

사람 골육종 세포 Saos2에서 아미노산 수송계 L의 발현 및 기능적 특성

김수관* · 김현호* · 김창현** · 김도경**

조선대학교 치과대학 *구강악안면외과학교실, **구강생리학교실

Abstract (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2006;32:200-208)

EXPRESSION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF AMINO ACID TRANSPORT SYSTEM L IN SAOS2 HUMAN OSTEOGENIC SARCOMA CELLS

Su-Gwan Kim*, Hyun-Ho Kim*, Chang-Hyun Kim**, Do Kyung Kim**

*Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, **Dept. of Oral Physiology, College of Dentistry, Chosun University

Amino acids are required for protein synthesis and energy sources in all living cells. The amino acid transport system L is a major nutrient transport system that is responsible for Na⁺-independent transport of neutral amino acids including several essential amino acids. In malignant tumors, the L-type amino acid transporter 1 (LAT1), the first isoform of system L, is highly expressed to support tumor cell growth. In the present study, the expression and functional characterization of amino acid transport system L were, therefore, investigated in Saos2 human osteogenic sarcoma cells.

RT-PCR and western blot analyses have revealed that the Saos2 cells expressed the LAT1 and the L-type amino acid transporter 2 (LAT2), the second isoform of system L, together with their associating protein heavy chain of 4F2 antigen (4F2hc) in the plasma membrane, but the expression of LAT2 was very weak. The uptakes of [¹⁴C]L-leucine by Saos2 cells were Na⁺-independent and were completely inhibited by the system L selective inhibitor, 2-aminobicyclo- (2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH). The affinity of [¹⁴C]L-leucine uptake and the inhibition profiles of [¹⁴C]L-leucine uptake by various amino acids in the Saos2 cells were comparable with those for the LAT1 expressed in *Xenopus* oocytes. The majority of [¹⁴C]L-leucine uptake is, therefore, mediated by LAT1 in the Saos2 cells.

These results suggest that the transports of neutral amino acids including several essential amino acids into Saos2 human osteogenic sarcoma cells are for the most part mediated by LAT1. Therefore, the Saos2 human osteogenic sarcoma cells are excellent tools for examine the properties of LAT1. Moreover, the specific inhibition of LAT1 in tumor cells might be a new rationale for anti-tumor therapy.

Key words: Nutrition to tumor cells, L-type amino acid transporters, Saos2 cells, Essential amino acids, Anti-tumor therapy

I. 서 론

아미노산은 세포 내 단백질 합성의 기질이 될 뿐만 아니라, glucose, purine, pyrimidine 등 다양한 물질의 생합성에도 관여하며, 세포 내에서 필요한 아미노산의 수송은 세포막에 위치하고 있는 아미노산 수송체(amino acid transporter)를 통하여 이루어진다¹⁾. 아미노산 수송체는 각기 그들이 수송하는 아미노산의 특성에 따라 중성, 염기성 및 산성아미노산 수송체로 분류

되며, 세포 외액의 소듐 이온에 대한 의존성에 따라 Na⁺-의존성 및 Na⁺-비의존성 수송체로 분류된다¹⁾.

아미노산 수송계 L은 Na⁺-비의존적으로 중성아미노산을 수송하는 세포막 단백질로서 중앙세포를 포함한 대부분의 세포에서 중성아미노산의 주 경로가 되는 아미노산 수송계로 알려져 있으며²⁾, 상피세포의 기저막 측에 존재하여 소장과 신세뇨관의 상피세포를 통한 중성아미노산의 흡수에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다³⁾. 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^{1,3,7)}.

1998년 Kanai 등에 의해 아미노산 수송계 L의 첫 번째 아형인 L-type amino acid transporter 1(LAT1)이 rat C6 glioma 세포에서 동정되었다⁸⁾. LAT1은 12회 세포막을 관통하는 막 단백질로서 Na⁺-비의존적으로 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyro-

김도경

501-759 광주광역시 동구 서석동 375번지
조선대학교 치과대학 구강생리학교실

Do Kyung Kim

Dept. of Oral Physiology, Chosun University College of Dentistry,
375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea
Tel: 82-62-230-6893
E-mail: kdk@chosun.ac.kr

※ 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업(A050142)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

sine, methionine, tryptophan과 histidine 같은 구조가 큰 중성아미노산을 수송하는 특징을 가지고 있다⁸⁻¹⁰. 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^{8,9,11-14}. 보조인자 4F2hc가 심장, 뇌, 태반, 폐, 간, 근육, 심장, 췌장, 비장, 흉선, 정소, 난소, 소장 및 대장 등 거의 모든 정상 조직에서 발현되는 것과 대조적으로 수송체 본체인 LAT1은 뇌, 태반, 정소 등 그 발현하는 부위가 제한되어 있다^{8,14}. 또한 LAT1은 악성 종양세포에서 과발현되며, 종양세포의 성장에 중요한 역할을 한다고 보고되었다^{8,9,15,16}. 한편, LAT1의 분자적 동정 후에 LAT1과 구조적으로 관련이 있는 아미노산 수송체 L의 두 번째 아형인 L-type amino acid transporter 2(LAT2)가 동정되었다^{17,19}. LAT2는 LAT1과 비교하여 볼 때 정상 조직 내 발현 하는 부위가 매우 많으며, 구조가 큰 중성아미노산 뿐만 아니라 구조가 작은 중성아미노산도 모두 수송한다^{18,20}.

아미노산 수송체 LAT1과 LAT2의 특성을 살펴보면, 이들 아미노산 수송체 L, 특히 종양세포에 과발현되는 LAT1의 조절을 통해 종양세포 성장억제를 위한 하나의 방법을 제시 할 수 있다. 종양세포에서 LAT1의 활성을 억제하는 억제제를 이용하여 세포내 중성아미노산의 고갈을 유도한다면 종양세포 성장의 억제를 유도할 수 있을 것이다.

2-Aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid(BCH)는 아미노산 수송체 연구에 주로 이용되는 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제이다^{8-10,16,19}. 아미노산 수송체 L이 leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, threonine, methionine과 histidine 등과 같은 필수아미노산을 포함한 중성아미노산을 수송하기 때문에, 만약 세포에서 아미노산 수송체 L이 BCH 같은 억제제에 의해 차단된다면 세포는 세포성장과 증식에 필수적인 필수아미노산이 고갈됨으로 큰 손상을 입을 것이다. 그러나 이러한 아미노산 수송 억제에 의한 세포성장 억제기전에 관한 보고는 거의 없다.

지금까지 아미노산 수송체의 수송 특성에 관한 연구는 *Xenopus*라는 아프리카산 발톱개구리의 oocyte 내에 아미노산 수송체의 cRNA를 미세 주입하여 발현된 단백질을 이용하여 시행되어 왔었다^{8,10,21-23}. 그러나 이 실험방법은 *Xenopus oocyte*가 손상을 입기 쉬워 다양한 화학물질의 시험이 어렵고 시간과 금전적으로 많은 손실을 동반하며, 또 진정한 포유동물에서의 실험적 결과를 얻기가 어려우므로 아미노산 수송체 연구를 위한 *Xenopus oocyte* 실험계를 대체할 수 있는 포유동물 세포 실험계의 개발이 필수적이다.

골육종은 미분화 중간엽 세포에서 직접 형성하는 비정형 유골 및 골 형성을 특징으로 하는 인구 100,000명 당 1명의 비율로 발생하는 가장 대표적이고 흔한 악성 골종양이다. 그럼에도 불구하고 골육종은 다른 악성종양에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 가장 되어있지 않은 암 중의 하나이다. 더욱이 골육종 세포의 성장에 필수적인 아미노산을 공급하여 주는 아미노산 수송체에 관한 연구 또한 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 사람의 골육종 세포주인 Saos2 human osteogenic sarcoma

세포를 이용하여 아미노산 수송체 L의 발현과 아미노산 수송체 L을 통한 중성아미노산의 수송특성 및 LAT1의 *in vitro* 연구에 Saos2 세포의 유용성 등을 밝히고, 또 아미노산 수송체 LAT1의 억제제를 통한 골육종 치료의 효용성을 제시하고자 한다.

II. 연구재료 및 방법

1. 실험재료

[¹⁴C]L-leucine은 Perkin Elmer Life Science Inc.(Boston, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였고, BCH는 Sigma(St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 아미노산 및 기타 시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다. Affinity-purified anti-LAT1, LAT2 및 4F2hc는 Kumamoto Immunochemical Laboratory, Transgenic Inc.(Kumamoto, Japan)로부터 제공받아 사용하였다²³.

Saos2 human osteogenic sarcoma 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분양받아 사용하였다.

2. 세포주와 세포배양

Saos2 세포는 10% Fetal Bovine Serum(FBS, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 및 항생제(100 u/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)가 함유된 37°C의 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 성장배지 하에서 배양하였다.

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

Saos2 세포로부터 TRI REAGENT kit(Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio, USA)를 이용하여 total RNA를 추출한 후, 자외선 분광기(UV spectrophotomet)를 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 LAT1, LAT2 및 4F2hc의 primer(Table 1)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 12분, 변성반응을 94°C에서 30초, 결합반응을 60°C에서 30초, 중합 반응은 72°C에서 45초 간 35주기를 반복하였고 마지막 중합반응을 72°C에서 30분간 연장하였다. RT-PCR 반응 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

4. Western blot analysis

Western blot analysis를 위하여 Saos2 세포로부터 단백질을 Kim 등²⁴이 제안한 방법을 이용하여 추출하였다.

Saos2 세포를 PBS로 3회 세척한 후 cell scraper로 긁어 eppen-

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

Primers	Sequence (5' → 3')	PCR product (bp)
LAT1 (sense)	TTCATCGCAGTACATCGTGG	536
LAT1 (antisense)	CCCAGGTGATAGTCCCGAA	
LAT2 (sense)	AGCCCTGAAGAAAGAGATCG	529
LAT2 (antisense)	TGCATATCTGTACAATCCCC	
4F2hc (sense)	TCGATTACCTGAGCTCTCTG	509
4F2hc (antisense)	GGGATTTTGTATGCTCCCCA	

dorf tube에 옮기고 1,000 X g에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 9 volume의 homogenization buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 250 mM sucrose)를 넣고 혼합한 후, Dounce homogenizer에 옮겨 15회 stroke하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 8,000 X g에서 10분간 원심분리하고, 상층액을 회수하여 다시 100,000 X g에서 1시간 원심분리 한 후 단백질 pellet을 resuspend buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 250 mM sucrose)에 녹여 단백질을 정량하였다. Saos2 세포의 단백질 10 µg을 2배의 SDS sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)에 넣고 5분간 100 °C에서 변성 시킨 후에 SDS-polyacrylamide gel에 2시간 전기영동 한 다음 gel을 semi-dry transfer에서 30분간 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. Membrane을 5% fat-free dry milk-PBST buffer(PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking하였고, PBST buffer로 15분간 3회 세척하였다. Affinity-purified rabbit anti-LAT1, LAT2, 4F2hc 및 GAPDH를 5% fat-free dry milk-PBS buffer에 1,000배 희석하였으며, 이 용액에 membrane을 넣어 2시간 동안 배양한 후, PBST 용액을 사용하여 5분 간격으로 10회 세척하였다. Membrane을 다시 anti-rabbit-horseradish peroxidase conjugated-secondary antibody 용액에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBST 용액을 사용하여 5분 간격으로 10회 세척하고 Enhanced chemiluminescence(ECL) detection kit(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)를 사용하여 X-ray 필름에 현상하였다.

5. Uptake 실험

Saos2 세포에서 아미노산 수송계 L의 특성을 조사하기 위하여 Kim 등²⁵⁾의 방법을 이용하여 아미노산 uptake 실험을 시행하였다.

37°C의 성장배지 하에서 배양된 Saos2 세포를 수집하여 24 well plate에 seed(1 × 10⁵ cell/well)하고, seeding 24시간 후 uptake 실험을 시행하였다. 24시간 후 성장배지를 흡수기를 이용하여 제거한 뒤 세포를 standard uptake 용액(125 mM NaCl, 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) 또는 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 사용하여 3회 세척한 후 실험목적에 따라 37°C 및 얼음 위에서 10분간 전배양 하였다. 그 후, [¹⁴C]L-leucine이 존재하는 동일 uptake 용액으로 교체하여 실험목적에 따라 0.5 - 20분 배양시켰으며, 반응의 정지를 위해 4°C의 같은 용액으로 3회 세척하였다. 세척 후 세포를 0.1 N NaOH에 녹여 세포 안으로 uptake 되어진 방사능을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였으며, 측정된 방사능을 pmol/mg protein/min으로 산출하였다. 본 논문의 uptake 실험에서 각각의 결과를 위해 각 군은 3개의 well을 이용하였으며, 각각의 결과를 mean ± SEM(n = 3)으로 표시하였다. 각 결과의 재현성을 확인하기 위하여 3회 이상 반복 실험을 수행하여 결과를 산출하였다.

Saos2 세포에서 L-Leucine의 K_m은 L-Leucine 농도 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 µM에서 Eadie-Hofstee equation을 이용하여 산출하였다. L-Leucine 수송을 억제하는 BCH의 IC₅₀은 BCH 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 및 3000 µM의 존재 하에서 [¹⁴C]L-leucine 1 µM의 uptake를 수행하여 산출하였다. L-Leucine 수송을 억제하는 BCH의 K_i는 BCH 0 및 100 µM의 존재 하에서 [¹⁴C]L-leucine 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 µM의 uptake를 수행하여 산출하였다. 아미노산 수송계 L에 의해 유도된 L-Leucine uptake에 미치는 여러 아미노산들의 억제효과를 보기 위해 30 µM의 [¹⁴C]L-leucine과 방사능이 표지되지 않는 아미노산 3 mM을 uptake 용액 내에 동시 투여하여 시행하였다.

6. 세포사 측정(MTT assay)

BCH에 의한 세포성장 억제효과를 관찰하기 위해 37°C의 성장배지 하에서 배양된 Saos2 세포를 수집하여 24 well plate에 seed(1 × 10⁵ cell/well) 하고, seeding 24시간 후 실험목적에 따라 다양한 농도의 BCH를 처리하여 37°C에서 반응시킨 후, MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 Saos2 세포에 BCH를 처리한 후, MTT 분석 직전에 성장배지에서 FBS를 제거하고 MTT 용액을 37°C에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04 N HCl이 함유된 isopropanol로 세포를 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

7. 통계학적 검증

모든 실험성적은 mean ± SEM으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만(p<0.05)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. Saos2 세포에서 아미노산 수송체 LAT1, LAT2 및 4F2hc의 발현

Saos2 세포에서 아미노산 수송체 LAT1, LAT2 및 4F2hc mRNA의 발현을 확인하기 위하여, 각각의 primer(Table 1)를 이용하여 RT-PCR 방법으로 그 발현정도를 관찰하였다. Saos2 세포에서 LAT1, LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc mRNA의 발현을 관찰할 수 있었으나, LAT2 mRNA의 발현이 매우 미약함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

Saos2 세포에서 아미노산 수송체 LAT1, LAT2 및 4F2hc 단백질 발현을 확인하기 위하여, 각각의 항체를 이용하여 western blot analysis를 수행하였다. Saos2 세포 단백질에서 LAT1, LAT2 및 4F2hc에 대한 특이 band를 각각 40 kDa, 47 kDa 및 85 kDa에서 확인할 수 있었으며, LAT2의 특이 band는 LAT1과 4F2hc의 band보다 매우 약하게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

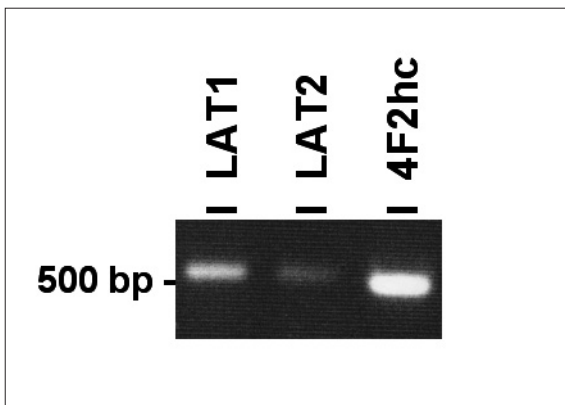


Fig. 1. Detection of LAT1, LAT2 and 4F2hc by RT-PCR in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.2 % agarose gel and visualized with ethidium bromide. The LAT1-specific PCR product (536 bp), LAT2-specific PCR product (529 bp) and 4F2hc-specific PCR product (509 bp) were obtained from Saos2 cells.

2. Saos2 세포에서 [¹⁴C]L-leucine의 수송 특성

Saos2 세포에서 L-leucine의 수송 특성을 조사하기 위하여 [¹⁴C]이 표지된 L-leucine의 uptake 실험을 시행하였다. Saos2 세포를 37°C에서 [¹⁴C]L-leucine 30 μM이 함유된 standard uptake 용액(Fig. 3A, Na)과 Na⁺-free uptake용액(Fig. 3A, Choline)에 배양시킨 결과 [¹⁴C]L-leucine의 uptake를 볼 수 있었으며, [¹⁴C]L-leucine의 uptake 양은 standard uptake 용액과 Na⁺-free uptake 용액에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 3A). 이 결과는 Saos2 세포에서 L-leucine의 수송이 Na⁺-비의존적으로 이루어짐을 시사하는 것이므로 이 논문에서 이후의 모든 uptake 실험은 Na⁺-free uptake 용액에서 시행하여 비교하였다. Fig. 3A에서와 같이 Saos2 세포를 [¹⁴C]L-leucine 30 μM이 함유된 얼음 위의 standard uptake 용액(Fig. 3A, Na, on ice) 또는 Na⁺-free uptake 용액(Fig. 3A, Choline, on ice)에 배양시킨 결과 [¹⁴C]L-leucine의 uptake를 볼 수 없었다(Fig. 3A). 얼음 위와 37°C에서의 [¹⁴C]L-leucine uptake 결과는 Saos2 세포에서 L-leucine의 수송이 아미노산 수송체를 통해 이루어짐을 시사한다. Saos2 세포에서 [¹⁴C]L-leucine 30 μM의 uptake는 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH 3 mM에 의해 완전히 차단되었으며(Fig. 3B), 이 결과는 Saos2 세포에서 [¹⁴C]L-leucine의 수송이 아미노산 수송체 L을 통해 이루어짐을 가리킨다.

Saos2 세포에서 [¹⁴C]L-leucine uptake의 time-course를 결정하기 위하여 배양시간 0.5 - 20분에서 [¹⁴C]L-leucine uptake를 시행하였다. [¹⁴C]L-leucine 30 μM의 uptake는 배양시간 의존적이었고, 배양시간 2.5분까지 직선을 유지하였으며, 배양시간 5분에 최대

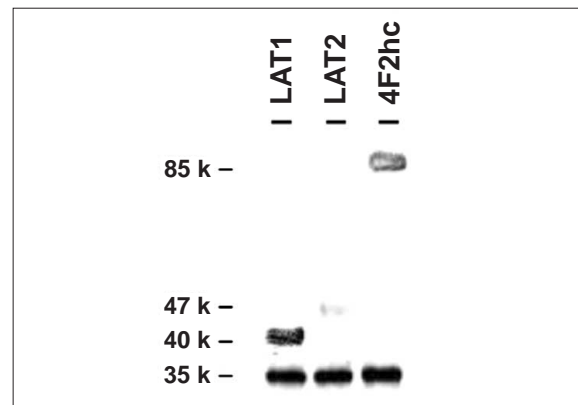


Fig. 2. Western blot analysis of LAT1, LAT2 and 4F2hc in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. Western blot analyses were performed on the membrane fractions prepared from Saos2 cells in the presence of 2-mercaptoethanol using anti-LAT1, anti-LAT2 and anti-4F2hc antibodies. For GAPDH, LAT1, LAT2 and 4F2hc, the 35 kDa-, 40 kDa-, 47 kDa- and 85 kDa-protein bands detected, respectively.

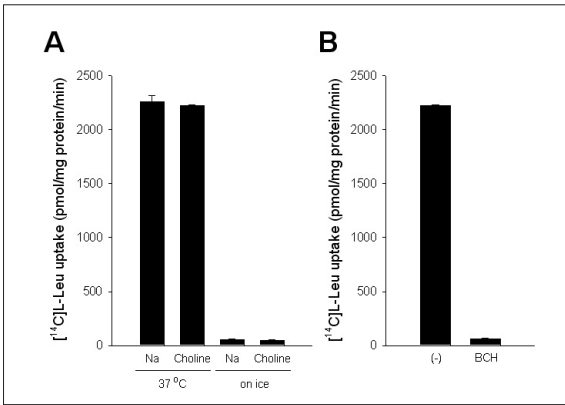


Fig. 3. [¹⁴C]L-leucine uptake by Saos2 human osteogenic sarcoma cells. (A) Ion dependence of [¹⁴C]L-leucine transport. [¹⁴C]L-leucine (30 μM) uptake measured in the standard uptake solution (Na) was compared with that measured in the Na⁺-free uptake solution (Choline). The [¹⁴C]L-leucine transport measurement was performed at 37 °C and on ice. (B) Inhibition of [¹⁴C]L-leucine transport by BCH, a specific inhibitor of amino acid transport system L. The [¹⁴C]L-leucine (30 μM) uptake was measured in the presence (BCH) or absence (-) of 3mM BCH.

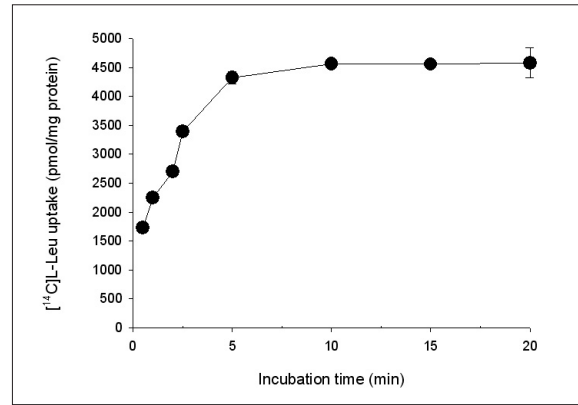


Fig. 4. Time course of [¹⁴C]L-leucine uptake by Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The Saos2 cells were incubated in the Na⁺-free uptake solution containing 30 μM [¹⁴C]L-leucine for 0.5, 1, 2, 2.5, 5, 10, 15 and 20 min.

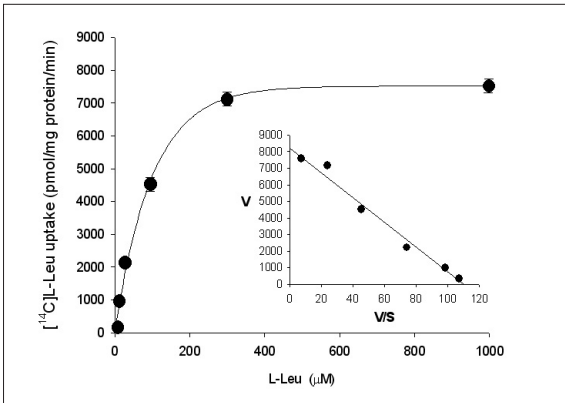


Fig. 5. Concentration dependence of [¹⁴C]L-leucine uptake by Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The uptake of [¹⁴C]L-leucine by Saos2 cells was measured for 1 min and plotted against L-leucine concentration. The L-leucine uptake was saturable and fit to the Michaelis-Menten curve ($K_m = 76.3 \mu M$). The inset shows an Eadie-Hofstee plot of L-leucine uptake that was used to determine the kinetic parameters.

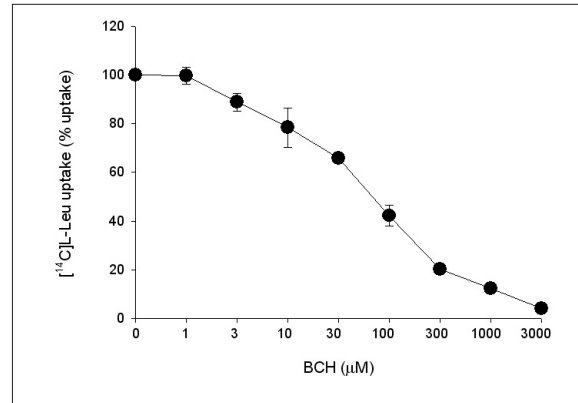


Fig. 6. Concentration-dependent inhibition of [¹⁴C]L-leucine uptake by BCH in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The [¹⁴C]L-leucine uptake (1 μM) was measured for 1 min in the presence of various BCH concentrations in Saos2 cells, and was expressed as a percentage of the control L-leucine uptake in the absence of BCH.

에 이르러 배양시간 20분까지 유지되었다(Fig. 4). 따라서 이 논문에서 이후의 모든 uptake 실험은 배양시간 1분에서 시행하였으며, 그 결과를 pmol/mg protein/min으로 산출하여 비교하였다. Fig. 5에서와 같이, Saos2 세포에서 [¹⁴C]L-leucine의 uptake는 포화되었으며, Michaelis-Menten kinetics에 의하여 K_m 치는 $76.3 \pm 6.9 \mu M$ (mean \pm SEM, n=3)로 산출되었다.

3. Saos2 세포에서 BCH에 의한 [¹⁴C]L-leucine uptake의 억제

Saos2 세포에서 L-leucine의 uptake에 미치는 BCH의 특성을 조사하기 위하여, [¹⁴C]이 표지된 L-leucine(1 μM)의 uptake를 BCH 존재 하에서 시행하였다. BCH 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 및

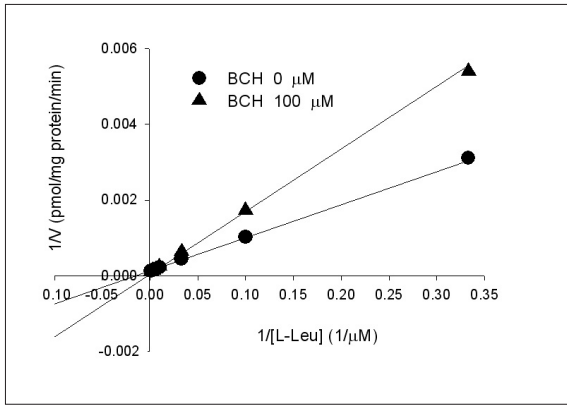


Fig. 7. Double reciprocal plot analysis of inhibitory effect of BCH on the $[^{14}\text{C}]$ L-leucine uptake in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The $[^{14}\text{C}]$ L-leucine uptakes (3, 10, 30, 100, 300 and 1000 μM) were measured in the Na^+ -free uptake solution in the presence (filled triangle) or absence (filled circle) of 100 μM BCH in Saos2 cells.

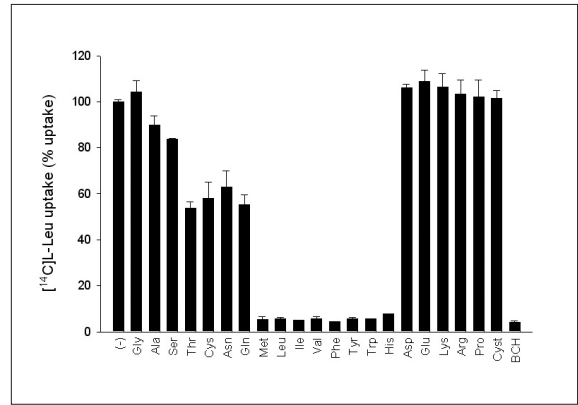


Fig. 8. Inhibition of $[^{14}\text{C}]$ L-leucine uptake by amino acids in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The $[^{14}\text{C}]$ L-leucine (30 μM) uptake was measured in the presence of 3 mM nonradiolabeled indicated L-amino acids and system L specific inhibitor BCH in the Na^+ -free uptake solution.

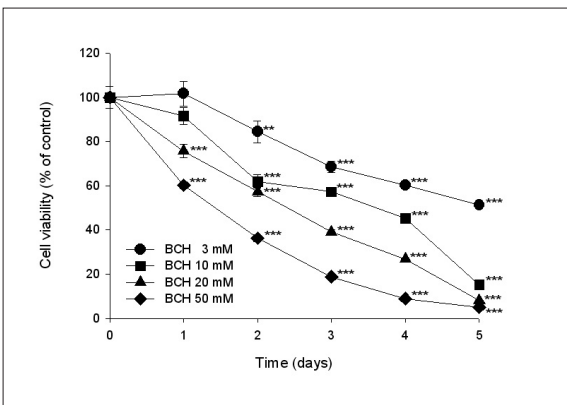


Fig. 9. Time-dependent effect of BCH on the cell viability in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The Saos2 cells were treated with 0, 3, 10, 20 and 50 mM BCH for 0 - 5 days. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of $A_{570\text{nm}}$ of BCH treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of three experiments. ** $P < 0.01$ vs. control and *** $P < 0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of BCH).

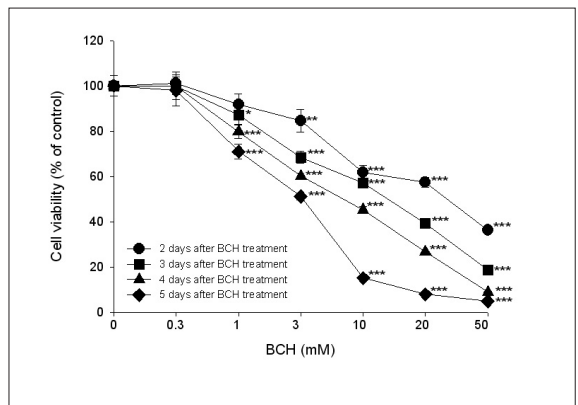


Fig. 10. Concentration-dependent effect of BCH on the cell viability in Saos2 human osteogenic sarcoma cells. The Saos2 cells were treated with various concentrations of BCH or without BCH for 5 days. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of $A_{570\text{nm}}$ of BCH treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of three experiments. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control and *** $P < 0.001$ vs. control (the control cells measured in the absence of BCH).

3000 μM 은 $[^{14}\text{C}]$ L-leucine 1 μM 의 uptake를 농도 의존적으로 억제 하였으며, 그 IC_{50} 치는 $78.8 \pm 4.5 \mu\text{M}$ (mean \pm SEM, $n = 3$)로 산출되었다(Fig. 6). 억제상수인 K_i 치를 구하기 위해 BCH 0 및 100 μM 존재 하에서 $[^{14}\text{C}]$ L-leucine 3, 10, 30, 100, 300 및 1000 μM 의 uptake를 수행하였다. K_i 치는 $90.9 \pm 7.9 \mu\text{M}$ (mean \pm SEM,

$n = 3$)로 산출되었고(Fig. 7), 그 숫치가 IC_{50} 치와 매우 유사함을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 7의 분석으로 L-leucine과 BCH가 동일한 수송체를 이용하여 Saos2 세포 내로 이동을 하며, 서로 경쟁적 억제제로 작용하고 있음을 확인할 수 있었다.

4. Saos2 세포에서 여러 아미노산들에 의한 [¹⁴C]-leucine uptake의 억제

Saos2 세포에서 [¹⁴C]-leucine의 수송과 다른 아미노산들과의 상호작용을 조사하기 위하여 30 μM [¹⁴C]-leucine의 uptake를 방사선이 표지되지 않은 아미노산들의 존재 하(3 mM)에서 측정하였다. Saos2 세포에서 [¹⁴C]-leucine의 uptake는 methionine, leucine, isoleucine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, histidine 및 BCH에 의해서는 완전히 억제되었으며, serine, threonine, cysteine, asparagine 및 glutamine에 의해서는 약간 억제되는 경향을 보였으나, glycine, alanine, aspartate, glutamate, lysine, arginine, proline 및 cystine에 의해서는 억제되지 않았다(Fig. 8).

5. Saos2 세포에서 세포성장에 영향을 미치는 BCH의 효과

Saos2 세포에서 BCH에 의한 세포성장 억제효과를 조사하기 위하여 각 세포에 BCH를 투여한 후 MTT assay를 시행하였다. Saos2 세포에 BCH 3, 10, 20 및 50 mM의 다양한 농도를 1일부터 5일까지 처리한 결과, Saos2 세포의 성장 억제는 BCH 처리 시간에 의존적임을 확인 할 수 있었다(Fig. 9). BCH 3 및 10 mM 처리군에서는 BCH 처리 2일부터 통계적인 의의가 있었으며, 20 및 50 mM 처리군에서는 BCH 처리 1일부터 뚜렷한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었다(Fig. 9).

BCH 0, 0.3, 1, 3, 10, 20 및 50 mM의 다양한 농도로 5일 동안 세포에 투여한 후 MTT assay를 시행한 결과, BCH 0.3 mM 이하의 농도는 대조군과 비교 하였을 때 세포성장 억제정도의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 10). 그러나 BCH 1, 3, 10, 20 및 50 mM 처리군에서는 대조군과 비교하여 볼 때, 뚜렷한 세포성장 억제효과를 볼 수 있었으며(Fig. 10), 이 결과는 BCH에 의한 Saos2 세포의 성장억제가 시간과 농도에 의존적임을 시사한다.

IV. 고 찰

본 연구에서 Saos2 사람 골육종 세포를 이용하여 아미노산 수송체 L의 발현 및 기능적 특성을 조사하였다. RT-PCR 기법을 이용한 아미노산 수송체 L의 mRNA 발현을 조사하는 실험을 통해 Saos2 세포에서 아미노산 수송체 L의 첫번째와 두번째 아형인 LAT1, LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc mRNA 발현을 관찰 할 수 있었으나, LAT2가 매우 약하게 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1). Saos2 세포의 단백을 이용한 western blot analysis에서도 LAT1과 그 보조인자 4F2hc 단백질의 발현은 뚜렷이 확인할 수 있었지만, LAT2 단백질의 발현은 매우 약하였다(Fig. 2). 이 실험결과는 T24 사람 방광암 세포²³⁾와 Hep2 사람 후두암 세포²⁶⁾에서 LAT1과 4F2hc는 발현을 하지만 LAT2는 발현하지 않는다는 것을 확인한 다른 문헌들의 결과와 거의 유사하였다. 따라서 Saos2 세포를 이용한 본 실험에서의 결과와 T24²³⁾ 및 Hep2²⁶⁾ 세포를 이용한 이전 문헌에서의 결과 및 LAT1이 종양세포에서 과발현되고 세포의 계속되는 성장에 중요한 역할을 한다고

보고한 이전 문헌들^{8,9,15,16)}의 결과를 같이 고찰하여 볼 때, Saos2 세포에서 중성아미노산의 수송에는 아미노산 수송체 L 중에서 LAT1이 중요한 역할을 할 것이라는 것을 예상할 수 있다. 그러나 T24²³⁾ 및 Hep2²⁶⁾ 세포에서의 결과들과는 달리 Saos2 세포에서는 LAT2의 약한 발현이 확인되었다. 따라서 Saos2 세포에서 중성아미노산을 수송하는 주된 아미노산 수송체가 무엇인지를 확인하기 위하여, 중성아미노산 중에서 실험적으로 가장 많이 이용되는 L-leucine의 uptake 실험을 시행하였다.

Saos2 세포에서 L-leucine의 uptake는 Na⁺-비의존적이었으며, 아미노산 수송체 L의 선택적 차단제인 BCH^{8-10,17-19)}에 의해 완전히 차단되었다(Fig. 3). BCH는 아미노산 구조를 가진 화합물로서 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제이며^{8-10,17-19)}, 중성과 염기성 아미노산을 수송하는 Na⁺-의존적 아미노산 수송체 ATB⁰⁺(amino acid transporter B⁰⁺)의 약한 차단제이다²³⁾. 그러나 Na⁺이 존재하지 않는 조건에서 BCH는 아미노산 수송체 L만을 선택적으로 차단한다. 따라서 Saos2 세포에서 L-leucine의 수송에는 아미노산 수송체 L이 중요한 기능을 하고 있다고 할 수 있다.

Saos2 세포에서 L-leucine uptake의 시간경과를 결정하기 위하여, 배양시간 0.5 - 20분에서 [¹⁴C]-leucine uptake를 시행한 결과, L-leucine의 uptake는 배양시간에 의존적이었고 배양시간 2.5분까지 직선을 유지하였으며, 배양시간 5분에 최대에 이르러 배양시간 20분까지 유지되었다(Fig. 4). 따라서 이 연구에서는 아미노산 수송이 직선을 유지하는 배양시간 2.5분 이내에서 실험이 가장 용이한 1분을 배양시간으로 선택하여 실험을 수행하였다.

아미노산 수송체의 수송 특성에 관한 연구는 *Xenopus*라는 아프리카산 발톱개구리의 oocyte 내에 아미노산 수송체 cRNA를 미세 주입하여 발현된 단백질을 이용하여 주로 시행되어 왔었다. *Xenopus* oocyte가 손상을 입기 쉬워 다양한 화학물질의 실험이 어렵고 시간과 금전적으로 많은 손실을 동반한다는 단점이 있지만, 포유동물 세포들과는 달리 내재성 아미노산 수송체의 발현이 극단적으로 미약하여 미세주입한 아미노산 수송체만의 수송특성을 확인할 수 있다는 큰 장점이 있다. Saos2 세포에서 L-leucine의 uptake는 포화되었으며 Michaelis-Menten kinetics에 의한 *K_m* 치가 약 76.3 μM(Fig. 5)이었다. 이전 문헌들의 *Xenopus* oocyte expression system 방법에 의한 *Xenopus* oocyte에서 human LAT1⁹⁾과 human LAT2¹⁸⁾의 cRNA를 미세 주입하여 얻은 L-leucine uptake의 *K_m* 치는 각각 약 19 μM과 220 μM이었다. 그리고 LAT2는 발현하지 않고 LAT1만 특이적으로 발현하는 T24 사람 방광암 세포²³⁾와 Hep2 사람 후두암 세포²⁶⁾에서 L-leucine uptake의 *K_m* 치는 각각 약 100 μM과 56 μM이었다. 본 연구에서 Saos2 세포에 의한 L-leucine uptake의 *K_m* 치 약 76.3 μM은 LAT1만 발현하는 암세포들인 T24 세포²³⁾와 Hep2 세포²⁶⁾에서의 *K_m* 치와 매우 유사한 결과임을 알 수 있다. 또한 *Xenopus* oocyte에서 얻은 human LAT1⁹⁾과 human LAT2¹⁸⁾의 L-leucine uptake의 *K_m* 치와 비교하여 보았을 때, LAT2보다는 LAT1에 더 가까운 것을 알 수 있다. 본 논문의 Saos2 세포에서 L-leucine

uptake의 K_m 치가 T24 세포 및 Hep2에서의 K_m 치와는 매우 유사하지만, *Xenopus oocyte*에서 human LAT1의 K_m 치와는 경미한 차이를 보이는 것은 세포의 종류 등 실험조건이 다른 데에서 기인하는 차이로 생각된다. 그러나 Saos2 세포에서 L-leucine uptake의 K_m 치를 이전 논문들^{9,18,23,26}에서의 결과와 비교하여 보았을 때, Saos2 세포에서 L-leucine을 포함한 중성아미노산의 수송에는 아미노산 수송체 L 중에서 LAT1이 중요한 역할을 하고 있다고 말할 수 있다.

Saos2 세포에서 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH는 L-leucine uptake를 농도 의존적으로 억제하였고, 그 IC_{50} 치는 약 78.8 μ M(Fig. 6)이었으며 K_i 치는 약 90.9 μ M(Fig. 7)로 산출되었다. Saos2 세포에서의 이 결과들은 LAT1만 특이적으로 발현하는 T24 세포에서의 결과($IC_{50} = 131 \mu$ M, $K_i = 156 \mu$ M)²³보다 더 LAT1의 특성과 유사하였다. 또한 이 연구의 결과로 Saos2 세포에서 BCH가 중성아미노산인 L-leucine과 동일한 수송체를 이용하여 세포 내로 이동을 하며, 서로 경쟁적인 억제제로 작용을 하고 있음을 확인할 수 있었다.

Saos2 세포에서 아미노산들에 의한 L-leucine uptake의 억제 실험 결과(Fig. 8)는 *Xenopus oocyte*를 이용한 human LAT1⁹, rat LAT¹⁸, T24 세포²³ 및 Hep2 세포²⁶에서의 결과와 매우 유사하였다. 본 연구의 Saos2 세포에서 여러 아미노산들에 의한 [¹⁴C]L-leucine uptake의 억제 경향, 아미노산 수송체의 발현을 확인한 실험결과와 이전의 문헌들인 T24 세포²³ 및 Hep2 세포²⁶에서의 실험결과를 같이 고찰하여 볼 때, Saos2 세포에서 L-leucine의 수송은 아미노산 수송체 L 중에서 LAT1에 의해 이루어지고 있는 것으로 사료된다. 특히 Saos2 세포에서 L-leucine uptake에 대한 K_m 치가 *Xenopus oocyte*에서 얻은 human LAT1⁹의 K_m 치와 T24 세포의 결과보다 더 유사한 결과는 Saos2 세포가 LAT1의 특성을 연구하는데 하나의 좋은 실험계가 될 수 있다는 것을 시사하고 있다.

세포성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 실험에서 BCH는 시간과 농도에 의존적으로 Saos2 세포의 성장을 억제시켰다(Fig. 9, 10). 이는 시간과 농도에 의존적으로 종양세포 성장을 억제 시키는 항암효과를 지닌 여러 화합물들(pingyang-mycine, norcantharidin)에서의 연구결과^{27,28}와 일치하는 것이었다. Saos2 세포에서는 아미노산 수송체 L 중에서 LAT1과 LAT2가 모두 존재하지만, 그 발현정도나 L-leucine 수송특성을 조사하여 보았을 때 LAT1이 중요한 기능을 하고 있을 것으로 사료된다. Saos2 세포에서 BCH는 중성아미노산인 L-leucine과 동일한 수송체 LAT1을 이용하여 세포 내로 이동을 하고 서로 경쟁적인 억제제로 작용을 하고 있으며, 또 BCH는 시간과 농도에 의존적으로 Saos2 세포의 성장을 억제시켰다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, Saos2 세포에서 BCH에 의한 세포성장 억제는 중성아미노산을 수송하는 LAT1에 BCH와 중성아미노산들이 경쟁적으로 작용하여 세포성장에 필수적인 필수아미노산을 다수 포함하는 중성아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 Saos2 세포성장의 억제를 유도하는 것으로 사료된다.

Saos2 세포에서 아미노산 수송체 LAT1의 발현과 LAT1에 의

해 유도되는 L-leucine 수송특성에 대해 고찰하였다. 또 Saos2 세포가 LAT1의 특성을 연구하기 위한 사람세포 실험계가 될 수 있다는 것을 제안하였다. LAT1이 계속되는 성장과 분화의 특성을 지닌 종양세포에서 과발현되는 특성을 가지고 있고^{8,9,15,16}, 또 LAT1이 수송할 수 있는 아미노산 기질이 대부분의 필수아미노산을 포함한 중성아미노산이므로^{8,10}, Saos2 세포에서 LAT1의 억제제는 골육종 세포의 성장억제에 관한 또 하나의 이론적 근거를 제시할 수 있을 것으로 생각되며, Saos2 세포는 이들 LAT1의 억제를 위한 많은 화합물을 조사하는데 매우 유용하게 사용될 수 있으리라 사료된다.

결론적으로, 본 연구의 결과로서 사람의 골육종 세포주인 Saos2 세포에서 중성아미노산 수송체 L인 LAT1, LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc의 발현을 확인하였으며, 수송체 L 중에서 주로 LAT1을 통해 L-leucine을 포함한 중성아미노산의 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 BCH는 Saos2 세포에서 높게 발현하는 LAT1을 차단하여 세포성장에 필수적인 L-leucine 등 중성아미노산들의 수송억제를 유도하여 세포 성장을 억제함을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과로 LAT1의 연구에 Saos2 세포 유용성의 제시 및 이 LAT1의 억제제를 이용하여 골육종 세포의 성장 억제에 관한 또 하나의 방향성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

Saos2 사람 골육종 세포에서 아미노산 수송체 L의 발현 및 이들 수송체 L을 통한 아미노산 수송특성을 밝히기 위하여, Saos2 세포에서 RT-PCR, western blot analysis, uptake 실험 및 MTT 분석을 시행하여 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. Saos2 세포에서 LAT1, LAT2 및 그들의 보조인자 4F2hc의 발현을 관찰할 수 있었으나, LAT2의 발현이 매우 미약함을 확인하였다.
2. Saos2 세포에서 L-leucine 수송은 Na⁺-비의존적이었다.
3. Saos2 세포에서 L-leucine 수송은 아미노산 수송체 L의 선택적 억제제인 BCH에 의해 완전히 차단되었다.
4. Saos2 세포에서 [¹⁴C]L-leucine의 수송친화력은 *Xenopus oocyte*에서 시행한 LAT1의 수송친화력과 유사하였다.
5. Saos2 세포에서 아미노산들에 의한 [¹⁴C]L-leucine의 수송억제는 *Xenopus oocyte*에서 시행한 LAT1의 실험결과와 유사하였다.
6. BCH는 시간과 농도에 의존적으로 Saos2 세포의 성장을 억제시켰다.

본 연구의 결과로서 사람의 골육종 세포주인 Saos2 세포에서 중성아미노산 수송체 L 중에서 주로 LAT1을 통해 L-leucine을 포함한 중성아미노산의 수송이 이루어지고 있다는 것을 확인할 수 있었으며, BCH는 이 LAT1을 차단하여 중성아미노산들의 세포 내 고갈을 유도함으로써 Saos2 세포성장의 억제를 유도하는 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과로 LAT1의 연구에 Saos2 세포 유용성의 제시 및 이 LAT1의 억제제를 이용하여

골육종 세포의 성장 억제에 관한 또 하나의 방향성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Christensen HN: Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol Rev* 1990;70:43-77.
- Silbernagl S: Renal transport of amino acids. *Klin Wochenschr* 1979;57:1009-1019.
- 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* 1999;829:143-150.
- 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* 1979;254:1057-1064.
- 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* 1993;60:1407-1413.
- 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* 1995;64:2125-2131.
- 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* 1990;126:3245-3250.
- 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* 1998;273:23629-23632.
- Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, Kim DK, Segawa H, Nii T, et al: Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2001;1514:291-302.
- Uchino H, Kanai Y, Kim DK, Wempe MF, Chairoungdua A, Morimoto E, et al: Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanism of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 2002;61:729-737.
- Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, et al: Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 1998;395:288-291.
- 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* 1998;439:157-162.
- 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* 1998;273:33127-33129.
- Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et al: 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* 1999;274:3009-3016.
- 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* 1995;55:1152-1159.
- 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* 1996;56:5012-5022.
- Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC: Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 2000;440:503-512.
- Pineda M, Fernandez E, Torrents D, Estevez R, Lopez C, Camps M, et al: 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 acids. *J Biol Chem* 1999;274:19738-19744.
- 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* 1999;274:19745-19751.
- Rossier G, Meier C, Bauch C, Summa V, Sordat B, Verrey F, et al: LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 1999;274:34948-34954.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y: Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem* 1996;271:14883-14890.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y: Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 1997;416:312-316.
- Kim DK, Kanai Y, Choi HW, Tangtrongsup S, Chairoungdua A, Babu E, et al: Characterization of the system L amino acid transporter in T24 human bladder carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1565:112-121.
- Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H: Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 2001;276:17221-17228.
- Kim DK, Kanai Y, Masuo H, Kim JY, Chairoungdua A, Kobayashi Y, et al: The human T-type amino acid transporter-1, characterization, gene organization and chromosomal location. *Genomics* 2002;79:95-103.
- Kim DK, Yoon JH, Jeon JE, Lee SH: Expression and functional characterization of neutral amino acid transporter in Hep2 human head and neck squamous cell Carcinoma. *Int J Oral Biol* 2004;29:51-58.
- Tai KW, Chou MY, Hu CC, Yang JJ, Chang YC: Induction of apoptosis in KB cells by pingyangmycin. *Oral Oncol* 2000;36:242-247.
- Kok SH, Hong CY, Kuo MY, Lee CH, Lee JJ, Lou Iu, et al: Comparison of norcantharidin cytotoxic effects on oral cancer cells and normal buccal keratinocytes. *Oral Oncol* 2003;39:19-26.