

Choriocarcinoma 세포주 BeWo 세포에서 nitric oxide에 의한 phospholipase C ν 의 활성화

차문석 · 곽종영^{1*}

동아대학교 의과대학 산부인과학교실
¹생화학교실, 동아대학교 암분자치료연구센터

Activation of Phospholipase C ν by Nitric Oxide in Choriocarcinoma Cell Line, BeWo Cells

Moon-Seok Cha and Jong-Young Kwak^{1*}

*Department of Obstetrics and Gynecology and ¹Department of Biochemistry, College of Medicine, Dong-A University
Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, Dong-A University, Busan 602-714, Korea*

Abstract

Nitric oxide (NO) plays an important role as a signaling molecule in the proliferation of placenta trophoblasts. In this study, we investigated the effect of NO on the activation of phospholipase C (PLC) in BeWo cells, choriocarcinoma cell line. Sodium nitroprusside (SNP), an agent to produce NO spontaneously in cells, alone increased [³H]thymidine incorporation of BeWo cells, indicating NO stimulates proliferation of the cells. NO-induced proliferation of BeWo cells was blocked by U73122, an inhibitor of PLC, suggesting that NO-induced PLC activation is involved in the cell proliferation. NO also stimulated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in BeWo cells, indicated by increased phosphorylation of ERK1/2 in Western blotting using anti-phospho-ERK1/2 antibody. NO-induced phosphorylation of ERK1/2 was not abrogated by U73122. PLC ν_1 but not PLC ν_2 was tyrosine phosphorylated by SNP in immunoprecipitation assay using anti-PLC ν_1 /PLC ν_2 antibodies, and SNP-induced phosphorylation of PLC ν_1 was abrogated by pre-treatment of cells with genistein and PD98059, indicating that NO induced-phosphorylation of PLC ν_1 is mediated by ERK. These results suggest that NO stimulates the proliferation of BeWo cells through ERK and PLC ν_1 .

Key words – BeWo cells, phospholipase C ν , nitric oxide, extracellular signal-regulated kinase, trophoblast, choriocarcinoma

서 론

Nitric oxide(NO)는 NO synthase(NOS)의 작용에 의하

여 L-arginine으로부터 L-citrulline이 만들어지면서 생성된다. NOS는 endothelial NOS(eNOS), inducible NOS(iNOS), 및 neuronal NOS(nNOS)의 3종류가 밝혀져 있다[7,11]. iNOS는 사이토카인이나 성장인자 등의 자극에 의하여 발현이 유도되는 형(inducible NOS)이나 eNOS와 nNOS는 세포 내에서 아무런 자극이 없이도 NO를 생성시키는 형

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 051-240-2928, Fax : 051-241-6940

E-mail : jkwak@mail.donga.ac.kr

(constitutive NOS)이다. NO는 세포의 증식, 염증반응, 세포사멸 등 생체 내 중요한 작용을 한다[11]. 특히 암 세포들에서 NO는 암의 생성을 억제하거나 암 세포의 살상을 유도하기도 하는데 이는 세포의 형태나 NO의 농도 등에 의하여 그 반응은 다르게 나타난다고 하였다[7,11]. Choriocarcinoma 세포주인 BeWo 세포는 eNOS가 발현되어 있다는 것이 알려져 있는데 이러한 사실은 세포 내 NO의 생성이 세포 기능에 어떠한 작용을 할 것이라는 것을 암시한다 [8,9].

BeWo 세포들은 혈관 내피세포를 특이적으로 증식시킨다고 알려진 vascular endothelial growth factor(VEGF)에 대한 수용체를 가지고 있어서 그에 반응하여 여러 작용을 가지는데 VEGF에 의한 NO의 생성은 BeWo세포의 증식에 관여한다[1,3]. VEGF에 의한 NO의 생성에 대한 전달과정을 보면, VEGF 수용체가 가지고 있는 tyrosine kinase의 활성화에 의하여 수용체의 자가 인산화가 일어나고 phospholipase C(PLC)를 포함한 그 아래 단계의 작용 단백질과 결합한다고 현재까지 알려져 있다[12]. 그러나, BeWo 세포는 혈관 내피세포와는 다르게 주로 VEGF 수용체 1형을 가지고 있어서 VEGF 수용체 2형을 통한 반응과는 차이를 나타내는데 본 연구자들은 혈관 신생을 촉진하는 대표적인 물질인 VEGF를 처리한 BeWo 세포에서 NO 생성이 증가하고 NO에 의하여 세포의 증식이 억제된다는 것을 보고한 바 있다[2]. 또한, BeWo 세포에서 NO의 생성은 mitogen activated protein kinase(MAPK)에 속하는 extracellular signal-regulated kinase(ERK)의 억제제에 의하여 그 증가가 감소하였으나 세포 증식은 아무런 영향을 받지 않음으로써 NO는 ERK 경로를 거치고 세포 증식 자체는 ERK-비의존성이라는 것을 알 수 있었다[2]. 그러나 아직까지 NO 자체가 어떠한 기전으로 이러한 영향을 미치는가를 밝히지 못하였는데 본 연구에서는 NO에 의하여 세포 증식이 변화하는가를 보고 그에 관여하는 신호 전달 경로를 조사하였다.

재료 및 방법

BeWo 세포의 배양 및 세포 증식 조사 ($[^3\text{H}]$ thymidine incorporation assay)

세포의 증식 정도는 배양액의 thymidine이 세포 내 증

가하는 양으로 측정하였다[2]. BeWo 세포들은 한국 세포주 은행으로부터 제공받았으며 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/F-12 배지(Hyclone, USA)에서 10% fetal bovine serum(Hyclone, USA), 100 units/ml penicillin 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin을 함유시키고 37°C에서 배양하였다. VEGF(R&D, USA)나 sodium nitroprusside (SNP) (Sigma, USA)처리를 위하여 세포는 24-well 플레이트에 5×10^4 cells/well로 분주시켰다. 배지는 혈청이 들어 있지 않은 것으로 바꾸어서 24시간 배양하였고 여러 약물을 처리하고 $[^3\text{H}]$ thymidine(1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)(NEN, USA)을 넣고 다시 24시간 더 배양하였다. 배양액을 버리고 차가운 5% trichloroacetic acid 용액으로 15분간 처리한 후 1 M NaOH로 1시간 처리하여 녹이고 여기에 1 M HCl로 중화한 다음 liquid scintillation counter(Beckman, USA)로 측정하였다.

면역침전

배양한 BeWo 세포(2×10^7)를 인산염 완충액으로 세척한 다음 단백질 분해 효소 억제제와 50 mM NaF 및 2.5 mM Na_3VO_4 가 첨가된 세포 용해 완충액(1% Triton X-100, 50 mM NaCl 및 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 이용하여 4°C 하에서 1시간 동안 방치하였다. 파괴된 세포를 함유하는 용액을 Eppendorf microcentrifuge를 이용하여 16,000 $\times\text{g}$ 로 10분간 원심분리하여 핵 분획 및 파괴되지 않은 세포 등을 침전시키고 상층액을 얻어서 단백질 양을 측정한다 다음 PLC ν_1 이나 PLC ν_2 항체(포항공대 류성호 박사로부터 제공)를 5 μg 정도 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 여기에 충분히 세척된 protein A-Sepharose를 30 μL (50% slurry) 넣고 다시 실온에서 1시간 반응시킨 후 인산염 완충액으로 Sepharose bead를 6회 이상 세척한 다음 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer를 첨가하여 90°C에서 5분간 처리하였다.

Western blot법

세포로부터 얻은 세포 추출물에 2.5% mercaptoethanol과 1.2% SDS를 넣고 95°C에서 5분간 가열하여 처리한 다음 10% polyacrylamide 겔에 얹고 전기영동을 시행하였다. Western blot법은 ERK의 인산화형인 p-ERK에 대한 항체(Santa Cruz, USA), PLC ν_1 에 대한 항체, PLC ν_2 에 대한 항체, phosphotyrosine(PY)에 대한 항체(Santa Cruz, USA)

를 이용하여 측정하였다. 전기영동 후 겔의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이시키고 nitrocellulose membrane을 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 및 0.1% sodium azide로 구성된 완충액에 5% skim milk를 포함하는 용액으로 2시간 처리하였으며 1차 항체는 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시키고 nitrocellulose membrane(Bio-Rad, USA)을 세척하였다. 다시 Triton X-100이 들어있지 않는 Tris 용액으로 세척하고 ECL chemiluminescence(Amersham, USA)로 전개시켰다.

통계 처리

세포 증식의 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 통계학적 유의성은 자료들의 분포를 확인하고 Student's t-test를 이용하여 검정하였고 p값이 0.05 이하이면 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

BeWo 세포의 증식에 대한 NO 및 신호 전달 인자 억제제들의 영향

BeWo 세포는 MEM 배양액에서 키우면서 24시간 동안 혈청이 들어 있지 않은 상태로 유지한 후 1 μ Ci의 [3 H] thymidine을 넣고 24시간 더 배양하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 10 μ M에서 500 μ M의 SNP를 처리하였을 때 250 μ M까지 세포 내 [3 H]thymidine가 축적되는 양은 지속적으로 증가하였으며 500 μ M 이상의 높은 농도에서는 더 이상의 증가는 보이지 않았다. 이러한 결과는 세포 내 증가한 NO에 의하여 BeWo 세포의 증식이 증가한다는 것을 제시한다. 이러한 결과와는 다르게 본 연구자들의 이전 연구에서 VEGF에 의한 BeWo 세포의 증식에 대하여 NO는 억제 현상을 보였다[2]. 다른 연구자들에서도 NO는 태반에서 분리한 영양모세포의 증식을 억제시킨다고 보고하였는데 이 경우에도 NO 단독의 영향보다는 VEGF에 의한 증식을 억제하는 것이었다[1]. 본 연구의 결과와 유사하게 VEGF에 의한 세포의 증식 효과가 NO를 통하여 일어난다고 하였는데[10,18] 이러한 보고들 사이에서 결과의 차이가 나타나는 것은 세포의 종류나 세포 내 NO의 농도 등에 따라서 NO는 세포의 증식을 촉진하거나 억제하는 현상을

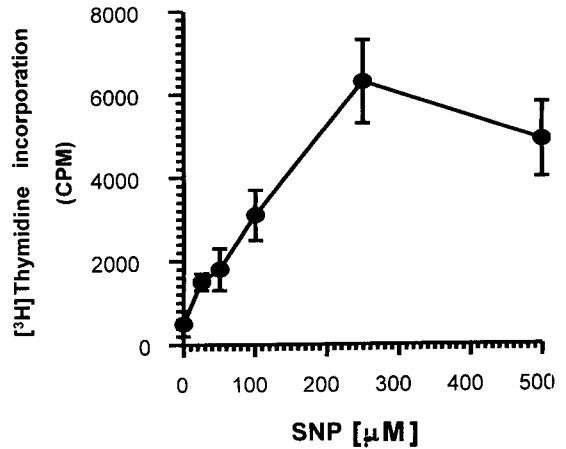


Fig. 1. Effect of sodium nitroprusside on the proliferation of BeWo cells.

BeWo cells (5×10^4) were treated with increasing concentrations of sodium nitroprusside (SNP). After 24 h, cells were harvested and [3 H]thymidine incorporation was measured, as described under Materials and Methods. Data represents mean±SD of three independent experiments.

보이는 것으로 추측된다. 특히, VEGF에 의한 영향에서 뿐만 아니라 NO 자체가 세포의 증식을 촉진하거나 억제한다는 상반된 보고가 있는데[11], 본 연구의 결과는 choriocarcinoma 세포주에서 NO는 세포의 증식을 촉진하는 것으로 나타났다.

ERK는 세포의 증식을 조절하는 중요한 신호전달 인자라는 것이 잘 알려져 있다[14]. NO에 의한 세포의 증식은 ERK의 활성화를 거쳐서 일어나며[13], VEGF의 작용은 PLC를 거친다는 것이 밝혀져 있으므로[4] NO에 의한 세포의 증식 과정에 ERK 및 PLC가 관여하는가를 알기 위하여 이들의 억제제를 사용하여 세포 증식의 변화를 조사하였다. PLC의 억제제인 U73122(1-[6-((17b-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl-1H-pyrrole-2,5-dione)(Calbiochem, USA)는 10 μ M 농도에서 SNP에 의한 세포 증식을 현저히 감소시켰으며 ERK kinase 억제제인 PD98059 (2'-Amino-3'-methoxyflavone)(Calbiochem, USA)나 tyrosine kinase의 억제제인 genistein(4',5,7-Trihydroxyisoflavone)(Calbiochem, USA)도 1 μ M 농도에서 SNP의 영향을 감소시켰다(Fig. 2). Fig. 3에 나타난 바와 같이 U73122의 효능을 농도에 따라 측정하였을 때 1 μ M의 낮은 농도에서 SNP에 의한 세포의 증식을 억제하였다. VEGF에 의한 NO의

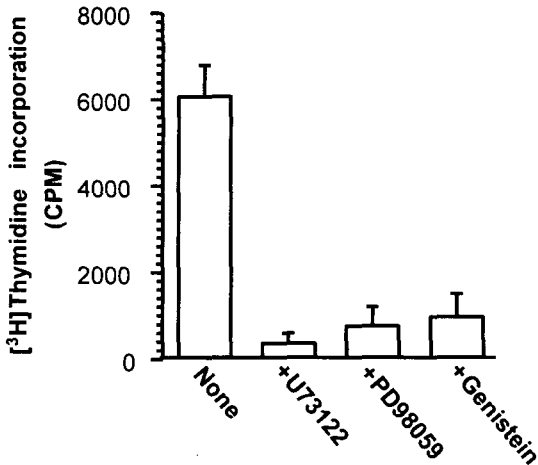


Fig. 2. Effect of tyrosine kinase inhibitors on SNP-induced proliferation of BeWo cells.

BeWo cells were pre-treated with U73122 (1 μ M), PD98059 (10 μ M), and genistein (1 μ M) for 1 h and incubated for 24 h with SNP. [³H]thymidine incorporation was measured as in Fig. 1. Each value is the mean \pm SD of three independent experiments.

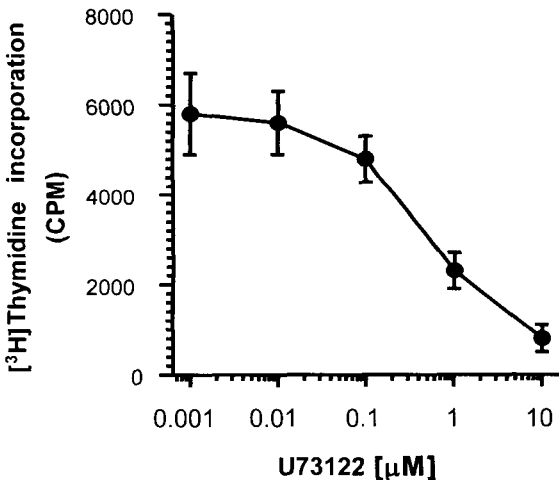


Fig. 3. Dose-dependent effect of U73122 on SNP-induced proliferation of BeWo cells.

BeWo cells were pre-treated for 1 h with 1 μ M U73122 and then further incubated for 24 h in the presence of 250 μ M SNP. Each value is the mean \pm SD of three independent experiments.

생성에 PLC가 중요한 역할을 한다는 보고와 비교하여[6], 본 연구의 결과는 BeWo 세포에서 NO에 의한 세포의 증식에는 ERK뿐만 아니라 PLC의 활성화가 필요하다는 것을 제시하고 있다.

NO에 의한 ERK의 활성화에 대한 PLC 억제제의 영향

세포 내 증가된 NO는 그 자체가 신호전달 인자로 작용을 한다. SNP를 처리한 세포에서 ERK1/2의 활성 정도를 ERK1/2가 인산화되는 것으로 측정하였다. Phospho-ERK1/2에 대한 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였을 때 SNP를 10분간 처리하였을 경우는 대조군에 비교하여 phospho-ERK1/2가 현저히 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 세포 내 증가된 NO에 의하여 ERK가 활성화된다는 것을 의미한다. SNP를 처리하기 전에 PD98059와 U73122를 투여하여 SNP에 대한 영향을 보았을 때 PD98059는 ERK의 인산화를 억제하였으나 U73122는 아무런 영향을 주지 못하였다. 이 결과는 VEGF에 의한 ERK의 활성화에는 PLC가 관여하지 않거나 활성화 과정에서 PLC가 ERK의 아래 단계라는 것을 제시한다. 지금까지 보고된 연구 결과에 의하면 VEGF에 의한 PLC의 활성화를 통하여 ERK가 활성화되며, ERK에 의한 활성화는 NOS를 통한 NO의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있으나[5], 본 연구 결과는 BeWo 세포에서 NO 자체에 의한 PLC의 활성화는 ERK의 활성화 경로가 필요하다는 것으로 제시한다.

PLC γ_1 의 tyrosine 인산화에 대한 NO의 영향

PLC는 β , γ , 및 δ 3 가지가 여러 조직에서 발현되고 세포 활성화에 관여하는데 BeWo 세포에서 VEGF에 의한 세포의 증식에는 주로 PLC γ 가 관여한다[5]. PLC γ 는 tyrosine 잔기의 인산화에 의하여 활성화된다. 본 연구에서는 NO에 의하여 PLC γ 가 활성화되는가를 조사하였다. SNP를

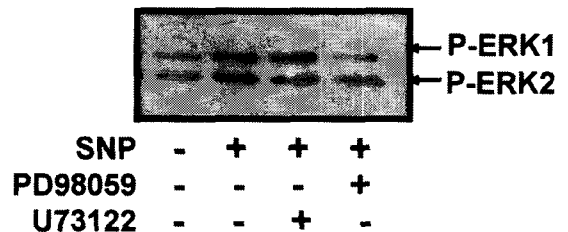


Fig. 4. Effect of PLC inhibitor on NO-induced phosphorylation of ERK.

BeWo cells were pre-incubated for 10 min at 37°C with 10 μ M PD98059 and 1 μ M U73122. Cells were then treated with 250 μ M SNP for 10 min, and the cells were harvested. The levels of phosphorylated ERK1/2 were then determined using Western blotting with phosphospecific sera. Results are representative of three experiments.

처리한 후 세포 추출액을 PLC γ_1 및 PLC γ_2 에 대한 특이 항체를 사용하여 면역침전을 시행한 후 phosphotyrosine 항체인 PY로 western blotting을 시행하여 이들 단백질이 인산화되는가를 조사하였다(Fig. 5). PLC γ_1 및 PLC γ_2 에 대한 항체로 면역침전한 단백질을 다시 이들 항체로 Western blotting을 하였을 때 검출되는 양은 동일하였다. 이들 면역침전된 시료를 PY항체를 사용하여 조사하였을 때 SNP에 의하여 PLC γ_1 은 tyrosine 잔기가 인산화되어 활성화되는 것으로 나타났으나 PLC γ_2 의 인산화에는 아무런 변화가 없었다. 또한, SNP에 의한 PLC γ_1 의 tyrosine 인산화는 tyrosine kinase의 억제제인 genistein에 의하여 억제되는

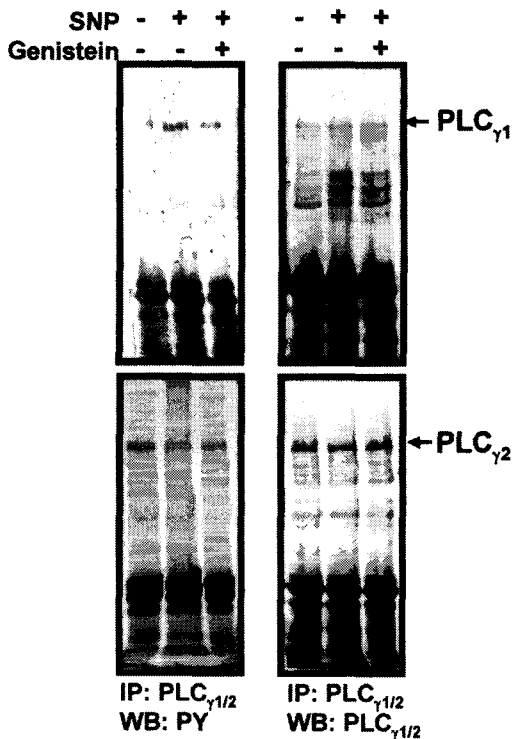


Fig. 5. Effect of SNP and tyrosine kinase inhibitor on tyrosine phosphorylation of PLC γ .

BeWo cells were pre-incubated for 10 min at 37°C with or without 1 μ M genistein. Cells were then stimulated with 250 μ M SNP for 10 min, and the cells were harvested. Cell lysates were mixed with specific antibodies against PLC γ_1 and PLC γ_2 for 1 h and protein A-Sepharose were added to the reaction mixture. After 1 h, the beads were harvested and the levels of tyrosine phosphorylation (PY) were then determined using Western blotting with phosphospecific sera. Results are representative of two experiments. IP; immunoprecipitation, WB; Western blotting.

것으로 보아 이들의 활성화를 나타내는 인산화는 tyrosine kinase에 의하여 일어난다는 것을 알 수 있다.

다음으로 NO에 의한 PLC γ_1 의 인산화가 ERK를 통하여 일어나는가를 조사하였다. PD98059를 전 처리한 후 SNP를 투여한 BeWo 세포로부터 얻은 추출액을 PLC γ_1 으로 면역침전하고 PY에 대한 항체로 Western blotting을 하였을 때 SNP에 의한 tyrosine 잔기의 인산화는 크게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이 결과는 NO에 의한 PLC γ_1 의 인산화는 ERK를 통하여 일어난다는 사실을 제시한다.

다른 연구자의 보고에 의하면 peroxynitrite를 처리한 NIH3T3세포에서 PLC γ_1 의 tyrosine 잔기가 인산화된다고 보고하였지만 그들은 인산화 효소를 거쳐서 일어나는가를 밝히지 못하였다[17]. 또 다른 연구자들은 PLC β_1 이 ERK에 의하여 직접적으로 인산화된다고 보고하기도 하였으나[16], 본 연구에서는 PLC γ_1 이 ERK에 의하여 직접적으로 인산화되는지 혹은 다른 인자를 통하여 일어나는지는 밝히지 못하였다. NO는 세포 내 cGMP의 양을 증가시키고 결국에는 cGMP-의존형 인산화 효소인 protein kinase G의 활성화를 유도하는데 NO에 의한 단백질의 인산화가 PKG에 의하여 일어날 수 있으나 이들은 serine이나 threonine기의 인산화를 시키며 특히, PLC β 가 PKG에 의하여 인산화되면 세포

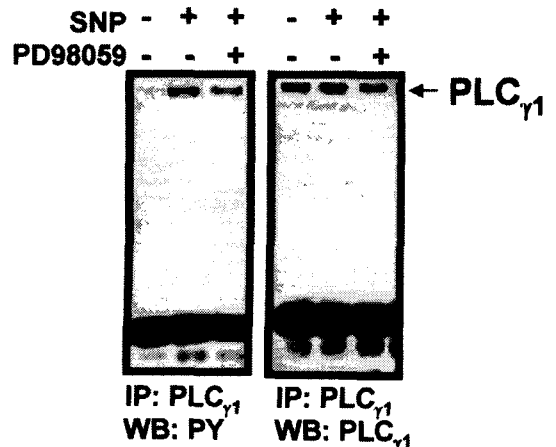


Fig. 6. Effect of PD98059 on SNP-induced tyrosine phosphorylation of PLC γ_1 .

BeWo cells were pre-incubated for 10 min at 37°C with or without 10 μ M PD98059. Cells were then stimulated with 250 μ M SNP for 10 min. Immunoprecipitation was performed as described in Fig. 5. Results are representative of two experiments. IP; immunoprecipitation, WB; Western blotting.

자극에 의한 반응은 오히려 억제된다고 하였다[15]. NO에 의하여 PLC β 나 PLC δ 가 인산화될 가능성도 배제할 수 없으나 본 연구 결과에서는 PLC γ_1 이 NO에 의한 ERK의 활성화 경로를 통하여 tyrosine기의 인산화가 이루어지고 이들의 활성화에 의하여 세포의 증식이 일어날 것으로 추측된다.

비록 PLC γ_1 의 어느 아미노 잔기가 인산화되어 NO에 의한 세포 증식의 조절에 중요한 조절 인자로 작용하는가는 앞으로 연구되어야 하겠지만 본 연구 결과는 choriocarcinoma 세포에서 ERK나 PLC γ_1 의 신호전달 인자를 조절함으로써 NO에 의한 세포 증식을 억제할 수 있다는 것을 제시하고 있다. 더욱 중요한 점으로는, 생리-병리학적으로 볼 때, BeWo 세포가 VEGF로 자극을 받으면 VEGF 수용체의 인산화를 통한 PLC γ 의 활성화가 ERK를 자극하여 세포의 증식이나 NO의 생성에 영향을 줄 뿐만 아니라 세포 내 증가된 NO에 의하여 자가적으로 PLC γ 가 활성화되어 세포 증식에 대한 증폭 작용을 할 것으로 추측된다.

요 약

NO는 태반의 영양모세포의 증식에서 중요한 신호전달 인자로서 작용을 한다. 본 연구에서는 choriocarcinoma 세포주인 BeWo 세포에서 NO에 의한 세포의 증식에서 PLC의 관련성을 조사하였다. 세포 내 NO 생성을 자연적으로 유발하는 약물인 SNP를 단독으로 처리하였을 때 BeWo 세포에서 [3 H]thymidine의 축적 양이 현저히 증가하였는데 이러한 결과는 NO가 BeWo 세포의 증식을 촉진한다는 것을 보여주고 있다. NO에 의한 BeWo 세포의 증식은 PLC의 억제제인 U73122에 의하여 현저히 감소하였다. BeWo 세포에 SNP를 10분간 처리하였을 때 ERK1/2의 인산화가 증가되는 것을 Western blot으로 확인하였다. 이들 인산화는 U73122에 의하여 아무런 영향을 받지 않았다. PLC γ_1 과 PLC γ_2 에 대한 특이 항체를 이용한 면역침전을 시행한 후 phosphotyrosine에 대한 항체인 PY로 Western blotting을 시행하였을 때 PLC γ_1 은 SNP에 의하여 tyrosine 잔기의 인산화가 이루어졌으나 PLC γ_2 는 인산화가 되지 않았다. SNP에 의한 PLC γ_1 의 인산화는 genistein이나 PD98059를 전 처리하였을 때 억제되었다. 따라서, NO에 의한 PLC γ_1 의 tyrosine 인산화는 ERK의 활성을 통하여 일어난다는 것을 알 수 있다. 이상의 결과들은 BeWo세포에서 NO는 세포

증식을 촉진하며 ERK와 PLC γ_1 의 활성화를 통하여 일어난다는 사실을 제시하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2001학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Ahmed, A., C. Dunk, D. Kniss and M. Wilkes. 1997. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab. Invest.* **76**, 779-791.
2. Cha, M. S., M. J. Lee, G. H. Je and J. Y. Kwak. 2001. Endogenous production of nitric oxide by vascular endothelial growth factor down-regulates proliferation of choriocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1061-1066.
3. Charnock-Jones, D. S., A. M. Sharkey, C. A. Boocock, A. Ahmed, R. Plevin, N. Ferrara and S. K. Smith. 1994. Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol. Reprod.* **51**, 524-530.
4. Cunningham, S. A., M. P. Arrate, T. A. Brock and M. N. Waxham. 1997. Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 635-639.
5. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.
6. Gelinas, D. S., P. N. Bernatchez, S. Rollin, N. G. Bazan and M. G. Sirois. 2002. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br. J. Pharmacol.* **137**, 1021-1030.
7. Griffith, O. W. and D. J. Stuehr. 1995. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707-736.
8. Kiss, H., C. Schneeberger, W. Tschugguel, H. Lass, J. C. Huber, P. Husslein and M. Knofler. 1998. Expression of endothelial (type III) nitric oxide synthase in cytotrophoblastic cell lines: regulation by hypoxia

- and inflammatory cytokines. *Placenta* **19**, 603-611.
9. Myat-Thanda, Y. Hitsumoto, S. Saheki, H. Kitagawa, J. Yano and S. Matsuura. 1996. Attenuation of human chorionic gonadotropin release by nitric oxide in choriocarcinoma cell lines. *J. Endocrinol.* **150**, 243-253.
 10. Morbidelli, L., C. H. Chang, J. G. Douglas, H. J. Granger, F. Ledda and M. Ziche. 1996. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am. J. Physiol.* **270**, H411-H415.
 11. Nathan, C. and Q. W. Xie. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915-918.
 12. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch and Z. Poltorak. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**, 9-22.
 13. Parenti A., L. Morbidelli, X. L. Cui, J. G. Douglas, J. D. Hood, H. J. Granger, F. Ledda and M. Ziche. 1998. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J. Biol. Chem.* **273**, 4220-4226.
 14. Seger, R, and E. G. Krebs. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
 15. Xia, C., Z. Bao, C. Yue, B. M. Sanborn and M. Liu. 2001. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C- β 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* **276**, 19770-19777.
 16. Xu, A., P. G. Suh, N. Marmy-Conus, R. B. Pearson, O. Y. Seok, L. Cocco and R. SImour. 2001. Phosphorylation of nuclear phospholipase C beta1 by extracellular signal-regulated kinase mediates the mitogenic action of insulin-like growth factor I. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2981-2890.
 17. Yuen, E. C., E. C. Gunther and M. Bothwell. 2000. Nitric oxide activation of TrkB through peroxynitrite. *Neuroreport* **11**, 3593-3597.
 18. Ziche, M., L. Morbidelli, R. Choudhuri, H. T. Zhang, S. Donnini, H. J. Granger and R. Bicknell. 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**, 2625-2634.

(Received August 26, 2003; Accepted November 17, 2003)