

다양한 자극에 의한 넙치의 Phospholipase C β 3 조직별 발현 분석

우수지 · 이형호 · 정준기[†]
(부경대학교)

Tissue Type Expression of Phospholipase C β 3 in Olive Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Following Various Stimulation

Soo-Ji WOO · Hyung-Ho LEE · Joon-Ki CHUNG[†]
(Pukyong National University)

Abstract

Phospholipase C is a key enzyme of signaling pathways hydrolyzed phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate 2 second messengers. Among the PLC, PLC- β subfamily consisted of 4 isoforms, PLC- β 1~4. Here, we studied the tissue specific expression of PLC- β 3 in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) following external stimulation like lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (ConA) and environmental stress compared with the inflammatory cytokines IL-1b. PoPLC- β 3 gene transcripts has the effect in stimulated tissue compared to control. These results provide what we sure to be a important role for PLC- β 3 activity in tissue and verify PLC- β 3 as potential immune enzyme for signal transduction.

Key words : Phospholipase C - β 3, Tissue expression, Olive flounder

I. 서론

Phospholipase C는 호르몬, 펩티드 성장인자, 신경전달물질, 면역글로불린 등을 포함한 일련의 세포내 신호전달 반응에 중요한 역할을 하는 세포막 인지질 분해효소이다. 활성화된 PLC는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)를 가수분해해 2차 전령물질인 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) diacylglycerol (DAG)를 생성한다 (Rhee et al., 1992). 생성된 DAG는 protein kinase C (PKC)를 생리학적 활성화 시키고, IP₃는 세포 내 저장부위로부터 Ca²⁺을 유리 촉진시킨다 (Hansmann et

al., 1989). 현재까지 포유류에서 클로닝 된 총 13개의 PLC isozymes 중 PLC- β subfamily는 4가지 (PLC- β 1~4)로 분류되며, 이는 서로 다른 조직발현과 G 단백질 조절을 가진다 (Berridge MJ & Irvine RF, 1989). PLC- β isoforms는 공통적으로 N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, 4개의 EF hand, (X+Y) catalytic TIM barrel domain, C2 domain 그리고 C-terminal (CT) domain으로 구성되어 있다 (Singh & Murray, 2003). Heterotrimeric G 단백질의 α -subunits (α_q , α_{11} , α_{14} and α_{16})와 G $\beta\gamma$ 는 PLC- β isoform를 자극시킨다 (Sternweis PC & Smrcka AV, 1992). Noh et al. (1995)에 따

[†] Corresponding author : 051-629-5940, jkchung@pknu.ac.kr

* 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비 (2015년)에 의하여 연구되었음.

르면 PLC- β 3는 넓은 범위의 세포와 조직에 분포되어 있고, 최근 쥐의 말초신경 모집단에 특히 분포가 많은 것으로 밝혀졌다 (Han et al., 2006). 또한 PLC- β isoform이 chemokine과 연관된 세포수송 조절에 관여하고 (Vatter et al., 2016) 특히 T cell의 chemotaxis와 cell proliferation, apoptosis 예방, CD⁴⁺·CD⁸⁺ T cell 분화에 관련한 lymphocyte 기능에 기여하는 것으로 알려져 있다 (Bach et al., 2007). 그러나, 면역과 관련된 PLC- β isoform 세포신호전달의 중요성에도 불구하고, 수계 대표 생물인 어류에서의 PLC 연구가 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 대한민국 대표 양식어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 사용하여 병원체 면역 관련인자 및 물리적 환경변화 자극으로 인한 PoPLC- β 3의 조직별 시간대 별 발현량을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험어

총 40 마리의 건강한 넙치 (28±11g)를 포항 양식장에서 구입하여 500L의 수온 20°C, 염도 30±0.2‰ 수조에 10마리씩 1주일 동안 순치시켰다. 대조구의 시험어는 phosphate buffered saline (PBS) 500 μ l를 주사였다. 면역자극 실험어류는 500 μ l의 lipopolysaccharide, (LPS, 100 μ g/ml) 및 concanavalin A (ConA, 100 μ g/ml)를 복강주사하였다. 주사 후 0, 1, 3, 6, 24 시간 경과 시 각 시간마다 3마리씩 해부하여 신장과 비장을 샘플링하였다.

2. 물리적 환경 자극 분석

수온변화를 실험을 위해 20°C에서 1주일 순치시킨 넙치를 사용하였다. 시간 당 2.5°C 씩 수온을 상승시켜 최종 실험 수온인 30°C에 도달한 시점부터 24시간 후 모든 장기를 샘플링 하였다. 염도변화 실험에 사용된 어류는 30‰에서 1주일

간 순치시킨 후 시간당 5‰ 씩 감소시켜 최종 염도 0‰에 도달한 시점부터 24시간 후 모든 장기를 샘플링 하였다.

3. 넙치의 mRNA 추출과 cDNA 합성

Total RNA는 GeneAll[®] Hybrid-R[™]를 사용해 넙치의 조직을 protocol에 따라 추출하였다. 추출된 RNA는 first-strand cDNA 합성을 위해 주형으로 사용하였다. 분리된 RNA는 260nm의 optical density에서 UV spectrophotometer(Ultrospec 6300 pro, Amersham Biosciences)를 사용하여 정량하였다. 정량된 cDNA는 Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis kit(Roche)를 사용하여 제작하였다. 이후 65°C에서 10분 동안 denaturation 하였다. 5X buffer 4 μ l, dNTP 2 μ l, RNase inhibitor 0.5 μ l, RTase 0.5 μ l 첨가한 뒤 50°C에서 1시간, 85°C에서 5분 동안 polymerase chain reaction (PCR)하였다.

4. Reverse Transcription PCR을 통한 조직별 유전자 발현분석

PoPLC- β 3 mRNA의 조직별 유전자 발현분석을 위해 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)을 하였다. 넙치의 18S rRNA를 control로 사용하였다. 본 실험에서 사용된 primer는 <Table 1>에 나타내었다. initial denaturation (94°C, 5min) 1 cycle; denaturation (94°C, 30sec), annealing (55°C, 30sec), extension (72°C, 30sec) 30 cycles; final elongation (72°C, 7min) 1 cycle 조건으로 polymerase chain reaction (PCR)하였다. 증폭된 PCR product는 Ethidium bromide를 포함한 1.2% agarose/TAE gel을 사용하여 전기영동 하였고, Gel Doc image analysis system(Bio Rad, USA)를 통해 확인하였다. PCR 산물은 agarose gel extraction (QIAquick[®] Gel Extraction kit)를 통해 분리하였고 sequence(COSMO co, Ltd., DNA Sequencing Service, Seoul, Korea)를 분석하였다.

5. Quantitative PCR을 통한 조직별 유전자 발현 정량분석

PoPLC-β3 mRNA의 조직별 유전자 발현 정량 분석을 위해 gene-specific primer를 이용해 Quantitative PCR을 실시하였다. 넙치의 18s rRNA를 internal control로 사용하였다. qPCR은 quantitative thermal cycler (LightCycler®480II, Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland) 기기를 이용하여 총 20 μl 중 10 μl의 Master Mix (LightCycler® 480 II SYBR Green, Roche, Switzerland), 1 μl의 각각의 primer 와 0.5 μl의 cDNA를 사용하였다. qPCR은 initial denaturation (95°C, 5min) 1 cycle; denaturation (95°C, 10sec), annealing (58°C, 10sec), extension (72°C, 10sec) 45cycles; final elongation (72°C, 10sec) 1 cycle 조건으로 polymerase chain reaction (PCR)한다. 증폭된 PCR product는 2^{-ΔΔCT} method를 통해 상대발현량을 분석하였다 (Giulietti et al., 2001). 또한 lymphocyte mitogen이자 전 염증 cytokine인 interleukin 1β (IL-1β)의 발현도 함께 분석하였다.

<Table 1> PCR primers used in this study

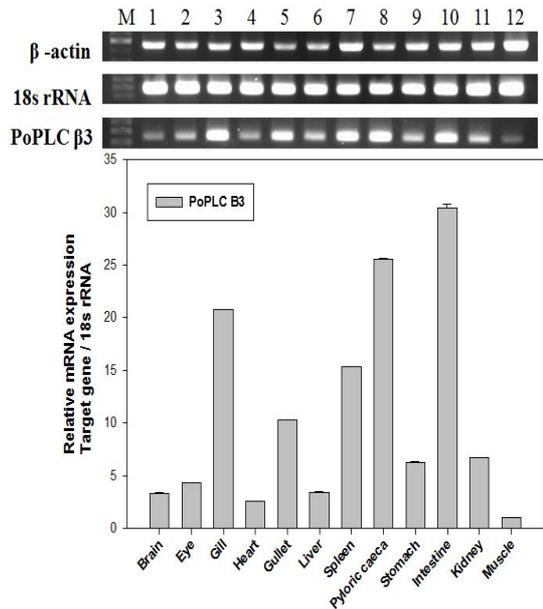
Primer name	5'-3' sequence	Description
IL-1β-F	AACAGCCAAGGCAAGATTG	GenBank accession no: AB070835
IL-1β-R	AATGTCCAGCTCCTCTCA	
18s-rRNA-F	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG	GenBank accession no : DQ267937
18s-rRNA-R	CATCTAAGGGCATCACAGACCTG	
PoPLC-β3-F	GGCCAAGATGGCTGAGTACTGC	For RT-PCR and qRT-PCR
PoPLC-β3-R	GTCAACAGGCCGTCAGTGTGG	

III. 결 과

1. PoPLC-β3의 조직 특이적 발현

정상넙치 PoPLC-β3의 조직 특이적 발현을 알아보기 위해 넙치의 12 조직인 뇌, 눈, 아가미,

심장, 식도, 간, 비장, 유문수, 위, 장, 신장 그리고 근육 조직의 cDNA를 이용해 RT-PCR과 qPCR을 실시하였다. 모든 세포에 고루 발현되는 housekeeping gene의 일종인 β-actin과 18s rRNA를 control로 사용하였다. 대부분 조직에서 PoPLC-β3가 골고루 발현되었고 그 중, 장, 유문수, 아가미, 식도에서 높게 발현되는 것으로 나타났다([Fig. 1]).

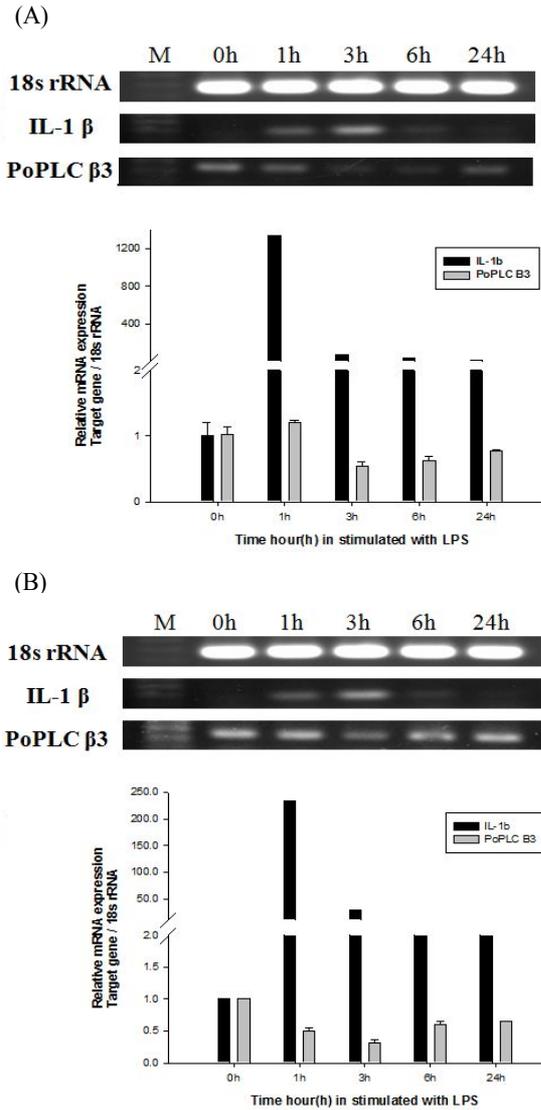


[Fig. 1] Tissue-specific distribution of the PoPLC-β3 mRNA. The olive flounder 18s rRNA gene was used as a reference gene to normalize the expression mRNA levels between sample tissues. Each value is the average of three replicate samples and data are shown as means ±S.E.

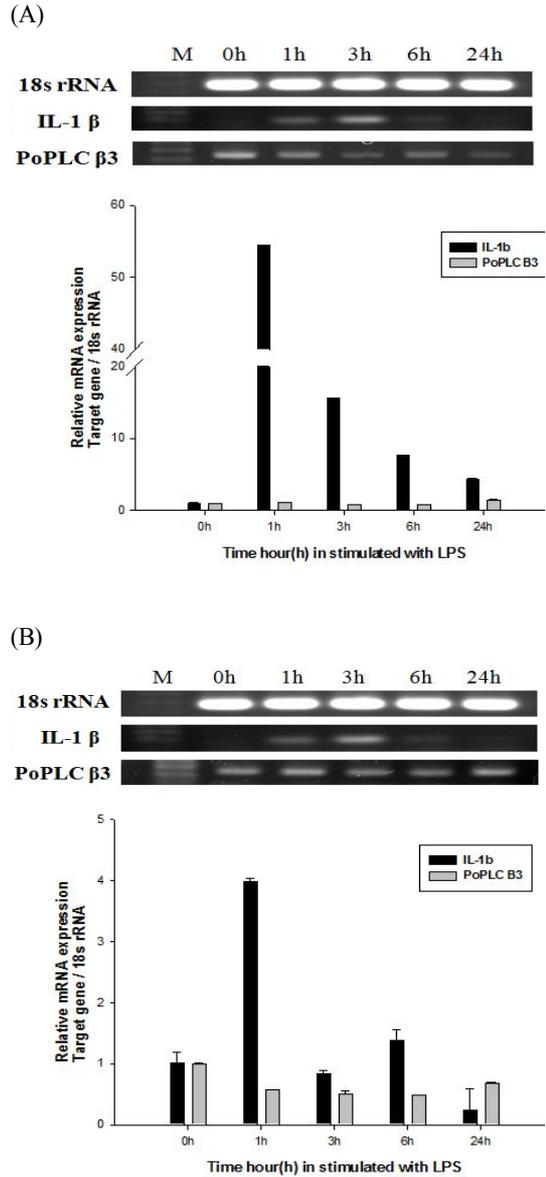
2. 면역 자극에 따른 변화

LPS 자극시 비장과 신장에서는 자극 후 3시간째에 PoPLC-β3 발현양이 줄어들다가 시간이 지남에 따라 증가하였다. IL-1β는 자극 후 1시간째에 증가하였다가 점차 감소하였다([Fig. 2]). 마찬가지로 ConA 자극시 비장과 신장에서는 자극 후

3시간째에 PoPLC- β 3 발현양이 줄어들다가 시간이 지남에 따라 점차 증가하였다. IL-1 β 는 자극 후 1시간째에 증가하였다가 점차 감소하였다 ([Fig. 3]).



[Fig. 2] RT-PCR and qRT-PCR analysis of IL-1 β and PoPLC- β 3 following stimulation with LPS from (A) spleen and (B) kidney at 0,1,3,6,24H. Each value is the average of three replicate samples and data are shown as means \pm S.E.

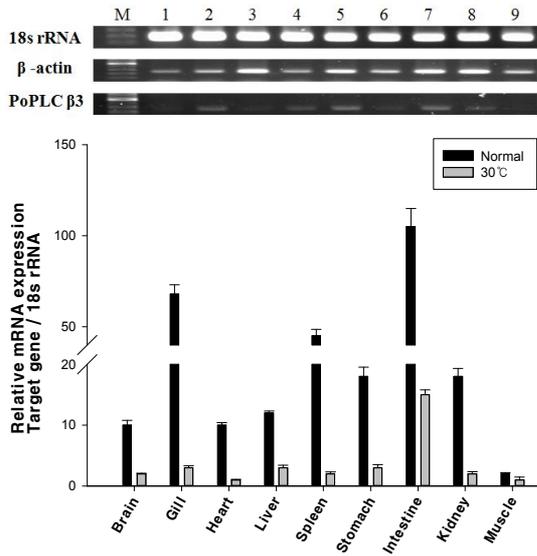


[Fig. 3] RT-PCR and qRT-PCR analysis of IL-1 β and PoPLC- β 3 following stimulation with ConA from (A) spleen and (B) kidney at 0,1,3,6,24H. Each value is the average of three replicate samples and data are shown as means \pm S.E.

3. 물리적 환경 자극에 따른 변화

넵치의 물리적 환경 자극변화에 따른 특정 유

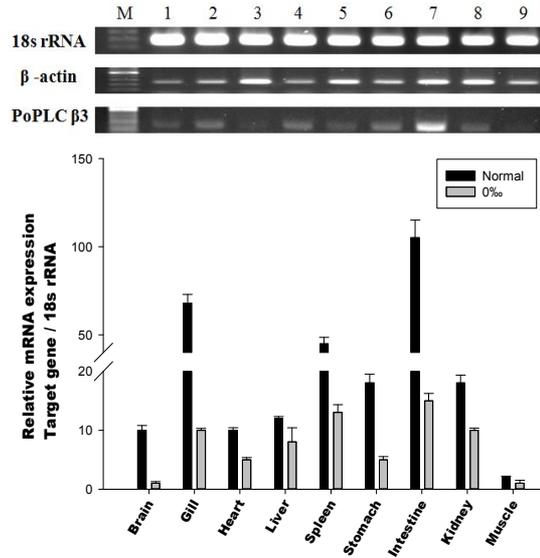
전자의 발현 차이를 비교하고자 housekeeping gene의 일종인 β -actin과 18s rRNA를 control로 사용하였다. 그 결과 수온 및 염도변화 2가지 자극 모두 PoPLC- β 3 발현에 영향을 미쳤다. 수온 30°C 자극은 PoPLC- β 3가 정상 어류 조직 발현과 대비해 눈에 띄게 모두 수십 배 가량 감소하였다. 그 중 아가미, 비장, 장, 신장 조직의 경우 약 90% - 85% 로 발현량이 감소하였다 ([Fig. 4]). 마찬가지로 염도 0‰ 자극에서는 PoPLC- β 3가 아가미, 위, 장 조직에서 약 85% - 72% 로 발현량이 감소하였다 ([Fig. 5]).



[Fig. 4] RT-PCR and qRT-PCR analysis of IL-1 β and PoPLC- β 3 following temperature increased after 24H. Each value is the average of three replicate samples and data are shown as means \pm S.E.

IV. 고 찰

PLC- β isoform는 세포내 네트워크와 G 단백질과 관련된 주요 신호전달 효소 중 하나이다. 본 실험에서는 넙치의 PLC- β 3의 조직 내 발현 정도와 면역 자극 및 물리적 환경 자극에 따른 발현 정도를 비교분석하였다.



[Fig. 5] RT-PCR and qRT-PCR analysis of IL-1 β and PoPLC- β 3 following salinity decreased after 24H. Each value is the average of three replicate samples and data are shown as means \pm S.E.

포유류의 PLC- β 3가 뇌, 간, 이하선에서 발현이 높았던 것과는 달리 (Rössler et al., 1998), 넙치의 PLC- β 3는 주로 소화계나 아가미에서 발현이 높은 것을 보아 조직 특이적으로 발현하는 것으로 나타났다. 이는 어류가 포유류와 달리 수계라는 독특한 환경에서 서식하며 이에 따른 특유의 생리적 기능을 가지기 때문에 인 것으로 추정된다 (Beitinger & Fitzpatrick, 1979).

LPS 와 ConA는 면역자극 인자로 경골어류에 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히 LPS는 그람 음성균의 세포벽에서 발견되는 endotoxin으로 선천적 면역체계에서 TLR4에 의해 인식되며 (Swain et al., 2008) ConA는 글로불린의 일종으로 T세포 분열촉진제로서의 작용과 각종 인터루킨 인자들의 생성을 촉진시킨다 (Kremer et al., 1990). Wang et al.(2007) 은 쥐의 PLC- β 3가 동맥 병소에서 Macrophage 연속된 분화와 T 세포 및 인터루킨과 관련된 염증반응을 일으킨다고 밝

했다. 따라서 본 연구에서 이들 면역 자극 인자들이 넙치의 시간에 따른 PLC- β 3 발현에 영향을 주었음을 알 수 있었다.

어류에서의 스트레스 요인은 물리적 요인과 화학적 요인으로 나뉘어진다. 이 중 물리적 요인으로 온도, 염도, 양식 밀도, DO 등이 있으며 (Barton & Iwama, 1991), 온도와 염도 스트레스는 성장, 번식, 대사, 삼투 조절 그리고 면역 기능에 영향을 미친다 (Conte, 2004). An et al.(2010) 연구에 따르면 온도 상승(30°C) 과 삼투압 감소 (10 psu and 0 psu) 시 black porgy 의 간조직에서 스트레스를 받음을 확인하였다. 한편, Testerink & Munnik (2005) 는 stress 인자에 따라 phosphatidic acid (PA)의 up and downstream에 인지질가수분해 효소가 영향을 준다고 밝혔다.

본 연구에서는 물리적 외부 환경 변화에 따른 stress 와 넙치의 면역 반응의 증가로 인해 넙치의 PLC- β 3가 감소하였음을 알 수 있었다. 이러한 연구결과는 어류의 PLC- β 3의 조직별 기능을 이해하고 면역 및 외부 물리적 환경 자극에 의한 면역체계를 이해하는데 중요한 자료가 될 것이다.

References

- An, K. W. · Kim, N. N. · Shin, H. S. · Kil, G. S. & Choi, C. Y.(2010). Profiles of antioxidant gene expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic stresses in black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(2), 262~268.
- Bach, T. L. · Chen, Q. M. · Kerr, W. T. · Wang, Y. · Lian, L. · Choi, J. K. · Wu, D. · Kazanietz, M. G. · Koretzky, G. A. · Zigmund, S. & Abrams, C. S.(2007). Phospholipase c β is critical for T cell chemotaxis. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2223~2227.
- Barton, B. A. & Iwama, G. K.(1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1, 3~26.
- Beitinger, T. L. & Fitzpatrick, L. C.(1979). Physiological and ecological correlates of preferred temperature in fish. *American Zoologist*, 19(1), 319~329.
- Berridge, M. J. & Irvine, R. F.(1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, 341, 197~205.
- Conte, F. S.(2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86(3), 205~223.
- Giulietti, A. · Oververgh, L. · Valckx, D. · Decallonne, B. · Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25(4), 386~401.
- Han, S. K. · Mancino, V. & Simon, M. I. (2006). Phospholipase C β 3 mediates the scratching response activated by the histamine H1 receptor on C-fiber nociceptive neurons, *Neuron*, 52(4), 691~703.
- Hansmann, R. H. · Mauser, E. · Sandler, T. · Uhr, E. · Wood, I. & Young, D.(1989). Studies of Inositol Phospholipid-Specific Phospholipase C. *Science*, 244, 546.
- Kremer, J. M. · Lawrence, D. A. · Jubiz, W. · Digiacomo, R. · Rynes, R. · Bartholomew, L. E. & Sherman, M.(1990). Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with Rheumatoid Arthritis clinical and immunologic effects. *Arthritis & Rheumatism*, 33(6), 810~820.
- Noh, D. Y. · Shin, S. H. & Rhee, S. G. (1995). Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1242(2), 99~113.
- Rhee, S. G. · Choi, K. D. · Pan, G. · Sadowski, P. D. · Wynn, R. M. · Davie, J. R. & Brownlee, M.(1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *Regulation*, 267(18), 12393.
- Rössler, P. · Kroner, C. · Freitag, J. · Noè, J. · & Breer, H.(1998). Identification of a phospholipase C β subtype in rat taste cells. *European journal of cell biology*, 77(3), 253~261.

- Singh, S. M. & Murray, D.(2003). Molecular modeling of the membrane targeting of phospholipase C pleckstrin homology domains. *Protein Science*, 12(9), 1934~1953.
- Sternweis, P. C. & Smrcka, A. V.(1992). Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(12), 502~506.
- Swain, P. · Nayak, S. K. · Nanda, P. K. & Dash, S.(2008). Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish & shellfish immunology*, 25(3), 191~201.
- Testerink, C. & Munnik, T.(2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in plant science*, 10(8), 368~375.
- Vatter, P. · Schuhholz, J. · Koenig, C. · Pfreimer, M. & Moepps, B.(2016). Ligand-dependent serum response factor activation by the human CC chemokine receptors CCR2a and CCR2b is mediated by G proteins of the Gq family. *Journal of leukocyte biology*, 99(6), 979~991.
- Wang, Z. · Liu, B. · Wang, P. · Dong, X. · Fernandez-Hernando, C. · Li, Z. & Wu, D.(2008). Phospholipase C β 3 deficiency leads to macrophage hypersensitivity to apoptotic induction and reduction of atherosclerosis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(1), 195~204.
-
- Received : 28 June, 2016
 - Revised : 09 August, 2016
 - Accepted : 24 August, 2016