

구강 편평세포암종 KB 세포에서 아미노산 수송억제제 BCH에 의한 세포성장 억제

윤정훈 · 김윤배 · 김도경[†]

조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

Induction of Growth Inhibition by BCH in KB Human Oral Epidermoid Carcinoma Cells

Jung Hoon Yoon, Youn Bae Kim and Do Kyung Kim[†]

Oral Biology Research Institute, College of Dentistry, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract

Amino acid transporters play an important role in supplying nutrients to normal and cancer cells for cell proliferation. System L is a major transport system responsible for the Na^+ -independent, large neutral amino acids including several essential amino acids. L-type amino acid transporter 1 (LAT1), an isoform of system L amino acid transporter, is highly expressed presumably to support their continuous growth and proliferation in malignant tumors. 2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) is a model compound for study of amino acid transporter as a system L selective inhibitor. In the present study, we examined whether BCH induced growth inhibition in KB human oral squamous carcinoma cell line or not. The uptake of L- ^{14}C leucine by KB cells is inhibited by BCH in a concentration dependent manner with a IC_{50} value of $75.3 \pm 6.2 \mu\text{M}$ and a K_i value of $98.7 \pm 4.1 \mu\text{M}$. The growth of KB cells is inhibited by BCH in time dependent manner and concentration dependent manner with a IC_{50} value of $11.1 \pm 0.8 \text{ mM}$. In the DNA of KB cells treated with the various concentrations and various periods of BCH, the characteristic ladders associated with DNA fragmentation were not observed. These results suggest that BCH inhibits the growth of KB oral epidermoid carcinoma cells through the inhibition of transport of neutral amino acids into cells without DNA break down. This phenomenon will be a new rationale for anti-cancer therapy.

Key words: nutrition to cell, amino acid transporter, growth inhibition, oral squamous cell carcinomas, anti-cancer therapy

서 론

아미노산은 세포 내에서 단백질 합성의 기질이 될 뿐만 아니라, glucose, purine, pyrimidine 등 다양한 물질의 생합성에도 관여하며, 세포 내에서 필요한 아미노산의 수송은 아미노산 수송체(transporter)를 통하여 이루어진다(1).

아미노산 수송체 L은 Na^+ -비의존적으로 중성 아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 종양 세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성 아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송체로 알려져 있으며(1,2), 상피 세포의 기저층 막에 존재하여 소장 상피세포를 통한 중성 아미노산의 흡수에 중요한 기능을 한다(1). 또한 아미노산 수송체 L은 수송할 수 있는 기질, 즉 수송할 수 있는 아미노산이 아주 많다는 특징을 가지고 있으며(3) 다수의 필수 아미노산을 포함한 중성 아미노산 뿐만 아니라 L-dopa, melphalan, thyroid hormone 및 gabapentin 같은 아미노산 구조를 가진 약물들도 수송할 수 있으므로 약물 수송체로 간주되기도 한다(1,4-8).

1998년 Kanai와 공동연구자들에 의해 아미노산 수송체

L의 첫 번째 isoform인 아미노산 수송체 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 C6 rat glioma cell에서 동정되었다(9). LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서 Na^+ -비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, methionine과 histidine 같은 구조가 큰 중성 아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다(9-11). 그리고 LAT1은 4F2 heavy chain(4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide bond로 결합되어진 heterodimer형 막 단백질이며, LAT1이 기능을 나타내기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이라는 것이 보고되었다(9,10,12-15). 또한 LAT1은 종양세포에서 과발현되며, 세포의 지속적인 성장에 중요한 역할을 한다고 알려졌다(9,10,16,17). LAT1의 분자적 동정 후에 LAT1과 구조적으로 관련이 있는 아미노산 수송체 L의 두 번째 isoform인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정되었다(3,18-20). LAT1이 종양세포에 과발현 된다고 알려진 것과는 달리 LAT2는 많은 정상 조직에서 발현을 보이며, 구조가 큰 중성 아미노산 뿐만 아니라 구조가 작은 중성 아미노산도 모두 수송한다(19-21).

[†]Corresponding author. E-mail: kdk@chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-6893, Fax: 82-62-223-3205

아미노산 수송체 LAT1과 LAT2의 특성을 살펴보면, 이들 아미노산 수송체 L, 특히 종양세포에 과발현되는 LAT1의 조절을 통해 종양세포 성장억제를 위한 하나의 방법을 제시할 수가 있다. 종양세포에서 LAT1의 활성을 억제하는 억제제를 이용하여 세포 내 아미노산의 고갈을 유도한다면 종양세포 성장의 억제를 유도할 수 있을 것이다.

2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid(BCH)는 아미노산 수송체의 연구에서 수송체 L의 억제제로 자주 이용되는 화합물이다(9-11,20,22). 수송체 L이 leucine, iso-leucine, valine, phenylalanine, methionine 및 histidine 등의 필수아미노산을 수송하기 때문에, 만약 세포에서 수송체 L이 BCH 같은 억제제에 의해 차단된다면 세포는 세포성장과 증식에 필수적인 필수아미노산의 고갈에 의해 큰 손상을 입을 것이다. 그러나 이러한 아미노산 수송 억제에 의한 세포성장 억제기전에 관한 실험적 자료는 거의 없는 실정이다.

구강암은 쉽게 생검할 수 있고 치료효과의 모니터링이 다른 부분의 암과 달리 간편하여 화학 및 방사선요법 혹은 유전자요법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있다. 그럼에도 불구하고 구강암은 다른 암에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 가장 되어 있지 않은 암 중의 하나이다. 게다가 정상 구강상피 세포 뿐만 아니라 구강암 세포에서 세포 내 필수 영양물질인 아미노산의 수송체에 관한 연구 또한 부족한 실정이다. 따라서 본 연구자들은 구강 편평세포암종 KB 세포를 이용하여 아미노산 수송체 L 억제제인 BCH의 세포 성장 억제에 미치는 효과를 밝히고자 하며, 아울러 아미노산 수송체 LAT1의 억제를 통한 구강암 치료의 효용성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

L-[¹⁴C]leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc.(Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였고, BCH 및 N-methylthiotetrazole(MTT)는 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아미노산 및 기타시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

구강 편평세포암종 KB 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)에서 제공받아 사용하였다.

Uptake 실험

KB 세포에서 중성 아미노산 수송에 영향을 미치는 BCH의 특성을 조사하기 위해 Kim 등(22)의 방법을 이용하여 아미노산 uptake 실험을 시행하였다. KB 세포를 성장배지(10% FBS가 포함된 DMEM 배지) 하에서 37°C에서 배양하였다. KB 세포를 수집하여 24-well plate에 접종(1×10^5 cells/well)하고, 접종 48시간 후 uptake 실험을 시행하였다.

48시간 후 성장배지를 흡수기를 이용하여 제거한 뒤 KB

세포를 Na⁺-free uptake 용액(125 mM choline-Cl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.6 mM glucose, pH 7.4)을 이용하여 3회 세척한 후 37°C에서 10분간 전배양하였다. 그 후, 용액을 L-[¹⁴C]leucine이 존재하는 uptake 용액으로 교체하여 1분 배양시켰다. 반응의 정지를 위해 4°C의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 그 후 KB 세포를 0.1 N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake된 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 방사능을 pmol/mg protein/min으로 산출하였다. 본 논문의 uptake 실험에서 각각의 결과를 위해 각 실험군은 4~6개의 KB 세포가 존재하는 well을 이용하였으며, 각각의 결과를 mean \pm SEM(n = 4~6)로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 3회 이상 반복 실험을 수행하여 결과를 산출하였다.

KB 세포에서 L-leucine의 수송을 억제하는 BCH의 IC₅₀은 L-[¹⁴C]leucine 1 μ M 존재 하에서 BCH 농도 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 μ M에서 uptake를 수행하여 산출하였다. BCH의 K_i치를 산출하기 위한 실험에서는 BCH 0, 50 및 100 μ M 존재 하에서 L-[¹⁴C]leucine 농도 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 μ M에서 uptake를 수행하였으며, K_i치는 1/L-leucine 농도에 대한 1/L-leucine uptake율을 산출하여 double-reciprocal plot 분석으로 계산하였다(K_i=BCH 농도/(BCH 존재 하에서 L-leucine uptake의 K_m / L-leucine uptake의 K_m)-1)(22,23).

MTT assay

BCH에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 KB 세포를 24 well plate에 5×10^3 /well의 세포를 뿌리고 24시간동안 배양한 후, BCH를 다양한 농도 및 시간에서 처리하여 37°C에서 반응시킨 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 KB 세포에 MTT 용액을 37°C에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04 N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570 nm에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

DNA fragmentation 분석

세포사멸의 기전 중 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 실험을 시행하였다. BCH에 의한 DNA fragmentation 효과를 관찰하기 위해 KB 세포를 10 cm 배양접시에 5×10^5 의 세포를 뿌리고 24시간동안 배양한 후, BCH를 다양한 농도 및 시간에서 처리하여 37°C에서 반응시킨 후 배양한 세포를 모아 통상의 phenol-chloroform extraction법으로 DNA를 추출하였다. 매번 10초 동안 교반하고 14,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 3 M NaOAc와 100% ethanol을 이용하여 상층액으로부터 DNA를 분리시키기 위해 -20°C에서 2시간 동안 침전시켰다. DNA를 14,000 rpm에서 10분동안 원심분리하여 침전시켜 70% ethanol로 수세한 후 건조시켰다. DNA를 Tris-EDTA 용액으로 현탁시킨 후, 1.5% agarose

gel에서 전기영동하고 ethidium bromide 염색으로 visualization하여 결정하였다.

실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였다.

결 과

KB 세포에서 L-leucine 수송에 영향을 미치는 BCH의 효과

KB 세포에서 L-[¹⁴C]leucine의 수송에 미치는 BCH의 특성을 조사하기 위하여 [¹⁴C]이 표지된 L-leucine의 uptake 실험을 BCH 존재 하에서 시행하였다. BCH 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 μM은 L-[¹⁴C]leucine 1 μM의 uptake를 농도 의존적으로 억제하였으며 그 IC₅₀은 75.3 ± 6.2 μM(mean ± SEM, n = 4)로 산출되었다(Fig. 1). 억제상수인 K_i 치를 구하기 위해 BCH 0, 50 및 100 μM 존재 하에서 L-[¹⁴C]leucine 농도 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 μM에서 uptake를 수행하였으며 그 K_i 치는 98.7 ± 4.1 μM(mean ± SEM, n = 4)로 산출되었고, 그 숫치가 IC₅₀ 값과 매우 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한 Fig. 2의 분석으로 L-leucine과 BCH가 동일한 수송체를 이용하여 세포 내 이동을 하며, 서로 경쟁적 억제제로 작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

KB 세포에서 세포성장애 영향을 미치는 BCH의 효과

KB 세포의 BCH에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위해 MTT를 시행하였다. BCH를 0, 0.3, 1, 3, 10, 20 및 50 mM의 다양한 농도로 5일 동안 KB 세포에 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, BCH 1 mM 이하의 농도에서는 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제정도의 차이를 볼 수 없었다

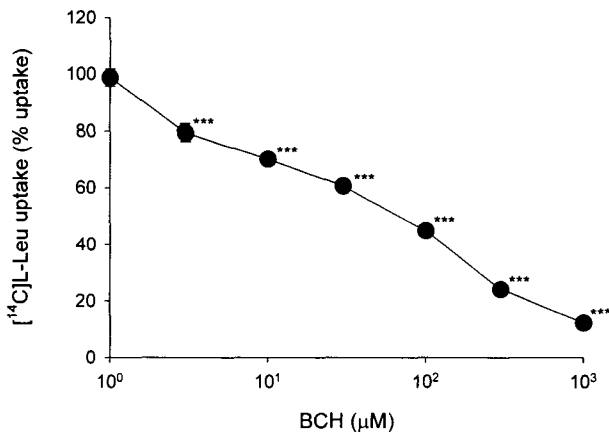


Fig. 1. The concentration-dependent inhibition of L-[¹⁴C]leucine uptake by BCH in KB cells. The L-[¹⁴C]leucine uptake (1 μM) was measured for 1 min in the Na⁺-free uptake solution in the presence of varied concentrations of BCH and expressed as a percentage of control-leucine uptake in the absence of BCH. ***p < 0.001 vs. control (the uptake measured in the absence of BCH).

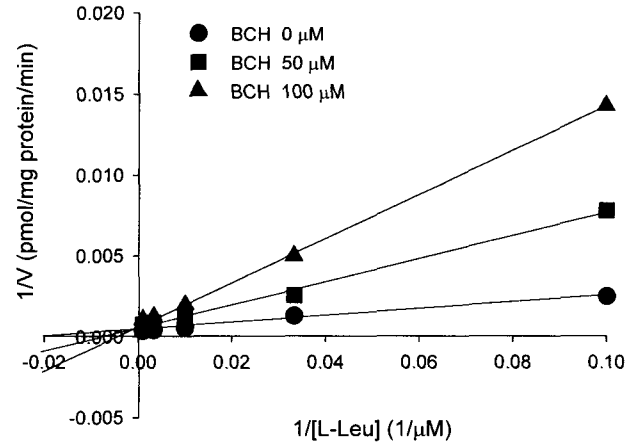


Fig. 2. Double reciprocal plot analyses of the inhibitory effect of BCH on L-[¹⁴C]leucine uptake in KB cells.

The L-[¹⁴C]leucine uptake (3, 10, 30, 100, 300 and 1000 μM) was measured in the Na⁺-free uptake solution in the presence (50 μM, filled square; 100 μM, filled triangle) or absence (filled circle) of BCH.

(Fig. 3). 그러나 BCH 3, 10, 20 및 50 mM에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 세포 성장억제 효과를 볼 수 있었으며, 그 생존율이 약 72, 54, 12 및 4%이었고 IC₅₀은 11.1 ± 0.8 mM(mean ± SEM, n = 4)로 산출되었다(Fig. 3). BCH 20 및 50 mM을 0.5일부터 5일까지 처리한 결과 KB 세포 성장억제는 BCH 처리 시간에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 4). BCH 20 mM 처리군에서는 BCH 처리 1.5일부터 통계적인 의의가 있었으며, 50 mM 처리군에서는 BCH 처리 1일부터 뚜렷한 차이가 있어, BCH에 의한 KB 세포의 성장억제는 시간과 농도에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

DNA fragmentation 분석

BCH에 의한 KB 세포 성장억제의 특성을 확인하기 위해

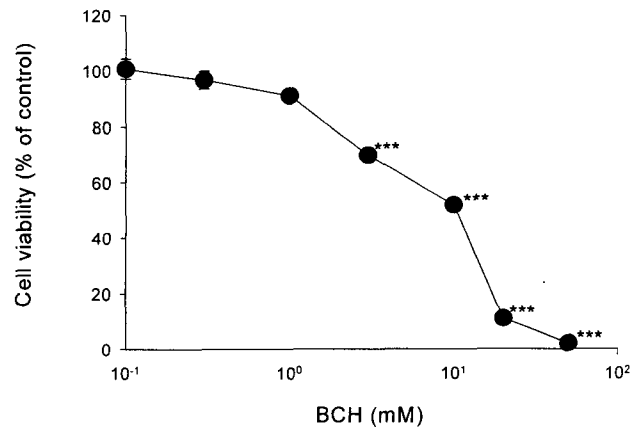


Fig. 3. Effect of BCH on the viability of KB cells. KB cells treated with various concentrations of BCH or without BCH for 5 days. The cell viability was determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of A570_{nm}s of BCH treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean ± SEM for four experiments. ***p < 0.001 vs. control.

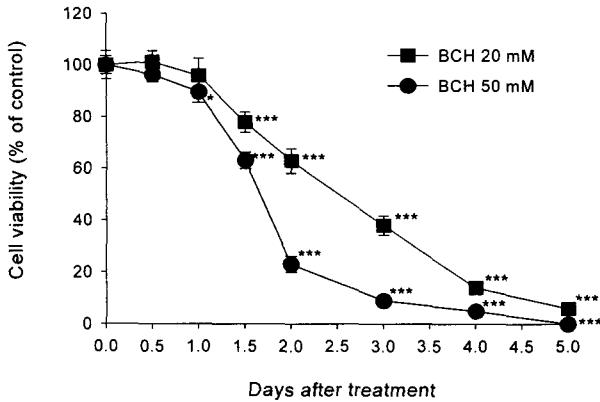


Fig. 4. Time-dependent effect of BCH on viability of KB cells. KB cells treated with 0, 20 and 50 mM BCH for 0~5 days. The cell viability was determined by the MTT assay. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of A570_{nms} of BCH treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM for four experiments. * $p < 0.05$ vs. control and *** $p < 0.001$ vs. control.

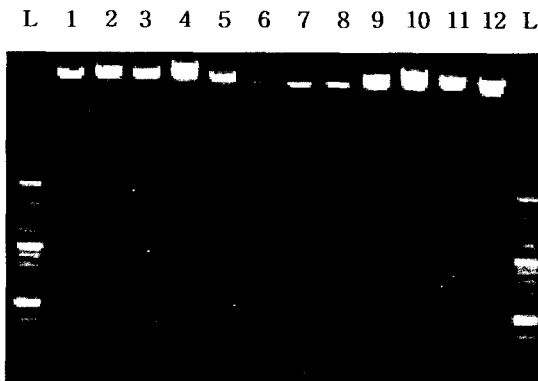


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from KB cells.

KB cells were treated with 50 mM BCH or without BCH for indicated time periods and was subjected to DNA fragment analysis by agarose gel electrophoresis.

- Lane L: ladder.
- Lane 1: KB cells treated with 0 mM BCH for 12 hrs.
- Lane 2: KB cells treated with 50 mM BCH for 12 hrs.
- Lane 3: KB cells treated with 0 mM BCH for 1 day.
- Lane 4: KB cells treated with 50 mM BCH for 1 day.
- Lane 5: KB cells treated with 0 mM BCH for 2 days.
- Lane 6: KB cells treated with 50 mM BCH for 2 days.
- Lane 7: KB cells treated with 0 mM BCH for 3 days.
- Lane 8: KB cells treated with 50 mM BCH for 3 days.
- Lane 9: KB cells treated with 0 mM BCH for 4 days.
- Lane 10: KB cells treated with 50 mM BCH for 4 days.
- Lane 11: KB cells treated with 0 mM BCH for 5 days.
- Lane 12: KB cells treated with 50 mM BCH for 5 days.

여 DNA fragmentation 분석을 시행하였다. BCH 0 및 50 mM을 처리한 KB 세포의 DNA를 분리하여 전기영동으로 확인한 결과, 대조군 및 BCH 처리 실험군에서 DNA fragmentation 현상을 볼 수 없었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서 구강 편평세포암종 KB 세포를 이용하여 아

미노산 수송계 L의 선택적 억제제인 BCH의 세포 성장억제에 미치는 효과를 조사하였다. 중성 아미노산 중의 하나인 L-leucine 수송실험에서 BCH는 L-[¹⁴C]leucine uptake를 농도 의존적으로 억제하였으며 그 IC₅₀은 약 75.3 μM이었고 K_i치는 약 98.7 μM로 산출되었다. 또한 L-leucine과 BCH가 동일한 수송체를 이용하여 세포 내 이동을 하고, 서로 경쟁적 억제제로 작용을 하고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 결과는 중성 아미노산과 BCH가 동일한 수송체를 이용하여 세포 내 이동을 함을 가리킨다. 또한 본 연구자들의 이전 연구에서 KB 세포에서 중앙 세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성 아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송계 L의 isoform인 LAT1과 LAT1의 보조인자 4F2hc의 발현을 확인할 수 있었으나 아미노산 수송계 L의 또 다른 isoform LAT2의 발현은 관찰할 수 없었다(논문 투고 중). 본 실험 결과는 비슷한 특성을 지닌 T24 human bladder carcinoma 세포에서 LAT1과 4F2hc 발현 및 BCH에 의한 L-leucine의 수송 억제를 확인한 다른 문헌들의 결과들과 일치하는 것이었다(10,22). 따라서 KB 세포를 이용한 본 실험에서의 결과와 T24 세포를 이용한 본 연구자의 이전 문헌에서의 결과(10,22) 및 LAT1이 중앙 세포에서 과발현되고 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고 보고한 이전의 문헌들(9,10,16,17)의 결과를 같이 고찰하여 볼 때 구강 편평세포암종 KB 세포에서는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT1과 그 보조인자 4F2hc를 통해 중성 아미노산들이 수송되며, BCH 역시 LAT1을 통해 수송된다고 볼 수 있다. KB 세포에서 L-leucine의 uptake는 BCH에 의해 차단되었다. BCH는 아미노산 구조를 가진 화합물로서 아미노산 수송계 L의 선택적 억제제이며, 중성과 염기성 아미노산을 수송하는 Na⁺-의존적 아미노산 수송체 ATB^{0,+} (amino acid transporter B^{0,+})의 약한 차단제이다(24). 그러나 Na⁺이 존재하지 않는 조건에서 BCH는 아미노산 수송계 L만을 선택적으로 차단한다(10,22). 또한 KB 세포에서는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT2는 존재하지 않고 LAT1만이 존재한다. 따라서 KB 세포에서 L-leucine을 포함한 중성 아미노산의 수송에는 LAT1이 중요한 기능을 하고 있다고 말할 수 있다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 실험에서 BCH는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다. 이는 시간과 농도에 의존적으로 중앙세포의 성장을 억제시키는 항암효과를 지닌 여러 화합물들([6]-paradol, norcantharidin, baccatin 등)에서의 연구 결과(25-27)와 일치하는 것이었다. KB 세포에서는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT1만이 존재하여 이를 통해 중성 아미노산 및 BCH가 수송되며, 또 BCH는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 KB 세포에서 BCH에 의한 세포성장의 억제는 중성 아미노산을 수송하는 LAT1에 BCH와 중성 아미노산들이 경쟁적으로 작용하여 세포성장에 필수적인 필수 아미노산을 다수 포함하는 중성 아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 KB 세포 성장의

억제를 유도하는 것으로 사료된다.

BCH에 의한 KB 세포 성장억제의 특성을 확인하기 위하여 DNA fragmentation 분석을 시행한 결과, BCH를 처리한 어떤 실험군에서도 DNA fragmentation 현상은 볼 수 없었다. 이는 항암효과를 지닌 여러 화합물들([6]-paradol, norcantharidin, baccatin 등)이 DNA fragmentation을 유도하는 apoptosis 과정에 의해 세포를 사멸시킨다는 연구 결과(25-27)와 다른 결과로서, BCH에 의해 유도되는 KB 세포 성장억제의 과정에는 apoptosis 과정이 포함되지 않는 것으로 사료되며, BCH의 세포성장 억제기전에 관한 연구는 더 추구하여야 할 과제로 생각된다.

결론적으로, 구강 편평세포암종 KB 세포에서 중성 아미노산 수송계 L 중에서 LAT1과 그 보조인자 4F2hc를 통해 L-leucine 및 BCH를 포함한 중성 아미노산의 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었으며 BCH는 이 LAT1을 차단하여 세포 성장에 필수적인 L-leucine 등 중성 아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 KB 세포 성장의 억제를 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 본 실험의 결과로 LAT1의 연구에 KB 세포의 유용성의 제시 및 이 LAT1의 억제제를 이용하여 구강암 세포의 성장 억제에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

구강 편평세포암종 KB 세포를 이용하여 아미노산 수송계 L 억제제인 BCH의 세포 성장억제에 미치는 효과를 밝히기 위해, KB 세포에서 uptake 실험, MTT 분석 및 DNA fragmentation 분석 등을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. KB 세포에서는 아미노산 수송계 L 중에서 LAT1과 그 보조인자 4F2hc를 통해 BCH 및 중성 아미노산들이 수송되었다. BCH는 시간과 농도에 의존적으로 KB 세포의 성장을 억제시켰다. BCH를 처리한 실험군에서 DNA fragmentation 현상은 볼 수 없었다. 본 연구의 결과로서 구강암 세포주인 구강 편평세포암종 KB 세포에서 LAT1과 그 보조인자 4F2hc를 통해 BCH 및 중성 아미노산의 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었으며 BCH는 이 LAT1을 차단하여 중성 아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 KB 세포 성장의 억제를 유도하는 것으로 사료된다.

문 헌

- Christensen HN. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 70: 43-77.
- Silbernagl S. 1979. Renal transport of amino acids. *Klin Wochenschr* 57: 1009-1019.
- Kanai Y, Endou H. 2001. Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab* 2: 339-354.
- Gomes P, Soares-da-Silva P. 1999. L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. *Brain Res* 829: 143-150.
- Goldenberg GJ, Lam HY, Begleiter A. 1979. Active carrier-mediated transport of melphalan by two separate amino acid transport systems in LPC-1 plasmacytoma cells *in vitro*. *J Biol Chem* 254: 1057-1064.
- Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J. 1993. Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. *J Neurochem* 60: 1407-1413.
- Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J. 1990. The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. *Endocrinology* 126: 3245-3250.
- Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender DL. 1995. Transport of gabapentin, a gamma-amino acid drug, by system 1 alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. *J Neurochem* 64: 2125-2131.
- Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E, Endou H. 1998. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273: 23629-23632.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, Cha SH, Matsuo H, Fukushima J, Fukasawa Y, Tani Y, Taketani Y, Uchino H, Kim JY, Inatomi J, Okayasu I, Miyamoto K, Takeda E, Goya T, Endou H. 2001. Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514: 291-302.
- Uchino H, Kanai Y, Kim do K, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H. 2002. Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61: 729-737.
- Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F. 1998. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395: 288-291.
- Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F. 1998. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439: 157-162.
- Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME. 1998. The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. *J Biol Chem* 273: 33127-33129.
- Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N. 1999. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 274: 3009-3016.
- Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL. 1995. TA1, a highly conserved oncofetal complementary DNA from rat hepatoma, encodes an integral membrane protein associated with liver development, carcinogenesis, and cell activation. *Cancer Res* 55: 1152-1159.
- Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL. 1996. Expression of a highly conserved oncofetal gene, TA1/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to *Schistosoma mansoni* amino acid permease and *Caenorhabditis elegans* gene products. *Cancer Res* 56: 5012-5022.
- Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. 2000. Glycoprotein-

- associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 440: 503-512.
19. Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M. 1999. Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274: 19738-19744.
 20. Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y. 1999. Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274: 19745-19751.
 21. Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC. 1999. LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274: 34948-34954.
 22. Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, Tachampa K, Anzai N, Iribe Y, Endou H. 2002. Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1565: 112-121.
 23. Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H. 2001. Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276: 17221-17228.
 24. Sloan JL, Mager S. 1999. Cloning and functional expression of a human Na⁺ and Cl⁻-dependent neutral and cationic amino acid transporter B⁰⁺. *J Biol Chem* 274: 23740-23745.
 25. Keum YS, Kim J, Lee KH, Park KK, Surh YJ, Lee JM, Lee SS, Yoon JH, Joo SY, Cha IH, Yook JI. 2002. Induction of apoptosis and caspase-3 activation by chemopreventive [6]-paradol and structurally related compounds in KB cells. *Cancer Lett* 177: 41-47.
 26. Miller MC 3rd, Johnson KR, Willingham MC, Fan W. 1999. Apoptotic cell death induced by baccatin III, a precursor of paclitaxel, may occur without G(2)/M arrest. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 444-452.
 27. Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Lee CH, Lee JJ, Lou IU, Lee MS, Hsiao M, Lin SK. 2003. Comparisons of norcantharidin cytotoxic effects on oral cancer cells and normal buccal keratinocytes. *Oral Oncol* 39: 19-26.

(2003년 3월 13일 접수; 2003년 6월 16일 채택)