韓國營養學會誌 34(2) : 150~157, 2001

스트레스를 유발시킨 인체 소장상피세포주(HT-29) 모델에서 타우린수송체 활성의 변화*

윤미영** · 박성연** · 박태선§

연세대학교 식품영양학과, 연세대학교 식품영양과학연구소*

Stress-induced Changes of Taurine Transporter Activity in the Human Colon Carcinoma Cell Line(HT-29)*

Yoon, Miyoung** · Park, Sungyoun** · Park, Taesun§

Department of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
*Research Institute of Food and Nutritional Sciences,** Yonsei University, Seoul 120-749, Korea*

ABSTRACT

Intestinal absorption of dietary taurine is one of the regulatory component maintaining taurine homeostasis along with renal reabsorption, bile acid conjugation and secretion, and de novo synthesis of taurine in mammals. Recent observations of decreased enterocytic levels of taurine in response to trauma, infection and surgical insults, postulate the possibility that intestinal taurine absorption might be impaired in such stressed conditions. The aim of the present study was to evaluate changes in enterocytic taurine transporter activity using the human intestinal colon carcinoma cell line, HT-29, in various stress-induced conditions. Pretreatment of the HT-29 cells with dexamethasone, a stress hormone(0.1, 1, 10 or 100μM) for 3 hrs, or with *E. coli* heat-stable enterotoxin(10, 100, or 200nM) for 30 minutes in order to induce the condition of enterotoxigenic infection did not influence taurine uptake as compared to the value found in control cells. In contrast, pretreatment of the cells with cholera toxin(10, 100, 500, or 1000ng/ml) for 3hr or 24hr significantly decreased taurine uptake by HT-29 cells to 40~50% of the value found in untreated control cells. Kinetic studies of the taurine transporter activity were conducted in control and cholera toxin treated HT-29 cells with varying taurine concentrations(2~60μM) in the uptake medium. Pretreatment of the cells with cholera toxin(100ng/ml) for 3hr did not influence the Vmax, but resulted in a 55% increase in the Michaelis-Menten constant(Km) of the taurine transporter compared to those in control cells. These results suggest that cholera toxin-induced reduction in taurine transporter activity in HT-29 cells is associated with decreased affinity of the taurine transporter without altering the amount of transporter protein. Intestinal taurine absorption appears to be reduced in the condition of water-borne diseases caused by bacteria such as *V. cholerae*. This might influence the taurine status of infants and young children more readily, an age group in which the prevalence of intestinal infection is high and the role of intestinal absorption is crucial for maintaining the body taurine pool. (*Korean J Nutrition* 34(2) : 150~157, 2001)

KEY WORDS: taurine transporter, HT-29 cell line, dexamethasone, *E. coli* heat-stable enterotoxin(STa), cholera toxin.

서 론

포유동물에서 타우린은 생체막의 안정화,[1] 담즙산 생성,[2] 항산화작용,[3] 칼슘 항상성의 유지,[4] 해당작용 및 글리코겐 합성의 촉진,[5] 성장 조절,[6] 삼투압 조절,[7] 시력유지[8] 및 면역반응[9] 등과 같은 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 타우린의 생리적 역할에 대한 관심이 고조되면서 체내 타우린 풀의 항상성 유지 및 그 조절 기전에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있다. 일반적으로 타우린의 항상성은 신세뇨관에서의 재흡수, 소장에서의 흡수, 담즙산을 통한 배설, 그리고 조직에서의 생합성조절에 의해 유지되는 것으로 알려져 있다.

음식물로부터 섭취된 아미노산들은 주로 소장상피세포를 통하여 문맥혈로 이동되는데, 이때 소장 상피세포막에 존재하는 수송체 단백질에 의한 능동적 수송이 아미노산 흡수에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 소장상피세포막에는 산성,

접수일 : 2001년 1월 2일
채택일 : 2001년 3월 13일
*This work was supported by grant No. (1999-2-20900-013-5) from the Basic Research Program of the Korea Science & Engineering Foundation.
§To whom correspondence should be addressed.

© 2001 The Korean Nutrition Society

염기성 및 중성 아미노산뿐 아니라 타우린과 같은 β-아미노산에 대한 특정 수송체가 존재한다. 소장에서의 타우린흡수 연구를 위한 *in vitro* 모델로 최근 HT-29 및 Caco-2 세포주의 이용이 증가하고 있는데, 이들 세포주는 인체의 대장암 세포에서 유래된 것으로서 분주 후 일정 시간이 지나 confluent한 상태가 되면 형태학적 및 생화학적으로 성숙한 소장 상피세포의 성질을 나타내는 것으로 알려져 있다.[10] 또한 최근에는 이들 세포주에서 흰쥐, 토끼 및 고양이의 공장에서 발견된 것과 유사하게 sodium 및 chloride 이온 의존성을 나타내는 타우린수송체가 발현됨이 보고되었다.[11,12]

아미노산수송체의 활성은 비교적 넓은 범주의 물질들에 의해서 조절되는데, 예를 들어 혈중 호르몬농도, 그리고 세포내의 신호전달물질들을 비롯하여 각종 cytokines들이 소장상피세포의 아미노산수송체 활성에 영향을 미친다.[13] 스트레스와 연관된 패혈증은 다양한 아미노산의 장내 흡수를 방해하는 것으로 알려져 있으며, 특히 glutamine과 arginine의 흡수를 감소시켜 장관의 생리적 역할, 대사반응 및 면역기능 등에 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 보고되었다[14-18]. 신체가 스트레스를 받게 되면 장세포의 ischemia가 유발되고 이와 연관지어 활성산소 및 nitrogen oxide의 증가, leukotriens, cytokines 및 스트레스호르몬 분비의 증가 등이 수반되는데, 이와 같은 현상들은 타우린을 비롯한 기타 아미노산의 장내 흡수에 영향을 미칠 것으로 추측된다.

타우린은 인체의 십이지장 점막에서 가장 고농도로 존재하는 유리아미노산으로써 총유리아미노산 풀의 약 38%를 차지하며, 대장점막에서도 glutamine에 이어 두 번째로 풍부하여 총유리아미노산 풀의 약 18.3%를 차지한다.[19] 수술, 외상, 중증 질환 등의 스트레스 상황에서 타우린의 혈중농도가 감소할 뿐 아니라,[20-22] 장점막에서의 타우린농도 또한 현저히 감소됨이 보고되었다.[23,24] 다양한 종류의 조직에서 염증반응시 나타나는 조직손상에 대하여 타우린이 보호활성을 나타냄이 관찰된 바 있고,[25-28] 따라서 이러한 상황에서 장세포내 타우린농도가 감소하는 경우 세포의 방어체계에 장애를 유발할 가능성이 있을 것으로 생각된다.

스트레스 상황에서 장세포내 타우린농도가 감소하는 현상을 이해하기 위해서는 소장상피세포를 통한 타우린의 흡수조절을 연구하는 것이 필수적일 것이다. 따라서 본 연구는 HT-29 세포주를 이용하여 다양한 스트레스 상황을 유도하고, 이에 따른 타우린수송체 활성의 변화유무를 평가하고자 시도되었다. 스트레스 발생시 혈중 농도가 증가하는 glucocorticoid 호르몬의 일종인 dexamethasone, 대장균 감염시 문제가 되는 *E. coli* heat-stable enterotoxin, 그리고 콜레라 감염시 수반되는 증상의 원인이 되는 cholera toxin을 이용하여 인체 대장암세포주에 인위적인 스트레스를 유발하였다. 타우린의 생리적 요구도가 높은 어린동물의 경우 성숙한 동물에 비해 소장의 타우린수송체 활성이 더 높고, 타우린의 항상성을 유지하기 위해 장에서의 타우린 흡수에 더 많이 의존한다는 점 등으로 미루어 볼 때,[29,30] 본 연구의 결과는 특히 수인성 감염에 취약한 영유아 집단에서 장내 감염에 따른 타우린 영양상태의 변화 가능성에 대한 기초자료를 제공할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 세포배양

인체 대장암세포주인 HT-29 세포는 175cm^2 culture flask에서 10% heat inactivated fetal bovine serum(FBS), 100u/ml penicillin, 100μg/ml streptomycin, 25μg/ml amphotericin B를 함유한 RPMI 1640을 사용하여 배양시켰다. 개별 실험을 위해 세포주를 분주할 경우 confluent한 상태의 세포를 0.25% trypsin이 함유된 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)을 사용하여 분산시키고, 6-well plate의 각 well(35-mm dish)에 2 × 10^{6}개의 세포를 넣고 배양하기 시작하였다. 세포배양은 5% CO_2가 존재하는 37℃ 배양기에서 진행되었다.

2. 약물의 처리

Dexamethasone(Sigma Chemical, #D8893)을 DMSO에 녹여서 0.1~100μM의 농도 범위로 HT-29 세포에 3시간 동안 전처리한 후, 타우린수송체(uptake) 활성을 측정하였다. *E. coli* heat-stable enterotoxin(Sigma Chemical, #E 5763)을 PBS에 녹여서 10~200nM의 농도로 HT-29 세포에 30분 동안 전처리하고, 타우린 uptake 활성을 측정하였다. Cholera toxin(Sigma Chemical, #C8052)은 PBS에 녹여서 동안 10~1000ng/ml의 농도로 3시간 또는 24시간 동안 HT-29 세포에 전처리한 후 타우린 uptake 활성을 측정하였다.

3. HT-29세포에 의한 타우린수송체 활성 측정

HT-29 세포에 의한 타우린 uptake 활성은 Tiruppathi 등[12]의 방법을 일부 변형하여 세포를 6-well plate에 분주한 후 4 일째 되는 날, 상온에서 측정하였다. 실험에 이용된 uptake 용액의 구성 성분은 다음과 같았다: 25mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES)/hydroxymethyl aminomethane(Tris)(pH 7.5), 140

mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.8mM $CaCl_2$, 0.8mM $MgSO_4$, 5.5mM D-mannitol, 그리고 49nM cold 타우린 및 1nM의 ^{3}H-타우린(NEN Life Science Products, #NET 541). 타우린 uptake 실험을 실시하기 직전, 6-well plate으로부터 세포 배양액을 제거한 후 PBS를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 각 well에 1ml의 uptake 용액을 넣은 후, 30분간 상온에서 배양하여 세포내로 ^{3}H-타우린이 이동하도록 한 후, 흡입장치를 이용해 재빠르게 용액을 제거하고 PBS로 세번 이상 세척하였다. 1ml의 0.1% SDS 용액을 각 well에 넣은 후 실온에서 30분간 방치하여 세포막을 파괴시켰다. 세포 용해액을 scintillation cocktail(Beckman, #S812547)이 담긴 vial에 옮기고, liquid scintillation counter(Beckman, LS6500)를 사용하여 3분간 radioactivity를 측정하였다.

타우린 수송체를 경유하지 않고 단순 확산에 의해 HT-29 세포내로 이동된 타우린 uptake 값은 NaCl 대신 동량의 choline chloride를 uptake 용액에 첨가시킨 상태에서 측정하였다. 능동적 타우린 uptake 값은 NaCl이 존재하는 uptake 용액에서 측정된 총 uptake 값에서 NaCl 대신 choline chloride가 함유된 uptake 용액에서 측정된 uptake 값을 제하여 계산하였다. 타우린 uptake 값은 두번 또는 세번 반복실험의 평균값으로 취하였으며, pmole taurine · mg cell protein^{-1} · 30min^{-1}으로 나타내었다.

4. 타우린 uptake의 kinetics 측정

HT-29 세포에서 타우린 uptake의 kinetics를 평가하기 위해 uptake 용액의 타우린농도를 2~60μM까지 달리하면서 총 uptake 값과 단순 확산에 의한 uptake 값을 측정하였다. 앞에서 설명한 것과 동일한 방법으로 능동적 타우린 uptake 값을 계산하여 Lineweaver-Burk plot으로 변환시키고, 타우린수송체의 Vmax 값과 Km 값을 각기 산출하였다.

각각의 타우린농도에서 얻어진 HT-29 세포의 타우린 uptake 값은 세번 반복실험의 평균값으로 취하였으며, Vmax 값은 nmole taurine · mg cell protein^{-1} · 30min^{-1}으로, 그리고 Km 값은 μM로 제시하였다.

5. 통계분석

모든 분석 결과는 mean ± SEM으로 제시하였고, 각 군의 평균값의 차이는 Student's *t*-test를 실시하여 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0001$ 수준에서 유의성 유무를 검증하였다. 타우린수송체의 Vmax 값과 Km 값은 Lineweaver-Burk plot의 Y 절편과 X 절편 값을 취하여 각기 산출하였다. 모든 통계 처리는 Microsoft EXCEL PC 프로그램을 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

1. Dexamethasone이 타우린수송체 활성에 미치는 영향

스트레스 발생시 혈중에 농도가 증가하는 glucocorticoid 호르몬의 일종인 dexamethasone은 위장관에 여러 가지 해로운 효과를 유발하는 것으로 알려져 있다. 즉, dexamethasone에 의해 위장 점막세포에서 secretory immunoglobulin A(IgA)의 생성이 억제되고, 박테리아가 장관벽에 부착되거나 통과하는 효율이 증가된다.[31-33] 그외에도 glucocorticoid는 장점막의 단백질과 DNA양을 감소시키는 효과가 있으며, 이는 장관문합술등의 수술 후 나타나는 회복장애 현상과 연관이 있을 것으로 생각된다.[34,35] 한편, Caco-2 세포에서 dexamethasone이 glutamine의 흡수를 저해시켰음이 Souba와 Copeland[15]에 의해 보고되면서, 장점막 세포를 통한 아미노산 수송에 있어서 dexamethasone이 좋지 않은 영향을 미칠 수 있음이 제기되었다.

본 연구에서는 스트레스시 glucocorticoid 호르몬 농도가 높아지는 상황과 유사한 환경을 유도하고자 HT-29 세포주를 dexamethasone을 이용하여 전처리한 후 타우린수송체 활성의 변화 유무를 평가하였다. DMSO에 용해시킨 dexamethasone을 HT-29 세포의 배양액에 농도별로 첨가하여 3시간 동안 전처리하고, 50nM의 타우린농도에서 30분동안 세포내로 이동된 타우린의 양을 측정하였다. Dexamethasone을 첨가하지 않고 DMSO만으로 전처리한 대조세포에서 얻어진 타우린 uptake 활성과 dexamethasone을 0.1, 1, 10 및 100μM 농도로 전처리한 세포에서 측정된 타우린 uptake 활성을 비교한 결과 두군간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1). 이와는 대조적으로 또 다른 종류의 인체 대장암세포주인 Caco-2 세포주를 이용한 O'Flaherty 등[36]의 연구결과에 의하면 본 연구에서 사용된 것과 동일한 용량의 dexamethasone으로 전처리한 결과, 2시간 후부터 타우린수송체 활성이 대조세포 수준의 약 50%로 유의하게 감소하여 본 연구에서와 상이한 결과를 나타냈다.

2. *E. coli* heat-stable enterotoxin이 타우린수송체 활성에 미치는 영향

*Escherichia coli*로부터 생성되는 heat-stable enterotoxin (STa)은 유아 및 여행자 설사를 일으키는 가장 흔한 형태의 설사 유발 독소이다.[37,38] 장의 수분균형을 교란시키는 STa의 작용기전은 장세포 융모막의 특정 수용체에 STa가

결합하여[39-41] guanylate cyclase를 활성화시키는 것에서부터 시작되는 것으로 현재까지 알려져 있으며, 그 이후의 과정은 세포내 cyclic GMP(cGMP) 농도가 증가하는 것에 의해 매개될 것으로 추정된다.[41,42]

STa가 HT-29 세포에서 타우린수송체 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 PBS에 용해시킨 STa를 10, 100 및 200nM의 농도로 30분간 세포에 전처리한 후 타우린 uptake를 측정하였다. STa로 전처리한 세포는 PBS만으로 처리한 대조세포와 비교시 타우린 uptake 활성에 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2). 한편 Caco-2 및 HT-29세포주를 대상으로 STa가 타우린수송체 활성에 미치는

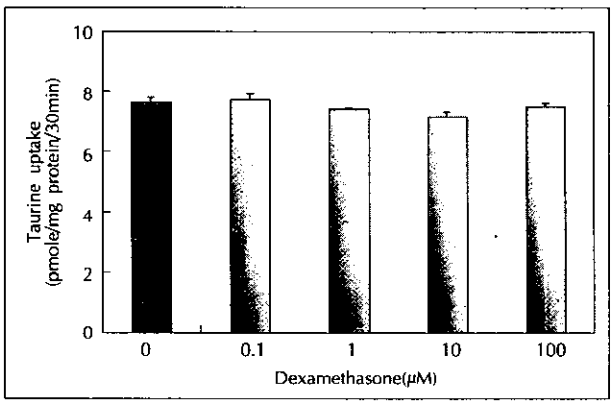

Fig. 1. Effect of dexamethasone treatment on taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean ± SEM from a single experiment done in triplicate. Uptake of taurine(50nM) was measured in the HT-29 cell line 4 days after seeding using a 30 minute incubation. Dexamethasone was added to the HT-29 cells 3hr prior to the taurine uptake experiment. ^{3}H taurine concentration was maintained at 1nM in the uptake solution.

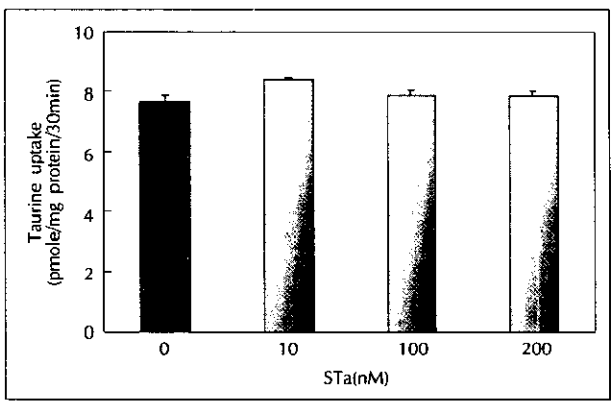

Fig. 2. Effect of *E. coli* heat stable enterotoxin treatment on taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean ± SEM from a single experiment done in duplicate. Uptake of taurine (50nM) was measured in the HT-29 cell line 4 days after seeding using a 30 minute incubation. E. coli heat stable enterotoxin was added to the HT-29 cells 30min prior to the taurine uptake experiment. ^{3}H taurine concentration was maintained at 1nM in the uptake solution.

영향을 측정한 Brandsch 등[43]의 연구결과에 의하면 Caco-2세포주에서는 본 연구에서 사용된 것과 유사한 농도 범위의 STa로 처리시 타우린수송체 활성이 매우 신속하게 감소한 반면, 100nM의 STa로 전처리한 HT-29 세포에서는 타우린수송체 활성에 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 STa 농도를 최고 200nM까지 증가시켜서 HT-29세포에 전처리하였으나, 여전히 타우린수송체 활성에 유의적인 변화를 나타내지 못하였다.

이상의 결과들로부터 소장상피세포주 모델로 사용되는 HT-29 및 Caco-2 세포에 존재하는 타우린수송체는 일반적으로 매우 유사한 성질을 지니고 있음[11,12]에도 불구하고, glucocorticoid 호르몬 또는 enterotoxin에 의한 타우린수송체 활성의 조절 양상이 소장상피세포주의 종류에 따라 상이하게 나타날 수 있음을 알 수 있다. Dexamethasone이 Caco-2 세포에서 타우린수송체 활성을 감소시킨 작용기전에 관하여는 아직까지 명확히 설명되고 있지 않으며, 다만 glucocrticoid 수용체를 경유하여 효과를 나타낼 가능성만이 제기되고 있다.[36] Caco-2 세포주에서 STa가 타우린수송체 활성을 감소시킨 것은 부분적으로 세포내 cGMP농도의 증가와 연관이 있을 것으로 추정되고 있다.[43] 따라서 dexamethasone 및 STa와 같이 수용체를 통해 효과를 유발하는 물질들이 세포주의 종류에 따라 서로 다른 효과를 나타낼 수 있다는 사실은 세포막에 존재하는 수송체의 발현 또는 세포내에서의 수용체 신호전달과정이 HT-29 및 Caco-2 세포에서 서로 다르게 나타날 수 있음을 제시하는 것이다. Cohen 등[41]의 연구에 의하면 Caco-2 세포주에 존재하는 STa 수용체는 STa 수용체에 대한 내인성 ligand로 알려진 guanylin에 대하여 인체의 소장상피세포 융모막에서 발견된 것과 매우 유사한 binding kinetics를 보이는 것으로 밝혀졌다. 따라서 대장균 감염시 인체의 장에서 타우린 흡수가 감소될 가능성이 높을 것으로 생각되며, STa를 통한 타우린수송체 활성의 변화를 연구하기 위해서는 HT-29 세포보다는 Caco-2 세포주가 더 유용한 모델이 될 것으로 사료된다.

3. Cholera toxin에 의한 타우린수송체 활성의 변화

Cholera toxin은 *Vibrio cholerae*로부터 생성되는 설사유발 독소로서 세포내의 cyclic AMP(cAMP) 수준을 현저히 증가시키는 대표적인 물질이다. 본 연구에서는 cholera toxin을 HT-29 세포에 전처리하여 장내의 세균 감염 상황을 유도하였다. Cholera toxin을 1000ng/ml의 농도로 HT-29세포에 3시간 또는 24시간 전처리한 후 hemocytometer를 이용하여 intact한 세포의 수를 측정한 결과 toxin으

로 처리하지 않은 대조세포와 유의적인 차이가 없었고, 따라서 cholera toxin에 의한 cell death는 나타나지 않았음을 알 수 있다. Cholera toxin을 10~1000ng/ml의 농도 범위로 HT-29 세포에 3시간 동안 전처리한 경우 cholera toxin의 농도 의존성은 관찰되지 않았으나, 사용된 모든 농도 범위에서 타우린 uptake 활성이 대조세포의 약 40~49% 수준으로 유의하게 감소되었다(Fig. 3). Cholera toxin의 전처리 시간을 24시간으로 증가시켜 타우린 uptake 활성을 관찰한 결과(Fig. 4), 3시간동안 전처리한 결과에서와 매우 유사하게 타우린 uptake활성이 대조세포의 약 41~50% 수준으로 유의하게 감소하였으며, 농도 의존성은 역시 관찰되지 않았다.

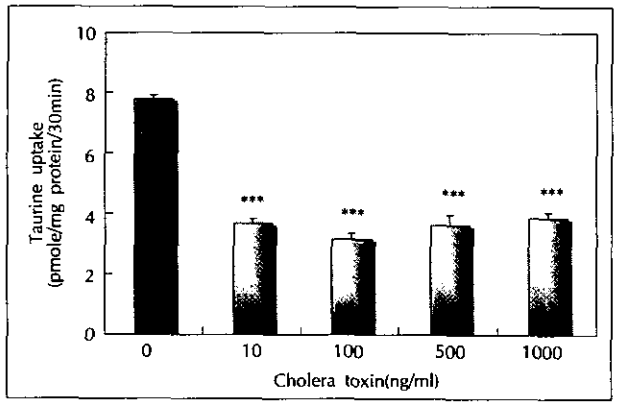

Fig. 3. Decrease in taurine uptake by cholera toxin pretreatment for 3hrs in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean ± SEM from a representative experiment done in triplicate. Uptake of taurine(50nM) was measured in the HT-29 cell line 4 days after seeding using a 30 minute incubation. Cholera toxin dissolved in phosphate-buffered saline was added to the HT-29 cell 3hr prior to the taurine uptake experiment. ^{3}H taurine concentration was maintained at 1nM in the uptake solution. *** : Significantly different from the control cells(cholera toxin, 0ng/ml) by Student's t-test at $p < 0.001$.

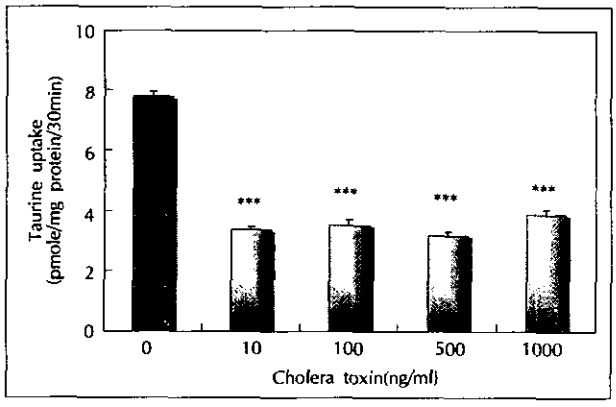

Fig. 4. Decrease in taurine uptake by cholera toxin pretreatment for 24 hrs in the HT-29 colon carcinoma cell line. Values are mean ± SEM from a representative experiment done in triplicate. Uptake of taurine(50nM) was measured in the HT-29 cell line 4 days after seeding using a 30 minute incubation. Cholera toxin dissolved in phosphate-buffered saline was added to the HT-29 cell 24hr prior to taurine uptake experiment. ^{3}H taurine concentration was maintained at 1nM in the uptake solution. *** : Significantly different from the control cells(cholera toxin, 0ng/ml) by Student's t-test at $p<0.001$.

Ganapathy 등[44]은 인체 망막상피세포주(retinal pigmental epithelial cell, HRPE)를 대상으로 cholera toxin의 효과를 평가한 결과, 타우린수송체의 활성과 함께 수송체의 mRNA 합성이 같이 증가하였음을 관찰하였다. 이와는 달리 Miyamoto 등[45]은 HRPE 세포에서 cholera toxin이 타우린수송체의 활성을 높이는 현상은 수송체의 친화력이 증가하였기 때문임을 제시하여 타우린활성을 증가시킨 cholera toxin의 효과에 관하여 Ganapathy와는 다른 견해를 보였다. Ganapathy 등[44]과 Miyamoto 등[45]은 HRPE 세포에서 타우린수송체 활성을 증가시키는 cholera toxin의 작용기전에 관하여 cAMP에 의한 세포내 신호전달과정이 관여함을 제시하였다. 아울러 Caco-2 세포주를 대상으로 한 Brandsch 등[43]의 연구에서도 cholera toxin으로 세포를 4시간 동안 전처리한 결과 세포내 cAMP농도가 증가하였고, 타우린수송체 활성이 감소한 것으로 보고하였다.

이상의 선행 연구결과와 본 연구결과를 종합해 볼 때, cholera toxin 또는 혹은 cAMP가 타우린수송체 활성에 미치는 효과는 세포의 종류에 따라서 다르게 나타나며, STa 또는 dexamethasone의 경우와는 달리 cholera toxin은 HT-29 및 Caco-2 세포주모델에서 타우린수송체 활성에 동일

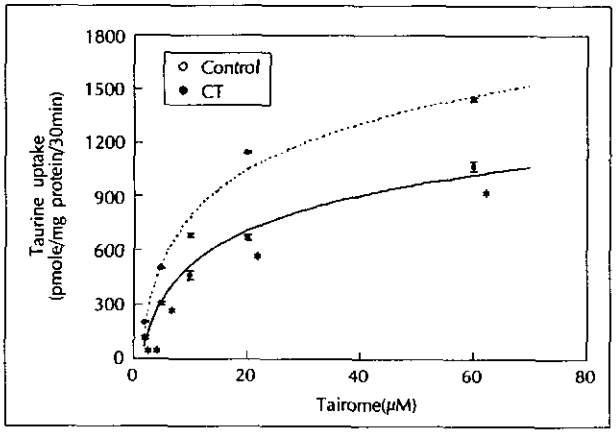

Fig. 5. Changes in kinetics of active taurine uptake in the HT-29 colon carcinoma cell line by cholera toxin pretreatment(CT). Values are mean ± SEM from two separate experiments done in triplicate. Uptake of taurine was measured in the HT-29 cell line 4 days after seeding over a taurine concentration range of 2~60μM using a 30 minute incubation. ^{3}H taurine concentration was maintained at 1nM in the uptake solution. Cholera toxin dissolved in phosphate-buffered saline was added at a concentration of 100ng/ml to the HT-29 cell 3hr prior to the taurine uptake experiment. *,** : Significantly different from the control cells by Student's t-test at $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, respectively.

한 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

4. 타우린수송체의 kinetics 변화

HT-29 세포에서 cholera toxin이 타우린수송체 활성을 감소시키는 작용기전을 규명하기 위해 대조세포와 100ng/ml 농도의 cholera toxin으로 3시간 동안 전처리한 세포에서 타우린 uptake의 kinetics를 비교하였다. HT-29 세포에 의한 타우린 uptake 속도는 uptake 용액내 타우린농도가 증가할수록 10μM까지 매우 빠르게 증가하였으며, 그 이상의 타우린농도에서는 uptake 속도가 차츰 둔화되는 전형적인 Michaelis-Menten kinetics 패턴을 보였다(Fig. 5). Cholera toxin으로 HT-29 세포를 3시간 동안 전처리한 경우 기질(타우린)의 농도변화에 따른 타우린 uptake 속도는 대조세포에서와 동일한 kinetics 양상을 보였다. Cholera toxin으로 전처리시 HT-29세포에 의한 타우린 uptake 값은 2μM 타우린농도에서는 대조세포 수준의 약 59%, 5μM에서는 62%, 10μM에서는 69%, 20μM에서는 59%, 그리고 60μM에서는 74%수준으로 유의적인 감소를 나타냈다(Fig. 5).

Lineweaver-Burk plot을 이용하여 타우린 uptake 활성의 Vmax 및 Km 값을 계산한 결과(Fig. 6), 대조세포에서 타우린수송체의 Vmax 값은 1.53 ± 0.26nmole taurine · mg cell protein^{-1} · 30min^{-1}이며, Km 값은 14.2 ± 0.86μM으로 나타났다. 한편, cholera toxin으로 전처리한 세포에서 얻어진 타우린수송체의 Vmax 값은 1.55 ± 0.15nmole taurine · mg cell protein^{-1} · 30min^{-1}이었으며 Km 값은 22.0 ± 3.02μM으로 나타나, Vmax 값은 두 군간에 차이가 없었으나, Km 값은 cholera toxin으로 전처리한 세포에서 대조세포에 비하여 55% 정도 증가하였다. 본 연구의 결과에서 cholera toxin 전처리에 의해 HT-29 세포에 존재하는 타우린수송체의 Vmax 값에 유의적인 차이가 관찰되지 않은 점과 3시간이라는 비교적 짧은 시간내에 타우린 uptake 활성이 유의적으로 감소한 결과는 cholera toxin이 수송체 단백질의 양에 변화를 초래한 것은 아님을 의미한다. 그보다는 cholera toxin이 타우린수송체의 타우린에 대한 친화성을 감소시키고, 결과적으로 타우린 uptake 활성을 감소시킨 것으로 해석된다. 본 연구의 결과는 콜레라 감염시 타우린의 장내흡수가 현저히 감소할 수 있음을 시사하는 것이며, 특히 수인성 전염병 발병의 위험률이 높은 영유아에서 장내 감염시 타우린 영양상태가 취약해질 가능성이 클 것으로 사료된다.

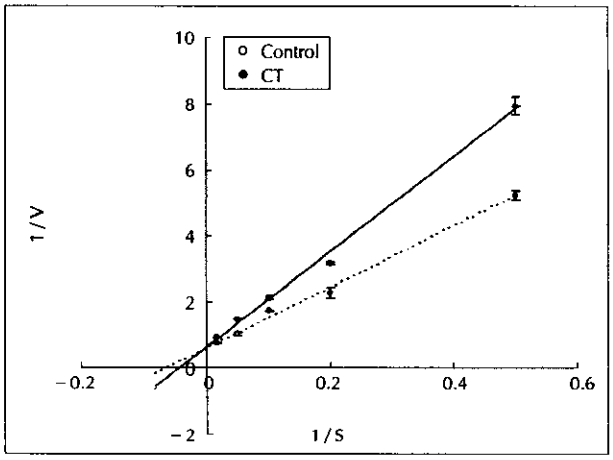

Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of active taurine uptake in the cholera toxin treated HT-29 cell line(CT) or control HT-29 cell line. Values are mean ± SEM from two separate experiments done in triplicate. Uptake of taurine was measured in the HT-29 cell line 4 days after seeding over a taurine concentration range of 2~60μM using a 30 minute incubation. ^{3}H taurine concentration was maintained at 1nM in the uptake solution. Cholera toxin dissolved in phosphate-buffered saline was added at a concentration of 100ng/ml to HT-29 cell 3hr prior to the taurine uptake experiment. The units for V and S are nmole taurine · mg protein^{-1} · 30 min^{-1} and μM, respectively. Calculated Vmax and Km values were 1.53 ± 0.26nmol taurine · mg protein^{-1} · 30min^{-1} and 14.2 ± 0.86μM for control cells, and 1.55 ± 0.15nmole taurine · mg protein^{-1} · 30min^{-1} and 22.0 ± 3.02μM for cholera toxin treated cells, respectively.

요약 및 결론

본 논문에서는 장내 감염 또는 스트레스 상황에서 소장조직의 타우린농도가 감소하는 현상에 대한 작용기전을 연구하고자 HT-29 세포주에 dexamethasone, *E. coli* heat-stable enterotoxin(STa) 및 cholera toxin을 이용하여 인위적인 스트레스를 유발하고 타우린수송체 활성의 변화 유무를 평가하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, 스트레스 호르몬인 dexamethasone이 타우린수송체 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 HT-29 세포를 0.1, 1, 10, 또는 100μM의 dexamethasone으로 3시간 동안 전처리한 결과, 대조세포와 비교시 타우린수송체 활성에 유의적인 변화가 나타나지 않았다.

둘째, 소장점막이 대장균 감염에 의한 독소에 노출되었을 때 장세포의 타우린수송체 활성의 변화를 평가하기 위하여 HT-29 세포를 10, 100 또는 200nM의 STa로 30분간 전처리한 결과 타우린 uptake 활성에 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

셋째, 콜레라 감염시 장세포내 타우린수송체 활성의 변화를 평가하기 위하여 cholera toxin을 10, 100, 500, 또는 1000ng/ml 농도로 3시간 또는 24시간 동안 HT-29 세포에

처리한 결과, 두가지 시간대에서 모두 대조세포의 40~50% 수준으로 타우린 uptake 활성이 유의적으로 감소되었다($p < 0.001$).

넷째, cholera toxin에 의한 타우린수송체의 kinetics 변화를 평가하기 위하여 HT-29 세포를 100ng/ml 농도의 cholera toxin으로 3시간 동안 전처리한 후, 능동적 타우린 수송체 활성을 측정하였다. Cholera toxin은 타우린 uptake의 최고속도(Vmax)는 변화시키지 않았으나, 수송체의 타우린에 대한 친화력(Km)을 감소시키는 것으로 관찰되었다.

이상의 연구결과를 종합하면 cholera toxin은 소장 상피세포에서 타우린수송체의 타우린에 대한 친화력을 감소시키므로서 타우린 uptake 활성을 저해하였고, 이와같은 결과는 콜레라 감염시 타우린의 장내 흡수가 현저히 감소할 수 있음을 시사하는 것이다.

Literature cited

1) Pasantes-Morales H, Wright CE, Gaull GE. Taurine protection of lymphobalstoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol* 34(12): 2205-2207, 1985
2) Hofmann AF, Small DM. Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Ann Rev Med* 18: 333-376, 1967
3) Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine, and their metabolic precursors. *Biochem J* 256: 251-255, 1988
4) Takahashi K, Harada H, Schaffer SW, Azuma J. Effect of taurine on intracellular calcium dynamics of cultured myocardial cells during the calcium paradox. *Adv Exp Med Biol* 315: 153-61, 1992
5) Kulakowski EC, Maturo J. Hypoglycemic properties of taurine not mediated by enhanced insulin release. *Biochem Pharmacol* 33(18): 2835-2838, 1984
6) Hayes KC, Stephan ZF, Sturman JA. Growth depression in taurine-depleted infant monkeys. *J Nutr* 110(10): 2058-2064, 1980
7) Thurston JH, Hauhart RE, Dirgo JA. Taurine: a role in osmotic regulation of mammalian brain and possible clinical significance. *Life Sci* 26(19): 1561-1568, 1980
8) Geggel HS, Ament ME, Heckenlively JR, Martin DA, Kopple JD. Nutritional requirement for taurine in patients on long-term parenteral nutrition. *N Engl J Med* 312(3): 142-146, 1985
9) Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: The role of taurine. *Nutrition* 14: 599-604, 1998
10) Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* model for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68: 1035-1040, 1986
11) Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Liebach 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
12) Tiruppathi C, Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Liebach FH. Constitutive expression of the taurine transporter in a human colon carcinoma cell line. *Am J Physiol* 263: G625-G631, 1992
13) O'Flaherty L, Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. Intestinal taurine transport: a review. *Eur J Clin Invest* 27(11): 873-880, 1997
14) Salloum RM, Copeland EM, Souba WW. Brush border transport of glutamine and other substances during sepsis and endotoxemia. *Ann Surg* 213(5): 401-409, 1991
15) Souba WW, Copeland EM. Cytokine modulation of Na^+ dependent glutamine transport across the brush border membrane of monolayers of human intestinal Caco-2 cells. *Ann Surg* 215: 536-544, 1992
16) Gardiner KR, Gardiner RG, Barbul A. Reduced intestinal absorption of arginine during sepsis. *Crit Care Med* 23(7): 1227-1232, 1995
17) Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, Fukushima R. Arginine-supplemented diets improves survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulation of bacterial clearance. *Ann Surg* 217(6): 644-653, 1993
18) Adjei AA, Yamauchi K, Nakasone Y, Konishi M, Yamamoto S. Arginine-supplemented diets inhibit endotoxin-induced bacterial translocation in mice. *Nutrition* 11(4): 371-374, 1995
19) Ahlman B, Leijonmarck CE, Wernerman J. The content of free amino acids in the human duodenal mucosa. *Clin Nutr* 12: 266-271, 1993
20) Gray GE, Landel AM, Meguid MM. Taurine supplemented total parenteral nutrition and taurine status of malnourished cancer patients. *Nutrition* 10: 11-15, 1994
21) Paauw JD, Davis AT. Taurine concentrations in serum of injured patients and age and sex matched healthy controls. *Am J Clin Nutr* 52: 657-660, 1990
22) Paauw JD, Davis AT. Taurine supplementation at three different dosages and its effect on trauma patients. *Am J Clin Nutr* 60: 203-206, 1994
23) Ahlman B, Ljungqvist O, Persson B, Bindslev L, Wernerman J. Intestinal amino acid content in critically ill patients. *J Parenteral Enteral Nutr* 19(4): 272-278, 1995
24) Ahlman B, Ljungqvist O, Andersson K, Wernerman J. Free amino acid in the human intestinal mucosa: impact of surgery and critical illness. *Clin Nutr* 14: 54-55, 1995
25) Gorden GE, Shaked AA, Solano DF. Taurine protects hamster bronchioles from acute NO_2-induced alterations. *Am J Pathol* 125: 585-600, 1986
26) Masuda M, Horiksaka K, Koeda T. Effect of taurine on neutrophil function in hyperlipidaemic rats. *Jpn J Pharmacol* 40: 478-480, 1986
27) McLoughlin DM, Stapleton PP, Bloomfield FJ. Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response. *Biochem Coc Trans* 19: 73-78, 1991
28) Waston RGW, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Taurine upregulates antimicrobial function of human inflammatory cells. *Surg Forum* 45: 679-681, 1994
29) Moyer MS, Goodrich AL, Rolfes MN, Suchy FJ. Ontogenesis of taurine transport: Evidence for a β-carrier in developing rat jejunum. *Am J Physiol* 254: G870-G871, 1988
30) Sharafuddin M, Nassar GM, Nassar CF. Taurine transport across the small intestine of adult and suckling rats. *Comp Biochem Physiol* 91A: 33-36, 1988
31) Alverdy J, Aoys E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired immunodeficient state. *Ann Surg* 214(6): 719-723, 1991
32) Alverdy J, Aoys E. The effect of dexamethasone and endotoxin administration on biliary IgA and bacterial adherence. *J Surg Res* 53(5): 450-454, 1992
33) Spitz JC, Ghandi S, Taveras M, Aoys E, Alverdy JC. Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress. *Crit Care Med* 24(4): 635-641, 1996
34) Park JH, McCusker RH, Mohammadpour H, Blackwood DJ, Horbek M, Vanderhoof JA. Dexamethasone inhibits mucosal adaptation after small bowel resection. *Am J Physiol* 266(3 pt1): G497-G503, 1994
35) Kim CS, Buchmiller TL, Fonkasrud EW, Phillips JD. The effect of anabolic steroids on ameliorating the adverse effect of chronic cor-

ticosteroids on intestinal anastomotic healing in rabbits. *Surg Gynecol Obstet* 176(1): 73-79, 1993

36) O'Flaherty L, Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. Dexamethasone and lipopolysaccaride regulation of taurine transport in Caco-2 cells. *J Sur Res* 69: 331-336, 1997

37) Levine MM. *Escherichia coli* that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377-389, 1987

38) Farthing MJG. Travellers' diarrhea. *Gut* 35: 1-4, 1994

39) Giannella RA, Luttrell M, Thompson M. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to receptors on rat intestinal cells. *Am J Physiol* 245: G492-G498, 1983

40) Guarino A, Cohen MB, Overmann G, Thompson MR, Giannella RA. Binding of *E. coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinal brush borders and to basolateral membranes. *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026, 1987

41) Cohen MB, Jensen NJ, Hawkins JA, Mann EA, Thompson MR, Lentze MJ, Giannella RA. Receptors for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin in human intestine and human intestinal cell line(Caco-2). *J Cell Physiol* 156: 138-144, 1993

42) Field ML, Graf H, Laird WJ, Smith PS. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: *in vitro* effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2800-2804, 1978

43) Brandsch M, Ramamoorthy S, Marczin N, Catravas JD, Liebach JW, Ganapathy V, Liebach FH. Regulation of taurine transport by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and guanylin in human intestinal cell lines. *J Clin Invest* 96: 361-369, 1995

44) Ganapathy V, Ramamoorthy JD, Del Monte MA, Liebach FH, Ramamoorthy S. Cyclic AMP-dependent up-regulation of the taurine transporter in a human retinal pigment epithelial cell line. *Curr Eye Res* 14(9): 843-850, 1995

45) Miyamoto Y, Marczin N, Catravas JD, Del Monte MA. Cholera toxin enhances taurine uptake in cultures of human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 15(3): 229-236, 1996