

## 에탄올이 신경아세포종 B103세포의 Protein Kinase C Isozyme 활성에 미치는 영향

조효정<sup>1</sup> · 정영진<sup>1</sup> · 진승하<sup>2</sup> · 오우균<sup>3</sup> · 김상원<sup>3</sup> · 강은정<sup>3</sup> · 박진규<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>펜실바니아 의대 약리학교실

<sup>3</sup>주식회사 케이티앤지 중앙연구원

### Effect of Ethanol on the PKC Isozyme Activities in B103 Neuroblastoma Cells

Hyo-Jung Cho<sup>1</sup>, Young-Jin Chung<sup>1</sup>, Sung-Ha Jin<sup>2</sup>, Woo-Kyun Oh<sup>3</sup>,  
Sang-Won Kim<sup>3</sup>, Eun-Jung Kang<sup>3</sup> and Jin-kju Park<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Pharmacology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

<sup>3</sup>Dept. of Bioresearch, KT&G Central Research Institute, Daejeon 305-345, Korea

#### Abstract

It is well known that long-term heavy ethanol intake causes alcoholic dementia, cerebellar degeneracy or Wernicke-Korsakoff syndrome and aggravates the conditions of many other neuro-psychotic disorders. Recently it is indicated that protein kinase C (PKC) plays an important role in the action of ethanol and in the neuro-adaptational mechanisms under chronic ethanol exposure. In order to investigate the effect of ethanol on PKC isoforms levels within the range of not showing any cytotoxicity, B103 neuroblastoma cell line transformed from murine central nervous system was employed and western blot analysis was carried out by using PKC isoform-specific antibodies. The changes of PKC- $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  and  $\zeta$  level in the range of ethanol concentration 50~200 mM were examined at the exposure time 1, 2, 8, 18 and 24 hrs in both cytosolic and membrane fraction. A typical ethanol concentration inducing the PKC isozymes was 100 mM, and the transforming time ranges of PKC isozymes could be considered as two different parts to each PKC isoform such as initial (0~2 hrs) and prolonged (8~24 hrs) stages. PKC- $\gamma$  and PKC- $\epsilon$  were clearly induced during the prolonged stages in cytosol at 18 hrs, and membrane fraction at 8 hrs and 18 hrs, respectively. On the other hand the PKC- $\alpha$  and PKC- $\zeta$  isozymes were largely induced in the prolonged stages at 18 hrs and 24 hrs, where the PKC- $\alpha$  isozyme was induced in both cytosol and membrane fractions at 200 mM ethanol concentration while the PKC- $\zeta$  isozyme was induced only in the membrane fractions at 100, 200 mM. At 200 mM ethanol concentration of 24 hrs incubation in the prolonged stage, the PKC- $\alpha$  was maximally induced by 150% of the control values whereas the PKC- $\gamma$  was significantly decreased to 47% of the control values. These results suggest that 100~200 mM ethanol may modulate the signal transduction and neurotransmitter release in the central nervous system through the regulation of PKC isozymes, and the action of these isoforms may act differently each other in the cell.

**Key words:** ethanol, protein kinase C, isozyme, central nervous system

#### 서 론

장기간의 과량 알코올 섭취는 알코올성 치매(1), 소뇌의 퇴화(2), Wernicke-Korsakoff 증후군(3)의 원인이 되며, 다른 신경-정신병 질환의 상태를 악화시킨다(4). 이 에탄올의 대사적 특징을 알아보기 위한 많은 동물 실험 결과는 에탄올의 노출 양상에 따라 달라 낮은 수준의 반복적인 노출보다 단기적인 다량 에탄올의 노출이 더 심각한 영향을 미치고, 뇌 기능 발달단계의 노출 시간에 따라 에탄올에 대한 영향이 다르다는 것이 보고되어 있다(5). 또한, 해마의 피라미드 세포(py-

ramidal cell)와 소뇌의 과립 세포(granule cell), 푸르킨예 세포(purkinje cell) 등에서 신경세포의 손상이 나타나며, 신경교 세포(glia cell)에서의 이상이 관찰되었다(6-8). 그러나, 급성 또는 만성 에탄올 노출시 변형되는 뇌기능의 분자생물학적, 세포학적 기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 이들 세부 기전에 대한 연구는 에탄올 의존성 질환의 치료 대책을 계획하는데 기초를 제공해 줄 것이다. 최근, 특정 신경 단백질 사이의 분자 상호작용 기전에 대한 연구경향은 protein kinase C(PKC)가 에탄올의 생리적 작용과 만성적인 에탄올 노출에 대한 신경적응(neuroadaptation)

\*Corresponding author. E-mail: jkypark@ktng.com  
Phone: 82-42-866-5536, Fax: 82-42-861-1949

기전에 중요한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다(9).

뇌에서 PKC는 호르몬, 신경전달물질 및 몇 가지 성장 요소 등 세포 밖의 신호를 세포 내로 전달하는데 중요한 조절 작용을 하는 효소로서 기질의 serine/threonine 잔기를 선택적으로 인산화시키며, inositol phosphate의 가수분해에 의해서 생기는 diacylglycerol에 의해서 활성화되는 효소이다(10,11). PKC는 서로 다른 칼슘 의존성을 나타내며 세포내 위치가 다른 많은 isozyme들( $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\lambda$ )을 가지고 있으며 구조적인 관련성을 토대로 3부류(cPKC, nPKC, aPKC)로 나누어지고 있다. 이들 PKC isozyme들은 지금까지  $Ca^{2+}$ , DAG(diacyl glycerol), 다른 인지질 분해산물의 다양한 조합 등에 의해 다르게 반응하는 것으로 관찰되었으며 그것에 의해 PKC 이성체들의 함량(extent), 반응기간(duration), 세포 내 위치 등이 영향을 받아 각기 다른 활성화 패턴을 나타낸다(12-14).

이와 같이 PKC는 세포 내 기능을 조절하는 효소들 중의 하나로서 그 조절의 기본 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 지금까지 밝혀진 에탄올의 PKC 활성화에 미치는 영향은 에탄올이 PKC의 양과 활성화, 세포 내 분포를 변화시키며, 세포주에 따라 활성화 증가를 나타내는 PKC의 isozyme을 각기 다르게 한다. 즉, 만성적인 에탄올 노출시에 NG108-11 세포와 PC12 세포에서 PKC 활성화가 증가되는데, NG108-11 세포에서는 PKC  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ (15)이, PC12 세포에서는 PKC- $\delta$ ,  $\epsilon$  등이 증가되는 것으로 보고(16)되었다. 또한, 사람 혈소판(17)과 임파세포(18), 상피 각질세포(19)에서도 급성적인 에탄올 노출시에 PKC 활성화가 증가됨이 보고되었다. 그 외에도 에탄올에 의해 astroglia 세포(20)와 사람의 임파세포(18), 상피 각질세포(19) 등의 세포질 분획에서 세포막 분획으로 PKC 활성화가 이동(translocation)됨을 보였다고 했다. 이러한 사실은 세포에 따라 알코올에 반응하는 신호전달체계가 서로 다를 수 있음을 시사한다.

B103세포는 BDIX 흰쥐에서 유래된 neuroblastoma에 속하는 미분화된 신경세포이나 신경전달 물질대사에 관여하여 choline acetyltransferase와 glutamic acid decarboxylase와 같은 신경전달물질의 합성 효소를 가지고 있고, 분화된 신경암세포의 특성을 지녀서 신경전달물질 합성 부위연구나 신경세포와 지지세포 연구에 주로 쓰이고 있다. 본 실험에서는 에탄올이 뇌신경세포의 PKC isozyme들의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 B103 세포주를 사용하였으며, 세포독성에 직접 영향을 미치지 않는 50, 100, 200 mM 에탄올 농도에서 1, 2, 8, 18, 24시간 동안 시간경과에 따른 PKC isozyme 형태들의 활성화변화를 세포질과 세포막 분획으로 나누어 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 세포 배양 용기

세포배양액에 사용한 fetal bovine serum(FBS)은 Hy-

clone사(South Hyclone LR) 제품을 구입하였으며 Western blot 실험에서 primary antibody로 사용한 PKC- $\alpha$ 는 Transduction Laboratories사(Lexington, KY), PKC- $\epsilon$ 과  $\zeta$ 는 Gibco사(Grand Island, NY), PKC- $\gamma$ 는 Boehringer Mannheim사 제품을 각각 사용하였다. Secondary antibody로 사용한 anti-mouse IgG 및 enhanced chemical luminescence (ECL) kit 등은 Amersham사 제품을, blocking buffer에 사용한 Tween 20은 Bio-Rad사(Hercules, CA) 제품을 사용하였으며 ammonium persulfate(APS), N-N-N'-N'-tetramethylene diamine(TEMED) 등은 Promega사(Madison, WI) 제품을 사용하였다. Total RNA mini prep kit는 Qiagen사(Valencia, CA), AMV reverse transcriptase XL 및 Taq DNA polymerase 등은 TaKaRa사(Shiga, Japan) 그리고 Agarose는 Boehringer Mannheim사 제품을 사용하였다. 그 밖의 모든 시약들은 Sigma Chemical사(St. Louis, MO)의 제품을 사용하였으며 세포 배양에 사용된 disposable culture flask와 plate 등의 초자류는 Falcon사(Loncoln Park, NJ) 또는 Corning사(Cambridge, AC)의 제품을 사용하였다.

### 사용기기

세포 증식 측정을 위한 microplate reader는 Bio-TEX사의 ELx 800 기종을 사용하였으며, 세포 형태 관찰을 위한 도립 현미경은 Olympus사의 IMT-2 기종을 사용하였다. 세포 배양용 원심분리기는 한일과학의 HRT-60IV 기종을, CO<sub>2</sub> incubator는 비전과학의 VS-9108MS 기종을, 그리고 clean bench는 수공양행의 제품을 사용하였다. 단백질 전개 및 전이는 Hoefer사의 Mighty Small II SE250/SE260와 Bio-Rad사의 Mini Trans-Blot Cell 153BR18807 및 PAC300 기종을 사용하였다. 표적물질 정량을 위한 densitometer는 Hoefer사의 GS300 Transmittance/Reflectance 기종을 사용하였다. 그밖에 PCR의 수행은 Perkin Elmer사의 gene Amp PCR system 9600 기종을 사용하였으며 DNA 및 RNA 분석용 전기영동장치는 Cosmos Bio사의 Mupid-2 기종을, 확인을 위해서는 서린과학의 SL-20 DNA Image Visualizer™를 각각 사용하였다.

### 세포배양

실험에 사용한 B103는 BDIX 흰쥐에서 유래된 nitroso-ethylurea에 의해 유발된 neuroblastoma세포(22)로 Salk 연구소(San Diego, USA)의 David Schubert 박사의 허가를 받아 사용하였다. 세포 배양액으로는 25 mM glutamine, 1,000 unit/L penicillin과 100 mg/L streptomycin을 첨가한 DMEM 용액에 10% FBS로 보강한 배지를 사용하였으며, 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% O<sub>2</sub>의 혼합조건에서 배양하였고, 배양액의 교환은 3~4일 간격으로, 계대배양은 6~7일 간격으로 실시하였다.

### 세포증식 실험

세포를 96 well plate에 분주( $2.15 \times 10^4$  cell/well)하여 24

시간 동안 배양한 후에 배양액을 제거하고 0, 50, 100, 200 mM 농도의 에탄올이 첨가된 배지를 well당 100  $\mu$ L씩 넣어 24시간 동안 배양하였다. 세포증식은 배양이 끝난 후 살아있는 세포 내 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase 활성을 측정하는 MTT assay를 이용하여 측정하였다(21). 각 농도의 에탄올이 첨가된 배지에 20~21시간이 지난 후에 MTT stock solution(5.0 mg/mL)을 각 well당 10  $\mu$ L씩 첨가한 후 다시 3~4시간 동안 배양하고 50% dimethyl formamide와 693 mM SDS를 1:1 혼합한 시약을 각 well당 70  $\mu$ L씩 첨가하여 형성된 formazan을 용해시켰다. 흡광도는 microplate reader를 이용하여 570 nm 파장에서 측정하였다. 결과는 대조군에 대한 시험군의 백분율로 환산하였다.

#### 에탄올 처리 및 전기영동시료 제조

에탄올 농도 0, 50, 100, 200 mM를 1, 2, 8, 18, 24시간 간격으로 처리하였다. 에탄올은 실험에 사용하기 직전에 10% FBS가 함유된 DMEM에 농도별로 첨가하여 사용하였으며, 에탄올의 증발을 막기 위해 파라필름을 이용하여 well plate를 밀폐하였다. 실험이 완료된 세포는 culture plate의 바닥을 긁어 세포를 수확하여 lysis 완충용액 30 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.54 TU/mL Aprotinin, 0.1 mM EGTA, 2  $\mu$ g/mL Leupeptin, 2  $\mu$ g/mL Pepstatin A)를 첨가하여 4°C에서 10분 동안 방치한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 cell lysate를 제조하였다. 제조된 lysate는 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 새 튜브에 옮겨 세포질 분획으로 사용하였다. 남은 pellet은 앞의 lysis 완충용액에 Triton X-100을 첨가한 후 앞의 방법과 같이 초음파에 의해 파쇄 시키고, 12,000 rpm, 4°C에서 40분간 원심분리, 200 rpm, 4°C에서 40분간 섞은 후, 다시 12,000 rpm, 4°C에서 40분간 원심분리한 후에 상층액을 새 튜브에 옮겨 세포막 분획으로 사용하였다. 모든 분획은 Bradford 방법(22)에 준하여 단백질량을 정량하였다. 시료는 6 $\times$  SDS buffer(0.375 mM Tris-HCl, 1% SDS, 30% glycerol, 3% 2-mercaptoethanol, 0.5% Bromophenol blue(BPB))와 혼합한 후에 100°C에서 5분간 끓여 전기영동시료로 사용하였다.

#### Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

4% stacking gel과 10% separating gel을 준비하고 전기영동 set를 완전히 장치하고, tank buffer(25 mM Tris; pH 8.3, 192 mM glycine, 0.1% SDS)로 채웠다. 전기영동 시료는 well 당 70  $\mu$ g의 단백질을 부하하고 20 mA의 일정한 전류를 걸어 시료 내에 존재하는 BPB가 gel 하단에서 0.5 cm에 도달할 때까지 전개하였다.

#### Western blot analysis

Whatman 3 MM 여과지를 gel과 같은 크기로 잘라 blotting buffer(20 mM Tris, 150 mM glycine, pH 8.0)로 적셔 플라스틱 지지대 위에 놓고 PAGE에서 전개한 gel을 blotting buffer로 적시고 여과지 위에 공기방울이 생기지 않도록

잘 놓았다. Nitrocellulose(NC) paper를 blotting buffer로 적셔 gel 위에 조심스럽게 놓고 공기방울을 완전히 제거하였다. 이렇게 조합된 sandwich를 NC paper가 양극으로 향하게 설치하고 blotting buffer로 탱크를 채우고 4°C에서 1시간 동안 250 mA의 일정한 전류를 흘려 gel의 단백질을 NC paper로 전이시켰다. 전이가 끝난 NC paper는 0.5% Ponceau S 용액을 사용하여 protein의 전이여부를 확인한 후 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 다음, 5% nonfat dry milk를 사용하여 1시간 정도 blocking시켰다. 표적 물질에 대한 항체로 PKC- $\alpha$  (1/1000),  $\epsilon$ (1/500),  $\zeta$ (1/400),  $\gamma$  (1/1000)를 상온에서 1 시간 또는 4°C에서 16시간 동안 반응시키고, PBS로 3~4번 세척한 후 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 anti-mouse IgG(1/5000) 또는, anti-rabbit IgG(1/5000)로 상온에서 1시간 반응시키고 PBS로 3~4번 세척하였다. 항체로 표지된 표적물질은 ECL kit를 사용하여 확인한 후, densitometer(Hofer사의 GS 300 Transmittance/Reflectance)를 사용하여 정량화하였다.

#### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

실험이 완료된 세포는 세포를 수확한 후 total RNA minipreps kit를 사용하여 total RNA를 분리한 다음, spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA의 농도를 정량하였다. 분리한 total RNA 2  $\mu$ g을 reverse transcriptase 0.1  $\mu$ L(3.8 units)을 이용하여 cDNA를 합성한 다음 이것을 polymerase chain reaction(PCR)을 위한 template로 사용하였다. 역전사 반응은 42°C에서 1.5시간 동안 cDNA를 합성, 95°C에서 5분 동안 변성시키고 5°C에서 5분간 냉각시키는 단계로 진행하였다.

PKC  $\alpha$ 의 primer로는 5'-ATCTAACAACCTGGACAGGG-3'(sense strand, 310 bp)와 5'-GCTGAATGTGGTACATGAGG-3'(anti-sense strand, 310 bp)를 사용하였으며, PCR은 Taq DNA polymerase 0.2  $\mu$ L(1 unit)와 RT reactant 2  $\mu$ L 및 PCR buffer를 primer와 희석하여 사용하였다. PCR은 94°C에서 2분간 predenaturation, 94°C에서 30초 동안 melting, 58°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 30초 동안 extension하는 과정을 35회 반복하여 수행하였고 마지막 cycle에서는 72°C에서 10분 동안 extension 단계를 거쳐 유전자 증폭을 실시하였다. House keeping gene으로는  $\beta$ -actin을 사용하였다. 증폭된 PCR 산물이 target mRNA의 단편임을 확인하기 위해서 같은 조건으로 nested PCR을 실시하였다. Nested PCR을 위해 사용된 primer는 5'-GACTTCAA-CTTCCTCATGGTG-3'(sense strand)와 5'-GTATTCC-ATGACGAAGTACAG-3'(anti-sense strand)였다.

#### Agarose gel electrophoresis

Agarose와 0.5 $\times$ tris-borate/EDTA(0.045 M tris-borate, 0.001 M EDTA) buffer(TBE), ethidium bromide를 섞어 1%

agarose gel을 만든 다음, 전기영동 set을 완전히 장치하고, 0.5×TBE로 채웠다. 시료는 well당 1 μL RNA와 PCR reactant 전량의 DNA를 부하하고, 100V의 일정한 전압을 걸어 시료를 전개하였다. 전개된 RNA와 DNA는 UV lamp하에서 확인하고 Polaroid 667 film으로 촬영하였다.

통계 처리

얻어진 자료는 SPSS/PC+를 이용하여 평균과 표준 오차 (mean±SEM)로 표기하였으며, 통계적 유의성 검정에는 ANOVA와 Tukey test를 이용하였으며, α<0.05인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

세포증식에 미치는 영향

BDIX 흰쥐의 neuroblastoma의 일종인 B103 세포에서 에탄올에 의한 세포증식을 조사하기 위해서 10% serum media, 3% serum media 및 serum free media에 에탄올 농도를 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 그리고 1000 mM로 각각 처리한 결과 3종류 media 모두에서 에탄올 농도 20~200 mM는 세포증식에 유의적인 변화를 보여주지 않음에 비해 400, 600, 800 그리고 1000 mM의 에탄올 농도에서는 세포증식이 유의적으로 감소되고 있음을 관찰하였다(Fig. 1). 또한, 에탄올 처리에 의한 세포의 형태 변화를 24시간 후에 관찰한 결과 대조군과 상이하지 않음을 확인하였다(Fig. 2).

이와 같은 결과로부터 세포증식의 변화가 나타나지 않는 에탄올 농도(50, 100, 200 mM)에서 1, 2, 8, 18, 24시간으로 시간 경과에 따라 세포내 신호전달에 중요한 역할을 담당하는 PKC의 변화를 알아보기 위해 PKC isozyme들 중에서 α, γ, ε과 ζ 변화를 조사하였다.

PKC-α의 활성화에 미치는 영향

세포질 분획에서 전반적으로 1, 2, 8시간에서는 에탄올 농도 의존적으로 효소 활성이 감소되다가 18시간부터는 원래 상태로 회복하기 시작하며, 특히 에탄올 농도 200 mM에서는 18시간과 24시간에서와 같이 처리 시간이 길어질수록 효소활성도가 상대적으로 크게 증가하는 경향을 보였다. 세포막 분획에서는 1시간에는 미약한 감소경향을 보였으나, 2시간대에서는 모든 에탄올 농도에서 증가하는 경향을 나타내어 18, 24시간에서는 에탄올 농도 200 mM에서 모두 유의적인 증가를 보였다(Fig. 3). 이러한 PKC-α의 활성 증가는 NG 108 15 세포 및 PC12 세포(17)에서 관찰된 활성증가와 일치된 양상을 보였다. 따라서, PKC-α는 B103세포의 세포질과 세포막에서 에탄올의 지속적인 노출에 의해 지속적으로 발현 분포되는 isozyme으로 추정된다.

PKC-γ의 활성화에 미치는 영향

PKC-γ isozyme의 활성은 세포질 분획에서 2, 8시간 동안 노출된 모든 에탄올 농도에서 감소되는 경향을 보였으나

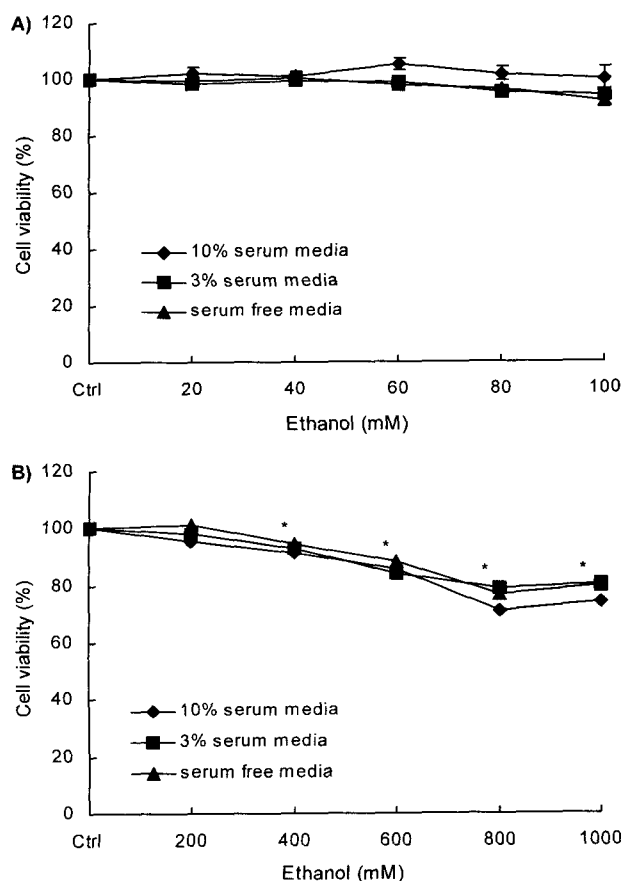


Fig. 1. Effect of ethanol on the proliferation of B103 cells for 24 hr exposure.

Cultures were exposed to the media of the three different serum formula (10% serum, 3% serum, serum free) and ethanol concentration (A: 20, 40, 60, 80, and 100 mM, B: 200, 400, 600, 800, and 1000 mM). MTT assay was used for the proliferation assay. Data were represented as mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate. \*Means significantly different from that of control group at p<0.05 tested by ANOVA and Tukey test.

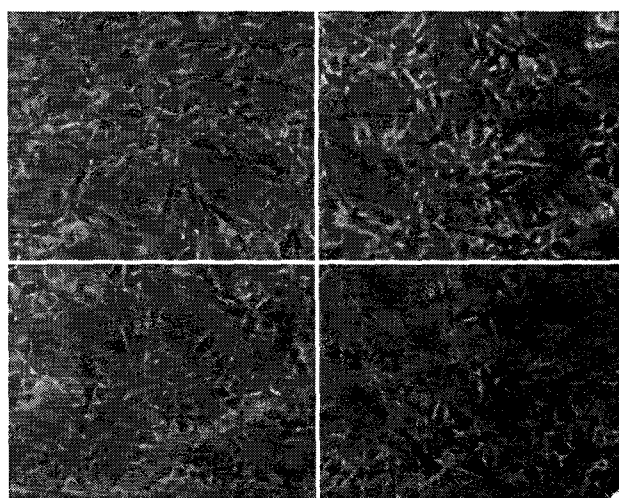
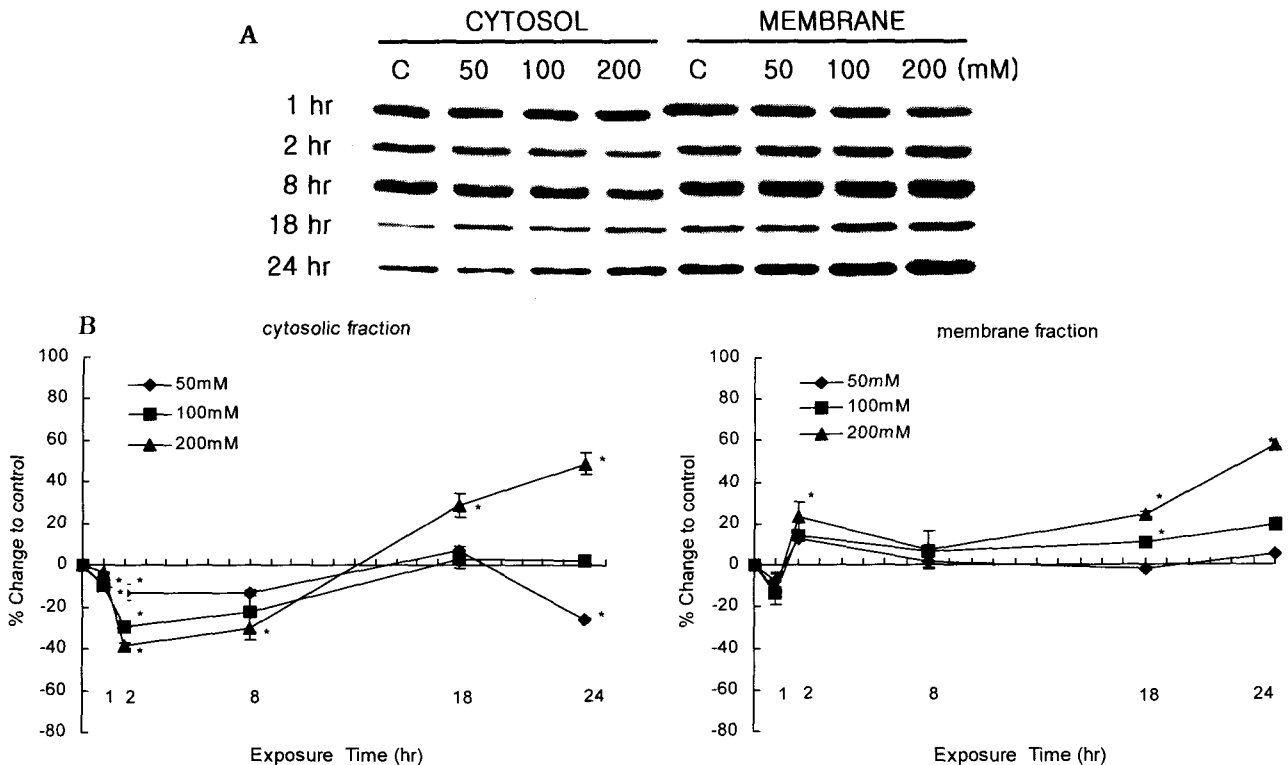


Fig. 2. Morphology of B103 cells exposed to ethanol. Phase-contrast microscop shows a representative of field of B103 cells after the exposure to 0 (A), 50 (B), 100 (C), and 200 (D) mM ethanol for 24 hr. ×100.



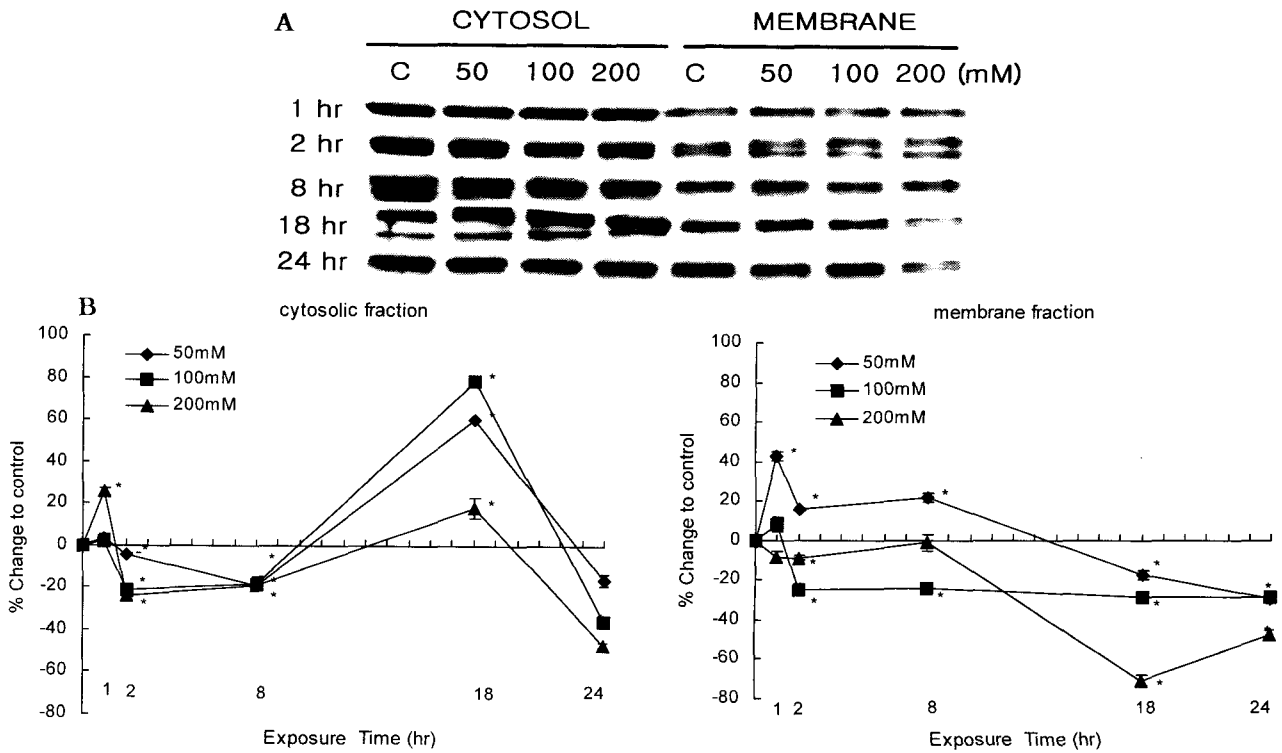
**Fig. 3. Western blot analysis of PKC- $\alpha$  in B103 cells by ethanol concentration and exposure time.**  
 A. Cell lysates were harvested from control and ethanol-exposed cell for the indicated time. Equal amount of proteins was loaded into the gel and processed for western blot analysis using antibodies against the PKC- $\alpha$ . The experiment was repeated three times.  
 B. Changes of relative intensity to control (%). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

18시간대에서는 활성이 현저히 증가하고, 24시간 경과 후에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 막 분획에서는 에탄올 농도에 따라 2, 8시간에서는 50 mM농도에서는 활성 증가, 100 mM에서는 활성 감소, 200 mM에서는 변화를 보이지 않는 등 서로 다른 양상을 나타냈으나 18시간과 24시간대에서는 모든 에탄올 농도에서 유의적인 감소현상을 보였다(Fig. 4). 본 결과에서 두개의 band가 나타난 것은 polyclonal antibody와의 cross reactivity 때문으로 생각되며 경험적으로 아래의 band를 선별적으로 사용하여 분석하였다. 결과는 일정 농도(50~100 mM)의 에탄올 농도에서는 일정시간(18시간) 경과 후 PKC- $\gamma$ 가 세포질에서 발현되어 시간 경과에 따라 그 활성이 감소함을 보여주고 있다. 18시간의 세포막 분획과 24시간의 세포질과 세포막 분획에서 모두 PKC- $\gamma$ 가 감소되는 현상을 보이는 것으로 보아 PKC- $\gamma$ 는 지속적 에탄올 노출에 의한 신호전달체계의 방어 또는 저해 기전과 관련되어 있음을 시사한다. PKC- $\gamma$ 는 뇌와 척수에만 특이적으로 존재하는 isozyme으로 시냅스에 일정 농도의 에탄올이 작용할 때 신경계의 신호전달체계에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 이러한 PKC- $\gamma$ 의 감소는 Alzheimer환자의 fibroblast에  $\beta$ -amyloid peptide( $\beta$ -AP)를 처리했을 때 나타나는 현상(23)과 유사한 것으로 지속적 에탄올 노출에 의한 영향이 치매증상의 유발과정과 관련이 있을 가능성을 시사하고 있다. 그밖에 PKC- $\gamma$ 가 결여된 쥐에서 에탄올에 의한 행동

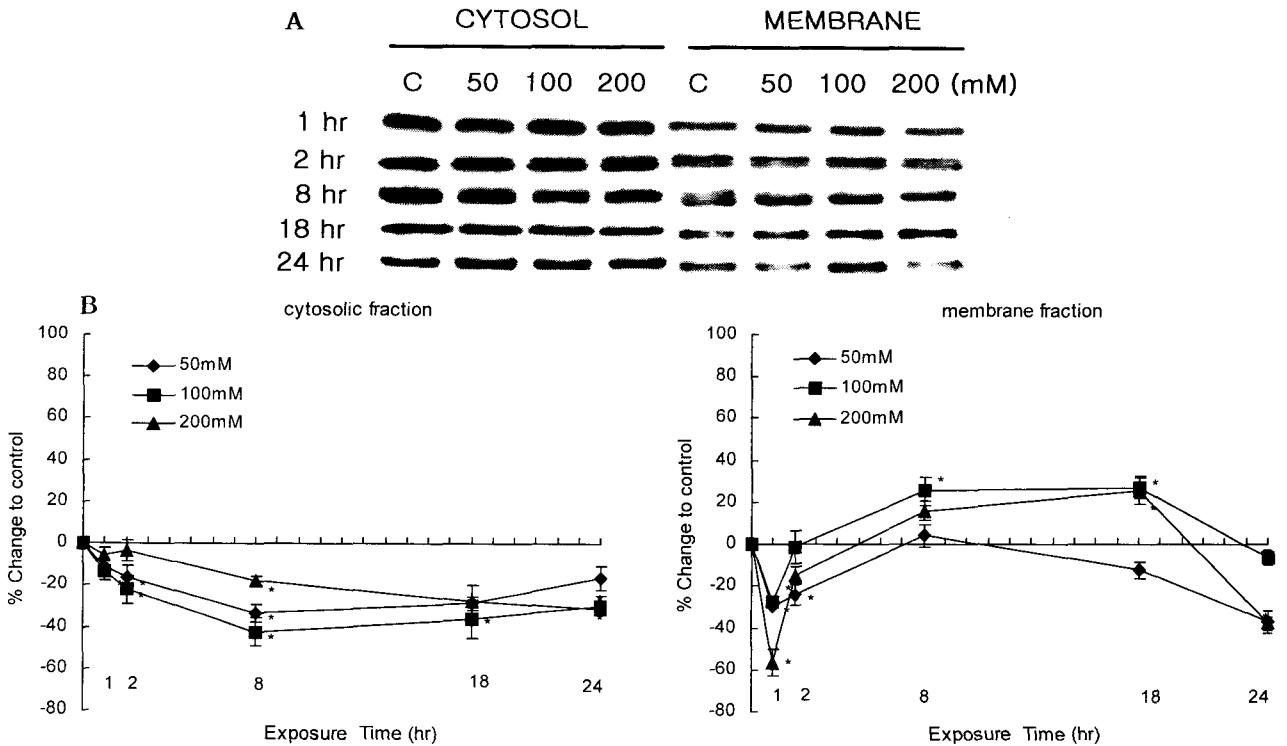
반응이 적게 나타났다는 보고(24)는 에탄올에 의한 행동 손상에서 PKC- $\gamma$ 가 관련될 수도 있음을 시사한다.

**PKC- $\epsilon$ 의 활성에 미치는 영향**

PKC- $\epsilon$ 활성은 세포질 분획에서는 전반적으로 모든 시간과 농도에서 감소되는 경향을 보였으며, 막 분획에서는 모든 에탄올 농도에 대하여 초기 1시간에서 PKC- $\epsilon$ 의 양적인 유의적인 감소를 나타낸 후 2시간부터 다시 원상태로 회복되어 8시간과 18시간대에 이르기까지 증가되어 있다가 24시간대에서는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). PKC- $\epsilon$ 는 특이적으로 신경말단에 존재하며(13), 신경전달물질의 방출에 관여하는 isozyme으로 알려져 있다. 이는 2시간 이상 지속적으로 에탄올을 처리한 NG108-15 세포(15)와 PC12 세포(16)에서의 활성증가와 반대되는 현상이나, 흰쥐의 간세포를 분리하여 에탄올을 60분 동안 처리한 실험(25)에서 나타난 PKC- $\epsilon$ 의 감소현상과는 일치하고 있다. 이는 조직세포의 종류 및 에탄올 처리시간에 따라 PKC- $\epsilon$ 의 활성경향이 다를 수 있음을 보여주고 있다. 또한 분화된 PC12 세포에서 에탄올에 의한 PKC- $\epsilon$ 의 증가를 초래하고, 이 증가는 신경 성장요소가 신경돌기(neurite)의 성장 증가를 유도시켰으나(26), 미분화된 B103 세포에서는 지속적인 에탄올 노출에 의해 PKC- $\epsilon$ 이 감소되는 방향으로 진행될 수 있는 가능성을 보여준다. 이 PKC- $\epsilon$ 의 감소는 또한 신경전달물질 방출의 감소로 이어질



**Fig. 4. Western blot analysis of PKC- $\gamma$  in B103 cells by ethanol concentration and exposure time.**  
 A. Cell lysates were harvested from control and ethanol-exposed cell for the indicated time. Equal amount of proteins was loaded into the gel and processed for western blot analysis using antibodies against the PKC- $\gamma$ . The experiment was repeated three times.  
 B. Changes of relative intensity to control (%). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 5. Western blot analysis of PKC- $\epsilon$  in B103 cells by ethanol concentration and exposure time.**  
 A. Cell lysates were harvested from control and ethanol-exposed cell for the indicated time. Equal amount of proteins was loaded into the gel and processed for western blot analysis using antibodies against the PKC- $\epsilon$ . The experiment was repeated three times.  
 B. Changes of relative intensity to control (%). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

수 있음을 시사하고 있다.

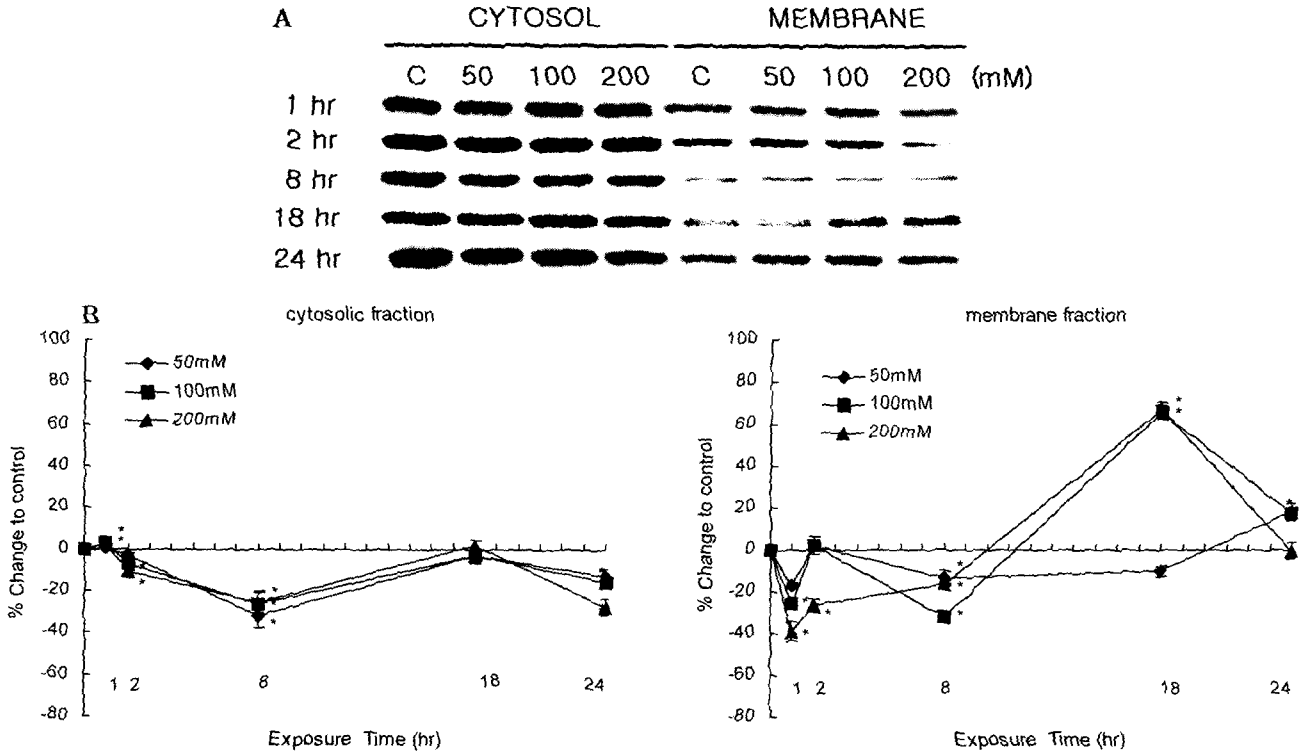
**PKC-ζ의 활성화에 미치는 영향**

세포질 분획에서 PKC-ζ의 활성화는 8시간에서 모든 에탄올 농도에서 감소하는 현상을 보였으나, 18시간에는 다시 원상태로 회복되었다가 24시간에서는 다시 유의적으로 감소되는 현상을 보였다. 막 분획에서는 세포질 분획과 마찬가지로 1시간과 8시간대에서 모든 에탄올 농도에 대하여 PKC-ζ isozyme의 활성화가 감소하였다가 18시간에서는 100 mM, 200 mM의 농도범위에서 대조군의 165% 이상 현저히 증가하는 현상을 보였으나 24시간에서는 그 증가의 폭이 다시 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6). 이러한 결과는 PKC-ζ isozyme이 일정농도범위(100~200 mM)의 에탄올에 의해 일정시간대(18시간)에 막 근처에서 유도됨을 보여준 것으로 PKC-γ와는 isozyme이 유도된 장소가 서로 다름을 보여주고 있다.

**PKC α isoform의 mRNA 활성화**

B103 세포주에서 에탄올의 각 농도별(50, 100 그리고 200 mM) 처리시간(1, 2, 8, 18 그리고 24시간)에 따른 PKC-α, γ, ε과 ζ isozyme의 활성을 분석한 결과 PKC α는 모든 분획에서 처리시간 경과에 따라 isozyme의 활성화가 농도의존적으로 유의하게 증가하였으며 특히 24시간대에는 200

mM의 에탄올농도에서 PKC-α isozyme의 증가 현상이 가장 현저히 나타났다. 이 PKC-α의 mRNA의 발현을 확인하기 위해 PKC-α의 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과를 분석하였다. 그 결과 1, 2, 8시간에서는 PKC-α isozyme의 활성분석 결과와 같이 유의적인 PKC-α mRNA의 변화가 없었고, 18시간에서는 control에 비해 에탄올 농도가 증가함에 따라 PKC-α mRNA가 증가하는 경향을 보였다. 그러나 24시간대의 50 mM과 200 mM 에탄올 농도에서는 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 7). 이때 내부에 일정량씩 존재하는 house keeping gene인 β-actin을 marker로 사용하여 template의 양이 같음을 확인하였으며, PKC-α의 internal primer를 이용하여 nested PCR을 실시하여 사용한 PKC-α mRNA 단편을 확인하였다. 그 결과, 에탄올 처리 24시간 후 PKC-α의 mRNA가 50 mM에서는 감소, 100 mM에서는 증가로 PKC-α isozyme 활성화 분석 결과와 일치한 반면 200 mM에서는 예상과는 달리 100 mM농도에서보다는 감소되는 현상이 관찰되었다(Fig. 7). 이 현상은 에탄올 농도 200 mM에서는 PKC-α의 post-transcription 단계에도 에탄올이 작용하여 PKC-α의 활성화가 계속 증가될 수 있음을 시사한다(8). 또한 200 mM(0.92%) 이상 고농도의 에탄올의 노출이 PKC-α mRNA 유도 수준을 down-regulation시키고 PKC-γ의 이동에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 6. Western blot analysis of PKC-ζ in B103 cells by ethanol concentration and exposure time.**  
 A. Cell lysates were harvested from control and ethanol-exposed cell for the indicated time. Equal amount of proteins was loaded into the gel and processed for western blot analysis using antibodies against the PKC-ζ. The experiment was repeated three times.  
 B. Changes in relative intensity to control (%). \*p<0.05, \*\*p<0.01.

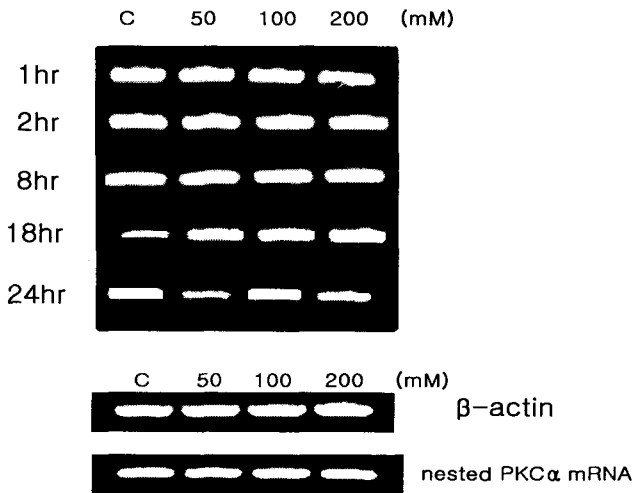


Fig. 7. The level of PKC- $\alpha$  mRNA in ethanol exposed B103 cells.

The total RNA was extracted from B103 cells at the indicated times following ethanol exposure. The PKC- $\alpha$  mRNA was analyzed by Revers transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. The experiment was repeated times with similar results.

이상의 결과들은 각 PKC isozyme들의 종류에 따라 세포 내 역할이 서로 다름을 시사하며 또한 에탄올 농도에 따라 PKC isozyme들의 변화가 각각 다르게 조절됨을 제시해 주고 있다. 대체로 본 실험에 사용된 모든 에탄올 농도에서 PKC- $\alpha$ 와  $\gamma$ 의 세포질분획, PKC- $\epsilon$ 와  $\zeta$ 의 세포질과 막 분획 등에서 각각의 isozyme들이 초기 1, 2시간대에서의 유의적인 저하를 나타냈는데 이러한 결과가 8시간대 이후의 변화와 서로 어떤 연관성을 갖는지는 아직 해석이 불가능하다. 이러한 초기 1, 2시간대의 변화는 세포주가 에탄올에 적응하는 과정에서 나타나는 일반적인 결과일 수도 있다. 현재로서는 8시간 이상의 지속적 에탄올 노출에 대한 PKC isozyme들의 현저한 양적인 변화의 해석에 전반적인 가중치를 두는 것이 더 타당하다고 본다. 본 연구 결과는 세포독성이 나타나지 않는 범위의 에탄올 농도(100~200 mM)에 의해 신경계의 신호전달체계 및 신경전달물질 방출의 변화, 더 나아가서는 행동손상이 영향 받을 수 있음을 시사한다. 추후, 뇌의 보호 작용 효과를 갖는 양성대조 약물들(positive drugs)을 이용하여 가장 현저한 결과를 나타내었던 시간 및 에탄올 농도에서의 PKC isozyme들의 변화, 그리고 세포 독성을 나타내는 400 mM에서 1000 mM에 이르는 알코올 농도에서의 뇌세포의 손상 회복력을 측정하는 연구 등이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

에탄올이 지속적으로 뇌 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 흰쥐의 신경세포로부터 유래 된 B103 neuroblastoma cell을 사용하여 세포독성이 나타나지 않는 에탄올 농도(0, 50, 100, 200 mM)에서의 1, 2, 8, 18, 24시간 경과에

따라 유도되는 PKC  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  isozyme들의 양을 세포질 분획과 세포막 분획으로 나누어 Western blot으로 각각 분석하였다. 100 mM의 에탄올 농도에서 분석된 PKC isozyme들 중 PKC- $\gamma$ 는 18시간대의 세포질에서, 그리고 PKC- $\epsilon$ 은 8~18시간대의 세포막분획에서 각각 현저한 유도현상을 보였다. PKC- $\alpha$ 는 200 mM의 에탄올 첨가 후 18시간과 24시간에 세포질과 세포막 분획에서 모두 대조군의 150%까지 현저한 증가를 나타낸 반면 PKC- $\zeta$ 는 100, 200 mM 에탄올 농도에서 배양(18, 24시간 동안)한 세포의 세포막분획에서만 유도되었다. 그리고 50, 100, 200 mM의 에탄올 농도에서 24시간동안 배양한 세포질 분획에서 PKC- $\gamma$ 는 농도 의존적으로 감소하여 200 mM의 에탄올 농도에서는 대조군의 47%까지 현저한 감소를 나타내었으며, 세포내에 세포독성을 나타내지 않는 농도 특히 100~200 mM 농도범위의 에탄올을 첨가하여 24시간 동안 지속적으로 배양할 때 PKC- $\gamma$  및  $\epsilon$ 이 관련된 신호전달체계가 억제됨을 보였다. 이는 에탄올이 PKC isozyme들의 상호간 조절을 통해 신호전달계 또는 신경전달 물질들의 변화에 영향을 줄 수 있음을 시사하며 에탄올의 중추신경계에 미치는 지속적 영향으로 나타나는 행동장애 및 뇌기능의 손상 또는 보호과정에 PKC-isozyme들이 관여할 수 있음을 시사한다.

문 헌

1. Emsley R, Smith R, Roberts M, Kapnias S, Pieters H, Maritz S. 1996. Magnetic resonance imaging in alcohol Korsakoff's syndrome: evidence for an association with alcoholic dementia. *Alcohol Alcohol* 31: 479-486.
2. Rintala J. 1997. Effects of lifelong ethanol consumption on cerebellar layer volumes in AA and ANA rats. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 311-317.
3. Martin PR. 1994. Thiamine utilization in the pathogenesis of alcohol-induced brain damage. *Alcohol Alcohol Suppl* 2: 273-279.
4. Frentzel-Beyme R, Grossarth-Maticek R. 2001. The interaction between risk factors and self-regulation in the development of chronic disease. *Int J Hyg Environ Health* 204: 81-88.
5. Samson HH, Harris RA. 1992. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13: 206-211.
6. Tarelo-Acuna L, Olyera-Cortesand E, Gonzalez-Burgos I. 2000. Prenatal and postnatal exposure to ethanol induces changes in the shape of the dendritic spines from hippocampal CA1 pyramidal neurons of the rat. *Neuroscience Letters* 286: 13-16.
7. Ledig M, Holownia A, Copin JC, Tholey G, Anokhina I. 1996. Development of glial cells cultured from prenatally alcohol treated rat brain: effect of supplementation of the maternal alcohol diet with a grape extract. *Neurochem Res* 21: 313-317.
8. Costa LG. 1998. Signal transduction in environmental neurotoxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 21-43.
9. Fadda F, Rossetti ZL. 1998. Chronic ethanol consumption from euroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56: 385-431.
10. Snell LD, Iorio KR, Tabakoff B, Hoffman PL. 1994. Protein



- kinase C activation attenuates N-methyl-D-aspartate-induced increases in intracellular calcium in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 62: 1783-1789.
11. Dildy-Mayfield JE, Harris RA. 1995. Ethanol inhibits kainate responses of glutamate receptors expressed in *Xenopus* oocytes; role of calcium and protein kinase C. *J Neurosci* 15: 3162-3171.
  12. Nishizuka Y. 1992. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
  13. Chikako T, Nishizuka Y. 1994. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci* 17: 55-67.
  14. Jun-Ping L. 1996. Protein kinase C and its substrates. *Molecular and Cellular Endocrinology* 116: 1-29.
  15. Coe IR, Yao L, Diamond I, Gordon AS. 1996. The role of the protein kinase C in cellular tolerance to ethanol. *J Biol Chem* 271: 29468-29472.
  16. Messing RO, Petersen PJ, Henrich CJ. 1991. Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C- $\delta$  and  $\epsilon$  protein kinase C-mediated phosphorylation in cultures neural cells. *J Biol Chem* 266: 23428-23432.
  17. Deitrich RA, Bludeau P, Elk ME, Baker R, Menez JF, Gill K. 1996. Effect of administered ethanol on protein kinase C in human platelets. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 1503-1506.
  18. Depettrillo PB, Liou CS. 1993. Ethanol exposure increases total protein kinase C activity in human lymphocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 351-354.
  19. Kharbanda S, Nakamura T, Kufe D. 1993. Induction of the c-jun protooncogene by a protein kinase C-dependent mechanism during exposure of human epidermal keratinocytes to ethanol. *Biochem Pharmacol* 45: 675-681.
  20. Skwish S, Shain W. 1990. Ethanol and diolein stimulate PKC translocation in astroglial cells. *Life Sci* 47: 1037-1042.
  21. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65: 55-63.
  22. Bradford MM. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
  23. Antonella F, Gimaldi M, Nelson TJ, Alkon DL. 1998. Alzheimer's-specific effects of soluble  $\beta$ -amyloid on protein kinase C- $\alpha$  and degradation in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5562-5567.
  24. Harris RA, McQuilkin SJ, Paylor R, Abeliovich A, Tonegawa S, Wehner JM. 1995. Mutant mice lacking the  $\gamma$  isoform of protein kinase C show decreased behavioral action of ethanol and altered function of  $\gamma$ -aminobutyrate type A receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3658-3662.
  25. Domenicotti C, Paola D, Vitali A, Nitti M, Cottalasso D, Pronzato MA, Poli G, Melloni E, Marinari UM. 1998. Ethanol-induced effects on expression level, activity, and distribution of protein kinase C isoforms in rat liver Golgi apparatus. *Chem Biol Interact* 114: 33-43.
  26. Roivainen R, McMahon T, Messing RO. 1993. Protein kinase C isozymes that mediate enhancement of neurite outgrowth by ethanol and phorbol esters in PC12 cells. *Brain Res* 624: 85-93.

(2003년 9월 5일 접수; 2004년 1월 30일 채택)