

토끼의 관절 연골 세포에서 Lysophosphatidic acid의 효과

김 송 자* · 이 선 령

*공주대학교 자연과학대학 생명과학과 · 제주대학교 자연과학대학 생명과학과

요 약

Lysophosphatidic acid (LPA)는 여러 종류의 세포에서 apoptosis, differentiation, dedifferentiation 등 세포가 살아가기 위한 세포내부의 신호전달에 관련되어 기능을 발휘하거나 형태학적으로 actin 골격구조의 변화를 유도하여 세포 형태학적 모양을 변화시키는 중요한 요인으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 연골 세포에 미치는 LPA의 효과 및 신호경로 체계를 확인하였다. 그 결과, LPA는 염증 인자 발현량의 조절 뿐 아니라 NO 유도에 의한 chondrocyte의 dedifferentiation에도 관련되어 있으며 이는 MAP kinase pathway가 아닌 또 다른 신호전달 경로에 의해 조절되고 있음을 보여주었다.

서 론

Lysophosphatidic acid (LPA)는 화학적으로 lyso 형태를 가지고 있는 인지질(phospholipid)의 일종으로서 인지질의 기본 골격인 글리세롤의 2번 탄소에 붙어있는 아라키돈산(arachidonic acid)이 phospholipase A₂ (PLA₂)에 의해서 분해되어 없어진 구조를 하고 있다. 또한 3번 탄소에 붙어있는 choline, inositol, ethanolamine의 부분이 phospholipase D (PLD)에 의해 제거되고 인산만이 남아 있는 심플한 구조를 가지고 있다. 이들은 다양한 cell type에서 여러 각기 다른 기능, 즉 cell survival에 관련된 apoptosis, differentiation, dedifferentiation 등 살아가기 위한 각각의 세포내부의 신호전달에 관련되어 기능을 발휘하는가 하면 형태학적으로 actin 골격구조의 변화를 유도하여 cell change, size, shape 등 세포의 형태학적 모양을 변화시키는데 중요한 요인으로 보고되어 있다.

세포 사멸이란 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태이다. 세포가 죽는 방식에는 크게 세포의 피사나 병적인 죽음인 necrosis와 미리 프로그램화 되어 있는 apoptosis가 있다. necrosis는 화상과 타박, 독극물 등의 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음으로, 말하자면 세포의 '사고사'라고 할 수 있다. necrosis의 경우에는 세포 밖에서 수분이 유입됨으로써 세포가 팽창하여 파괴된다. 이전에는 세포의 죽음은 모두 necrosis라고 생각했으나 최근 30여 년 사이에 세포에는 자발적인 죽음을 일으키는 유인이 있다는 사실이 알려졌다. 유전자에 의해 제어되는 이와 같은 능동적인 세포의 죽음이 apoptosis이다. necrosis는 오랜 시간에 걸쳐 무질서하게 일어나는 데 반해 apoptosis는 단시간에 질서있게 일어난다. apoptosis는 세포가 축소되면서 시작되고, 이후 인접하는 세포 사이에 틈새가 생기고, 세포 내에서는 DNA가 규칙적으로 절단되어 단편화된다. 마지막으로 세포 전체도 단편화하여 'apoptotic body'라고 불리는 것으로 된 후 가까이 있는 세포에게 먹혀버림으로써 죽음에 이르게 된다. apoptosis는 발생 과정에서 몸의 형태 만들기를 담당하고, 성체에서는 정상적인 세포를 갱신하거나 이상이 생긴 세포를 제거하는 일을 담당하고 있다.

따라서 본 연구에서는 articular chondrocyte에서 세포 분화에 미치는 LPA의 역할과 그에 따른 신호전달경로를 밝히고자 연골세포로의 분화 마커로 알려진 type II collagen의 발현량과 기존의 연구에서 확인한 바 있는 여러 신호전달물질들을 확인하였다.

재 료 및 방 법

1. Culturing of Rabbit articular Chondrocyte

생후 2~3주된 New Zealand White Rabbit의 다리 관절 연골을 사용하였다. 연골 세포의 단층 배양을 위해 관절을 얇게 슬라이스로 잘라 0.2%의 collagenase type II에 6시간 동안 배양을 하여 하나의 세포들로 떨어지도록 한 다음 10% fetal bovine calf serum과 50 µg/ml의 streptomycin과 50 units/ml penicillin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 5×10^4 의 밀도로 배양되었다. 세포 사멸을 유도하기 위해 NO를 생성시킴으로서 cell death를 유도하는 Sodium Nitroprusside (SNP)를 사용하였고 dedifferentiation과 differentiation에 관련된 ERK와 p38 kinase를 억제하기 위해 PD98059와 SB203580, 그리고 PI3kinase의 억제제인 LY293002와 Rapamycin을 사용하였다.

2. Western Blot Analysis

50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.1% SDS를 포함한 buffer에 protease inhibitor를 첨가한 후 만든 lysis buffer를 사용하여 protein을 lysate시킨다. 단백질 정량 결과 얻어진 동일한 양의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis한 후 nitrocellulose membrane에 transfer한다. anti-COX, anti-type II collagen, anti-pp70S6 kinase의 항체를 이용하여 반응하고 X-ray film에 감광시켜 protein의 발현양을 확인 하였다.

3. Immunofluorescence microscopy

배양된 세포에 확인하고자 하는 시약을 처리 한 지 24 시간 후 PBS로 세 번 수세하고 acetic acid : MeOH = 1 : 1의 비율로 섞어 1 ml/dish로 넣어 10분간 고정하고 다시 세 번 PBS로 수세한다. 0.1% Triton X 100을 처리하여 10분간 반응시킨 후 PI solution을 약 30μ씩 loading 한 후 약 10분정도 염색을 한다.

결 과 및 고 찰

LPA가 chondrocyte에서 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 LPA의 농도변화에 따른 염증유발 인자인 cyclooxygenase (COX-2)의 발현양상을 확인하였다. Fig 1에서 보는 바와 같이 0-10 μM의 LPA를 1ml당 1μ씩 처리 하고 24 시간 후에 발현정도를 확인한 결과COX-2는 1-2 μM에서 증가하는 경향을 보였다. 이 실험을 바탕으로 LPA가 chondrocyte에 확실한 영향을 주는 농도는 2μM이라 예상 할 수 있다.



Fig. 1. Effect of LPA on the expression of COX-2. Rabbit articular chondrocytes were treated with 0.5 - 10 uM LPA and detected by Western blotting.

Chondrocyte에서 시간에 따른 LPA의 효과를 확인 한 결과 염증 유발인자인 COX-2의 발현이 12 hr까지 점차적으로 증가하였고 이 후 24h 무렵에는 거의 대조군과 유사한 발현 양상을 보였다. 특히 3~6 hrs 에서 급격한 증가를 관찰할 수 있었다. 그러나 COX-2의 조절인자라고 알려진 β -catenin을 보게 되면 시간이 지남에 따라 발현 양상이 거의 일정하였다 (Fig. 2). 이는 LPA가 시간이 지남에 따라 β -catenin을 통해 COX-2의 expression양을 조절하는 것이 아닌 다른 경로를 통해 COX-2의 expression양을 조절한다는 것을 보여주는 것이다.

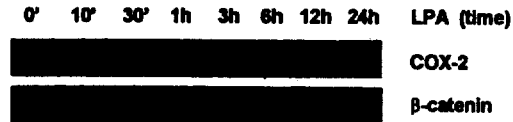


Fig. 2. Effect of LPA on the expression of COX-2 and catenin in a time dependent manner. Rabbit articular chondrocytes were treated with 2 μ M LPA and detected by Western blotting.

LPA가 differentiation에 어떠한 영향을 주는지 살펴보기 위해 분화의 정도를 알 수 있는 Type II collagen의 발현양을 조사한 결과 대조군에 비해 LPA 처리군에서 Type II collagen의 발현양에 변화가 없음을 확인 할 수 있었다. SNP의 처리에 의한 NO의 유도는 Type II collagen의 발현양을 현저히 감소시켜 연골세포로의 분화를 억제하는 양상을 보여 주었다. 이러한 과정에 관련되어지는 신호전달 경로를 알아보기 위해 연골 세포의 분화 및 탈분화에 관여하는 것으로 알려진 MAP kinase pathway와의 관련성 여부를 확인 하였다. differentiation를 유도하고 de-differentiation을 방해하는 것으로 보고된 p38 MAP kinase의 경우 억제제인 SB203580를 처리했을 때 Type II Collagen은 거의 발현이 일어나지 않았다. 반면, differentiation을 방해하고 dedifferentiation을 유도하는 것으로 알려진 ERK MAP kinase의 경우 억제제인 PD98059를 전처리 했을 때 오히려 발현양이 증가함을 보였다 (Fig. 3). 이는 기존에 밝혀졌던 MAP kinase에 의한 dedifferentiation과 비슷한 결과로서 LPA가 MAP kinase pathway와는 무관하게 영향을 주는 것을 사료된다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때 LPA는 염증 인자 발현량의 조절 뿐 아니라 NO 유도에 의한 chondrocyte의 dedifferentiation에도 관련되어 있으며 이는 MAP kinase

pathway가 아닌 또 다른 신호전달 경로에 의해 조절되고 있음을 보여주었다.

-	+	-	+	+	+	SNP (1mM)
-	-	+	+	SB	PD	LPA (2μM)
[Blacked out area]						Type II collagen

Fig. 3. Effect of LPA on the expression of type II collagen. Rabbit articular chondrocytes were incubated with 2 μM LPA and 1 mM SNP for 24 h. SB203580 (SB) and PD98059 (PD) were pretreated.

참 고 문 헌

- [1] Moolenaar, W.H., Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem*, 1995. 270(22)
- [2] Kotaro Hama, Koji Bandoh. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids : possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Letters* 2002. 523
- [3] Andrew Grey, Qi Chen. The Phospholipids Sphingosine-1-Phosphate and Lysophosphatidic acid Prevent Apoptosis in Osteoblastic Cells Via a Signaling Pathway Involving G_i proteins and Phosphatidylinositol-3 Kinase. *Endocrinology* 2002. 143(12)
- [4] Mei-Zhen Cui, Gunjun Zhao. Lysophosphatidic acid Induction of Tissue Factor Expression in Aortic Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003. 23
- [5] Dong-Seok Kim, Seo-Hyung Park. Effect of Lysophosphatidic acid on melanogenesis. *SCIENCE* 2004. 127
- [6] Randa Hilal-Dandan, Christopher K. Means. Lysophosphatidic acid induced hypertrophy of neonatal cardiac myocytes via activation of G_i and Rho. *SCIENCE DIRECT* 2003 36(481-493)
- [7] Saubhik Sengupta, Zeneng Wang. Biology of LPA in health and disease. *CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 2004. 15 (503-512)

- [8] Pramod K. Dash, Sara A. Orsi. A role of hippocampal Rho-ROCK pathway in long-term spatial memory SCIENCE DIRECT 2004. 322 (893-898)
- [9] Song-Ja Kim, Sang-Gu Hwang. p38 kinase Regulates Nitric Oxide-induced Apoptosis of Articular Chondrocytes by Accumulating p53 via NFkB-dependent Transcription and Stabilization by Serine 15 Phosphorylation. JBC. 2002. 277
- [10] Song-Ja Kim, Jung-Won Ju. ERK-1/2 and p38 kinase Oppositely Regulate Nitric Oxide-induced Apoptosis of Articular Chondrocytes in Association with p53, Caspae-3, and differentiation Status. JBC. 2001. 277
- [11] Song-Ja Kim, Han-Gyul Kim. p38 Kinase-dependent and -independent Inhibition of Protein kinase C ζ and α Regulates Nitric Oxide-induced Apoptosis and Dedifferentiation of Articular Chondrocytes. JBC. 2002. vol 277
- [12] Je-Hwang Ryu, Song-ja Kim. Regulation of Chondrocytes Phenotype by β -catenin. DEVELOPMENT AND DISEASE. 2002. dev00110
- [13] Steve R. White, Paula Williams. Initiation of Apoptosis by Actin Cytoskeletal Derangement in Human Airway Epithelial Cells. Cell Mol. Biol. 2001. vol 24.
- [14] Kotha Subbaramaiah, Janice C. Hart. Microtubule-interfering Agents Stimulate the Transcription of Cyclooxygenase-2. JBC. 2000. vol 275