

**Regucalcin(SMP30)의 백서 심장에서
발현변화 및 저산소성 심근세포에서의
칼슘 항상성 조절기능**

연세대학교 대학원

의 학 과

김 경 은

**Regucalcin(SMP30)의 백서 심장에서
발현변화 및 저산소성 심근세포에서의
칼슘 항상성 조절기능**

지도 설준희 교수

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2005년 6 월 7 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 경 은

김경은의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 6월 7 일

감사의 글

이 논문이 완성되기까지 아낌없는 배려와 용기를 북돋아 주신 설준희 교수님께 고개 숙여 감사 드립니다. 아울러 본 연구를 위하여 각별한 조언을 아끼지 않으신 안덕선 교수님께 깊은 감사를 드리며, 연구의 시작에서부터 마지막 완성에 이르기까지 아낌없는 지도와 세세한 가르침을 주신 황기철 교수님께 감사의 말을 전합니다. 마지막으로 보이지 않게 끊임없이 격려해주신 가족들에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씬

차 례

국문 요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
III. 결과	11
IV. 고찰	19
V. 결론	22
참고 문헌	24
영문 요약	26

그림 차례

그림 1	Expression of regucalcin in rat hearts	11
그림 2	Morphology of cardiomyocytes isolated from neonatal rat	12
그림 3	Effect of regucalcin on ROS production and Ca^{2+} homeostasis in hypoxic cardiomyocytes	13
그림 4	Effect of regucalcin on ROS-stimulated cell death of cardiomyocytes	14
그림 5	Proliferative effect of regucalcin in hypoxic cardiomyocytes	15
그림 6	Effect of regucalcin on the proliferation-related signals in hypoxic cardiomyocytes	16
그림 7	Effect of regucalcin on the apoptosis-related signals in hypoxic cardiomyocytes	18

국 문 요 약

Regucalcin(SMP30)의 백서 심장에서 발현변화 및 저산소성 심근세포에서의 칼슘 항상성 조절기능

Regucalcin (SMP30)은 칼슘 결합 단백질로서 칼슘의 세포내 유입을 차단하여 세포의 사멸을 억제하며, 조직의 성숙 단계에서 높게 발현되나 노화단계에서 그 발현이 감소하는 것으로 알려져 있다. 현재까지, regucalcin의 기능은 주로 간세포와 신장관 표피 세포에서 많은 연구가 이루어졌으나, 심장에서 작용기작은 알려져 있지 않았다. 본 연구에서는 백서의 일령 변화에 따른 심장에서 regucalcin 발현 변화와 저산소 조건으로 유발되는 심근세포사멸 기작에서 regucalcin의 역할을 조사하였다. 백서의 심장에서 regucalcin의 발현은 신생 단계에서부터 생육 일수가 증가함에 따라 증가하다가 7일째에 신생 1일째 발현량의 10배 정도로 최대 발현량을 나타내었으며, 이후로 감소하였다. 심근세포를 저산소 조건에서 24시간 동안 처리했을 때, 활성 산소종의 생성은 약 4배 정도 증가하였으나, regucalcin의 발현은 변화가 없었다. 그러나, regucalcin을 과발현할 수 있는 백터를 심근세포에 도입한 경우, 저산소 조건에서 활성 산소종의 생성이 regucalcin 유전자를 도입하지 않은 경우에 비해 60% 정도 현저하게 감소하였다. 세포내 칼슘 농도도 저산소 조건에서 7배 이상 증가하였으나, regucalcin을 과발현 하도록 유전자를 도입한 세포에서는 과부하된 칼슘의 양이 감소되었다. 또한, 활성 산소종인 H_2O_2 로 유발된 세포사멸에서 regucalcin을 도입은 사멸 정도를 현저하게 감소하여 세포의 생육을 크게 보완되었다. Regucalcin을 도입한 세포를 처리저산소 조건으로 처리한 경우, 저산소로 인한 PKC, ERK, 및 MEK1/2의 인산화 감소를 회복하였으나, Ras 단백질은

regucalcin 유전자의 도입과 상관없이 저산소 처리에서도 아무런 변화를 보이지 않았다. Regucalcin에 의한 원 종양 유전자 발현은 c-myc만이 영향을 받으며, elk-1과 c-fos는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. Regucalcin을 도입한 심근세포에서는 저산소 조건에서 caspase-3의 활성이 도입하지 않은 세포에 비해 50% 이상 현저히 감소하였으며, Bcl2/Bax의 비율도 증가하였다. JNK의 전체 발현량은 동일하지만, 인산화 형태는 감소시킴을 확인하였다. 본 연구의 결과들은 regucalcin의 심장에서의 발현이 일련에 따라 증가하다 감소함을 보여주었으며, 칼슘의 세포내 유입을 조절하므로써 심근세포의 사멸을 억제하는 생존요인으로 작용할 수 있음을 보여주었다.

핵심 되는 말: regucalcin, 심근세포, 활성산소종, 칼슘항상성

Regucalcin(SMP30)의 백서 심장에서 발현변화 및 저산소성 심근세포에서의
칼슘 항상성 조절기능

<지도교수 설준희>

연세대학교 대학원 의학과

김 경 은

I. 서 론

심혈관의 기능에 실질적인 역할을 하는 심근세포는 노화됨에 따라 다양한 구성 성분의 변화가 일어나고 이것은 허혈성 자극에 대해 방어하는 세포의 능력이 감소함을 의미한다¹. 심근에 대한 허혈성 자극은 세포내에 활성 산소종의 생성과 함께 Ca^{2+} 과부하를 유발하여 궁극적으로 세포를 사멸에 이르게 한다. 심근세포 내 Ca^{2+} 은 세포 신호체계에서 중요한 이차 전달물질이고, 세포내 Ca^{2+} 신호 체계 혹은 체계 구성 성분들의 기능 변화는 심근세포의 생리학적 변화를 유발한다.

세포내 Ca^{2+} 의 농도는 세 가지 주요한 구성원인 세포질, 소포체, 및 미토콘드리아에 의해 조절되는데, 세포질에서 Ca^{2+} 완충은 Ca^{2+} 신호에 상당한 영향을 미치고, regucalcin과 같은 세포질의 Ca^{2+} 결합 단백질이 이러한 완충작용에 관여한다고 알려져 있다. 심근세포에 활성산소종인 H_2O_2 를 처리하면, Ca^{2+} 과부하가 초래되며 Ca^{2+} 항상성 관여 단백질들에서 다양한 기능적 변이가 일어나는데², 이 때 전압에 민감한 Ca^{2+} channel 활성화의 직접적인 혹은 K^+ channel의 억제와 연속적인 막의 탈분극화를 통한 간접적인 조절을 통한 증가된 Ca^{2+} 의 유입, 강화된 sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} 분비, SR Ca^{2+} ATPase에 의한 Ca^{2+} 흡수의 억제 혹은 Na^+ /

Ca²⁺ 교환의 직접적인 조절 혹은 증가된 NHE-1 활성화에 대한 이차적인 간접적인 활성을 통한 강화된 Na⁺/Ca²⁺ 교환이 등이 관여하는 것으로 알려져 있다³. 세포내 Ca²⁺농도의 증가하면 Ca²⁺/Mg⁺ 의존적 endonuclease를 자극하고 Ca²⁺/CaM 의존성 효소적 활성을 조절하여 세포사멸이 유발된다.

최근에는, regucalcin (SMP-30; Senescence Marker Protein 30)이 과발현된 Hep G2 세포를 사용하여 regucalcin이 세포막을 관통하는 Ca²⁺ 유출을 강화하여 세포외부의 ATP에 의해 야기되는 세포내 Ca²⁺ 증가를 억제한다는 것이 보고되었으며⁴, 이것은 세포사멸을 방지하는데 regucalcin이 중요한 역할을 수행하는 것을 의미한다. Regucalcin은 간세포와 신장관 상피세포에서 높게 발현되는 단백질로 처음 알려졌으나, 최근에는 폐, 정소, 심장 등과 같은 다양한 기관에서도 그 발현이 확인되었다⁵. 또한, Regucalcin은 조직의 성숙 단계에서 높게 발현되는 단백질이며 노화단계에서 그 발현이 감소되는 것으로 알려져 있으며⁶, 칼슘과 결합하는 능력을 가지고 있어 칼슘의 세포내의 유입을 차단하는 기능을 통해 세포의 사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다⁷. 현재까지, regucalcin의 기능 연구에 의하면, regucalcin은 간과 신장의 성숙과 배아형성의 시기에 발현이 조절되며, 특히 간과 신장 피질의 세포막과 마이크로솜에서 세포내 Ca²⁺ pump 효소의 보존에 연관된다고 알려져 왔으나^{8,9,10}, 심장에서 regucalcin의 역할은 아직 확인되지 않았다^{4,11}.

본 연구에서는 백서의 일령 변화에 따른 심장에서 regucalcin의 발현 변화와 저산소 조건으로 인해 유발된 심근세포의 사멸과정에서 regucalcin의 역할을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 항체 및 시약

phospho-ERK, phospho-Akt, 및 phospho-MEK에 대한 항체는 New England Biolabs(UK)에서 구입하였고 MEK1/2, PKC에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(USA)에서, 그리고 Ras에 대한 항체는 Chemical International(USA)에서 구입하였다. 세포배양배지 (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium)와 소태아혈청은 Gibco Lifetechnologies(USA)에서 구입하였다. 세포증식 분석 시스템 (premix-WST-1 cell proliferation assay kit)은 Takara사의 제품을 사용하였으며, Enhanced-chemiluminiscence (ECL) western blotting kit는 Amersham (USA)에서 구입하였고, 역전사효소 (Reverse Transcription System)은 Promega사 (USA)에서 구입하였다.

2. 백서 신생 심근세포의 분리와 배양

1-3일 된 백서의 심장을 분리하여 PBS에 넣어 left ventricle만 분리한 다음, micro dissecting scissor를 사용해 1mm³ 정도 될 때까지 잘라 주었다. 5ml의 collagenase II (0.8mg/ml, 262units/mg, Gibco BRL)를 넣고 37°C, 5% CO₂의 배양기에 5분간 방치한 후, collagenase II 부유액을 제거하였다. 새로운 collagenase II 5ml을 첨가하여 현탁하고 5분간 더 방치한 다음, 새 튜브에 상등액을 옮겼다. 여기에 세포 배양 배지(10% FBS contained α -MEM, Gibco BRL)을 5ml 첨가한 후, 4 분간 1200 rpm에서 원심 분리하여 세포를 수집하였다. 위의 과정을 tissue가 거의 남지 않을 때까지 7-9번 반복하여, single cell로 분리된 cell suspension을 하나의 튜브에 모았다. 100mm tissue culture plate에 cell을 1-3시간 동안 배양하여 fibroblast만 plate에 부착하게 한 다음,

plate에 붙지 않은 cell을 모아 5×10^5 cells/ml의 농도로 cell을 seeding하여 배양하였다. 4-6시간이 경과한 후, 신선한 배지로 갈아준 다음, 0.1mM 의 BrdU를 첨가하여 fibroblast의 성장을 억제시키면서 배양하였다.

3. 세포내 생성된 활성산소종의 측정

백서 신생 심근세포를 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA; Molecular probe, CA, USA)로 표지하는데, 이 때 탐침인 H₂DCFDA (10uM)는 세포내로 들어가서 세포내 esterase에 의해 acetate group이 해리되면서 비 형광성 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFA)이 내부에 포획된다. 활성산소종에 의해 일어나는 산화반응으로 형광산물인 DCF가 생성되며, 이 염색제는 480nm에서 자극하면 산화된 경우에 한해서만 535nm에서 빛을 발생한다. 표지된 심근세포에서 산화된 염색제는 발광 광도계를 통해 측정되었다.

4. 심근세포내 Ca²⁺ 농도 분석

세포질에 유리되어 있는 Ca²⁺ 농도의 측정은 동일초점 현미경 분석으로 수행되었다. 신생 백서의 심근세포를 laminin (5 g/cm²)으로 코팅된 유리 박편위에 0.1 mM BrdU가 함유된 세포배양배지 (10% FBS를 함유하고 있는 α -MEM, Gibco BRL)에서 하루 동안 배양한다. 배양 후, 세포를 변형된 Tyrode's 용액으로 세척하는데, 이 용액은 0.265 g/l CaCl₂, 0.214 g/l MgCl₂, 0.2 g/l KCl, 8.0 g/l NaCl, 1 g/l glucose, 0.05 g/l NaH₂PO₄, 그리고 1.0 g/l NaHCO₃로 구성되어 있다. 변형된 Tyrode's 용액상에 fluo-4의 acetoxymethyl ester (Fluo-4 AM, Molecular Probes, Eugene, OR) 2uM을 첨가하여 암실, 상온에서 20 분 동안 반응한다. 형광 이미지는 argon laser 동일초점 현미경 (Leica, Solms, Germany)을 통해 얻었다. Fluorochrome은 argon laser의

488nm에서 자극되고 발생하는 빛은 510-560 nm의 띠 투과성 필터를 통해 모아지며, 세포내 유리 Ca^{2+} 의 상대적 변화는 형광 강도의 측정에 의해 결정되었다.

5. 면역 분석

심근세포는 저산소증을 이용한 다양한 실험조건하에서 처리되었다. 실험 목적에 따라 regucalcin 유전자의 도입을 거치고 저산소 조건에서 배양된 다음, 수집된 세포는 1mM PMSF와 함께 Cell Lysis Buffer(20mM Tris-HCl;pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA pH8.0, 1mM EGTA;pH8.0, 1% Triton, 1mM Na_3VO_4 , 1mM β -glycerphosphate, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1ug/ml leupeptin) (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)을 이용하여 4°C에서 15분 동안 용해하고 단백질 용해액의 농도는 Bradford protein assay kit(Bio-Rad)를 이용하여 측정하였다. 전체 세포 용해액으로부터 같은 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에 전기영동 (SDS-PAGE)후 메탄올로 처리된 polyvinilidene difluoride막 (millipore Co, Bedford, MA, USA)에 옮긴다. 5% skim milk(Bio-Rad)을 포함한 TBS-t (20mM Tris, 137mM NaCl, 0.1% Tween 20; pH 7.6)에 상온에서 60분 동안 막을 blocking 한 다음 상온에서 1시간 내지 4°C에서 밤새도록 1차 항체로 반응하였다. 이 과정이 끝나면 10분 동안 3번씩 TBS-T로 닦아주고 상온에서 horseradish peroxidase(HRP)-conjugate된 이차 항체를 45분 동안 반응하였다. 잘 닦아주고 난 뒤 밴드는 enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Santa Cruz Biotechnology)로 조사한다. 밴드의 강도는 photo-image system (Molecular Dynamic, Uppsala, Sweden)을 사용하여 조사하였다.

6. RT-PCR analysis

원 종양유전자인 c-fos, c-myc, elk-1의 발현 정도를 분석하기 위하여 역전사 중합효소연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 실시하였다.

전체 RNA는 Ultraspec-II™ RNA system (Biotex Laboratories Inc.)를 이용하여 분리하였으며, AMV 역전사 효소를 사용하여 분리된 전체 RNA로부터 단일가닥의 cDNA를 합성하였다. 1µg의 전체 RNA에 1×역전사 완충용액 (10mM Tris-HCl; pH9.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 0.5units의 RNase 억제제, 0.5mg의 oligo dT, 15units의 역전사 효소를 모두 첨가하여 42°C에서 15분간 반응시켰다. 그 다음 99°C에서 5분간 열을 가한 후 0-5°C에서 5분간 방치한다. 증합효소연쇄반응은 각각의 primer를 사용하여 35cycle 반복하여 수행하였다. 각각의 primer는 다음과 같다. c-fos; 5'ACCATGATGTTCTCGGGTTTCAA-3', 5'-CTCTGTAATGCACCAGCTCAGTCA-3', c-myc; 5'-GAAGTGACCGACTGTTCTATGACT-3', 5'-CGCAACCAGTCAAGTTCTCAAGTT-3', elk-1; 5'-TACATCGTAGCGAATCAATCAATCCGTG-3', 5'-TGGTGGTGGTAGTATAGTCATGGCTT-3'

7. Regucalcin 발현 벡터 제조 및 도입

진핵세포 발현 벡터인 pcDNA3.1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands)에 백서의 regucalcin 유전자를 크로닝한 다음, 심근세포로의 도입은 Lipofectamine PLUS™ reagent(Gibco BRL)을 사용하여 수행하였다. 즉, 60mm 배양접시에 배양된 신생 백서의 심근세포(5×10^5 cell per plate)를 혈청이 없는 DMEM으로 두 번 세척한다. Lipofectamine PLUS™ reagent는 혈청이 없는 DMEM으로 희석하고, 2µg의 DNA도 배지와 혼합한다. 15분 후 DNA 용액과 Lipofectamine PLUS™ reagent 희석액을 혼합하고 다시 15분이 지난 후 세포가 들어 있는 배양접시에 첨가한다. 37°C의 CO₂ 배양기에 3시간 배양 후 배지를 10% FBS가 들어있는 DMEM으로 교환한다. 세포는 37°C에서 48시간 더 배양하고 벡터 도입의 효과를 실험한다.

8. 저산소 처리 및 세포 생존도 분석

배양 접시에 세포가 80~90% 정도 배양되었을 때, 37°C 배양기에서 1시간 동안 배양한 후 저산소 조건으로 24시간 배양하였다. 저산소 조건의 배양은 37°C로 유지되고 계속적으로 10% CO₂, 5% H₂, 85% N₂의 혼합기체가 공급되는 airtight humidified chamber (Anaerobic Environment, ThermoForma, Marietta, OH, USA)에서 이루어졌는데, 이 때 배지는 1% 소태아 혈청만이 들어 있는 배지를 사용하였다. 대조군의 경우는 백터를 도입하지 않은 상태에서 동일하게 저산소 조건으로 배양하였다. 세포의 생존도는 MTT 분석에 의해 측정하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (5mg/ml)을 PBS에 용해시켰다. 세포는 24시간 동안 4-well 접시에 배양한 뒤 저산소 배양기에 옮겼다. 저산소 배양기에서 배양한지 6시간, 24시간과 48시간 뒤에 배양된 배지를 제거하고, 0.5ml의 MTT 용액을 첨가하였다. 그 뒤 배양용기를 다시 배양기에서 배양하였다. 3시간 후에 MTT 용액을 제거하고 MTT/formazan을 용해시키기 위해 0.5ml의 dimethylsulfoxide로 추출했다. 추출 시약을 사용하여 공백값을 설정하고 570nm에서의 흡광도를 측정했다.

9. Caspase-3 활성 분석

심근세포에서 caspase-3의 활성은 DEVD-pNA의 가수분해에 의한 chromopore인 p-nitroanilide (pNA)의 방출을 측정하는 방법에 의해 Apoalert™ CPP32/caspase-3 assay kit(BD Science, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분광광도 측정하였다. 1 x 10⁶ 세포를 60mm 배양 접시에 24시간 배양 후, pcDNA3.1-regucalcin 을 도입한 다음 저산소 배양기에서 24시간 배양하였다. 세포를 모으고 차가운 세포 용해 용액으로 고르게 섞어준 뒤 10분 동안 얼음에 방치하였다. 세포 용해액을 원심분리기를 이용하여

수집하고 상등액을 새 튜브에 옮긴 다음, 단백질 농도는 Bradford assay(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에 의해 결정했다. 같은 양의 단백질이 들어있는 용해액을 기질과 반응시켰는데, 각 assay를 위한 50ul의 세포 용해액에 100~300ug의 단백질이 희석되어 있는 것이 적당하다. 10mM dithiothreitol (DTT)을 포함하는 2배의 반응 완충액 50ul를 첨가하고 각 표본마다 4mM의 DEVD-pNA를 5ul씩 넣어 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. Caspase-3의 활성은 405nm에서 microtiter plate reader를 사용하여 측정하며 기준 곡선 (standard curve)은 standard CPP32를 chromogenic substrate를 이용하여 그렸다.

III. 결 과

1. 백서 심장에서 regucalcin의 발현

백서의 생육 정도에 따른 regucalcin의 발현 변화를 확인하기 위하여, 일령에 따라 적출한 백서의 심장에서 regucalcin의 발현 정도를 면역분석하였다. 백서의 심장에서 regucalcin의 발현은 그림 1에서 보는 바와 같이, 신생 단계에서부터 생육 일수가 증가함에 따라 증가하다가 7일째에 신생 1일째 발현량의 10배 정도의 최대 발현량을 나타내었다. 그리고, 14일째까지 유사한 발현 정도를 보이다가 점차 감소하여 84일째 생육단계의 심장에서는 발현량이 7일째에 비해 절반 이하로 감소함을 확인하였다. 이로써 regucalcin이 신생단계에서부터 왕성한 생육을 보이는 단계까지는 높게 발현되나 노화단계로 들어서면 점차 감소한다는 사실을 알 수 있었다.

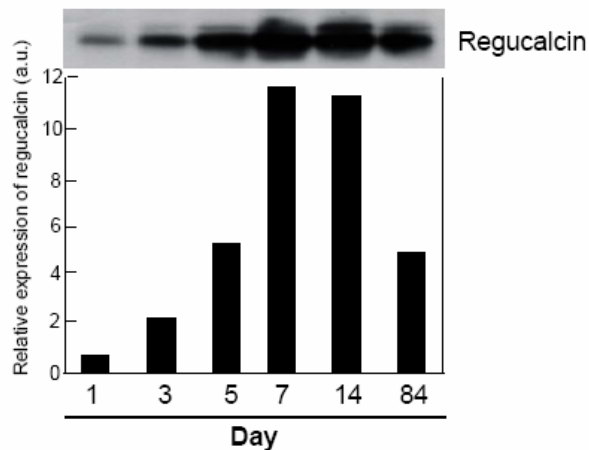


Fig. 1. Expression of regucalcin in rat hearts. Expression levels of regucalcin in rat heart with days after birth were determined by immunoblot with anti-regucalcin antibody and relative amounts were estimated using densitometry.

2 저산소증 심근세포에서, regucalcin이 활성산소종 생산과 Ca^{2+} 항상성에 미치는 영향

백서의 일령의 증가에 따른 regucalcin이 활성산소종의 조절과 칼슘 항상성 조절에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 백서 신생 심근세포를 분리하였다. 1-3일 된 백서의 심장을 collagenase II 효소를 이용하여 0.1mM 의 BrdU를 첨가하여 fibroblast의 성장을 억제시키면서 심근세포를 배양한 다음, 1일이 경과되면 plate상에서 beating을 관찰할 수 있고 4일 이후로는 심근 세포의 beating이 관찰되지 않아 이 후의 실험에서는 심근세포의 분리 후 2일째 배양된 세포를 사용하였다 (그림 2).

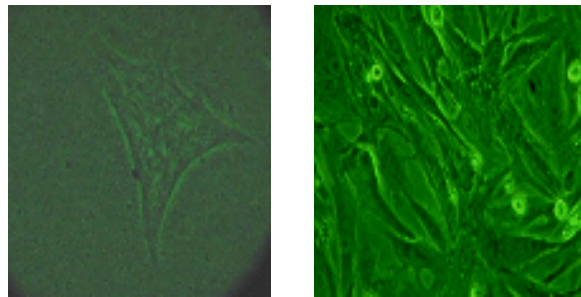


Fig. 2. Morphology of cardiomyocytes isolated from neonatal rat

분리된 백서의 심근세포를 저산소 조건으로 처리한 뒤, regucalcin의 영향을 확인한 결과, 그림 3에서, 심근세포를 저산소 조건에서 24시간 동안 처리했을 때, 활성 산소종의 생성은 약 4배 정도 증가하였으나, regucalcin의 발현은 변화가 없었다. 그러나, regucalcin을 과발현할 수 있는 벡터를 심근세포에 도입한 후, 저산소 조건을 동일하게 24시간 처리했을 때, 활성 산소종의 생성이 regucalcin 유전자를 도입하지 않은 경우에 비해 60% 정도 현저하게 감소하였다. 그림 3에서 알 수 있듯이,

세포내 칼슘 항상성의 변화도 유사한 양상을 나타내었다. 현미경 사진에서 붉은 색으로 나타나는 칼슘의 양이 저산소 조건을 처리했을 때, 그렇지 않은 세포보다 7배 이상 증가하므로써 과부하 상태가 됨을 확인하였으나 regucalcin을 과발현 하도록 유전자를 도입한 후 저산소 조건을 처리한 경우에 칼슘의 양이 현저하게 감소되어 칼슘 항상성 유지에 효과가 있음을 확인하였다.

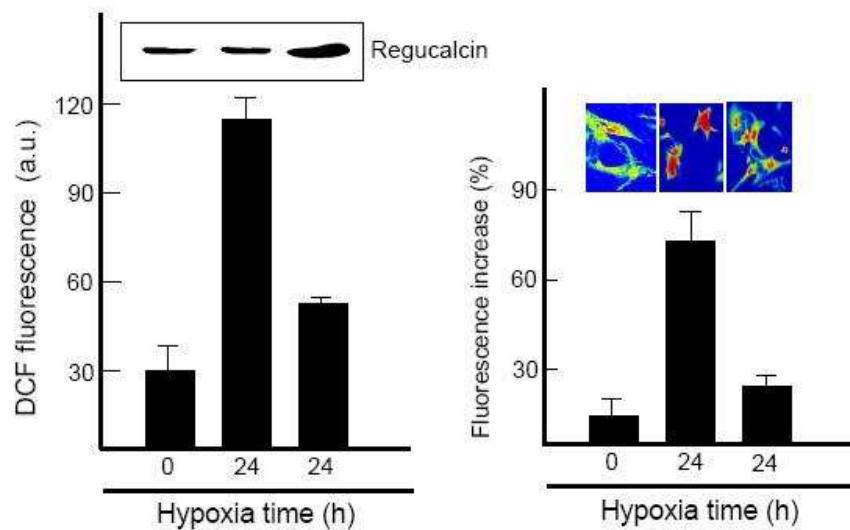


Fig. 3. Effects of regucalcin on ROS production and Ca^{2+} homeostasis in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (1×10^4 cells per well) were incubated at hypoxic conditions for 24 hours. Left, Cells were further treated with H_2DCFDA ($5 \mu M$) for 10 min and 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. Right, Confocal fluorescent image of neonatal rat cardiomyocytes was obtained loading with fluoro-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.

3. 활성산소종에 의해 자극된 심근세포의 사멸에 대한 regucalcin의 영향

세포내 생육 및 사멸 기전에 관여하는 활성산소종의 한 종류인 H_2O_2 를 다양한 농도로 세포의 처리하여 심근세포 사멸을 유도한 조건에서, regucalcin이 활성산소종으로 유발된 세포사멸에 어떤 영향을 가지는지를 regucalcin을

과발현시켜 확인하였다. H_2O_2 를 0에서부터 1mM까지 농도별로 처리했을 때, 400 μ M 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. 그림4에서 보는 바와 같이, regucalcin을 과발현시킨 심근세포의 경우에는 정상의 심근세포에서 급격한 사멸을 유도했던 600 μ M의 농도에서도 H_2O_2 를 처리하지 않은 경우와 동일한 정도의 사멸 정도를 나타내므로서

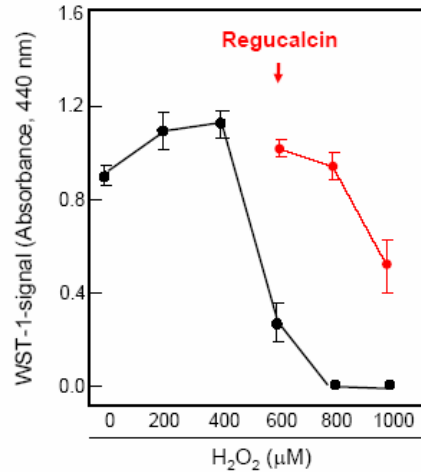


Fig. 4. Effect of regucalcin on ROS-stimulated cell death of cardiomyocytes. The cells with or without regucalcin (5×10^4 cells per well) were stimulated with various concentrations of H_2O_2 for 48 h. WST-1 reagent was added to each well and incubated for 3hrs at 37 °C. Cell proliferation was measured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

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

4. 저산소증 심근세포에서 regucalcin이 생육에 미치는 효과

저산소 조건으로 처리한 심근세포에서 regucalcin이 생육에 미치는 영향을 확인하였다. 심근세포를 저산소 조건으로 처리했을 때, 생육의 정도는 정상 조건에서 배양한 심근세포에 비해 60% 이상의 생육감소를 나타내었다 (그림 5). Regucalcin을 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.

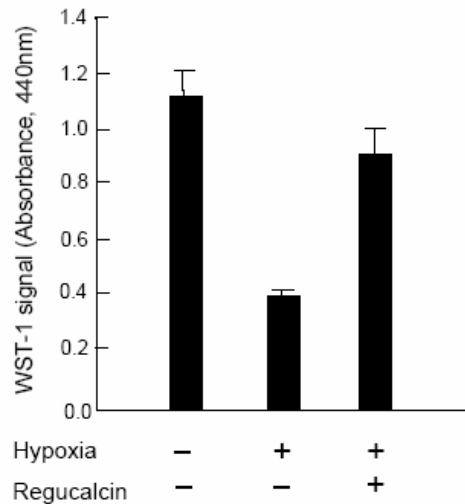


Fig. 5. Proliferative effect of regucalcin in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (5×10^4 cells per well) were incubated at hypoxic conditions for 24 hours. WST-1 reagent was added to each well and incubated for 3hrs at 37 °C. Cell proliferation was measured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

5. 저산소증 심근세포에서 regucalcin이 생육관련 신호전달에 미치는 효과

저산소 조건에서 배양한 심근세포에서 regucalcin이 생육에 관련된 신호 전달자들(PKC, ERK, MEK1/2, Ras)과 원종양 유전자들 (c-myc, elk-1, c-fos)에 미치는 영향을 각각 면역 분석과 RT-PCR 방법을 통해 조사하여 세포내에서 어떤 신호 전달체계가

관련되어 있는지를 확인하였다. 그림 6에서 알 수 있듯이, 저산소 조건으로 인해 PKC, ERK, MEK1/2의 인산화 정도는 크게 감소하였으나, regucalcin을 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

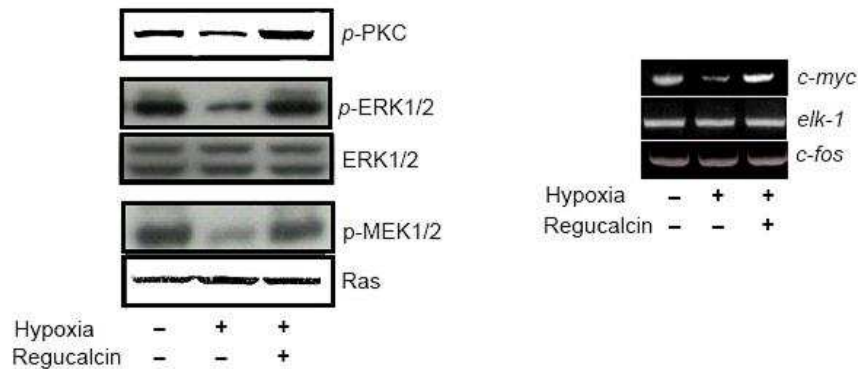


Fig. 6. Effects of regucalcin on the proliferation-related signals in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (1×10^6 at 60 \emptyset plates) were incubated at hypoxic conditions for 24 hours. Left, the phosphorylation of MEK1,2, ERK1,2, and PKC were detected by immunoblots with antiphospho-antibodies and expression levels of Ras and ERK1,2 were measured by immunoblot. Data are representative examples of four independent experiments. Right, 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.

세포내 생존 신호전달 체계에서 Ras 관련 경로와는 무관하게, PKC-MEK1/2-ERK 경로에 영향을 미치는 것을 의미한다. 또한, 그림 6에 나타난 것처럼, 원 종양 유전자 발현은 regucalcin에 의해 c-myc만이 영향을 받으며, elk-1과 c-fos는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다.

6. 저산소증 심근세포에서 regucalcin이 세포사멸 기전에 미치는 영향

저산소 조건으로 처리된 심근세포에서 regucalcin의 사멸 저해효과를 caspase-3 활성의 변화로 확인하였다. 심근세포를 저산소 조건으로 24시간 처리했을 때, 사멸 신호인 caspase-3의 활성은 정상조건에서 배양한 심근세포에 비해 2.5배 정도 증가하였다 (그림 7). Regucalcin을 도입한 심근세포에서는 저산소 조건의 처리에도 불구하고 caspase-3의 활성이 현저히 감소하여 regucalcin을 도입하지 않은 세포의 50% 수준으로 감소함을 확인하였다. 또한, 세포내 대표적인 생존 신호인 Akt와 PI3K의 인산화가 regucalcin을 도입한 심근세포에서 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였다. 한편, 저산소 조건으로 유발되는 심근세포의 사멸에서 regucalcin의 사멸 저해기능이 세포내 여러 사멸 신호를 어떻게 변화시키는지를 확인하고자, pro-apoptotic 신호인 Bax, anti-apoptotic 신호인 Bcl-2, 그리고 caspase에 독립적인 사멸 신호로 작용하는 JNK의 변화를 면역분석을 통해 확인하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이, regucalcin의 도입은 Bax의 발현은 현저히 감소시키고, 항사멸 신호인 Bcl-2의 발현은 반대로 증가시킴으로서 사멸 저해 효과를 나타냄을 알 수 있다. 또한, JNK의 전체 발현량은 동일하지만, 인산화 형태는 감소시킴을 확인하였다. 이 결과는 regucalcin의 저산소 조건의 심근세포에 대한 사멸 저해 효과가 caspase- 의존적, 비의존적 방식 모두에 영향을 주고 있음을 의미한다.

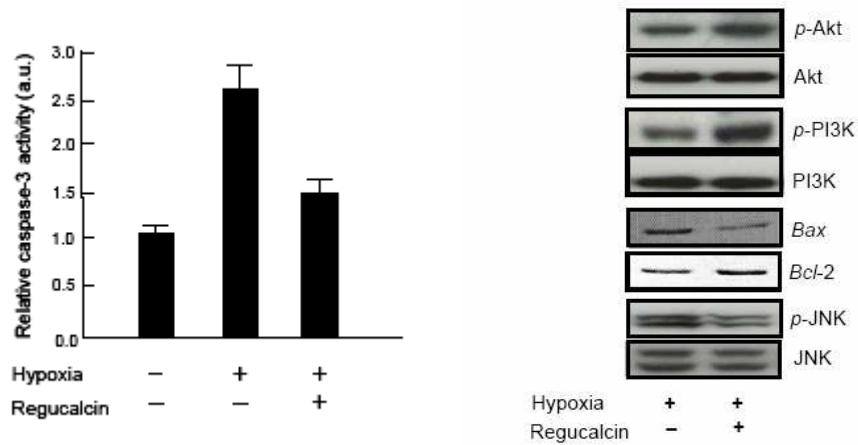


Fig. 7. Effects of regucalcin on the apoptosis-related signals in hypoxic cardiomyocytes. Regucalcin-transfected or nontransfected cardiomyocytes (1×10^6) were incubated at hypoxic conditions for 24 hours. Left, caspase-3 activity was measured using ApoAlert caspase-3 assay kit (Clontech, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Right, the phosphorylation of Akt, PI3K, and JNK were detected by immunoblots with antiphospho-antibodies and expression levels of Bax, Bcl-2, and JNK were measured by immunoblot. Data are representative examples of four independent experiments

IV. 고찰

본 연구에서는 백서의 심장에서 regucalcin이 신생단계에서부터 왕성한 생육을 보이는 단계까지는 높게 발현되나 노화단계로 들어서면서 점차 감소한다는 사실을 확인하였으며 regucalcin을 심근세포에 과발현시켰을 때, 저산소 조건에 의해 증가된 활성산소종과 세포내 Ca^{2+} 농도를 조절함으로써 세포사멸이 억제된다는 사실을 밝혔다. 현재까지의 연구들에서 regucalcin이 TNF- α 와 actinomycin D (Act-D)에 의해 유도된 사멸로부터 Hep G2 간세포를 보호하며 또한, 혈청 결핍시 유발되는 사멸과정도 억제한다는 것이 보고되었다. 이러한 보호 작용은 regucalcin이 도입된 세포에서 대표적인 세포내 생존신호인 serine, threonine 활성화효소(kinase), Akt,의 활성화에 의한 것임이 확인되었으며, Akt의 활성화는 calmodulin(CaM)의 억제제인 trifluoperazine에 의해 저해됨으로서 calmodulin이 중요한 매개인자임이 알려졌다¹². 세포내 Ca^{2+} 농도의 증가가 세포 사멸을 유발하는데 매우 중요한 요소임은 잘 알려져 있는데, regucalcin이 백서 심근세포의 sarcoplasmic reticulum에서 Ca^{2+} pump 활성화효소인 Ca^{2+} -ATPase를 활성화시킬 수 있음이 보고되었다¹³. 따라서 본 연구에서 백서의 심근세포에 대한 저산소 조건으로 유발되는 칼슘의 과부하로 인한 세포의 사멸을 억제하는데 있어 regucalcin의 역할을 규명하고자 하였다. 먼저, 일령에 따른 regucalcin의 발현은 신생 단계에서부터 생육 일수에 따라 14일째까지 초기의 10배 정도의 최대발현량을 보이다가 점차 감소하여 84일째 생육단계의 심장에서는 발현량이 7일째에 비해 절반 이하로 감소함을 확인하였다. 이로써 regucalcin이 심장조직에서도 다른 조직에서와 마찬가지로 신생단계에서부터 왕성한 생육을 보이는 단계까지는 높게 발현되나 노화단계로 들어서면 점차 감소한다는 사실을 알 수 있었다. 또한, 저산소 조건으로 처리된 심근세포에서 regucalcin을 과발현시킨

경우에는 활성 산소종의 생성이 regucalcin 유전자를 도입하지 않은 경우에 비해 60% 정도 현저하게 감소하였으며 칼슘의 양도 현저하게 감소되어 칼슘 항상성 유지에 효과가 있음을 확인하였다. H₂O₂를 처리하여 심근세포 사멸을 유도한 조건에서도 regucalcin을 과발현시킨 심근세포의 경우에는 정상의 심근세포에서 급격한 사멸을 유도했던 600μM의 농도에서도 H₂O₂를 처리하지 않은 경우와 동일한 정도의 사멸 정도를 나타내므로써 활성 산소종 즉, H₂O₂로 유발된 세포사멸 기작을 저해함을 알 수 있었다. 저산소 조건으로 인해 PKC, ERK, MEK1/2의 인산화 정도는 크게 감소하였으나, regucalcin을 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 세포내 생존 신호전달 체계에서 Ras 관련 경로와는 무관하게, PKC-MEK1/2-ERK 경로에 영향을 미치는 것을 의미한다. 또한, 원 종양 유전자 발현은 regucalcin에 의해 c-myc만이 영향을 받으며, elk-1과 c-fos는 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. 또한 regucalcin을 도입한 세포의 저산소 조건 처리시 세포사멸과 관련된 가장 주요한 매개체인 caspase-3의 활성과 Bax의 발현이 현저히 감소되고, 항사멸 신호인 Bcl-2의 발현은 반대로 증가시킴으로써 사멸 저해 효과를 나타냄을 알 수 있다. 또한, JNK의 전체 발현량은 동일하지만, 인산화 형태는 감소시킴을 확인하였다. 이 결과는 regucalcin의 저산소 조건의 심근세포에 대한 사멸 저해 효과가 caspase-의존적, 비의존적 방식 모두에 영향을 주고 있음을 의미한다. 이는 regucalcin이 세포의 사멸을 억제하고 생존력을 향상시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 말해 준다. 또한, 세포 내 대표적인 생존 신호인 Akt와 PI3K의 인산화가 regucalcin을 도입한 심근세포에서 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였다. PI3K-Akt 신호의 활성화는 인산화 작용을 통해서 사멸

단백질인 Bad를 불활성화시키는 항사멸 작용을 하는 단백질 중 Bcl-2족의 발현을 증가시킬 수 있으며 또한 caspase 활성을 억제하기 위해 mitochondria에서 일어나는 과정에 작용할 수도 있다는 것을 의미한다. Regucalcin이 어떤 방식으로 세포의 생존을 촉진하는 Akt를 조절하는지에 대한 기작은 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 그러나 최근 CHO세포에서 Ca^{2+}/CaM (calmodulin)이 PI3K의 활성을 증가시킨다는 사실이 보고되었고⁴, 더 나아가 CaM은 PI3K-Akt 신호의 활성을 통해 세포생존을 조절한다는 점이 밝혀졌다. 따라서 앞으로의 연구에서는 CaM과 regucalcin의 연관성도 조사돼야 할 것이다. 이 연구결과들에서 생육에 따라 regucalcin의 발현이 감소한다는 점은 사람의 경우 노화에 따라 증가하는 활성산소종에 따른 심근손상에 대한 이해를 폭넓게 해 줄 것이며, 세포내 생존과 사멸에 대한 신호체계의 규명은 regucalcin의 세포내 역할을 이해하는데 좋은 단서를 제공하는 것이다. 그리고, regucalcin이 활성 산소종의 생성과 칼슘의 과부하를 억제한다는 사실은 이 단백질의 심근손상을 억제할 수 있는 약리학적인 이용 가능성을 제시한다.

V. 결 론

본 연구는 백서의 심장에서 일령에 따른 Regucalcin (SMP-30)의 발현 정도를 확인하고, 저 산소 조건으로 유발되는 활성 산소종의 생성과 칼슘 항상성 변화에 regucalcin이 미치는 영향과 심근세포의 생존 신호와 사멸 신호의 변화, 그리고 신호 전달체계에서 어떤 경로에 관여하는지를 확인하고자 하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 백서의 심장에서 regucalcin의 발현은 신생 단계에서부터 생육 일수가 증가함에 따라 증가하다가 7일째에 최대 발현량을 보였으며, 14일째부터 점차 감소하였다.

2. Regucalcin을 과발현할 수 있는 백터를 도입한 심근세포에서는 저산소 조건에서, 활성 산소종의 생성과 세포내 칼슘 농도의 증가량이 도입하지 않은 경우에 비해 현저하게 감소하였다. 또한, 활성 산소종인 H_2O_2 를 처리하여 유발된 세포 사멸을 경감하여 세포 생육을 보완해 주었다.

3. 저산소 조건으로 인해 심근세포에서 PKC, ERK, MEK1/2의 인산화 정도는 크게 감소하였으나, regucalcin을 도입한 세포에서는 정상 배양한 심근세포에서와 같은 인산화 정도를 나타내었고, Ras 단백질은 regucalcin 유전자의 도입과 상관없이 아무런 변화를 보이지 않았다. 이로써, 세포내 생존 신호전달 체계에서 regucalcin이 Ras 관련 경로와는 무관하게, PKC-MEK1/2-ERK 경로에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 원 종양 유전자 발현은 regucalcin에 의해 c-myc만이 영향을 받으며, elk-1과 c-fos는 영향을 받지 않았다.

4. Regucalcin을 도입한 심근세포는 저산소 처리에도 caspase-3의 활성이 현저히

감소하였으며, 세포내 대표적인 생존 신호인 Akt와 PI3K의 인산화는 regucalcin을 도입한 심근세포에서 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타나는 것을 확인하였다. 또한, regucalcin의 도입은 Bax의 발현은 현저히 감소시키고, 항사멸 신호인 Bcl-2의 발현은 반대로 증가시켰다. 또한, JNK의 전체 발현량은 동일하지만, 인산화 형태는 감소시키므로써 regucalcin의 저산소 조건의 심근세포에 대한 사멸 저해 효과가 caspase-의존적, 비의존적 방식 모두에 영향을 주고 있음을 확인하였다.

이상의 결과에서 심근세포에서 과발현시킨 regucalcin이 저산소 조건의 스트레스하에서 활성산소종의 생성과 칼슘 과부하를 저해하므로써 세포의 생존성을 증가시킴을 보여주었다. 세포내 생존신호의 강화와 사멸신호의 억제 결과가 위의 사실을 뒷받침해주며, 이러한 실험결과는 regucalcin이 심장에서 노화에 따라 증가하는 활성 산소종에 의한 심근손상 기작을 이해하는데 많은 도움을 주며, 심근손상을 경감할 수 있는 유용한 수단으로서의 가능성을 제시하였다.

참고문헌

1. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999; 341:1276-1283.
2. Masayoshi Y, Hiroko T, Yoshinori T. 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* 2003;1226-1234.
3. Yasushi T, Masaharu A, Jones, SP, Marbán, E. Cariporide (HOE642), a Selective Na⁺-H⁺ Exchange Inhibitor, Inhibits the Mitochondrial Death Pathway. *Circulation* 2003;108:2275-2281
4. Fujita T, Inoue H, Kitamura T, Sato N, Shimosawa T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 (SMP30) rescues cell death by enhancing plasma membrane Ca(2+)-pumping activity in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;250:374-380.
5. Mori T, Ishigami A, Seyama K, Onai R, Kubo S, Shimizu K, Maruyama N, Fukuchi Y. Senescence marker protein-30 knockout mouse as a novel murine model of senile lung. *Pathol Int.* 2004 Mar;54(3):167-173.
6. Fujita T, Shirasawa T, Uchida K, Maruyama N. Gene regulation of senescence marker protein-30 (SMP30): coordinated up-regulation with tissue maturation and gradual down-regulation with aging. *Mech Ageing Dev.* 1996 Jun 25;87(3):219-229.
7. Ishigami A, Fujita T, Handa S, Shirasawa T, Koseki H, Kitamura T, Enomoto N, Sato N,

- Shimosawa T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1273-1281.
8. Shimokawa N, Yanaguchi M. Calcium administration stimulates the expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in the liver. *FEBS Lett.* 1992;305:151-154.
 9. Yamaguchi M, Isogai M. Tissue concentration of calcium binding protein regucalcin in rats by enzyme-linked immunoabsorbant assay. *Mol Cell Biochem.* 1993;122:65-68.
 10. Yamaguchi M, Kurota H. Expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in the kidney cortex of rats: the stimulation of calcium administration. *Mol Cell Biochem.* 1995;146:71-77.
 11. Fujita T, Shirasawa T, Inoue H, Kitamura T, Maruyama N. Hepatic and renal expression of senescence marker protein-30 and its biological significance. *J Gastroenterol Hepatol.* 1998;13 Suppl:S124-31.
 12. Syujirou M, Tsuneo K, Nobuyuki E, Toshiko F, Akihito I, et al. Senescence marker protein-30 regulates Akt activity and contributes to cell survival in Hep G2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321:386-390
 13. Yamaguchi M, Nakajima R. Role of regucalcin as an activator of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in rat heart muscle. *J Cell Biochem.* 2002;86:184-193

Abstract

Differential expression of regucalcin(SMP30) at rat hearts and its function in hypoxic cardiomyocytes

Kyeong Eun Kim

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jun Hee Sul)

Expression of regucalcin (SMP30) is maintained at a high level throughout the tissue maturation process but is dramatically decreased during senescent stages. It is known that regucalcin is a Ca^{2+} -binding protein and could rescue cells from cell death caused by calcium influx. Regucalcin has been proposed to be involved in the maintenance of intracellular Ca^{2+} pump enzymes in the plasma membrane and microsomes of liver and renal cortex cells. However, the roles of regucalcin in heart were not elucidated yet. In this study, the expression levels of regucalcin were primarily measured in hearts of rats from the neonatal to the senescent stages of life. Its roles were also estimated in death process induced by hypoxia in cardiomyocytes. Although expression levels of regucalcin were gradually increased from neonatal stage to 7 day-age (about 10 folds), its expression was decreased with age. The generation of reactive oxygen species (ROS) was increased to 4-folds in cardiomyocytes under hypoxia but expression of regucalcin was not changed. However, overexpression of regucalcin significantly decreased the generation of ROS in hypoxic cardiomyocytes. Besides, transfection of regucalcin displayed suppressive effect on increase of cellular $[\text{Ca}^{2+}]$ at hypoxic condition and H_2O_2 -induced cell

death was significantly reduced in regucalcin-transfected cardiomyocytes. Viability of regucalcin-transfected cardiomyocytes was also increased at hypoxic conditions. Overexpression of regucalcin significantly increased the phosphorylation of PKC, ERK, MEK1/2 compared with non-transfected cardiomyocytes at hypoxic conditions, but expression of ras protein was not changed regardless of transfection of regucalcin. At hypoxic conditions, regucalcin-transfected cardiomyocytes displayed increase of Bcl2/Bax ratio and reduction of JNK phosphorylation, compared to cardiomyocytes only. Caspase-3 activity was also reduced in regucalcin-transfected cardiomyocytes at hypoxic conditions. Proto-oncogene, expression of c-myc only was affected by regucalcin, but elk-1 and c-fos were not affected. These results indicate that the expression of regucalcin in heart was increased in order to ages, but decreased in senescent stages and regucalcin could rescue cells from cell death caused by calcium influx in heart.

Key Words : regucalcin, cardiomyocyte, ROS; reactive oxygen species,
calcium homeostasis