

□ 원 저 □

## 인체 폐암조직에서 Phospholipase C 동위효소의 발현양상

이주대학교 의과대학 호흡기내과학교실<sup>1</sup>, 해부병리학교실<sup>2</sup>, 의학유전학교실<sup>3</sup>, 이화여대 생물학교실<sup>4</sup>

황성철<sup>1</sup>, 마경애<sup>1</sup>, 최소연<sup>1</sup>, 오윤정<sup>1</sup>, 최영인<sup>1</sup>, 김덕기<sup>1</sup>, 이형노<sup>1</sup>,  
최영화<sup>1</sup>, 박광주<sup>1</sup>, 이이형<sup>1</sup>, 이기범<sup>2</sup>, 하만준<sup>3</sup>, 배윤수<sup>4</sup>

= Abstract =

### Expression of Phospholipase C Isozymes in Human Lung Cancer Tissues

Sung Chul Hwang, M.D.<sup>1</sup>, Kyung Ae Mah, M.D.<sup>1</sup>, So Yeon Choi, M.D.<sup>1</sup>,  
Yoon Jung Oh, M.D.<sup>1</sup>, Young In Choi, M.D.<sup>1</sup>, Deog Ki Kim, M.D.<sup>1</sup>, Hyung Noh Lee, M.D.<sup>1</sup>,  
Young Hwa Choi, M.D.<sup>1</sup>, Kwang Ju Park, M.D.<sup>1</sup>, Yi Hyeong Lee, M.D.<sup>1</sup>,  
Kyi Beom Lee, M.D.<sup>2</sup>, Mahn Joon Ha, Ph. D.<sup>3</sup>, Yoon Su Bae, Ph. D.<sup>4</sup>

*Department of Pulmonary and Critical Care Medicine<sup>1</sup>,*

*Department of Anatomic Pathology<sup>2</sup>, Laboratory of Medical Genetics<sup>3</sup>,*

*Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

*Department of Biological Sciences<sup>4</sup>, Ehwa Womans University, Seoul, Korea*

**Background :** Phospholipase C (PLC) plays an important role in cellular signal transduction and is thought to be critical in cellular growth, differentiation and transformation of certain malignancies. Two second messengers produced from the enzymatic action of PLC are diacylglycerol (DAG) and inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3). These two second messengers are important in down stream signal activation of protein kinase C and intracellular calcium elevation. In addition, functional domains of the PLC isozymes, such as Src homology 2 (SH2) domain, Src homology 3 (SH3) domain, and pleckstrin homology (PH) domain play crucial roles in protein translocation, lipid membrane modification and intracellular membrane trafficking which occur during various mitogenic processes.

We have previously reported the presence of PLC- $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3, and  $\delta$ 1 isozymes in normal human lung

---

Address for correspondence :

Sung Chul Hwang, M.D.

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Ajou University School of Medicine

Paldal-Gu, Woncheon-Dong, San 5, Suwon 442-749, Korea

Phone : 031-219-5123 Fax : 031-219-5124 E-mail : schwang@madang.ajou.ac.kr

tissue and tyrosine-kinase-independent activation of phospholipase C- $\gamma$  isozymes by tau protein and AHNAK. We had also found that the expression of AHNAK protein was markedly increased in various histologic types of lung cancer tissues as compared to the normal lungs.

However, the report concerning expression of various PLC isozymes in lung cancers and other lung diseases is lacking. Therefore, in this study we examined the expression of PLC isozymes in the paired surgical specimens taken from lung cancer patients.

**Methods :** Surgically resected lung cancer tissue samples taken from thirty seven patients and their paired normal control lungs from the same patients, The expression of various PLC isozymes were studied. Western blot analysis of the tissue extracts for the PLC isozymes and immunohistochemistry was performed on typical samples for localization of the isozyme.

**Results :** In 16 of 18 squamous cell carcinomas, the expression of PLC- $\gamma$ 1 was increased. PLC- $\gamma$ 1 was also found to be increased in all of 15 adenocarcinoma patients. In most of the non-small cell lung cancer tissues we had examined, expression of PLC- $\delta$ 1 was decreased. However, the expression of PLC- $\delta$ 1 was markedly increased in 3 adenocarcinomas and 3 squamous carcinomas. Although the numbers were small, in all 4 cases of small cell lung cancer tissues, the expression of PLC- $\delta$ 1 was nearly absent.

**Conclusion :** We found increased expression of PLC- $\gamma$ 1 isozyme in lung cancer tissues. Results of this study, taken together with our earlier findings of AHNAK protein-a putative PLD- $\gamma$ , activator-over-expression, and the changes observed in PLC- $\delta$ 1 in primary human lung cancers may provide a possible insight into the derranged calcium-inositol signaling pathways leading to the lung malignancies. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 49 : 310-322)

---

**Key words :** PLC isozymes, PLC- $\gamma$ 1, PLC- $\delta$ 1, Lung cancer, Carcinogenesis.

---

## 서 론

외부로부터 오는 많은 다양한 종류의 자극들은 세포막에 존재하는 고유의 특이적인 수용체에 결합하여, 세포내에 신호를 전달하고 각각의 신호에 해당하는 고유의 변화를 유발시킨다. 이러한 일련의 과정을 세포내 신호전달(intracellular signal transduction)이라고 하는데, 이러한 신호전달의 결과로, 세포의 성장, 분화, 증식 및 변이 등이 일어 날 수 있으며, 심지어는 세포나 유기체의 움직임이나 감각신호의 전달과정마저도 이러한 과정을 거치는 것으로 알려져 있다<sup>1-7</sup>.

Phospholipase C (PLC)는 이러한 세포내 신호 전달에 관여하는 중요한 효소로 최근들어, 세포의 증식, 세포골격의 재배열(cytoskeletal rearrange-

ment) 및 발암과정 등과 관련하여 주목 받고 있다<sup>1-5</sup>. PLC는 그동안 단지 세포막을 구성하는 성분으로만 이해되고있던 phosphatidyl inositol 4, 5 bisphosphate (PIP2)를 분해하여, 이차전령물질(second messenger)인 diacyl glycerol (DAG)과 inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3)를 생성한다. 이중에서, DAG는 protein kinase C를 활성화 시켜서 세포의 증식을 유도하고, IP3는 세포내의 조면세포체(endoplasmic reticulum) 내의  $Ca^{2+}$ 을 유리시켜 신호전달에 중요한 역할을 한다<sup>1-6</sup>.

포유 동물의 PLC는 현재 까지 10 종류가 알려져 있으며, 이들은 세가지 아형(subtype)으로 구분되는데, PLC- $\beta$ 1-4, PLC- $\gamma$ 1 과  $\gamma$ 2, 그리고 PLC- $\delta$ 1-4가 그것이다. 이 중에서 PLC  $\beta$ 동위효소는 주로 세

포막에 존재하고, 현재까지 4개의 동위 효소가 알려져 있으며, heterotrimeric G-protein에 의해 활성화된다. PLC- $\beta$  아형은 주로 호르몬이나, 신경전달물질, 혈소판의 응고, 간장에서의 epidermal growth factor (EGF) 신호전달에 관여 한다<sup>2,4,8,9</sup>. 저자 등이 관찰한 바로는 정상인의 폐에서는 PLC- $\beta$ 1과  $\beta$ 3가 존재하고 있다<sup>10</sup>.

PLC- $\gamma$ 1과 - $\gamma$ 2는 자극받지 않은 상태의 세포에서는 주로 세포질내에 존재하지만 활성화 되면 인산화되어 세포골격(cytoskeleton)으로 이동한다고 하며<sup>11,12</sup>, 2개의 SH2와 한 개의 SH3 domain을 갖고 있다<sup>8,9</sup>.  $\gamma$ 아형의 PLC 동위효소는 주로 성장인자 수용체의 tyrosine kinase에 의해 활성화 되는것으로만 알려져 왔으나<sup>8,9</sup>, 최근들어, 저자 등은 이외에도, PLC- $\gamma$  아형이, arachidonic acid 존재 하에 tau 단백질이나<sup>13</sup>, AHNAK 단백질에 의해 활성화 되는 것을 보고 하였다<sup>14</sup>. 특히 PLC- $\gamma$ 1 아형은 여러 종류의 성장인자에 의해 활성화 된다는 특성 때문에, 그동안 유방암<sup>15</sup>, 대장암<sup>16</sup>, 위암<sup>17</sup>등에서, 가장 먼저 연구의 대상이 되었으며, 이미 이들 암종에서 발현이 증가되어 있음이 확인되었고, 이들의 암종의 암성변이에 관여할것으로 추정된다<sup>6,7</sup>.

PLC- $\delta$  아형의 경우는 분자량이 85 kda 정도로 세가지 아형중에서 가장 작으며, 세포질내에 존재하고, Ca<sup>2+</sup>binding (C2) domain과 pleckstrin homology (PH) domain 을 통해 Ca<sup>2+</sup> 및 PIP<sub>2</sub>와 결합하는 것으로 알려져 있으나, 아직 그 활성화 단백질에 대한 것은 알려 지지 않고 있으며 질병과의 연관성에 대한 보고도 미미한 수준이다<sup>8,9</sup>.

이 연구에 앞서, 이미 저자 등은 수술로 적출된 정상 인체 폐조직에서, PLC-  $\beta$ 1, - $\beta$ 3, - $\gamma$ 1, 및 - $\delta$ 1 동위효소가 존재함을 보고 하였으며<sup>10</sup>, PLC- $\gamma$  아형이 성장인자 수용체에 있는 receptor tyrosine kinase나, 세포질내의 비수용체(non-receptor) tyrosine kinase에 의해서 뿐만아니라, 신경조직(neuronal tissue)에서는 tau 단백질이나<sup>13</sup>, 비 신경조직(non-neuronal tissue)에서는 AHNAK 단백질에 의해 활성

화 됨을 최근 보고하였고<sup>14</sup>, 인체 폐암조직에서 AHNAK 단백질의 발현이 증가해 있음을 보고한 바 있다<sup>18</sup>.

하지만 인체 폐암조직을 대상으로 PLC 동위 효소의 발현을 관찰한 연구는 없었으므로, 이에 저자 등은 인체 폐암조직에서 PLC 동위 효소의 발현을 immunoblot을 통해 연구하였으며, 동일조직의 대표적인 증례를 면역조직화학 염색을 통해 조직내 분포를 확인하고자 하였다.

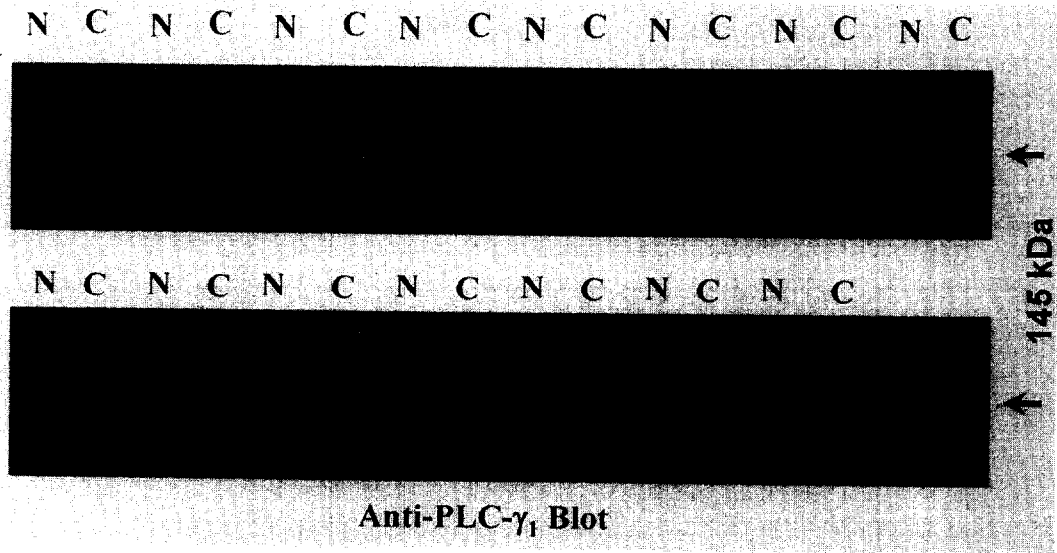
## 대상 및 방법

### 1. 대상 선정 및 폐암조직과 정상조직 확보

본 연구는 1994년 6월부터 1997년 2월까지 아주대학교 병원에 입원하여 폐암으로 폐전절제술(pneumonectomy)이나 폐엽절제술(lobectomy)을 받았던 환자중 포르말린으로 고정하기 이전의 신선냉동조직의 확보가 가능하였던 37예를 대상으로 하였다. 조직학적 유형을 보면 편평세포암이 18예, 선암이 15예로 비 소세포암이 33예이었으며, 소세포 폐암이었던 경우가 4예 있었다. 조직의 채취는 수술시 적출된 폐에서, 육안적으로 보아 괴사가 없는 부위의 폐암 조직과, 종괴에서 충분히 떨어져있는 동일 환자의 정상 폐조직을 쌍으로 취하였으며, liquid nitrogen tank에 바로넣고, 섭씨 -70°에 냉동시켜 보관하였고, 이들 조직은 추후 hematoxyline/eosin 염색상에서 폐암조직과 정상조직임을 확인 하였다.

### 2. 단백질 추출 및 정량

신선, 냉동보관된 조직을 10 mM Tris(pH 7.4), 1 % Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM dithiothreitol (DTT), 2  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 4  $\mu$ g/ml calpain inhibitor I & II 로 구성된 조직 파쇄 완충액(homogenization buffer)에서 해동시켰



**Fig. 1. Increased expression of phospholipase C- $\gamma_1$  in adenocarcinoma of the lung.**

Total tissue extracts from adenocarcinoma of the lung (15 paired samples) were subjected to 6% SDS-PAGE. Each lane had received 70  $\mu$ g of protein. Samples were blotted with anti-PLC- $\gamma_1$  monoclonal antibody and visualized with alkaline phosphatase-labelled rabbit anti-mouse IgG antibody. (N ; Normal tissue, C ; Cancer tissue).

다. 이어서 Polytron homogenizer로 분쇄후 glass homogenizer의 teflon coated pestle을 이용하여 충분히 파쇄하였으며, 세포막 속의 PLC를 추출하기 위하여, homogenate를 섭씨 4도에서 2시간 동안 흔들어 주어, 세포질과 세포막 내의 PLC 추출액을 얻었다. 추출액을 10,000 g 에서 30분간 원심분리 후 상층액을 취하였으며, Bradford 단백정량시약을 이용하여, 각 표본의 단백질 농도를 정량하였다.

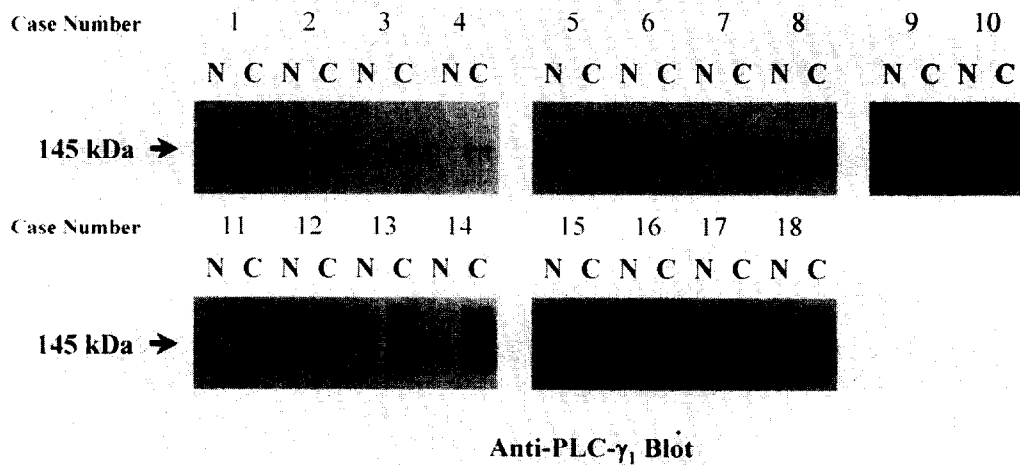
### 3. PLC 등위 효소의 Western blot 분석

상기 방법으로 준비한 표본을 2×Laemmli's sample buffer와 혼합하여, 섭씨 90도에서 3분간 가열하였으며, 각각의 lane 당 80  $\mu$ g을 넣고 6% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동한 후, nitrocellulose membrane에 이동시켰다. 이후 2% bovine serum albumin으로 30분간 차단하였고, PLC  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma_1$ , 및  $\delta_1$ 에 대한 단일클론 항체<sup>19</sup>(Lab. of Cell Signaling, NHLBI, Bethesda, MD)를 일차 항체로 실온에

서 6시간 처리 하였다. 이후 Tween Tris Buffer (TTBS)용액으로 3차례이상 세척한 후에, alkaline phosphatase label 된 rabbit anti-mouse IgG 이차 항체로 2시간 반응시켜, 발색된 면역반응대(immunoreactive bands)를 관찰하였다.

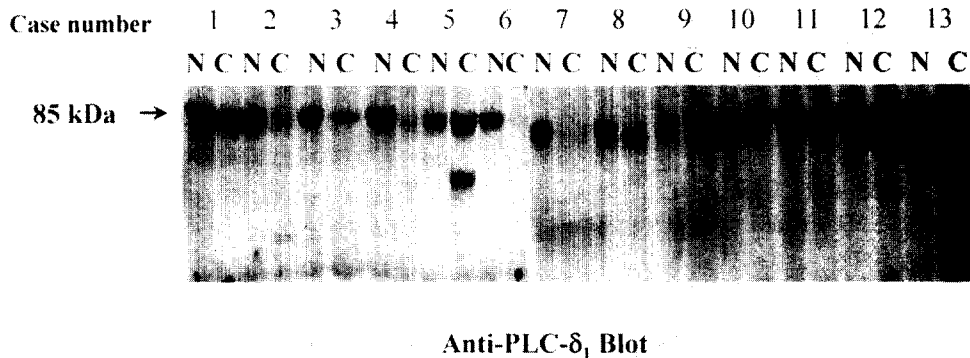
### 4. 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색은 파라핀으로 고정된 폐암조직의 조직절편을 이용하여 시행하였다. Western 분석에서 발현의 증가를 보였던 PLC- $\gamma_1$ 의 단일클론항체를 일차항체로 사용하였다. 우선 파라핀을 제거한후에 10% 정상 goat 혈청으로 차단하여, 비특이적인 흡착이 없도록 만들었다. 4시간동안 anti-PLC- $\gamma_1$  monoclonal antibody로 incubation한 후, phosphate buffered saline으로 3회 세척 하였고, SLAB kit (Dako, Denmark)의 avidin-biotin reagent로 incubation 하였다. 발색은 DAB로 하였고, hematoxylin-eosin으로 counter stain 하였다.



**Fig. 2. Increased expression of phospholipase C- $\gamma_1$  in squamous carcinoma of the lung.**

Total tissue extracts from squamous carcinoma of the lung (18 paired samples) were subjected to 6% SDS-PAGE. Each lane had received 35  $\mu$ g of protein. Samples were blotted with anti-PLC- $\gamma_1$  monoclonal antibody and visualized with alkaline phosphatase-labelled rabbit anti-mouse IgG antibody. (N ; Normal tissue, C ; Cancer tissue).



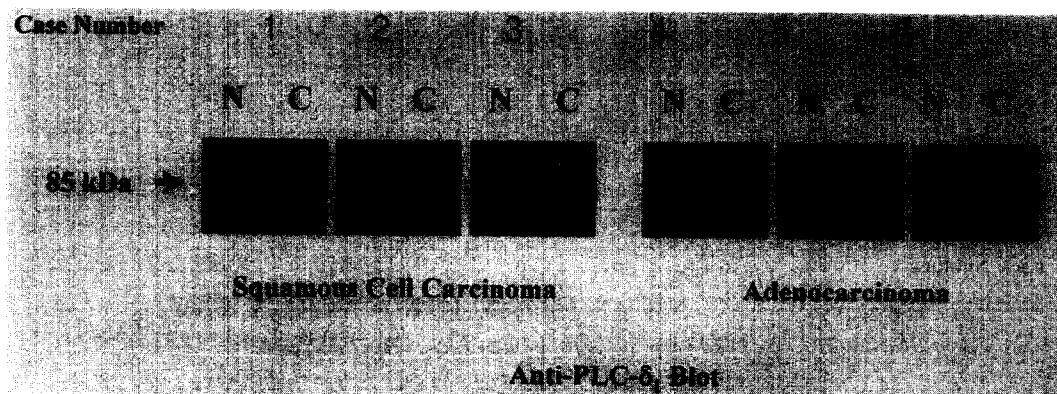
**Fig. 3. Decreased expression of PLC- $\delta_1$  in adenocarcinoma of the lung.**

Thirteen pairs of adenocarcinoma samples were subjected to 6% SDS-PAGE. Each lane had received 70  $\mu$ g of protein. Samples were blotted with monoclonal anti-PLC- $\delta_1$  antibody and visualized with alkaline phosphatase labelled rabbit anti-mouse IgG antibody. N ; Normal tissue, C ; Cancer tissue.

## 결 과

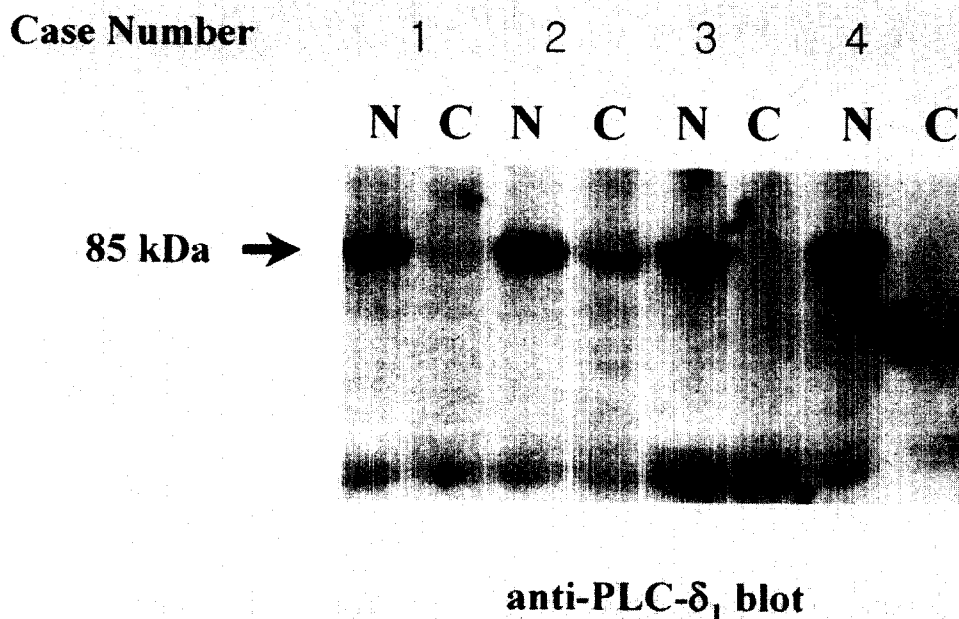
총 37 예의 환자의 조직표본에서 각각의 PLC 동위

효소에 대한 분석이 가능하였다. 이를 조직학적으로 살펴보면, 편평상피세포암 18예, 선암 15예, 소세포 폐암 4예 등이었다. 이들중 15예의 선암모두와(Fig. 1),



**Fig. 4.** Selected cases of squamous and adenocarcinoma which showed a markedly increased expression of PLC- $\delta_1$  Isozyme.

Unlike in other samples we had studied, in three cases each of squamous and adenocarcinomas, expression of PLC- $\delta_1$  was markedly increased. 6% SDS-PAGE, N ; Normal tissue, C ; Cancer tissue.



**Fig. 5.** PLC- $\delta_1$  expression in small cell lung cancer.

In 4 cases of small cell lung cancer tissue we had studied, PLC- $\delta_1$  expression was markedly reduced compared to their paired normal. N ; Normal tissue, C ; Cancer tissue.

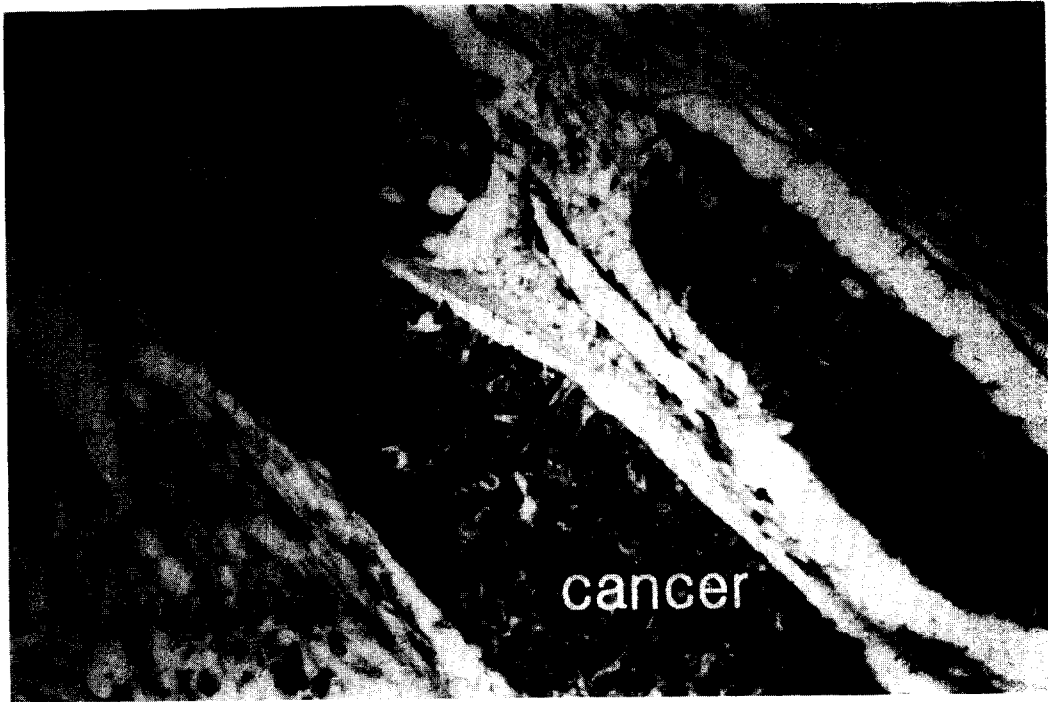


Fig. 6. Immunohistochemistry of squamous cell carcinoma using monoclonal anti-PLC- $\gamma$ 1 antibody.

Immunohistochemical staining of the squamous carcinoma tissue with monoclonal anti-PLC- $\gamma$ 1 antibody shows an intense staining of the cancer tissue (marked Cancer) as compared to its surrounding normal lung (marked Normal)  $\times 200$ .

18예중 16예의 편평상피세포암조직(Fig. 2)에서, PLC- $\gamma$ 1의 발현이 현저히 증가 되어 있었다.

PLC- $\beta$ 1과  $\beta$ 3 동위 효소의 경우는 폐암조직이나, 정상조직에서 발현의 차이를 관찰할수 없었으며(data not shown), PLC- $\delta$ 1 isozyme의 경우는 대부분의 경우 발현이 감소한 경향을 보였다(Fig. 3). 하지만 일부 선암조직 및 편평상피암조직에서는(각각 3예) PLC- $\delta$ 1이 현저히 증가 된것이 관찰되기도 했다(Fig. 4). 비록 그 증례의 수가 적기는 하였으나, 소 세포폐암 4예에서는 4예 모두에서 PLC- $\delta$ 1의 발현이 현저히 감소되어 있었다(Fig. 5).

PLC- $\gamma$ 1의 면역조직화학검사 소견에서는 폐암조직 절편의 폐암세포 내에서 강한 발색반응을 보여, Western blot에서 증가한 PLC- $\gamma$ 1의 양은 폐암세포

에서 기인한 것임을 확인하였다(Fig. 6).

## 고 찰

세포내에 신호를 전달하는 각종 성장인자, 호르몬이나, 신경전달물질 등은 각기 세포 표면에 존재하는 각자의 특이 수용체와 결합한후, 세포내의 변화를 유도하는 과정을 거치게 된다<sup>1-5</sup>

이와같은 일련의 세포내 신호전달을 구성하는 중요한 인자들이 바로 phospholipases들 인데 이들은 외부의 자극에따라, 세포막을 구성하고 있는 다양한 종류의 phospholipid를 분해하여, 신호를 증폭하는 이차 전령물질을 생성한다. 이들은 각각이 phospholipid의 ester 결합중 어느곳에 작용하는가에 따라

phospholipase A2, Phospholipase C, 그리고 Phospholipase D 등으로 구분되어 진다<sup>2, 8, 9</sup>.

이중에서 phospholipase C는 세포막의 PIP<sub>2</sub>를 분해하여, DAG와 IP<sub>3</sub>를 만드는 효소이다. 이때 생성된 DAG는 protein kinase C에 대해 강력한 활성화 효과를 보이고, IP<sub>3</sub>는 세포질내의 유리 칼슘의 농도를 증가 시켜서, 다음단계로 신호가 확산되는데 기여한다. 따라서 PLC는 세포내 신호전달에 중추적인 역할을 담당하고 있으며, PLC가 갖고있는 여러 종류의 protein-protein interaction domain들은 이러한 PLC 동위 효소의 다양한 세포 내에서의 기능을 대변해주고 있다<sup>1-5, 8, 9</sup>.

현재 다양한 종류의 PLC 동위효소가 알려져있는데 PLC는 아미노산 서열 및 면역화적인 특성에 따라,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ 의 세 가지 아형으로 분류된다. 현재 까지 포유류에서 분리, 정제, 클론된 PLC 동위 효소는 모두 10 종류이며,  $\beta$ 형이 4종류(PLC- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 및 - $\beta$ 4),  $\gamma$ 형 2종류(PLC- $\gamma$ 1, - $\gamma$ 2)와  $\delta$ 형 4종류(PLC- $\delta$ 1, - $\delta$ 2, - $\delta$ 3 및 - $\delta$ 4) 이다<sup>2, 4, 8, 9</sup>.

이들중에서 PLC- $\gamma$ 아형의 경우는 특이 하게도 효소의 중앙 부위에 2개의 src oncogene 유사영역(Src Homology domain 2 or SH2 domain)과 한 개의 SH3 domain을 갖고 있다. SH2 domain의 경우는 phosphotyrosine과 결합하는 영역이고, SH3 domain은 세포골격을 구성하는 단백질의 proline-rich sequences에 결합하는 것으로 알려져 있어 세포가 분열하고, 변형, 이동, 또는 전이하는데 중요한 역할을 하는 영역으로 알려져 있다<sup>23-26</sup>. 다시말해서, PLC- $\gamma$ 1의 SH2 domain은 세포의 성장인자 수용체가 활성화 되었을 때 phosphotyrosine residue와 결합하고, PLC- $\gamma$ 1의 다른 한 끝인 SH3 domain은 세포골격을 구성하는 dynamin<sup>27, 28</sup>, tau<sup>13</sup>, AHNAK<sup>14</sup> 등의 단백질과 결합해서, PLC- $\gamma$  효소가 활성화 되고 actin cytoskeleton으로 이동하여 세포의 변형, 세포 분열, 세포이동을 돕는 역할을 한다<sup>11, 12, 27, 28</sup>. 또한 PLC- $\gamma$ 1의 구조 중에서 phosphatidyl inositol과 결합하는 것으로 밝혀진 PH domain<sup>21-23</sup>은 이들 효소

를 세포막 쪽으로 이동시켜서, 매우 다양한 기능을 하는 단백질인, phosphatidyl inositol-3 kinase (PI3K)나, atypical PKC (eg. PKC- $\delta$ )등과 co-localization 하도록 만듦으로 해서 종양세포에서 볼수 있는 여러 가지 변화를 가능하게 만든다<sup>29</sup>.

본 연구에서는 편평상피 세포암과 선암 모두에서 PLC- $\gamma$ 1의 증가가 관찰 되었는데, PLC- $\gamma$ 1의 경우 일부 장기에만 선택적으로 존재하는, 다른 PLC 동위 효소 들과는 달리 광범위한 대부분의 세포내에 존재하며<sup>9</sup>, 많은 성장촉진인자 수용체의 receptor tyrosine kinase나, 세포내 발암 전구인자(cellular proto-oncogene)에 의해서 인산화되어 translocation 하는 등, 세포의 성장, 증식, 발암과정 등 과 밀접한 관계가 있기 때문에 사료된다<sup>30, 31</sup>.

특히 이러한 결과는 유방암<sup>15</sup>, 대장암<sup>16</sup>과 대장암 전구단계인 Gardner 씨 증후군의 대장용종증(colonic polyposis in Gardner's syndrome)에서, PLC- $\gamma$ 1의 과발현을 보고했었던, 이전의 연구와도 일치하는 내용이며<sup>32</sup>, 양성 질환인 피부의 과각화증(hyperkeratosis of the skin)에서, PLC- $\gamma$ 1의 발현증가를 관찰한 것과도 동일한 소견이다<sup>33</sup>.

이전의 보고에 따르면, 이러한 암조직 내에서의 PLC- $\gamma$ 1의 증가를, 처음에는 단순히 과발현으로 생각 하였으나, 최근 들어 대장암에서 연구된 바로는, 이러한 현상을 PLC- $\gamma$ 1 유전자의 promotor region의 이상으로 설명하고 있다<sup>34</sup>. 저자 등도 이미 90%가 넘는 위암 환자 조직에서 PLC- $\gamma$ 1의 과발현을 보고한바 있으며<sup>17</sup>, 중이 상피세포의 과증식 질환인 중이 진주종에서 EGF 수용체 와 PLC- $\gamma$ 1, 그리고 PI3 kinase가 증가 되었음을 보고한 바 있어<sup>35, 36</sup>, PLC- $\gamma$ 1의 과발현과 세포의 증식 및 암성변이 사이에는 어떤 상관관계가 있음을 추측하게 된다. 물론 PLC- $\gamma$ 1 효소의 단순한 과발현 만으로 폐암의 발암과정을 모두 체계적으로 설명하기는 어려우나, 본 연구에 앞서서, 저자들은 PLC- $\gamma$ 1의 활성화 단백질인 AHNAK 단백질이 폐암조직내에서 과발현 되어있음을 관찰한바 있으며, 같은 폐암조직 내에서 PLC- $\gamma$ 1 효소와 그를 활



성화시킬수 있는, AHNAK 단백질이 동시에 증가되어 있음은 유의할만 하다고 하겠다.

특히 AHNAK 단백질의 경우 phospholipase A2의 신호에 의해 phosphatidyl-choline이 분해되어 생성되는 arachidonic acid 존재 하에서 PLC- $\gamma$ 1과 PLC- $\gamma$ 2 동위효소를 활성화시키게 되는데,이런점은 바로, AHNAK 단백질이나, tau 단백질, PLC와 PLA2 사이의 "cross talk" 및 신호의 증폭에 관여할것으로 생각되게 하는 점이다<sup>13,14</sup>. 또한 AHNAK 단백질의 경우 그 proline-rich sequence 를 통하여, PLC- $\gamma$ 1 이나 PKC를 비롯한 많은 종류의 신호전달 단백질 들과 결합하는 것으로 알려져 있다<sup>14</sup>.

최근 AHNAK 단백질의 경우, 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주에서, AHNAK 단백질의 tandem repeat motif에 point mutation이 발견되기도 하였는데, 이런 tandem repeat motif의 기능을 연구하기 위해, yeast two-hybrid system에서 연구한 바로는 scaffolding 단백질인 AHNAK이 TGF- $\beta$  신호전달체계 하방의 SMAD나, PKC, 또는 monomeric G-protein 중의 하나인 RACK 단백 등과 상호작용하는 부위일 것으로 사료된다(배운수 et al.; 미 발표자료).

이상의 결과로 폐암에서의 PLC- $\gamma$ 1과 AHNAK 단백질의 동시 증가가 갖는 의미를 추론해 보면, 여러 종류의 증식 신호는 각종의 성장인자 수용체를 통해 세포내에 과발현 되어있는 PLC- $\gamma$ 1 효소의 인산화를 유도하고<sup>12,30</sup>, 활성화된 PLC- $\gamma$ 1은 SH3 domain을 통해서 함께 과발현되어있는 AHNAK 이라는 scaffolding 단백을 통해 cytoskeleton에 결합하게 된다<sup>14</sup>. 이때 PLC는 자신의 PH domain을 이용하여, inositol lipid가 풍부한 세포막 쪽으로 이동하게 되는데, 이 부위에 co-localization 되어있는 PKC 또는 PI3 kinase 등과 함께 작용하여 암성변이에 관여할것으로 추정된다. 이들 PLC, PKC, PI3kinase의 신호 전달체계 하방에는 protein kinase B (Akt), Rho, Rac 등이있어 이들을 자극하면 세포의 증식이나 암성변이를 유발하는 것이 아닌가 사료된다<sup>29,40</sup>. 또한,

PLC의 활성 증가로인한 국소적인 PIP<sub>2</sub>의 감소는 세포막과 cytoskeleton 사이의 "tether force"의 감소를 가져와서, 세포의 형태학적인 변화(morphologic change)나 세포의 이동(migration or motility) 등을 유발할 수 있을 것으로 생각된다<sup>41</sup>.

PLC- $\delta$ 1의 경우 high molecular weight G-protein이 그 활성인자로 사료되기는 하지만<sup>42,43</sup>, 아직까지 질병발생과정에서 PLC- $\delta$ 1 동위효소가 하는 역할은 뚜렷하지 않다. PLC- $\delta$ 1은 85 kda의 비교적 작은 분자량을 갖고 있는 PLC 효소의 아주 기본 형태로, 주로 세포질 내에 존재 하지만, PH domain을 이용해서, 세포막으로 재분포(localization)되는 것으로 알려져 있다<sup>41,45</sup>. Ca<sup>2+</sup> 이온과 결합하는 C2 domain을 가지고 있으며, 유리 Ca<sup>++</sup> 농도에 따라 그 활성이 2-3 log scale 증가 하기 때문에 세포내 Ca<sup>++</sup> 증가에 따라, 신호를 증폭시키는 역할을 할것으로 추측하고 있다<sup>43,44</sup>.

본 연구에서는 소세포 폐암조직 전부와 많은수의 비소세포 폐암에서 병소내의 PLC- $\delta$ 1 발현이 감소 하였는데, 이러한 현상을 설명하기에는 현재까지 알려진 자료로는 설명하기가 부족하며, 추후 더 많은 연구를 통해 PLC- $\delta$ 계 동위효소들의 구체적인 기능들이 밝혀진다면 폐암이나, paraneoplastic syndrome 등과의 연관성이 명확해질 것으로 사료된다.

## 요 약

### 배 경 :

Phospholipase C는 세포내 신호 전달과정의 초기 단계에 있어서, 매우 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있으며, 세포막에 존재하는 인지질 가운데 중요한 부분을 차지하는 PIP<sub>2</sub>를 분해하여 제2전령물질인 DAG와 IP3를 생성한다. 이들 제2전령물질은 각각 PKC를 활성화시키고, 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시켜서 세포내 여러 단백질 효소들을 활성화시키는 동시에, PLC 효소는 자체적으로 갖고 있는 고유의 SH2, SH3 및 PH domains 등의 기능 영역을 통해, 다른

신호 전달 인자들과 상호 작용하고, 세포막의 재구성이나, 세포분열, 발암과정에 관여 하게 된다.

이에 저자 등은 이전의 연구에서, 인체 정상 폐조직에서 PLC- $\beta 1$ , - $\beta 3$ , - $\gamma 1$  및 - $\delta 1$  동위효소가 존재함을 보고하였으며, bovine lung 내에서 PLC- $\gamma 1$  동위효소를 활성화 시키는 AHNAK 단백을 분리, 정제 및 클로닝 하였고, 이 AHNAK 단백질이 인체 폐암조직내에서 정상조직에 비해 증가 되어 있음을 보고하여, 폐암의 발암과정에 있어서 칼슘-inositol 신호전달체계의 이상이 연관 되어있음을 제시하였다.

하지만 아직 인체 폐암조직이나 다른 종류의 폐질환에 대해서는, PLC 동위효소의 발현양상에 대한 보고가 없었으므로, 이에 저자 등은 수술로 적출한 인체 폐암 조직 내에서 PLC 동위 효소의 발현을 연구하여, 폐암의 발암과정에서 이들 효소가 갖는 역할을 규명하고자 하였다.

#### 대상 및 방법 :

아주 대학교 병원에 내원하여 원발성 폐암으로 수술적 절제술을 받은 환자중에서, 신선냉동상태의 암조직과 동일환자의 정상폐조직이 확보가, 가능했던 37예의 환자를 대상으로 하였다. 이들조직을 대상으로 PLC- $\beta 1$ , - $\beta 3$ , - $\gamma 1$  및 - $\delta 1$  동위효소에 대해 Western blot 분석을 시행하였고, 대표적인 표본에 대해서는 PLC- $\gamma 1$ 에 대한 면역조직화학검사를 시행하였다.

#### 결 과 :

연구의 대상이었던 15예의 선암조직 모두에서, PLC- $\gamma 1$  동위효소의 과발현을 관찰할 수 있었으며, 편평상피세포암 18예 중 16예에서 PLC- $\gamma 1$ 의 발현이 정상조직에 비해 증가하였음이 확인되었다. PLC- $\delta 1$  동위효소의 경우, 대부분의 폐암조직에서 감소되어 있었다. 하지만 이와는 반대로, 일부 선암 및 편평상피암 조직(각3예)에서는, 현저한 증가를 보이기도 했다. 또한, 비록 그 증례수가 적기는 하였지만, 소세포 폐암 4예에서는, 모두에서 정상 폐조직보다, PLC- $\delta 1$  효소의 발현이 현저히 감소되어 있음을 관찰하였다.

#### 결 론 :

이상의 결과로 미루어 폐암 조직 내에서 PLC- $\gamma 1$  동

위효소의 발현이 증가되어 있었는데, 이는 저자 등이, 이미 보고한바 있는, PLC- $\gamma 1$ 의 활성화 단백질 AHNAK의 과발현과 함께, 폐암의 발암과정에, 칼슘-inositol 신호전달 체계의 이상이 관여할것이라는 실험적인 증거가 될수 있다고 하겠다. 하지만, PLC- $\delta 1$  동위효소의 감소에 대해서는, 좀더 구체적인 기전의 규명 및 PLC- $\delta 1$  효소의 역할에 대한 보다 많은 연구가 필요할것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol, two interacting second messengers. *Ann Rev Biochem* 1987;56:159-93.
2. Rhee SG, Choi KD. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 1992;267:12393-96.
3. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984;312:315-21.
4. Cockcroft S, Thomas GMH. Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors. *Biochem J* 1992;288:1-14.
5. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 1986;233:305-12.
6. Chang JS, Noh DY, Park IA, Kim MJ, Song H, Ryu SH, Suh PG. Overexpression of phospholipase C- $\gamma 1$  in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation. *Cancer Res* 1997;57:5465-68.
7. Smith MR, Court DW, Kim HK, Park Jb, Rhee SG, Rhim JS, Kung HF. Overexpression of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\gamma 1$  In NIH 3T3 cells promotes transformation and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 1998;19:177-85.
8. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY. Studies of

- inositol-specific phospholipase C. *Science* 1989; 244:546-50.
9. Rhee SG, Choi KD. Multiple forms of phospholipase C and their activation mechanisms. *Adv Second Messenger and Phosphoprotein Res* 1992;26:35-61.
10. Hwang SC, Park KH, Ha MJ, Noh IS, Park TB, Lee YH. Distribution of phospholipase C isozymes in normal human lung tissue and their immunohistochemical localization. *J Korean Med Sci* 1996;11:305-13.
11. McBride K, Rhee SG and Jaken S: Immunocytochemical localization of phospholipase C- $\gamma$  in rat embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7111-15.
12. Yang L, Rhee SG and Williamson JR. Epidermal growth factor induced activation and translocation of phospholipase C- $\gamma$ 1 to the cytoskeleton in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1994;269:7156-62.
13. Hwang SC, Shon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG. Activation of phospholipase C- $\gamma$  by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 1996;271:18432-49.
14. Sekiya F, Bae YS, Jhom DY, Hwang SC, Rhee SG. AHNAK, a protein that binds and activates phospholipase C- $\gamma$ 1 in the presence of arachidonic acid. *J Biol Chem* 1999;274:13900-7.
15. Arteaga CL, Johnson MD, Todderud G, Coffey RJ, Carpenter G, Page DL. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- $\gamma$ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10435-9.
16. Noh DY, Lee YG, Kim SS, Kim YI, Rhy SH, Suh PG, Park JG. Elevated content of PLC- $\gamma$ 1 in colorectal cancer tissues. *Cancer* 1994;73:36-41.
17. Hwang SC, Ha MJ, Park KW, Joo HJ, Cho YK. Increased expression of phospholipase C- $\gamma$ 1 in human gastric cancer tissues. *Ajou Medical Journal* 1996;1:68-75.
18. 오윤정, 박준성, 최소연, 정성철, 이선민, 황성철, 이이형, 한명호, 이기범, 류한영, 배운수, 이서구. 인체 폐암조직에서 Phospholipase C- $\gamma$ 1의 활성화 단백질, AHNAK의 발현 양상. 결핵 및 호흡기 질환 1999;47:347-55.
19. Suh PG, Ryu SH, Choi WC, Lee KY, Rhee SG: Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. *J Biol Chem* 1988; 263:14477-504.
20. Haslam RT, Kolde HB, Hemmings BA: Pleckstrin domain homology. *Nature* 1993;363: 309-10.
21. Parker PJ, Hemmings BA, Gierschik: PH domain and phospholipase C-a meaningful relationship? *Trends Biochem Sci* 1994;19:54-55.
22. Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 1994;19:349-53.
23. Stahl ML, Ferenz CR, Kelleher KL, Kriz RW, Knopf JL. Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature* 1988;332:269-72.
24. Suh PG, Ryu SH, Moo KH, Suh HW, Rhee SG. Inositol phospholipid-specific phospholipase C: Complete cDNA and protein sequences and sequence homology to tyrosine kinase-related oncogene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5419-23.
25. Pawson T, Gish GD. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 1992;71:359-62.
26. Williamson HP. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 1994; 297:249-60.
27. Bar-Sagi D, rotin D, Batzer A, Mandiyan V, Schlessinger J. SH3 domains direct cellular locali-

- zation of signaling molecules. *Cell* 1993;74:83-91.
28. Seedorf K, Kostka G, Lammers R, Bashkin P, Daly R, Burgess W, van der Bliek AM, Schlesinger J, Ullrich A. Dynamin binds to SH3 domains of phospholipase C- $\gamma$ 1 and GRB-2. *J Biol Chem* 1994;269:16009-14.
29. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333:471-90.
30. Kim HK, Kim JW, Ziberstein A, Margolis B, Kim JG, Schlessinger J, Rhee SG. PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- $\gamma$ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 1991;65:435-41.
31. Liao F, Shin HS and Rhee SG. Cross-linking of Fc $\gamma$ RIIIA on natural killer cells results in tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1 and phospholipase C- $\gamma$ 2. *J Immunol* 1993;150:2668-2674.
32. Homma MK, Homma Y, Namba M, Yuasa Y. Enhanced phosphoinositides metabolism in colorectal carcinoma cell derived from familial adenomatous polyposis patients. *J Cell Biochem* 1994;55:477-85.
33. Nanney LB, Gates R, Todderud G, King LE, Carpenter G. Altered distribution of phospholipase C- $\gamma$ 1 in benign hyperproliferative epidermal disease. *Cell Growth Diff* 1992;3:233-9.
34. Lee SJ, Lee SD, Park JG, Kim CM, Rhu SH, Suh PG. Overexpression of phospholipase C- $\gamma$ 1 in colorectal carcinomas is associated with overexpression of factors that bind its promoter. *J Bio Chem* 1995;270:16378-84.
35. 전영명, 박기현, 이동훈, 황성철. 중이 진주종에서 PLC- $\gamma$ 1의 발현. *대한이비인후과학회지* 1997; 40:984-89.
36. Park KH, Chun YM, Lee DH, Hwang SC. Signal transduction pathway in human middle ear cholesteatoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 1999;120:899-904.
37. Hashimoto T, Amagai M, Parry DA, Dixon TW, Tsukita S, Miki K. Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK. *J Cell Science* 1993;105: 275-86.
38. Shtivelman E, Cohen FE, Bishop JM. A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2 microns polyionic rod structure. *Proc Natl Acad USA* 1992;89:5472-76.
39. Kudoh J, Wang Y, Minoshima S, Hashimoto T, Amagai M, Nishikawa TI. Localization of the human AHNAK/desmoyokin gene (AHNAK) to chromosome band 11q12 by somatic cell hybrid analysis and fluorescence in hybridization. *Cytogenetics & Cell Genetics* 1995;70:218-20.
40. Fukui Y, Ihara S, Nagata S. Downstream of phosphatidylinositol-3 kinase, a multi functional signaling molecule, and its regulation in cell response. *J Biochem* 1998;124:1-7.
41. Raucher D, Stauffer T, Chen W, Shen K, Guo S, York JD, Sheetz MP, Meyer T. Phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* 2000;100:221-8.
42. Zhang J, Tucholski J, Jope RS, Johnson GV. Novel bimodal effects of the G-protein tissue transglutaminase on adrenoreceptor signaling. *Biochemical J* 1999;343:541-9.
43. Singer WD, Brown HA, Sternweis PC. Regulation of eukaryotic phospholipase C and phospholipase D. *Ann Rev Biochem* 1997;66:475-509.
44. Perisic O, Fong S, Lynch DE, Bycroft M, Wil-

- liams RL. Crystal Structure of a calcium binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 1998;273:1596-604.
45. Shimohama S, Kamiya S, Fujii M, Ogawa T, Kanamiri M, Kawamata J, Imura T, Taniguchi T, Yagisawa H. Mutation in the pleckstrin homology domain of the human phospholipase C- $\delta$ 1 gene is associated with loss of function. *Biochem Biophys Res Comm* 1998;245:722-8.
-