

Tissue transglutaminase가 죽상동맥경화증 심장동맥에서 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

김승오, 김민경, 서동현, 김찬웅¹, 조승묵²

한장희, 박정현, 박경한, 김대중

강원대학교 의과대학 해부학교실, ¹중앙대학교 의과대학 응급의학교실

²가천의학전문대학원 해부학교실

간추림 : Tissue transglutaminase (tTGase)는 세포외기질 (extracellular matrix)의 유지를 위한 번역후수식 (post-translational modification) 작용과, 세포 안팎의 신호 전달체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 죽상동맥경화의 발생 기전에서 nuclear factor- κ B (NF- κ B)의 활성화에 미치는 tTGase의 영향을 조사하고자 하였다.

초기 및 고도의 죽상동맥경화증을 동반하는 한국인 40대 남성의 심장동맥을 대상으로 tTGase 및 NF- κ B 활성화의 중요 요소인 I- κ B (inhibitor of NF- κ B)의 활성을 조직면역염색으로 관찰하였다.

죽상동맥경화증의 진행에 따른 tTGase의 단백질 발현의 증가를 확인하였고, 고도로 진행된 혈관의 신생혈관내막 (neointima)에서 I- κ B의 활성이 증가하였다. 쥐의 심장근육세포로부터 유래된 세포주 (H9c2)와 tTGase 단백질이 과발현된 세포주 (H9c2/ tTGase)를 대상으로 tTGase의 억제제를 이용하여 tTGase의 발현과 I- κ B 인산화를 비교한 결과 tTGase가 I- κ B의 인산화를 촉진시키는 결과를 얻었다.

본 실험을 통해 얻은 결과들은 tTGase와 NF- κ B pathway의 활성화기전 사이에 연관성이 있음을 시사하고 있으며, 심장동맥의 죽상동맥경화 발생기전에서 tTGase 단백질의 역할을 규명하는 작업의 바탕이 될 것이다.

찾아보기 낱말 : tissue transglutaminase, NF- κ B, 죽상동맥경화, 심장동맥

서 론

혈관 민무늬근육의 증식과 비후는 동맥경화성 혈관질환의 여러 가지 병리조직학적 특징 중의 하나로서, 세포의 증식과 세포자멸사 (apoptosis) 사이의 미묘한 균형이 민무늬근육의 전체 양을 결정하는 중요한 요소이다. 즉, 세포의 증식을 일으키는 자극과 세포자멸사를 억제하는 신호가 결합될 경우 혈관의 벽을 구성하는 민무늬근육 세포의 전체 부피는 증가하게 된다. 지금까지 발표된 연구결과들에 의하면 이와 같은 균형을 저해하는 물질의 하나로

서 활성산소 (reactive oxygen species: ROS)의 역할을 주목하고 있다. ROS는 각종 성장인자 (growth factor)에 의해 세포내 생산이 증가하게 되고, 이렇게 증가한 ROS는 MAPK (mitogen activated protein kinase) 경로의 인산화 (phosphorylation)를 촉발시켜 세포의 증식과 성장을 유도하며, 동시에 아직 확실치는 않으나 세포자멸사를 억제하는 기전을 일부분 자극하는 것으로 알려져 있다 (Tsai 등 1996, Brown 등 1999).

NF- κ B pathway는 죽상동맥경화의 발생 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 이미 알려져 있다 (Brand 등 1996, Ross 등 1999, Li와 Karin, 1999). NF- κ B는 동맥경화의 발병 초기에 죽상판 (plaque) 속에서 발

교신저자 : 김대중 (강원대학교 의과대학 해부학교실)
E-mail : camackim@kangwon.ac.kr

현이 증가한다. 뿐만 아니라 oxidative stress를 비롯하여 죽상동맥경화를 일으키는 것으로 알려진 많은 요소들이 NF- κ B를 동시에 활성화시킬 수 있다는 점(Collins와 Cybulsky, 2001)과 NF- κ B와 연관된 여러 가지 유전자들이 질병이 일어난 혈관에서 발현되는 점 등으로 미루어 죽상동맥경화의 발병기전에서 중요한 역할을 하는 신호전달계 중의 하나라는 것을 짐작할 수 있다. NF- κ B 억제제를 처리하였을 때 pro-atherogenic factor 들에 의한 영향이 줄어드는 것이 확인되었으나(Bellas 등 1995, Selzman 등 1999) 불행히도 아직 NF- κ B가 동맥경화를 일으킨다는 직접적인 증거는 없는 실정이다. 더욱이 동맥경화가 이미 진행된 혈관에서 죽상판(plaque)에 미치는 NF- κ B의 역할은 아직 밝혀지지 않은 부분이 많다.

Transglutaminase (TGase)는 생체 내에서 마치 생물학적 접착제와 같은 역할을 하며 조직 손상의 억제 및 복구에 깊이 관여한다. 따라서 여러 가지 질병의 병인과도 매우 밀접한 관계를 갖고 있는 것으로 알려진 물질이다. Glutamine과 lysine residue를 서로 묶어 주는 공유결합 형성에 관여함으로써 단백질 안정화시키는 것이 TGase의 가장 대표적인 기능이다. 조직의 곳곳에서 광범위하게 발현되는 TGase 군은 각각 다른 기질과 생리기능을 갖는 다양한 효소로 구성되는데 그 중에서도 혈구세포의 응고에 관여하는 factor XIIIa와 손상조직의 복구, 신혈관형성, 뼈형성 등에 중요한 역할을 하는 tissue TGase (tTGase, TGII 또는 TG_H 이하 tTGase) 등이 대표적인 구성 효소이다. 그중에서도 tTGase는 Ca⁺⁺ 의존성 결합반응을 통해 세포외기질이 치밀하게 유지될 수 있도록 번역후수식(post-translational modification) 작용에 관여하는 것으로 알려져 있으므로 tTGase를 매개로 하는 세포외기질 구성 단백질의 조합은 매우 중요한 병태생리학적 의미를 갖고 있다. tTGase의 이와 같은 작용에 덧붙여서 최근에는 tTGase가 신호전달계에도 일부 관여할 것이라는 증거들이 발표되고 있어 더욱 주목을 끌고 있다. tTGase가 미세아교세포에서 NF- κ B의 활성화시켰다거나(Antonyak 등 2002) ERK 경로와 retinoic acid에 의해 유발된 tTGase 활성화의 연관 관계에 관한 결과

(Antonyak 등 2003)들은 신호전달경로에서 tTGase의 역할을 암시하는 것들이라고 할 수 있다. 저자들은 사람 심장동맥에서 죽상동맥경화증의 진행에 따라 NF- κ B가 활성화 되는 것은 보고하였으며(Shin 등 2006), 본 연구에서는 심장근육세포를 대상으로 tTGase에 의한 NF- κ B 활성화의 경로를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사람 심장동맥 시료

한국인 40대 남자의 심장동맥 시료는 국립과학수사연구소에 보관되어 있는 사람 심장동맥 파라핀 블록을 대상으로 하였다. 사람 심장동맥 조직의 파라핀 블록은 부검을 통해 얻은 것으로서 일차 병리 조직 검사를 통해 정상 조직과 죽상동맥경화증 조직을 구분하였다. 정상 조직은 사고로 인해 사망한 40대 한국인 남성의 예에서 얻었으며, 죽상동맥경화증 조직들은 급성심근경색증으로 사망한 40대 남자의 예에서 얻었다. 죽상동맥경화증 조직을 채취한 예의 경우 사망 직전의 기록을 토대로 혈관 벽에 NF- κ B를 활성화시킬 수 있는 감염성질환의 가능성을 최대한 배제하고자 하였다.

2. 면역조직화학염색

Poly-L-Lysine 또는 젤라틴으로 코팅된 슬라이드 글라스를 이용하여 4 μ m의 절편을 만든 후 통상의 방법으로 파라핀을 제거하였다. 조직 절편을 3.0% hydrogen peroxide (in PBS)로 15분간 처리하여 내인성 과산화 효소를 불활성화 하였고 1차 항체의 반응에 앞서 비특이적 반응을 없애기 위해 2% BSA (in DW)로 30분간 처리하였다. 1차 항체는 상온에서 4시간, 또는 4°C에서 12시간 처리하였고, 2차 항체의 처리는 사용화된 키트(N-Histofine simple stain MAX PO, Nichirei)를 이용하였다. 발색반응은 AEC substrate kit (ScyTek, USA)를 사용하였다. TTBS (Tween-Tris Buffered Saline: 0.1% Tween-20 in 100 mM Tris-CL, pH 7.5, 0.9% NaCl)로 세척한 후

hematoxylin으로 대조염색 한 후 DPX로 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. 세포배양 및 oxidative stress 유도

쥐 심장근육 세포주(CRL-1446)는 ATCC에서 구입하여 제공된 자료에 따라 배양하였다. 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 4 mM L-glutamine, 0.2 mg/mL G418 등이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 속에서 5% CO₂, 37°C로 유지된 CO₂ incubator 환경에서 배양하였다. tTGase 활성 유발제로서 retinoic acid를 일반적으로 이용하지만 본 실험에서는 심장동맥경화증과 유사한 환경을 얻기 위하여 oxidative stress를 이용하여 tTGase의 발현을 유도하였다. Oxidative stress는 동일한 세포주를 대상으로 얻은 LD₅₀ 결과를 토대로 H₂O₂ (300 μ M)를 일정한 시간 간격으로 처리하는 방법을 이용하였다.

4. Western blotting 방법

세포추출물에 대하여 각 대상 단백질의 항체를 사용하여 immuniblotting을 시행하였다. 즉, 100-mm 배양접시에 준과밀도로 자란 세포들을 cold PBS로 2~3회 씻은 후, 세포들을 수확한 후, RIPA 완충액 (10 mM Tris-Cl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton X-100; 1% sodium deoxycholate; 0.1% SDS; 25 μ g/mL leupeptin; 20 μ g/mL phenylmethylsulfonylfluoride; 10 μ g/mL aprotinin; 2 mM benzimidazole)을 넣고 얼음 속에서 10분간 세포들을 용해시켰다. 다시 원심분리 (15,000 \times g, 20분)하여 얻은 상층액에 대해 Bradford assay로 단백질 양을 측정하였다. 동량의 단백질을 Laemmli sample 용액 (62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8; 2% SDS; 10% glycerol; 0.5% β -mercaptoethanol; 10 μ g/mL bromophenol blue)에 넣고 5분간 끓인 후 15% polyacrylamide-gel에 얹고 SDS-PAGE를 실시하였다. 10% CAPS 용액 속에서 gel 내의 단백질을 PVDF membrane으로 이송 (50 V, 50 mA 90분)시켰다. PVDF membrane을 5% BSA가 포함된 TTBS 완충액 (10 mM Tris-Cl, pH 7.4; 50 mM NaCl, 0.05% Tween 20)에 넣고 2시간 상온에서 혼

들어 준 후 각 항체들이 첨가된 TTBS 완충액 속에서 2시간 반응시켰다. TTBS 완충액으로 PVDF membrane을 다시 4~5회 씻은 후 HRP-conjugated anti-mouse IgG (1/5000 dilution)를 넣고 1시간 반응시키고, PVDF membrane을 TTBS 완충액으로 4~5회 씻은 후 enhanced chemiluminescence (Amersham) 방식으로 단백질 밴드를 검출하였다. 비교대상인 세포주의 양을 표준화하기 위해 시료의 단백질 농도를 정량하여 동일한 양의 세포단백질을 전기영동하고, 필요할 경우 SDS-gel을 Coomassie blue 염색을 하여 확인하였다.

5. 사람 tTGase cDNA의 세포주로의 도입

배양 중인 세포에서 oxidative stress를 이용하여 tTGase의 발현을 유도하는 방법은 세포 내에 존재하는 다른 경로의 신호전달계에 영향을 미칠 가능성이 있으므로 tTGase를 과발현하는 세포주를 제조하여 동일한 실험을 실시하였다. 포유동물 발현 vector인 pcDNA3에 tTGase cDNA가 정방향으로 삽입된 plasmid를 세포내로 도입하였다. 60 mm 배양접시에 준과밀도로 자란 세포주들을 serum-free 배양액으로 2번 세척한 후 plasmid (2 μ L)와 LipofectAMIN (Gibco-BRL) 15 μ L를 혼합하여 10분간 상온에서 반응시킨 혼합액이 포함된 serum-free 배양액으로 교체하였다. 세포들을 24시간 배양한 후 해당 세포주에 적합한 배양액으로 교체하여 48~72시간 배양하였다. 대조군 transfectant line을 얻기 위해 pcDNA3 vector 만을 사용해 위와 동일한 방식으로 transfection 시켰다. Stable transfectant 세포들을 선별적으로 배양하기 위하여 G418 (0.2 mg/mL)이 첨가된 배양액을 넣고 세포들을 약 4주간 지속적으로 배양한 후 G418 저항성 clone들을 ring-isolation 방식으로 분리, 배양하였다. 이들 subcloned line들에 대해 앞 4 항에 기술한 방법으로 각각의 단백질의 발현 양상을 모세포나 대조군 transfectant line과 비교하였다.

6. 항체 및 시약

일차항체는 rabbit anti-human tTGase (Neomarker, USA), rabbit anti-rat phospho-Erk1/2 (Cell signaling,

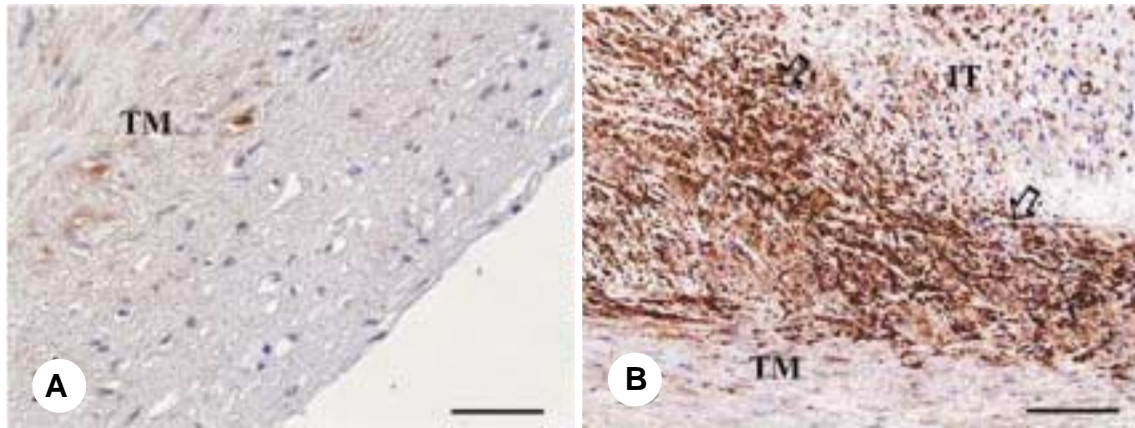


Fig. 1. Representatives of the tTGase immunoreactivity in the human coronary artery with early lesion (A), and advanced lesion (B). tTGase signal was found at low levels in the tunica media (A). In the advanced atherosclerotic coronary arteries, tTGase signal was prominent both in the tunica media (TM) and neointima (B: arrow). IT: intimal thickening. Bar size=200 μ m

USA), rabbit anti-rat phospho-I- κ B (Cell signaling, USA), rabbit anti-human phospho-NF- κ Bp65 (Cell signaling, USA)를 사용하였다. tTGase 억제제로서 monodansyl-1, 5 diaminopentane (MDC: Sigma, USA)와 cystamine (Sigma, USA)을 사용하였다. PD98059 역시 Sigma로부터 구입하여 사용하였다.

결 과

1. 죽상동맥경화증 혈관에서 tTGase와 활성 I- κ B의 발현

동맥경화증의 초기 병변이 관찰되는 심장동맥에서 tTGase 단백질은 혈관 벽의 내피세포층과 중간층을 중심으로 미약하게 발현되었으나, 동맥경화가 고도로 진행된 혈관에서는 이와는 대조적으로 내피세포층과 중간층을 구성하는 근육조직, 그리고 병적으로 증식된 내피밑층(subendothelial layer)에서 강하게 발현되었다(Fig. 1A, B).

NF- κ B 경로는 혈관 민무늬근 세포의 증식에 관여하는 것으로 알려져 있고, 연구자들은 이미 증식된 신생혈관내막(neointima)과 혈관중간막의 연결 부위에 존재하는 민무늬근세포들을 중심으로 NF- κ B가

활성화된다는 사실을 확인하였으므로(Shin 등 2006), 사람의 심장동맥에서 NF- κ B 경로의 중요한 요소인 I- κ B 활성 여부를 비교하였다. 정상 혈관 조직에서는 I- κ B의 활성을 관찰하지 못하였다. 병변이 발생한 혈관에서는 중간층 보다는 새롭게 증식되어 혈관의 속공간을 점유한 부분에서 활성 I- κ B가 관찰되었으며, 지방성분(lipid core) 주변에서도 작은 점의 형태로 활성 I- κ B가 관찰되었다(Fig. 2).

2. Oxidative stress에 의한 tTGase와 NF- κ B 경로의 변화

동맥경화증이 발생한 혈관에서 관찰되는 NF- κ B의 활성화와 tTGase와의 관계를 규명하기 위하여 oxidative stress를 가한 심근세포주를 이용하여 tTGase의 발현, NF- κ B pathway의 활성을 관찰하였다. tTGase 단백질은 oxidative stress에 대해서 자극의 강도에 비례하여 30분 처리군까지는 발현이 증가하였으며 이후 감소하는 양상을 보였다(Fig. 3). 120분 처리군에서 tTGase의 발현량이 급격히 감소한 것은 세포의 사멸과 연관이 있는 것으로 추정된다. 동일한 자극 강도의 변화에 대응하여 NF- κ B 활성화에 중요한 역할을 담당하는 I- κ B의 인산화가 증가하였으며 tTGase의 발현과 마찬가지로 30분 처리군에서

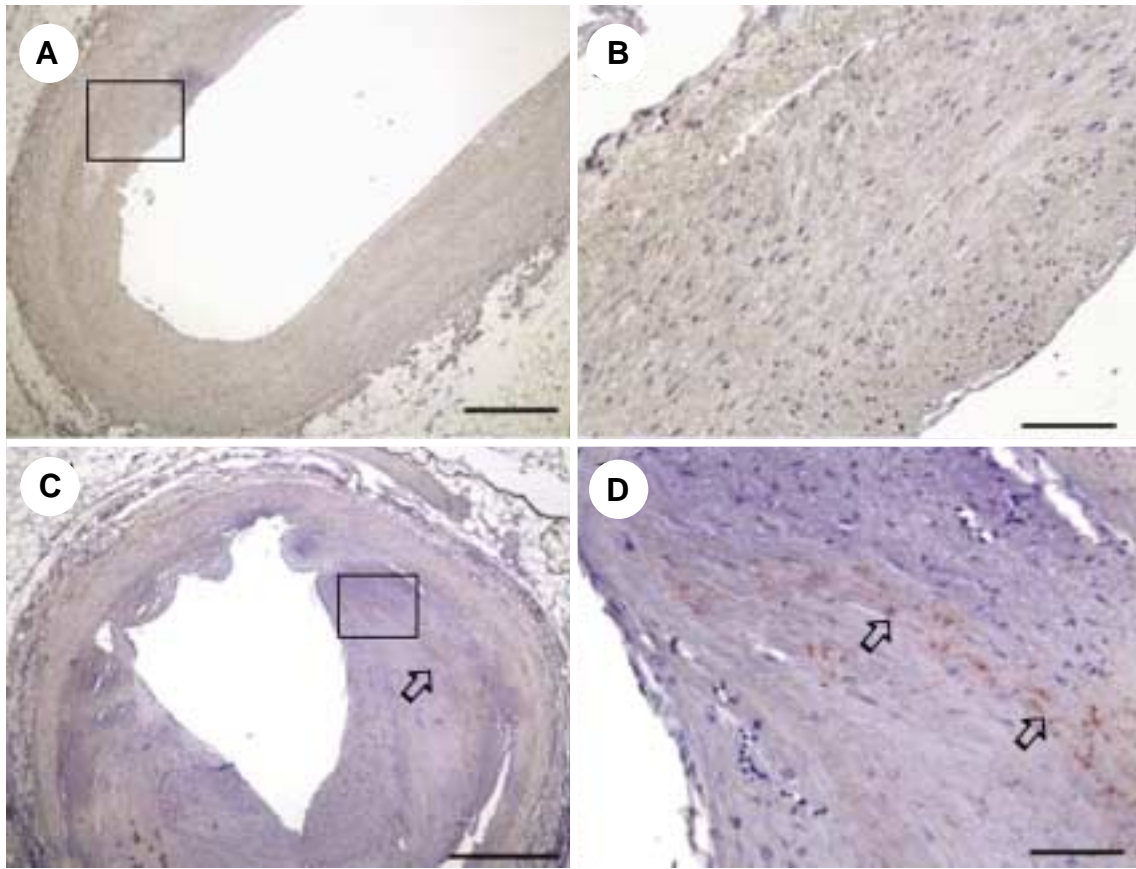


Fig. 2. Representatives of phosphorylated I- κ B immunoreactivity in the human coronary artery with early lesion (A), and advanced lesion (C). Phosphorylated I- κ B signal was hardly detected in the vessel wall with early lesion. In the advanced atherosclerotic coronary arteries, phosphorylated I- κ B was found in the neointima (C: arrow). Panel B and D show higher magnification micrograph of the boxed area. Bar size=500 μ m (A and C), 200 μ m (B and D)

가장 강한 활성을 보였다. NF- κ B의 인산화 역시 tTGase, I- κ B의 인산화와 유사한 변화가 관찰되었다(Fig. 3). tTGase와 I- κ B 인산화 변화와의 관계를 확인하고자 oxidative stress에 대해서 가장 강하게 반응하는 10분 처리군을 대상으로 tTGase의 길항제인 cystamine (500 μ M)과 MDC (monodansyl cadaverine: 500 μ M)를 처리하고 변화를 관찰하였다. Oxidative stress에 의해서 증가하였던 I- κ B와 NF- κ B의 인산화 정도가 tTGase 길항제 처리군에서 급격하게 감소하였다(Fig. 4).

3. tTGase 과발현 세포에서 ERK 1/2 경로의 변화

tTGase 과발현은 ERK 1/2와 I- κ B 인산화를 촉진하는 것으로 관찰되었으며, tTGase 길항제인 MDC는 ERK 1/2와 I- κ B 인산화를 동시에 억제하였다(Fig. 5). 흥미롭게도 ERK 1/2의 인산화에 작용하는 PD98059 (MEK1/2 억제제)를 처리하였을 때 ERK1/2와 I- κ B의 인산화는 물론이고 tTGase의 발현 역시 미세하게 감소하는 양상을 보였다. MAPK는 세포의 증식을 위하여 중요한 신호전달체계이다. ERK1/2는

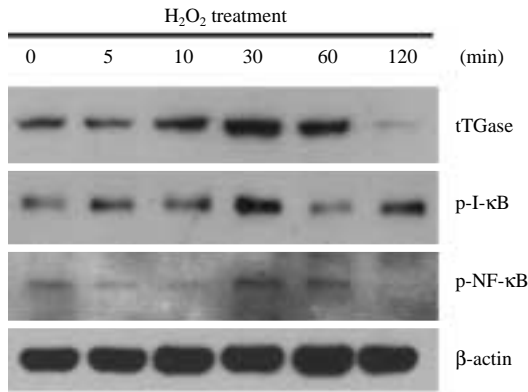


Fig. 3. Induction of tTGase and the I-κB phosphorylation in rat cardiomyoblast (H9c2 from ATCC) by oxidative stress. tTGase protein (85 kDa) was time-dependently induced by H₂O₂ (300 μM). Phosphorylation level of the I-κB and NF-κB also show similar course of change with tTGase to oxidative stress.

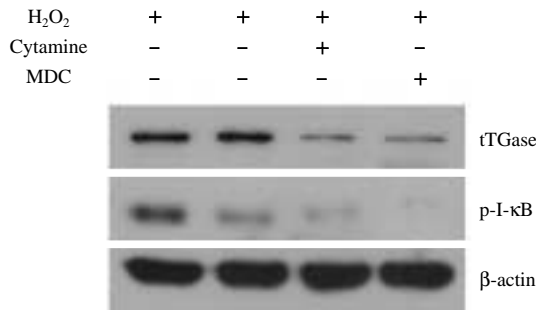


Fig. 4. Phosphorylation of I-κB was blocked by tTGase-specific inhibitors in the oxidative stressed rat cardiomyoblast. H9c2 cells were pre-treated with MDC (monodansyl-1, 5 diaminopentane, 500 μM) and cystamine (500 μM) for 24 hrs, respectively, followed by 30 min H₂O₂ treatment (300 μM). Reduction of I-κB phosphorylation level was observed markedly in the MDC and cystamine-treated cells.

민무늬근육 세포의 증식을 자극하는 요소로서, 손상을 입은 실험동물의 동맥 조직에서 매우 큰 폭으로 증가하는 것으로 알려져 있다(Lille 등 1997). 따라서 ERK1/2의 활성화에 미치는 tTGase의 영향은 혈관 민무늬근육의 증식과 tTGase 단백질 사이의 연결 가능성을 시사하는 결과라고 할 수 있다.

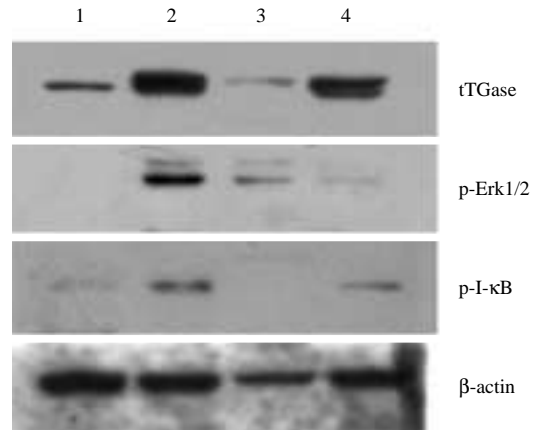


Fig. 5. Phosphorylation of Erk1/2 and I-κB is blocked by MDC and MEK1/2 inhibitor in tTGase-overexpressed H9c2 cells. H9c2/TG cells were treated with 500 μM of MDC (lane 3) and 10 μM of PD98059 (lane 4) for 24 hrs. MDC-treated cells showed marked reduction of phosphorylation of Erk1/2 and I-κB, simultaneously, compare to untreated cells (lane 2). PD98059 reduced the expression of tTGase. Lane 1: control

고 찰

Tissue transglutaminase는 세포외기질의 단백질들을 서로 연결시키는 기능을 통해 세포외기질을 안정화시키는 역할을 한다. tTGase의 기질로서 여러 종류의 기질 단백질들이 알려져 있으며, 그중에는 fibronectin (Tamaki와 Aoki 1981), fibrinogen (Chen와 Doolittle 1971), osteonectin (Aeschlimann 등 1995), osteopontin (Prince 등 1991), collagen (Moshier, 1984), vitronectin (Sane 등 1988), elafin (Nara 등 1994) 등이 포함된다. 위에 열거한 tTGase의 여러 가지 기질들의 면면에서도 알 수 있듯이 tTGase는 세포외기질의 구조 유지 및 대사를 위해 매우 중요한 역할을 수행하고 있으며, 따라서 그 작용이 비정상적으로 이루어질 경우 비정상적으로 증식되는 섬유화(fibrosis) 또는 동맥경화증(Aeschlimann와 Tomazy 2000)과 같은 병적인 상태를 초래할 수 있다. 뿐만 아니라 tTGase는 LDL (low density lipoprotein) 구성요소 중의 하나인 lipoprotein (a)와 세

포외기질 간의 연결을 촉진시킴으로써 죽상동맥경화 혈관의 죽상판 형성에도 일정한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 아직 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 lipoprotein (a)가 tTGase의 기질로 작용할 가능성이 있다(Bowness 등 1989, Borth 등 1991, Romanic 등 1998). 죽상동맥경화증이 고도로 진행된 사람의 심장동맥에서 tTGase는 주로 혈관 민무늬근 세포들 주위에서 정상 혈관에 비해 매우 높게 발현되고 있는 결과는 tTGase가 동맥경화가 진행된 혈관의 복잡하고 다양한 병리현상과 관련이 있을 것임을 시사한다. 특히 tTGase의 활성이 혈관 민무늬근 세포들 중에서도 주로 내피밑층(subendothelial layer)에서 유래된 신생혈관내막(neointima)의 민무늬근세포들에서 강하게 나타나는 것은 tTGase와 병적으로 증식된, 또는 증식중인 혈관 민무늬근 세포들과의 밀접한 관계를 예상하게 하는 결과라고 할 수 있다.

혈관 민무늬근 세포들의 증식과 그 결과로 이루어지는 신생혈관내막 층의 형성은 동맥경화와 풍선 혈관성형술(balloon angioplasty) 후에 발생하는 혈관 재협착(restenosis)의 중요한 병태생리학적 현상이다. 민무늬근육 세포들의 증식과 연관된 여러 가지 신호전달체계를 중에서 NF-κB (Hoshi 등 2000, Sasu 등 2000, Wang 등 2002), MAPK (Koyama 등 1998, Che 등 2001), PI-3K (Duan 등 2000, Shigematsu 등 2000) 등이 잘 알려진 신호전달체계들이다. 죽상동맥경화증이 진행된 혈관 조직에서 NF-κB 단백질의 발현은 이미 관찰된바 있으며 (Brand 등 1996), 내피층의 손상을 입은 혈관의 민무늬근육 세포들에서도 발현이 관찰되었다 (Cercek 등 1997, Landry 등 1997). 본 실험 결과 및 다른 결과에서도 정상혈관과 비교하여 병변이 진행된 혈관의 경우 증식된 중간층의 민무늬근세포 주위에서 NF-κB 및 I-κB 단백질의 활성이 관찰되어 신생혈관내막 층의 민무늬근 세포들의 증식과 NF-κB 경로의 활성이 서로 연관 관계에 있음을 보여주고 있다.

최근 tTGase 연구자들은 이 단백질이 세포외기질의 각 구성 단백질들을 묶어주는 단순한 접착제의 역할뿐만이 아니라 신호전달체계에서도 특정한 역할을 할 것이라는 여러 가지 증거들을 보고하고 있

으며, 그중 대표적인 것으로서 tTGase와 NF-κB pathway와의 상관관계를 보여주는 보고에 따르면 tTGase는 I-κB를 중합반응(polymerization)을 통해 NF-κB 경로를 활성화시켜서 다양한 세포작용을 이끌어낸다고 하였다(Lee 등 2004). 본 실험의 결과에서도 tTGase가 NF-κB 경로를 활성화시킬 수 있는 능력이 있는 것으로 확인되었다. 그러나 세포배양을 통해 얻은 결과에 의하면 NF-κB를 활성화시키는 기전으로 I-κB 중합반응 이외에 tTGase는 I-κB의 인산화 반응 역시 촉진시키는 것으로 생각된다. NF-κB는 IKK의 인산화 과정을 통해 I-κB를 떼어냄으로써 핵 속으로 이동하여 전사물질(transcription factor)로서의 역할을 수행하게 된다. Sachi 등(2000)은 Erk1/2가 혈관민무늬근육 세포에서 I-κB의 작용을 저하시킨다고 보고하였는 바, 본 실험 결과 중 tTGase 과발현세포에서 Erk1/2가 정상대조군의 세포에 비해서 강하게 발현되는 것은 tTGase가 NF-κB를 활성화시키는 과정에서 Erk1/2의 역할을 생각할 수 있는 증거라고 할 수 있다. tTGase 길항제 처리에 의해 Erk1/2의 활성이 저하되는 결과 역시 이와 같은 해석을 뒷받침한다.

연구자들은 본 실험을 통하여 죽상동맥경화증이 진행된 사람의 심장동맥에서 tTGase 단백질의 발현 증가와 NF-κB 경로 구성 단백질의 활성을 관찰하였으며 심장근육세포주 및 tTGase 과발현 세포주를 이용하여 tTGase 단백질과 NF-κB 경로 활성기전 사이의 연관성을 뒷받침하는 결과를 얻었다. 이와 같은 결과들을 바탕으로 앞으로 심장동맥의 죽상동맥경화 발생기전에서 tTGase 단백질의 역할을 규명하고자 한다.

참 고 문 헌

- Aeschlimann D, Kaupp O, Paulsson M : Transglutaminase-catalyzed matrix cross-linking in differentiating cartilage: identification of osteonectin as a major glutaminyl substrate. *J Cell Biol* 129: 881-892, 1995.
- Aeschlimann D, Tomazy V : Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res* 41: 1-27, 2000.

- Antonyak MA, Boehm JE, Cerione RA : Phosphoinositide 3-kinase activity is required for retinoic acid-induced expression and activation of the tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 277: 14712-14716, 2002.
- Antonyak MA, McNeill CJ, Wakshlag JJ, Boehm JE, Cerione RA : Activation of the Ras-ERK pathway inhibits retinoic acid-induced stimulation of tissue transglutaminase expression in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 278: 15859-15866, 2003.
- Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE : Expression of a constitutive NF-kappa B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 96: 2521-2527, 1995.
- Borth W, Chang V, Bishop P, Harpel PC : Lipoprotein (a) is a substrate for factor XIIIa and tissue transglutaminase. *J Biol Chem* 266: 18149-18153, 1991.
- Bowness JM, Folk JE, Timpl R : Identification of a substrate site for liver transglutaminase on the aminopropeptide of type III collagen. *J Biol Chem* 262: 1022-1024, 1987.
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D : Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97:1715-1722, 1996.
- Brown MR, Miller FJ Jr, Li WG, Ellingson AN, Mozena JD, Chatterjee P, Engelhardt JF, Zwacka RM, Oberley LW, Fang X, Spector AA, Weintraub NL : Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85: 524-533, 1999.
- Cercek B, Yamashita M, Dimayuga P, Zhu J, Fishbein MC, Kaul S, Shah PK, Nilsson J, Regnstrom J : Nuclear factor-kappaB activity and arterial response to balloon injury. *Atherosclerosis* 131: 59-66, 1997.
- Che W, Abe J, Yoshizumi M, Huang Q, Glassman M, Ohta S, Melaragno MG, Poppa V, Yan C, Lerner-Marmarosh N, Zhang C, Wu Y, Arlinghaus R, Berk BC : Bcr mediates platelet-derived growth factor activation of extracellular signal-regulated kinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104: 1399-1406, 2001.
- Chen R, Doolittle RF : Cross-linking sites in human and bovine fibrin. *Biochemistry* 10: 4487-4491, 1971.
- Collins T, Cybulsky MI : NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107: 255-264, 2001.
- Duan C, Bauchat JR, Hsieh T : Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 86: 15-23, 2000.
- Hoshi S, Goto M, Koyama N, Nomoto K, Tanaka H : Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear factor-kappaB and its inhibitor, I-kappaB. *J Biol Chem* 275: 883-889, 2000.
- Irani K : Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell. *Mitogenic and Apoptotic Signaling* 87: 179-183, 2000.
- Koyama H, Olson NE, Dastvan FF, Reidy MA : Cell replication in the arterial wall: activation of signaling pathway following in vivo injury. *Circ Res* 82: 713-721, 1998.
- Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V : Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol* 151: 1085-1095, 1997.
- Lee J, Kim YS, Choi DH, Bang MS, Han TR, Joh TH, Kim SY : Transglutaminase 2 induces nuclear factor-kappaB activation via a novel pathway in BV-2 microglia. *J Biol Chem* 279: 53725-53735, 2004.
- Li N, Karin M : Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 13: 1137-1143, 1999.
- Nara K, Ito S, Ito T, Suzuki Y, Ghoneim MA, Tachibana S, Hirose S : Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem (Tokyo)* 115: 441-448, 1994.
- Prince CW, Dickie D, Krumdieck CL : Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 1205-1210, 1991.
- Romanic AM, Arleth AJ, Willette RN, Ohlstein EH : Factor XIIIa cross-links lipoprotein (a) with fibrinogen and is present in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 83: 264-269, 1998.
- Sane DC, Moser TL, Pippen AM, Parker CJ, Achyuthan KE, Greenberg CS : Vitronectin is a substrate for transglutaminases. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 115-120, 1988.
- Sasu S, Beasley D : Essential roles of IkappaB kinases alpha

- and beta in serum- and IL-1-induced human VSMC proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1823-1831, 2000.
- Selzman CH, Shames BD, Reznikov LL, Miller SA, Meng X, Barton HA, Werman A, Harken AH, Dinarello CA, Banerjee A : Liposomal delivery of purified inhibitory-kappa-Balpha inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced human vascular smooth muscle proliferation. *Circ Res* 84: 867-875, 1999.
- Shigematsu K, Koyama H, Olson NE, Cho A, Reidy MA : Phosphatidylinositol 3-kinase signaling is important for smooth muscle cell replication after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2373-2378, 2000.
- Shin EK, Kim MK, Ahn JS, Kim SO, Lee JH, Park JH, Hanh JH, Cho CK, Cho SM, Kwon TJ, Kim DJ : Activation of nuclear factor-kB in the atherosclerotic human coronary artery. *Kor J Anat* 39: 111-118, 2006. (in Korean)
- Tamaki T, Aoki N : Cross-linking of alpha 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor. *Biochim Biophys Acta* 661: 280-286, 1981.
- Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, Lee WS, Yoshizumi M, Patterson C, Perrella MA, Cooke C, Wang H, Haber E, Schlegel R, Lee ME : Induction of apoptosis by pyrrolidine dithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 271: 3667-3670, 1996.
- Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH : An I kappa B-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 102: 198-206, 2002.

Abstract

Tissue Transglutaminase Activates NF- κ B Pathway in the Atherosclerotic Coronary Artery

Seung-Oh Kim, Min-Kyoung Kim, Dong-Hyun Suh, Chan-Woong Kim¹,
Seung-Muk Cho², Jang-Hee Hahn, Jeong-Hyun Park,
Kyoung-Han Park, Dae-Joong Kim

Department of Anatomy, College of Medicine, Kangwon National University

¹*Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Chungang University*

²*Department of Anatomy, Gachon Medical School*

Molecular mechanism of nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the atherosclerosis has been unclear. Recently, NF- κ B activating function of tissue transglutaminase (tTGase), multifunctional calcium-dependent transamidation enzyme, have been reported in the various tissues like neuroglia.

In this report, we investigated the immunoreactivity of tTGase at the human atherosclerotic coronary artery, and examined the effect of tTGase on the well-known proatherogenic NF- κ B pathway using tTGase-overexpressed cells.

Immunohistochemical studies on autopsy samples showed that immunoreactivity of tTGase was markedly elevated in the neointimal tissues of atherosclerotic coronary arteries with progression of disease. Immunohistochemical staining also demonstrated that phosphorylated I- κ B was activated in the atherosclerotic vessel wall. In vitro study using rat cardiomyoblast (H9c2) and tTGase-overexpressed H9c2 showed that activated tTGase enhanced the phosphorylation of I- κ B, and this activation was inhibited by tTGase specific inhibitors.

These findings suggest that cytosolic tTGase may serve as an activator of NF- κ B.

Key words : Tissue transglutaminase, NF- κ B, Atherosclerosis, Coronary artery