

급성 심근 손상에서 GADD45 β의 역할

조석기* · 홍종면** · 이정렬*** · 이학모**** · 오병철**** · 이재웅****

The Role of GADD45 β in Acute Myocardial Injury

Sukki Cho, M.D.*, Jong Myeon Hong, M.D.**, Jeong Ryul Lee, M.D.***, Hak-Mo Lee, D.V.M., Ph.D.****, Byong Chul Oh, D.V.M.****, Jae Woong Lee, M.D.****

Background: A critical shortage of donor organs has necessitated an investigation of new strategies to increase the availability of additional organs available for human transplantation. We investigated the amount of apoptosis and expression of GADD45 β in two groups, a GADD45 β-transfected group and untransfected group.

Material and Method: The experimental groups consist of a control group (normal H9C2 cell line) and GADD45 β-transfected group. After injury of the each group, we evaluated the expression of GADD45 β and the level of apoptosis in each group. **Result:** There was a significant increase in the expression of GADD45 β in the GADD45 β-transfected group at 1 hour, 2 hours, and 3 hours after stimuli as compared with the control group. The amount of cardiac myoblast cell line apoptosis was significantly lower in the GADD45 β-transfected group as compared with the control group. The concentration of annexin in the GADD45 β-transfected group was significantly lower than that of the control group after cell injury. **Conclusion:** Transfection of a rat myoblast cell line with the GADD45 β gene results in decreased susceptibility to cell injury of human serum.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2008;41:25-33)

- Key words:**
1. Xenotransplantation
 2. GADD45 β
 3. Transfection
 4. Apoptosis
 5. H9C2

서 론

현대의학에서 질병 치료의 한 분야로 자리 잡은 장기 이

식은 관련 의학 기술의 발달에 힘입어 좋은 성적을 보이고 있어 시행 횟수가 해마다 증가하고 있다. 따라서 동종 이식은 심장, 신장, 간 등의 다양한 장기에서 시행되고 있

*경북대학교 의과대학 경북대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kyungpook National University Hospital, College of Medicine, Kyungpook National University

**충북대학교 의과대학 충북대학교병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Chungbuk University Hospital, College of Medicine, Chungbuk National University

***서울대학교 의과대학 서울대학교어린이병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University Children's Hospital, Seoul National University College of Medicine

****서울대학교병원 임상의학연구소 이종장기 연구개발센터

Xenotransplantation Research Center, Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital

****한림대학교 의과대학 한림대학교성심병원 흉부외과학교실

Department of Cardiothoracic Surgery, Hallym University Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University

논문접수일 : 2007년 11월 5일, 심사통과일 : 2007년 12월 27일

책임저자 : 이정렬 (110-744) 서울특별시 종로구 연건동 28번지, 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 서울대학교 어린이병원 흉부외과

(Tel) 02-2072-2877, (Fax) 02-3672-3637, E-mail: jrl@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

지만 가장 큰 문제는 공여 장기의 부족에 있다. 특히 심장과 같이 생체 공여자(living donor)가 없는 장기의 경우에는 그 부족이 더욱 심각하다. 이에 대한 대안으로는 인공심장, 인공 심실 보조기구 등이 개발, 사용되고 있으나 각각의 부작용으로 인해 장기 성공률이 낮아 제 역할을 하지 못하고 있으며 이종 간의 심장 이식이 이론적으로 거론되고 있지만 아직까지는 임상적으로 적용되지 못하고 있는 실정이다. 그 이유는 이종 장기간의 면역학적 문제, 감염 문제 등 해결해야 할 제반의 문제가 많기 때문인데 이종 간의 면역학적 문제는 그 메커니즘이 복잡하고 다양하여 아직도 해결되지 않고 있다. 이종 간의 이식에서는 우선 초급성 거부 반응이 발생하는데 이는 이식된 조직의 내피 세포 표면의 이종 항원과 수혜자의 혈액 내에 이미 존재하고 있는 자연 항체가 반응하면서 이어서 보체계가 활성화되어 혈관 내피 세포의 파괴를 유발하여 수분에서 수 시간 안에 이식된 장기가 파괴된다[1,2].

따라서 이 연구에서는 돼지 심장을 인간에게 이식하였을 때 발생하는 여러 가지 면역 거부 반응을 알아보고자 돼지 심장의 체외 관류 모델을 개발하였다. 이 관류 모델을 이용하여 돼지 심장을 일정시간 인간 혈액으로 관류시킨 뒤에 돼지의 심근에서 시간적으로 다르게 발현되는 유전자를 찾아내고자 하였고, 또 발현된 30여 가지의 유전자 중에서 세포보호 유전자로 알려져 있는 GADD45 β 의 급성 심근 손상에서의 기능을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1) 돼지 심장의 생체 외 관류

생후 10일 된 체중 3~4 kg의 신생돈 10마리를 사용하였다. 실험에 사용된 인간 혈액은 모두 자발적인 지원자들에게서 얻었으며 헤파린(2000 unit)이 첨가되어 있는 진공 혈액 보관 용기에 400 mL를 넣어서 실험에 사용할 때까지 냉장보관 하였고 ABO type B형만을 사용하였다. 신생돈을 kg당 100 mg의 케타민을 근육주사하여 마취하였고, 마취된 신생돈을 수술대로 옮겨 사지를 절박하고 양와위에서 전정부에 국소마취를 시행하고 기관절개술을 시행하였다. 이때 기도 내 도관은 4-5 F 크기의 도관을 사용하고 인공호흡기(Servo 3000, USA)와 연결하여 100% 산소로 분당 15~20회로 인공호흡을 시작하였다. 정중 흉골 절개로 개흉한 후 흉선과 전방 심낭을 충분히 제거하여 심장과 연결되어 있는 대혈관들이 충분히 노출되도록 하였다. 심장을 우측으로 견인하면서 좌측에 있는 반기정맥과 좌측

쇄골하 동맥을 0번 흑색 명주사로 결찰하고 하행대동맥, 무명동맥, 상공정맥, 하공정맥, 주폐동맥에 혈관 고리를 걸어 두었다. 헤파린(300 unit/kg)과 항생제(50 mg/kg)를 주폐동맥을 통하여 주사하였다. 무명동맥에 특별히 고안된 12G 도관을 이용하여 삽관한 후 동맥압을 감시하였고 상공정맥과 하공정맥을 결찰하고 폐정맥과 주폐동맥에 소절개를 가하여 양심실 감압조치를 시행한 후 하행대동맥을 혈관 겹자로 차단하였다. 열린 생리 식염수를 이용하여 심장의 외부 국소 급속냉각을 유도하면서 동시에 섭씨 4도로 냉각 시킨 심정지용액(위스콘신 용액)을 무명 동맥 도관을 통해 평균 60 mmHg 압력으로 2분간 주입하여 심장을 정지시켰다. 하행대동맥, 좌측반기정맥, 무명동맥, 상공동맥, 하공동맥, 주폐동맥을 차례대로 결찰 부위보다 원위부에서 절개한 후 좌심방 끝동(cuff)을 최대한 많이 남기면서 적출하였다. 이 때 무명동맥 도관은 미세하게 파쇄된 채로 남겨두었다. 심장을 적출한 뒤에 최대한 빠르게 생체 외 관류시스템에 연결하였다(Fig. 1). 무명동맥 도관을 통한 관상 동맥만을 관류시키고 심방부하는 걸지 않은 무작업성 관상 동맥 관류 모델로 심장 관류를 실시하였다. 관류 시스템에 연결한 후에 관류액에 B형의 인간혈액을 첨가하여서 적혈구 용적률(hematocrit)을 15%로 유지하고, 총 부피는 800 mL로 관류하였다. 일정시간 후 심박동이 멈춘 뒤에도 180분까지 돼지 심장을 관류를 시켰다. 심장의 적출은 10분과 180분에 각각 5마리씩 시행하였으며 적출한 심장에서 일부의 심근조직을 떼어내서 액체 질소 탱크에 보관하였다.

2) 유전자 획득

보관된 돼지 심장의 심근세포에서 EazyBlue (Intron Biotechnology Inc., Korea)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였고 모든 RNA는 역전사에 이용될 때까지 -80°C에 보관하였다. 역전사는 42°C에서 1시간 30분 동안 시행되었으며 총 부피는 3 μ g purified total RNA, 4 μ L 5' reaction buffer (Promega, Madison, WI, USA), 5 μ L dNTPs (each 2 mM), 2 μ L 10 μ M dT-ACP1 (5' -CGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIIT (18)-3'), 0.5 μ L RNasinO RNase Inhibitor (40 U/ μ L; Promega), 1 μ L Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/ μ L; Promega)등을 포함한 총 20 μ L였다. 역전사를 통해 얻은 cDNA는 GeneFishingTM PCR에 사용하기 위해서 80 μ L의 ultra-purified water을 첨가하여 희석하였고 -20°C에 보관하였다.

10분과 180분 사이에 시간적으로 다르게 발현된 유전자

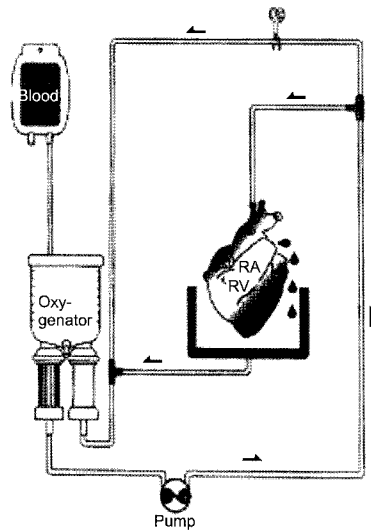


Fig. 1. Diagram of isolated non-working heart perfusion circuit. The pig heart was perfused with human type B blood. Blood flow: Innominate A. → Coronary A. → RA → Pulmonary A. Ao=Aorta; PA=Pulmonary artery; RA=Right atrium; RV=Right ventricle.

의 선별은 GeneFishing™ DEG kits (Seegene, Seoul, South Korea)을 이용한 ACP-based PCR 방법을 이용하였다. 간략하게 요약하면, second-strand cDNA의 합성에서 one cycle first-stage PCR은 50°C에서 총량은 3~5 μ L (about 50 ng) diluted first-strand cDNA, 1 μ L dT-ACP2 (10 μ M), 1 μ L, 10 μ M arbitrary ACP, 10 μ L 2' Master Mix (Seegene)을 포함한 20 μ L로 하였다. second-strand cDNA의 합성은 94°C에서 1분, 50°C에서 3분, 72°C에서 1분간 시행하였다. second-strand DNA 합성이 완성된 뒤에 second-stage PCR amplification protocol은 총 40 cycle로 94°C에서 40초간, 65°C에서 40초간, 72°C에서 40초간, 마지막으로 72°C에서 5분간 시행하였다. 이런 방법으로 증폭된 PCR 산물은 2% agarose gel에서 분리하였고 ethidium bromide 염색하였다.

시간적으로 차별되게 발현된 밴드들은 재 증폭하였고 GENCLEANO II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여서 추출하였다. 이렇게 추출된 유전자들은 ABI PRISMO 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)방법을 이용하여 시퀀싱하였다.

3) GADD45 β 유전자 연구

한국세포주은행(Korea Cell line Bank)에서 쥐의 심근 세포주(rat cardiomyoblast cell line, H9C2)를 얻었고 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum)이 보강된 Dulbecco's modi-



Fig. 2. This picture shows heart after 3 hours perfusion with human blood. The heart of pig was swelled and got dark.

fied Eagle's Medium (JBI, Seoul, Korea)에 배양하였다. 세포 배양은 37°C, 5% CO₂ 환경의 배양기에서 시행하였다.

H9C2 (5×10^5 cells) 세포에 AMAXA Nucleofector™ bio-system (AMAXA, Cologne, Germany)방법을 이용하여 네오마이신 내성 유전자와 GADD45 β 유전자를 가지고 있는 pcDNA 3.1 plasmid (5 μ g)를 삽입시켰다. 삽입시킨 세포주를 2일간 배양하고 2일 뒤 G418 (Aminoglycoside, Scientific Inc., CA, USA)을 0.5 mg/mL의 농도로 첨가하여 GADD45 β 유전자가 삽입된 세포주만을 선택하였다. 약물이 첨가된 배지는 2일에 한번씩 교체를 하였고 2주 후에 배지에서 집락(colony)을 뽑아서 G418가 없는 배지에서 배양하였다.

10^5 개의 정상적인 H9C2 세포주와 GADD45 β 를 과발현시킨 세포주를 플레이트 위에 각각 분주하고 24시간 동안 배양을 한 뒤에 세포 손상 자극제인 TNF- α 와 인간 혈청을 배양액에 첨가하여 1시간, 2시간, 3시간까지의 변화를 관찰하였다.

세포 자멸사의 평가는 ApoAlert™ Annexin V assay 방법을 이용하여 측정하였다. 세포 자멸 유도 직후에 자멸된 세포의 Phosphatidylserine (PS)이 세포질에서 세포막으로 이동하는 현상과 Annexin V 단백질이 PS에 강한 특이적 친화성을 갖는 원리를 이용한다.

4) 통계 분석

모든 양적인 결과들은 평균 \pm 표준편차 형식으로 표현하

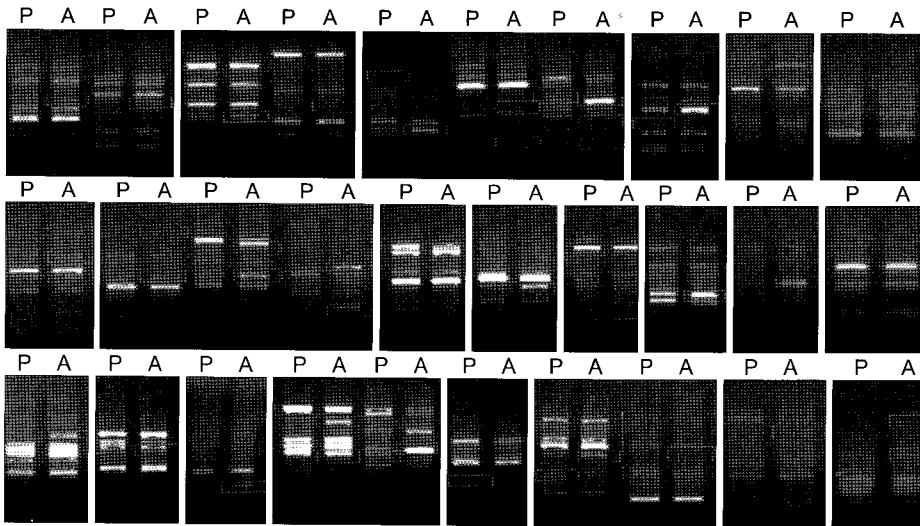


Fig. 3. Differentially expressed gene of pig heart after 10 minutes perfusion and 180 minutes perfusion. P=10 minutes- perfusion; A=180 minutes-perfusion.

였으며 두 군 간의 비교는 t-test를 이용하여서 분석하였고 통계적인 의미는 p 값이 0.05 이하일 때 의미를 두었다.

결 과

1) 돼지 심장의 생체 외 관류 결과

총 10마리의 신생돈을 실험하였으며 심장 적출 후 생체 외 관류 시스템에 연결까지 걸린 시간은 6~8분이었다. 돼지 심장은 연결 후 무작업성 관류를 시켰고 심장 박동은 연결 직후부터 있었으며 지속시간은 평균 4.7분이었다. 심장 박동이 멈춘 뒤에도 180분 동안 계속해서 관류 시켰으며 관류 후의 돼지 심장은 심하게 충혈되었으며 부종이 심했다(Fig. 2).

2) 돼지 심근에서 발현된 유전자

관류 시킨 뒤 10분과 180분 후에 적출한 돼지 심근에서 발현된 유전자 중에서 관류 후 180분에 적출한 심근에서 더 의미 있게 증가한 30여 종의 유전자를 찾았다. 이들 유전자 중에서 염기 서열 상동성 검색(sequence homology search)을 통해서 GADD45 β , MyD 118, PQBP1 gene, PAK2 등의 유전자를 확인하였다(Fig. 3).

3) GADD45 β 를 삽입한 군과 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에서의 GADD45 β 발현 차이

GADD45 β 를 삽입한 군과 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에서 각각의 세포에 손상을 주지 않은 상태에서 GADD45 β 발현 정도를 비교하였다. GADD45 β 를 삽입한 군에서 삽

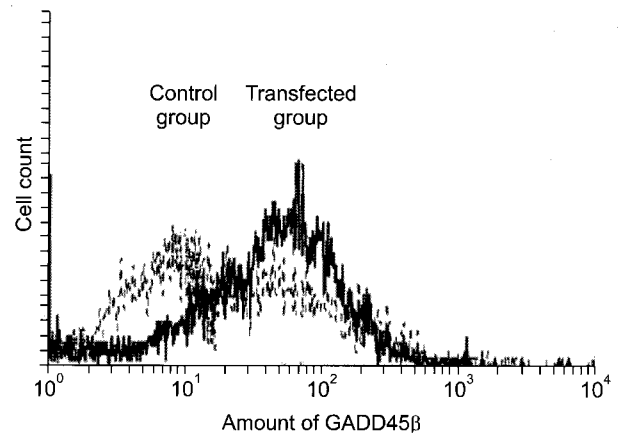


Fig. 4. Comparison of GADD45 β expression between untransfected group and transfected group. Without cell injury, there was an increase in the expression of GADD45 β in the GADD45 β -transfected group.

입하지 않은 군에 비해서 의미 있게 발현의 정도가 증가하였다(Fig. 4).

4) 세포 손상에 따른 GADD45 β 의 발현 정도

GADD45 β 를 삽입시키지 않은 군에 TNF- α 와 인간 혈청으로 1시간에서 3시간까지 세포 손상의 자극을 준 뒤에 GADD45 β 의 발현 정도를 측정된 결과 TNF- α 와 인간 혈청 모두에서 자극을 주기 전 보다 GADD45 β 의 발현이 증가하였고 시간대에 따라서는 1시간 지난 뒤에 가장 많은 증가를 보였고 시간이 지나면서 점점 줄어드는 양상을 보였다(Fig. 5).

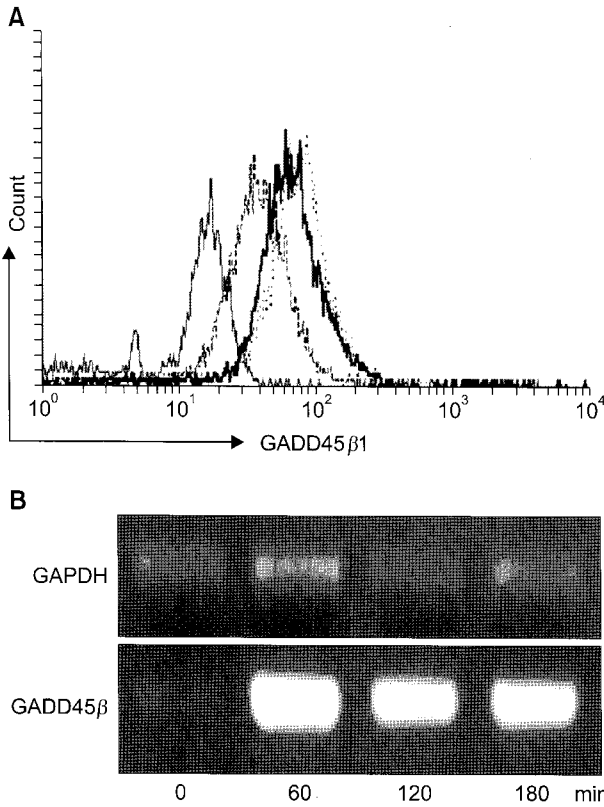


Fig. 5. GADD45 β expression in the untransfected cell after cell injury (A) Histogram of untransfected cell line with GADD45 β . After injured with human serum, the expression of GADD45 β gene was explosively increased in 1 hour and the expression of gene was decreased after 2 hours (from left to right; 0 hr, 3 hr, 2hr, 1hr) (X axis=Degree of GADD45 β expression; Y axis=Cell counts). (B) RT-PCR results of untransfected cell line with GADD45 β .

5) 세포 자멸사 평가

먼저 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에서 혈청으로 세포 손상을 주었을 때와 주지 않았을 때의 자멸한 세포의 비율은 각각 17.88 \pm 0.91%, 31.37 \pm 2.51%로 통계적으로 혈청을 처리하였을 때 높았다. TNF- α 로 세포에 손상을 주었을 때는 세포 손상을 주지 않은 정상 세포에 비해서 세포 자멸사는 증가하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (18.71 \pm 1.92% vs 20.93 \pm 1.23%, p>0.05) (Fig. 6). GADD45 β 를 삽입한 군과 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에서 인간 혈청으로 세포 손상 자극을 준 뒤에 측정된 세포 자멸사의 정도는 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에 비해서 GADD45 β 를 삽입한 군에서 낮았다(Fig. 7).

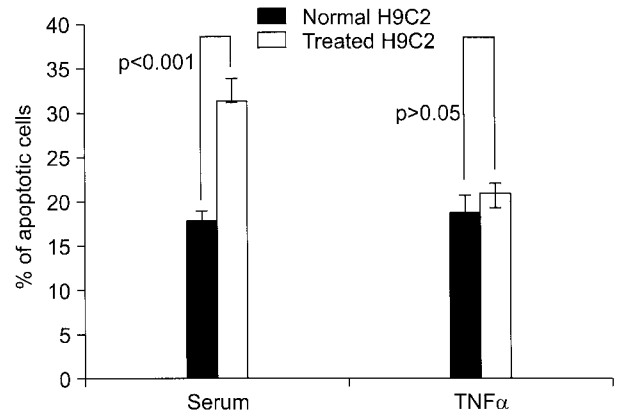


Fig. 6. Comparison of apoptosis according to cell injury. Left=Human serum; Right=TNF- α .

고찰

동종 장기 이식술은 관련된 의학 분야의 발전에 힘입어 해마다 시행 건수가 증가하고 좋은 장기 성적을 보여 하나의 치료방법으로 자리를 잡고 있지만 이식 수여자에 비해서 공여 장기의 부족은 동종 장기 이식에서 가장 큰 문제이다. 특히, 말기 심부전 환자는 일시적으로 인공심장, 심실 보조 장치 등의 도움을 받을 수는 있지만 아직까지는 심장이식을 받아야 장기 생존을 기대할 수 있다. 하지만 신장이나 간이식과는 달리 생체 공여(living donor)를 할 수 없기 때문에 공여 장기가 절대적으로 부족하다. 이에 대한 대책의 하나로 이종 장기 이식이 거론되고 있으며 이에 대한 많은 이론과 실험이 진행되고 있으나 임상 적용하기에는 아직 해결해야 할 많은 문제들이 있으며, 이종 간의 면역학적 거부 반응은 대표적인 문제라고 할 수 있다[1,2]. 이종 간의 심장이식에서 돼지 심장은 구조적인 면이나 기능적인 면에서 인간의 심장과 유사한 점이 많아서 이종 이식 장기로서 가장 많이 쓰일 가능성이 높기 때문에 이 실험의 의미는 크다고 할 수 있다. 하지만 이 실험에서와 같이 면역학적 거부 반응으로 돼지 심장에 인간의 혈액을 관류시켰을 때 심장 박동이 수분 밖에 지속이 되지 않는 초급성 거부 반응이 발생하였는데, 그 원인으로서는 돼지 조직 내에 존재하는 항원 중 하나인 α Gal 이 인간 혈액 내에 자연적으로 존재하는 항체와 반응하여 발생한 항원-항체 반응일 가능성이 있다[3]. 따라서 이러한 형태의 초급성 거부 반응을 억제하기 위해서는 돼지 심장을 이용한 이종 이식에서 α Gal에 의한 항원 항체 반응을 억제하는 것이 필수적이며, 실제로 많은 연구에서

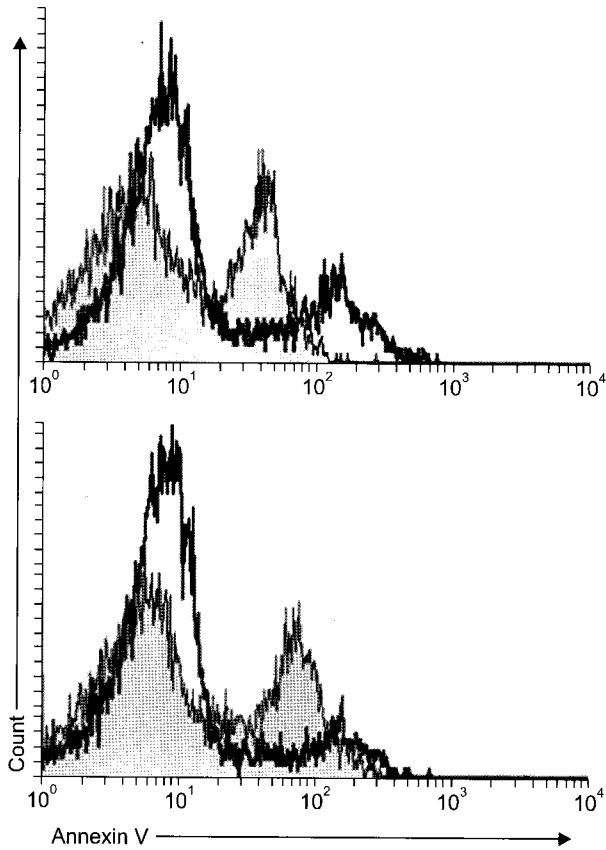


Fig. 7. Comparison of apoptosis between untransfected group and transfected group. The blank represents cell transfected with GADD45 β , and shadow represents cells not transfected with GADD45 β . The concentration of Annexin V in the transfected cells is lower than that in the untransfected cells.

이 문제를 해결하기 위해서 여러 가지 방법들을 사용하고 있다. 예를 들면 수여자의 α Gal에 대한 항체를 제거하거나 cobra venom factor나 보체 수용체 I과 같은 항보체 약물을 투여하기도 하며 hDAF (human decay-accelerating factor)와 같은 인간 보체 조절 단백질을 삽입시킨 이종 장기를 사용하여 α Gal에 의한 초급성 거부 반응을 없애려는 노력을 하고 있다[4-6]. 또 하나의 초급성 거부 반응의 원인으로는 이종 이식에서 수여자인 인간의 혈액형을 들 수 있다. 동종 이식에서는 혈액형이 불일치할 경우 초급성 거부 반응이 일어나기 때문에 동종 간의 혈액형이 이식에 있어서 중요한 인자로 작용하며 같은 이유로 이종 이식 즉 인간-돼지의 이식에서도 인간의 혈액형에 따라 초급성 거부 반응에 차이가 있을 수 있다는 보고가 있다[3,7,8]. 이 보고에 따르면 α Gal 항원이 인간의 혈액형 B형과 유사성이 있어서 인간의 혈액형에 따라서 이식된 돼지 심장

의 거부 반응 정도가 결정이 된다고 하며 이들은 돼지 심장의 생체 외 인간 혈액관류 실험을 통해서 인간의 혈액형이 A, O형일 경우 돼지 심장의 생존율이 낮고 B, AB형일 경우에는 생존율이 좋았다고 보고 하였으며 그 메커니즘은 정확히 밝혀져 있지는 않지만 α Gal 항원이 B항원과 유사하여 항 B항체를 지닌 A형 또는 O형에서 초급성 거부 반응이 심하게 발생하였다고 하였다. 따라서 본 연구에서도 이 연구의 결과를 바탕으로 관류시키는 인간 혈액의 혈액형을 B형으로 국한시켰지만 다른 혈액형으로는 실험을 진행하지 않아서 위 실험의 차이를 검증하지는 못했다.

본 연구는 돼지-인간 간의 이종 이식을 위한 전 단계로 돼지 심장의 생체 외 관류 모델을 만들었으며 추가적으로 관류 모델에서 발견되는 수십 가지 유전자들의 확인과 역할을 알아보는 것이 목적이었다. 총 180분까지 관류를 시켜서 10분과 180분에서 적출한 심장의 심근세포에서 발견에 차이가 있는 30여 가지의 유전자들을 찾았고 이들 중에서 세포 보호 인자로 알려져 있는 GADD45 β 의 역할에 대해서 연구하였다. 10분과 180분이라는 차이를 둔 것에 대한 택한 근거는 정확히 없지만 10분에서 발견된 것 보다 180분에 더 높게 발견된 유전자들은 시간 차를 두고 발생하는 여러 가지 변화에 대처하기 위해 발현이 증가되었을 것으로 생각하였다. GADD45 β 유전자는 GADD45 핵단백질 집합체에 속하는 단백질로 포유류 세포에 존재하고 DNA에 손상을 일으키는 자극에 반응을 나타낸다. GADD45 β 발현은 세포 분화, 세포 주기의 진행 및 세포 자멸사를 조절하는데 관여하고 특히 세포의 생존을 조절하는 PCNA (proliferating cell nuclear antigen)와 p21 등과 직접적인 관계를 통해서 세포의 주기와 자멸사를 조절하는 것으로 알려져 있다[9-13]. Zang 등은 GADD45 β 의 역할 및 반응을 쉽게 알아보기 위해 GADD45 β -luciferase 유전자를 삽입(transgenic)한 쥐 모델을 만들었고 이 실험에서 TNF- α , LPS (lipopolysaccharide) 등의 세포 손상물질을 준 결과 GADD45 β mRNA의 발현 증가를 확인하였고, 또한 NF- κ B의 억제제를 투여한 결과 GADD45 β 의 발현이 억제되는 것을 확인 하였다. 따라서 GADD45 β 유전자는 NF- κ B에 의해서 전사가 촉진되는 하나의 유전자임을 유추하였고 세포 자멸사를 억제하는 것으로 알려져 있는 NF- κ B의 전달체계가 GADD45 β 의 발현을 촉진시키고 발현이 촉진된 GADD45 β 는 세포 손상의 자극에서 세포를 보호하는 역할을 할 것이라고 결론지었다[14]. 또 다른 연구에서는 B 림프구에서 Fas에 의한 세포 괴사는 CD40에

의해서 억제되는데 그 메카니즘은 CD40에 의해서 GADD45 β 가 과발현 되면서 Fas에 의한 caspase의 작용을 억제시켜 세포 자멸사를 억제한다고 보고하였다[15]. 이들의 연구 결과를 바탕으로 이번 실험에서 시간적으로 발현에 차이를 보인 여러 유전자들 중에서 GADD45 β 의 역할이 세포 자멸사의 환경에서 세포를 보호하기 위한 하나의 보호 유전자로 작용할 것이라 생각하였다. 따라서 GADD45 β 가 세포 자멸사를 억제하며 세포 보호 여부를 확인하기 위해 GADD45 β 를 과발현 시킨 세포를 만들었고 세포 손상 자극에 대해 정상적인 세포에 비해서 세포 자멸사가 적게 발생하는 것을 확인하였다. 하지만 단점으로는 GADD45 β 의 발현을 억제시킨 실험군에서 세포 자멸사의 증가가 있는지 밝히지 못해 향후 실험에서 이를 증명할 연구를 진행할 예정이다. GADD45 β 의 발현을 억제시키는 실험은 몇몇 보고들이 있는데 GADD45 β 를 knock-out 시키거나 antisense-GADD45 β 를 발현하는 플라즈미드를 삽입시키는 방법을 사용하였다[16].

GADD45 β 의 발현을 촉진시키는 인자로 알려진 NF- κ B (Nuclear Factor- κ B)는 전사인자로 여러 가지 염증 및 세포 독성 유전자의 발현을 조절하는 역할을 하여 세포의 괴사를 억제하는 기능을 한다고 알려져 있다[16,17]. 세포가 손상 자극을 받기 전에는 NF- κ B 단백질은 세포질 내에 존재하며 억제제인 I κ B와 결합된 상태로 있게 되지만 TNF, IL-1등의 자극을 받게 되면 I κ Bs는 인산화가 되고 프로티아좀에 의해서 분해된다. 억제제인 I κ Bs가 분해되면 NF- κ B는 핵 내로 이동하고 IAP-1, GADD45 β , bcl-2 등의 전사를 촉진시킨다. 이렇게 전사된 유전자들에 의해서 세포 자멸사(apoptosis), 세포예정사(programmed cell death)가 억제된다[18-25]. 심근세포에서 NF- κ B와 세포 자멸사를 연구한 논문에서도 pyrrolidine dithiocarbamate 등의 약물을 투여하거나 I κ Bs를 과발현하는 바이러스를 삽입시켜서 NF- κ B를 억제하였을 때는 심근 세포의 사멸을 촉진하는 결과를 얻어 NF- κ B의 작용은 세포 사멸을 억제하는 IAP-1, XIAP, bcl-2등의 발현을 유발하여 세포를 보호한다는 결론을 내렸다[26-30].

이 연구를 통해서 세포에서는 사멸을 촉진시키는 자극이 전달 될 때 이를 극복하려는 시도가 일어나고 있으며 돼지 심장을 생체 외 인간 혈액을 관류시켰을 때 일어나는 현상도 같은 상황으로 볼 수 있다고 생각되었다. 따라서 이종 장기 이식 모델에서 세포 내에서는 NF- κ B와 GADD45 β 라는 세포 보호 과정을 통해서 세포의 괴사를 억제하려는 일련의 과정을 볼 수 있었다.

결론

이상으로 볼 때 GADD45 β 를 삽입시킨 세포주는 인간의 혈청에 의한 세포 손상에 덜 영향을 받았으며 GADD45 β 는 세포 손상에 의한 세포의 자멸사를 줄이는 역할을 하였다.

참고 문헌

1. Kobayashi T, Yokoyama I, Morozumi K, et al. *Comparative study of the efficacy of removal of anti-ABO and anti-gal antibodies by double filtration plasmapheresis*. Xenotransplantation 2000;7:101-8.
2. Sato Y, Kimikawa M, Suga H, et al. *Prolongation of cardiac xenograft survival by double filtration plasmapheresis and ex vivo immunoabsorption*. ASAIO J 1992;38:673-5.
3. Manji RA, Manji JS, Koshal A, Korbitt GS, Rajotte RV. *Human ABO blood group is important in survival and function of porcine working hearts*. Am J Transplant 2003;3: 286-93.
4. Buhler L, Yamada K, Kitamura H, et al. *Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal (alpha) 1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation*. Transplantation 2001; 72:1743-52.
5. Teranishi K, Gollackner B, Buhler L, et al. *Depletion of anti-gal antibodies in baboons by intravenous therapy with bovine serum albumin conjugated to gal oligosaccharides*. Transplantation 2002;73:129-39.
6. Gojo S, Harper D, Down J, Awwad M, Cooper DK. *Differential expression of Galalpha1, 3Gal epitopes on fetal and adult porcine hematopoietic cells*. Xenotransplantation 2002; 9:297-300.
7. Leight GS, Kirkman R, Rasmusen BA, et al. *Transplantation in miniature swine. III: effect of MSLA and A-O blood group matching on skin allograft survival*. Tissue Antigens 1978; 12:65-74.
8. Zweibaum A, Bouhou E. *Studies on digestive groups II Influence of the digestive group A system on skin allografts in rabbits*. Transplantation 1973;15:294-7.
9. Abdollahi A, Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D. *Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines*. Oncogene 1991;6:165-7.
10. Fornace AJ, Jackman J, Hollander MC, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D. *Genotoxic-stress-response genes and growth-arrest genes. gad, MyD, and other genes induced by treatments eliciting growth arrest*. Ann N Y Acad Sci 1992;663:139-53.

11. Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, et al. Association with *Cdc2* and inhibition of *Cdc2/Cyclin B1* kinase activity by the *p53*-regulated protein *Gadd45*. *Oncogene* 1999;18:2892-900.
12. Smith ML, Ford JM, Hollander MC, et al. *p53*-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cell lacking *p53*, *p21*, and/or *gadd45* genes. *Mol Cell Biol* 2000;20:3705-14.
13. Vairapandi M, Balliet AG, Fornace AJ, et al. The differentiation primary response gene *MyD 118*, related to *GADD45*, encodes for a nuclear protein which interacts with *PCNA* and *p21WAF1/CIP1*. *Oncogene* 1996;12:2579-94.
14. Zang N, Ahsan MH, Zhu L, Sambucetti LC, Purchio AF, west DB. *NF-kB* and not the *MAPK* signaling pathway regulates *GADD45 β* expression during acute inflammation. *J Biol Chem* 2005;280:21400-8.
15. Zazzeroni F, Papa S, Alicia AS, et al. *Gadd45 β* mediates the protective effects of *CD40* costimulation against *Fas*-induced apoptosis. *Blood* 2003;102:3270-9.
16. Yoo JY, Ghiassi M, Jirmanova L, et al. Transforming growth factor- β -induced apoptosis is mediated by *smad*-dependent expression of *GADD45 β* through *p38* activation. *J Biol Chem* 2003;44:43001-7.
17. De SE, Zazzeroni F, Papa S, et al. Induction of *gadd45 β* by *NF-kappaB* downregulates pro-apoptotic *JNK* signaling. *Nature* 2001;15:308-13.
18. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thonos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: *NF-kappa-B* and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909.
19. Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, et al. *NF-kB* is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med* 1999;5:554-9.
20. Byaert R, Fiers W. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett* 1994;340:9-16.
21. Antwerp DJV, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of *TNF-a*-induced apoptosis by *NF-kB*. *Science* 1996;274:787-9.
22. Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by *NAIP* and a related family of *IAP* genes. *Nature* 1996;379:349-53.
23. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J. *NF-kB*-regulated *X-chromosome-linked IAP* gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;188:211-6.
24. Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK. Differential regulation of *Bcl-2*, *AP-1*, and *NF-kB* on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett* 1999;443:331-6.
25. De Moissac D, Zheng H, Kirschenbaum LA. Linkage of the *BH4* domain of *Bcl-2* and the *NF-kB* signaling pathway for suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:29505-9.
26. Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by *in vitro* stimulation with interferon- γ , tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:19-27.
27. Lawrence R, Chang LJ, Siebenlist U, Bressler P, Sonenshein GE. Vascular smooth muscle cells express a constitutive *NF-kB*-like activity. *J Biol Chem* 1994;269:28913-8.
28. Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. *NF-kB* regulates induction of apoptosis and inhibition of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999;84:668-77.
29. Erl W, Weber C, Hansson GK. Pyrimidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of *Cu(2+)* and *Zn(2+)*. *Am J Physiol* 2000;278:C1116-25.
30. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the *RelA* component of *NF-kB*. *Nature* 1995;376:167-70.

=국문 초록=

배경: 말기 장기부전 환자가 증가하고 있지만 장기 공여자의 수는 부족하여 이종장기 이식의 필요성이 대두되고 있다. 하지만 아직까지 이종장기 이식 시 발생하는 면역학적 거부 반응은 해결되지 못하고 있다. 이에 본 연구에서는 이종장기 이식에서의 거부반응 극복을 위한 노력의 일환으로 돼지 심장의 생체 외 인간 혈액 관류 모델을 만들어 장기에 대한 인간 혈액의 거부반응과 관련되어 발현되는 유전자에 대한 기능을 규명하고 거부반응 극복을 위한 활용방안을 연구하고자 하였다. 대상 및 방법: 돼지의 심장을 이용한 생체 외 인간혈액 관류 모델을 구축하여 인간 혈액을 관류시킨 뒤 시간의 경과에 따른 유전자 발현양상의 변화를 관찰하여 시간 변화에 다르게 발현되는 30여 개의 유전자 중 하나인 GADD45 β 를 찾았다. GADD45 β 의 역할을 규명하고자 쥐의 심근 세포주 H9C2에 GADD45 β 를 삽입시켜 과발현 시켰고 다양한 염증 및 거부반응 환경에서 이 유전자의 발현양상과 기능을 알아보고자 역전사 중합 효소 연쇄반응(RT-PCR)을 통해 GADD45 β 의 발현 정도와 심근 세포주의 자멸사 정도를 평가하였다. 결과: 세포 손상을 주지 않은 상태에서는 GADD45 β 를 삽입한 군에서 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군보다 GADD45 β 의 발현이 증가하였으며 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에서 세포 손상을 준 후 측정된 GADD45 β 발현은 시간에 따라서 변화하는 양상을 보여 1시간까지는 증가하다가 그 이후에는 감소하였다. 세포에 인간 혈청으로 세포 손상을 주고 세포의 자멸사를 평가한 결과 GADD45 β 를 삽입한 군에서 GADD45 β 를 삽입하지 않은 군에 비해서 자멸사 정도가 적었다. 결론: GADD45 β 를 삽입시킨 세포주는 인간의 혈청에 의한 세포 손상이 GADD45 β 를 삽입시키지 않은 세포주 보다 자멸사의 정도가 적어 GADD45 β 는 세포 손상에 의한 세포의 자멸사를 줄여 세포를 보호하는 역할을 하였다.

- 중심 단어 : 1. 이종 이식
2. GADD45 β
3. 유전자 삽입
4. 세포 자멸사
5. 랫드 심근 세포주