약학회지 제53권 제3호 151~155 (2009)
Yakhak Hoeji Vol. 53, No. 3

성상세포에서 메테오린에 의한 TSP-1 발현조절에 PKCδ 신호경로의 연관성

박수연* · 이혜신* · 고금재* · 박정애*,**,#
*서울대학교 약학대학, **안양대학교 해양생명공학과

(Received March 23, 2009; Revised April 14, 2009; Accepted April 20, 2009)

Effect of Meteorin on the Regulation of TSP-1 via PKCδ Signalings in Astrocytes

Soo Youn Park*, Hye Shin Lee*, Keum Jae Ko* and Jeong Ae Park*,**,#
**College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*
***Department of Marine Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea*

Abstract — Meteorin in astrocytes has antiangiogenic activities via thrombospondin-1 (TSP-1), however, the regulatory mechanism has been unclear. Here we report that Meteorin upregulates TSP transcriptionally through luciferase reporter assays in astrocytes. Moreover, Meteorin activates PKCδ and ERK1/2 in astrocytes. Inhibition of PKCδ and ERK1/2 activities attenuated expression of TSP-1 by Meteorin in astrocytes. We, therefore, demonstrate that Meteorin activates PKCδ signaling and, in turn, increases TSP-1 expression in astrocytes to inhibit angiogenesis in the brain.

Keywords □ astrocyte, meteorin, TSP-1, PKCδ, brain, thrombospondin-1

뇌혈관은 성상세포(astrocyte)와 pericyte에 의해 둘러싸인 뇌혈관장벽구조(blood-brain barrier, BBB)로 형성되어 있는데, 뇌혈관장벽구조는 뇌혈관과 뇌조직사이의 물질투과성을 엄격하게 조절함으로써 뇌기능의 항상성을 유지하게 한다.[1,2] 그러나 만성 뇌질환과 뇌종양 및 허혈성 뇌질환 등에서 뇌혈관과 주변세포인 성상세포/pericyte와의 상호작용의 손상과 더불어 뇌혈관장벽구조의 손상, 뇌혈관의 퇴행, 혹은 과도한 뇌혈관의 형성등이 보고되어 있다.[3] 이러한 현상은 기능적인 뇌혈관을 형성하고 유지하기 위해서는 성상세포/pericyte와 혈관내피세포간의 상호작용의 중요성을 시사하므로, 뇌혈관형성과정에서 성상세포/pericyte의 역할규명에 대한 연구의 필요성이 대두되었다.

기능적인 뇌혈관형성기작은 뇌표면의 pia vessel에서 뇌조직속으로 혈관이 형성되는 뇌혈관신생과정(brain angiogenesis)과 과도하고 불필요한 혈관등을 제거(pruning)하는 뇌혈관 remodeling 과정, 그리고 tight junction과 adherens junction 등에 의한 뇌혈관장벽구조 형성과정으로 나뉜다. AKAP12, angiopoietin-1, VEGF, 메테오린(Meteorin), 그리고 thrombospondin(TSP) 등이 이 과정 중 성상세포에서 발현되어 혈관내피세포에 작용하여 뇌혈관형성에 영향을 준다고 보고하고 있다.[4-6] 따라서 이들 단백질의 작용기작에 대한 연구는 뇌혈관 형성기작 규명뿐만 아니라 뇌혈관질환 치료의 근간을 마련하게 된다.

메테오린은 최근에 발굴된 유전자로서 뇌에서 다량으로 발현되며 neuroglia와 성상세포에서 발현되어 성상세포로의 분화에 관여하며 세포외로 분비되는 단백질이다.[7,8] 본 연구진에 의하여 메테오린은 성상세포를 산소에 노출시켰을 때 증가하며 발생 중 혈관근처에서 존재하는 성상세포에서 발현되어 혈관신생억제작용을 한다고 처음으로 보고 한 바 있다.[6,7] 메테오린을 처리한 성상세포 배양액(conditioned media)을 혈관내피세포에 가하면 혈관형성이 억제된다. 이러한 현상은 메테오린이 성상세포 배양액에 TSP-1의 분비를 증가시킴으로써 일어난다. 즉, 성상세포의 메테오린단백질이 유도하는 혈관신생억제기능은 TSP-1을 매개로 해서 이루어진다.[6] 또한 성상세포에서의 TSP-1의 증가는 ERK1/2의 활성화와의 연관성을 제시하고 있다. TSP-1은 혈관신생억제제(angiogenesis inhibitor)로서 혈관내피세포와 암세포에서 발현 분비된다고 알려져 있다.[9,10] TSP-1의 발현조절기작으로 ras, c-myc, v-src와 같은 암유전자에 의해 발현이 저해되며, p53이나 PTEN 등 암세포억제제의 작용으로 발현이 증가하다는 정도로 알려져 있을 뿐이다.[11,12] 최근에는 TSP-1은 뇌의 성상세포에서

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-876-1827 (팩스) 02-885-1827
(E-mail) jeaepark@hotmail.com

도 발현함으로써 인접한 신경세포의 시냅스 형성과 뇌혈관형성 등에 관여한다는 기능도 알려지기 시작했다.[6,13)]

본 연구에서는 뇌의 성상세포에서 발현되며 분비되는 메테오린 단백질에 대한 혈관신생억제제로서의 기능 규명을 위하여 메테오린에 노출시킨 성상세포에서 단백질신호전달기작과 TSP-1 발현조절기작에 관한 연구를 수행하였다.

실험방법

실험재료

TSP antibody(Ab-11)은 Lab Vision Corporation(Fremont CA)로부터 구입하였으며, recombinant TSP단백질, Rottlerin은 Sigma-Aldrich Corporation(St. Louis, Missouri)로부터 구입하였다. anti-Akt, anti-pAkt, anti-ERK1/2, anti-pERK1/2와 anti-pPKCδ(Thr505) antibody는 Signaling Technology Inc.(Danvers, MA)에서 구입하였으며, anti-PKCδ, anti-VEGF, anti-JNK, anti-pJNK antibody는 Santa Cruz로부터 구입하였다. (RS)-{4-[5-(4-Fluorophenyl)-2-methylsulfanyl-3H-imidazol-4-yl]pyridin-2-yl}-(1-phenylethyl)amine(p38 MAPK inhibitor), 4-(4'-Phenoxy-anilino)-6,7-dimethoxyquinazoline(Src kinase inhibitor), U0126 (MEK inhibitor), wortmannin(PI3 kinase inhibitor)은 Calbiochem(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

세포배양

Primary human brain astrocyte(ACBRI 371, 성상세포)은 Cell Systems Corporation(Kirkland, WA)에서 2 passage를 구입하여 5~8 passage에서 실험에 사용하였다. 성상세포는 10% FBS를 보충한 DMEM 배지에서 배양하였으며 conditioned media(CM)을 얻는 경우에는 serum-free DMEM에서 수행하였다. CM의 Amicon(Millipore Corporation)을 사용하여 50배로 농축한 다음 사용하였다. 메테오린의 siRNA의 transfection는 Astrocyte Nucleofactor kit(Amaxa Inc., Gaitherburg, MD)의 가이드라인에 따라서 수행하였다. 메테오린을 배양액에 처리하는 경우에는 세포가 50% 포화상태가 되었을 때 12시간 정도 FBS를 제거한 DMEM 배지에서 세포를 배양한 후 메테오린단백질을 첨가하여 배양하였다. 신호전달단백질의 저해제를 처리하는 경우에는 메테오린단백질과 동시에 처리하거나 4시간전처리를 하였다. 사용한 신호전달단백질 저해제인 U0126(10 μM), wortmannin(100 nM), SB203580(10 μM), rottlerin(1 μM)의 농도로 각각 처리하였다.

Short interfering RNA (siRNA)

Dharmacon에서 제공하는 program(www.dharmacon.com)을 이용하여 디자인한 메테오린유전자에 대한 siRNA는 5'-GCAGGAGTCTGTCATCA-3' and 5'-CAGGTGCTCTCATCG-TTAA-3'이다. siNC는 negative control로서 Dharmacon에서 제공하는 siGFP를 사용하였다.

메테오린(Meteorin) 단백질분리

CHO-K1세포에서 메테오린 과발현주를 제작한 다음 Talon metal affinity resin column(Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA)과 centricon YM10(Millipore)를 이용하여 분리 정제하여 사용하였다.

Luciferase reporter assay

pGL3-TSP-LUC reporter(a, -2200/+750; b, -1290/+750; c, -767/+750)와 pCMV-β-gal과 siMeteorin을 Nucleofator kit (Amaxa Inc.)를 이용하여 성상세포에 transfection을 수행하였다. 2일후 assay kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 luciferase activity를 측정하였다. Luciferase 활성은 RLU/β-galactosidase activity로 보정하였다.

통계

오차막대는 평균에 대한 표준편차를 나타냈으며 통계적인 유의성에 관한 수치는 스튜던트 t-검정(Student's *t*-test)를 이용하여 계산하였다.

실험결과

메테오린(Meteorin)은 성상세포에서 TSP-1 발현을 전사단계에서 조절한다

메테오린단백질을 성상세포에 처리하면 TSP-1이 세포내에서 증가하여 세포외로 분비된다고 보고되어 있으나 그 작용기작은 잘 알려져 있지 않다.[12)] TSP-1의 발현기작을 조사하기 위하여, 먼저 성상세포에 메테오린단백질을 직접 처리하면 세포내 TSP-1 유전자발현이 증가한다는 것을 확인하였다(Fig. 1A and B, left). 다음으로 메테오린전사체에 대한 siRNA를 성상세포에 처리하여 메테오린을 억제하였더니 TSP-1 mRNA발현 또한 감소되었다 (Fig. 1B, right). 이러한 결과로부터 메테오린이 TSP-1 mRNA발현을 조절하리라 예상할 수 있었다.

메테오린이 TSP-1 전사체발현단계에서 조절하는지 조사하기 위하여 TSP-1 promoter-luciferase reporter plasmid를 이용하여 luciferase활성을 측정하는 reporter assay를 수행하였다. 이 assay를 수행하기 위하여 세 종류의 TSP-1프로모터, 즉 full length인 -2200/+750와 두 종류의 deletion mutant -1290/+750와 -767/+750 부위를 포함한 구조를 사용하였다(Fig. 2A). 성상세포에 세 종류의 reporter plasmid를 각각 transient transfection한 다음 메테오린단백질을 처리하여 대조군과 luciferase 활성을 비교하

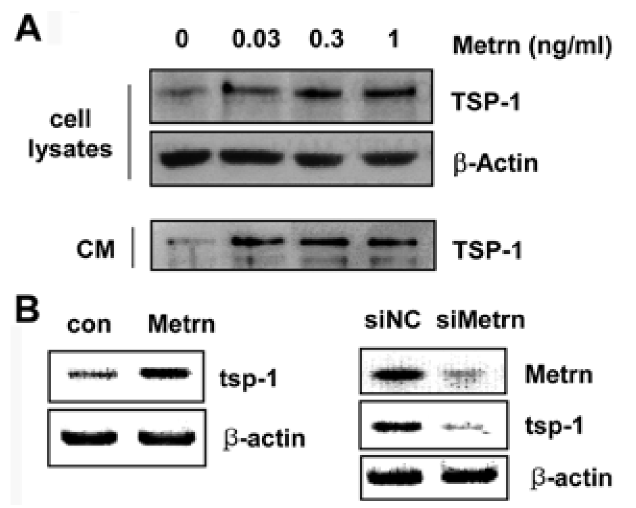

Fig. 1 – Meteorin regulates TSP-1 expression in astocytes. (A) Western blot analysis showing that human astrocytes were treated with various concentration of purified Meteorin protein for 24 hours. TSP-1 levels were examined in cell lysates and conditioned media (CM). β-Actin was used as an internal control. (B) RT-PCR analysis showing that purified Meteorin (1 ng/m*l*)-treated (left) or siMeteorin-transfected (right) human astrocytes were cultured for 24 hours. Abbreviations are: Metrn, Meteorin; siMetrn, siMeteorin; siNC, siNegative Control.

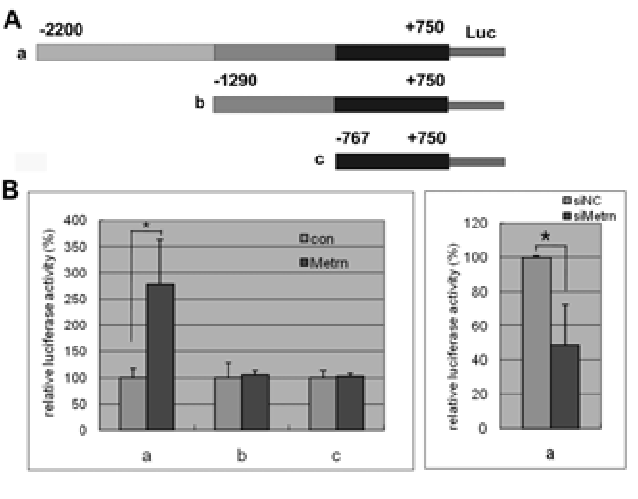

Fig. 2 – Meteorin controls the transcriptional expression of TSP-1 in astrocytes. (A) Schematic representatives of various deletion constructs of TSP-Luc reporter plasmids. a, -2200/+750; b, -1290/+750; c, -767/+750. (B) Twenty-four hours after transfection of astrocytes with three deletion constructs, cells were treated with 1 ng/m*l* Meteorin and followed by incubation for another 24 hours, and then luciferase activities were assayed (left). Astrocytes were transfected with the full length (a, -2200/+750) construct and siMeteorin (siMetrn). After 2 days, luciferase activities were examined (right). The luciferase specific activity of each construct was normalized to the cotransfected β-gal activity. The data represent the mean and SD of three independent experiments. *, $P<0.05$.

였다. 그 결과 full length의 TSP-1프로모터를 지닌 세포에 메테오린단백질을 처리 하였을 때 luciferase활성이 2.5배 증가되었으나 다른 두 종류의 deletion mutant에서는 변화가 거의 없었다 (Fig. 2B, left). siRNA를 이용하여 성상세포에서 메테오린의 발현을 억제할 경우에는 full length의 TSP-1 프로모터를 과발현한 세포에서만 luciferase 활성이 감소하였다(Fig. 2B, right). 이 결과에서 메테오린은 성상세포에서 TSP-1 mRNA의 발현을 증가시키며, TSP-1 증가는 TSP-1 프로모터의 상류지역인 -2200~-1290 사이의 염기서열이 중요하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2A and B).

성상세포에서 메테오린에 의한 TSP-1 발현은 Rottlerin과 U0126으로 억제된다

성상세포에 메테오린단백질을 처리하면 TSP-1 발현이 증가한다는 결과로부터 TSP-1의 발현을 조절하는 상위 kinase 신호전달경로를 규명하기 위하여 기존에 알려진 protein kinase 억제제(inhibitor)를 이용하였다. 성상세포에 protein kinase 억제제를 먼저 처리함으로써 단백질의 활성을 억제시킨 다음, 메테오린단백질을 처리하여 TSP-1의 발현변화를 조사하였다(Fig. 3). PI3 kinase 억제제, p38 MAPK 억제제 혹은 Src kinase 억제제를 처리해도 메테오린으로 증가되는 TSP-1의 발현에는 영향을 주지

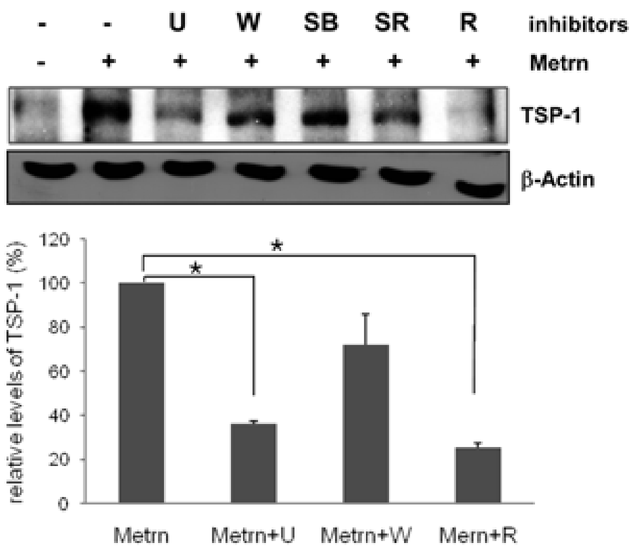

Fig. 3 – Rottlerin and U0126 downregulate Meteorin-induced TSP-1 in astrocytes. Human astrocytes were treated with purified Meteorin and various kinase inhibitors. Western blot analysis shows the expression of TSP-1 after 24 h exposure of human astrocytes to 1 ng/m*l* Meteorin in the presence or absence of inhibitors for 24 hour (upper). The relative levels of TSP-1 were quantified by densitometry from three independent assays (lower). *, $P<0.01$ Abbreviations are: U, U0126 as in MEK inhibitor; W, wortmannin as in PI3 kinase inhibitor; SB, SB203580 as in p38 MAPK inhibitor; SR, as in Src inhibitor; R, rottlerin as in PKCδ inhibitor.

못했다(Fig. 3). 그러나 MEK kinase 억제제인 U0126과 PKCδ kinase 억제제인 rottlerin에 의하여 TSP-1 발현이 감소된다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 결과로부터 메테오린으로 증가되는 TSP-1의 발현에는 PKCδ와 ERK1/2의 인산화가 관여할 가능성을 유추할 수 있었다.

성상세포에서 메테오린은 PKCδ/ERK1/2 인산화를 증가시킨다

성상세포에 메테오린의 작용으로 PKCδ와 ERK1/2의 활성화되는 지는 이들 단백질의 인산화측정으로 알 수 있다. 메테오린 단백질을 성상세포에 15분간 처리하면 ERK1/2와 PKCδ의 인산화가 증가되었지만 AKT와 JNK의 인산화에는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 4A). Fig. 3에서 살펴본 protein kinase 억제제를 처리 할 경우와 Fig. 4A에서의 인산화결과를 함께 고려해 보면, 메테오린의 작용은 ERK1/2와 PKCδ의 활성변화와 관련이 있으며 이 활성은 TSP-1의 발현조절을 유도한다는 것을 알 수 있다.

다음으로 메테오린으로 유도되는 ERK1/2와 PKCδ kinase의 신호전달기구가 상호 연관성을 지니면서 활성화되는지를 확인하고 자 하였다. 이를 위해 rottlerin 혹은 U0126을 처리하여 ERK1/2 혹은 PKCδ에 대한 영향을 조사하였다. 메테오린으로 증가된 ERK1/2활성은 PKCδ 활성 억제제인 rottlerin을 처리하면 감소하였다. 그러나 U0126로 ERK1/2 활성을 억제해도 PKCδ 인산화에는 영향을 주지 못했다(Fig. 4B). 따라서 메테오린은 성상세포에 작용하여 PKCδ 활성화시킨 후 ERK1/2 활성화하는 신호전달체계로 TSP-1의 프로모터활성을 증가시키고 궁극적으로 TSP-1 분비를 증가시킬 것으로 예상된다.

결론 및 고찰

본 연구에서 성상세포에서 메테오린단백질은 1) TSP-1 유전자를 전사단계에서 조절하며 2) PKCδ/ERK1/2 신호전달경로를 활성화하며 3) PKCδ 신호전달경로를 경유하여 TSP-1의 발현을 증가한다는 것을 밝혔다.

혈관형성과정에는 촉진인자와 억제인자간의 균형변화 즉, angiogenic switch가 관여한다고 알려져 있다.[14] 따라서 성상세포에서 분비되는 혈관신생촉진인자와 혈관신생억제인자간의 균형의 변화는 인접하는 혈관에 직접적인 영향을 지니라 예상된다. 전 연구에 의하면 성상세포에 대한 메테오린의 작용으로 혈관신생억제활성이 증가하게 되었고 이는 성상세포배양액(conditioned media)에 분비된 단백질인 VEGF와 angiopoietin-1 분비에는 큰 영향이 없으나 혈관신생억제제인 TSP-1의 발현 및 분비증가에 기인한다고 보고 되었다. 즉, 메테오린은 성상세포에서 TSP-1과 같은 혈관신생억제단백질의 분비를 증가시킴으로써 혈관신생촉진인자와 억제인자간의 균형에 변화가 일어나게 되어 혈관신생억제기능으로 나타낸다. 따라서 성상세포가 혈관신생에 미치는 영향을 규명하기 위해서는 성상세포에서 분비조절되는 혈관신생관련인자들의 조절기작이 요구된다.

본 연구에서 메테오린을 처리한 성상세포에서 혈관신생억제단백질인 TSP-1의 발현조절기작을 밝힘으로써 메테오린의 혈관억제기작을 규명하고자 하였다. 본 연구에 의하여 성상세포에서 메테오린단백질은 mRNA 단계에서 tsp-1의 발현을 증가시키며(Fig. 1B), 이러한 tsp-1의 mRNA 수준에서의 조절은 tsp-1 프로모터

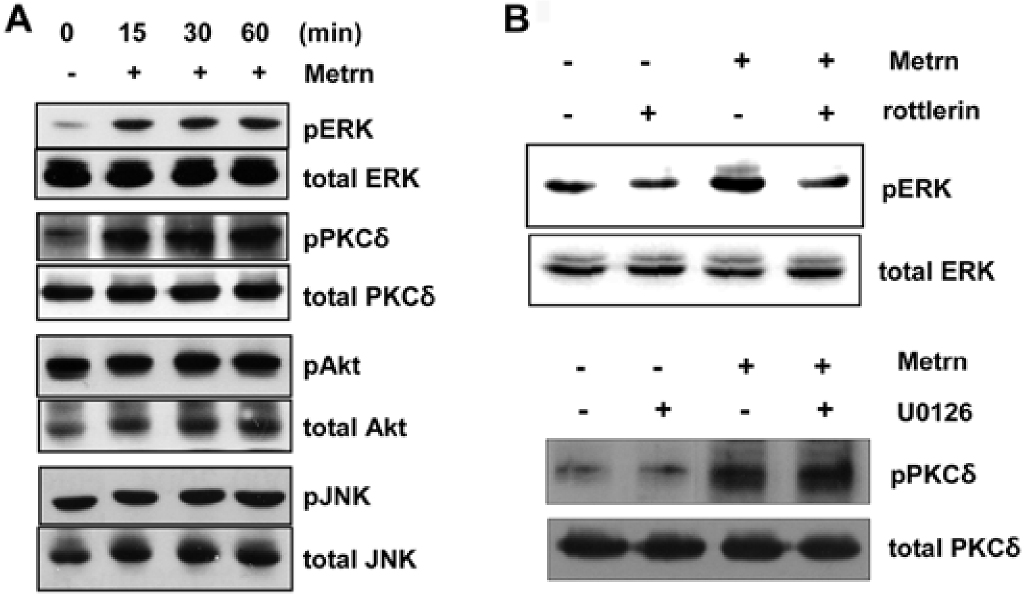

Fig. 4 – Meteorin activates PKCδ and ERK1/2 in astrocytes. (A) Human astrocytes were treated with purified Meteorin protein for indicated time and phophorylation of kinases at each time were examined by western blot analysis. (B) After pretreatment with rottlerin (upper) or U0126 (lower), Meteorin was added to astrocytes for 1 hour.

활성측정으로 확인되었다(Fig. 2B). 메테오린으로 증가되는 tsp-1프로모터활성은 -2200~-1290 내에 존재하는 염기서열에 직간접으로 결합하는 전사인자에 의해 조절되리라 예상되나 tsp-1프로모터의 활성을 조절하는 구체적인 전사인자에 대한 규명하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다. TSP-1 발현이 전사단계에서 조절되므로 상위신호기작에 대한 연구를 위하여 kinase 억제제를 처리한 결과 메테오린으로 인한 TSP-1의 증가는 PKCδ/ERK1/2 활성신호경로에 의한다는 것을 알 수 있었다(Figs. 3과 4). 즉 메테오린은 성상세포에 작용하여 PKCδ의 활성을 증가시켜 하위 단백질의 활성 및 발현을 조절하리라 예상할 수 있었다. 그 하위 조절인자의 하나로서 TSP-1의 발현과 분비를 증가시켜 궁극적으로는 혈관신생억제신호로서 작동하게 될 것으로 예상된다. TSP-1 이외에도 PKCδ/ERK1/2 활성으로 조절되는 다양한 단백질, 특히 혈관신생촉진 또는 억제에 관여하는 단백질의 변화가 예상되므로 이들 단백질의 발굴 또한 흥미로울 것이다.

메테오린은 단량체로 분비되고, 시험관내에서의 분리정제가 용이하며, 뇌조직에서 쉽게 확산되는 단백질이다.[6,15] 따라서 메테오린단백질의 구체적인 기작을 규명함으로써 성상세포와 혈관세포간 상호작용의 손상으로 야기되는 뇌질환의 치료제로서의 가능성을 제시할 수 있게 된다.

참고문헌

1) Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E. : Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci*. **7**, 41 (2006).
2) Kim, J. H., Kim, J. H., Park, J. A., Lee, S. W., Kim, W. J., Yu, Y. S. and Kim, K. W. : Blood-neural barrier: Intercellular commmunication at glio-vascular interface. *J. Biochem. Mol. Biol*. **39**, 339 (2006).
3) Zlokovic, B. V. : The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178 (2008).
4) Lee, S. W., Kim, W. J., Choi, Y. K., Song, H. S., Son, M. J., Gelman, I. H., Kim, Y. J. and Kim, K.-W. : SSecCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med*. **9**, 900 (2003).
4) Park, J. A., Lee, H. S., Ko, K. J., Park, S. Y. and Kim, K.-W. : Meteorin regulates angiogenesis at the gliovascular interface. *Glia* **56**, 247 (2008).
5) Choi, Y. K. and Kim, K.-W. : AKAP12 in astrocytes induces barrier functions in human endothelial cells through protein kinase C. *FEBS J.* **275**, 2338 (2008).
6) Park, J. A., Lee, H. S., Ko, K. J., Park, S. Y. and Kim, K.-W. : Meteorin regulates angiogenesis at the gliovascular interface. *Glia* **56**, 247 (2008).
7) Park, J. A., Song, H. S., Lee, H. S. and Kim, K.-W. : Isolation of a hypoxia/reoxygenation regulatory factor in rat astrocytes. *Yakhak Hoeji* **40**, 124 (2006).
8) Nishino, J., Yamashita, K., Hashiguchi, H., Fujii, H., Shimazaki, T. and Hamada, H. : Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension. *EMBO J.* **23**, 1998 (2004).
9) Adams, J. C. : Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **17**, 25 (2001).
10) Lawler, J. : The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr. Opin. Cell. Biol*. **12**, 634 (2000).
11) Volpert, O. V., Pili, R., Sikder, H. A., Nelius, T., Zaichuk, T., Morris, C., Shiflett, C. B., Devlin, M. K., Conant, K. and Alani, R. M. : Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* **2**, 473 (2002).
12) Lawler, J. : Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Cell Mol. Med*. **6**, 1 (2002).
13) Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mullowney, C. E., Hll, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P. and Barres, B. A. : Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421 (2005).
14) Hanahan, D. and Folkman, J. : Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353 (1996).
15) Jorgensen, J. R., Thompson, L., Fjord-Larsen, L., Krabbe, C., Torp, M., Kalkkinen, N., Hansen, C. and Wahlber, L. : Characterization of Meteorin-An evolutionary conserved neurotrophic factor. *J. Mol. Neurosci*. (2009) [Epub ahead of print].