

3T3-L1 세포주에서 분비하는 인체 암세포 성장억제 단백질에 대한 연구

은재순* · 권진
우석대학교 약학대학

A Study on Growth-inhibiting Protein of Human Cancer Cells Secreted from 3T3-L1 Cell-line

Jae-Soon EUN* and Jin KWEON

College of Pharmacy, Woosuk University, Chonbuk 565-701, Korea

(Received February 13, 1996; accepted February 21 1996)

Abstract - Inhibition of the growth of human cancer cells by proteins secreted from 3T3-L1 cells was investigated in the present study. The growth of human cancer cells was inhibited by co-culture with 3T3-L1 cells under 10% FBS and DME, DME, GIT and serumless medium, respectively. The conditioned medium of cultured 3T3-L1 cells under serumless medium was concentrated 100-fold through an ultrafiltration cell with a 10,000 molecular weight cutoff at 4°C under positive pressure using nitrogen(3T3-L1 EM). 3T3-L1 EM inhibited the growth of HeLa, Hep G 2, KHOS-Np, A431 and MCF-7 cells. 3T3-L1 EM was purified with FPLC, DEAE-ion exchange chromatography and phenyl-sepharose chromatography. The major protein of 3T3-L1 EM has a molecular weight of 66,000-68,000 in SDS-PAGE analysis. The results suggest that the inhibitory activity of 3T3-L1 EM appears to be due to some protein(m.w. 66,000-68,000) secreted by 3T3-L1 cells.

Keywords □ 3T3-L1 cell, MTT, serumless medium, anti-cancer protein

정상적인 breast epithelial cell의 분화는 EGF와 IGF 등의 growth factor, estrogen, progesterone, prolactin, glucocorticoid, insulin 등의 hormone 및 retinoid, vitamin D, E, C, nicotinamide 등의 vitamin에 의한 복잡한 상호관계에 의해 조절된다(Tooper & Freeman, 1980; Lippman & Dickson 1989; Sato 등, 1980; Kawada 등, 1990; Ono 등, 1990; Lewis 등, 1982).

이들 조절물질들의 일부는 mammary stromal cell인 fibroblast, preadipocytes 및 adipocytes 등에서 만들어져, mammary epithelium의 성장, 형태적 변화 및 분화 등을 조절하는 것으로 알려져 있다(Oka & Yoshimura 1986; Haslam, 1987). 이들 조절물질중 mammary epithelial cell의 성장을 촉진하는 분자량 76,000인 단백질이 embryonic mammary mesenchymal tissue에서 분리 정제되었으며 (Taga 등, 1983), mouse mammary fibroblasts의 배양액 중 neoplastic mammary epithelial cell의 성장에 영향을 준다고 보고되었다(Enami 등, 1983).

3T3-L1 세포는 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된

세포주로서 적절한 조건하에서 배양하면 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있으며(Green & Kehinde, 1974), 분화시 collagen IV, entactin 및 laminin과 같은 단백질들의 분비가 촉진된다고 알려져 있어(Aratani & Kitagawa, 1988), 세포분화 과정을 연구하는 모델로 많이 사용되고 있다. 최근 3T3-L1 세포는 분화시 인체 유방암세포의 성장에 영향을 주는 물질을 분비한다고 보고하였으나(Patric 등, 1992), 아직 그 물질에 대한 정확한 특성은 밝혀지지 않고 있다.

따라서 본 실험에서는 3T3-L1 세포와 다양한 인체 암세포주를 co-culture 할 때 3T3-L1 세포가 분화하는 동안 분비하는 물질이 각 인체 암세포주에 미치는 영향을 관찰하였으며 그 물질의 성질 규명 및 분리 정제를 하였다.

실험방법

시약 및 기구

Dulbecco's modified Eagle's medium(DME, Sigma), GIT medium(Wako), serumless medium(Neuman & Type II, Gibco), fetal bovine serum(FBS, Gibco), penicillin-streptomycin (Sigma), trypsin(Gibco), PVDF(Sigma), coomassie brilliant

* To whom correspondence should be addressed.

blue R250(Fluka), SDS(Sigma), acrylamide(Sigma), Dalton mark(Sigma), trizma(Sigma), PEG(Sigma), MTT(Sigma) 등을 사용하였으며, 기타 시약은 세포배양용이나 일급시약을 사용하였다. 기구는 transwell(6.5 mm, Costar), membrane filter(MSI), culture flask(Nunc), ultrafiltration cell(Amicon), centriprep(Amicon), DEAE ion exchange Column-5PW (TSK, 8×75 mm), phenyl-sepharose column(LKB, 8×75 mm), inverted microscope(Nikon Co.), CO₂ incubator (Vision Co.), microplate reader(Dynatech MR-5000), freeze dryer(Labconco Co.), FPLC(LKB Co.) 등을 사용하였다.

3T3-L1세포와 인체 암세포주의 co-culture

3T3-L1세포를 10% FBS가 첨가된 DME배지에 2×10⁵ cells/ml 농도로 부유시켜 24 well plate의 각 well당 1 ml씩 분주하고 37°C CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. Confluent상태가 된 것을 확인한 후, 10% FBS가 첨가된 DME배지(FDME), 10% FBS가 첨가되지 않은 DME배지(NFDME), GFS(growth factor in serum)가 함유된 GIT배지(GIT) 및 serumless배지(SL)로 교환하였다. 이때 별도로 각 암세포주를 2×10⁵ cells/ml로 조제하여 6.5 mm transwell에 100 μl씩 넣고 24시간 배양한 후 이 transwell을 3T3-L1세포를 배양한 24 well plate에 옮겨 44시간 co-culture 하였다. Transwell을 새로운 24 well plate에 옮겨 4시간 동안 5 mg/ml 농도로 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μl를 transwell에 첨가하고 배양 종료시까지 은박지로 차광하였다. 배양 종료시 배양액을 제거한 뒤 생성된 formazan을 0.04 N HCl-isopropyl alcohol 100 μl로 용출시켜 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고, 각 교환배지만을 첨가한군을 대조군으로 하여 세포성장율을 백분율로 환산하였다.

3T3-L1세포 배양농축액이 암세포 증식에 미치는 영향

3T3-L1세포를 10% FBS가 첨가된 DME배지에 2×10⁵ cells/ml 농도로 부유시켜 250 μl culture flask에 15 μl를 넣고 37°C CO₂ incubator에서 48시간 배양하여 confluent상태가 된 것을 확인한 후 SL 배지로 3회 세척하였다. 새로운 SL 배지로 교환한 다음 48시간 배양하고 배양액을 조심스럽게 모은 다음(약 500 μl), membrane filter(0.22 μm)로 여과하고 여액을 질소가스 기류하에서 ultrafiltration 하여 분자량 10,000 이상의 분획을 100 배 농축하였다(이하 3T3-L1 EM이라 함). 농축액을 FDME 배지로 희석하여(1:5) well 당 각 암세포 2×10⁴ cells이 들어 있는 96 well plate에 200 μl첨가하고 44시간 배양하였다. 배양 후 DPBS-A에 희석된 MTT용액 20 μl를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료시 배양액을 제거한 뒤 생성된 formazan을 0.04 N HCl-isopropyl alcohol 100 μl로 용출시켜 발색된 각 well의 흡광도를 Microplate Reader를 이용하여 570 nm에서 측정하고, 배지만을 첨가한군을 대조군으로 하여 세포성장율을

백분율로 환산하였다.

3T3-L1세포 배양액중 단백질의 분리 및 확인

위에서 얻은 3T3-L1 EM을 FPLC(protein Pak glass 300SW 0.8×30 cm)를 이용하여 flow rate 0.5 ml/min. 조건 하에서 분리한 후, DEAE-Ion exchange chromatography (TSK-DEAE-5PW, 8×75 mm) 및 phenyl-sepharose chromatography(8×75 mm)를 이용하여 분리 정제하였다. 분리 정제시 각 fraction은 12.5% SDS-PAGE electrophoresis를 통하여 확인하였으며(Laemmli, 1970), gel은 coomassie brilliant blue로 염색하였다(Fairbanks 등, 1971).

통계처리

통계처리는 Student's t-test를 이용하였다.

실험결과

3T3-L1세포와 인체 암세포주의 co-culture 결과

3T3-L1세포가 confluent 상태가 된 후 분비하는 물질에 대한 배지의 영향을 살펴보기 위해, 3T3-L1 세포와 HeLa 세포를 FDME배지, NFDME배지, GIT배지 및 SL배지를 사용하여 각각 co-culture하였을 때, HeLa세포의 세포생존율이 43.1±6.9, 77.2±2.4, 77.6±1.3 및 53.6±1.1%로 FDME 배지와 SL배지에서 세포생존율이 약 50%로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 물질 분리를 용이하게 하기 위하여 serum이 함유되어 있지 않은 SL배지를 사용하였다(Fig. 1).

SL배지를 사용하여 3T3-L1세포와 인체 암세포주인 Hep G2, KHOS-NP, A431 및 MCF-7세포를 각각 co-culture 하였을 때, 각 암세포주의 생존율이 75.3±1.7, 62.6±4.6, 69.4±2.0 및 50.7±5.5%로 나타났다. 이 결과는 3T3-L1세포가 분화시 세포외로 다양한 인체 암세포주의 성장 억제

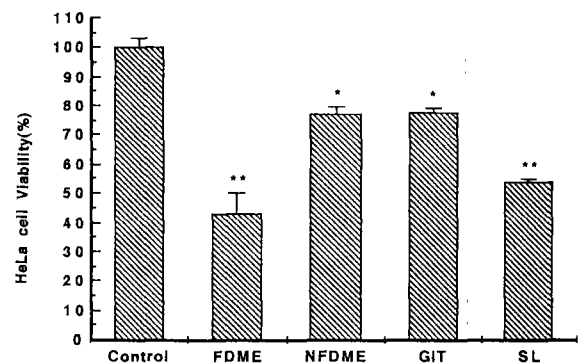


Fig. 1. Effect of co-culture with 3T3-L1 cells and HeLa cells under various medium conditions. 3T3-L1 cells were cultured in 24 well plate, and HeLa cells were cultured in transwell (6.5 mm). FDME; 10% FBS+DME medium, NFDME; DME medium, GIT; GIT medium, SL; Serumless medium Each bar represents the mean±SE from 4 experiments. *, Significantly different from control group (*p<0.01, **p<0.001).

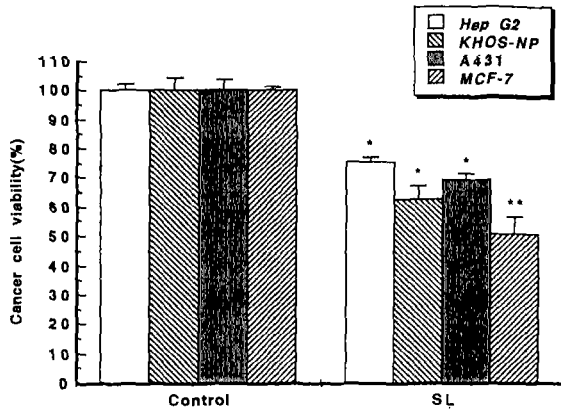


Fig. 2. Effect of co-culture with 3T3-L1 and human cancer cells under serumless medium. Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments. *; Significantly different from control group (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

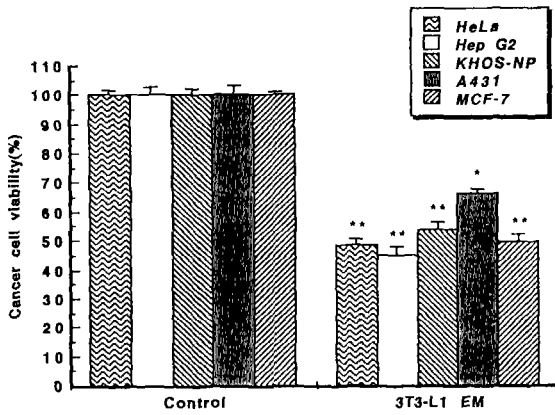


Fig. 3. Effect of 3T3-L1 EM on human cancer cells. 3T3-L1 EM represents the 100X concentrated extracellular medium of cultured 3T3-L1 cells under serumless medium. The extracellular medium was concentrated through ultrafiltration cell with a 10,000 molecular weight cutoff at 4°C under positive pressure using nitrogen. Each bar represents the mean \pm SE from 4 experiments. *; Significantly different from control group (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$).

물질을 분리하고 있음을 시사하는 것이다(Fig. 2).

3T3-L1 EM이 암세포 증식에 미치는 효과

위의 결과를 확인하기 위해 3T3-L1 EM을 인체 암세포 주인 HeLa, Hep G2, KHOS-NP, A431 및 MCF-7세포에 첨가하여 세포생존율을 측정 한 결과 48.3 ± 2.2 , 44.9 ± 3.0 , 53.7 ± 2.7 , 66.3 ± 1.1 및 $49.5 \pm 2.8\%$ 로 나타났다. 이 결과는 3T3-L1세포가 분화시 세포외로 분비하는 암세포 성장 억제 물질이 분자량 10,000 이상임을 의미하는 것이다(Fig. 3).

3T3-L1 EM중 단백질의 분리 및 확인

3T3-L1 EM을 membrane filter로 분자량 50,000이상 및 이하로 분획하여 인체 암세포주에 처리한 결과 분자량 50,000이상의 분획에 암세포의 성장을 억제하는 단백질이 존

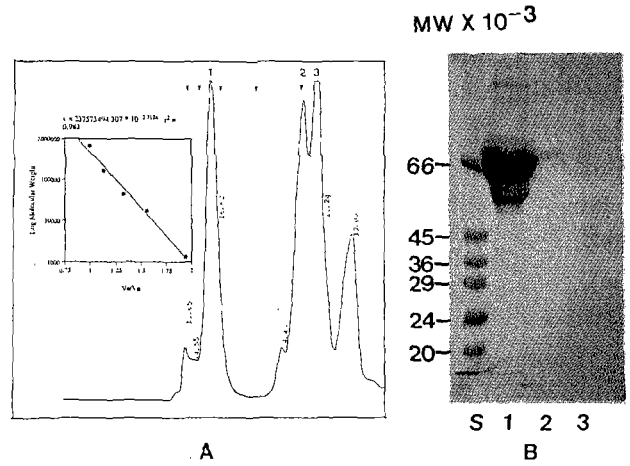


Fig. 4. Molecular weight analysis of 3T3-L1 EM. (A)3T3-L1 EM was subjected to FPLC on a Protein Pak glass 300SW (0.8×30 cm). Fractions (0.5 ml) were collected at a flow rate of 0.5 ml/min. Filled triangles represent the peak elution positions of gel filtration standards: thyroglobulin (670,000), bovine γ -globulin (158,000), chicken ovalbumin (44,000), equine myoglobin (17,000), cyanocobalamin (1,350). The inset shows the plot of V_0/V_s vs log (mon. wt.) (B) 12.5% SDS-PAGE of each fraction. S, molecular weight standards: bovin albumin (66,000), egg albumin (45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000), carbonic anhydrase (29,000), trypsinogen (24,000), trypsin inhibitor (20,000), α -lactalbumin (14,200). Lane1, A1 fraction, Lane2, A2 fraction, Lane3, A3 fraction.

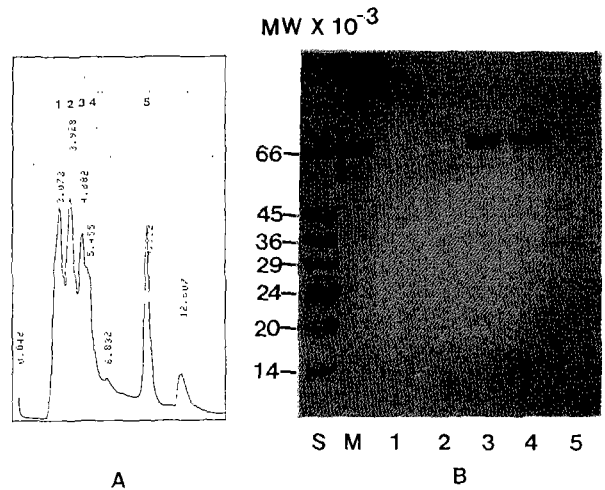


Fig. 5. DEAE-ion exchange chromatography of 3T3-L1 EM. (A) Columns (TSK-DEAE 5PW, 8×75 mm) were equilibrated with PBS (pH 7.1). The columns were eluted under the following conditions; Detector wavelength (280 nm), buffer (0.7 M NaCl in PBS, pH 7.1), flow rate (0.1 ml/min.). (B) SDS-PAGE of each fraction. S, molecular weight standards, M, A1 fraction of Fig. 4, Lane1, A1 fraction, Lane2, A2 fraction, Lane 3, A3 fraction, Lane4, A4 fraction, A5, A5 fraction.

재하고 있음을 알 수 있었다(Data not shown). 3T3-L1 EM 중의 단백질을 FPLC를 이용하여 분리하고 각 peak를 전기

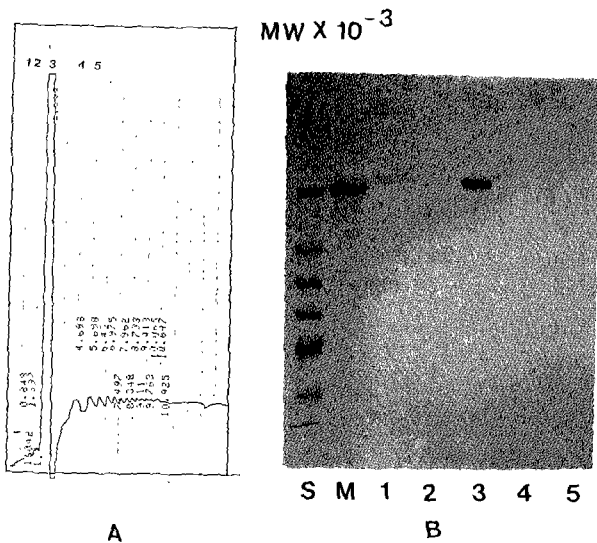


Fig. 6. Phenyl-sepharose chromatography of 3T3-L1 EM. (A) Phenyl-Sepharose columns (8×75 mm) were equilibrated with PBS (pH 7.1). Columns were eluted under the following conditions; Buffer 1.8 M (NH₄)₂SO₄ in PBS (pH 7.1), flow rate (1.0 ml/min.). (B) SDS-PAGE of each fraction. S, molecular weight standards, M, A3,4 fraction of Fig. 5, Lane1, A1 fraction, Lane2, A2 fraction, Lane3, A3 fraction, Lane4, A4 fraction, Lane5, A5 fraction.

영동하여 확인한 결과 분자량 50,000 이상의 단백질들이 주로 1번 분획에 함유되어 있었으며(Fig. 4), 1번 분획을 DEAE-ion exchange column을 이용하여 분리한 결과 3,4번 분획에 주단백질이 함유되어 있었다(Fig. 5). 3,4번 분획을 phenyl-sepharose column으로 분리한 결과 3번 분획에 주 단백질이 함유되어 있었으며(Fig. 6), 이 단백질을 PVDF막에 전기적으로 blotting 하였을 때 분자량 66,000에서 68,000 사이에 2개의 band가 나타났다(Data not shown).

고 찰

세포의 분화시 분비하는 단백질을 규명하기 위해서는 세포 배양시 배양액의 선택이 중요하다. 세포의 증식과 분화에는 일반적으로 10% FBS가 함유된 배지를 사용하는 것이 좋으나, FBS에 함유된 다양한 단백질들의 영향 때문에 정제하는데 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 본 실험에서는 3T3-L1 세포를 배양하여 confluent 상태가 되면 배지를 FDME배지, DME배지, GIT배지 및 SL배지로 교환하여 3T3-L1 세포를 배양하면서 인체 암세포주와 co-culture를 실시한 결과, 3T3-L1 세포 분화초기에 SL배지로 교환하여 배양하였을 때 FDME배지로 배양시와 비슷한 정도로 다양한 인체 암세포의 증식을 억제하였다. 이 결과는 3T3-L1 세포에서 분비되는 암세포 성장 억제물질을 얻기 위해서는 세포 분화시 serum이 첨가되지 않은 SL배지로 교환하는

것이 유리함을 의미하는 것이다. 3T3-L1 세포가 세포외로 분비하는 물질을 분리하기 위해 ultrafiltration cell을 이용하여 분자량 50,000이상의 분획 및 50,000에서 10,000사이의 분획을 얻어 각 암세포에 처리한 결과, 분자량 50,000 이상에 암세포의 성장을 억제하는 물질이 함유되어 있었다. 3T3-L1 EM에 함유된 단백질을 정제한 결과 분자량 66,000에서 68,000사이에 2개의 단백질을 확인하였으나, 이들 단백질의 항암성 여부는 아직 정확히 규명하지 못하였다. 하지만 이 단백질들이 3T3-L1 EM에 함유된 분자량 50,000이상의 단백질 중 주 단백질이기 때문에 항암성을 가진 단백질이라 추정되나, 이들 단백질에 대한 정확한 특성 및 항암작용 기전을 규명하기 위해서는 많은 양의 정제된 단백질이 필요하며 이에 대하여는 추후 실험하고자 한다.

감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

Aratani, Y. and Kitagawa, Y. (1988). Enhanced synthesis and secretion of type IV collagen and entactin during adipose conversion of 3T3-L1 cells and production of unorthodox laminin complex. *J. Biol. Chem.* **263**, 16163-16169.

Enami, J., Enami, S. and Koga, M. (1983). Growth of normal and neoplastic mouse mammary epithelial cells in primary culture; stimulation by conditioned medium from mouse mammary fibroblasts. *Gann.* **74**, 845-853.

Fairbanks, G., Steck, T. L. and Wallach, D. F. H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2611.

Green, H. and Kehinde, O. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133.

Haslam, S. Z. (1987). Cell to cell interactions and normal mammary gland function. *J. Dairy Sci.* **71**, 2843-2854.

Kawada, T., Aoki, N., Kamei, Y., Maeshige, K., Nishiu, S., and Sugimoto, E. (1990). Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation from preadipocytes to adipocytes of 3T3-L1 cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **96A**(2), 323-326.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.

Lewis, J. E., Shimizu, Y. and Shimizu, N. (1982). Nicotinamide inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* **146**, 37-41.

Lippman, M. E. and Dickson, R. B. (1989). Mechanism of growth control in normal and malignant breast epithelium. *Recent Prog. Horm. Res.* **45**, 383-441.

Oka, T. and Yoshimura, M. (1986). Paracrine regulation of mammary gland growth. *Clin. Endocrinol. Metab.* **15**, 79-97.

- Ono, M., Aratani, Y., Kitagawa, I., and Kitagawa, Y. (1990). Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.* **187**, 309-314.
- Patrik, G. J., Christina, M. R., Donna, V. and Carmen, J. A. (1992). Identification of a protein factor secreted by 3T3-L1 preadipocytes inhibitory for human MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Research* **52**, 6860-6865.
- Sato, M., Hiragun, A. and Mitsui, H. (1980). Preadipocytes possess cellular retinoid binding proteins and their differentiation is inhibited by retinoid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 1839-1845.
- Taga, M., Sakakura, T. and Oka, T. (1983). Identification and partial characterization of mesenchyme-derived growth factor that stimulates proliferation and inhibits functional differentiation of mammary epithelium in culture. *J. Cell Biol.* **97**, 317-322.
- Tooper, Y. J. and Freeman, C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* **60**, 1044-1106.