 환원에 관여하고 있는 것으로 알려진 케르세틴 (Quercetin)을 이용하여 연구를 진행하였다. 케르세틴은 산화적 연쇄 반응을 일으키는 자유 라디칼 (free radical)의 제거제로 작용하여 다른 분자의 산화를 억제하는 항산화제로 분류된다[16]. 또한 여러 종류의 단백질을 활성화 시키거나 활성을 억제하는 것으로도 알려져 있다. 즉, 단백질 인산화 효소 (Protein Kinase)의 활성을 억제뿐만 아니라 에스트로젠 수용체를 활성화 시키는 것으로도 알려져 있다[17]. 케르세틴은 플라보노이드계 폴리 페놀로 다양한 유도체가 존재한다[18]. 최근에는 케르세틴류의 다양한 활성화에 기반하여 항암제로서의 연구가 활발히 진행되고 있다[19, 20].

우리는 이 실험을 하기 위해서 CL-P1 유전자의 상류 부분인 프로모터 부분 500염기를 DNA중합효소를 이용하여 분리하였다. 또한 분리된 500염기 DNA 조각의 앞과 뒤 쪽의 일부 염기를 제거 및 변이를 시켜서 루시페라제 발현 벡터인 pGL4.10 DNA에 연결하였다. 제작된 복수의 프로모터 중에 어느 부분이 단백질 발현에 영향을 주는가를 조사하기 위하여 RAW264.7 세포와 NIH3T3세포에 DNA를 도입시켜서 형광 색소 발현기법으로 발현된 단백질을 간접적으로 측정 하였다.

그 결과, 유전자 앞부분으로부터 약 -250에서 -350 사이 염기 부분이 단백질 만드는데 가장 중요하다는 것을 확인하였다. 또한 이 유전자는 케르세틴에 자극 받으면 평소보다 2-3배 정도 단백질을 많이 생산한다는 결론을 얻었다. 또한 E2F 단백질 결합 부위의 염기를 변화 시키면 발현 양이 최저로 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 즉 세포주기 조절 인자인 E2F가 발현에 중요한 부위인 것을 확인 할 수 있었다.

또한 케르세틴이 RAW264.7 세포배양에 영향을 주는 지를 간단한 세포배양으로 확인하였다. 세포 배지에 첨가 되는 혈청을 1시간 정도 제거 후에 케르세틴을 배지에 첨가 한 후 다시 1시간 배양 하여 관찰하면 배양용기에 부착되었던 세포가 탈락하는 현상을 확인 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시약 및 세포 배양

모든 시약은 달리 명시하지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입한 것을 사용 하였다. RAW264.7세포와 NIH3T3세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입 하였다. 세포를 Dulbecco's modified Eagle's 배지 (DMEM, GIBCO, Grand Island, NY, USA)와 10 % FBS가 보충 된 MEM (GIBCO)에서 각각 배양 하였다. 실험용 세포는 37 °C, 5 % CO₂ 환경의 가습 챔버에서 배양 하였다.

2.2 프로모터 DNA 제작 및 PCR 반응

DNA중합효소를 이용하여 마우스 CL-P1 유전자의 프로모터에 해당되는 상류 -500에서 전사가 시작되는 +1까지의 500 염기부분을 다음의 프라이머 들을 이용하여 마우스 게놈 라이브러리 용액에서 분리 하였다. 즉, DNA 중합효소 연쇄 반응 (PCR)은 마우스 전 혈청으로부터 제작된 게놈DNA를 사용하였고, 이때 센스 (forward) 와 안티센스 (backward) 프라이머에는 각각 *EcoRV* 와 *KpnI*의 제한효소 사이트를 넣어서 재조합 DNA시에 편리하도록 제작하였다.

CL-P1-*EcoRV* (센스): 5'- CGG ATA TCA AGG GAA GGT TCG CGC GGG AGG CAC CTC CGT -3'

CL-P1-*KpnI* (안티 센스): 5'- ATG GTA CCA TGG TGA CTT CGG ATT CTG GCC ACT CGG -3'

PCR반응은 처음 5분간 DNA를 변성시키기 위해 95°C 에서 5분간 가열 하였다. 가열 변성된 DNA를 94°C에서 30초 다시 변성 시킨 후, 게놈 DNA와 제작 된 프라이머를 결합 시키기 위해 65°C 1분 가온 하고, DNA중합 효소를 반응시켜 72°C에서 1분간 합성연장 시켰다. 이 반응을 30회 반복하여 프로모터 부분을 제작 하였다. 이때 사용된 기계는 PCR thermal cycler model 480 (Takara Shuzo, Tokyo, Japan)을 사용하

였다. PCR에 의해 생성된 DNA를 벡터 DNA를 연결하기 위해 각각의 DNA를 제한효소 *KpnI*과 *EcoRV* 반응 시킨 후, 한천 전기 영동기 (agaros gel)에 전개시켜서 목적하는 DNA 부분을 잘라내서 정제하였다. 그 후 두 DNA를 연결효소 (ligase)로 연결하여 프로모터 활성을 측정하였다. 이때 사용된 정제 키트는 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다. 완성된 DNA의 염기배열을 확인하기 위해 DNA sequencing을 통해 확인하였다. 그리고 앞뒤의 염기를 제거한 짧은 프로모터 제작을 위해 다음과 같은 프라이머를 제작하여 상기와 같은 방법으로 재조합 DNA를 제작하였다.

mP1A (reverse), 5'- AT GGT ACC CGT TTG GGG AAG GGC CCA CCT TAC CCC CCG CC-3',

mP1A1 (reverse), 5'- AT GGT ACC GAC CCC AGC AGC AGC GGC ACC TTA GGT GCT CG-3',

mP1A2 (reverse), 5'- AT GGT ACC GGG AAA AAG AGA GAG CCC GCG CGA GTG GGG CC-3',

mP1B (forward), 5'-AC GAT ATC GGT GAC CGT GGG GAC GCA CCG CCG GCC GG -3':

mP1C (reverse), 5'-AC GAT ATC CCC GGC CGA GCG AGC GGC CGC GCC CAC GCC CCT C-3',

mP1C (forward), 5'-AC GAT ATC TCT CCT GCG CGC CCT GGC CCC ACT CGC GCG G-3'

밑줄 친 부분은 제한효소가 작용하는 염기배열을 나타 내고 있다.

2.3 재조합 DNA 제작

상기의 정제된 프로모터 DNA는 동물세포 발현 벡터 인 pGL4.10 (Promega)의 *KpnI*과 *EcoRV*부위에 연결 하였다. pGL4.10 벡터는 반딧불에서 채취한 발광효소 (luciferase) 유전자가 들어 있어서 프로모터 부분이 제대로 작동 된다면 발광효소 단백질이 생산되고, 측정 시 발광효소가 작용할 수 있는 기질을 넣음으로 해서 형광 빛을 발한다. 그 빛의 강도를 측정함으로써 프로모터 활성여부를 측정하는 것이다.

이때 제작된 모든 DNA는 QIAprep Spin Maxprep Kit 를 통해 정제하여 독소성분인 LPS등을 제거하여 동물세포에 도입 하였다.

2.4 재조합 DNA 도입 및 케르세틴 처리

프로모터 DNA를 도입시키기 위해 마우스 섬유아세포와 대식세포를 도입 하루 전에 배양한 후, 96 well plate에 8×10^3 되도록 하여 다시 24시간을 배양한다. 세포가 96 well plate 바닥에 80-90% 되게 자라면 DNA를 도입 시킨다. 이때 도입 DNA는 프로모터 재조합 DNA 0.1 μ g 과 control DNA인 pGL4.74 5ng을 동시에 처리하는데, pGL4.74는 해조류 발광효소 유전자가 들어있는 DNA로 프로모터 활성에 관계없이 일정한 활성을 나타내야 한다, 즉 DNA가 일정량 도입이 되었는지를 확인하는 것이다 (*renilla luciferase*, Promega). DNA의 세포 내 도입 시에는 Lipofectamine LTX (Invitrogen) 사용하였고, 도입 5-6시간 후에는 새 배양액으로 교환하여 LTX로 인한 독소 성분을 제거하여 24시간 배양을 계속하였다. 그 후에 10 μ M의 케르세틴을 처리한 후 1시간 배양을 계속하였다. 배양이 끝난 세포는 생리식염수 (PBS)로 세척 후에 발광효소 (luciferase)에 의한 활성을 luminometer로 측정하였다.

2.5 프로모터 활성 분석

프로모터 활성을 측정하기 위해 세포 용해용액과 반딧불 형광효소 기질이 혼합된 용액을 100 μ l를 첨가하여 10분 경과 후에 측정기계 (luminometer, Promega)를 이용해서 발광을 측정한다[21]. 그리고 다시 같은 용액에 반응 정지용액과 control인 해조류 발광효소 용액 기질 (*hRluc/TK*)을 50 μ l 첨가해서 2분 방치 후에 발광을 측정하여 세포에 도입된 DNA 양을 측정한다[22]. 이 두 개의 측정값 (반딧불효소측정값 / 해조류효소측정값)을 가지고 프로모터 활성을 결정하였다. 이러한 실험의 측정치는 4-5반응을 동시에 시행한 후에 그 평균치를 활성 값으로 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 대식세포 (RAW264.7 cell)에 있어서의 프로모터 활성 및 활성 촉진 인자

동물에서 면역반응의 최 첨병 중에 해당하는 대식세포에서의 활성을 측정하였다. 대식세포를 대상으로 한 이유 중에 하나는 대식세포는 체외에서 침입하는 세균이나 해로운 물질이 들어올 경우 식음작용이 매우 왕성하여 CL-P1유전자 활성에 영향을 주지 않을까 하는 생각에서 실시하였다. 사용한 RAW264.7 세포는 거의 모든 기능

이 순수한 대식세포와 같거나 유사하기 때문에 순수하게 동물체내에서 분리한 대식세포 대신 사용하였다.

그림 1a에서는 도입된 DNA의 프로모터 영역을 나타내고 있다. 그 결과 그림 1b 회색 그래프에서 보여주듯이 500염기쌍으로 이루어진 mP1 보다는 150 염기쌍이 줄어든 mP1A에서 활성이 좋은 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 mP1보다 100염기가 줄어든 mP1A1에서는 다시 어느 정도 감소하는 현상을 확인 할 수 있었다. 그 후 100염기가 짧아진 (-150 / +1)에서는 전사활성이 거의 제로에 가까운 정도인 결과를 확인하였다.

이 결과는 유전자 프로모터 부분은 활성을 높이는 부분과 억제하는 부분 등이 존재하는데 이 부분들에 제어 인자와 활성인자 등이 (일명 전사인자) 결합하여 활성에 + 혹은 - 영향을 준다는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 가장 두드러진 것은 -350에서 -150부분의 영역에 활성에 중요한 부위가 존재한다는 것을 확인 할 수 있었다. 그림 1b의 mP1A2와 mP1B의 회색 그래프에서 보여주듯이 이 부위가 존재해야 만이 활성이 높게 나타난다는 것은 단백질 발현에 필요하다는 결론이다.

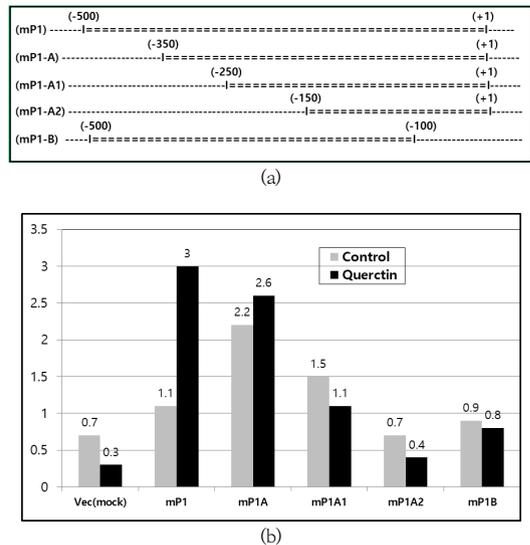


Fig. 1. Mouse CL-P1 promoter. (a) The promoter region from +1 base to -500 base upstream was divided into five parts to analyze the part important for the activity of the promoter. (b) The gray graph shows the activity of the control promoter and the black graph shows the activity of quercetin treated for 1 hour.

이번에는 CL-P1유전자 발현에 도움이 되는 외부자극 인자를 조사하기 위해 동시에 케르세틴을 처리하여 실험

한 결과가 그림 1b의 검은색 그래프이다. 많은 실험 가능한 물질을 조사한 결과 그 중에 유일하게 케르세틴이 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 케르세틴은 항산화 물질로 홍당무나 양파 맨 위 껍질 층에 많이 존재한다. 그림 1b에서 케르세틴의 자극으로 mP1에서는 거의 3배의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것의 -500과 -250 사이에 케르세틴 반응 부위가 존재한다는 것을 확인시켜주는 것으로, 그러나 케르세틴 자극에 의한 활성화는 -250에서 +1까지 영역에서는 작용하지 않는 것으로 판단되었다 (그림 1b의 mP1A1, mP1A2, mP1B).

3.2 배지의 포함되어 있는 혈청 성분이 CL-P1 프로모터에 미치는 영향

그림 1에서 보여주는 결과는 세포배양 시에 일반적으로 송아지 혈청 성분이 포함된 상태에서의 결과를 나타낸다. 그러나 혈청성분에는 프로모터의 활성화에 영향을 주는 수많은 종류의 물질이 포함되어 있다. 그림 2에서는 혈청성분이 제거된 상태에서 프로모터의 활성화와 케르세틴의 영향을 조사하기 위해 우선 세포를 혈청이 포함된 배지에서 배양한 후, 혈청성분을 제거하기 위하여 무혈청 배지로 교체하여 1시간 배양 후에 케르세틴을 첨가한 상태에서의 1시간 배양후에 CL-P1 활성을 측정하였다.

여기서 우리는 -350에서 +1까지의 영역인 mP1A의 프로모터에서는 무혈청 상태에서 케르세틴에 의해 약 1.5배의 활성이 증가한다는 새로운 사실을 알게 되었다. 여기서 의미하는 것은 -350과 -250 염기사이 케르세틴이 반응한다는 것을 의미한다.

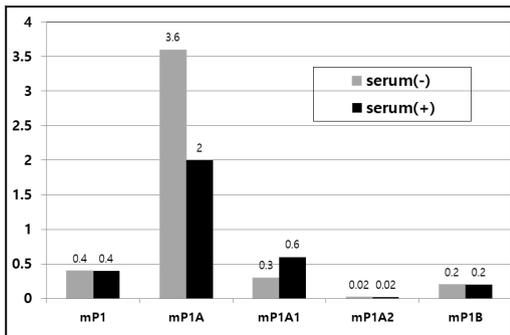


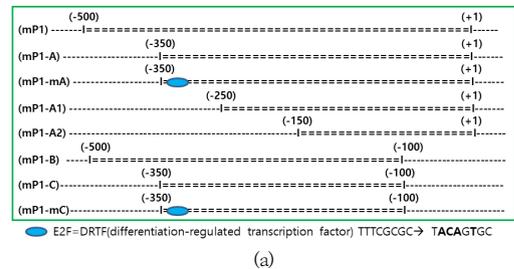
Fig. 2. Quercetin stimulation with and without serum components.

Cells were cultured in serum-free medium for 1 hour and quercetin was added for 1 hour to measure CL-P1 activity (grey bar). The black graph was treated with quercetin after one hour incubation with fresh serum medium.

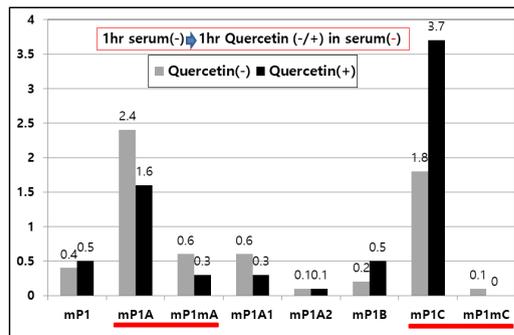
3.3 무혈청 배지에서 케르세틴이 CL-P1 프로모터 활성화에 미치는 영향

그림 2에서 보이듯이 무혈청 상태에서의 케르세틴의 가장 많은 영향을 받는 부위를 조사하기 위하여 새로운 프로모터인 mP1C 및 E2F결합부위를 돌연변이 시킨 mP1mC를 제작하였다. 또한 mP1A의 E2F 사이트를 돌연변이 시킨 mP1mA를 제작하여 각각의 두 쌍으로 구성된 프로모터의 활성을 조사해 보았다 (그림 3b의 밑줄 친 부분).

그림 3a에서 보여주는 바와 같이 무혈청 환경에서 E2F의 염기배열인 TTTCGCGC를 TACAGTGC로 변화시킨 mP1mA와 mP1mC에서 급격하게 활성이 없어지는 것을 그림 3b에서 확인하였다. 즉, 케르세틴에 직접적으로 반응하는 부위가 E2F인 것으로 확인되었다. 여기서 추측할 수 있는 것은 -500에서 -350까지와 -100에서 +1까지는 또 다른 전사 제어 조절인자가 작용하는 것이 아닐까 하는 것이 mP1과 mP1B의 활성화에서 보여주고 있다.



(a)



(b)

Fig. 3. Assay of transcriptional activity by using mutated promoters.

(a) The E2F portion with the changed base was marked with an ellipse. (b) The black bars were incubated in serum-free medium for 1 hour to remove residual serum components, followed by addition of quercetin and incubation for 1 hour. The gray bars did not add quercetin.

여기서의 결과는 -500에서 -350까지의 영역과 -100에서 +1영역을 포함한 프로모터에서는 혈청성분에 의해 전사활성의 효과를 보이지만 (Fig. 1b), 이 부위가 제거된 상태에서는 케르세틴이 결정적으로 E2F부위에 작용하여 전사활성을 높이는 것으로 보여주고 있다 (Fig. 2b). 이상의 데이터에서 혈청 성분과 케르세틴의 작용부위를 어느 정도 확인할 수 있지만 정확한 부분에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

3.4 섬유아세포 (NIH 3T3 세포)에 있어서의 프로모터 활성 및 활성 촉진 인자

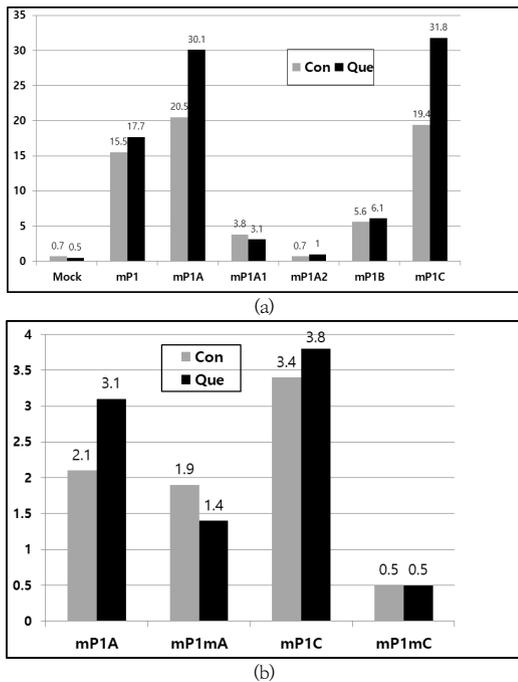


Fig. 4. Measurement of promoters activity in NIH3T3 cells in medium where serum is present. (a) Promoter activity was measured by treating quercetin for 1 hour. (b) Indicating the promoter activity of mutant mP1mA and mP1mC. The black bars are quercetin treated in serum containing medium.

대식세포와 같은 방법으로 혈청성분이 포함된 배지에서 배양한 마우스 섬유 아세포 (fibroblast cell)인 NIH3T3에서 활성을 조사하였다. Fig.4a 에서 보이는 바와 같이 DNA 도입 후에 활성 패턴은 Fig 1b와 유사하였다. 여기서도 볼 수 있는 것은 E2F사이트가 제거된 상태

인 mP1A와 mP1A2에서 케르세틴 유무에 관계없이 활성이 저하되는 현상을 보여주고 있다. E2F를 변이시켜 활성을 측정된 그림 4B에서는 이 사이트가 활성에 중요한 부위인 것을 확인해주고 있다 (Fig. 4b). 이것 역시 예측할 수 있는 것은 -500과 -350 사이에 결합하는 미지의 제어인자가 존재한다고 추측할 수 있다.

3.5 케르세틴이 RAW264.7 cell 배양에 미치는 영향

케르세틴이 CL-P1유전자 활성에 많은 영향을 준다는 것을 확인하였고, 이 성분에 세포 전체에는 어떤 영향을 주는지 가장 간단한 실험을 통해 알아보기로 했다 (Fig. 5). 대식세포는 전형적인 부착세포로 배양용기에서 배양할 경우 바닥에 부착하면서 자라는 것이 특징이다.

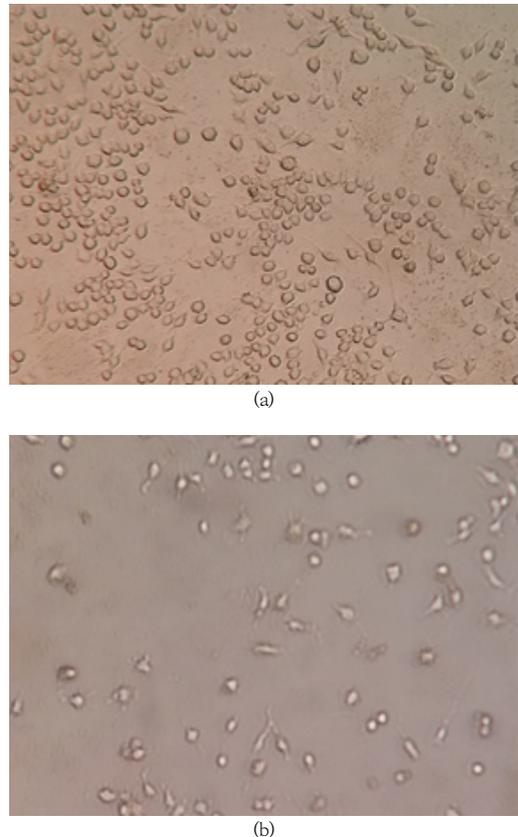


Fig. 5. Morphological change of RAW264.7 under quercetin stimulation. (a) Culture in serum-present medium. (b) After incubation for 1 hour in serum-free medium, quercetin was added and incubated for 1 hour.

일반적인 세포 배양 시에는 배양액에 혈청이 최종 10% 되도록 첨가하는데, 이 혈청에는 많은 종류의 유전자를 활성화 시키는 물질이 존재한다. 고로 이번 실험에서는 혈청 존재 하에서 배양 중에 무혈청 배지로 교체하여 1시간 배양 후 케르세틴을 최종 10 uM 농도 되게 배지에 첨가하여 다시 1시간 배양 하였다. 그 후에 세포배양 플라스크를 생리식염수로 세정한 후 각 세포형태를 현미경으로 관찰하였다. Fig. 5b 에서의 결과는 케르세틴이 대식세포 배양액에 첨가 되었을 때 부착세포의 50%이상 배양용기에서 탈락하는 현상을 나타내었다. 세포가 배양용기에 부착하기 위해서는 세포 부착인자가 발현 되어야 하는데 케르세틴이 부착인자 발현에 영향을 주는 것으로 추측 된다.

이러한 현상이 CL-P1 유전자와 연관성이 있는지는 더 많은 실험과 연구를 통해서 확인해야 할 것이다.

4. 결론

유전자 프로모터 부분은 활성을 높이는 부분과 억제하는 부분 등이 존재하는데 이 부분들에 제어 인자와 활성 인자 등이 (일명 전사인자) 결합하여 활성에 + 혹은 - 영향을 준다. 본 실험에서 목표로 했던 프로모터의 활성은 적어도 -350에서 -250 사이에 존재하는 E2F사이트가 결정적이라는 것을 확인할 수 있었다. 또한 케르세틴은 무혈청 배지에서 E2F 사이트가 존재하는 프로모터에서 활성을 증가시키는 enhancer로 작용한다는 것을 확인하였다. 또한 그림 3에서와 같이 -500에서 -350 사이와 -100에서 +1사이의 염기쌍에는 제어 인자가 작동한다는 추측이다. 즉, mP1에서 -500에서 -350 영역을 제거한 mP1A 과 mP1A에서 -100에서 +1영역을 제거한 mP1C에서는 활성이 증가하는 데이터가 이를 증명 있다. 그러나 -500에서 -350영역 부분에 어떤 억제인자가 작용하는지는 많은 인자가 존재하므로 확인하기가 쉽지 않았다. 여기서 확실히 알 수 있는 것은 -350에서 -250 영역 사이에 CL-P1활성을 촉진하는 인자가 결합한다는 것이다. 케르세틴의 영향부위도 역시 -350에서 -250 사이의 영역에 존재하는 E2F라는 것이다. 케르세틴 처리에 -100에서 +1사이의 영역이 존재한다면 케르세틴의 활동이 작용할 수 없다는 결론이다. 이상의 데이터에서 혈청성분과 케르세틴의 작용부위를 어느 정도 확인 할 수 있지만 정확한 부분에 대해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

References

- [1] M. S. Brown, S. K. Basu, J. R. Falck, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, "The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: Specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively- charged LDL by macrophages" *J. Supramol. Struct.*, Vol.13, No.1, pp.67-81, 1980.
DOI: <http://doi.org/10.1002/jss.400130107>
- [2] J. L. Goldstein, Y. K. Ho, S. K. Basu, M. S. Brown, "Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.76, No.1, pp.333-337, Jan. 1979.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333>
- [3] T. Kodama, P. Reddy, C. Kishimoto, M. Krieger, "Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.85, No.23, pp.9238-9242, Dec. 1988.
DOI: 10.1073/pnas.85.23.9238
- [4] C. Santiago-Fernández, L. M. Pérez-Belmonte, M. Millán-Gómez, I. Moreno-Santos, F. Carrasco-Chinchilla, "Overexpression of scavenger receptor and infiltration of macrophage in epicardial adipose tissue of patients with ischemic heart disease and diabetes", *J. Transl. Med.*, Vol.20, No.17, pp.95-99, Mar. 2019.
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12967-019-1842-2>
- [5] K. Ohtani, Y. Suzuki, S. Eda, T. Kawai, T. Kase, H. "The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, Vol.262, No.47, pp.44222-44228, Nov. 2001.
DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M103942200>
- [6] F. Bogie, J. Mailloux, E. Wouters, W. Jorissen, E. Grajchen, "Scavenger receptor collectin placenta 1 is a novel receptor involved in the uptake of myelin by phagocytes", *Sci Rep*, Vol.20, No.7, pp.44794-44799, Mar. 2017.
DOI: <http://doi.org/10.1038/srep44794>
- [7] K. Drickamer, "Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins", *J. Biol. Chem.*, Vol.263, No.20, pp.9557-9560, Jul. 1988.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3290208/>
- [8] K. Nakamura, H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokunaga, T. Nakamura, "Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.280, No.4, pp.1028-1035, Feb. 2001.
DOI: <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4210>
- [9] R. T. White, D. Damm, J. Miller, K. Spratt, J. Schilling, "Isolation and characterization of the human pulmonary surfactant apoprotein gene" *Nature*, Vol.317, No.6035, pp.361-363, Sep. 1985.
DOI: <http://doi.org/10.1038/317361a0>

[10] A. Persson, D. Chang, K. Rust, M. Moxley, W. Longmore, "Purification and biochemical characterization of CP4 (SP-D), a collagenous surfactant-associated protein", *Biochemistry*, Vol.28, No.15, pp.6361-6367, Jul. 1989.
DOI: <http://doi.org/10.1021/bi00441a031>

[11] K. Ohtani, Y. Suzuki, S. Eda, T. Kawai, T. Kase, "Molecular cloning of a novel human collectin from liver (CL-L1)", *J. Biol. Chem.*, Vol.274, No.19, pp.13681-13689, May 1999.
DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13681>

[12] H. Keshi, T. Sakamoto, T. Kawai, K. Ohtani, T. Katoh, "Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1", *Microbiol Immunol*, Vol.50, No.12, pp.1001-1013, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03868.x>

[13] S. Jang, K. Ohtani, A. Fukuoh, T. Yoshizaki, M. Fukuda, "Scavenger receptor collectin placenta 1 (CL-P1) predominantly mediates zymosan phagocytosis by human vascular endothelial cells", *J. Biol. Chem.*, Vol.284, No.6, pp.3956-3965, Feb. 2009.
DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M807477200>

[14] N. Roy, K. Ohtani, Y. Matsuda, K. Mori, I. Hwang, "Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation", *Biochim Biophys Acta*, Vol.1860, No.6, pp.1118-1128, Jun. 2016.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.02.012>

[15] Y. U. Kim, K. Ohtani, K. Mori, S. J. Jang, Y. Suzuki, "Gene Regulation Function of the Three Specificity Protein-1 (Sp1) within the Human Collectin Placenta-1 Proximal Promoter", *Genes & Genomics*, Vol.33, No.3, pp.275-283, Jun 2011.
DOI: <http://doi.org/10.1007/s13258-011-0001-9>

[16] R. J. Williams, J. P. Spencer, C. Rice-Evans, "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?", *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.36, No.7, pp.838-849, Apr. 2004.
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001>

[17] G. L. Russo, M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto, "Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer", *Cancer Treatment and Research*, Vol.159, pp.185-205, 2014.
DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5_11

[18] G. Juergenliemk, K. Boje, S. Huewel, C. Lohmann, H. J. Galla, "In vitro studies indicate that miquelianin (quercetin 3-O-beta-D-glucuronopyranoside) is able to reach the CNS from the small intestine", *Planta Medica*, Vol.69 No.11, pp.1013-1017, Nov. 2003.
DOI: <http://doi.org/10.1055/s-2003-45148>

[19] A. Massi, O. Bortolini, D. Ragno, T. Bernardi, G. Sacchetti, "Research Progress in the Modification of Quercetin Leading to Anticancer Agents", *Molecules*, Vol.29, No.22, pii: E1270, Aug. 2017.
DOI: <http://doi.org/10.3390/molecules22081270> , Review.

[20] M. Russo, A. Milito, C. Spagnuolo, V. Carbone, A. Rosén, "CK2 and PI3K are direct molecular targets of

quercetin in chronic lymphocytic leukaemia", *Format: AbstractSend to Oncotarget*. Vol.8, No.26, pp.42571-42587, Jun. 2017.

DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.17246>

[21] W. W. Lorenz, R. O. McCann, M. Longiaru, M. J. Cormier, "Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol.88, No.10, pp.4438-4442, May 1991.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4438>

[22] A. Farr, A. Roman, "A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency", *Nucleic Acids Res*, Vol.20, No.4, pp.920-930, Feb. 1992.
DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/20.4.920>

김 근 호(Geun Ho Kim)

[준(학생)회원]



- 2018년 2월 : 선문대학교 의생명 과학과 (이학사)
- 2018년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 대학원 생명공학과

<관심분야>

생명과학, 바이오제약

김 연 욱(Youn Uck Kim)

[정회원]



- 1987년 2월 : 건국대학교 미생물 공학과 (공학석사)
- 1992년 2월 : 오사카 대학교 의대 세균학교실 (이학박사)
- 1994년 3월 ~ 1998년 2월 : 삼성 생명과학연구소 선임연구원
- 1998년 3월 ~ 현재 : 선문대학교 제약생명공학과 교수

<관심분야>

면역학, 생명과학, 바이오제약