J. Appl. Biol. Chem. 52(3), 103-108 (2009) Article

지방세포배양액이 유방암세포주에서 GITRL의 발현을 유도

백아미 · 박미영 · 박정수 · 한정혜 · 양 영*
숙명여자대학교 생명과학부

Adipocyte Culture Medium Stimulates GITRL Expression in MDA-MB-231 Cells

Ahmi Baek, Miyoung Park, Jeongsu Park, Jeonghye Han, and Young Yang*
Department of Life Science, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Received April 11, 2009; Accepted September 10, 2009

Little is known about roles of adipose tissue, although obesity is one of the potential risk factors in causing breast cancer and adipose tissue surrounding breast ductal cells is the largest organ. To identify the genes that are regulated by factors secreted from adipocytes in breast cancer cells, MDA-MB-231 cells were treated with the culture medium of adipocytes. In present study glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand (GITRL) gene was studied among the induced genes. It was found that GITRL was significantly increased by the culture medium of adipocytes. Proteinase K-treated adipocyte culture supernatants failed to induce GITRL expression. These findings indicate that unknown protein factors are responsible for the induction of GITRL expression. The expression of GITRL did not affect the invasive ability of MDA-MB-231 cells, but coculture with NK92 expressing GITR suppressed the invasiveness of MDA-MB-231 cells.

Key words: *adipocytes, breast cancer, immune system*

서 론

비만은 유방암의 전이를 촉진하는 위험 요소로서 잘 알려져 있고[Josefson, 2001; McCann, 2001; Bianchini 등, 2002], 지방세포와 유방암세포의 상호작용에 대하여 연구된 논문이 많지는 않지만 몇몇의 연구가 그 중요성에 대하여 말해주고 있다. 쥐에 유방암 세포주를 주입할 때, 지방조직과 떨어진 곳에 주입한 경우보다 지방조직에 직접 유방암 세포를 주입한 경우 암의 성장이 촉진되는 것이 알려졌고[Elliott 등, 1992], 미분화된 지방세포와 분화된 지방세포를 각각 유방암 세포주와 섞어 쥐에 주입했을 때, 분화된 지방세포와 함께 주입한 경우에서 암세포의 성장이 증가됨이 알려졌다[Johnston 등, 1992]. 또한 유방암 세포주인 MCF-7에 지방세포의 배양액을 첨가하여 MCF-7에서 변화하는 종양관련 유전자들을 연구한 그룹도 있다[Iyengar 등, 2003].

지방조직은 아디포넥틴, 렙틴과 같은 대사조절 호르몬과 TNF-α, IL-6, MCP-1 등과 같은 각종 사이토카인들을 생산하는데 [Fantuzzi, 2005] 이들을 통칭하여 아디포카인이라 부른다. 아디포카인들은 당대사나 지방대사, 면역 항상성을 유지하는데 관여하며 비만, 심혈관계 질병, 인슐린 저항성이나 암과 같은 질병에서는 정상인 경우와 비교해 보면 아디포카인의 발현 정도가 달라져 있다[Goodfriend 등, 1998; Grundy, 2000; Steppan 등, 2001; Baillargeon 등, 2006; Mauro 등, 2007; Schaffler 등, 2007; Spyridopoulos 등, 2007]. 예를 들어 비만 환자에게서 렙틴의 양은 정상의 경우와 비교해서 증가되어져 있으며 그와 반대로 아디포넥틴의 경우에 있어서는 비만환자에게서 감소 경향을 보인다. 또한 유방암에 있어서 렙틴의 경우 암세포의 증식능력을 증가 시키나 아디포넥틴의 경우 반대로 증식억제 기능을 보인다[Baillargeon 등, 2006; Dos 등, 2008]. 이는 비만에 의하여 감소되는 아디포넥틴과 증가하는 렙틴이 서로 작용하여 비만한 유방암환자의 유방암세포증식을 촉진할 수 있음을 뜻한다.

Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor(GITR)은 생쥐 hybridoma T 세포주에서 glucocorticoid에 반응하는 유전자로 처음 확인되었다[Nocentini 등, 1997]. GITR은 사람의 자연살해세포에서 낮은 레벨로 발현하고 있으며, T 세포, 대식세포, B 세포 등에서도 발현되고 있다. Toll-like receptor ligand나 자연살해세포 성장인자인 IL-15들에 의해 발현이 증가되며, 주로 T 세포를 자극시키며 regulatory T cell의 면역억제

*Corresponding author
Phone: +82-2-710-9590; Fax: +82-2-2077-7322
E-mail: yyang@sm.ac.kr

doi:10.3839/jabc.2009.018

기능을 약화시킨다고 알려져 있다[McHugh 등, 2002; Shimizu 등, 2002; Kim 등, 2003; Ji 등, 2004; Shevach and Stephens, 2006]. GITR의 리간드인 GITRL은 주로 내피세포와 항원제시 세포에서 발현되며, 근래에는 많은 암세포에서 발현된다고 보고되고 있다. 현재까지 GITR-GITRL system의 기능에 대해서는 T 세포에 초점이 맞춰져 있었다. 하지만 최근 human plasmacytoid DC(pDC)에 발현되는 GITRL은 자연살해세포를 활성화시키는 역할을 하고 있으며[Hanabuchi 등, 2006], 암세포에서 발현하는 GITRL은 자연살해세포의 IFN-γ 생산과 세포살상능력을 낮춘다는 연구 보고가 있다[Baltz 등, 2007]. 본 연구에서는 지방세포가 유방암세포에 미치는 작용을 알아보기 위하여 지방세포배양액을 MDA-MB-231 유방암세포주에 처리하여 변화하는 유전자중에 GITRL의 발현증가를 확인하고 암세포의 전이에 미치는 기능을 조사하였다.

재료 및 방법

세포 배양. 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포와 생쥐 미분화 지방세포 OP9 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입하였다. 인간 유방암세포주인 MDA-MB-231세포는 2 mM L-glutamine, 항생제 그리고 10% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 배양하였고 생쥐골수유래 기질세포주인 OP9세포는 2 mM L-glutamine, 항생제 그리고 20% FBS가 포함된 Alpha minimum essential medium(alpha-MEM)를 사용하여 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포배양에 사용된 DMEM, Trypsin-EDTA, Antibiotic-Antimycotics, FBS는 Invitrogen(Carlsbad, CA)에서 구입하였다.

지방세포 배양액 준비. 미분화 지방세포 배양액은 OP9 세포를 100 mm dish에 5×10^6 cells/mL로 분주하고 2-3일 동안 배양한다. 80% 정도의 confluent가 될 때, 1X PBS 두 차례 세척 후 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 바꾸어 24시간 동안 배양하고 회수하였다.

지방분화 배양액은 OP9 세포주를 100 mm dish에 5×10^6 cells/mL로 분주하고 2-3일 동안 배양한 후, 0.5 M isobutylmethlxanthine, 2 μM dexamethasone, 1.7 μM insulin을 첨가하여 분화를 유도하였다. 분화유도배지는 24시간 후에 제거해 주었으며 배지는 20% FBS가 포함된 α-MEM 배지를 이틀마다 교체하였다. 약 99%의 세포에 lipid droplet이 찼을 때 10% FBS가 들어간 DMEM 배지로 바꿔준 후 24시간배양하고 그 배양액을 회수하여 실험에 사용하였다.

RNA의 분리 방법. MDA-MB-231 세포를 1X PBS를 이용하여 2회 세척한 후 RNAzolB reagent 1 mL을 이용하여 세포막을 용해시켰다. Chloroform 100 μL를 첨가하고 잘 섞은 후 원심 분리하여 단백질 층과 phenol을 제외한 상등액을 얻었다. 이 상층액에 동일량의 isopropanol을 넣고 얼음에서 20분간 보관 후 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 MDA-MB-231 세포의 전체 RNA를 얻었다. 얻어진 RNA 침전은 80% ethanol/diethylenepyrocarbonate(DEPC)로 세척하였다. 세척된 RNA는 DEPC가 첨가된 멸균수에 녹이고 260 nm의 흡광도에서 정량하였다.

역전사-중합효소 연쇄 반응. 준비된 전체 RNA중 5 μg를 70°C에서 10분간 반응시켜 denaturation시킨 후 6 μL 10 mM dNTP mixture, 8 μL 5X RT buffer, 1 μL random primer (0.5 μg/μL)와 함께 1 μL의 M-MLV RTase(200 U/μL)(Promega, Madison, WI)를 혼합하여 40 μL의 부피로 37°C 항온기에서 1시간 동안 역전사 반응시킨 후 80°C에서 5분간 가열하여 M-MuLV RTase의 활성을 제거하고 얼음에 냉각 시켜 single-stranded cDNA를 얻었다. 얻어진 cDNA중 1 μL를 1 μL의 primer(10 pmol/μL), 10 μL의 i-max II PCR premix, 8 μL의 D.W.가 함유된 총 20 μL의 반응 혼합물을 만들었다. 반응조건은 94°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extention 30초를 1cycle로 하여 30 cycle을 반복하였고 추가적으로 72°C에서 post extension을 10분을 더 주었다. 이와 같은 반응은 PTC-500 thermocycler(MJ Research, Waltham, MA)를 이용하여 수행하였다.

Amplification을 위해 PCR이 수행되었고, 이때 사용한 primer pair는(GITRL forward 5'-CGA ATT CAT GTG TTT GAG CCA C-3', reverse 5'-GGA GCT CGA TCC TCT AGT TAA C-3', GITR forward 5'-ATG GCA CAG CAC GGG GCG ATG-3', reverse 5'-ACT GAA TTT CCC CTG GGA CT -3', CXCL2 forward 5'-ACC GAA GTC ATA GCC ACA-3' reverse 5'-AAT GGG AGA GTG TGC AAG-3', CXCL3 forward 5'-TAC TGA ACA AGG GGA GCA-3' reverse 5'-CCC CAC CCT GTC ATT TAT-3', Selectin E forward 5'-CTG GCA GTT TCC GTT ATG-3' reverse 5'-CAC TGC AGC TCA TGT TGA-3', b-actin forward 5'-CTC GGA CGA CAT GGA GAA-3' reverse 5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT C-3'이다

인간 GITRL, GITR 유전자의 발현벡터 제작. 인간 GITRL의 stable cell line구축을 위하여 reverse transcription을 통하여 얻어진 인간 MDA-MB-231 세포의 cDNA를 주형으로 하여 *pfu*-PCR을 수행하였다. 이때 제작된 primer는 5'-CGA ATTCATGTGTTTGAGCCAC와 3'-GTTAAGTAGAGGATCGA GCTCC를 사용하였다. Primer의 양쪽 말단에는 EcoR I과 Xho I을 삽입하여 제작하였다. PCR을 통하여 인간 GITRL 560 bp를 얻었으며 얻어진 PCR 산물은 염기 서열 분석을 통하여 mutation이 없음을 확인 한 후 EcoR I과 Xho I의 제한 효소를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 반응 시킨 후 정제하여 pcDNA3.1 벡터에 클로닝 하였다.

암세포 전이 측정 방법. NK92 세포와 GITRL을 과발현 하고 있는 MDA-MB-231세포가 만났을 때, MDA-MB-231세포의 invasion 능력을 측정하였다. 두 세포주 모두 6-well plate에서 각각 transfection 되었고, 다음 날 matrigel-coated filters 24-well Boyden chamber(Corning Coastar; 8-μm pore size)에 각각의 세포를 넣었다. Transwell의 upper chamber에 합하여 5×10^4 개가 되도록 1:1의 비율로 MDA-MB-231 세포와 NK92 세포를 넣었다. Lower chamber에는 10% FBS가 함유된 DMEM 을 50 μL 넣었다. 37°C, 5% CO_2 incubator에서 48시간 동안 배양 후 lower chamber로 invaded 된 세포는 1×

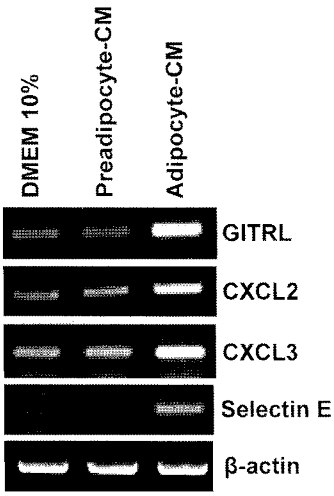

Fig. 1. MDA-MB-231 cells were incubated with preadipocyte-CM or adipocyte-CM for 6 h. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis.

PBS로 2차례 씻어 NK92 세포를 제거한 후, MDA-MB-231 세포만을 Calcein-AM reagent(Molecular probes, Carlsbad, CA)가 포함된 disassociation buffer를 300 μL 넣어chamber 에서 분리한다. 그 후 Wallac 1420 Victor3 plate reader(Perkin Elmer, Waltham, MA)를 사용하여 excitation 485±10 nm, emission 520±10 nm의 흡광도로 세포의 invasion을 측정하였다.

통계처리. 실험군당 triplicates로 실험을 수행하고 결과는 student t-test 분석했으며 *p* 값이 0.05보다 크면 기각하였다.

결 과

지방세포 배양액에 의하여 MDA-MB-231세포에서 발현이 증가하는 유전자. 이전의 연구에서 인간 유방암 세포주 중 하나인 MDA-MB-231세포에 지방세포 배양액을 처리하고 변화하는 유전자를 microarray 방법으로 분석하였다[Kim 등, 2008]. 이때 발현차이를 보인 유전자중에 CXCL2, CXCL3 케모카인과 selectin E 그리고 GITRL의 발현이 지방세포 배양액의 처리에 의하여 증가 하였는데 이를 재확인하기 위하여 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에 미분화 지방세포 배양액과 분화된 지방세포 배양액을 6시간 동안 각각 처리하였다. 그 후 RNA를 isolation한 후 RT-PCR을 수행하여 각각의 유전자 발현 변화를 측정하였다. 그 결과 이들 유전자가 미분화된 지방세포 배양액에 의해서는 변화하지 않지만 분화된 지방세포 배양액을 처리한 경우 그 발현 정도가 증가됨을 확인하였다(Fig. 1).

GITRL 발현이 지방세포 배양액에 의하여 증가. 지방세포 배양액에 의해 MDA-MB-231 세포에서 GITRL의 발현이 증가됨을 다시 한 번 확인하기 위해, MDA-MB-231 세포를 6 well plate에 배양하고 다음 날 준비된 지방세포 배양액을 처리한후에 시간에 따라 전체 RNA를 분리하였다. 그 후 RT-PCR을 수행하여 GITRL의 mRNA level을 측정하였다. 그 결과 GITRL mRNA level은 지방세포 배양액 처리 후 3시간부터 충분히 증가되었으며 6시간까지 그 발현이 유지되었다(Fig. 2A). 다음으로 지방세포 배양액에 의해 증가된 GITRL 발현이 지방세포 배양액 제거 후 얼마나 오래 유지되는지를 알아보았다. MDA-MB-231 세포에 6시간 동안 지방세포 배양액을 처리한 후 10% FBS를 포함한 DMEM으로 바꾸어 주었다. 지방세포 배양액 제거 후 12시간까지 GITRL 발현 변화 추이를 살펴보았는데 지방세포의 제거 후에 MDA-MB-231세포의 GITRL 발현이 6시간째부터 사라짐을 알았다. 유방세포에서 발현되는 GITRL이 기능을 하기 위해서는 지방세포의 배양액이 지속적으로 필요함을 나타낸다(Fig. 2B).

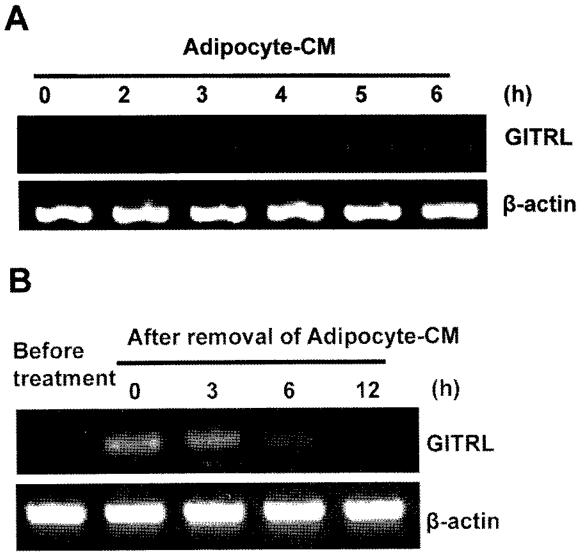

Fig. 2. (A) MDA-MB-231 cells were treated with adipocyte-CM. At the indicated time points, cells were harvested and total RNA was isolated. Then RT-PCR analysis was performed using GITRL primer. (B) MDA-MB-231 cells were treated with adipocyte-CM for 6 h and adipocyte-CM was removed. The total RNA was isolated at the indicated time points after removal of the adipocyte-CM, and then subjected to RT-PCR analysis.

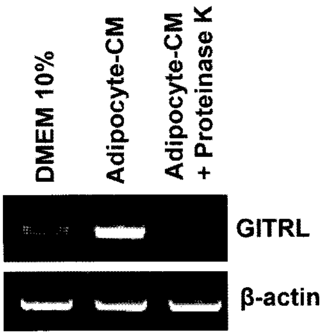

Fig. 3. MDA-MB-231 cells were treated with adipocyte-CM or proteinase K-treated adipocyte CM, for 6 h. Total RNA was isolated and subjected to RT-PCR analysis.

지방세포에 존재하는 단백질이 GITRL의 발현을 증가시킴. 지방세포는 유리지방산뿐만 아니라 렙틴, 레지스틴, 아디포넥틴을 포함하는 아디포카인 등을 분비한다고 알려져 있다. 어떤 인자가 MDA-MB-231 세포에서 GITRL mRNA 발현을 증가시키는지 알아보기 위해, 우리는 지방세포 배양액에 proteinase K를 처리하여 단백질 인자들을 제거하였다. 그 후 단백질이 제거된 지방세포 배양액을 이전 실험과 동일하게 MDA-MB-231 세포

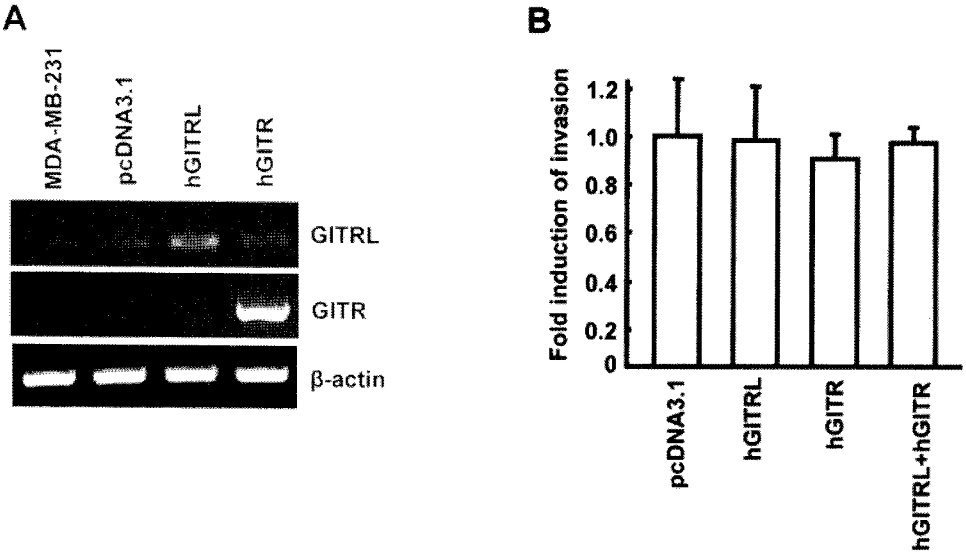

Fig. 4. (A) MDA-MB-231 cells were transfected with human GITRL and GITR expression plasmids, respectively. Expression was examined using RT-PCR. (B) GITRL or GITR expressing MDA-MB-231 cells were mixed and then incubated in upper chamber of transwell for 48 h. After incubation for 48h, the cells that invaded to lower chamber were disassociated with 500 L of disassociation buffer containing Calcein-AM reagents. Invaded cells were detected using Wallac 1420 Victor3 plate reader. The experiment was performed at the triplicates. Data represent means±SEM.

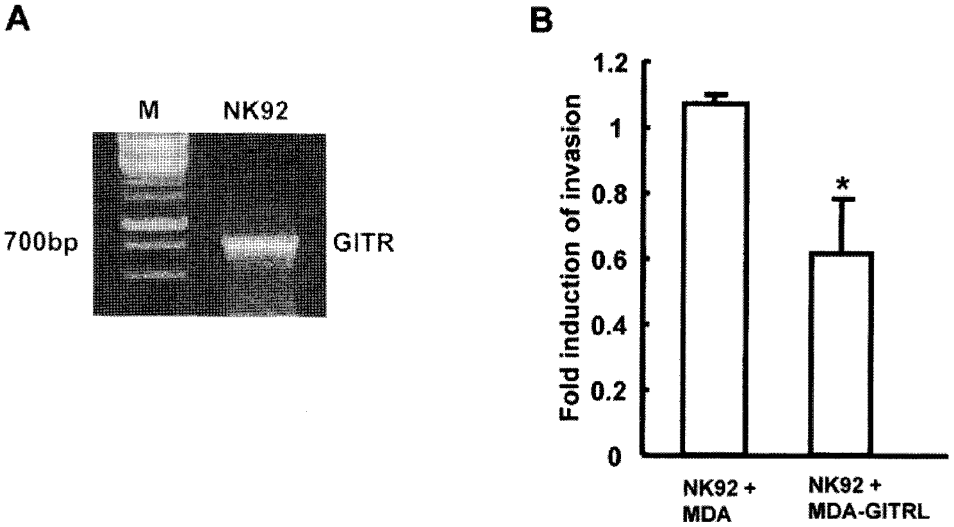

Fig. 5. (A) GITR expression was determined in NK92 cells. (B) GITRL expressing MDA-MB-231 cells and GITR expressing NK92 cells were mixed and then incubated in upper chamber of transwell for 48 h. After incubation for 48 h, the cells that invaded to lower chamber were disassociated with 500 L of disassociation buffer containing Calcein-AM reagents. Invaded cells were detected using Wallac 1420 Victor3 plate reader. The experiment was performed at the triplicates. Data represent means±SEM. *p<0.05 versus MDA-MB-231 cells+NK92 cells.

에 6시간 동안 처리하여 GITRL 발현을 살펴보았다. 그 결과 단백질이 제거된 지방세포 배양액은 GITRL의 발현을 올리지 못하였다. 즉, 지방세포가 분화되면서 증가되는 단백질 인자 중 하나가 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에서 GITRL mRNA 발현을 증가시킴을 말한다(Fig. 3).

GITR-GITRL의 상호작용이 MDA-MB-231 세포의 전이에 미치는 영향. GITR-GITRL 상호작용의 영향을 알아보기 위해, MDA-MB-231 세포에 GITR과 GITRL을 각각 과발현 시켰다. MDA-MB-231 세포가 GITR, GITRL을 각각 발현하는 지 알아보기 위해 transfection 후, RT-PCR로 각각의 발현을 확인하였다(Fig. 4A). 그 후 세포의 invasion 능력을 알아보기 위해 GITR을 발현하는 MDA-MB-231 세포와 GITRL을 발현하는 MDA-MB-231 세포를 1:1의 비율로 섞어 48시간 동안 전이 정도를 관찰하였다. GITR을 발현하는 MDA-MB-231 세포와 GITRL을 발현하는 MDA-MB-231 세포 그리고 각각을 발현하는 세포주들에서 전이 능력의 차이를 관찰 할 수 없었다(Fig. 4B).

NK세포와 MDA-MB-231세포의 GITR-GITRL interaction. 이번에는 GITRL을 발현하고 있는 유방암 세포가 GITR을 발현하고 있는 면역세포에 의해 어떤 영향을 받는지 살펴보았다. 먼저 자연살해 세포주인 NK92 세포를 사용하여 우선적으로 NK92 세포에서 GITR이 발현되는지 확인하였다. GITR primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 700bp 정도 크기의 밴드가 증폭되는 것으로 보아 NK92 세포주가 GITR을 발현하는 것

을 알 수 있었다(Fig. 5A). GITRL이 과발현 된 MDA-MB-231 세포와 GITR을 발현하는 NK92 세포를 1:1의 비율로 섞어 24 시간 동안 배양하면서 전이능력을 조사하였다. GITRL을 과발현한 MDA-MB-231 세포와 GITR을 발현하는 NK92 세포를 함께 넣은 chamber에서 MDA-MB-231 세포의 invasion 능력이 감소됨을 확인하였다(Fig 5B). 결론적으로 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포는 주변의 microenvironment 변화에 의해 GITRL 발현이 증가될 수 있으며, 이 때 GITR을 발현하는 NK 세포에 의해 그 invasion 능력이 감소하게 될 수 있다.

고 찰

암의 성장과 전이는 그 주변 환경에 의해 많은 영향을 받는다. 암세포를 둘러싸고 있는 기질세포와 암세포는 서로 여러 물질들을 분비하며 직간접적으로 상호작용한다. 어떤 인자들은 암의 침윤과 전이 등을 조절하고, 또 다른 인자들은 암세포의 생존에도 영향을 미친다. 지방세포는 유방을 둘러싸는 가장 흔한 세포로써 이들 간의 상호작용은 유방암의 생성과, 증식, 전이에 중요한 영향을 미친다. 이를 뒷받침하는 증거로 지방세포인 3T3-L1 세포 배양액을 유방암 세포주인 MCF-7 세포에 처리하였을때 MCF-7 세포의 생존과 전이가 촉진됨이 보고되었다[Iyengar 등, 2003]. 본 연구에서는 지방세포의 배양액을 MDA-MB-231 유방암 세포주에 처리하여 변화하는 여러 유전자들 중에 GITRL을 연구하였다. 미분화 지방세포 배양액과 더불어 NIH3T3 섬유아세포주의 배양액을 처리하면 GITRL의 발현이 증가하지 못하지만 지방세포배양액은 GITRL의 유전자 발현을 증가 시키었다.

지방세포의 분비 물질이 암세포에 긍정적인 영향을 주는지, 부정적인 영향을 주는지는 인체의 상황에 따라 다르게 나타난다. 미분화된 지방세포 배양액은 MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435 세포의 증식을 유도하는 반면에, 분화된 지방세포 배양액은 오히려 유방암 세포주의 증식을 억제한다는 보고도 있다[Chamras 등, 1998]. 지방세포 분비 물질인 아디포카인의 하나인 아디포넥틴은 유방암 세포의 증식을 억제시키는 역할을 하는 반면[Kang 등, 2005] 렙틴은 유방암 세포의 증식을 촉진시키는 역할을 한다[Mauro 등, 2007]. 이들 아디포카인의 발현은 비만의 정도에 따라 변화하기 때문에 비만으로 인한 아디포카인의 발현차이가 유방암세포의 증식과 전이를 조절하는 조건에 대한 연구가 매우 중요하다. 또한 지금까지 밝혀진 아디포카인들 외에 새로운 유방암세포조절 아디포카인의 발굴과 이들 아디포카인에 의하여 유방암세포가 어떻게 영향을 받는지 연구하는 것 또한 중요한 하나의 과제이다.

TNF family의 member들은 면역체계와 암세포 사이의 상호작용에서 중요한 역할을 한다[Locksley 등, 2001]. 본 연구에서는 지방세포 배양액에 의하여 유방암에서 발현이 증가하는 TNF family, GITRL과 수용체인 GITR의 밝혀지지 않은 역할에 대해 초점을 맞추어 연구하였다. 지방세포 배양액에 의한 GITRL의 발현은 지방세포 배양액에 존재하는 단백질 인자임을 알 수 있었고(Fig. 3) GITRL의 발현이 유방암세포주의 전이에는 영향을 미치는 않음을 알 수 있었다(Fig. 4B). 이전 보고에 따르면, GITRL을 발현하는 plasmacytoid predendritic 세포와 GITR을 발현하는 자연살해세포의 coculture는 자연살해세포의 cytotoxicity를 증가시킨다고 한다[Hanabuchi 등, 2006]. 하지만 반대로 암세포에 GITRL이 과발현 되면 자연살해세포의 IFN-γ의 분비를 억제시켜서 암세포가 면역회피를 하게 돕는다고 한다[Baltz 등, 2007]. 본 연구에서는 지방세포가 분비하는 특정 단백질 인자가 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포에서 GITRL의 발현을 증가시켜, 자연살해세포의 감시로부터 벗어나게 할 수 있다는 사실과 다른 한편으로는 GITRL이 과발현된 MDA-MB-231 세포는 자연살해세포주 NK92 세포의 GITR과 상호작용을 통해 전이가 감소될 수 있음을 알았다. 이런 상반된 결과는 앞으로 더 많은 실험을 수행하여야 해석이 가능할 것이다.

암세포의 경우 언제나 그 주변의 미세환경의 변화에 민감하게 반응한다. 그 중 유방암은 주위를 둘러싸는 가장 대표적인 기질세포인 지방세포와의 상호작용이 매우 중요할 수밖에 없다. 정상인 경우와 비만의 경우 지방세포가 분비하는 물질의 종류나 그것들의 비율이 달라지며 이것은 직간접적으로 유방암세포의 변화에 영향을 미치게 되는 것이다. GITRL 이외에도 많은 유전자들이 지방세포배양액에 의하여 증감되는데 이들의 연구 또한 유방암과 비만 사이의 관계를 규명하는 기초가 될 것이다.

초 록

비만은 유방암을 일으키는 잠재적 위험 요소 중 하나이며 현재 이들의 상관관계를 밝히려는 많은 연구들이 진행 중에 있다. 지방세포는 유방조직을 이루는 기질세포 중 가장 높은 비중을 차지하며, 이들이 분비하는 물질인 아디포카인이 유방암의 성장과 전이에 영향을 줄 것으로 예상되어지고 있다. 지방조직이 생산하는 아디포카인들 중 렙틴은 유방암 세포의 증식능력을 증가 시키고 아디포넥틴의 경우 반대로 증식억제 기능을 보인다는 연구 결과가 있다. 또한 정상의 경우와 비교해서 비만 환자에게서 렙틴의 양은 증가되어져 있으며 그와 반대로 아디포넥틴은 비만환자에게서 감소 경향을 보인다. 이는 비만에 의하여 변화되는 아디포카인들이 서로 작용하여 비만한 유방암환자의 유방암세포증식을 촉진할 수 있음을 뜻한다. 본 연구에서는 지방세포의 분비 물질인 아디포카인들에 의해 조절되는 유방암세포의 유전자들을 조사하기 위해 유방암세포주인 MDA-MB-231 세포주에 지방세포 배양액을 처리하였으며, 이 때 증가되는 유전자 중 glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand(GITRL)를 선택 연구하였다. GITRL은 지방세포 배양액을 처리한 MDA-MB-231 세포주에서 높게 발현되었으며, proteinase-K를 처리한 지방세포 배양액에 의해서는 발현 정도에 변화가 없었다. 이는 지방세포가 분비하는 단백질 인자 중 하나가 유방암 세포의 GITRL 발현을 증가시킴을 말한다. 또한 유방암 세포주 MDA-MB-231 세포에서 증가된 GITRL은 그 자체의 전이 능력에는 영향을 주지 못하였으나, glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein(GITR)을 발현하는 자연살해 세포주인 NK92 세포와의 상호작용 때에는 전이 능력을 감소시켰다.

Key words: *adipocytes, breast cancer, immune system*

감사의 글

이 연구는 2008년 숙명여자대학교 교비에 의하여 지원받았다.

참고문헌

Baillargeon J, Platz EA, Rose DP, Pollock BH, Ankerst DP, Haffner S, Higgins B, Lokshin A, Troyer D, Hernandez J, Lynch S, Leach RJ, and Thompson IM (2006) Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**, 1331-1335.

Baltz KM, Krusch M, Bringmann A, Brossart P, Mayer F, Kloss M, Baessler T, Kumbier I, Peterfi A, Kupka S, Kroeber S, Menzel D, Radsak MP, Rammensee HG, and Salih HR (2007) Cancer immunoediting by GITR (glucocorticoid-induced TNF-related protein) ligand in humans: NK cell/tumor cell interactions. *FASEB J* **21**, 2442-2454.

Bianchini F, Kaaks R, and Vainio H (2002) Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol* **3**, 565-574.

Chamras H, Bagga D, Elstner E, Setoodeh K, Koeffler HP, and Heber D (1998) Preadipocytes stimulate breast cancer cell growth. *Nutr Cancer* **32**, 59-63.

Dos Santos E, Benaitreau D, Dieudonne MN, Leneveu MC, Serazin V, Giudicelli Y, and Pecquery R (2008) Adiponectin mediates an antiproliferative response in human MDA-MB 231 breast cancer cells. *Oncol Rep* **20**, 971-977.

Elliott BE, Tam SP, Dexter D, and Chen ZQ (1992) Capacity of adipose tissue to promote growth and metastasis of a murine mammary carcinoma: effect of estrogen and progesterone. *Int J Cancer* **51**, 416-424.

Fantuzzi G (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **115**, 911-919 (quiz 920).

Goodfriend TL, Egan BM, and Kelley DE (1998) Aldosterone in obesity. *Endocr Res* **24**, 789-796.

Grundy SM (2000) Metabolic complications of obesity. *Endocrine* **13**, 155-165.

Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, Wang YH, Ito T, Shaw J, Cao W, Qin FX, and Liu YJ (2006) Human plasmacytoid predendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood* **107**, 3617-3623.

Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, Pestell RG, and Scherer PE (2003) Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* **22**, 6408-6423.

Ji HB, Liao G, Faubion WA, Abadia-Molina AC, Cozzo C, Laroux FS, Caton A, and Terhorst C (2004) Cutting edge: the natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression. *J Immunol* **172**, 5823-5827.

Johnston PG, Rondinone CM, Voeller D, and Allegra CJ (1992) Identification of a protein factor secreted by 3T3-L1 preadipocytes inhibitory for the human MCF-7 breast cancer cell line. *Cancer Res* **52**, 6860-6865.

Josefson D (2001) Obesity and inactivity fuel global cancer epidemic. *Br Med J* **322**, 945.

Kang JH, Lee YY, Yu BY, Yang BS, Cho KH, Yoon DK, and Roh YK (2005) Adiponectin induces growth arrest and apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cell. *Arch Pharm Res* **28**, 1263-1269.

Kim JD, Choi BK, Bae JS, Lee UH, Han IS, Lee HW, Youn BS, Vinay DS, and Kwon BS (2003) Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* **4**, 564-569.

Kim JH, Kim KY, Jeon JH, Lee SH, Hwang JE, Lee JH, Kim KK, Lim JS, Kim KI, Moon EY, Lee HG, Ryu JH, and Yang Y (2008) Adipocyte culture medium stimulates production of macrophage inhibitory cytokine 1 in MDA-MB-231 cells. *Cancer Lett* **261**, 253-262.

Locksley RM, Killeen N, and Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.

Mauro L, Catalano S, Bossi G, Pellegrino M, Barone I, Morales S, Giordano C, Bartella V, Casaburi I, and Ando S (2007) Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression. *Cancer Res* **67**, 3412-3421.

McCann J (2001) Obesity, cancer links prompt new recommendations. *J Natl Cancer Inst* **93**, 901-902.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, and Byrne MC (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311-323.

Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, and Riccardi C (1997) A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 6216-6221.

Schaffler A, Scholmerich J, and Buechler C (2007) Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer-endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**, 345-354.

Shevach EM and Stephens GL (2006) The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat Rev Immunol* **6**, 613-618.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, and Sakaguchi S (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* **3**, 135-142.

Spyridopoulos TN, Petridou ET, Skalkidou A, Dessypris N, Chrousos GP, Mantzoros CS, and the Obesity and Cancer Oncology Group (2007) Low adiponectin levels are associated with renal cell carcinoma: a case-control study. *Int J Cancer* **120**, 1573-1578.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, and Lazar MA (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409**, 307-312.