

이학 석사학위 논문

저산소성 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서  
PKC의 역할

아주대학교 대학원

의학과

윤이슬

저산소성 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서  
PKC의 역할

지도교수 문 창 현

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

윤 이 슬

윤이슬의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 수 환 인

심사위원 문 창 현 인

심사위원 백 은 주 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2006년 12월 22일

## 저산소성 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 PKC의 역할

뇌혈관 질환은 혈류를 통한 지속적인 산소 및 포도당 공급이 필요한 국소 뇌조직 대사에 이상을 일으키게 되어 그에 따른 국소 뇌조직의 기능 이상이 임상 증상으로 나타나는 질환이다. 저산소에 의한 세포 사멸과정에는 protein kinase C(PKC)가 관여한다고 알려져 있는데, 세포의 종류에 따라 다르게 작용하는 PKC isotype의 역할이 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았고, 조절기전 역시 불분명한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 PKC isotype의 활성 변화 및 역할을 알아보았다.

저산소성 뇌혈관 내피세포 사멸을 유도하기 위하여 Oxygen-Glucose Deprivation (OGD) 모델을 이용하였으며, bEnd.3 뇌혈관 내피세포주를 실험 전 과정에 사용하였다. 저산소 상태에서 PKC- $\delta$ 의 활성화 변화를 확인하였고 저산소에 의한 세포 사멸과정에서 PKC- $\delta$ 의 역할을 알아보기 위해 PKC- $\delta$  활성을 억제하거나 PKC- $\delta$ 를 과발현시켜 세포사멸의 변화를 관찰하였다. 세포사멸의 정도는 lactate dehydrogenase (LDH) 유리, trypan blue 염색 방법을 통해 관찰하였다.

bEnd.3 뇌혈관 세포주를 저산소에 노출시킨 지 1 시간째 PKC- $\delta$ 의 활성 가장 증가하였고 4 시간까지 지속되었다. 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 PKC- $\delta$ 의 역할을 알아보기 위해 PKC- $\delta$  저해제인 rottlerin을 처리한 결과, 저해제의 농도가 증가함에 따라 세포 사멸이 현저히 증가하였으며 저산소 자극 후 PKC- $\delta$  활성이 rottlerin에 의해 감소됨을 확인하였다. 또한, PKC- $\delta$ 를 과발현 시켰을 때 저산소에 의한 세포사멸이 감소하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과들로부터 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 활성이 증가된 PKC- $\delta$ 는 세포사멸로부터 세포를 보호하는 것으로 추정되었다.

---

핵심어: PKC- $\delta$ , 뇌혈관 내피세포, 저산소, 세포사멸

## 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	ii
그림 차례 .....	iii
사용 약어 .....	iv
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
III. 결과 .....	9
IV. 고찰 .....	18
V. 결론 .....	22
참고문헌 .....	23
ABSTRACT .....	27

## 그림 차례

Fig. 1. Scheme of pcDNA3 .....	7
Fig. 2. Activation of PKC- $\delta$ during hypoxia in bEnd.3 cells .....	10
Fig. 3. Effect of rottlerin on hypoxia-induced cell death; LDH release .....	11
Fig. 4. Effect of rottlerin on hypoxia-induced cell death; trypan blue staining .....	12
Fig. 5. Effect of rottlerin on hypoxia-induced PKC- $\delta$ activation .....	13
Fig. 6. Transient overexpression of PKC- $\delta$ wild-type .....	15
Fig. 7. Effect of overexpressed PKC- $\delta$ on hypoxia-induced cell death; LDH release .....	16
Fig. 8. Effect of overexpressed PKC- $\delta$ on hypoxia-induced cell death; trypan blue staining .....	17

## 사 용 약 어

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

Nm : Normoxia

Hx : Hypoxia

Veh : Vehicle

CTL : control

LDH : Lactate dehydrogenase

PKC : Protein kinase C

HCSS : HEPES control salt solution

PBS : Phosphate buffered saline

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylene diaminetetraacetic acid

EGTA : Ethylene glyco-bis-(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

PVDF : Polyvinylidene fluoride membrane

MARCKS : Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate

PSD : Phosphorylation site domain

HA : Hemagglutinin

LAS : Image Analyzer system-Luminescent

ECL : Enhancer chemiluminescent assay

# I. 서 론

## A. 허혈성 뇌혈관 질환에 의한 세포사멸

허혈성 뇌혈관 질환이란 뇌에 혈액을 공급하는 혈관에 여러 가지 형태의 병리학적 이상이 발생되어 정상적 뇌혈류의 장애를 초래하게 되는 질환을 말한다. 우리 몸에서 뇌의 활동은 뇌동맥을 흐르고 있는 혈액에 의해 산소와 영양소를 공급받아 이루어진다. 우리 몸의 조직 가운데 특히 뇌조직은 산소 부족에 민감하기 때문에 충분한 양의 산소가 공급되지 못하면 해당 부분의 뇌조직은 손상을 받고 시간이 지나면 뇌활동은 정지되어 버린다. 뇌허혈시 허혈 중심부에서는 심한 허혈로 인해 신경세포막이 손상되어 괴사 형태의 세포사가 유발되고, 허혈 주변부에서는 소량의 산소와 포도당이 공급되어 세포 기능이 일시 정지되어 있는 상태에 빠지게 된다. 허혈 주변부 세포들은 혈류가 재건되면 기능이 회복되거나 재관류성 손상 (reperfusion injury) 또는 지연성 세포사가 일어난다 (Du 등, 1996).

뇌허혈시에는 adenosine, arachidonic acid 대사산물 등의 vasoactive substance가 생성되고, 조직 내 전해질의 변화가 일어나고, lactate의 축적 및 세포막 단백질과 인지질의 분해산물에 의해 조직내 삼투압이 증가하고, 또한 허혈에 의하여 혈뇌장벽(Brain-Blood Barrier, BBB)이 파괴되는 현상이 일어나게 되는데, 이는 모두 부종을 일으키는 요인으로 알려져 있다 (Chen 등, 2006). 또한 허혈에 의해 변화된 뇌의 대사는 고에너지 인산화합물인 ATP의 급격한 감소와 조직 내 lactate의 증가에 의한 산증의 발생, 칼슘 평형의 상실, 유리지방산의 유리 및 oxygen free radical의 생성 등으로 크게 나누어 볼 수 있고, 더 나아가 뇌혈관 질환을 일으킨다고 보고되었다 (Liao 등, 2003).

이러한 허혈성 뇌혈관 질환으로 인해 중요한 뇌세포 조직이 괴사에 빠지면 어떤 치료에도 정상 회복은 될 수 없다. 그렇기 때문에 허혈성 뇌혈관 질환은 심



각한 후유증을 남기는 경우가 많고 이로 인한 환자 자신의 고통은 물론이고 사회적, 경제적 손실은 매우 엄청난 규모에 달하게 된다. 따라서 효과적인 뇌혈관 질환 예방과 치료를 위해서는 뇌혈관의 병변을 막고 뇌혈관 기능을 개선시키는 것이 중요하다.

## B. 세포 사멸과 protein kinase C (PKC)

저산소에 의한 스트레스는 다양한 세포와 조직에서 세포사멸과 기관이상을 이끄는 여러 가지 신호전달의 원인이 되는 것으로 알려져있다 (McMurtry 등, 2003). 다양한 세포에서 protein kinase C (PKC) family는 저산소로 유발되는 신호전달에서 중요한 매개체로 알려져 있으며 세포내 신호전달, 종양 생성, 유전자 발현, 그리고 세포성장 및 증식 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Rao 등, 1993; Stauble 등, 1994; Amstad 등, 1992). 이러한 PKC의 활성화는 효소의 활성화와 인산화, 그리고 단백질 분해작용에 의해 조절된다. 현재까지 알려진 PKC의 12가지 isotype은 다음과 같이 세 가지로 분류된다. 첫째, phospholipids (PS), calcium, diacylglycerol(DAG)에 의존적인 conventional PKC( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ )와 둘째, calcium에 독립적이고, DAG에는 의존적인 novel PKC( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ), 마지막으로 calcium과 DAG에 모두 독립적인 atypical PKC( $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\lambda$ )가 있다 (Hongyu 등, 2003). 이러한 PKC isotype들은 다양한 유전자를 발현시키고, 조직 발현과 생화학적 다양성들을 나타내기 때문에 다양한 생물학적 기능을 나타내는 것으로 보고되었다 (Yukitaka 등, 1999).

허혈성 심장에서 PKC- $\delta$ 는 미토콘드리아 분획으로 이동하여 세포보호 효과를 나타낸다고 보고(Kawamura 등, 1998)되어 있으며, PKC- $\delta$ 의 활성이 미토콘드리아 기능을 상실시켜 심근세포 사멸을 일으킨다는 보고(Perez 등, 2005)가 있다. 또한, 허혈성 혈관내피세포에서 저산소 자극을 주었을 때 PKC- $\delta$  활성의 감소가 허혈성 상태에 대한 적응력을 갖게 하기도 (Saurin 등, 2000) 하지만 반

면 세포사멸을 일으킨다는 보고도 있다 (Shizukuda 등, 1999). 이렇듯 저산소에 의한 세포사멸 과정에서 PKC- $\delta$ 의 역할이 아직까지 세포의 종류에 따라 다른 실정이고, 조절기전 역시 명확하게 밝혀지지 않았다.

### C. 연구목적

본 연구에서는 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 PKC- $\delta$ 의 활성 변화 및 그 역할을 알아보려고 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### A. 실험기기 및 시약

#### 1. 시약 및 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium  
(DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)  
Fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA)  
Penicillin-streptomycin (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA)  
Trypsin-EDTA (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA)  
Rottlerin (Sigma, St. Louis, MO, USA)  
Antibody for PKC  $\delta$  isoform (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA)  
LDH enzyme (Sigma, St. Louis, MO, USA)  
HRP anti rabbit antibody (Cell signaling technology, Beverly, USA)  
Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)  
HA antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)  
PVDF membrane (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)  
pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)  
MARCKS PSD-Derived peptide, PKC substrate  
(Calbiochem, San Diego, CA, USA)

#### 2. 기기 및 기구

ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)  
Image Analyzer system-Luminescent (Kodak, Japan)  
Centrifuge (Vision, Seoul, Korea)

Anaerobic chamber (Forma scientific, Marietta, OH, USA)  
Ultrasonicator (Sonics & Materials INC, Danbury, CT, USA)  
Ultracentrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA)  
Microcentrifuge (Eppendorff, Germany)  
Clean bench (Sam Ki, Seoul, Korea)  
CO<sub>2</sub> Incubator (Sanyo, Japan)  
Electrophoresis (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)  
Inverted Microscope  
(Leica DMLS, Lilienthalstrasse, Bensheim, Germany)

## B. 연구방법

### 1. 세포배양

뇌혈관 내피세포주 bEnd.3를 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml), streptomycin(100 µg/ml)이 추가된 DMEM으로 항온기(5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37 °C)에서 유지하였다. 배지는 2 일마다 교환해 주었으며 100 mm dish에 세포가 90% 정도 자라면 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 계대하였다.

### 2. 저산소로 인한 세포사멸 유도

bEnd.3 세포를 혐기 chamber(85% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 37 °C)에 넣어 저산소성 세포사멸을 유도하였다. 이 때 배지는 N<sub>2</sub> 가스를 이용하여 산소를 제거한 DMEM-base(serum free, glucose free)배지로 갈아주었다. PKC-δ 억제제인 rottlerin(0.01, 0.03, 0.1, 0.3 µM)은 Oxygen-Glucose Deprivation (OGD) 상태에 노출시키기 30 분전과 노출 동안에 세포에 처리하였다. 이때, 대조군은 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37 °C가 일정하게 유지되는 조건에서 serum이 배제된 DMEM으로 갈아주었다.

### 3. LDH (lactate dehydrogenase) 유리 측정

뇌혈관 내피세포사멸을 측정하기 위해 유리된 LDH의 활성을 측정하였다. 저산소 12 시간째에 상층액을 25  $\mu$ l씩 96 well에 취한 후 LDH assay를 실시하였다. Full kill은 1% Triton X-100으로 처리하여 최대 세포사멸을 유발하였다. 이들 상층액은 NADH (3 mg/10 ml NADH, 4.53 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11.6 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH7.4) 100  $\mu$ l와 pyruvate (22.7 mM pyruvic acid, 4.53 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11.6 g/l  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) 25  $\mu$ l를 혼합한 후, 즉시 340 nm 파장에서 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 이 때 standard로 LDH enzyme을 이용하여 발색과 동시에 비교 정량하였다.

### 4. Trypan blue staining

뇌혈관 내피세포사멸을 측정하기 위해 trypan blue staining을 시행하였다. 저산소 12 시간에서 자극을 받은 세포들을 1 X HCSS에 1번 세척한 후 0.2% trypan blue로 염색하였다. 광학현미경을 통하여 염색되지 않은 생세포수와 염색된 사세포의 수를 세어 [(전체세포-생세포수)/전체세포] x 100으로 세포사멸율(%)을 측정하였다.

### 5. Western blot analysis

단백질의 발현을 알아보기 위하여 100 mm dish 상에서 차가운 sterile PBS(pH 7.4)로 2회 세척 후 protease inhibitors(10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 0.1 mM PMSF)와 phosphatase inhibitors(1 mM NaF, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM glycerophosphate)가 첨가된 PKC extraction buffer(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 10% glycerol, pH 7.5)를 넣었다. 그런 다음 세포를 수집하여 5초 간격으로 3회의 sonication으로 세포를 깨어준 후 14,000 x g, 4  $^{\circ}$ C에서 15 분간 원심분리하였다. BCA 방법으로 단백질 정량을 한 다음, Laemli buffer를 넣어 100  $^{\circ}$ C에서 10 분

간 끓인 후 8% SDS-PAGE를 행하여 단백질을 분리하고 PVDF membrane으로 옮겼다. Membrane은 TBS-0.05% tween(T-TBS)로 씻어낸 후 60분간 5% non-fat dry milk로 blocking하였다. 이를 다시 T-TBS로 5 분씩 5 회 씻어내고 TBS에 primary antibody(1:500)를 희석하여 하룻밤 동안 반응시킨 후 발색을 위해 2차 antibody인 HRP antibody (1:5,000)를 1 시간 동안 반응시켜 ECL로 발색시키고, LAS를 이용하여 이미지를 관찰하였다.

## 6. Plasmid construction

여기서 PKC- $\delta$ 의 기능을 관찰하기 위해 실험에 이용한 pcDNA-PKC- $\delta$  Wild-type(WT) 유전자는 pcDNA3(Fig. 1)을 *Bam*H1과 *Eco*RI으로 digestion 한 후 PKC- $\delta$ 의 N-terminal에 HA tag가 부착된 PKC- $\delta$  WT 유전자를 도입시킨 것으로 국립 암센터(Korea Cancer Center Hospital)의 이수재 박사님으로부터 제공받았다 (Lee 등, 2003). PKC- $\delta$  WT construct는 PKC- $\delta$ 의 full-length open reading frame으로 구성되었다.

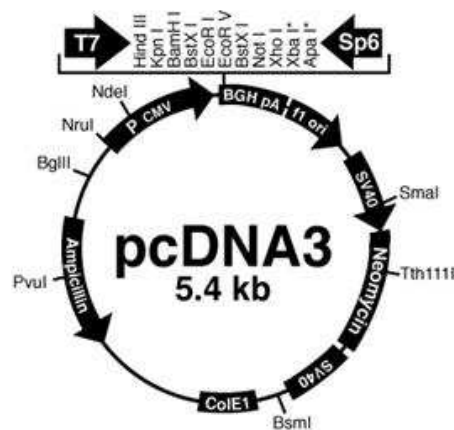


Fig. 1. Scheme of pcDNA3.

## 7. Transfection

bEnd.3 세포를 Transfection하기 전날  $6 \times 10^4$  cells/ml으로 seeding하여

대략 80% confluence 정도가 되도록 배양하였다. DNA와 Lipofectamine 2000을 각각 혈청과 항생제가 포함되지 않은 transfection medium으로 희석하고 혼합하였다. 이 transfection medium을 20 분 동안 실온에서 방치한 후 혈청과 항생제가 포함되지 않은 medium이 담긴 세포 위에 붓고 5 시간 동안 incubation 하였다. Transfection한 시점으로부터 5 시간이 지난 후 혈청과 항생제가 포함된 growth medium으로 교체해 주었다.

## 8. PKC activity 측정

세포내 단백질은 protease inhibitors(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 0.1 mM PMSF)와 phosphatase inhibitors(1 mM NaF, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM glycerophosphate)가 첨가된 PKC extraction buffer(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 10% glycerol, pH 7.5)로 수집하였다. 수집한 세포내 단백질량은 500  $\mu\text{g}$ 으로 하여 PKC- $\delta$  antibody 2  $\mu\text{g}$ , protein G-Sepharose 20  $\mu\text{l}$ 와 4  $^\circ\text{C}$ 에서 4 시간 동안 incubation 하였다. 면역 침전물은 PKC reaction buffer(50 mM HEPES, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 2.5 mM EGTA, 1 mM NaF, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM glycerophosphate, pH 7.5)로 재부유시킨 후, PKC substrate인 myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) phosphorylation site domain(PSD)-derived peptide와 5  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP가 함유된 PKC reaction buffer를 첨가하여 37  $^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 반응시켰다. 준비된 부유물은 SDS sample buffer와 혼합하여 10 분 동안 100 $^\circ\text{C}$ 에서 끓인후 SDS-PAGE와 autoradiography를 시행하였다.

## 9. 통계처리

각 자료 값은 최대값에 대한 % 값으로 나타냈고, 모든 자료는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ S.E.M.)로 나타내었다. 유의성은 student's *t*-test로 통계 처리하여  $P < 0.05$  수준에서 검증하였다.

### III. 결 과

#### A. 저산소성 뇌혈관 내피세포에서 PKC- $\delta$ 의 활성화

저산소성 뇌혈관 내피세포에서 PKC- $\delta$ 의 활성을 알아보기 위해 bEnd.3 뇌혈관 내피세포를 저산소 상태에 시간별로 노출 시킨 후 경과시간에 따른 PKC- $\delta$ 의 활성을 PKC- $\delta$ 에 대한 항체로 Immunoprecipitation(IP)을 하고,  $^{32}\text{P}$  동위원소가 label 된 PKC substrate를 이용하여 측정하였다. 그 결과 PKC- $\delta$ 의 활성은 저산소에 노출시킨 지 1 시간째 가장 증가하였고 4 시간까지 지속되었다 (Fig. 2A). PKC- $\delta$ 의 양적인 변화는 없었다 (Fig. 2B).

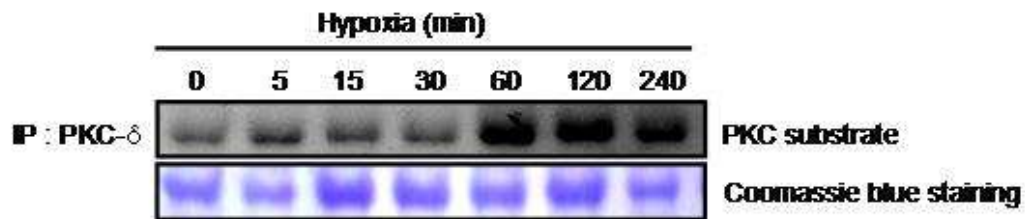
#### B. 저산소성 뇌혈관 내피세포 사멸에 대한 PKC- $\delta$ 억제제의 영향

##### 1) LDH (lactate dehydrogenase) 유리 측정

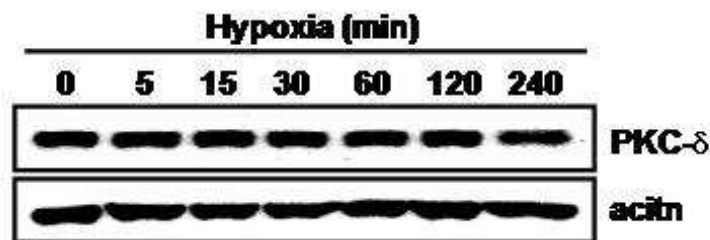
저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정동안 활성화된 PKC- $\delta$ 가 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여, PKC- $\delta$  억제제인 rottlerin을 농도별(0.03, 0.01, 0.1, 0.3  $\mu\text{M}$ )로 처리하여 세포사멸을 관찰하였다. 뇌혈관 내피세포에 rottlerin을 저산소 노출 30 분전부터 처리하여 12 시간 동안 저산소에 노출시켰을 때, rottlerin 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 더욱 증가하였다. Rottlerin을 처리한 실험군에서의 LDH 유리 정도는 Full Kill(100%)에 대해 0.01  $\mu\text{M}$ 에서 63.5 $\pm$ 3.6%, 0.03  $\mu\text{M}$ 에서 69.5 $\pm$ 3.5%, 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 82.2 $\pm$ 5.9%, 0.3  $\mu\text{M}$ 에서 95.7 $\pm$ 1.2%로 관찰되었으며, rottlerin 0.01, 0.03, 0.1, 0.3  $\mu\text{M}$ 을 처리한 것에서는 rottlerin을 처리하지 않은 대조군의 42.7 $\pm$ 0.8%에 비해 유의적으로 높은 LDH 유리 수치가 관찰되었다. Rottlerin 0.01 ~ 0.3  $\mu\text{M}$  까지 자체 독성은 나타나지 않았다 (Fig. 3).



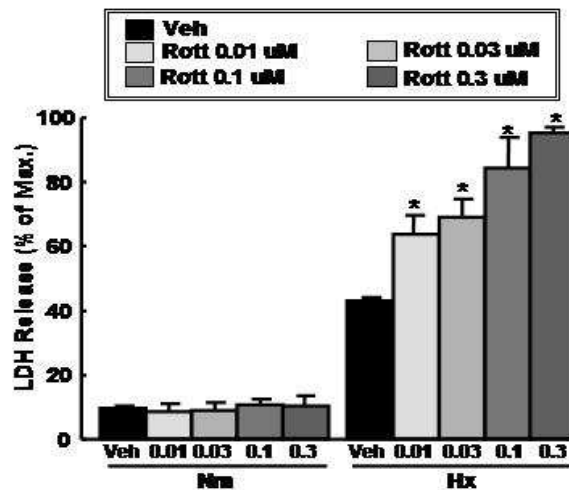
A.



B.



**Fig. 2. Activation of PKC- $\delta$  during hypoxia in bEnd.3 cells.** (A) Activation of PKC- $\delta$  was visualized by autoradiography and coomassie blue staining. Activation of PKC- $\delta$  was shown after indicated time period of hypoxia. The cellular proteins were, extracted by PKC extraction buffer. PKC- $\delta$  proteins were immunoprecipitated with anti PKC- $\delta$  antibodies and protein G-Sepharose. Immune complex kinase reactions were performed in the presence of the PKC substrate and 5  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. The reaction products were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The apparent molecular mass of the recombinant PKC substrate protein was about 45 kDa. (B) Immunoblotting of PKC- $\delta$  in the cells exposed to hypoxia for the indicated time periods.

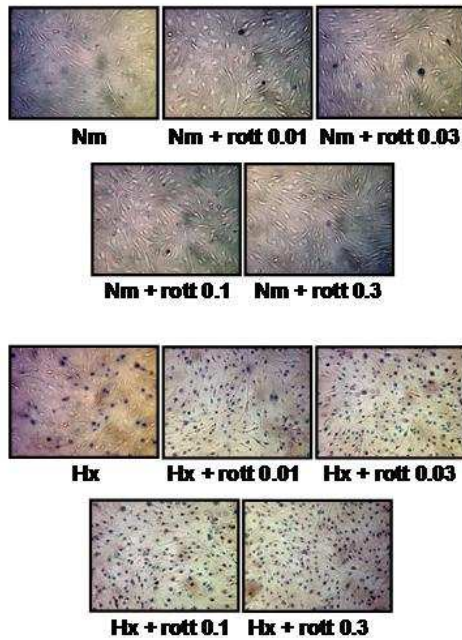


**Fig. 3.** Effect of rottlerin on hypoxia-induced cell death; LDH release. bEnd.3 cells were incubated in anaerobic condition, in the absence or in the presence of 0.01, 0.03, 0.1 and 0.3  $\mu$ M rottlerin 30 min before and during 12 h hypoxia. Hypoxia-induced LDH release was increased by rottlerin. Nm, normoxia; Hx, hypoxia; Veh, vehicle-treated control; Rott, rottlerin (PKC- $\delta$  inhibitor). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n=3). \*P<0.05 vs. Veh-Hx.

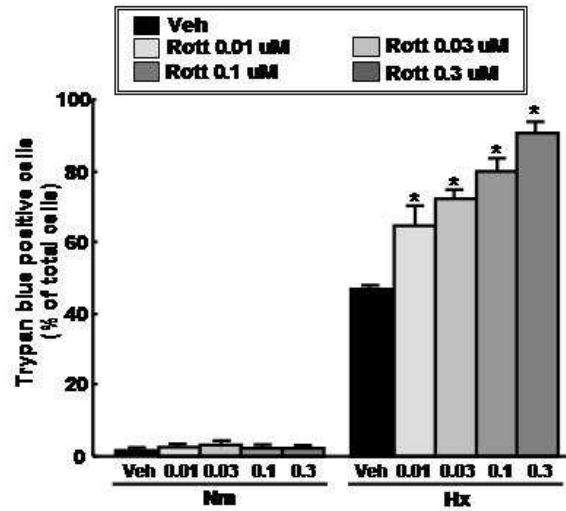
## 2) Trypan blue staining

PKC- $\delta$  억제제인 rottlerin에 의해 증가된 세포사멸 정도를 재확인하기 위해 trypan blue assay 방법을 수행하였다. Rottlerin을 처리한 실험군에서의 trypan blue positive cell은 0.01  $\mu$ M에서 66.5 $\pm$ 5.8%, 0.03  $\mu$ M에서 72.5 $\pm$ 2.1%, 0.1  $\mu$ M에서 82.4 $\pm$ 2.7%, 0.3  $\mu$ M에서 91.5 $\pm$ 2.4%로 관찰되었으며 rottlerin을 처리하지 않은 대조군에 비해 농도에 따라 높은 trypan blue positive cell이 관찰되었다. rottlerin 0.01 ~ 0.3  $\mu$ M을 처리한 군에서는 rottlerin을 처리하지 않은 대조군의 49.1 $\pm$ 0.9%에 비해 유의적으로 높은 trypan blue positive cell이 관찰되었다. Rottlerin 0.01 ~ 0.3  $\mu$ M 까지 자체독성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

A.



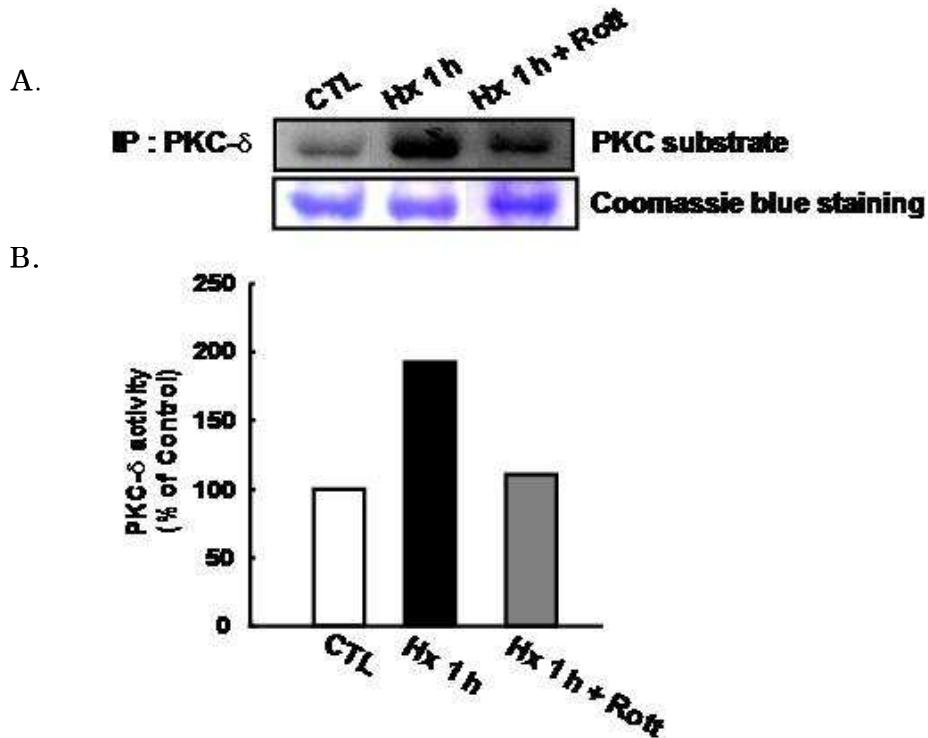
B.



**Fig. 4. Effect of rottlerin on hypoxia-induced cell death; trypan blue staining.** bEnd.3 cells were treated with rottlerin 0.01, 0.03, 0.1 and 0.3 uM 30 min before and during 12 h hypoxia. (A) shows photographs of trypan blue positive cells (magnification: X 200), and (B) shows % of trypan blue positive cell count. Hx, hypoxia; Nm, normoxia; Veh, vehicle-treated control; Rott, rottlerin (PKC- $\delta$  inhibitor). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n=3). \*P<0.05 vs Veh-Hx.

### C 저산소성 뇌혈관 내피세포 활성화에 대한 PKC- $\delta$ 억제제의 영향

저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정 동안 PKC- $\delta$  억제제인 rottlerin을 농도별로 처리시, 세포사멸을 가장 많이 증가시켰던 rottlerin 0.3  $\mu$ M을 저산소에 의한 PKC- $\delta$  활성이 가장 높았던 1 시간에 처리하여  $^{32}$ P 동위원소가 label된 PKC substrate를 이용한 protein kinase assay를 통해 PKC- $\delta$ 의 활성을 측정하였다. 그 결과 0.3  $\mu$ M rottlerin이 PKC- $\delta$ 의 활성을 억제하는 것을 확인하였다 (Fig. 5).



**Fig. 5.** Effect of rottlerin on hypoxia-induced PKC- $\delta$  activation. bEnd.3 cells were treated with 0.3  $\mu$ M rottlerin 30 min before and during 1 h hypoxia. PKC substrate was phosphorylated with PKC- $\delta$ , run on an SDS-poly-acrylamide gel and (A) visualized by autoradiography and coomassie blue staining. (B) shows % of PKC- $\delta$  activity compared to control (100%). Hx, hypoxia; Rott, rottlerin (PKC- $\delta$  inhibitor).

#### D. PKC- $\delta$ 의 과발현

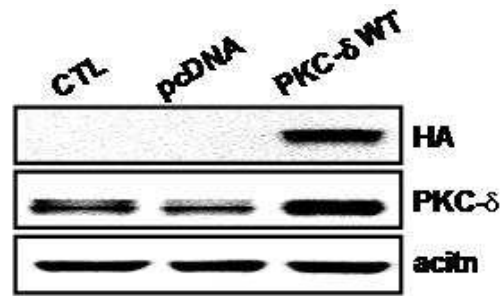
PKC- $\delta$ 의 full-length open reading frames으로 구성된 유전자를 동물발현 벡터인 pcDNA3에 삽입하여 pcDNA-PKC- $\delta$  WT constructs를 제작하였다. 제작된 유전자를 bEnd.3 뇌혈관 내피세포에 transient chemical transfection 방법으로 도입시켰다. 그리고 PKC- $\delta$  WT과 함께 발현되는 표지단백질(tagging protein)인 HA의 발현을 western blotting 방법으로 관찰하였다 (Fig. 6A). pcDNA3 vector에는 HA 표지단백질이 없기 때문에, pcDNA-PKC- $\delta$  WT으로 과발현된 세포에서만 HA가 관찰되었다. 그리고 PKC- $\delta$  활성을  $^{32}\text{P}$  동위원소가 label 된 PKC substrate를 이용한 protein kinase assay를 통해 측정한 결과, 과발현된 PKC- $\delta$  WT의 활성이 control 벡터에 비해 현저히 증가됨을 관찰하였다 (Fig. 6B).

#### E. 저산소성 뇌혈관 내피세포 사멸에 대한 과발현된 PKC- $\delta$ 의 영향

##### 1) LDH (lactate dehydrogenase) 유리 측정

저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정 동안 과발현된 PKC- $\delta$ 가 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여, pcDNA3과 pcDNA-PKC- $\delta$  WT을 bEnd.3 cell에 transfection 시켰다. 저산소 상태에서 12 시간 동안 노출시킨 후 세포사멸 정도를 유리된 LDH 양을 통해 관찰하였다. 그 결과 transfection 하지 않은 대조군은  $45.0 \pm 3.6\%$ 의 유리수치가 측정되었고 pcDNA로 transfection한 대조군에서는  $42.0 \pm 4.1\%$ 의 유리된 LDH 수치를 보였다. 그러나 PKC- $\delta$ 를 과발현시킨 실험군에서는  $29.1 \pm 3.5\%$ 로 transfection 하지 않은 대조군과 pcDNA로 transfection한 대조군에 비해 유의적으로 낮은 유리 LDH 수치가 관찰되었다 (Fig. 7).

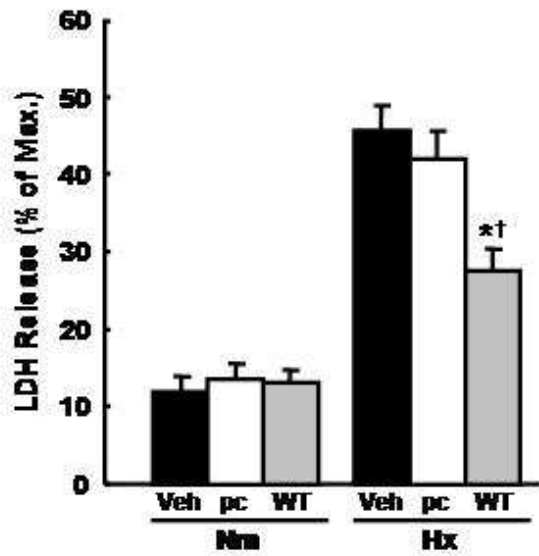
A.



B.



**Fig. 6. Transient overexpression of PKC- $\delta$  wild-type.** An empty control vector pcDNA3 or PKC- $\delta$  WT were transiently transfected into bEnd.3 cells. (A) Total lysates were subjected to Western blot analysis with anti-HA or PKC- $\delta$  antibodies. (B) bEnd.3 cells were transfected with the PKC- $\delta$  wild-type expression vector and control vector pcDNA3, and cellular proteins were, extracted by PKC extraction buffer. HA-tagged PKC proteins were immunoprecipitated by anti-HA antibodies and protein G-Sepharose. Immune complex kinase reactions were performed in the presence of the PKC substrate and 5  $\mu$ Ci of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP. The reaction products were then analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. The apparent molecular mass of the recombinant PKC substrate protein was about 45 kDa.



**Fig. 7. Effect of overexpressed PKC- $\delta$  on hypoxia-induced cell death; LDH release.** The PKC- $\delta$  transfected cells were incubated in anaerobic condition during 12 h hypoxia. Hypoxia-induced LDH release was decreased by PKC- $\delta$  WT. Hx, hypoxia; Nm, normoxia; Veh, vehicle-treated control; pc, pcDNA3; WT, pcDNA-PKC- $\delta$  WT. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n=3). † P<0.05 vs. Veh-Hx. \*P<0.05 vs. pc.

## 2) Trypan blue staining

저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정동안 과발현된 PKC- $\delta$ 가 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여, pcDNA와 pcDNA-PKC- $\delta$  WT를 transfection 시킨 bEnd.3 cell에 12시간 동안 저산소에 노출시킨 후 trypan blue assay를 통해 세포사멸 정도를 관찰하였다. 그 결과 pcDNA로 transfection한 대조군에서는 50.0 $\pm$ 3.3%의 trypan blue positive cell의 수치를 보였으나, PKC- $\delta$ 를 과발현시킨 실험군에서는 36.6 $\pm$ 2.2%로 transfection 하지 않은 대조군과 pcDNA3으로

transfection한 대조군에 비해 유의적으로 낮은 trypan blue positive cell의 수치가 관찰되었다 (Fig. 8).

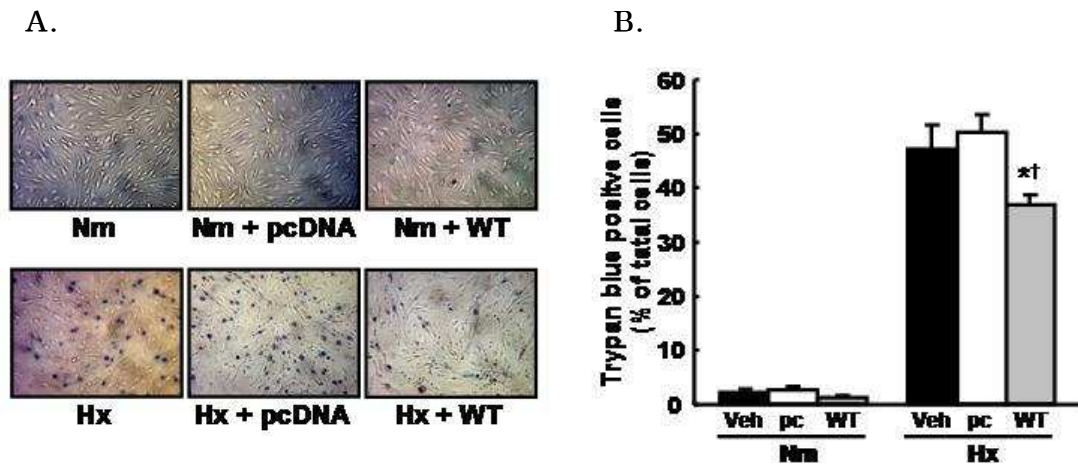


Fig. 8. Effect of overexpressed PKC- $\delta$  on hypoxia-induced cell death; trypan blue staining. The PKC- $\delta$  transfected cells were incubated in anaerobic condition during 12 h hypoxia. (A) shows photographs of trypan blue positive cells (magnification: X 200), and (B) shows % of trypan blue positive cell count. Hypoxia-induced trypan blue positive cells were decreased by PKC- $\delta$  WT. Nm, normoxia; Hx, hypoxia; Veh, vehicle-treated control; pc, pcDNA3; WT, pcDNA-PKC- $\delta$ -WT. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n=3). † P<0.05 vs. Veh-Hx. \*P<0.05 vs. pc.



## IV. 고 찰

뇌혈관 질환은 혈류를 통한 지속적인 산소 및 포도당 공급이 필요한 국소 뇌조직 대사에 이상이 일어나 그에 따른 국소 뇌조직의 기능이상인 임상 증상으로 나타나는 질환이다. 허혈성 뇌졸중, 뇌부종, 치매 등의 뇌허혈성 질환은 암과 더불어 현대인의 사망원인 중 1위를 차지하고 있으며 우리나라에서 점차 허혈성 뇌혈관 질환이 급격히 증가하고 있다. 최근 이러한 허혈성 질병들의 치료를 위해 배양세포를 이용하여 저산소에 의한 세포사멸을 연구하려는 시도가 많이 행해지고 있다. 그러나 저산소에 노출된 뇌혈관 내피세포에서의 세포 기능 변화와 신호 전달 체계는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 따라서 보다 효과적인 뇌혈관질환 치료법을 위해서는 뇌혈관의 병변을 막고 뇌혈관 기능을 개선시키기 위해 세포사멸 기전을 밝히는 것이 중요하다고 할 수 있다.

저산소에서 세포 사멸에 관여하는 요인들에는 여러 가지가 있다. 그 중, 첫째는 산소 결핍으로 인한 ATP 부족이다. 세포 내에 ATP가 부족하게 되면 양성자의 이동이 원활하지 못하게 되어 미토콘드리아의 세포막 전위가 떨어지며, 이로 인해 세포막의 투과성이 높아져 미토콘드리아의 안쪽에 있던 cytochrome C가 세포질로 방출된다. 방출된 cytochrome C는 세포질에서 Apoptotic protease activating factor 1(Apaf-1)과 결합하여 caspase-9을 활성화시키고, 이것은 다시 caspase-3를 활성화시켜 세포 사멸을 유도한다 (Greijer 등, 2004). 두 번째는 reactive oxygen species(ROS) 등과 같은 라디칼의 형성이다. ROS는 미토콘드리아에서의 cytochrome C의 방출 없이도 caspase-9을 거쳐 caspase-3, -12를 활성화시켜 세포 사멸을 유도한다는 보고가 있다. 세 번째는 mitogen activated protein kinases(MAPKs)의 활성화이다. c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase(JNK)/stress activated protein kinase(SAPK)의 돌연변이를 이용한 실험에서 저산소 상태에서의 세포사멸이 차단된다는 연구 결과로 JNK/SAPK가 저산소 상태에서의 세포사멸과정

에 관련한다는 것이 입증되었으며 extracellular signal-regulated kinase(ERK)와 p38이 세포 보호작용을 한다고 보고되었다 (Sowter 등, 2001). 마지막으로 저산소 자극시 PKC가 세포사멸 및 세포보호 작용에 중요한 요소로 알려져 있다 (Speechly 등, 1994).

저산소에 의한 세포사멸에서 일반적으로 PKC가 세포 보호작용에 관여한다고 알려져 있다. 최근 본 실험실에서도 허혈성 심근세포에서 PKC- $\epsilon$ 의 활성이 미토콘드리아 막  $K_{ATP}$ 를 개방시켜 심근사멸에 대한 보호효과를 나타낸다고 보고하였으며 (Kim 등, 2006), 저산소에 의한 심근세포에서 PKC- $\delta$ 의 활성이 ERK를 활성화시켜 저산소성 세포사멸에 대한 방어효과를 나타낸다고 보고하였다 (Kim 등, 2004). 그 외에도 신경세포에서는 PKC의 활성이 p38의 활성을 억제하여 세포사멸을 억제하며, human glioma 세포에서는 PKC- $\alpha$ 가 ERK의 활성을 통해 세포보호효과를 나타낸다고 보고되었다 (Leirdal 등, 2000). 이와 같이 세포사멸기전에서 일반적으로 PKC가 세포 보호작용에 관여한다고 알려져 있는 반면 PKC가 세포사멸에 관여한다는 상반된 보고도 있다. 허혈성 심근세포에서 PKC- $\epsilon$ 의 증가가 JNK/p38 MAPK의 활성을 통해 세포사멸을 유발한다고 보고되었고 (Jung 등, 2004), 혈관세포에서 저산소에 의해 활성화된 PKC- $\zeta$ 가 세포사멸을 일으킨다고 보고되었다 (Short 등, 2006).

PKC- $\delta$ 는 가장 자세히 연구된 novel PKC subfamily 중 하나이다. 이 효소는 1986년에 발견된 이후 1987년에 클로닝되었고 1990년에 순수하게 분리된 PKC isoenzyme으로 발현과 단백질구조 등의 세포내 기능이 보고되었다 (Gschwendt, 1999). PKC- $\delta$ 는 다양한 세포조직에서 아폽토시스를 유발한다고 알려져 있다 (Brodie and Blumberg, 2003). PKC- $\delta$  유전자를 결여시킨 쥐의 허혈성 평활근 세포에서 세포사멸이 감소되었고 감소된 세포사멸이 평활근 세포의 축적을 유발시켜 동맥경화증을 촉진시켰다 (Leitges 등, 2001). PKC- $\delta$  억제제와 촉진제를 이용한 연구는 PKC- $\delta$ 가 허혈성 심장에서 중요한 pro-apoptotic 역할을 한다고 보고하였으며 (Murriel 등, 2004), 허혈성 재관류 동안 PKC- $\delta$ 가 미토콘드

리아로 이동하고 미토콘드리아에서 세포질내로 cytochrome C를 방출시켜 세포 사멸을 이끌었다고도 보고하였다 (Churchill and Szweda, 2005).

반면 PKC- $\delta$ 의 활성화가 preconditioning에 관여하였고 (Liu 등, 2001), NO로 유발되는 대식세포 사멸에서도 PKC- $\delta$ 가 JNK와 p38 활성을 억제하여 세포 보호효과를 나타내기도 하였으며 (Behrens 등, 1999), 저산소성 심근세포에서 PKC- $\delta$ 의 활성화가 세포사멸을 억제하였다고 보고하였다 (Kheifets 등, 2006). 이와 같이 PKC- $\delta$ 의 활성화 정도와 역할 및 신호전달 기전이 세포종류나 손상자극의 종류에 따라 다양하며 저산소 상태에서 PKC- $\delta$ 의 활성화가 뇌혈관 내피세포에서 세포사멸유발 혹은 보호작용을 하는지 아직 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 뇌혈관 내피세포에서 저산소 노출에 따른 PKC- $\delta$ 의 역할을 알아보려고 하였다. 우선 저산소성 뇌혈관 내피세포에서 PKC- $\delta$ 의 활성을 알아보기 위해 bEnd.3 뇌혈관 내피세포를 저산소 상태에 시간별로 노출 시킨 후 경과시간에 따른 PKC- $\delta$ 의 활성을 관찰한 결과, 저산소에 노출된지 1 시간, 2 시간 쯤 가장 증가하였고, 4 시간까지 지속되었다. 그러나 저산소 동안 PKC- $\delta$ 의 발현 양은 변화가 없었던 것으로 보아 유전자 발현과는 관련이 없을 것으로 추정된다. 또한 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정 동안 활성이 증가된 PKC- $\delta$ 가 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위하여, PKC- $\delta$  억제제인 rottlerin을 농도별 (0.03, 0.01, 0.1 0.3  $\mu$ M)로 처리하여 유리된 LDH 측정법과 trypan blue 염색법을 통한 세포사멸을 관찰한 결과 억제제의 농도가 증가함에 따라 세포사멸이 증가하였다.

또한 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정 동안 PKC- $\delta$ 의 역할을 더 자세히 알아보기 위해 뇌혈관 내피세포 bEnd.3 세포에 PKC- $\delta$ 를 과발현 시킨 후, PKC- $\delta$ 의 역할을 유리된 LDH 측정법과 trypan blue assay를 시행하였다. 그 결과 PKC- $\delta$ 를 과발현시킨 실험군에서 transfection을 하지 않은 실험군과 pcDNA3로 transfection한 실험군에 비해 유의적으로 낮은 유리 LDH 수치와 trypan blue positive cell 수치가 관찰되었다.

결론적으로 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 PKC- $\delta$  저해제에 의한 세포사멸 증가와 PKC- $\delta$  과발현에 의한 세포사멸 억제를 관찰함으로써 저산소 동안 활성이 증가된 PKC- $\delta$ 는 세포사멸로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 저산소로 유도된 세포사멸과정에서 뇌혈관 세포주 bEnd.3 cell 의 PKC- $\delta$  활성변화와 그 역할을 밝히고자 하였다.

저산소 과정에서 PKC- $\delta$ 의 활성변화를 관찰한 결과, bEnd.3 뇌혈관 세포주를 저산소에 노출시킨지 1 시간에서 활성이 가장 높게 증가되었고 4 시간째 까지 지속되었다. 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 PKC- $\delta$ 의 역할을 알아보기 위해 PKC- $\delta$  저해제인 rottlerin을 사용하여 유리된 LDH 양을 측정하고 trypan blue positive cell 수치를 측정한 결과 농도에 따라 세포사멸이 현저히 증가됨이 관찰되었다. 이때 저산소 자극 후 PKC- $\delta$ 의 활성이 rottlerin에 의해 감소됨을 확인하였다. PKC- $\delta$ 의 역할을 더 자세히 알아보기 위해 PKC- $\delta$ 가 과발현된 세포에서 세포사멸 실험을 한 결과, 세포사멸이 감소하는 것이 관찰되었다.

이상의 결과는 저산소에 의한 뇌혈관 내피세포 사멸과정에서 활성이 증가된 PKC- $\delta$ 가 세포사멸로부터 세포를 보호하는 것을 시사하고 있다.

## 참 고 문 헌

1. Amstad PA, Krupitza G, Cerutti PA: Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* 52:3952-3960, 1992
2. Behrens MM, Strasser U, Koh JY, Gwag BJ, Choi DW: Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester-induced activation of protein kinase C: blockade of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* 94(3):917-927, 1999
3. Brodie C, Blumberg PM: Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta. *Apoptosis* 8:19-27, 2003
4. Chen CH, Toung TJ, Sapirstein A, Bhardwaj A: Effect of duration of osmotherapy on blood-brain barrier disruption and regional cerebral edema after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(7):951-958, 2006
5. Churchill EN, Szweda LI: Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys* 439(2):194-199, 2005
6. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW: Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? *J Cereb Blood Flow Metab* 16:195-201. 1996
7. Gschwendt M: Protein kinase C delta. *Eur J Biochem* 259:555-564, 1999
8. Greijer AE, Van der Wall E: The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 57:1009-1014, 2004

9. Hongyu Ni, Melek E, Shalini S, Tibudan, Mitch FD, Kith FI, Serhan A: Protein kinase C-delta is commonly expressed in multiple myeloma cells and its downregulation by rottlerin causes apoptosis. *Br J Haematol* 121(6):849-856, 2003
10. Jung YS, Jung YS, Kim MY, Kim EH: Identification of caspase-independent PKC $\epsilon$ -JNK/p38 MAPK signaling module in response to metabolic inhibition in H9c2 Cells. *Japanese J physiology* 54:23-29, 2004
11. Kawamura S, Yoshida K-I, Miura T, Mizukami Y, Matsuzaki M: Ischemic preconditioning translocates PKC- $\delta$  and - $\epsilon$ , which mediate functional protection in isolated rat heart. *Am J Physiol* 275:H2266-H2271, 1998
12. Kheifets V, Bright R, Inagaki K, Schechtman D, Mochly-Rosen D: Protein kinase C delta (deltaPKC)-annexin V interaction: a required step in deltaPKC translocation and function. *J Biol Chem* 281(32):23218-23226, 2006
13. Kim MJ, Moon CH, Kim MY, Kim MH, Lee SH, Baik EJ, Jung YS: Role of PKC- $\delta$  during hypoxia in heart-derived H9c2 cells. *Japanese J physiology* 54:405-414, 2004
14. Kim MY, Kim MJ, Yoon IS, Ahn JH, Lee SH, Baik EJ, Moon CH, Jung YS: Diazoxide acts more as a PKC- $\epsilon$  activator, and indirectly activates the mitochondrial K<sub>ATP</sub> channel conferring cardioprotection against hypoxic injury. *British J Pharmacology* 16; 1-12, 2006
15. McMurtry IF, Bauer NR, Fagan KA, Nagaoka T, Gebb SA, Oka M: Hypoxia and Rho/Rho-kinase signaling. Lung development versus hypoxic pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol* 543:127-137, 2003
16. Lee YJ, Soh JW, Jeoung DI, Cho CK, Jhon GJ, Lee SJ, Lee YS: PKC- $\epsilon$

- mediated ERK1/2 activation involved in radiation-induced cell death in NIH3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* 1593(2-3):219-229, 2003
16. Leirdal M, Sioud M: Protein kinase C alpha isoform regulates the activation of the MAP kinase ERK1/2 in human glioma cells: involvement in cell survival and gene expression. *Mol Cell Biol Res Commun* 4(2):106-110, 2000
  17. Leitges M, Mayr M, Braun U, Mayr U, Li C, Pfister G, Ghaffari-Tabrizi N, Baier G, Hu Y, Xu Q: Exacerbated vein graft arteriosclerosis in protein kinase C delta-null mice. *J Clin Invest* 108(10):1505-1512, 2001
  18. Liao SL, Chen WY, Raung SL, Chen CJ: Ethanol attenuates ischemic and hypoxic injury in rat brain and cultured neurons. *Neuroreport* 14(16):2089-2094, 2003
  19. Liu H, McPherson BC, Yao Z: Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of Protein kinase C  $\epsilon$ -epsilon and  $\delta$ -delta isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 104(1):85-90, 2001
  20. Murrier CL, Churchill E, Inagaki K, Szweda LI, Mochly-Rosen D: Protein kinase C delta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. *J Biol Chem* 279(46):47985-47991, 2004
  21. Rao GN, Lassegue B, Griendling KK, Alexander WR: Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells: Role of arachidonic acid. *Oncogene* 8:2759-2764, 1993
  22. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, Wang Y, Marber MS: The role of differential activation of p38-mitogen activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J*



14:2237-2246, 2000

23. Shizukuda Y, Helisch A, Yokota R, Ware JA: Downregulation of protein kinase c  $\delta$  activity enhances endothelial cell adaptation to hypoxia. *Circulation* 100:1909-1916, 1999
24. Short MD, Fox SM, Lam CF, Stenmark KR, Das M: Protein kinase C zeta attenuates hypoxia-induced proliferation of fibroblasts by regulating MAP kinase phosphatase-1 expression. *Molecular Biol Cell* 17(4):1995-2008, 2006
25. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P: HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61:6669-6673, 2001
26. Speechly-Dick ME, Mocanu MM, Kloner RA, Yellon DM: Protein kinase C: its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* 75:586-690, 1994
27. Stauble B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A: Modulation of activator protein-1(AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-a-tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 226:393-402, 1994
28. Perez-Pinozon MA, Dave KR, Raval AP : Role of reactive oxygen species and protection kinase C in ischeic tolerance in the brain. *Antioxid Redox Signal* 7(9-10):1150-1157, 2005
29. Yukitaka S, Armin H, Ryoji Y, Anthony W: Downregulation of Protein Kinase C $\delta$  activity enhances endothelial cell adaptation to hypoxia. *Circulation* 100:1909-1916, 1999

- ABSTRACT -

## **The Role of PKC- $\delta$ in Hypoxia-induced Cerebrovascular Endothelial cell death.**

Ieseul Yoon

Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Chang-Hyun Moon)

In various cell types, PKC(protein kinase C)- $\delta$  has been found to be an important mediator during hypoxia-induced cell death. However, the role of PKC- $\delta$  in cerebrovascular endothelial cells is unknown. Therefore, we investigated the role of PKC- $\delta$  during hypoxia-induced cell death using bEnd.3 cell, a cerebrovascular endothelial cell line.

The activity of PKC- $\delta$  increased remarkably after 1 hour of hypoxic injury, and the increase was maintained until 4 hours of hypoxia. To investigate the role of PKC- $\delta$  during hypoxia in terms of cell death, we measured the amount of released LDH (lactate dehydrogenase) and trypan blue positive cells during hypoxia after treatment with rottlerin, PKC- $\delta$  inhibitor. Hypoxia-induced LDH release was significantly increased by the treatment with rottlerin. We examined the specific blockade of PKC- $\delta$  activation by rottlerin after 1 hour of hypoxia in bEnd.3 cells. When pcDNA-PKC  $\delta$ -WT was transfected into bEnd.3 cells, LDH release and trypan

blue positive cells were attenuated during hypoxia. From these results, it is suggested that hypoxia causes an activation of PKC- $\delta$ , rendering bEnd.3 cells resistant to hypoxia-induced cell death.

---

**Key words** : PKC- $\delta$ , cerebrovascular endothelial cells, hypoxia, cell death