

급성 저산소증 상태에서 심장 내 전사인자 NF-κB의 기능

전북대학교 의과대학 소아과학교실, 심혈관연구소

주찬웅 · 정우석 · 김재철 · 이호근

Role of the Nuclear Transcription Factor NF-κB Caused by Acute Hypoxia in the Heart

Chan Uhng Joo, M.D., Woo Suk Juhng, M.D.
Jae Cheol Kim, Ph.D. and Ho Keun Yi, Ph.D.

*Department of Pediatrics, Institute of Cardiovascular Research, Medical School,
Chonbuk National University, Jeonju, Korea*

Purpose : Nuclear factor-κB(NF-κB) is now recognized as playing a potential role in programmed cell death and the adaptive response to various stress. Cellular hypoxia is a primary manifestation of many cardiovascular diseases. It seems that vascular endothelial growth factor (VEGF) and insulin like growth factor-I(IGF-I) have a function as a protective molecule in the heart against several stress including hypoxia. In this study, the role of NF-κB to the cellular response and regulation of protective molecules against the acute hypoxia in the heart was studied.

Methods : To cause acute hypoxic stress to the heart, Sprague Dawley rats were exposed to hypoxic chamber(N₂ 92% and O₂ 8%). After the hypoxic exposure, nuclear proteins, total proteins and mRNA were isolated from heart. Translocation of the transcription factors NF-κB, NF-ATc, AP-1 and NKX-2.5 were evaluated by electrophoretic mobility shift assay(EMSA). The expression of IGF-I and VEGF were studied before and after the hypoxic stress by competitive-PCR, Northern hybridization and Western hybridization. To confirm the role of the NF-κB in the heart, the rats also were pretreated with diethyl-dithiocarbamic acid(DDTC) into peritoneal cavity to block NF-κB translocation into nucleus.

Results : The expression of NF-κB, AP-1 and NF-ATc were increased by the hypoxic stress. Increased expression of the VEGF and IGF-I were also observed by the hypoxic stress. However, the blocking of the NF-κB translocation reduced those expressions of VEGF and IGF-I.

Conclusion : These results suggest that NF-κB has a protective role against the acute hypoxia through several gene expression, especially VEGF and IGF-I in heart muscle. (*J Korean Pediatr Soc* 2002;45:1106-1113)

Key Words : NF-κB, Hypoxia, VEGF, IGF-I

* 이 논문의 연구는 전북대학교 연구기반 연구비에 의하여 지원되었음.

접수 : 2002년 4월 26일, 승인 : 2002년 7월 10일
책임저자 : 주찬웅, 전북대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : 063)250-1471 Fax : 063)250-1464
E-mail : joocu@moak.chonbuk.ac.kr

서 론

최근 분자 생물학적 연구에 의해 심장의 기능적 그리고 구조적인 결함과 관련하여 발생단계의 심장 연구

뿐만 아니라 심근 비대와 관련된 여러 유전자의 구체적인 역할에 관한 많은 연구 결과가 소개되고 있다. 특히 발생단계에 심장의 형성에 관여하는 유전자로는 전사인자(nuclear factor, NF) NF-ATc, NKX-2.5, GATA-4 등이 보고되어지고 있는데 이들 유전자는 심장 발생 이후에도 지속적으로 발현하고 있지만 그 기능에 관해서는 정확히 밝혀지고 있지 않다¹⁾. 한편 심근 조직으로의 혈류 장애 시 심근 세포의 저산소증 상태가 초래되며, 이러한 저산소증 상태 후 발현되는 심근세포의 핵 내 전사인자로는 nuclear factor- κ B (NF- κ B)가 알려지고 있는데, 이 전사인자 NF- κ B는 여러 장기에서 질환이나 급격한 상황을 제어하는 기능에 관련된 중요한 인자로 알려지고 있다²⁾. 여러 조직에서 NF- κ B는 I κ B와 결합체를 이루고 세포질에 평상 시 존재하다가 저산소증과 같은 외부적인 자극이 있는 경우 I κ B 인산화가 이루어지면서 NF- κ B가 유리되어 핵 내로 이동하게 된다³⁾. 핵 내로 이동된 NF- κ B는 여러 cytokines과 세포접착자인 ELAM-1과 VCAM-1 등과 신호전달 중간자인 nitric oxide synthase(NOS)의 발현을 촉진시키며 세포 자멸사(apoptosis)로부터 세포를 보호하는 것으로 추측되고 있다^{4,5)}. 그러나 심장에서 여러 자극에 대한 NF- κ B의 역할은 잘 알려져 있지 않았다.

저산소증은 혈관의 생성을 유발시키는 것으로 알려져 있는데 이러한 혈관의 신생에는 여러 성장인자가 상호 작용을 하며 특히 vascular endothelial growth factor(VEGF)의 작용이 중요한 기능을 하는 것으로 보고되고 있다^{6,7)}. VEGF를 비롯하여 IGF는 혈관의 신생과 혈관 자체의 투과성을 향상시키는 작용이외에 여러 조직에서 여러 인산화 효소를 자극하여 세포의 생존력을 향상시킨다. 그러나 심장에서 이들의 인자가 어떻게 심근 세포를 보호하는지에 대한 연구와 기전 설명이 아직까지 미진한 상태이다.

본 연구에서는 심장이 저산소증 자극에 대해 심장의 적응 반응을 검토하여 전사인자 NF- κ B 및 VEGF와 같은 관련 분자의 기능을 밝히고자 하였다. 또한 이러한 자극 시에 NF- κ B 뿐만 아니라 다른 전사인자 NF-ATc, AP-1, NKX-2.5의 발현을 아울러 조사하였다. 특히 전사인자 NF- κ B가 심장의 저산소증 자극시 보호 물질로서의 기능을 가진 VEGF와 IGF-I의 발현을 어떻게 조절하는지를 검토하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물과 저산소증 유도

출생시기가 동일한 Sprague-Dawley계 수컷 6-7주령(체중 170-200 g)을 실험대상으로 하였다. 심근 저산소증을 유도하기 위한 hypoxia chamber는 12,000 cm³ 부피로, 질소 92%와 산소 8%의 혼합 형태를 분당 5 L로 연속적으로 관류시켰다. 이러한 저산소 환경에 1, 2, 3, 6, 12, 24시간 동안까지 실험동물을 넣어 저산소 자극을 유도 후 노출 시간에 따른 각각의 심장 조직을 얻기 위해 경추 탈골을 시킨 후 심장을 적출하여 분석 할 때까지 -80℃에 보관하였다.

2. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

심장 핵 내 단백질을 다음과 같이 분리하였다. 심장조직 1 g 정도를 200 μ L ice-cold PBS 용액을 넣어서 조직을 분쇄 후 14,000 rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층의 PBS 용액을 제거시켜 세척하였다. 분쇄된 조직에 저장성 완충액(10 mM HEPES, pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT) 800 μ L를 넣어서 원심분리로 1차 세척하였다. 저장액 용액 500 μ L를 넣고 세포간 기질과 세포질을 용해시키고, 4,000 rpm에서 원심 분리하여 이를 제거하였다. 저염 완충액(20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT) 200 μ L를 넣고 강하게 교반 후, 여기에 고염 완충액(20 mM HEPES, pH 7.9, 25% glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 800 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT) 200 μ L를 넣고 혼합시키고 다시 원심 분리하여 상층액만을 취하였다. 상층액을 투석용액(20 mM HEPES, pH 7.9, 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT)에서 투석시키고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻어 이를 핵 내 단백질로 하며, Bladford 방법으로 전 단백질량을 정량하고 -80℃에 보관하였다.

NF- κ B의 핵 내 이동을 정량하기 위하여 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' 염기 배열을 double strand로 합성하였으며, 각각 2.5 μ g의

up-strand와 down-strand에 5 unit의 T4 polynucleotide kinase, 50 μ Ci(γ - 32 P) ATP를 첨가 5' 말단에 인산화를 시켰다. 10 μ g의 핵단백질과 poly(dI/dC) 3 μ g을 혼합시키고 실온에 10분간 방치시켰다. 여기에 인산화 된 probe 2 μ L, GRAB buffer(10X: 10 mM Tris-HCl, pH 7.9; 500 mM KCl; 100 mM EDTA; 50% glycerol)를 1X 조건으로 첨가하여 총 20 μ L를 되게 하여 10분간 방치시켰다. 6%의 non-denature acrylamide gel을 만든 후 100 V에서 pre-running 시키고, 위의 전사인자와 probe 결합액 전량을 gel에 loading하여 150 V 1시간 전기 영동하였다. Gel을 건조시키고, X-ray film에 결합된 소식자를 확인하였다.

3. Northern Hybridization

Total RNA를 분리하기 위하여 심장조직(50-100 mg)에 TRI reagent(MRC Co, U.S.A) 1 mL을 첨가한 후 homogenizer(Polytron Co, U.S.A)를 이용하여 5,000 rpm 이상에서 30초 동안 분쇄하였다. 분쇄된 조직을 Eppendorf tube에 옮겨 상온에서 5분간 방치한 다음 chloroform을 200 μ L 첨가하여 교반한 다음 15분간 방치시켰다. 그 후 원심 분리하여 조직내의 DNA, 단백질 등을 제거하였다. 다시 상층액에 500 μ L의 isopropanol를 첨가하고 원심 분리하여 RNA pellet을 획득하였다. RNA pellet에 75%의 ethanol(1 mL)을 첨가하여 세척 후 건조시킨 다음 DEPC(diethylpyrocarbonate; Sigma, USA)를 처리한 증류수에 용해시키고 -70°C에 보관하였다.

VEGF 및 IGF-I 발현을 검토하기 위해 total RNA 20 μ g에 formamide(10 μ L), formaldehyde(4 μ L), 10 \times gel running buffer(2 μ L), ethidium bromide(2 μ L; 400 μ g/mL)를 첨가하여 65°C에서 10분간 변성시켰다. 얼음에서 5분 동안 방치한 후 2 \times loading dye(20 μ L)를 첨가하여 formaldehyde가 포함된 1.2% agarose gel에서 15 V로 12시간 전기영동하였다. 전기 영동 후 agarose gel을 nylon membrane에 전이시켜 실온에서 건조시킨 다음 cross-linking(Ultraviolet cross-linker, Fisher Scientific Co, USA)하여 hybridization에 이용할 때까지 실온에 보관하였다.

VEGF와 IGF-I probe 표식은 template DNA 50 ng을 열 변성시킨 후 5 \times labelling buffer(Promega

Co, USA) 10 μ L, 5 μ M dNTP, 0.8 μ g bovine serum albumin(BSA), 50 μ Ci α - 32 P dCTP, DNA polymerase I와 Klenow fragment 5 unit를 첨가하여 실온에서 60분간 반응시켜 probe를 label화 시켰다. Hybridization 용액 10 mL(5 \times SSC, 0.1% SDS, 5% dextran sulphate)을 65°C로 맞추고, RNA가 transfer된 membrane을 넣고 hybridizer에서 1시간 동안 pre-hybridization을 시켰다. 여기에 VEGF 및 IGF-I 32 P cDNA probe를 첨가한 다음 18시간 동안 hybridization을 시켰다. Membrane은 1 \times SSC와 0.1% SDS solution이 함유된 세척액으로 65°C에서 세척한 다음 건조하여 X-ray film(Kodak Co, Japan)에 -70°C에서 72시간 동안 감광하였다.

4. 역 전사 증합효소연쇄 반응(reverse transcription-PCR, RT-PCR) 및 Competitive-PCR

Total RNA의 분리는 위와 동일하게 수행하였으며, RNA 3 μ g을 65°C 10분간 변성시키고 역 전사 효소 반응액을 첨가하여 cDNA를 제작하였다. 합성된 VEGF 및 IGF-I cDNA(10 μ L)에 Taq-polymerase 효소 반응액을 첨가하고 VEGF cDNA에 특이적으로 반응하는 primer 5'-GAC CCT GGC TTT ACT GCT-3'(sense)과 5'-AAT GCT TTC TCC GCT CTG-3'(anti-sense)를 사용하였다. IGF-I cDNA에 특이적으로 반응하는 primer 5'-CAC AGG CTA TGG CTC-3'(sense)과 5'-CTT CTG AGT CTT GGG-3'(anti-sense)를 각각 1 μ L(10 pM) 첨가하여 증폭한 후 2% agarose gel 상에서 발현량을 조사하였다. 역 전사 반응 후 존재하는 VEGF mRNA를 정량하기 위해 competitive PCR을 수행하였고, 필요로 하는 standard VEGF cDNA의 제작은 RT-PCR로 증폭된 432 bp의 중간부분 210 bp를 제거하였다. Standard IGF cDNA의 제작은 RT-PCR로 증폭된 175 bp의 중간부분 53 bp를 제거하여 제작하였다. 각각의 역 전사 산물 cDNA 10 μ L와 제작된 standard VEGF 및 IGF cDNA를 1 ng을 같은 PCR tube에 넣은 후 전 과정은 위의 RT-PCR과 같은 조건으로 증합효소연쇄 반응을 시켰으며, 증폭된 산물은 2% agarose gel 상에서 발현량을 조사하였다.

5. Western Hybridization

심장조직 100 mg 정도에 150 mM NaCl, 5 mM

EDTA, 50 mM Tri-HCl(pH 8.0), 1%-NP 40, 1 mM aprotinin, 0.1 mM leupeptin, 1 mM pepstatin 가 함유된 용액을 1 mL 첨가한 후 분쇄한 다음 14,000 rpm에서 30 분 동안 원심 분리하였다. 단백질 (20 µg)은 10% SDS-polyacrylamide gels을 이용한 전기영동을 통해 변성된 후 polyvinyl difluoride membrane에 전이시켰다. Membrane은 Phosphate-buffered saline(PBS)에 5% skim milk가 첨가된 용액에서 차단시키고, polyclonal anti-VEGF antibody (Santacruz, CA)가 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응된 후 PBS에 0.1% tween-20이 함유된 용액에서 15분 동안 세척하였다. Membrane을 goat anti-rabbit IgG conjugated secondary antibody가 첨가된 용액에서 1시간 동안 반응한 다음 Kodak 필름을 통해 immunoreactive bands를 측정하였으며, bands의 상대적 강도는 densitometer(Sci-Scan, USB)를 통해 정량화 하였다.

결 과

1. 저산소증에 의해서 유도되는 심근 내 전사인자들의 변화

실험용 쥐에 저산소증을 유도 후 1시간부터 24시간까지 저산소 상태 노출 후 경과 시간에 따른 심장의 핵 내에 변화되는 전사인자 NF-κB, AP-1, NF-ATc, NKX-2.5를 EMSA로 분석하였다. 저산소증 유도 1시간부터 심장의 핵 내으로 NF-κB의 이동에 따른 이 전사인자 NF-κB의 증가가 나타났는데 저산소증 노출 시간으로 3시간과 6시간 동안 노출 경우에 가장 많은 발현이 나타났다(Fig. 1A). 이러한 NF-κB의 저산소 노출시 증가된 핵 내 발현은 본 실험에서 관찰한 최장시간인 24시간까지도 지속되는 결과를 보였다. 전사조절인자 AP-1은 c-Jun과 fos가 결합된 dimer의 단백질로 일반적으로 외부자극에 민감히 발현되는 특징을 가지고 있는데 저산소증 노출 시 AP-1 또한 지속적으로 핵 내에 발현되었다. 발생초기부터 심장에서 주로 발현하여 심장의 형성에 관여하는 전사인자로 알려진 NF-ATc와 NKX-2.5의 핵 내 변화를 역시 관찰하였다. 저산소증 유도 전에는 NF-ATc의 핵 내 발현이 거의 없었고, NKX-2.5는 저산소 자극 전에도 그 발현이 관찰되었다. 저산소증의 유도로 NF-ATc는 심장의 핵 내에서 급격히 증가되었으며

24시간까지 초기 발현 변화를 지속적으로 나타냈다. 그러나 NKX-2.5는 저산소증 유도에 따른 의의 있는 변화를 나타내지 않았다. NF-κB의 핵 내 이동을 억제하기 위하여 IκB의 분해억제 작용이 보고된 diethyl-dithiocarbamic acid(DDTC)를 사용하였는데, 저산소증 유도 15분 전에 실험 동물 복강 내로 DDTC를 투여하였고 처치 후 6시간까지 NF-κB의 핵 내 이동을 관찰하였다. DDTC 투여 군은 6시간까지 핵 내의 NF-κB의 이동이 거의 없었다(Fig. 1B).

2. 저산소증에 의한 NF-κB 발현 및 VEGF와 IGF-I의 변화

저산소증에 대한 적응 반응으로 추정되는 심장의 NF-κB의 핵내 이동이 관찰되었다. 이러한 NF-κB의 변화와 더불어 저산소증 상태에 노출 시 심장 보호 기능을 할것으로 예측되는 VEGF와 IGF-I의 발현을 아울러 검토하였다. NF-κB의 핵 내 발현이 증가되는 저산소증 실험 군과 DDTC 투여로 NF-κB의 핵 내 발현이 억제된 실험 군에서 VEGF와 IGF-I의 발현을 각각 측정하였다. 이들의 발현을 정량발현의 정도를 측정할 수 있는 competitive-PCR로 확인하였는데, VEGF는 저산소증 유도 후 1시간째부터 발현이 나타났다. NF-κB의 핵 내 이동이 정점에 달하

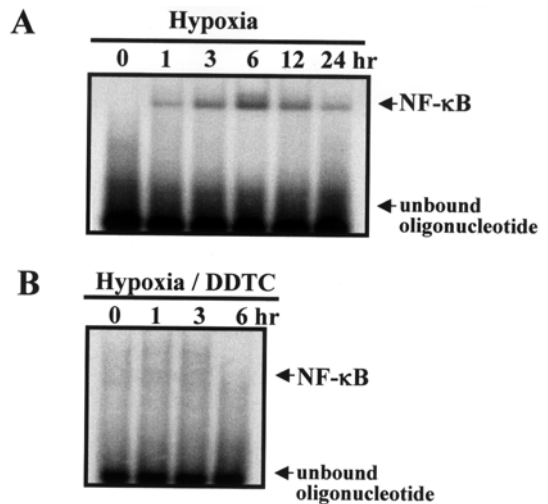


Fig. 1. (A) Induction of nuclear factor kappa B (NF-κB) activation according to the different lengths of hypoxic exposure in heart muscle. The expression of NF-κB was increased by hypoxic stress. **(B)** Blocking of the NF-κB activation was shown by pretreatment with diethyl-dithiocarbamic acid(DDTC), a inhibitor of NF-κB.

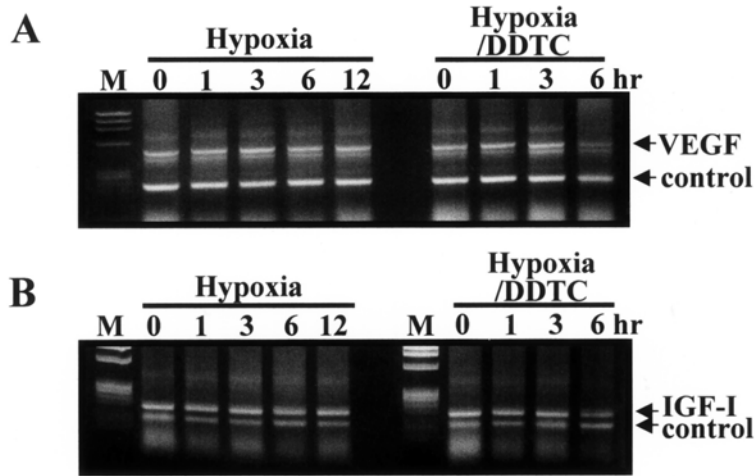


Fig. 2. (A) Changes of vascular endothelial growth factor(VEGF) mRNA expression by NF- κ B activation according to the hypoxic exposure in heart muscle. Increased VEGF expression in the hypoxic exposure was shown. The expression was inhibited by pretreatment with diethyl-dicarbamic acid(DDTC). (B) Changes of insulin-like growth-I(IGF-I) mRNA expression by NF- κ B activation according to the hypoxic exposure. Increased IGF-I expression in the hypoxic exposure was shown. The expression was inhibited by DDTC.

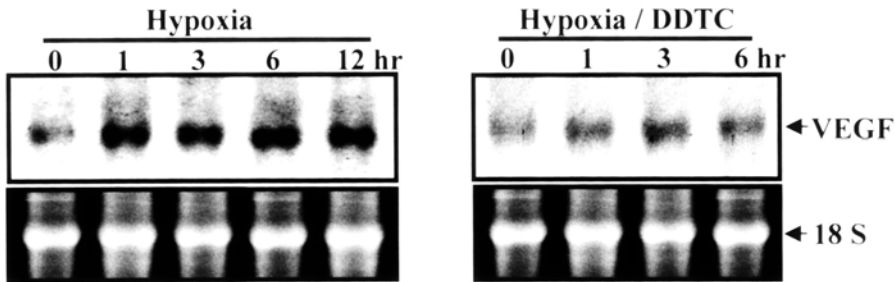


Fig. 3. Northern blot analysis of VEGF mRNA expression by NF- κ B activation according to the hypoxic exposure in heart muscle. Increased VEGF expression in the hypoxic exposure was shown. The expression was inhibited by diethyl-dicarbamic acid(DDTC).

는 3시간에 VEGF의 발현이 증가되었으며 이러한 증가가 12시간까지 지속되었다. 그러나 DDTC 전 처치 실험 군에서는 이러한 저산소증에 의한 VEGF의 발현 증가가 나타나지 않았으며 오히려 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2A). IGF-I의 발현도 저산소증 시에 유도되었지만, DDTC 전 처치 실험 군에서는 상당히 감소하였다(Fig. 2B). 이상의 VEGF의 발현의 변화를 Northern hybridization과 단백질의 변화를 예측할 수 있는 Western hybridization으로 다시 확인하였다. Competitive-PCR과 동일하게 저산소증 군에서 VEGF mRNA와 protein 모두 발현이 증가되었으며 DDTC 전 처치 실험 군은 감소하였다(Fig. 3, 4).

고 찰

심 비대는 심장에 압력 또는 용적 과부하에 의해 초래되는 현상으로 여러 심 질환에서 관찰된다. 이러한 심 비대 초래 시에 유도되는 각종 분자들에 대한 연구는 심장병과 관련된 분자기전의 연구모델이 될 수 있다. 심근에 대한 기계적 자극은 세포 내 여러 이차 신호전달 체계를 활성화시키는데 이러한 활성화 과정은 성장인자 신호전달 체계와 유사하며 결국에는 신전(stretch) 자극에 의한 비후가 초래됨이 보고되었다⁸⁾. 또한 비대 심장에 저산소증 상태를 부가할 때

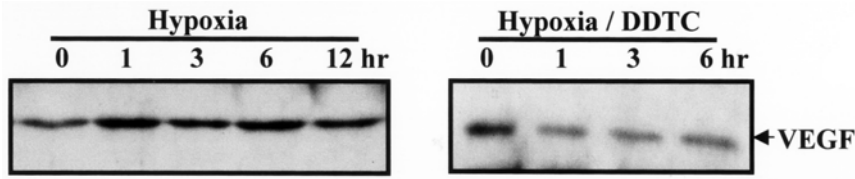


Fig. 4. Western blot analysis of VEGF protein expression by NF- κ B activation according to the hypoxic exposure in heart muscle. Increased VEGF expression in the hypoxic exposure was shown. The expression was inhibited by diethyl-dicar-bamic acid(DDTC).

심장의 발생 시 나타나는 일부 유전자가 재발현되어 이들이 심장 기능을 보호 할 것으로 추측되어진다⁹⁾. 본 연구에서는 저산소증으로 심장 세포 물질의 변화를 유도하였는데 특히 NF- κ B의 변화와 함께, 초기 심장의 발생과 관련 있는 전사인자인 NKX-2.5와 NF-ATc의 변화를 관찰하였다. 심 비대를 비롯하여 여러 질환 시에 NF- κ B의 활성화는 나타난다. NF- κ B는 핵 내로 이동하여 여러 성장 인자와 lymphokine 등을 발현시키는 것으로 생각된다⁴⁾. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 전사인자 NF- κ B는 저산소증 노출과 동시에 발현이 유도되었다. 이러한 NF- κ B의 발현이 심장의 보호기능과 관련된 유전인자들의 발현을 검증하였다.

전사인자 NF-AT는 활성화된 T 세포에서 lymphokines과 cytokines의 발현을 유도하는 유전자로 발견되었다¹⁰⁾. 이러한 NF-AT는 4개의 isotypes이 있는데 심장 판막과 심실중격을 형성하는데 관여되는 isotype으로는 NF-ATc이 보고되고 있다^{11, 12)}. 그런데 현재까지 저산소증이나 심 비대와 관련하여 NF-ATc의 발현에 관한 문헌상 보고는 없었다. 본 연구 결과에서는 저산소증에 의해 NF-ATc의 심장 내 발현이 유도되고 본 실험의 최장 노출 시간인 저산소 자극 24시간까지도 이러한 NF-ATc의 심장 내 발현이 지속적으로 유지됨을 나타냈다. NF-AT는 평상시 세포질에 phosphate 상태로 존재하며 외부적인 자극에 세포질 내 calcium의 농도가 증가하면 calcineurin의 dephosphorylation 활성이 유도되면서 핵 내로 이동한다¹³⁾. 한편 Sussman 등¹⁴⁾에 의하면 이러한 calcineurin의 작용을 방해하면 심장의 비대를 억제시킬 수 있다고 보고하였는데 이는 NF-AT가 심장 비대의 진행에 필수적인 여러 인자의 발현을 발현시키는 것으로 가정 될 수 있다. NF-ATc의 knock out mouse가 심장 판막과 심실중격 형성 이상이 관찰되어 초기의

심장의 발생과정에 이러한 NF-ATc가 중요한 기능을 수행을 나타냄을 보였지만, 심 비대와 관련하여서는 NF-ATc의 작용의 역제가 관련됨이 가정되고 있다¹²⁾. 이를 증명하기 위해서는 NF-ATc의 핵 내 이동을 저해시키면서 운동자극 등을 이용한 심 비대 유발 시 심장 내에 VEGF 등의 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편 전사인자 NKX-2.5는 저산소증 자극 전후에 그 발현의 변화가 없었다. 지금까지의 보고도 NKX-2.5의 발현은 심장 발생에 국한되어 있으며, 특히 모든 척추동물에서 이 전사인자의 단백질 배열이 거의 일치하는 점으로 모든 척추동물에서 초기 심장 발생에 중요한 작용을 하는 것으로 인식된다¹⁵⁾. 이는 NKX-2.5가 급격한 심장의 변화 혹은 심 질환 등과 관련된 심장 내에서의 기능은 없는 것으로 여겨진다. 다만 in vitro의 결과이지만 NKX-2.5가 α -cardiac actin과 ANF의 발현에 관여하는 것이 보고된 바 있어^{16, 17)} 이 인자가 심장의 항상성을 유지하는 기능에 관련되는 인자로도 추정된다. 저산소증과 관련되어 발현의 변화가 나타나는 전사인자로 잘 알려진 인자로는 NF- κ B이지만²⁾, 그 외의 전사조절 인자로 AP-1이 역시 알려져 있으며¹⁸⁾ 이러한 AP-1은 TGF- β 의 발현에 관여하는 것으로 예측된다¹⁹⁾. AP-1은 저산소증 상태에서 특히 내피세포에 많은 작용이 예측되며, 세포주기의 진행을 억제하는 기능을 보인다¹⁹⁾. 또한 심근세포에서 염증 상태 경우에 NO가 활성화되며 이는 세포 자멸사를 유도시키는데 이때에 관여하는 전사인자로 AP-1이 매개된다고 보고되고 있다²⁰⁾. 따라서 심장에 대한 저산소 자극 시 AP-1은 세포 주기의 진행을 억제하고 궁극적으로 자멸사 유도 분자의 발현에 작용하는 것으로 사료된다. 본 연구 결과에서도 AP-1이 저산소증에 따른 발현유도가 관찰되었다.

저산소증 및 허혈성 자극은 심근세포 내 nitric oxide(NO)의 생성을 유발하며 이어서 protein kinase C

(PKC)의 활성화 기타의 여러 kinase의 활성화가 유도된다고 알려지고 있다^{21, 22}). NO의 활성화와 여러 protein kinase의 활성화는 성장인자이며 조직을 보호하는 VEGF와 IGF-I의 발현 증가를 유도하는데 결국 저산소증은 혈관의 구조 및 재생에 관여하는 분자의 발현을 유도하여, 이러한 VEGF의 발현으로 angiogenesis와 vasculogenesis가 일어난다고 보고되고 있다⁶). 또한 저산소증 자극 시는 심근세포의 생존력 향상을 위한 IGF-I의 발현을 유도하는데 이러한 발현 유도가 Akt/PKB 신호전달체계를 활성화하는 것으로 알려지고 있다²³). 본 연구 결과에서도 저산소증 자극과 동시에 VEGF와 IGF-I의 발현이 유도되었다. 결국 저산소증은 VEGF의 발현을 촉진하고 심혈관 내피세포의 remodeling을 유발시키는 것으로 사료된다. 따라서 심장이 여러 자극으로부터 보호되는 신호체계는 NO를 경유하여 NF- κ B의 활성화가 유도되며, NF- κ B는 VEGF와 IGF-I 등을 발현시키며 이러한 심 기능 보호 기능 분자는 2차적으로 세포 생존력을 유지하는 Akt/PKB의 경로를 활성화 시키는 것으로 추정된다.

한편 여러 자극에 대한 NF- κ B의 심장 보호기능에 대한 검증을 위해서 본 실험에서는 NF- κ B의 핵 내로의 이동 저해제로 DDTC를 복강 내에 투여하면서, 저산소증과 같은 심장 자극으로 인한 VEGF와 IGF-I 변화와 함께 NF- κ B의 핵 내 발현과의 상호 관련성을 관찰하였다. DDTC 투여 군은 NF- κ B의 핵 내 이동이 없었는데 이들 군에서는 IGF-I과 VEGF의 발현이 오히려 감소하였다. 결국 NF- κ B 핵 내 활성화는 VEGF와 IGF-I의 발현을 유도시켰으며, DDTC 투여로 인한 NF- κ B의 활성화저해는 이들 분자의 발현을 감소시키는 결과를 얻었다. 따라서 NF- κ B는 여러 자극에 의한 초기 심장을 보호하는데 중요한 작용을 하고 있음을 확인하였다. 그 동안 여러 질병과 관련하여 NF- κ B의 활성화는 보고되었으며, 질병의 상황에서 NF- κ B는 anti-apoptosis의 기능을 수행하는 것으로 인식되고 있다^{4, 24}). 또한 IGF가 심근세포의 anti-apoptotic 인자로서의 기능을 수행하고 있음이 보고된 바 있다²³). 또 다른 성장인자의 하나인 VEGF는 주로 심혈관 내피세포에 국한되어 보고되고 있지만, 이 또한 Akt/PKB 경로를 경유하여 심근세포의 생존력을 향상시켜 궁극적으로 VEGF의 심장 보호 기능이 추정된다. 우리 몸의 여러 암 세포에서도 NF- κ B의 활성을 저해하면 암세포의 전이와 침윤에

관련 분자인 VEGF의 발현이 저하되고 있음이 보고되고 있다²⁵). 결국 저산소증 등의 자극 시 심장에서 NF- κ B가 직접 VEGF와 IGF의 발현에 관여하는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 NF- κ B의 활성화와 관련하여 세포간 접촉인자나 cardiac-actin 등의 발현을 관찰하지 않았지만, 저산소증에 대한 심장의 보호기능으로 NF- κ B의 활성화와 VEGF와 IGF-I의 발현이 중요한 기능을 수행하는 기본적인 체제임을 추정할 수 있다.

요 약

목적 : 전사인자 NF- κ B는 스트레스 등으로부터 세포 자멸사를 조절하여 적응을 유지하는 기본적인 분자로 인식되고 있다. 저산소증 상태는 많은 심장병에서 동반되는 병변으로 성장인자 VEGF와 IGF-I는 저산소증 시에 심장을 보호하는 작용을 할 것으로 추측되고 있다. 본 연구에서는 저산소증과 같은 자극으로부터 심장의 보호 기능이 추정된 NF- κ B의 발현과 함께 VEGF와 IGF-I의 발현 연관성을 검토하여 분자 생물학적인 기전을 이해하고자 하였다.

방법 : 실험동물로 Sprague Dawley rat을 이용하여, 저산소 자극은 8%의 산소와 92% 질소를 hypoxic chamber로 관류시키며 유도하였다. 심장에 대한 저산소증 자극 후 심근세포로부터 측정 인자들과 관련된 핵 내 단백질, 전단백질 그리고 mRNA를 분리하였다. 핵 내의 전사인자는 EMSA로 측정하였으며, VEGF와 IGF-I의 발현은 competitive-PCR, Western hybridization, Northern hybridization으로 확인하였다. 또한 이러한 성장인자의 발현과 관련된 NF- κ B의 기능을 확인하기 위하여 NF- κ B의 핵 내 이동 억제제인 DDTC를 전 처치로 복강 내 주사하여 그에 따른 VEGF 및 IGF-I의 발현 양상을 비교하였다.

결과 : 저산소 자극 후에 심근 세포 내에 전사인자 NF- κ B, AP-1, NF-ATc의 활성화가 증가되었다. VEGF와 IGF-I의 발현도 저산소증 자극 시 증가되었지만, DDTC 전 처치에 의한 NF- κ B의 핵 내 이동 차단 후 이들 인자의 발현은 의의 있게 감소하였다.

결론 : 전사인자 NF- κ B는 저산소증 상태에서 그 활성이 증가하고 저산소증 상태와 같은 심장에 대한 이상 자극 시 VEGF와 IGF-I의 발현을 증가시켜 심장을 보호하는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- 1) Mably JD, Liew CC. Factors involved in cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. *Circ Res* 1996;79:4-13.
- 2) Boyle EM, Canty TG, Morgan EN, Yun W, Pohlman TH, Verrier ED. Treating myocardial ischemia-reperfusion injury by targeting endothelial cell transcription. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:1949-53.
- 3) May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today* 1998;19:80-8.
- 4) Abraham E. NF- κ B activation. *Crit Care Med* 2000;28:N100-4.
- 5) Xuan YT, Tang XL, Banerjee S, Takano H, Li RCX, Bolli R, et al. NF- κ B plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Cir Res* 1999;84:1095-109.
- 6) Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. *Cir Res* 1995;77:638-43.
- 7) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-4.
- 8) Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 1997;73:424-38.
- 9) Baldwin HS. Advances in understanding the molecular regulation of cardiac development. *Curr Opin Pediatr* 1999;11:413-8.
- 10) Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:707-47.
- 11) Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, Brousse FC, Glimcher LH, et al. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 1998;392:186-90.
- 12) Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Mak TW, et al. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 1998;392:182-6.
- 13) Abbott KL, Friday BB, Thaloor D, Murphy TJ, Pavlath GK. Activation and cellular localization of the cyclosporine A sensitive transcription factor NF-AT in skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 1998;9:2905-16.
- 14) Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Molkentin JD, et al. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 1998;281:1688-93.
- 15) Schwartz RJ, Olson EN. Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating NKX-2.5 transcription. *Development* 1999;126: 4187-92.
- 16) Chen CY, Schwartz RJ. Recruitment of the tinman homologue NKX-2.5 by serum response factor activates cardiac α -actin gene transcription. *Mol Cell Biol* 1996;16:6372-84.
- 17) Durocaer D, Chen CY, Ardati A, Schwartz RJ, Nemer M. The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for NKX-2.5 in the myocardium. *Mol Cell Biol* 1996;16:4648-55.
- 18) Xanthoudakis S, Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA binding activity. *EMBO J* 1992;11:653-65.
- 19) Shih SC, Claffey KP. Role of AP-1 and HIF-1 transcription factors in TGF- β activation of VEGF expression. *Growth Factors* 2001;19:19-34.
- 20) Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1(AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J* 2001;15:2518-20.
- 21) Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qui Y, Zhang Q, Jadoon AK, et al. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res* 1997;81:42-52.
- 22) Ping P, Zhang J, Qui Y, Tang XL, Machikalapudi S, Bolli R, et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms ϵ and η in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* 1997;81:404-14.
- 23) Mehrhof FB, Muller FU, Bergmann MW, Li P, Wang Y, von Harsdorf R, et al. In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein. *Circulation* 2001;104:2088-94.
- 24) Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998;281:1680-83.
- 25) Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF- κ B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001;20:4188-90.