

# Phosphatidic acid에 의한 intercellular adhesion molecule-1 발현 조절에 관여하는 MAPK와 PKC- $\delta$ 의 역할

조우성 · 윤홍식 · 진병로 · 백석환\*

영남대학교 의과대학 치과학교실, \*생화학 · 분자생물학교실

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2007;33:445-454)

## THE ROLE OF MAPK AND PKC- $\delta$ IN PHOSPHATIDIC ACID-MEDIATED INTERCELLULAR ADHESION MOLECULE-1 EXPRESSION

Woo-Sung Cho, Hong Sik Yoon, Byung-Rho Chin, Suk-Hwan Baek\*

Department of Dentistry and \*Biochemistry & Molecular Biology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

**Background:** Phosphatidic acid (PA), an important second messenger, is involved in inflammation. Notably, cell-cell interactions via adhesion molecules play a central role in inflammation. This thesis show that PA induces expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on macrophages and describe the signaling pathways.

**Materials and methods:** Macrophages were cultured in the presence of 10% FBS and assayed cell to cell adhesion using HUVEC. For the gene and protein analysis, RT-PCR, Western blot and flow cytometry were performed. In addition, overexpressed cell lines for dominant negative PKC- $\delta$  mutant established and tested their effect on the promoter activity and expression of ICAM-1 protein by PA.

**Results:** PA-activated macrophages significantly increased adhering to human umbilical vein endothelial cell and this adhesion was mediated by ICAM-1. Pretreatment with rottlerin (PKC- $\delta$  inhibitor) or expression of a dominant negative PKC- $\delta$  mutant, but not Go6976 (classical PKC- $\alpha$  inhibitor) and myristoylated PKC- $\zeta$  inhibitor, attenuated PA-induced ICAM-1 expression. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor blocked PA-induced ICAM-1 expression in contrast, ERK upstream inhibitor didn't block ICAM-1.

**Conclusion:** These data suggest that PA-induced ICAM-1 expression and cell-cell adhesion in macrophages requires PKC- $\delta$  activation and that PKC- $\delta$  activation is triggers to sequential activation of p38 MAPK.

**Key words:** Macrophage, ICAM-1, Adhesion, MAPK, Protein kinase C

### I. 서 론

신호전달 능력을 함유한 지질은 세포막 조직구성을 담당하는 일반적인 지질과는 다르게 적은 양이 존재하고 이들은 특정 자극에 신속하게 반응하여 축적되었다가 재빨리 원상회복되는 특징을 가지고 있다. 인지질산(phosphatidic acid)은 비교적 최근에 밝혀진 신호전달에 관여하는 중심지질로써 세포 내 인지질산 양은 주로 3가지 경로로 조절되고 있다. 첫째는 phos-

pholipase D (PLD)에 의해 직접 생성되는 것이다. 즉, phosphatidylcholine은 PLD가 가수분해하면 인지질산과 head group으로 나누어진다. 둘째는 phospholipase C와 diacylglycerol kinase (DGK)의 연속적인 작용을 통하여 이루어진다. 즉, phosphatidylinositol - 4,5-bisphosphate가 phospholipase C에 의해 가수분해되면 diacylglycerol (DAG)과 inositol-1,4,5-trisphosphate로 전환되는데 inositol-1,4,5-trisphosphate는 세포질 안으로 확산되어 세포 내 저장소의 칼슘 양을 조절하는 반면, 세포막에 남아있는 diacylglycerol은 DGK에 의해 인산화되어 인지질산으로 전환된다. 셋째는 DAG pyrophosphate를 DAG pyrophosphate phosphatase 작용으로 인지질산을 생성한다.

인지질산은 세포 내 소통을 원활히 하는데 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 특히 수많은 세포 내 특정 단백질과 작용하여 소통을 조절하는데 현재까지 밝혀진 인지질산의

#### 백 석 환

705-717 대구광역시 남구 대명5동 317-1

영남대학교 의과대학 생화학 · 분자생물학교실

#### Suk-Hwan Baek

Dept. of Biochemistry & Molecular Biology, College of Medicine, Yeungnam Univ.

317-1, Daemyeong 5 dong, Nam gu, Daegu, 705-717, Korea

Tel: 82-53-620-4523 Fax: 82-53-620-8032,

E-mail: sbaek@med.yu.ac.kr

작용 타겟 단백질은 단백질 인산화 효소가 있고, 단백질 탈인산화 효소도 있으며, 지질 인산화 효소도 알려져 있다<sup>4)</sup>. 인지질산은 세포 신호전달에 관여하는 cAMP phosphodiesterase, small G-protein, mammalian target of rapamycin과 NADPH oxidase 같은 단백질과 상호 작용하는 것으로 알려지고 있다<sup>5)</sup>. 각종 타겟 단백질에서 인지질산 결합부위가 일부 밝혀졌으나, 그들의 1차 아미노산 분석결과는 타겟 단백질에서 공통적으로 존재하는 특정 시퀀스를 찾지 못하였다<sup>6)</sup>. 비록 특정 아미노산 시퀀스를 규명하지 못하였지만 인지질산은 PX domain, plextrin homology와 일부 단백질의 C2 domain과 매우 친화력이 강한 것으로 나타났다<sup>6)</sup>.

인지질산은 정상적인 세포성장과 분화에 매우 중요한 2차 전령인자로 인식되고 다양한 단백질의 인산화나 산화적 스트레스의 활성화에 관여하지만<sup>1)</sup> 최근에는 단핵구나 호중구세포의 염증반응에도 관여한다는 증거가 나타나고 있다<sup>12)</sup>. 염증 진행과정에서 필수적으로 요구되는 것은 세포와 세포사이의 부착과정이다. 특히 혈관에서 염증반응이 개시되고 혈관 내피세포가 손상되면 케모카인이 생성되고 혈액속에 유주하는 단핵구, 대식세포, 호중구 등은 내피세포 근처로 모이게 된다. 염증 진행 과정에서 세포부착은 염증반응 전체를 좌우하는 중심적인 역할을 하고 나아가 세포부착에 관여하는 단백질의 동정과 조절 기전 규명은 염증반응 전반을 이해하는데 필수적이다. 세포와 세포사이의 부착과정에서 초기 rolling 과정에는 selectin이 주로 담당하지만 실질적으로 혈액을 순환하는 단핵구같은 세포와 혈관 내피세포사이의 견고한 부착과정에는 integrin이나 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 또는 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)이 주로 담당한다<sup>13)</sup>. ICAM-1은 내피세포에서는 항상 발현하고 있는 단백질이지만 염증과정 동안 사이토카인이나 케모카인과 같은 다양한 자극에 의해 발현이 증가하는 부착 단백질이다<sup>14)</sup>. ICAM-1 유전자를 제거한 실험용 쥐를 이용한 연구에서 염증반응에 관여하는 ICAM-1의 중요성이 입증되었다. 최근에는 ICAM-1은 내피세포뿐만 아니라 단핵구나 대식세포에서도 발현함으로써 내피세포와 상호 협력하여 부착과정을 조절하는 것으로 확인되었다<sup>15)</sup>. 인지질산이 염증반응을 조절한다는 구체적인 예가 제시되었는데, 인지질산이 상피세포에서 염증반응의 매개체중의 하나인 인터류킨-8 생성을 조절하거나<sup>16)</sup>, 대식세포에서 염증 개시인자로 가장 잘 알려진 tumor-necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 인터류킨-1 $\beta$ 와 인터류킨-6 생성을 강하게 야기하여 조절한다는 것이 보고되었다<sup>12)</sup>.

비록 인지질산은 염증반응을 조절할 것이라는 몇몇 예가 보고되었지만 아직 구체적인 세포 내 신호전달 과정과 조절기전은 명백하게 밝혀져 있지 않다. 더구나 염증반응에서 필수적으로 수반되는 세포와 세포의 부착에 관한 연구는 전혀 규명되지 않은 상태이다. 그러므로 이 연구에서는 인지질산이 세포와 세포의 부착을 조절하는가를 검토하고 어떠한 부착 단백질이 이 과정을 매개하고 어떠한 신호전달과정으로 조절하는가를 집중적으로 검토하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### A. 실험 재료

RPMI-1640, Opti-MEM, penicilline-streptomycin, trypsin-EDTA, lipofectamine 2000, 세포배양용 혈청 및 reverse transcriptase-PCR kit은 Gibco BRL사로부터, EGM-2 배지와 첨가물질은 Cambrex사로부터, 인지질산과 p-nitrophenyl-N-acetyl-D- glycosaminide는 Sigma사로부터, rotterlin, myristoylated PKC- $\zeta$  펩타이드 저해제, Go6976, PD98059, SB203580 및 SP600125등은 BioMol사로부터 구입하여 사용하였다. 각종 phospho PKC 항체와 PKC- $\alpha$  및 PKC- $\delta$  항체는 Cell Signaling사로부터, peroxidase가 부착된 토끼 Ig 항체와 쥐 Ig 항체는 Santa-Cruz사로부터, FITC가 부착된 ICAM-1 항체는 Becton-Dickinson사로부터 구입하였다.

### B. 실험 방법

#### 세포부착능

혈관 내피세포에 부착하는 대식세포의 능력을 검토하는 방법은 p-nitrophenyl-N-acetyl-D-glycosaminide 염색법을 이용하였다. 인지질산을 농도별로 대식세포에 12시간 처리하고 미리 배양한 혈관 내피세포를 대식세포에 첨가하였다. 30분 동안 방치한 다음 대식세포에 부착하지 않은 혈관 내피세포를 2% BSA가 함유된 phosphate-buffered saline (PBS) 완충액으로 세척하고 3.75 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-D-glycosaminide이 포함된 완충액 (50 mM citrate buffer, pH 5.0, 0.25% Triton X-100)을 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시켰다. 세포부착 반응은 5 mM EDTA가 포함된 50 mM Glycine, pH 10.4 용액을 첨가하여 종결하고 405 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 검토하였다.

#### Flow Cytometry

시료를 처리한 세포를 수확하여 1,000 rpm으로 원심분리하고, PBS로 세척 후, 세포수를 측정하였다. 일정한 세포를 결합 완충액 (10 mM HEPES-NaOH, pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) 100  $\mu$ l로 현탁하고 ICAM-1-FITC를 첨가하고 실온에서 30분간 반응시키고 400  $\mu$ l binding buffer를 더 첨가한 후, 유세포 분석기 (FACSCalibur, Becton Dickinson사)로 측정하였다. 실험 결과는 세포 10,000개를 측정하여 ICAM-1이 발현되는 양만큼 히스토그램이 이동되는 것으로 확인하였다.

#### Western Blot 분석

세포를 배양접시에 동일한 수로 나누고 인지질산 또는 저해제와 함께 처리한 후, 세포를 냉각된 PBS로 세척하고 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 수확한 세포는 각종 단백질 분해효소 억제제가 함유된 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40)을 첨

가하고 원심 분리하여 상층액을 취하여 세포질 분획을 확보하였다. 세포질 분획의 단백질은 Bradford 시약을 사용하여 정량하였다. 정량된 세포질 분획의 단백질을 50  $\mu$ g을 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하였다. 시료를 처리한 세포에서 세포질 분획을 얻고, 전기영동하여 분리한 단백질은 나이트로 셀룰로스 막 (NC막)으로 20% 메탄올, 25 mM Tris 및 192 mM glycine 완충액에 담그어 transfer 탱크 장치를 이용하여 이동하였다. 단백질이 이동된 NC막은 Ponceau 용액으로 이동의 유무를 확인한 후 5% blocking 용액 (Non-fat milk)을 사용하여 30분간 실온에서 반응하였다. 반응 후 완충액으로 1,000배 희석한 각종 항체와 단백질이 이동된 NC막을 4시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Tris-Tween buffered saline (TTBS)으로 5분 간격으로 6회 세척하고, 계속하여 horse radish peroxidase가 부착된 이차항체인 토끼 또는 쥐 IgG 항체와 2시간 반응시키고 다시 한번 TTBS로 6회 세척하였다. 다시 증류수로 세척하고 enhanced chemiluminescence 용액으로 1분간 반응하고 필름에 감광하여 나타난 띠의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 또는 발현 정도를 확인하였다.

#### 안정적인 PKC- $\delta$ 발현 세포주 구축

PKC- $\delta$  wild type과 mutant cDNA는 대식세포에 Lipofectamine 2000 시약을 사용하여 transfection하였다. 200  $\mu$ l의 Opti-MEM 배지가 든 튜브에 1  $\mu$ g의 플라스미드와 3  $\mu$ l의 Lipofectamine 2000을 혼합하여 20분 동안 실온에서 방치하고 배양한 세포에 이 혼합액을 천천히 처리하였다. 5시간 후, 새로운 배지로 교체하여 12시간 동안 다시 배양하였다. 안정적으로 PKC- $\delta$  단백질이 발현되는 세포주를 확보하기 위하여 transfection된 세포에 1000  $\mu$ g/ml G418이 포함된 배지로 수일 동안 배양하고 살아남은 세포로부터 단일 클론의 세포주를 획득하기 위하여 하나의 well에 한개의 세포가 분포하도록 각각 96-well에 분주하였다. 약 4-5주 동안 배양한 후, 콜로니가 형성된 well에서 세포를 취하여 대량 배양하고 PKC- $\delta$  발현 정도는 Western blot 분석법으로 확인하였다.

#### Transfection 및 luciferase 활성 측정

대식 세포를 배양점시에 일정 수 나누고 luciferase를 발현하는 DNA가 결합되어 있으며, ICAM-1 프로모터 DNA를 함유하는 매개체 DNA와 Lipofectamine 2000을 섞어서 혈청이 포함되지 않은 Opti-MEM 배지에 희석하여 20분간 실온에서 반응시킨다. 20분 후 천천히 한 방울씩 세포에 첨가하고 계속하여 5시간 반응시킨다. 5시간 후 10% 세포배양용 혈청이 포함된 Opti-MEM 배지로 교체하고 계속하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 배지를 다시 교체하고 시료로 자극한 후 수확하였다. 수확한 세포는 완충액을 사용하여 세포질 분획을 얻었으며, luciferase 활성은 luminometer를 사용하여 기질과 반응하여 측정하였다.

#### mRNA 분리와 reverse transcriptase-PCR

세포를 배양하고 인지질산 또는 저해제와 함께 처리한 세포를 수확하고 2% bovine serum albumin이 포함된 완충액으로 세척하고 RNA 추출 용액 (4 M guanidium thiocyanate, 0.5% sarcosyl, 25 mM sodium citrate, 0.1 M 2-mercaptoethanol)으로 세포를 용해하였다. 용해된 세포에 sodium acetate, water-saturated phenol 및 클로로포름을 순서대로 첨가하고 잘 섞은 다음, 4°C에서 10분간 방치하였다. 방치한 세포 분획을 원심 분리하여 상층액을 취하고 에탄올 침전으로 mRNA를 얻었다. Reverse transcriptase 반응은 분리한 mRNA를 사용하여 RT-PCR kit를 이용하여 역전사시켜 cDNA를 얻었다. PCR은 주형으로 사용하는 시료 cDNA를 94°C에서 1분동안 변성시키고 ICAM-1에 대한 2개의 primer를 혼합하여 60°C에서 25 cycle을 반복하여 얻은 PCR 산물은 ethidium bromide가 포함된 1.5% agarose gel 전기영동으로 분리, 확인하였다. PCR 산물은  $\beta$ -actin을 대조군으로 사용하였다.

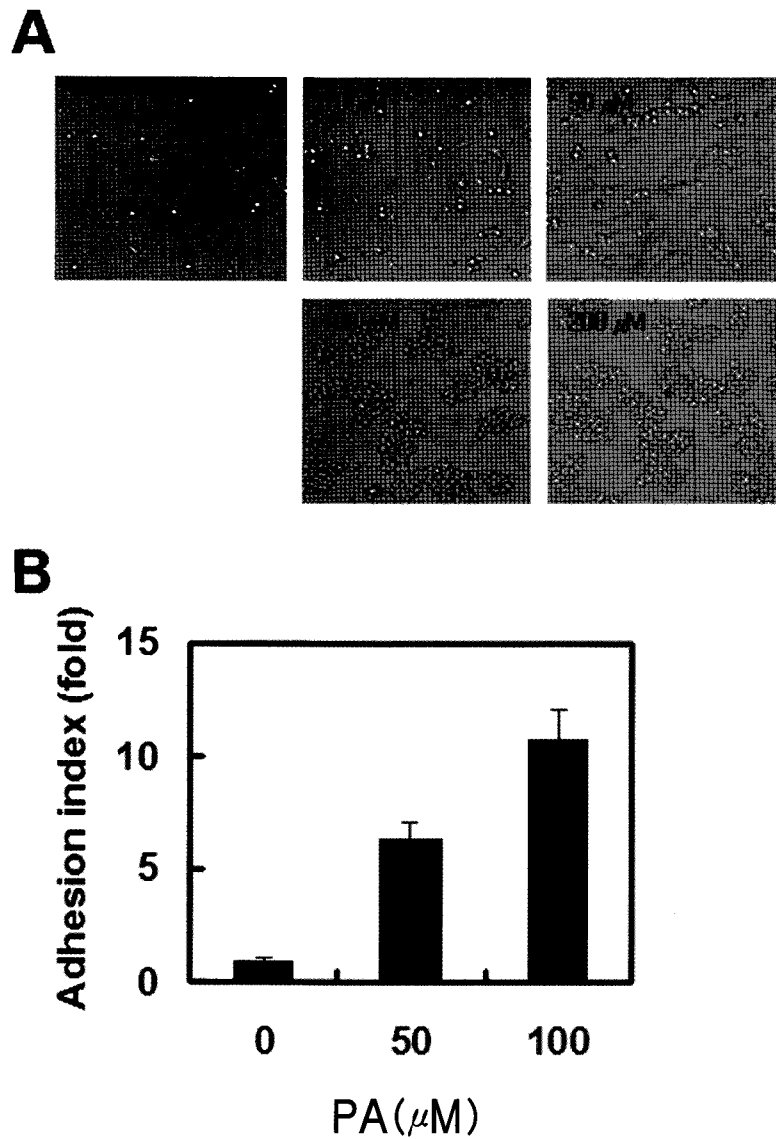
### III. 결 과

#### (1) 인지질산에 의한 세포부착작용

인지질산의 혈관 내피세포에 부착하는 대식세포의 능력을 검토하였다. 내피세포에 부착하는 대식세포는 10  $\mu$ M 인지질산을 처리하였을 때부터 증가하기 시작하고 50  $\mu$ M 농도부터 아주 강하게 부착하였으며, 200  $\mu$ M 농도까지 용량-의존적으로 증가하였다. 100  $\mu$ M 이상의 인지질산 처리농도에서는 내피세포와 대식세포의 부착이외에 대식세포와 대식세포사이에서도 서로 부착하는 현상을 현미경 사진으로 관찰하였다 (Fig. 1A). ICAM-1이 대식세포의 부착에 관여하는지 ICAM-1 항체를 사용하여 확인하였다. ICAM-1 항체를 미리 코팅한 plate에서 인지질산을 24시간동안 처리한 세포는 처리하지 않은 세포에 비하여 강하게 부착하였으며, 인지질산의 농도가 증가할수록 더욱 강하게 부착하였다. 세포염색법으로 부착 정도를 측정할 결과, 50  $\mu$ M 농도에서는 약 7배, 200  $\mu$ M 농도에서는 약 12배 증가하였다 (Fig. 1B).

#### (2) 인지질산의 ICAM-1 단백질과 mRNA 발현작용

ICAM-1 단백질발현과 mRNA 발현은 flow cytometry와 RT-PCR 방법으로 확인하였다. 인지질산을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 FITC 형광이 연결된 ICAM-1 항체와 반응시킨 결과, 처리한 세포에서 히스토그램이 오른쪽으로 강하게 이동하였다. 이와 같은 결과는 ICAM-1 단백질발현이 증가되었음을 의미하는 것이다 (Fig. 2A). 인지질산을 세포에 시간별(0.5, 1, 2, 3, 4 시간)로 처리하고 reverse transcriptase를 사용하여 cDNA를 얻고 ICAM-1 특정 시퀀스에 해당하는 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, ICAM-1 mRNA 발현은 1시간 처리 후부터 증가하기 시작하였다. ICAM-1 mRNA 발현은 시간-의존적으로 증가



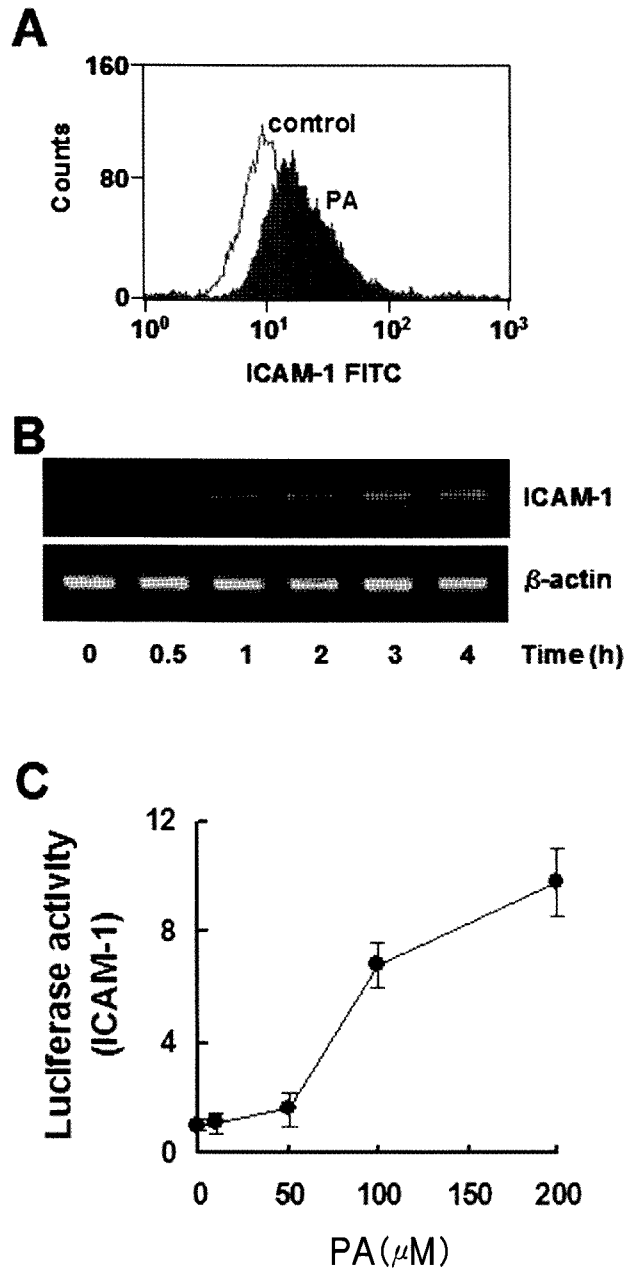
**Fig. 1.** Phosphatidic acid stimulates the adhesion of macrophages to human umbilical vein endothelial cells. Macrophages were incubated with the indicated concentrations of PA for 12 h or were unstimulated as negative control. Resting and PA-activated macrophages were allowed to adhere to a HUVEC monolayer. After seeding and incubation, the attached cells were quantified by measuring hexosaminidase and photographed, as described under "Materials and Methods". The results shown are the mean  $\pm$  SD of adhesion obtained in triplicate from three independent experiments. The photograph is a representative of three separate experiments.

다가 4시간부터 다시 감소하였다. 그러나 대조군으로 사용한  $\beta$ -actin mRNA 발현은 시간에 따라 별다른 영향을 미치지 않고 일정하게 발현하였다 (Fig. 2B).

(3) ICAM-1 프로모터 활성에 미치는 인지질산 작용

인지질산 작용으로 유도 발현되는 ICAM-1의 전사단계에 미

치는 영향을 재확인하기 위하여 luciferase가 연결된 ICAM-1 프로모터 DNA를 세포에 transfection하고 인지질산을 농도별 (0, 10, 50, 100, 200  $\mu$ M)로 24시간 처리하였다. 그 결과, ICAM-1 프로모터 활성에 의해 발현되는 luciferase 활성은 인지질산 처리 농도-의존적으로 증가하였다. 50  $\mu$ M 농도에서는 약 3배, 100  $\mu$ M 농도에서는 약 8배, 그리고 200  $\mu$ M 농도에서는 약 10배 증가하였다 (Fig. 2C).

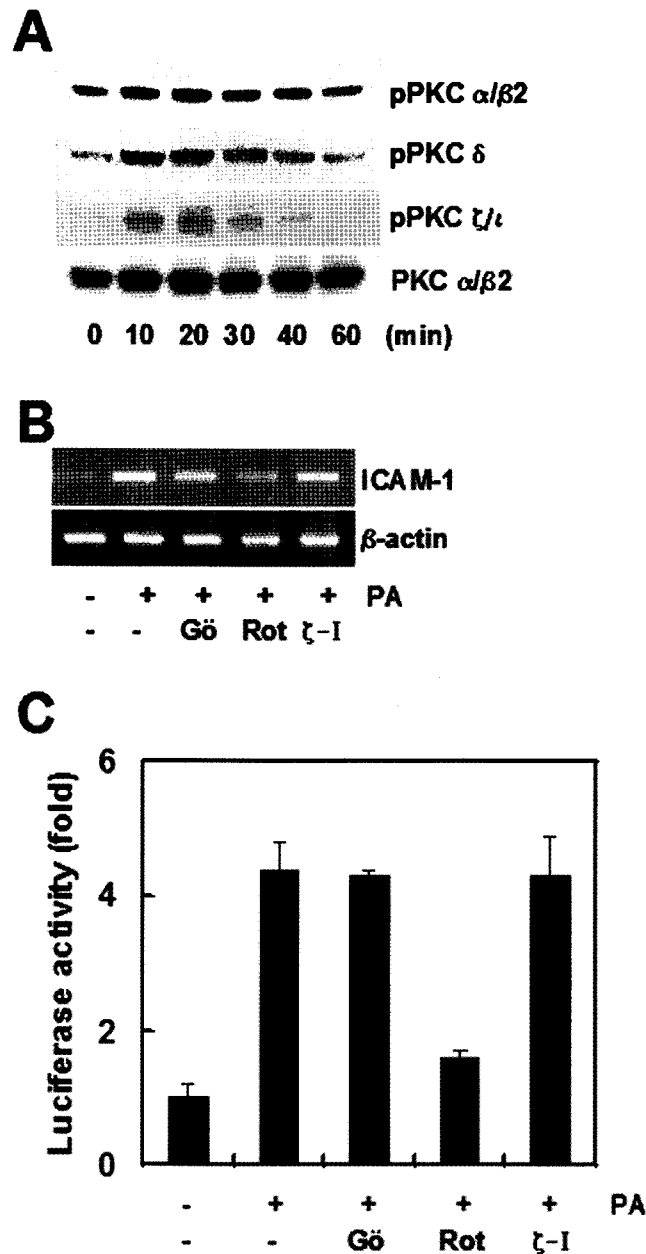


**Fig. 2.** ICAM-1 protein and mRNA in macrophages are induced by PA. (A) Macrophages were cultured for 24 h in culture medium (control) or in the presence of PA. After cell harvesting, ICAM-1 expressions were studied by FACS analysis. (B) PCR products of RNA prepared from macrophages stimulated by 50  $\mu$ M PA for different times were deposited on a 2% agarose gel. The  $\beta$ -actin housekeeping gene was used as the control. C, Macrophages were transiently transfected with 1  $\mu$ g of the ICAM-1-luciferase plasmid and exposed to increasing concentrations of PA for 8 h. The results shown are the mean  $\pm$  SD of luciferase activity (relative fold to untreated cells) obtained in triplicate from four independent experiments.

(4) 인지질산 작용 ICAM-1 발현조절에서 PKC 저해제의 영향

인지질산의 ICAM-1 발현을 조절하는 PKC의 영향을 검토하였다. 인지질산이 어떠한 종류의 PKC 활성을 야기하는가를

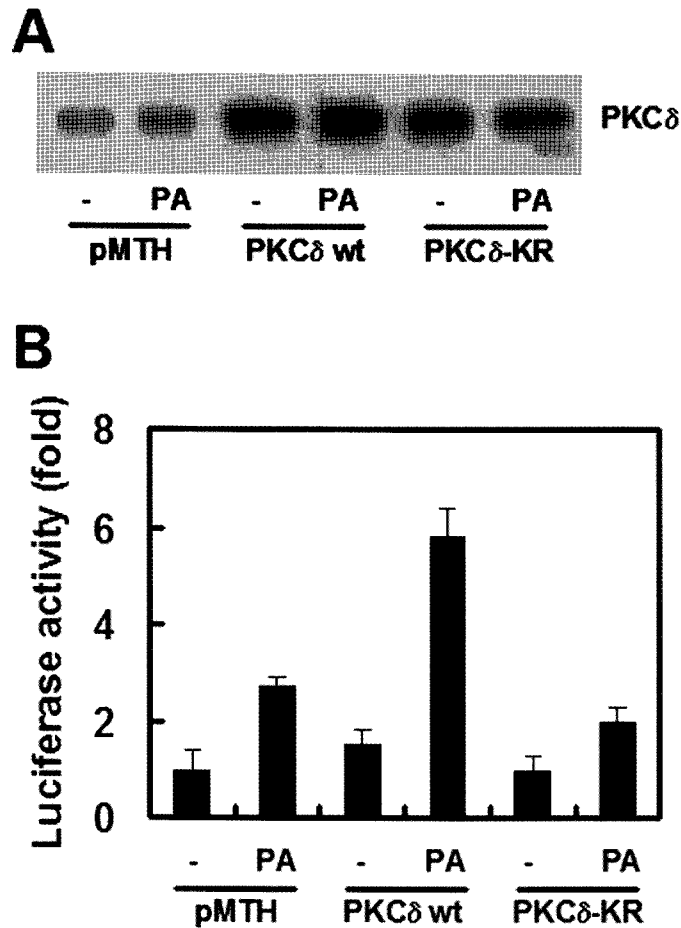
phospho-PKC 항체를 사용하여 확인한 결과, 인지질산은 PKC- $\alpha$ , PKC- $\delta$ , PKC- $\zeta/\iota$  세 종류에 관하여 모두 인산화를 야기하였다. PKC 인산화는 시간에 따라 일시적으로 증가하였으며, 10분 부터 증가하다가 20분에서 최대효과를 나타내고 40분 이후 부터는 점차 감소되어 원상회복되는 경향을 나타내었다. 동일



**Fig. 3.** Selective activation of PKC $\delta$  regulates ICAM-1 expression. (A) Macrophages were treated for the indicated times with PA (50  $\mu$ M). Whole cell lysates were blotted for phospho- PKC $\alpha/\beta$ 2 (Thr 638/641), phospho-PKC $\delta$  (Thr 505) or phospho-PKC $\zeta/\lambda$ . One of them was stripped and reprobed with anti-PKC $\alpha/\beta$ 2 antibody. (B) Macrophages were preincubated for 30 min with 1  $\mu$ M Go6976 (G), 2 mM rottlerin (Rot), or 10  $\mu$ M myristoylated PKC $\zeta$  peptide inhibitor ( $\zeta$ -I). For ICAM-1 expression, total RNA was extracted from macrophages treated with or without PA (50  $\mu$ M) for 3 h, and then reverse-transcribed and analyzed by PCR. The  $\beta$ -actin housekeeping gene was used as the control. (C) Macrophages were transiently transfected with ICAM-1-luciferase plasmid, preincubated for 30 min with 1  $\mu$ M Go6976, 2  $\mu$ M rottlerin, or 10  $\mu$ M myristoylated PKC $\zeta$  peptide inhibitor, and then treated in the absence or presence of PA (50  $\mu$ M). The results shown are the mean  $\pm$  SD of luciferase activity obtained in triplicate from three independent experiments.

한 양의 단백질 확인은 PKC- $\alpha$  항체를 사용하여 확인하였다 (Fig. 3A). 어떠한 종류의 PKC 동위효소가 인지질산 작용 ICAM-1 전사과정을 조절하는가를 검토하기 위하여 PKC 동위

효소-특이적 저해제를 30분 동안 전 처리하고 인지질산으로 처리한 후, ICAM-1 mRNA 발현을 측정하였다. Go6976은 PKC- $\alpha$ 를 저해하고, rottlerin은 주로 PKC- $\delta$ 를 억제하며, PKC- $\zeta$  peptide

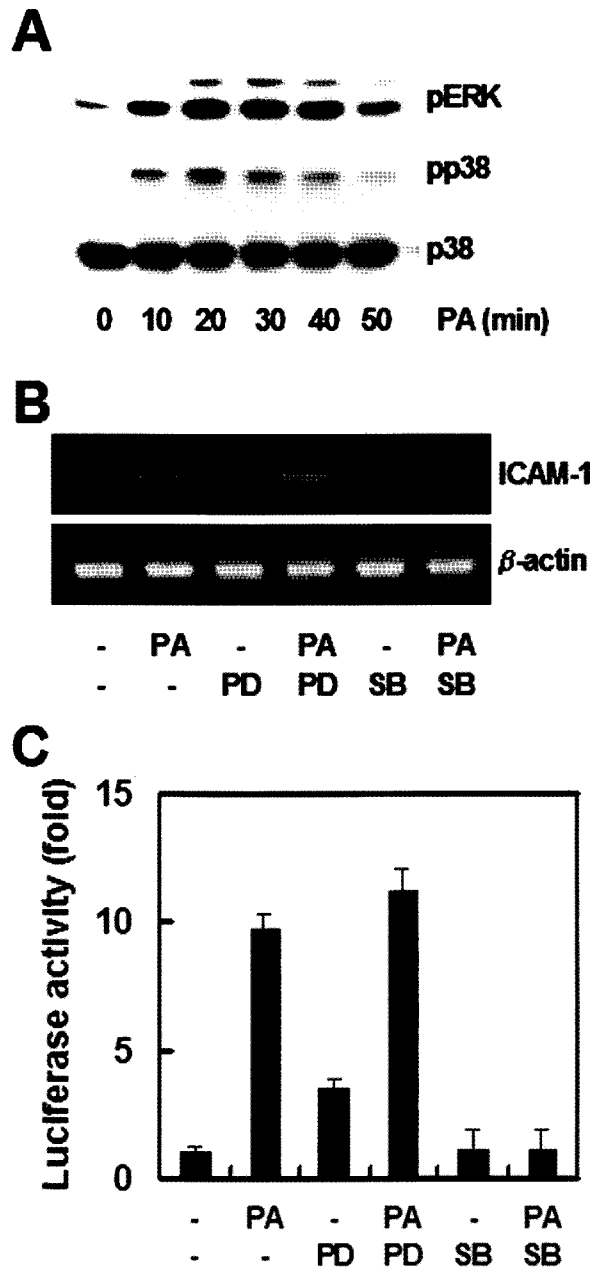


**Fig. 4.** Overexpression of wild type PKC $\delta$  increases activity of ICAM-1 promoter. (A) Macrophages were transiently cotransfected with ICAM-1 promoter and either wild type PKC $\delta$  or mutant PKC $\delta$ -KR and then treated in the absence or presence of PA (50  $\mu$ M). (B) Overexpression of PKC $\delta$  and PKC $\delta$ -KR was confirmed by western blot and promoter activities were measured. The results shown are the mean  $\pm$  SD of luciferase activity obtained in triplicate from three independent experiments.

성 저해제는 PKC- $\zeta$ 에 특이적으로 작용한다. 그 결과, 인지질산을 처리하지 않는 세포는 약간의 ICAM-1 mRNA 발현을 나타낸 반면, 인지질산을 처리한 세포는 강한 ICAM-1 mRNA 발현을 나타내었다. Go6976과 PKC- $\zeta$  peptide 저해제는 인지질산 작용에 의한 ICAM-1 mRNA 발현에 별다른 영향을 나타내지 않았으나 rottlerin은 강하게 ICAM-1 mRNA 발현을 억제하였다 (Fig. 3B). ICAM-1 프로모터 활성화에 작용하는 PKC 동위효소 저해제를 전 처리하여 ICAM-1 전사과정에 미치는 인지질산의 영향을 재검토하였다. ICAM-1 프로모터는 대조군 세포에서는 약한 활성을 나타내었으나 인지질산을 처리한 세포는 약 4배 이상 증가하였다. PKC 동위효소-특이적 저해제를 처리하면 ICAM-1 mRNA 발현과 유사하게 rottlerin은 인지질산이 유도하는 ICAM-1 프로모터 활성을 약 80% 억제함으로써 강한 효과를 나타내었지만 Go6976과 PKC- $\zeta$  저해제는 별다른 영향이 없었다 (Fig. 3C).

#### (5) ICAM-1 발현조절에서 PKC- $\delta$ 동위효소의 조절

ICAM-1 발현을 조절하는 PKC- $\delta$ 의 참여유무를 재확인하기 위하여 PKC- $\delta$  wild type과 PKC 활성이 소실된 mutant 플라스미드를 세포에 주입하여 PKC- $\delta$  wild type과 PKC- $\delta$  mutant를 과발현하는 단일 클론을 확보하였다. 벡터인 pMTH만 주입한 세포에 비하여 PKC- $\delta$  발현은 약 4배 증가하였다. PKC- $\delta$  mutant 발현도 벡터만 주입한 세포에 비하여 약 3배정도 증가하였다 (Fig. 4A). 확립한 PKC- $\delta$  wild type과 mutant 과발현 세포주를 사용하여 인지질산의 작용에 의한 ICAM-1 프로모터 활성의 변화를 검토하였다. 벡터만 주입한 세포에서 인지질산 처리는 처리하지 않은 대조군에 비하여 약 3배의 ICAM-1 프로모터 활성이 증가하였다. wild type PKC- $\delta$  플라스미드를 주입한 세포에서 인지질산 처리는 약 6배 정도 증가하여 벡터만 주입한 세포에 인지질산을 처리한 군에 비하여 약 2배 이상 더 증가하였다. 그러



**Fig. 5.** Phosphatidic acid-induced ICAM-1 expressions are regulated by p38 MAPK. (A) Macrophages were treated for the indicated times with PA (50  $\mu$ M). Whole cell lysates were blotted for phospho-ERK or phospho-p38 MAPK. One of them was stripped and reprobed with anti-p38 antibody. (B) Macrophages were pretreated with 25  $\mu$ M PD98059 (PD) or 10  $\mu$ M SB203580 (SB) for 30 min before PA (50  $\mu$ M) stimulation. Total RNA was subjected to RT-PCR for ICAM-1. The  $\beta$ -actin housekeeping gene was used as the control. (C) Macrophages were transiently transfected with ICAM-1-luciferase plasmid. After transfection, cells were preincubated with specific MAPK inhibitors (PD98059 or SB203580) for 30 min, and then treated with 50  $\mu$ M PA. The results shown are the mean  $\pm$  SD of luciferase activity obtained in triplicate from three independent experiments.

나 mutant PKC- $\delta$  플라스미드를 주입한 세포에서 인지질산 처리는 처리하지 않은 군에 비하여 약 2배만이 증가하고 이것은 백터만 주입한 세포군에 비해서 오히려 ICAM-1 프로모터 활성이 적게 나타났다(Fig. 4B).

(6) 인지질산 작용 ICAM-1 발현에 미치는 p38 MAPK 효능

인지질산 작용 ICAM-1 발현을 조절하는 ERK와 p38 MAPK



의 역할을 검토하였다. 인지질산은 대식세포의 ERK와 p38 MAPK의 인산화를 야기하였다. 두 MAPK의 인산화는 약 10분부터 증가하기 시작하여 20분과 30분 사이에서 최대 효과를 나타내고 40분부터는 다시 감소하였다 (Fig. 5A). 두 종류의 MAPK 중에서 어떠한 종류의 MAPK가 인지질산에 의한 ICAM-1 발현을 조절하는가를 검토하기 위하여 ERK 저해제인 PD98059와 p38 MAPK 저해제인 SB203580을 사용하였다. 인지질산을 처리한 세포는 이전의 실험결과와 비슷하게 대조군에 비하여 강하게 ICAM-1 mRNA 발현이 증가되었다. 그러나 PD98059 전 처리에 이은 인지질산으로 처리한 세포는 ICAM-1 mRNA 발현 변화를 나타내지 않은 반면, SB203580 전 처리 후 인지질산을 처리한 세포는 ICAM-1 mRNA 발현이 강하게 억제되었다 (Fig. 5B). ICAM-1 mRNA 발현을 조절하는 두 종류의 MAPK 상이성을 재확인하기 위하여 저해제를 사용하여 ICAM-1 프로모터 활성을 측정하였다. 대조군에 비하여 인지질산을 처리한 세포에서 프로모터 활성은 약 10배 증가하였다. 그러나 PD98059와 인지질산을 함께 처리한 세포는 ICAM-1 프로모터 활성 변화가 없는 반면, SB203580과 인지질산을 함께 처리한 세포는 ICAM-1 프로모터 활성을 강하게 억제하여 거의 대조군 수준으로 낮추었다 (Fig. 5C).

#### IV. 고 찰

인지질산은 중요한 2차 전령물질이고 염증반응에 관여한다. 염증반응에서 부착단백질에 의한 세포와 세포의 결합은 중심적인 역할을 하고 있다. 인지질산이 대식세포에서 부착단백질 중의 하나인 ICAM-1의 발현을 유도하고 이를 조절하는 신호 전달과정을 규명하였다. 인지질산으로 활성화된 대식세포는 혈관 내피세포에 강하게 부착하였으며, 세포간의 부착은 ICAM-1에 의해 매개되었다.

인지질산 작용 ICAM-1 발현을 조절하는 세포 내 인산화를 조절하는 신호전달물질의 정체를 파악하였다. 인지질산은 다양한 종류의 인산화 효소에 영향을 주지만 이 연구에서는  $\delta$ 형을 포함한 여러 종류의 PKC 인산화를 확인하였다. 최근 인지질산은 세포 내에서 다양한 단백질과 직접적인 결합을 통하여 세포성장 같은 생리적 기능과 염증반응 같은 병리적 기능을 일부 매개한다고 보고하였다<sup>9</sup>. 특히 위와 같은 세포의 기능을 조절하는데 있어서 필수적인 역할담당 인자인 인산화 조절 효소와 직접적인 결합은 인지질산이 중요한 세포성 지질임을 입증하는 증거이다. PKC 중에서도 인지질산과 직접적으로 결합하는 동위효소는  $\zeta$ 형과  $\epsilon$ 형 PKC가 보고 되었다<sup>17,18</sup>. Rottlerin은  $\delta$ 형 PKC 활성을 억제하는 화합물이다. 그러므로 이 화합물에 의해 강력히 억제되는 인지질산의 작용은  $\delta$ 형 PKC가 ICAM-1 발현을 조절하는 중요한 인산화 효소임을 입증하는 것이다. PKC- $\delta$ 형의 중요성은 wild type과 mutant PKC- $\delta$ 를 과발현하여 검토한 실험에서도 재확인 되었다. 그러나 인지질산 작용 ICAM-1 발현을 조절하는 과정에서  $\alpha$ 형과  $\zeta$ 형 이외 다른 종류의 PKC 동위효소의 참여성을 배제할 수는 없다.  $\epsilon$ 형,  $\iota$ 형 및  $\eta$

형에 대한 검토는 하지 않았으며 이들 형에 관한 특이적 저해제의 한계 때문에 아직 이들의 관여성은 잘 모르지만 최소한  $\delta$ 형 PKC 관여한다는 점은 명백한 결과로 입증되었다. 또한 인지질산이 어떻게 PKC- $\delta$  활성을 조절하는가는 아직 모르고 있다. 인지질산과 PKC- $\delta$ 의 직접적인 결합 유무나 간접적인 작용에 관한 구체적인 기전은 모르고 있다. 인지질산이 PKC- $\delta$  활성을 어떻게 조절하는가에 대한 구체적인 결과를 입증할 수 있는 지속적인 연구가 필요하다.

염증반응과 ICAM-1 발현 조절과정에서 무엇보다 중요한 인자는 MAPK 활성화이고, 인지질산에 의해 활성화되는 인산화 효소 중에서 가장 많이 연구된 것도 MAPK이다. 그러므로 인지질산 작용으로 야기되는 ICAM-1 발현을 조절하는 MAPK 역할 규명은 필수적이다. MAPK는 크게 ERK, p38 MAPK 및 JNK 3부류로 나누어지고 세포 외부와 내부 환경, 외부 자극과 세포 종류에 따라 작용하는 MAPK 종류가 달라진다. 다른 종류의 MAPK 활성화에 따라 세포성장, 세포사멸 및 세포분화등과 같은 다른 세포 기능이 나타난다. 특히 p38 MAPK는 세포사멸을 조절하는 중심 인산화 효소이고 염증반응에서 가장 두드러지게 나타나는 사이토카인 생성을 매개하는 중심인자이다. 그러나 인지질산 작용으로 활성화되는 MAPK 중에서 가장 잘 알려진 것은 ERK1/2이다. 인지질산은 Ras-Raf와 MEK를 통하여 ERK1/2 활성을 조절하고, 활성화된 ERK1/2는 세포의 특정 기능을 조절한다<sup>9</sup>. 대표적인 예로서 인지질산은 ERK1/2 활성을 통하여 머리카락 성장을 조장하고<sup>19</sup>, dendritic cell의 분화와 성숙을 조장하는 CD 83 발현을 조절하고, endocytosis를 조절하며<sup>20</sup>, 염증성 사이토카인 생성을 조절한다<sup>21</sup>. 이 연구에서 인지질산은 3종류 MAPK 모두에 관하여 인산화를 일시적으로 증가시키고 있으므로 ICAM-1 발현 조절에 관한 가능성을 예견할 수 있었다. 실제로 각각의 특이적 저해제를 사용하여 확인하였을 때 p38 MAPK 활성화는 인지질산이 야기하는 ICAM-1 발현 조절에 매우 중요함을 알 수 있었다. 다음은 PKC- $\delta$ 와 MAPK의 상관성을 검토한 결과, PKC- $\delta$  활성화에 의해 p38 MAPK의 활성이 조절되고 이로 인하여 ICAM-1 발현이 조절되었다. 이와 같은 결과는 인지질산 작용으로 야기되는 ICAM-1 발현은 최소한 PKC- $\delta$ 와 p38 MAPK의 연속적인 활성화에 따라 조절된다는 것을 의미한다.

현재까지 알려진 인지질산의 신호전달 효과는 여러 가지 방식으로 전해질 것으로 추측하고 있다. 그러나 대부분의 방식은 세포질에 존재하는 단백질을 특정 막으로 이동시켜 인지질과 결합하는 방식이다. 즉, 인지질산은 세포 내에 비활성형으로 존재하는 결합 단백질을 직접 또는 간접적으로 그들의 기능을 수행하는 장소로 이동시킴으로서 활성화시키는 방법이다. 가장 좋은 보기는 Raf-1의 활성화 방법이며, Raf-1 활성을 위해서는 인지질산이 막으로 이동되는 것이 필수 불가결이다. 이렇게 이동된 Raf-1은 근처에 존재하는 MEK를 활성화하고 다시 ERK를 활성화하고 궁극적으로는 세포 성장과 같은 다양한 세포성 기능을 수행할 것으로 생각하고 있다<sup>21</sup>. 그러나 p38 MAPK에 관한 작용기전은 밝혀지지 않았다. 대식세포에서도

인지질산은 3종류의 MAPK 모두를 활성화 시켰으나 ICAM-1 발현 조절은 p38 MAPK에 의해서 특별히 조절되었다. 인지질산이 ERK와 p38 MAPK를 활성화하는 것으로 미루어 위와 같은 작용 기전으로 전개될 가능성이 있으나 p38 MAPK가 ICAM-1 발현 조절에 우선적으로 관여하는 것으로 미루어 또 다른 작용기전으로 전개될 가능성이 높으므로 앞으로 더 많은 연구가 필요하다.

### V. 결 론

인지질산은 세포의 중요한 2차 전령물질로서 염증반응에 관여한다. 세포와 세포사이의 부착은 세포 부착 단백질을 통하여 매개되고 부착반응은 염증반응의 중심과정에 속한다. 그러므로 이 논문은 대식세포에서 인지질산이 부착단백질 ICAM-1 발현과 이를 조절하는 신호전달과정을 연구하였다. 인지질산은 대식세포와 사람 내피세포의 상호 부착을 증진시키고 이와 같은 부착반응은 ICAM-1 발현증가에 의하여 이루어졌다. 인지질산은 여러 종류의 protein kinase C (PKC) 단백질의 인산화를 야기하고 활성화된 PKC는 ICAM-1 발현을 조절하였다. PKC- $\delta$  저해제인 rottlerin 전 처리와 PKC 활성이 소실된 PKC- $\delta$  mutant는 인지질산이 야기하는 ICAM-1 발현을 억제하였으나, PKC- $\alpha$  또는 PKC- $\zeta$  저해제는 ICAM-1 발현을 억제하지 못하였다. 인지질산은 3종류의 mitogen activated protein kinase (MAPK) 인산화를 증진시켰으나, 이 중에서 ERK1/2 저해제나 JNK 저해제는 인지질산 작용 ICAM-1 발현을 조절하지 못하였으나, p38 MAPK 저해제는 ICAM-1 발현을 조절하였다.

### 참고문헌

1. Meijer HJG, Munnik T: Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2003;54:265-306.
2. Ghosh S, Moore S, Bell RM, Dush M: Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. *J Biol Chem* 2003;278(46):45690-45696.
3. Jones JA, Hannun YA: Tight binding inhibition of protein phosphatase-1 by phosphatidic acid. specificity of inhibition by the phospholipid. *J Biol Chem* 2002;277(18):15530-15538.
4. Delon C, Manifava M, Wood E, Thompson D, Krugmann S, Pyne S, et al: Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J Biol Chem* 2004;279(43):44763-44774.
5. Baillie GS, Huston E, Scotland G, Hodgkin M, Gall I, Peden AH, et al: TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Calcium-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *J Biol Chem* 2002;277(31):28298-28309.
6. Manifava M, Thuring JW, Lim ZY, Packman L, Holmes AB, Ktistakis NT: Differential binding of traffic-related proteins to phos-

- phatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate-coupled affinity reagents. *J Biol Chem* 2001;276(12):8987-8994.
7. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J: Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 2001;294(5548):1942-1945.
8. Palicz A, Foubert TR, Jesaitis AJ, Marodi L, McPhail LC: Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J Biol Chem* 2001;276(5):3090-3097.
9. Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, Romero G: The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS* 2002;531(1):65-68.
10. Karathanassis D, Stahelin RV, Bravo J, Perisic O, Pacold CM, Cho W, et al: Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction. *EMBO J* 2002;21(19):5057-5068.
11. Park J, Gu Y, Lee Y, Yang Z, Lee Y: Phosphatidic acid induces leaf cell death in Arabidopsis by activating the Rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation. *Plant Physiol* 2004;134(1):129-136.
12. Lim HK, Choi YA, Park W, Lee T, Ryu SH, Kim SY, et al: Phosphatidic acid regulates systemic inflammatory responses by modulating the Akt-mammalian target of rapamycin-p70 S6 kinase 1 pathway. *J Biol Chem* 2003;278(46):45117-45127.
13. Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, Jovanovic I, Emeson EE, Ugarova TP, et al: Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* 2002;99(12):4457-4465.
14. Strasly M, Cavallo F, Geuna M, Mitola S, Colombo MP, Forni G, et al: IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol* 2001;166(6):3890-3899.
15. Okada S, Shikata K, Matsuda M, Ogawa D, Usui H, Kido Y, et al: Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes* 2003;52(10):2586-2593.
16. Cummings R, Parinandi N, Wang L, Usatyuk P, Natarajan V: Phospholipase D/phosphatidic acid signal transduction: role and physiological significance in lung. *Mol Cell Biochem* 2002;234-235(1-2):99-109.
17. Limatola C, Schaap D, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ: Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem J* 1994;304(Pt 3):1001-1008.
18. Corbalan-Garcia S, Sanchez-Carrillo S, Garcia-Garcia J, Gomez-Fernandez JC: Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC epsilon. *Biochemistry* 2003;42(40):11661-11668.
19. Takahashi T, Kamimura A, Hamazono-Matsuoka T, Honda S: Phosphatidic acid has a potential to promote hair growth *in vitro* and *in vivo*, and activates mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase in hair epithelial cells. *J Invest Dermatol* 2003;121(3):448-456.
20. Burger KN, Demel RA, Schmid SL, de Kruijff B: Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry* 2000;39(40):12485-12493.
21. Rizzo MA, Shome K, Watkins SC, Romero G : The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 2000;275(31):23911-23918.