

## 호중구에서 phospholipase D의 활성화에 대한 protein kinase G의 영향

박지연 · 이민정<sup>1</sup> · 장민정<sup>1</sup> · 이선영 · 배외식 · 곽종영<sup>1\*</sup>

동아대학교 의과대학 생화학교실

<sup>1</sup>동아대학교 암분자치료연구센터

### Effects of Protein Kinase G on Phospholipase D Activity of Human Neutrophils

Ji-Yeon Park, Min-Jung Lee<sup>1</sup>, Min-Jung Jang<sup>1</sup>, Sun-Young Lee,  
Yoe-Sik Bae and Jong-Young Kwak<sup>1\*</sup>

*Department of Biochemistry, Dong-A University College of Medicine, Busan 602-714, Korea*

*<sup>1</sup>Medical Research Center for Cancer Molecular Therapy, Dong-A University, Busan 602-714, Korea*

#### Abstract

Phospholipase D (PLD) plays an important role as a signaling molecule in the activation of neutrophils. In this study, effect of nitric oxide (NO) and cGMP on the activation of PLD in human neutrophils was investigated. Sodium nitroprusside (SNP), an agent to produce NO spontaneously in cells, alone increased PLD activity and the maximal activation was obtained with 0.5 mM SNP. Dibutyryl-cAMP, an agent to increase an intracellular cAMP concentration inhibited formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)-stimulated PLD activity but 8-bromo-cGMP (300  $\mu$ M), an agent to increase an intracellular cGMP concentration did not affect basal and fMLP-stimulated PLD activity. NO-induced activation of PLD was not blocked by KT 5823, an inhibitor of cGMP-dependent protein kinase (PKG), suggesting that NO-induced PLD activation is not mediated by cGMP. NO also stimulated p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) in human neutrophils, indicated by increased phosphorylation of p38 MAPK in Western blotting. NO-induced phosphorylation of p38 MAPK was not inhibited by KT 5823 or n-butanol. RhoA, a regulatory factor of PLD activation was translocated from cytosolic fraction to plasma membranes by fMLP or phorbol ester, and fMLP-stimulated but not phorbol ester-stimulated translocation of RhoA was inhibited by cGMP. These results suggest that NO stimulates PLD activity through other unidentified factor(s) than cGMP even though cGMP inhibits the activation of RhoA.

**Key words** – Neutrophils, phospholipase D, nitric oxide, cGMP, RhoA, protein kinase G

#### 서 론

Phospholipase D(PLD)는 세포 내 신호전달, 분비, 세포

구조체 형성 및 respiratory burst의 작용을 매개한다[11, 17]. 호중구가 여러 가지 종류의 세포막 수용체의 자극을 받으면 활성화가 일어나며 PLD는 호중구의 신호전달에 있어서 중요한 역할을 한다[9,17]. 이 효소는 phosphatidylcholine을 가수분해하여 choline과 phosphatidic acid(PA)를 형성시키며 PA는 그 자체가 신호전달 물질로서 기능을

\*To whom all correspondence should be addressed

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

Email : jkwak@mail.donga.ac.kr

하면서[21,30] PA phosphohydrolase에 의하여 diacylglycerol(DAG)로 변한다[30]. 이 DAG은 호중구를 포함한 여러 세포에서 신호전달로 쓰이는 주요 구성 성분으로서 세포의 성장, 분화, 염증반응 및 호중구에서의 respiratory burst와 같은 세포특이성과 같은 여러 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다[4,9,17]. PLD경로를 통하여 만들어진 DAG는 phospholipase C에 의하여 생성되는 DAG보다 뒤에 생성되며 그 작용도 오래가므로 protein kinase C(PKC) 등을 활성화시키는 물질로서 여러 반응에서 지속적인 영향을 미친다[11].

세포막에 결합된 guanylyl cyclase에 의하여 합성된 guanosine 3',5'-cyclic monophosphate(cGMP)에 의하여 활성화되는 cGMP-dependent protein kinase (protein kinase G, PKG)는 세포 내 중요한 신호전달 물질로서 평활근, 혈소판 및 신장의 혈관 등에 다량 존재하고 호중구에도 존재한다[13]. PKG는 평활근 확장, 혈소판 응집 등의 여러 생리적인 작용을 가지는데, 75 kDa로 된 두 개의 dimer로 구성된 PKG는 PKG1 $\alpha$ , PKG1 $\beta$  및 PKG2가 밝혀져 있으며 이들 중에서 PKG1은 nitric oxide(NO)에 의하여 활성화되고 PKG2는 Cl<sup>-</sup> channel의 조절에 관여한다[12]. NO에 의한 세포의 반응은 세포에 따라 그 반응이 각각 다른데 이는 cGMP와 PKG를 경유하는가와 그렇지 않은가에 따라서 많은 차이를 보이고 있다. 호중구에서는 formyl-Met-Leu-Phe(fMLP)의 자극에 의하여 PKG는 intermediate filament로 전이되어 vimentin을 인산화시킴으로써 작용을 나타낸다고 하였는데[28], fMLP에 의한 화학주성의 증가는 NO와 cGMP에 의하여 일어나며 PLD의 억제제에 의하여 감소한다고 보고되었다[27].

세포 내 cAMP를 증가시키는 약물로 알려진 prostagandin E2과 theophylline 혹은 세포막 투과가 가능한 cAMP제제인 dibutyryl-cAMP 등을 처리한 세포에서 PLD의 활성은 감소한다[24]. 본 연구진은 호중구의 cell-free system에서 PLD의 활성인자의 하나인 저분자 GTP결합 단백질인 RhoA가 cAMP-dependent protein kinase(PKA)에 의하여 인산화되어 PLD의 활성이 억제된다고 보고하였다[16]. 그 후 다른 연구자들에 의하여 RhoA는 *in vitro*에서 PKG에 의하여 인산화가 이루어지는데 인산화되는 아미노기는 PKA에 의한 인산화와 마찬가지로 Ser188 아미노기이

며 작용 기작도 PKA와 같은 것으로 보고되었다[23]. 또한, 백서의 신장세포에서 angiotensin에 의한 PLD 활성은 cGMP의 증가로 인하여 억제된다고 하였다[2]. Ca<sup>2+</sup>이나 polyamine에 의한 장세포의 미토콘드리아 PLD의 활성이 NO에 의하여 억제된다는 것이 보고된 바가 있으나[20], PKG에 의한 RhoA의 인산화가 PLD의 활성에도 영향을 미치는가는 아직 보고된 바가 없다. 따라서, 본 연구에서는 세포에 대하여 손상과 보호작용을 나타내는 물질인 NO 및 cGMP가 호중구의 PLD 활성에 어떠한 영향을 주는가를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 사람 호중구의 분리 및 배양

사람의 말초 혈액 중의 호중구는 Kwak 등[15]의 방법에 의하여 분리하였다. 혈액(100 ml)은 0.1 M EDTA, pH 7.4/0.9% NaCl이 들어 있는 수혈용 팩에 채혈한 후 이 혈액에 40 ml의 Hespán을 넣고 조심스럽게 섞은 다음 플라 스틱 시린더에서 한시간 동안 실온상태에서 방치하여 적혈구를 침전시켰다. 호중구를 포함하는 혈장 성분 층을 분리하여 4°C 상태에서 850×g로 15분 동안 원심분리하였다. 침전된 세포를 10 ml의 완충액 A(8.0 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4)에 부유시킨 다음 30 ml의 증류수를 넣고 20초간 방치한 후 10 ml의 4%(w/v) NaCl을 넣어 등장성 용액으로 하여 혼재된 적혈구를 파괴하였다. 세포는 원심분리(850×g, 10분)한 다음 5.5 mM glucose가 함유된 완충액 A에 부유시켰다. 임파구 분리용액을 세포 층 밑에 넣고 850×g에서 30 분간 원심하여 중간층에 존재하는 임파구는 버리고 침전된 과립구층은 11 mM glucose와 1 mg/ml bovine plasma albumin을 첨가한 완충액 B(25 mM Hepes pH 7.4, 125 mM NaCl, 0.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA)에 부유시켜 사용하였다.

1-O-(<sup>3</sup>H)-octadecyl-lyso platelet activating factor로 세포의 라벨링

PLD 효소 활성도를 측정하는 방법으로 transphosphatidylcholine 측정용 라벨링이 필요하며 그 방법은 Billah 등[4]

의 방법을 변형하여 사용하였다. Toluene과 ethanol이 1:1로 된 용매에 녹은 1-O-[<sup>3</sup>H]-octadecyl-lyso platelet activating factor(80~180 mCi/mmol)를 질소 가스 하에서 건조시킨 다음 bovine serum albumin을 첨가한 완충액 B(1 ml)에 잘 혼합시켰다. 이 용액과 세포 성분을 잘 혼합시키고 세포의 밀도는  $2 \times 10^7$  cells/ml이 되게 하고 동위원소는  $1.5 \mu\text{Ci/ml}$ 이 되도록 하였다. 세포는 37°C에서 90분간 배양하여 첨가시킨 지방의 70% 정도가 세포에 함유되도록 하며 이 과정 중에 50 U/ml DNase를 섞어서 세포들이 영가지 않도록 하였다.

#### PLD 활성도 측정

$1 \times 10^6$ 의 호중구를 반응액에 넣고 시료를 첨가하여 10분 동안 배양하고 활성도를 측정하는 경우에는 1 mM CaCl<sub>2</sub>와 1.6% 에탄올이 들어있는 상태에서 1  $\mu\text{M}$  fMLP로서 반응을 시작시키고 15분 후 1.5 ml chloroform/methanol(1:2 v/v)을 첨가하여 반응을 중지시켰다[15]. 반응이 중지된 용액에 0.5 ml의 chloroform과 0.5 ml의 2% acetic acid를 넣고 잘 섞은 다음 원심분리(850×g, 2분)를 하여 수용성 층과 지용성 층을 분리한 다음 아래층의 지용성 부분을 질소 가스를 이용하여 건조시켰다. 다시 시료를 30  $\mu\text{l}$  chloroform/methanol(95:5 v/v)에 녹인 다음 모세관 튜브를 이용하여 Silica gel 60의 편평 크로마토그래피판(EM Science, Gibbstown, NJ)에 점적한 다음 chloroform/methanol/acetic acid(90:10:10 v/v/v)용액으로 전개시켰다. 효소의 활성도는 phosphatidylethanol으로 라벨된 정도를 전체 방사선의 양에 대한 %로 환산하여 표시하였다.

#### 호중구 세포막의 분리

시약을 처리한 호중구를 원심분리(850×g, 5분)한 후 완충액 B에 다시 부유시키고 4.6 mM diisopropyl fluorophosphate를 넣어 20분간 방치한 후 세포를 즉시 원심분리하여 단백질 분해효소 억제제(0.5  $\mu\text{M}$  leupeptin, 1  $\mu\text{M}$  aprotinin 및 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)가 첨가된 10 ml 완충액 C(25 mM triethanolamine HCl pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM NaCl)에 부유시켰다. 세포는 ultrasonic disruptor를 사용하여 파괴하고 다시 원심분리하여 파괴되지 않은 세포와 핵성분을 제거하였다. 완충액 C에 녹인 50%(w/v)와 30%(w/v)의 sucrose로 된 discontinuous sucrose gradient에 세포 추출액을 조심스럽

게 넣고 이 gradient를 Beckman SW-41 Ti 로터를 이용하여 Beckman L8-80M 초원심분리기에서 209,000×g로 90분간 원심분리하여 30%/50% 중간층의 분획을 막성분(membrane fraction)으로 이용하였다.

#### Western blotting

배양한 세포( $2 \times 10^7$ )를 완충액 A로 세척한 다음 단백질 분해효소 억제제와 50 mM NaF 및 2.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>가 첨가된 세포용해 완충액(1% Triton X-100, 50 mM NaCl 및 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)을 이용하여 4°C 하에서 10분간 동안 방치하였다. 파괴된 세포를 함유하는 용액을 Eppendorf microcentrifuge를 이용하여 16,000×g로 10분간 원심분리하여 핵 분획 및 파괴되지 않은 세포 등을 침전시키고 상층액을 얻어서 단백질 양을 측정하는 다음 전기영동에 이용하였다. 약물을 처리한 호중구는 2.5% mercaptoethanol과 1.2% sodium dodecyl sulfate를 넣고 95°C에서 5분간 가열하여 처리한 다음 15% polyacrylamide 겔에 얹고 전기영동을 시행하였다. Western blot법은 p38 MAPK의 인산화형인 p-p38 MAPK에 대한 항체나 RhoA에 대한 항체(Santa Cruz, USA)를 이용하여 측정하였다. 전기영동 후 겔의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 전이시키고 처리한 membrane을 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 및 0.1% sodium azide로 구성된 완충액에 5% skim milk을 포함하는 용액으로 2시간 처리하며 1차 항체는 1:1000으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시키고 세척하였다. 다시 Triton X-100이 들어있지 않는 Tris 용액으로 세척하고 ECL chemiluminescence(Amersham)나 nitroblue tetrazolium과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 발색 방법으로 전개시켰다.

#### 통계 처리

세포사멸의 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

#### PLD 활성에 대한 NO의 영향

cGMP의 증가에 의한 PKG 활성화 경로를 통하는 것 중에

서 가장 대표적인 병태생리적인 자극제 중의 하나는 NO이다. 따라서 본 연구에서는 NO가 호중구의 PLD 활성화에 어떠한 영향을 미치는 가를 조사하였다. 세포 내 NO의 생성을 증가시키는 물질인 sodium nitroprusside(SNP)를 처리한 호중구에서 0.5 mM 농도일 때 PLD의 활성이 SNP를 처리하지 않은 세포와 비교하여 2배 정도 증가하였다( $P < 0.05$ )(Fig. 1). 1 mM 이상의 SNP를 처리하였을 때는 더 이상의 PLD 활성 증가는 없었으며 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. Fig. 3의 결과에서와 같이 fMLP에 의하여 증가된 PLD의 활성은 NO에 의하여 크게 영향을 받지 않았다. 따라서, 이러한 결과는 세포 내 증가된 NO는 그 자체가 PLD의 활성을 증가시킨다는 것을 제시하고 있다. 본 연구 결과와 비교하여  $Ca^{2+}$ 이나 polyamine에 의하여 활성화되는 미토콘드리아의 PLD는 NO에 의하여 억제된다고 보고하였다[20]. 또한, 다른 연구자의 실험 결과에 의하면 IL-1 $\beta$ 에 의한 PLD1a의 발현의 감소는 NO가 매개하여 이루어진다고 보고됨으로써 NO가 PLD의 활성화에 어떠한 작용을 한다는 것을 알 수 있다[8]. 한편으로, 대식세포에서 lipopolysaccharide(LPS)에 의한 iNOS의 발현 증가와 NO

의 생성에는 PLD가 중요한 역할을 한다고 보고되었다[7].

PLD 활성화에 대한 cGMP의 영향

호중구 내 cGMP의 농도가 증가하면 이들의 화학주성은 억제될 뿐 아니라 cGMP의 농도가 증가하면 myeloperoxidase나 lactoferrin과 같은 호중구의 과립 내 효소의 분비가 증가된다[28]. 호중구에서 LPS에 의한 IL-8의 생성이 NO의 생성을 유도하는 SNP를 처리한 경우 증가되고 이러한 작용은 cGMP를 통하여 이루어진다고 하였다[10]. 본 연구에서는 세포 내 증가한 cGMP가 직접적으로 PLD의 활성화에 영향을 주는가를 보기 위하여 세포 내로 쉽게 통과하는 약물인 8-bromo-cGMP를 처리한 후 PLD의 활성을 측정하였다(Fig. 2). cGMP를 단독 처리한 경우에는 SNP와는 다르게 PLD의 활성은 증가되지 않았다. cAMP를 증가시키는 물질인 dibutyl cAMP를 처리한 호중구에서 fMLP에 의한 PLD의 활성은 억제된다고 보고되었다[24]. Fig. 2에 나타난 바와 같이 fMLP에 의한 PLD의 활성 증가는 cAMP에 의하여 억제되었으나 cGMP는 오히려 활성을 약간 증가시켰으나 유의성은 없었다. 따라서, PLD 활성화에 대한 NO의 영향은 cGMP를 통하여 일어나지는 않는 것으로 보이며 cGMP는 cAMP와는 다른 경로를 통하여 PLD에 작

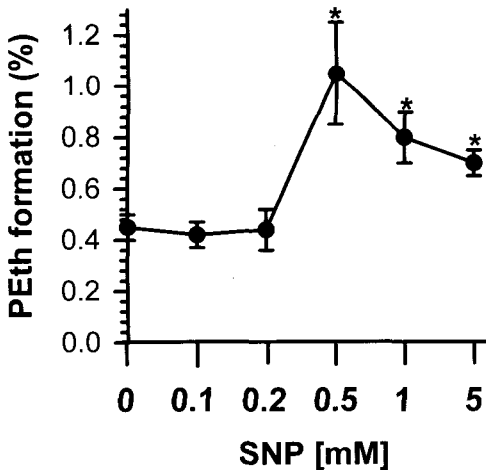


Fig. 1. Effect of sodium nitroprusside on phospholipase D activity human neutrophils. Freshly isolated neutrophils were treated with increasing concentrations of sodium nitroprusside (SNP) for 15 min in the presence of 1.6% ethanol. The reactions were terminated by addition of chloroform and methanol and then the formation of phosphatidylethanol (PEth) was measured as described in "Materials and Methods". Data represents mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$  with respect to control.

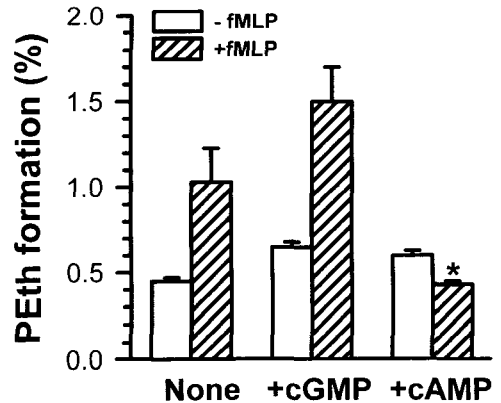


Fig. 2. Effect of cGMP on unstimulated and fMLP-stimulated PLD activity of human neutrophils. Freshly isolated neutrophils were preincubated for 10 min at 37°C with buffer (None), 300  $\mu$ M 8-bromo-cGMP (+cGMP), and 300  $\mu$ M dibutyl cAMP (+cAMP), and then further incubated for 15 min in the presence (+fMLP) or absence (-fMLP) of 1  $\mu$ M fMLP with 1.6% ethanol. PLD activity was measured as Fig. 1. Each value is the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.05$  with respect to none.

용할 것이라는 것을 알 수 있다. NO가 cGMP 비의존형으로 세포에 영향을 주는 것은 단백질을 직접 nitrosylation시키거나 혹은 nitration시킴으로써 단백질의 구조를 변화시키거나 peroxynitrate를 형성하여 어떠한 인자를 산화시킴으로써 일어난다고 제안되고 있다[19,22]. Guanylyl cyclase를 활성화하여 cGMP의 농도를 증가시키는 약물인 3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole(YC-1)을 호중구에 처리하였을 때 fMLP에 의한 O<sub>2</sub>의 생성이 억제되고 이러한 억제는 다시 cGMP의 농도를 감소시키는 약물에 의하여 회복됨으로써 호중구의 활성화에 cGMP가 억제작용을 한다고 하였으며 phorbol myristate acetate(PMA)나 arachidonate에 의한 O<sub>2</sub>의 생성은 YC-1에 의하여 억제되지 않는다고 하였다[26]. 또한, ionomycin에 의하여 증가된 호중구 내의 Ca<sup>2+</sup> 농도는 cGMP에 크게 영향을 받지 않는다고 하였다[25]. 따라서, 호중구에서 PLD 활성화에 대한 cGMP의 영향은 PLD를 자극하는 물질에 따라서 다양하게 나타나는 것으로 추정할 수 있다.

NO에 의한 PLD 활성의 증가에 대한 PKG 및 p38 MAPK의 역할

NO에 의한 화학주성의 억제는 cGMP와는 관계없이 O<sub>2</sub>에 의한 효과로 actin의 ADP-ribosylation에 의하여 일어난다고도 하였지만[14], PKG의 억제제인 KT 5823이나 NO생성의 억제제인 N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME)는 호중구의 화학주성을 억제하였으며 PLD의 억제제인 n-butanol에 의하여도 이러한 억제 현상이 나타남으로써 PLD와 PKG에 의한 경로가 호중구의 화학주성에 중요하다고 하였다[27]. 본 연구에서는 SNP에 의한 PLD의 활성이 cGMP를 경유하여 일어나는가를 보기 위하여 cGMP-dependent protein kinase(PKG)의 억제제인 KT 5823으로 세포를 전처리한 후 PLD 활성도를 측정하였다. SNP를 단독으로 처리하여 증가된 PLD의 활성은 KT 5823에 의하여 영향을 받지 않았으며 fMLP에 의한 PLD의 활성의 증가도 KT 5823에 의하여 변화되지 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 SNP에 의한 PLD의 증가는 cGMP 이외의 경로를 통하여 일어나며 fMLP에 의한 PLD의 활성화도 cGMP와는 관계가 없다는 것을 의미한다.

fMLP에 의한 p38 MAPK의 인산화는 n-butanol에 의하

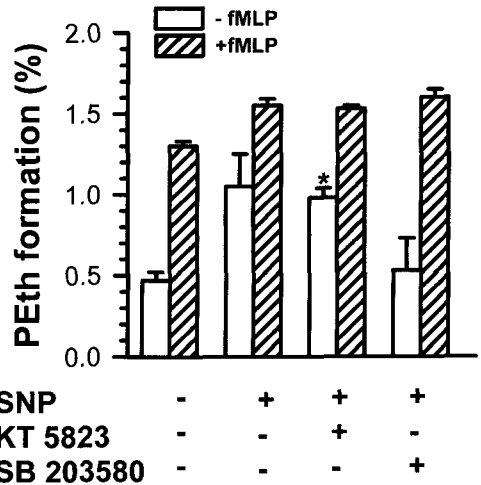


Fig. 3. Effect of PKG inhibitor, KT 5823 and p38 MAPK inhibitor, SB203580 on SNP-induced activation of PLD.

Neutrophils were preincubated for 10 min at 37°C with 5 μM KT 5823 or 10 μM SB 203580 and then further incubated for 10 min in the presence or absence of 5 mM sodium nitroprusside (SNP). The cells were the stimulated with 1 μM fMLP for 15 min and PLD activity was measured. Each value is the mean ± SD of three independent experiments.

\*P<0.05 with respect to no addition of SNP.

여 억제되었으나 t-butanol에 의하여 변화가 없었으므로 fMLP에 의한 p38 MAPK의 활성화에는 PLD가 필요하다고 보고되었으며[3], 한편으로 Browning 등[5,6]은 LPS에 의하여 세포 내 증가된 NO에 의하여 p38 MAPK가 인산화되는 과정에서 PKG의 경로가 중요하다고 하였다. Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 호중구에서 NO에 의한 PLD의 활성화는 p38 MAPK의 억제제인 SB 203580에 의하여 큰 영향을 받지 않았다. p38 MAPK의 활성화는 인산화의 증가로 나타나는데 SNP를 처리한 호중구에서 p38 MAPK의 인산화가 증가됨으로써 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 Western blot 실험에서 인산화된 p-p38 MAPK가 처리하지 않은 세포에 비교하여 현저히 증가되었다. 이러한 인산화의 증가는 SB 203580에 의하여 감소하였으나 KT 5823에 의하여 큰 변화가 없었다. 따라서, NO에 의한 호중구의 p38 MAPK 활성화는 PKG에 의하여 일어나지 않는 것으로 보인다. 또한 NO에 의한 p38 MAPK의 활성화는 n-butanol이나 t-butanol으로도 감소되지 않았으므로 PLD가 NO에 의한 p38 MAPK의 활성화에는 관여하지 않는 것으로 보인다.

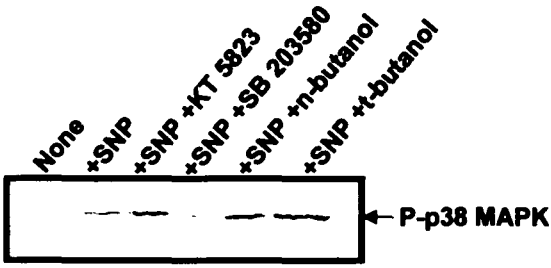


Fig. 4. NO-induced phosphorylation of p38 MAPK is not related to PKG and PLD pathways.

Neutrophils were preincubated for 10 min at 37°C with 5 μM KT 5823, 10 μM SB 203580, 1% n-butanol, or 1% t-butanol. Cells were then treated with 5 mM SNP for 10 min, and the cells were harvested. The levels of phosphorylated p38 MAPK were then determined using Western blotting with phosphospecific sera. Results are representative of three experiments.

#### RhoA활성에 대한 cGMP의 영향

최근에 PLD의 활성화에는 RhoA가 필요하며 이들 두 단백질과의 결합이 직접적으로 이루어진다는 것이 규명되었다[1,29]. RhoA는 대부분(90%)이 세포질에 존재하며 자극을 받지 않은 경우에는 Rho GDP-Dissociation Inhibitor (Rho-GDI)에 결합된 상태로 존재하며 자극을 받으면 GTP 결합형인 RhoA(GTP-RhoA)가 되어 Rho-GDI로부터 분리되어 세포막으로 이동하여 작용을 나타낸다[15]. 세포막에 존재하는 Rap1이 PKA에 의하여 인산화되는 것과 비슷하게 세포막에 존재하는 활성형의 RhoA는 PKA에 의하여 인산화가 되고 세포막으로부터 세포질로 떨어져 나온다[18]. 본 연구자들은 호중구에서 cAMP나 PKA가 PLD의 활성화를 억제하는 것은 RhoA를 인산화시키고 세포막으로의 결합을 방해하기 때문이라는 사실을 밝혀내어 보고한 바 있다[16]. PKA 뿐만 아니라, RhoA가 PKG에 의하여 인산화된다는 것이 최근 알려져 있으나 RhoA에 대한 PKG의 생리적인 영향은 거의 알려져 있지 않은 실정이다[23]. 특히, PKG에 의한 RhoA의 인산화가 PLD에 대한 영향이 PKA에 의한 영향과 유사한지는 아직 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 NO에 의한 PLD 활성의 증가가 비록 PKG를 거치지 않고 일어나는 것으로 나타났지만 RhoA가 세포막으로 전이하는 것이 cGMP에 의하여 영향을 받는가를 조사하였다. Fig. 5에서와 같이 RhoA는 fMLP나 PKC의 자극제인 PMA에 의하여 활성화되어 세포질에서 세포막으로의

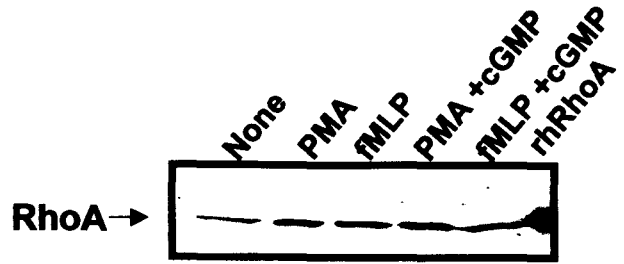


Fig. 5. Effect of cGMP on the translocation of RhoA from cytosol to plasma membrane.

Neutrophils were preincubated for 10 min at 37°C with buffer (None) or 300 μM 8-bromo-cGMP (+cGMP). Cells were then stimulated with 100 nM PMA or 1 μM fMLP for 15 min. Membrane fractions were isolated from mid layer of sucrose gradient (30%/50%) as described in "Materials and Methods". Proteins (15 μg) were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane, and visualized using antibody to RhoA. Recombinant human RhoA (rhRhoA) was used as positive control. Results are representative of two experiments.

전이되는 양이 현저히 증가되었다. cAMP를 처리하였을 때와 유사하게 cGMP를 전처리하였을 때 PMA에 의한 전이는 억제되지 않았으나 fMLP에 의한 전이는 억제되었다. 이와 같은 결과로서 RhoA의 활성화는 cGMP의 증가에 의하여 억제된다는 것을 알 수 있다.

따라서 NO가 호중구에 미치는 영향은 신호전달 인자의 활성화를 증가시키거나 억제하는 두 가지 영향을 동시에 가지는 것으로 제안되고 있지만 본 연구결과로부터 NO는 PLD의 활성화는 증가시키지만 이러한 반응은 PKG 비의존형으로 일어난다는 것을 제시하고 있으며 cGMP는 RhoA의 활성화는 억제하지만 PLD 활성화에는 큰 영향이 없으므로 추측된다.

#### 요 약

Phospholipase D(PLD)는 호중구의 활성화에서 중요한 신호전달 인자로 작용한다. 본 연구에서는 호중구에서 PLD의 활성화에 대한 nitric oxide(NO)와 cGMP의 영향을 조사하였다. 세포 내 NO의 생성을 증가시키는 물질인 sodium nitroprusside (SNP)를 단독으로 처리하였을 때 SNP를 처리하지 않은 세포에 비교하여 PLD 활성화는 0.5 mM 농도에서 2배 이상 증가하였다. 세포 내 cAMP의 농도를

증가시키는 물질인 dibutyryl-cAMP를 처리하였을 때 fMLP에 의한 PLD활성은 억제되었으나 cGMP를 증가시키는 물질인 8-bromo-cGMP(300  $\mu$ M)를 단독으로나 fMLP와 같이 처리하였을 때 PLD의 활성화는 큰 영향이 없었다. NO에 의한 PLD의 활성화는 cGMP-의존형 인산화 효소인 protein kinase G(PKG)의 억제제인 KT 5823에 의하여 억제되지 않았는데 이러한 결과는 PKG 이외의 경로를 통하여 일어남을 제시한다. NO를 처리한 호중구에서 p38 mitogen activated protein kinase(MAPK)가 활성화되어 인산화된 p38 MAPK가 Western blot에서 증가되었다. NO에 의한 p38 MAPK의 인산화는 KT 5823에 의하여 억제되지 않았고 PLD 억제제인 n-butanol에 의하여도 영향을 받지 않았다. PLD 활성화의 인자인 RhoA는 fMLP나 phorbol myristate acetate(PMA)의 자극에 의하여 세포질로부터 세포막으로 전이가 되었으나 cGMP의 전처리에 의하여 fMLP에 의한 RhoA의 전이는 억제되었으나 PMA에 의한 전이는 영향을 받지 않았다. 이들 결과들은 호중구 내 증가된 cGMP가 RhoA를 억제하였으나 세포 내 증가된 NO는 cGMP 이외의 인자를 통하여 PLD의 활성화를 일으킨다는 것을 제시하고 있다.

### 감사의 글

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

### 참고 문헌

1. Bae, C. D., D. S. Min, I. N. Fleming and J. H. Exton. 1998. Determination of interaction sites on the small G protein RhoA for phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **273**, 11596-115604.
2. Barnett, R. L., L. Ruffini, L. Ramsammy, R. Pasmantier, M. M. Friedlaender and E. P. Nord. 1995. cGMP antagonizes angiotensin-mediated phosphatidylcholine hydrolysis and C kinase activation in mesangial cells. *Am. J. Physiol.* **268**, C376-C381.
3. Bechoua, S. and L. W. Daniel. 2001. Phospholipase D is required in the signaling pathway leading to p38 MAPK activation in neutrophil-like HL-60 cells, stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **276**, 31752-31759.
4. Billah, M. M., S. Eckel, T. J. Mullmann, R. W. Egan and M. I. Siegel. 1989. Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diacylglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J. Biol. Chem.* **264**, 17069-17077.
5. Browning, D. D., N. D. Windes and R. D. Ye. 1999. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by lipopolysaccharide in human neutrophils requires nitric oxide-dependent cGMP accumulation. *J. Biol. Chem.* **274**, 537-542.
6. Browning, D. D., M. P. McShane, C. Marty and R. D. Ye. 2000. Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 2811-2816.
7. Chen, C. C., J. K. Wang, W. C. Chen and S. B. Lin. 1998. Protein kinase C eta mediates lipopolysaccharide-induced nitric-oxide synthase expression in primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 19424-19430.
8. Chen, M. C., V. Paez-Espinosa, N. Welsh N and D. L. Eizirik. 2000. Interleukin-1  $\beta$  regulates phospholipase D-1 expression in rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology* **141**, 2822-2828.
9. Cockcroft, S. 1992. G-protein-regulated phospholipase C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**, 135-160.
10. Corriveau, C. C., P. J. Madara, A. L. Van Dervort, M. M. Tropea, R. A. Wesley and R. L. Danner. 1998. Effects of nitric oxide on chemotaxis and endotoxin-induced interleukin-8 production in human neutrophils. *J. Infect. Dis.* **177**, 116-126.
11. Exton, J. H. 1999. Regulation of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* **1439**, 121-133.
12. Francis, S. H. and J. D. Corbin. 1994. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 237-272.
13. Hofmann, F., A. Ammendola and J. Schlossmann. 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* **113**, 1671-1676.
14. Kubes, P., S. Kanwar, X. F. Niu and J. P. Gaboury. 1993. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J.* **7**, 1293-1299.
15. Kwak, J. Y., I. Lopez, D. J. Uhlinger, S. H. Ryu and

- J. D. 1995. Lambeth. Rho A and a cytosolic 50-kDa factor reconstitute GTP  $\gamma$ S-dependent phospholipase D activity in human neutrophil subcellular fractions. *J. Biol. Chem.* **270**, 27093-27098.
16. Kwak, J. Y. and D. J. Uhlinger. 2000. Downregulation of Phospholipase D by Protein Kinase A in a Cell-Free System of Human Neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 305-310.
17. Kwak, J. Y. and D. J. Uhlinger. 2002 Regulation of phospholipase D activity in human neutrophils by RhoA and cAMP-dependent protein kinase, pp 209-218, In Condat, C. and A. Baruzzi A (eds.), *Recent Research Development in Biophysical Chemistry*, Vol. 2, Research Signpost Co., India.
18. Lang, P., F. Gesbert, M. Delespine-Carmagnat, R. Stancou, M. Pouchelet and J. Bertoglio. 1996, Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* **15**, 510-519.
19. Lipton, S. A., Y. B. Choi, Z. H. Pan, S. Z. Lei, H. S. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel and J. S. Stamler. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**, 626-632.
20. Madesh, M. and K. A. Balasubramanian. 1997. Nitric oxide inhibits enterocyte mitochondrial phospholipase D. *FEBS Lett.* **413**, 269-272.
21. Moolenaar, W. H., W. Kruijer, B. C. Tilly, I. Veriaan, A. J. Biermann and S. W. deLaat. 1986. Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature* **323**, 171-173.
22. Roy, B., M. Lepoivre, Y. Henry and M. Fontecave. 1995. Inhibition of ribonucleotide reductase by nitric oxide derived from thionitrites: reversible modifications of both subunits. *Biochemistry* **34**, 5411-5418.
23. Sawada, N., H. Itoh, J. Yamashita, K. Doi, M. Inoue, K. Masatsugu, Y. Fukunaga, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, K. Nakao. 2001. cGMP-Dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 798-805.
24. Tyagi, S. R., S. C. Olson, D. N. Burnham and J. D. Lambeth. 1991. Cyclic AMP-elevating agents block chemoattractant activation of diradylglycerol generation by inhibiting phospholipase D activation. *J. Biol. Chem.* **266**, 3498-3504.
25. Wang, J. P., L. C. Chang, L. J. Huang and S. C. Kuo. 2001. Inhibition of extracellular  $Ca^{2+}$  entry by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase, through a cyclic GMP-independent pathway in rat neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 679-684.
26. Wang, J. P., L. C. Chang, S. L. Raung, M. F. Hsu, L. J. Huang and S. C. Kuo. 2002. Inhibition of superoxide anion generation by YC-1 in rat neutrophils through cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **63**, 577-585.
27. Wanikiat, P., D. F. Woodward and R. A. Armstrong. 1997. Investigation of the role of nitric oxide and cyclic GMP in both the activation and inhibition of human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 1135-1145.
28. Wyatt, T. A., T. M. Lincoln and K. B. Pryzwansky. 1993. Regulation of human neutrophil degranulation by LY-83583 and L-arginine: role of cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol.* **265**, C201-C211.
29. Yamazaki, M., Y. Zhang, H. Watanabe, T. Yokozeki, S. Ohno, K. Kaibuchi, H. Shibata, H. Mukai, Y. Ono, M. A. Frohman and Y. Kanaho. 1997. Interaction of the small G protein RhoA with the C terminus of human phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **274**, 6035-6038.
30. Yu, C.L., M.H. Tsai and D. W. Stacey. 1988. Cellular ras activity and phospholipid metabolism. *Cell* **52**, 63-71.

(Received May 13, 2003; Accepted November 17, 2003)