J Korean Soc Food Sci Nutr
37(6), 721~728(2008)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2008.37.6.721

Caco-2 소장세포와 J774 대식세포에서 Hepcidin 호르몬이 철분 수송체 Ferroportin과 Divalent Metal Transporter 1의 유전자 발현에 미치는 영향

채선주 · 정자용†
경희대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of Hepcidin Hormone on the Gene Expression of Ferroportin and Divalent Metal Transporter 1 in Caco-2 Cells and J774 Cells

Sun-Ju Chae and Jayong Chung†
Dept. of Food & Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-710, Korea

Abstract

Hepcidin is a peptide hormone produced by the liver, of which secretion is closely related to iron status in the body. However, little is known about the molecular mechanism(s) by which this peptide regulates body iron homeostasis. The purpose of this study was to determine the effects of hepcidin treatment within the physiological concentration range on the expressions of two different iron transporter proteins-ferroportin (FPN) and divalent metal transporter 1 (DMT1). Differentiated Caco-2 intestinal cells and macrophage J774 cells were treated with either synthetic hepcidin or hepcidin-rich fraction separated from human urine at the concentration of 10 nM and 100 nM for 24 hours. Results show that hepcidin treatment in differentiated Caco-2 cells or in J774 cells did not change the level of either FPN mRNA or DMT1 mRNA. On the other hand, hepcidin treatment at the dose of 100 nM significantly decreased the FPN protein levels and DMT1 protein levels in differentiated Caco-2 cells. Similarly, urinary hepcidin treatment (10 nM & 100 nM) also significantly decreased the levels of FPN and DMT1 proteins in J774 macrophage cells. These results showed that hepcidin might play an important role in the regulation of iron homeostasis by lowering the protein levels of iron transporter FPN and DMT1 both in enterocytes and in macrophage cells.

Key words: iron homeostasis, ferroportin, divalent metal transporter 1, hepcidin

서 론

철분은 생물의 생존과 성장에 필요한 필수영양소로서 헤모글로빈 또는 미오글로빈과 같이 체내 산소 운반과 저장을 담당하는 단백질 및 cytochrome과 같은 산화, 환원 반응에 관여하는 효소들의 중요한 구성 성분으로 작용한다(1). 그러나 과잉된 철분은 fenton 반응에 의해 유리라디칼을 생성시켜 단백질의 산화와 세포막 지질의 과산화 및 DNA 손상 등을 초래한다(2). 또한 체내에 축적된 과량의 철분은 당뇨, 간경화, 고혈압 및 신경계 질환 등의 발병 위험율을 높이는 것으로 보고되고 있다(3). 따라서 체내 필요량은 충족시키면서 독성을 나타내지 않는 수준의 유지가 매우 중요하다.

체내 철분 항상성은 주로 소장에서의 철분 흡수 과정과 세망내피계(reticuloendothelial system, RES)를 구성하는 대식세포에서의 철분 재이용(recycling) 과정을 조절함으로써 이루어진다. 우선, 소장에서의 흡수율은 체내 요구도에 따라 매우 긴밀하게 조절되는데 체내 철분 저장량이 감소하거나 적혈구 생성량 증가 등으로 인한 체내 필요량이 증가하게 되면 소장에서의 철분 흡수율은 급격히 증가한다(4). 또한, RES를 구성하는 대식세포는 식세포 작용으로 흡수한 노쇠한 적혈구의 철분을 세포내에 저장해 두었다가, 체내 철분 요구량이 증가되면 이에 반응하여 혈액 속으로 철분 방출(export)을 증가시킴으로써 철분의 재이용에 중추적 역할을 한다. 이러한 대식세포로부터의 철분 방출은 체내 철분 이동의 가장 큰 부분으로서, 하루에 대식세포로부터 공급되어지는 철분의 양은 약 20 mg으로 소장에서의 철분 흡수량 1~2 mg의 10배 이상에 해당된다(5,6).

소장과 대식세포에서 철분의 이동을 담당하는 trans-membrane 수송체 단백질로 DMT1(divalent metal transporter 1)과 FPN(ferroportin) 두 가지가 현재까지 알려져 있다. DMT1은 소장 상피세포의 apical membrane에 위치한 단백질로 DCT1(divalent cation transporter1) 혹은 Nramp2 (natural resistance-associated macrophage protein2)라고도 불린다. DMT1 유전자의 돌연변이를 갖고 있는 *mk* mice

†Corresponding author. E-mail: jchung@khu.ac.kr
Phone: 82-2-961-0977, Fax: 82-2-968-0260

모델의 경우, 소장세포로부터의 철분 흡수가 원활하지 못하여 선천적으로 소적혈구성 빈혈(microcytic anemia)을 나타낸다(7). 한편, FPN은 2000년에 밝혀진 iron exporter 단백질로 Ireg1(iron regulated protein 1) 혹은 MTP1(metal transport protein 1)이라고도 불린다(8-10). 이 단백질은 소장세포의 basolateral membrane에 위치하여 소장 내강에서 흡수한 식이로부터의 철분을 체내 혈액으로 이동시키는데 필수적으로 요구되며, 또한 체내 철분 이동에서 양적으로 가장 많은 부분을 차지하는 대식세포의 plasma membrane에 위치하여 철분 방출에 관여한다. FPN 유전자에 돌연변이를 갖고 있는 사람에게서 세망내피계의 대식세포에 과량의 철분이 축적되어 있음은(11-14) FPN이 철분의 세포외로의 방출에 중요하게 작용함을 보여준다. 이상의 선행 연구를 요약해 볼 때, DMT1과 FPN 단백질의 수준에 따라 체내 철분 대사가 민감하게 변화할 것으로 생각된다. 하지만, 이들 단백질들의 수준을 조절하는 다양한 요인들에 대한 연구는 아직 미흡한 편이다.

Hepcidin은 간의 hepatocyte에 의해 생성·분비되는 펩타이드 호르몬으로, 84개의 아미노산으로 이루어진 propeptide 형태로 만들어졌다가 processing 과정을 거쳐 25개의 아미노산으로 구성된 형태로 혈액으로 분비되고 소변을 통해 배설된다. 이 펩타이드의 아미노산 배열을 살펴보면 cysteine 잔기를 무려 8개나 포함하고 있어 다수의 disulfide bond를 형성하는 특징을 갖고 있다(15,16). Hepcidin과 철분 대사와의 관련성은 몇몇 실험동물연구를 통해 밝혀지기 시작했는데, hepcidin 발현이 결여된 knock out 마우스에서는 간 조직 등에 철분이 과잉 축적되었으며, 이와 반대로 hepcidin을 과량 발현시킨 transgenic mice의 경우 체내 철 저장량이 매우 낮고 심한 철분 결핍성 빈혈 증세를 나타내었다(17,18). 또한, carbonyl iron 주사로 철분을 과부하(overload)시킨 마우스에서 hepcidin 생성량이 증가되는 반면(19), 철분 결핍 식이를 공급하였을 때에는 간의 hepcidin mRNA 발현량이 급격하게 감소하였다(20). 이로 볼 때, hepcidin은 체내 철분 항상성 유지에 주요하게 관여하는 것으로 제시되고 있지만 구체적으로 분자 수준에서의 작용기작은 분명하지 않다. 이에 본 연구는 철분의 수송에 중추적 역할을 담당하는 FPN과 DMT1의 유전자 발현에 hepcidin 호르몬이 미치는 영향을 살펴보고자 수행되었다. 구체적으로, 체내 철분 대사의 주요 조절 기관인 소장세포(Caco-2)와 대식세포(J774)에서 생리적 농도 범위의 hepcidin을 처리했을 때, FPN과 DMT1의 mRNA와 단백질 수준의 변화를 분석하였다. 또한, 화학적으로 합성된 hepcidin peptide의 경우 체내에 존재하는 peptide와 비교하여 disulfide bond의 형성 양상이 생체내의 peptide 형태와 다를 수 있고 그 활성 여부도 명확하지 않으므로, 합성 hepcidin과 소변 hepcidin의 효과를 비교하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 처리

실험에 사용한 Caco-2 세포와 J774 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 사용하였다. Caco-2 세포와 J774 세포의 배양액은 각각 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)(Gibco, USA)과 minimum essential medium(α-MEM)(Gibco, USA)을 사용하였고 두 세포 모두 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 배양액에 포함시켰다. 배양은 5%의 CO_2와 95% humidity 조건으로 37°C에서 실시하였으며, 80~90%의 confluency에 도달하면 계대 배양하였다.

Hepcidin 처리 실험을 위해서는 Caco-2 세포의 경우, 소장 상피세포의 특성을 갖는 형태로 분화시켜 사용하였다(21). 즉, polycarbonate membrane(Falcon, USA)을 포함하는 이중구조 배양관에 16.3×10^4 cells/cm^{2}의 density로 seeding 한 후 confluent 한 상태에서 23일간 배양하여 polarization과 microvilli 형성이 이루어지도록 하였다. 또한 이틀 간격으로 EVOM^{TM} epithelial voltohmmeter(Millipore corp, USA)를 이용하여 세포 단층의 전기저항 값을 측정함으로써 tight-junction의 형성을 확인하였다. J774 세포는 실험하기 대략 24시간 전에 6-well plate로 옮겨 배양하고 50~60% confluency에 도달하였을 때 hepcidin 처리를 실시하였다.

세포 처리에는 화학적으로 합성한 형태와 체내에서 배설된 형태 등 두 가지 종류의 hepcidin이 사용되었다. 합성 hepcidin은 Peptides International사(Japan)로부터 구입하여 0.016% HCl 용액에 용해시켜 사용하였으며, 소변 hepcidin은 아래에 설명된 방법으로 건강한 성인의 소변으로부터 분리하여 이용하였다. 합성 hepcidin은 소변 hepcidin과 동일한 아미노산 조성과 배열을 갖도록 만들어졌으나, 8개의 cycteine로부터 형성되는 disulfide bond의 형성 양상이 소변 hepcidin과 다를 수 있어 peptide 활성에 차이가 있을 것으로 예상된다.

소변 속 hepcidin-rich fraction 분리 및 hepcidin 정량

소변 샘플은 연구 참여에 동의한 여자 성인으로부터 24시간 소변을 제공 받아 이용하였다. 샘플 제공자는 특별한 질병이 없고 체내 철분 상태를 나타내는 각종 지표가 정상 범위에 속하였다(Hematocrit 42%, 헤모글로빈 농도 13.6 g/dL, 혈청 ferritin 농도 37.6 ng/mL). 먼저, CM Macroprep cation exchange matrix(Bio-Rad, USA) 3 mL를 hepcidin의 등전점보다 낮은 pH 6.2의 25 mM NH_4-acetate로 평형화시킨 뒤, 수집된 24시간 소변을 잘 섞어 그 중 6.8 mL를 취하여 상온에서 4시간 동안 아래위로 잘 흔들어 주며 부착시켰다. 이 후, washing buffer 25 mM NH_4-acetate와 1 mM NH_4-acetate로 각각 1회 세척한 후, 5% acetic acid를

3 mL 첨가하여 용리한 다음 동결 건조하여 용매를 모두 휘발시킨 후, 0.01% acetic acid를 첨가하여 재용해하는 과정을 거쳐 hepcidin-rich fraction을 얻었다(22).

분리한 hepcidin-rich fraction 속의 hepcidin 양을 정량하기 위하여 immuno-dot assay를 수행하였으며, standard로는 0~21 pmol의 합성 hepcidin peptide(Peptides International Inc, Japan)을 이용하였다. 먼저 PVDF membrane (Amersham, USA)에 hepcidin-rich fraction 혹은 표준물질을 각각 4 μL씩 duplicate로 loading하고, 이를 고정하기 위해 실온에서 20분간 0.05% glutaraldehyde로 처리하였다. 그 다음 실온에서 30분간 blocking solution(Superblock, Pierce, USA)으로 처리한 후, rabbit polyclonal anti-human hepcidin을 1:500으로 희석하여 20시간 이상 부착시켰다. 0.1% bovine serum albumin(BSA)가 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T, pH 5.5) 용액으로 세척한 후 2차 antibody로 donkey anti-rabbit IgG(Amersham, USA)을 1:5000으로 희석하여 실온에서 2시간동안 부착시켰다. 이후, TBS-T solution으로 2차 세척하고, ECL(SUPEX solution, Takara, Japan) 반응으로 X-ray film에 감광하였다. 감광된 band의 density는 Gel Doc XR system(Bio-Rad, USA)으로 영상을 찍은 후 Quantity one 1-D analysis software(Bio Rad, USA)를 사용하여 정량하였다.

RT-PCR을 이용한 DMT1과 FPN의 mRNA 정량

처리가 끝난 세포에 500 μL의 TRIzol® reagent(Invitrogen, USA)를 첨가하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 추출하고, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Total RNA 1 μg로부터 reverse transcription master premix(5X)(ELPIS biotech, Korea)를 이용해 cDNA를 합성하고, 이를 주형으로 각 유전자에 맞게 제작된 primer를 이용하여 MJ mini gradient thermal cycler(Bio-Rad, USA)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 사용된 PCR 조건은 denaturation 95°C에서 15초, annealing은 Caco-2와 J774세포 각각 57°C와 65°C에서 30초 동안 실시하였고, 72°C에서 1분간 elongation 과정을 거쳤다. Caco-2 세포의 경우, DMT1 (+IRE)은 24 cycle, FPN 21 cycle, HPRT(hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 28 cycle로 실시하였고, J774 세포는 DMT1과 FPN 24 cycle, β-actin은 18 cycle로 실시하였다. PCR product는 ethidum bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동 하였다. 각 band는 Gel Doc XR system(Bio-Rad, USA)으로 영상을 찍은 후 Quantity one 1-D analysis software(Bio Rad, USA)를 사용하여 정량하였다.

Western blot analysis를 이용한 DMT1과 FPN의 단백질 수준 분석

처리가 끝난 세포에 4X Tris/SDS(pH 6.8) buffer, 5% β-mercaptoethanol, protease inhibitor를 함유한 complete lysis buffer를 첨가하여 collect 한 후, 21G needle로 shearing 하였다. Bradford assay를 사용하여 단백질을 정량한 후, 15~30 μg의 단백질을 95°C에서 5분간 열처리한 다음 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하였다. 단, FPN 분석의 경우는 열처리 과정을 생략하였다. 분리된 단백질을 PVDF membrane (millipore, USA)에 이동시킨 후, blocking solution(5% skim milk in TBS-T)으로 1~2시간 동안 blocking을 실시하였다. Blocking 한 membrane을 TBS-T로 10분간 3회 세척한 후, DMT1(Santa Cruz Biotechnology, USA)과 FPN antibody를 2.5% skim milk/TBS-T에 각각 200배와 1000배로 희석하여 20시간 이상 부착하였다. 그리고 membrane을 TBS-T로 10분간 3회 세척하였으며, 각각의 primary antibody에 대항하는 donkey anti-rabbit IgG(Amersham, USA, NA 934V, 1:10000), donkey anti-sheep/goat IgG (The Binding Site Limited, UK, AP360, 1:10000)를 2.5% skim milk/TBS-T에 희석하여 실온에서 1시간 동안 부착시키고 마찬가지로 TBS-T로 세척하였다. 각 blot의 specific band는 5분간 감광하였으며 감광된 band는 Gel Doc XR system(Bio-Rad, USA)으로 영상을 찍은 후 Quantity one 1-D analysis software(Bio Rad, USA)를 사용하여 정량하였다. 각 단백질의 발현 수준은 아무것도 처리하지 않은 control을 기준으로 상대적인 값으로 계산하였다.

통계분석

모든 실험의 결과는 Statistical Analysis System version8.2(SAS Institute, Cary, NC, USA)를 사용하여 분석하였다. 모든 결과는 평균(mean)과 표준오차(SE)로 표시하였으며, 대조군과 처리군의 차이는 t-test를 이용하여 $p<0.05$ 유의수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

Caco-2 세포의 분화에 따른 FPN과 DMT1의 mRNA 및 단백질 발현 수준

Caco-2 세포는 원래 대장세포에서 유래된 세포이지만 confluent한 상태로 polycarbonate membrane transwell insert에 2~3주간 배양하면 세포 분열은 정지되고 분극(polarization), microvilli 형성 등 소장 상피세포(enterocyte)의 특성을 띠는 세포로 분화된다. 본 연구에서는 Caco-2 세포주를 소장 상피세포의 특성을 갖도록 분화시킨 후 실험에 사용하였다.

우선 Caco-2 세포를 transwell membrane insert에 분주한 후, polarized monolayer가 형성되는 과정을 세포 단층 저항(transepithelial electrical resistance, TEER)을 이용하여 2일 간격으로 측정하고 모니터링 하였다. 세포 간 치밀이음부(tight junction)의 permeability를 나타내는 TEER

값은 배양 일수에 따라 증가하는 양상을 보였는데(Fig. 1), 배양 초기에는 395.5±50.06 Ω · cm^2였고, 계속 증가하다가 13~15일 사이에 증가의 폭이 둔화되기 시작하였다. 배양 후 19일째의 TEER 값은 1002.7±24.8 Ω · cm^2으로 최대값을 나타냈으며 이후 23일까지 배양했을 때 TEER 값이 계속 유지되었다.

Caco-2 세포 분화가 진행되는 동안 2일 간격으로 FPN과 DMT1의 mRNA 수준 변화를 RT-PCR로 측정하였다. 그 결과, 배양이 진행되는 동안 FPN과 DMT1 mRNA의 수준 증가가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 2A). 특히 DMT1의 경우 분화에 따른 mRNA 수준 증가의 폭이 FPN에 비해 훨씬 크게 나타났는데, FPN mRNA의 경우 배양 초기에도 어느 정도 발현되었지만 DMT1 mRNA는 배양 5일까지는 거의 발현되지 않았다. 한편, loading control로 사용된 HPRT mRNA의 수준은 분화 일수에 따른 변화가 관찰되지 않았다. 이는 본 RT-PCR 분석에서 각 lane마다 사용된 초기 total RNA의 양은 동일함을 보여준다.

세포 분화가 진행되는 동안의 FPN과 DMT1 단백질 수준 변화 역시 mRNA의 변화와 비슷하게 나타났는데(Fig. 2B),

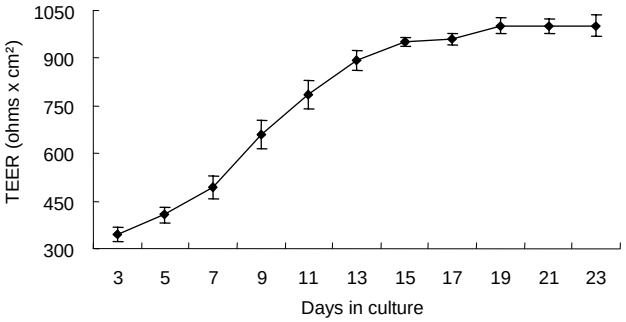

Fig. 1. Increase of transepithelial electrical resistance (TEER) in Caco-2 cells by cellular differentiation.
Caco-2 cells were seeded on to polycarbonate membrane at the density of 16.3×10^4 cells/cm^2. TEER was measured every other day after the seeding by epithelial voltohmmeter. Data presented are mean±SE of 3 independent experiments.

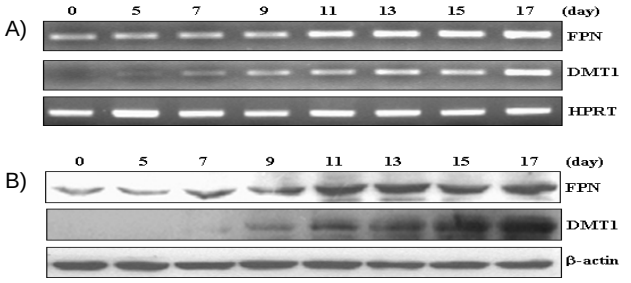

Fig. 2. Increase of DMT1 and FPN mRNA & protein level in Caco-2 cells by cellular differentiation.
Caco-2 cells were plated on polycarbonate transwell membrane at the density of 16.3×10^4 cells/cm^2 and harvested on 0, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 days after the plating. A) FPN and DMT1 mRNA levels by RT-PCR analysis. B) FPN and DMT1 protein levels by Western blot analysis.

DMT1 단백질은 배양 초기에는 거의 발현되지 않고, 배양 후 7일째에 이르러 band가 나타나기 시작했으며, 배양 후 17일째에는 7일째에 비하여 단백질 수준이 10배 이상 크게 증가되었다. 한편 FPN 단백질의 경우는 Caco-2 세포가 분화되기 이전에도 어느 정도의 양이 발현되었으며 분화가 진행됨에 따라 발현양이 증가되어 배양 후 17일째에는 배양 첫 날에 비하여 약 6배 증가하였다.

Jumarie와 Malo(21)의 연구에 따르면, Caco-2 세포의 TEER 값이 최대(1000 Ω · cm^2 이상)에 이르렀을 때, enterocyte의 형태적 특성인 돌출된 형태가 전자현미경으로 관찰되며, 여러 가지 brush-border enzyme(sucrase, maltase, lactase, alkaline phosphatase 등)의 활성이 최대가 되는 등 enterocyte의 기능적 특성도 지니는 것으로 보고되었다. 본 연구에서 Caco-2 세포를 17일 이상 배양하였을 때 TEER 수치가 최대에 도달하였고, 이 시점에서 FPN과 DMT1 단백질도 많은 양이 발현되는 것을 확인하였으므로, 이때를 분화가 완료된 시점으로 간주하였다.

분화된 Caco-2 세포에서 hepcidin이 FPN과 DMT1의 mRNA 및 단백질 수준에 미치는 영향

Caco-2 세포에서 hepcidin이 FPN과 DMT1의 발현 수준에 미치는 영향을 알아보기 위해, 19일간 transwell membrane insert에 배양하여 분화시킨 Caco-2 세포에 소변 hepcidin 혹은 합성 hepcidin을 10 nM과 100 nM의 농도로 24시간 처리하였다. 그 결과, 소변 hepcidin을 100 nM 농도로 처리하였을 때 FPN 단백질 수준이 아무것도 처리하지 않은 대조군의 60% 수준으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이와 비슷하게, 합성 hepcidin을 100 nM 처리했을 때 역시 FPN 단백질 수준이 유의하게 감소하였다. 한편, DMT1 단백질 수준의 경우, 소변 hepcidin을 100 nM 처리하였을 때는 유의적으로 감소하였으나 합성 hepcidin의 경우 100 nM 처리 시 DMT1 단백질 수준에 변화를 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이로 볼 때, 생체 내에 존재하는 형태인 소변 hepcidin은 100 nM 농도에서 소장세포의 FPN과 DMT1 단백질 수준을 유의하게 감소시키는 것으로 보인다.

Hepcidin이 소장세포에서 FPN과 DMT1 발현에 미치는 영향에 대한 기존의 몇 가지 선행 연구들을 살펴보면 일관성이 없는 결과를 보이고 있다. Yamaji 등(23)은 합성 hepcidin을 Caco-2 세포에 10 μM 농도로 24시간 처리하였을 때 DMT1 단백질은 감소되었으나 FPN 단백질에는 변화가 없음을 보고하였고, Yeh 등(24)의 연구에서는 his-tagged recombinant hepcidin peptide를 mice에 injection 하였을 때, 소장 조직에서 FPN1 수준이 유의적으로 감소되는 상반된 결과를 보고한 바 있다. 이들 두 가지 선행 연구는 혈청 내에 존재하는 형태의 peptide가 아닌 화학적으로 합성되거나 유전자 재조합 방법으로 합성된 형태의 peptide를 사용한 제한점이 있다. 앞에서 언급되었듯이 hepcidin peptide는 다수의

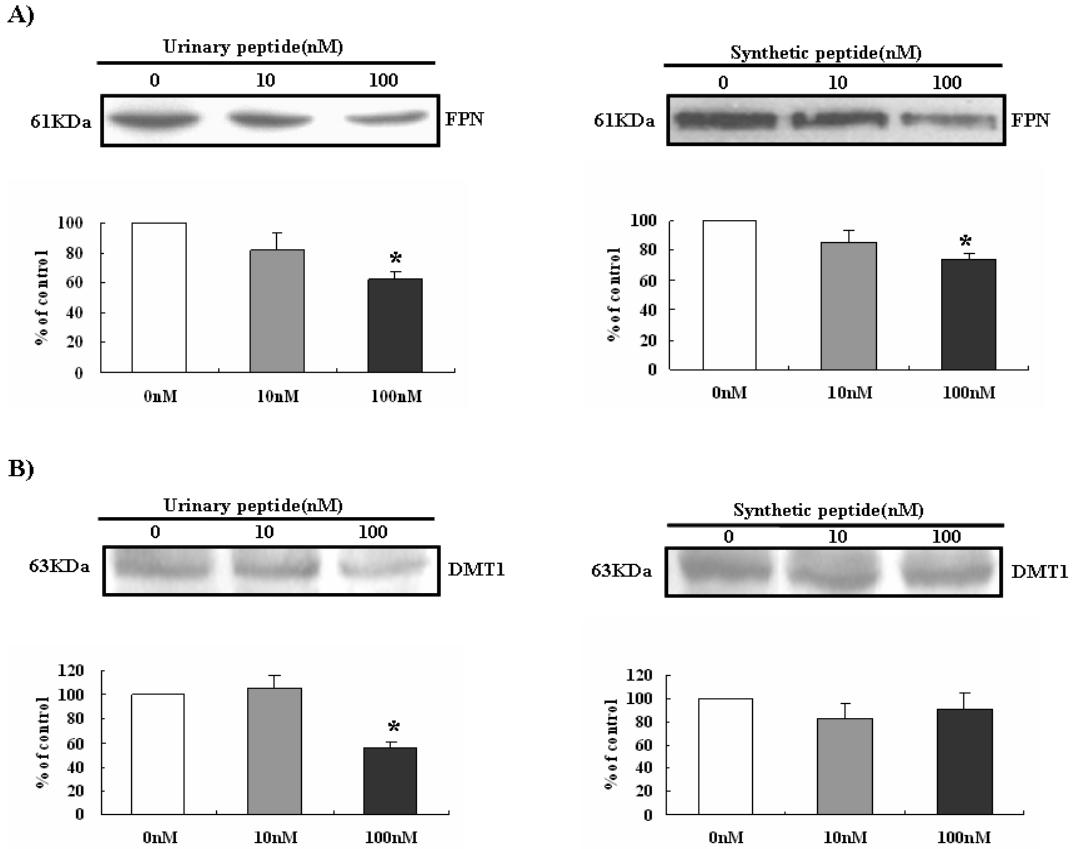

Fig. 3. Effects of hepcidin on FPN and DMT1 protein levels in differentiated Caco-2 cells.
Caco-2 cells were incubated for 24 hr with urinary or synthetic hepcidin peptide (10 nM, 100 nM). Proteins from cell lysates were separated and analyzed for A) FPN and B) DMT1 protein expression by Western blotting. Representative blots are shown. Data presented in graphs are the mean±SE of 3 independent experiments. $^{*}p<0.05$ compared with the control (0 nM).

cysteine 잔기를 포함하므로 disulfide bond의 형성 양상이 hepcidin의 활성도에 주요한 영향을 미칠 것으로 사료된다. 또한, Yamaji 등(23)의 연구에서는 10 μM의 무척 높은 농도가 사용되었는데, 이는 본 연구에서 사용된 농도(100 nM)의 100배에 해당하는 농도이다. 실제 정상인의 혈액에 존재하는 hepcidin 농도는 160 nM 미만이므로 (25), 생리적 범위에 속하는 농도의 hepcidin을 사용하여 얻은 본 연구의 결과는 중요한 의미가 있다. 또한, Nemeth 등(26)은 형광물질인 GFP를 부착시킨 FPN 유전자를 HeLa 세포에 과잉 발현시킨 모델에서 hepcidin 처리가 FPN 단백질 분해를 촉진함을 보고한 바 있는데, 본 연구에서는 hepcidin 처리가 Caco-2 세포에서 실제로 발현되는 내인성(endogenous) FPN 단백질의 수준을 낮출 수 있음을 확인하였다.

한편, hepcidin 처리 후 FPN과 DMT1 mRNA 수준의 변화를 RT-PCR 법으로 비교한 결과, 소변 hepcidin과 합성 hepcidin 모두 10 nM과 100 nM 농도 범위에서 이들 mRNA 수준에 변화를 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이로 볼 때 hepcidin 처리는 FPN과 DMT1 유전자의 전사 과정을 억제하기보다는 FPN과 DMT1 단백질로의 번역과정을 억제하거나 분해를 촉진함으로써 이들 단백질의 수준을 낮추는 것으로 생각된다.

J774 세포에서 hepcidin이 FPN과 DMT1의 mRNA 및 단백질 수준에 미치는 영향

대식세포에서 hepcidin이 FPN과 DMT1의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스 대식세포주인 J774 세포에 10 nM과 100 nM의 소변 hepcidin과 합성 hepcidin을 24시간 처리한 후 FPN과 DMT1의 단백질과 mRNA 수준을 대조군과 비교하였다. 그 결과, 10 nM과 100 nM의 소변 hepcidin 처리는 FPN 단백질 수준을 각각 대조군의 72%, 60% 수준으로 감소시키는 것으로 나타났으며(Fig. 5), 합성 hepcidin을 처리한 경우 역시 10 nM과 100 nM 농도 모두에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. Chaston 등(27)은 THP-1 대식세포주에 합성 hepcidin을 1 μM 농도로 4시간 혹은 24시간 처리했을 때 FPN 단백질 수준이 유의적으로 감소됨을 보고한 바 있는데, 본 연구 결과, 이보다 낮은 농도 범위(10~100 nM)에서도 hepcidin은 FPN 단백질 수준을 낮출 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 앞의 Caco-2 세포를 이용한 실험 결과(Fig. 3)에서는 100 nM 농도 처리 시에만 FPN 단백질의 감소가 있었음을 고려할 때, 소장세포에서보다 대식세포에

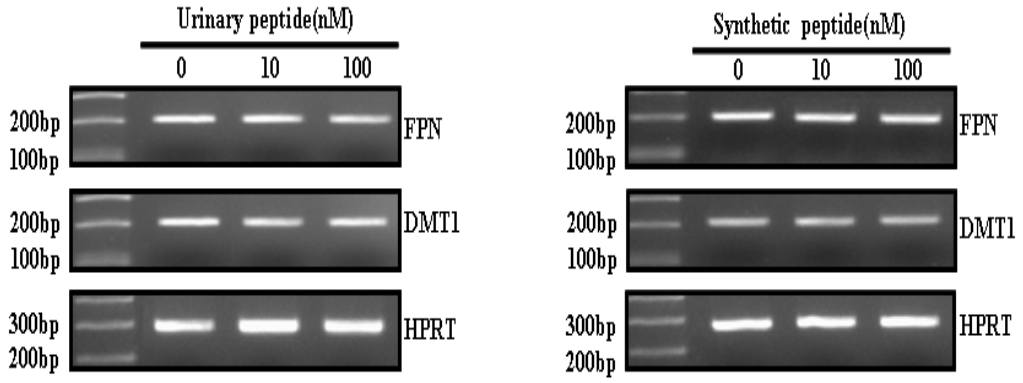

Fig. 4. Effects of hepcidin on FPN and DMT1 mRNA levels in differentiated Caco-2 cells.
Caco-2 cells were incubated for 24 hr with urinary or synthetic hepcidin peptide (10 nM, 100 nM). Total RNA were extracted analyzed for FPN and DMT1 mRNA levels by RT-PCR.

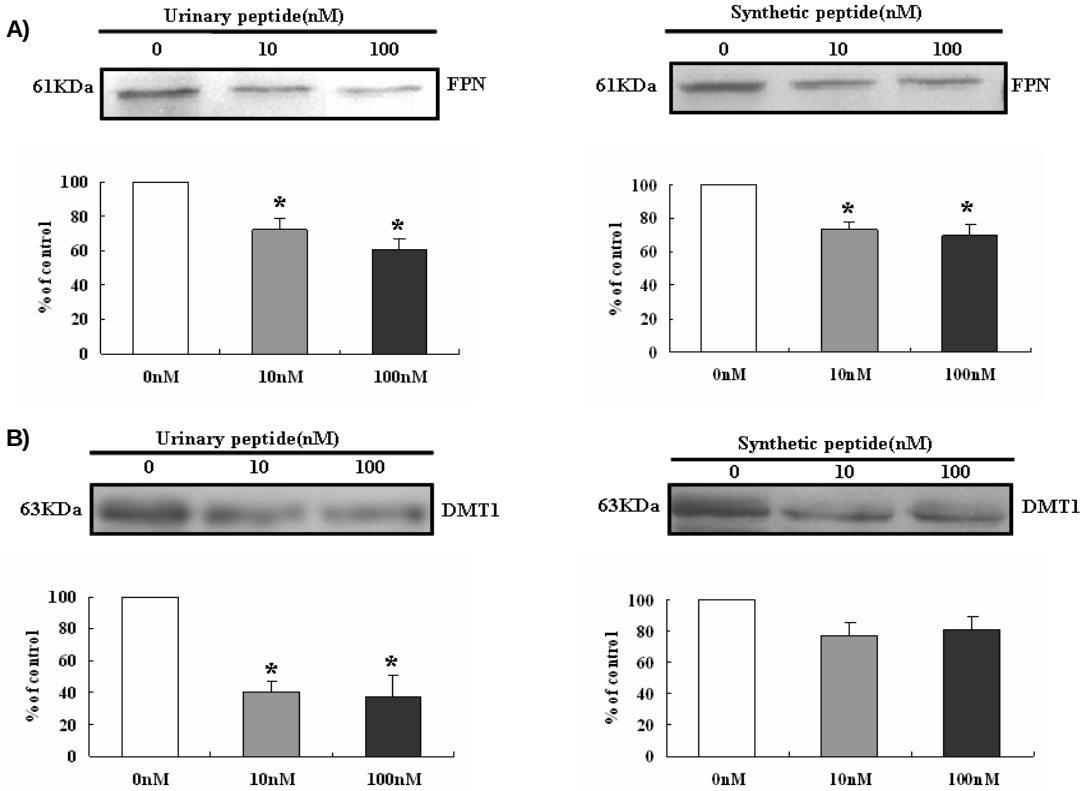

Fig. 5. Effects of hepcidin on FPN and DMT1 protein levels in J774 cells.
J774 cells were incubated for 24 hr with urinary or synthetic hepcidin peptide (10 nM, 100 nM). Proteins from cell lysates were separated and analyzed for A) FPN protein expression B) DMT1 protein expression by Western blotting. Representative blots are shown. Data presented in graphs are the mean±SE of 3 independent experiments. $^{*}p<0.05$ compared with the control (0 nM).

서 hepcidin 농도 변화에 대해 더욱 민감하게 FPN 단백질 수준을 조절하는 것으로 보인다.

DMT1 단백질 역시 소변 hepcidin 처리에 의해 10 nM과 100 nM에서 각각 대조군의 40%, 37% 수준으로 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 합성 hepcidin 처리 시에는 유의적인 차이는 없었으나 대조군에 비해 DMT1 단백질의 수준이 감소되는 경향을 보였으며, 이러한 차이는 생체 내 존재하는 hepcidin의 활성이 합성 hepcidin에 비해 높기 때문인 것으로 생각된다(Fig. 5). 소변 hepcidin은 혈장에서 발견되는 peptide와 동일한 형태로 알려져 있다(28). 한편, J774 세포에 hepcidin을 처리했을 때, 처리한 hepcidin의 농도와 형태에 상관없이 FPN mRNA와 DMT1 mRNA 수준에는 변화를 주지 않는 것으로 나타났으며(결과 제시 생략), 이는 Caco-2 세포에서의 결과와 일치한다(Fig. 4).

대식세포에서 hepcidin의 영향에 대한 기존의 연구는 주로 FPN 단백질에 대해서만 이루어졌었고, hepcidin 처리에 의해 대식세포 DMT1 단백질이 감소함을 밝힌 것은 본 연구가 처음이다. 대식세포에서 DMT1은 endosome의 막에 존재하는데, 대식세포의 endosome은 식세포 작용에 의해 흡수된 노쇠한 적혈구가 위치하므로 다량의 철분을 함유한다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, hepcidin은 대식세포의 plasma membrane에 존재하는 FPN 단백질을 감소시켜 철분의 세포 외로의 방출을 억제할 뿐 아니라, endosome 막의 DMT1 수준을 낮춰 endosome에 존재하는 철분의 세포질로의 이동을 감소시킴으로써 체내 철분의 항상성을 조절하는 데에 관여하는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 소장세포(Caco-2)와 대식세포(J774)를 이용하여 FPN과 DMT1의 유전자 발현에 hepcidin 펩타이드 호르몬이 미치는 영향을 알아보기 위하여 수행되었으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다. Caco-2 세포에서 FPN과 DMT1의 mRNA 및 단백질 수준은 분화 진행에 따라 비례하여 증가하였으며, 특히 DMT1 단백질은 분화 초기에는 거의 발현되지 않다가 분화 7일째에 비로소 발현되기 시작한 후 급격히 증가하여 분화 17일째에는 7일째에 비해 단백질 수준이 10배 이상 크게 증가되었다. 분화된 Caco-2 세포에서 소변 hepcidin과 합성 hepcidin을 100 nM 농도로 24시간 동안 처리하였을 때, FPN 단백질 수준이 대조군에 비해 각각 60%와 70% 수준으로 유의하게 감소하였다. DMT1 단백질의 경우, 소변 hepcidin 100 nM 농도에서만 대조군의 55% 수준으로 유의하게 감소되었다. J774 세포에 소변 hepcidin 혹은 합성 hepcidin을 24시간 처리한 결과, 10 nM과 100 nM 농도에서 모두 대조군에 비해 FPN 단백질 수준이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, DMT1 단백질 수준도 소변 hepcidin 10 nM과 100 nM 처리에 의해 각각 대조군의 40%와 37% 수준으로 유의하게 감소하였다. 분화된 Caco-2 세포와 J774 세포에서 10 nM 혹은 100 nM 농도의 hepcidin 처리 시 DMT1 mRNA와 FPN mRNA 수준에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 이로 볼 때 hepcidin은 전사과정의 조절보다는 DMT1과 FPN 단백질로의 번역과정을 억제하거나 분해 속도를 촉진함으로써 이들 단백질의 수준을 낮추는 것으로 보인다. 이상의 결과는, hepcidin 펩타이드 호르몬이 DMT1 단백질과 FPN 단백질의 수준을 억제함으로써 체내 철분 대사 조절에 중요하게 관여함을 나타낸다. 특히 소장세포와 대식세포에 동시에 작용함으로써, 소장에서의 철분 흡수와 대식세포에서의 철분 방출을 효율적으로 억제하는 조절 인자로 작용할 수 있음을 제시한다. 앞으로 hepcidin의 생성 및 분비를 조절하는 요인에 대한 연구와 hepcidin이 실제 세포 내외로의 철분의 수송이 미치는 영향에 대한 기능적 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2004-204-C00091과 KRF-2005-331-C00194).

문 헌

1. Chua AC, Graham RM, Trinder D, Olynyk JK. 2007. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci* 44: 413-459.
2. Papanikolaou G, Pantopoulos K. 2005. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 202: 199-211.
3. Weinberg ED. 2008. Iron out-of-balance: A risk factor for acute and chronic diseases. *Hemoglobin* 32: 117-122.
4. Roy CN, Enns CA. 2000. Iron homeostasis: new tales from the crypt. *Blood* 96: 4020-4027.
5. Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ, Wessling-Resnick M. 2003. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood* 102: 4191-4197.
6. Ganz T. 2005. Hepcidin: a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 18: 171-182.
7. Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1148-1153.
8. Abboud S, Haile DJ. 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* 275: 19906-19912.
9. Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J, Paw BH, Drejer A, Barut B, Zapata A, Law TC, Brugnara C, Lux SE, Pinkus GS, Pinkus JL, Kingsley PD, Palis J, Fleming MD, Andrews NC, Zon LI. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776-781.
10. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S, Bomford A, Peters TJ, Farzaneh F, Hediger MA, Hentze MW, Simpson RJ. 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 5: 299-309.
11. Njajou OT, Vaessen N, Joosse M, Berghuis B, van Dongen JW, Breuning MH, Snijders PJ, Rutten WP, Sandkuijl LA, Oostra BA, van Duijn CM, Heutink P. 2001. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat Genet* 28: 213-214.
12. Montosi G, Donovan A, Totaro A, Garuti C, Pignatti E, Cassanelli S, Trenor CC, Gasparini P, Andrews NC, Pietrangelo A. 2001. Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J Clin Invest* 108: 619-623.
13. Devalia V, Carter K, Walker AP, Perkins SJ, Worwood M, May A, Dooley JS. 2002. Autosomal dominant reticuloendothelial iron overload associated with a 3-base pair deletion in the ferroportin 1 gene (SLC11A3). *Blood* 100:

695-697.
14. Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo G, Cali A, De Gobbi M, Gasparini P, Camaschella C. 2001. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood* 97: 2555-2560.
15. Ganz T. 2004. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 11: 251-254.
16. Nemeth E, Ganz T. 2006. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr* 26: 323-342.
17. Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. 2001. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8780-8785.
18. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S. 2002. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4596-4601.
19. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. 2001. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 276: 7811-7819.
20. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. 2002. Hepcidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 123: 835-844.
21. Jumarie C, Malo C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol* 149: 24-33.
22. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. 2004. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 113: 1271-1276.
23. Yamaji S, Sharp P, Ramesh B, Srai SK. 2004. Inhibition of iron transport across human intestinal epithelial cells by hepcidin. *Blood* 104: 2178-2180.
24. Yeh KY, Yeh M, Glass J. 2004. Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: 385-394.
25. Dallalio G, Fleury T, Means RT. 2003. Serum hepcidin in clinical specimens. *Br J Haematol* 122: 996-1000.
26. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. 2004. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 306: 2090-2093.
27. Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srai SK, Sharp P. 2008. Evidence for differential effects of hepcidin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 57: 374-382
28. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. 2001. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276: 7806-7810.

(2008년 3월 21일 접수; 2008년 4월 21일 채택)