

## 쥐 심근에서 Protein Kinase C $\epsilon$ 발현에 의한 허혈 손상으로부터의 보호효과

좋은강안병원 내과,<sup>1</sup> 동강병원 내과,<sup>2</sup> 한사랑병원 내과,<sup>3</sup> 해동병원 내과,<sup>4</sup>  
충북대학교 의과대학 내과학교실,<sup>5</sup> 동아대학교 의과대학 내과학교실 심혈관센터<sup>6</sup>

유정남<sup>1</sup> · 이수훈<sup>2</sup> · 장선익<sup>2</sup> · 김상억<sup>2</sup> · 이광희<sup>2</sup>  
박민아<sup>3</sup> · 임태형<sup>4</sup> · 권진숙<sup>5</sup> · 조명찬<sup>5</sup> · 김영대<sup>6</sup>

### Protection of Cardiomyocytes from Acute Ischemic Injury by Protein Kinase C $\epsilon$ Expression

Jeong-Nam Yoo, MD<sup>1</sup>, Soo-Hoon Lee, MD<sup>2</sup>, Sun-Ik Jang, MD<sup>2</sup>, Sang-Ok Kim, MD<sup>2</sup>,  
Kwang-Hee Lee, MD<sup>2</sup>, Min-A Park, MD<sup>3</sup>, Tae-Hyung Lim, MD<sup>4</sup>,  
Jin-Sook Kwon, PhD<sup>5</sup>, Myeong-Chan Cho, MD<sup>5</sup> and Young-Dae Kim, MD<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Jooun Gangan Hospital, Busan, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Dong Kang Hospital, Ulsan,

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Hansarang Medical Hospital, Busan, <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Haedong Hospital, Busan,

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, <sup>6</sup>Cardiovascular Research Center,  
Department of Internal Medicine, Dong-A University School of Medicine, Busan, Korea

#### ABSTRACT

**Background and Objectives :** Ischemic injury is the most common and important cause of myocardial damage. Over past decades, a number of studies have identified a protective mechanism known as ischemic preconditioning, which can block or delay cell death from ischemic injury. Protein kinase C (PKC), especially the  $\epsilon$  isoform has been proposed as a key factor in the signaling pathway of ischemic preconditioning. However, whether PKC $\epsilon$  expression in cardiomyocytes can offer such protection from acute ischemia has not been explored. **Materials and Methods :** To demonstrate a direct effect of PKC $\epsilon$  expression, a lentiviral vector system was established. Using the lentiviral vector, PKC $\epsilon$  was introduced to neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) cultured under ischemic conditions, and also to adult rat myocardium subject to left coronary artery ligation. **Results :** Compared to control, PKC $\epsilon$  expression in cultured NRVM under ischemia resulted in preserved cell density and morphology, and a reduction in cell death ( $77.6 \pm 12.8\%$  vs  $58.1 \pm 7.2\%$ ,  $p < 0.05$ ). In adult rats, the infarcted area after coronary artery ligation was markedly reduced in myocardium injected with PKC $\epsilon$  vector compared to control ( $11.4 \pm 5.3\%$  vs  $20.5 \pm 11.3\%$ ,  $p < 0.01$ ). **Conclusion :** These results provide direct evidence that PKC $\epsilon$  is a central player in protection against cell death from acute ischemia. (Korean Circulation J 2007;37:327-333)

**KEY WORDS :** Myocytes, cardiac ; Protein kinase C-epsilon ; Lentivirus ; Ischemic preconditioning.

## 서 론

허혈은 심장에 가해지는 가장 흔하고 중요한 손상이다. 허혈에 의한 심근 손상은 비가역적인 것으로서 기본적으로는 허

혈의 원인을 신속하게 제거하는 것이 손상을 최소화할 수 있는 방법이다. 심근 경색의 경우, 생성된 혈전을 녹이는 혈전 용해술이나<sup>1)</sup> 폐색된 관상동맥 내강을 물리적으로 확장하여 개통시키는 재관류(reperfusion) 치료가<sup>2)</sup> 혈류를 복원시킴으로써 경색의 진행과 심근 손상을 막을 수 있는 수단이며, 이러한 치료는 실질적으로 심근 경색 초기의 사망률을 현저히 감소시킬 수 있다. 그러나 경색 초기에 허혈에 노출된 심근이 생존해 있는 시간내, 즉 6시간 이내에 이러한 재관류 치료를 받는 환자의 비율은 아직 미흡한 실정이며 환자 자신의 지체,

논문접수일 : 2007년 5월 14일

심사완료일 : 2007년 6월 5일

교신저자 : 김영대, 602-715 부산광역시 서구 동대신동 3가 1번지  
동아대학교 의과대학 내과학교실 심혈관센터

전화 : (051) 240-2959 · 전송 : (051) 255-8174

E-mail : kimyd@mail.donga.ac.kr

후송에 따르는 지체, 24시간 중재 가능한 의료기관의 부족 등 여러 가지 현실적인 제약으로 신속한 재관류 치료를 받는 경우는 전체의 1/3에 불과하다.<sup>3)</sup> 그러므로 허혈을 제거하지 못하더라도 허혈에 처한 상태에서 조직을 보호할 수 있는 수단의 필요성이 부각되었고, 심근세포 자체에서 허혈에 대한 방어기전이 있는지가 관심이 되었다.

허혈에 대한 심근 세포의 고유 방어 기전은 1986년 Reimer 등<sup>4)</sup>의 실험에서 본격적인 허혈을 부과하기 전에 짧은 기간 반복하여 허혈에 노출시킨 개의 심장에서 오히려 경색 범위가 현저하게 줄어드는 것을 관찰함으로써 그 존재가 처음 드러나게 되었고, 후에 허혈성 전치치(ischemic preconditioning)라고 명명되었다.<sup>5)</sup> 이후 허혈에 대한 보호 작용을 조사한 연구는 대부분 허혈성 전치치를 중심으로 하여 이루어졌으며 세포내에서 이를 수행하는 물질과 신호 전달 경로를 규명하고자 하는데 주력하였다. 허혈성 전치치를 중재하는 물질들은 다수가 발견되었지만 그 중에서도 protein kinase C(PKC)는 특히 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 허혈에 대한 보호 효과를 매개할 것으로 관측된 PKC 아형은 몇 가지가 있으나 가장 가능성이 많은 것으로 제시된 아형은 PKC $\epsilon$ 이다. PKC $\epsilon$  아형은 저산소증에서 세포막으로 이동할 뿐 아니라,<sup>7)</sup> 선택적 억제제인  $\epsilon$  V1-2 투여시 세포 보호 효과가 소실됨이 관찰되었다.<sup>8)</sup> 또한 guinea pig 모델에서 심장 보호 작용이 있는 에탄올의 섭취는 PKC $\epsilon$ 의 지속적인 활성화와 연관되어 있음이 보고되기도 하였다.<sup>9)</sup>

그러나 PKC $\epsilon$ 의 작용은 상기와 같이 주로 간접적인 방법, 즉 세포내의 이동이나 억제제 사용시의 변화와 같은 방법들을 통하여 추정되었으며 세포에서 PKC $\epsilon$ 의 발현이 허혈 상태에서 세포의 생존을 보존하는 효과가 있는지를 직접 증명한 연구는 별반 발표된 바 없다. 따라서 본 연구는 심근세포에서 PKC $\epsilon$ 의 유전자를 전달하여 발현을 증가시키고 이를 허혈에 노출시킨 후 PKC $\epsilon$  발현이 실제 허혈로부터 세포의 사망을 감소시키고 생존을 향상시키는지를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

성체쥐는 중량이 200~250 g 정도 되는 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 사용하였으며 신생쥐는 같은 종으로서 생후 1일에서 2일된 쥐를 사용하였다.

### 신생쥐 심근세포의 분리 배양<sup>10)</sup>

신생쥐의 흉곽을 절개한 후 신속히 절제한 심장을 Hank's buffered salt solution(HBSS; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 액에 담그고 가위로 잘게 자른 후 이를 다시 HBSS로 세척하였다. 그 후 조직을 건져내어 trypsin/EDTA(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 액에 넣고 4°C 진탕배양기에서 밤새 소화시켰다. 다음날 trypsin 효소액은 버리고 10% fe-

tal calf serum(FCS; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's media(DMEM; GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)액을 넣어 소화과정을 중화시킨 후 DMEM 상층액을 제거하였다. 여기에 collagenase 효소액(34 mg collagenase II와 DMEM 혼합용액)을 더하고 37°C 진탕배양기에 3분 정도 두었다가 상층부에 있는 소화액만 원뿔튜브에 모았다. 이같은 과정을 3차례 정도 반복하여 모은 상층액을 750 rpm에서 5분간 원심한 후 침전물은 10% FCS/DMEM 액으로 재부유시켰다. 다음 이를 배양플라스크에 옮겨 37°C에서 75분간 배양하고 이후 부유액을 다시 새 배양 플라스크에 옮겨 75분간 배양하여 상층액인 심근 세포와 접촉된 비심근 세포를 분리하였다. 분리된 심근 세포는 0.1% penicillin/streptomycin가 함유된 10% FCS/DMEM 배지에서 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>의 조건하에 배양하였다.

### 심근 세포의 허혈 배양

#### 저산소 공급(Hypoxia)

95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 기체가 담긴 탱크로부터 관을 통하여 배양기 내에서 심근세포를 배양중인 용기에 연결하여 저산소 기체를 공급하였다. 용기 입구는 고무마개로 막고 질소가스가 출입할 수 있는 입구만을 남겨 놓았다.

#### 허혈 배지(Media)

저산소 공급과 함께 배양 배지 대신 Ca<sup>++</sup>free Henseleit buffer(6.9 g/L NaCl, 350 mg/L KCl, 180 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 144 mg/L MgSO<sub>4</sub>, 162 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.1 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 2.16 g/L dextrose; Invitrogen, Carlsbad, CA)를 배양액으로 교체하였으며 허혈군은 이중 dextrose 대신에 deoxydextrose를 동량 사용하여 영양원을 박탈하였다. 이 배양액을 사용하기 전에 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 기체를 20분간 공급하여 배지내의 남아 있는 산소를 미리 제거하였다.

### PKC $\epsilon$ 재조합 lentiviral vector의 생성

#### PKC $\epsilon$ 유전자 재조합

Lentiviral vector의 명칭은 배열 유전자 순으로 명명된 것으로 RRE: HIV Rev response element, cPPT: HIV-1 central polypurine tract, CMV: human cytomegalovirus promoter, X: multi-cloning site, PRE: human hepatitis virus posttranscriptional regulatory element, GFP: green fluorescent protein, SIN: self inactivating을 약칭한 것이다. Full-length PKC $\epsilon$  cDNA는 일본 고베 대학의 Ono 박사로부터 기증받았다.

PBST SK(II) cloning vector에 들어있는 PKC $\epsilon$  cDNA를 pRRL-cPPT-CMV-X-PRE-SIN vector에 EcoR I site를 이용해 연결하고 정방향으로 들어간 집락(colony)을 채취하여

pRRL-cPPT-CMV-PKC $\epsilon$  -PRE-SIN를 완성하고, mega prep kit(QUIAGEN, Hilden, Germany)를 이용해 대량의 DNA를 생성한 후 lenti virus를 생성하였다. 이를 HeLa cell에 감염시킨 후 PKC $\epsilon$ 의 발현을 western blot을 통해 확인하였다.

#### Virus 생성

Lentiviral transfer vector인 pRRL-cPPT-CMV-X-PRE-SIN에 green fluorescent protein(GFP) 유전자를 클론한 pRRL-cPPT-CMV-GFP-PRE-SIN 혹은 pRRL-cPPT-CMV-PKC $\epsilon$  -PRE-SIN 23  $\mu$ g과 packaging plasmid인 pMDL 15  $\mu$ g, expression plasmid인 VSV-G 8  $\mu$ g와 pRSV-REV 11.5  $\mu$ g를 calcium phosphate 방법으로 293T 세포에 감염시켰다. 16시간 후에 배양액을 갈아주고 72시간 동안 더 배양한 다음 상층액을 모아 0.2  $\mu$ m의 filter로 여과시킨 후 20,000 rpm에서 2시간 동안 농축시켰다.

바이러스 역가는 Lentivirus-GFP를 HeLa cell에 감염시킨 후 녹색형광이 나타나는 세포를 FACS로 측정하고 상층액에서의 바이러스 P24gag 단백질을 ELISA kit로 측정하는 방법에 따랐다.  $5 \times 10^5$  HeLa 세포를 6-cm dishes에 배양하였고 초고속원심분리기로 농축하기 전의 lentivirus-GFP가 들어있는 배양액 1 mL를 DEAE dextran(10  $\mu$ g/mL)이 존재하는 조건에서  $5 \times 10^5$  HeLa cell에 넣어 감염시켰다. 16시간 후에 배양액을 교환하고 이후 48시간이 지났을 때 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)에 3회 세척한 후 세포를 trypsin으로 처리하여 모은 후, 2%의 paraformaldehyde로 30분 고정한 후 FACS 분석을 실시하였다. 바이러스에 감염시키지 않은 HeLa 세포를 대조군으로 사용하였다. 1 ng의 p24 단백질양에 해당되는 GFP를 발현하는 HeLa 세포의 개수로 lentiviral의 역가를 결정하였다.

#### 성체쥐의 심근 경색 모델

Sprague-Dawley rat 체중(200~220 g)을 대상으로 ketamine(100 mg/kg)과 xylazine(2.5 mg/kg)을 복강내에 투여하여 전신마취를 시킨 후, 16G medicut을 기관내 삽입하고 소동물 인공호흡기(Harvard rodent ventilator, Model 683, MA, USA)에 연결시켜 일회 호흡량은 체중의 10% 정도(0.2~0.3 mL), 분당 호흡수는 90~95회로 인공호흡을 실시하였다. 좌측 3번째 늑간 부위에 작은 구멍을 만들고 견인기로 벌린 후 좌심방이 잘 관찰되면 6-0 silk로 좌심방 직하부에 위치하고 있는 좌관상동맥을 포함한 심근 조직을 결찰하여 심근경색을 유도하였다. 좌관상동맥이 성공적으로 결찰된 것은 좌심실 벽이 일시적으로 불어나면서 약간 흰 색조를 띠는 것으로 확인하였다. 흉강을 폐쇄하고 결찰 후 30분 후에 결찰을 제거하여 재관류시켰다. 재관류 후 3시간 후에 심장을 분리하여 염색을 실시하고 경색 부위를 정량 분석하였다.

#### 대상군의 실험 처치

##### 신생쥐 심근 세포

분리된 신생쥐 심근 세포를 포화(confluence)에 이르기 까지 5일간 배양한 후 이를 95% 산소와 포도당이 포함된 정상조건(normoxia)과 95% 질소가스와 탈산소포도당이 포함된 허혈조건(ischemia)으로 나누어 10시간 동안 배양하였으며 허혈조건하의 배양세포에는 2일전에 tetradecanoylphorbol 13-acetate(TPA), PKC $\epsilon$ , TPA+PKC $\epsilon$  viral vector, empty viral vector, TPA+empty viral vector를 투여하였다.

##### 성체쥐 심근 경색

관상동맥 결찰하기 전 4일전에 전신마취 후 개흉하여 경색 예상 부위의 좌심실 심근에  $1 \times 10^6$ 의 역가를 갖고 있는 Lenti-PKC $\epsilon$  virus 혹은 control buffer(대조군)를 총용적 100  $\mu$ L로 하여 인슐린주사기를 이용하여 한 부위에 주입하여 흉강 폐쇄 후 회복시켰으며 4일 후 전신마취 하에 좌관상동맥을 30분간 결찰하였다가 3시간동안 재관류시켰다. 이후 쥐를 희생시켜서 심장을 분리한 뒤 경색의 크기를 측정하기 위한 염색을 하였다.

#### 허혈 손상의 측정

##### 신생쥐 배양 세포

##### 광학현미경 소견

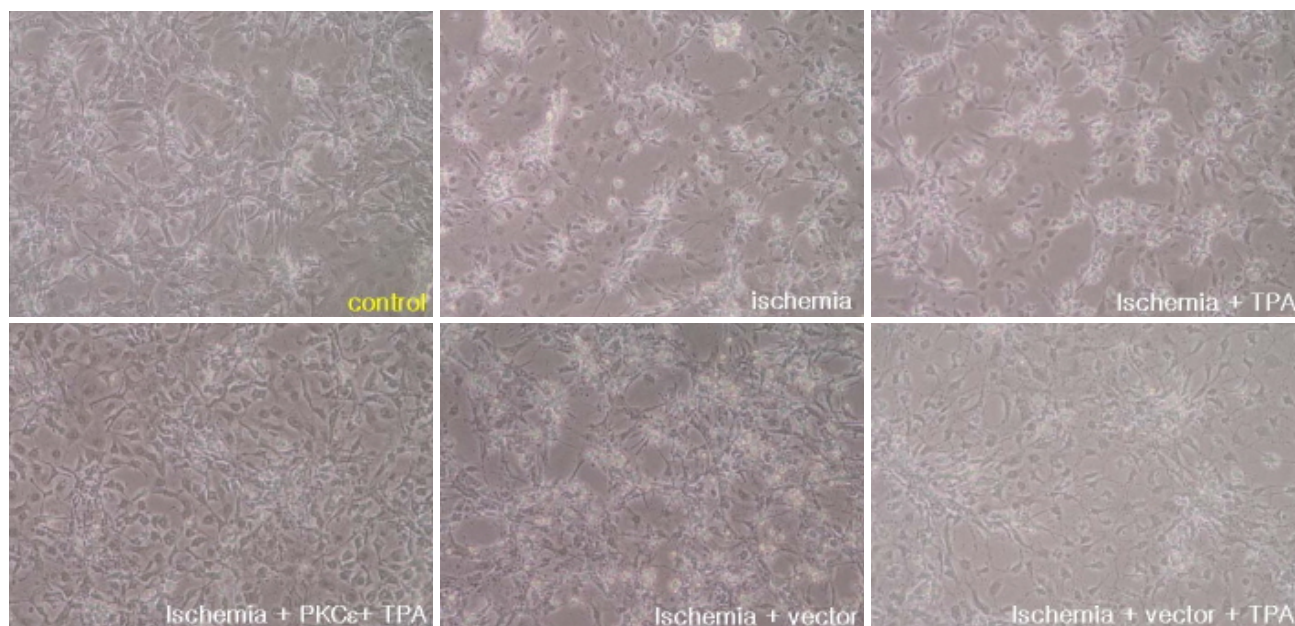
각군의 배양 접시를 위상차 현미경 하에서 관찰하고 생존 세포의 밀도와 형태를 관찰하였다.

##### 세포 사망 측정: trypan blue staining

Trypan blue(Invitrogen, Carlsbad, CA)와 배지를 각각 동량으로 혼합한 후 실온에서 약 2분간 두었다가 이를 광학현미경으로 관찰하여 trypan blue에 질게 염색되는 세포는 사망한 것으로 간주하고 trypan blue를 배척하여 염색되지 않는 세포는 살아있는 세포로 간주하여 단위 면적당의 생존한 세포의 수를 관측하였다.

##### 성체쥐 심근 경색모델에서의 경색크기

쥐에서 심장을 분리한 후 상행 대동맥을 통해 phthalocyanine blue(1.5%, 1 mL)을 주입하여 관류부위를 염색하였다. 이후 심근을 1 mm 간격으로 절편을 만들어 1% triphenyl-tetrazolium chloride(TTC)로 염색하여 생존 조직을 염색하였다. 경색 부위(infarcted area)는 양쪽 모두에 염색되지 않은 부위이고, phthalocyanine blue에 염색되지 않은 부위는 위험 부위(area at risk)를 나타내었다. 경색크기는 위험부위와의 상대적인 비율로서 표시하였다.



**Fig. 1.** Microscopic findings of neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) cultured under various conditions. Control: NRVM cultured under normal condition, Ischemia: NRVM cultured under ischemic condition, Ischemia+TPA: NRVM cultured under ischemic condition treated with tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), Ischemia+vector: NRVM cultured under ischemic condition treated with empty vector, Ischemia+vector+TPA: NRVM cultured under ischemic condition treated with empty vector and TPA, Ischemia+PKC $\epsilon$ +TPA: NRVM cultured under ischemic condition treated with protein kinase C  $\epsilon$  vector and TPA, PKC: protein kinase C.

#### 통계적 분석

모든 실험은 3회 이상 반복 시행하였다. 대조군과 허혈군 사이의 생존 비교는 unpaired t-test로 하였으며 통계값 0.05 미만을 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

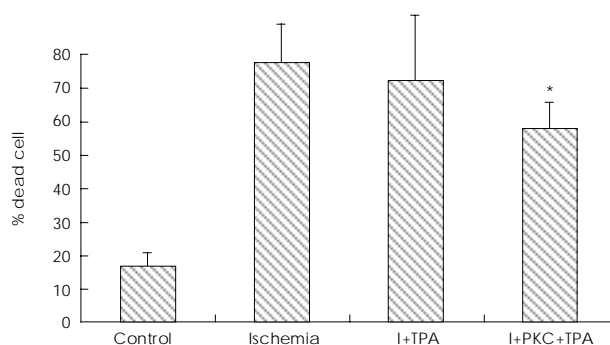
#### 신생쥐 배양 심근 세포

##### 광학현미경 소견(Fig. 1)

정상 조건하에 배양된 신생쥐의 심근세포는 다각형의 심근세포가 균질하게 배양되어 있음을 관찰할 수 있었으며 허혈상태의 세포는 세포의 밀도가 현저하게 감소되어 있었다. 허혈 상태의 배양세포에 TPA 혹은 PKC $\epsilon$  재조합 lentiviral vector만을 투여한 군은 세포의 밀도나 형태면에서 크게 변화가 없는 반면, PKC $\epsilon$  viral vector와 TPA를 동시에 투여한 치료군에서는 세포수의 감소는 현저하게 줄어들었으며 세포의 형태도 변형이 없어 정상 조건하의 세포와 유사한 소견을 보였다. 그러나 허혈 상태에서 viral vector만을 투여하거나 viral vector와 TPA를 동시에 투여한 군에서는 허혈조건에 비해서 세포수와 형태에서 현저한 변화를 보이지 않았다.

##### Trypan blue 염색(Fig. 2)

정상 조건군과 허혈조건, 허혈조건에 TPA를 투여한 군, 허혈조건에 PKC $\epsilon$ 과 TPA를 같이 투여한 군을 비교하였다. Trypan 축출에 실패한 사망세포는 정상 조건에서  $16.9 \pm 4.2\%$ , 허



**Fig. 2.** Comparison of cell death of cultured neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) under various conditions. Number of cell death was determined by counting cells failing to exclude the trypan blue dye. Control: NRVM cultured under normal condition, Ischemia: NRVM cultured under ischemic condition, I+TPA: NRVM cultured under ischemic condition treated with tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), I+PKC+TPA: NRVM cultured under ischemic condition treated with protein kinase C  $\epsilon$  vector and TPA. \*:  $p < 0.05$  between ischemia and ischemia+PKC+TPA, PKC: protein kinase C.

혈조건 군에서  $77.6 \pm 12.8\%$ , 허혈조건에 TPA를 투여한 군에서는  $72.3 \pm 18.7\%$ 이었으며 허혈조건에 TPA와 PKC $\epsilon$  vector를 투여한 치료군에서는  $58.1 \pm 7.2\%$ 로서 세포 사망에서 유의한 감소를 보였다( $p < 0.05$ ).

#### 성체쥐 심근 경색 모델

##### 육안적 소견(Fig. 3)

매개 완충액을 근주한 대조군과 PKC $\epsilon$  vector를 근주한 치료군의 심장을 분리하여 염색하였으며 대표적인 결과를 Fig. 3

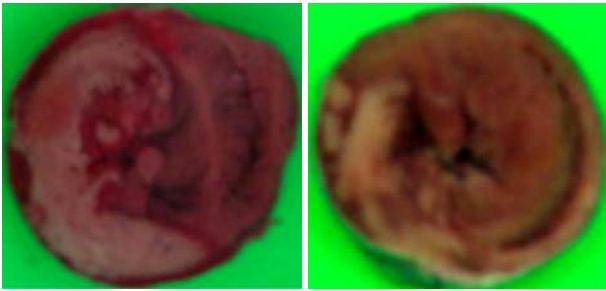


Fig. 3. Representative samples of transverse section of myocardium stained with phthalocyanin blue and triphenyltetrazolium chloride in control and treated rat heart, injected with PKC $\epsilon$  lentiviral vector intramuscularly. Unstained area (white color) represents infarcted myocardium. PKC $\epsilon$ : protein kinase C $\epsilon$ .

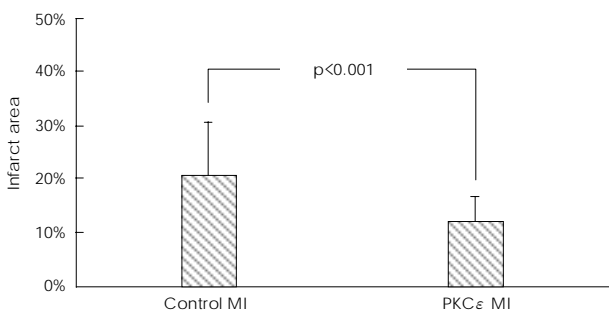


Fig. 4. Bar graphs represent area of infarction between control and treated rat heart, injected with PKC $\epsilon$  lentiviral vector intramuscularly. Control MI: rat heart injected with control buffer 4 days prior to left coronary artery ligation, PKC $\epsilon$  MI: rat heart injected with PKC $\epsilon$  vector 4 days prior to left coronary artery ligation. PKC $\epsilon$ : protein kinase C $\epsilon$ , MI: myocardial infarction

에서 보여주고 있다. Phthalocyanine blue로 염색되지 않은 부분이 관류가 되지 않은 위험부위(허혈부위)이며, 이중 TTC로 염색된 붉은색 부분은 생존부위며 TTC로 염색되지 않은 흰색부위가 경색부위로서 치료군의 경색부위는 대조군에 비해 현저히 감소되어 있음을 보여주었다.

#### 경색크기의 비교(Fig. 4)

대조군 8마리, 치료군의 11마리의 경색크기를 비교하였다. 경색크기는 대조군에서 평균  $20.5 \pm 11.3\%$ , 치료군에서  $11.4 \pm 5.3\%$ 로서 치료군에서 약 45%의 경색 크기가 현저하게 감소하였으며 그 차이는 통계적으로 유의하였다( $p < 0.01$ ).

## 고 찰

허혈은 심근세포에 가해지는 가장 중요한 손상이다. 특히 급성 허혈은 심근 조직에 측부 혈류(collateral circulation)의 발생이나 심근 세포의 적응에 필요한 시간을 주지 않으므로 손상의 정도는 상대적으로 크다. 심장에서의 급성 허혈은 심근 경색의 형태로 나타나며 재관류 요법이 시행되는 오늘날에도 여전히 중요한 사망원인이 되는 질환이다.

허혈에 대한 세포 고유의 방어기전은 허혈성 전처치에 의

해서 처음 알려지게 되었으며 심근세포의 보호기전에 관한 많은 연구는 허혈성 전처치를 중심으로 이루어졌다. 허혈성 전처치는 2~3시간 경과 후 약 1시간 정도의 심근 보호 작용을 나타내는 early(classic) preconditioning과,<sup>5)</sup> 전처치 후 하루가 지나서 보다 긴 시간동안 심근 보호 작용을 나타내는 delayed preconditioning의<sup>11)</sup> 두 가지가 있다고 알려져 있다. 보호 작용이 이루어지는 것은 세포내 새로운 유전자의 전사(transcription), 번역(translation)을 필요로 하는 방식과 기존에 존재하는 세포의 대사나 신호전달 경로(signaling pathway)를 변조함으로써 이루어지는 방식으로 구분되며 허혈의 급성기에 작동하는 것은 후자의 방식으로 생각된다.<sup>12)</sup>

허혈성 전처치에 관한 많은 연구들은 세포내 존재하는 여러 분자들이 신호전달 경로에 참여하고 있음을 밝히고 있다. 심근 세포의 보호 효과를 수행하기까지의 여러 신호 전달 경로에서 PKC가 차지하는 비중은 크며, 다수의 실험 연구에서 PKC가 허혈성 전처치의 중요한 매개 물질임을 제시하고 있다.<sup>13)14)</sup> PKC는 여러 가지의 아형(isoform)으로 구성되어 있으므로 허혈에 대한 보호 작용도 아형에 따라서 달라질 수 있다. 신생쥐와 성체쥐는 세포당 PKC 아형의 함량이 성장에 따라 현저한 차이를 보이며<sup>15)</sup> 이러한 아형변화는 허혈에 노출되었을 때 PKC 보호 효과에서 차이를 나타내었다.<sup>16)</sup> PKC $\alpha$ 와 PKC $\epsilon$  아형은 허혈에 노출된 신생쥐 심근에서 세포내에서 이동함이 관찰되었고,<sup>17)</sup> PKC $\delta$ 는 허혈/재관류 손상으로부터 심근 보호 작용을 증대함이 보고되었다.<sup>18)</sup> PKC $\delta$ 는 또한 opiod에 의한 보호 효과를 매개하는 것으로 보고되었다.<sup>19)</sup> 따라서 각각의 아형은 다른 종류의 심장 보호 효과를 매개할 가능성도 있다. 그러나 허혈 보호 효과 매개에 있어서 가장 많은 실험적 자료를 가지고 있는 것은 PKC $\epsilon$  아형이며 성체쥐의 심근에 가장 많이 존재하는 것도 PKC $\epsilon$  아형이다.<sup>20)</sup> Ping 등<sup>7)</sup>은 허혈성 전처치에서 PKC $\epsilon$ 의 세포내 이동을 관찰하였으며 Liu 등<sup>21)</sup>의 실험에서 허혈성 전처치에서 효소의 활성도를 측정하였을 때 증가되는 것은 PKC $\epsilon$ 이었고 PKC $\delta$ 의 활성도는 증가하지 않았다. 또한 PKC $\epsilon$ 에 특이적인 길항제인  $\epsilon V1-2$ 를 사용하면 저산소로 인한 세포 사멸을 감소시키는 보호효과가 상쇄되는 것이 관찰되었다.<sup>8)</sup> 그러나 PKC $\epsilon$ 의 역할은 상기와 같이 간접적인 방법에 의해서 제시되었으며 세포에서 PKC $\epsilon$ 의 유전자를 발현시켜서 허혈에 대한 효과가 있는지를 관찰한 연구는 드문 실정이다. 따라서 본 실험은 PKC $\epsilon$ 를 심근세포에 전달하여 허혈로부터의 보호 효과를 직접적인 방식으로 증명해 보고자 하였다.

세포내로의 유전자 전달을 위한 전달체로는 lentiviral vector를 사용하였다. Lentivirus는 Retroviridae에 속하는 virus로서 같은 군에 속하는 reovirus와 달리 non-dividing cell을 감염시킬 수 있는 특징이 있고 따라서 신경세포, 심근 세포, 조혈세포, 줄기세포 등에서의 유전자 전달에 광범위하게 적용될 수 있다.<sup>22)</sup> 또한 lentiviral vector는 *in vitro* 뿐 아니라 *in vivo*로 각 종 실험동물의 장기에 성공적으로 투



여될 수 있는 장점을 가지고 있다.<sup>23)</sup> 따라서 본 실험에서는 유전자 전달을 위한 매개체로 lentiviral vector를 사용하였다.

체외실험의 대상으로서는 신생쥐의 배양 심근세포를 선택하였다. 신생쥐의 심근 세포는 PKC 아형중에서 PKC $\alpha$ 와 PKC $\epsilon$ 의 함량이 성체쥐에 비해 매우 작으며<sup>15)</sup> 따라서 이전의 실험에서 허혈 노출하에서 PKC 활성화제인 TPA를 첨가하더라도 성체쥐와 같은 심근 보호 효과는 관찰되지 않았었다.<sup>15)</sup> 따라서 본 실험에서는 PKC 아형 함량이 부족한 신생쥐 배양 심근 세포에 PKC $\epsilon$ 의 발현을 증가시켜서 허혈에 대한 보호 효과가 실제로 나타나는지를 보고자 하였다. 허혈 조건에서 10시간 노출된 배양 심근세포는 현미경 관찰하에서 정상 조건에 비해 세포의 수와 밀도가 현저하게 감소되었을 뿐 아니라 부착된 세포들도 형태학적으로 정상적인 다각형 윤곽을 잃어버렸다. 그러나 PKC $\epsilon$  lentiviral vector와 PKC 활성화제인 TPA로 사전 처리한 신생쥐 심근 세포는 허혈 조건에서도 세포 수와 형태 면에서 정상 대조군과 유사하였다. 한편 PKC $\epsilon$  lentiviral vector 단독투여나 TPA 단독 투여군에서는 세포 보호 효과는 관찰되지 않았고 empty vector와 TPA를 같이 투여한 세포군에서도 세포의 수와 형태에서 처리하지 않은 허혈 조건에 비해 호전을 보여주지 못하였다. 이들은 PKC $\epsilon$  활성화가 허혈 상태에서 세포를 보호하는 역할을 수행하는데 중추적인 역할을 한다는 것을 시사하는 소견이다. 세포 사멸을 정량적으로 측정하기 위한 trypan blue 염색에서 PKC $\epsilon$  vector 및 TPA 투여군은 허혈군에 비해서 사망률이 유의하게 작았으나(77.7% vs 58.1%,  $p < 0.05$ ), 정상 조건의 세포군(16.9%)에 비해서는 사망률이 현저히 높아서 현미경 소견에 비해 보호 효과는 미약하게 나타났다. 이같은 괴리는 부착세포를 배양 용기에서 분리하는 과정에서 세포의 손상이 가해지거나 혹은 생존 세포가 소실된 데 주로 연유할 것으로 생각되나, 그 밖에 양 실험에서의 허혈 시간의 차이, trypan blue 염색 세포 판정의 주관성 등에서 기인하였을 수도 있다.

*In vivo* 실험 대상으로는 성체쥐의 심근 경색 모델을 택하였다. 이는 염색으로 심근 보호 효과를 쉽게 측정할 수 있는 방법이고, 실제 임상에서 볼 수 있는 가장 중요한 허혈 손상이기 때문이다. 허혈성 전처치의 효과를 처음 관찰한 것도 개의 경색 모델이었으며<sup>4)</sup> 이후 많은 연구에서 관상 동맥 결찰에 의한 실험적 경색 모델에서 경색 크기의 감소로 보호 효과를 측정하였다. 실험 결과 대조군에서의 경색 크기가 20.5%인데 반해 PKC $\epsilon$  lentiviral vector를 주입한 쥐의 경색 크기는 11.4%로서 대조군에 비해 45% 정도의 현저한 감소를 보였다. 이는 Reimer 등<sup>4)</sup>이 개에서 시행하여 허혈성 전처치에서 얻은 75%의 경색 감소에 비하면 작은 수치이나 Okamura 등<sup>24)</sup>의 쥐 실험에서 허혈성 전처치로 얻어진 경색 감소(56%)에 비하면 차이가 크지 않고 또 다른 쥐 실험의 허혈성 전처치 효과(44%)와는 유사하였다.<sup>25)</sup> 이 결과는 PKC $\epsilon$  발현에 의한 심근 보호의 정도는 허혈성 전

처치에 의한 효과의 상당 부분에 해당함을 보여주고 있다. 향후 PKC 억제제를 사용하거나 같은 모델에서 허혈성 전처치를 하여 심근 경색의 크기를 비교한다면 허혈성 전처치의 효과 중에서 PKC $\epsilon$ 가 기여하는 부분을 추정할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로 본 실험에서는 lentiviral vector를 이용하여 유전자를 심근 세포에 효과적으로 발현시키는 전달체계를 성공적으로 수립하였으며 이를 이용하여 심근세포에 PKC $\epsilon$ 를 발현시켜 허혈 조건하에서 이의 효과를 관찰할 수 있었다. 실험 결과 PKC $\epsilon$  발현은 허혈조건에서 이 아형이 결핍된 신생쥐 배양 심근 세포의 생존능력을 유의하게 증가시켰으며, 성체쥐 심근에 주입된 경우는 관상동맥 결찰 후의 경색크기가 현저하게 감소됨을 관찰하였다. 이는 급성 허혈에 처한 심근 세포에서 PKC $\epsilon$ 가 세포 보호 작용의 주요 역할을 담당하는 것을 직접적인 방법으로 입증하는 자료이다. 그러나 본 연구에서 배양 세포 실험과 쥐 심근 경색 실험에서 lenti virus의 의한 PKC $\epsilon$ 의 발현을 reporter gene을 이용하거나 PKC $\epsilon$  단백을 western blot을 통해서 입증하지 못하였던 점은 중요한 한계점으로서 본래의 연구 취지를 완전하게 실현하기 위해서는 필히 보완되어야 할 사항이다. 또 배양 세포 실험에서 부착된 세포의 분리 과정에서 발생한 문제점들로 인해서 trypan blue 염색으로 산정된 PKC $\epsilon$ 의 효과가 현미경 소견에 비해 저평가되어 나타난 점과, 성체쥐의 심근 경색 모델에서 허혈성 전처치를 동시에 시행하지 못하여 PKC $\epsilon$ 의 효과와 비교하지 못하였다는 점도 한계점으로 들 수 있다. 최근 허혈성 전처치에 대해 다른 매개물질들의 역할도 새로 조명되고 있으나<sup>26)</sup> 본 연구의 한계점에 실험을 추가하고 방법을 개선한다면 허혈 손상 보호에서의 PKC $\epsilon$  역할 규명에 대해 보다 설득력 있는 자료를 제시할 수 있을 것으로 생각한다.

## 요 약

### 배경 및 목적 :

허혈은 심근 조직에 가해지는 가장 흔하고 중요한 손상이다. 허혈성 전조치(ischemic preconditioning)는 허혈 상태에서도 세포의 사망을 억제하고 생존을 촉진하는 심근의 고유기능으로서, protein kinase C(PKC), 특히  $\epsilon$  아형(PKC $\epsilon$ )이 이의 신호전달 과정에서 주요 매개체로 알려져 있다. 그러나 대부분의 실험에서 PKC $\epsilon$ 의 역할은 이의 억제제나 효현제 투여 후에 변화를 봄으로써 추정되었고 심근 조직에서 PKC $\epsilon$  발현이 허혈에 대한 보호 효과가 있는지를 직접적으로 관찰한 경우는 드물다. 본 연구는 lentiviral vector를 이용하여 PKC $\epsilon$ 를 심근세포에 발현시킴으로써 허혈 손상에 대한 보호 효과를 직접 입증하고자 하였다.

### 방 법 :

체외 실험으로서는 신생쥐의 일차 배양을 이용하여 허혈 상

태를 조성하였으며 생체 실험으로서는 성체 백서의 심근 경색 모델을 이용하였다. 배양된 심근세포는 허혈 조건을 가하기 2일전에 PKC $\epsilon$ 가 재조합된 lentiviral vector를 배양액에 첨가하였으며 심근 경색 모델에서는 관상동맥 결찰 4일전에 lentiviral vector를 심근내 주입하였다.

#### 결 과 :

신생쥐 심근 세포의 일차 배양에서 PKC $\epsilon$ 를 처치한 군에서는 10시간의 허혈 배양 후의 세포 사망이 대조군에 비해서 유의한 감소를 보였으며( $77.6 \pm 12.8\%$  vs  $58.1 \pm 7.2\%$ ,  $p < 0.05$ ), 생체 실험에서 PKC $\epsilon$  vector를 주입한 쥐에서는 심근 경색의 크기가 대조군에 비해 45% 정도 감소하였다( $20.5 \pm 11.3\%$  vs  $11.4 \pm 5.3\%$ ,  $p < 0.01$ ).

#### 결 론 :

이같은 소견들은 쥐에서 PKC $\epsilon$ 의 발현이 허혈 손상으로 인한 심근세포의 사망을 억제하고 생존을 증가시킬 수 있음을 직접적으로 보여주는 증거라고 할 수 있다. 이러한 결과는 PKC $\epsilon$ 를 매개로 한 기전이 향후 허혈에 노출된 심근의 손상을 최소화하는 방편으로 이용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

**중심 단어 :** 쥐 심근 세포 ; Protein kinase C $\epsilon$  ; Lentiviral vector ; 허혈성 전치치.

#### ■ 감사문

We are deeply grateful to professor Yoshitaka Ono of Biosignal Research Center, Kobe University, for the generous gift of PKC $\epsilon$  cDNA, which enables us to conduct this study.

본 연구는 한국과학재단 2001년도 산학협력 연구지원 프로그램(관리번호(2001-20900-001-1) 및 2002년도 대한순환기학회 산학협동연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

#### REFERENCES

- 1) Fibrinolytic Therapy Trialist's (FTT) Collaborative Group. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity from all randomized trials of more than one thousand patients. *Lancet* 1994;343:311-22.
- 2) Weaver WD, Simes RJ, Betriu A, et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA* 1997; 278:2093-8.
- 3) Rogers WJ, Bowlby LJ, Chandra NC, et al. Treatment of myocardial infarction in the United States (1990 to 1993): observation from National Registry of Myocardial Infarction. *Circulation* 1994; 90:2103-14.
- 4) Reimer KA, Murry CE, Yamgawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986;251:H1306-15.
- 5) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
- 6) Simkhovich BZ, Pizyklenk K, Kloner RA. Role of protein kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc Res* 1998;40:9-22.
- 7) Ping P, Zhang J, Qiu Y, et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoform  $\epsilon$  and  $\eta$  in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997;81:404-14.
- 8) Gray MO, Karliner JS, Mochly-Rosen D. A selective  $\epsilon$ -protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* 1997;272:30945-51.
- 9) Miyanmae M, Rodriguez MM, Camcho SA, Diamond I, Mochly-Rosen D, Figueredo VM. Activation of protein kinase C correlates with a cardioprotective effect of regular ethanol consumption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8262-7.
- 10) Springhorn JP, Claycomb WC. Preproenkephalin mRNA expression in developing rat heart and in cultured ventricular cardiac muscle cells. *Biochem J* 1989;258:73-8.
- 11) Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993;88:1264-72.
- 12) Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early and preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. *Circ Res* 2004;94:7-16.
- 13) Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997;99:55-61.
- 14) Kim HC, Kim H, Chung ST, et al. Cardioprotective effect of the ischemic preconditioning: its relation to activation of protein kinase C. *Korean Circ J* 1999;29:602-12.
- 15) Park SK, Kim HS, Son CS, Tockgo YC, Jeon YS. Expression of protein kinase C isoform mRNA in the developing rat heart. *Korean Circ J* 1998;28:1341-9.
- 16) Son JW, Kim YD. Protein kinase C activation protects the cardiomyocytes from ischemic insults in adult, but not in neonatal rat heart. *Korean Circ J* 2002;32:689-96.
- 17) Goldberg M, Zhang HL, Steinberg SF. Hypoxia alters distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997;99:55-61.
- 18) Inagaki K, Kihara Y, Hayashida W, et al. Anti-ischemic effect of a novel cardioprotective agent, JTV519, is mediated through specific activation of  $\delta$  isoform of protein kinase C in rat ventricular myocardium. *Circulation* 2000;101:797-804.
- 19) Zhang HY, McPherson BC, Liu H, et al. Role of nitric-oxide synthase, free radicals, and protein kinase C delta in opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:1012-9.
- 20) Rybin VO, Steinberg SF. Protein kinase C isoform expression and regulation in the developing rat heart. *Circ Res* 1994;74:299-309.
- 21) Liu H, McPherson BC, Yao Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C  $\epsilon$  and  $\delta$  isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H404-10.
- 22) Romano G, Micheli P, Pacilio C, Giordano A. Latest developments in gene transfer technology: achievement, perspectives, and controversies over therapeutic applications. *Stem Cells* 2000;18:19-39.
- 23) Romano G. Gene transfer in experimental medicine. *Drug News Perspect* 2003;16:267-76.
- 24) Okamura T, Miura T, Iwamoto H, et al. Ischemic preconditioning attenuates apoptosis through protein kinase C in rat hearts. *Am J Physiol* 1999;277:H1997-2001.
- 25) Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Yellon DM. Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in rat. *Circ Res* 1994;75: 586-90.
- 26) Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, Inserte J, Agullo L, Cabestrero A. The end-effectors of preconditioning protection against myocardial cell death secondary to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 2006;70:274-85.