

디메틸히드라진(1,2-Dimethylhydrazine)으로 유도된 혈관내피세포의 비정상적인 증식에서 단백활성효소 시이(Protein Kinase C)의 역할; 동종효소 분석

이진¹ · 배용찬² · 박숙영² · 문재술² · 남수봉²

이진 성형외과¹, 부산대학교 의과대학 성형외과학교실²

Role of Protein Kinase C in Abnormal Proliferation of Vascular Endothelial Cell induced by 1,2-Dimethylhydrazine; Analysis of Isoform

Jin Lee, M.D.¹, Yong Chan Bae, M.D.²,
Suk Young Park, M.S.², Jae Sul Moon, M.D.²,
Su Bong Nam, M.D.²

¹Lee Jin Aesthetic Clinic, Busan, Korea,

²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Purpose: Protein tyrosine kinase(PTK), protein kinase C(PKC), oxidase, as a mediator, have been known to take a role in signal transduction pathway of angiogenesis. The authors confirmed that PKC is the most noticeable mediator for abnormal proliferation of vascular endothelial cells through *in vitro* study model using the inhibitors, targeting the formation of three co-enzymes. In this study, we would investigate which isoform of PKC play an important role in abnormal angiogenesis of vascular endothelial cell.

Methods: In 96 well plates, 10⁴ HUVECs(human umbilical vein endothelial cells) were evenly distributed. Two groups were established; the control group without administration of DMH(1,2-dimethylhydrazine) and the DMH group with administration of 7.5 × 10⁻⁹M DMH. RNA was extracted from vascular endothelial cell of each group and expression of the PKC isoform was analyzed by RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) method.

Results: RT-PCR analysis showed that PKC α , - β I, - β II, - η , - μ and - ν were expressed in vascular endothelial cells of each group. DMH increased the expression of PKC α and PKC μ , and decreased PKC β I, PKC β II expression dominantly.

Received May 19, 2006

Revised September 7, 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: baeyc2@hanmail.net

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

Conclusion: Based on the result of this study, it was suggested that PKC α and PKC μ may have significant role in abnormal proliferation of vascular endothelial cell.

Key Words: Cell Proliferation, Protein Kinase C, Endothelial cells

I. 서론

혈관내피세포의 증식에 있어 중요한 단계 중 하나는 내피세포와 관련된 매개체, 즉 전달물질과 성장인자간의 상호작용으로 이루어지는 신호전달경로(signal transduction pathway)이다. 신호전달경로에서 중요한 역할을 수행하는 매개 효소들로는 단백티로신활성효소(protein tyrosine kinase), 단백활성효소 시이(protein kinase C) 및 각종 산화효소(oxidase) 등이 있으며 이러한 효소들의 작용이 관여하는 신호전달경로에 이상이 생기면 비정상적인 혈관증식이 유발될 수 있다고 알려져 있다.¹⁻⁴ 앞서 저자들은 1,2-디메틸히드라진(1,2-dimethylhydrazine) 처리에 의하여 비정상적으로 증식한 혈관내피세포를 대상으로 3가지 주요 신호전달물질인 단백티로신활성효소, 단백활성효소 시이, 산화효소의 저해제를 사용한 생체외(*in vitro*) 실험결과, 단백활성효소 시이의 역할이 가장 현저함을 확인한 바 있다.⁵

이러한 단백활성효소 시이는 11개의 동종효소(isoform)들로 구성되었다고 알려져 있고 이들은 각기 다른 효소학적 성질을 가지고 있으며 세포와 조직에 따라 다양하게 분포하며 각기 다른 생리적 역할을 수행한다고 밝혀져 있다.⁶

이에 저자는 디메틸히드라진에 의해 유도되는 사람탯줄 정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cells)의 과증식과 관련된 세포 내 단백활성효소 시이 동종효소들의 발현 변화를 역전효소-중합효소연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 통해 비교함으로써 혈관내피세포의 증식과 관련되어 있는 단백활성효소 시이 동종효소를 확인하여 비정상적인 세포증식과 연관된 신호전달과정의 이해를 돕고자 하였다.

II. 재료 및 방법

혈관내피세포의 세포주는 'Modern Tissue Technologies, Inc.'(Seoul, Korea)로부터 분양받은 사람땃줄정맥내피세포를 이용하였다. 사람땃줄정맥내피세포는 계대배양을 10회 이상 할 경우 세포의 변형이 일어날 수 있으므로, 본 실험에서는 8회를 넘기지 않았으며 세포는 5% CO₂, 37°C 조건의 가슴된 배양기에서 배양하였다.

96 well plate에 각 well 당 10⁴개로 사람땃줄정맥내피세포를 분주하고, 내피세포 바탕배지[Endothelial cell basal medium, 0.1% 사람표피성장인자(human epidermal growth factor), 0.1% 히드로코르티손(hydrocortisone), 0.1% 겐타마이신 황산염/암포테리신 비이(Gnetamicin sulfate/Amphotericin B-1000), 0.4% 소의 뇌추출물(bovine brain extract), 2% 소의 태아혈청(fetal bovine serum)]로 배양하고, 2일째는 무혈청 배지로 교체하여 1일간 배양하였다. 대조군으로는 3일째부터 아무런 처리를 추가하지 않고 배양된 세포를, 디메틸히드라진 처리군으로는 3일째에 디메틸히드라진을 처리하여 과증식을 유도한 세포를 사용하였다. 배양 3일째에 새로운 무혈청 배지로 교체하였으며 5개의 plate 중 2개의 plate에 디메틸히드라진을 7.5 × 10⁻⁹M 농도로 처리하였다.

디메틸히드라진을 처리한 시간대를 0시로 설정하고 처리 후 12시, 24시에서 역전이효소-중합효소연쇄반응에 이용할 알엔에이 시료를 채취하였다. 0시간대에서 plate 1개를 사용하였고, 처리 후 12시간대와 24시간대에서 대조군과 디메틸히드라진 처리군에 대한 plate를 각각 1개씩 사용하였다. 각 시간대에서 대조군과 디메틸히드라진 처리군의 세포를 0.25% 트립신-에틸렌디아민사아세트산(Trypsin-EDTA)을 처리하여 모은 후 RNeasy mini kit(Qiagen®)를 이용하여 알엔에이를 추출하였다. 두 군에서 단백질활성효소 시이 동종효소의 발현정도를 비교하고자 역전이효소-중합효소연쇄반응을 시행하였다.

가. 역전사효소(Reverse Transcriptase) 반응

각 동종효소에 대한 유전자를 증폭시키는 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)은 시이디엔에이(cDNA) 상태에서 반응이 진행되므로 추출한 대조군과 디메틸히드라진 처리군의 알엔에이를 시이디엔에이로 전환시키는 역전사 과정을 다음과 같이 실행하였다.

각각의 100 ng 알엔에이와 100 pmole oligo dT 시동체(primer)를 섞어서 65°C에서 5분간 반응시킨 후, 얼음 위에서 식혔다. 반응액을 RT premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)에 넣고 최종 부피 20 µl가 되도록 RNase가 포함되지 않은 물을 첨가한 뒤 잘 배합하여 42°C에서 60분이 경

과한 다음, 다시 94°C에서 5분간 반응시켰다. 역전사 반응을 마친 용액은 4°C에 보관하였다.

나. 단백질활성효소 시이 동종효소 시동체에 대한 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)

먼저 단백질활성효소 시이 동종효소 발현의 비교를 위하여 동종효소 11개에 대한 특수 시동체(specific primer)를 제작하였다(Table I). House keeping gene인 베타 액틴(β -actin)을 이용하여 각 시료의 시이디엔에이에 대한 동일량을 확인하였다. 베타 액틴의 감각 시동체(sense primer)는 5'-gactatgacttagttgctga, 항감각 시동체(antisense primer)는 5'-gcctcatatctcaagttg이다. 확인된 양의 시이디엔에이로 단백질활성효소 시이 동종효소에 대한 시동체를 사용하여 중합효소연쇄반응 premix(Bioneer Corp., Seoul, Korea)에 넣고 최종 부피 20 µl가 되도록 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 시동체가 첨가된 관은 94°C에서 5분 동안 반응시킨 뒤, 94°C(30초)-61°C(60초)-72°C(60초) 과정을 21번 반복하고, 72°C에서 5분간 반응을 완료하였다.

Table I. Specific Primer's Sequences of PKC Isoform

Name		Sequence
PKC α	sense	5'-cgg aag ccc cac ctt ctg c
	antisense	5'-ctt tgt tgc cag cag ggc
PKC β I	sense	5'-cgt gat gaa tgt tcc cag c
	antisense	5'-cgc agt tct tca ttg gc
PKC β II	sense	5'-cgc tga caa ggg tcc agc
	antisense	5'-cca atc cca aat ctc tac
PKC γ	sense	5'-gca gcc cca cct tct gcg
	antisense	5'-gcc ccc atg aag tgc ttg cg
PKC δ	sense	5'-gca gat gca ct gca ceg
	antisense	5'-gcc cac gac tgt gaa cg
PKC ϵ	sense	5'-gac ag aac tat ctt gag
	antisense	5'-agt tgt cct gta gga aag
PKC ζ	sense	5'-gcg ctt taa cag gag agc gt
	antisense	5'-gct tct ctg tct gta ccc ag
PKC η	sense	5'-gct gct gcg cac gac cgg cg
	antisense	5'-gcc acg ttc gct tgc cat cg
PKC θ	sense	5'-gca ggc aaa ggt cca cca cg
	antisense	5'-gcc acc tta atc atg gcc ag
PKC ι	sense	5'-cgg gtg aac gcc tac tac c
	antisense	5'-cgc ctg ttg aaa cgc ttg gc
PKC μ	sense	5'-gct gtg ggg gct ggt acg
	antisense	5'-gca tct cgc cac tgt cg

다. 전기영동 및 중합효소연쇄반응 단편의 흡광도 측정

중합효소연쇄반응 반응을 마친 용액은 1% 아가로스 겔로 전기영동하였고, Ethidium bromide(Sigma Inc., St. Louis, MO)를 이용하여 중합효소연쇄반응 단편을 염색시켰다. 염색된 중합효소연쇄반응 띠는 겔 형태 분석기(Gel image analysis system)를 사용하여 중합효소연쇄반응 띠의 밝기와 굵기 정도를 육안으로 확인하고 사진을 얻었으며, 동일한 기계에서 자외선 365 nm 파장으로 각 중합효소연쇄반응 단편에 대한 흡광도를 측정하였다.

라. 통계 처리 및 검증

위의 실험을 9회 반복한 후 대조군과 디메틸히드라진 처리군에서 수치화된 각각의 단백질효소 시이 동종효소를 Scheffe's posthoc test로 통계 분석하여 동종효소별로 각 군간에 유의한 차이가 있는지를 조사하였다. $p < 0.01$ 인 경우에 한하여 통계적 유의성을 부여하였다.

III. 결 과

단백활성효소 시이 동종효소에 대한 역전사효소-동종효소연쇄반응을 시행한 결과, 대조군과 디메틸히드라진 처리군에서 동일하게 11개의 단백질효소 시이 동종효소 중 단백질효소 시이 알파(α , alpha), 베타1(BI, beta1), 베타2(BII, beta2), 에타(η , eta), 아이오타(ι , iota), 뮤(μ , mu)의 6개의 동종효소만이 발현되었다(Fig. 1). Scheffe's posthoc test로 통계 분석한 결과 단백질효소 시이 알파, 아이오타, 뮤는 대조군에 비해 디메틸히드라진 처리군에서의 발현이 높은 것으로 분석되었으며, 베타1, 베타2, 에타는 대조군에 비해 디메틸히드라진 처리군에서 발현이 낮은 것으로 분석되었다($p < 0.01$). 그러나 단백질효소 시이 에타와 아이오타의 경우 실제 수치상의 차이는 미미하였다(Fig. 2).

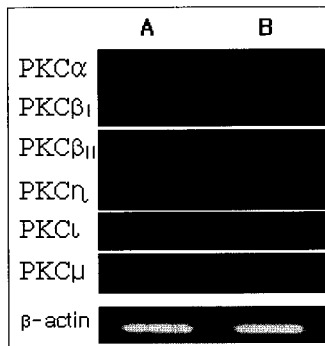


Fig. 1. mRNA expression of PKC isoforms in HUVECs. HUVECs were treated with 7.5×10^{-9} M DMH and the cells were collected at 24 hours later. (A) control group, (B) DMH treatment group.

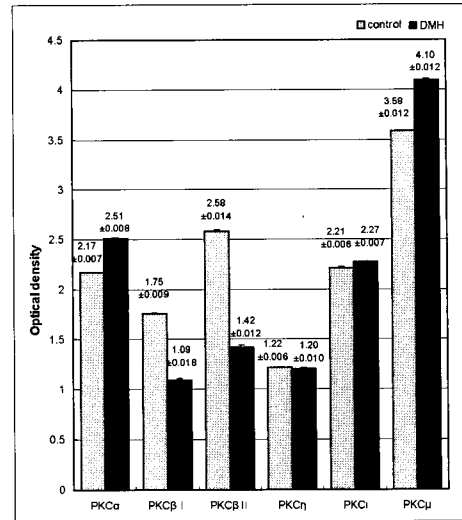


Fig. 2. Measured optical density in mRNA expression of PKC isoforms in HUVECs. Gray line is optical density of mRNA expression in control group and dark line is optical density in DMH group. The values show "mean values \pm standard deviation(SD)".

IV. 고 찰

혈관신생의 과정은 다양한 기전으로 이루어져 있으며 그 중에서 신호전달경로는 외부의 신호가 일차전달물질인 각종 성장인자, 신경전달물질 및 호르몬 등에 의해 세포막에 있는 각각의 독특한 수용체와 결합하고 또한 이러한 결합에 의하여 세포내로 정보가 전달되며 수용체분자의 입체구조의 변화가 초래되어 세포 내 지역(intracellular domain)의 티로신 활성효소(tyrosine kinase)가 활성화된다. 이외에도 C-아데노신 단인산염(adenosine monophosphate), diacylglycerol(DAG), 칼슘이온(Ca^{2+}) 등의 이차전달물질(second messenger)을 만들고 이에 따라 단백질효소 시이, G 결합단백질, adenylyl cyclase 등의 활성화로 일련의 생화학적 반응이 일어나 결국 세포의 변화, 세포의 과증식, 종양화 변환 등을 유발하는 과정이다. 이러한 신호전달경로에서 단백질효소 시이는 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화시키는 역할을 하며, 세포성장 및 분화와 같은 세포의 필수적인 기능을 조절하고 세포간 신호전달체계에 중요한 역할을 한다. 따라서 단백질효소 시이의 활성의 변이는 세포증식 조절의 교란이나 종양세포의 성장을 촉진한다.⁷

단백활성효소 시이는 시이-디엔에이 클로닝에 따라 아종(subspecies)인 11개의 동종효소들이 알려져 있고 그 활성 특성에 따라 classic 단백질효소 시이(cPKC), new 단백질효소 시이(nPKC), 및 atypical 단백질효소 시이(aPKC)로 크게 3종류로 분류된다. Classic 단백질효소

시이는 알파, 베타1, 베타2, 감마(γ , gamma)의 동종효소로 구성되어 있고 효소활성화는 Ca^{2+} 와 DAG에 의존적이며, new 단백질활성효소 시이는 델타(δ , delta), 입실론(ϵ , epsilon), 에타(η , eta), 썸타(θ , theta), 뮤(μ , mu)로 구성되어 있으며 Ca^{2+} 에는 의존적이지 않으나 DAG에는 의존적이고, atypical 단백질활성효소 시이는 제타(ζ , zeta), 아이오타(ι , iota)로 구성되며 Ca^{2+} , DAG 모두에 비의존적이다. 이러한 각각의 동종효소들은 조직에 따라 분포양상이 다양하고 그 작용도 또한 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, 세포의 성장조절 기능 외에도 호르몬이나 신경전달물질의 분비, 유전자 발현 및 세포대사 등에도 관여한다.^{6,8-10}

본 연구에서는 디메틸히드라진에 의해 과증식된 인체탯줄정맥내피세포에서의 단백질활성효소 시이 동종효소들의 발현정도를 알아보았다. 실험결과로 대조군과 디메틸히드라진 처리군 각각에서 11개의 단백질활성효소 시이 동종효소들 중 단백질활성효소 시이 알파, 베타1, 베타2, 에타, 아이오타, 뮤인 6가지의 발현이 확인되었다. 인체탯줄정맥내피세포에서 발현되는 단백질활성효소 시이 동종효소 중에서 알파와 뮤는 디메틸히드라진 처리군에서 대조군에 비해 발현이 증가되었고, 베타1, 베타2는 디메틸히드라진 처리군에서 대조군에 비해 발현이 현저히 감소하였다. 대조군보다 디메틸히드라진 처리군의 발현이 증가하거나 감소하는 등의 변화는 디메틸히드라진의 영향으로 인한 세포 내 물질 생성반응의 일환이므로, 디메틸히드라진 처리에 따른 세포의 과증식에 영향을 주었다고 볼 수 있다. 즉, 단백질활성효소 시이 알파와 뮤의 증가는 세포의 증식을 유도하며, 이와 상반되는 현상으로 베타1, 베타2의 감소가 세포의 증식을 유도하는 것으로 사료된다. 또한 에타와 아이오타도 수치상의 차이가 미미하나 통계적으로 유의성을 보이므로 본 실험과의 연관성은 있으나 세포증식에 미치는 영향력은 적을 것으로 생각된다.

이미 밝혀진 바에 따르면, 단백질활성효소 시이의 저해제를 이용한 실험에서 각막내피세포의 증식에서는 단백질활성효소 시이 알파와 입실론, 두 가지 동종효소가 변화를 보였으며,³ 심근질환(cardiomyopathy)의 발생에는 베타가 연관이 되어있다고 보고되었다.¹¹ 또한 단백질활성효소 델타를 과발현시킨 세포들을 이용한 실험에서는 세포의 성장이 증가하는 것으로 밝혀졌고,¹² 베타2와 입실론은 식도의 수축과 관여한다고 알려져 있다.¹⁰ 섬유아세포(fibroblast)에서 알파, 베타, 감마의 과다발현이 미치는 효과에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다.¹¹ 이렇듯 다양한 분야에서 단백질활성효소 시이 동종효소의 역할과 세포증식과의 연관성에 대한 연구가 이루어지고 있다.

저자의 앞선 실험에서도 단백질활성효소 시이의 저해제 처리를 통해 디메틸히드라진 처리에 의한 인체탯줄정맥내

피세포의 과증식의 억제현상을 확인한 바 있으며, 또한 인체탯줄정맥내피세포의 과증식에 영향을 주었을 것으로 확인된 성장인자의 발현이 억제됨도 확인하였다.

이와 같이, 현재 단백질활성효소 시이가 세포 과증식의 조절에 있어서 중요하게 다루어지고 있음을 볼 때, 본 연구의 결과로 얻어진 인체탯줄정맥내피세포의 세포증식과 관련된 단백질활성효소 시이의 6가지 동종효소는 혈관 내피세포의 증식의 주요 인자로 주목할 수 있으며, 특히 큰 차이를 보인 알파, 뮤, 베타1, 베타2는 각각의 동종효소들의 발현조절을 통한 혈관 내피세포의 과증식의 억제를 유도함에 있어서 효과적인 역할을 할 것으로 기대된다.

그리고, 본 연구에서는 각각의 동종효소에 대한 선택적인 저해를 시도하지 않았으나 최근에는 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 효율적으로 억제할 수 있는 알엔에이 간섭기술이 개발되고 있고 이 과정에서 단편 간섭 알엔에이(siRNA, short interference RNA)가 이용되고 있다.¹³ 따라서 향후 이러한 단편 간섭 알엔에이를 인체탯줄정맥내피세포에 처리하여 단백질활성효소 알파, 뮤, 베타1, 베타2 유전자의 발현을 선택적으로 억제시킴으로써 나타나는 세포의 증식에 대한 반응을 살펴 이들 효소의 세포 내 역할을 밝히고, 연쇄적인 반응으로 연계되어 있는 물질을 규명함으로써, 혈관 내피세포의 과증식으로 야기되는 질환의 신호전달체계를 파악하여 실질적인 세포 과증식의 억제 및 치료제 개발 연구에 도움이 될 것으로 사료된다.

V. 결 론

디메틸히드라진은 동물실험에서 경구투여나 피하주사 시 악성 혈관내피종과 혈관육종 등 혈관종양을 유발하며 *in vitro*에서 인체탯줄정맥 내피세포의 과증식을 유발하는 물질로 알려져 있으나 그 기전은 명확하게 파악되지 않고 있다. 이에 저자는 인체탯줄정맥 내피세포의 과증식과 연관된 신호전달경로 중 단백질활성효소 시이가 가장 강력하게 연관되어 있음을 확인하였고 이와 관련된 동종효소들의 발현양상을 파악하고자 하였다. 실험결과 배양된 인체탯줄정맥 내피세포에서 단백질활성효소 시이 11가지의 동종효소 중 알파, 베타1, 베타2, 에타, 아이오타, 뮤의 6개의 동종효소만이 관련이 있는 것으로 조사되었다. 특히 알파와 뮤의 발현이 현저히 증가되었음을 확인하였다. 이러한 내용을 종합해 볼때 디메틸히드라진에 의해 유도된 혈관 내피세포의 과증식에서 단백질활성효소 시이 동종효소 중 알파와 뮤가 가장 의미있게 관련되어 있다고 사료된다.

REFERENCES

1. Lee OH, Kim YM, Lee YM, Moon EJ, Lee DJ, Kim JH, Kim KW, Kwon YG: Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 743, 1999
2. Levitzki A: Protein tyrosine kinase inhibitors as novel therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 82: 231, 1999
3. Graham MA, Rawe I, Dartt AD, Joyce NC: Protein kinase C regulation of corneal endothelial cell proliferation and cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4124, 2000
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. Clemens MJ, Trayner I, Menaya J: The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 103: 881, 1992
7. Zoukhri D, Hodges RR, Willert S, Dartt DA: Immunolocalization of lacrimal gland PKC isoforms. Effect of phorbol esters and cholinergic agonists on their cellular distribution. *J Membr Biol* 157: 169, 1997
8. Sohn UD, Zoukhri D, Dartt D, Sergheraert C, Harnett KM, Behar J, Biancani P: Different protein kinase C isoenzymes mediate lower esophageal sphincter tone and phasic contraction of esophageal circular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 51: 462, 1997
9. Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaechtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF: Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 268: 6090, 1993
10. Wakasaki H, Koya D, Schoen FJ, Jirousek MR, Ways DK, Hoit BD, Walsh RA, King GL: Targeted overexpression of protein kinase C β 2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9320, 1997
11. Gschwendt M: Protein kinase C δ . *Eur J Biochem* 259: 555, 1999
12. Jones SW, Souza PM, Lindsay MA: siRNA for gene silencing: a route to drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol* 4: 522, 2004