

라디신너크다운SGC7901세포의 제작과 특성

홍성희, 리호남

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학연구사업을 더욱 강화하여 세포공학과 유전자공학, 초고압물리학, 극저온물리학을 발전시키며 레이자와 플라즈마기술, 원자에너지와 태양에너지를 개발하여 인민경제에 받아들이는데서 나서는 과학기술적문제를 적극 풀어나가야 하겠습니다.》(《김정일선집》증보판 제11권 139페이지)

라디신(radixin)은 에즈린(ezrin), 모에진(moesin)과 함께 세포골격단백질과 세포막단백질 사이의 호상작용을 중개하는 단백질의 하나이다.[1-7] 그런것으로 하여 라디신은 세포증식, 접착, 운동 등 여러가지 기능수행에 참가할수 있다.

우리는 사람위암세포 SGC7901의 이동 및 침습과정에서 노는 라디신의 역할을 해명하기 위하여 siRNA를 리용하여 라디신의 발현을 억제시킨 라디신너크다운SGC7901세포를 제작하고 그것의 이동 및 침습특성을 조사하였다.

재료와 방법

라디신너크다운SGC세포는 라디신siRNA삽입배열을 재조합시킨 재조합piGENE™ tRNA^{Pur}(이하 재조합pPur로 표기)를 양이온성지질체 Lipofectamine®2000(《Invitrogen》)을 리용하여 사람위암세포그루 SGC7901에 형질감염시키는 방법으로 제작하였는데 크게 두단계 즉 일시적형질감염과 안정형질감염단계를 거쳤다.

일시적형질감염은 다음과 같이 진행하였다.

형질감염시약인 양이온성지질체 Lipofectamine®2000 12μL를 150μL의 Opti-MEM®무혈청배지(《Gibco》)와 혼합하고 방온도에서 15min동안 방치하였다. 이와 동시에 분리정제한 라디신siRNA삽입배열을 재조합시킨 재조합pPur 12μL를 150μL의 Opti-MEM®무혈청배지(《Gibco》)와 혼합하고 방온도에서 5min동안 방치하였다. 두 용액을 혼합하고 방온도에서 20min동안 방치하였다. 한편 6구형세포배양판의 한 구멍에서 SGC7901세포의 점유율이 80% 정도인 때 본래의 DMEM배지를 제거하고 1mL의 린산완충용액(PBS)으로 2회 세척하였다. 다음 여기에 소태아혈청(FBS)이 들어있지 않는 DMEM배지 1mL와 위의 혼합용액을 전부 첨가하고 동물세포배양장치(《Thermo Scientific》, 37℃, 5% CO₂)에서 6h동안 배양하였다. 다음 배양액을 FBS포함DMEM배지 2mL와 교체하고 동물세포배양장치(37℃, 5% CO₂)에서 배양세포가 용기의 바닥을 전부 덮을 때까지 배양하였다. 이렇게 얻은 배양세포의 배양액을 전부 제거하고 1mL씩의 PBS로 2회 세척한 다음 600μL의 트리졸(《Invitrogen》)을 첨가하고 미크로피펫으로 흡입, 배출을 반복하여 세포추출물을 얻었다. 이것을 리용하여 세포속의 총RNA를 추출한 다음 반정량PCR법으로 추출물속에 들어있는 라디신mRNA의 수준을 평가하였다.

라디신mRNA수준이 유의하게 감소된 경우 안정형질감염실험을 진행하였다.

안정형질감염에 리용하는 시약과 공정은 일시적형질감염실험과 거의나 같은데 차이나는것은 100mm 배양접시를 리용한다는것과 형질감염시약처리 6h후 교체해넣는 배지에 푸로미찐을 5 μ g/mL되게 첨가한다는것뿐이다. 매일 배양액의 색을 관찰하면서 배양그릇바닥에 독립세포무리들이 생겨날 때까지 2~3일에 한번씩 푸로미찐이 포함(5 μ g/mL)된 DMEM 배지(FBS⁺)를 교체해주면서 배양하였다. 독립세포무리들이 일정한 정도 크면 그 주위에 와셀린을 바른 원통형의 짧은 관을 눌러붙이고 트립신/EDTA용액을 리용하여 배양그릇바닥에서 세포를 떼내어 개개의 독립세포무리를 24구멍 또는 48구멍세포배양판의 매 구멍들에 옮겼다. 다음 500 μ L의 DMEM(10% FBS, 5 μ g/mL 푸로미찐 포함)배지를 첨가하고 배양액의 색변화를 관찰하면서 2~3일에 한번씩 새 배양액으로 교체해주면서 배양세포가 배양그릇바닥을 다 덮을 때까지 동물세포배양장치(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 배양세포가 배양그릇바닥을 다 덮으면 트립신/EDTA용액을 리용하여 배양그릇바닥에서 세포를 떼내어 12구멍세포배양판의 매 구멍들에 옮기고 우와 같은 방법으로 배양을 계속하였다. 배양세포가 12구멍세포배양판의 바닥을 다 덮으면 다시 같은 방법으로 6구멍세포배양판의 매 구멍들에 배양세포를 옮기고 같은 방법으로 배양하였다. 배양세포가 6구멍세포배양판의 배양그릇바닥을 다 덮으면 일시적형질감염실험에서와 같은 방법으로 RNA를 추출하고 반정량 및 정량PCR법으로 라디신mRNA수준을 평가하였다. 이때 리용한 프라이머는 다음과 같다.

상류프라이머 5'-ATGCCGAAACCAATCAATGTC-3'

하류프라이머 5'-CCAGCTTCAGCCAGGTAGGA-3'

총단백질을 추출하여 웨스턴블로팅법으로 라디신단백질의 발현수준을 정량적으로 평가하였다. 라디신발현이 억제된 독립세포무리를 동결보존하였다.

라디신너크다운SGC7901세포의 이동특성은 다음과 같은 방법으로 조사하였다.

기공크기가 8 μ m인 폴리카르본산막이 들어있는 24구멍세포배양판(《Corning》)의 옷칸에 200 μ L의 무혈청DMEM배지로 현탁한 라디신너크다운SGC세포를 접종(1.0 \times 10⁴개/mL)하였다. 다음 이것을 500 μ L의 DMEM배지(10% FBS 포함)가 들어있는 아래칸우에 올려놓고 동물세포배양장치에서 48h동안 배양한 다음 아래칸으로 이동되어나온 세포들을 메타놀로 고정하고 결정자색으로 염색하였다. 염색상을 CCD촬영기가 달린 도립현미경(《Olympus》)으로 관찰하고 전용프로그램을 리용하여 분석하였다.

라디신너크다운SGC세포의 세포침습특성은 다음과 같은 방법으로 조사하였다.

8 μ m크기의 폴리카르본산막을 가진 24구멍세포배양판(《Corning》)의 옷칸에 60 μ L의 마트리젤(《Becton Dickinson》, 50 μ g/mL)을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1h동안 피복한 다음 거기에 200 μ L의 무혈청DMEM배지로 현탁한 라디신너크다운SGC7901세포(1.0 \times 10⁴개/mL)를 접종하였다. 이것을 500 μ L의 DMEM배지(10% FBS 포함)가 들어있는 아래칸우에 올려놓고 동물세포배양장치(5% CO₂)에서 48h동안 배양한 다음 아래칸으로 침습되어나온 세포들을 메타놀로 고정하고 결정자색으로 염색하였다. 염색상을 CCD촬영기가 달린 도립현미경으로 관찰하고 전용프로그램을 리용하여 분석하였다.

결과 및 론의

라디신siRNA삽입배렬이 들어있는 재조합pPur를 양이온성지질체 Lipofectamine[®]2000을 리용하여 사람위암세포그루 SGC7901에 일시적형질감염시키고 배양한 세포로부터 총RNA를 분

리하여 라딕신mRNA를 반정량하였다. 일시적형질감염시킨 SGC7901세포의 라딕신mRNA 반정량실험결과는 그림 1과 같다.

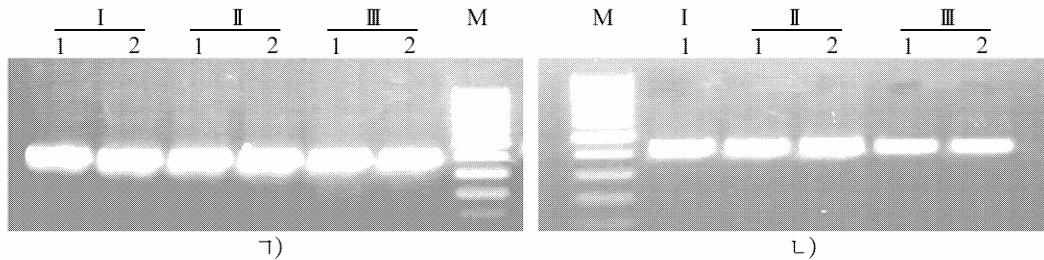


그림 1. 일시적형질감염시킨 SGC7901세포의 라딕신mRNA 반정량실험결과

1) 대조유전자인 글루타르알데히드-3-린산수소페기효소유전자의 mRNA수준, 2) 라딕신mRNA수준; I-야생형SGC7901세포, II-플라스미드운반체 pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포, III-재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포; M-분자량표식자(아래로부터 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1 000bp); 1, 2는 반복구를 의미

그림 1에서 보는바와 같이 라딕신siRNA삽입배열이 들어있는 재조합pPur운반체를 일시적형질감염시킨 SGC7901세포에서는 야생형SGC7901세포와 pPur를 일시적형질감염시킨 SGC7901세포에 비해 라딕신mRNA수준이 현저히 낮았다.

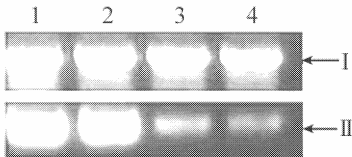


그림 2. 안정형질감염실험으로부터 얻은 두가지 독립세포무리들의 라딕신mRNA 반정량실험결과

1-야생형SGC7901세포, 2-pPur를 형질전환시킨 SGC7901세포, 3과 4-재조합pPur를 안정형질감염시켜 얻은 독립세포무리인 R6과 R11; I-글루타르알데히드-3-린산수소페기효소유전자, II-라딕신유전자

이러한 결과에 기초하여 라딕신너크다운SGC7901세포그룹을 얻기 위한 안정형질감염실험을 진행하였다. 라딕신siRNA삽입배열이 들어있는 재조합pPur를 사람위암세포 SGC7901세포에 안정형질감염시켜 배양하여 배양그릇 바닥에 생겨난 여러개의 독립세포무리를 얻고 그것들의 라딕신mRNA수준을 반정량하였다. 안정형질감염실험으로부터 얻은 두가지 독립세포무리들의 라딕신mRNA 반정량실험결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 얻어진 독립세포무리 R6, R11들의 라딕신mRNA수준은 모두 감소하였다.

라딕신mRNA수준이 유의하게 감소되는 독립세포무리 R6과 R11에 대하여 정량PCR(Real-time PCR)법과 웨스턴블로팅법으로 라딕신mRNA수준과 라딕신단백질발현수준을 정량적으로 평가하였다. 라딕신너크다운SGC세포그룹들의 라딕신mRNA수준과 라딕신단백질발현수준은 각각 그림 3, 4와 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 라딕신너크다운SGC7901세포그룹들의 라딕신mRNA수준은 야생형SGC7901세포나 pPur형질감염SGC세포그룹의 약 60%정도였다.

마찬가지로 라딕신너크다운SGC7901세포그룹들의 라딕신단백질발현수준은 야생형SGC7901세포그룹나 pPur형질감염SGC7901세포그룹에 비해 현저히 낮았으며 야생형의 약 50%수준이었다.(그림 4)

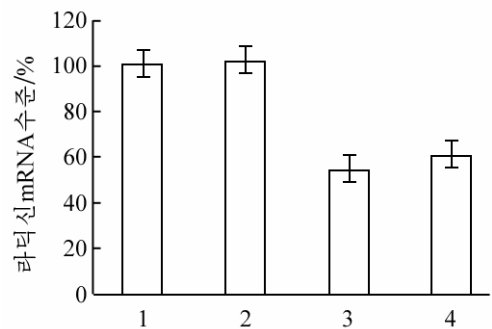


그림 3. 라딕신너크다운SGC세포그룹들의 라딕신mRNA수준

1-야생형SGC7901세포그룹, 2-pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹, 3과 4-라딕신siRNA삽입배열이 들어간 재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹들인 R6과 R11

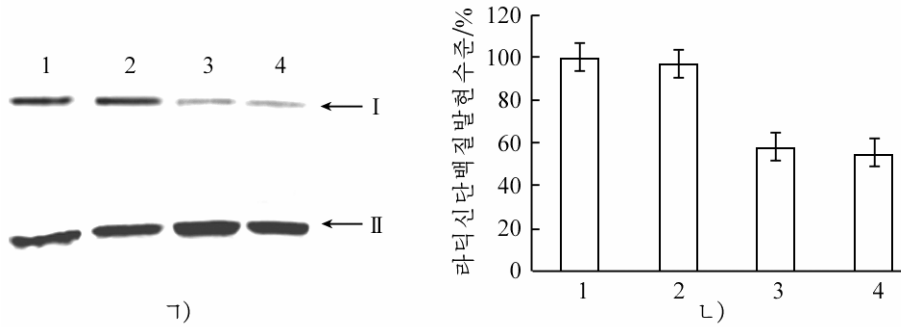


그림 4. 라디신너크다운SGC세포그룹들의 라디신단백질발현수준

ㄱ) 웨스턴블로팅상, ㄴ) 라디신단백질발현수준;

I-라디신, II-β-악틴; 1-4는 그림 3에서와 같음

이러한 실험결과들은 라디신siRNA삽입배열을 재조합한 재조합pPur운반체를 형질감염시킨 사람위암세포(SGC7901)그룹들인 R6과 R11에서 라디신유전자가 너크다운되었다는것을 명백히 보여준다.

그림 5와 6에 라디신너크다운SGC7901세포그룹들의 세포이동능력 및 세포침습능력분석결과를 주었다.

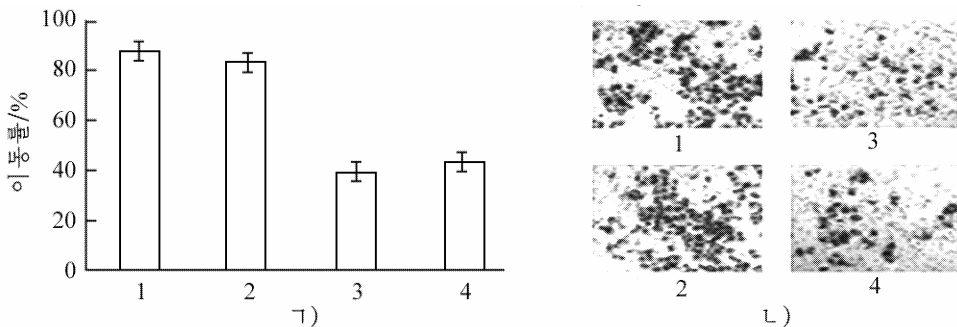


그림 5. 라디신너크다운SGC7901세포그룹들의 세포이동능력분석결과

ㄱ) 이동률그래프, ㄴ) 현미경으로 관찰한 실제적인 이동상;

1-4는 그림 3에서와 같음

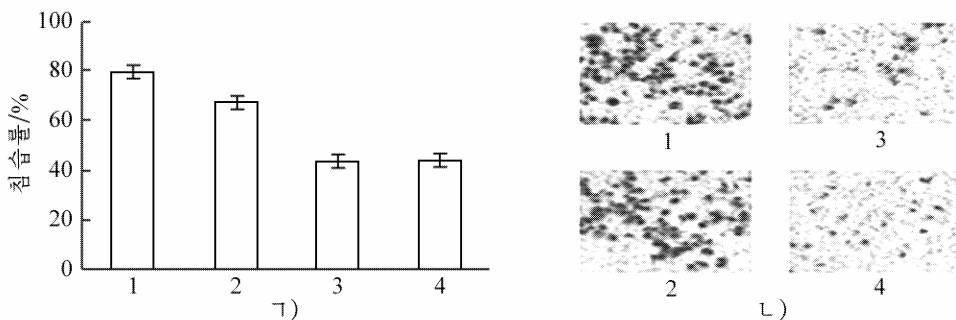


그림 6. 라디신너크다운세포그룹들의 세포침습능력분석결과

ㄱ) 침습률그래프, ㄴ) 현미경으로 관찰한 실제적인 침습상;

1-4는 그림 3에서와 같음

그림 5와 6에서 보는바와 같이 라디신너크다운SGC세포그룹들의 세포이동 및 침습률은 각각 40%정도로써 야생형SGC7901세포그룹이나 pPur형질감염SGC7901세포그룹(세포이동 및

침습률이 각각 80~90, 70~80%)보다 훨씬 낮았다. 이것은 라디신의 발현이 위암세포 SGC7901의 세포이동 및 침습에서 매우 중요하다는것을 보여준다. 이러한 결과는 siRNA로 라디신 발현을 억제시킨 취장암세포에서 이동 및 침습, 종양성장이 억제된다는 선행연구자료[2]와도 일치되는것으로서 사람암의 전이능발현에서 라디신의 보편적기능과 함께 암치료표적으로서의 가능성도 시사해주고있다.

맺는 말

라디신 siRNA 발현운반체를 리용하여 라디신유전자를 너크다운시킨 사람위암세포 SGC7901의 이동 및 침습능력은 야생형 SGC7901세포에 비해 현저히 약화된다.

참고 문헌

- [1] Benjamin Bruce et al.; Clin. Exp. Metastasis, 24, 69, 2007.
- [2] Chen Shu-Dong et al.; Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 13, 753, 2012.
- [3] Fiévet et al.; Biochimica et Biophysica Acta, 1773, 653, 2007.
- [4] Li Wei et al.; Biochimica et Biophysica Acta, 1491, 327, 2000.
- [5] Naoaki Akisawa et al.; Biochemical and Biophysical Research Communications, 258, 395, 1999.
- [6] S. H. Ross et al.; J. Cell Sci., 124, 1808, 2011.
- [7] Tomohiko Wakayama et al.; J. Histochem. Cytochem., 57, 4, 351, 2009.

주체106(2017)년 6월 5일 원고접수

Preparation and Characterization of Radixin-Knockdown SGC7901

Hong Song Hui, Ri Ho Nam

Migration and invasion abilities of radixin-knockdown human gastric cancer cell (radixin-knockdown SGC7901) which is made, using radixin siRNA inserted recombinant piGENETMtrNAPur plasmid vector, decrease remarkably than wild SGC7901 cell.

Key words: radixin, knockdown, siRNA