

초대배양한 신장 근위세뇨관세포에서 estradiol-17 β 와 IGF-I 수용체 발현과의 상관관계

한호재 · 남성안 · 박권무

전남대학교 수의과대학, 호르몬연구센터
(1997년 3월 25일 접수)

Relationship between estradiol-17 β and IGF-I receptor expression in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells

Ho-jae Han, Seong-ahn Nam, Kwon-moo Park

College of Veterinary Medicine, Hormone Research Center, Chonnam National University
(Received Mar 25, 1997)

Abstract : The mechanisms of estradiol-17 β regulating growth of both normal and neoplastic cells are not clear until now. In studies using various estrogen-dependent breast cell lines, it is recently known that estrogen controls the cell growth by regulating the expression of growth factors and/or their receptors. In the present study, we investigated the effects of estradiol-17 β on cell growth and IGF-I binding sites using primary cultured renal proximal tubule cells. We have obtained results as follows :

Estradiol-17 β (10⁻⁹M) has stimulatory effects in cell growth. Cotreatment of estradiol-17 β (10⁻⁹M) and IGF-I(5 × 10⁻⁸M) significantly increased the growth of primary rabbit renal proximal tubule cells compared to that of estradiol-17 β or IGF-I alone treated cells. In binding studies, we found that the binding of ¹²⁵IGF-I on cell membranes was incubation time- and temperature-dependent. Incubation at 37°C results in higher binding of ¹²⁵IGF-I than that of 23°C or 4°C. Maximum binding was observed at 37°C between 30 and 60 minutes. The binding of ¹²⁵IGF-I to both control and estradiol-17 β -treated cells was inhibited by unlabelled IGF-I(10⁻⁸~10⁻¹²M) in a concentration-dependent manner. However, EGF did not compete for ¹²⁵IGF-I binding at 10⁻⁸~10⁻¹²M. IGF-I binding to the membranes from both control and estradiol-17 β -treated cells was also analyzed. We found that estradiol-17 β -treated cells exhibited higher binding activity for IGF-I. When estradiol-17 β or tamoxifen alone, or estradiol-17 β and tamoxifen cotreated cells were compared, the binding ratio of ¹²⁵I-IGF-I of estradiol-17 β -treated cell was significantly increased but was similar to control in both estradiol-17 β and tamoxifen cotreated cell.

본 연구는 한국과학재단의 호르몬연구센터(HRC 96-0401-0401)와 '95 핵심전문연구비(951-0612-024-1)의 지원을 받아 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Ho-Jae Han, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Republic of Korea.

These results suggest that estradiol-17 β in part controls cell proliferation by regulating the expression of IGF-I receptors in primary rabbit renal proximal tubule cells.

Key words : Estradiol-17 β , IGF-I, Kidney.

서 론

정상 및 종양세포의 성장과 기능은 성장인자들과 그들 특이수용체와의 상호작용에 의하여 부분적으로 조절되고 있다. 신장에는 epidermal growth factor(EGF)^{1,2}, insulin-like growth factor(IGF-I)^{3,4}, hepatocyte growth factor(HGF)⁵, transforming growth factor α , β (TGF α , β)⁶와 같은 성장인자들이 존재한다고 알려져 있다. 이와같은 사실은 이들 각 인자들이 신장발생, 형성 및 치유과정에서 주요한 매개체로서 역할을 함을 시사해준다⁷. 따라서 성장인자 또는 이들 수용체 발현의 조절부전은 악성 형질 전환과 연결될 수 있다. 신장 유래 세포주들에서 IGF-I과 이들 수용체가 발현됨을 보고하였다⁸. 이와 더불어 estrogen 유도성 신장암 발생과 진행에 있어서 성장인자들이 중요한 역할을 함을 제안하였다⁹.

생체에서 estrogen은 DNA 합성을 촉진시키거나, thymidine kinase와 synthase같은 핵산합성에 관련된 효소 및 단백질이나, 종양세포의 침윤에 관련된 세포외기질의 파괴를 일으키는 laminin 수용체와 cathepsin D를 유도하기도 한다. 또한 estrogen은 *c-myc*, *c-erbB* 및 *int-2* 같은 protooncogene의 발현 및 동물에서 종양이나 세포형질 전환을 일으키는 단백질의 생산을 유도한다. 그리고 성장인자의 생산을 자극하거나 또는 estrogen 수용체가 자가 또는 주위분비 성장인자들을 생산하여 세포반응을 일으킨다¹⁰⁻¹⁴. 최근에 estrogen 유도성 신장암은 신장이 스테로이드성 또는 비스테로이드성 구조에 관계없이 estrogen들의 발암원성 특성을 밝히는데 중요한 실험모델 중의 하나로 대두되고 있다. Estrogen이 신장암 발생에 있어 어떠한 역할을 하는가에 대한 실험모델로서는 Syrian hamster가 가장 많이 사용되어지고 있다. 햄스터의 신장피질에는 estrogen 특이적 수용체가 존재하여 estrogen의 지속적인 자극시에는 이들 수용체가 증가하며 표적기관을 포함한 다양한 조직에서 종양이 발생되는 것으로 알려졌다¹⁵. 고콜레스테롤혈증 숫컷 Imai rat에서 estrogen은 단백질과 사구체 경화를 감소시킴으로써 사

구체 손상의 진행을 완화시켰을 뿐만아니라 혈중 testosterone 수준을 억제한 반면 성장호르몬 수준은 증가시켰다¹⁶. 이 결과로 보아 estrogen은 그 자체 또는 estrogen과 testosterone에 의해서 조절되는 성과 관련된 인자들에 의해서 사구체 손상의 진행에 억제효과를 보이는 것 같다.

Estrogen 의존성 cell line에서 IGF-I, EGF 또는 basic fibroblast growth factor(basic FGF)와 같은 성장인자들은 세포분열을 일으키는데, 이중 IGF-I이 생체 및 체외실험에서 정상조직과 종양세포에 강한 성장자극효과를 나타낸다¹⁷. 난소가 제거된 미성숙 rat에 estradiol-17 β 를 투여했을 때 자궁에서 IGF-I mRNA의 발현이 현저히 증가함을 보여주었다. 이것은 자궁조직에서 estrogen의 성장자극 반응과 IGF-I 수용체 수준사이의 연관관계를 보여주는 결과로 estrogen에 의한 자궁세포의 증식활성이 IGF-I에 의해 조절됨을 시사한다¹⁸. 그러나 estrogen이 직접적으로 영향을 미치는지 아니면 주위 분비조절인자를 통해서 조절하는지는 명확하지 않다. 그리고 estrogen 유도성 신장암 발생에 관련된 기전 또는 변화에 관해서는 거의 알려지지 않았다.

따라서 본 연구는 hormonally defined 무혈청배지에 초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관세포에서 estradiol-17 β 와 IGF-I 수용체 발현과의 상관관계를 알아보려고 실시하였다.

재료 및 방법

재 료 : 체외실험동물사육소(경기도 용인)에서 분양받은 New Zealand white 수컷 토끼(1.3~1.8kg)를 사용하였다. 기본배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, glucose, L-glutamine, phenol red, sodium bicarbonate, sodium pyruvate가 포함되지 않음)과 F-12 Nutrient Mixture(Ham)(L-glutamine, sodium bicarbonate가 포함되지 않고, glucose 1,802mg/1,000ml 포함)의 1:1 혼합체를 사용하였다. 모든 실험에 사용한 배지는 항생제를 첨가하지 않았지만, 근위세뇨관 분리과정에서 사용한

배지에는 penicillin G 192 IU/ml와 streptomycin 200µg/ml을 첨가하였다. 배지는 증류수에 녹여 pH를 7.3으로 적정한 후 0.22µm Millipack filter(Millipore)로 여과시켜 사용하였다.

Collagenase, soybean trypsin inhibitor, trypsin 2.5%, fetal bovine serum(Gibco BRL), insulin, apo-transferrin, estradiol-17β, tamoxifen, sodium bicarbonate, SDS(sodium dodecyl sulfate), ferrous sulfate, ouabain, rubidium chloride, HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), methyl-α-D-glucopyranose, IGF-I, EGF 등은 Sigma 사에서 ¹²⁵I-IGF-I은 Dupont/NEN에서 각각 구입하였다. Protein assay reagent globulin은 Bio-Rad사에서 구입하였고 그 이외의 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

성장첨가제로 사용한 insulin은 0.01N HCl, transferrin은 증류수에 녹여서 Nalgene filter apparatus(0.22µm pore size)에 여과시킨 후 분주하여 냉장 및 냉동보관하면서 사용하였다.

사구체를 제거하기 위해 관류과정에서 사용된 0.5% 산화철 용액 [iron oxide solution(wt/vol)]은 Cook와 Pickering(1958)이 기술한 방법¹⁹대로 sodium hydroxide(1.3g)와 potassium nitrate(10g)는 산소가 포화된 증류수 50ml에, ferrous sulfate(4.5g)는 증류수 50ml에 각각 용해시킨 후 혼합하여 암록색이 될 때까지 가열하였다. 이렇게 준비된 iron oxide solution은 증류수로 3회 세척한 후 0.9% NaCl로 부유시켜 멸균하였다. 관류과정에서 이용한 iron oxide 용액은 PBS(phosphate buffered saline : NaCl 137mM, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.4mM, Na₂HPO₄ 4.3mM, pH 7.4)로 5배 희석하여 사용하였다.

방 법 :

토끼 신장 근위세뇨관세포의 초대배양 : 토끼 신장 근위세뇨관세포의 초대배양은 Taub(1990)의 방법²⁰을 변형한 것으로 수컷 토끼(1.3~1.8kg)를 경추 타격으로 안락사시킨 후 신동맥과 정맥을 그대로 유지한 채 즉시 신장을 적출해 지방과 주위조직을 제거한 다음 기본배지에 penicillin G 192 IU/ml와 streptomycin 200µg/ml을 첨가하여 얼음으로 차게한 배지에 보관하였다.

적출된 신장은 신동맥에 끝이 무딘 18호 주사바늘을 삽입하여 외과용 silk로 결찰한 후 혈액이 완전히 제거될 때까지 멸균된 PBS로 관류시킨다. 이어서 0.5% iron oxide 용액으로 피질이 암회색으로 될 때까지 관류시킨 후 항생제가 첨가된 기본배지로 관류시켰다. 피막을 박리

시킨 후 외과용 가위를 사용하여 피질부만을 약 0.5cm 정도의 조각으로 잘라내어, 멸균된 조직 균질기로 3~4회 갈아 두층(254µm와 85µm)의 나일론망을 통과시킨 후 85µm 나일론망에 걸린 세포만을 수집하여, DMEM/F-12 배지가 채워진 시험관으로 옮긴다. 이들 중 산화철을 포함하고 있는 사구체 세포는 멸균된 막대자석을 이용하여 제거하고, 근위세뇨관은 60µg/ml collagenase class IV와 60µg/ml soybean trypsin inhibitor로 상온에서 각각 3분씩 처리한 후 원심분리(1,000rpm, 5분)하여 3회 세척하였다. 이렇게 준비된 근위세뇨관을 2가지 성장인자(insulin 5µg/ml, transferrin 5µg/ml)가 첨가된 기본배지로 희석하여 35mm 플라스틱 배양접시에 접종하였다. 배양은 95% 공기와 5% CO₂를 함유한 배양기에서 37℃를 유지하며 실시하였고 배지는 접종후 첫날 교체하고 그 이후는 3~4일 마다 교환하였다. 단, 세포의 활성 및 생화학적 측정을 위해서는 매 실험 24시간 전에 배지를 교환하였다.

세포성장 연구 : 세포의 성장은 근위세뇨관 접종 후 주기적으로 관찰하였다. 세포는 DMEM/F-12배지(pH 7.4)에 insulin 5µg/ml, transferrin 5µg/ml 만을 첨가한 대조군과 여기에 estradiol-17β(10⁻⁹M), IGF-I(5×10⁻⁸M) 또는 estradiol-17β와 IGF-I을 동시에 첨가한 군으로 나누어 95% 공기와 5% CO₂를 함유한 배양기에서 37℃를 유지하며 배양하였다. 각 군에서 세포수를 측정하기 전에 배양세포를 0.25% trypsin-0.1% EDTA 용액으로 20분간 처리한 후 0.1% soybean trypsin inhibitor를 첨가하고 세포를 분리시킨 후 PBS로 희석하여 Coulter counter Model ZF로 측정하였다. 매번 세포수 측정시 3개의 배양접시를 이용하였다.

Competitive binding assay : Competitive binding assay는 Yagil *et al*²¹이 사용한 방법²¹을 변형하여 세포표면과 세포내에 있는 표지된 IGF-I의 분포를 측정하기 위해 실시하였다. 배양접시에서 confluent 하게 단층을 형성한 세포를 상온에서 Krebs-Ringer Hartman(KRH) 용액(NaCl 120mM, NaHCO₃ 15.4mM, NaH₂PO₄ 1.2mM, KCl 5.9mM, MgCl₂ 1.2mM, CaCl₂ 2.5mM, glucose 5mM, HEPES 16mM, pH 7.4)으로 세번 세척한 후 KRH 용액에 ¹²⁵I-IGF-I(2×10⁻¹¹M)과 각 농도의 IGF-I 및 EGF(10⁻¹²~10⁻⁸M)를 동시에 첨가하여 30분동안 배양하였다. 배양후에 단층세포는 얼음으로 차게한 KRH 용액으로 3회 세척한 후 pH 2.8인 얼음으로 차게한 KRH 용액으로 4℃에서 10분간 배양하였다. 그리고 KRH 용액(pH 2.8)을 취해 세포표면에 결합

된 ^{125}I -IGF-I의 방사선량을 측정하고 세포내 ^{125}I -IGF-I의 활성은 0.1% SDS로 세포를 용해시킨 후에 측정하였다. 방사선의 활성은 γ -counter로 측정하였다. 결과는 대조군으로 교정하여 백분율로 나타냈으며 단백질량은 Bradford(1976) 방법²²에 의해서 측정하고, 매 실험마다 3개 이상의 배양접시를 사용하였다.

Affinity cross-linking analysis : 대조군과 estradiol-17 β (10^{-9}M)처리군의 세포가 완전히 단층을 형성한 후에 배지를 제거하고 이들 세포를 KRH 용액으로 3회 세척한 후 1ml KRH 용액에 ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{11}\text{M}$)과 IGF-I($5 \times 10^{10}\text{M}$)을 동시에 첨가하여 30분간 배양시켰다. 배양후 KRH 용액을 제거하고 차가운 KRH 용액(pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 수용체에 결합된 IGF-I을 cross-link 시키기 위해 DMSO로 녹인 DSS를 1.0mM 되게 1ml KRH 용액에 첨가하여 15 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 배양시킨 후 0.1mM Tris와 0.1mM EDTA(pH 7.4)를 3.0ml 첨가하여 반응을 정지시켰다. 세포용해물에서 단백질은 SDS-PAGE로 분석하였다. 전기영동후 젤을 건조시킨 후 Kodak film에 10일 동안 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 노출시켜 autoradiogram을 얻었다.

통계처리 : 실험성적의 통계처리는 Student's t-test에 의하여 유의성 검정을 실시하여 P value가 0.05 이하일 때 유의성 있는 것으로 간주하였다.

결 과

근위세뇨관세포의 성장에 대한 estradiol-17 β 와 IGF-I의 효과 : Estradiol-17 β 와 IGF-I이 신장 근위세뇨관세포의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 실시하였다. Estradiol-17 β 를 각 농도별로 처리하여 세포성장 자극효과를 관찰하였는데 10^{-10}M 이상에서 유의성있는 세포성장 자극효과를 보였다(Fig 1, $p < 0.05$). 이 결과를 근거로 하여 estradiol-17 β (10^{-9}M)와 IGF-I($5 \times 10^{-8}\text{M}$)을 각각 단독 또는 병합처리하여 배양하면서 세포성장을 비교하였다. 배양 4일째부터 상피세포들이 세뇨관으로부터 분화되어 증식하기 시작하였는데, 배양 8일째 coulter counter를 이용하여 세포수를 측정하였다. Estradiol-17 β ($143.8 \pm 15.0\%$) 또는 IGF-I($170.0 \pm 14.0\%$) 단독처리군의 세포숫자는 대조군에 비해 각각 증가하였으며, estradiol-17 β 와 IGF-I($213.3 \pm 13.0\%$)을 병합처리하였을 때는 세포숫자가 단독처리군들에 비해 더욱 증가하였다(Fig 2, $p < 0.05$).

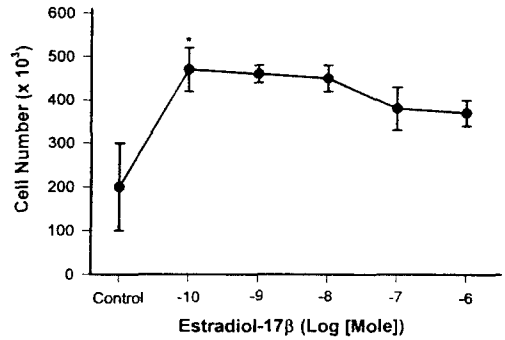


Fig 1. Dose-response of estradiol-17 β on rabbit kidney proximal tubule cell growth. Proximal tubules from a rabbit kidney were grown in phenol red free hormonally defined medium. The medium contained estradiol-17 β at various concentrations in separate dishes. Cell counts were determined on day 11 from triplicate culture plates using a Coulter Model ZF particle counter. Each point represents the means \pm S.E. of 18 separate counts performed on 6 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control.

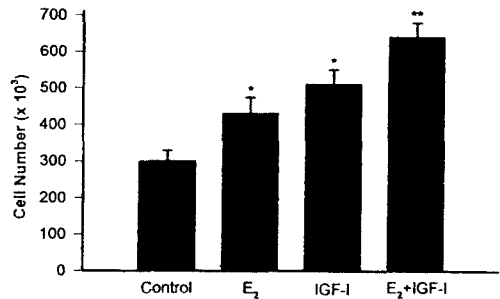


Fig 2. Effects of estradiol-17 β (E₂) and IGF-I on the primary cultured renal proximal tubule cell growth. Primary cultured proximal tubule cells were grown in the DMEM/F-12 supplemented with insulin(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and transferrin(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or in addition, with either estradiol-17 β (10^{-9}M), IGF-I($5 \times 10^{-8}\text{M}$) or both. Cell counts were determined on day 8. Values are the means \pm S.E. of 12 separate experiments performed on 4 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control. ** $p < 0.05$ vs. E₂ and IGF-I.

^{125}I -IGF-I 결합에 대한 IGF-I 및 EGF의 효과 : 초대배양한 신장 근위세뇨관세포에 대한 ^{125}I -IGF-I 결합이 시간 및 온도 와 어떤 상관관계가 있는지를 알아보기 위해 실험을 하였다. Confluent 하게 세포를 배양한 후 ^{125}I -IGF-I을 4 $^{\circ}\text{C}$, 23 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 조건하에서 10, 30, 60, 90분씩 각각

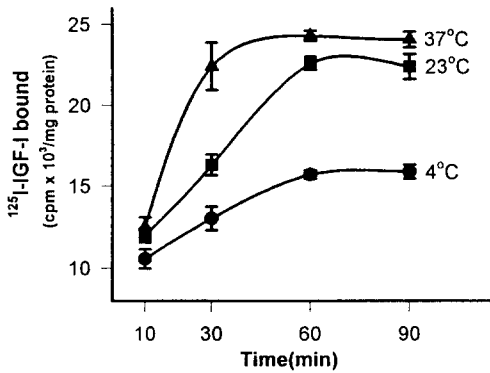


Fig 3. Incubation time- and temperature-dependent specific binding of ^{125}I -IGF-I to primary cultured renal proximal tubule cells. Monolayer cells were incubated with ^{125}I -IGF-I ($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of unlabelled IGF-I ($5 \times 10^{-10}\text{M}$) at 37°C , 23°C or 4°C from 10 to 90 minutes. Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures.

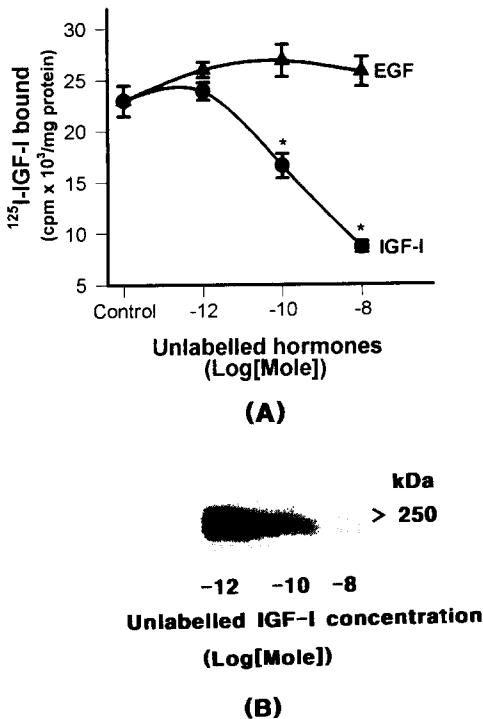


Fig 4. (A) Displacement curves of ^{125}I -IGF-I binding to the primary cultured renal proximal tubule cells by IGF-I and EGF. Monolayers were incubated with ^{125}I -IGF-I ($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of various concentrations of unlabelled IGF-I and EGF for 30 minutes at 37°C . Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * p <

0.05 vs. control. (B) Autoradiogram of ^{125}I -IGF-I cross-linking to the primary cultured renal proximal tubule cells without reduction by DTT. Near-confluent cells were incubated with ^{125}I -IGF-I ($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of unlabelled IGF-I ($5 \times 10^{-10}\text{M}$) for 30 minutes at 37°C . The bound ligand was cross-linked with 0.1mM disuccinimidyl suberate and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

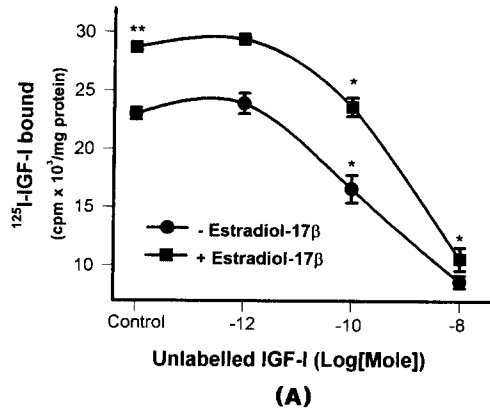


Fig 5. (A) Comparison of ^{125}I -IGF-I binding to normal and estradiol-17 β (E_2)-treated cells by increasing concentration of IGF-I in primary cultured renal proximal tubule cells. Monolayer cells were incubated with ^{125}I -IGF-I ($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of various concentrations of IGF-I for 30 minutes at 37°C . Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * p < 0.05 vs. each point of E_2 with IGF-I, ** p < 0.05 vs. $-\text{E}_2$ control without IGF-I. (B) Autoradiogram of ^{125}I -IGF-I cross-linking to estradiol-17 β (10^{-9}M)-treated renal proximal tubule cells without reduction by DTT. Near-confluent cells were incubated 30 minutes at 37°C ^{125}I -IGF-I ($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of unlabelled IGF-I ($5 \times 10^{-10}\text{M}$). The bound ligand was cross-linked with 0.1mM disuccinimidyl suberate and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

배양시켜 세포막에 결합된 ^{125}I -IGF-I만을 분리하여 그 활성을 측정하였다. 측정결과 4°C 와 23°C 보다는 37°C 에서 결합이 가장 많이 되었으며 30분과 60분 사이에서 포화되었다(Fig 3). 이 실험결과를 근거로 모든 IGF-I 결합 실험은 37°C 에서 30분동안 실시하였다.

Confluent 하게 초대배양된 신장 근위세뇨관세포에

^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$)과 IGF-I 및 EGF를 농도별(10^{-12} ~ 10^{-8}M)로 첨가하여 ^{125}I -IGF-I 결합과의 상관관계를 조사해보았다. ^{125}I -IGF-I 결합은 표지되지 않은 IGF-I을 첨가하였을 때 대조군에 비해 농도의존적으로 억제되었다. 그러나 EGF는 대조군에 비해 농도에 관계없이 ^{125}I -IGF-I의 결합에 영향을 미치지 않았다(Fig 4).

초대배양한 신장 근위세뇨관세포에서 estradiol-17 β 와 IGF-I 수용체 발현과의 연관관계를 알아보기 위해 실험을 실시하였다. Estradiol-17 β 를 첨가하여 배양한 세포에서 ^{125}I -IGF-I의 결합($124.8 \pm 1.0\%$)은 대조군에 비해 유의

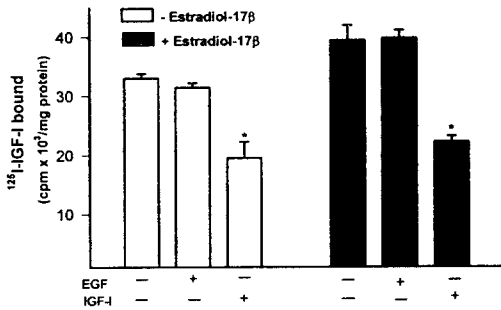


Fig 6. Displacement of ^{125}I -IGF-I binding to estradiol-17 β -treated cells by IGF-I and EGF. Monolayer cells were incubated with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) to estradiol-17 β (10^{-9}M)-treated cells in presence of unlabelled IGF-I($5 \times 10^{-10}\text{M}$), respectively. Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. each control.

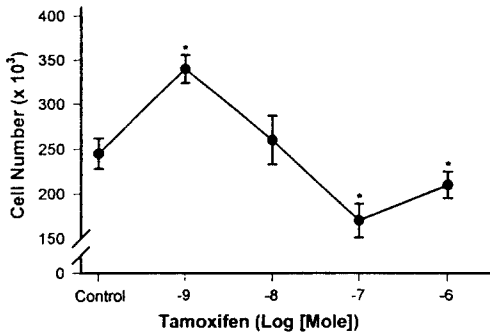


Fig 7. Dose-response of tamoxifen on rabbit kidney proximal tubule cell growth. Proximal tubules from a rabbit kidney were grown for 6 days in phenol red free hormonally defined medium. The medium contained tamoxifen at various concentrations in separate dishes. Each point represents the means \pm S.E. of 18 separate counts performed on 6 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control.

성 있게 증가하였으며, 두 군에서 모두 비표지된 IGF-I에 농도의존적으로 억제되었다. Cross-linking analysis에 의한 autoradiography에서도 대조군에 비해 estradiol-17 β 처리군의 ^{125}I -IGF-I 결합이 증가해 competitive binding assay에서의 결과와 일치하였다(Fig 5). Estradiol-17 β 에 의한 ^{125}I -IGF-I 결합증가는 EGF에 의해서는 영향을 받지 않았다(Fig 6).

Estradiol-17 β 에 의한 ^{125}I -IGF-I 결합증가에 대한 tamoxifen의 효과 : 초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관 세포에서 estradiol-17 β 에 의해 증가된 ^{125}I -IGF-I 결합증가가 estradiol-17 β 길항제인 tamoxifen에 의해서 차단되는지를 알아보려고 실험을 실시하였다. Tamoxifen은 농도에 따라 세포성장을 촉진 또는 억제하였기 때문에 본 실험에서는 세포성장 억제효과를 보이는 농도(10^{-7}M)를 사용하였다(Fig 7). 대조군에 비해 tamoxifen 단독처리군($85.2 \pm 10.4\%$)은 IGF-I 결합에 영향을 미치지 않았으나, estradiol-17 β 와 tamoxifen 병합처리시 estradiol-17 β ($119.6 \pm 7.5\%$)에 의해서 증가된 IGF-I 결합은 유의성 있게 차단($65.9 \pm 11.2\%$)되었다(Fig 8, $p < 0.05$).

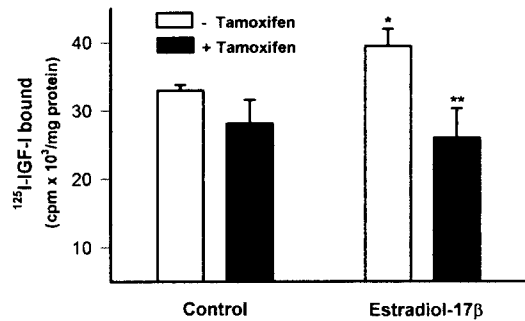


Fig 8. Interaction of estradiol-17 β and tamoxifen on ^{125}I -IGF-I binding to primary cultured proximal tubule cells. Monolayers were incubated with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of tamoxifen(10^{-7}M), estradiol-17 β (10^{-9}M) or both. Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control, ** $p < 0.05$ vs. estradiol-17 β .

고 찰

신장기능의 호르몬성 조절에 관한 연구들은 동물로부터 직접 채취한 조직을 사용해 실시해 왔으나 이러한 조

직은 수명이 짧을 뿐만 아니라 항정상태를 유지시킬 수도 없다는 한계점을 가지고 있다²³. 보다 정확하고 재현성 있는 연구는 조직절편보다 단층상피세포를 가지고 가능하다. 즉, **hormonally defined** 배지에서 배양한 세포를 이용하면 분리동정이 쉽고 또한 이들 인자가 어떤 기전에 의해서 물질이동을 조절하는지도 연구할 수 있다²⁴. 한편 조직배양배지에서 pH 지시제로 가장 널리 사용되고 있는 phenol red는 nonsteroidal estrogen과 구조상 유사점을 갖고 있어 약한 estrogen과 같은 활성을 가졌으며 사람의 유방암세포(MGF-7) 성장도 자극하는 것으로 알려졌다²⁵. 한편 phenol red에 의한 세포성장은 antiestrogen인 tamoxifen과 hydroxytamoxifen에 의해 대조군의 수준으로 억제되었다. 그러므로 본 실험에서는 phenol red-free, serum-free, hormonally defined 배지에서 세포를 배양하였다. 이와같은 *in vitro* 실험계는 estrogen 표적세포들의 정상 또는 비정상적인 성장조절 뿐만 아니라 종양발생의 기전을 연구하는데 매우 중요한 모델이 될 것이다.

본 실험에서 초대배양된 신장 근위세뇨관 세포의 성장은 estradiol-17 β 또는 IGF-I만을 첨가하여 배양한 세포에 비해 estrogen과 IGF-I을 같이 첨가하여 배양한 세포에서 더욱 촉진되었다. 이 실험에서 estrogen이 생리적 농도에서 초대배양된 세포를 직접 증식시킬 수 있음을 보여주는 것으로 보아 신장세포의 형질전환에 있어서 estrogen의 역할을 강하게 시사해준다. Hamster를 estrogen으로 지속적으로 처리했을 때 신세뇨관 손상이 관찰되었으며, 세뇨관중 근위곡세뇨관이 가장 많은 영향을 받았고 원위곡세뇨관, 집합관 순이었으며 그 손상 정도는 호르몬에 노출된 기간이 증가될수록 심하였다²⁶. 또한 본 실험결과로부터 estrogen과 IGF-I의 단독처리군에 비해 병합처리군에서 세포성장에 대한 상승효과는 매우 흥미롭다. 이 결과는 estrogen이 유사분열 물질로서 직접 작용할 뿐만 아니라 성장인자들에 대한 세포반응의 조절인자로서 역할을 할 수 있음을 시사해준다. Hamster 신장종양의 estrogen 수용체수는 대조군 신장에 비해 약 4배 정도 가까이 증가되어진다. 종양에 의한 estrogen의 대사적 변환감소와 함께 수용체의 증가는 estrogen의 존성 종양의 성장을 더욱 가속화시킬 것이다²⁷. Estrogen은 MGF-7 세포에서 IGF-I의 생산을 조절하는 것으로 보고되고 있으며, estrogen과 insulin 또는 EGF와 IGF-I은 상승적으로 상호작용한다고 알려져 있다^{28,29}.

본 실험에서 초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관세포에

서 ¹²⁵I-IGF-I의 결합은 비표지된 IGF-I에 농도의존적으로 유의성 있게 감소되었으나 EGF에 의해서는 영향을 받지 않았다. IGF-I이 정상신장보다 종양세포에서 세포막에 결합하는 능력이 높다는 보고³⁰가 있으며, 한편 자궁내막 조직에서 EGF 수용체는 증가된 종양단계에서 감하조절하며 자궁내막암 cell line의 증식에 산발적 효과가 있다고 한다³¹. 본 실험에서 배지에 estradiol-17 β (10⁻⁹M)를 첨가하여 배양한 세포에서 ¹²⁵I-IGF-I의 결합은 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였는데 estrogen에 의한 IGF-I 수용체 증가로도 설명될 수 있을 것이다. 이와같은 IGF-I 수용체 증가는 estrogen 수용체를 가진 cell line에서도 증명되었다³². 그리고 estrogen은 사람 유방암세포에서 성장인자들의 수용체 발현을 증가시켰으며, 더욱이 성장인자 수용체들의 과도발현은 세포의 형질전환을 유도하는 것으로 보고된 적이 있다³³. 또한 뇌하수체암 cell line을 이용한 연구에서도 estrogen이 성장인자의 발현과 수용체를 조절하여 세포를 성장시킨다고 하였다³⁴. 또한 난소를 제거한 미성숙 rat에 estrogen을 투여했을 때 IGF-I mRNA 발현이 현저하게 증가되었는데 이는 estrogen이 부분적으로 IGF-I을 매개로 하여 자궁세포를 증식시킨다는 것을 의미한다^{35,36}. 그러므로 estrogen은 초대배양된 근위세뇨관 세포에서 성장인자 수용체를 과도발현시켜 호르몬 유도성 신장 종양발생과정에서 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 그리고 estrogen에 의한 ¹²⁵I-IGF-I의 결합증가는 antiestrogen인 tamoxifen에 의해서 차단되었다. 이는 estrogen 처리세포에서 IGF-I 결합증가가 estrogen의 특이적인 효과임을 말해준다^{37,38}. 이와같은 결과들로 보아 estrogen을 첨가하여 배양한 세포에서는 종양세포에서와 비슷하게 IGF-I에 높은 결합 활성을 나타낸다고 할 수 있다. 그러나 estrogen이 초대배양한 세포에서 IGF-I 수용체 발현을 직접적으로 촉진하는지 또는 estrogen과 연관된 다른 조절인자를 통한 간접적인 영향인지는 본 실험 결과로는 알 수 없었다.

결론적으로 estradiol-17 β 에 의한 초대배양한 신장 근위세뇨관세포의 성장촉진은 부분적으로 IGF-I 수용체 발현과 관련되는 것으로 생각된다.

결 론

초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관세포의 성장조절에 있어 estradiol-17 β 와 IGF-I 수용체 발현과의 상관관계를

알아보기 위해 실험을 실시하였다. 그 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 토끼 신장 근위세뇨관세포의 성장은 대조군에 비해 estradiol-17 β (10⁻⁹M), IGF-I(5 \times 10⁻⁸M) 처리군에서 촉진되었으며 estradiol-17 β 와 IGF-I을 병합처리하였을 때는 단독처리군들보다 유의성 있게 촉진되었다.

2. 초대배양한 신장 근위세뇨관세포에 대한 ¹²⁵I-IGF-I 결합을 시간 및 온도별로 측정했을 때 4 $^{\circ}$ C와 23 $^{\circ}$ C에서보다 37 $^{\circ}$ C에서 높았으며 30분과 60분 사이에 최대치에 이르렀다. ¹²⁵I-IGF-I 결합은 표지되지 않은 IGF-I(10⁻¹²~10⁻⁸M) 첨가시에는 농도의존적으로 억제되었으나 EGF(10⁻¹²~10⁻⁶M)는 농도에 관계없이 영향을 미치지 않았다.

3. Estradiol-17 β 는 ¹²⁵I-IGF-I의 결합을 대조군에 비해 유의성 있게 증가(124.8 \pm 1.0%)시켰으며 표지되지 않은 IGF-I(10⁻¹²~10⁻⁸M) 첨가시에는 농도의존적으로 억제되었다. Estradiol-17 β 에 의해서 증가(119.6 \pm 7.5%)된 IGF-I 결합은 tamoxifen(10⁻⁷M)에 의하여 유의성 있게 차단되었다.

결론적으로 estradiol-17 β 는 신장 근위세뇨관세포의 성장을 조절함에 있어 직·간접적으로 IGF-I 수용체 발현의 조절을 통해 작용하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Lau JLT, Fowler JE, Ghosh L. Epidermal growth factor in normal and neoplastic kidney and bladder. *J Urol*, 139:170-175, 1988.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem*, 48:193-216, 1979.
- Bortz JD, Rotwein P, DeVol D. Focal expression of insulin-like growth factor I in rat kidney collecting duct. *Am J Physiol*, 107:811-819, 1988.
- Rogers SA, Miller SB, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I gene expression in isolated rat renal collecting duct is stimulated by epidermal growth factor. *J Clin Invest*, 87:347-351, 1991.
- Nagaike M, Hirao S, Tajima H. Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. *J Biol Chem*, 268:22781-22784, 1991.
- VanZoelen EJJ, Tertoolen LGJ. Transforming growth factor-enhances the extent of intercellular communication between normal rat kidney cells. *J Biol Chem*, 266:12075-12081, 1991.
- Hammerman MR, Miller SB. Therapeutic use of growth factors in renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 5:1-11, 1994.
- Hammerman MR, Rogers S. Distribution of IGF receptors in the plasma membrane of proximal tubular cell. *Am J Physiol*, 253:F841-847, 1987.
- Larger DJ, Slagel DD, Palechek PL. The expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- α in renal cell carcinoma. *Modern Pathol*, 7:544-548, 1994.
- Albini A, Graf JO, Kitten GT, et al. 17 beta-estradiol regulates and V-Ha-ras transfection constitutively enhances MCF 7 breast cancer cell interactions with basement membrane. *Proc Natl Acad Sci*, 83:8182-8186, 1986.
- Groner B, Hynes NE. Mutations in human breast cancer cells: dominantly-acting oncogenes and tumor suppressor genes suggest strategies for targeted interference. *Int J Cancer(suppl)*, 5:40-46, 1990.
- Dickson RB, Lippman ME. Estrogenic regulation of growth and polypeptide growth factor secretion in human breast carcinoma. *Endocrine Rev*, 8:29-43, 1987.
- Aaronson SA. Growth factor and cancer. *Science*, 254:1146-1153, 1991.
- Chaidarun SS, Eggo MC, Stewart PM, et al. Role of growth factors and estrogen as modulators of growth, differentiation, and expression of gonadotropin subunit genes in primary cultured sheep pituitary cells. *Endocrinology*, 134:935-944, 1994.
- Soto AM, Bass JC, Sonnenschein C. Estrogen-sensitive proliferation pattern of cloned syrian hamster kidney tumor cells. *Cancer Res*, 48:3676-3680, 1988.
- Jung-Testas I, Renoir JM, Gasc JM, et al. Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Exp Cell Res*, 193:12-19, 1991.
- Pratt SE, Pollak MN. Insulin-like growth factor binding protein 3(IGF-BP3) inhibits estrogen-stimulated breast cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 198:292-297, 1994.

18. Hana V, Murphy LJ. Expression of insulin-like growth factors and their binding proteins in the estrogen responsive Ishikawa human endometrial cancer cell line. *Endocrinology*, 135:2511-2516, 1994.
19. Cook WF, Pickering GW. A rapid method for separating glomeruli from rabbit kidney. *Nature*, 182: 1103-1104, 1958.
20. Taub M. Primary kidney cells. *Methods in Molecular Biology*, 5:189-196, 1990.
21. Yagil C, Frank BH, Rabkin R. Effect of bacitracin on binding and processing of insulin by established renal cell line. *Diabetes*, 37:800-805, 1988.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254, 1976.
23. Tang MJ, Suresh KR, Tannen RL. Carbohydrate metabolism by primary cultures of rabbit proximal tubules. *Am J Physiol*, 256:C532-C539, 1989.
24. Taub M, Sato G. Growth of functional primary cultures of kidney epithelial cells in defined medium. *J Cell Physiol*, 105:369-378, 1980.
25. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue media is a weak estrogen : Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83: 2496-2500, 1986.
26. Oberley TD, Gonzalez A, Lauchner LJ, *et al.* Characterization of early kidney lesions in estrogen-induced tumors in the syrian hamster. *Cancer Res*, 51:1922-1929, 1991.
27. Li JJ, Talley DJ, Li SA, *et al.* An estrogen binding protein in the renal cytosol of intact, castrated and estrogenized golden hamsters. *Endocrinology*, 95:1134-1141, 1974.
28. Daws MR, Westley BR, May FEB. Paradoxical effects of overexpression of the type I insulin-like growth factor(IGF) receptor on the responsiveness of human breast cancer cells to IGFs and estradiol. *Endocrinology*, 137:1177-1186, 1996.
29. Sheikh MS, Shao ZM, Clemmons DR, *et al.* Identification of the insulin-like growth factor binding proteins 5 and 6(IGFBP-5 and 6) in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 183:1003-1010, 1992.
30. Bhaumick B, Bala RM. Binding and degradation of insulin-like growth factors I and II by rat kidney membrane. *Endocrinology*, 120:1439-1448, 1987.
31. Rajkumar K, Dheen T, Krsek M, *et al.* Impaired estrogen action in the uterus of insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice. *Endocrinology*, 137:1258-1264, 1996.
32. Narayan S, Roy D. Insulin-like growth factor 1 receptors are increased in estrogen-induced kidney tumors. *Cancer Res*, 53:2256-2259, 1993.
33. Pollak MN, Polychronakos C, Yousefi S, *et al.* Characterization of insulin-like growth factor I(IGF-I) receptors of human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 154:326-331, 1988.
34. Amara JF, Dannies PS. 17β -estradiol has a biphasic effect on GH-3 cell growth. *Endocrinology*, 112:1141-1143, 1983.
35. Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA, *et al.* Insulin-like growth factor I receptors in normal and neoplastic human endometrium. *Cancer Res*, 50:3019-3024, 1990.
36. Hana V, Murphy LJ. Interdependence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I expression in the mouse uterus. *Endocrinology*, 135:107-112, 1994.
37. Bezwoda WR, Meyer K. Effect of α -interferon, 17β -estradiol, and tamoxifen on estrogen receptor concentration and cell cycle kinetics of MCF 7 cells. *Cancer Res*, 50:5387-5391, 1990.