

HeLa 세포에서 Estrogen이 Na,K-ATPase 활성화에 미치는 영향

이시내 · 김화정 · 이경림*
이화여자대학교 약학대학

Estrogen Effect on the Na,K-ATPase Activity Repressed by IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor in HeLa Cells. Lee, Si-Nae, Hwa-Jung Kim, and Kyunglim Lee*. *College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea* – IgE-dependent histamine-releasing factor (HRF) is found extracellularly to regulate the degranulation process of histamine in mast cells and basophils and known to play a predominant role in the pathogenesis of chronic allergic disease. HRF has been also identified in the intracellular region of the cell. Previously, we reported that HRF interacts with the 3rd cytoplasmic domain of the alpha subunit of Na,K-ATPase and inhibits Na,K-ATPase activity. Since it is known that estrogen activates the sarcolemmal Na,K-ATPase, we tested whether estrogen recovers the Na,K-ATPase activity repressed by HRF. In this study, we showed that estrogen activates Na,K-ATPase repressed by HRF. RT-PCR and western blot analysis showed that estrogen doesn't reduce the expression level of HRF in HeLa cell, suggesting that this recovery effects of estrogen probably occur via indirect mechanism on HRF and Na,K-ATPase.

Key words: HRF, estrogen, Na,K-ATPase

IgE-dependent histamine-releasing factor(HRF)는 translationally controlled tumor protein(TCTP)이라고도 불리는 house keeping protein이다[4, 5]. 1995년 MacDonald *et al.* 은 아토피 환자의 림프세포와 알레르기 환자의 생체액에서 HRF를 분리, 정제하였고 이 HRF가 이미 알려진 성장관련 단백질인 TCTP와 동일한 단백질이라는 것을 밝혔다[14]. 일반적으로 알려진 HRF의 기능은 히스타민 유리기능인데, IgE에 상관없이 HRF가 호염기구(basophil)에서 histamine, IL-4, IL-13의 분비를 조절하는 것이 관찰되어[18] HRF가 IgE가 아닌 특이적 수용체에 결합하여 기능할 것이라는 가능성이 제시되고 있다[2, 12, 13, 17]. 또 HRF의 다른 기능으로 칼슘결합 단백질로서의 기능[11, 16], 세포성장과 관련한 튜블린 결합단백질로서의 기능[8], 말라리아 치료제인 artemisinin의 타겟으로서의 기능[3], 금속 항상성[19]와 세포내 신호전달[15] 관련 분자로서의 기능 등이 알려져 있다. 본 실험실에서는 yeast two-hybrid assay를 통해 HRF가 Na,K-ATPase의 세포내 노출된 도메인 중 3번째 루프와 결합하여 Na,K-ATPase의 활성을 저해한다고 발표하였다[10].

Na,K-ATPase은 신경, 신장, 혈관근육 등에서 Na^+ 이온과 K^+ 이온의 transmembrane electrochemical gradient를 조절함으로써 심혈관계의 항상성을 유지하는 데 매우 중요한 역할을 하는 효소이다[9]. Na,K-ATPase는 α , β subunit으로 이루어진 heterodimer 인데 이 중에서도 α subunit이 ATP,

cation 등과 결합하여 이온 수송을 주로 하는 것으로 생각되고 있다[1]. 본 실험실에서는 Na,K-ATPase의 $\alpha 1$ subunit의 3번째 loop을 bait로 하여 rat kidney cell library에서 yeast two-hybrid assay를 실시하였다. 그 결과 positive clone의 상당수가 HRF이었다는 점을 볼 때, HRF가 Na,K-ATPase와 상호작용하면서 신장에서 Na^+ 이온의 움직임을 주관하는 등, 심혈관계의 항상성 조절에 관여하리라는 추측을 할 수 있다.

Estrogen은 생식기계에 중요한 역할을 하는 여성의 성호르몬이다. Estrogen 결핍 시 심혈관계의 위험도가 높아져 폐경기 여성에 있어서 허혈성 심질환, 고혈압, 고지혈증 등의 심혈관 질환의 가능성이 커진다고 알려져 있다. 또, estrogen은 심근막 세포에서 Na,K-ATPase에 직접적으로 작용하여 Na,K-ATPase를 활성화시키며, 세포의 각종 oxidative stress를 줄여줌으로서 Na,K-ATPase가 저해되는 것을 막아준다.

본 연구를 통해 HRF가 Na,K-ATPase의 활성을 저해하고, HRF에 의해 저해된 Na,K-ATPase의 활성이 estrogen에 의해 회복됨을 확인하였다. 그러나 이러한 estrogen의 작용이 HRF의 RNA 나 단백질 수준의 발현을 직접적으로 변화시키는 것은 아니었다.

N-terminal Enhanced Fluorescent Protein vector인 pEYFP-N1에 rat HRF를 subcloning 하기 위해 rat HRF의 stop codon을 제외한 full length(519 bp)를 rHRF/HA-LacZ를 template로 하고 sense oligo GGAATTCGGTCACCATGATCATCTACCGGAC과 antisense oligo ACGCGTCGACTGACATTTTTTCATCTTTAA를 이용하였다. PCR은 pre-denaturation 94°C, 5분/denaturation 95°C, 1분/annealing

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-3024, Fax: 82-2-3277-2851
E-mail: klyoon@ewha.ac.kr

55°C, 1분/elongation 72°C, 40초/post-elongation 72°C, 7분의 조건에서 25 cycle 동안 반응시켰다. PCR primer들에 직접 *EcoRI*과 *SalI*의 restriction site를 도입했으므로 이는 PCR 과정 중에 각 fragment 끝에 넣어진다. 증폭된 PCR product를 1.0% agarose gel에 걸어서 예상되는 크기 519 bp를 확인한 후 PCR purification kit을 사용해 정제하였다. 그 후 *EcoRI*, *SalI*을 가해 37°C aluminium bath에서 2시간 배양하였다. Vector pEYFP-N1 역시 *EcoRI*, *SalI*으로 2시간 digestion한 후, agarose gel에 걸어 linearization된 것을 확인하고 insert와 함께 다시 정제하였다. Restriction enzyme site가 동일한 vector와 insert를 ligation 시킨 후 DH10B supercompetent cell에 transformation 시켰다. Kanamycin resistant colony들에서 제대로 ligation된 colony를 내부의 *EcoRI*, *SalI* restriction site를 확인함으로써 원하는 construct를 찾아내었다. 최종적으로 이화여대 세포신호전달 연구 센터에 DNA sequencing을 의뢰하여 pEYFP-N1/rat HRF의 sequence가 맞는지 확인하였다.

HeLa cell을 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin을 첨가한 phenol red가 없는 DME/F-12 배지에서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 키우며 2-3일에 한번씩 100 mm petri dish에 10⁶ cells/ml로 분주해 주었다.

Transient transfection을 하기 위해, transfection 당일에 70-80% confluence가 되도록 실험 전날 100 mm dish나 well plate에 세포를 분주한 후 Lipofectamine PLUS reagent kit을 이용하여 transfection 시켰다. 즉, serum-free dilution 배지에 DNA 4 µg(100 mm dish 기준)씩 넣어 잘 혼합한 후, PLUS reagent 20 µl(100 mm dish 기준)을 가하여 15분간 상온에서 반응시켰다. 이 혼합 반응액을 serum-free dilution 배지에 Lipofectamine reagent 30 µl을 섞은 반응액과 다시 혼합하여 15분간 상온에서 반응시켰다. DNA, PLUS, Lipofectamine이 혼합된 반응액을 serum-free 배지로 교환된 HeLa cell에 가한 후, 3시간동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 3시간 동안 배양된 혼합 반응액을 10% FBS가 포함된 DME/F-12 배지로 교환 후, 다시 24-48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

17β-estradiol을 처리할 때는 10% FBS를 첨가한 phenol red가 없는 DME/F-12 배지에서 자란 HeLa cell을 serum과 phenol red가 없는 DME/F-12 배지로 갈아주었다. 여기에 absolute ethanol에 1.0×10⁻⁶ M으로 용해시킨 17β-estradiol을 최종 농도 1.0×10⁻⁸ M이 되게 첨가하였다. 대조군에는 vehicle인 absolute ethanol을 동일한 volume으로 첨가해주었다. 처리 시간은 18-24시간으로 맞추었다.

17β-estradiol과 absolute ethanol을 가한 HeLa cell을 24시간 배양한 후, 따뜻한 PBS 5 ml로 1회 세척하고 1 ml TRIZOL reagent를 가하여 pipet으로 여러번 통과시키면서 lysis해서 eppendorf tube로 옮겼다. 상온에서 5분간 배양한

뒤 chloroform 0.2 ml을 가해 15초간 잘 흔들어 섞어준 후 12,000 g, 15분, 4°C로 원심 분리했다. 층만을 새 tube에 깨끗이 옮긴 후 0.5 ml RNA용 isopropyl alcohol을 가하여 상온에서 10분간 배양하고 이를 12,000 g, 10분, 4°C로 원심 분리하여 상층액을 제거하고 RNA pellet을 얻었다. 이 pellet을 RNA용 75% Ethanol로 2회 씻어준 후 살짝 말려서 RNase-free water로 녹여서 55-60°C에서 10분간 배양했다.

위와 같이 얻은 RNA를 정량하여 1 µg를 5 mM MgCl₂, 1× reverse transcriptase buffer, 1 mM dNTP, 1 u/µl rRNasin, 15 u/µl AMV reverse transcriptase, 50 µg/µg RNA oligo (dT)₁₅ primer, RNase-free water와 reaction 시켜 42°C에서 15분간 배양했다. 이렇게 얻은 DNA를 template로 하여 PCR 하였다.

positive control인 β-actin의 PCR에서 사용한 primer는 sense; TACAATGAGCTGCGTGTGGC, antisense; ATGTCACGCACGATTTCCC 이며 human, mouse form을 인식할 수 있으며 PCR 산물은 400 bp이다. HRF의 primer는 sense; ATGATTATCTACCGGGAC, antisense; ACATTTTCCATCTCTAA이며 HRF의 full length를 amplification 할 수 있으며 human, mouse, rat 등을 인식할 수 있고 PCR 산물의 크기는 516 bp이다. Na-pump α1의 primer는 sense; GAGGAGTTATCCACCTTGC, antisense; GGGGTTGGA-CGTGATAA이며 isotype별로 상동성이 낮은 loop 1부분의 서열을 인식하도록 제작하였으며, human에 특이적으로 작용하며, 최종산물의 크기는 650 bp이다.

12 well plate에 HeLa cell을 1.0×10⁵ cells로 분주한 후, 10% FBS, phenol red가 없는 DME/F-12 배지에 배양하였다. Complete DME/F-12 배지 상태에서 자란 세포를 실험 방법에 따라 transfection 한 후 3-5시간이 지나면 serum이 없는 배지로 갈아주고 17β-estradiol을 최종 농도 1.0×10⁻⁸ M이 되게 첨가하였다. 대조군에는 absolute ethanol을 동일한 volume으로 첨가해주었다. 18-24시간이 지난 후 차가운 PBS 1 ml로 2회 세척하였다. Trypsin 처리하여 세포를 부유시킨 후, 상온 2,500 rpm에서 원심분리하였다. KRP 용액 1 ml로 다시 현탁시킨 후, Sodium Green™ tetraacetate를 최종 농도 8 µM이 되도록 실온에서 1시간 동안 세포와 함께 배양하였다. 세포를 상온 2,500 rpm에서 원심분리 후, PBS 1 ml로 1회 세척하였다. PBS 1 ml로 현탁시킨 후, Flow cytometer의 CellQuest program을 이용하여 10,000 cell/event, FL-1 filter 조건으로 측정하였다.

100 mm dish에 HeLa cell을 1.0×10⁶ cells이 되게 분주한 후 10% FBS, DME/F-12 without phenol red 배지에서 배양하였다. 다음날 confluence가 60-70%가 되었을 때 transfection시키고 3-5시간이 지난 후 24 well plate 위에 serum이 없는 배지로 HeLa cell을 1.0×10⁵ cell로 분주하였다. 12-18시간이 지나 cell이 안정화되면 serum이 없는 배지 상태에서 17β-estradiol을 최종 농도 1.0×10⁻⁸ M이 되게 첨

가하였다. 대조군에는 vehicle인 absolute ethanol을 동일한 volume으로 첨가해주었다. 18-24시간이 지난 후 cell을 KRP 용액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 1.4 mM CaCl₂, 2.5 mM glucose, 0.1% BSA, pH 7.4)으로 2회 세척 후, ouabain 1 mM로 37°C에서 30분간 배양시켰다. 여기에 ⁸⁶Rb를 최종농도 2 μCi/ml로 하여 상온에서 10분간 배양하였다. 즉시 차가운 KRP 용액으로 3회 세척 후, lysis 용액(50 mM NaOH, 1% Triton X-100) 200 μl을 가하였다. 100 μl를 취하여 1 ml LSC-cocktail 용액과 잘 혼합한 후, β-counting을 하였다.

HeLa cell에서는 flow cytometry를 통해 간접적으로 Na,K-ATPase의 활성 정도를 측정할 수 있다. Sodium green™ tetraacetate를 이용하여 flow cytometry를 시행하여 cell 내 Na⁺ 이온의 분포를 살펴보았다. HRF를 과발현한 HeLa cell에서는 세포 내 Na 이온이 증가함을 알 수 있었다. 또한 17β-estradiol을 10⁻⁸ M로 처리할 경우 세포내 Na⁺ ion이 줄어드는 현상을 보았다(Fig. 1).

Na,K-ATPase의 활성을 다시 알아보기 위하여 pEYFP/rHRF를 transfection한 후 17β-estradiol을 10⁻⁸ M이 되게 처리한 다음 ⁸⁶Rb⁺ uptake assay를 시행하였다. β-counting 결과 ouabain 처리 시와 비처리 시에 각각 HRF에 의해 cpm 값이 33.4%, 42.4% 떨어지는 현상을 관찰하였고 estrogen에 의해서 control 대비 86.1%, 93.9% 정도로 다시 회복하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 그러므로 HRF 과발현에 의한 Na,K-ATPase의 활성 저해가 estrogen에 의해 회복되는 것으로 생각할 수 있다.

Estrogen이 HRF에 의해 감소된 Na,K-ATPase의 활성을 회복시킨다면, 이러한 작용이 HRF와 Na,K-ATPase 각각의 mRNA와 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하였다.

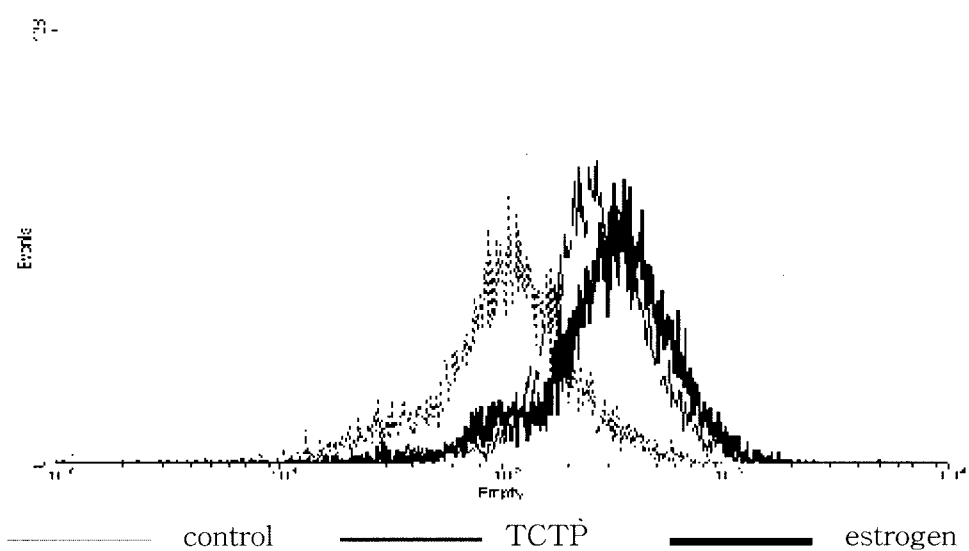


Fig. 1. Flow cytometry with Sodium Green dye. Intracellular sodium was analyzed by Flow cytometry using a 488 nm argon laser. In the histogram, each curve was overlaid.

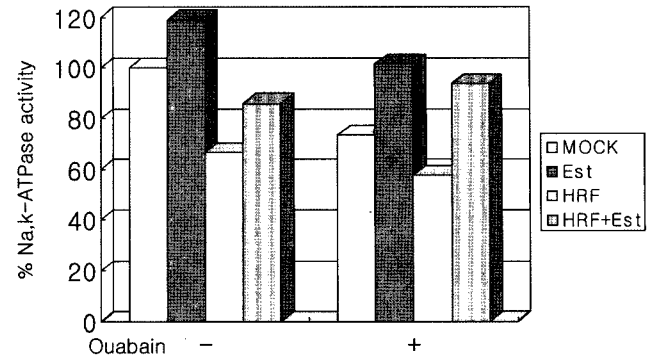


Fig. 2. ⁸⁶Rb uptake assay. The Na,K-ATPase activity was calculated with percentage of control value by ouabain-sensitive ⁸⁶Rb uptake.

mRNA level에 대한 estrogen의 영향을 확인하기 위해, estrogen을 처리한 HeLa cell lysate로부터 RNA를 추출하고 reverse transcription을 시행하여 DNA를 얻은 후 positive control인 β-actin(400 bp)과 HRF(519 bp), Na,K-ATPase α1(650 bp)에 specific한 primer를 이용하여 PCR을 하였다. 1% agarose gel 상에서 증폭된 DNA를 확인해본 결과 estrogen에 의해 HRF와 Na,K-ATPase α1 subunit 각각의 mRNA level이 증가하지는 않았다(Fig. 3a).

위의 결과를 단백질 수준에서 확인하기 위해 17β-estradiol을 처리한 세포를 lysis하여 Western blot으로 HRF의 발현 정도를 확인하였다. RT-PCR 결과와 같이 estrogen에 의해 HRF 발현의 변화는 없었다(Fig. 3b).

위의 결과들을 종합적으로 보면, HRF에 의해 저해된 Na,K-ATPase 활성을 회복시켜주는 estrogen의 역할은 HRF나, Na,K-ATPase에 직접적인 영향을 미치는 것이 아니라,

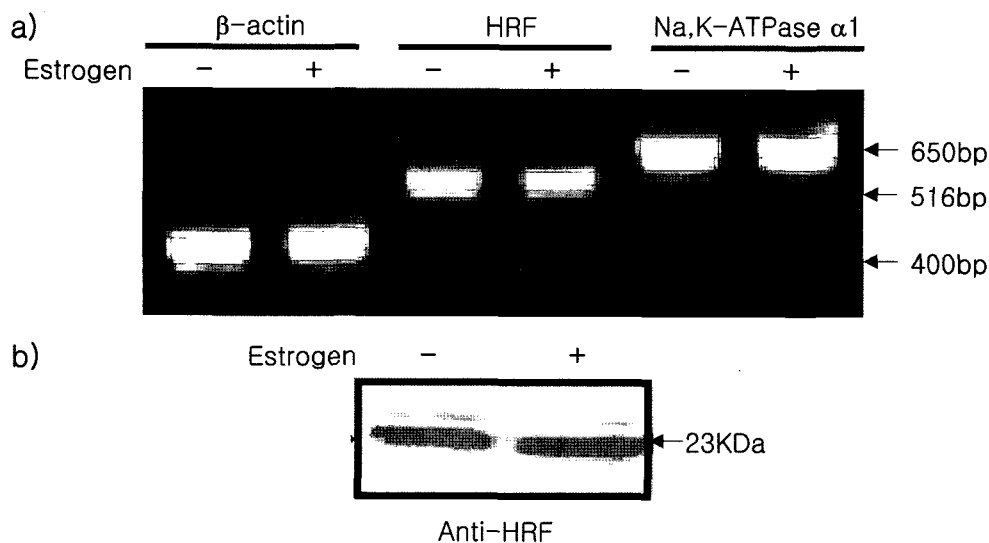


Fig. 3. Identification of HRF expression from HeLa cell lysate. a) RT-PCR. Total RNAs were obtained from HeLa cell lysate. After performing reverse transcription, the cDNA was used in PCR using the primer of β -actin (400 bp), HRF (516 bp), Na,K-ATPase α 1 (650 bp). b) Western blotting with anti-HRF (23 KDa) antibody from HeLa cell lysate.

Na,K-ATPase의 활성인자들을 조절함으로써 HRF에 의한 저해작용을 보상하는 것으로 판단된다. Na,K-ATPase의 활성에 대한 estrogen의 작용을 확인하기 위해서 transcription factor의 조절과 같은 nuclear action의 측면과 nongenomic action에 근거한 다른 기전에 대한 연구가 더 진행되어야 한다.

감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

REFERENCES

- Bastide, F., G. Meissner, S. Fleischer, and R. L. Post. 1973. Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase from transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the sarcoplasmic reticulum of muscle. *J. Biol. Chem.* **258**: 8385-8394.
- Beaven, M. A. and R. A. Baumgartner. 1997. Downstream signals initiated in mast cells by Fc epsilon RI and other receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 766-772.
- Bhisutthibhan, J., X. Q. Pan, P. A. Hossler, D. J. Walker, C. A. Yowell, J. Carlton, J. B. Dame, and S. R. Meshnick. 1998. The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem.* **273**: 16192-16198.
- Bohm, H., B. Gross, M. Gaestel, U. A. Bommer, G. Ryffel, and H. Bielka. 1991. The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich ascites tumor is involved in translation control of the growth related protein p23. *Biomed. Biochim. Acta* **50**: 1193-1203.
- Chitpatima, S. T., S. Markrides, R. Bandyopadhyay, and G. Brawerman. 1988. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucl. Acids Res.* **16**: 2350.
- Džurba, A., A. Ziegelhöffer, N. Vrbjar, J. Styk, and J. Slezák. 1997. Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol. Cell. Biochem.* **176**: 113.
- Džurba, A., A. Xiegelhöffer, and N. Vrbjar. 1983. Influence of estradiol on sarcolemmal (Na,K)-ATPase of the myocardium. In: *J.E. Purkyne, Proceedings of the International Symposium on Hormones and Cardiovascular System. Czechoslovak Medical Society, Prague, 1983*, 21.
- Gachet, Y., Tourner, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T., and Bommer, U. A. 1999. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 8)**: 1257-1271.
- Horisberger, J. D., V. Lemas, J. P. Kraehenbuhl, and B. C. Rossier. 1991. Structure-function relationship of Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **53**: 565.
- Jung, J., M. Kim, M. J. Kim, J. Kim, J. Moon, J. S. Lim, M. Kim, and K. Lee. 2004. Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the Third Cytoplasmic Domain of Na,K-ATPase alpha Subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 49868-49875.
- Kim, M., Y. Jung, K. Lee, and C. Kim. 2000. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharm. Res.* **23**: 633-636.

12. MacDonald, S. M., L. M. Lichtenstein, D. Proud, M. Plaut, R. M. Naclerio, D. W. MacGlashan, and A. Kagey-Sobotka. 1987. Studies of IgE-dependent histamine releasing factors: heterogeneity of IgE. *J. Immunol.* **139**: 506-512.
13. MacDonald, S. M. 1997. Human recombinant histamine-releasing factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **113**: 187-189.
14. MacDonald, S. M., T. Rafnar, J. Langdon, and L. M. Lichtenstein. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* **269**: 688-690.
15. Nielsen, H. V., A. H. Johnsen, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser, and P. O. Schiotz. 1998. Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor. *Allergy* **53**: 642-652.
16. Sanchez, J. C., D. Schaller, F. Ravier, O. Golaz, S. Jaccoud, M. Belet, M. R. Wilkins, R. James, J. Deshusses, and D. Hochstrasser. 1997. Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* **18**: 150-155.
17. Sampson, H. A., K. R. Broadbent, and J. Bernhisel-Broadbent. 1989. Spontaneous release of histamine from basophils and histamine-releasing factor in patients with atopic dermatitis and food hypersensitivity. *N. Engl. J. Med.* **321**: 228-232.
18. Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1996. An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J. Exp. Med.* **183**: 1265-1270.
19. Sturzenbaum, S. R., P. Kille, and A. J. Morgan. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (HRF) in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1398**: 294-304.

(Received Oct. 1, 2005/Accepted Oct. 19, 2005)