

## DMH에 의한 비정상적인 혈관 내피세포의 증식에서 Protein Kinase C 동종효소 Alpha 단백질발현의 특성

남수봉 · 배용찬 · 박숙영 · 최수중

부산대학교 의학전문대학원 성형외과학교실

### Characterization of the Expression of PKC $\alpha$ (Isoform) in DMH-induced Vascular Endothelial Proliferation

Su Bong Nam, M.D., Yong Chan Bae, M.D.,  
Suk Young Park, M.S., Soo Jong Choi, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, School of  
Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

**Purpose:** DMH(1,2-dimethylhydrazine) has been known to induce vascular neoplasm such as malignant endothelioma in animal experiment, through induction of abnormal proliferation of HUVECs. In our previous studies, 11 types of PKC isoenzymes were determined by RT-PCR and the expression of PKC $\alpha$ , and  $\mu$  was more prominent than other PKC isoenzymes in the DMH-treated group. However, this result was not based on objective assessment. In this study, we further evaluated the role of PKC $\alpha$  on the DMH-induced abnormal proliferation of HUVECs by two different methods to identify its presence with high relevance in objective view. PKC $\mu$  will be investigated in further study.

**Methods:** The study was conducted with the cultured HUVECs group(control) and the  $0.75 \times 10^{-9}$  M DMH-treated group. After processing protein extraction in 0 and 24 hour, extracted protein was treated of quantitative test through BCA protein assay. In the western blot analysis, electrophoresis was performed in the order of gel preparation, sample preparation, and gel running. Electrotransfer to nitrocellulose membrane and reaction with antibody were done. Detection of PKC $\alpha$  was achieved through "Gel Image Analysis System". In the fluorescence immunocytochemical analysis, the grading of radiance of the intracellular PKC $\alpha$  particles was detected with confocal microscope after treating with primary and fluorescent secondary antibody in 0 and 24

hours.

**Results:** The Western blot analysis showed increased PKC $\alpha$  expression from the specimen obtained in 24 hour of the DMH treatment group when compared to those in control group. Under confocal fluorescence microscope, the emitting radiance in the DMH treated group was brighter at 24 hours as well.

**Conclusion:** We believe that PKC $\alpha$  plays a role in DMH-induced abnormal proliferation of the vascular endothelium, which may provide insights in understanding the vascular neoplasm.

**Key Words:** HUVEC, Protein Kinase C, Isoform

### I. 서 론

새로운 혈관 형성의 과정에 대한 이해를 위해서는, 혈관 형성 및 신생에서 가장 먼저 발생하는 단계가 혈관 내피세포이므로, 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 기전에 대한 기초적인 연구가 필요하다.<sup>1</sup> 동물 실험에서 혈관 종양을 유발한다고 알려진 DMH(1,2-dimethylhydrazine)를 사용하여 인체 제대정맥 내피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)의 비정상적인 증식을 유도한 실험에서 차등적으로 발현되는 인자들이 밝혀져 있고, 이러한 비정상적인 증식 과정에서 Protein kinase C(PKC)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>2-5</sup> 그런데 PKC에는 11가지의 동종효소(isoforms)들이 존재하는 것으로 알려져 있으므로, DMH에 의한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 과정에서 11가지 동종효소의 발현 정도를 알아보기 위해 RT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)을 시행하였다. 그 결과 6가지 동종효소의 발현이 확인되었는데, 특히 이 6가지 동종효소 중 PKC $\alpha$ 와 PKC $\mu$ 가 가장 발현이 증가되어 이 두 가지 동종효소가 가장 관련이 높을 것으로 추측되었다.<sup>6</sup> 그러나 PKC $\alpha$ ,  $\mu$ 의 발현이 높게 나타난 RT-PCR의 결과는 객관성이 부족하므로, 이에 대해서 객관적인 검정을 통해 연관성이 높음을 확인할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 발현 증가가 뚜렷한 두 가지 동종효소 중에서 먼저 PKC $\alpha$ 에 대

Received April 26, 2007

Revised August 22, 2007

**Address Correspondence:** Yong Chan Bae, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, School of Medicine, Pusan National University, 1-10 Ami-dong, Seo-gu, Busan 602-739, Korea. Tel: (051) 240-7269 / Fax: (051) 243-9405 / E-mail: baeyc2@hanmail.net

\* 본 논문은 2006년 제 61차 대한성형외과학회 학술대회에서 구연 발표되었음.

해 단백질 발현 정도를 western blot analysis와 형광면역화학분석(fluorescence immunocytochemical analysis)을 통해 확인함으로써, DMH에 의한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 과정에서 중요한 역할을 하는 PKC 동종 효소인지를 검정하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 세포주 배양 및 약물처리

본 실험에서 혈관 내피세포의 세포주는 'Modern Tissue Technologies, Inc.(MCTT, Seoul Korea)'로부터 분양받은 HUVECs를 이용하였다. HUVECs은 계대배양을 10회 이상 할 경우 세포의 변형이 일어날 수 있으므로 본 실험에서는 8회를 넘기지 않았다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건의 가슴된 배양기에서 배양하였다.

HUVECs를 Western blot analysis를 위해서는 100 mm 배양그릇에 3 × 10<sup>5</sup>개씩 분주하였고, Fluorescence immunocytochemical analysis를 위해서는 pre-coated cover slip이 포함된 6 well plate에 10<sup>5</sup>개씩 분주하였다. 분주한 후 EBM 완전배지[Endothelial cell basal medium, 0.1% hEGF(human epidermal growth factor), 0.1% hydrocortisone, 0.1% GA-1000, 0.4% BBE(bovine brain extract), 2% FBS(fetal bovine serum)]에서 1일 배양하고, 2일째는 무혈청 배지로 교체하여 1일간 배양하였다. 이 후 아무런 처리를 추가하지 않고 배양된 HUVECs 군을 대조군으로 삼았으며, 3일째에 DMH를 0.75 × 10<sup>-9</sup> M 농도로 처리하여 HUVECs의 과증식을 유도한 군을 DMH 처리군으로 삼아 서로 비교하였다.

### 나. 단백질 추출

DMH를 처리한 시간을 기준으로 대조군과 DMH 처리군에서 0시, 처리 후 24시간에서 단백질을 추출하였다. 세포 내 전체 단백질을 추출하기 위하여 다음과 같은 과정을 실시하였고 모든 과정은 4°C 이하에서 시행하였다.

배양세포를 HBSS(Hank's Balance Salt Solution)로 세척하고, 세포 찧과기(cell scraper)를 이용하여 세포를 모아 1.5 ml tube에 담은 후, 4°C에서 13,000 rpm으로 15초 동안 원심 분리하였다. 상등액을 제거하고 단백질 추출 용액인 PRO-PREPTM(iNtRON)을 첨가하여 잘 섞은 후, 얼음에 20분간 반응시켰다. 그런 다음 다시 4°C에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상등액을 단백질 정량과 PKCa의 분석에 이용하였다. 분리한 단백질은 -70°C에서 보관하였다.

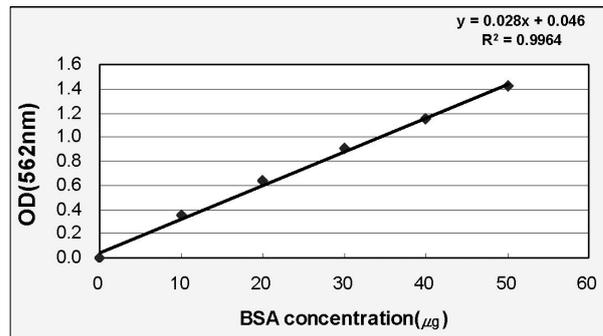


Fig. 1. Standard curve of reagent for quantitative analysis. BSA: Bovine Serum Albumin

### 다. 단백질 정량

분리한 단백질은 "BCA(Bicinchoninic acid) Protein Assay" 방법을 이용하여 정량하였다.<sup>17</sup> BCA Protein Assay Reagent A, B(A;#23228, B;#1859078, PIERCE, NY, USA)를 1 : 1 비율 만든 혼합액을 단백질 시료와 잘 섞어 37°C에서 30분간 반응시킨 후, Spectrophotometer (Pharmacia biotech, England)를 이용하여 흡광도 562 nm에서 단백질 양에 따른 흡광도를 통해 정량을 확인하였다. 이 때 BSA(Bovine Serum Albumin)를 이용하여 정량 분석에 사용된 시약에 대한 Standard 곡선은 99%의 정확도를 보였다(Fig. 1).

### 라. Western blot analysis

#### 1) Gel preparation

사용할 두 유리판을 조립하여 고정시킨 후, 7.5% Separating gel(30% acrylamide, 증류수, 1.5 M Tris-HCl(pH8.8), 10% SDS, TEMED, 10% APS)을 만들어 유리판 사이에 채웠다. Gel의 단면을 고르기 위해 70% 에탄올을 가하고, gel이 완전히 굳은 뒤 에탄올을 제거하였다. 4% Stacking gel(30% acrylamide, 증류수, 0.5 M Tris-HCl(pH6.8), 10% SDS, TEMED, 10% APS)을 Separating gel 위에 붓고, comb을 유리판 사이에 삽입한 후 다시 gel을 굳혔다.

#### 2) Sample preparation

대조군과 DMH 처리군으로부터 추출한 단백질에서 각각 20 µg씩 덜고 4 × Sample buffer로 32 µl가 되게끔 첨가한 후, 미리 95°C로 가열해 둔 heating block에 넣어 5분간 반응시켰다.

#### 3) Gel running

Gel이 굳어있는 유리판에서 comb을 제거하고 전기 영동 chamber에 고정시킨 후 Transfer Buffer Solution

(TBS)으로 채웠다. 각 gel의 well에 protein size marker와 준비해둔 sample을 넣고, 비어있는 well에는 전압을 고르게 하기 위해 1× sample buffer를 넣었다. 80 V로 30분경과 뒤, 120 V에서 90분 동안 두었다.

#### 4) Electrotransfer

전기영동을 마친 gel을 유리판에서 분리하여 TBS에 10분간 두었다. Semi-dry Transfer (BIO-RAD, USA) 기기판 위에 차가운 TBS에 둔 filter paper 3장을 깔고, 그 위에 Nitrocellulose(NC) membrane을 얹고, 다시 그 위에 전기영동을 마친 gel을, 그 위에 마지막으로 차가운 TBS에 둔 filter paper 3장을 얹어 마무리하였다. 기기의 뚜껑을 고정시킨 후, 25 V에서 30분간 두었다.

#### 5) Immunochemical analysis

Electrotransfer를 마친 NC membrane에 5% Skim Milk Solution을 가하여 1시간동안 반응시킨 후, Tween 20이 포함된 TBS(TBS-T)로 세척하였다. PKC $\alpha$ 에 대한 primary antibody(1:250, Abcam<sup>®</sup>, England)를 NC membrane과 1시간 반응 후 TBS-T로 세척하였고, 다시 secondary antibody(1:1000, Abcam<sup>®</sup>, England)를 1시간 동안 반응시킨 후 TBS-T로 세척하였다.

#### 6) Detection

OHP film 위에 NC membrane을 두고 그 위에 ECL(Enhanced Chemiluminescence) solution을 첨가한 뒤 다른 OHP film으로 덮고 새어나오는 용액을 말끔히 제거하였다. 암실에서 X-ray Cassette 내에 NC membrane이 포함된 film을 놓고 그 위에 X-ray film을 고정하여 20분간 감광시킨 후 FUJI X-ray film processor(FPM 3500<sup>®</sup>, Japan)를 이용하여 현상하였다. X-ray film에 현상된 band의 밝기와 굵기 정도를 육안으로 확인하고, "Gel Image Analysis System"을 사용하여 각 band에 대한 volume을 측정하였다.

#### 7) 통계 처리

위의 과정을 각각 3회 반복하였다. 처리 후 24시간에서 대조군과 DMH 처리군의 band's volume의 차이는 Kruskal Wallis test를 통해 검정하였다( $p < 0.05$ ).

#### 마. Fluorescence immunocytochemical analysis

Pre-coated cover slip이 포함된 6 well plate에서 배양액을 제거하고 차가운 100% 에탄올을 첨가하여 얼음에서 10분간 고정하였다. PBS(Phosphate Buffered Saline, Cambres, USA)로 세척하고 PKC $\alpha$ 에 대한 primary

antibody(1:250, Abcam<sup>®</sup>, England)를 4°C에서 12시간 이상 반응시켰다. PBS로 세척한 후, 암실에서 다음 과정을 진행하였다. Fluorescent secondary antibody(FITC Goat ant- Rabbit IgG conjugate, 1:300, Zymed, USA)를 30분간 반응시키고 PBS로 세척한 후, plate 바닥에 붙어있는 cover slip을 떼어내어 물기를 제거한 상태에서 mount 용액인 GVA-Mount(Zymed, USA)를 떨어뜨리고 slide glass에 부착시켰다. Mount 용액을 건조시킨 후, confocal 형광현미경(Leica, ICS SP 2, Germany)을 이용하여 세포내 PKC $\alpha$ 의 분포를 관찰하였다.

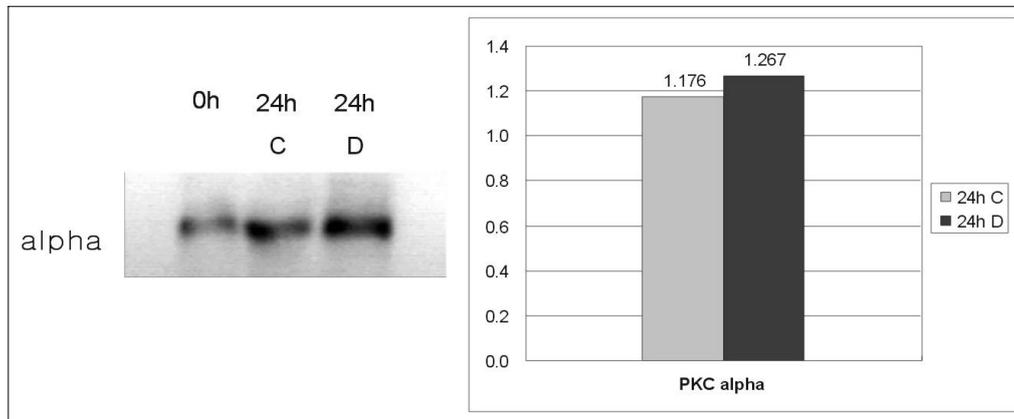
### III. 결 과

Western blot analysis을 통한 PKC $\alpha$  단백질 발현의 결과로 DMH 처리 후 24시간에서 대조군과 DMH 처리군 간에 발현의 차이를 비교해 볼 때, 대조군에 비해 DMH 처리군에서 발현이 더 증가됨을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ) (Fig. 2). 그리고 Fluorescence immunocytochemical analysis에 의한 PKC $\alpha$  단백질 입자의 발광정도에 대한 결과로는 DMH 처리 후 24시간에서 대조군에 비해 DMH 처리군에서 발광정도가 더 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 3).

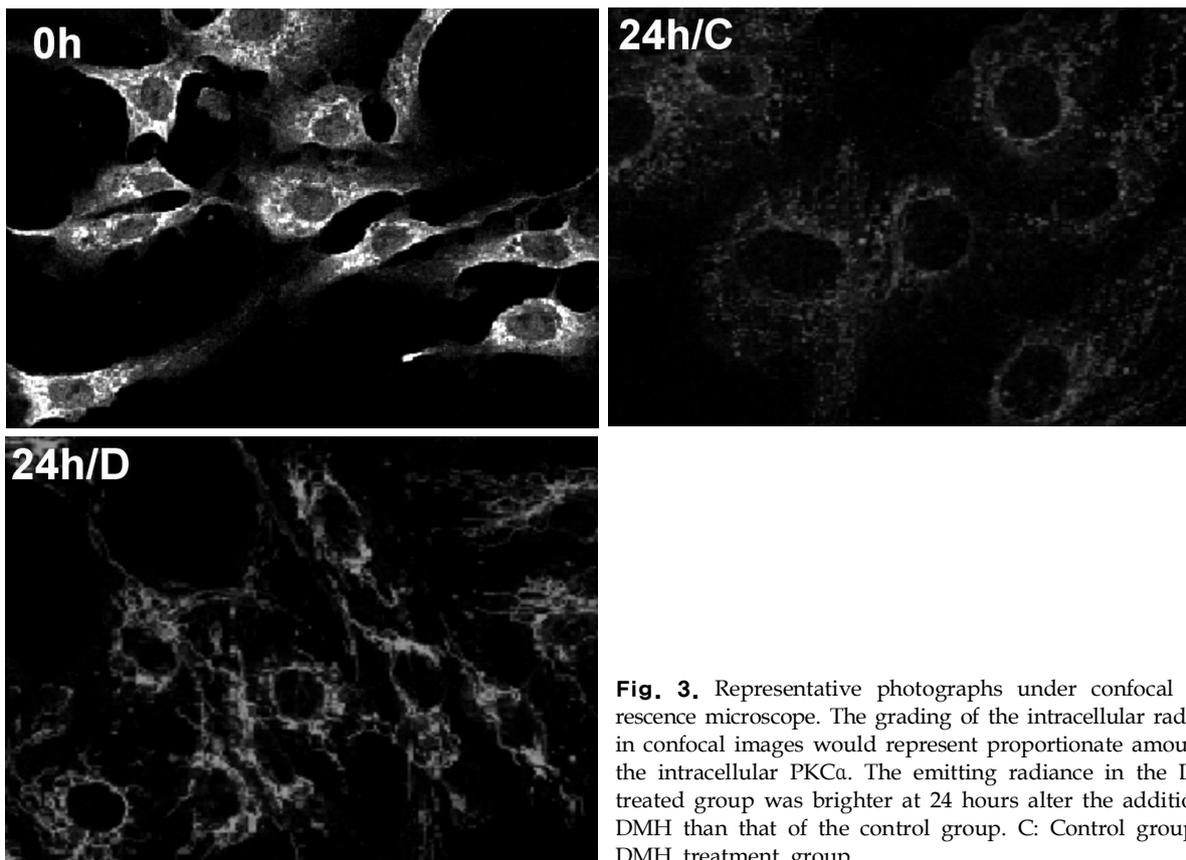
### IV. 고 찰

PKC(protein kinase C)의 구조는 한 가닥의 폴리펩티드(polypeptide)로 N-terminal regulatory region과 C-terminal catalytic region으로 구성되어 있다.<sup>7</sup> PKC는 세포 성장 주기에서 G1-phase에 관여하며, 효소학적으로 혈관 생성 등의 과정 중 신호전달경로에서 특정단백질의 serine기와 threonine기를 인산화시키는 역할을 하며 세포 간 신호전달체계에 중요한 조절자로 알려져 있다.<sup>7,9</sup> 그리고 PKC는 세포 성장 이외에도 세포 분화(differentiation), 이주(migration), 세포자멸사(apoptosis)의 조절에 관여하며 종양의 진행에도 관여하고 있다.<sup>7,8</sup> 예를 들어 여러 종류의 세포에서 종양을 유발한다는 phorbol 12- myristate 13-acetate(PMA)를 이용하여 여러 세포 종류에서 PKC가 VEGF(vascular endothelial growth factor)의 발현을 촉진시킨다는 연구들이 있었으며, 세포 성장주기에 따른 PKC의 역할은 PKC 동종 효소에 영향을 주는 여러 가지 촉진제나 억제제를 사용한 연구들에 의해 소개되어져 왔다.<sup>7,10</sup>

PKC는 포유류 세포에서 11가지 동종효소가 있는 것으로 알려져 있으며 이들은 구조적, 기능적인 측면에서 classic PKCs or cPKCs( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ), novel PKCs or



**Fig. 2.** Western blot analysis of PKC $\alpha$ . Representative photographs of PKC $\alpha$  in western blot band(left). The HUVECs were treated with  $7.5 \times 10^{-9}$  M DMH and the cells were collected at 24 hour. The right panel represents the band's volume in HUVECs of PKC $\alpha$ . The gray bar is band's volume of PKC $\alpha$  in control group and dark bar is that of PKC $\alpha$  in DMH group. The Western blot analysis shows increased values of PKC $\alpha$  expression from the specimen obtained at 24 hour in the DMH treated group compared with those in the control group ( $p < 0.05$ ). C: Control group, D: DMH treatment group.



**Fig. 3.** Representative photographs under confocal fluorescence microscope. The grading of the intracellular radiance in confocal images would represent proportionate amount of the intracellular PKC $\alpha$ . The emitting radiance in the DMH treated group was brighter at 24 hours after the addition of DMH than that of the control group. C: Control group, D: DMH treatment group.

nPKCs( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$ ), atypical PKCs or aPKCs( $\zeta$ ,  $\iota$ )의 세 가지 종류로 분류된다.<sup>7</sup> PKC 동종효소들 각각의 분포나 역할에 대해 알려진 것으로 PKC $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ 는 뇌, 폐, 비장 등 대부분의 조직에 분포하고, PKC $\alpha$ ,

$\epsilon$ 는 NIH3T3 세포에서 세포 증식을 촉진하며, 각막내피 세포의 증식에서도 PKC $\alpha$ 와  $\epsilon$ 가 중요하게 관여한다는 보고 등이 있다.<sup>11</sup> 그리고 동종효소들의 부위별 존재 유무에 대해 비교적 명확히 밝혀진 것으로는 간(liver) 조

직의 경우 PKC $\beta$  I,  $\beta$  II가 주로 분포하고 있으나 PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$ 는 존재하지 않으며, 신장 조직에서는 PKC $\beta$  I,  $\beta$  II를 찾을 수 없으나 PKC $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ 는 존재한다고 알려져 있다.<sup>12,13</sup> 이와 같이 각각의 동종효소에 대한 기능이 장기가 다 다를 것으로 예상되므로, 각각의 동종효소에 대한 분포나 기능을 예측해 보는 것은 여러 가지 질환 등에 대한 기초 연구 자료로서 중요한 의미를 부여할 수 있겠다.

DMH에 의해 과증식된 HUVECs에서 PKC 동종효소들의 발현정도를 RT-PCR을 통해 알아 본 이전 연구의 결과에서 대조군과 DMH 처리군 각각에서 11가지의 PKC 동종효소들 중 PKC $\alpha$ ,  $\beta$  I,  $\beta$  II,  $\nu$ ,  $\iota$ ,  $\mu$ 인 6가지의 발현이 확인되었으며, 이 6가지 동종 효소 중에서도 PKC $\alpha$ ,  $\mu$ 는 DMH 처리군에서 대조군에 비해 발현정도가 의미 있게 증가되는 것이 확인됨으로서 이 두 동종 효소들은 DMH에 의한 HUVECs의 과증식에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 추측 할 수 있다고 하였다.<sup>6</sup> 그러나 PKC $\alpha$ ,  $\mu$ 의 발현이 높게 나타난 RT-PCR의 결과와 연관성에 대해서는 객관성이 부족하므로 반드시 이에 대해서는 객관적인 검정을 통해 이 두 종류의 동종효소가 연관성이 높음을 확인할 필요가 있다. 즉 PKC 동종효소에 대한 세포내 분포나 발현 형태를 명확히 확인하기 위해서는 Western blot technique과 면역세포화학적 검정(immunocytochemical finding)이 필요하다.<sup>13</sup> 다른 논문에서도 PKC 동종효소 각각에 대한 특수 탐색자(specific probe)를 이용한 Northern blot technique과 Western blot technique를 통해 각각의 동종효소에 대한 세포나 조직 등에서 표현 형태, 분포, 위치 등을 알 수 있으며, 이로 말미암아 복잡한 PKC 동종효소 복합체 형태(complex PKC isoenzyme network)를 완전히 파악하고 이해할 수 있다고 하였다.<sup>12</sup> 결국 PKC 동종효소에 대한 이러한 실험들을 통해서 앞으로 세포의 증식이나 분화에 있어 유전자의 발현을 신호전달과정에서 조절할 수 있을 것으로 전망되어 질 수 있다.

본 교실에서도 의미 있게 발현이 증가된 PKC $\alpha$ ,  $\mu$  각각에 대한 객관적인 검정이 필요하다고 사료되어 우선 PKC $\alpha$ 에 대한 검정을 하고 추후 PKC $\mu$ 에 대해서 검토하기로 하였다. 따라서 PKC $\alpha$ 에 대해서 Western blot analysis와 Fluorescence immunocytochemical analysis를 시행하였고, 그 결과 DMH에 의한 HUVECs의 비정상적인 증식 과정에서 PKC $\alpha$  동종효소의 발현 증가가 확인되었다. 그러므로 PKC $\alpha$ 가 비정상적인 혈관 내피세포의 증식과정에서 관련성이 높음을 객관적으로 확인할 수 있었다. 이러한 PKC $\alpha$ 에 대한 다른 연구들을 살펴보

면, PKC $\alpha$ 는 PMA(phorbol 12-myristate 13-acetate)의 사용으로 인해 세포막에 전위(translocation)를 변화시켜 하향조절(down regulation)되는 것으로 알려져 있고,<sup>8,12</sup> 평활근세포(smooth muscle cell)에서는 세포의 증식을 촉진하며, 유방 종양세포에서는 세포 증식을 감소시킨다고 하고,<sup>14</sup> PKC $\alpha$ 에 돌연변이를 일으키니까 핵막에 일차적으로 변화가 관찰되었다고 한다.<sup>11</sup>

본 연구의 결과와 함께 추후 PKC $\mu$ 에 관해서도 객관적인 검정을 시행함으로써, DMH에 의한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 과정에서 PKC $\alpha$ ,  $\mu$  각각의 연관성을 비교 검토해 볼 수 있을 것이며, 이러한 결과들을 바탕으로 siRNA(short interference RNA)을 이용하여 유전자의 발현을 효율적으로 억제할 수 있는 간접 기술 등을 통해 좀 더 세부적인 연구를 시행한다면 비정상적인 혈관 형성 과정이나 발생 기전을 이해하고 치료적 목적에서 접근할 수 있는 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

DMH를 이용한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 기전에서, 중요한 역할을 하는 것으로 추측되어진 PKC  $\alpha$  동종효소에 대해서 객관적인 검정 방법인 Western blot analysis와 Fluorescence immunocytochemical analysis를 통해 확인해 본 결과, PKC $\alpha$ 의 발현이 DMH 처리로 인해 증가됨을 확인할 수 있었다. 따라서 DMH를 이용한 혈관 내피세포의 비정상적인 증식 기전에서 PKC $\alpha$ 가 중요한 역할을 하는 것으로 판단되며, 이러한 결과는 비정상적인 혈관 형성 과정이나 발생 기전에 대한 연구 등에 기초 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

1. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931, 1992
2. Kim HO, Kang YS, Bae YC, Park SY, Hwang SM, Nam SB: Gene expression profiling of 1,2-Dimethylhydrazine-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 31: 858, 2004
3. Kim SH, Kang YS, Bae YC, Park SY, Nam SB: RT-PCR of up-regulated factors in abnormal proliferated vascular endothelial cells by 1,2-Dimethylhydrazine. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 689, 2005
4. Bae YC, Park SY, Nam SB, Herh JY, Kang YS: A study for the mechanism of abnormal proliferation in vascular endothelial cells using inhibitors to the signal transduction pathway. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 33: 5, 2006
5. Bae YC, Park SY, Nam SB, Moon JS, Choi SJ: Activity

- of protein kinase C in abnormally proliferated vascular endothelial cells. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 34: 13, 2007
6. Lee J, Bae YC, Park SY, Moon JS, Nam SB: Role of protein kinase C in abnormal proliferation of vascular endothelial cell induced by 1,2-Dimethylhydrazine; analysis of isoform. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 34: 9, 2007
  7. Newton AC: Protein kinase C Structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270: 28495, 1995
  8. Nishizuka Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484, 1995
  9. Clemens MJ, Trayner I, Menaya J: The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 103: 881, 1992
  10. Chabannes E, Fauconnet S, Bernardini S, Wallerand H, Adessi G, Bittard H: Protein kinase C signalling pathway is involved in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in human bladder transitional carcinoma cells. *Cell Signal* 13: 585, 2001
  11. Grabam MA, Rawe I, Dartt DA, Joyce NC: Protein kinase C regulation of corneal endothelial cell proliferation and cell cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4124, 2000
  12. Hug H, Sarre TF: Protein kinase C isoenzymes divergence in signal transduction? *Biochem J* 291: 329, 1993
  13. Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA: Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzyme. *J Cell Biol* 117: 121, 1992
  14. Sohn UD, Zoukhri D, Dartt D, Sergheraert C, Harnett KM, Behar J, Biancani P: Different protein kinase C isozymes mediate lower esophageal sphincter tone and phasic contraction of esophageal circular smooth muscle. *Mol Pharmacol* 51: 462, 1997