

비정상적인 세포증식이 유도된 혈관 내피세포에서 Protein Kinase C에 대한 활성 분석

배용찬 · 박숙영 · 남수봉 · 문재술 · 최수종

부산대학교 의과대학 성형외과학교실

Activity of Protein Kinase C in Abnormally Proliferated Vascular Endothelial Cells

Yong Chan Bae, M.D., Suk Young Park, M.S.,
Su Bong Nam, M.D., Jae Sul Moon, M.D.,
Su Jong Choi, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Purpose: To understand the pathogenesis of the disease that presents abnormally proliferated vascular endothelial cells, a model of DMH(1,2-dimethylhydrazine)-induced abnormal proliferation of HUVECs(Human Umbilical Vein Endothelial Cells) was made. We indirectly determined that Protein Kinase C(PKC) restricts the cellular proliferation and inhibits the manifestation of growth factor by using several inhibiting substances of the transmitter through our previous studies. Thereupon, we attempted to observe direct enzymatic activities of PKC and its correlation with the abnormal proliferation of vascular endothelial cells.

Methods: 10^5 HUVECs cells were applied to 6 individual well plates in three different groups; A control group cultured without treatment, a group concentrated with 0.75×10^{-8} M DMH only, and a group treated with DMH & 5×10^{-9} M Calphostin C, inhibitor of PKC. In analyzing the formation of intracellular PKC enzyme, protein separation was performed, and separated protein was quantitatively measured. PKC enzyme reaction was analyzed through Protein Kinase C Assay System (Promega, USA), and the results were analyzed according to Beer's law.

Results: Enzymatic activity of PKC presented the

highest in all reaction time of a group concentrated only with DMH, and the lowest in the control group. The group treated with DMH and the inhibitor revealed statistically lower enzymatic activity than group only with DMH in all reaction time, although higher than the control group.

Conclusion: From the enzymatic aspect, most active and immediate reaction of the PKC was observed in the group concentrated with DMH only. The group treated with DMH & PKC inhibitor showed meaningful decrease. Accordingly, PKC holds a significant role in DMH-induced abnormal proliferation of vascular endothelial cells.

Key Words: Proliferation, Protein Kinase C, Vascular endothelial cells

I. 서 론

혈관형성(angiogenesis)의 기전은 수많은 질환의 발생에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 혈관형성 및 신생(neoangiogenesis)의 과정에 대한 연구결과는 이들 질환의 새로운 치료적 접근법으로 이용되어질 수 있다. 성형외과 영역에서는 혈관형성과 관련된 중요한 질환인 혈관종(hemangioma)에 대해서 많은 연구가 이루어져 왔는데, 혈관종은 자가조절의 기능을 가지고 있어 이에 대한 연구가 혈관 생성과 소멸에 대한 많은 정보를 제공할 것이라고 기대되지만 아직 정확한 기전이 밝혀져 있지 않은 상태이다.^{1,2} 이에 저자들은 혈관 내피세포의 비정상적인 증식이 나타나는 질환에 대한 발생과정을 이해하기 위해, 이전 기초 연구에서 DMH(1,2-dimethylhydrazine)에 의한 인체 제대정맥 내피세포(HUVECs)의 비정상적인 증식 모델을 만들었고,³ 비정상적인 증식 과정에서 발현되는 성장 인자들을 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 통해 확인하였다.⁴ 이들 결과를 토대로 비정상적인 세포증식과 깊은 연관성을 가진 신호전달과정을 예측해 보기 위해, 여러 가지 신호전달물질에 대한 저해제를 이용한 실험에서 protein kinase C(PKC)가 비정상적인 증식 과정에서 가장 연관성이 높음을 간접적으로 알 수 있었다.⁵ 이에 이러한 간접적인 결과에 대해서 PKC에 대한 효

Received June 21, 2006
Revised August 18, 2006

Address Correspondence: Yong Chan Bae, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Pusan National University, 1-10 Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea. Tel: (051) 240-7269 / Fax: (051) 243-9405 / E-mail: bayc2@hanmail.net

* 본 논문은 2006년 제 60차 대한성형외과학회 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

* 본 논문은 2005년도 부산대학교 의학연구소 연구비(2005-24)의 지원으로 이루어졌음.

소화적인 접근을 통해 PKC의 활성을 직접 살펴봄으로써, DMH에 의한 HUVECs의 비정상적인 증식 과정에서 PKC가 중요한 역할을 하는지 확인해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

가. 세포주 배양 및 약물처리

혈관 내피세포의 세포주는 'Modern Tissue Technologies, Inc.(MCTT, Seoul, Korea)'로부터 분양받은 인체 제대정맥 내피세포를 이용하였고, 제대배양 횟수는 본 실험에서 8회를 넘기지 않았다. 세포는 5% CO₂, 37°C 조건의 가습된 배양기에서 배양하였다.

HUVECs를 6 well plate에 각 well 당 10⁵개씩 분주하고, EBM 완전배지[Endothelial cell basal medium, 0.1% hEGF(human epidermal growth factor), 0.1% hydrocortisone, 0.1% GA-1000, 0.4% BBE(bovine brain extract), 2% FBS(fetal bovine serum)]로 1일 배양하고, 2일째는 무혈청 배지로 교체하여 1일간 배양하였다. 이 후 아무런 처리를 추가하지 않고 배양된 인체 제대정맥 내피세포군을 대조군으로 삼았으며, 3일째 DMH를 0.75 × 10⁻⁸ M 농도로 처리하여 인체 제대정맥 내피세포군의 과증식을 유도한 군을 DMH 처리군, 같은 시기에 protein kinase C (PKC)의 저해제인 calphostin C를 5 × 10⁻⁹ M 농도로 DMH 0.75 × 10⁻⁸ M과 동시 처리한 군을 저해제 처리군으로 삼아 서로 비교하였다.

나. 단백질 추출과정

세포 내 PKC의 효소의 생성정도를 분석하기 위하여 단백질 분리를 다음과 같은 과정으로 실시하였으며, 모든 과정은 4°C 이하에서 시행하였다.

배양세포를 HBSS(Hank's Balanced Salt Solution)로 세척하고 깨끗이 제거한 후, PKC extraction buffer[25 mM Tris-HCl(pH 7.4), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.05% Triton[®] X-100, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml aprotinin, 0.5% PMSF stock solution (100 mM PMSF in 100% Ethanol)]를 넣고 세포와 잘 섞었다. 세포내용물이 포함된 용액을 1.5 ml tube로 옮겨 담아 homogenizer를 이용하여 세포를 아주 잘게 분쇄하였고, 이 후에 14,000 g에서 5분간 4°C를 유지하면서 원심분리하였다. 상층액을 diethylaminoethyl cellulose column에 통과시킨 후, PKC extraction buffer를 column에 흘려주면서 세척하였다. PKC extraction buffer-NaCl을 column에 넣고, column 안으로 흘러나오는 용액을 1.5 ml tube에 담은 후, 분리한 단백질은 -70°C하에 보관하였다.

다. 단백질 정량

분리한 단백질은 BCA(Bicinchoninic acid) protein assay 방법을 이용하여 정량하였다.⁶ BCA protein assay reagent A, B(A;#23228, B;#1859078, PIERCE, NY, USA)를 1:1 비율 만든 혼합액을 단백질 시료와 잘 섞어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, spectrophotometer(Pharmacia biotech, England)를 이용하여 흡광도 562 nm에서 단백질 양에 따른 흡광도를 통해 정량을 확인하였는데, 이때 BSA(Bovine Serum Albumin)를 이용하여 정량 분석에 사용된 시약에 대한 standard 곡선은 99%의 정확도를 보였다(Fig. 1).

라. PKC 효소반응 분석

분리한 단백질은 protein kinase C assay system (#V5330, Promega, Madison, USA)을 이용하여 효소반응을 살펴보았다. 효소반응을 비교하기 위하여, PKC negative control에는 PKC activator 5 × buffer, Pep Tag[®] PKC reaction 5 × buffer, Pep Tag[®] C1 peptide, peptide protection solution을 혼합하였고, PKC positive control에는 negative control의 4가지와 정제된 PKC를 혼합하였으며, PKC standard에는 위와 동일한 4가지와 세포에서 분리한 동일한 양의 단백질 시료를 혼합하여 3가지의 분석 시료를 만들었다. 3가지 시료를 30°C에서 30분간 반응시켰고, 95°C에서 10분간 두어 효소 반응을 정지시켰다. 반응을 마친 시료에 80% glycerol를 첨가한 뒤 50 mM Tris-HCl로 만든 0.8% agarose gel에서 100V로 15분간 전기영동하였다. 이때 인산화된 PKC는 '+'극으로 이동하고 비인산화된 PKC는 '-'극으로 이동하여 두 개의 밴드가 나타났다(Fig. 2).

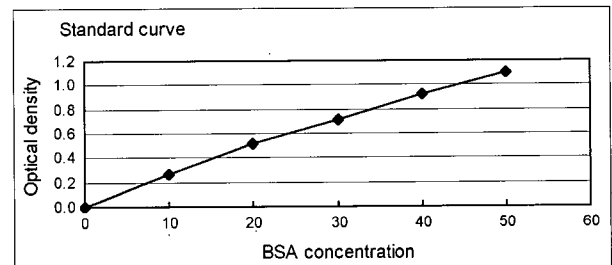


Fig. 1. Standard curve of reagent for quantitative analysis. BSA: Bovine Serum Albumin

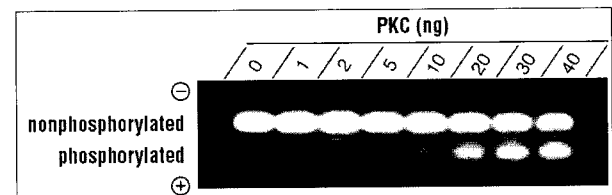


Fig. 2. The results of electrophoresis after the phosphorylation of PKC.

효소반응을 통해 인산화반응이 일어난 단백질이 포함된 gel만을 분리하여 1.5 ml tube에 담고 gel solubilization solution을 첨가하여 95°C에서 gel이 완벽하게 녹을 때까지 둔 후, 녹은 용액의 일부를 덜어 gel solubilization solution 과 glacial acetic acid가 들어있는 1.5 ml tube에 넣고 잘 섞고 96 well plate로 옮겨 담아서, scanning multi well spectrophotometer(ELISA reader, Molecular Devices, USA)를 사용하여 570 nm의 파장에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다.

마. PKC 효소활성 계산법

효소반응 실험에서 얻은 3가지 시료에 대해 흡광도를 이용하여 Beer's 법칙에 따라 계산하였다.⁷ Beer's 법칙은 다음과 같으며,

$$A = \epsilon BC$$

$$\epsilon = A/BC$$

$$C = A/\epsilon B$$

$$\text{Peptide MW} = 1,684 (\therefore 2 \mu\text{g peptide} = 1.187 \text{ nmol})$$

ϵ = The molar absorptivity of the peptide in $\ell / \text{mol} \cdot \text{cm}^{-1}$

A = Absorbance of the sample

B = The width of the light cell = 0.7

C = The concentration of the peptide in mol/ ℓ of the sample read

$$= (\text{number of mol}) \div (\text{volume in } \ell) = (1.187 \times 10^{-9} \text{ mol}) \div (5 \times 10^{-4} \ell) = 2.374 \times 10^6 \text{ mol} / \ell$$

위 수식을 이용하여 아래와 같이 계산하였다.

$$\epsilon = (\text{Negative control } A_{570} \times 2) / (0.7 \times 2.374 \times 10^6)$$

$$C_p = \text{positive control } A_{570} / (\epsilon \times 0.7), C_s = \text{standard } A_{570} / (\epsilon \times 0.7)$$

$$N_p = C_p \times 5 \times 10^4, N_s = C_s \times 5 \times 10^4$$

$$T_p = N_p / 30, T_s = N_s / 30 (\text{pmol} / \text{min.})$$

$$\text{Activity}(p) = T_p / \text{sample vol.}, \text{Activity}(s) = T_s / \text{sample vol.} (\text{unit} / \text{ml})$$

바. 통계 처리 및 검정

모든 실험 과정은 9회 반복하였으며, 0, 4, 8, 12, 24 시간별로 대조군, DMH 처리군 및 저해제 처리군과의 비교 결과는 Tukey test를 사용하여 통계적으로 분석하였고, $p < 0.001$ 의 경우에 한하여 통계적 유의성을 부여하였다.

III. 결 과

인체 제대정맥 내피세포에 DMH를 이용하여 인위적인

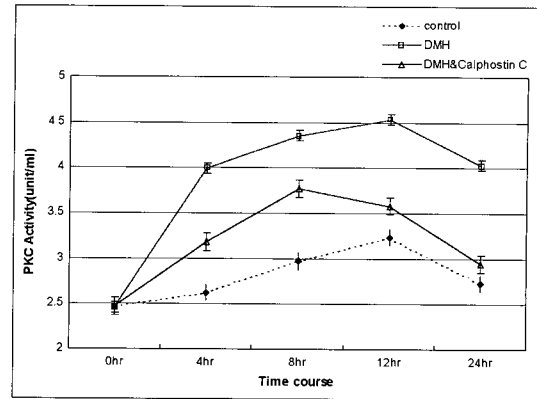


Fig. 3. The activity of PKC depending on time in three groups: control, DMH, DMH & calphostin C group.

비정상 세포증식을 유도하였고, 세포증식과 관련된 신호 전달물질인 PKC의 저해제를 함께 처리하여, 대조군과 처리군 세포에서 단백질을 추출하고 정량 분석한 후 효소의 활성을 산출하였다(Fig. 3).

대조군의 시간에 따른 PKC의 활성 변화는 처리시간인 0시부터 처리 후 12시간까지 PKC 활성이 완만히 증가하다가 그 이후부터 24시간까지 감소하였다. DMH 처리군의 PKC 활성 변화는 처리 후 4시간까지 급격한 증가를 보이며 처리 후 12시간까지 활성이 증가하다가, 처리 후 24시간에서는 감소하는 양상을 보였다. 저해제 처리군에서는 PKC 활성 변화가 처리 후 8시간까지 증가하였으나 이후 감소하는 것을 알 수 있었다.

PKC의 활성은 처리 후 모든 시간대에 DMH 처리군에서 가장 높았고, 대조군에서 가장 낮았다. 저해제 처리군은 DMH 단독 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았고, 대조군에 비해서는 높게 나타났으나 처리 12시간 이후에는 대조군에 가까운 결과를 보였다.

IV. 고 찰

여러 생리적 혹은 병적인 상황에서 혈관의 생성은 아주 중요한 과정이며 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있고, 성형외과 영역에서는 혈관종과 같은 혈관 기형 등의 질환에 대한 치료적 접근을 위해서 새로운 혈관 형성의 기전을 이해할 필요가 있다.^{1,2} 저자들은 혈관 종양과 같이 비정상적인 혈관 증식에 대한 연구가 혈관생성 기전의 알아보는 데 더욱 유리할 것이라 생각하게 되어 먼저 동물실험에서 혈관종양을 유발한다고 알려진 DMH(1,2-dimethylhydrazine)를 이용하여 실험적인 체외 모델(*in vitro*)을 만들었다.³ 이를 토대로 DMH에 의해 비정상적으로 증식이 유발된 혈관 내피세포에서 차등적으로 발현되는 인자들을

DNA microarray 방법을 이용하여 확인하였으며, 이들 인자들에 대해서 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 통해 시간에 따른 발현 양상을 분석하여 비정상적인 증식 기전의 설명을 위한 기초적인 자료를 얻을 수 있었다.⁴ 이러한 이전 실험결과를 바탕으로 혈관 형성 기전을 알아보기 위해, 신호전달과정(signal transduction pathway)에서 중요한 매개분자로 주목받고 있는 3가지 효소, protein tyrosine kinase(PTK), protein kinase C(PKC), oxidase에 대해 각각의 저해제를 사용하여 DMH에 의해 유도되는 비정상적인 세포증식과정에서 세포의 성장률을 통한 저해 정도를 알아 본 결과, PKC의 저해제인 calphostin C를 동시 처리한 군에서 가장 의미 있게 저해 효과가 높게 나타났다(Fig. 4).⁵ 이것은 PKC와 관련된 신호 전달 과정이 비정상적인 세포증식과 가장 깊은 연관을 가진 것으로 예측할 수 있었다. 그러나 이러한 결과는 각각의 신호전달물질들의 저해제 처리에 따른 세포 성장률을 대조군과 비교함으로써 세포증식의 연관성을 간접적으로 확인해 본 것으로, PKC 자체의 양적 변화나 활성화 정도를 직접 확인한 것은 아니었다. 따라서 DMH에 의해 유도되는 비정상적인 세포증식과정에 대해서 PKC의 직접적인 관련성을 확인할 필요가 있어 효소학적인 측면에서 PKC의 활성화 정도를 검토하게 되었다.

PKC는 세포 성장이나 분화 과정에서 중요한 조절 인자로서 여러 가지 작용 과정 등이 알려져 있으며, 다양한 isoform을 가지고 있어 그 기능이 아직까지 완전히 밝혀져 있지 않다.^{8,9} 예를 들어 각막 내피세포의 분화에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고,¹⁰ 여러 가지 종양세포에서도 다양한 역할들이 관찰되고 있다.¹¹ 이전의 실험결과에서 PKC의 역할이 비정상적인 세포증식과 깊은 연관이 있을 것임을 간접적으로 확인할 수 있었던 것도 같은 맥락으로 사료된다.

이전 연구와 마찬가지로 인체 제대정맥 내피세포와 DMH를 이용하여, 세 가지 군으로 나눠 단백질 추출 과정

을 거친 후 BCA(Bicinchoninic acid) protein assay 방법으로 정량을 하였는데, 이는 Pierce 방식이라고도 한다. 샘플 내에 있는 단백질 양을 측정하고자 할 때 주로 쓰는 방법으로, 단백질이 구리 이온(Cu^{2+} , Cu^{1+})을 환원(reduction)시킬 수 있는 성질을 이용한 것이다. 이렇게 정량화된 PKC는 활성이 있는 것과 없는 것을 모두 합친 양이며, 정상적인 혈관 내피세포에서도 PKC는 존재하므로, DMH에 의해서 비정상적으로 높게 활성화된 PKC의 정도를 알아보기 위해 protein kinase C assay system(Promega, USA)을 이용하였다. 이것은 PKC가 없는 시료와 PKC가 있는 시료, 그리고 알아보고자 하는 시료를 전기 영동하여 활성화된 PKC 부분만을 ELISA를 이용하여 흡광도를 측정하고, 이미 알려진 Beer's 법칙을 이용하여 활성화된 PKC의 정도를 알 수 있었다.

DMH에 의해 혈관 내피세포의 비정상적인 증식이 유도된 경우 모든 시간대에서 PKC의 활성화 정도가 가장 높게 나타났으며, 특히 처음 4시간까지 급격히 증가하는 것을 보였다. 그리고 calphostin C에 의해 저해된 경우 통계학적으로 유의하게 감소하는 것으로 봐서 비정상적인 증식과정에서 PKC의 역할이 중요함을 알 수 있었다. 이는 이전 연구에서 calphostin C 처리군에서 세포 성장률이 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 가장 유사하게 나타났었던 결과를 뒷받침하는 것으로 볼 수 있었다. 다만 저해제 처리군에서 세포 성장률은 대조군과 거의 일치하였으나 PKC의 활성화 정도는 대조군보다 높게 나타났는데, 세포 성장률은 DMH에 의한 많은 물질들의 상호작용으로 인해 나타난 결과이고, PKC 활성화도는 각 시간대의 PKC의 순수 활성화 정도를 측정한 것이기 때문이다. 따라서 저해제에 의한 PKC의 활성화 정도가 세포 성장률과는 일치하지 않았으나 DMH 단독 처리군보다 통계학적으로 유의하게 낮으면서 처리 후 8시간 이후부터 PKC 활성화가 급격히 감소함을 볼 수 있었으므로 PKC가 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

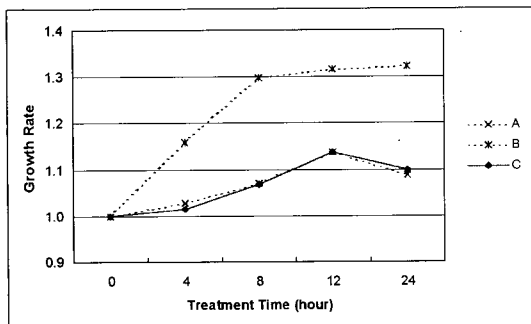


Fig. 4. Measured growth rate depending on time after treatment with DMH and inhibitors of growth factors. (A: control group, B: 10^{-1} ng/ml DMH, C: DMH and Calphostin C)

V. 결론

혈관 내피세포의 비정상적인 증식의 원인으로 나타나는 질환에 대한 발생 과정을 이해하기 위해 DMH를 사용한 'in vitro' 모델을 이용하여 효소학적인 면에서 PKC의 활성을 직접 살펴보았다. 그 결과, PKC의 활성화는 대조군보다 DMH 처리군에서 높았으며, DMH처리군보다 저해제 처리군에서 낮았다. 이것은 DMH에 의해 유도된 'in vitro' 모델에서 PKC는 비정상적인 혈관 내피 세포증식의 신호전달 초기단계에서 즉각적인 반응을 일으켜 세포 내로 신호를 전달하여 세포의 성장과 관련한 물질의 발현, 생성에

영향을 미치는 등의 비정상적인 세포증식 과정에 있어서 큰 비중을 차지하는 물질일 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Gampper TJ, Morgan RF: Vascular anomaly: hemangiomas. *Plast Reconstr Surg* 110: 572, 2002
2. Mulliken JB, Glowacki J: Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* 69: 412, 1982
3. Kim HO, Kang YS, Bae YC, Park SY, Hwang SM, Nam SB: Gene expression profiling of 1,2-Dimethylhydrazine-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 858, 2004
4. Kim SH, Kang YS, Bae YC, Park SY, Nam SB: RT-PCR of up-regulated factors in abnormally proliferated vascular endothelial cells by 1,2-Dimethylhydrazine. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 689, 2005
5. Bae YC, Park SY, Nam SB, Herh JY, Kang YS: A study for the mechanism of abnormal proliferation in vascular endothelial cells using inhibitors to the signal transduction pathway. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 33: 5, 2006
6. Turner P, Coombes AG, Al-Rubeai M: Measuring the heterogeneity of protein loading in PLG microspheres using flow cytometry. *J Control Release* 96: 193, 2004
7. Terenji A, Willmann S, Osterholz J, Hering P, Schwarzmaier HJ: Measurement of the coagulation dynamics of bovine liver using the modified microscopic Beer-Lambert law. *Lasers Surg Med* 36: 365, 2005
8. Clemens MJ, Trayner I, Menaya J: The role of protein kinase C isoenzymes in regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 103: 881, 1992
9. Nishizuka Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular response. *FASEB J* 9: 484, 1995
10. Graham MA, Rawe I, Dartt DA, Joyce NC: Protein kinase C regulation of corneal endothelial cell proliferation and cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4124, 2000
11. Chabannes E, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Adessi G, Bittard H: Protein kinase C signalling pathway is involved in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in human bladder transitional carcinoma cells. *Cell Signal* 13: 585, 2001