

뇌염모델에서 Protein Kinase C의 발현에 관한 연구

신태균¹, 김형민², Naoyuki Tanuma³, Yoh Matsumoto³

¹제주대학교 농과대학 수의학과, ²원광대학교 약학대학 한약학과

³Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience

Expression of Protein kinase C in the spinal cords of rats with autoimmune encephalomyelitis

Tae-Kyun Shin¹, Hyung-Min Kim², Naoyuki Tanuma³, Yoh Matsumoto³

¹Department of Veterinary Medicine, Cheju National University Cheju, Korea, ²Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang University Iksan, Korea, ³Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience, Tokyo, Japan

Abstract. Protein kinase C, an enzyme of signal transduction, has been known to regulate cell proliferation, activation as well as apoptosis in some cancer cell lines. To explore the role of PKC in the course of cell mediated autoimmune disease such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), EAE was induced in Lewis rats (6-8 weeks old) with immunization of myelin basic protein supplemented with complete Freund's adjuvants, and affected spinal cords were sampled at days 13 postimmunization(PI) as peak stage of EAE and at days 21 PI as recovery stage. The spinal cords with EAE were subjected to Northern blot analysis and in situ hybridization of PKC delta, which is one of prominent isotypes of PKC in the haematopoietic cells. Northern blot analysis showed that levels of PKC delta mRNA in the spinal cords of rats with EAE was significantly increased at days 13 PI, in which inflammatory cells including T cells and macrophages in the EAE lesions appeared. However, the transcript of PKC in the affected spinal cords decreased to the level of non-immunized controls at recovery stage. By in situ hybridization, signals of PKC delta in EAE lesions was intensely expressed on the inflammatory cells including T lymphocytes and macrophages as well as some apoptotic cells, while PKC delta is also expressed on some brain cells in normal rat central nervous system.

This finding suggests that PKC plays an important role on either activation of inflammatory cells including encephalitogenic T cells and macrophages or apoptotic elimination of some inflammatory cells depending on the stage of EAE.

Key words: protein kinase C, experimental autoimmune encephalomyelitis.

서 론

Protein kinase C(PKC)는 세포막투과신호전달체계에 서 중요한 역할을 하는 것으로 세포가 자극을 받게 되면 세포막 인지질로부터 생긴 diacylglycerol에 의해 PKC는 활성화되며,¹⁷ PKC는 또한 phorbol ester의 수용체로 작용하기도 한다.²⁰ diacylglycerol 및 phorbol ester의 다양한 작용으로 인해 PKC는 세포의 성장과 증식, 호르몬 및 신경전달물질의 방출에 관련되어 있다.^{16,31} PKC는 cDNA 클로닝에 따라 여러 종류의 isozyme(알파, 베타, 감마, 델타, 쉐타등)이 알려져 있고,⁸ 각 isozyme은 조직에 따라 분포양상이 다양하고 그 작용도 또한 차이가 있는

것으로 알려져 있다.^{6,13,16}

혈구세포에서 PKC는 세포의 분화뿐만 아니라 활성화에 관여하여, 림프구에서는 interleukin-2를 유도하고,^{2,30} 탐식계세포²⁴에서는 반응성 질소화합물의 생산 분비를 촉진시킴으로써 생체 방어를 담당하기도 한다.^{9,12} 그러나 이와같은 PKC가 overexpression되면 종양 세포의 분화를 정지시키거나 apoptosis를 초래하기도 하여 PKC의 기능은 isozyme의 종류만큼이나 다양성을 나타내고 있다.

자기면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 T세포에 의해 야기되는 중추신경계통 질병으로 백색질내 수초탈락을 특징적으로 하

며,^{4,5} 병리조직학적 소견이 사람의 수초탈락성 질병인 multiple sclerosis와 유사하여 이의 동물모델로 연구되고 있다.^{22,23} EAE는 항원을 인식한 뇌염야기성 T림프구가 활성화된 후 복잡한 과정을 거쳐 표적장기인 뇌에 homing함으로써 병변이 형성되며, EAE 병소내 침윤된 염증세포의 아형은 주로 CD 4양성이면서 TCR 알파베타 양성의 T림프구이며 bystander 세포로는 macrophage 등이 관여하고 있다.²⁶ 그리고 이들 뇌염야기성 T림프구와 macrophage들은 IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, 감마 인터페론 및 종양괴사인자 등을 분비하는 것이 여러 연구자에 의해 확인되고 있다.^{10,29} 그러나 이상과 같은 세포활성화 과정에는 PKC등의 복잡한 signaling pathway가 혈구세포내에서 일어나고 있으나 이에 관련된 연구는 많지 않다.²

PKC의 혈구내 작용기전은 명확하지 않으나 T림프구의 활성화에 중요한 역할을 하며, 실험적으로 PKC activator를 처리하면 interleukin-2를 비롯한 cytokine을 생성 분비하는 것으로 알려지고 있다.² 따라서 T림프구에 의해 야기되는 자기면역성 질병에서 T cell activation과 관련성이 큰 PKC에 대한 생체내 연구는 질병의 mechanism을 이해하는데 매우 중요할 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 뇌척수염의 진행과정중 조직내 침윤된 염증세포에서 PKC의 역할을 추정하기 위하여 자기면역성 뇌척수염 모델에서 PKC의 발현을 다각적으로 검사하였던 바 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

자기면역성 뇌척수염 유도

guinea pig spinal cord에서 분리정제된 수초기본 단백질(myelin basic protein, MBP)을 항원으로 사용하였다. 면역방법으로는 MBP(1mg/ml)를 동량의 Freund's adjuvant (supplemented with Mycobacterium tuberculosis 5mg/ml)와 혼합하여 immersion을 만든후 7-8주령의 Lewis rat(한국유전공학연구소)의 뒷발바닥에 피하주사하였다. 면역후 매일 임상증상을 관찰하며 발증시기 별로 조직을 채취하였다. 임상증상은 꼬리의 유약성 마비를 grade 1(G 1), 뒷다리의 불완전 마비를 G 2, 뒷다리의 완전 마비를 G 3로 표기하였다.

척수표본의 채취

조직표본은 EAE의 초기(면역후 7-9일), 극기(면역후 12-14일) 및 회복기(면역후 21일)로 구분하여 채취하였으며 ether 마취하에 각 그룹별 3마리 rat로부터 척수를

채취하였다. In situ hybridization용 표본을 위하여 모든 용액 및 기구를 diethylpyrocarbonate(DEPC, Sigma)을 처리한후 사용하여 RNase-free조건으로 준비하여 활용하였다. 조직내 PKC의 반응을 확인하기 위하여 4% paraformaldehyde 고정용액에 뇌 및 척수조직을 고정하고, 탈수과정을 거쳐 포매하였다. 이들 조직은 연속절편을 만들어 hematoxylin & eosin염색을 실시하여 염증을 검사함과 동시에 면역조직 염색을 실시하였다. 그리고 T세포의 면역염색을 위하여는 OCT compound에 척수조직을 넣은후 액체질소로 냉각한 아세톤용액내에서 급속냉동후 cryocut (Leica)를 활용하여 동결절편을 만들어 면역염색에 이용하였다.

면역조직화학적 염색

파라핀 포매조직 및 동결절편에서 침윤세포의 세포형을 구분하기 위하여 avidin-biotin complex kit(Vector, Burlingame, CA)을 활용하여 면역염색을 실시하였다. 큰포식세포 및 림프구를 확인하기 위하여는 ED1 (Serotec) 및 R73(anti-T cell receptor $\alpha\beta$)(Serotec, Blackthorn, Bicester, Bucks, UK)을 각각 사용하였다.

RNA분리 및 Northern blotting

뇌척수염 rat의 척수조직에서 total RNA는 LiCl-urea법으로 분리하여 1% agarose-formaldehyde gel에 전기영동하고 nylon membrane에 전이시켰다. 50% formaldehyde, 4xSSC, 0.5mg/ml sheared salmon sperm DNA 및 1% Denhardt's 용액을 함유한 완충용액에서 42°C 에서 prehybridization하였고 hybridization은 [α -³²P] deoxycytidine triphosphate (dCTP)로 label한 probe 1x10⁶ cpm/ml를 함유하는 같은 완충 용액에서 수행하였다. 여과지는 순차적으로 2xSSC / 0.1% SDS, 1xSSC / 0.1%SDS, 0.2xSSC / 0.1% SDS용액으로 55°C에서 20분 동안 건조하여 자동방사선 사진술에 의해 분석하였다.⁸

Probe제작

여러 PKC isozymes중에서 혈구세포, 특히 림프구에 강하게 발현되는 PKC delta를 확인하고자 하였다.^{7,21-23} 노던 브릿팅 및 in situ hybridization을 위한 PKC delta의 cRNA probe는 1,054-bp(PstI-PstI)로써 실험실에서 유지되고 있는 것을 이용하였다.⁸

In situ Hybridization

모든 용액은 0.02% DEPC로 처리하고 autoclave하여 사용하고 유리그릇은 RNase를 불활성화 시키기 위해 180°C에서 3시간이상 baking후 사용하였다.

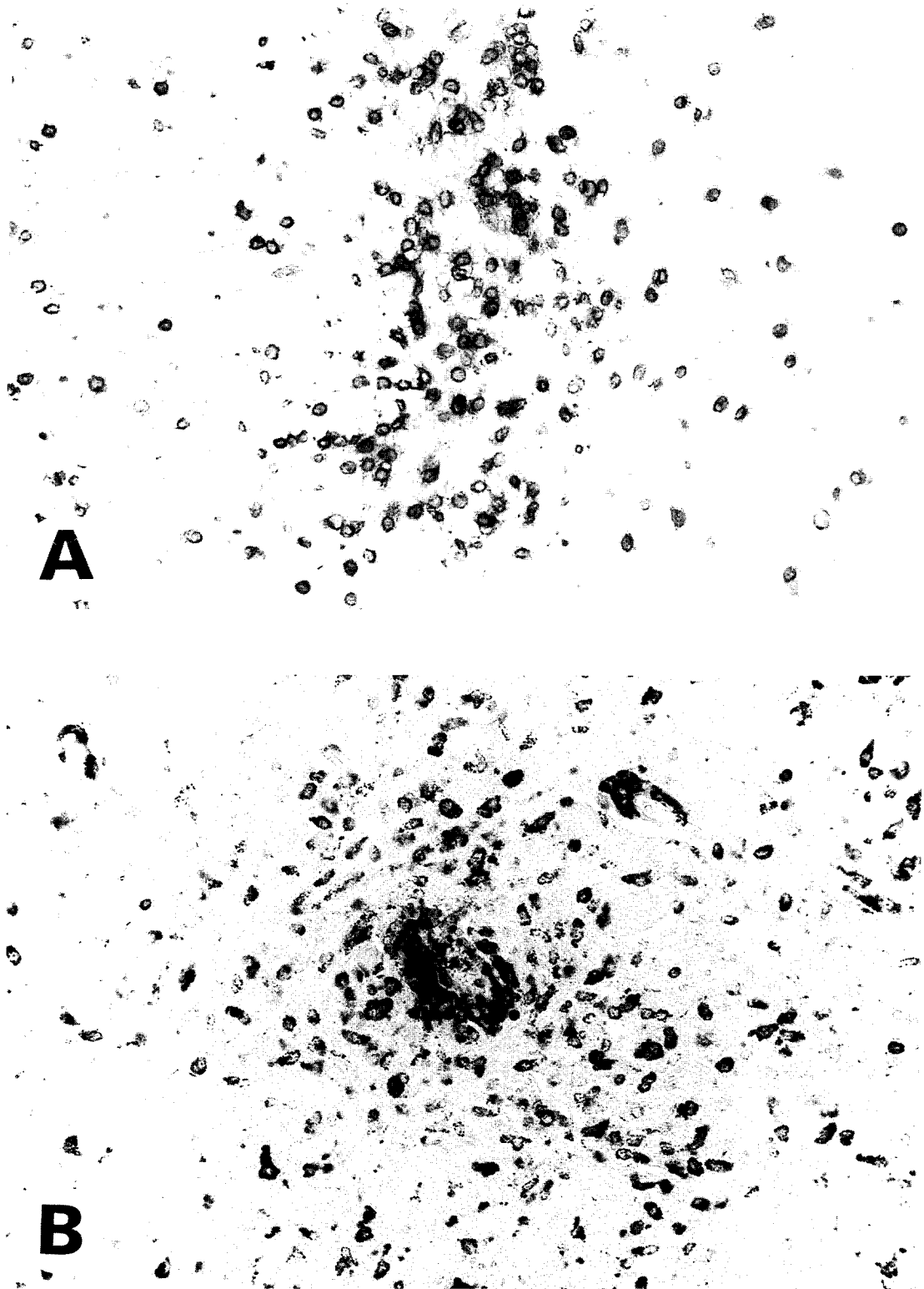


Figure. 1. Immunohistochemical staining of R73 and ED1 in the spinal cords of rats with EAE. In EAE lesions, the majority of inflammatory cells were TCR alpha/beta-positive T cells(A) and ED1-positive macrophages(B). Spinal cords of rats with EAE(grade 3) were obtained at days 14 postimmunization(pi). Counterstained with hematoxylin. Magnification; A,B; X240.

Prehybridization 전에 조직 절편을 0.1M phosphate 완충용액으로 만든 신선한 4% paraformaldehyde로 20분 동안 고정하였고, 다음 내재성의 alkaline phosphatase를 불활성화시키기 위해 0.2M HCl을 처리한후 0.1M triethanolamine(pH 8.0)에 0.25% acetic acid로 acetylation하였다. 5분 동안씩 0.1M PB로 2번 헹구고 70%, 80%, 90%, 95%, 100%알콜로 탈수한 다음 공기중에서 건조시켰다. Hybridization용액은 50% 탈이온화 formamide, 10% dextran sulfate, 1x Denhardt's용액 600mM NaCl, 10mM DTT(dithiothretol), 0.25% SDS, E.coli tRNA 250µg/ml, digoxigenin 라벨된 RNA probe 약 0.5µg/ml를 포함시켰다. 그리고 Hybridization용액의 50µl를 각 절편위에 놓은 다음 parafilm으로 덮고 수분 유지 할수있는 용기에서 50°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Hybridization후에 parafilm를 5x SSC에 넣고 parafilm을 제거하고 50°C 수조에서 50% formamide, 2x SSC용액에서 30분간 각각 씻은후 RNase A 소화(10µg/ml)는 37°C에서 30분동안 수행하였다. 그리고 50°C 수조에서 2x SSC용액, 0.2x SSC 용액에서 단계적으로 15분간씩 2회 씻고, alkaline phosphatase가 결합된 Nucleic Acid Detection Kit(Boehringer Mannheim)를 사용하여 면역반응시켰다. 그리고 BCIP/NBT로 발색반응후 10mM Tris HCl(pH 8.0)으로 반응을 종료시킨후 검정하였다.

결 과

자기면역성 뇌척수염의 경과

MBP를 면역한 Rat는 면역후 7-9일부터 꼬리의 긴장도가 떨어지기 시작하여 면역후 12-14일사이 뒷다리의 마비로 인해 보행실조가 된 후 면역후 15일째부터는 점차 회복되어 21일째는 보행상태가 면역전의 상태로 회복되었다. 시기별로 조직을 검사한 결과 면역후 8일째부터 척수의 거미막 밑 공간에서 염증세포가 처음 확인된 후, 면역후 12-14일 사이(G3)에는 혈관주위 염증세포의 침윤이 현저하였다. 한편 면역후 15일째부터는 걸음걸이가 회복되기 시작하였다²⁶.

면역조직화학적 염색을 통해 침윤세포의 아형을 규명한 바 이 세포들은 주로 TCR alpha/beta 양성 T 세포(Fig. 1. A) 와 ED1 양성 큰포식세포(Fig. 1, B)로 구성되어 있었다. 그외 B세포와 자연살해세포들도 일부 관찰되었으나 감마델타 T세포는 거의 확인되지 않았다.

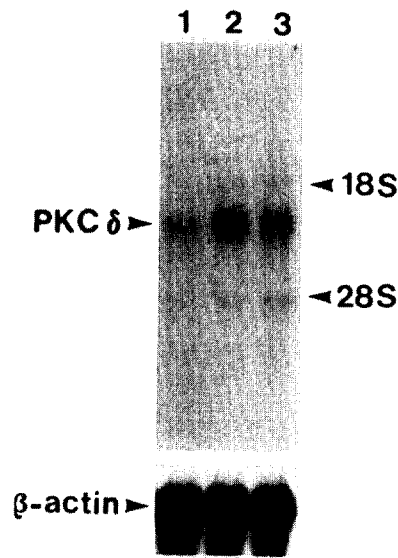
Northern blotting

Fig. 2에서 보는 바와 같이 면역시키지 않은 대조군 (lane 1)에 비해 EAE의 극기(G3; 면역후 14일째)에는

PKC delta mRNA는 현저히 증가하였고(lane 2), 그후 회복기(lane 3; 면역후 21일째)에서는 감소하는 경향이 었다.

In situ hybridization 및 면역염색

척수조직내 PKC gene의 발현을 확인하기 위하여 in situ hybridization을 행한 결과 PKC delta 양성 세포는 거미막 밑 공간 및 혈관주위에서 주로 관찰되었고(Fig. 3, A), 이 세포들은 T 세포 및 큰 포식세포로 추정되었다. 또한 침윤세포뿐만 아니라 EAE 병소와 떨어진 부위에서도 신경아교세포가 PKC를 발현하고 있었으며 이와 같은 소견은 면역시키지 않은 뇌조직에서도 인정되었다(Fig. 3, B).



2

Figure. 2. Northern blot analysis of PKC delta in the normal and EAE-induced spinal cord. Lane 1: normal spinal cord; lane 2: Peak stage of EAE(G3) at day 14 pi; Lane 3, recovery stage of EAE at day 21 pi. Total cellular RNA(20 µg) was loaded in each lane. Blots were hybridized with the indicated [³²P] dCTP-radiolabeled PKC delta cDNA and exposed to X-ray film for 8 hours. The amount of loaded RNA samples were monitored by the expression of beta actin.

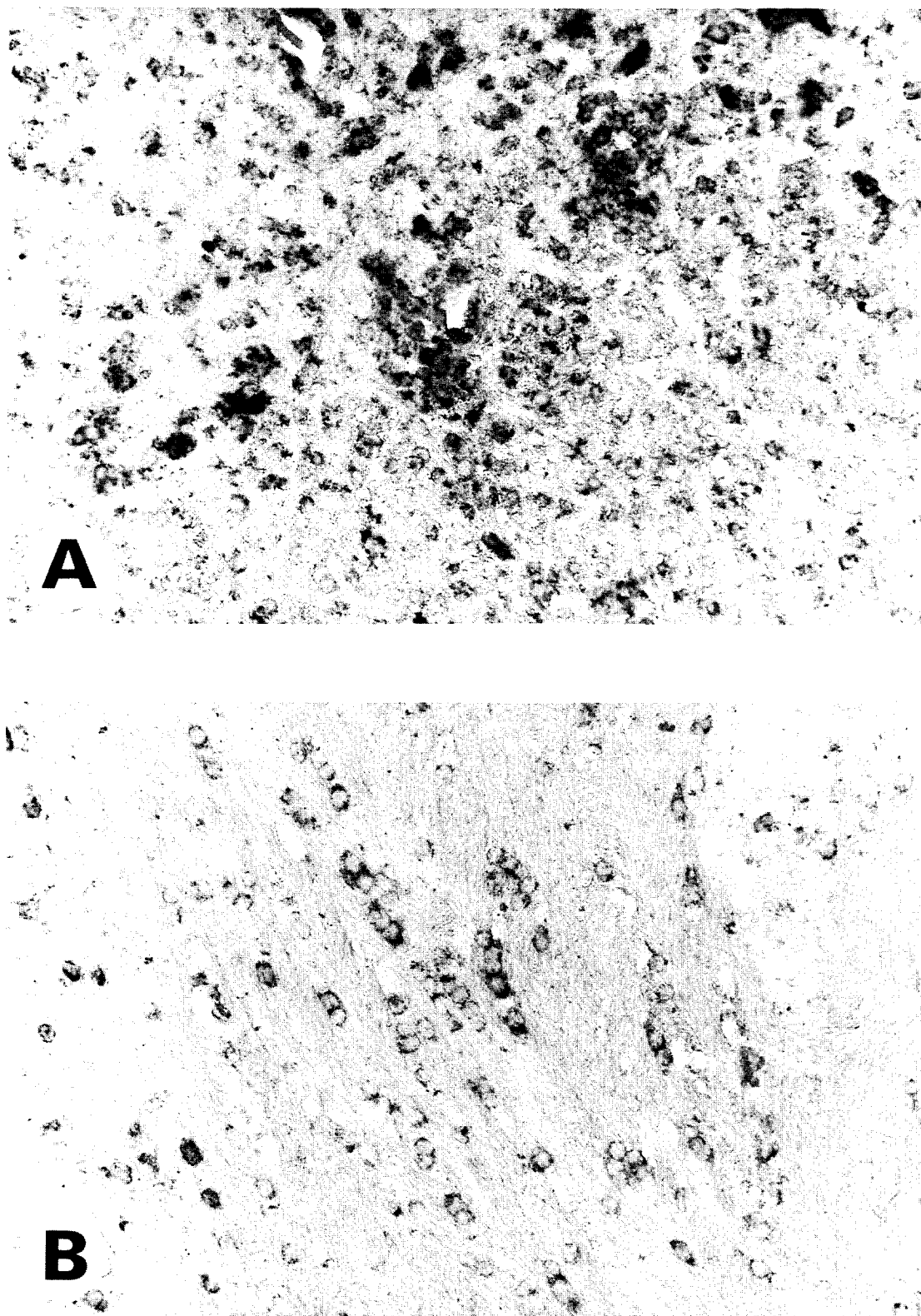


Figure 3. Expression of PKC delta mRNA in the spinal cord of rats with EAE. A: Spinal cord sections of EAE(A) and normal(B) rats were hybridized with cRNA probe for PKC delta. X240.

고 찰

이 연구에서는 T세포의 활성화에 밀접한 관련이 있는 것으로 알려지고 있는 PKC가 자기면역성 뇌척수염에서 어떤 형태로 발현되는가를 확인한 첫 보고로써, 뇌염 야기성 T림프구와 macrophage가 뇌척수염의 초기, 극기 및 회복기의 진행 단계에 따라 다음과 같이 PKC의 역할도 다소 차이가 있음을 시사하고 있다.

PKC가 강하게 발현된 침윤된 T 세포는 말초림프조직에서 이미 활성화된 상태에서 침윤된 것으로 생각되며 이와같은 경우는 배양된 T 세포를 활성화시킨 연구에서 증명된 바 있다.⁵ 그러나 실제 EAE 뇌조직에 침윤한 T세포는 세포분열이 현저하지 않고,¹⁸ 오히려 apoptosis에 의해 소멸되는 점^{21,25}으로 보아 EAE 병소내 T림프구에서 PKC의 강한 발현은 T 세포의 분열증식 단계를 지나 오히려 후자의 세포사멸에 관련성이 클 것으로 생각된다. 더구나 과다하게 발현된 PKC는 중앙세포에서 세포분열을 정지시킬 뿐만 아니라 오히려 세포사멸을 일으킬 수 있다고 한 점에 비추어 볼때 이 연구에서 나타난 PKC mRNA의 증가는 오히려 T 세포의 apoptosis를 초래할 수 있을 것으로 생각되며, 이는 EAE 모델이 마비가 심한 극기(grade 3)를 지나 자연 회복^{4,21}하게 될 것으로 추정하고 있다.

macrophage 또는 microglia 등의 탐식세포계통에서 PKC가 활성화되면 세포독성을 야기할 수 있는 nitric oxide 등의 물질이 생성되어 생체방어에 관여하는 것으로 알려지고 있다.¹⁴ 본 연구에서 EAE 병소뿐만 아니라 정상적인 뇌조직에서도 일부 신경아교세포가 PKC를 발현하고 있었던 점으로 보아(Figure 3, B), PKC delta는 뇌조직내 신경아교세포에 상재하는 유전자로써 유도인자 또는 환경적 변화에 따라 발현이 변화될 것으로 생각된다. 특히 Bosca 및 Lazo³는 배양된 macrophage에서 nitric oxide의 분비는 PKC 의존성임을 증명하였고, Okuda et al¹⁹은 자기면역성 뇌척수염 병소에서는 nitric oxide의 생성에 필수 불가결한 nitric oxide synthase는 침윤된 macrophage내에서만 확인된다고 하였다. 그러나 생체내 결과와는 달리 배양된 microglia¹⁵와 별아교세포²⁷도 nitric oxide를 생산할 수 있다고하여 in vivo¹⁹와는 다소 차이가 인정된다. 본 연구에서는 T세포 및 macrophage의 면역염색을 통하여 PKC 발현세포는 T세포뿐만 아니라 침윤된 macrophage 또는 활성화된 microglia로 분류되었으며 이들세포에서 PKC의 발현이 증가된 것은 여러 cytokine의 생산에도 관여할 것으로도 생각되나 EAE의 회복기에 염증세포가 현저히 감소한 점에 비추어

PKC는 자기면역성 질병에서 apoptosis에 깊이 관여하는 것으로 생각된다.

결론적으로 뇌척수염 병소에서 발현이 증가된 PKC는 주로 침윤된 T 세포 및 macrophage 유래일 것으로 생각되며 이들세포에서 PKC의 역할을 구분해보면 뇌염 야기성 T세포의 활성화 초기단계에는 세포의 분화에 관여하나 target organ에 침윤된 후 침윤세포의 apoptosis를 유도하는데 밀접한 관련성이 있을 것으로 추정되었다.

감사의 글

이 연구는 제주대학교 대학발전기금의 연구비로 수행되었음.

참고문헌

- 1 Baier G, Telford D, et al. A. Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C(PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **268**:4997-5004, 1993.
- 2 Berry N, Ase K, et al. Human T cell activation by phorbol esters and diacylglycerol analogues. *J Immunol* **143**:1407-1413, 1989.
- 3 Bosca L, Lazo PA. Induction of nitric oxide release by MRC OX-44(anti-CD53) through a protein kinase C dependent pathway in rat macrophages. *J Exp Med* **179**:1119-1126, 1994.
- 4 Feurer C, Prentice DE, et al. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* **10**:159-166, 1985.
- 5 Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathology* **1**:97-105, 1991.
- 6 Huang FL, Scott Young IIIW, et al. Developmental expression of protein kinase C isozymes in rat cerebellum. *Dev Brain Res* **52**:121-130, 1990.
- 7 Kim HM, Hirota S, et al. Differential expression of protein kinase C genes in cultured mast cells derived from normal and mast-cell-deficient mice and mast cell lines. *Int Arch Allergy Immunol* **105**:258-263, 1994.
- 8 Knopf JL, Lee M, et al. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNA. *Cell* **46**:491-502, 1986.
- 9 Kovacs EJ, Radzioch D, et al. Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents

- which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* **141**:3101-3105, 1988.
- 10 Kuchroo VK, Martin CA, et al. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* **151**:4371-4382, 1993.
 - 11 Leibersperger H, Gschwendt M, et al. Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the delta type different species and murine tissues. Predominance in epidermis. *J Biol Chem* **266**: 14778-14784, 1991.
 - 12 MacMicking JD, Willenborg DO, et al. Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis; enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *J Exp Med* **176**:303-307, 1992.
 - 13 Mizuno K, Kubo K, et al. Structure and properties of a ubiquitously expressed protein kinase C, nPKC delta. *Eur J Biochem*. **202**:931-940, 1991.
 - 14 Munn DH, Bell AC, et al. Activation-induced apoptosis in human macrophages; developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J Exp Med* **181**:127-136, 1995.
 - 15 Murphy S, Simmons ML, et al. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *TNIS* **16**:323-328, 1993.
 - 16 Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**:305-312, 1986.
 - 17 Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* **334**:661-665, 1988.
 - 18 Ohmori K, Hong Y, et al. In situ demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence suggesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organs. *Lab Invest* **66**:54-62, 1992.
 - 19 Okuda Y, Nakatsuji Y, et al. Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **62**:103-112, 1995.
 - 20 Osada S, Mizuno K, et al. A phorbol ester preceptor/protein kinase, nPKC, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J Biol Chem* **265**:22434-22440, 1990.
 - 21 Pender MP, McCombe PA, et al. Apoptosis of alpha/beta T lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis: its possible implications for recovery and acquired tolerance. *J Autoimmunity* **5**:401-410, 1992.
 - 22 Raine CS. Experimental allergic encephalomyelitis and related conditions. *Progress in Neuropathology Vol III*. ed. Zimmerman HM, Grune and Stratton, NY, San Francisco, London, 1976.
 - 23 Raine CS. Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* **53**:328-337, 1994.
 - 24 Reiner NE. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunology Today* **15**:374-381, 1994.
 - 25 Schmied M, Breitschopf H, et al. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol* **143**:446-452, 1993.
 - 26 Shin T, Kojima T, et al. The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **56**:171-177, 1995.
 - 27 Simmons ML, Murphy S. Role for protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Glia* **11**:227-234, 1994.
 - 28 Smith BL, Krushelnycky BW, et al. The HIV Nef protein associates with protein kinase C theta. *J Biol Chem* **271**:16753-16757, 1996.
 - 29 Tanuma N, Kojima T, et al. Competitive PCR quantification of cytokine mRNA in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **58**:197-206, 1997.
 - 30 Weiss A, Shields R, et al. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol* **138**:2169-2176, 1987.
 - 31 Wetsel WC, Khan WA, et al. Tissue distribution and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol* **117**:121-133, 1992.