

C6 Rat Glioma Cell에서 리튬에 의한 성장 억제와 Insulin-like Growth Factor System Components의 발현과의 관계

김인애 · 진은정 · 조은정 · 손시환 · 이철영

진주산업대학교 동물소재공학과 · 동물생명산업 지역협력연구센터

Relationships of the Lithium-Induced Growth Inhibition of C6 Rat Glioma Cell to Expression of the Insulin-like Growth Factor System Components

I. A. Kim, E. J. Jin, E. J. Cho, S. H. Sohn and C. Y. Lee

Regional Animal Industry Research Center, Jinju National University, Department of Animal Resources Technology

ABSTRACT

The insulin-like growth factor(IGF) system, consisting of IGFs-I and -II ligands and their receptors and six IGF-binding proteins(IGFBPs), plays an important role in survival, proliferation and differentiation of a variety of cell types. Lithium is a known modulator of survival and proliferation of many cell types *in vitro*. The present study was undertaken to investigate the relationship between LiCl-induced changes in cell survival and growth and the expression of the IGF system components in C6 rat glioma cell line which, besides IGF-I and its receptor, is known to express IGFBP-3 as its major IGF carrier. When C6 cells were cultured for 24h in the absence or presence of 2mM or 5mM LiCl in a 10% serum-containing medium, the viability and the number of cells were not affected by added lithium. In 72-h culture, however, C6 cells clearly exhibited a dose-dependent response to added LiCl. The cells cultured for 72h in the presence of 0, 2mM and 5mM LiCl exhibited a typical mitotic, a growth-arrested and an apoptotic appearances, respectively. Moreover, the apoptotic cells were accompanied by reduced expression of IGF-I, IGF-I receptor and IGFBP-3 as examined by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Interestingly, blockade of IGFBP-3 mRNA translation by addition of 10µM IGFBP-3 anti-sense oligodeoxyribonucleotide in serum-free, 24-h culture resulted in a decrease in the number of cells as well as relative abundance of the target mRNA. In summary, results suggest that the cytotoxic effect of lithium in C6 cell is likely to be mediated, in part, by suppression by this agent of the expression of the IGF system components. In this regard, IGFBP-3 may play at least a 'permissive' role in normal proliferation of this cell.

(Key words : Lithium, IGF, IGFBP, Growth, C6 cell)

I 서 론

Insulin-like growth factor(IGF) system은 7.5-kDa의 IGF-I과 IGF-II ligands, 6종류의 구조·기능적으로 유사한 25~45-kDa의 IGF-binding proteins (IGFBPs) 및 type I IGF receptor[혹은 IGF(-I) receptor]와 type II IGF receptor [혹은 mannose-6-phosphate(M6P)/IGF-II receptor]로 이루어진 복

합성장인자계이다(Jones와 Clemmons, 1995; 이, 1996, 2000). IGF-I과 -II 특히 IGF-I은 무수히 많은 생물학적 작용이 있으나, *in vivo* & *in vitro* 공히 세포의 증식과 분화를 자극하는 반면 세포사멸을 억제(anti-apoptosis)하고, 세포의 포도당과 아미노산 운반 및 글리코겐과 단백질 합성을 자극하는 인슐린 유사 작용과 면역기능을 증강시키는 작용으로 대부분될 수 있다. 체액

Corresponding author : C. Y. Lee, Regional Animal Industry Research Center, Jinju National University, Jinju 660-758, Republic of Korea. Tel : 055-751-3258, Fax : 055-753-4422, E-mail : cylee@jinju.ac.kr

중 IGF는 거의 모두 IGFBP에 1:1의 비율로 결합된 상태로 발견된다. 특히 생체에서 가장 많은 양의 IGF가 존재하는 혈장에는 대부분의 IGF가 40~45-kDa의 IGFBP-3에 결합된 후 IGFBP-3의 BP 역할을 하는 85-kDa의 acid-labile subunit와 결합하여 150-kDa ternary complex 형태로 존재하기 때문에 IGFBP-3는 생체의 IGF 운반체이자 저장체 역할을 한다. Type I IGF receptor는 *in vitro*에서 밝혀진 모든 IGF-I과 IGF-II의 작용을 매개하나, type II IGF receptor는 IGF-II를 세포 안으로 끌어들여 분해시키는 기능 외에 어떤 생물학적 작용을 매개하는지의 여부는 명백히 알려지지 않고 있다.

Rat C6 glioma cell은 신경세포의 도움세포인 glial cell로부터 유래된 암세포로서 다음과 같은 이유로 IGF system을 연구하기에 적합한 세포이다. 무엇보다도 IGF는 C6 cell의 주요 세포 분열 자극인자(mitogen)이다. C6 cell은 IGF-I, IGF-I receptor 및 IGFBP가 발현되고, 기아 (serum-free) 배양 조건 하에서 배양액에 IGF-I 혹은 IGF-II만 첨가해도 세포 증식이 잘 된다. 더욱이 IGF-I 혹은 IGF-I receptor의 anti-sense oligonucleotide를 C6 cell에 transfection 시키면 생체에서 암을 유발시킬 수 있는 이 세포 고유의 능력을 상실한다는 사실(Trojan 등, 1992; Resnicoff 등, 1994)은 IGF system이 C6 cell의 증식과 암 유발에 결정적인 역할을 하고 있음을 시사한다. 또한 C6 cell은 IGFBP-2~5의 발현이 검출되기는 하나(Chernausek 등, 1993; Bradshaw 등 1999; Wang 등, 2001) IGFBP-3의 발현 수준이 타 IGFBP의 발현 수준보다 월등히 높기 때문에 C6 cell은 IGFBP-3를 중심으로 하는 IGF system 연구에 매우 유용한 세포이다 (Yang 등, 1990).

리튬은 의학적으로는 우울증 치료제로 오랫동안 쓰여왔고(Foster, 1992; Bschor 등, 2003), 세포배양에서는 세포의 종류 혹은 세포가 처한 환경에 따라 세포의 증식 혹은 사멸(apoptosis)을 유도하는(D'Mello 등, 1994; Madiehe 등, 1995; Hasgekar 등, 1996) 조절제로 쓰이기도 한다(Garberscek 등, 2002; Salzman, 2003). 전술한 바와 같이 IGF system은 세포의 생존, 사멸과 증식에 있어서 매우 중요한 역할을 하기 때문

에 *in vitro* culture에서 리튬의 효과와 IGF system components의 발현과는 밀접한 관계가 있을 소지가 크나 이들 간의 관계에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 C6 cell에서 리튬이 세포의 생존, 증식, 사멸과 형태 및 IGF-I, IGF receptor 및 IGFBP-3 발현에 미치는 영향을 조사하여 이들간의 상관관계를 구명하고자 수행되었다.

II 재료 및 방법

1. 세포배양

C6 cells(American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA)은 Chacko와 Adamo(2000) 및 Wang 등(2001)이 기술한 방법을 따라 아래와 같이 배양하였다. 분주 받은 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 1mM glutamine과 0.001% (w/v) penicillin 및 streptomycin을 첨가한 Ham's F-12 medium(Invitrogen, San Diego, CA, USA)으로 culture flask에서 약 80% confluency에 이를 때까지 배양하였다. 세포는 다시 35-mm culture dish에 1×10^5 cells/well 밀도로 seeding하고 1 M LiCl 용액을 첨가하여 최종농도가 0, 2mM, 혹은 5mM 되게 하여 37°C, 5% CO₂/95% atmosphere 조건 하에서 24 혹은 72시간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 검경 후 aspiration하여 떠있는 세포를 제거하고 culture dish에 부착된 세포는 trypsin/EDTA 처리하여 떼어낸 다음 세포 수를 counting하고 RNA를 추출하였다.

IGFBP-3 anti-sense oligodeoxyribonucleotide(ODN) 첨가의 효과에 대한 실험에서는 FBS를 함유하는 배양액으로 위에서와 같이 culture flask에서 배양한 후 PBS로 washing하고 35-mm culture dish에 seeding 하였다. 이들 세포는 FBS를 함유하지 않은 배양액에서 overnight 배양한 다음 IGFBP-3 mRNA 5' 비해독부위(Albiston과 Herington, 1990)의 말단과 보족되는 anti-sense ODN[5'-CATGGCGCTGGCGGAGGGC-3'; GenoTech(대전)에서 합성]을 0 혹은 10 μ M 농도 되게 첨가하여 24시간 동안 더 배양한 후 검경하고 RNA를 추출하였다.

2. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

배양된 세포로부터 total cellular RNA는 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 추출하였다. PCR을 위한 first-strand cDNA는 total RNA 1 μ g을 주형으로 하여 cDNA Cycle kit(Invitrogen)를 이용하여 역전사(reverse transcription; RT) 반응으로 합성하였다(Lee 등, 2001). IGF-I, IGF-I receptor 및 IGFBP-3 cDNAs 합성을 위한 primers는 Saito 등(2003)이 썼던 oligonucleotide sequences를 이용하였고(Table 1), reference standard로 이용한 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) PCR의 primers 염기서열 또한 Table 1에 제시하였다. PCR 반응물은 50 μ l 총부피에 각각의 primer 25pmoles, 각각의 deoxyribonucleoside-5'-triphosphate 10nmoles, *Taq* polymerase(TaKaRa Shuzo Co., Otsu, Japan) 2.5U와 DMSO 5 μ l 및 1 \times PCR buffer 농도[10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM Mg²⁺]를 함유하도록 하였다. 온도 조건(thermal cycle)은 94 $^{\circ}$ C 4분(denaturation) \rightarrow [denaturation(94 $^{\circ}$ C 1분) \rightarrow annealing{55 $^{\circ}$ C 1분} \rightarrow extension(72 $^{\circ}$ C 1분)] \times 35cycles \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10분 \rightarrow 4 $^{\circ}$ C 이었다. PCR products는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하고 ethidium bromide staining으로 가시화하였다.

3. 통계분석

세포배양에서 리튬의 첨가 여부와 배양시간(24시간 대비 72시간) 및 리튬첨가 \times 배양시간 간의 상호작용의 유의성 여부를 SAS(1996)의 GLM procedure를 이용하여 검정하였다.

III 결 과

1. LiCl 첨가의 효과

C6 배양액에 0(대조구; control), 2mM, 혹은 5mM LiCl을 첨가하고 24시간 배양했을 때 현미경 하에서 관찰되는 세포 모양이나 수에서 LiCl 첨가수준간 차이를 나타내지 않았다(결과 미제시). 그러나 72시간 배양했을 때는 LiCl 첨가 수준간 세포 수, 생존률 및 세포 모양상 현격한 차이를 나타냈다(Fig. 1). 대조구(Fig. 1, 상단)는 전형적으로 confluency를 향하여 분열하는 세포 모습을 나타냈고, 2mM LiCl 첨가구(Fig. 1, 중앙)는 대조구에 비해 분열이 정체된 세포 모습을 보였으나 사멸해서 떠있는 세포의 비율은 낮았다(<5%). 그러나 5mM LiCl 첨가구(Fig. 1, 하단)에서는 반 정도의 세포는 이미 떠있었고 부착된 세포도 구상으로 응축되어 이미 사멸해가고 있음을 나타냈다. 본 실험의 결과를 토대로 이후 실험에서는 LiCl의 첨가 효과가 뚜렷한 5mM 첨가 수준에서 첨가구와 대조구를 비교하였다.

(살아있는)세포 수(Fig. 2)에 있어서(5mM) LiCl 첨가구의 세포 수는 대조구의 세포 수보다 작았고($P < 0.01$), 72시간 배양했을 때는 24시간 배양했을 때보다 세포 수가 많았다($P < 0.01$). 대조구는 24시간 대비 72시간 배양시 세포 수가 증가하였으나($P < 0.01$) LiCl 첨가구는 24시간 이후 세포 수가 증가하지 않았고, 24시간 배양 시 LiCl 첨가구 대비 대조구간 세포 수의 차이가 없었으나 72시간 배양했을 때는 LiCl 첨가구가 대조구보다 세포 수가 작았다($P < 0.01$).

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers and expected sizes of PCR products

Item	Primer	Sequence	Size(bp)	Ref.
IGF-I	Forward	5'-GCTCTTCAGTTCGTGTGTGG-3'	221	18
	Reverse	5'-TTGGGCATGTCAGTGTGG-3'		
IGF-IR	Forward	5'-TCTTGGATGCGGTGTCCAATAAC-3'	215	40
	Reverse	5'-GCAGCACTCATTTCTCGTTGC-3'		
IGFBP-3	Forward	5'-GACACCCAGAACTTCTCCTCC-3'	220	35
	Reverse	5'-CATACTTGTCCACACACCAGC-3'		
GADPH	Forward	5'-GGTGAAGGTCGGTGTCAACGG-3'	505	37
	Reverse	5'-CCATGACAACCTTTGGCATCGTGG-3'		

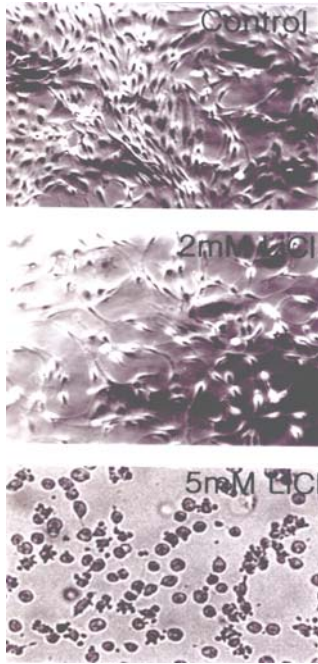


Fig. 1. Changes in cellularity, viability and morphology of C6 cells following 72-h culture in the presence of LiCl. C6 cells were cultured for 72h in the absence(*top*) or presence of 2mM(*middle*) or 5mM(*bottom*) LiCl. Note the growth-arrested and apoptotic appearances in *middle* and *bottom* panels, respectively, compared with the mitotic appearance of the *top* panel. Representative results are shown in this figure.

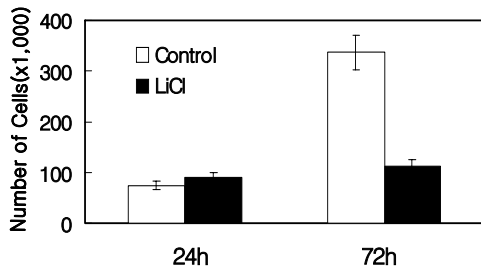


Fig. 2. Numbers of C6 cells following 24-h and 72-h cultures in the absence or presence of 5mM LiCl. Data are means \pm SE of 10 and 12 observations for the 24-h and 72-h cultures, respectively. Effects of LiCl addition and duration of incubation as well as their interaction were significant ($P < 0.01$).

앞서 제시한 LiCl이 C6 cell의 생존·증식에 미치는 영향과 IGF system 간의 상관관계를 구명하기 위해 다음은 72시간 배양한 C6 cells로부터 추출한 RNAs를 이용하여 IGF-I, IGF receptor 및 IGFBP-3에 대한 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 3). PCR products를 agarose gel 위에서 전기영동하고 ethidium bromide로 staining한 결과 reference standard로 이용한 GAPDH에 대한 RT-PCR product band의 intensity는 LiCl 첨가구 시료 대비 대조구 시료간 가시적인 차이가 없었으나 세 개의 IGF system components의 PCR product bands의 intensity는 모두 LiCl 첨가구 시료가 대조구 시료에 비해 낮았다. 즉 본 실험의 결과는 LiCl 첨가에 의해 이들 IGF system components의 발현이 내리조절(down-regulation)되고 있음을 시사하였다. 그러나 본 실험에서 GAPDH에 대한 RT-PCR의 cycle 수(35회)는 PCR cycle 수와 PCR product의 양(agarose gel 상에서의 band intensity)이 비례하는 한계 cycle 수를 초과했을 수도 있기 때문에 LiCl 첨가에 의해 IGF system components는 물론 타 유전자 발현 역시 전자와 같이 내리조절되었을 가능성을 배제할 수는 없다.

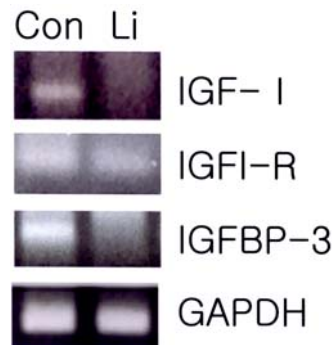


Fig. 3. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) for IGF-I, IGF-I receptor and IGFBP-3 after 72-h culture of C6 cells in the absence or presence of 5mM LiCl. RT-PCR for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) was included in this experiment as reference standard. For clarity, only ethidium bromide-stained PCR products of expected sizes following agarose gel electrophoresis are shown. Representative results are shown in this figure.

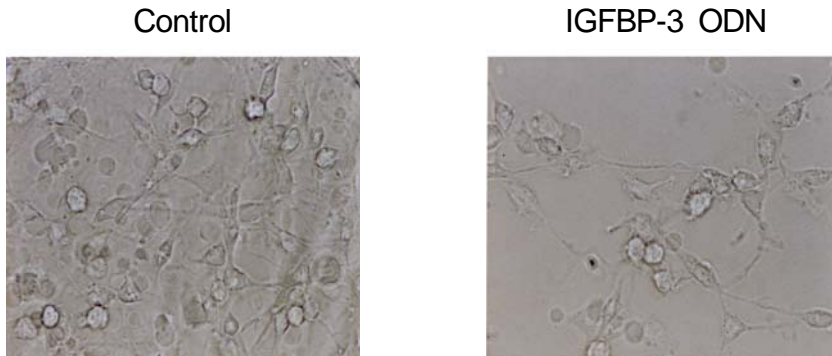


Fig. 4. Morphology and relative numbers of cells following 24-h culture of a fixed number of C6 cells in the absence (Con) or presence of 10µM IGFBP-3 anti-sense oligodeoxyribonucleotide(ODN).

2. IGFBP-3 anti-sense oligodeoxyribonucleotide의 첨가 효과

본 실험에서는 IGFBP-3에 대한 anti-sense oligodeoxyribonucleotide(ODN)로 IGFBP-3 mRNA의 해독(translation)을 억제했을 때 C6 cell의 세포증식과 발달에 미치는 영향을 조사하였다. 혈청에는 많은 양의 IGFBPs가 존재하기 때문에 본 실험에서는 무혈청(serum-free) 배양액 ± IGFBP-3 ODN 조건하에서 24시간 배양하였다.

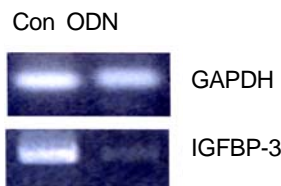


Fig. 5. Effect of IGFBP-3 anti-sense oligodeoxyribonucleotide(ODN) on relative abundance of IGFBP-3 mRNA examined by RT-PCR in cultured C6 cells.

C6 cells were cultured in the absence (Con) or presence of 10µM IGFBP-3 ODN for 24 h in a serum-free medium. RT-PCR for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) was included in this experiment as reference standard. For clarity, only ethidium bromide-stained PCR products of expected sizes following agarose gel electrophoresis are shown. Representative results are shown in this figure.

IGFBP-3 ODN 첨가에 의해 C6 cells의 수는 가시적으로 줄어들었으나 형태적인 변화는 보이지 않았다(Fig. 4). 한편 Fig. 5는 IGFBP-3에 대한 RT-PCR 결과로서 IGFBP-3 ODN 첨가에 의해 예상대로 RT-PCR product가 거의 합성되지 않았음을 나타냄으로써 본 실험에 쓰인 ODN의 신빙성을 입증한다.

IV 고 찰

IGF가 세포막의 IGF receptor를 통하여 무수히 많은 형태의 세포에서 분열(증식)을 자극하는 인자(mitogen)란 사실은 오래 전부터 잘 알려져 왔고(Nissley와 Rechler, 1984; Jones와 Clemmons, 1995), 근년에 들어와서는 IGF가 세포사멸을 억제하고(anti-apoptosis) 세포의 생존에 꼭 필요한 인자(survival factor)임이 밝혀졌다(Hansen과 Knudsen, 1991; Van Golen과 Feldman, 2000). IGFBPs는 IGF의 운반체이자 IGF 작용의 조절체로서 구조 및 기능적으로 상동성 있는 6 종류의 단백질군이다(Rechler와 Clemmons, 1998; Hwa 등, 1999; Baxter, 2000). *In vitro* culture system에서 IGFBP-3는 타 IGFBPs와 같이 대체로 IGF 작용을 억제하나 세포의 종류 및 배양 조건에 따라서는 IGF 작용을 증강시키기도 한다(De Mellow와 Baxter, 1988; Clemmons, 1992). 타 IGFBPs와 비교하여 IGFBP-3의 특이한 점은 생체에서 IGFBP-3는 혈중 대부분의 IGF 및 acid-labile subunit와 결합하여 150-kDa ternary complex를 형

성함으로써 혈중 IGF의 반감기를 연장시켜 IGF를 저장하는 기능이 있다. *In vitro*에서 IGFBP-3는 IGF와 유관 혹은 무관하게 P53 혹은 TGF- β 의 세포증식 억제/세포사멸 촉진 작용을 매개하고 (Buckbinder 등, 1995; Oh 등, 1995), P53 및 IGF와 무관하게 세포사멸을 촉진한 예(Rajah, 1997; Kim 등, 2004) 및 TGF- β 의 세포증식 자극 효과를 매개한 예(Cohen 등, 2000; Kansra 등, 2000)도 보고되었다.

본 연구에서는 IGFBPs 중 주로 IGFBP-3가 발현되는 IGF system을 연구하기에 적합한 C6 rat glioma cell line(Yang 등, 1990)에서 세포의 생존과 증식의 조절제로서 LiCl을 배양액에 첨가했을 때 세포의 생존/증식 및 형태 변화를 조사하였다. C6 cell을 72시간 배양했을 때 LiCl 2mM 첨가수준에서는 가시적인 세포 모양의 변화는 없었으나 세포증식이 억제되었고, 5mM 수준에서는 세포독성 효과를 나타내어 약 반정도의 세포는 이미 사멸하고 살아있는 세포도 사멸해가는 형태를 나타냄으로써 C6 cell이 HL-60 promyelocytic leukemia cell line에 비해 Li⁺에 민감함을 나타냈다. HL-60 cell line에서는 LiCl 10mM 이상의 수준에서는 세포독성이 있었으나 5mM 수준에서는 세포증식이 촉진되었고(Becker와 Tyobeka, 1990; Tyobeka와 Becker, 1990), FRTL-5 갑상선 세포에서는 LiCl 0.4~2mM 수준에서 세포증식 촉진 효과가 있었으나 배양액에 TSH를 첨가했을 때는 2mM 첨가수준의 LiCl이 TSH의 세포증식 자극 작용을 억제하는 효과가 있었다고 보고되었다(Gaberscek 등, 2002).

IGF-I과 IGF receptor는 세포증식을 매개하는 *trans elements*이기 때문에 LiCl(5mM) 존재 하에서 배양된 세포에서 RT-PCR로 유추한 IGF-I 및 IGF receptor의 유전자 발현 감소는 예상되었던 결과로서 LiCl 첨가에 의한 세포 수의 감소와 일치되는 결과로 해석된다. 반면, IGFBP-3는 대체로 IGF의 작용을 억제하기 때문에 LiCl 첨가에 따른 IGFBP-3의 유전자 발현 저하는 다소 의외의 결과이었다. 따라서 본 연구에서는 IGFBP-3 anti-sense oligodeoxyribonucleotide(ODN)를 첨가하여 IGFBP-3 mRNA의 해독을 차단하였을 때 세포의 생존과 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험의 결과는 ODN의 첨가에

의해 세포 수는 역시 감소하였고, 아마도 ODN과 결합한 IGFBP-3 mRNA가 RNase H에 의해 분해되어(Crooke, 2004) IGFBP-3 RT-PCR product가 거의 검출되지 않았으므로 C6 cell line에서 IGFBP-3가 세포증식을 억제하는 작용이 없음을 반증하였다. 그러나 IGFBP-3는 그 자체로서 혹은 protease(s)에 의해 부분 분해된 다음 IGF와 상호작용하여 세포증식을 자극한 예(Angelloz-Nicoud 등, 1996, 1998)도 있기 때문에 본 결과만으로는 IGFBP-3가 그 자체로 C6 cell의 증식 자극 작용이 있는지의 여부는 알 수 없다. 따라서 현재로서는 IGF system과 관련하여 C6 cell에서 리튬에 의한 세포증식의 억제는 IGF system components의 전반적인 발현 저하에 기인한 것으로 추측되고, IGFBP-3는 적어도 C6 cell의 정상적인 증식을 위해 필요하다('permissive' 역할)는 결론을 내릴 수 있다.

V 요 약

Insulin-like growth factors(IGF)s-I과 -II ligands와 이들의 receptors 및 6 종류의 IGF-binding proteins(IGFBPs)로 구성된 IGF system은 여러 종류의 세포의 생존, 증식 및 분화에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 리튬은 *in vitro*에서 여러 종류의 세포의 생존과 증식의 조절제로 알려져 있다. 본 연구는 IGF-I, IGF-I receptor 및 IGF carrier로서 주로 IGFBP-3를 발현하는 rat C6 glioma cell에서 LiCl로 유도된 세포 생존 및 증식의 변화와 IGF system components의 발현간의 관계를 구명하고자 수행되었다. 10% 혈청을 함유하는 배양액에서 0, 2mM, 혹은 5mM LiCl을 첨가하여 C6 cell을 24시간 배양했을 시 세포의 생존률과 세포 수는 리튬 첨가에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나 72시간 배양했을 때 C6 cell은 명백히 리튬의 첨가수준에 따라 반응하였다. 0, 2mM, 5mM LiCl 첨가수준에서 72시간 배양한 C6 cell은 각각 전형적인 세포분열, 세포분열 중지 및 세포사멸 양상을 보였다. 더욱이 사멸해가는 세포는 reverse transcription-polymerase chain reaction으로 조사한 IGF-I, IGF receptor 및 IGFBP-3의 발현수준이 저하되었다. 흥미롭게도 혈청을 첨가하지

않은 배양조건 하에서 IGFBP-3에 대한 anti-sense oligodeoxyribonucleotide를 10 μ M 수준으로 첨가하여 IGFBP-3 mRNA의 해독을 차단하고 24 시간 배양했을 때도 표적 mRNA는 물론 세포 수도 줄었다. 종합하자면, C6 cell에서 리튬의 독성 효과의 일부는 이 제제에 의한 IGF system components의 발현 억제 효과에 의해 매개될 소지가 크다. 이러한 관점에서 IGFBP-3는 적어도 이 세포의 정상적인 증식을 위해 꼭 필요한('permissive') 역할을 할 수 있다는 점을 시사한다.

VI 사 사

본 연구는 한국과학재단 지정 진주산업대학교 동물생명산업 지역협력연구센터의 연구비 지원에 의한 것입니다.

VII 인용 문헌

- Albiston, A. L. and Herington, A. C. 1990. Cloning and characterization of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166:892-897.
- Angelloz-Nicoud, P., Harel, L. and Binoux, M. 1996. Recombinant human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 stimulates prostate carcinoma cell proliferation via an IGF-dependent mechanism. Role of serine proteases. *Growth Regul.* 6:130-136.
- Angelloz-Nicoud, P., Lalou, C. and Binoux, M. 1998. Prostate carcinoma(PC-3) cell proliferation is stimulated by the 22-25-kDa proteolytic fragment (1-160) and inhibited by the 16-kDa fragment(1-95) of recombinant human insulin-like growth factor binding protein-3. *Growth Horm. IGF Res.* 8:71-75.
- Baxter, R. C. 2000. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278:E967-976.
- Becker, R. W. and Tyobeka, E. M. 1990. Lithium enhances the proliferation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Leuk. Res.* 14:879-884.
- Bradshaw, S. L., D'ercole, A. J. and Han, V. K. M. 1999. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in C6 glioma cells results in conditioned alteration of cellular growth. *Endocrinology* 140:575-584.
- Bschor, T., Lewitzka, U., Sasse, J., Adli, M., Koberle, U. and Bauer, M. 2003. Lithium augmentation in treatment-resistant depression: clinical evidence, serotonergic and endocrine mechanism. *Pharmacopsychiatry* 36(Suppl.) 3:S230-234.
- Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R. and Kley, N. 1995. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377:646-649.
- Chacko, M. S. and Adamo, M. L. 2000. Double-stranded ribonucleic acid decreases C6 rat glioma cell numbers: effects on insulin-like growth factor I gene expression and action. *Endocrinology* 141: 3546-3555.
- Chernausk, S. D., Murray, M. A. and Cheung, P. T. 1993. Expression of insulin-like growth factor binding protein-4(IGFBP-4) by rat neural cells-comparison to other IGFBPs. *Regul. Pept.* 48: 123-132.
- Clemmons, D. R. 1992. IGF binding proteins: regulation of cellular actions. *Growth Regul.* 2:80-87.
- Cohen, P., Rajah, R., Rosenbloom, J. and Herrick, D. J. 2000. IGFBP-3 mediates TGF-beta1-induced cell growth in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278:L545-551.
- Crooke, S. T. 2004. Progress in antisense technology. *Annu. Rev. Med.* 55:61-95.
- De Mellow, J. S. and Baxter, R. C. 1988. Growth hormone-dependent insulin-like growth factor(IGF) binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156:199-204.
- D'Mello, S. R., Anelli, R. and Calissano, P. 1994. Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp. Cell Res.* 211:332-338.
- Foster, J. R. 1992. Use of lithium in elderly psychiatric patients: a review of the literature. *Lithium* 3:77-93.
- Gaberscek, S., Kalisnik, M., Pezdirc, M., Pavlin, K. and Hojker, S. 2002. Influence of lithium on growth and viability of thyroid follicular cells. *Folia Biol.(Praha)* 48:200-204.
- Hannon, K., Smith II C. K., Bales, K. R. and Santerre, R. F. 1992. Temporal and quantitative analysis of myogenic regulatory and growth factor gene expression in the developing mouse embryo. *Dev. Biol.* 151:137-144.
- Hansen, H. O. and Knudsen, J. 1991. Lactating goat mammary gland cells in culture. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A:129-135.
- Hasegkar, N. N., Gokhale, P. P., Amin, M. K., Seshadri, R. and Lalitha, V. S. 1996. Lithium inhibits growth in a murine neural precursor cell line. *Cell Biol. Int.* 20:781-786.
- Hwa, V., Oh, Y. and Rosenfeld, R. G. 1999. The insulin-like growth factor-binding protein(IGFBP)

- superfamily. *Endocr. Rev.* 20:761-787
22. Jones, J. I. and Clemmons, D. R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16:3-34.
 23. Kansra, S., Ewton, D. Z., Wang, J. and Friedman, E. 2000. IGFBP-3 mediates TGF beta 1 proliferative response in colon cancer cells. *Int. J. Cancer* 87:373-378.
 24. Kim, H. S., Ingermann, A. R., Tsubaki, J., Twigg, S. M., Walker, G. E. and Oh, Y. 2004. Insulin-like growth factor-binding protein 3 induces caspase-dependent apoptosis through a death receptor-mediated pathway in MSF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 64:2229-2237.
 25. Madiehe, A. M., Mampura, L. J. and Tyobeka, E. M. 1995. Induction of apoptosis in HL-60 cells by lithium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:768-774.
 26. Nissley, S. P. and Rechler, M. M. 1984. Insulin-like growth factors: biosynthesis, receptors, and carrier proteins. In *Hormonal Proteins and Peptides*, C. H. Li (Ed.), Academic Press, New York, USA., vol. 12:127-203.
 27. Lee C. Y., Kwak, I., Chung, C. S., Choi, W. S., Simmen, R. C. M. and Simmen, F. A. 2001. Molecular cloning of the porcine acid-labile subunit (ALS) of the insulin-like growth factor-binding protein complex and detection of ALS gene expression in hepatic and non-hepatic tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 26:135-144.
 28. Oh, Y., Muller, H. L., Ng, L. and Rosenfeld, R. G. 1995. Transforming growth factor-beta-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J. Biol. Chem.* 270:13589-13592.
 29. Rajah, R., Valentinis, B. and Cohen, P. 1997. Insulin-like growth factor(IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta 1 on programmed cell death through a p53-and IGF-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 272:12181-12188.
 30. Rechler, M. M. and Clemmons, D. R. 1998. Regulatory actions of insulin-like growth factor-binding proteins. *Tren. Endocrinol. Metab.* 9:176-183.
 31. Resnicoff, M., Sell, C., Rubini, M., Coppola, D., Ambrose, D., Baserga, R. and Rubin, R. 1994. Rat glioma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor-1(IGF-1) receptor are nontumorigenic and induce regression of wild-type tumors. *Cancer Res.* 54:2218-2222.
 32. SAS. 1996. *User's Guide: Statistics.* SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA.
 33. Saito, T., Akutsu, S., Urushiyama, T., Ishibashi, K., Nakagawa, Y., Shuler, C. F. and Yamane, A. 2003. Changes in the mRNA expressions of insulin-like growth factors, their receptors, and binding proteins during the postnatal development of rat masseter muscle. *Zool. Sci.* 20:441-447.
 34. Salzman, C. 2003. New uses for lithium and anticonvulsants. *Harv. Rev. Psychiatry* 11:230-244.
 35. Schuller, A. G. P., Groffen, C., van Neck, J. W., Zwarthoff, E. C. and Drop, S. L. S. 1994. cDNA cloning and mRNA expression of the six mouse insulin-like growth factor binding proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104:57-66.
 36. Trojan, J., Blossey, B. K., Johnson, T. R., Rudin, S. D., Tykocinski, M., Ilan, J. and Ilan, J. 1992. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4874-4878.
 37. Tso, J. Y., Sun, X. H., Kao, T. H., Reece, K. S. and Wu, R. 1985. Isolation and characterization of rat and human glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13:2485-2502.
 38. Tyobeka, E. M. and Becker, R. W. 1990. Growth and morphological changes induced by lithium chloride treatment of HL-60 Cell. *Biol. Int. Rep.* 14:667-679.
 39. Van Golen, C. M. and Feldman, E. L. 2000. Insulin-like growth factor is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 182:24-32.
 40. Wada, J., Liu, Z. Z., Alvares, K., Kumar, A., Wallner, E., Makino, H. and Kanwar, Y. S. 1993. Cloning of cDNA for the α subunit of mouse insulin-like growth factor I receptor and the role of the receptor in met-anephric development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10360-10364.
 41. Wang, L., Ma, X., Yeh, L-C. C. and Adamo, M. L. 2001. Differential regulation of IGF-binding protein gene expression by cAMP in rat C6 glioma cells. *Endocrinology* 142:3917-3925.
 42. Yang, Y. Y. W., Brown, A. L., Orlowski, C. C., Grahman, D. E., Tseng, L. Y., Romanus, J. A. and Rechler, M. M. 1990. Identification of rat cell lines that preferentially express insulin-like growth factor binding proteins-1, 2, or 3. *Mol. Endocrinol.* 4:29-38.
 43. 이철영. 1996. Insulin-like growth factor system의 생식기능에서의 역할: 자궁편. *대한불임학회지* 23: 247-268.
 44. 이철영. 2000. Insulin-like growth factor system과 성장, 대사 및 영양과의 관계. *동물자원지* 42: 795-816.
- (접수일자 : 2004. 5. 21. / 채택일자 : 2004. 8. 10.)