

Lysophosphatidic Acid Inhibits Nitric Oxide-induced Apoptosis via p70S6kinase Pathway in Rabbit Articular Chondrocytes

Seon Mi Yu and Song Ja Kim[†]

Department of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Kongju National University,
Chungnam 314-701, Korea

Lysophosphatidic Acid (LPA) is a bioactive lysophospholipid that is a potent signaling molecule able to provoke a variety of cellular responses in many cell types such as differentiation, inflammation and apoptosis. In this study, we have investigated the effect of LPA on Nitric oxide (NO)-induced apoptosis in rabbit articular chondrocytes. LPA dramatically reduced NO induced apoptosis of chondrocytes determined by phase contrast microscope and MTT assay. When chondrocytes alone treated with LPA, LPA induced phosphorylation of p70S6kinase, a serine/threonine kinase that acts downstream of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) and phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in the PI3 kinase pathway, dose-dependently detected by Western blot analysis. Phosphorylation of p70S6k with LPA was reduced expression of p53 in NO- induced apoptosis of chondrocytes. Also, inhibition of p70S6kinase with rapamycin was enhanced expression of p53 in chondrocytes. Our findings collectively suggest that LPA regulates NO induced apoptosis through p70S6kinase pathway in rabbit articular chondrocytes.

Key Words: Chondrocyte, Lysophosphatidic Acid (LPA), Nitric oxide (NO), Apoptosis

서 론

관절 연골을 구성하고 있는 연골세포는 배 발생 과정 중 중간엽 세포로부터 분화하고 증식한다 (Sandell and Adler, 1999; DeLise, 2000). 분화된 연골세포는 연골 특이적인 세포외 기질인 type II collagen과 sulfated glycosaminoglycan 등의 정상적인 합성 및 유지를 통해 연골세포의 특성을 유지한다 (Poole, 1999; Sandell and Adler, 2001). 이러한 항상성은 퇴행성 관절염과 같은 퇴행성 질환이 발생할 때 파괴된다 (Sandell and Aigner, 2001). 관절염은 연골세포와 관절을 덮고 있는 기질의 합성이 감소되거나 파괴될 때, 기질이 불충분하게 합성이 될 때, 세포사멸이 일어날 때와 같은 연골세포 내의 구조적, 생화학적 변화에 의해 유발 된다 (Poole et al., 1999). 또한 사이토카인, 케모카인, 성장인자 등의 자극원은 신호전달경로와 유전자 발현을 조절하여 연골세포의 생화학적

기능에 영향을 줌으로써 연골세포의 세포외기질 합성의 불균형을 야기하며, 세포사멸을 유도함으로써 관절염 유발의 주된 요소로 작용하기도 한다 (Stadler et al., 1991; Amin et al., 1991; Denko and Malemud, 1999; Martel-Pelletier et al., 1999).

NO는 다양한 방법을 통하여 연골세포와 연골 조직의 기능을 조절한다. Lysophosphatidic acid (LPA; 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate)는 하나의 지방산으로 구성된 생물 활성 lysophospholipid로써, 수많은 세포에 존재하는 G단백질 결합 수용체를 활성화 시킴으로써, 활성화된 혈소판, 성장인자의 자극을 받은 상피세포, 암세포, 염증반응에 관여하는 다양한 세포로부터 생산되어 분비된다 (Eichholz et al., 1993; Fourcade et al., 1995; Moolenaar, 1999; Moolenaar, 2000). 기존의 연구에 의하면, LPA 신호전달경로는 암세포의 증식, 생존, 전이, 이동에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Van Corven et al., 1989; Fang et al., 2002; Deng et al., 2002; Mills et al., 2003; Hama et al., 2004; Ren et al., 2006). 또한 이러한 지질매개체 (lipid mediator)에 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있는 연골세포에서도 LPA는 세포의 증식, 분화, 세포 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Caverzasio et al., 2000; Panupinthu et al., 2007). 그러나 연골세포의 세포사멸과 관련된 LPA

* 접수일: 2009년 12월 4일 / 수정일: 2009년 12월 17일
채택일: 2009년 12월 18일

[†]교신저자: 김송자, (우)314-701 충남 공주시 신관동 182번지,
국립공주대학교 자연과학대학 생명과학과
Tel: 041-850-8507, Fax: 041-850-0927
e-mail: ksj85@kongju.ac.kr

의 분자적 기작은 아직 명확히 밝혀진 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 토끼관절 연골세포를 사용하여 기존 연구를 통해 연골세포의 세포사멸을 유도한다고 알려진 NO공여체인 SNP (sodium nitroprusside)을 사용하여, LPA가 SNP에 의해 유도된 세포사멸을 조절하는지, 또 조절한다면 어떠한 신호전달경로를 통해 조절하는지에 관한 연구를 수행하였다. 본 연구결과에 따르면 LPA는 SNP가 유도하는 연골세포의 세포사멸을 농도 의존적으로 억제하였으며, 이는 serine/threonine kinase인 p70S6kinase에 의해 조절되어짐을 알 수 있었다.

재료 및 방법

1. Cell culture

2주된 New Zealand White 종의 토끼를 사용하여 무릎 관절에서 토끼의 무릎관절에서 연골 조직을 분리해 낸 후, TESCA (50 mM TES, 0.36 mM CaCl₂) buffer에 0.2% collagenase 를 섞어 37°C로 유지되는 CO₂ incubator에서 7시간 동안 조직을 세포로 분리하는 작업을 시행한다. 조직이 모두 세포로 분리되었으면 원심분리 (1,000 rpm, 10분)하여 단세포만을 모은다. 모은 세포를 10%의 FBS (Fetal bovine serum), 50 µg/ml의 streptomycin, 50 units/ml의 penicillin으로 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)에서 5×10⁴ cells/dish의 밀도로 배양한다. 배양액은 이틀에 한 번 교체를 했으며, 세포 밀도가 약 70~80% 정도 되었을 때, 시약

을 처리하였다.

2. Western blot analysis

50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% Sodium dodecylsulfate를 포함한 buffer에 다양한 protease inhibitor [10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride]와 phosphatase inhibitor (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄)를 첨가한 후 lysis buffer를 사용하여 단백질을 lysis 시킨다. 이 단백질을 SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 Nitrocellulose 막으로 이동시켰다. 후에 항체 p53, pp70S6k, p70S6k, actin과 secondary antibody를 불인 후 X-ray film에 감광시킨다.

3. MTT Assay

96 well plate에 세포를 4×10⁵ cells/well로 분주하여 37°C에서 24시간 동안 배양 한 후 MTT reagent I을 10 µl/well씩 넣고 4시간 동안 배양한 후, 다시 solubilization solution인 MTT reagent II을 넣어 12시간 더 배양을 한다. 후에 ELISA reader를 사용하여 흡광도 (550~600 nm) 값을 측정한다.

결 과

LPA는 NO가 유도한 세포사멸을 억제한다

이전 실험 결과에서 Nitric oxide의 공여체인 sodium

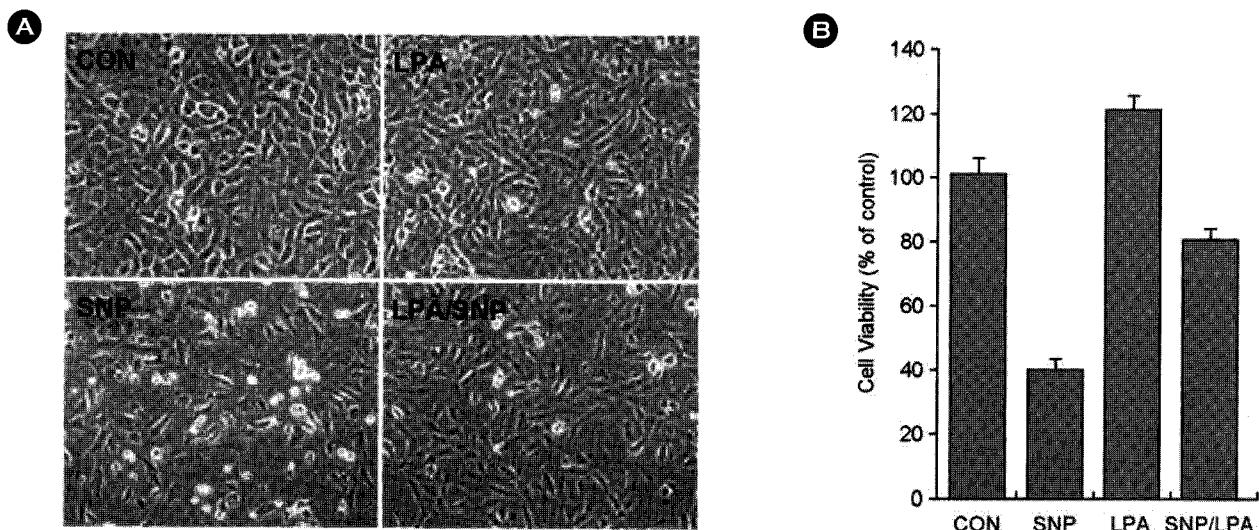


Fig. 1. LPA inhibited NO-induced apoptosis in rabbit articular chondrocytes. Chondrocytes were untreated or treated for 24 h with 2 µM LPA with or without 1 mM SNP. Cells photographs were taken using phase contrast microscope (A). Apoptosis was determined by MTT assay (B). The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments (B).

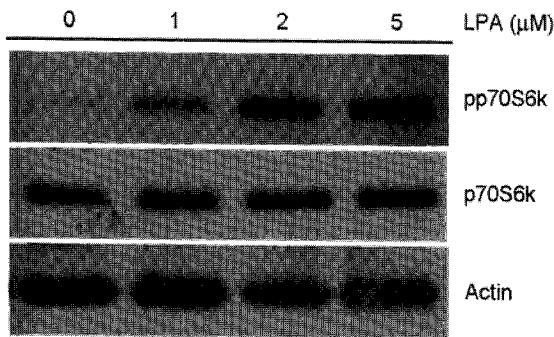


Fig. 2. LPA induced phosphorylation of p70S6k in primary cultured chondrocytes. Cells were treated with the indicated concentrations of LPA for 24 h. Expressions of pp70S6k, p70S6k and actin were detected by Western blot analysis. Expression of actin was used by loading control. The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

nitroprusside (SNP)를 연골세포에 처리하였을 때, 연골세포의 세포사멸을 유도한다는 내용이 보고된 바 있다 (Kim et al., 2002a, 2002b). 이에 본 연구에서는 관절 연골세포의 생존과 증식을 조절한다고 알려진 LPA 2 μ M를 SNP를 처리한 세포에 함께 처리하여 세포사멸과의 관계를 규명하고자 하였다. 그 결과, SNP를 단독으로 처리한 실험군보다는 LPA를 함께 처리한 실험군에서 세포사멸 정도가 감소되어짐을 위상차 현미경을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 이에 세포사멸 정도를 정확히 확인하고자 MTT assay를 실현한 결과 SNP를 단독으로 처리한 실험군에서는 약 60% 정도의 세포사멸이 유도되었으나, LPA를 SNP와 함께 처리한 군에서는 약 20% 정도의 세포사멸을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 이는 LPA가 산화질소에 의해 유도된 연골세포의 사멸을 저해함을 말해주는 결과라 하겠다.

LPA는 p70S6kinase의 활성을 유도한다

위의 실험 결과를 토대로 LPA를 토끼관절 연골세포에 처리하여 세포의 사멸에 관련되어 있는 것으로 알려진 여러 가지 신호전달 관련 단백질의 활성 및 발현 정도를 확인한 바, 주요 MAP kinase인 ERK-1/2와 p38kinase의 활성 및 발현에는 아무런 영향이 없음을 확인할 수 있었으나, (data not shown) PI3Kinase의 downstream에 존재하는 것으로 알려진 p70S6kinase의 발현이 처리 농도 의존적으로 증가되어짐을 Western blot analysis를 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

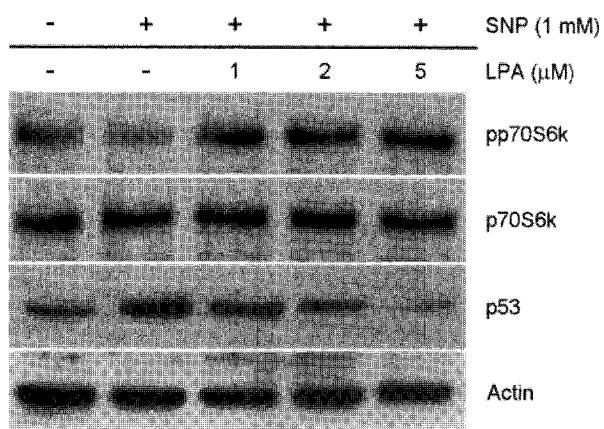


Fig. 3. Phosphorylation of p70S6k by LPA inhibited expression of p53 by production of NO in chondrocytes. Primary chondrocytes were treated with 1 mM SNP in the absence or presence of the indicated concentrations of LPA for 24 h. Expressions of pp70S6k, p70S6k, p53 and actin were detected by Western blot analysis. Expression of actin was used by loading control. The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

LPA는 NO가 유도한 세포사멸을 p70S6kinase 신호전달 체계를 통해 조절한다

LPA에 의한 p70S6kinase의 활성이 연골세포의 사멸과 관련이 있는지를 알아보기 위해 NO가 유도하는 세포사멸 주요 관련 단백질인 p53과의 발현 조절 상관관계를 조사하였다. SNP를 처리한 세포군에 LPA를 농도 의존적으로 처리하여 발현 정도를 Western blot analysis를 통해 확인하였다. 그 결과 SNP에 의해 감소되었던 phospho-70S6kinase의 발현이 LPA 처리 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 이와 함께 SNP에 의해 유도된 p53의 발현이 LPA 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 이는 SNP에 의해 유도된 세포사멸이 LPA 처리에 의해 현저히 감소하는 것과 동일한 결과라 하겠다 (Fig. 3). 이와 같은 결과는 LPA에 의한 세포사멸 저해 기작이 p70S6kinase에 의해 조절됨을 말해주는 것이라 하겠다. 따라서 위 결과를 확실히 하기 위해 p70S6kinase의 억제자로 알려진 rapamycin을 사용하여, LPA에 의한 phospho-70S6kinase의 발현을 저해하였다. 그 결과 SNP와 LPA를 함께 처리한 세포군보다 rapamycin을 함께 처리한 세포군에서 p53의 발현이 현저히 회복되어짐을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 이는 위상차 현미경을 통해 확인한 세포사멸 양상에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다 (data not shown). 이 모든 결과를 종합해 볼 때, SNP에 의해 유도된 세포사멸은 LPA에 의해 활성화된 p70S6kinase

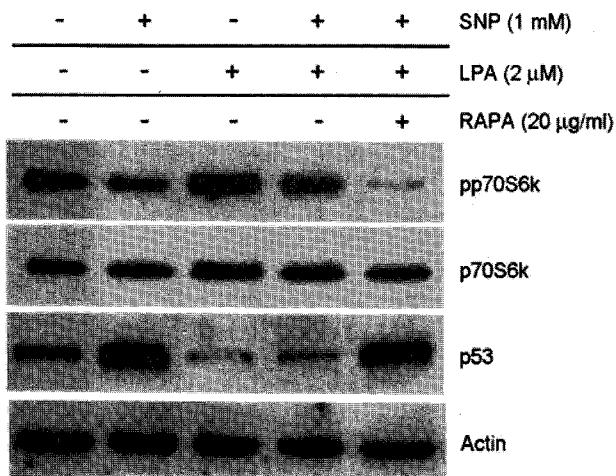


Fig. 4. LPA regulated NO induced apoptosis via pp70S6k pathway in rabbit articular chondrocytes. Articular chondrocytes were untreated or treated for 24 h with 20 μ g/ml rapamycin (RAPA) in the absence or presence of 1 mM SNP and 2 μ M LPA. Expressions of pp70S6k, p70S6k, p53 and actin were detected by Western blot analysis. Expression of actin was used by loading control. The data present results of a typical experiment from at least four independent experiments.

의 활성을 유도함으로써 p53 단백질의 발현을 감소시켜 세포사멸을 저해한다는 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

이전의 연구 결과를 볼 때, 다양한 세포에 LPA를 처리한 결과 세포의 증식, 성장, 생존이 촉진됨을 확인할 수 있었다 (Van Corven et al., 1989; Fang et al., 2002; Deng et al., 2002; Mills et al., 2003; Hama et al., 2004; Ren et al., 2006). 또한 이러한 세포 반응에 있어서 p70S6kinase pathway가 중요한 역할을 한다는 사실 또한 확인할 수 있었다. SNP는 NO의 공여체로서 연골세포에 처리하게 되면 세포사멸을 유도한다. 이에 본 연구는 SNP에 의해 유도된 세포사멸이 LPA에 의한 p70S6kinase pathway의 활성을 의해 억제되는지, 세포사멸을 억제한다면 그 억제 기작은 무엇인가에 관한 연구를 수행하였다. 토끼의 무릎관절 연골세포에 NO의 공여체인 SNP를 처리한 결과 p53 단백질이 증가하는 반면 p70S6kinase의 활성은 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 LPA를 함께 처리하였을 때, SNP를 단독으로 처리했을 때보다 p53 단백질은 감소하는 경향을 보였고, phospho-p70S6kinase는 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, LPA는 연골세포의 p70S6kinase의 인산화를 통해 세포사멸을 억제한다는 사실을 확인

하였다. 따라서 우리는 연골세포의 세포사멸을 억제하는 LPA의 기작에 미치는 p70S6kinase의 명확한 역할을 입증하기 위해서, 앞서 확인한 p70S6kinase 활성의 억제자인 rapamycin을 처리하였을 때 SNP가 유도한 세포사멸에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 그 결과 p70S6kinase 활성을 억제하였을 때, SNP에 의한 세포사멸이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 연골세포의 세포사멸에 있어서 p70S6kinase 신호전달경로가 중요한 조절자로서 작용한다는 것을 말해 준다. 연골세포의 이러한 세포 내 반응을 조절하는 인자는 매우 다양하며 복잡하기 때문에 본 연구를 바탕으로 더 명확하고 구체적인 신호전달경로를 파악하는 것이 필요하다. 그러므로 앞으로 연골세포의 세포사멸과 관련된 신호전달경로에 대한 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

Acknowledgements

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea Government (MEST) (2009-0071662 & 2009-0084569).

REFERENCES

- Amin AR and Abramson SB. Curr Opin Rheumatol. 1998. 10: 263-268.
- Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP. Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in osteoblast-like cells. J Bone Miner Res. 2000. 15: 1697-1706.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. Osteoarthritis Cartilage 2000. 5: 345-351.
- Denko CW, Malemud CJ. Frontiers Biosci. 1999. 4: 686-693.
- Deng W, Balazs L, Wang DA, Van Middlesworth L, Tigyi G, Johnson LR. Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiationand chemotherapy-induced apoptosis. Gastroenterology 2002. 123: 206-216.
- Eichholz T, Jlink K, Fahrnefort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. Biochem J. 1993. 291: 677-680.
- Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, Mills GB. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in

- ovarian cancer. *Biochem Biophys Acta*. 2002. 1582: 257-264.
- Fourcade O, SimonMF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 1995. 80: 919-927.
- Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, Ohta H, Yamori T, Watanabe M, Chun J, Arai H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem*. 2004. 279: 17634-17639.
- Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem*. 2002a. 277: 1332-1339.
- Kim SJ, Kim HG, Oh CD, Hwang SG, Song WK, Yoo YJ, Kang SS, Chun JS. p38 kinase-dependent and -independent Inhibition of protein kinase C zeta and -alpha regulates nitric oxide-induced apoptosis and dedifferentiation of articular chondrocytes. *J Biol Chem*. 2002b. 277: 30375-30381.
- Martel PJ, Alaaeddine N, Pelletier JP. *Frontiers Biosci*. 1999. 4: 694-703.
- Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003. 3: 582-591.
- Moolenaar WH. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*. 1999. 253: 230-238.
- Moolenaar WH. Development and current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann NY Acad Sci*. 2000. 905: 1-10.
- Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 2007. 282: 3403-3412.
- Poole S. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci*. 1999. 4: 662-670.
- Ren J, Xiao YJ, Singh LS, Zhao X, Zhao Z, Feng L, Rose TM, Prestwich GD, Xu Y. Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2006. 66: 3006-3014.
- Sandell LJ, Adler P. Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci*. 1999. 15: D731-742.
- Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH. *J Immunol*. 1991. 147: 3915-3920.
- Van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 1989. 59: 45-54.