

인간 교세포주에서 CoCl₂에 의한 phospholipase D의 조절기전

이승훈 · 민계식¹ · 민도식*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, ¹진주산업대학교 미생물공학과

Received June 5, 2006 / Accepted June 21, 2006

Regulation of Phospholipase D by CoCl₂ in Human Glioblastoma Cells. Seung Hoon Lee, Gyesik Min¹ and Do Sik Min*. *Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, ¹Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea* – Phospholipase D (PLD) is known to play an important role in a variety of cells. However, little is known about CoCl₂-mediated PLD signaling. In this study we demonstrated for the first time that CoCl₂ stimulates PLD activity and increases expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), which is known to mediate inflammatory reaction. CoCl₂-induced PLD activity was assessed by measuring the formation of [³H] phosphatidylbutanol (PtdBut), the product of PLD-mediated transphosphatidylation, in the presence of 1-butanol. To study mechanism of PLD signaling induced by CoCl₂, U87 human glioblastoma cells were stimulated by CoCl₂ and regulators of PLD activity induced by CoCl₂ were investigated using several inhibitors of signaling proteins. Moreover, PLD activation by CoCl₂ increased not only expression of COX-2 protein but also COX-2 promoter activity. In summary, these results suggest that CoCl₂ increases expression of COX-2 protein via PLD in human U87 glioblastoma cells.

Key words – CoCl₂, phospholipase D, glioma, COX-2

서 론

Phospholipase D (PLD)는 주요 인지질인 phosphatidylcholine을 이차신호전달 물질인 phosphatidic acid (PA)와 choline으로 가수분해 시켜주는 작용을 촉진시킨다 [10,29]. PA는 또한 물질대사를 거치며 다른 신호전달 물질인 lysophosphatidic acid (LPA)와 diacylglycerol (DAG)로 변환되기도 한다. PLD는 염증, 과립의 이동과 분비, 증식, 분화, 사멸, 신경과 심장 자극, 당뇨, 그리고 호중성 백혈구에서의 호흡작용 등 병리생리학적 과정의 광범위한 영역에 관여한다 [11]. 현재 사람에게서 PLD1과 PLD2의 두 가지 PLD 동위효소가 보고되었는데, 이 동위효소는 50%의 아미노산 유사성을 가지지만 꽤 다른 조절적인 특성을 가진다 [18,36]. 우선 PLD1은 낮은 수준의 활성을 가지고 있고, ARF, Rho 그리고 Ral 등의 small G protein들과 phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP₂), 그리고 protein kinase Ca (PKCa)에 의해 활성화된다 [17,18,43,46]. PLD1은 골지체를 포함하는 핵주변의 영역, 엔도솜, 리소솜, 그리고 원형질막뿐만 아니라 mast 세포들에서의 히스타민 과립구와 지방세포들에서의 glut4을 내포하는 소포들과 같은 특별한 소포들에 존재한다고 보고되고 있고 caveolae에 위치하고 있다 [13,24]. 반면에 PLD2는 일정하게 높은 수준의 활성을 띠고 있고 oleate, PIP₂, 그리고 PKCa 등에 의해 활성화된다. PLD2는 일반적인

로 원형질막, 그리고 어떤 경우에는 엔도솜에서 발견되고 caveolae에 위치하고 있다 [8].

활성화된 세포에서 phospholipase A2 (PLA₂)와 PLD 효소들 사이에서는 기능적인 상호관계를 가진다. 다른 증거들으로써 cPLA₂가 활성화된 경우, 자극에 의해 유도되어지는 arachidonic acid (AA)의 방출이 PLD의 약물적인 방해에 의해서 억제 된다는 것이 보고되었다. 그리고 세포가 활성화되어 있는 동안 PLD의 기능적인 역할로써 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 조절하는 것이 제시되었다 [2,3,14,23]. 두 PLD 동위효소들 모두 일차 알코올을 사용하면 PLD의 반응산물이면서 이차신호전달 물질로써 작용하는 PA가 형성되는 대신 phosphatidylalcohol이 형성됨으로써 PLD에 대한 신호전달을 막는다. 예를 들어, ethanol은 자극에 의해 유도되는 COX-2의 발현 증가를 방해한다 [7,47].

염증반응에 의해 신경적 손상을 받아 활성화된 교세포는 Parkinson's disease (PD) 뿐만 아니라 Alzheimer's disease (AD)의 뇌에서 발견된다 [30,31,38]. 활성화된 교세포에서는 prostanoids, reactive oxygen species (ROS)과 같은 염증 전 사이토카인들이 많이 생성된다 [4,32,33]. 또한 COX-2의 과발현도 AD의 뇌에서 발견되고 있다 [20,37]. 이러한 보고들에 의해서 염증 상태의 microglia 세포에서 COX-2 발현과 연결 지을 수 있다.

저산소증은 많은 생리학적 그리고 질병 상태들에서 주요한 자극이다 [5]. 저산소증에 의해 유도되는 세포 사멸은 허혈성 질병, 조직 이식, 그리고 다른 질병들과 같은 많은 경우들에서 중요하게 관계하는데 그것은 활성 산소의 생성에 의해서도 동반되어진다 [41]. 그리고 많은 보고들에서 CoCl₂가 배

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-3682, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : minds@pusan.ac.kr

양된 세포들에 처리되었을 때 활성산소의 생산을 포함하는 많은 사건들을 일으키는 저산소증 반응들을 만들어 줄 수 있는 물질이라는 것을 보여준다[1,16,26,40,42]. 이처럼 CoCl_2 에 의한 저산소증에 대한 반응들은 hypoxia-induced factor 1 α (HIF-1 α)와 같은 어떠한 유전자의 전사와 활성산소의 생성 등을 포함하는 반응들이다[15,16]. 활성산소는 많은 자극인자들에 의해 생성되고 자극에 관련되는 신호 전달에서 일반적으로 매개자가 된다. 예를 들어 H_2O_2 는 p38의 잠재적인 활성 인자이고[12,21,45], 이 자극적인 효과는 N-acetyl-L-cysteine (NAC)과 같은 항산화제들에 의해서 방해된다[44]. 활성산소는 PKC, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 그리고 nuclear factor- κ B (NF- κ B)와 같은 염증 전 요소들의 발현을 조절하는 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있다[25,39].

Prostanoid는 AA으로부터 변형된 물질로써, PGG₂/H₂ 합성효소인 COX에 의해 생산되어 생물적인 활성을 띠는 다양한 집단을 포함한다[9]. COX는 두 가지 동위효소가 분류되어졌는데, 일정하게 발현되는 COX-1과 일시적으로 발현되는 COX-2이다. 이들 두 단백질은 다른 유전자들에서 암호화되어있고, 약 60%의 일치성을 가지며 모두 비 선택적 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)에 의해 활성이 저해된다[19]. 이러한 유사점 대신에 COX-1과 COX-2 유전자의 발현 양식은 꽤 다르다. COX-1은 여러 조직들에서 일정하게 발현되어지고 위상피체의 유지를 포함하는 house-keeping 기능, 다시 말해서 조직 또는 세포내 항상성 유지에 관여한다. COX-2 발현은 cytokines 뿐만 아니라 mitogenic 요소들에 의해 염증 세포들에서 일시적으로 유도되어진다[6]. PLA₂는 막 인지질을 AA와 LPA로 가수분해반응을 촉진하는데 이는 생물적 활성 매개자로서, 자극에 의해 유도되어지는 AA 방출을 향상시키고, 이는 COX에 의해 촉진되어지는 PG 형성으로 연결되어진다. 그러므로 PGs는 PLA₂와 COX의 일련의 행동에 의해 생산되어진다[28,34,35]. 그리고 염증이 유발되면 모든 세 가지 MAP kinase 경로들의 활성이 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서 지금까지 살펴본 바와 같이, neuroblastoma, glioma, astrocytoma, pheochromocytoma 세포 등을 포함한 다양한 신경세포와 교세포에서 신경 전달 물질과 신경조절 물질들이 PLD 효소활성을 증가시키는 것으로 밝혀짐으로써 세포표면에 존재하는 수용체 배위자를 통한 PLD의 활성화는 세포내 새로운 신호전달 기작에 중요하게 관여하고 있으리라고 추정되어진다. 본 연구에서는 인간 U87 glioblastoma 세포에서 CoCl_2 에 의한 PLD 매개 신호전달 기전을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

Lipofectamine과 PLUS 반응물은 Invitrogen사에서 구입

하였다. CoCl_2 는 Sigma chemical 회사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PD169316, Rottlerin, G66976, U73122, PD98059, U0126, SP600125, PDTC, LY294002, NAC, Catalase, H89, KN93, SB203580, BAPTA과 Wortmannin은 Calbiochem사 (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. COX-2 항체는 Santa Cruz biotechnology사에서 구입하였다. PLD1과 PLD2에 대한 다중성 항체는 이전 논문에서 기술한 것처럼 생산하였다[27]. 양고추냉이 과산화효소와 복합된 anti-goat 면역글로블린 G (IgG), anti-rabbit IgG는 Kirkegaard & Perry Lab으로부터 생산된 것을 구입하였다. ECL Western blotting detection kit는 Amersham Pharmacia Biotech사 (Piscataway, NJ, USA) 제품을 사용하였다. Phosphatidylbutanol (PtdBut) 기준은 Avanti Polar Lipid에서 구입하였고, [³H] myristate는 Perkin-Elmer Life Sciences 사 제품을 구입하여 사용하였다. Silica gel 60 A thin-layer chromatography plate는 Whatman사 (Alabaster, AL, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

세포 배양과 stable transfection

인간 U87 glioblastoma 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 귀착된 세포 개체군은 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 항생물질 (8 mM HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin)과 10% 소의 태아 혈청이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양되었다. 인간 U87 glioblastoma 세포는 대조군으로써 비어있는 기본 벡터와 PLD 동위효소가 발현되는 벡터들을 각각 transfection시켰는데, 이는 제작자가 권유하는 절차대로 lipofectamin과 PLUS 반응물을 사용하여 진행되었다. 여기서 인간 PLD1과 인간 PLD2의 cDNA가 포함된 기본 벡터인 pcDNA3.1 (Clontech, Palo Alto, CA)이 발현 벡터로써 사용되었다. transfection된 세포들은 항생물질인 1 mg/ml G418이 포함된 배양액에서 계속해서 성장되었다. 3주가 지난 후, 항생물질에 내성이 있는 clones가 분리되어 성장되었다.

PLD 효소활성의 측정

PLD 효소활성은 1-butanol의 존재 하에 일어나는 trans-phosphatidyltion 반응에 의해서 생성되는 [³H] phosphatidylbutanol (PtdBut)의 생성량을 측정하였다. U87 세포는 6-well plates에 2×10^5 cells/well로써 2 차 배양되었다. 세포는 실험을 시작하기 전에 24 시간동안 혈청을 공급하지 않아 굶주리게 하였고 이때 최종 20 시간 동안은 1 μCi/ml [³H] myristic acid로 표지하였다. 세포는 5 ml 인산완충염수로 세 번 세척되어졌고 1 시간동안 무혈청 DMEM으로 미리 안정화시켰다. 최종 10 분은 사전 배양동안 0.3% butanol을 첨가하여 배양시켰다. 배양 전단계가 끝났을 때, 세포는 지시된

시간동안 CoCl_2 가 처리되었다. 배양은 배지를 제거함으로써 종결되었고 5 ml 차가운 인산완충염수로 세척되어진 뒤 1 ml 차가운 methanol이 첨가되었다. 세포는 policeman을 사용하여 판으로부터 긁어내어졌고 지질은 methanol/chloroform/0.1 N HCl (1:1:1)으로 추출되고 분리되었다. 질소 가스로 상층액은 날리고 농축한 뒤, 30 μl 의 chloroform/methanol (2:1) 용액으로 희석하였고, silica gel 60A thin layer chromatography plate (Whatman)에서 ethyl acetate/iso-octane/ H_2O /acetic acid (55:25:50:10)의 용매에 의해 윗면으로 전개되었고 iodine으로 착색하였다. phosphatidylbutanol 기준 (Avanti Polar Lipids)은 띠의 위치를 확인하는데 사용하였다. 전체 인지질은 방사능 기계에 의해 측정되었고, 결과는 정상화된 결과로써 방사능 표지된 전체 인지질에 대한 phosphatidylbutanol의 비율로써 나타내었다.

Western blot 분석

세포들은 용해 완충액 (20 mM HEPES, pH 7.2, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.2% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 10 % glycerol, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)을 이용하여 lysis되었고 단백질 농도는 표준값으로써 소 혈청 알부민 (BSA)과 함께 Bio-Rad 단백질 분석방법을 사용하여 결정되었다. 단백질 정량 후 동일한 양의 단백질을 적합한 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동을 하고 nitrocellulose membrane으로 이동시켜 각 단백질에 대한 특이적 항체를 이용하여 Western blot을 수행하였다. 검출은 ECL (Amersham Biosciences) 방식으로써 수행되었다.

Promoter 활성 측정

COX-2 reporter gene plasmid는 PLD 동위효소가 과발현된 U87 세포들에 Renilla luciferase plasmid (pRL-TK)와 함께 24 시간동안 cotransfection 되었다. transfection 후에 세포는 CoCl_2 가 처리되지 않은 조건과 CoCl_2 가 처리된 조건에서 배양되었다. COX-2에 의존적인 luciferase 활성은 두 조건 모두 12 시간 후에 측정되었다. 이 두 가지 조건에 대한 luciferase 활성의 측정은 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)을 사용하였다.

결 과

인간 U87 교세포에서 CoCl_2 에 의한 PLD동위효소의 활성 유도

우리는 인간 U87 glioblastoma 세포에서 CoCl_2 가 PLD 동위효소를 활성화시키는지를 조사하였다. U87 야생형 세포와 PLD1, PLD2가 각각 안정하게 과발현된 세포에 200 μM CoCl_2 를 처리하였다 (Fig. 1A). Fig. 1A에서 나타나는 결과와

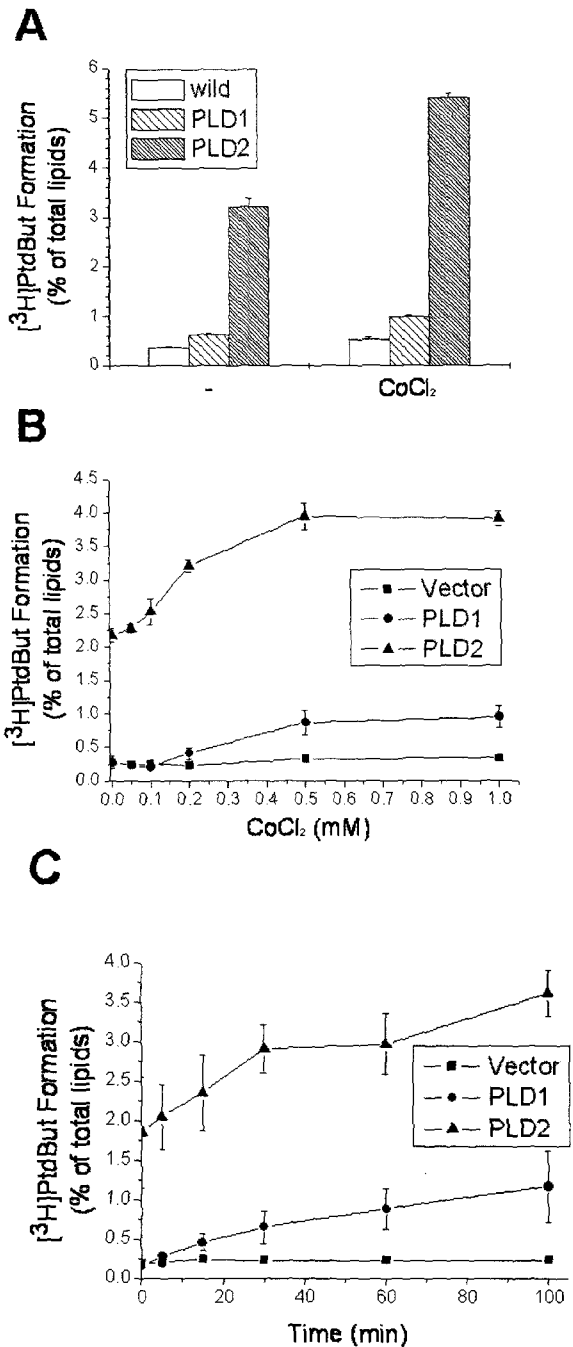


Fig. 1. CoCl_2 induces activation of PLD isoforms in human U87 glioblastoma cells. U87 cells were stably transfected with a wild-type hPLD1 or hPLD2. Human U87 wild type cells, over-expressing PLD1 or PLD2 were cultured in six-well plates, labeled with [^3H] myristate, and treated for 60 min without or with 0.2 mM CoCl_2 in the presence of 0.3% butanol (A). [^3H] myristate-labeled U87 cells over-expressing vector, PLD1, or PLD2 were treated with the indicated concentration of CoCl_2 for 60 min (B) or with 0.5 mM CoCl_2 for the indicated times (C). The radioactivity incorporated into phosphatidylbutanol was measured as described under Experimental Procedures. Results are means \pm S.D. of three independent experiments.

같이 CoCl₂는 확실하게 PLD 동위효소의 활성을 증가시켰고, CoCl₂가 PLD 동위효소에 대하여 활성인자임을 보여주었다. 또한 butanol 존재 시 CoCl₂에 의해 유도되어지는 [³H] PtdBut의 형성이 농도와 시간에 의존적인 방법에서도 증가 되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1B와 1C). 우선 기본 백터가 과발현된 U87 세포에서 CoCl₂를 1 시간동안 농도별로 처리하였을 때는 PLD의 활성에 변화가 없었던 반면에 PLD1과 PLD2가 각각 과발현된 U87 세포에서의 PLD 활성은 점차 증가하였는데, PLD1이 과발현된 U87 세포에서는 0.2 mM에서 0.5 mM까지 CoCl₂에 대한 PLD의 활성이 증가하여 1 mM을 처리하였을 때까지 그 활성이 유지되었고, PLD2가 과발현된 U87 세포에서는 0.1 mM에서 0.5 mM까지 CoCl₂에 대한 PLD의 활성이 증가하여 1 mM을 처리하였을 때까지 그 활성이 유지되었다. 시간에 의존적인 방법에서는 CoCl₂를 시간별로 0.5 mM 처리하였다. 기본 백터가 과발현된 U87 세포에서의 PLD 활성은 농도에 의존적인 방법에서 본 결과와 같았고, PLD1과 PLD2가 각각 과발현된 U87 세포들에서는 CoCl₂에 대한 PLD 효소들의 활성이 시간별로 꾸준히 증가

됨을 볼 수 있었다.

U87 세포에서 CoCl₂에 의해 유도되는 PLD 동위효소의 활성조절 기전

CoCl₂에 대한 PLD 동위효소의 활성이 증가됨을 확인한 후, U87 세포에서 CoCl₂에 의해 유도되는 PLD 동위효소의 활성이 어떻게 조절되는지를 신호전달 단백질에 대한 억제제를 이용하여 조사하였다. PLD1과 PLD2가 각각 과발현 되어있는 세포들에 p38 MAPK 저해제인 PD1 (PD169316)과 SB (SB203580), PKC-δ 저해제인 R (Rottlerin), cPKC 저해제인 G (Gö6976), phosphoinositide에 특이적인 PLC의 저해제인 U7 (U73122), MEK 저해제인 PD9 (PD98059)와 U0 (U0126), JNK 저해제인 SP (SP600125), NFκB 저해제인 PDT (PDTIC), PI3K 저해제인 LY (LY294002)와 W (Wortmannin), PKA 저해제인 H (H89), CaMKII 저해제인 K (KN93), Ca²⁺의 세포내 킬레이트 저해제인 B (BAPTA) 그리고 항산화제인 N (NAC)과 Ca (Catalase)를 전처리하였고 그 후에 CoCl₂를 처리하였다 (Fig. 2A와 2B). 여기에서 NAC과 Catalase의

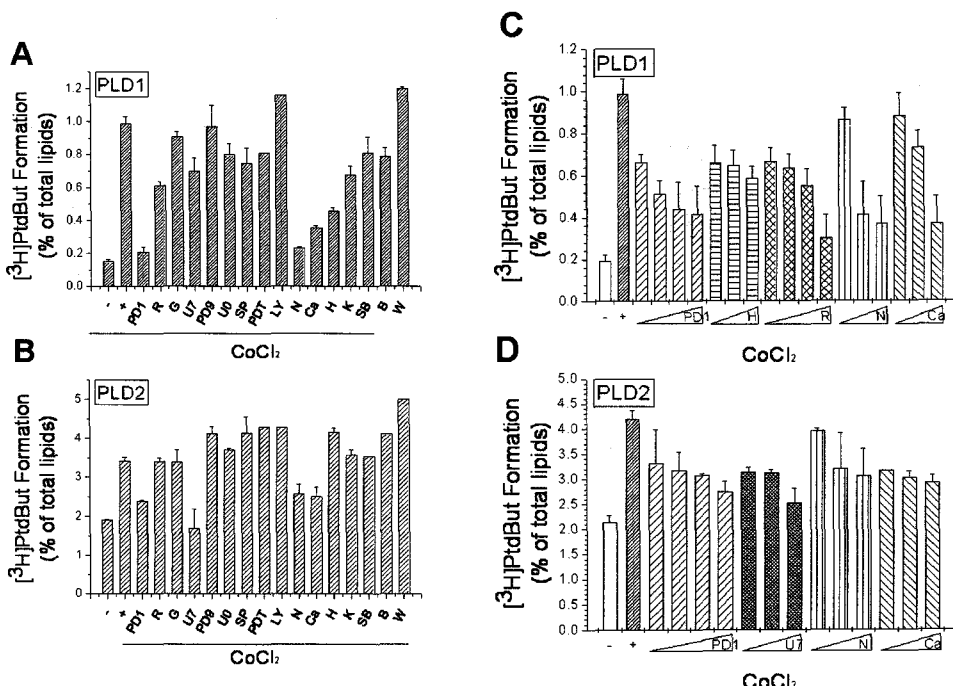


Fig. 2. Mechanism of CoCl₂-induced PLD isozymes activity in U87 cell. U87 cells over-expressing PLD1 (A) or PLD2 (B) were cultured in six-well plates, labeled with [³H] myristate, and pretreated with 20 μM PD1 (PD169316), 5 μM R (Rottlerin), 5 μM G (Gö6976), 20 μM U7 (U73122), 50 μM PD9 (PD98059), 20 μM U0 (U0126), 20 μM SP (SP600125), 20 μM PDT (PDTIC), 20 μM LY (LY294002), 10 mM N (NAC), 100 μg/ml Ca (Catalase), 20 μM H (H89), 20 μM K (KN93), 20 μM SB (SB203580), 10 μM B (BAPTA) or 10 μM W (Wortmannin) for 30 min, and stimulated with 0.5 mM CoCl₂ for 60 min. U87 cells over-expressing PLD1 (C) or PLD2 (D) were pretreated with the indicated concentration of inhibitors for 30 min, and treated CoCl₂ for 1 h. Concentration of inhibitors were PD1 (2, 5, 10, 20 μM), H (5, 10, 20 μM), R (2, 5, 10, 20 μM), N (5, 10, 20 mM), Ca (20, 50, 100 μg/ml) in result (C) and PD1 (2, 5, 10, 20 μM), U7 (5, 10, 20 μM), N (2, 5, 10 mM), Ca (20, 50, 100 μg/ml) in result (D). The radioactivity incorporated into phosphatidylbutanol was measured as described under Experimental Procedures. Results are means±S.D of three independent experiments.

효과가 있는 것으로 보아서 CoCl₂는 세포내에서 활성산소를 생성 또는 생성을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. PLD1이 과발현된 U87 세포에서는 PD169316, H89 그리고 Rottlerin의 순서대로 효과가 컸고, PLD2가 과발현된 U87 세포에서는 U73122와 PD169316의 순서대로 효과가 있었다. 이러한 효과를 다시 증명하기 위해서 효과가 있던 저해제를 농도별로 처리하였다 (Fig. 2C와 2D). Fig. 2C에서 PLD1이 과발현된 U87 세포에 PD169316, H89, Rottlerin과 NAC, Catalase를 농도별로 처리하였을 때 PLD의 활성이 점차 감소되었다. Fig. 2D에서는 PLD2가 과발현된 U87 세포에 PD169316과 U73122 그리고 NAC과 Catalase를 농도별로 처리하였고 PLD의 활성이 점차 감소되었다. 따라서 U87 세포에서 CoCl₂에 의한 PLD1과 PLD2 효소활성의 증가는 PLD1은 p38 MAP kinase, PKA와 PKC-δ 그리고 PLD2는 p38 MAP kinase와 PLC에 의하여 각각 조절되고 있음을 알 수 있었다.

PLD 동위효소가 과발현된 U87 세포에서 CoCl₂에 의한 COX-2의 발현증가

우리는 CoCl₂에 의해 PLD가 활성화되는 생리적인 의미를 찾기 위하여 먼저 염증반응을 매개하는 COX-2의 발현을 조사하였다. 기본 벡터인 pcDNA3.1, PLD1 그리고 PLD2가 각각 과발현 되어있는 U87 세포들에서 CoCl₂가 COX-2 발현에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였다. CoCl₂를 처리하지 않은 대조군과 CoCl₂를 0.2 mM, 6 시간 처리한 실험군에서 COX-2의 발현이 증가하였고, 벡터가 과발현된 세포보다 PLD1과 PLD2가 각각 과발현된 세포에서 기본적으로 COX-2가 많이 발현되고 있음이 확인되었다 (Fig. 3A). 그래서 우리는 CoCl₂를 농도별로 6 시간 처리하였고, PLD1과 PLD2가 각각 과발현 되어있는 U87 세포에서 COX-2 발현이 점차적으로 증가됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3B). 이러한 결과를 통하여, CoCl₂는 PLD 단백질을 통하여 염증반응을 매개하는 COX-2의 발현을 증가시킨다는 사실을 발견하였다.

PLD 단백질의 매개를 통한 CoCl₂에 의한 COX-2 promoter의 활성 증가

PLD 동위효소가 각각 과발현 되어있는 U87 세포에서 CoCl₂에 의한 COX-2의 발현을 전사수준에서 조사하였다. 우리는 우선 COX-2 promoter를 기본 벡터, PLD1 그리고 PLD2가 각각 과발현 되어있는 U87 세포에 lipofectamine과 PLUS 반응물에 대한 방법으로 transfection 하였고, 이 때 pRL-TK 벡터를 함께 transfection 하였다. 대조군에 대하여 CoCl₂를 0.2 mM, 12 시간 처리한 조건을 실험하였다 (Fig. 4). 그 결과 CoCl₂에 의한 COX-2 promoter의 활성은 각각의 세포들에서 증가를 하였지만 기본적으로 벡터가 과발현된 U87 세포에서 보다 PLD1과 PLD2가 과발현된 세포들에서 그 활성이 더 높았다.

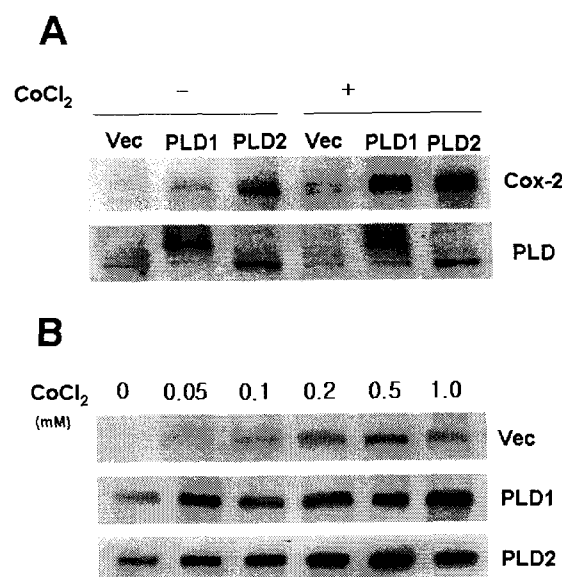


Fig. 3. Expression of CoCl₂-induced COX-2 is increased in U87 cells over-expressing PLD isozymes. U87 cells over-expressing control vector, PLD1 or PLD2 were starved for 24 h in a serum-free condition and treated with 0.2 mM CoCl₂ for 6 h. Cells were harvested then lysed and extracted proteins were analyzed by western blot with anti-PLD antibody which is generated against C-terminal peptide of PLD isozymes. COX-2 proteins were monitored by using anti-COX-2 antibody (A). To investigate involvement of COX-2, U87 cells over-expressing PLD isozymes were treated with the indicated concentrations of CoCl₂ for 6 h. Cells were harvested and analyzed by western blotting (B). Data are representative of three experiments.

고 찰

지금까지 인간 U87 세포에서 CoCl₂에 대하여 PLD를 매개로 하는 신호전달 경로에 관한 연구는 전혀 이루어지지 않았다. CoCl₂는 배양된 세포들에 처리되었을 때 활성산소의 생성을 포함하는 많은 사건들을 일으키는 저산소증 반응들을 만들어 주는 물질이다[1,16,26,40,42]. Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 세포 내에 활성산소 종의 생성을 유도하는 CoCl₂가 농도와 시간에 의존적으로 PLD 동위효소의 활성을 증가시켜주었다. 이는 CoCl₂가 PLD를 매개로 하여 세포내 신호전달 경로에 관여하고 있음을 처음으로 시사한다. 또한 다양한 신경세포와 교세포에서 신경 전달 물질과 신경 조절 물질들이 PLD 효소활성을 증가 시키는 것으로 보고되어졌으며 [8,17,18,43,46] 세포 표면에 존재하는 수용체 배위자를 통한 PLD 효소활성화는 세포내 새로운 신호전달 기작에 중요하게 관여하는 것으로 추정되는데 glioblastoma 세포주인 U87 세포에서 이를 관찰 하였기에 더욱더 의미 있다. 게다가 CoCl₂는 활성산소 종의 생성뿐만 아니라 HIF-1α의 ubiq-

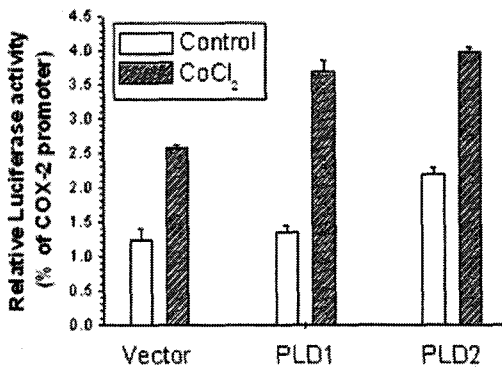


Fig. 4. CoCl₂-induced COX-2 promoter activity in U87 glioblastoma over-expressing PLD isozymes. U87 cells over-expressing vector, PLD1 or PLD2 were cultured in twelve-well plates, and cells were transiently transfected with COX-2 promoter construct and pRL-TK vector using Lipofectamine™ and Plus™ reagent (Invitrogen). 24 h later, cells were treated for 12 h without or with 0.2 mM CoCl₂ harvested, and lysed. Measurement of luciferase activity was derived from Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Results are means±S.D of three independent experiments.

uitin-proteosome에 의한 분해를 저해하는 등등 몇몇 논문들이 보고되고 있지만[15,22] PLD와 관련된 보고는 현재까지 없는 관계로 하여, 우리는 신호전달 기전을 분자 수준에서 접근하기 위해 CoCl₂에 의한 PLD 효소 활성 증가에 관여하는 여러 가지 단백질들을 규명하고자 하였다. Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 다양한 저해제를 처리하여 CoCl₂에 의해 유도되는 PLD 동위효소의 활성을 측정된 결과 여러 가지 단백질이 관련되어 있음을 확인하였다. 우선 Fig. 2A에서 PLD1이 과발현 되어있는 U87 세포에서 PD169316, H89 그리고 Rottlerin 등의 저해제에 대해서 PLD 효소 활성이 감소하였다. 그러므로 CoCl₂에 의해 유도되는 PLD1의 효소활성은 중간 매개 단백질로써 p38 MAP kinase, PKA 그리고 PKC-δ가 관여하고 있다는 것을 확인하였다. 그리고 Fig. 2B에서 PLD2가 과발현 되어있는 U87 세포에서는 PD169316과 U73122 등의 저해제에 대해서 PLD 효소 활성이 감소하였다. 그러므로 CoCl₂에 의해 유도되는 PLD2의 효소활성은 중간 매개 단백질로써 p38 MAP kinase와 PLC가 관여하고 있었다. 즉, CoCl₂에 의해 유도되는 PLD 동위효소의 활성은 공통적으로 중간에서 p38 MAP kinase의 조절을 크게 받지만, PLD1과 PLD2는 CoCl₂에 의해 유도되어지는 활성에서 각각 다른 기전을 통해 영향을 받는다. 그리고 NAC과 Catalase는 항산화제로써 CoCl₂에 의해 생성되는 활성산소 종에 대한 억제제로써 작용을 했다는 사실과[44], 또 활성산소 종이 PLD 동위효소의 활성을 증가시키고 있다는 사실을 간접적으로 확인할 수 있었다[15].

우리는 또한 CoCl₂에 의해 활성화되는 PLD 동위효소의

하위에 어떤 단백질이 존재하는가에 대해서 연구하였다. 우선 우리는 CoCl₂에 의해 활성산소 종이 생성된다는 점과 [15,16] 우리가 연구하고 있는 세포가 뇌에서 분리되어 배양된 U87 glioblastoma 세포인 것에 착안하여 저산소증 또는 염증 등과 관련하여 연구를 시작하였다[4,32,33]. 우선 기존에 보고된 논문들을 기초로 하여 염증 조건 시에만 발현이 되는 COX-2에 초점을 맞췄고[16,30,33,41], CoCl₂에 의해 유도되는 PLD 동위효소에 의한 COX-2 발현에 대하여 연구를 하였다. Fig. 3A에서 우선 기본 벡터, PLD1, PLD2가 각각 과발현 되어있는 U87 세포에 CoCl₂를 처리하고 western blot 분석을 실시한 결과, PLD1과 PLD2가 과발현 되어있는 세포에서 CoCl₂에 의한 COX-2의 발현이 크게 증가하였고 CoCl₂를 처리하지 않은 대조군에서도 COX-2가 아주 미미하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다[20,30,37]. 그래서 CoCl₂를 각각의 세포에 농도별로 처리한 결과, PLD1과 PLD2가 각각 과발현 되어있는 세포에서 점차적으로 COX-2의 발현이 증가되었다. 이러한 결과에서 확인할 수 있듯이, PLD 동위효소는 COX-2의 발현증가에 관여하고 있었다[2,3,7,14,23,47]. Fig. 4는 Fig. 3에 대한 결과를 전사 수준에서 다시 한번 살펴봄으로써 증명을 뒷받침해 준 것이다. 염증반응 시에 발현되는 COX-2 단백질에 대한 COX-2 promoter를 기본 벡터, PLD1 그리고 PLD2가 각각 과발현 되어있는 세포에 트랜스펙션 시키고 대조군과 CoCl₂를 처리한 경우에 대해서 luciferase 활성을 측정하였다. 측정 결과 기본 벡터, PLD1 그리고 PLD2가 과발현된 각각의 세포에서 CoCl₂에 대한 COX-2 promoter 활성이 모두 증가되었지만 기본적으로 PLD1과 PLD2가 과발현된 세포에서 그 활성이 더 큰 것을 확인하였고, 이로써 CoCl₂에 의해 활성화된 PLD 동위효소가 COX-2 promoter의 활성을 증가시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서 최근 세포내 신호전달을 매개하는 중요한 효소로써 PLD 동위효소에 대하여, CoCl₂가 PLD 동위효소의 활성을 증가시킨다는 사실을 밝혔으며, 중간에 매개되는 단백질로써, PLD1은 p38 MAP kinase, PKA와 PKC-δ의 조절을 받고 PLD2는 p38 MAP kinase와 PLC의 조절을 받으므로 그 활성 기전이 각각 다르다는 사실을 확인하였다. 그리고 CoCl₂에 의해 생성되는 활성산소 종에 의한 염증상태가 유도될 것이라고 예상하였고 CoCl₂가 PLD 동위효소를 매개로 하여 염증상태에서만 특이적으로 발현되고 염증반응을 매개하는 COX-2 단백질에 어떠한 영향을 미칠 것인가를 조사하였다. 결과적으로 CoCl₂에 의해 PLD 효소 활성이 증가됨으로써 COX-2의 발현이 증가한다는 것을 발견하였을 뿐만 아니라 COX-2의 발현에 대하여 COX-2 promoter의 활성도 증가한다는 사실을 확인함으로써 전사수준에서의 결과도 이를

뒷받침 해 주고 있었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Atlante, A., S. G. M. Gagliardi, M. T. Minervini, E. Ciotti, and M. P. Calissano. 1997. Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role for xanthine oxidase in oxygen radical formation. *J. Neurochem.* **68**, 2038-2045.
- Bae, Y. S., Y. Kim, J. H. Kim, T. G. Lee, P. G. Suh and S. H. Ryu. 2000. Independent functioning of cytosolic phospholipase A2 and phospholipase D1 in Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-induced superoxide generation in human monocytes. *J. Immunol.* **164**, 4089-4096.
- Balboa, M. A., J. Balsinde and E. A. Dennis. 1998. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in arachidonic acid mobilization in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 7684-7690.
- Bronstein, D. M., I. Perez-Otano, V. Sun, S. B. Mullis Sawin, J. Chan, G. C. Wu, P. M. Hudson, L. Y. Kong, J. S. Hong and M. K. McMillian. 1995. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. *Brain Res.* **704**, 112-116.
- Brown, J. M. 2000. Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies. *Mol. Med. Today* **4**, 157-162.
- Crofford, L. J. 1997. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J. Rheumatol.* **49**, 15-19.
- Cummings, R. J., N. L. Parinandi, A. Zaiman, L. Wang, P. V. Usatyuk, J. G. Garcia and V. Natarajan. 2002. Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 30227-30235.
- Czarny, M., Y. Lavie, G. Fiucci and M. Liscovitch. 1999. Localization of Phospholipase D in Detergent-insoluble, Caveolin-rich Membrane Domains. *J. Biol. Chem.* **274**, 2717-2724.
- DeWitt, D. and W. Smith. 1988. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1412-1416.
- Exton, J. H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1212**, 26-42.
- Exton, J. H. 1999. Regulation of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1439**, 121-33.
- Floyd, R. A. 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* **4**, 2587-2597.
- Freyberg, Z., D. Sweeney, A. Siddhanta, S. Bourgoin, M. Frohman and D. Shields. 2001. Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 943-955.
- Fujita, K., M. Murakami, F. Yamashita, K. Amemiya and I. Kudo. 1996. Phospholipase D is involved in cytosolic phospholipase A2-dependent selective release of arachidonic acid by fMLP-stimulated rat neutrophils. *FEBS Lett.* **395**, 293-298.
- Guichun, W., K. H. Tapas, M. Sankar, L. Heung-Man and W. E. Eila. 2000. Mitochondria DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2135-2140.
- Guillemin, K. and M. A. Krasnow. 1997. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* **89**, 9-12.
- Hammond, S. M., J. M. Jenco, S. Nakashima, K. Cadwallader, Q. Gu, S. Cook, Y. Nozawa, G. D. Prestwich, M. A. Frohman and A. J. Morris. 1997. Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868.
- Hammond, S. M., Y. M. Altschuller, T. C. Sung, S. A. Rudge, K. Ross, J. Engebrecht, A. J. Morris and M. A. Frohman. 1995. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 29640-29643.
- Hla, T. and T. Maciag. 1991. Cyclooxygenase gene expression is down-regulated by heparin-binding (acidic fibroblast) growth factor-1 in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**, 24059-24063.
- Hoozemans, J. J., A. J. Rozemuller, I. Janssen, C. J. De Groot, R. Veerhuis and P. Eikelenboom. 2001. Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta. Neuropathol.* **101**, 2-8.
- Huot, J., F. Houle, F. Marceau and J. Landr. 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ. Res.* **80**, 383-392.
- Kanaya, K. and T. Kamitani. 2003. pVHL-independent ubiquitination of HIF1 α and its stabilization by cobalt ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 750-755.
- Kim, J. H., B. D. Lee, Y. Kim, S. D. Lee, P. G. Suh and S. H. Ryu. 1999. Cytosolic phospholipase A2-mediated regulation of phospholipase D2 in leukocyte cell lines. *J. Immunol.* **163**, 5462-5470.
- Kim, Y., J. M. Han, B. R. Han, K. A. Lee, J. H. Kim, B. D. Lee, I. H. Jang, P. G. Suh and S. H. Ryu. 2000. Phospholipase D1 Is Phosphorylated and Activated by Protein Kinase C in Caveolin-enriched Microdomains within the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* **18**, 13621-13627.
- Lal, M. A., H. Brismar, A. C. Eklof and A. Aperia. 2002. Role of oxidative stress in advanced glycation end product-induced mesangial cell activation. *Kidney Int.* **61**, 2006-2014.

26. Lancelot, E., J. Callebert, M. L. Revaud, R. G. Boulu and M. Plotkine. 1995. Detection of hydroxyl radicals in rat striatum during transient focal cerebral ischemia: possible implication in tissue damage. *Neurosci. Lett.* **197**, 85-88.
27. Lee, M. Y., S. Y. Kim, D. S. Min, Y. S. Choi, S. L. Shin, M. H. Chun, S. B. Lee, M. S. Kim and Y. H. Jo. 2000. Upregulation of phospholipase D in astrocytes in response to transient forebrain ischemia. *Glia* **30**, 311-317.
28. Lin, L. L., M. Wartmann, A. Y. Lin, J. L. Knopf, A. Seth and R. J. Davis. 1993. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**, 269-278.
29. Liscovitch, M., M. Czarny, G. Fiucci and X. Tang. 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.* **345**, 401-415.
30. Liu, B. and J. S. Hong. 2003. Role of microglia in inflammation mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **304**, 1-7.
31. McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes and E. G. McGeer. 1988. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285-1291.
32. Merrill, J. E., Y. Koyanagi, J. Zack, L. Thomas, F. Martin and I. S. Chen. 1992. Induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in brain cultures by human immunodeficiency virus type1. *J. Virol.* **66**, 2217-2225.
33. Minghetti, L. and G. Levi. 1998. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog. Neurobiol.* **54**, 99 -125.
34. Murakami, M., T. Kambe, S. Shimbara and I. Kudo. 1999. Functional Coupling Between Various Phospholipase A2s and Cyclooxygenases in Immediate and Delayed Prostanoid Biosynthetic Pathways. *J. Biol. Chem.* **274**, 3103-3115.
35. Murakami, M., S. Shimbara, T. Kambe, H. Kuwata, M. V. Winstead, J. A. Tischfield and I. Kudo. 1998. The Functions of Five Distinct Mammalian Phospholipase A2s in Regulating Arachidonic Acid Release. *J. Biol. Chem.* **273**, 14411-14423.
36. Park, S. K., J. P. Provost, C. D. Bae, W. T. Ho and J. H. Exton. 1997. Cloning and characterization of phospholipase D from rat brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 29268-29271.
37. Pasinetti, G. M. and P. S. Aisen. 1998. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience* **87**, 319-324.
38. Raine, C. S. 1994. Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **53**, 328-337.
39. Rosenberger, J., G. Petrovics and B. Buzas. 2001. Oxidative stress induces proorphanin FQ and proenkephalin gene expression in astrocytes through p38- and ERK-MAP kinases and NF-kappaB. *J. Neurochem.* **79**, 35-44.
40. Rukenstein, A., R. E. Rydel and L. A. Greene. 1991. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription independent mechanisms. *J. Neurosci.* **11**, 2552-2563.
41. Shimizu, S., Y. Eguchi, W. Kamiike, H. Matsuda and Y. Tsujimoto. 1996. Bcl-2 expression prevents activation of the ICE protease cascade. *Oncogene* **12**, 2251-2257.
42. Simonson, S. G., J. Zhang, A. T. Jr. Canada, Y. F. Su, H. Benveniste and C. A. Piantadosi. 1993. Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion in the rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**, 125-134.
43. Sung, T. C., Y. Zhang, A. J. Morris and M. A. Frohman. 1999. Structural Analysis of Human Phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **274**, 3659-3666.
44. Tao, J., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, G. Wong and J. G. Levy. 1996. Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *J. Biol. Chem.* **271**, 27107-27115.
45. Ushio-Fukai, M., R. W. Alexander, M. Akers and K. K. Griendling. 1998. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signalling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **273**, 15022-15029.
46. Yamazaki, M., Y. Zhang, H. Watanabe, T. Yokozeki, S. Ohno, K. Kaibuchi, H. Shibata, H. Muraki, Y. Ono, M. A. Frohman and Y. Kanaho. 1999. Interaction of the small G protein RhoA with the C Terminus of human Phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **274**, 6035-6038.
47. Zhong, M., T. Joseph, D. Jackson, S. Beychenok and D. A. Foster. 2002. Elevated phospholipase D activity induces apoptosis in normal rat fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 474-477.