

## 인체 소장상피세포주(HT-29)의 분화단계에 따른 타우린수송체 활성의 변화\*

박태선<sup>§</sup> · 이해미 · 김정아 · 김하원\*\* · 박건구\*\*\*

연세대학교 식품영양학과, \*\*서울시립대학교 생명과학과, \*\*\*아산생명과학연구소

### Taurine Transporter Activity in the Human Colon Carcinoma Cell Line(HT-29) is Decreased during Cell Differentiation

Park, Tae Sun<sup>§</sup> · Lee, Hae Mee · Kim, Jung-A · Kim, Ha-Won\*\* · Park, Kun-Koo\*\*\*

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

\*\*Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea,

\*\*\*Department of Molecular Genetics, Asan Institute for Life Sciences, Seoul 138-736, Korea

#### ABSTRACT

Previous studies on the effect of age on intestinal taurine transport in animals have invariably shown a decline in the activity of the transport system with increasing age. In the present study, changes in taurine transporter activity were observed during cell differentiation in the human colon carcinoma cell line, HT-29. This cell line exhibits various enterocytic characteristics when differentiated, and therefore has frequently been used to study the characteristics and regulation of nutrient and drug absorption in the small intestine at the cellular level. Pre-treatment of the cells with  $\beta$ -alanine(10mM) reduced the taurine transport activity to 33% of the value for the control cells( $p < 0.05$ ), which implies that taurine and  $\beta$ -alanine share a common  $\beta$ -amino acid transport system for their cellular uptake in the HT-29 cells. As the HT-29 cell line was incubated for 4, 14, and 21 days post seeding, activities of brush border membrane marker enzymes(alkaline phosphatase and  $\gamma$ -glutamyl transferase) were kept increased( $p < 0.001$ ), suggesting that cell differentiation of HT-29 was continued until 21 days post seeding. Kinetic studies of the taurine transporter were conducted in the HT-29 cell line with varying taurine concentration(5-60 $\mu$ M) in the uptake medium. Both  $V_{max}$  and the Michaelis-Menten constant( $K_m$ ) of taurine transporter were decreased as differentiation of the HT-29 cell line was progressed:  $V_{max}$  of the taurine transporter in cells incubated for 4, 14, and 21 days post seeding was  $2.79 \pm 0.13$ ,  $0.85 \pm 0.08$  and  $0.32 \pm 0.01 \mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 30\text{min}^{-1}$ , respectively( $p < 0.001$ ), and  $K_m$  was  $42.3 \pm 3.4$ ,  $16.89 \pm 1.74$ , and  $11.2 \pm 3.0 \mu\text{M}$ , respectively ( $p < 0.01$ ). These results indicate that the activity of sodium dependent active taurine transport system in the HT-29 cell line is decreased as confluent cells are differentiated. This phenomenon in cell culture system corresponds well with the earlier observation of lower intestinal taurine transport activity in suckling rats compared to that in adult animals, although direct relationship of cell differentiation with in vivo aging process needs further verification. (*Korean J Nutrition* 33(6) : 660~667, 2000)

KEY WORDS: taurine, taurine transporter, HT-29, human colon carcinoma cell line, differentiation.

#### 서론

함황아미노산인 타우린은 거의 모든 동물조직에서 가장 풍부히 존재하는 유리아미노산 중의 하나이며, 세포외액보다는 세포내액에 수집~수천배 더 농축되어 존재한다<sup>1,2</sup>. 뇌 세포의 경우 세포내액에 세포외액의 약 400배에 달하는 타우린이 함유되어 있으며, 에를리히(Ehrlich)세포와 헬라

(HeLa)세포의 경우 세포외액에 비해 각기 약 2,000배와 7,000배나 더 높은 타우린이 세포질에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같이 격심한 농도구배에 역행하여 고농도의 타우린을 세포내액에 유지시킬 수 있다는 사실은 에너지를 필요로 하는 능동적 타우린수송체가 세포막에 존재함을 뜻한다. 실제로 고친화력을 지니는 능동적 타우린수송체가 생체막에 존재한다는 보고가 지난 20년간 꾸준히 제기되어 왔으며, 현재까지 신장<sup>3)</sup>, 간<sup>4)</sup>, 망막<sup>5)</sup>, 태반<sup>6)</sup>, 뇌<sup>7)</sup> 및 소장<sup>11,12)</sup> 등에서 타우린수송체가 발견되어 졌다.

타우린의 주요 역할은 간에서 글라이신과 함께 담즙산을 포함시켜 소장으로 배설시키는 것으로 알려져 왔으며, 실제

채택일 : 2000년 8월 31일

\*This work was supported by a grant No 1999-2-209-013-5 from the Interdisciplinary Research Program of the KOSEF.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

로 이와 연관지어 타우린의 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 저하효과가 보고된 바 있다<sup>19,15</sup>. 아울러 최근 타우린의 다양한 특이적 기능을 시사하는 많은 연구들이 진행되어져 왔는데, 그 예로 타우린은 항산화작용을 통해 생체에서 발생하는 oxygen radical을 중화시키며<sup>16,17</sup>, 각종 해독작용에 관여하는 것으로 보고되었다<sup>18,19</sup>. 그 외에도 타우린은 뇌조직에서 신경조절 작용을 나타내며<sup>20,21</sup>, 생식기능에 관여하여 임신 중 타우린이 결핍될 경우 유산 또는 사산의 확률이 증가하는 것으로 실험동물에서 보고되었다<sup>22,23</sup>.

세포막을 통한 타우린의 운반기전은 신장의 근위세뇨관(proximal tubule)에서 가장 폭넓게 연구되어져 왔다. 신세뇨관을 통한 타우린의 재흡수는 타우린을 비롯하여  $\beta$ -alanine,  $\beta$ -aminobutyric acid와 gamma-aminobutyric acid(GABA) 등의 능동적 운반을 담당하고 있는  $\beta$ -아미노산수송체에 의해 이루어지고 있으며, 이와 같은  $\beta$ -아미노산수송체의 특성 및 kinetics 등이 Chesney 등<sup>4,23,24</sup>과 Park 등<sup>25</sup>에 의해 집중적으로 연구되어 졌다. 쥐 및 토끼의 신장에서부터 제조함된 근위세뇨관 용모막(brush border membrane vesicle, BBMV)을 사용하여 타우린의 재흡수과정을 연구한 결과를 종합하면, 타우린수송체는 기질 특이성을 지니며 전통적인 Michaelis-Menten kinetics를 따르는 능동적 수송체로서 타우린 1몰 당  $\text{Na}^+$  2몰과  $\text{Cl}^-$  1몰을 필요로 하는  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  보조운반체계(cotransport system)임이 제시된 바 있다<sup>26</sup>.

신장에서의 타우린 재흡수와 함께 체내의 타우린 항상성(homeostasis)을 유지하는데 있어서 중요한 역할을 담당하는 것으로서 소장상피세포를 통한 타우린의 흡수 조절을 들 수 있겠다. 소장점막을 통한 영양소 흡수에 관한 연구는 현재까지 주로 소장조직을 perfusion하거나, 소장점막으로부터 분리된 제조함 용모막 등을 이용하여 이루어져 왔으며, 세포배양방법이 사용된 것은 90년대 이후 최근의 일이다. 인체 대장암세포주인 HT-29 또는 Caco-2 세포는 세포배양시 분화(differentiation)되지 않은 상태로 증식하다가 일단 confluent한 단계를 지나 계속적으로 배양시킬 경우 미소용모막(microvilli)을 형성하는 등 전형적인 성숙한 소장점막세포(enterocyte)의 분화 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. 이와 같은 사실은 다양한 영양소 및 약물이 소장으로부터 흡수되는 기전 및 이들의 체내 이용률을 연구하는데 있어서 HT-29와 Caco-2 세포주가 유용한 *in vitro* 모델로 사용되어질 수 있음을 시사해 주는 것이다. 실제로 1990년 이후 이러한 세포주를 이용함으로써 칼슘<sup>28</sup>, 철분<sup>29</sup> 및 아연<sup>30</sup> 등의 무기질이 소장으로부터 흡수되는 기전을 규명하는데 큰 성과를 거두었다.

Leibach와 그의 연구팀<sup>11,31</sup>은 쥐의 소장에서부터 제조함된 BBMV에서 발견되었던 능동적 타우린수송체와 매우 흡사한 특성을 지니는 타우린수송체가 HT-29와 Caco-2 세포주에 존재함을 발견하여 소장에서의 타우린 흡수기전 연구에 일보를 내딛었으나, 아직까지 소장상피세포주모델을 이용한 타우린 uptake 및 transport에 관한 연구는 초기 단계에 있다고 하겠다. 따라서 본 연구에서는 HT-29세포를 대상으로 소장상피세포막에서 타우린수송체의 기본 특성을 규명하고, 세포의 분화단계에 따른 능동적 타우린수송체의 활성 및 kinetics의 변화 유무를 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

인체대장암세포주인 HT-29세포는 75cm<sup>2</sup> culture flask에서 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS), 100units/ml penicillin과 100 $\mu$ g/ml streptomycin을 함유한 RPMI 1640배지를 사용하여 배양시켰다. 개별 실험을 위해 세포주를 분주할 경우 confluent한 상태의 세포를 0.25% trypsin과 0.3% ethylenediaminetetra acetic acid(EDTA)가 함유된 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)을 사용하여 처리하고, 6-well plate의 각 well(35mm)에 2  $\times$  10<sup>6</sup>개의 세포를 넣고 배양하기 시작하였다. 세포배양은 5% CO<sub>2</sub> 가스가 존재하는 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 진행되었다. 분주 후 약 3일이 경과하면 HT-29세포가 다시 confluent한 상태로 자라게 된다.

### 2. Brush border membrane marker enzyme 측정

소장상피세포는 분화가 진행되면서 미소용모막을 형성하게 되므로 용모막에서 다량 발현되는 alkaline phosphatase와  $\gamma$ -glutamyl transferase 효소의 활성을 측정하여 소장상피세포가 분화되는 정도의 표지자로 사용하였다. 6-well plate에서 confluent한 상태를 지나 일정 기간 배양시킨 세포로부터 배양액을 제거한 다음 PBS로 세포를 2회 세척하고, 다시 PBS 1ml을 넣은 후 cell scraper를 이용하여 세포를 수거하였다. 얼음 위에서 초음파분쇄기를 이용하여 수거된 세포의 막을 파괴시킨 후 피펫으로 균질화시켰다.

세포균질액의 alkaline phosphatase 활성은 Bessy 등<sup>32</sup>의 방법을 기초로 한 상업적 kit(Sigma, #104 LL)를 이용하여 측정하였다. 즉, phosphatase의 촉매하에 p-nitrophenyl phosphate 기질로부터 생성된 p-nitrophenol을 알칼리 환경에서 노란색 화합물로 전환시킨 후 410nm에서

흡광도를 측정하여 정량하였다. 효소활성은  $\mu\text{mol p-nitrophenol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 15 \text{ min}^{-1}$ 로 나타났다.

$\gamma$ -Glutamyl transferase 활성은 Pillion 등<sup>33)</sup>의 방법에 준해 시료 200 $\mu\text{l}$ 에 11.1mM glycylglycine과 2.8mM L- $\gamma$ -glutamyl p-nitroanilide을 기질로 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 4°C의 2N 아세트산용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 생성된 p-nitroanilide의 양은 spectrophotometer를 이용하여 410nm에서 흡광도를 측정하여 구하였으며, 효소활성은  $\text{nmol p-nitroaniline} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 20 \text{ min}^{-1}$ 으로 제시하였다.

세포의 단백질함량을 측정하기 위해 동일한 조건에서 배양시킨 3개의 well에 1ml의 deionized water를 첨가한 후 냉동 및 해동을 2회 이상 반복하고, 25-gauge 바늘이 달린 1ml 주사기를 이용하여 세포를 파괴시켰으며, 파괴된 세포액의 단백질함량은 Lowry 등<sup>34)</sup> 방법에 의해 측정하였다.

### 3. 타우린 uptake 측정

HT-29세포에 의한 타우린 uptake는 Tiruppathi 등<sup>11)</sup>이 제시한 방법을 수정하여 측정하였다. Uptake 실험을 실시하기 전 6-well plate에서 monolayer로 자란 세포의 배양액을 제거시킨 후  $^3\text{H}$ -타우린이 포함되지 않은 uptake용액을 사용하여 세포를 2회 세척하였다. Uptake용액의 구성성분은 다음과 같았다. 2.5mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES)/hydroxymethylaminomethane(Tris)(pH 7.5), 140mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8mM  $\text{MgSO}_4$ , 5mM D-mannitol, 그리고 50mM cold taurine. 각 well에 0.1 $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -타우린(NEN Life Science Products, #Net 541)을 포함하는 1ml의 uptake 용액을 넣은 후, 0~180분까지 시간을 달리하여 37°C에서 배양시키므로써 세포내로  $^3\text{H}$ -타우린이 이동하도록 한 후 흡입력을 이용해 재빠르게 용액을 제거하고 PBS로 세번 이상 세포를 세척하였다. 1ml의 1% SDS를 함유한 0.2N NaOH 용액을 6-well plate의 각 well에 넣은 후 실온에서 30분간 방치하여 세포막을 파괴시키고, 각 well로부터 세포용해액(cell lysate)을 수거하여 scintillation vial에 옮겼다. 각 vial에 scintillation 콕테일(Beckman #S812547)을 첨가한 후 liquid scintillation counter(Beckman, LS6500)를 사용하여 3분간 radioactivity를 측정하였다.

$\text{Na}^+$  이온이 HT-29세포에 의한 타우린 uptake활성에 미치는 영향을 평가하는 실험에서는 분주 후 4일이 경과한 HT-29세포를 대상으로 uptake용액에 NaCl 대신 동량의 choline chloride를 첨가시킨 상태에서 타우린 uptake를 측

정하였다.

$\beta$ -alanine이 HT-29세포에 의한 타우린 uptake활성에 미치는 영향을 평가하기 위한 실험에서는 분주 후 4일이 경과한 HT-29 세포를 대상으로 배양액에 첨가되는  $\beta$ -alanine의 농도를 0.1~10mM로 달리하여 24시간 동안 배양시킨 후 타우린 uptake를 측정하였다.

HT-29세포에서 타우린 uptake의 kinetics를 평가하기 위해서는 uptake용액의 타우린농도를 5~60 $\mu\text{M}$ 까지 달리하면서 능동적 타우린 uptake의 활성을 측정하였고, 이를 Lineweaver-Burk plot으로 변환시켜 타우린수송체의  $V_{\text{max}}$ 값과  $K_m$ 값을 각기 산출하였다. 능동적 타우린 uptake수치는  $\text{Na}^+$  이온이 존재하는 uptake용액에서 측정된 uptake 수치(총 uptake 값)에서  $\text{Na}^+$  이온이 제거된 uptake용액에서 측정된 uptake 수치(단순 확산에 의한 uptake 값)를 뺀 값으로 계산하였다.

모든 uptake활성은 세번 반복실험의 평균값으로 나타냈으며, uptake값은 pmole taurine/mg cell protein으로 제시하였다.

### 4. 통계분석

모든 분석수치는 mean  $\pm$  SEM으로 제시하였고, 수집된 자료는 SAS(Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계분석하였다. 소장상피세포의 분화 정도에 따른 uptake 활성,  $V_{\text{max}}$  및  $K_m$ 값의 차이는 ANOVA test에 의해  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  또는  $p < 0.001$  수준에서 유의성 유무를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. HT-29 세포주의 분화 확인

HT-29세포를 35mm dish에  $2 \times 10^6$ 개씩 분주하고, 21일까지 배양하면서 소장상피세포의 marker enzyme인 alkaline phosphatase와  $\gamma$ -glutamyl transferase 활성을 측정하였다. 각 well에서 수거된 세포용해액의 단백질함량은 분주 후 4일, 14일 및 21일이 경과하면서  $0.68 \pm 0.6$ ,  $2.1 \pm 0.03$  그리고  $2.5 \pm 0.07 \text{ mg/dl}$ 로 서서히 증가하였다. HT-29 세포는 분주 후 3일이 경과하면 confluent한 상태로 자라게 되며, 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 confluent한 상태를 지나 계속 배양시킬 경우 단백질함량이 계속 증가하는 현상은 dish의 단위면적 당 세포밀도가 증가하거나 또는 단일 세포내의 단백질함량이 증가함을 의미한다고 볼 수 있겠다.

세포용해액의 효소활성을 단백질함량으로 보정해 준 결과 alkaline phosphatase 활성은 분주 후 4일, 14일 또는

**Table 1.** Activities of brush border membrane marker enzymes in the HT-29 colon carcinoma cell line

Culture time	Protein (mg/dl)	Alkaline phosphatase		γ-Glutamyl transferase
		(μmol p-nitrophenol	mg protein <sup>-1</sup> · 15 min <sup>-1</sup> )	
4 days	0.68 ± 0.6 <sup>cl</sup>	11.0 ± 1.8 <sup>cl</sup>	42.7 ± 4.3 <sup>cl</sup>	
14 days	2.1 ± 0.03 <sup>bn</sup>	55.2 ± 4.2 <sup>bn</sup>	118 ± 1.1 <sup>bn</sup>	
21 days	2.5 ± 0.07 <sup>an</sup>	78.9 ± 0.3 <sup>an</sup>	168 ± 6.9 <sup>an</sup>	

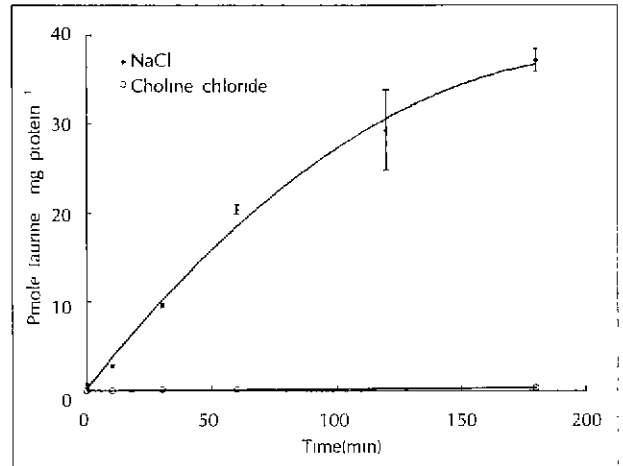
Different superscripts in the same column indicate significant difference among differentiation stage tested by ANOVA at p < 0.001

21일간 배양시킨 결과 각기 11 ± 1.8, 55.2 ± 4.2 및 78.9 ± 0.3 μmol p-nitrophenol · mg protein<sup>-1</sup> · 15 min<sup>-1</sup>로 시간이 경과함에 따라 계속 증가하였고(p < 0.001), γ-glutamyl transferase 활성 역시 42.7 ± 4.3, 118 ± 1.1과 168 ± 6.9nmol p-nitroaniline · mg protein<sup>-1</sup> · 20 min<sup>-1</sup>로 시간이 경과함에 따라 증가되어(p < 0.001), 분주 후 21일 까지 분화가 계속됨을 알 수 있었다(Table 1).

Rousset<sup>27)</sup>는 대장암세포주 중에서도 특히 HT-29와 Caco-2세포주가 뚜렷한 소장상피세포의 분화특성을 나타낸다는 사실을 1986년 처음으로 보고하였다. 이 두 가지 세포주는 모두 인체에서 유래된 것이며, 따라서 인체 소장에서의 소화효소 분비 및 영양소 흡수기전의 연구를 위한 유용한 *in vitro* 모델이 될 수 있다.

**2. HT-29 세포에 의한 타우린 uptake의 시간적 변화 패턴**

분주 후 4일이 경과한 HT-29세포를 대상으로 140mM NaCl을 포함한 uptake용액에 타우린(50nM)을 첨가하여 타우린 uptake의 시간적 변화(time course)를 측정된 결과 180분까지 uptake가 계속 증가하였으며, 특히 처음 60분 동안은 uptake 수치가 일차함수 관계로 증가하였다(Fig 1). Tiruppathi 등의 연구<sup>11)</sup>에서도 HT-29세포주를 대상으로 타우린 uptake의 시간적 변화를 측정된 결과, 타우린 uptake가 60분까지는 일차함수 관계로 증가하였고, 120분까지 계속하여 증가한 것으로 보고하여 본 연구의 결과와 일치하고 있다. HT-29세포주를 이용한 실험에서 세포내로 이동되는 타우린의 함량이 uptake용액에서의 배양시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하는 현상을 보인 것과는 달리, 고양이 신장의 근위세뇨관<sup>28)</sup> 또는 쥐의 공장(jejunum)<sup>12)</sup>에서 분리된 재조합용모막을 대상으로 타우린 uptake의 시간적 변화를 측정된 연구에 의하면 타우린 uptake가 3분 내에 최고점에 이르고 그 이후부터는 점차 감소하여 평형점에 이르는 것으로 보고되고 있다. 이와같은 차이점은 살아있는 세포의 경우 ATP가 지속적으로 재생성됨으로써 타우린의 능동적 이동을 계속 지원하는 반면, 인공적인 재조합용모막에서는 지속적인 ATP의 공급이 불가능하기 때문인 것으로 사려된다.



**Fig. 1.** Time course of taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean ± SEM from a single experiment done in triplicate. Uptake of taurine(final concentration 50nM) in confluent monolayer cultures of HT-29 cell line was measured 4 days after seeding using uptake medium containing either 140mM NaCl(●) or 140mM choline chloride(○).

또 다른 인체 대장암세포주로서 영양소의 흡수조절연구에 흔히 이용되는 Caco-2세포주의 경우에도 타우린수송체가 발견되어지는 것으로 알려져 있다. 그러나 HT-29와 Caco-2 세포주에서 타우린수송체의 활성을 비교 연구한 결과에 의하면, 타우린 uptake활성은 Caco-2세포주에서 HT-29세포주에 비해 훨씬 더 낮게 나타나고 있다. 예를 들어 Brandsch 등<sup>31)</sup>은 분주 후 7일이 경과된 HT-29세포주와 Caco-2세포주를 대상으로 20nM의 타우린농도에서 타우린 uptake를 측정된 결과 Caco-2세포에서 HT-29세포의 약 1/10에 해당되는 타우린 uptake활성을 관찰하였고(HT-29세포의 경우 0.38 ± 0.01pmol · 10min<sup>-1</sup> · cm<sup>2</sup>, 그리고 Caco-2세포의 경우 0.028 ± 0.002pmol · 10min<sup>-1</sup> · cm<sup>2</sup>), 따라서 소장에서의 타우린 흡수기전 및 조절에 관한 연구를 위해서는 HT-29세포주가 Caco-2세포주에 비해 더 유용한 모델임을 제시한 바 있다.

**3. 타우린수송체의 Na<sup>+</sup> 의존성**

HT-29세포에서 타우린수송체의 Na<sup>+</sup> 의존성을 평가하기 위해 50nM의 타우린을 포함하는 uptake용액에

NaCl(140mM) 대신 동량의 choline chloride를 첨가한 상태에서 타우린 uptake활성의 시간적 변화를 측정된 결과, 측정된 모든 시간대에서 타우린 uptake가 거의 0에 가깝게 나타났다(Fig. 1). 이와같은 결과는 HT-29세포의 용모막에 Na<sup>+</sup>이온을 필요로 하는 능동적 타우린수송체가 존재하고, 50nm의 타우린농도에서는 HT-29세포에 의한 타우린 uptake의 거의 대부분이 이와 같은 능동적 운반(active transport)에 의해 이루어진 것임을 의미한다.

소장상피용모막을 통한 타우린의 흡수는 타우린수송체에 의해 농도구배에 역행하여 진행되는 능동적 운반과 용모막을 사이에 두고 세포 안쪽의 타우린 농도구배에 의한 단순확산(simple diffusion)과정에 의해 진행된다. 타우린의 능동적 운반을 담당하는 수송체는 Na<sup>+</sup>이온을 필요로 하며, 따라서 세포외액에 Na<sup>+</sup>이온이 존재하지 않는 상태에서 진행되는 타우린 uptake는 단순확산에 의한 것임을 의미한다. 소장상피세포내로 타우린이 운반되는데 있어서, 이 두 가지 운반과정의 상대적 기여도는 전적으로 소장내강(lumen)의 타우린농도에 의해 좌우된다. 즉, 소장내강의 타우린농도가 상피세포내의 타우린농도보다 낮을 경우에는 거의 대부분의 uptake가 능동적 운반에 의해 진행되는 반면, 다량의 타우린을 섭취하여 소장내강의 타우린농도가 세포내 타우린농도보다 월등히 높을 경우에는 단순확산에 의한 타우린 uptake의 비중이 증가하게 된다. 현재까지 인체 소장상피세포에서 타우린농도를 측정된 보고는 없었으나, 본 연구자가 정상 타우린식이(0.15%타우린)를 섭취하는 고양이의 공장에서 타우린농도를 측정된 결과에 의하면 식이내 단백질함량에 따라 7.5~8.2μmole/g fresh tissue(7.5~8.2mM)의 타우린을 함유하는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험의 uptake용액에 첨가된 타우린농도(50nM)는 소장상피세포의 생리적 타우린농도의 약 0.6%정도에 불과하고, 이와 같이 낮은 외부농도에서는 단순확산에 의한 타우린 uptake는 거의 일어나지 않을 것으로 사려된다.

타우린수송체의 Na<sup>+</sup>이온 의존성은 소장상피세포에서 뿐만 아니라 고양이<sup>25)</sup>와 쥐<sup>23)24)</sup>의 신세뇨관에서 재조합된 용모막을 이용한 선행 실험에서도 증명된 바 있다. Chesney 등<sup>4)</sup>은 또한 쥐의 신장에서 분리한 재조합용모막을 이용한 실험에서 Na<sup>+</sup>-channel ionophore인 gramicidin을 uptake용액에 첨가시킨 결과 타우린 uptake의 Na<sup>+</sup>이온 의존성이 사라졌음을 관찰함으로써 이와 같은 사실을 재입증하였다.

#### 4. β-alanine이 타우린수송체의 활성에 미치는 영향

β-alanine은 같은 β-아미노산의 일종인 타우린과 분자

구조가 유사하여 포유류의 조직에서 타우린수송체에 대해 타우린과 경쟁적인 관계에 있는 것으로 알려져 있다<sup>45)</sup>. 본 논문에서는 β-alanine이 타우린수송체의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 분주 후 4일간 배양시킨 HT-29세포를 농도를 달리한 β-alanine으로 24시간 전처리하고 50nM의 타우린을 포함한 uptake용액에서 30분간 배양시킨 후 타우린 uptake를 측정하였다. 0.1 mM의 β-alanine으로 전처리 한 HT-29세포에서 측정된 타우린 uptake는 전처리하지 않은 대조군의 91.8%에 해당되었으며, 0.5mM과 1.0mM의 β-alanine으로 전처리한 경우 각각 대조군의 71.7%와 82.9%로 타우린 uptake 수치가 감소하였다. 이와 같은 β-alanine에 의한 타우린 uptake의 감소현상은 β-alanine의 농도가 증가할수록 더욱 현저하여 10mM의 β-alanine으로 전처리한 경우에는 대조군의 33.4%로 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 따라서 HT-29세포에서 β-alanine이 타우린 uptake를 감소시키는 효과는 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있으며, 타우린과 β-alanine이 β-아미노산 운반체를 공유하는 것으로 사려된다.

Jayanthi 등<sup>5)</sup>은 인체 태반세포주인 JAR세포를 250μM의 β-alanine으로 24시간 전처리한 결과 타우린 uptake가 대조군의 38%로 감소하였음을 보고하였고, 또 다른 인체 대장암세포주인 Caco-2세포주에서도 10mM의 β-alanine으로 24시간 전처리한 결과 타우린 uptake가 대조군의 60%로 감소되었음이 Satsu 등<sup>36)</sup>에 의해 보고되어 본 연구의 결과와 일치하고 있다

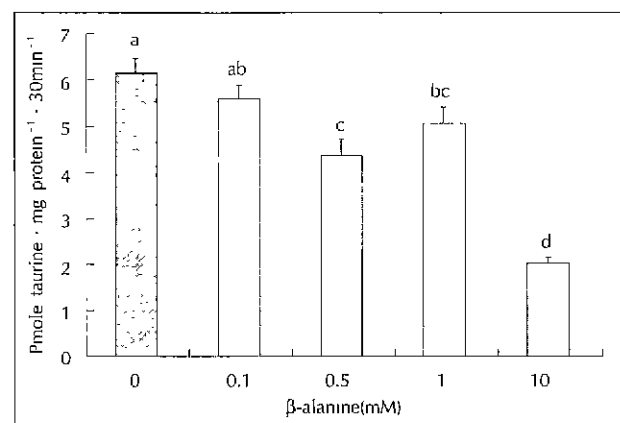


Fig. 2. Effect of β-alanine on taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean ± SEM from a single experiment done in triplicate. Uptake of taurine(50nM) was measured using a 30 minute incubation in the HT-29 cell line(4 days post seeding) treated with varying concentrations of β-alanine(0.1~10mM) for 24 hours. Different alphabets above the bar indicate significant difference among varied β-alanine concentration in the uptake media tested by ANOVA at p < 0.05.

5. HT-29 세포의 분화단계에 따른 타우린수송체의 활성 변화

HT-29세포의 분화단계에 따른 타우린수송체의 활성을 비교하기 위해 HT-29세포를 분주 후 4일, 14일 및 21일간 계속하여 배양시킨 상태에서 타우린 uptake를 측정된 결과, 각기  $0.54 \pm 0.07$ ,  $0.23 \pm 0.03$  및  $0.15 \pm 0.04$  nmole taurine · mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup>로 나타나 분화가 진행될수록 타우린 uptake 활성이 감소함을 알 수 있었다( $p < 0.001$ )(Fig. 3). 본 실험에 이용된 uptake용액의 타우린농도는 10 $\mu$ M이었으며, HT-29세포를 uptake 용액에서 30분간 배양시킨 후 타우린 uptake가 측정되었다.

HT-29세포에서 타우린 uptake의 kinetics를 평가하기

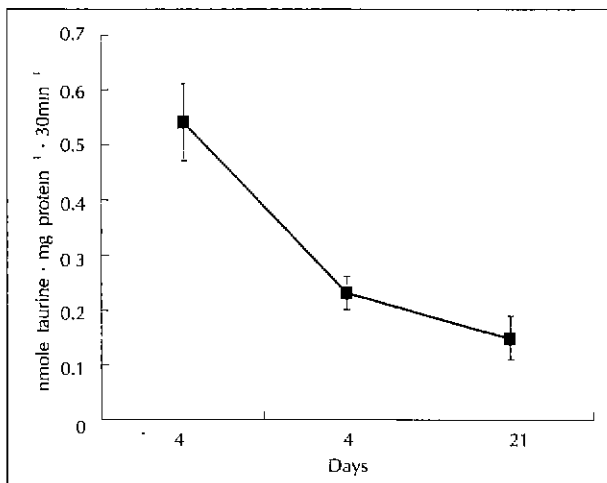


Fig. 3. Changes in taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line at varying differentiation stage. Values are mean  $\pm$  SEM from a single experiment done in triplicate. Uptake of taurine(10 $\mu$ M) was measured in the HT-29 cell line 4, 14 or 21 days post seeding using a 30 minute incubation.

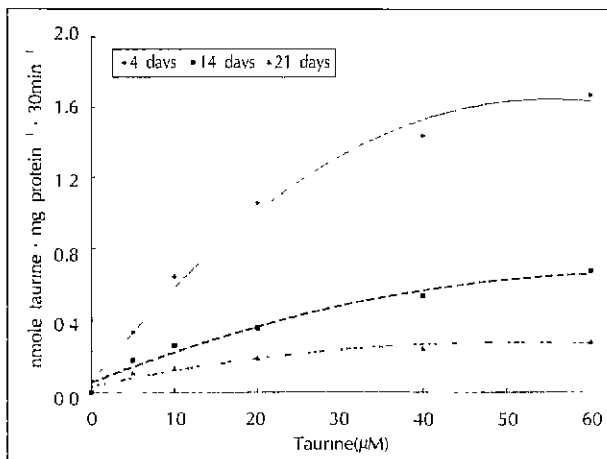


Fig. 4. Kinetics of taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean  $\pm$  SEM from 2 separate experiments done in triplicate. Uptake of taurine was measured in the HT-29 cell line 4, 14 or 21 days post seeding over a taurine concentration range of 5~60 $\mu$ M using a 30 minute incubation.

위해 uptake용액의 타우린농도를 5~50 $\mu$ M로 변화시키면서 30분간 세포내로 이동된 타우린의 함량을 측정하였으며 (Fig. 4). Lineweaver-Burk plot을 이용하여 Vmax와 Km값을 계산한 결과가 Fig. 5와 Table 2에 제시되어 있다. 우선 분주 후 4일이 경과된 HT-29세포를 대상으로 실험을 실시한 결과, 타우린 uptake활성이 농도 의존적으로 증가하였다. 특히 20 $\mu$ M미만의 타우린농도에서 타우린농도와 uptake 수치간에 직선적인 일차함수관계가 성립하였고, 20~60 $\mu$ M의 농도범위에서는 타우린수송체가 점차로 포화되기 시작하여 uptake 수치가 포물선을 나타냈다(Fig 4). 아울러 분주 후 21일이 경과한 HT-29세포의 경우 20 $\mu$ M 타우린농도에서 타우린수송체가 완전히 포화되어 더 이상 uptake활성이 증가하지 않는 hyperbolic curve를 나타냈다(Fig. 4). 이와 같은 현상은 타우린수송체가 전형적인 Michaelis-Menten kinetics를 따르고 있음을 제시하는 것이며, 이는 직선그래프로 변형된 Lineweaver-Burk plot에 의해 재입증되었다(Fig. 5).

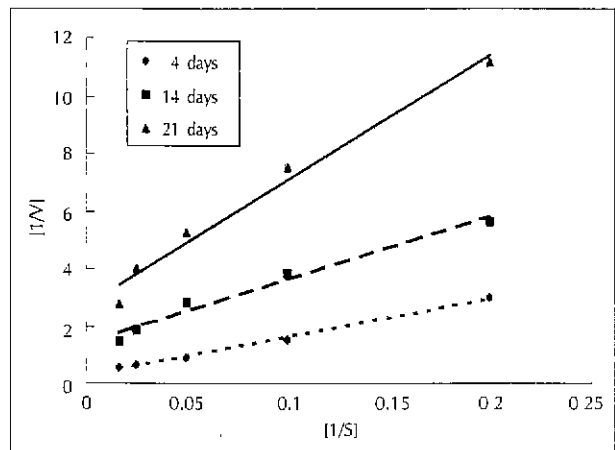


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of active taurine uptake in the HT-29 cell line with varying taurine concentrations of 5~60 $\mu$ M. Taurine uptake was measured in the HT-29 cell line 4, 14 and 21 days post seeding using a 30 minute incubation. The units for V and S are nmole taurine · mg protein<sup>-1</sup> · 30min<sup>-1</sup> and  $\mu$ M, respectively.

Table 2. Changes in the kinetic data of active taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line at varying differentiation stage

	Km ( $\mu$ M)	Vmax (nmole taurine · mg protein <sup>-1</sup> · 30 min <sup>-1</sup> )
4 days	42.3 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	2.8 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
14 days	16.9 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
21 days	11.2 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	0.32 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

Values are mean  $\pm$  SEM from 2 separate experiments done in triplicate. Uptake of taurine was measured in the HT-29 cell line 4, 14, or 21 days post seeding over a taurine concentration range of 5~60 $\mu$ M using a 30 minute incubation. Different superscripts in the same column indicate significant difference among differentiation stage tested by ANOVA at  $p < 0.05$ .

HT-29세포의 분화단계에 따른 타우린수송체의 kinetics 변화 유무를 평가한 결과(Table 2), 분주 후 4일, 14일 및 21일이 경과한 HT-29세포에서 측정된 능동적 타우린수송체의 Vmax값은 각기  $2.79 \pm 0.13$ ,  $0.85 \pm 0.08$ 과  $0.32 \pm 0.01$  nmol · mg protein<sup>-1</sup> · 30min<sup>-1</sup>로 분화가 진행됨에 따라 감소하였고( $p < 0.01$ ), Km값 역시 각기  $42.3 \pm 3.4$ ,  $16.89 \pm 1.7$  및  $11.2 \pm 3.0$  μM로 감소하였다( $p < 0.01$ ). 이와 같은 결과는 HT-29세포의 분화가 진행될수록 용모막을 통한 능동적 타우린수송체의 최대 uptake 속도는 감소하는 한편, 타우린수송체의 친화력은 증가함을 제시하는 것이다. 한편 1993년 Brandsch 등<sup>37)</sup>은 분주 후 3일이 경과된 HT-29세포를 대상으로 타우린 uptake의 kinetics를 평가한 결과 Vmax값이  $954 \pm 26$  pmol · mg protein · 10 min<sup>-1</sup>이었으며, Michaelis-Menten 상수(Km)값은  $9.8 \pm 0.5$  μM로 보고하여 본 연구에서 얻어진 수치와 다소 차이를 보였다.

본 연구의 결과에서 confluent한 상태에 다다른 HT-29세포주가 가장 높은 타우린 uptake활성을 나타냈고, 계속 배양시켜 분화가 진행될수록 타우린 uptake활성이 감소하는 현상은 실험동물의 소장과 소장상피 제조합용모막을 사용한 선행연구들<sup>37-40)</sup>에서 동물의 나이가 증가하면서 소장에서의 타우린운반체 활성이 감소한 것으로 나타난 결과들과도 일치하는 내용이다. 이유 전의 쥐와 성숙한 쥐를 대상으로 소장에서의 타우린흡수를 비교한 Sharafuddin 등<sup>40)</sup>의 연구에 의하면 이유 전의 쥐는 성숙한 쥐에 비해 소장상피세포에 존재하는 타우린수송체의 Km값이 7배, 그리고 Vmax값이 3배 정도 더 높은 것으로 보고되었으며, 이러한 높은 타우린수송체 활성은 이유가 시작되는 생후 21일 후가 되면 성숙한 쥐의 수준으로 감소하는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 이와 같이 어린 동물에서 성숙한 동물에 비해 소장상피세포의 타우린수송체 활성이 더 높게 나타나는 사실은 어린 동물의 경우 조직의 타우린 생합성능력이 저조하고<sup>41)</sup>, 신세뇨관의 미성숙으로 인해 신장의 타우린 재흡수 능력이 낮아서<sup>42)</sup> 체내 타우린 필요량이 성숙한 동물에 비해 더 높다는 사실에 비추어 볼 때 다행스러운 점으로 사려된다.

## 요약 및 결론

본 논문에서는 분화가 되면 소장상피세포의 특성을 나타내는 것으로 알려진 인체 대장암세포주(HT-29세포)를 대상으로 타우린수송체의 기본 특성을 규명하고, 분화단계에 따른 능동적 타우린수송체의 활성 및 kinetics의 변화 유무를 평가하고자 하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, HT-29세포를 분주 후 4일, 14일 및 21일간 배양한

후 소장상피 용모막의 marker enzyme인 alkaline phosphatase와  $\gamma$ -glutamyl transferase 활성을 측정된 결과, 배양시간이 증가할수록 두가지 효소의 활성이 계속 모두 증가하여 분주 후 21일까지 분화가 진행됨을 알 수 있었다.

둘째, HT-29세포에서 타우린 uptake의 시간적 변화를 측정된 결과 180분까지 uptake 활성이 계속 증가하였으며, 특히 처음 60분 동안은 배양 시간에 따른 uptake 활성이 일차함수 관계로 증가하였다.

셋째, HT-29세포에서 타우린수송체의 Na<sup>+</sup>이온 의존성을 평가하기 위해 50nM의 타우린을 포함하는 uptake용액에 NaCl(140mM)대신 동량의 choline chloride를 첨가한 상태에서 타우린 uptake 활성의 시간적 변화를 측정된 결과, 측정된 모든 시간대에서 타우린 uptake가 거의 0에 가깝게 나타났고, 따라서 HT-29세포의 용모막에 Na<sup>+</sup>이온을 필요로 하는 능동적 타우린수송체가 존재함이 입증되었다.

넷째  $\beta$ -alanine이 타우린수송체의 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 HT-29세포를 10mM의  $\beta$ -alanine으로 24시간 전처리한 결과, 타우린 uptake 활성이 전처리하지 않은 대조군의 33%로 유의하게 감소하였고, 따라서 타우린과  $\beta$ -alanine이  $\beta$ -아미노산 운반체를 공유하는 것으로 사려된다.

다섯째, HT-29세포의 분화단계에 따른 타우린수송체 활성의 변화를 평가하기 위해 분주 후 4일, 14일 및 21일이 경과된 세포를 10μM의 타우린이 함유된 uptake 용액에서 30분간 배양시킨 후 측정된 타우린 uptake 수치는 각기  $0.54 \pm 0.07$ ,  $0.23 \pm 0.03$  및  $0.15 \pm 0.04$  nmol taurine/mg protein로 나타나, 분화가 진행될수록 타우린 uptake 활성이 감소함을 알 수 있었다( $p < 0.001$ ).

여섯째, 분주 후 4일, 14일 및 21일간 배양시킨 HT-29세포에서 측정된 능동적 타우린수송체의 Vmax값은 각기  $2.79 \pm 0.13$ ,  $0.85 \pm 0.08$ 과  $0.32 \pm 0.01$  nmol · mg protein<sup>-1</sup> · 30 min<sup>-1</sup>로 분화가 진행됨에 따라 감소하였고( $p < 0.001$ ), Km값 역시 각기  $42.3 \pm 3.4$ ,  $16.89 \pm 1.74$  및  $11.2 \pm 3.0$  μM로 점차 감소하였다( $p < 0.01$ ). 이와 같은 결과는 HT-29세포의 분화가 진행될수록 용모막을 통한 능동적 타우린수송체의 최대 uptake 속도는 감소하는 한편, 수송체의 타우린에 대한 친화력은 증가해 감을 제시하는 것이다.

## Literature cited

- 1) Park T, Rogers QR Effect of dietary taurine on free amino acid concentration in blood and various tissues of cats *Kor J Nur* 28(9) 846-854, 1995
- 2) Huxtable RJ, Lippincott SE Comparative metabolism and taurine-de-

- pleting effects of guanidinoethanesulfonate in cats, mice and guinea pigs. *Arch Biochem Biophys* 210(2) : 698-709, 1981
- 3) Sturman JA, Messing JM, Rossi SS, Hofmann AF, Neuringer M. Tissue taurine content, activity of taurine synthesis enzymes and conjugated bile acid composition of taurine-deprived and taurine-supplemented rhesus monkey infants at 6 and 12 month of age. *J Nutr* 121: 854-862, 1991
  - 4) Chesney RW, Gusowski N, Dabbagh M, Theissen M, Padilla M, Diehl A. Factors affecting the transport of  $\beta$ -amino acid in rat renal brush border membrane vesicles. The role of external chloride. *Biochim Biophys Acta* 812 : 702-712, 1985
  - 5) Hammerman M, Sacktor B. Transport of  $\beta$ -alanine in renal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 509 : 338-347, 1978
  - 6) Bucuvalas JC, Goodrich AL, Suchy FJ. Hepatic taurine transport: A  $\text{Na}^+$ -dependent carrier on the basolateral plasma membrane. *Am J Physiol* 25 : G351-G358, 1987
  - 7) Ramamoorthy S, Del Monte MA, Leibach FH, Ganapathy V. Molecular identity and calmodulin-mediated regulation of the taurine transporter in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr Eye Res* 13 : 523-529, 1994
  - 8) Moyer MS, Insler N, Dumaswala R. The role of chloride in taurine transport across the human placental brush-border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1109(1) : 74-80, 1992
  - 9) Miyamoto YD, Balkovetz DF, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V.  $\text{Na}^+$  +  $\text{Cl}^-$  gradient driven, high affinity, uphill transport of taurine in human placental brush border membrane vesicles. *FEBS Lett* 231 : 263-267, 1988
  - 10) Meiners BA, Speth RC, Bresolin N, Huxtable RJ, Yamamura HL. Sodium-dependent, high-affinity taurine transport into rat brain synaptosomes. *Federation Proc* 39 : 2695-2700, 1980
  - 11) Tiruppathi C, Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Constitutive expression of the taurine transporter in a human colon carcinoma cell line. *Am J Physiol* 263(5 Pt 1) : G625-G631, 1992
  - 12) Bamard JA, Thaxter S, Kikuchi K, Ghishan FK. Taurine transport by rat intestine. *Am J Physiol* 254 : G334-G338, 1988
  - 13) Park T, Lee K, Um Y. Dietary taurine supplementation reduces plasma and liver cholesterol and triglyceride concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutr Res* 18(9) : 1559-1571, 1998
  - 14) Park T, Lee K. Effect of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid levels in rats fed a cholesterol-free diet. *Kor J Nutr* 30(10) : 1132-1139, 1997
  - 15) Gandhi VM, Cherian KM, Mulky MJ. Hypolipidemic action of taurine in rats. *Ind J Exp Biol* 30 : 413-417, 1992
  - 16) Aruoma OL, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256 : 251-255, 1988
  - 17) Green TR, Fellman JH, Eicher AL, Pratt KL. Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1073 : 91-97, 1991
  - 18) Schuller-levis G, Quinn MR, Wright C, Park E. Taurine protects against oxidant-induced lung injury: possible mechanisms of action. In: Huxtable RJ, Michalk DV ed. Taurine in Health and Disease, pp.31-39, Plenum Press, New York, 1994
  - 19) Waterfield CJ, Mesquita M, Parnham P, Timbrell JA. Taurine protects against the cytotoxicity of hydrazine, 1,4-naphthoquinone and carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46 : 589-595, 1993
  - 20) Sturman JA. Taurine in development. *Physiol Rev* 73(1) : 119-147, 1993
  - 21) Panula-Lehto E, Makinen M, Ahtee L. Effects of taurine, hypotaurine and GABA on hypothalamic and striatal dopamine metabolism. *Nuunyn-Schmedeberg Arch Pharmacol* 346 : 57-62, 1992
  - 22) Sturman JA, Palackal T, Imaki H, Moretz RC, French J, Wisniewski HM. Nutritional taurine deficiency and feline pregnancy and outcome. *Adv Exp Med Biol* 17 : 113-124, 1987
  - 23) Chesney RW, Gusowski N, Zeilkovic I, Padilla M. Developmental aspects of renal  $\beta$ -amino acid transport. V: Brush border membrane transport in nursing animals-Effect of age and diet. *Pediatr Res* 20 : 890-894, 1986
  - 24) Zeilkovic I, Stejskal-Lorenz E, Lohstroh P, Budreau A, Chesney RW. Anion dependence of taurine transport by rat renal brush-border membrane vesicles. *Am J Physiol* 256 : F646-F655, 1989
  - 25) Park T, Rogers QR, Morris JG, Chesney RW. Effect of dietary taurine on renal taurine transport by proximal tubule brush border membrane vesicles in the kitten. *J Nutr* 119 : 1452-1460, 1989
  - 26) Chesney RW, Zeilkovic I, Friedman AL, Dabbagh S, Lippincott S, Gusowski N, Stejskal-Lorenz E. Renal taurine transport-recent development. *Adv Exp Med Biol* 217 : 49-59, 1987
  - 27) Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68 : 1035-1040, 1986
  - 28) Guilbano AR, Wood RJ. Vitamine D-regulated calcium transport in Caco-2 cells : unique in vitro model. *Am J Physiol* 260 : G207-G212, 1991
  - 29) Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER, Smith JC. Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J Nutr* 125 : 1291-1299, 1995
  - 30) Raffaniello RD, Wapnir PA. Zinc-induced metallothionein synthesis by Caco-2 cells. *Biochem Med Metab Biol* 45 : 101-107, 1991
  - 31) Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines(HT-29 and Caco-2) by protein kinase C. *Am J Physiol* 264 : G939-G946, 1993
  - 32) Bessey OA, Lowry OH, and Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 164 : 321, 1946
  - 33) Pillion DJ, Jeske AH, and Leibach FH.  $\gamma$ -Glutamyl transferase in the urine from an isolated rabbit kidney perfused with and without DMSO. *Biochem Pharmacol* 25 : 913-918, 1976
  - 34) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
  - 35) Jayanthi LD, Ramamoorthy S, Mahesh VB, Leibach FH, Ganapathy V. Substrate-specific regulation of the taurine transporter in human placental choriocarcinoma cells(JAR). *Biochim Biophys Acta* 1235 : 351-360, 1995
  - 36) Satsu H, Watanabe H, Arai S, Shimizu M. Characterization and regulation of taurine transport in Caco-2, human intestinal cells. *J Biochem* 121(6) : 1082-1087, 1997
  - 37) Stevens BR, Ross HJ, Wright EM. Multiple transport pathways for neutral amino acids in rabbit jejunal brush border membrane vesicles. *J Membr Biol* 66 : 213-215, 1982
  - 38) Wolffram S, Hagemann C, Schaver E. Regulation of a high affinity carrier mediated intestinal transport of taurine in adult cats. *Am J Physiol* 261 : R1089-R1095, 1991
  - 39) Moyer MS, Goodrich AL, Rolfes MM, Suchy FJ. Ontogenesis of taurine transport: Evidence for a  $\beta$ -carrier in developing rat jejunum. *Am J Physiol* 254 : G870-G871, 1988
  - 40) Sharafuddin M, Nassar GM, Nassar CF. Taurine transport across the small intestine of adult and suckling rats. *Comp Biochem Physiol* 91A : 33-36, 1988
  - 41) Hayes KC, Sturman JA. Taurine in metabolism. *Ann Rev Nutr* 1 : 401-425, 1981
  - 42) Zeilkovic I, Chesney RW, Friedman AL, Ahlfors CE. Taurine depletion in very low birth weight infants receiving prolonged total parenteral nutrition: role of renal immaturity. *J Pediatr* 116 : 301-306, 1990