

무기비소에 의한 마우스 간의 단백질 발현 조절: 단백체 분석

진보환 · 성제경 · 류덕영*
서울대학교 수의과대학

Regulation of Protein Expression in Mouse Liver by Inorganic Arsenic: Proteomic Analysis

Bohwan Jin, Je Kyung Seong, and Doug-Young Ryu*

College of Veterinary Medicine and BK21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received April 7, 2006 / Accepted June 5, 2006)

ABSTRACT : Background: Inorganic arsenic is a human carcinogen that can target the liver, but its carcinogenic mechanisms are still unknown. Inorganic arsenic induces a spectrum of tumors including hepatocellular carcinoma in mice. Methods: Pregnant C3H mice were supplied with drinking water containing 50 ppm sodium arsenite during their pregnancy. The protein expression profile in the liver of 0.5-day-old male offsprings exposed transplacentally to sodium arsenite was analyzed using protein 2D gel electrophoresis followed by mass spectrometry (MALDI-TOF). Results: Expression of proteins such as hydroxymethylglutaryl-CoA synthase mitochondrial precursor (HMG-CoA synthase), β -actin (cytoplasmic 1) and apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV) were induced in mouse liver by sodium arsenite, while uricase (urate oxidase), guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1 (RACK1) and fructose-bisphosphate aldolase B (Aldolase 2) were down-regulated. Summary: Expression of proteins that have been implicated in carcinogenesis, such as HMG-CoA, β -actin, and RACK1, was regulated in the liver of mice transplacentally exposed to inorganic arsenic.

Key words : arsenic, water, liver, mouse, HMG-CoA synthase, RACK1, proteomics

서 론

우리 주변에는 다양한 금속 (metal)이나 반금속 (metalloid)들이 있다. 이 중 3가 혹은 5가의 형태로 존재하는 비소는 독성이 매우 강하다고 알려져 있다 (Rojas *et al.*, 1999). 비소는 공기, 물, 흙 등에 분포되어 있고, 호흡기나 경구를 통하여 노출된다 (Liu *et al.*, 2001).

ATSDR (Agency for Toxic Substances & Disease Registry)에서 발표하는 CERCLA Priority List (ATSDR, 2005)는 비소를 상위에 위치하여 위험성을 알려주었다. 비소로 인한 독성작용은 다양한 장기에서 나타나며, 주로 피부에서의 작용이 잘 알려져 있다. 무기비소가 소량의 농도로 음수를 통하여 만성적으로 노출되었을 때 피부암이나 방광암 또는 폐암을 일으킬 수 있다는 보고가 있다 (Brown and Ross, 2002). 음수에 존재하는 비소의 농도는 국가에 따라 다른데 아르헨티나, 칠레, 태국, 멕시코, 인도, 미국에서 높게

나타났다 (Rojas *et al.*, 1999).

비소는 embryogenesis 단계에서 노출된 실험동물에서 독성을 나타내었다 (Lammon and Hood, 2004). 태반을 통하여 비소에 노출된 마우스는 기형을 가지고 태어나거나, 성체가 되었을 때 간 조직에서 종양이 발생한다 (Waalkes *et al.*, 2003; Waalkes *et al.*, 2004). 본 연구에서는 태반을 통하여 비소에 노출되어 태어난 마우스와 정상적으로 태어난 마우스의 간 조직에서 단백질 발현 차이를 비교하여 보았다.

재료 및 방법

실험동물

8주령의 C3H/He 마우스 암컷과 수컷을 사용하였다 (Samtako, Osan, Korea). 마우스는 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 12시간 명암주기를 유지하며 사육하였다. 일주일의 순화기간 동안 수컷은 정상의 물 (HPLC-grade water, Tedia, Fairfield, OH)과 사료 (Purina 5057, Purina, St Louis, MO)를 공급하였고, 암컷은 비소 (AsNaO_2 , 50 ppm)가

*To whom requests for reprints should be addressed at dryu@snu.ac.kr.

함유된 물과 사료를 공급하였다. 순화기간이 지난 후 수컷과 암컷의 비가 1:3의 비율로 교배를 하였다. 교배 기간 동안에는 모두 비소가 함유된 물을 공급하였다. 일주일간의 교배기간이 지난 후 수컷을 제거하고 출산이 될 때까지 사육하였다. 태아가 태어날 때까지 매일 관찰하였으며, 태어난 직후 24시간 내에 태아의 간 조직을 확보하여 본 연구에 사용하였다.

단백질 추출

동결 보관된 마우스 간 조직 100 mg을 sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% w/v CHAPS, 2% Pharmalyte pH 3-10, 100 mM DTE)에 넣어서 분쇄한 후, 4°C에서 50,000 rpm의 속도로 1시간 원심분리를 실시하였다. 상층액을 새로운 tube에 회수하여 DNase (Roche, Basel, Switzerland, 2.5 mg/ml)와 RNase (Roche, Basel, Switzerland, 2.5 mg/ml)를 첨가 한 후 20°C에서 30분간 반응시켰다. Bradford법을 이용하여 추출한 단백질의 농도를 측정하였다. 추출한 단백질용액 sample은 1mg씩 tube에 분주하여 -80°C에서 보관하였다.

2D-PAGE (2 dimension polyacrylamide gel electrophoresis)

동량의 단백질이 함유된 용해액의 용량을 450 µl로 만든 후, 각각의 샘플을 immobilized pH gradient (IPG) strip (pH 3-10, nonlinear, IPG Drystrips, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 이용하여 10시간 정도 재수화과정을 실시하여 gel 속으로 흡수시켰다. 재수화 과정이 끝난 후 strip을 30 V의 전압으로 3시간, 100 V의 전압에서 1시간, 200 V의 전압에서 1시간, 500 V의 전압에서 1시간, 1,000 V

의 전압에서 1시간, 마지막으로 8,000 V의 전압에서 22시간 동안 전기영동하여 단백질을 분리한다. IEF 과정이 끝나면 각 strip을 20% glycerol, 2% SDS, 10 mM tributyl phosphine (TBP)이 함유된 0.01% bromophenol blue (BPB) 등이 들어있는 6 M urea를 이용하여 평형화시켰다. SDS EttanDalt system을 이용하여 SDS가 함유된 gel을 이용하여 20°C에서 2 W/gel의 조건으로 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Coomassie G-250 (Bio-rad, Hercules, CA)으로 염색을 하였다 (Park *et al.*, 2004).

단백질 구상화 및 분석

염색된 gel을 GS-800 Calibrated Densimeter (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 탐지하였고, Melanie III (Gen-Bio, Geneva, Switzerland)을 이용하여 분석을 실시하였다. 탐지된 2장의 gel의 영상은 서로 대조하여 달리 발현된 spot을 찾아내었다.

MALDI-TOF를 이용한 Mass Spectrometry

발현의 차이가 보이는 gel의 spot을 잘라내었다. 잘라낸 gel 조각을 물로 1시간 동안 세척을 한 후, 40% ethanol, 100% Acetonitrile (ACN), 50 mM Ammonium bicarbonate (ABC, pH 8.0)이 함유된 용액을 이용하여 미리 silicon 처리가 된 튜브에 넣고 10분씩 3회 반응시켰다. 반응이 끝난 gel 조각은 진공증착기를 사용하여 탈수시킨 후, gel 조각을 0.1-0.2 µg의 trypsin이 함유된 50 mM의 ABC에 넣어 부풀렸다. 37°C의 온도에서 ABC용액을 더 첨가하여 Gel 조각이 원래의 크기가 될 때까지 반응시켰다. MALDI/MS에 사용할 수 있도록 reversed-phase columns을 이용하여 trypsin이 처리된 peptide를 5% formic acid를 사용하여 평형화시

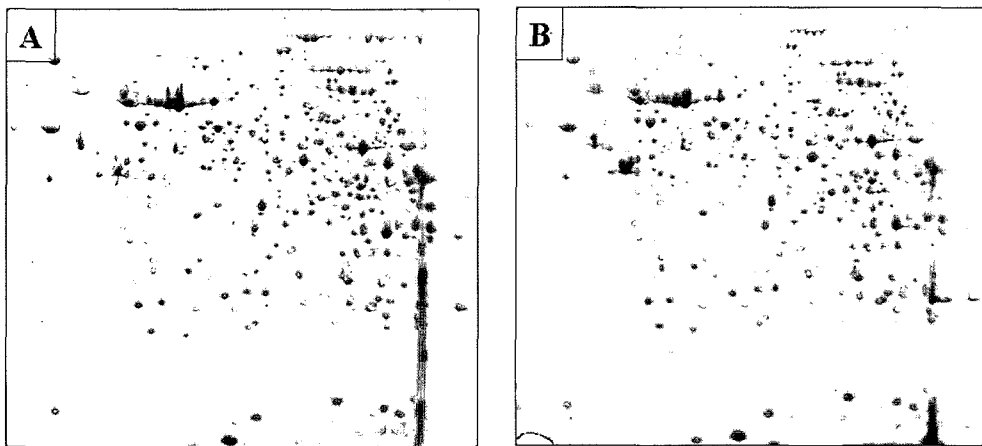


Fig. 1. 2-DE images of master gel visualized by Coomassie blue staining (A, Control mouse livers; B, Sodium arsenite-exposed mouse livers).

Table 1. List of identified proteins that exhibited significant differential expression in the liver of 0.5-day-old male mice exposed transplacentally to sodium arsenite.

Protein name	accession #	sequence coverage (%)	M.W(Da)//pI	Species	Control mouse	Arsenic mouse	ratio	As / Cont
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	P60710	34	41737/5.3	mouse	0.508653	1.49135	2.93196	2.93195951
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial precursor (HMG-CoA synthase) (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase)	P54869	32	53787/8.0	mouse	0.251744	0.531901	2.112865	2.11286466
Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV) (ApoA-IV)	P06728	46	45029/5.4	mouse	0.17978	0.34098	1.896651	1.89665146
Fructose-bisphosphate aldolase B (Liver-type aldolase) (Aldolase 2)	Q91Y97	31	39507/8.5	mouse	1.68611	0.313891	5.37163	0.18616282
Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1 (Receptor of activated protein kinase C 1) (RACK1) (Receptor for activated C kinase) (p205) (12-3)	P68040	69	35077/7.6	mouse	0.219578	0.102232	2.14784	0.46558398
Uricase (Urate oxidase)	P25688	51	35039/8.5	mouse	0.352235	0.186663	1.88701	0.52993882

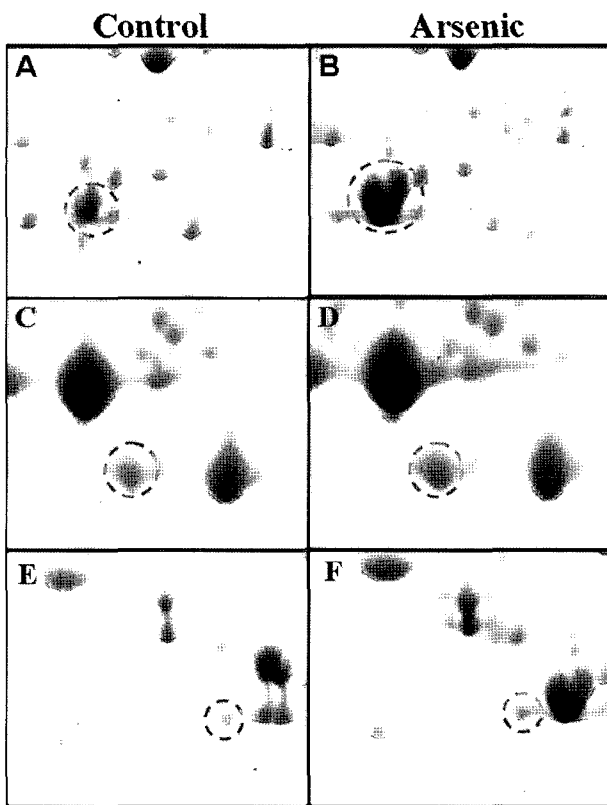


Fig 2. 2-DE images of proteins up-regulated in the liver of 0.5-day-old male mice exposed transplacentally to sodium arsenite (A, B, β -Actin; C, D, HMG-CoA; E, F, Apo-A IV).

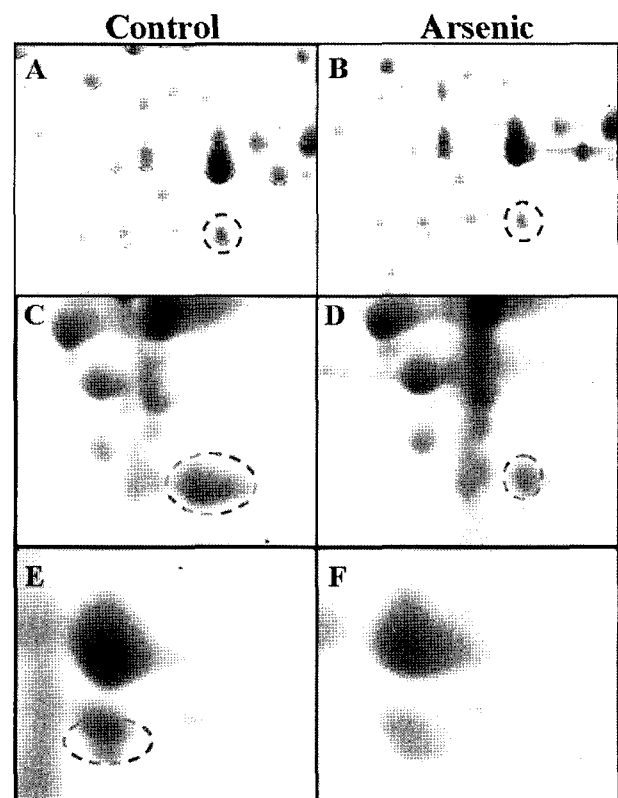


Fig 3. 2-DE images of proteins down-regulated in the liver of 0.5-day-old male mice exposed transplacentally to sodium arsenite (A, B, RACK 1; C, D, Aldolase 2; E, F, Uricase).

켰다. a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)을 2 μ l 첨가하여 희석시킨 후 MALDI plate에 넣었다 (96x2, Applied

Biosystems, Foster city, CA). 분리한 단백질 spot의 규명을 위하여 단백질 질량분석기인 MALDI-TOF (Applied

Biosystems, Forster City)를 이용하였다. Swiss-Prot과 NCBI 데이터베이스인 MS-FIT (Protein Prospector, UCSF, San Francisco, CA)을 사용하여 분석된 단백질을 검색하였다.

결과 및 고찰

모체를 통하여 비소에 노출된 마우스 간 조직의 단백질 변화를 측정하기 위하여 2-D PAGE를 사용하였다. 비소에 노출된 간 조직과 정상의 간 조직에서 차이가 나는 단백질은 총 629개로 나타났다 (Fig. 1). 그 중 4배 이상 발현의 차이가 나는 단백질은 4개이며, 2배 이상의 차이가 나는 단백질은 38개로 나타났다. 분석이 완료되어 규명된 단백질은

6개 (Table 1, Fig. 2, Fig. 3)이며, 발현의 차이를 보이는 10개의 단백질은 분석이 되지 않았다 (Fig. 4).

Swiss-Prot과 MS-FIT을 사용하여 분석이 완료된 단백질 (Table 1, Fig. 2, Fig. 3) 중 β -actin (cytoplasmic 1), Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase mitochondrial precursor (HMG-CoA synthase), Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV)은 발현이 증가하였고, Fructose-bisphosphate aldolase B (Aldolase 2), uricase (Urate oxidase), guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1 (RACK1)은 발현이 감소하였다. 발현이 변화된 유전자들의 특징을 살펴보면 다음과 같다.

환경물질에 노출된 종양세포에서 유전자의 변화가 나타나

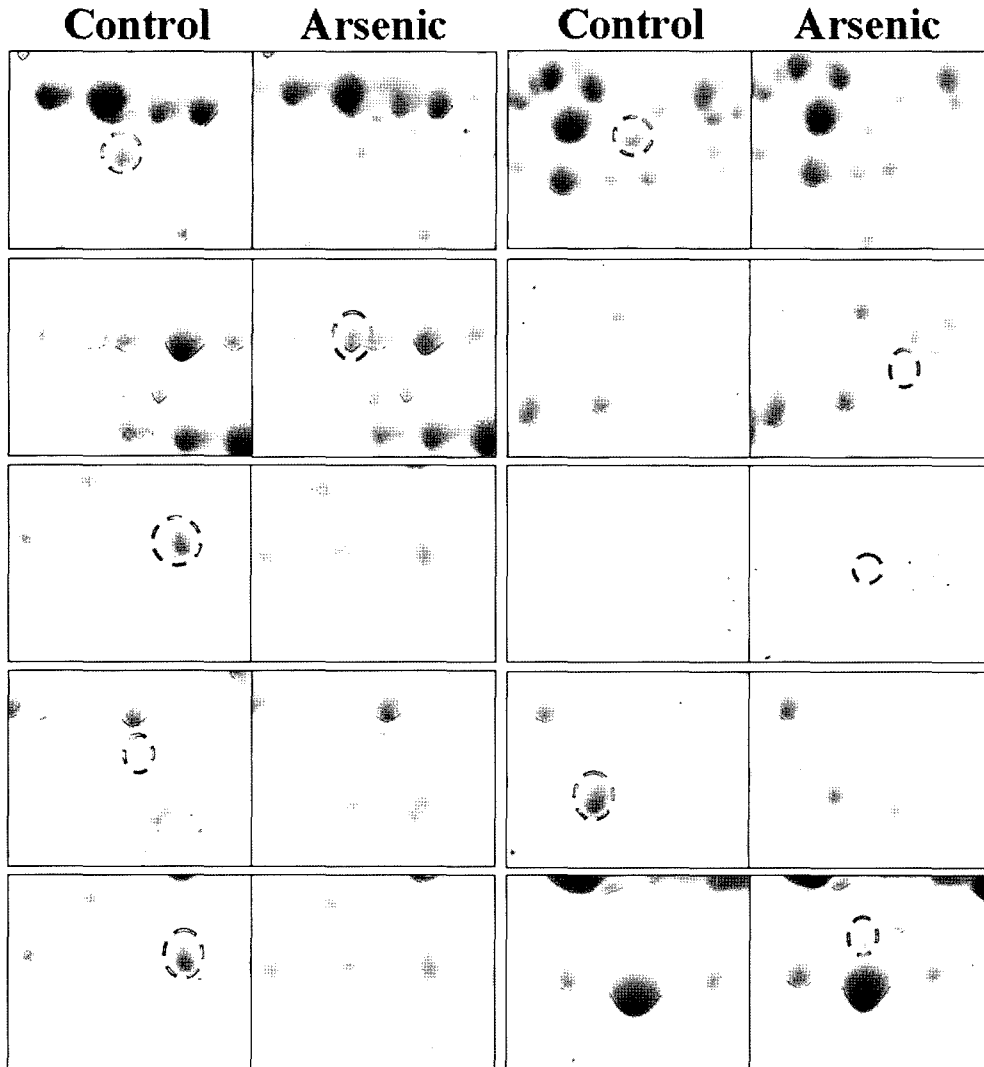


Fig 4. 2-DE images of unidentified proteins differentially expressed in the liver of 0.5-day-old male mice exposed transplacentally to sodium arsenite.

는데, 그 중에 β -actin이 포함되어 있다. 랫트의 간암 조직 세포에서 세포골격유전자인 α -tubulin, β -actin, γ -actin의 mRNA의 발현이 정상의 간세포보다 증가되었다 (Lee *et al.*, 1998). 본 연구에서도 랫트의 간암조직세포와 마찬가지로 β -actin의 발현이 증가되었다. β -actin의 발현 증가는 비소의 노출과 관련이 있다고 생각한다.

Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase mitochondrial precursor (HMG-CoA synthase)는 콜레스테롤 합성의 전구체이며, acetyl-CoA에서 케톤체를 형성하게 하는 물질이다. 미토콘드리아 간질에 케톤체의 형성을 위한 효소가 존재한다. 암이나 다른 감염이 일어나면 지방산 (Fatty acid)의 산화나 ketogenesis 등의 신체의 반응이 나타난다 (Memon *et al.*, 1992). 간의 ketogenesis는 미토콘드리아에서 HMG-CoA synthase의 과발현이 원인이다 (Valera *et al.*, 1994). 비소가 처리된 마우스의 간 조직에서 HMG-CoA 유전자 변화를 확인하였으나, 갓 태어난 마우스였기 때문에 육안적인 병변은 확인할 수 없었다. 종양에 의하여 Ketogenesis가 발생하였다면, HMG-CoA 유전자의 영향을 받을 것이라고 생각한다. 간 종양이 발생한 성체 마우스를 이용하여 확인해야 할 것이다.

Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV)는 지질 대사와 관련된 유전자이며, Phenobarbital을 rat에 처리한 후 간 조직에서의 발현이 감소가 된다는 보고는 있었으나 (Shibutani *et al.*, 2002), 아직 종양의 발생과 관련되는 보고가 되어있지 않다.

Fructose-bisphosphate aldolase B (Liver-type aldolase, Aldolase 2)은 태아기일 때 간에서 발현하는 특징적인 유전자이다 (Zhao *et al.*, 1994). 간에서의 Aldolase 2 유전자의 발현은 인슐린이나 글루카곤과 같은 호르몬에 의하여 조절된다 (Takano *et al.*, 2000). 당성분이 풍부한 사료를 랫트에 공급하였을 때 랫트 혈장의 인슐린 수치와 Aldolase 2의 발현이 증가하는 반면, 혈장 글루카곤의 수치는 상대적으로 감소한다 (Gomez *et al.*, 1994). Uric acid의 대사에 관련된 효소인 Uricase(Urate oxidase)는 마우스의 간에서만 발현이 된다고 보고되었다 (Shiokawa and Tanuma, 2001).

Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1 (Receptor of activated C kinase, RACK1)은 세포의 성장주기 중 G0/G1을 길게 하여 세포의 성장을 억제한다. Rack1은 Vav2, Rho, GTPases, Stat3, Myc 등의 유전자를 억제하는 Src를 조절하기 위하여 발현이 되며, 이를 통하여 부분적으로 G1기의 억제를 유도한다 (Mamidipudi *et al.*, 2004). 비소에 의하여 RACK1 유전자의 발현이 조절되어 정상세포 및 종양세포의 성장에 영향을 준다고 생각된다.

본 연구를 통해서 태반을 통하여 비소에 노출된 마우스

간 조직 단백질에서 종양의 발생과 관련이 있다고 알려진 HMG-CoA와 종양세포에서 발현이 변화되는 β -actin의 증가, 세포의 성장을 억제하는 RACK1의 감소를 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술 개발사업 (Eco-technopia 21 project)”의 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- ATSDR (2005). CERCLA Priority List of Hazardous Substances for 2005.
- Brown, K.G. and Ross, G.L. (2002). Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol.*, **36**, 162-174.
- Gomez, P.F., Ito, K., Huang, Y., Otsu, K., Kuzumaki, T. and Ishikawa, K. (1994). Dietary and hormonal regulation of aldolase B gene transcription in rat liver. *Arch Biochem Biophys.*, **314**, 307-314.
- Lammon, C.A. and Hood, R.D. (2004). Effects of protein deficient diets on the developmental toxicity of inorganic arsenic in mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.*, **71**, 124-134.
- Lee, C.H., Bradley, G. and Ling, V. (1998). Increased P-glycoprotein messenger RNA stability in rat liver tumors in vivo. *J Cell Physiol.*, **177**, 1-12.
- Liu, S.X., Athar, M., Lippai, I., Waldren, C. and Hei, T.K. (2001). Induction of oxyradicals by arsenic: implication for mechanism of genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**, 1643-1648.
- Mamidipudi, V., Zhang, J., Lee, K.C. and Cartwright, C.A. (2004). RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol.*, **24**, 6788-6798.
- Memon, R.A., Feingold, K.R., Moser, A.H., Doerrler, W. and Grunfeld, C. (1992). In vivo effects of interferon-alpha and interferon-gamma on lipolysis and ketogenesis. *Endocrinology.*, **131**, 1695-1702.
- Park, J.Y., Seong, J.K. and Paik, Y.K. (2004). Proteomic analysis of diet-induced hypercholesterolemic mice. *Proteomics.*, **4**, 514-523.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Poirier, L.A. and Ostrosky-Wegman, P. (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res.*, **443**, 157-181.
- Shibutani, M., Takahashi, N., Kobayashi, T., Uneyama, C., Masutomi, N., Nishikawa, A. and Hirose, M. (2002). Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by phenobarbital treatment in a medium-term rat liver bioassay. *Carcinogenesis.*, **23**, 1047-1055.
- Shiokawa, D. and Tanuma, S.I. (2001). Isolation and characterization of the DLAD/Dlad genes, which lie head-to-head with the genes for urate oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.*, **288**, 1119-1128.
- Takano, Y., Iuchi, Y., Ito, J., Otsu, K., Kuzumaki, T. and Ish-

- ikawa, K. (2000). Characterization of the responsive elements to hormones in the rat aldolase B gene. *Arch Biochem Biophys.*, **377**, 58-64.
- Valera, A., Pelegrin, M., Asins, G., Fillat, C., Sabater, J., Pujol, A., Hegardt, F.G and Bosch, F. (1994). Overexpression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in transgenic mice causes hepatic hyperketogenesis. *J Biol Chem.*, **269**, 6267-6270.
- Waalkes, M.P., Liu, J., Chen, H., Xie, Y., Achanzar, W.E., Zhou, Y.S., Cheng, M.L. and Diwan, B.A. (2004). Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J Natl Cancer Inst.*, **96**, 466-474.
- Waalkes, M.P., Ward, J.M., Liu, J. and Diwan, B.A. (2003). Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **186**, 7-17.
- Zhao, Y., Tsutsumi, R., Yamaki, M., Nagatsuka, Y., Ejiri, S., and Tsutsumi, K. (1994). Initiation zone of DNA replication at the aldolase B locus encompasses transcription promoter region. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5385-5390.