

## *Ezrin*너크다운SGC세포의 제작과 특성

리 호 남

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《의학과학부문에서는 이미 이룩된 성과에 토대하여 유전자공학, 면역학, 분자생물학 분야를 개척하며 전자공학과 레이자공학을 비롯한 최신과학기술의 성과를 치료예방사업에 널리 받아들이기 위한 연구사업을 강화하여야 하겠습니다.》(《김정일선집》증보판 제11권 82페이지)

*Ezrin*은 세포골격단백질과 세포막단백질사이의 호상작용을 중개하는 단백질중의 하나이다.[1-5] 이 단백질은 세포증식, 접착, 운동성 등 여러가지 기능수행에 참가하며[3, 5] 취장암, 자궁암을 비롯한 여러가지 암들에서 과잉발현된다는 연구결과들이 제기되고있다.[1, 3, 6]

논문에서는 사람위암세포 SGC7901의 전이능발현에서 *Ezrin*이 노는 역할을 해명하기 위하여 siRNA에 의해 *Ezrin*의 발현을 억제시킨 *Ezrin*너크다운SGC7901세포를 제작하고 그것의 이동 및 침습특성을 조사하였다.

### 재료와 방법

*Ezrin*너크다운SGC세포는 *Ezrin* siRNA삽입물을 재조합해넣은 재조합piGENE™tRNAPur(이하 재조합pPur로 표기)를 양이온성지질체 Lipofectamine® 2000(《Invitrogen》)을 리용하여 사람위암세포그루 SGC7901에 형질감염시키는 방법으로 제작하였다.

*Ezrin*너크다운SGC세포그루는 크게 2개의 단계 즉 일시적형질감염과 안정형질감염단계를 거쳐 제작하였다.

일시적형질감염은 다음과 같이 진행하였다.

형질감염시약인 양이온성지질체 Lipofectamine® 2000 12μL를 150μL의 Opti-MEM®무혈청배지(《Gibco》)와 혼합하고 방온도에서 15min간 방치한다. 이와 동시에 분리정제한 *Ezrin* siRNA삽입재조합pPur 12μL를 150μL의 Opti-MEM®무혈청배지와 혼합하고 방온도에서 5min동안 방치한다. 두 용액을 혼합하고 방온도에서 20min동안 방치한다. 한편 6구멍 세포배양판의 한 구멍에서 SGC7901세포의 점유율이 80%정도인 때 본래의 DMEM배지를 제거하고 1mL의 린산완충액(PBS)으로 두번 세척한다. 다음 여기에 소태아혈청(FBS)이 들어있지 않는 DMEM배지 1mL와 위의 혼합용액을 전부 첨가하고 동물세포배양장치(《Thermo Scientific》, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 6h동안 배양한다. 다음 배양액을 FBS포함 DMEM배지 2mL와 교체하고 배양세포가 용기의 바닥을 전부 덮을 때까지 동물세포배양장치(《Thermo Scientific》, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양한다. 이렇게 얻은 배양세포의 배양액을 전부 제거하고 1mL씩의 PBS로 두번 세척한 다음 600μL의 Trizol(《Invitrogen》)을 첨가하고

미크로피펫으로 흡입, 배출을 반복하여 세포추출물을 얻는다. 이것을 리용하여 세포속의 총 RNA를 추출한 다음 반정량PCR법으로 추출물속에 들어있는 *Ezrin* mRNA의 수준을 평가하였다.

*Ezrin* mRNA수준이 유의하게 감소된 경우 안정형질감염실험을 진행한다.

안정형질감염에 리용하는 시약과 공정은 일시적형질감염실험과 거의나 같은데 차이는  $\phi$  100mm 배양접시를 리용하는것과 함께 형질감염시약처리 6h후 교체해넣는 배지에 퓨로미친을 5 $\mu$ g/mL 되게 첨가하는것뿐이다. 매일 배양액의 색을 관찰하면서 배양 그릇바닥에 독립세포무리들이 생겨날 때까지 2~3일에 한번씩 퓨로미친포함(5 $\mu$ g/mL)DMEM 배지(FBS포함)를 교체해주면서 배양한다. 독립세포무리들이 일정한 정도 크면 그 주위에 와셀린을 바른 원통형의 짧은 판을 눌러붙이고 트립신/EDTA용액을 리용하여 배양그릇바닥에서 세포를 떼내어 개개의 독립세포무리를 24구멍 또는 48구멍 세포배양판의 매 구멍들에 옮긴다. 다음 500 $\mu$ L의 DMEM(FBS 10%, 5 $\mu$ g/mL 퓨로미친포함)배지를 첨가하고 배양액의 색변화를 관찰하는것과 함께 2~3일에 한번씩 새 배양액으로 교체해주면서 배양세포가 배양그릇바닥을 다 덮을 때까지 동물세포배양장치(《Thermo Scientific》, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양한다. 배양세포가 배양그릇바닥을 다 덮으면 트립신/EDTA용액을 리용하여 배양그릇바닥에서 세포를 떼내어 12구멍 세포배양판의 매 구멍들에 옮기고 우와 같은 방법으로 배양을 계속한다. 배양세포가 12구멍 세포배양판의 바닥을 다 덮으면 다시 같은 방법으로 6구멍 세포배양판의 매 구멍들에 배양세포를 옮기고 같은 방법으로 배양한다. 배양세포가 6구멍 세포배양판의 배양그릇바닥을 다 덮으면 일시적형질감염실험에서와 같은 방법으로 RNA를 추출하고 반정량 및 정량PCR법으로 *Ezrin* mRNA의 양을 평가하는데 mRNA의 반정량 및 정량PCR에 리용한 프라이머는 다음과 같다.

정방향프라이머 5'-CTATGAGGAGAAGACAAAGAAG-3',

역방향프라이머 5'-TTCTTCTCTGCCTCAGTGAT-3'

다음 총단백질을 추출하여 웨스턴블로팅법으로 Ezrin단백질의 발현수준을 정량적으로 평가한다. Ezrin발현이 억제된 독립세포무리를 동결보존한다.

*Ezrin*너크다운SGC세포의 이동특성은 다음과 같은 실험으로 조사하였다.

*Ezrin*너크다운SGC세포를 기공크기가 8 $\mu$ m인 폴리카르본산막이 들어있는 24구멍 Transwell세포배양판(《Corning Co. Ltd》)의 옷칸에 200 $\mu$ L의 무혈청DMEM배지로 현탁한 *Ezrin*너크다운SGC세포( $1.0 \times 10^4$ 개/mL)를 접종한다. 다음 이것을 500 $\mu$ L의 10% FBS포함 DMEM배지가 들어있는 아래칸우에 올려놓고 동물세포배양장치에서 48h동안 배양한 다음 아래칸으로 이동되어나온 세포들을 메타놀로 고정하고 결정자색으로 염색한다. 염색상을 CCD촬영기가 달린 《Olympus》도립현미경으로 관찰하고 전용프로그램을 리용하여 분석한다.

*Ezrin*너크다운SGC세포의 세포침습특성은 다음과 같은 실험으로 조사하였다.

기공크기가 8 $\mu$ m인 폴리카르본산막을 가진 24구멍 Transwell세포배양판(《Corning Co. Ltd》)의 칸에 60 $\mu$ L의 마트리젤(Matrigel, 《Becton Dickinson》) 50 $\mu$ g/mL을 첨가하고 37°C에서 1h동안 피복한 다음 거기에 200 $\mu$ L의 무혈청DMEM배지로 현탁한 *Ezrin*너크다운SGC세포( $1.0 \times 10^4$ 개/mL)를 접종한다. 이것을 500 $\mu$ L의 10% FBS포함DMEM배지가 들어있는 아래칸우에 올려놓고 동물세포배양장치에서 48h동안 배양한 다음 아래칸으로 침습되어나온 세포들을 메타놀로 고정하고 결정자색으로 염색한다. 염색상을 CCD촬영기가 달린 《Olympus》도립현미경으로 관찰하고 전용프로그램을 리용하여 분석한다.

## 결과 및 논의

*Ezrin* siRNA 삽입물이 들어있는 재조합 pPur를 양이온성지질체 Lipofectamine® 2000을 리용하여 사람위암세포그루 SGC7901에 일시적형질감염시키고 배양한 세포로부터 총RNA를 분리한 다음 *Ezrin* mRNA를 반정량한 결과는 그림 1과 같다.

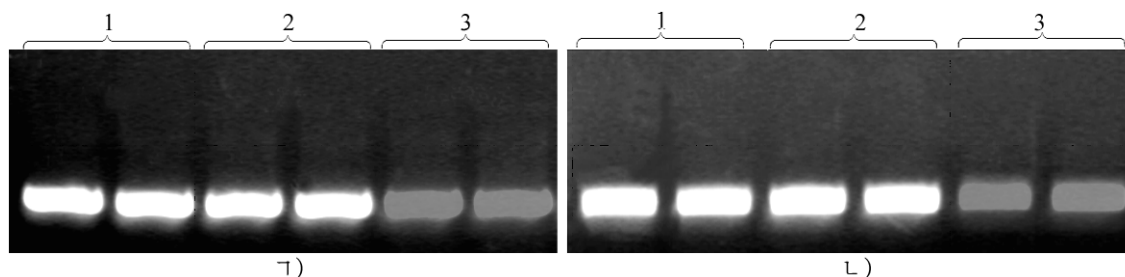


그림 1. 일시적형질감염시킨 SGC7901세포의 *Ezrin* mRNA반정량실험결과

1) 대조유전자 *gapdh*의 mRNA수준, 2) *Ezrin* mRNA수준;

1-야생형SGC7901세포(대조), 2-플라스미드운반체 pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포,

3-Ezrin siRNA 삽입물이 들어간 재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포

그림 1에서 보는바와 같이 *Ezrin* siRNA 삽입물이 들어있는 재조합 pPur 운반체를 일시적형질감염시킨 SGC7901세포에서는 야생형SGC7901세포와 pPur를 일시적형질감염시킨 SGC7901세포에 비해 *Ezrin* mRNA수준이 현저히 감소하였다. 이러한 결과에 기초하여 *Ezrin* 너크다운 SGC7901세포그루를 얻기 위한 안정형질감염실험을 진행하였다. *Ezrin* siRNA 삽입물이 들어있는 재조합 pPur를 사람위암세포SGC7901세포에 안정형질감염시켜 배양그릇 바닥에 생겨난 여러개의 독립세포무리를 얻고 그것들의 *Ezrin* mRNA수준을 반정량한 결과는 그림 2와 같다.

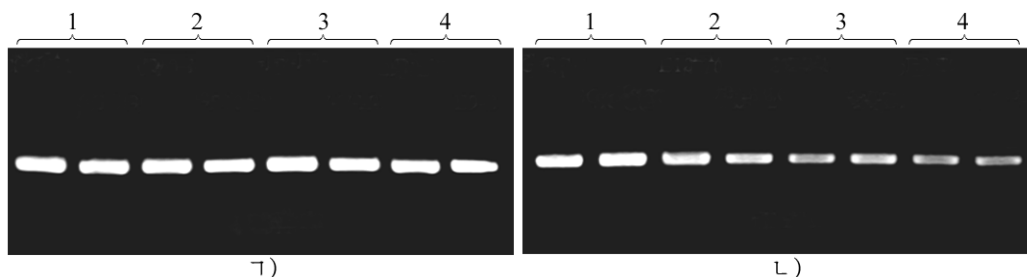


그림 2. 안정형질감염실험으로부터 얻은 세가지 독립세포무리들의

*Ezrin* mRNA반정량실험결과

1) 대조유전자 *gapdh*의 mRNA수준, 2) *Ezrin* mRNA수준;

1-야생형SGC7901세포(대조), 2-4는 *Ezrin* siRNA 삽입물이 들어간

재조합pPur를 안정형질감염시켜 얻은 독립세포무리(E10, E7, E9)

그림 2에서 보는바와 같이 얻어진 독립세포무리들의 *Ezrin* mRNA수준은 모두 감소하였다. *Ezrin* mRNA수준이 유의하게 감소되는 독립세포무리중 2개(E7 및 E9)를 선택하여 정량PCR(Real-time PCR)법과 웨스턴블로팅법으로 *Ezrin* mRNA수준과 *Ezrin* 단백질발현수준을 정량적으로 평가한 결과는 그림 3, 4와 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 Ezrin너크다운SGC7901세포그룹들의 Ezrin mRNA 전사수준은 야생형SGC7901세포나 pPur형질감염SGC세포그룹의 약 60%정도였다. 마찬가지로 웨스턴블로팅분석결과 Ezrin너크다운SGC7901세포그룹들의 Ezrin단백질발현수준은 야생형SGC7901세포그룹나 pPur형질감염SGC7901세포그룹에 비해 현저히 줄어들었는데 야생형의 약 50%수준이었다.(그림 4)

그림 5와 6에 Ezrin너크다운SGC7901세포그룹들의 세포이동 및 침습능력분석결과를 주었다.

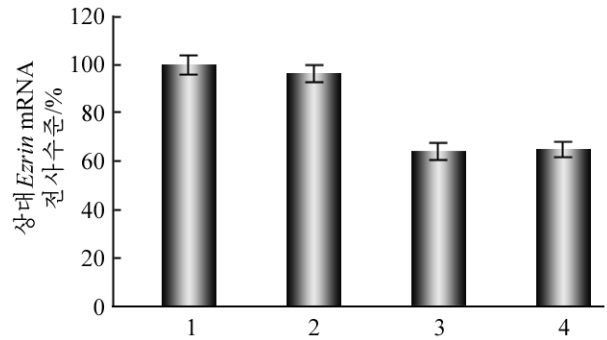


그림 3. Ezrin너크다운SGC세포그룹의 Ezrin mRNA정량실험결과

1-야생형SGC7901세포그룹(대조), 2-pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹, 3, 4-Ezrin siRNA삽입물이 들어간 재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹(E7, E9)

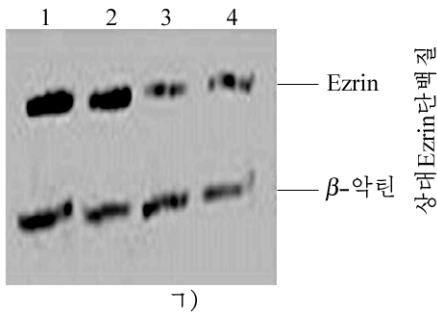


그림 4. Ezrin너크다운SGC세포그룹들의 Ezrin단백질발현량  
 1) 전기영동상, 2) 단백질발현량도표

1-야생형SGC7901세포그룹(대조), 2-pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹,  
 3, 4-Ezrin siRNA삽입물이 들어간 재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹(E7, E9)

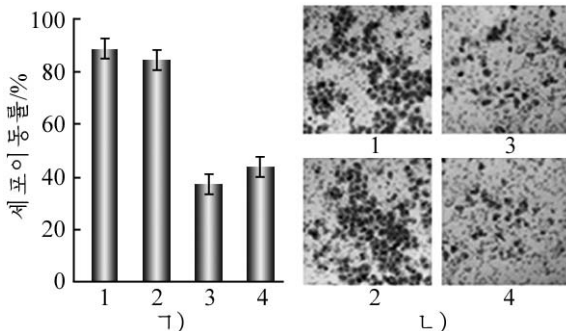
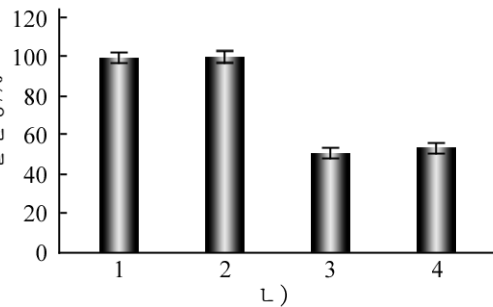


그림 5. Ezrin너크다운SGC7901세포그룹들의 세포이동능력분석결과  
 1) 세포이동률도표, 2) 현미경상;

1-야생형SGC7901세포그룹(대조), 2-pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹, 3, 4-Ezrin siRNA 삽입물이 들어간 재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹(E7, E9)

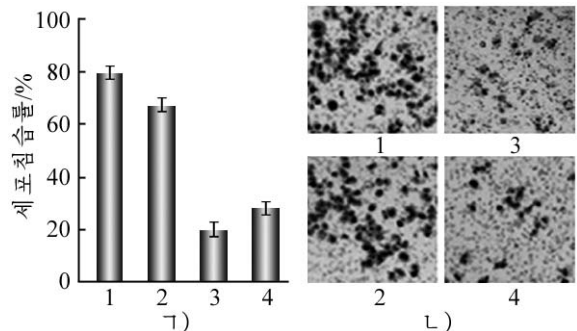


그림 6. Ezrin너크다운세포그룹들의 세포침습능력분석결과  
 1) 세포침습률도표, 2) 현미경상;

1-야생형SGC7901세포그룹(대조), 2-pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹, 3, 4-Ezrin siRNA 삽입물이 들어간 재조합pPur를 형질감염시킨 SGC7901세포그룹(E7, E9)

그림 5와 6에서 보는바와 같이 *Ezrin*너크다운SGC세포그루들의 세포이동 및 침습률은 각각 40, 30%정도로서 야생형SGC7901세포그루나 pPur형질감염SGC7901세포그루(세포이동 및 침습률이 각각 80~90, 70~80%)보다 훨씬 낮아진다. 이것은 *Ezrin*이 위암세포SGC7901세포의 세포이동 및 침습에서 매우 중요한 역할을 한다는것을 보여준다. 이러한 결과는 취장암의 전이능발현에서 *Ezrin*의 역할을 논의한 선행연구[3]결과와도 일치되는것으로서 사람암의 전이능발현에서 *Ezrin*의 보편적기능과 함께 암치료의 표적으로서의 가능성을 암시하는것으로 된다.

## 맺 는 말

*Ezrin* siRNA발현운반체를 리용하여 *Ezrin*유전자를 너크다운시킨 사람위암세포 SGC7901그루의 이동 및 침습능력은 야생형SGC7901세포에 비해 현저히 약화된다.

## 참 고 문 헌

- [1] Kaori Ohtani et al.; Cancer Letters, **179**, 79, 2002.
- [2] Kaori Ohtani et al.; Cancer Letters, **147**, 31, 1999.
- [3] Zhi-Qiang Zhong et al.; Asian Pacific J. Cancer Prev., **13**, 3781, 2012.
- [4] B. Benjamin et al.; Clin. Exp. Metastasis, **24**, 69, 2007.
- [5] H. R. Sarah et al.; J. Cell Sci., **124**, 1808, 2011.
- [6] A. Naoaki et al.; Biochemical and Biophysical Research Communications, **258**, 395, 1999.

주체104(2015)년 6월 5일 원고접수

## Preparation and Characteristics of *Ezrin*-Knockdown SGC Cell

*Ri Ho Nam*

Migration and invasion abilities of *Ezrin*-knockdown human gastric cancer cells(*Ezrin*-knockdown SGC7901) which are made by using *Ezrin* siRNA inserted recombinant piGENE™tRNAPur plasmid vector, decrease remarkably than wild SGC7901 cell.

Key words: *Ezrin*, gene-knockdown, SGC, migration ability, invasion ability