

방사선 조사에 의한 쥐 조직의 포스포리파제 D의 활성 변화

고려대학교 의과대학 방사선 종양학과*, 한양대학교 의과대학 미생물학과†,
서울대학교 자연과학대학 화학과†

최명선* · 조양자† · 최명언†

Alteration of Phospholipase D Activity in the Rat Tissues by Irradiation

Myung Sun Choi, M.D.* , Yang Ja Cho, M.D.† and Myung-Un Choi, Ph.D.†

Department of Radiation Oncology, Korea University College of Medicine, Department of Microbiology,
Hanyang University College of Medicine†, Department of Chemistry,
Seoul National University†, Seoul, Korea*

Purpose : Phospholipase D (PLD) catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholine to phosphatidic acid (PA) and choline. Recently, PLD has been drawing much attentions and considered to be associated with cancer process since it is involved in cellular signal transduction. In this experiment, oleate-PLD activities were measured in various tissues of the living rats after whole body irradiation.

Material and Methods : The reaction mixture for the PLD assay contained 0.1 μ Ci 1,2-di(1-¹⁴C)palmitoyl phosphatidylcholine, 0.5mM phosphatidylcholine, 5mM sodium oleate, 0.2% taurodeoxycholate, 50mM HEPES buffer(pH 6.5), 10mM CaCl₂, and 25mM KF. phosphatidic acid, the reaction product, was separated by TLC and its radioactivity was measured with a scintillation counter. The whole body irradiation was given to the female Wistar rats via Cobalt 60 Teletherapy with field size of 10cm×10cm and an exposure of 2.7Gy per minute to the total doses of 10Gy and 25Gy.

Results : Among the tissues examined, PLD activity in lung was the highest one and was followed by kidney, skeletal muscle, brain, spleen, bone marrow, thymus, and liver. Upon irradiation, alteration of PLD activity was observed in thymus, spleen, lung, and bone marrow. Especially PLD activities of the spleen and thymus revealed the highest sensitivity toward γ -ray with more than two times amplification in their activities. In contrast, the PLD activity of bone marrow appears to be reduced to nearly 30%. Irradiation effect was hardly detected in liver which showed the lowest PLD activity.

Conclusion : The PLD activities affected most sensitively by the whole-body

이 논문은 학술진흥재단 자유공모과제 연구비(1992년도)와 한국과학재단 특정기초 연구비 (1992-1995년도)의 일부에 의하여 지원되었으며 실험에 참여한 송수미에게 감사합니다.

본 논문은 1997년 6월 2일 접수하여 1997년 9월 5일 채택되었음.

통신저자: 최명선 고려대학교 의료원 안암병원 방사선 종양학과 서울시 성북구 안암동 5가 126-1

irradiation seem to be associated with organs involved in immunity and hematopoiesis. This observation strongly indicates that the PLD is closely related to the physiological function of these organs. Furthermore, radiation stress could offer an important means to explore the phenomena covering from cell proliferation to cell death on these organs.

Key Words : Phospholipase D, Whole-body irradiation, Radiation effect, Thymus, Spleen

서 론

Phospholipase D (PLD)는 glycerolphospholipid의 끝쪽의 phosphate ester 결합을 가수분해시키는 효소로 phosphatidic acid (PA)와 알코올 염기를 생성시킨다. 1947년 Hanahan과 Chikoff에 의해 처음으로 알려졌는데¹⁾, 초기에는 당근, 땅콩씨, 양배추 등의 식물계와 미생물원에서 주로 연구되어 왔으며²⁾ 그 후 1970년대말에 Taki와 Kanfer 등³⁾에 의해 백서의 뇌등동물계에서도 발견되어 많은 연구가 진행되고 있다^{4, 5)}. PLD는 염기쪽 알코올기의 가수분해 뿐만 아니라 다른 알코올의 존재하에서도 transphosphatidylolation이 일어나 염기 교환이 가능하기 때문에 생체내에서의 인지질 사이의 변환에 참여한다고 알려져 있다^{6, 7)}.

최근 PLD는 세포 신호 전달에 관여하는 중요한 효소중의 하나로 알려지기 시작해 많은 관심의 대상이 되고 있다⁸⁾. 보고된 바에 의하면 다른 phospholipase들과 유사하게 PLD 도 여러가지 세포 내에서 다양한 agonist에 의해 활성화 된다고 알려져 있고^{9, 10)}, PLD의 생성물인 PA나 PA가 한단계 더 나아가 phosphatidate phosphohydrolase (PAP)에 의해 가수분해되 생성된 diacylglycerol (DAG)도 세포내 지방질 대사의 중간물질 및 화학전령 (chemical messenger)으로서 매우 중요한 작용을 하고 있는 것으로 밝혀지고 있다^{8, 11, 12)}. 따라서 이들 화학 전령들은 protein kinase C (PKC) 활성화^{13, 14)}, 세포내Ca²⁺ ion 농도 조절¹⁵⁾, 그리고 phospholipase A₂ 활성화에도 관여하는 것으로 알려져 있다^{16, 17)}. 특히 최근에는 PLD의 첫 생성물인 PA의 생리 역할에 대해 많은 보고가 있는데, 몇가지 예로 PA가 phosphatidylinositol-4-phosphate kinase의 선택적 활성인자로 밝혀졌으며¹⁸⁾, PA가 세포분열 (mitogenesis)의 첫단계에 관여하리라는 보고가 있다¹⁹⁾.

이러한 현상들을 감안하여 PLD 조절 메카니즘에 관한 몇가지 제안이 알려져 있다. 첫번째가 receptor-linked agonist가 GTP binding protein을 활성화 시키

고, 이 단백질이 Ca²⁺를 통해 PLD를 활성화 시킨다고 추정하고 있다. 그 근거로 G-protein activator인 GTP γ S, AIF3, cholera toxin등이 PLD를 활성화 시키고 있다^{20, 21)}. 실제로 small G-protein인 ARF에 좌우되는 PLD가 밝혀졌다²²⁾. 두 번째로 PKC에 의해 PLD가 활성화 되는 증거로는 PKC activator인 phorbol ester류^{23, 24)}와 diacylglyceride에 의해서 PLD가 활성화 된다는 보고가 있다²⁵⁾. Phorbol ester (특히 TPA: tetradecanoyl-phorbolacetate)는 cancer promoter로 알려져 있어, 이에 의한 활성화는 발암과정과 PLD 활성화가 매우 밀접한 관계에 있음을 암시해 준다. 세 번째 경로로는 몇가지 growth factor들에 의한 활성화를 들 수 있다. 즉, G protein이나 PKC와 상관없이 PLD 활성이 tyrosine kinase 경로와 연결되고 있다는 논의이다^{26, 27)}. 그외에도 sphingolipid인 ceramide에 의해서 PLD 활성이 크게 변하고 있다는 보고가 있다²⁸⁾. 현재 동물세포의 PLD 유전인자 PLD1이 1995년말 밝혀졌으며²⁹⁾, 이 유전인자는 ARF에 의해 활성화되는 PLD 임이 확인되었다. PLD 연구 초기부터 알려진 oleate-PLD의 유전자는 아직 밝혀지지 않고 있다.

본 연구에서는 쥐의 여러 조직에서 oleate에 의해 활성화되는 PLD 활성을 측정하고 이 oleate-PLD가 외부 긴장(stress)에 어떤 영향을 받는가를 관찰하기 위해 방사선 조사를 시행하였다. 실험결과 PLD의 활성이 흉선과 췌장에서 크게 변화하고 있음이 처음으로 관찰되어 PLD가 세포의 성장, 피사 등의 생리현상과 연계되어있음을 시사해 주고 있다.

재료 및 방법

1. 재료

1,2-Di-[1-¹⁴C]palmitoyl-L-3-phosphatidylcholine(specific activity, 112mCi/mmol)은 Amersham 회사 (Aylesbury, England)로부터 구입했으며, phosphatidylcholine (PC)과 sodium oleate, taurodeoxycholic acid, N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethanesul-

nic acid (HEPES)는 Sigma 회사 (St. Louis, U. S. A.)의 상품을 사용하였다. Chloroform과 methyl 알코올은 비교적 순수한 것으로 Junsei (Tokyo, Japan)와 Aldrich에서 각각 구입해 사용하였다. 미리 입혀진 silica gel TLC plate (Art. 5735)는 Merck 회사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Egg yolk에서 분리한 제품상태의 phosphatidylcholine은 aluminum oxide column을 더 정제하여 사용했으며, phosphatidic acid (PA)는 정제한 PC를 양배추에서 추출한 phospholipase D (PLD)를 가수분해시킨 후 정제하여 사용하였다³⁰⁾.

2. 효소원의 분리

실험대상은 생후 약 4주 된 암컷 Wistar 쥐로서 여러조직을 해부하여 효소원으로 사용하였다. 먼저 뇌는 Choi와 Suzuki의 방법³¹⁾에 따라 전체 뇌의 9배의 0.32M sucrose용액을 넣어 10% (w/v) 되게 한 다음 Wheaton homogenizer를 이용하여 파쇄하였다. Teflon pestle을 모터에 연결해 다섯번 행정하여 파쇄한 것을 고속원심분리기 (Sorvall, RC5C)로 10,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 pellet은 버리고 위의 supernatant 만을 취해 초고속원심분리기 (Beckman L8-70M)로 100,000×g에서 1시간 동안 다시 원심분리해 얻은 pellet (microsomal fraction)을 효소원으로 사용하였다. 이들 분리과정은 모두 4℃ 이하에서 수행하였다.

간조직은 Sottocasa 등의 방법³²⁾에 따라 잘게 다져서 0.25M sucrose를 역시 10% (w/v) 되게 넣고 ultra-turrax homogenizer로 30초씩 3회 갈아 파쇄하였으며, 폐, 신장, 비장과 흉선은 0.32M sucrose 내에서 ultra-turrax homogenizer로 30초씩 2회 갈아 파쇄하였다. 이것을 뇌조직과 같은 방법으로 원심분리하여 microsomal fraction을 얻었다. 근육은 대퇴부의 것을 택하여 폐 등과 같이 처리하였고, 골수는 대퇴골에서 취한것을 원심분리 없이 그대로 sonication하여 효소원으로 사용하였다.

3. Phospholipase D 효소 활성도 측정

Phospholipase D의 활성도는 계면활성제와 활성인자 존재하에서 가수분해된 1,2-di[1-¹⁴C]palmitoyl phosphatidic acid의 방사능을 측정하므로써 분석하였다. 반응 혼합물에는 0.1 μCi 1,2-di[1-¹⁴C]palmitoyl phosphatidylcholine과 0.5mM PC, 그리고 5mM sodium oleate, 0.2% taurodeoxycholate, 50mM HEPES buffer (pH 6.5), 10mM CaCl₂와 25mM KF

를 넣었으며, 마지막으로 500 μg-1000 μg의 단백질을 넣어 최종부피가 100 μl가 되도록 했다. 모든 인자질은 chloroform에 녹여 microcentrifuge tube에 넣고 질소 가스를 흘려넣어 건조시킨 다음 계면활성제, CaCl₂, KF 등이 있는 완충용액을 넣고 bath type sonicator에서 1 분간 sonication 했다. 반응의 시작은 microsome 효소원을 넣어 줌으로써 시작하였으며 30℃에서 60분간 반응시켰다. 여기에 1ml의 chloroform: MeOH(2:1) 용액을 첨가하여 반응을 중지시켰으며, 1ml의 0.1M KCl 수용액을 넣어 salt 등의 수용성 불순물을 분리 제거하였다. Blank값은 "0" time incubation된 것을 사용하였다. 추출해 낸 인지질들은 TLC (thin layer chromatography)를 사용하여 분리하였으며, 용출 용매는 클로로포름: 메탄올: 아세톤: 초산: 증류수 (부피로 50: 15: 15: 10: 5)를 사용하였다. 전개한 TLC 판은 요오드로 발색시켜 phosphatidic acid 부분을 확인한 후, 끊어서 액체 섬광계수기로 방사능을 측정하였다. PLD의 활성도는 시간당 cpm/mg protein으로 나타났으며 원래 세포막에 있는 PC의 양을 정량해 전체 PC에 대한 비방사능을 계산할 수 있는 경우는 생성된 PA를 nmole로 표시하였다.

4. 방사선 조사

방사선 조사는 고려대학교 의과대학 부속병원 치료 방사선과에서 사용하는 코발트-60 원격치료 기기에서 방출되는 γ-선을 방사선 발생원으로 사용하였다. 조사선량은 SSD (source surface distance) 60cm 거리에서 쥐를 아크릴로 만든 틀 속에 가두고 조사범위를 10cm×10cm로 하여 분당 선량을 2.7Gy (1Gray = 100 rad)로 방사선 조사선량은 10Gy 와 25Gy를 조사하였다. 효소활성도 측정은 대개의 경우 방사선 조사 후 24 시간 뒤에 행하였다.

5. 단백질 정량

단백질 정량은 Coomassie blue G-250 염료를 이용한 Bradford 방법³³⁾을 사용하였으며, 표준 단백질로서 ovalbumine을 사용하였다. 표준곡선은 단백질량 0-25 μg 범위에서 그렸으며, 흡광계수는 595nm에서 읽었다.

결 과

1. PLD 활성측정 조건

PLD는 인지질을 기질로 하는 효소이기 때문에 기질의 균질화를 위한 계면활성제의 포함등 그 활성측정

에 여러 가지 요인들이 함께 고려되어야 한다. 따라서 조직에 따른 PLD 활성 측정의 조건을 검토할 필요성이 있다. 본 실험에서는 폐와 뇌 조직을 효소원으로 PLD 활성을 자세히 비교 실험하였다. 실험 결과는 폐를 중심으로 보고 하였다. 검토된 조직들에서는 대개 PLD의 반응 시간은 1시간까지 일정한 직선관계를 보이다가 그 이후에는 활성의 증가세가 현저히 줄어들었다. 단백질 양에 대한 실험 결과 폐에서는 약 1400 μg 까지 직선관계를 보여주었으나 뇌조직에서는 400 μg 까지만 직선관계를 유지하였다. pH 의존도 실험에서는 pH 5.6-7.4까지 조사한 결과 폐의 경우 pH 6.0 이하의 산성 pH에서는 PLD 활성이 급격히 줄어들었다[Fig. 1(a)]. 온도 의존도 실험 결과는 폐에서의 최적 활성 온도가 20 $^{\circ}\text{C}$ 로 나타났으며[Fig. 1(b)], 그 이상의 온도에서는 활성이 감소하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 최고치의 20% 이하로 감소 하였다. 뇌조직의 경우는 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 나타났다. PLD 활성은 Ca^{2+} ion 농도에 영향을 받아 15mM 까지 활성의 증가를 보였다[Fig. 1(c)]. 그리고 PLD 활성을 증폭시키는 인자로 알려진 oleate의 최적 농도는 폐의 경우 10mM이고[Fig. 1(d)] 뇌의 경우는 5mM로 나타났다. 이 두 조직의 실험조건을 수합하여

Table 1에 수록하였다. 특히 단백질양과 oleate양이 assay조건에 상당한 영향을 미친다는 판단하에 다른 조직들의 단백질과 oleate양에 대한 실험조건은 별도로 Table 2에 종합하였다. 폐 PLD의 경우 실험실에서 새로 정립한 최적 측정조건은 다음과 같다. 먼저 효소원인 microsome에 내재해 있는 PC의 양을 감안하지 않고 0.1 μCi [$1\text{-}^{14}\text{C}$] PC와 함께 넣어 준 cold PC의 양이 0.5mM일 때 PLD의 활성이 가장 높게 나왔으며, 최적 pH는 6.5, 반응시간은 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간으로 하였다. 넣어준 oleate양은 10mM 이고 microsome 단백질의 양은 1000 μg 으로 하였을 때 측정된

Table 1. Comparison of Optimum Conditions for PLD Activities of Rat Brain and Lung

	Brain	Lung
temperature($^{\circ}\text{C}$)	30	20
pH	6.5	7.0
Ca^{2+} ion(mM)	15	-15
protein amount(μg)	400	>1000
oleate(mM)	5	10

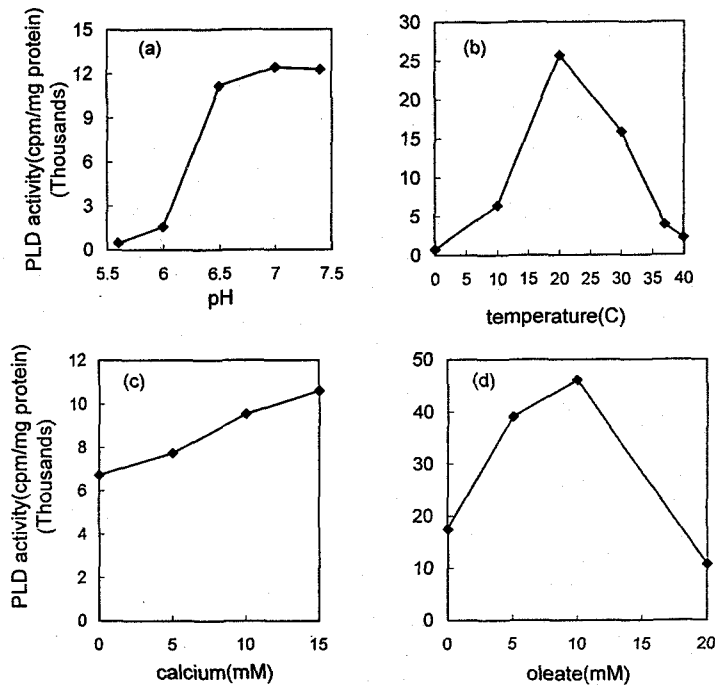


Fig. 1. Assay conditions for PLD activity in lung tissue of rat. (a) Effect of pH; (b) Effects of temperature; (c) Effect of calcium ion (\square : added 5mM EDTA); (d) Effect of sodium oleate.

Table 2. Amounts of Protein and Sodium Oleate Added in Measurement of PLD Activities in Various Tissues

Rat issue	단백질(μ g/100 μ l)	Sodium oleate(mM)
Brain	~ 500 μ g	5mM
Liver	~ 1,400 μ g	5mM
Lung	~ 500 μ g	10mM
Kidney	~ 600 μ g	10mM
Spleen	~ 400 μ g	5mM
Thymus	~ 400 μ g	5mM
Bone marrow	~ 1,500 μ g	5mM
Skeletal muscle	~ 600 μ g	10mM

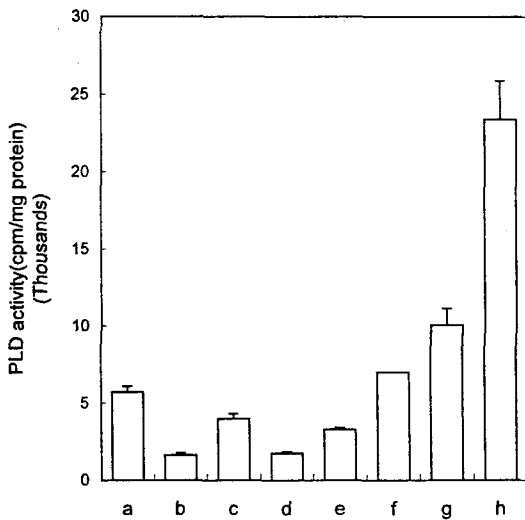


Fig. 2. Activity of PLD in microsomes of various rat tissues. a, brain; b, liver; c, spleen; d, thymus; e, bone marrow; f, skeletal muscle; g, kidney; h, lung.

PA의 생산 정도는 약 7.5nmole/mg protein/h로 추정되었다.

2. 여러 조직의 PLD 활성

각 조직의 PLD 활성도 측정 결과는 Fig. 2에 요약하였다. 즉, 폐에서 가장 높은 PLD 활성을 보였으며, 신장, 근육, 뇌, 비장, 골수, 흉선, 간의 순으로 나타났다. 폐의 비활성도는 약 21,000cpm/mg protein이었으나 간은 2,000cpm 정도로 폐에 비해 1/10정도밖에 활성이 없었다. 흉선도 2,000cpm을 약간 상회하는 정도의 활성만을 갖고 있었다. 대부분의 반응조건을 폐의 microsome과 동일하게 처리하였으나, 몇몇 조직들은 단백질양과 sodium oleate 농도 등에서 틀린 조건을

Table 2에서와 같이 요구했다. 본 실험의 PLD는 oleate에 좌우되는 PLD이기 때문에 이 부분의 조건이 활성측정에 많은 영향을 미치고 있다. 최적 oleate 농도에서 각각의 조직들은 oleate를 넣지 않았을 때보다 2배에서 5배까지 증가한 PLD 활성을 보이고 있으나 그 이상의 농도에서는 오히려 저해되고 있다. 실험 결과 검토한 조직에서의 oleate 농도는 5mM 부터 10mM 사이에서 최고값을 나타내었다. 따라서 실험의 편의를 위하여 sodium oleate 농도는 조직에 따라 5mM과 10mM로 고정하여 사용하였다. 골수의 경우 subcellular fractionation 과정을 거치지 않은 그대로 파쇄한 상태이므로 1.5mg 정도의 많은 단백질을 넣어 주었을 때에야 반응이 진행됨이 확인 되었다.

3. 방사선 조사후 각 조직의 PLD 활성 변화

외부 긴장(stress)에 의한 PLD의 활성변화를 관찰하기 위해 방사선 효과를 살펴보았다. 그 결과는 Fig. 3(a)와 3(b)와 같다. 선량 25Gy의 γ -ray를 조사했을 때 비장과 폐에서 눈에 띄게 효소활성이 증가하였다. 비장의 경우 정상치에 비해 200% 이상, 폐는 150% 정도 각각 증가하였다. 이와 같은 결과는 3회의 실험(여섯개의 data 값)에서 얻은 값으로 이들 조직의 PLD가 매우 방사선 조사에 민감함을 보여주고 있다. 따라서 다음 단계로 방사선량을 10Gy로 낮추고, 비장과 함께 면역 체제에 관계하는 흉선과 골수의 PLD 활성도 함께 관찰하였다. 방사선 조사선량을 낮춘 까닭은 10Gy 이상에서는 치사율이 3일 후에 50% 이상이므로 가능한 한 적은 조사선량으로 PLD 활성도 변화를 관찰하기 위해서이다. PLD 활성 측정 결과 10Gy에서 폐의 PLD는 별로 활성화가 관찰되지 않았으며 비장의 경우 약 30% 정도의 활성 증가가 나타났다. 그러나 흉선에서는 2회의 반복 실험 결과 낮은 방사선 조사후에도 PLD 활동이 200% 정도 증가할 만큼 방사선 조사에 민감했다. 여기서 이 두 조직의 방사선 선량에 따른 영향을 더 자세히 검토하여 Fig. 4에 도시하였다. 흉선의 경우 5Gy 때 이미 최고치(5배 증가)의 활성화가 나타났으며 그 이상의 선량에서는 오히려 줄어 들었다. 비장의 경우 10Gy까지 활성이 증가하고 그 이상에서는 큰 변동은 보여주지 않았다. 골수 PLD 측정은 효소원 분리에 다소 어려움이 있었으며, 예비실험을 통해 대퇴골을 꺼내어 충격으로 파쇄한 후 완충용액을 넣고 ultrasonication으로 추출하여 그대로 사용하는 방법을 택하였다. 분리과정에서 육안으로 관찰했을 때 방사선을 받은 쥐의 골수는 적혈구가 많이 파괴된 듯이 보였으나 단백질 농도는 정

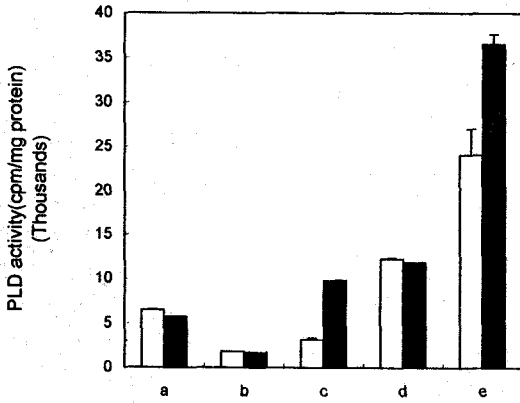


Fig. 3a. Effect of γ -ray radiation on the activity of PLD in various rat tissues (□: control, ■: 25Gy irradiation). a, brain; b, liver; c, spleen; d, kidney; e, lung.

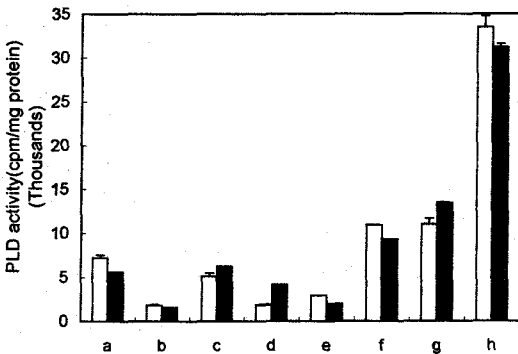


Fig. 3b. Effect of γ -ray radiation on the activity of PLD in various rat tissues (□: control, ■: 10 Gy irradiation). a, brain; b, liver; c, spleen; d, thymus; e, bone marrow; f, skeletal muscle; g, kidney; h, lung.

상치와 별 차이가 없는 것으로 나타났으며, 비장이나 흉선과는 다르게 PLD의 활성이 약 30% 정도 감소한 것으로 나타났다. 그 외 방사선조사에 가장 영향을 받지않는 조직은 PLD 활성이 가장 낮은 간으로 밝혀졌다. 방사선 조사 결과 뇌의 PLD 활성은 약간 감소하고 신장의 PLD 활동은 약간 증가한 것으로 나타났으나 실험결과의 재현성이 좋지 않아 이들 조직에 대해서는 현재 결과로서는 분명한 결론을 내리기 힘들것 같다. Table 3에는 Fig. 3의 방사선 조사결과를 상대적 수치로 정리하였다.

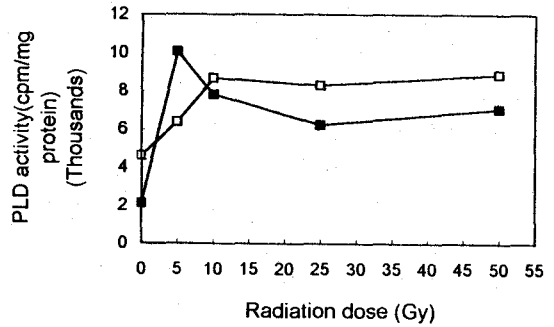


Fig. 4. Dose-response effects of γ -ray radiation on PLD activities in thymus (■) and spleen (□).

Table 3. Alteration of PLD Activity in Various Rat Tissues after Irradiation

	% activity	
	10Gy	25Gy
Brain	83.0±4.6	98.0±13.6
Liver	97.3±10.9	101.7±8.7
Spleen	135.7±13.6	262.5±49.0
Thymus	227.5±3.9	266.9
Bone Marrow	67.0	74.6
Skeletal Muscle	85.2	65.0
Kidney	116.4±6.0	102.2±15.4
Lung	97.0±3.8	154.3±5.6

고 찰

본 실험의 결과 oleate-PLD 는 동물의 여러 조직에 폭넓게 존재하는 것이 재확인 되었으며, 쥐의 여러 조직의 PLD 활성도는 폐>신장>근육>뇌>비장>흉선>골수 ~ 간의 순으로 나타났다(Fig. 2). 이 결과는 초기 Chalifour와 Kanfer 의 논문에서 나온 결과와 정성적으로 일치하고 있다³⁴. 여러 조직의 PLD 중 폐와 뇌의 일반특성을 대표적으로 비교하였다. 두 조직에서 PLD는 pH는 6.5-7.0 사이에서 모두 최적 활성도를 보였으며, pH 5.6 이하의 산성에서는 그 활성도가 급격히 줄어들어 체내와 비슷한 조건에서 최적 효소활동을 보임을 확인할 수 있었다(Fig. 1(a)). 그러나 폐의 PLD 최적온도는 20℃로 나타나 계면활성제를 포함한 in vitro 실험의 한계점을 드러내고 있다(Fig. 1(b)). Ca²⁺ ion은 일반적으로 식물 PLD에서 절대적임에 반해 동물 PLD에서는 의존적이기는 하나 Ca²⁺ ion 부재시에도 어느정도 활성의 측정이 가능하였다. Ca²⁺ ion의 의존곡선은 뇌와 폐에서 그 양상은 다소 차이가 있었

으나 모두 15mM 까지는 꾸준한 증가를 보였다[Fig. 1(c)]. 긴 사슬 지방산인 oleate는 폐에서 10 mM일 때 최고 활성도를 보였다[Fig. 1(d)]. 현재 알려진 PLD의 두 형태중 본 실험에서는 oleate-PLD를 측정했으며 oleate농도에 따른 각 조직의 PLD 최적조건은 Table 2에 종합하였다.

각 조직들의 방사선 조사 결과는 흥미있는 것으로 나타났다. 특히 PLD가 발암과정에 관여하리라는 추측을 감안할 때 몇몇 조직의 PLD 활성 변화는 주시할 만 하다(Table 3). 방사선 조사선량은 각 조직의 방사선에 대한 민감성의 차이를 고려해 처음 비교적 높은 조사선량인 25Gy를 사용했으며, 다음 단계로 10Gy로 낮추어 조사하였다. 예비 실험 결과 PLD 활성 측정은 24시간 후에 시행하는 것이 적절한 것으로 판단되었다. 상대적으로 낮은 조사선량에서 방사선에 민감한 활성 변화를 보인 조직은 비장, 흉선, 신장과 골수 등이며, 면역체제와 연관된 것으로 알려져 있는 흉선과 비장은 PLD의 활성도가 크게 증폭된 반면, 조혈과 연관된 골수는 감소된 것으로 나타나 전신 방사선 조사와 PLD 활성도 사이에 어떤 연관성이 있음을 시사해 주고 있다. 최근 방사선 영향에 대한 생물학 연구에 큰 진전이 있어 방사선에 의한 serine-threonine protein kinase인 Raf-1의 활성화³⁵⁾, protein phosphatase Wip1의 유도³⁶⁾ 및 sphingomyelinase와 방사선에 의한 세포 괴사와의 연관성 등이 알려졌다³⁷⁾.

역사적으로 원자폭탄 투하로 사망한 사람들의 사망 원인이 림프양 기관 (lymphoid organ)과 조혈에 관여하는 생체세포들의 괴멸로 알려져 있으며, 현재 방사선 영향의 결과는 PLD 활성도 변동이 비장과 흉선 조직에서 주로 나타나고 있어 이 괴멸과정에서 PLD가 크게 영향을 받고 있음을 암시해 주고 있다. 최근 쥐 thymocytes의 세포분열에서 PLD의 생성물인 PA가 주요 조절물질로 제시된 보고¹⁹⁾, IgE receptor와 연계된 PLD의 활성화³⁸⁾, 한쪽 신장을 제거했을 때 나머지 신장의 PLD 활성화 등³⁹⁾은 현 PLD 활성 결과를 뒷받침해 주는 현상이라고 볼 수 있다. 특히, 사람의 편평상피세포종양 세포주인 SQ-20B가 방사선에 의해 그 PLD가 활성화 된다는 보고는 현재의 조직 결과와 일치하고 있다⁴⁰⁾. 따라서 PLD 효소의 조절 메카니즘이 이들 세포에서의 세포분열(mitogenesis)이나 예정세포사(apoptosis)같은 세포생리에 주요한 역할을 함을 말해주고 있어 새로운 방사선 대응 표적 분자로 간주될 수 있다⁴¹⁾. 이와 더불어 tumor necrosis factor가 PLD 활성화를 유도한다는 결과와⁴²⁾ PLD에 의해 in vitro에서 tumor cell invasion이 유도된다는 보고⁴³⁾

는 세포의 암적 성장 현상과 PLD의 연관성을 나타내 주고 있어 각종 종양조직에서의 PLD 활성측정의 필요성을 대두시키고 있다.

결 론

세포내의 성장조절 장치와 직·간접으로 관련된 신호전달과정 (signal transduction)에 관여하는 phospholipase D (PLD)의 연구는 분자생리학이나 임상학적 측면에서 모두 중요하다. 본 연구에서는 쥐를 γ 선으로 조사하여 여러조직에서의 oleate-PLD의 활성변화를 비교 검토하였다.

1) 각 조직에서의 PLD의 assay 조건을 수립하기 위해 뇌와 폐 조직의 일반특성을 검토하여 이들 조직들의 PLD 활성이 시간, 단백질 양, pH, 온도, Ca^{2+} 이온 등에 어떤 영향을 받고 있는가를 밝혔다. 이 결과 뇌와 폐의 PLD 특성은 유사하나 oleate와 온도에 대한 영향은 다소 차이가 있는것으로 나타났다.

2) 각 조직의 PLD 활성도는 적절한 단백질 양과 oleate 양을 조절한 후 폐에서 가장 높게 나왔고, 그 다음 신장, 근육, 뇌, 비장, 골수, 흉선, 간 순으로 나타났다.

3) γ -선 조사에 의한 PLD의 방사선 영향 실험에서 흉선, 비장, 폐, 골수 등에서 활성의 변화가 관찰되었으며, 그 중 흉선과 비장의 PLD가 특히 민감하게 2 배 이상 활성화 됨이 관찰되었으며, 반대로 골수에서는 30%정도 감소되었다.

4) 방사선 조사후 이들 PLD 활성변화는 동물의 방사선 영향이 주로 면역체제와 조혈세포에 영향을 미친다는 사실과 일치하고 있어 이들 조직에서의 PLD 역할의 중요성을 시사해 주고 있다.

참 고 문 헌

1. Hanahan DJ, Chikoff IL. A new phospholipid-spilting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping. *J Biol Chem* 1947; 168:233-240
2. Heller M. Phospholipase D. *Adv Lipid Res* 1978; 6:267-326
3. Taki T, Kanfer JN. Partial purification and properties of a rat brain phospholipase D. *J Biol Chem* 1979; 254:9761-9765
4. Okamura S, Yamashita S. Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *J Biol Chem* 1994; 269:31207-

- 31213
5. **Banno Y, Kamiya-Koizumi K, Oshima H, et al.** Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF) and oleate-dependent phospholipase D in rat liver cells. *J Biol Chem* 1997; 272:5208-5213
 6. **Chalifour RJ, Taki T, Kanfer JN.** Phosphatidylglycerol formation via transphosphatidylolation by rat brain extracts. *Can J Biochem* 1980; 58:1189-1196
 7. **Kobayashi M, Kanfer JN.** Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylolation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* 1987; 48:1597-1603
 8. **Liscovitch M, Chalifa V.** Signal-activated phospholipase D. In: Liscovitch M, eds. Signal-activated phospholipases. Austin, TX: R. G. Landes Co. 1994:31-63
 9. **Billah MM, Anthes JC, Mullmann TJ.** Receptor-coupled phospholipase D: regulation and functional significance. *Biochem Soc Trans* 1991; 19:324-329
 10. **Kanfer J, McCartney D.** Phospholipase D activity of isolated rat brain plasma membrane. *FEBS* 1994; 227:251-254
 11. **Nozawa Y, Nakashima S, Nagata K.** Phospholipid-mediated signaling in receptor activation of human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1082:219-238
 12. **Barritt GJ.** Communication within animal cells. Oxford: Oxford University Press, 1992
 13. **Geny B, Cockcroft S.** Synergistic activation of phospholipase D by protein kinase C and G-protein-mediated pathway in streptolysin O-permeabilized HL60 cell. *Biochem J* 1992; 284:531-538
 14. **Stasek JE, Natarajan V, Garcia JGN.** Phosphatidic acid directly activates endothelial cell protein kinase C. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 191:134-141
 15. **Altin JG, Bygrave FL.** Phosphatidic acid and arachidonic acid each interact synergistically with glucagon to stimulate Ca^{2+} influx in perfused rat liver. *Biochem J* 1989; 247:613-619
 16. **Channon JY, Leslie CC.** A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the microphage cell line RAW. *J Biol Chem* 1990; 265:5409-5413.
 17. **Sato T, Ishimoto T, Akiba S, Fuji T.** Enhancement of phospholipase A2 activation by phosphatidic acid endogenously formed through phospholipase D action in rat peritoneal mast cell. *FEBS* 1993; 323:23-26
 18. **Moritz A, Graan PN, Giespen WH, Wirtz KW.** Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J Biol Chem* 1992; 267:7207-7210
 19. **Marcoz P, Némoz G, Prigent AF, Lagarde M.** Phosphatidic acid stimulates the rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat thymocytes. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1196:129-136
 20. **Anthes JC, Krasovsky J, Egan RW, et al.** Sequential degradation of choline phosphoglycerides by phospholipase D and phosphatidate phosphohydrolase in dibutyl cAMP-differentiated U937 cells. *Arch Biochem Biophys* 1991; 287:53-59
 21. **Bowman EP, Uhlinger DJ, Lambeth JD.** Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J Biol Chem* 1993; 268:21509-21512
 22. **Cockcroft S, Thomas GMH, Fensme A, et al.** Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science* 1994; 263:523-526
 23. **Olson SC, Bowman EP, Lambeth JD.** Phospholipase D activation in a cell-free system from human neutrophils by phorbol 12-myristate 13-acetate and guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate). *J Biol Chem* 1991; 266:17236-17242
 24. **Mizunuma M, Tanaka S, Kudo R, Kanoh H.** Phospholipase D activity of human amnion cells stimulated with phorbol ester and bradykinin. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1168:213-219
 25. **Conricode KM, Smith JL, Burns DJ, et al.** Phospholipase D activations in fibroblast membrane by the α and β isoforms of protein kinase C. *FEBS Letter* 1994; 342:149-153
 26. **Dubyak GR, Shomisch SJ, Kusner DJ, et al.** Phospholipase D activity in phagocytic leucocytes is synergistically regulated by G-protein and tyrosine kinase-based mechanism. *Biochem J* 1993; 292:121-128
 27. **Yeo E, Kazlauskas A, Exton JH.** Activation of phospholipase C- γ is necessary for stimulation of phospholipase D by platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269:27823-27826
 28. **Gomez-Munoz A, Waggoner DW, O'Brien L, et al.** Interaction of ceramides, sphingosine and sphingosine 1-phosphate in regulating DNA synthesis and phospholipase D. *J Biol Chem* 1995; 270:26318
 29. **Hammond SM, Altshuler YM, Sung T, et al.** Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem*

- 1995; 270:29640-29643
30. Jung K, Koh E, Choi M. Catalytic properties of phospholipase D using phosphatidic acid as an activator. *Bull Korean Chem Soc* 1989; 10:595-600
 31. Choi M-U, Suzuki K. A cholesterol-esterifying enzyme in rat central nervous system myelin. *J Neurochem* 1978; 31:879-885
 32. Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L, Bergstrand A. An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J Cell Biol* 1991; 32:415
 33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
 34. Chalifour RJ, Kanfer JN. Microsomal phospholipase D of rat brain and lung tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96:742-747
 35. Kasid U, Suy S, Dent P, et al. Activation of Raf by ionizing radiation. *Nature* 1996; 382:813-816
 36. Fiscella M, Zhang HL, Fan S, et al. Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6048-6053
 37. Santana P, Pena LA, Haimovitz-Freidman A, et al. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 1996; 86:189-199
 38. Kumada T, Miyata H, Nozawa Y. Involvement of tyrosine phosphorylation in IgE receptor-mediated phospholipase D activation in rat vasophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:1363-1368
 39. Gatalica Z, Moehren G, Hoek JB. Unilateral nephrectomy selectively stimulates phospholipase D in the remaining kidney. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1177:87-92
 40. Avila MA, Otero G, Cansado J, et al. Activation of phospholipase D participates in signal transduction pathways responsive to γ -radiation. *Cancer Res* 1993; 53:4474-4476
 41. Amaity A, Kao GD, Muschel RJ, McKenna Wg. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 37:639-653
 42. De Valck D, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W. Tumor necrosis factor cytotoxicity is associated with phospholipase D activation. *Eur J Biochem* 1993; 212:491-497
 43. Imamura F, Horai T, Mukai M, et al. Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayer by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochim Biophys Res Commun* 1993; 193:497-503

= 국문 초록 =

방사선 조사에 의한 쥐 조직의 포스포리파제 D의 활성 변화고려대학교 의과대학 방사선 종양학과*, 한양대학교 의과대학 미생물학과†,
서울대학교 자연과학대학 화학과†

최명선* · 조양자† · 최명언†

목적 : Phospholipase D (PLD)는 phosphatidylcholine을 phosphatidic acid (PA)와 choline으로 가수분해 시키는 효소이다. 최근 이 효소는 다른 phospholipase들과 유사하게 세포 신호전달과정에 관여하는 것으로 알려져 많은 관심의 대상이 되고 있으며, 아울러 발암과정에 관여하리라는 추측을 하게 하고 있다. 이 실험에서는 쥐를 방사선 조사하여 각 조직에서 올레산-PLD에 미치는 영향을 관찰하였다.

방법 : PLD assay를 위한 반응 혼합물에는 0.1 μ Ci의 1,2-di[1-¹⁴C]palmitoyl phosphatidylcholine, 0.5mM phosphatidylcholine, 5mM sodium oleate, 0.2% taurodeoxycholate, 50 mM HEPES buffer(pH 6.5), 10mM CaCl₂와 25mM KF 를 함께 넣어주었다. 생성된 PA는 TLC로 분리하여 그 방사능을 측정하였다. 사용된 동물은 암컷 Wistar 쥐로서 코발트 60 원격치료 기기를 이용, 조사범위를 10cm×10cm로하여 분당 선량을 2.7Gy로 방사선 조사선량 10Gy와 25Gy를 조사 하였다.

결과 : PLD 활성은 폐조직에서 가장 높았으며 신장, 근육, 뇌, 비장, 골수, 흉선, 간의 순으로 나타났다. 방사선 조사결과 PLD 활성에 변동을 보인 조직은 흉선, 비장, 폐와 골수이며, 특히 흉선과 비장은 PLD의 활성이 각각 2배 이상 증가한 것으로 관찰되었다. 이와는 반대로 골수의 PLD는 30% 이상 감소한 것으로 나타났다. 한편 PLD 활성값이 가장 낮은 간은 방사선 영향을 거의 받지 않는 것처럼 보였다.

결론 : 동물전신에 방사선 조사시 PLD가 가장 민감한 영향을 받는 조직은 림프양 기관과 조혈 세포인 것으로 보여 PLD가 이들 조직의 생리기능과 밀접한 관계가 있음을 암시해 주고있다. 더 나아가 방사선 긴장 (radiation stress)이 이들 조직의 세포증식내지 괴사현상연구에 중요한 수단을 제공해 줄 수 있을 것이다.