

한우의 자궁내막세포에서 발현되는 Two-pore Domain 포타슘 통로

강다원^{1,2*} · 김은숙¹ · 양혜영¹ · 최창용³ · 한재희^{1,2}
¹경상대학교 의과대학 생리학교실

Expression of Two-pore Domain K⁺ Channels in Endometrial Cells of Korean Cattle

D. Kang^{1,2*}, E. S. Kim¹, H. Y. Yang¹, C. Y. Choe³ and J. Han^{1,2}

¹Department of Physiology, College of Medicine Gyeongsang National University

SUMMARY

Endometrial cells play important roles in implantation and during pregnancy. This study was carried out to identify whether two-pore domain K⁺ (K_{2P}) channels are expressed in endometrial cells of Korean cattle. K_{2P} channels set the resting membrane potential of many kinds of neuronal cells in the central and peripheral nervous systems. RT-PCR data showed that TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2, and TRAAK were expressed in bovine endometrial cells, and the mRNA expression levels were similar between endometrial cells with or without endometritis. The protein expression was confirmed by using commercially available polyclonal antibodies (TASK-3, TREK-1, TREK-2, and TRAAK). TASK-3 and TREK-1 were expressed in all area of endometrial cells including nuclei, while TREK-2 and TRAAK were expressed in all area of cells except nuclei. These results demonstrate for the first time the presence of K_{2P} channel in endometrial cells of Korean cattle.

(Key words : two-pore domain K⁺ channel, endometrial cell, Korean cattle, endometrium)

서 론

자궁내막(endometrium)은 자궁의 내면에 있는 점막으로 보통 자궁의 중간 부위인 체부의 내부를 덮고 있는데, 자궁근층(myometrium)에 가까운 부분을 기저층, 내강에 가까운 부분을 기능층이라고 하며, 그 아래를 해면층이라고 한다. 기능층은 난소에서 나오는 스테로이드 호르몬에 반응하여 주기적으로 구조와 기능이 변화하며 월경시에 배출되지만, 기저층은 남아서 내막을 재생시킨다. 자궁내막은 수정된 배아의 착상이 일어나는 기관으로 자궁의 안을 감싸고 있는 상피 세포 조직이다. 자궁내막 조직은 상피세포, 섬유아세포류인 기질세포와 자궁근층으로 구성되어 있다.

임신은 progesterone과 estradiol-17β의 작용에 의해 자궁상피세포에 수정란이 부착하면서 자궁 기질 탈락 등의 과정을 거치게 된다(Rice와 Chard, 1998). 최근 자궁내막 상피세포와 기질세포는 사이토카인의 분비와 작용을 담당하는 것으로 알려져 있다(Young 등, 2004). 이러한 사이토카인의 작용은 착상 및 면역 작용에 관여하는 것으로 생각되며, 부적절한 사이

토카인의 분비는 유산 및 자궁내막염 등을 초래할 수 있다는 내용이 보고되었다(Kelly 등, 2001). 따라서 자궁내막세포는 정상적인 생식기능에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

세포막에는 세포의 생리 기능을 조절하는 칼슘 (Ca²⁺), 포타슘 (K⁺), 소듐 (Na⁺) 등의 이온들이 세포 안팎으로 이동할 수 있는 이온 통로가 다수 존재한다. 이러한 이온 통로를 통한 이온들의 움직임에 의해 세포의 흥분성은 조절되며, 막전압의 변화, 신경 전달 물질, 기계적 자극 등과 같은 다양한 자극들에 의해 이온 통로의 개폐는 조절된다. 특히, 포타슘 통로를 통해 이동하는 포타슘 이온은 세포 내에서 가장 높은 비율을 차지하는 중요한 이온으로써 세포의 안정막 전압을 적정한 수준으로 맞춘다.

최근 자궁근층에서 two-pore domain K⁺ (K_{2P}) 통로의 발현이 보고되었다. K_{2P} 통로는 포유류의 중추신경계에 주로 분포하며, 세포의 흥분성을 조절하고, 세포의 안정막 전압 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다. K_{2P} 통로의 구조는 두 개의 큰 부분(pore domain)이 하나의 소단위(subunit)를 이루고, 이 소단위 두 개가 합쳐져서 하나의 기능적인 통로를 구성한다.

* 본 연구는 농촌진흥청 현장협력기술개발사업(과제번호: 2007-0401080057)의 지원에 의해 이루어진 것임.

² 경상대학교 의과대학 건강과학연구원(Institute of Health Sciences, College of Medicine, Gyeongsang National University)

³ 농촌진흥청 축산과학원 가축유전자원시험장(Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA)

* Correspondence : E-mail : dawon@gnu.ac.kr

K_{2P} 통로는 생리적 또는 병리적 상태에서 세포막의 흥분성을 조절하고, 세포내 포타슘 항상성에 관여하며, 막전압 의존성 및 칼슘 의존성 포타슘 통로의 억제제인 tetraethylammonium (TEA), 4-aminopyridine(4-AP) 및 Cs^+ 등에 잘 반응하지 않는다(Lesage and Lazdunski 2000). 지금까지 16종의 K_{2P} 유전자가 사람으로부터 클로닝되었고, 이 중 13개가 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. K_{2P} 통로는 6개의 아종(subfamily)으로 분류할 수 있다(Goldstein 등, 2001; Patel 등, 2001; Kim, 2005). TWIK (tandem pore domain weak inwardly rectifying K^+ channel: TWIK-1과 TWIK-2), THIK (tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel: THIK-1과 THIK-2), KCNK7, TREK (TWIK-related K^+ channel)/TRAAK (TWIK-related arachidonic acid-stimulated K^+ channel: TREK-1, TREK-2 및 TRAAK), TASK (TWIK-related acid-sensitive K^+ channel: TASK-1, TASK-3 및 TASK-5), TALK (TWIK-related alkaline pH activated K^+ channel: TALK-1, TALK-2 및 TASK-2) 및 TRESK (TWIK-related spinal cord K^+ channel: TRESK-1과 TRESK-2)가 포함된다. 그들 중 KCNK7, THIK-2 및 TASK-5는 독립적인 이온 통로 역할을 하지 않는 것으로 알려져 있다. 그리고 TWIK-1과 TWIK-2가 독립적인 이온 통로로서의 기능을 하는지에 대해서는 상반되는 연구 결과가 있다.

본 연구에서는 사람 및 동물에서 생리학적으로 중요한 역할을 하는 K_{2P} 통로의 발현을 처음으로 한우의 자궁내막세포에서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 배양액

본 연구에 이용된 한우 자궁은 도축장으로부터 회수하여 아이스팩을 이용하여 냉장 상태로 운반하였고, 자궁내막세포 분리 및 배양에는 100 U/ml penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA)이 첨가된 TCM-199/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA)을 사용하였다.

2. 자궁세포 분리

멸균된 가위로 자궁 조직을 채취하고 오염 요인에 노출된 조직은 70% 알코올에 살짝 담갔다가 TCM-199/DMEM으로 3회 세척하였다. 자궁내막 조직의 일부를 잘라내어 기본 배양액에 수차례 세척하고 세절판에 올려 칼로 내막 조직을 세절한 후 0.25% trypsin-EDTA를 조금씩 떨어뜨리면서 되도록 잘게 세절하였다. 세절된 조직을 15 ml tube로 옮겨, 0.25% trypsin-EDTA를 최종 용량이 3 ml 되도록 넣어 37°C 배양기에서 5분간 배양하였다. 배양 후, 세절된 조직을 원심 분리기(Labofuge 400, Heraeus®, Germany)를 이용하여 1,000 rpm(194

g)에서 10분간 원심 분리시켜 상층액을 제거하고 새로운 TCM-199/DMEM 5 ml를 넣어 pipetting하고 다시 세절된 조직을 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리시키는 순서로 세척과 원심 분리 과정을 2회 더 반복하였다. 상층액을 제거한 후 새로운 배양액 3 ml를 채워 culture flask(25 cm², Nunc, Roskilde, Denmark)에 조심스럽게 분주하였다. 세포의 분주 형태 및 양을 현미경으로 관찰하여 37°C, 5%의 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 1일 후 오염 및 배양 상태를 확인하고 3일 후 배양액을 2 ml 첨가하여 7일 동안 배양 상태를 확인하였으며, 세포의 부착 상태를 확인한 후 배양액 교환 여부를 결정하였다.

3. 역전사 증합 효소 증합 반응(RT-PCR)

Total RNA는 TRIzol(Invitrogen, USA)을 사용하여 정상 및 자궁내막염을 가진 자궁내막세포에서 추출하였다. 추출된 total RNA는 Superscript preamplification system(Invitrogen, USA)과 oligo(dT)를 이용하여 cDNA로 합성되었다. 합성된 cDNA는 소(bovine) K_{2P} 통로의 특정 영역 primer를 이용하여 증폭하였다(Table 1). 증폭산물은 염기 서열 분석을 통하여 확인하였다. 각 유전자의 mRNA 발현량은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 발현량으로 정량·비교하였다.

4. 면역 세포 화학 염색 방법을 이용한 K_{2P} 통로의 동정

한우의 자궁 내막 세포에서 K_{2P} 통로의 존재를 확인하기 위하여 면역 세포 화학 염색 방법으로 자궁내막세포를 염색하였는데, 일차 항체(primary antibody)로는 K_{2P} 통로 중 상업적으로 판매되고 있는 항체, TREK-1, TREK-2, TRAAK, TASK-3 및 TREK-2(Alomone labs, Jerusalem, Israel)를 사용하였다. 고정액으로는 4% paraformaldehyde가 들어 있는 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.3)을 사용하여 세포를 실온에서 30분간 고정하였으며, 고정 후 PBS로 세포를 5분간 3번 세척하였다. 비특이적 반응의 억제를 위해 1시간 30분 동안 실온에서 Triton X-100을 포함한 normal goat serum으로 세포를 전처리하였다. 세포들은 세척없이 일차 항체에 4°C에서 16시간 동안 노출되었으며, 대조군은 일차 항체 대신 일차 항체 희석 용액에 노출되었다. 16시간 후 일차 항체를 PBS로 세척하고 이차 항체(secondary antibody)를 1시간 30분 동안 실온에서 처리하였으며, 이차 항체의 반응 후 세포를 PBS로 3번 이상 세척한 후 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)으로 K_{2P} 통로의 발현을 조사하였다.

5. 통계학적 분석 및 실험 성적의 처리

실험 결과의 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 이용하여 처리구간의 유의성을 검정하였다($p < 0.05$).

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Channel name	GenBank Acc. No.	Primer sequences(5'-3')	Expected size(bp)
TASK-1	XM_597401	Sense: ACACCTTCGTGAAGTACCTG Antisense: GGATGTAGACGAAGCTGAAG	287
TASK-3	XM_588194	Sense: CTACGTGGCCTTTAGCTTTA Antisense: GTCGGTAAAGCTGTGTAACC	433
TREK-1	NM_174686	Sense: CTGATTTGCTGGATCCTAAG Antisense: CTGATTTGATTGGAGGTGTT	364
TREK-2	XM_603455	Sense: GAAACTCTCCAACAACAGC Antisense: GAGAGTGACCACCACAAAGT	395
TRAAK	XM_869390	Sense: GACACCAACTCAACCAGTAAC Antisense: GTCACCACCACGAAGTAGAT	401

결 과

1. 자궁세포의 분리

자궁내막세포의 분리 및 배양법을 확립하고 동결·용해 후

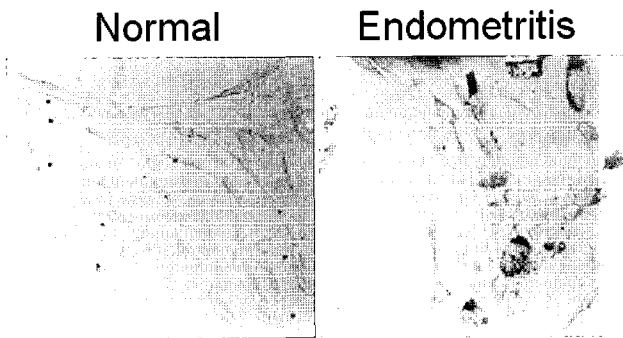


Fig. 1. Photomicrographs of endometrial cells. The cells were observed with a phase-contrast inverted microscope. Scale bar, 80 μm.

계대 배양을 실시하여 세포들의 생존성을 확인하였다. 본 연구에서는 자궁내막 상피세포와 기질세포를 따로 분리하지는 않았다. 상피세포는 다면체 형태를 띠며 나선형으로 자라고, 기질세포는 길쭉한 형태를 띠며 상피세포보다 오래 살고, 빠르게 증식하는 것으로 알려져 있는데(홍 등, 2003), 정상 자궁과 자궁내막염이 있는 조직으로부터 세포를 분리 배양한 결과, 배양 3일째 Fig. 1과 같은 세포의 형태를 나타내었다.

2. 자궁내막 세포에서 발현되는 K_{2p} 통로

정상 자궁과 자궁내막염이 있는 자궁의 내막으로부터 분리된 내막세포에서 K_{2p} 통로의 mRNA 발현을 조사하였다. 내막세포에서 TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 발현을 확인하였으나, 자궁내막염이 있는 자궁의 내막세포에서 이들 통로의 발현 변화가 확인되지 않았다(Fig. 2). 예비 실험 결과, 조직에서의 K_{2p} 통로의 발현 정도가 자궁내막염과 정상 조직에서 유의한 차이를 보였지만, 본 연구에서는 내막세포에서 K_{2p} 통로의 유의한 발현 변화를 관찰하지 못하였다.

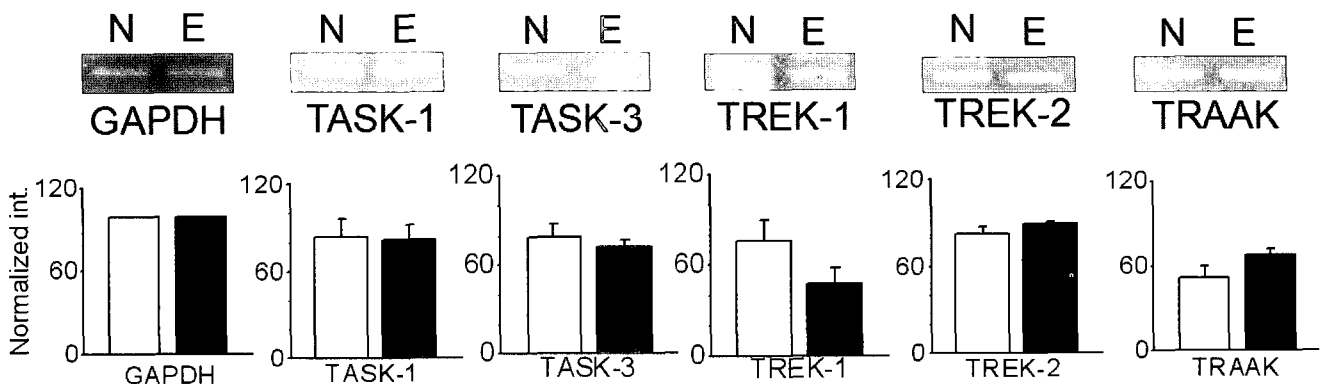


Fig. 2. The relative mRNA expression of K_{2p} channels in endometrial cells. The expression levels were normalized to GAPDH. Normal(N) vs endometritis(E)

자궁내막 세포에서 면역 염색법을 이용하여 K_{2P} 통로의 발현 형태 및 존재 여부를 확인하였는데, 상업적으로 판매되는 항체 중 소와 교차 반응(cross reaction)이 없는 항체만을 선택하여 실험하였다. 산양은 소와 교차 반응을 나타내는 것으로 알려져 있다(Jackson Immuno Research Lab. Inc.). TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 항체를 이용하여 자궁내막세포에서 K_{2P} 통로 발현을 조사한 결과, TASK-3와 TREK-1은 핵을 포함한 세포 전역에 발현하는 반면 TREK-2와 TRAAK은 핵을 제외한 세포 전역에 발현하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

고 찰

본 연구를 통하여 처음으로 K_{2P} 통로가 한우의 자궁내막 세포에서 발현함을 확인할 수 있었다. K_{2P} 통로 중 유일하게 TREK-1이 소의 부신피질 섬모대(adrenal zona fasciculata cell)에서 클로닝되고 부신피질 세포에서 전기생리학적 실험 기법으로 기록되었다(Enyeart 등, 2002). 본 연구에서는 한우의 자궁내막세포에서 TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 mRNA 및 단백질이 발현함을 확인하였다. 본 연구에서 K_{2P}

통로의 기능적인 발현을 전기생리학적 실험기법으로 확인하지는 못하였지만 생리학적, 병리학적 조건에서 K_{2P} 통로가 자궁의 기능을 도울 것으로 추정된다.

포타슘 통로는 세포의 증식 및 분화에 관여하는데, 이들의 활성도는 자궁내막암(endometrial cancer) 및 자궁암(uterine cancer)의 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 중간 크기의 전도도를 나타내는 칼슘 활성화 포타슘 통로(intermediate-conductance- Ca^{2+} -activated K^+ channel), HERG, 막전압 의존성 포타슘 통로($Kv2$)의 발현 변화가 보고되었고(Wang 등, 2007; Suzuki와 Takimoto, 2004; Cherubini 등, 2000), K_{2P} 통로 중 TASK-3는 유방암 및 전립선암에서 발현율이 증가하며(Patel과 Lazdunski, 2004), 흑색종세포(melanoma cell)에서 TASK-3는 핵에 강하게 발현되는 것으로 보고되고 있다(Pocsai 등, 2006).

지금까지 K_{2P} 통로의 발현과 분포 형태는 주로 중추신경계에서 연구되어져 왔으나, 최근 그들의 발현 양상이 자궁 조직 및 세포에서 지속적으로 연구되고 있다. TASK-1과 TREK-1이 임신한 여성의 자궁근층에서 우세하게 발현하는 것이 확인되었고, 자궁 수축력을 조절할 것으로 유추되었다. 특히, 세

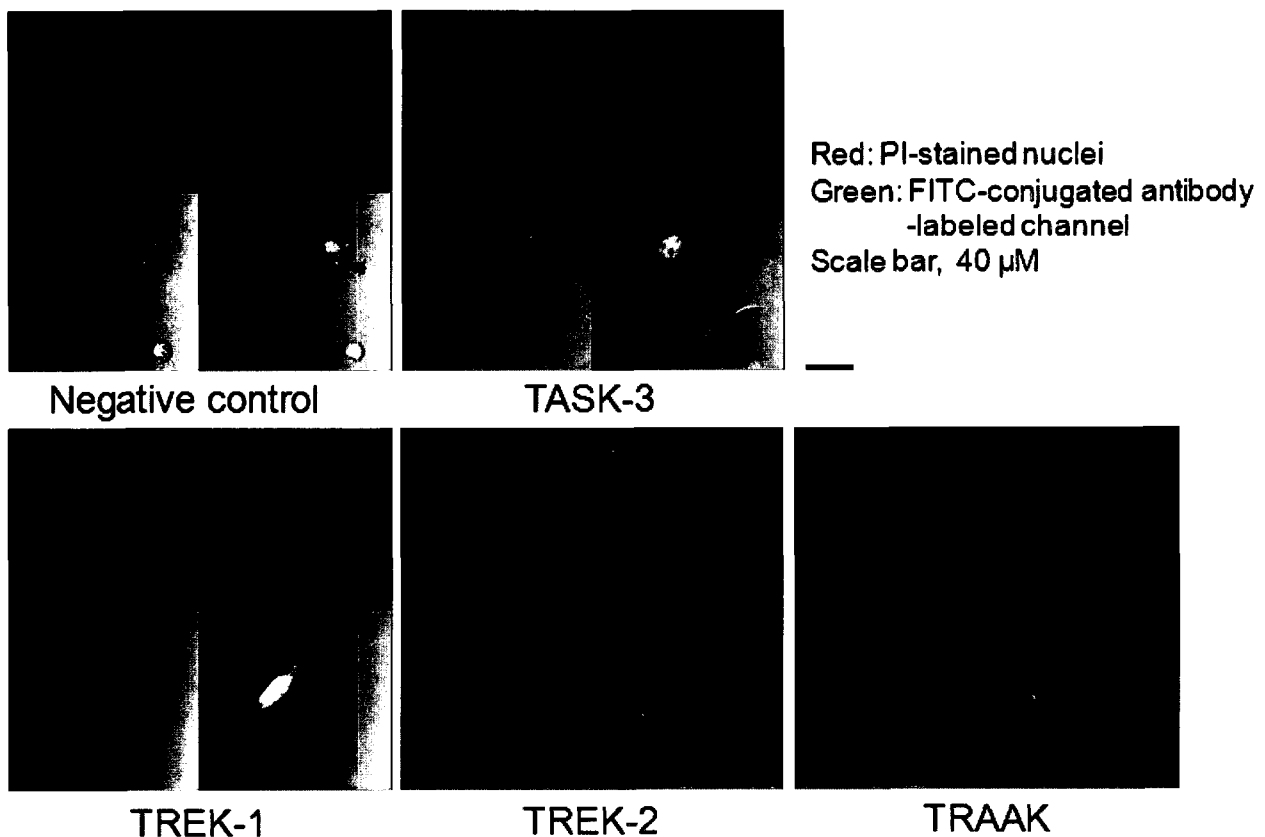


Fig. 3. Expression and localization of K_{2P} channels in endometrial cells of Korean cattle. Primary antibodies were omitted as a negative control. PI, propidium iodide; FITC, fluorescence isothiocyanate.

포 신전에 의해 활성화되는 TREK-1 통로는 임신동안 팽창되는 자궁근층에 더 큰 영향을 줄 것이라고 보고하였다(Bai 등, 2005b). TREK-1과 TRAAK은 임신 또는 임신이 이루어지지 않은 자궁근층 모두에서 발현되었으며, TREK-1의 발현은 임신된 조직에서 유의하게 증가하였다(Jennifer 등, 2005). 임신 시 사람의 세포영양막세포(cytotrophoblast)에서 TASK-1과 TREK-1이 우세하게 발현하고(Bai 등, 2005a), 인간의 태반 영양막 세포에서는 TASK-1과 TASK-2의 발현을 보고하였다. 특히 TASK-1은 세포영양막세포의 세포막에 분포하면서 융합세포영양막세포(syncytiotrophoblast cell)의 항상성 및 물질 수송에 관여할 것으로 예상하였다(Bai 등, 2006). TASK-1은 사람의 태반 조직에서 발현되었으며, 태반의 혈관 긴장도(vascular tone)를 조절할 것이라고 보고하였다(Wareing 등, 2006). 사람의 자궁근층에서 다양한 기능을 할 것으로 예상되는 K_{2P} 통로의 정확한 기능을 알기 위해서는 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 비록 자궁내막염이 있는 자궁내막세포에서 K_{2P} 통로의 발현 변화가 관찰되지는 않았지만 한우의 자궁내막세포에서 발현되는 K_{2P} 통로는 자궁의 생리 작용, 자궁내막염 및 자궁암 등과 같은 여러 자궁 관련 질병에 관여할 가능성이 높을 것으로 생각된다.

적 요

임신의 성립 및 유지에 중요한 역할을 하는 자궁내막세포에 K_{2P} 통로의 존재를 확인하기 위하여 본 연구를 수행하였다. K_{2P} 통로는 일반적으로 중추신경계에 풍부하게 존재하면서 세포의 안정막 전압을 유지시킨다. 역전사 중합 효소 중합 반응과 면역 세포 화학 염색 방법을 이용하여 자궁내막세포에 존재하는 K_{2P} 통로를 조사한 결과, TASK-1, TASK-3, TREK-1, TREK-2 및 TRAAK의 발현이 확인되었다. TASK-3와 TREK-1은 핵을 포함한 세포 전역에 발현하였고, TREK-2와 TRAAK은 핵을 제외한 세포 전역에 발현하였다. 그러나 자궁내막염이 있는 자궁내막세포와 정상 자궁내막세포에서 K_{2P} 통로의 발현 변화를 비교한 결과, 두 군 간의 mRNA 발현 수준이 변화하지 않았다.

본 연구는 한우의 자궁내막세포에서 K_{2P} 통로의 존재를 처음으로 보고하는데, 이를 통하여 한우의 자궁내막세포에서 확인된 K_{2P} 통로들은 자궁의 생리 작용과 자궁암 등과 같은 여러 자궁 관련 질병에 관여할 가능성이 높을 것으로 생각된다.

참고문헌

Bai X, Bugg GJ, Greenwood SL, Glazier JD, Sibley CP, Baker PN, Taggart MJ and Fyfe GK. 2005b. Expression of TASK

- and TREK, two-pore domain K^+ channels, in human myometrium. *Reproduction*, 129(4):525-30.
- Bai X, Greenwood SL, Glazier JD, Baker PN, Sibley CP, Taggart MJ and Fyfe GK. 2005a. Localization of TASK and TREK, two-pore domain K^+ channels, in human cytotrophoblast cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 12(2):77-83.
- Bai X, Lacey HA, Greenwood SL, Baker PN, Turner MA, Sibley CP and Fyfe GK. 2006. TASK channel expression in human placenta and cytotrophoblast cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 13(1):30-39.
- Cherubini A, Taddei GL, Crociani O, Paglierani M, Buccoliero AM, Fontana L, Noci I, Borri P, Borrani E, Giachi M, Becchetti A, Rosati B, Wanke E, Olivotto M and Arcangeli A. 2000. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br. J. Cancer.*, 83(12):1722-1729.
- Enyeart JJ, Xu L, Danthi S and Enyeart JA. 2002. An ACTH- and ATP-regulated background K^+ channel in adrenocortical cells is TREK-1. *J. Biol. Chem.*, 277(51):49186-49199.
- Goldstein SA, Bockenhauer D, O'Kelly I and Zilberberg N. 2001. Potassium leak channels and the KCNK family of two-P-domain subunits. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(3):175-184.
- Hong IS, Kim SH, Koong MK, Jun JH, Lee YS and Kang KS. 2003. Endometrial cell culture: Isolation, characterization, and immortalization. *Kor. J. Fertil. Steril.*, 30(4):317-324.
- Jennifer N, Tichenor, Eric T, Hansen and Iain LO Buxton. 2005. Expression of stretch-activated potassium channels in human myometrium. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 48:44-48.
- Kelly RW, King AE and Critchley HO. 2001. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*, 121(1):3-19.
- Kim D. 2005. Physiology and pharmacology of two-pore domain potassium channels. *Curr. Pharm. Des.*, 11(21):2717-2736.
- Lesage F and Lazdunski M. 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 279(5):F793-801.
- Patel AJ and Lazdunski M. 2004. The 2P-domain K^+ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Pflugers. Arch.*, 448(3):261-273.
- Pocsai K, Kosztka L, Bakondi G, Gönczi M, Fodor J, Dienes B, Szentesi P, Kovács I, Feniger-Barish R, Kopf E, Zharhary D, Szucs G, Csernoch L and Rusznák Z. 2006. Melanoma cells exhibit strong intracellular TASK-3-specific im-

- munopositivity in both tissue sections and cell culture. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 63(19-20):2364-2376.
- Rice A and Chard T. 1998. Cytokines in implantation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 9(3-4):287-296.
- Suzuki T and Takimoto K. 2004. Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 25(1):153-9.
- Tichenor JN, Hansen ET and Buxton IL. 2005. Expression of stretch-activated potassium channels in human myometrium. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 48:44-48.
- Wang ZH, Shen B, Yao HL, Jia YC, Ren J, Feng YJ and Wang YZ. 2007. Blockage of intermediate-conductance-Ca (2+)-activated K(+) channels inhibits progression of human endometrial cancer. *Oncogene*, in press.
- Wareing M, Bai X, Seghier F, Turner CM, Greenwood SL, Baker PN, Taggart MJ and Fyfe GK. 2006. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291(2):R437-446.
- Young SL, Lyddon TD, Jorgenson RL and Misfeldt ML. 2004. Expression of toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 52(1):67-73.
-

(접수일: 2007. 8. 15 / 채택일: 2007. 8. 31)