

저산소 상태의 백서 심근세포에서 Regucalcin의 특이적 발현 및 역할

임소연¹ · 송병욱² · 차민지² · 최은주² · 함은주² · 이창연² · 최성용² · 이세연² · 장양수^{2,3} · 황기철^{2,*}

¹Cardiovascular Research Institute, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY 14642, USA, ²연세대학교 의과대학 Brain Korea 21 심혈관 연구소, ³연세대학교 의과대학 심장내과

Differential Expression of Regucalcin (SMP30) and Its Function in Hypoxic Cardiomyocytes

Soyeon Lim¹, Byeong-Wook Song², Min-Ji Cha², Eun Ju Choi², OnJu Ham², Chang Yeon Lee², Seong Yong Choi², Se-Yeon Lee², Yangsoo Jang^{2,3} and Ki-Chul Hwang^{2,*}

¹ Cardiovascular Research Institute, University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, NY 14642, USA, ²Cardiovascular Research Institute, Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul, 120-752, Republic of Korea, ³Cardiology Division, Yonsei Cardiovascular Center, Yonsei University Health System, Seoul, 120-752, Republic of Korea

(Received: July. 27st, 2009; Accepted: September. 24th, 2009)

Abstract : Regucalcin (SMP30) has been proposed to be involved in the maintenance of calcium homeostasis. Although the expression of regucalcin was regulated in the liver and kidney during the embryogenesis and maturation of these tissues, the roles of regucalcin were not defined yet in heart. This study focused on the investigation of the differential expression changes in regucalcin and its function in hypoxic cardiomyocytes. The expression level of regucalcin was the highest in 7 days after neonatal stage of rat heart. In hypoxic condition, reactive oxygen species (ROS) production and calcium level were decreased in regucalcin-overexpressed cardiomyocytes about 60% compared to normal cells. Regucalcin-transfected cells were slowly induced cell death in H₂O₂ treated condition and not reduced proliferation in hypoxic condition. In proliferation-related signals, PKC-MEK1/2-ERK1/2 activation of regucalcin-overexpressed cells was recovered in hypoxia, compared to hypoxic cardiomyocytes, and expression of proto-oncogene was only affected *c-myc* by regucalcin. Transfected cardiomyocytes demonstrated that apoptotic signal was hampered in regucalcin-regulated manner. In conclusion, these data suggest that regucalcin may regulate proliferation and cell death in cardiomyocytes via calcium homeostasis.

Key words: Regucalcin, calcium, ischemia, cardiomyocytes

1. 서 론

심혈관 기능에 실제적인 자극을 주는 심근 세포는 노화됨에 따라 다양한 구성 성분의 변화가 일어나고 이것은 허혈성 자극을 수용하는 세포의 능력이 감소함을 의미한다.¹ 심근세포 내 [Ca²⁺]은 중요한 이차 전달물질이고, 세포 내 Ca²⁺ 신호 체계 혹은 체계의 구성 성분들의 변화는 심근 세포에 상당한 생리적인 영향을 미친다.

세포 내 Ca²⁺는 세 가지 주요한 구성원인 세포질, 소포체, 및 미토콘드리아에 의해 조절된다. 세포질에서 Ca²⁺ 원충은 Ca²⁺ 신호에 상당한 영향을 미치고, 세포질의 Ca²⁺ 결합 단백질은 완충작용에 관여한다. 세포질의 Ca²⁺ 농도의 변화는 수많은 신호 전달체계에 영향을 미치고 세포와 기관의 기능에 다양한 범위로 영향을 준다. H₂O₂에 의해 야기되는 Ca²⁺ 과부하에 기여할 수 있는 Ca²⁺ 항상성 관련 단백질에서 다양한 기능적 변이가 존재한다.² 이 기전에는 전압에 민감한 Ca²⁺ 채널 활성의 직접적인 혹은 K⁺ 채널의 억제와 연속적인 막의 탈분극화를 통한 간접적인

*Tel: 02-2228-8523; Fax: 02-365-1878
e-mail: kchwang@yuhs.ac (Ki-Chul Hwang)

조절을 통한 증가된 Ca^{2+} 의 유입, 강화된 SR Ca^{2+} 분비, SR Ca^{2+} ATPase에 의한 Ca^{2+} 흡수의 억제 혹은 NCX의 직접적인 조절 혹은 증가된 NHE-1 활성에 대한 이차적인 간접적인 활성을 통한 강화된 Na^+/Ca^{2+} 교환이 포함된다.³

세포 내 $[Ca^{2+}]$ 의 증가에서 세포자멸은 Ca^{2+}/Mg^{+} 의존적 endonuclease를 자극하고 Ca^{2+}/CaM 의존성 효소적 활성을 조절하여 야기된다. 최근에는, 다량의 regucalcin (SMP30, senescence marker protein-30)⁴⁻⁸을 발현하는 Hep G2 세포를 사용하여 regucalcin이 세포막을 관통하는 Ca^{2+} 유출을 강화하여 세포외부의 ATP에 의해 야기되는 세포 내 Ca^{2+} 증가를 억제한다는 것이 보고되었으며, 이것은 세포사멸을 방지하는데 regucalcin이 중요한 역할을 수행하는 것을 제안한다.⁹

비록 regucalcin의 발현이 간과 신장의 성숙과 배아형성의 기간에서 조절되며, 특히 간과 신장 피질의 세포막과 마이크로솜에서 세포 내 Ca^{2+} 펌프 효소의 보존에 연관된다고 알려져 왔으나¹⁰⁻¹², 심장에서 regucalcin의 역할은 아직 확인되지 않았다.^{9,13} 본 연구는 백서의 일령 변화에 따른 심장에서 regucalcin의 발현 변화와 저산소 상태에서 regucalcin의 역할을 규명하기 위하여 실시되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료 및 기기

실험에 사용된 인산화-ERK, 인산화-Akt 및 인산화-MEK에 대한 항체는 New England Biolabs (UK)에서 구입하였고 MEK1/2, PKC 및 Ras 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (USA) 및 chemical international (USA)에서 구입하였다. 세포배양배지(DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium)와 소 태아혈청은 Gibco Life technologies (USA)에서 구입하였다. 세포증식 분석 시스템(premix-WST-1 cell proliferation assay kit)은 Takara Shzo Co. 제품을 사용하였으며, Enhanced-chemiluminescence (ECL) western blotting kit는 Amersham (USA)에서 구입하였고, 역전사효소 (Reverse Transcription System)은 Promega Co. (USA)에서 구입하였다.

2.2 백서 신생 심근세포의 분리와 배양

1-3일 된 백서의 심장을 분리하여 PBS에 넣어 left ventricle만 분리한 다음, micro dissecting scissor를 사용해 1 mm³ 정도 될 때까지 잘라 주었다. 5 ml의 collagenase II (0.8 mg/ml, 262 units/mg, Gibco BRL, USA)를 37°C, 5% CO₂에 5분간 배양한 후, collagenase II 부유액을 제거하였다. 새로운 collagenase II 5 ml를 첨가하고 5분간 더 배양한 다음, 새 튜브에 상등액을 옮기고 세포 배

양 배지(10% FBS contained α -MEM, Gibco BRL)을 첨가한 후, 4 분간 1200 rpm에서 원심 분리하였다. 5 ml의 배양 배지에 세포 침전물을 다시 부양한 다음, 조직이 거의 남지 않을 때까지 7-9번 반복하여, 단일 세포로 분리된 부유물을 하나의 튜브에 모았다. 100 mm 조직 배양 접시에 세포를 1-3시간 동안 배양하여 섬유아세포를 접시에 부착하게 한 다음, 붙지 않은 세포판을 모아 5×10^5 cells/ml의 농도로 접종하여 배양하였다. 4-6 시간이 경과한 후, 신선한 배지로 갈아준 다음, 0.1 mM의 BrdU를 첨가하여 섬유아세포의 성장을 억제시키면서 배양하였다.

2.3 세포 내 생성된 활성 산소종의 측정

백서 신생 심근세포를 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA ; Molecular probe, USA)로 표지하는데, 이 때 탐침인 H_2DCFDA (10 μ M)는 세포 내로 들어가서 esterase에 의해 H_2DCFDA 의 acetate group이 해리되면서 비 형광성 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFA)이 내부에 포획되었다. 활성 산소종에 의한 이어지는 산화반응으로 형광산물인 DCF가 생성되었다. 이 염색제는 480 nm에서 자극하면 산화된 경우에 한해서만 535 nm에서 빛을 발생하였으며 표지된 심근세포에서 산화된 염색제는 발광 광도계를 통해 측정되었다.

2.4 심근세포 내 Ca^{2+} 측정을 위한 Confocal Microscopy와 형광 분석

세포질 유리 Ca^{2+} 농도의 측정은 동일초점 현미경 분석으로 수행되었다. 신생 백서의 심근세포를 laminin (5 g/cm²)으로 코팅된 유리 박편 위에 0.1 mM BrdU가 함유된 세포배양배지 (10% FBS를 함유하고 있는 α -MEM, Gibco BRL)에서 하루 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 변형된 Tyrode's 용액으로 세척하였는데, 이 용액은 0.265 g/l $CaCl_2$, 0.214 g/l $MgCl_2$, 0.2 g/l KCl, 8.0 g/l NaCl, 1 g/l glucose, 0.05 g/l NaH_2PO_4 , 그리고 1.0 g/l $NaHCO_3$ 로 구성되어 있다. 변형된 Tyrode's 용액상에 fluo-4의 acetoxymethyl ester (Fluo-4 AM, Molecular Probes, USA) 2 μ M을 첨가하여 암실, 상온에서 20분 동안 배양하였다. 형광 이미지는 아르곤 레이저 동일초점 현미경 (Carl Zeiss Inc., Germany)을 통해 얻었다. Fluorochrome은 argon laser의 488 nm에서 자극되고 발생하는 빛은 510-560 nm의 띠 투과 필터를 통해 모아졌으며 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 상대적 변화는 형광 강도의 측정에 의해 결정되었다.

2.5 Immunoblot 분석

수확한 세포들을 완충용액(20 mM Tris-HCl; pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH8.0, 1 mM EGTA;

pH 8.0, 1% Triton, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM β -glycerphosphate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin)으로 세포를 용해시켰다. 16000 g 에서 15 분간 원심분리 하여 얻은 상층액은 BCA 단백질 분석 용액을 사용하여 정량하였으며 동량의 protein 분리액을 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동 하였다. 전기영동한 단백질은 polyvinylidene difluoride (PVDF) 이동 막을 통해 이동 완충용액(20 μM Tris, 190 mM Glycine, 20% Methanol)안에서 이동, 고정시켰다. 전기이동 된 막은 5% 의 skim milk를 포함한 TBS-t (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20 pH 7.6) 완충용액과 반응시킨 후 토끼-항-인산화 ERK 항체, 토끼-항-인산화 JNK 항체, 토끼-항-인산화 MEK1/2 항체 등으로 1-16 시간 반응시켰다. 그 다음 horseradish peroxidase 가 부착된 염소-항-토끼 항체와 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 방법으로 MAPK의 발현과 인산화 정도를 관찰하였다.

2.6 역전사 중합효소연쇄반응 분석

중양유전자인 *c-fos*, *c-myc*, *elk-1* 의 발현 정도를 분석하기 위하여 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 을 실시하였다. 전체 RNA는 Ultraspec-II™ RNA system (Biotex Laboratories Inc., USA) 를 이용하여 분리 하였으며, AMV 역전사 효소를 사용하여 분리된 전체 RNA 로부터 단일가닥의 cDNA를 합성하였다. 1 μg 의 전체 RNA 에 1X 역전사 완충용액(10 mM Tris-HCl; pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 0.5 units의 RNase 억제제, 0.5 mg의 oligo(dT), 15 units의 역전사 효소를 모두 첨가하여 42°C에서 15 분간 반응시켰다. 그 다음 99°C에서 5 분간 열을 가한 후 0-5°C에서 5 분간 방치하였다. 중합효소연쇄반응은 각각의 primer 를 사용하여 35 cycle 반복하여 수행되었다. 각각의 primer는 다음과 같다. *c-fos* 5'-ACCATGATGTTCTCGGTTTCAA-3', 5'-CTCTGTAATGCACCAGCTCAGTCA-3', *c-myc* 5'-GAAG TGACCGACTGTTCTATGACT-3', 5'-CGCAACCAGTCAAGTTCTCAAGTT-3', *elk-1* 5'-TACATCGTAGCGAATCAATCAATCCGTG-3', 5'-TGTTGGTGGTAGTAT AGTCATGGCTT-3'

2.7 pcDNA3.1-Regucalcin 플라스미드 제조 및 세포 내 주입

진핵세포 발현 벡터인 pcDNA3.1 (Invitrogen, Netherlands) 에 쥐의 regucalcin 유전자를 클로닝 한 다음, 심근세포로의 형질전환은 LIPOFECTAMINE PLUS™ 용액 (Gibco BRL)을 사용하여 수행하였다. 즉, 60 mm 배양접시에서 배

양된 신생 백서의 심근세포(5×10^5 cells/plate)는 혈청이 없는 DMEM 으로 두 번 세척하였다. LIPOFECTAMINE PLUS™ 용액은 혈청이 없는 DMEM으로 희석하고 각 배양 접시에 5 μg DNA 와 혼합한다. DNA 와 LIPOFECTAMINE PLUS™ reagent 는 세포가 들어있는 신선한 배지와 함께 배양접시에 첨가했다. 37°C의 CO₂ 배양기에 3 시간 배양 후 배지는 10% FBS가 들어있는 DMEM으로 교환하였다. 세포는 37°C에서 48 시간 더 배양했다.

2.8 저산소 처리 및 세포 생존도 분석

배양 접시에 세포가 80~90% 정도 배양되었을 때, 37°C 배양기에서 1 시간 동안 배양한 후 저산소 조건으로 24 시간 배양하였다. 저산소 조건의 배양은 37°C로 유지되고 계속적으로 10% CO₂, 5% H₂, 85% N₂의 혼합기체가 공급되는 airtight humidified chamber (Anaerobic Environment, ThermoForma, USA) 에서 이루어졌는데, 이때 배지는 1% FBS 만이 들어 있는 배지를 사용하였다. 대조구의 경우는 용합 단백질을 처리하지 않은 상태에서 동일하게 저산소 조건으로 배양하였다. 세포의 생존도는 MTT 분석 에 의해 측정하였다. 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)(5 mg/ml)을 PBS 에 용해시켰다. 세포는 24 시간 동안 4-well 접시에 배양한 뒤 저산소 배양기에 옮겼다. 저산소 배양기에서 배양한지 6 시간, 24 시간과 48 시간 뒤에 배양된 배지를 제거한 뒤 0.5 ml의 MTT 용액을 첨가하였다. 그 뒤 배양용기를 다시 배양기에서 배양하였다. 3 시간 후에 MTT 용액을 제거하고 MTT/formazan 을 용해시키기 위해 0.5 ml의 dimethylsulfoxide (DMSO) 로 추출했다. 추출 시약을 사용하여 공백값(blank)을 570 nm에서의 광학적 밀도를 통해 측정했다. MTT는 살아있는 세포에 의해 생성된 formazan 으로 대사되었기 때문에 아무 처리도 되지 않은 건강한 세포와 비교하여 570 nm에서 측정된 흡광도가 감소하는 것은 세포의 성장과 생존도의 감소를 의미한다.

2.9 Caspase-3 Assay

심근세포에서 caspase-3 의 활성은 DEVD-pNA 의 가수분해에 의한 chromopore 인 pnitroanilide (pNA) 의 방출을 측정하는 방법에 의해 Apoalert™ CPP32/caspase-3 assay kit (BD Science, USA) 를 이용하여 분광광도 측정하였다. 1×10^6 세포를 60 mm 배양 접시에 24 시간 배양 후, pcDNA3.1-regucalcin 을 도입한 다음 저산소 배양기에서 24 시간 배양하였다. 세포를 모으고 차가운 세포 용해 용액으로 고르게 섞어준 뒤 10 분 동안 얼음에 방치하였다. 세포 용해액을 원심분리기를 이용하여 수집하고 상등액은 새 튜브에 옮겨주었다. 단백질 농도는 Bradford assay (Bio-Rad, USA)에 의해 결정했다. 10 mM

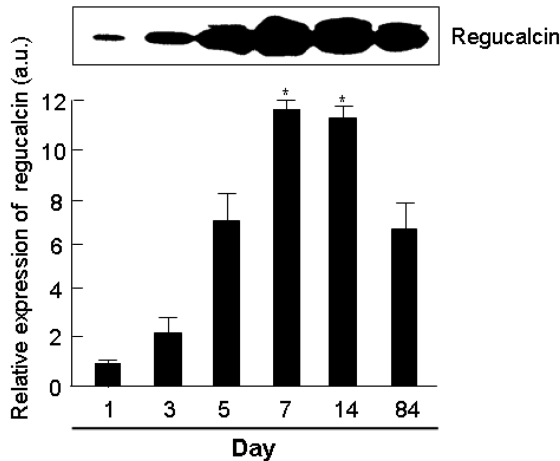


Figure 1. Expression of regucalcin in rat hearts. Expression levels of regucalcin in rat heart with days after birth were determined by immunoblot with anti-regucalcin antibody and relative amounts were estimated using densitometry (* $p < 0.01$ compared with 1 day).

dithiothreitol (DTT) 을 포함하는 2 배의 반응 완충액 50 μ l을 첨가하고 각 표본마다 4 mM의 DEVD-pNA를 5 μ l씩 넣어 37°C 에서 1 시간 동안 배양하였다. Caspase-3의 활성은 405 nm에서 microtiter plate reader를 사용하여 측정하였으며 기준 곡선(standard curve)은 standard CPP32를 chromogenic substrate 를 이용하여 그렸다.

2.10 통계 분석

데이터는 3 반복 이상의 평균 \pm S.E.M. 으로 수행되었다.

Immunoblot 분석과 역전사 중합효소연쇄반응 분석 결과물 등의 복합적 그룹들은 one-way ANOVA (Analysis of Variance)의 Bonferroni's test 를 실시하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 안에 있다.

3. 결과 및 고찰

3.1 백서 심장에서 Regucalcin의 발현

백서의 생육 정도에 따른 regucalcin 의 발현 변화를 확인하기 위하여, 일령에 따라 적출한 백서의 심장에서 regucalcin 의 발현 정도를 면역분석 하였다. 백서의 심장에서 regucalcin 의 발현은 Fig 1에서 보는 바와 같이, 신생 단계에서부터 생육 일수가 증가함에 따라 증가하다가 7 일째에 최대 발현양을 나타내었으며 그 상대적 값은 신생 1 일째 발현양의 10 배 정도 높은 수준이었다. 그리고 14 일째까지 유사한 발현 정도를 보이다가 점차 감소하여 84 일째 생육단계의 심장에서는 발현양이 7 일째에 비해 절반 이하로 감소함을 확인하였다. 이로써 regucalcin 이 신생단계에서부터 왕성한 생육을 보이는 단계까지는 높게 발현되나 노화단계로 들어서면 점차 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

3.2 저산소증 심근세포에서 활성 산소종 생산과 Ca^{2+} 항상성에 미치는 Regucalcin의 영향

현재까지의 연구들은 regucalcin이 TNF- α 와 actinomycin D (Act-D)에 의해 유도된 사멸로부터 Hep G2 간세포를 보호한다는 사실을 보여주며¹⁴⁻¹⁶ 이러한 효과는 calmodulin

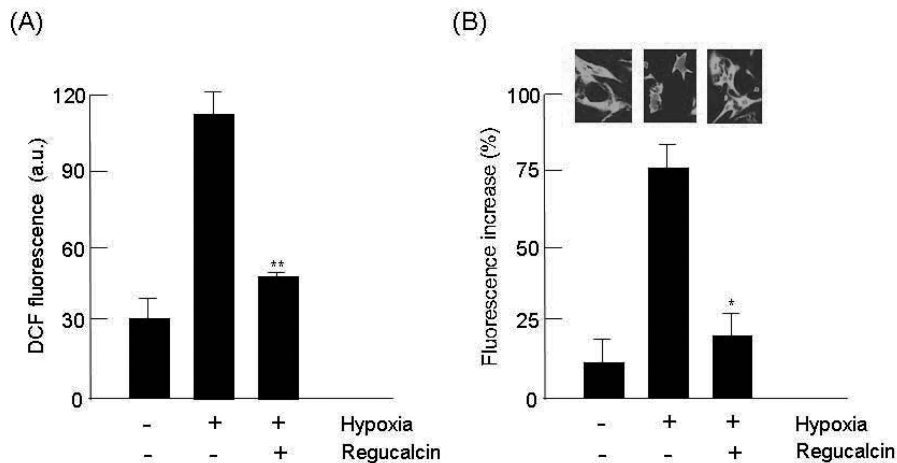


Figure 2. Effect of regucalcin on ROS production and Ca^{2+} homeostasis in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (1×10^4 cells per well) were incubated at hypoxic conditions for 24 hr. (A) Cells were further treated with H_2DCFDA (5 M) for 10 min and the oxidized dye, DCF, was measured using a luminescence spectrophotometer. Data denote the means \pm S.E. of 2-3 replicate measurements in three different cell cultures. (B) Confocal fluorescent image of neonatal rat cardiomyocytes was obtained loading with Fluo-4 AM. Mean increases of the normalized fluorescent level (expressed as: % of increase \pm S.E.M.) in individual cell ($n = 8$) observed in the each condition (* $p < 0.01$ compared with hypoxia only).

(CaM) 과 연관되어 있다고 보고하였다. 또한 regucalcin 이 백서 심근세포의 소포체 에서 Ca^{2+} 펌프 활성화소인 Ca^{2+} -ATPase를 활성화 시킬 수 있음이 보고되었고¹⁷⁻²⁰ 이는 심근조절에 있어서 생리학적인 역할을 한다는 것을 제시한다. 이러한 보고를 바탕으로 백서의 일령의 증가에 따른 regucalcin이 활성산소종의 조절과 칼슘 항상성 조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 백서 신생 심근세포를 분리하였다. 1-3 일 된 백서의 심장을 collagenase II 효소를 이용하여 0.1 mM 의 BrdU 를 첨가하여 섬유아세포의 성장을 억제시키면서 심근세포 분리 다음, 3 일이 경과되면 배양 접시상에서 beating 을 관찰할 수 있었으나 그 후로는 심근 세포의 beating이 관찰되지 않아 이 후의 실험에서는 심근세포의 분리 후 3일째 배양된 세포를 사용하였다.

분리된 백서의 심근세포를 저산소 조건으로 처리한 뒤, regucalcin 의 영향을 확인한 결과, Fig 2A에서, 심근세포를 저산소 조건에서 24 시간 동안 처리했을 때, 활성 산소종의 생성은 약 4 배 정도 증가하였으나, regucalcin 의 발현은 변화가 없었다. 그러나 regucalcin 을 과발현 할 수 있는 백터를 심근세포에 도입한 후, 저산소 조건을 동일하게 24 시간 처리했을 때, 활성 산소종의 생성이 regucalcin 유전자를 도입하지 않은 경우에 비해 60% 정도 현저하게 감소하였다. Fig 2B에서 알 수 있듯이, 세포 내 칼슘 항상성의 변화도 유사한 양상을 나타내었다. 현미경 사진에서 붉은 색으로 나타나는 칼슘의 양이 저산소 조건을 처리했을 때, 그렇지 않은 세포보다 7배 이상 증가 함으로서 과부하 상태가 됨을 확인하였으나 regucalcin 을 과발현 하도록 유전자를 도입한 후 저산소 조건을 처리한 경우에 칼슘의 양이 현저하게 감소되어 칼슘 항상성 유지에 효과가 있음을 확인하였다.

3.3 활성산소종에 의해 자극된 심근세포의 사멸에 대한 Regucalcin의 영향

세포 내 생육 및 사멸 기전에 관여하는 활성 산소종의 한 종류인 H_2O_2 를 다양한 농도로 세포 외에 처리하여 심근세포 사멸을 유도한 조건에서, regucalcin 이 활성 산소종으로 유발된 세포사멸에 어떤 영향을 가지는지 regucalcin 을 과발현시켜 확인하였다. H_2O_2 를 0 에서부터 1 mM 까지 농도별로 처리했을 때, 400 μM 정도까지의 H_2O_2 처리는 약간의 세포 증식 효과를 나타내었으나 그 이상의 농도에서는 급격한 세포사멸을 유발하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 regucalcin을 과발현하도록 유전자를 도입한 심근세포에 동일하게 H_2O_2 를 처리하고 세포사멸 정도를 확인하였다. Fig 3에서 보는 바와 같이, regucalcin 을 과발현 시킨 심근세포의 경우에는 정상 심근세포에서 급격한 사멸을 유도했던 600 μM 의 농도에서도 H_2O_2 를 처리하지 않은 경우와 동일한 정도의 사멸 정도를 나

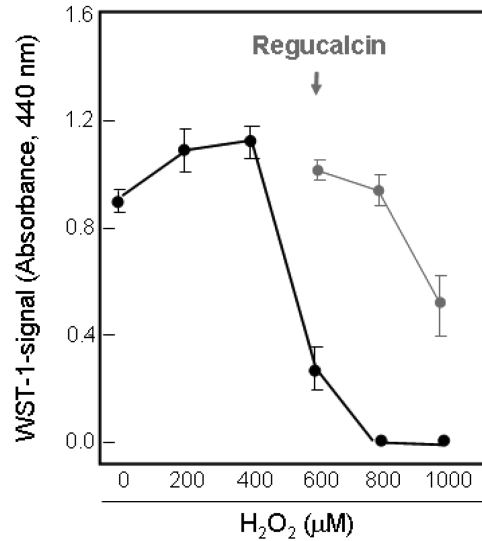


Figure 3. Effect of regucalcin on ROS-stimulated cell death of cardiomyocytes. The cells with or without regucalcin (5×10^4 cells per well) were stimulated with various concentrations of H_2O_2 for 48 hr. WST-1 reagent was added to each well and incubated for 3 hr at 37°C. Cell proliferation was measured by spectrophotometry ($\lambda = 440$ nm).

타냄으로서 활성 산소종 즉, H_2O_2 로 유발된 세포사멸 기작을 저해함을 알 수 있었다. 600 μM 이상의 농도에서도 높은 농도에 의해 사멸 정도가 점차 증가하기는 하였지만, 정상 심근세포보다 사멸 정도가 현저하게 감소함을 확인하였다.

3.4 저산소증 심근세포에서 Regucalcin의 생육에 미치는 효과

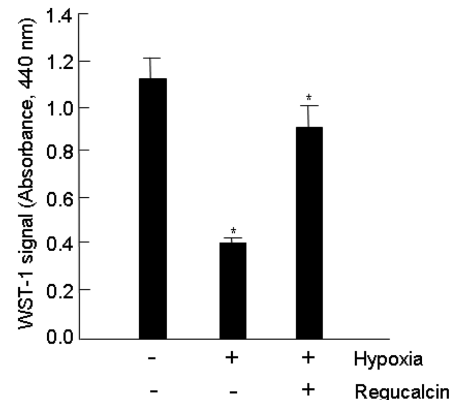


Figure 4. Proliferative effect of regucalcin in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (5×10^4 cells per well) were incubated at hypoxic conditions for 24 hr. WST-1 reagent was added to each well and incubated for 3 hr at 37°C. Cell proliferation was measured by spectrophotometry ($\lambda = 440$ nm) (** $p < 0.05$).

저산소 조건으로 처리한 심근세포에서 regucalcin 의 생육에 미치는 영향을 확인하였다. 심근세포를 저산소 조건으로 처리했을 때, 생육의 정도는 정상 조건에서 배양한 심근세포에 비해 60% 이상의 생육감소를 나타내었다(Fig 4). Regucalcin 을 과발현 하도록 유전자를 도입한 심근세포의 경우에는 저산소 조건을 처리했을 때, 세포의 생육이 크게 보완되어 정상 조건에서 배양한 심근세포와 큰 차이를 나타내지 않았으며, 그 감소 비율은 15% 정도 수준이었다.

3.5 저산소증 심근세포에서 Regucalcin의 생육관련 신호전달에 미치는 효과

저산소 조건에서 배양한 심근세포에서 regucalcin 이 생육에 관련된 신호 전달자들(PKC, ERK1/2, MEK1/2, Ras) 과 원종양 유전자들 (*c-myc*, *elk-1*, *c-fos*)에 미치는 영향을 각각 면역 분석과 역전사 중합효소연쇄반응 분석 방법을 통해 조사하여 세포 내에서 어떤 신호 전달체계가 관련되어 있는지를 확인하였다. Fig 5A에서 알 수 있듯이, 저산소 조건으로 인해 PKC, ERK1/2, MEK1/2 의 인산화 정도는 크게 감소하였으나, regucalcin 을 도입한 세포에서는 저산소 조건의 처리에도 정상조건에서 배양한 심근세포에서와 같은 인산화 정도를 나타내었다. 반면에 Ras 단백질은 regucalcin 유전자의 도입과 상관없이 저산소 처리에서도 아무런 변화를 보이지 않았다. 이는 regucalcin이 세포

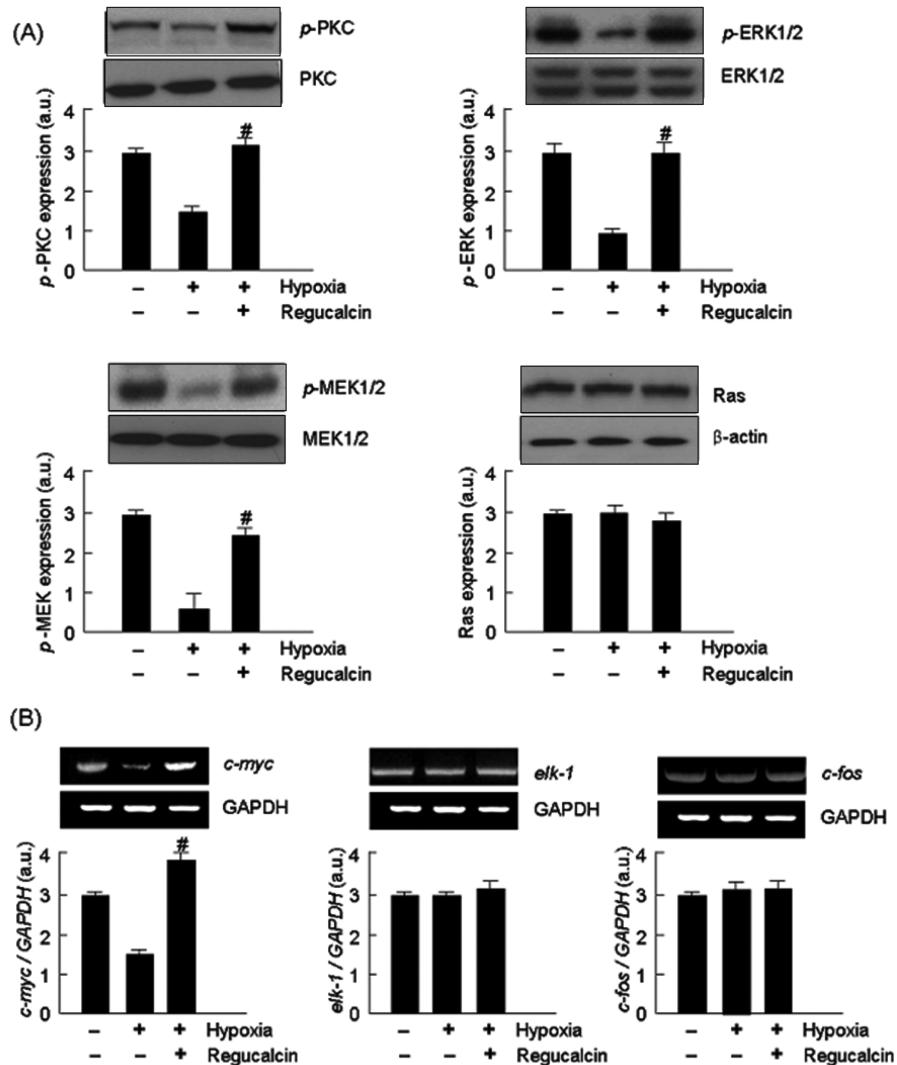


Figure 5. Effect of regucalcin on the proliferation-related signals in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (1×10^6 at 60 mm plates) were incubated at hypoxic conditions for 24 hr. (A) phosphorylation of MEK1/2, ERK1/2, PKC and Ras were detected by immunoblot with antiphospho-antibodies. Data are representative examples of four independent experiments. (B) The expression of protoonco-genes was analyzed by RT-PCR amplification. Amplification products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining ($^{\#}p < 0.005$, compared with hypoxia only).

내 생존 신호전달 체계에서 Ras 관련 경로와는 무관하게, PKC-MEK1/2-ERK1/2 경로에 영향을 미치는 것을 의미한다. 또한, Fig 5B에 나타난 것처럼, 원 중앙 유전자 발현은 regucalcin에 의해 *c-myc* 만이 영향을 받으며, *elk-1* 과 *c-fos* 는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다.

3.6 저산소증 심근세포에서 세포사멸 기전에 미치는 Regucalcin의 영향

저산소 조건으로 처리된 심근세포에서 regucalcin 의 사

멸 저해효과를 caspase-3 활성의 변화로 확인하였다. 심근세포를 저산소 조건으로 24 시간 처리했을 때, 사멸 신호인 caspase-3의 활성은 정상조건에서 배양한 심근세포의 2.5 배 정도 증가하였다(Fig 6A). Regucalcin 을 도입한 심근세포에서는 저산소 조건의 처리에도 불구하고 caspase-3의 활성이 현저히 감소하여 regucalcin 을 도입하지 않은 세포의 50% 수준으로 감소함을 확인하였다. 저산소 조건으로 유발되는 심근세포의 사멸에서 regucalcin 의 사멸 저해기능이 세포 내 여러 사멸 신호를 어떻게 변화시키는지

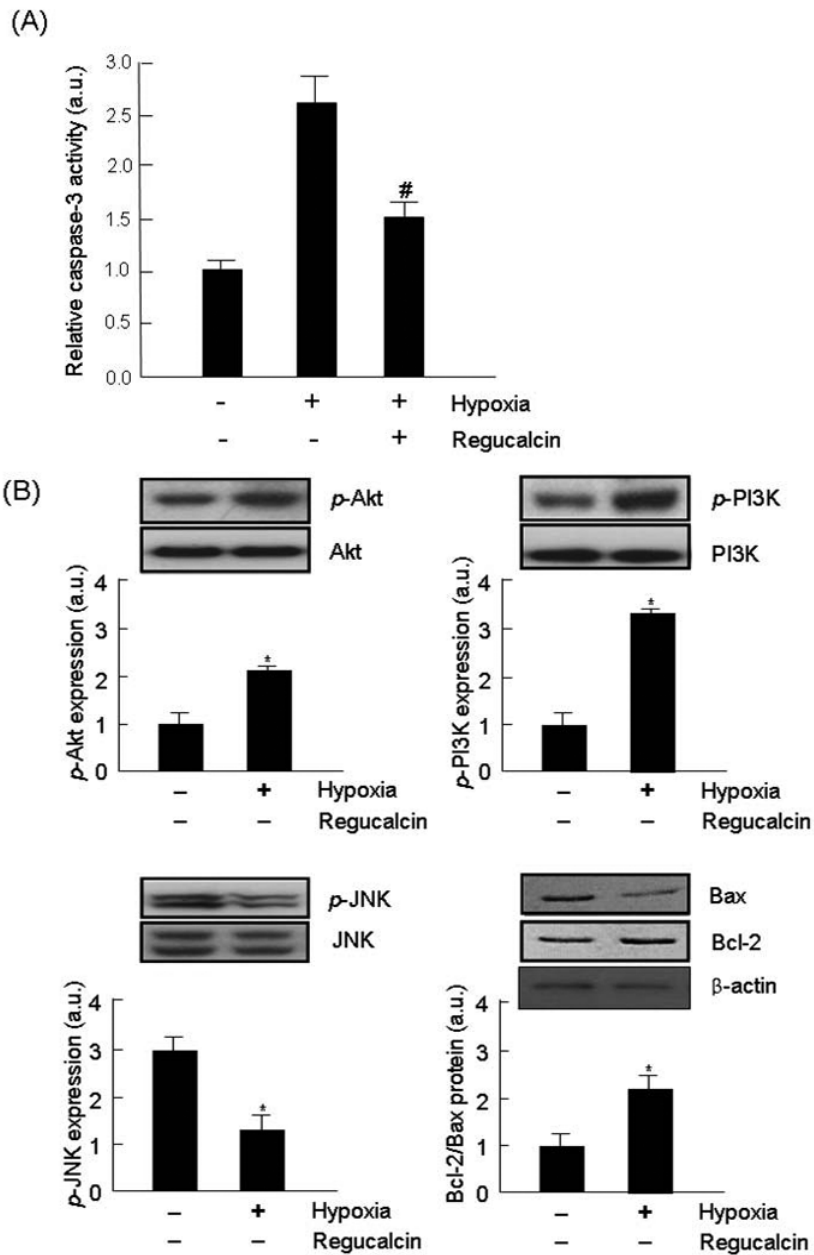


Figure 6. Effects of regucalcin on the apoptosis-related signals in hypoxic cardiomyocytes. (A) Caspase-3 activity was measured using ApoAlert caspase-3 assay kit according to the manufacturer's instructions. (B) Immunoblot analysis was performed with antiphospho-antibodies. Data are representative examples of four independent experiments (* $p < 0.05$, compared with hypoxia only).

를 확인하고자, pro-apoptotic 신호인 Bax, anti-apoptotic 신호인 Bcl-2, caspase 에 독립적인 사멸 신호로 작용하는 JNK, 그리고 생육 신호인 Akt, PI3K의 변화를 면역분석을 통해 확인하였다. Fig 6B에서 보는 바와 같이, regucalcin의 도입은 Bax의 발현은 현저히 감소시키고, Bcl-2의 발현은 반대로 증가시킴으로서 사멸 저해 효과를 나타냄을 알 수 있다. 또한, JNK의 전체 발현양은 동일하지만, 인산화 형태는 감소시킴을 확인하였고 생육 신호의 증가를 나타내었다. 이는 regucalcin의 저산소 조건의 심근 세포에 대한 사멸 저해 효과가 caspase-의존적, 비의존적 방식 모두에 영향을 주고 있음을 의미한다.

TNF- α 가 정상세포와 섬유모세포주 L292에서는 $[Ca^{2+}]$ 농도의 증가를 서서히 유발했지만 regucalcin이 결여된 간세포에서 증강된 세포사멸은 regucalcin이 $[Ca^{2+}]$ 의 항상성을 조절한다는 이전의 결과와 일치한다. Akt는 영양소의 고갈 후에 소뇌의 과립성 신경세포에서와 *c-myc* 이인위적으로 발현된 후의 섬유모세포에서 사멸 저해 신호로써 작용한다는 사실과도 본 연구 결과는 일치함을 보였다. 이러한 결과는 regucalcin 이 보호 작용을 하는데 있어 Akt 활성의 중요함을 제시하고 있기는 하지만 regucalcin 에 의해 사멸로부터 세포를 보호하는데 유발되는 nuclear factor κ B (NF- κ B)와 같은 다른 종류의 생존 요소가 있음을 제시 할 수 있다. 그러나 현재의 연구에서 사멸은 Hep G2 간세포에서 TNF- α 와 Act-D에 의해서 유발되어진다.²¹ 이는 간세포가 보통 TNF 의 세포독성에 대한 저항성을 가지고 있기는 하지만 Act-D가 존재할 때 NF- κ B의 선택적 억제 효과에 의한 세포사멸을 겪기 때문이다. 그러므로 적어도 NF- κ B가 세포 사멸 시에 regucalcin의 억제적 효과에 연관되지 않는다는 점을 배제 할 수 있다.

Akt 활성화효소의 활성은 다양한 선장 인자 수용체가 매개하는 신호전달 체계에서 PI3K의 활성을 유발한다. Akt를 활성화시키는 regucalcin 이 혈청 결핍에 의해 유도되는 세포사멸로부터 세포를 보호한다는 결과는 이전의 결과들과 일치한다. PI3K-Akt 신호의 활성은 인산화 작용을 해서 전-사멸 단백질인 Bad를 불활성화 시키는 항사멸 작용을 하는 단백질 중 Bcl-2 족의 발현을 증가시킬 수 있으며 또한 caspase 활성을 억제하기 위해 mitochondria 에서 일어나는 과정에 작용할 수도 있다.

Regucalcin 이 어떤 방식으로 세포의 생존을 촉진하는 Akt 를 조절하는지에 대한 기작은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 그러나 최근 CHO 세포에서 Ca^{2+}/CaM 이 PI3K의 활성을 증가시킨다는 사실이 보고되었고 이는 PI3K가 CaM 의 결합 부위에 대해 높은 반응성을 보인다는 사실에 의해 뒷받침된다. 더 나아가 CaM 은 PI3K-Akt 신호의 활성을 통해 세포생존을 조절한다는 점이 제시되어 왔다. 따라서 심근세포에서 regucalcin 에 의한 Ca^{2+}/CaM

의 조절 및 세포생존력 변화에 대한 기전을 정확히 밝히기 위한 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 심근세포에서 과발현시킨 regucalcin 이 저산소 조건의 스트레스하에서 증가된 세포 내 Ca^{2+} 수준을 저해함으로써 세포사멸을 억제 시킬 수 있음을 조사하였다. 특히 CaM의 억제제가 Akt 활성을 통한 regucalcin 의 항사멸 작용을 지연시킨다는 것을 보여준 이번 결과는 매우 흥미롭다. Regucalcin의 생리학적인 작용은 불확실하지만 생육에 따라 regucalcin의 발현이 감소한다는 점은 사람의 경우 노화에 따라 증가하는 활성 산소종에 따른 심근손상에 대해 이해하는데 더 많은 도움을 줄 것이다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부(A085136) 연구지원에 의하여 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. JJ Hunter, KR Chien, Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure, *N Engl J Med*, **341**, 1276 (1999).
2. M Yamaguchi, H Takahashi, Y Tsurusaki, Suppressive role of endogenous regucalcin in the enhancement of nitric oxide synthase activity in liver cytosol of normal and regucalcin transgenic rats, *J Cell Biochem*, **88**, 1226 (2003).
3. Y Teshima, M Akao, SP Jones, *et al.*, Cariporide (HOE642), a selective Na^+-H^+ exchange inhibitor, inhibits the mitochondrial death pathway, *Circulation*, **108**, 2275 (2003).
4. PC Supakar, T Fujita, N Maruyama, Identification of novel sequence-specific nuclear factors interacting with mouse senescence marker protein-30 gene promoter, *Biochem Biophys Res Commun*, **272**, 436 (2000).
5. SG Goto, Expression of Drosophila homologue of senescence marker protein-30 during cold acclimation, *J Insect Physiol*, **46**, 1111 (2000).
6. T Fujita, T Shirasawa, N Maruyama, Expression and structure of senescence marker protein-30 (SMP30) and its biological significance, *Mech Ageing Dev*, **107**, 271 (1999).
7. T Fujita, Senescence marker protein-30 (SMP30): structure and biological function, *Biochem Biophys Res Commun*, **254**, 1 (1999).
8. T Fujita, T Shirasawa, N Maruyama, Isolation and characterization of genomic and cDNA clones encoding mouse senescence marker protein-30 (SMP30), *Biochim Biophys Acta*, **1308**, 49 (1996).
9. T Fujita, H Inoue, T Kitamura, *et al.*, Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca^{2+} -pumping activity in Hep G2 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **250**, 374 (1998).
10. N Shimokawa, M Yamaguchi, Calcium administration stimulates the expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in rat liver, *FEBS Lett*, **305**, 151 (1992).

11. M Yamaguchi, M Isogai, Tissue concentration of calcium-binding protein regucalcin in rats by enzyme-linked immunoadsorbent assay, *Mol Cell Biochem*, **122**, 65 (1993).
12. M Yamaguchi, H Kurota, Expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in the kidney cortex of rats: the stimulation by calcium administration, *Mol Cell Biochem*, **146**, 71 (1995).
13. T Fujita, T Shirasawa, H Inoue, *et al.*, Hepatic and renal expression of senescence marker protein-30 and its biological significance, *J Gastroenterol Hepatol*, **13 Suppl**, S124 (1998).
14. T Fayad, V Levesque, J Sirois, *et al.*, Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization, *Biol Reprod*, **70**, 523 (2004).
15. A Ishigami, S Handa, N Maruyama, *et al.*, Nuclear localization of senescence marker protein-30, SMP30, in cultured mouse hepatocytes and its similarity to RNA polymerase, *Biosci Biotechnol Biochem*, **67**, 158 (2003).
16. A Ishigami, T Fujita, S Handa, *et al.*, Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis, *Am J Pathol*, **161**, 1273 (2002).
17. LR Jones, YJ Suzuki, W Wang, *et al.*, Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin, *J Clin Invest*, **101**, 1385 (1998).
18. HD Youn, CM Grozinger, JO Liu, Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4, *J Biol Chem*, **275**, 22563 (2000).
19. HY Sun, NP Wang, F Kerendi, *et al.*, Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **288**, H1900 (2005).
20. M Yamaguchi, R Nakajima, Role of regucalcin as an activator of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in rat heart muscle, *J Cell Biochem*, **86**, 184 (2002).
21. S Matsuyama, T Kitamura, N Enomoto, *et al.*, Senescence marker protein-30 regulates Akt activity and contributes to cell survival in Hep G2 cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 386 (2004).