대 한 체 질 인 류 학 회 지
Korean J Phys Anthropol
19(1): 37 ~ 48, 2006

# 상처치유 과정에서 아미노산 수송계 L의 발현

**정문진, 김창현, 최백동, 정순정, 박주철,**
**김흥중, 박경진, 김도경**
조선대학교 치과대학 구강생물학연구소

**간추림** : 상처치유 과정에는 계속적인 세포성장과 증식이 필수적이며, 이러한 과정에 영양물질 수송체의 역할은 필수적이라고 할 수 있다. 아미노산 수송계 L은 중성아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 종양세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송계로 알려져 있다. 본 연구는 상처를 유발시킨 흰쥐를 이용하여 상처치유 과정에서 아미노산 수송계 L의 발현양상 및 역할을 밝히고자 하였다.

동일조건 하에서 일정기간 사육한 흰쥐의 피부에 상처를 유발시킨 후, 12시간, 1일, 3일, 5일, 7일째에 조직을 적출하여 역전사-중합효소 연쇄반응과 면역조직화학적 분석 등을 이용하여 상처치유 과정에서 아미노산 수송계 L의 발현을 분석하였다.

LAT1의 발현은 상처유발 후 12시간째에 증가가 있었으며, 1일, 3일, 5일 및 7일째로 경과하면서 대조군과 점차 유사해졌다. LAT2의 발현은 상처유발 후 1일과 3일까지 증가하였으며, 5일과 7일째로 경과하면서 대조군과 점차 유사해졌다.

본 연구의 결과로서 중성아미노산 수송계 L 중, LAT1은 세포손상 후 상처치유과정의 초기단계에서 중요한 역할을 하며, LAT2는 상처치유 기간에서 점차 정상으로 진행되어가는 중기단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

**찾아보기 낱말** : 상처치유, 아미노산 수송계 L, 영양공급, 상피조직

## 서 론

상처치유 과정은 세포의 이동성과 접착성 등의 변화를 포함하는 세포들의 연속적 · 형태학적인 변화라 할 수 있다. 이러한 세포학적인 변화는 배아발생, 조직의 변화 또는 종양의 발생처럼 또 다른 생물학적 과정에 결정적인 역할을 한다. 상처치유는 체액유출의 방지, 재생되는 세포성 장벽의 보호, 조직의 잔재와 외부물질의 제거를 위하여 고안된 고도로 발달된 생물학적 방어기전이며, 상처를 아물게 하기 위하여 조직의 재생과 조직 잔재물의 제거를 유도하는 단기간의 과정이라고도 할 수 있다(Gould 등 1997, Ashcroft 등 1999, Song 등 1999).

아미노산은 세포 내 단백질 합성의 기질이 될 뿐만 아니라, 글루코스, 퓨린, 피리미딘 등 다양한 물질의 생합성에도 관여하며, 세포 내에서 필요한 아미노산의 수송은 세포막에 위치하고 있는 아미노산 수송체를 통하여 이루어진다(Christensen 1990). 아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산의 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성아미노산 수송체로 분류되며, 세포 외액의 소디움 이온에 대한 의존성에 따라 $Na^+$-의존성 및 $Na^+$-비의존성 수송체로 분류된다.

아미노산 수송계 L은 $Na^+$-비의존적으로 중성아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 종양세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성아미노산의 주 경로

*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2005-000-10135-0) 지원으로 수행되었음.
교신저자 : 김도경(조선대학교 치과대학 구강생리학교실)
전자우편 : kdk@chosun.ac.kr

가 되는 아미노산 수송계로 알려져 있으며(Silbernagl 1979, Christensen 1990), 상피세포의 기저막 측에 존재하여 소장과 신세뇨관의 상피세포를 통한 중성아미노산의 흡수에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다(Christensen 1990). 또한 아미노산 수송계 L은 중성아미노산 뿐만 아니라 L-dopa, melphalan, gabapentin 및 thyroid hormone 같은 아미노산 구조를 가진 약물들도 수송할 수 있으므로 약물 수송체로 간주되기도 한다(Goldenberg 등 1979, Christensen 1990, Lakshmanan 등 1990, Blondeau 등 1993, Su 등 1995, Gomes와 Soares-da-Silva 1999).

Kanai 등(1998)에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번째 아형인 L-type amino acid transporter 1 (LAT1)이 rat C6 glioma 세포에서 동정되었다. LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서 $Na^+$-비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, methionine, tryptophan과 histidine 같은 구조가 큰 중성아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다(Kanai 등 1998, Yanagida 등 2001, Uchino 등 2002). LAT1은 4F2 heavy chain (4F2hc)이라는 1회 세포막을 관통하는 막 단백질과 disulfide bond로 결합된 heterodimer형 단백질이며, LAT1이 기능을 수행하기 위해서는 보조인자 4F2hc의 존재가 필수적이라는 사실이 보고되었다(Kanai 등 1998, Mannion 등 1998, Mastroberardino 등 1998, Pfeiffer 등 1998, Nakamura 등 1999, Yanagida 등 2001). 또한 LAT1은 종양세포에서 과발현 되며, 종양세포의 성장에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Sang 등 1995, Wolf 등 1996, Kanai 등 1998, Yanagida 등 2001). 한편, LAT1의 분자적 동정 후에 LAT1과 구조적으로 관련이 있는 아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2 (LAT2)가 동정되었다(Pineda 등 1999, Rossier 등 1999, Segawa 등 1999, Verrey 등 2000). LAT2는 LAT1과 비교하여 볼 때 정상 조직 내 발현 하는 부위가 매우 많으며, 구조가 큰 중성아미노산 뿐만 아니라 구조가 작은 중성아미노산도 모두 수송한다.

아미노산 중에서 필수아미노산은 세포 자신이 합성하지 못하므로 세포 외로부터 세포 내로 수송 되어져야만 한다. 따라서 세포에서 만약 이 필수아미노산 수송체가 결여된다면 필수아미노산을 세포 밖으로부터 세포 내로 수송하지 못하므로 단백질 합성이 불가능 하게 되어 결국 세포의 증식이 중단될 것이다. 아미노산 수송계 중, 수송계 L은 그 수송기질이 필수아미노산을 포함한 대부분의 중성아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다(Silbernagl 1979, Christensen 1990).

세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 계속적인 증식과 성장이 필수적인 세포들에는 아미노산 수송체의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산의 공급이 활발하게 되며, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다(Sang 등 1995, Wolf 등 1996, Kanai 등 1998, Yanagida 등 2001). 상처치유 과정에도 대사의 항진 및 계속적인 세포성장과 증식이 필수적이라고 할 수 있으며, 이러한 과정에 아미노산 수송체들의 역할은 필수적이라고 할 수 있다. 그러나 상처치유 과정에서 여러 영양물질들을 포함한 아미노산 수송체의 발현 및 역할규명에 관한 연구는 없었다. 따라서 본 연구는 상처를 유발시킨 흰쥐를 이용하여 상처치유 과정에서 아미노산 수송계 L의 발현양상 및 역할을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 피부 상처유도

동일조건 하에서 일정기간 사육한 체중 약 100 gm (약 4주)의 Sprague-Dawley 흰쥐에 염산 ketamine (90 mg/kg, Yuhan, Seoul, Korea)과 xylazine (10 mg/kg, BayerKorea, Gyunggi, Korea)를 대퇴부에 근육주사하여 마취시키고, 감염방지 목적으로 gentamicin (5 mg/kg, Daesung Microbiological Labs Co., Gyunggi, Korea)을 근육주사하였다. 등쪽의 털을 제거한 뒤 알콜솜으로 소독한 후, 1회용 수술용 칼을 이용하여 1 cm의 간격을 두고 모두 4군데에 1 cm씩 일정하게 상처를 유도하였다. 상처유도 후 12시간부터 7일(12시간, 1, 3, 5, 7일)까지 흰쥐를 사육시킨 뒤, 각 시기별로 진피를 포함한 피부전체를 절제하여 실험에

사용하였으며, 각 군당 3마리의 흰쥐를 사용하였다. 대조군(control)으로는 동일조건 하에서 사육한 체중 약 100 gm의 상처를 유발시키지 않은 흰쥐를 이용하였다.

### 2. 조직학적 분석

절제된 피부를 고정액에 옮긴 다음, 실온에서 12시간 고정하여, 에탄올 농도 상승 순으로 탈수하여 Paraplast (Sherwood Medical Industries, USA)에 포매하였다. 포매된 조직은 박절기 (Reichert-Jung 820, USA)를 이용하여 6~7 μm 두께의 절편으로 제작한 다음, 조직변화를 관찰하기 위하여 hematoxylin-eosin (H & E)으로 이중염색한 후, 영상분석기 (AxioVision 3.1, Zeiss, Germany)가 장착된 현미경 (AxioSkop 2 plus, Zeiss)에 부착된 디지털 카메라 (AxioCam, Zeiss)로 촬영하여 관찰하였다.

### 3. 총 RNA 추출과 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

절제된 상처조직으로부터 TRI REAGENT kit (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출한 후, 자외선 분광기를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. cDNA 합성을 위하여 5 μg의 total RNA를 reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)와 oligo (dT) primer를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 역전사 반응을 시행하였다. 합성된 cDNA와 각 primer (Table 1)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 12분, 변성반응을 94°C에서 30초, 결합반응을 60°C에서 30초, 중합반응은 72°C에서 45초간 30주기를 반복하였고 마지막 중합반응은 72°C에서 30분간 연장하여 반응시켰다. RT-PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

### 4. 면역조직화학적 분석

수화시킨 조직절편을 sodium citrate (0.1 M, pH 6.0) 용액에 5분간 2회 침수하여 항원성 치유과정을 거친 후, 조직 내의 peroxidase 활성을 억제하기 위하여 3% 과산화수소를 처리하였다. 항체의 비특이적 반응을 제거하기 위하여 5% normal goat serum을 처리한 후, 일차항체로 affinity-purified anti-LAT1, LAT2 및 4F2hc를 희석 (1 : 100)하여 사용하였다. 이어 biotinylated goat anti-rabbit IgG (DAKO Co., USA)에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 수세하였다. 절편을 3, 3-diaminobenzidine tetrachloride와 hydrogen peroxide를 이용하여 발색시킨 후, Meyer씨 hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 반응이 끝난 시료들은 탈수 후, Permount (Fisher, USA)로 봉입하고 영상분석기가 장착된 현미경에 부착된 디지털 카메라로 촬영하여 관찰하였다.

### 5. 통계학적 검정

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

## 결 과

### 1. 상처치유 과정의 조직학적 관찰

상처유도 후 각 시기별로 적출된 상처조직의 H&E 염색결과를 Fig. 1에 나타내었다. 상처유도 후 12시간 (Fig. 1a)에서 관찰된 상처부위의 조직은 대부분 붕괴되고 유실되었으며, 1일째 (Fig. 1b)까지 지속되었다. 1일째 상처부위에서는 섬유성 조직과 혈액의 응고로 생긴 딱지가 관찰되었다. 딱지의 제거는 3일째 (Fig. 1c)까지 서서히 진행되었고, 이시기에 상피세포의 이동이 확인되었으며 진피 층의 잔재물은 많은 부분 제거되었다. 5일째 (Fig. 1d)와 7일째 (Fig. 1e)에는 딱지의 완전한 탈락이 관찰되었으며, 이에 상응하여 상피세포의 이동으로 상처부위는 외부와 완전히 차단되었다. 또한 진피를 포함한 상처부위가 상처초기인 상처유도 12시간과 1일째에 비하여 많이 축소되었다.

### 2. 상처치유 과정에서 아미노산 수송계 L의 발현양상

흰쥐의 피부에 상처를 유발시킨 후, 상처치유에

따른 아미노산 수송체 L의 mRNA 발현 정도를 조사 · 비교하기 위하여 각각의 primer (Table 1)을 이용하여 RT-PCR 분석을 하였으며, 그 결과를 video-based densitometry 방법으로 수치로 변환시켰다.

LAT1 mRNA의 발현은 상처유발 후 12시간째에 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가가 있었고, 1일째에는 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으며, 상처유발 후, 3, 5일 및 7일째로 경과하면

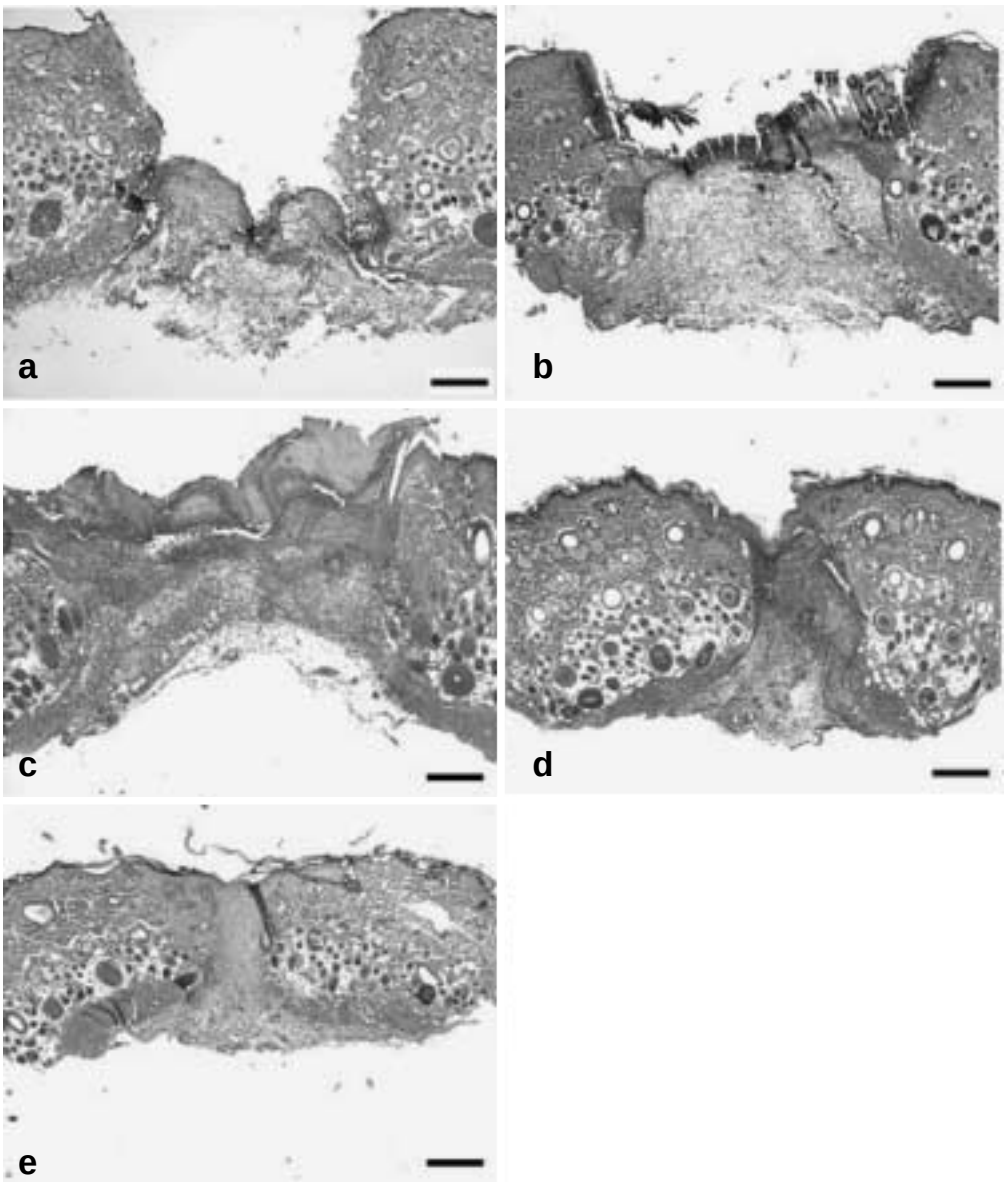


**Fig. 1.** The healing pattern of rat on the dorsal skin after artificial wounds. The skin samples were stained with hematoxylin & eosin. a, 12 hour; b, Day 1; c, Day 3; d, Day 5; e, Day 7. All scale bars indicate 200 μm.

서 LAT1 mRNA의 발현이 대조군과 점차 유사해짐을 확인할 수 있었다(Fig. 2). LAT2 mRNA의 발현은 상처유발 후, 12시간, 1일 및 3일까지 대조군에 비해 증가하였으며, 5일과 7일째로 경과하면서 대조군과 점차 유사해짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3). LAT1과 LAT2의 보조인자인 4F2hc mRNA의 발현은 상처유발 후, 12시간에서 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었으며, 1, 3, 5일 및 7일째에서는 발현이 감소하는 경향을 보였으나 통계적 의의는 없었다(Fig. 4).

**Table 1.** Primer sequences for PCR of LAT1, LAT2 and 4F2hc

| Primer | Sequence (5′→3′) | PCR product (bp) |
|---|---|---|
| LAT1 (sense) | ACAAAACAGGGTAGCAAAGA | 496 |
| LAT1 (antisense) | CGTCCTCAAGACTGTTCTTC | |
| LAT2 (sense) | TCATTGGCTCCGGAATCTTC | 509 |
| LAT2 (antisense) | ATGCATTCTTTGGCTCCAGC | |
| 4F2hc (sense) | AGACCTTCTACAAAGTGCCA | 489 |
| 4F2hc (antisense) | TAGAGTCGGAGAAACTGAGC | |

### 3. 상처치유 과정에서 면역조직화학적 관찰

피부 상처유발 후, 상처치유에 따른 아미노산 수송계 L 및 보조인자 4F2hc의 단백질 발현정도 및

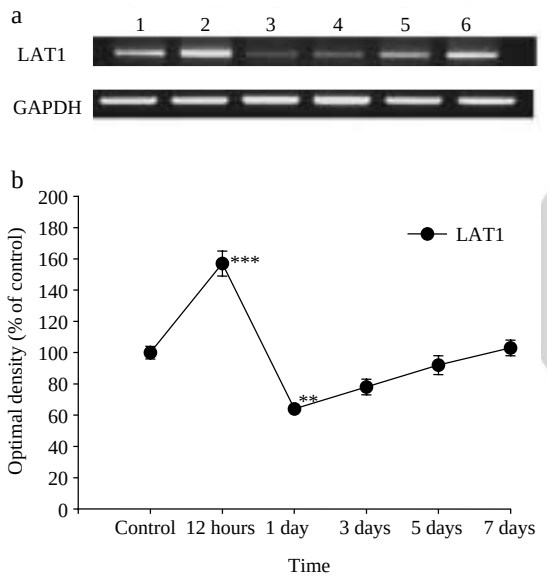


**Fig. 2.** Detection of LAT1 mRNA during healing after artificial wounds. (a) The first stand cDNA prepared from RNA of wound area tissue was used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visulaized with ethidium bromide. The LAT1-specific PCR product (496 bp) was obtained. (b) The percentage of LAT1 mRNA expression was calculated as a ratio of experimental wounded group and untreated control group (Lane 1: control rat skin, Lane 2: after 12 hours giving a wound, Lane 3: after 1 day giving a wound, Lane 4: after 3 days giving a wound, Lane 5: after 5 days giving a wound, Lane 6: after 7 days giving a wound). **$p < 0.01$ vs. control and ***$p < 0.001$ vs. control.

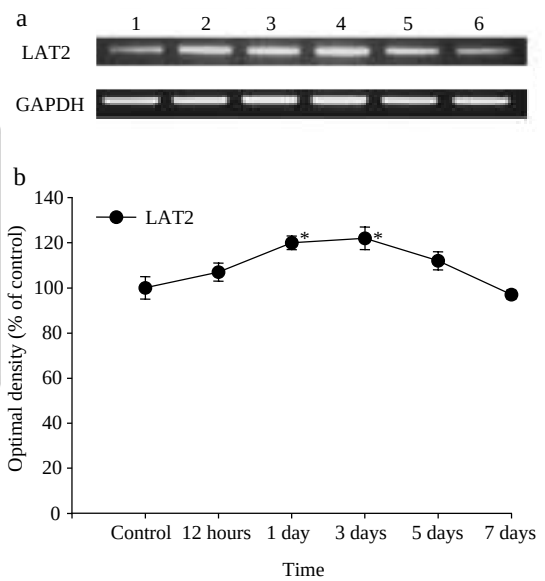


**Fig. 3.** Detection of LAT2 mRNA during healing after artificial wounds. (a) The first stand cDNA prepared from RNA of wound area tissue was used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visulaized with ethidium bromide. The LAT2-specific PCR product (509 bp) was obtained. (b) The percentage of LAT2 mRNA expression was calculated as a ratio of experimental wounded group and untreated control group (Lane 1: control rat skin, Lane 2: after 12 hours giving a wound, Lane 3: after 1 day giving a wound, Lane 4: after 3 days giving a wound, Lane 5: after 5 days giving a wound, Lane 6: after 7 days giving a wound). *$p < 0.05$ vs. control.

발현부위를 조사 · 비교하기 위하여 각 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다.

상처를 유도하지 않은 정상 대조군의 상피층에서는 전반적으로 LAT1의 항체에 면역반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5a). 상처 유발 후 12시간째의 조직에서는 상피와 진피의 전반적인 부분에서 면역반응이 관찰되었고, 특히 상처부위에 인접한 상피조직의 바닥부위와 가시층 부분의 상피세포에서 반응이 확인되었으며, 상처주변 진피에서는 털의 뿌리가 되는 털주머니의 세포주변에서 강한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 5b). 상처 유발 후 12시간째의 조직에서 LAT1 단백질의 발현은 대조군과 비교하여 다소 증가된 양상을 보였다(Fig. 5a, b). 상처 유발 1일째의 재생된 상피조직에서는 바닥부위를 제외한 위층의 세포들에서 강한 면역반응이 관찰되었으며(Fig. 5c), 이러한 양상은 상처 후 3일째까지 유지되었다(Fig. 5c, d). 상처 유발 3일째의 상피세포층에서는 상처부분으로 이동하는 세포에서 전반적으로 면역반응이 관찰되었으며(Fig. 5d), 상처 유발 1일과 3일째의 상처 내 진피부분에서는 면역반응이 확인되지 않았다(Fig. 5c, d). 상처 유발 5일 후, 재생된 상피조직 바닥층의 세포들과 진피 내 염증반응세포 및 섬유모세포들에서는 면역반응이 나타났으나(Fig. 5e), 7일째에서는 상피 및 진피 모두에서 면역반응이 매우 미약하였다(Fig. 5f).

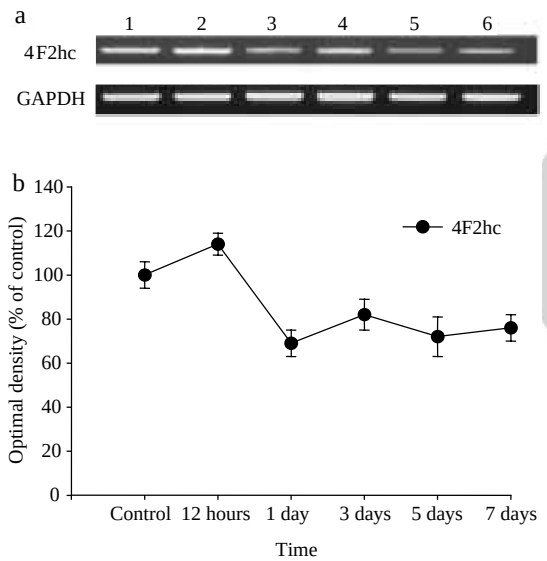


**Fig. 4.** Detection of 4F2hc mRNA during healing after artificial wounds. (a) The first stand cDNA prepared from RNA of wound area tissue was used as template for PCR amplification. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and visulaized with ethidium bromide. The 4F2hc-specific PCR product (489 bp) was obtained. (b) The percentage of 4F2hc mRNA expression was calculated as a ratio of experimental wounded group and untreated control group (Lane 1: control rat skin, Lane 2: after 12 hours giving a wound, Lane 3: after 1 day giving a wound, Lane 4: after 3 days giving a wound, Lane 5: after 5 days giving a wound, Lane 6: after 7 days giving a wound).

아미노산 수송계 L 중에서 두 번째 아형인 LAT2의 면역조직염색의 결과에서, 정상 대조군에서는 LAT2의 항체에 면역반응이 전반적으로 미약하게 나타나는 것을 확인할 수 있었고, 상처 유발 12시간째의 진피 내 조직부위에서는 모낭의 세포들에서 면역반응이 관찰되었으며 상피세포에서는 미약하게 반응하였다(Fig. 6a). 상처 유발 1일과 3일째의 상처부위에서 진피부위의 조직구 세포들과 재생된 상피층의 기저층에 분포한 세포들에서 LAT2의 면역반응이 확인되었다(Fig. 6b, c). 그러나 상처 유발 후 5일째에서는 1일과 3일째에서와는 다르게 상피층의 일부에서 약한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 6d).

상처치유 기간 중, LAT1과 LAT2의 필수적 보조인자인 4F2hc 단백질의 발현을 확인한 결과, 정상 대조군의 진피층 내 털주머니세포에서 발현되었으며 상피조직에서는 미약하게 관찰되었다. 상처 유발 후 1일째 조직에서 이동중인 상피세포에서 4F2hc의 발현이 증가하였으며(Fig. 7a), 3일째에서는 상처부위의 진피쪽에 위치한 염증반응세포 및 섬유모세포들에서의 발현을 확인하였다(Fig. 7b). 상처 유발 5일째의 상피 중 바닥층에서 약한 반응이 확인되었으며(Fig. 7c), 7일째에서는 발현이 매우 미약하였다.

## 고 찰

본 연구에서 흰쥐의 피부에 길이 1 cm가 되도록 일정하게 상처를 유발한 후, 상처치유 과정에서 아

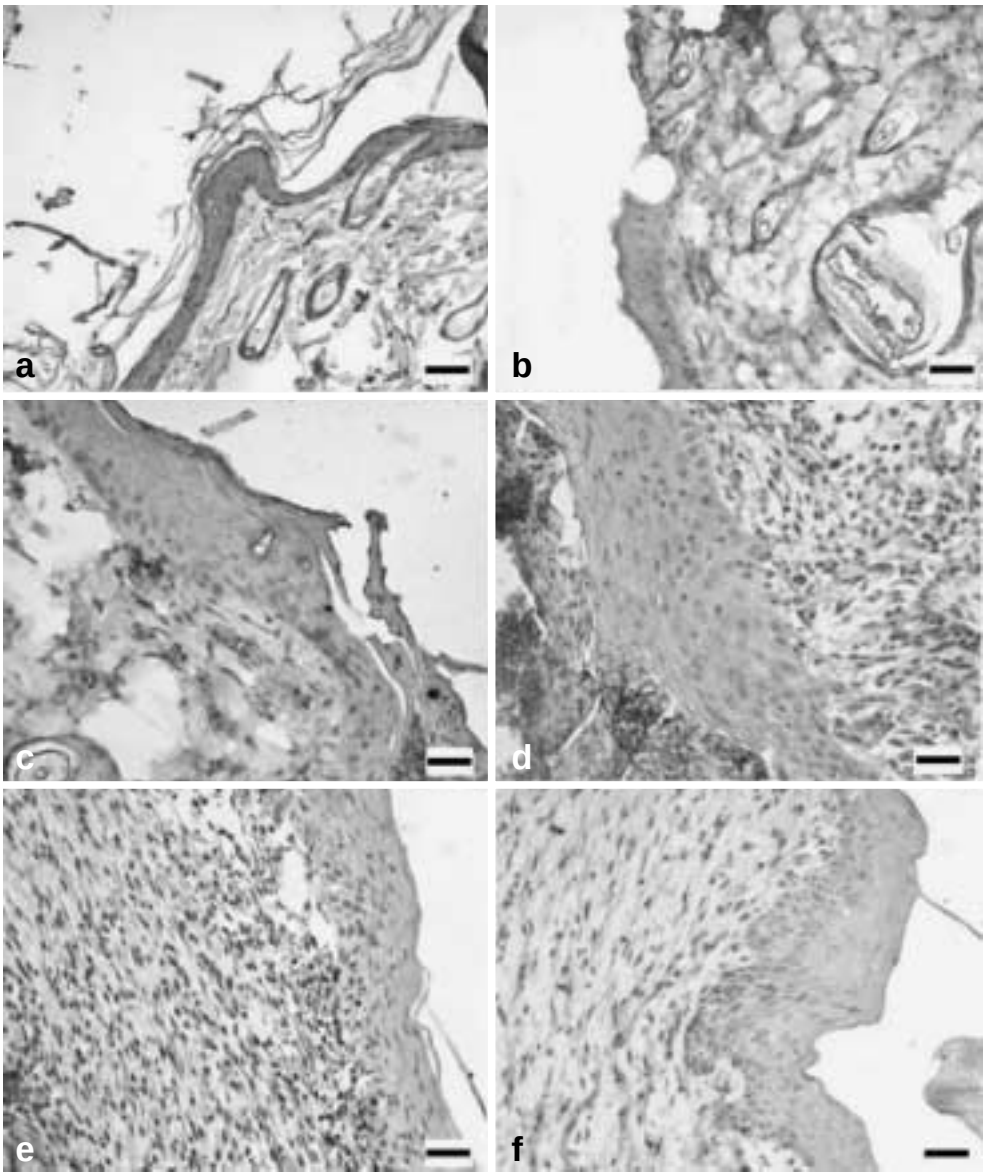


**Fig. 5.** Immuno-reaction of LAT1 during healing after artificial wounds. (a) normal (b) 12 hour (c) Day 1 (d) Day 3 (e) Day 5 (f) Day 7. All scale bars indicate 20 μm.

미노산 수송계 L의 발현양상 및 역할을 비교・분석하였다.

LAT1 mRNA의 발현은 상처유발 후 12시간째에 대조군에 비해 많은 증가가 있었고, 1일째에는 대조군에 비해 감소하였으며 3, 5일 및 7일째로 경과하면서 발현이 대조군과 점차 유사해졌다(Fig. 2). LAT2 mRNA의 발현은 상처유발 후, 12시간, 1일 및 3일까지 대조군에 비해 증가하였으며, 5일과 7일째

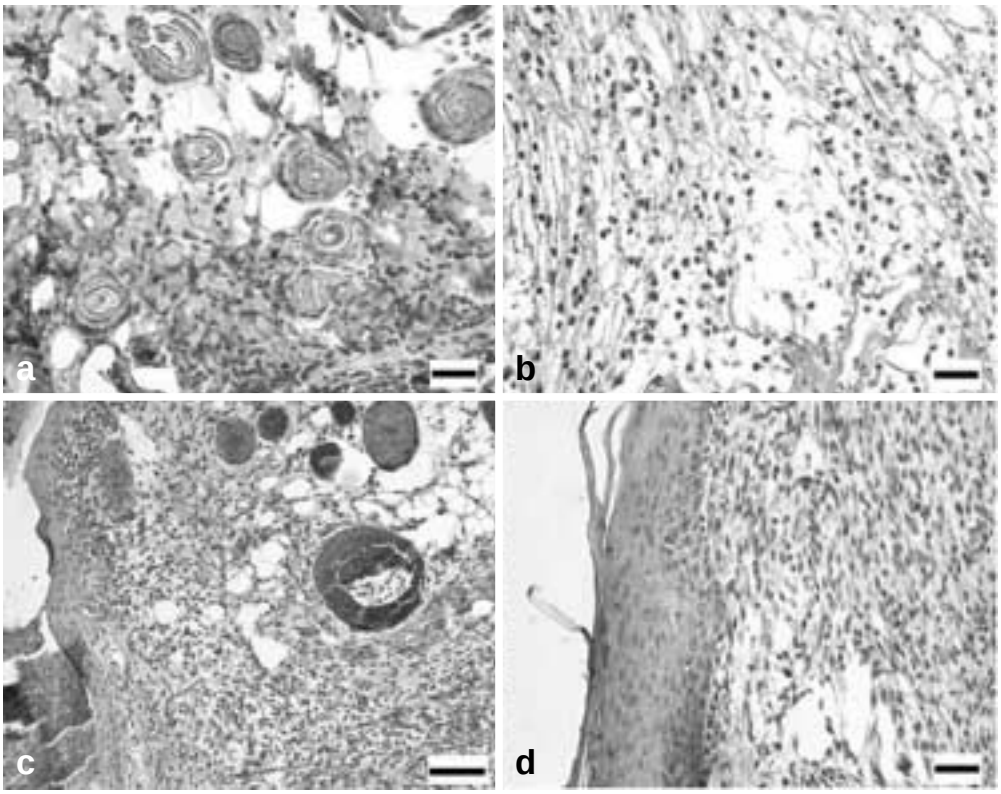


**Fig. 6.** Expression of LAT2 protein in wound area. (a) 12 hour (b) Day 1 (c) Day 3 (d) Day 5. All scale bars indicate 20 μm except that of c (50 μm).

로 경과하면서 대조군과 점차 유사해졌다 (Fig. 3). 4F2hc mRNA의 발현은 상처유발 후, 12시간에서 약간 증가하는 경향을 보였으며, 1, 3, 5일 및 7일째로 시간이 경과하면서 발현이 점차 감소하였다 (Fig. 4). Clark (1996)과 Mutsaer 등 (1997)은 상처유도 후 혈소판의 응고와 혈병의 형성과 관련된 항상성에 관련된 비트로넥틱, 피브리노겐과 같은 단백질의 발현이 증가됨으로서, 혈액 세포중 호중성백혈구의 유입을 돕고 포식세포의 활성을 돕는 화학주성물질들과 platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-beta (TGF-beta), tumor necrotic factor-alpha (TNF-alpha) 등과 같은 성장인자들의 발현이 증가 한다고 하였다. 상처 중기와 후기의 기질 재성형 시기에서는 각종 단백질분해 효소와 억제분자 그리고 metallomatrix proteinases (MMPs) 등과 이들의 억제제의 발현이 증가 또는 균형을 이루게 되어 상처치유에 기여할 것이라 보고하였다 (Talhouk 등 1992, Kobayashi 등 1994). 이 같은 선행연구자들의 보고들은 상처치유의 시기별로 중요한 역할을 하는 단백질들이 다르다는 것을 시사한다. 따라서 아미노산 수송계 L의 두 아형인 LAT1과 LAT2가 상처 유발 후 치유과정에서 시기별로 발현양상이 서로 다르다는 것을 확인한 본 연구결과와 상처치유 시기별로 중요한 역할을 하는 단백질들이 서로 다르다는 것을 시사한 선행연구자들의 보고 (Clark 1996)를 같이 고찰하여볼 때, 세포손상 후 상처치유 과정에서 중성아미노산 수송체 LAT1은 초기단계에서 중요한 역할을 하며, 중성아미노산 수송체 LAT2는 상

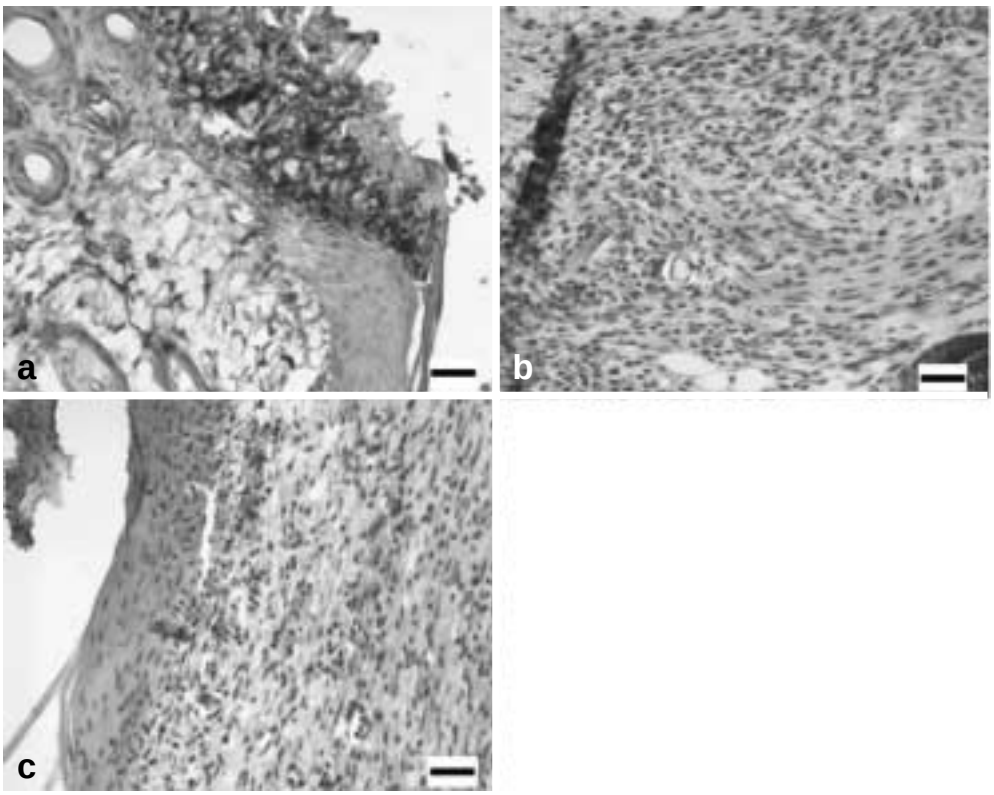


**Fig. 7.** Immuno-staining of 4F2hc during wound healing. (a) Day 1 (b) Day 3 (c) Day 5. All scale bars indicate 20 μm.

처치유 기간에서 점차 정상으로 진행되어가는 중기 단계에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 그러나 본 연구에 이용된 RT-PCR 분석방법은 유전자의 발현을 밝히는 실험방법이지만, 정확한 발현부위를 분석하기에는 어려움이 있다. 따라서 피부 상처 유발 후, 상처치유에 따른 아미노산 수송계 L 및 보조인자 4F2hc의 단백질 발현정도 및 발현부위를 분석하기 위하여 각 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였다.

LAT1 단백질의 발현은 상처 유발 후 12시간째 조직에서는 상피와 진피의 전반적인 부분에서 대조군과 비교하여 증가된 양상을 보였고, 특히 상처부위에 인접한 상피조직의 바닥부위와 가시층 부분의 상피세포에서 반응이 확인되었으며, 상처주변 진피에서는 털의 뿌리가 되는 털주머니의 세포주변에서 강한 면역반응이 관찰되었다(Fig. 5). 본 연구의 결과에서 LAT1 단백질이 이동하는 상피세포들에서 주로 강하게 발현하는 것은 중성아미노산 수송체 LAT1이 상처치유의 초기에 주로 관여한다는 것을 시사하고 있다.

아미노산 수송계 L의 두 번째 아형인 LAT2 단백질은 상처 유발 12시간째의 진피 및 상피세포에서 전반적으로 미약하게 발현하였다(Fig. 6). 상처 유발 1일과 3일째의 상처부위에서 진피부위의 염증반응 세포 및 섬유모세포들과 재생된 상피층의 기저층에 분포한 세포들에서 LAT2의 면역반응이 확인되었으나, 5일째에서는 상피층의 일부에서 약한 면역반응만이 관찰되었다(Fig. 6). 아미노산 수송계 L의 기능을 수행하기 위한 필수적 보조인자 4F2hc 단백질의 발현은 상처 유발 후 1일째 조직에서 이동중인 상

피세포에서 증가하였으며, 3일째에서는 상처부위의 진피쪽에 위치한 염증반응세포 및 섬유모세포들에서의 발현을 확인하였다(Fig. 7). 상처 유발 5일과 7일째에서는 발현이 매우 미약하였다. 본 연구의 결과는 LAT2 단백질이 상처치유 단계의 초기이후에 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시사한다.

아미노산 수송계 중, $Na^+$-비의존적으로 필수아미노산을 포함한 중성아미노산의 수송역할을 생체 내에서 담당하고 있는 아미노산 수송계 L은 그 수송기질이 필수아미노산을 포함한 대부분의 중성아미노산이므로 매우 중요하게 인식되고 있다(Silbernagl 1979, Christensen 1990). 또한 아미노산 수송계 L은 발현하는 부위가 제한되어 있는 다른 아미노산 수송체들과는 달리 생체 내 거의 모든 조직에 분포하고 있으므로 세포 및 조직에서 매우 중요한 기능을 하고 있는 수송계이고 아미노산 수송계 L에는 LAT1과 LAT2라는 두 개의 아형이 생체 내에서 존재한다고 알려져 있으며, 세포의 종류, 세포의 환경 및 조건에 따라 발현양상이 서로 다르다고 알려져 있다(Sang 등 1995, Wolf 등 1996, Kanai 등 1998, Pineda 등 1999, Rossier 등 1999, Segawa 등 1999, Verrey 등 2000, Yanagida 등 2001).

세포 내 대사가 특이적으로 항진되거나 계속적인 증식과 성장이 필수적인 세포들에는 아미노산 수송체의 기능이 상승되어 단백질 합성을 위한 아미노산의 공급이 활발하게 되며, 이는 이들 세포 내 아미노산의 공급을 위한 아미노산 수송체들의 발현이 특이적으로 과발현 됨에 의해서 이루어진다고 알려져 있다(Sang 등 1995, Wolf 등 1996, Kanai 등 1998, Yanagida 등 2001). LAT1은 정상조직에서는 뇌, 태반, 고환 등 그 발현하는 부위가 제한되어 있고, 주로 악성 종양세포에서 과발현 되며, 종양세포의 성장에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Kanai 등 1998, Yanagida 등 2001). 그러나 LAT2는 LAT1과 비교하여 볼 때 정상 조직 내 발현 하는 부위가 매우 많다(Pineda 등 1999, Rossier 등 1999, Segawa 등 1999, Verrey 등 2000). 따라서 본 연구의 결과에서 상처치유 과정 중, 환경의 변화에 민감한 중성아미노산 수송체 LAT1은 초기단계에서 중요한 역할을 하며, 정상세포 형 중성아미노산 수송체인 LAT2는 상처치유 기간에서 점차 정상으로 진행되어가는 중기단계에서 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

결론적으로, 본 연구의 결과로서 중성아미노산 수송계 L 중, 환경의 변화에 따라 발현의 변화가 민감한 LAT1은 세포손상 후 상처치유과정에서 초기단계에서 중요한 역할을 하고, 정상세포 형 중성아미노산 수송체인 LAT2는 상처치유 기간에서 점차 정상으로 진행되어가는 중기단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료되며, 이들 아미노산 수송체 이론을 이용한 약물들을 이용하여 상처치유 촉진에 관한 또 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌


Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MW : Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory responses. Am J Pathol 155: 1137-1146, 1999.

Blondeau JP, Beslin A, Chantoux F, Francon J : Triiodothyronine is a high-affinity inhibitor of amino acid transport system L1 in cultured astrocytes. J Neurochem 60: 1407-1413, 1993.

Clark RAF : Wound repair : overview and general considerations. In The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair by Eds Clark RAF and Henson PM edi. Pleum Press, NY, pp.3-50, 1996.

Christensen HN : Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. Physiol Rev 70: 43-77, 1990.

Goldenberg GJ, Lam HY, Begleiter A : 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, 1979.

Gomes P, Soares-da-Silva P : L-DOPA transport properties in an immortalised cell line of rat capillary cerebral endothelial cells, RBE 4. Brain Res 829: 143-150, 1999.

Gould LJ, Yager DR, Cohen K : In vitro analysis of fetal fibroblast collagenolytic activity. Wound Repair Regen 5: 151-158, 1997.

Kanai Y, Segawa H, Miyamoto K, Uchino H, Takeda E,

Endou H : Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). J Bio Chem 273: 23629-23632, 1998.

Kobayashi H, Ishii M, Chanoki M : Immunohistochemical localization of lysyl oxidase in normal human skin. Br J Dermatol 131: 325-330, 1994.

Lakshmanan M, Goncalves E, Lessly G, Foti D, Robbins J : The transport of thyroxine into mouse neuroblastoma cells, NB41A3: the effect of L-system amino acids. Endocrinology 126: 3245-3250, 1990.

Mannion BA, Kolesnikova TV, Lin SH, Wang S, Thompson NL, Hemler ME : The light chain of CD98 is identified as E16/TA1 protein. J Biol Chem 273: 33127-33129, 1998.

Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, Verrey F : Amino-acid tramsport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. Nature 395: 288-291, 1998.

Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ : Mechanism of tissue repair: from wound healing to fibrosis. Int J Biochem Cell Biol 29: 5-17, 1997.

Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, Matsuoka S, Noma A, Iwai K, Minato N : 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, 1999.

Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shpemaker CB, Verrey F : Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. FEBS Lett 439: 157-162, 1998.

Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, Lloberas J, Zorzano A, Palacin M : Identification of a membrane protein, LAT-2, that co-expressed with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transporter activity with broad specificity for small large zwitterionic amino aicds. J Biol Chem 274: 19738-19744, 1999.

Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, Kuhn LC : LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kindney and intestine. J Biol Chem 274: 34948-34954, 1999.

Sang J, Lim YP, Panzica M, Finch P, Thompson NL : 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, 1995.

Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K, Takeda E, Endou H, Kanai Y : Identification and functional characterization of a $Na^+$-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. J Biol Chem 274: 19745-19751, 1999.

Silbernagl S : Renal transport of amino acids. Klin Wochenschr 57: 1009-1019, 1979.

Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billinghurst RC, Poole AR, Wahl SM : Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-incuced arthritis. J Exp Med 190: 535-542, 1999.

Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender DL : 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, 1995.

Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z : Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinase and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. J Cell Biol 118: 1271-1282, 1992.

Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, Anders MW, Endou H : Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanism of substrate recognition. Mol Pharmacol 61: 729-737, 2002.

Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC : Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. Pflugers Arch 440: 503-512, 2000.

Wolf DA, Wang S, Panzica MA, Bassily NH, Thompson NL : 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, 1996.

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 : Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1) : characterization of function and expression in tumor cell lines. Biochim Biophys Acta 1514: 291-302, 2001.

Korean J Phys Anthropol
19(1): 37 ~ 48, 2006

## Abstract

# Differential Expression of System L Amino Acid Transporters in Wound Healing Process of Rat Skin

Moon-Jin Jeong, Chang-Hyun Kim, Baik-Dong Choi, Soon-Jeong Jeong,
Joo-Cheol Park, Heung-Joong Kim, Kyung-Jin Park, Do-Kyung Kim

*Oral Biology Research Institute, College of Dentistry Chosun University*

The continuous growth and proliferation of cells are essential for the wound healing process, and the amino acid transporters plays an important role in the continuous growing and proliferating cells. Among the amino acid transport systems, the amino acid transport system L, which is a $Na^+$-independent neutral amino acid transport system, is a major route for providing living cells including tumor cells with neutral amino acids including several essential amino acids.

In the present study, to elucidate the role of amino acid transport system L in the wound healing process, we investigated the expression pattern of LAT1 and LAT2 in the healing process after inflicting the wound on skin of rat.

The expression of LAT1 was increased at 12 hours after inflicting the wound and was similar to the control group getting closer to 7 days. The expression of LAT2 was increased at 1 day and 3 days after inflicting the wound and was similar to the control group getting closer to 7 days.

These results suggest that the LAT1 and LAT2 play important roles at the early stage and at the middle stage getting closer to normal skin in the wound healing process after inflicting the wound, respectively.

**Key words** : Wound healing, System L amino acid transporters, Nutrition to cells, Epithelial tissue

Correspondence to : Do Kyung Kim (Department of Oral Physiology, College of Dentistry, Chosun University)
E-mail : kdk@chosun.ac.kr