

프로게스테론과 에스트라디올 17 β 에 의한 Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 4의 발현 조절

박효영 · 강만중[†]

전남대학교 농업생명과학대학 동물자원학부

Regulation of Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 4 Expression with Progesterone and Estradiol-17 β

Hyo Young Park and Man-Jong Kang[†]

Department of Animal Science, College of Agriculture and Life Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

Acyl-CoA synthetase 4(ACSL4) is an arachidonate-preferring enzyme abundant in steroidogenic tissues and postulated to modulate eicosanoid production. The human and mouse ACSL4 gene are mapped on chromosome X. The female mice heterozygous for ACSL4 deficiency became pregnant less frequently and produced small litters, with 40% of embryos surviving gestation. In this study, we examined the regulation of ACS4 by estradiol-17 β and progesterone (P4) in the human endometrial cancer cell line HTB-1B. ACSL4 mRNA was increased in a dose-dependent manner. Also, expression of ACSL4 gene was up-regulated in a time-dependent manner in HTB-1B cells. However, combined treatment with progesterone and estradiol-17 β modestly decreased the levels of ACS4L mRNA as compared with the estradiol-17 β and progesterone respectively. Overall, these results suggest that the ACSL4 gene is regulated by progesterone and estradiol-17 β in the HTB-1B cells.

(Key words : Acyl-CoA synthetase, Pregnancy, Estradiol-17 β (E2), Progesterone (P4), Implantation)

서 론

포유동물에 있어서 long-chain acyl-CoA synthetase(ACSL)는 지방산 산화, 인지질의 리모델링, 여러 생리적 과정을 조절하는 long-chain acyl-CoA esters의 생산에 관여한다(Coleman 등, 2002). ACSL은 현재까지 조직특이성과 기질 특이성에 따라 ACSL1, ACSL3, ACSL4, ACSL5, ACSL6 5가지가 보고되고 있다. ACSL1은 1990년도에 Suzuki 등에 의하여 흰쥐에서 처음 유전자가 동정되었으며, 팔미트산 등 광범위한 포화 불포화 지방산을 기질로 이용하고 있는 것으로 보고하였다. ACSL6 (Fujino 등, 1992), ACSL5 (Oikawa 등, 1998)는 각각 뇌와 소장에서 높게 발현하는 ACSL 유전자로 동정되었으며, 기질 특이성은 ACSL1과 유사한 것으로 알려져 있다. ACSL3 (Fujino 등, 1996)는 주로 뇌에 발현하고 아라키돈산을 기질로 이용하는 것으로 동정되었으며 ACSL4는 1997년 Kang 등에 의하여 부신, 뇌, 간장, 정소, 자궁 등 광범위한 조직에서 발현하고, 특히 스테로이드 호르몬 생산 조직인 부신에서 가장 높은 발현을 보이는 것으로 보고되고 있다.

그리고 ACSL4는 프로스타글란딘과 루코트리엔 등의 생리활성을 가진 아이코사노이드 전구체인 아라키돈산과 아이코사펜타에노산에 높은 기질 특이성을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다.

아라키돈산은 세포막의 인지질로부터 phospholipases A2에 의하여 유리되며, 아라키돈산의 일부는 cyclooxygenase 1(COX1), cyclooxygenase 2(COX2)에 의하여 프로스타글란딘과 루코트리엔으로 변환되어 염증 반응, 혈소판 응집, 혈관신생, 분만, 세포사 등 다양한 반응에 이용되는 것으로 보고되고 있다(Bonventre, 1992; Abrahamsohn과 Zorn, 1993; Bonventre와 Koroshetz, 1993). 그러나 유리된 대부분의 아라키돈산은 프로스타글란딘과 루코트리엔의 생산을 조절하기 위하여 long-chain acyl-CoA synthetase에 의하여 아라키도닐-CoA로 변환되고 다시 인지질로 재에스터화되며, 이러한 기능에 의하여 세포내 아이코사노이드의 농도가 조절되는 것으로 보고되고 있다 (Majerus 등, 1983; Lin 등, 1992; Lin 등 1993). ACSL4는 X 염색체에 존재하면서 아라키돈산에 매우 높은 친화성을 나타내고, 부신, 난소, 고환의 steroidogenic cell에 발현하는 것으로 알려져 있다(Kang 등, 1997). 또한, ACSL4

* 이 논문은 2009년도 전남대학교 연구년교수연구비 지원에 의하여 연구되었음.

[†] Corresponding author : Phone: +82-62-530-2113, E-mail: mjkgang@chonnam.ac.kr

의 발현은 steroidogenic cell에서 부신피질호르몬(ACTH)에 의하여 유도되고, 스테로이드 호르몬인 글루코코르티코이드에 의하여 억제되는 것으로 보고되고 있다 (Cho 등, 2000). 특히 gene targeting에 의하여 ACSL4 유전자 한쪽의 발현이 knock-out된 ACSL4 암컷 heterozygous 생쥐에서는 불안정한 임신 유지와 발달 단계별 자궁의 조직에서는 자궁 전체 크기의 증가와 낭종(cysts)이 형성되는 것으로 보고되어 있다(Cho 등, 2001). 그리고 Cho 등 (2001)은 12주령의 ACSL4 암컷 heterozygous 생쥐 자궁에 있어서 PGE₂, 6-keto PGF₁ α, PGF₂ α의 양은 정상생쥐보다 2배 이상 높은 농도를 나타내는 것으로 보고하고 있으며, 이러한 결과는 ACSL4가 프로스타글란딘 생산에 관여하고 있을 뿐만 아니라 임신 유지에도 관여하는 것으로 추측되어지고 있다. Golej 등(2011)은 arterial smooth muscle cell에서 siRNA에 의한 ACSL4 knock-down 또는 과발현 실험에서 ACSL4는 prostaglandin E₂의 분비를 조절하는 것으로 보고하고 있다.

자궁은 다양한 세포로 구성되어 있으며, 이러한 세포는 배아의 발달과 착상을 위하여 활발하게 변화를 하는 것으로 알려져 있다(Martin L 등, 1973; Huet-Hudson YM 등, 1989). 또한, 이러한 세포의 변화는 난소로부터 분비되는 estrogen과 progesteron에 의하여 유도되는 조절작용에 따르는 것으로 알려져 있으며, estrogen은 자궁 상피 세포와 간질 세포이 증식을 자극하고, progesteron은 estrogen에 의하여 유도된 luminal과 glandular 상피 세포의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Martin L 등, 1973; Huet-Hudson YM 등, 1989).

따라서 본 연구에서는 사람 자궁 상피 세포주인 HTB-113에서 estradiol-17β (E2)와 progesterone (P4)에 의한 ACSL4의 발현 조절 여부를 검토하였다.

재료 및 방법

세포배양

HEC-1B세포는 5% charcoal FBS(Hyclone, 미국) 1 mM pyruvate(JBI, 한국), 2mM L-glutamin(JBI, 한국)을 포함하는 Minimum Essential Media Eagle(MEM, JBI, 한국) 배양액을 이용하여 배양하였다. Estradiol-17β와 progesterone 처리는 2×10⁵ cell을 3 cm cell culture dish에 접종한 후 24시간이 경과한 다음 Figure에 제시한 농도와 시간 동안 처리하였다.

Total RNA의 제조 및 RT-PCR

Total RNA는 호르몬이 처리된 세포와 대조군 세포를 이용하여 다음과 같이 제조하였다. 세포에 1ml의 TRIzol Regente(Gibco BRL)을 넣고 회수한 다음 균질하였다. 균질된 조직 sample의 단백질을 제거한 다음 에탄올 침전에 의하여 total RNA를 회수하였다. 회수된 RNA는 RNase-free water에 녹여 사용 전까지 -70°C에 보존하였다. Total RNA 5 μg를 사용하여 Superscript II RNaseH-reverse transcriptase(Invitrogen, USA)와 random primer를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. PCR은 1 μl first strand cDNA를 사용하여 NCBI에 보고된

ACSL4에 상응하는 20 pmole sense(TTGAAGTGAAC-TGCAGAGTG)와 antisense(CTACAGCTTCTCTGCCAAGT) primer를 이용하여 1×PCR-buffer, 0.5U ExTaq-polymerase(TaKaRa, Japan), 각 200 μM dNTP 조성으로 denaturation 94°C 30초, annealing 53°C 30초, extension 72°C 30초, 26cycle의 반응조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. Control PCR은 사람 β-actin 특이적 sense (CACACACCTTCTACAATGA)와 antisense(CATGATCTGGGTCATCTTCT) primer를 이용하여 실시하였다.

Real-time PCR

Real-time PCR은 total RNA, Superscript II RNaseH-reverse transcriptase(Invitrogen, USA)와 random primer를 이용하여 first strand cDNA를 합성한 후 실시하였다. real-time PCR은 QuantiTect SYBR Green PCR(Qiagen, Germany) kit와 Roter-Gene 3000 system (Corbett Research)을 이용하여 아래와 같이 수행하였다. 1st cDNA 2 μl (40ng), 10 pmole/l sense와 antisense primer를 각각 1 μl, 2×QuantiTect SYBR Green PCR master mix 10 μl, 멸균 증류수 6 μl를 이용하여 전체 20 μl계에서 실시하였다. PCR 조건은 94°C에서 15초 denaturation, 53°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 cycle을 45 cycle 수행하였다. 유전자 발현의 상대적 정량은 ΔCt 값(시료의 Ct 값- 18S RNA의 Ct 값)을 계산하고 난 다음 ΔΔCt 값(시료의 ΔCt 값-12개월 한우 등심의 ΔCt 값)을 구하여 12개월 한우 등심의 발현을 1로 보았을 때의 상대적 정량을 2^{-ΔΔCt} 값으로 계산하였다. Real-time PCR은 3 반복 실시하였으며, 같은 real-time PCR 조건에서 β-actin을 internal control로 함께 실시하였다.

결 과

Progesterone과 Estradiol-17β의 농도에 따른 ACSL4 유전자의 발현 조절

먼저 Progesterone과 estradiol-17β에 의하여 ACSL4 유전자의 발현이 조절되는 지 알아보기 위하여 사람 endometrial adenocarcinoma 세포인 HEC-1B 세포에 있어서 progesterone과 estradiol-17β의 농도에 따른 ACSL4 유전자의 발현 조절 여부를 검토하였다. Progesteron 0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M을 HEC-1B 세포 24시간 동안 처리하였을 때 농도의 증가에 따라 ACSL4 mRNA의 발현은 증가하였으며 10⁻⁵ M에 가장 높은 발현을 나타내었다 (Fig. 1A). 또한, estradiol-17β를 처리하였을 때도 동일한 양상의 결과를 얻었으며 10⁻⁵ M에서 가장 높은 ACSL4의 발현이 확인되었다 (Fig. 1B).

Progesterone과 Estradiol-17β의 처리시간 따른 ACSL4 유전자의 발현 조절

Progesterone과 estradiol-17β 10⁻⁵ M을 HEC-1B 세포에 처리하여 시간별 ACSL4의 발현을 검토하였다. Fig. 2A에 나타난 바와 같이 progesterone 10⁻⁵ M을 HEC-1B 세포에 처리하였을 때 12시간 후에는 progesterone 처리

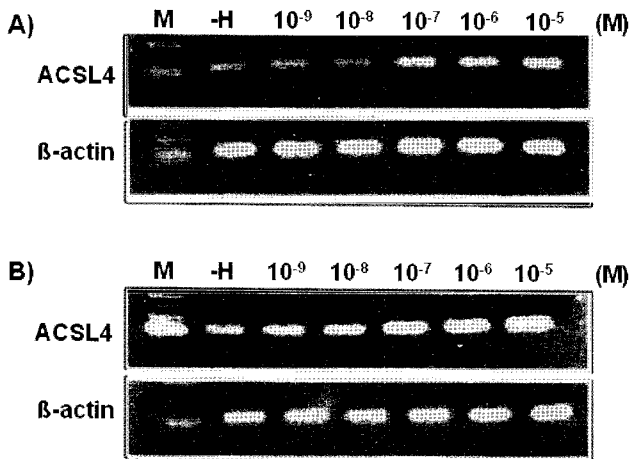


Fig. 1. Expression of ACSL4 mRNA in the human endometrial cancer cell line HTB-1B treated with various amounts of progesterone (A) and estradiol-17 β (B).

하지 않은 0시간의 대조군보다 약 3배의 발현 증가를 보였다. 그러나 24시간부터 72시간 사이에는 ACSL4의 발현이 다소 감소하였으나, 대조군보다는 높은 경향을 나타내었다. 또한, 12시간 동안 progesterone 처리에 의하여 급격한 ACSL4 발현의 변화를 나타내었기 때문에 0, 4, 8, 12시간 사이의 발현을 검토하였다. 그 결과, 0시간부터 점진적인 발현의 증가를 보였으며, 12시간에 가장 높은 발현을 나타내었다(Fig. 2B). 한편, estradiol-17 β 10⁻⁵ M을 HEC-1B 세포에 처리하여 시간별 ACSL4의 발현을 검토한 결과, ACSL4의 발현은 48시간까지 점진적인 발현의 증가를 나타내었으며, 72시간에는 다소 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2C).

Progesterone과 Estradiol-17 β 의 연속 처리에 따른 ACSL4 유전자의 발현 조절

Progesterone과 estradiol-17 β 의 이중 처리에 따른 AC-

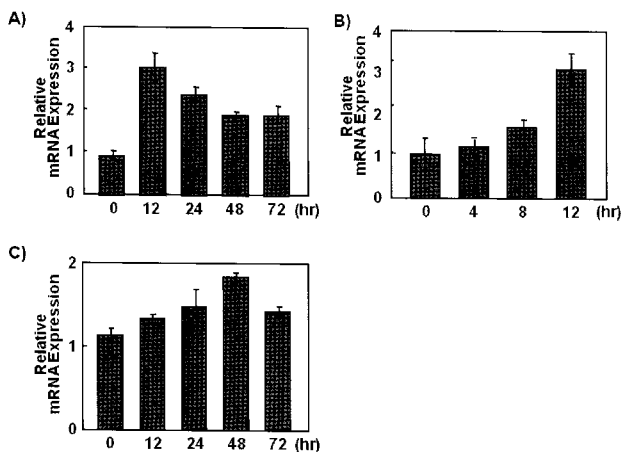


Fig. 2. Time-dependent changes in ACSL4 gene expression induced by progesterone (A, B) and estradiol-17 β (B) in the HTB-1B cell line. HTB-1B cells were cultured in the presence of 10⁻⁵ M progesterone and estradiol-17 β , and harvested at various indicated time points.

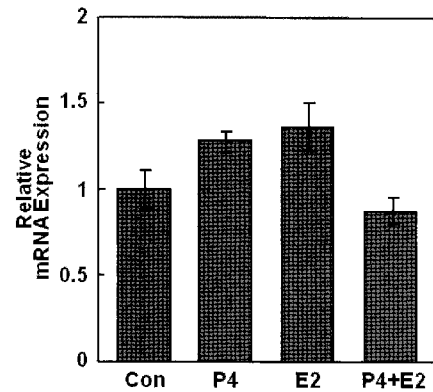


Fig. 3. Regulation of ACSL4 gene expression by the combined with progesterone and estradiol-17 β in the HTB-1B cell line. HTB-1B cells were cultured in the presence of 10⁻⁵ M progesterone (P4) and estradiol-17 β (E2) during 24 hours. Also, HTB-1B cells were cultured in the presence of 10⁻⁵ M progesterone during the 12 hours and changed the media containing estradiol-17 β and harvested the cell after 12 hours (P4+E2).

SL4 유전자 발현의 조절 여부를 확인하기 위하여 10⁻⁵ M의 progesterone과 estradiol-17 β 을 각각 HEC-1B 세포에 48시간 처리한 군과 progesterone 12시간 처리 후 progesterone을 제거한 다음 estradiol-17 β 을 처리한 군에서 ACSL4 발현을 real-time PCR로 확인하였다. Progesterone과 estradiol-17 β 을 각각 24시간 단독 처리한 군에서 ACSL4의 발현은 대조군보다 증가하였다. 그러나 progesterone을 12시간 처리한 후 estradiol-17 β 을 12시간 처리한 군에서는 ACSL4의 발현은 다소 줄어들어 대조군과 유사한 발현의 정도를 나타내었다(Fig. 3).

고찰

프로스타글란딘은 배란, 착상, 월경을 포함하는 다양한 생식과정에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다(Singh M 등, 2011). 이러한 프로스타글란딘은 세포막의 인지질로부터 유리된 아라키돈산을 전구체로 이용하여 cyclooxygenase 1(COX1), cyclooxygenase 2(COX2)에 의하여 합성되는 것으로 알려져 있으며, 생산된 프로스타글란딘은 염증 반응, 혈소판 응집, 혈관신생, 분만, 세포사 등 다양한 세포 반응에 이용되는 것으로 보고되고 있다(Bonventre, 1992; Abrahamsohn과 Zorn, 1993; Bonventre와 Koroshetz, 1993). 특히 COX2의 발현은 착상에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 이 유전자의 발현은 스테로이드 호르몬에 의하여 조절되는 것으로 보고되고 있다(Singh M 등, 2011). 또한, COX2는 HEC-1B에서 prostaglandin E₂(PGE₂)에 의하여 발현이 증가하는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 발현의 조절은 PGE₂에 의한 MAP kinase와 PI3K 신호전달 경로 조절에 의하여 COX2의 발현이 조절되는 것으로 보고되고 있다(Munir 등, 2000).

본 연구에서는 progesterone과 estradiol-17 β 을 사람 상피 세포주인 HTB-113에 처리하였을 때 프로스타글란딘 생성에 관여하고 있을 것으로 추측되는 ACSL4의 발

현을 증가시켰다. 특히 이들 호르몬의 발현 조절은 농도와 처리 시기에 따라 일정하게 ACSL4 발현을 유도하는 것을 확인하였다.

Golej 등(2011)은 arterial smooth muscle cells에서 ACSL4을 과발현시키면 PGE₂의 분비가 대조군에 비하여 줄어들었으며, ACSL4의 효소활성을 줄이는 triacsin과 losiglitazone을 처리하였을 때는 PGE₂의 분비가 증가하였음을 보고하고 있다. 이러한 결과는 ACSL4가 인지질로부터 cPLA₂에 의하여 유리된 아라키돈산을 세포막의 인지질로 재에스테로화하여 COX1과 COX2에 의하여 생산되는 프로스타글란딘의 생성을 조절하는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다(Golej 등, 2011). 그러나 ACSL4의 발현을 siRNA에 의하여 장기간 줄이면 PGE₂의 분비는 줄어들며 이러한 것은 ACSL4가 arterial smooth muscle cells에서 PGE₂의 분비를 조절하기 때문인 것으로 보고되고 있다(Golej 등, 2011). 또한, Sobrino A 등(2009)는 사람 내피세포에서 estradiol에 의하여 발현이 유도되는 유전자를 조사한 결과, COX1 유전자의 발현이 estradiol에 의하여 유도되는 것을 보고하였다.

Progesterone과 estradiol-17 β 에 의한 ACSL4 유전자의 발현 조절에 대해서는 보고된 바가 없으며, 다만 아라키돈산으로부터 프로스타글란딘을 생성하는데 관여하는 COX 유전자가 progesterone과 estradiol-17 β 에 의하여 발현이 조절되고 있음을 보고하고 있을 뿐이다. 그리고 본 연구에서는 progesterone과 estradiol-17 β 가 ACSL4 유전자의 발현을 증가시키지만 이들 호르몬을 12시간씩 나누어 처리하였을 때는 ACSL4 유전자의 발현을 대조군과 같은 수준으로 줄여들었다. 이러한 결과는 임신 과정 중에 황체에서 분비하는 progesterone과 estradiol-17 β 가 자궁에 있는 ACSL4 유전자의 발현을 조절하여 아라키돈산으로부터 생성되는 자궁의 프로스타글란딘 농도를 조절하는 것으로 추측할 수 있다. 그러나 이러한 기작을 더욱 명확하게 하기 위하여 ACSL4 유전자의 promoter 영역에 대한 자세한 연구와 progesterone과 estradiol-17 β 에 의하여 유도되는 전사인자의 결합 부위 등에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

인용문헌

1. Abrahamsohn PA, Zorn TMT (1993): Implantation and decidualization in rodents. *J Exp Zool* 266: 603-628.
2. Bonventre JV (1992): Phospholipase A2 and signal transduction. *J Am Soc Nephrol* 3:128-150.
3. Bonventre JV, Koroshetz WJ (1993): Phospholipase A2 (PLA2) activity in gerbil brain: characterization of cytosolic and membrane-associated forms and effects of ischemia and reperfusion on enzymatic activity. *J Lipid Mediat* 6:457-471.
4. Cho YY, Kang MJ, Ogawa S, Yamashita Y, Fujino T, Yamamoto TT (2000): Regulation by adrenocorticotropic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 274(3):741-745.
5. Cho YY, Kang MJ, Sone H, Suzuki T, Abe M, Igarashi M, Tokunaga T, Ogawa S, Takei YA, Miyazawa T, Sasano H, Fujino T, and Yamamoto TT (2001): Abnormal uterus with polycysts, accumulation of uterine prostaglandins, and reduced fertility in mice heterozygous for acyl-CoA synthetase 4 deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 284:993-997.
6. Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baró MR (2002): Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr* 132(8):2123-2126.
7. Fujino T, Yamamoto T (1992) Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *J Biochem* 111:197-203.
8. Fujino T, Kang M, Suzuki H, Iijima H, Yamamoto T (1996): Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *J Biol Chem* 271, 16748-16752.
9. Golej DL, Askari B, Kramer F, Barnhart S, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Bornfeldt KE (2011): Long-chain acyl-CoA synthetase 4 modulates prostaglandin E₂ release from human arterial smooth muscle cells. *J Lipid Res* 52(4):782-793.
10. Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK (1989): Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 125(3):1683-1690.
11. Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H, Yamamoto T (1997): A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2880-2884.
12. Lin L-L, Lin AY, Knopf JL (1992): Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6147-6151.
13. Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ (1993): cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72(2):269-278.
14. Martin L, Finn CA, Trinder G (1973): Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. *J Endocrinol.* 56(1):133-144.
15. Majerus PW, Prescott SM, Hofmann SL, Neufeld EJ, Wilson DB (1983): Uptake and release of arachidonate by platelets. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 11:45-52.
16. Munir I, Fukunaga K, Kanasaki H, Miyazaki K, Ohba T, Okamura H, Miyamoto E (2000): Expression of cyclooxygenase 2 by prostaglandin E(2) in

- human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B. *Biol Reprod* 63(3):933-941.
17. Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, Sasano H, Sato H, Kamataki A, Nagura H, Kang MJ, Fujino T, Suzuki H, Yamamoto TT (1998): A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem* 124(3): 679-685.
 18. Singh M, Chaudhry P, Asselin E (2011): Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*. 210(1):5-14.
 19. Sobrino A, Mata M, Laguna-Fernandez A, Novella S, Oviedo PJ, García-Pérez MA, Tarín JJ, Cano A, Hermenegildo C (2009): Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS One*. 4(12):e8242.
 20. Suzki H, Kawarabayasi Y, Kondo J, Abe T, NishiKawa K, Kimura S, Hashimoto T, Yamamoto T (1990): Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* 265:8681-8685.
(접수일자: 2011. 8. 26 / 채택일자: 2011. 9. 2)