

# 혈관내피세포에 열 충격 부과시 죽력이 stress proteins의 발현에 미치는 영향

전 훈\*

우석대학교 약학대학 한약학과

## Effects of Bambusae Caulis in Liquamen on the Stress Proteins Induced by Heating in Endothelial Cells

Hoon Jeon\*

Department of Oriental Pharmacy, Woosuk University

We have previously observed that Bambusae Caulis in Liquamen (BCL) stimulates the adipose conversion of 3T3-L1 cells and molecular chaperones were involved in the process of the assembly and replacement of laminin subunits in Bovine aortic endothelial cells(BAEC). Endothelial cells are exposed to continuous shear stress due to the blood flow. Heat shock proteins(hsp) are a well-known stress response protein, namely, stress proteins. To investigate effects of BCL on the stress proteins induced by heating in endothelial cells, we have analyzed synthetic amounts of stress proteins in sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis under reducing conditions. Under the condition of heating stress, BCL inhibited the synthesis of stress proteins in endothelial cells. These results suggest that BCL may have an important role for expression of stress proteins induced by heating in endothelial cells.

Key words : Bambusae Caulis in Liquamen, endothelial cells, heat shock proteins, stress

### 서 론

혈관내피세포는 혈관 벽의 가장 내측에 단일 층으로 구성되어 있으며, 지속적인 혈류에 노출되어 있어 자기자신의 세포적 기능을 관리하며 조절한다<sup>1)</sup>. 세포배양을 통한 in vitro 에서의 혈류의 효과는 혈관내피세포 내의 calcium의 농도를 증가시키고 actin cytoskeleton의 합성을 일으킨다<sup>2,3)</sup>. 또한 동맥 내의 유동 흐름의 변화는 국부적인 동맥경화의 발생과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>4)</sup>. Heat shock protein(hsp) family는 잘 알려져 있는 heat shock 단백질로서 정상세포에서는 chaperon의 기능을 하여 단백질의 폴딩, 올리고머의 해체, 단백질의 운반 및 전위를 돕는다<sup>5-8)</sup>. 또한 heat shock, 자외선, 화학적 및 물리적 자극 등에 의한 외부로부터의 stress에 유도되어 stress로부터 유발될 수 있는 단백질 손상을 방어하는 기능을 한다<sup>9-11)</sup>. 따라서 동물체는 외부로부터 유입되는 stress에 대응하기 위하여 대사적, 구조적 조정이 필요할

것으로 생각되며 이러한 이유로 특이하게 발현되는 단백질군을 총칭하여 stress proteins라고 명명하기도 한다. 竹瀝(Bambusae Caulis in Liquamen: BCL)은 예로부터 내려온 한약으로서 기침 및 천식에 효과가 탁월하고 담을 제거하는데 사용되어 왔다. 죽력은 불로 구우는 과정에 제조되며, 淡竹의 줄기를 불에 구어서 받은 액즙이다. 죽력은 활담(滑痰), 청열(淸熱), 자음(滋陰), 식풍(息風), 활혈(活血)의 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>12-13)</sup>. 최근에는 항염증, 항알러지 및 항피로 능력에 대해서도 연구되었고<sup>14)</sup>, 본 연자는 전보<sup>15)</sup>에서 죽력이 3T3-L1세포에서 기저막 단백질의 합성을 증가시킴을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 in vitro 상에서 혈관내피세포에 heating으로 stress를 부과하였을 때 기저막 단백질과 함께 발현되는 stress proteins (heat shock protein)의 종류와 죽력을 첨가시 stress proteins의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 Dulbecco's modified Eagle's medium

\* 교신저자 : 전 훈, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교 약학대학

· E-mail : jeonh@woosuk.ac.kr Tel : 063-290-1577

· 접수 : 2004/01/29 · 수정 : 2004/02/23 · 채택 : 2004/03/30

(DME), penicillin-streptomycin, Dulbecco's phosphate buffered saline, Triton-X100, sodium dodecyl sulfate(SDS), phenyl methyl sulfonyl fluoride(PMSF), anti-rabbit laminin, dexamethasone (DEX)은 Sigma Co.에서 fetal bovine serum(FBS), trypsin은 Gibco Co.에서 Protein A Sepharose CL-4B는 Pharmacia Co.에서 L-[<sup>35</sup>S]methionine (1200 Ci/mmol)은 ICN에서 구입하여 사용하였으며, BCL은 Juksan biotech. (전남 담양, 한국)으로부터 구입하였다. 기타 시약은 cell culture용 및 1급 시약을 사용하였다. 사용기구는 culture flask (Nunc), 24 well plate (Costar), CO<sub>2</sub> incubator (Vision scientific Co.), inverted fluoromicroscope (Zeiss Co.), electrophoresis system (Bio-Lad), XAR-5 X-ray film (Kodak) 등을 사용하였다.

2. 세포배양 및 stress 부과

혈관내피세포는 Bovine Aortic Endothelial Cells(BAEC)를 Gospodarowics<sup>16)</sup>등의 방법에 의해 소동맥으로부터 단리 하였으며, 세포 배양액은 FBS 10%와 antibiotics 1%(penicillin-streptomycin 100 units/ml)를 첨가한 DME 배지를 사용하였다. 최종농도가 0.1 %가 되도록 BCL을 처리<sup>17)</sup>하여 DME 배지상에서 24 well plate에 10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>가 되도록 혈관내피세포를 접종한 후, stress protein의 발현을 유도하기 위하여 배양된 혈관내피세포를 42℃에서 1시간 incubation하고 다시 37℃에서 incubation 하여 회복시간을 부여하였다.

3. 방사성 아미노산에 의한 세포의 labeling

24 well plate에서 배양한 혈관내피세포는 MEM으로 세척하고, 0.5 mCi/ml [<sup>35</sup>S] methionine을 첨가한 200μl의 methionine-free MEM 배지상에서 37℃ 조건에서 4시간 배양하였다.

4. 면역침강 및 전기영동

면역침강은 Aratani<sup>18)</sup> 등의 방법에 準하였다. Labeling한 혈관내피세포를 200μl의 면역침강 완충액(10mM Tris-HCl(pH8.0), 2mM EDTA, 1%(v/v) Triton X-100, 0.4%(w/v) SDS, 1mM PMSF, 0.4M NaCl)으로 용해한 후, 적당량을 면역침강 완충액으로 희석하여 1ml로 하여 1μl의 anti-laminin 혈청을 첨가해 37℃에서 1시간 incubation한 후, 25μl의 10%(w/v) protein A sepharose 현탁액을 가하여 1시간 동안 진탕하였다. 진탕한 세포를 2,000 rpm에서 3초간 원심분리하여 침강된 sepharose수지를 면역침강 완충액으로 3회 세척한 후, 3배 농도의 SDS 전기영동 buffer(9%(w/v) SDS, 0.2% Tris-HCl(pH6.8), 15%(v/v) glycerol, 6%(v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% BPB) 중에 5분간 예비한 후 SDS 전기영동을 하였다. SDS 전기영동은 Laemmli<sup>19)</sup>의 불연속완충액계를 사용, 3%의 농축용과 4% 또는 8%의 분리용 acrylamide gel을 이용하였다.

결 과

1. BCL 첨가와 stress 부과에 의한 laminin 합성능의 변화

BCL 첨가에 의한 laminin의 합성능의 변화를 관찰하기 위

해 방사선으로 labeling한 혈관내피세포를 anti-laminin 혈청으로 면역침강하여 SDS 전기영동으로 분리하였다. 24 well plate에서 배양한 세포는 stress를 부과한 세포와 함께 BCL의 添加와 未添加에서 24 시간 배양하였다. 방사성 아미노산에 의한 labeling은 BCL을 포함한 methionine-free MEM 배지에서 30 분간 전처리한 후, BCL과 0.5 mCi/ml [<sup>35</sup>S] methionine을 첨가한 200μl의 methionine-free MEM 배지상에서 37℃ 조건에서 4 시간 배양하였다. Labeling한 혈관내피세포의 cell lysates을 anti-rabbit laminin으로 면역침강하여 SDS 전기영동으로 분리하였다(Fig. 1). BCL 첨가시 증식된 혈관내피세포에서 laminin의 합성이 촉진됨이 관찰되었고, stress를 부과한 배양세포에서는 그다지 큰 변화는 볼 수 없었다.

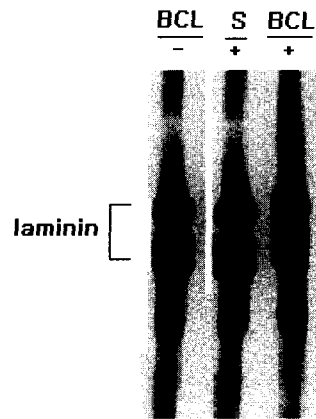
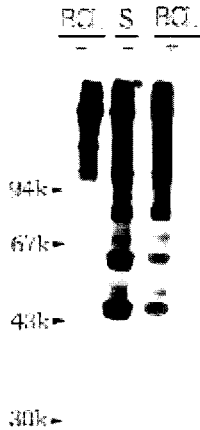


Fig. 1. Immunoprecipitation of laminin from endothelial cells with and without BCL after treatment of heating stress(S). Endothelial cells incubated with or without BCL for 24h after treatment of heating stress were labeled with [<sup>35</sup>S] methionine for 4h. Labeled cell lysates corresponding to 1.5x10<sup>6</sup> cpm of [<sup>35</sup>S] methionine incorporated into acid-insoluble proteins were immunoprecipitated by anti-laminin antiserum and analyzed by SDS-electrophoresis. A separating gel of 4% acrylamide was used.

2. Laminin의 세포내 회합시 stress proteins의 관여

Laminin subunit의 회합과 치환에 molecular chaperones의 관여에 대하여 전보<sup>20)</sup>에서 보고하였다. 정상세포에서는 chaperones의 기능을 하는 반면, stress 부과시에는 stress proteins으로서의 역할도 밝혀져 있다<sup>5-6)</sup>. 따라서 laminin subunit의 회합과 치환에 stress proteins의 관여에 대하여 관찰하기 위해 방사선으로 labeling한 혈관내피세포를 Fig. 1에서는 laminin subunit의 작용을 관찰하기 위해 4%의 acrylamide gel을 사용하였지만, 이와 같은 온화한 gel을 사용한 전기영동에서는 laminin subunit와 가교하고 있는 stress proteins과 같은 단백질이 저분자량일 경우 충분한 분리가 되지 않을 것으로 생각되어, 동일 시료를 8%의 acrylamide gel로 다시 분리하였다(Fig. 2). 이러한 방법을 이용하면 세포내 laminin subunit의 주위에 존재하고 있는 stress proteins이 기저막 단백질과 공침할 것으로 기대할 수 있다. 이 전기영동의 결과, laminin 각 subunit와 더불어 90, 80, 60 및 50kD에 상당하는 band가 검출되었다. 이들 단백질의 분자량을 측정해본 결과, grp94, grp78, hsp70 및

hsp47 등의 잘 알려진 stress proteins과는 다른 단백질을 알 수 있었다. Stress를 부과한 배양세포에서는 상당의 stress proteins이 검출됨을 알 수 있었고, BCL을 첨가시 stress proteins의 검출이 감소하는 것을 관찰하였다. 이러한 결과로부터 stress 부과시 BCL이 어떠한 기전에 의해 stress proteins의 발현을 저해하는 것으로 생각되어진다.



**Fig. 2. Stress proteins in endothelial cells coprecipitated to laminin subunits.** The radiolabelled cell lysates from endothelial cells with or without BCL after treatment of heating stress were separated in 8% acrylamide gel. Precipitates were applied to SDS-electrophoresis as in Fig.1. Arrow heads beside the lanes indicate the migration position of standard proteins with the corresponding sizes.

### 고 찰

생물체는 일반적인 생존조건이 아닌 불리한 환경 하에서 그 환경에 잘 적응하여야 함은 큰 과제이다. 온도, 자외선, 병원균 및 각종 오염원 등의 stress에 잘 적응하지 못하면 정상적인 성장이나 물질생산에 영향을 받게 된다. 따라서 생물체는 환경에서 오는 stress에 적응하기 위해서 대사적, 구조적 조정이 필요하게 된다. 생물체에 내재되어 있는 소거 능력을 초과하여 발생된 활성산소는 세포내의 지질과 반응하여 과산화지질을 생성하며<sup>21)</sup>, DNA쇄의 절단이나 수식과 같은 손상을 야기한다<sup>22)</sup>. 효소단백질의 경우 아미노산 잔기가 활성산소에 의해 특이적으로 산화, 수식을 받으면 효소의 불가역적인 활성 상실이 야기됨과 동시에, 활성을 잃은 효소가 세포내 단백질 분해효소에 의해 선택적으로 분해되기도 한다<sup>23)</sup>. 한편 활성산소에 대한 방어기구로 ascorbic acid, tocopherol, carotene 및 glutathione 등과 같은 항산화물질과 superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase 및 ascorbate reductase 등의 효소로 이루어진 일련의 항산화 소거시스템<sup>24)</sup> 및 손상된 DNA의 수복에 관여하는 효소<sup>21-22)</sup> 등이 있다.

이것들은 세포내에 구성적으로 존재하고 있을 뿐만 아니라 그 중 일부는 활성산소의 생성증대에 의해 새롭게 유도, 합성되는 것으로 알려져 있다. 혈관내피세포는 혈관 벽의 가장 내측에 단일 층으로 구성되어 있으며, 지속적인 혈류에 노출되어 있어 자기자신의 세포적 기능을 관리하며 조절한다<sup>1)</sup>. 세포배양을 통

한 in vitro 에서의 혈류의 효과는 혈관내피세포 내의 calcium의 농도를 증가시키고 actin cytoskeleton의 합성을 일으킨다<sup>2,3)</sup>. 또한 동맥 내의 유동 흐름의 변화는 국부적인 동맥경화의 발생과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>4)</sup>. 특히 hsp70은 잘 알려져 있는 heat shock 단백질로서 정상세포에서는 chaperon의 기능을 하여 단백질의 폴딩, 올리고머의 해체, 단백질의 운반 및 전위를 돕는다<sup>5-8)</sup>. 또한 heat shock, 자외선 및 물리적 자극 등에 의한 외부로부터의 stress에 유도되어 stress로부터 유발될 수 있는 단백질 손상을 방어하는 기능을 한다<sup>9-11)</sup>. 정상 동맥에서는 hsp70의 분포가 약하면서도 고르게 분포되어 있는 반면, 동맥경화가 발생된 혈관의 동맥에서는 hsp70이 중앙부에 집중되어 있어 heat shock proteins이 동맥경화와 관련될 것으로 보고된 바가 있다<sup>25)</sup>. 따라서 hsp70뿐만 아니라 stress proteins은 모두 유사한 작용이 있는 것으로 생각되어지며, 죽력 또한 ascorbic acid, tocopherol, carotene 및 glutathione 등과 같은 항산화 물질과 같은 작용을 하고 있어 stress 부과시 발현된 단백질에 대하여 저해작용을 하여 동맥경화 등 성인병예방에 탁월한 효과가 기대될 것으로 생각되어진다. 한편 죽력이 어떠한 기전에 의해 배양된 혈관내피세포에서 stress proteins의 발현을 저해하는지는 추후 연구되어야 할 것으로 생각되어진다.

### 결 론

혈관내피세포에 죽력(BCL)을 첨가하여 단백질의 합성능을 측정해본 결과 죽력에 의해 단백질의 합성이 증가함을 알 수 있었으며, stress 부과시에는 그다지 큰 변화를 관찰할 수 없었다. 그러나 stress 부과시 stress proteins으로 생각되어지는 저분자량의 단백질은 죽력 첨가에 의해 그 발현량이 감소하는 것이 관찰되었다. 이상의 실험 결과 죽력이 혈관내피세포에서의 stress proteins의 발현을 억제하며, 그 억제 기전에 대해서는 추후 연구되어야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 논문은 우석대학교 한방재활연구사업비 지원에 의하여 연구되었음.

### 참고문헌

1. Nerem RM Vascular fluid mechanics, the arterial wall, atherosclerosis. J.Biotech Eng. 114, 274, 1992.
2. Shen J. Luscinskas FW, Connolly A. Dewey CF, Gimbrone MA. Fluid shear modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. Am. J. Physiol. 262, 384, 1992.
3. Ando J. Ohtsuka A, Korenaga R, Kawamura T, Kamiya A. Wall shear stress rather than shear rate regulates cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> response to flow in vascular endothelial

- cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 190, 716, 1993.
4. Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112, 1018, 1988.
  5. Glick BS. Can hsp10 proteins act as force-generating motors? *Cell* 80, 11, 1995.
  6. Bukau B, Horwich AL. The hsp70 and hsp60 chaperone mechanics. *Cell* 92, 351, 1998.
  7. Netzer WJ, Hartl FU. Protein folding in the cytosol; chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *TIBS* 23, 68, 1998.
  8. Pilon M, Schekmann R. Protein translocation; how hsp70 pulls it off. *Cell* 97, 679, 1999.
  9. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY. Role of hsp70 in regulation of stress-kinase JNK; implications in apoptosis and aging. *FEBS Letters* 438, 1, 1998.
  10. Jaattela M. Escaping cell death; Survival proteins in cancer. *Exp. Cell Res.* 248, 30, 1999.
  11. Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber LA, Kampinga HH. In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol. Cell Biol.* 19, 2069, 1999.
  12. Kang, B. S., Ko, U. C., Kim, K. Y., Kim, S. H., Kim, I. R., Kim, H. C., No, S. H., Park, Y. K., Seo, B. I., Seo, Y. B., Song, H. J., Sin, M. K., Ahn, D. K., Lee, S. Y., Lee, Y. J., Lee, T. H., Cho, S. Y., Ju, Y. S. and Choi, H. Y. *Boncho-Hak*, Young-Lim Press, Seoul. 467, 1991.
  13. Park, K. J. and Chae, W. S. A literature study on *Succus Phyllostachyos*. *J. Kor. Acu. & Moxi. Soc.* 18(3), 184, 2001.
  14. Na, C. S., Youn, D. H., Choi, D. H., Kim, J. S. and Jang, K. S. The effects of BCL(Bambusae Caulis in Liquamen) on fatigue induced by swimming exercise. *J. Kor. Ori. Med.* 22(4), 90, 2001.
  15. Jeon, H. Effect of *Bambusae Caulis in liquamen* on the synthesis of basement membrane proteins during proliferation and differentiation of 3T3-L1 cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 17(5), 1315, 2003.
  16. Gospodrowicz, D., Moran, J., Braun, D., and Birdwell, C. Clonal growth of bovine aortic endothelial cells Fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 4120, 1976.
  17. Jeon, H., Kang, N. J. and Kim, G. S. CD gene microarray profiles of *Bambusae Caulis in Liquamen* in human mast cell. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 17(1), 241, 2003.
  18. Aratani, Y., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y. Lithium ion reversibly inhibits inducer-stimulated adipose conversion of 3T3-L1 cells. *FEBS Lett.* 218, 47, 1987.
  19. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680, 1970.
  20. Jeon H. and Leem K. H. Subunit assembly of laminin variants in cultured BAEC *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 16(4), 680, 2002.
  21. 光井 脩治, 泉 忠秀 活性酸素의 作用; 標的分子와의 反應性; 蛋白質, 核酸, 酵素 臨時增列 「活性酸素」 33, 3169, 1988.
  22. 長野 哲雄, 廣部 雅昭 活性酸素의 作用; 標的分子와의 反應性; 核酸, 蛋白質, 核酸, 酵素 臨時增列 「活性酸素」 33, 3094, 1988.
  23. 中村 知行 活性酸素의 作用; 標的分子와의 反應性; 蛋白質, 蛋白質, 核酸, 酵素 臨時增列 「活性酸素」 33, 3074, 1988.
  24. 淺田 造二 活性酸素의 生成, 消去 作用 蛋白質, 核酸, 酵素 臨時增列 33, 2659, 1988.
  25. Berberian PA, Mayers M, Tytell M, Challa V, Bond MG. Immunohistochemical localization of heat shock protein 70 in normal appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am. J. Pathol.* 136, 71, 1990.