大韓獸醫學會誌(2006) 第46卷 第2號
Korean J Vet Res(2006) 46(2) : 97~105

MCF-7 cell에서 all-trans retinoic acid에 의한 insulin-like growth factor-I와 insulin-like growth factor binding protein-3 분비조절에 있어서 PKC-δ의 역할

이선미 · 김상훈 · 최광수[1] · 강창원*

전북대학교 수의과대학 생체안전성연구소
[1]우석대학교 동물자원학과

(게재승인: 2006년 5월 9일)

The roles of PKC-δ on the regulation of insulin-like growth factor(IGF)-I and insulin-Like growth factor binding protein-3 secretion by all-trans retinoic acid in MCF-7 cell

Sun-Mi Lee, Sang-Hoon Kim, Kwang-Soo Choi[1], Chang-Won Kang*

Bio-safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[1]Department of Animal Resources Science, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

(Accepted: May 9, 2006)

Abstract : All-trans retinoic acid (AtRA) induces growth inhibition and apoptosis in a variety of tumer cells, including MCF-7 cells. Insulin-like growth factors (IGFs) system has been reported to be associated with the development of cancer. Although MCF-7 cell with AtRA is to be the major stimulus for the cell growth and apoptosis, the mechanism of insulin-like growth factor-I (IGF-I)/insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) system remains to be elucidated. Thus, this study was conducted to the effect of AtRA on the gene expression and level of IGF-I and IGFBP-3. In addtion, we investigated the involvement of PKC-δ on the IGF-I and IGFBP-3 secretion in MCF-7 cell. AtRA($\geq 10^{-7}$ M) decreased the IGF-I secretion and mRNA expressions, but increased IGFBP-3 secretion and mRNA expressions in MCF-7 cells. Especially, the treatment of AtRA at 72 hours caused a significant reduction in the IGF-I secretion and mRNA expressions but increment in IGFBP-3 secretion and mRNA expressions ($p < 0.05$). 10^{-7} M AtRA activated PKC-δ that is one among PKC-ι, α, λ and δ in MCF-7 cell. Rotllerin, a PKC-δ inhibitor, blocked AtRA-induced inhibition of the IGF-I and mRNA expressions, and increase of IGFBP-3 and mRNA expressions in MCF-7 cell. Together, AtRA inhibited the IGF-I secretion and mRNA expressions, but increased IGFBP-3 secretion and mRNA expressions in MCF-7 cell. Furthermore, AtRA- induced alteration of IGF-I, IGFBP-3 secretion, and the gene expressions were mediated via PKC-δ activity.

Key words : AtRA, IGF-I, MCF-7, IGFBP-3, PKC-δ

서 론

Retinoid는 망막, 수정, 대사, 면역 생체의 분화 및 세포 증식에 깊이 관여하고 있는 vitamine A의 유도체로 잘 알려져 있다 [8, 27]. Retinoid의 3구성 요소로는 retinal, retinol 및 retinoic acid(RA)로써 각각의 생물학적 기능을 가지고 있다. All-trans RA(AtRA)는 retinal이나 retinol로 전환이 불가능하나 그 기능은 암세포의 apoptosis와 세

*Corresponding author: Chang-Won Kang
College of Veterinary Medivine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: +82-63-270-3715, Fax: +82-63-270-3780, E-mail: cwkang@chonbuk.ac.kr]

포 증식 억제에 깊이 관여하고 있지만 최근까지도 증식 억제에 대한 논란이 계속되고 있다 [30, 31]. 또한 AtRA에 대한 생체 내 부작용 및 독성 역시 간과하지 않을 수 없다. 특히 그 독성은 발생단계의 랫트에서 AtRA의 다량투여가 많은 기형이 유발될 수 있음이 알려짐에 따라 임상적인 적용이 매우 신중하지 않을 수 없다 [8, 29]. 그럼에도 불구하고 AtRA는 임상학적으로 항암치료에 폭넓게 사용함으로써 그 유용성이 매우 크다고 할 수 있다. 특히 피부, 폐, 방광, 유선 및 소화기 등의 다양한 장기에 암이 유발될 경우에 AtRA는 광범위한 치료약물로서의 사용 가능성이 일찍이 보고되었다 [5, 24, 31]. 또한 AtRA는 유방암의 증식 및 억제에 estrogen, cyclin D, RAR-β, AP-1, PKC 및 PKC-α 활성이 관여하고 있으며 [2, 7, 20, 33], 특히, PKC-α 와 -δ는 암세포에서 증식과 분화에 깊이 관여하고 있음은 이미 보고되어 있다 [16].

Insulin-like growth facter-I(IGF-I)은 강력한 세포 증식과 암세포 apoptosis 억제 인자로써 생체 대사와 세포 성장 인자로 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다 [33]. 또한 IGF-I 활성을 조절하는 IGF binding proteins (IGFBPs)은 최소한 6 subtypes으로 구성되어 있으며, 그 중 하나인 IGFBP-3은 IGF-I 활성에 관여함으로써 암세포 증식를 억제한다고 보고되었다 [15]. 그러나 다른 연구에서는 IGFBP-3가 독립적으로 암세포 증식 억제에 관여한다는 보고 [26]와 같이 아직 그 기능 및 역할이 명확하지 않은 상태이다. IGF-I와 IGFBP-3 분비의 자극은 성장호르몬, steroid hormone, 및 vitamine D_3 등이 관여한다고 알려져 있으며 [15], 특히 MCF-7 cell에서 AtRA는 IGFBP-3 분비를 자극한다고 보고하였다 [1]. 그러나 MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 세포증식 억제가 IGF-I과 IGFBP-3 분비에 미치는 영향과 그 분비 기전에 대한 경로가 아직 명확하지 않은 상태이다. 따라서 본 연구자는 AtRA가 MCF-7 cell에서 IGF-I과 IGFBP-3 분비에 어떠한 영향이 있는지를 유전자 및 단백질 수준에서 관찰하고 이러한 분비 기전이 PKC isoforms 중 어떠한 isoform이 관련되어 있는지를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양

실험에 사용한 유방암세포는 MCF-7 cell이며, Korea Cell Line Bank(KCLB)를 통하여 구입하였다. 세포배양은 10% FBS(Hyclone, USA), 4 mM glutamine 및 25 mM HEPES가 첨가된 RPMI 1640(Sigma, USA) 배지에 5×10^5 cells/cm^2를 6 cm petri dish에 넣은 다음 2일간 5% CO_2 배양기에 배양하였다. 그 후 현미경으로 confluence 세포를 확인한 후 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 2회 세척한 다음 0.2% BSA가 첨가한 무혈청 RPMI 1640 배지에 옮겨 약물과 함께 배양하였다.

IGF-I 분석

약물을 처리한 MCF-7 세포의 배양배지의 상층액을 분리하여 Jin 등 [14]의 방법에 의하여 IGF-I을 분석하였다. 이를 요약하면, 우선 전처리로 시료 200 μl에 acid-ethanol(2 M HCl : ethanol = 1 : 7) 800 μl를 첨가한 후 3,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심 분리하여 IGF-I을 분리하였다. 전처리한 시료 100 μl에 polyclonal anti-IGFs (Gro-Pep, Australia) 50 μl를 첨가하고 60분 후에 조제된 [^{125}I]-IGF-I(20000 cpm/100 μl)를 100 μl씩 혼합하여 각각의 시험관에 4°C 18시간 반응시켰다. 그 후 말 혈청 50 μl와 12% polyethylene glycol #8000(PEG) 1 ml (Sigma, USA)을 첨가하여 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter(Packard, USA)로 측정하였다.

Western Blotting

시료내 IGFBPs를 관찰하기 위한 Western Ligand Blot (WLB) 분석을 이용하여 시행하였으며 [13], 이를 검증을 하기 위한 Western immuno blotting은 Lee 등의 방법에 의하여 수행되었다 [19]. 이를 요약하면, 배지를 제거한 MCF-7 세포를 각기 150 μl의 lysis buffer(10X PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A)를 처리하여 균질화를 시켰다. 균질화된 세포를 40 μg의 단백질을 정량하여 10% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidine difluoride membrane에 transfer하였다. membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 blocking을 시켰고, Primary Anti body를 1% skim milk에 1 : 250 ~ 1 : 1000의 비율로 희석하여 4°C에서 18시간 이상 incubation하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/TBS에 10분 간격으로 3번 washing을 하였고, membrane을 1% skim milk에 3,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled secondary antibody에 1시간 동안 incubating한 후, 3번 washing을 거쳐서 ECL solution(Santa Cruz, USA)을 처리한 다음 X-ray 필름에 노출시켜 현상하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

RNA 분리 및 RT-PCR은 LEE 등의 방법에 의하여 수행되었다 [19]. 합성된 IGFs cDNA 10 μl에 Taq-polymerase 효소반응액(10 × buffer(5 μl), 500 μM dNTP(5 μl), 25 mM $MgCl_2$(3 μl), Taq-polymerase(0.25 μl, 5 U/μl)을 첨가하고

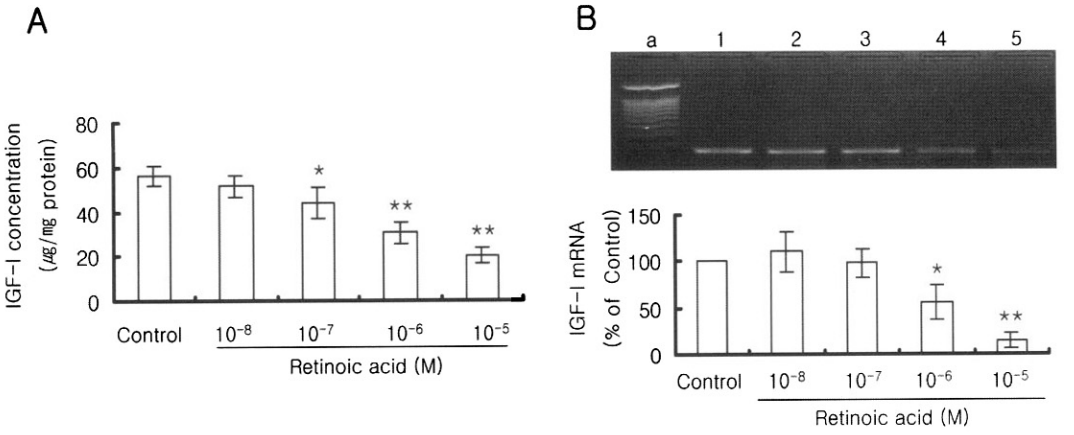

Fig. 1. Effects of AtRA on IGF-I concentration (A) and gene expresion (B) in MCF-7 cells. IGF-I concentrations was determined by RIA. MCF-7 cells were treated with vehicle (control, Lane 1), 10^{-8} M (Lane 2), 10^{-7} M (Lane 3), 10^{-6} M (Lane 4), and 10^{-5} M (Lane 5) AtRA using RT-PCR. Densitometric analysis was performed to compare each band (B, lower panel). All values are presented as the mean ± SD (n = 7), $*p < 0.05$ *vs.* control; $**p < 0.01$ *vs.* control a: DNA marker.

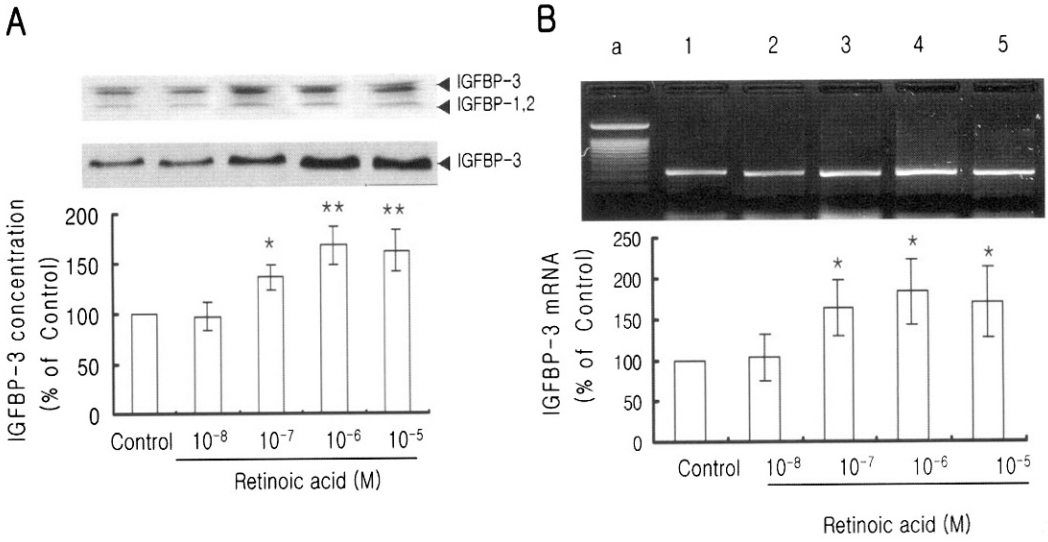

Fig. 2. Effects of AtRA on IGFBP-3 concentration (A) and gene expresion (B) in MCF-7 cells. Equal amounts (40 μg) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-IGFBP-3. MCF-7 cells were treated with vehicle (control, Lane 1), 10^{-8} M (Lane 2), 10^{-7} M (Lane 3), 10^{-6} M (Lane 4), and 10^{-5} M (Lane 5) AtRA using RT-PCR and western blotting. Densitometric analysis was performed to compare each band (B, lower panel). All values are presented as the mean ± SD (n = 7), $*p < 0.05$ *vs.* control. a: DNA marker.

IGF-I cDNA에 특이적으로 반응하는 IGF-I sense 5'-CAC AGG GTA TGG CTC-3' ; antisense, 5'-CTT CTG GGT CTT GGG-3'(anti-sense)를 각각 1 μl(10 pM) 첨가하여 94 °C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1 min 조건에서 30 cycles로 증폭하였으며, IGFBP-3 cDNA에 특이적으로 반응하는 primer sence, 5'-CTC TCC CAG GCT ACA CCA-3'; antisence,5'-GAA GTC TGG GTG CTG TGC-3'를 각각 1 μl(10 pM) 첨가하여 94°C/1 min, 61°C/1 min, 72°C/1 min 조건에서 30 cycles로 증폭한 후 2% agarose gel 상에서 발현량을 조사하였다.

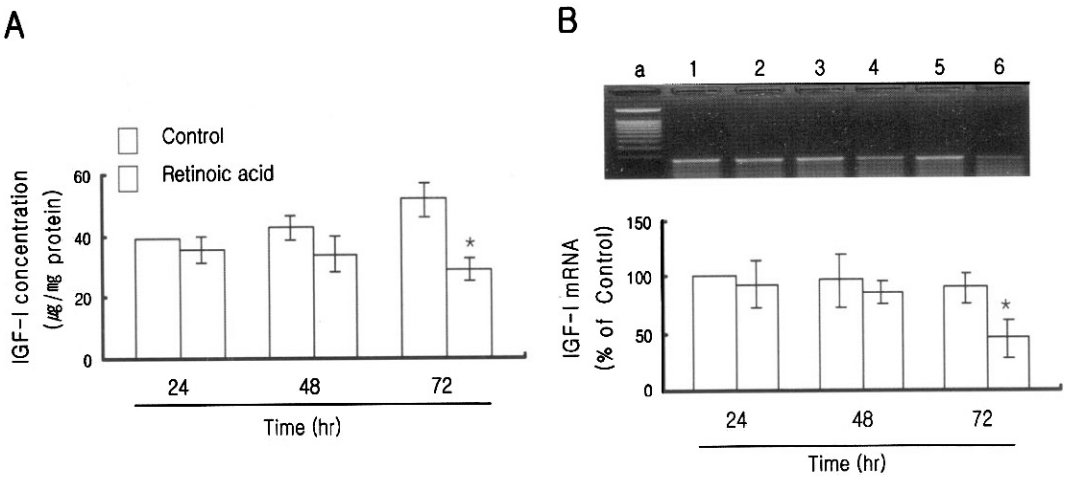

Fig. 3. Time course effect of AtRA on IGF-I concentration (A) and gene expression (B). MCF-7 cells were treated with AtRA (10^{-7} M) at 24, 48 and 72 h. Densitometric analysis was performed to compare each band (B, lower panel). a: DNA marker, 1: 24 h Control, 2: 24 h AtRA, 3: 48 h Control, 4: 48 h AtRA, 5: 72 h Control, 6: 72 h AtRA. All values are presented as the mean ± SD (n = 7). *$p < 0.05$ *vs* control.

통계처리

이 실험에서 측정한 결과는 means ± SD로 나타내었고 group간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하였으며, ($p < 0.05$) 경우를 유의한 차이로 인정하였다.

결 과

MCF-7 cell에서 AtRA가 IGF-I와 IGFBP-3 분비 및 유전자발현에 미치는 효과

MCF-7 세포에 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} 및 10^{-8} M AtRA를 72시간 처리하였다. 그림 1A에서와 같이 AtRA 처리군은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 IGF-I 분비를 감소시켰으며 특히 10^{-7} AtRA 처리군 부터 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 관찰하였다. 이때 IGF-I 유전자 발현 역시 AtRA 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 10^{-6} M AtRA 처리군 부터 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 관찰하였다(Fig. 1B). 이어 MCF-7cell에 AtRA를 처치한 후 IGFBPs를 분류하기 위하여 Western lagnd blotting 기법을 사용한 결과 IGFBP-3, -1 및 -2가 관찰되었고 이 중 AtRA 농도에 따라 IGFBP-3 증가를 관찰하여(Fig. 2A) 이를 입증하기 위하여 western immuno-blotting를 통하여 IGFBP-3 분비 변동을 관찰하였다(Fig. 2A). 그 결과 유방암세포에서 IGFBP-3 분비는 10^{-7} M AtRA부터 대조군에 비하여 유의성 있는 증가($p < 0.05$)를 확인하였다(Fig. 2A).

또한 MCF-7 cell에 AtRA처리는 IGFBP-3 mRNA 유전자 발현 역시 IGFBP-3 분비 양상과 유사하게 증가하였다(Fig. 2B, $p < 0.05$). 10^{-7}M AtRA를 MCF-7 cell에 24, 48 및 72시간 처리한 결과 72시간 AtRA 처리군에서 IGF-I과 IGF-I mRNA 발현이 유의하게 감소($p < 0.05$)하였으며(Fig. 3), 이에 반하여 IGFBP-3 분비와 IGFBP-3 mRNA 발현은 대조군에 비하여 유의하게 증가($p < 0.05$)됨을 관찰하였다(Fig. 4).

MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 PKC isoforms의 변화

MCF-7 cell에서 AtRA를 24, 48 및 72시간 처리한 후 이때 PKC isoforms인 PKC-α, δ, ι 및 λ를 측정하였다. 그 결과 PKC-α, ι 및 λ는 24, 48 및 72시간 모두에서 대조군과 차이를 관찰할 수 없었으나, AtRA 72시간에서 PKC-δ가 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 5).

MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 IGF-1와 IGFBP-3 분비 및 mRNA 발현 변동과 PKC-δ 관련성

MCF-7 cell에서 IGF-1와 IGFBP-3 분비 및 유전자 발현 변동이 PKC-δ와 어떠한 관련이 있는지를 구명하기 위하여 MCF-7 cell에 10^{-7} M AtRA를 72시간 처리하고 여기에 PKC-δ 억제제인 rottlerin(10^{-7} M)을 처리하였다. 이 연구 결과 AtRA에 의하여 증가된 PKC-δ 활성이 rottlerin에 의하여 억제되었다(Fig. 6A). AtRA에 의하여 감소된 IGF-I 분비와 IGF-I 유전자 발현은 rottlerin에 의하여 차단되었다($p < 0.01$)(Fig. 6, B and C). 또한 AtRA에 의하여 유의하게 증가($p < 0.05$)된 IGFBP-3 분비와

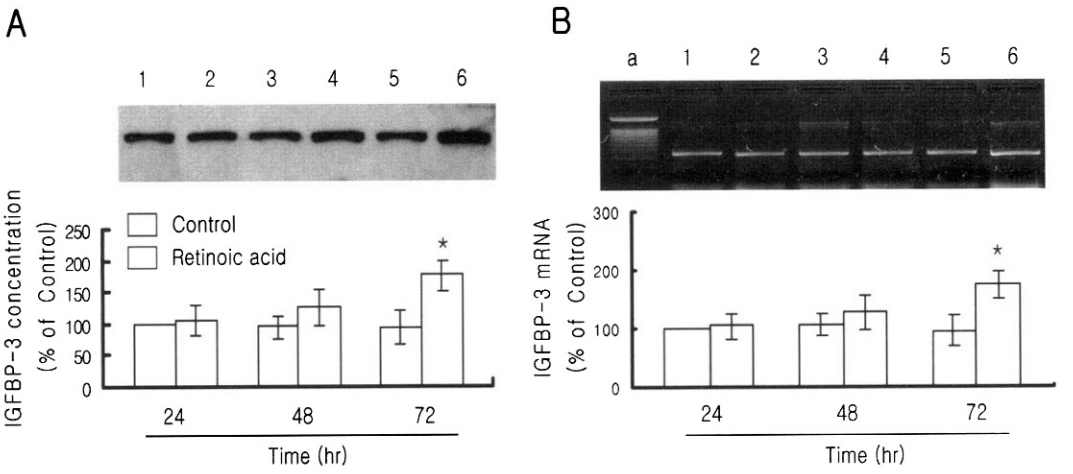

Fig. 4. Time course effect of AtRA on IGFBP-3 concentration (A) and gene expression (B). MCF-7 cells were treated with AtRA (10^{-7} M) at 24, 48 and 72 h. Equal amounts (40 μg) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-IGFBP-3. Densitometric analysis was performed to compare each band. a: DNA marker, 1: 24 h Control, 2: 24 h AtRA, 3: 48 h Control, 4: 48 h AtRA, 5: 72 h Control, 6: 72 h AtRA. All values are presented as the mean ± SD (n = 7). *$p < 0.05$ *vs* control.

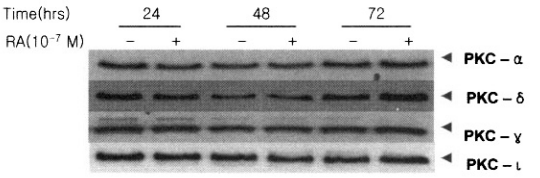

Fig. 5. Effects of AtRA on PKC isoforms activity at 24, 48 and 72 h in MCF-7 cells. Equal amounts (40 μg) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-PKC isoforms (n = 7). RA, retinoic acid.

mRNA 발현은 rottlerin에 의하여 역시 차단됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

MCF-7 cell에서 AtRA가 IGF-I과 IGFBP-3 분비에 어떠한 연관성 있으며, 그 분비가 PKC중 어떠한 PKC isoform를 경위하는지는 아직 잘 알려져 있지 않다. 따라서 이 연구는 MCF-7 cell에서 AtRA가 IGF-I와 IGFBP-3 분비 및 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치며 이러한 분비 변동이 PKC중 어떠한 PKC isoform이 관여 하는지를 연구하였다.

우선 MCF-7 cell에서 AtRA를 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} 및 10^{-8} M 처리한 결과 농도 의존적으로 IGF-I 분비와 mRNA가 억제하였고, 특히 10^{-7} M AtRA을 72시간 처리하였을때 그 분비가 유의성 있게 억제 되었다. MCF-7 cell는 IGF-I을 생산하고 자가 분비하는 세포로서 [10, 22] MCF-6 cell에 AtRA 처리는 직접적인 세포증식 억제에 관여하고 있음을 여러 연구자들에 의하여 보고되었다 [5, 26, 31]. 이러한 상기 연구자들의 보고와 이 연구을 종합하면 AtRA에 의한 세포 증식 억제와 10^{-7} M AtRA에 의한 IGF-I 분비 감소는 깊은 연관성이 있음은 의심할 여지가 없으며, 이러한 분비 억제는 IGF-I mRNA 발현 억제에 의하여 이루어짐을 알 수가 있었다. 또한 MCF-7 cell에서 IGF-I 분비와 유전자 발현의 유의성 있는 감소 시간은 10^{-7} M AtRA 처리 후 72시간이며, 이는 MCF-7 cell에서 AtRA 처리에 의한 암세포 억제가 72시간에 관찰된 다른 연구자의 [4] 보고와 일치하였다. 그러나 Stephen 등의 1 μM AtRA 96시간 처리가 MCF-7 cell 증식 억제를 감소시킨다는 보고와 차이가 있었다 [32]. 이는 세포 배지의 조건, AtRA농도 및 시간 차이에 의한 것으로 사료된다.

MCF-7 cell에서 AtRA에 대한 IGFBP-3 증가는 IGF/IGFs-receptor 변동과 RA receptors가 작용하여 세포 증식을 억제시킬 수 있음을 보고하였다 [1, 11]. 또한 IGFBP-3 분비 증가는 IGF-I DNA 억제와 암세포 증식 억제에 관여하고 [6], MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 IGF-I 분비 억제는 IGFBP-3 gene promotor가 관여하고 있음을 보고하였다 [3]. 이 연구는 MCF-7 cell에 10^{-7} M AtRA

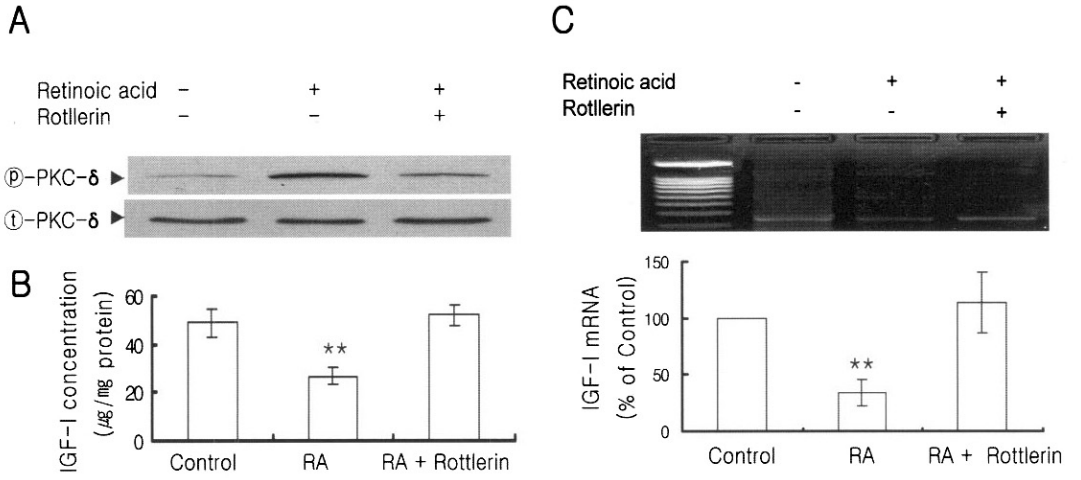

Fig. 6. Effects of PKC-δ inhibitor, rottlrin on AtRA-induced PKC-δ activity (A), IGF-I concentration (B) and its gene expresion (C) in MCF-7 cells. Equal amounts (40 μg) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-PKC δ. Densitometric analysis was performed to compare each band. All values are presented as the mean ± SD (n = 7). $^{**}p < 0.01$ *vs* control. ⓟ-PKC-δ, phospho-PKC-δ; ⓣ-PKC-δ, total-PKC-δ; RA, retinoic acid.

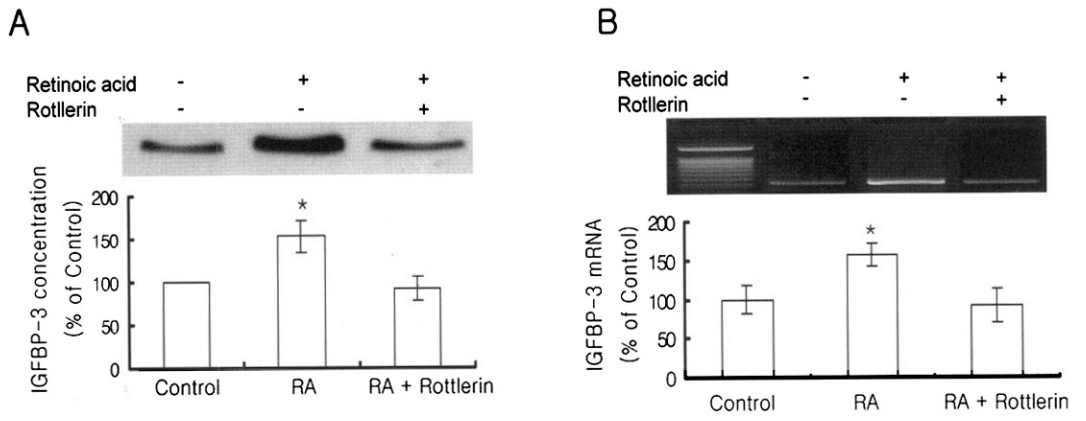

Fig. 7. Effects of PKC-δ inhibitor, rottlerin on AtRA-induced IGFBP-3 concentration (A) and gene expresion (B) in MCF-7 cells. Equal amounts (40 μg) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted with an anti-IGFBP-3. Densitometric analysis was performed to compare each band. All values are presented as mean ± SD (n = 7). $^{**}p < 0.05$ *vs* control. RA, retinoic acid.

로 자극하면 IGFBP-3 분비와 mRNA 발현이 증가됨을 확인하였으며, 특히 72시간에 현저한 증가를 관찰하였다. 이는 상기 연구자들의 MCF-7 cell에서 AtRA 처리가 IGFBP-3 분비를 증가시킨다는 연구 결과와 일치하였다. 더욱이 이 연구 결과는 IGFBP-3 분비 변동이 IGF-I 분비에 영향을 미칠 수 있음을 암시하였으며, MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 IGFBP-3 분비 증가가 IGF-I DNA 감소와 암세포 증식 억제에 깊은 연관성이 있으며, AtRA에 의한 IGF-I 분비의 억제는 IGFBP-3 gene promoter를 자극할 수 있음을 시사하였다. 그러나 Oh 등 [26]이 보고한 IGFBP-3가 IGF-I와 관계없이 세포 증식 및 억제에 직접 관여 할 수 있는 가능성은 앞으로 더욱 연구를 진행시켜야 할 것으로 사료된다.

한편 MCF-7 cell에서 IGF-I와 IGFBP-3 분비 자극은 PKC 활성이 관여하고 있으나 [2, 7, 9, 17, 18], 어떠한 PKC isoform이 관여하고 있는지는 보고되지 않았다. 그

러나 호르몬의 신호전달계에서 PKC는 다양한 PKC isoform에 따라 그 분비와 특성이 달라지며, 특히, PKC-α, β 및 γ는 세포내 Ca^{2+} 존재에 의하여 활성화되고, PKC-δ, -ε, -θ 및 -η는 세포내 Ca^{2+}과 관계없이 활성화됨이 보고되었다 [25]. 이러한 PKC isoforms은 그 종류에 따라 세포 증식, 억제 및 apoptosis에 관여한다고 보고하였다 [23]. 또한 MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 세포 증식 억제는 PKC-α, PKC-δ 및 IGFBP-3의 자극이 관여한다고 보고하였으며 [16, 28], Kambhampati 등은 AtRA에 의한 MCF-7 cell 증식 억제는 PKC-δ가 관여하고 있음을 보고하였다 [16]. PKC-α는 epidermal growth factor-transforming를 활성화 시키며, PKC-δ는 tumor suppressor gene을 활성화 시킨다고 보고하였고 [12], Mandil 등은 glima cells에서 PKC-α와 δ의 작용이 세포 증식과 억제에 있어서 그 기전이 상반된다고 보고하였다 [21]. 이는 MCF-7 cell에서도 PKC isoforms에 의하여 세포 증식과 억제가 서로 상반되게 작용할 수 있음을 암시하였다. 따라서 이 연구에서 10^{-7}M AtRA를 MCF-7 cell에 처리한 결과 PKC중 PKC-δ가 활성화됨을 관찰하였다. 이는 MCF-7 cell 증식 억제가 PKC isoform중 PKC-δ가 관련성이 있다는 상기 보고와 일치하였다. 더욱이 MCF-7 cell에서 AtRA에 의한 IGF-I, IGFBP-3 분비 및 mRNA 발현 변동에 PKC-δ 활성이 tumor suppressor gene을 활성화시킴으로서 증식 억제와 분비에 관여할 수 있음을 암시하였다.

따라서 이 연구 결과는 MCF-7 cell에서 AtRA가 IGF-I와 IGFBP-3 mRNA 발현에 관여하며, 이는 세포내 IGF-I 분비 억제와 IGFBP-3 분비 증가에 관여하고 그 분비 기전은 PKC isoforms 중 PKC-δ가 관련되어 있음을 알 수가 있었다. 앞으로 유방암세포에서 AtRA에 의한 IGFs system의 구명은 유방암치료에 있어서 AtRA 사용에 괄목할 만한 영향을 미칠 수 있으며, 더욱이 IGF-I/IGFBP-3 분비가 암세포의 증식 및 억제에 중요하게 관여함으로써 암 조기 진단의 지표로써 활용될 수 있음을 시사하였다.

결 론

MCF-7 cell에서 AtRA는 세포 성장과 apopt-osis에 관여하고 IGF-I/IGFBP-3 역시 생체 증식과 분화에 관여하고 있음은 이미 잘 알려진 사실이다. 그러나 MCF-7 cell에서 AtRA가 세포 증식과 관련하여 IGF-I와 IGFBP-3 분비 및 그 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 이 연구는 MCF-7 cell에서 AtRA가 IGF-I과 IGFBP-3 분비에 어떠한 영향을 미치는지를 유전자와 단백질 수준에서 관찰하고 이러한 분비 기전이 어떠한 PKC isoforms이 관련되어 있는지를 밝히고자 하였다.

MCF-7 cell에서 AtRA($\geq 10^{-7}$M)는 IGF-I 분비와 mRNA 발현을 억제하였고 IGFBP-3 분비와 mRNA 발현을 증가시켰다. 특히, 72시간 10^{-7}M AtRA 처리군이 대조군에 비하여 IGF-I 분비와 mRNA 발현이 유의성있게 감소하였으나($p < 0.05$), IGFBP-3 분비와 mRNA 발현은 증가하였다($p < 0.05$). 또한 유방암세포에서 10^{-7}M AtRA를 72시간 처리하면 PKC isoforms(PKC α, δ, ι 그리고 λ)중 PKC-δ가 활성화 하였다. 또한 유방암세포에서 AtRA에 의한 IGF-I 분비와 mRNA 발현 감소 및 IGFBP-3 분비와 mRNA 발현 증가는 PKC-δ 억제제인 rottlerin에 의하여 차단되었다.

이를 종합하면, MCF-7 cell에 AtRA는 IGF-I 분비와 mRNA 발현 억제 및 IGFBP-3 분비와 mRNA 발현 증가를 유발시키며, 이러한 변동은 PKC isoforms중 PKC-δ가 관여하고 있음을 관찰하였다.

참고문헌

1. **Adamo ML, Shao ZM, Lanau F, Chen JC, Clemmons D, Roberts CT, LeRoith D, Fontana JA.** Insulin-like growth factor-I(GF-I) and retinoic acid modulation of IGF-binding proteins(IGFBPs). IGFBP-2,-3 and 4 gene expression in a breast cancer cell line. Endocrinology 1992, **131,** 1858-1866.
2. **Agadir A, Chen G, Bost F, Li Y, Mercola D, Zhang X.** Differential effect of retinoic acid on growth regulation by phorbol ester in human cancer cell lines. J Biol Chem 1999, **15,** 29779-29785.
3. **Albiston AL, Saffery R, Herington AC.** Cloning and characterization of the promoter for the rat insulin-like growth factor-binding protein-3 gene. Endocrinology 1995, **136,** 696-704.
4. **Bentel JA, Lebwohl DE, Cullen KJ, Mark S, Rosen RN, Rubin MS, Mendelshon J, Miller WH.** Insulin-like Growth Factors medulate the growth inhibitory effects of retinoic acid on MCF-7 breast cancer cells. J Cell Physiol 1995, **165,** 212-221.
5. **Blomhoff R, Green H, Norum, KR.** Vitamine A , Physiological and biochemical processing. Annu Rev Nutr 1992, **12,** 37-57.
6. **Chen JC, Shao ZM, Sheilh MS, Hussain A, LeRoith D, Charles T, Roberts JR, Fontana JA.** Insulin-like growth factor-binding protein enhancement of insulin-like growth factor-I(IGF-I)-mediated DNA synthesis and IGF-I binding in a human breast carcinoma cell line. J Cell Physiol 1994, **158** 69-78.

7. **Cho Y, Tighe AP, Talmage DA.** Retinoic acid induced growth arrest of human breast carcinoma cells requires protein Kinase C alpa expression and activity. J Cell Physiol 1997, **172,** 306-313.
8. **Chytil F.** Retinoic acid biochemistry, pharmacology, toxicology and therapeutic Use. Pharmacol 1984, **36,** 938-978.
9. **Eggo MC, Sheppard MC, Evans FJ, Lord JM.** Phorbol ester showing selective activation of PKC isozymes in vitro regulate thyroid function and insulin-like growth factor binding protein secretion. Cell Signal 1994, **6,** 439-448.
10. **Freed KA, Herington AC.** Insulin-like growth factor-I and its autocrine role in growth of MCF-7 human breast cancer cells in culture. J Mol Endocrinol 1989, **3,** 183-190.
11. **Grimberg A, Cohen P.** Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. J Cell Physiol 2000, **183,** 1-9.
12. **Hornia A, Lu Z, Sukezane T, Zhong M, Joseph T, Frankel P, Foster DA.** Antagonistic effects of protein kinase C alpha and delta on both transformation and phospholipase D activity mediated by the epidermal growth factor receptor. Mol Cell Biol 1999, **19,** 7672-7680.
13. **Hossenlopp P, Segovia B, Lassare C, Roghani M, Bredon M, Binoux M.** Enzymatic evidence of degradation of insulin-like growth factor binding protein in 150K complex during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1990, **71,** 797-805.
14. **Jin SJ, Park SH, Cho NP, Kang CW.** Changes of the maternal insulin-like growth factors system in pregnant rats during perinatal periods. Korean J Vet Res 2003, **43,** 383-392.
15. **Jones JI, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. Endoc Rev 1995, **16,** 3-35.
16. **Kambhampati S, Li Y, Verma A, Sassano A, Majchrzak B, Parmer S, Giafis N, Kalvakolanu DV, Rahman A, Uddin S, Tallman MS, Fish EN, Pjatanias LC.** Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. J Biol Chem 2003 **29,** 32544-32551.
17. **Kimura M, Ogihara M.** Effects og IGF-I and II on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. Eur J Pharmacol 1998, **354,** 271-281.
18. **Lanson M, Besson P, Bougnoux P.** Supplementation of MCF-7 cells with essential fatty acids induces the activation of protein kinase C in response to IGF-1. J Lipid Mediat Cell Signal 1997, **16,** 189-197.
19. **Lee SM, Kang CW.** Effects of ethanol on secretion of insulin-like growth factor-I(IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-1(IGBP-1) in primary rat hepatocytes: Involvement of lipid peroxidase(LPO) activity, Korean J Lab Anim Sci 2004, **20,** 391-397.
20. **Liu Y, Lee MO, Wang HG, Li Y, Hashimoto Y, Klaus M, Reed JC, Zhang X.** Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. Mol Cell Biol 1996, **16,** 1138-1149.
21. **Mandil R, Ashkenazi E, Blass M, Kronfeld I, Kazimirsky G, Rosenthal G, Umansky F, Lorenzo PS, Blumberg PM, Brodie C.** Protein kinase C-alpa and protein kinase C-delta play opposite roles in the prpoliferation and apoptosis of glioma cells. Cancer Res 2001, **61** 4612-4619.
22. **Marc E, Lippman, Robert B, Dickson, Attan K, Edward G, Nancy D, Mary M, Karen H, Diane B, Susan B, Sandra S, Cornelius K.** Autocrine and paracrine growth regulation of human breast cancer. J Steroid Biochem 1986, **24,** 147-154.
23. **Mellor H and Parker PJ.** The extended protein kinase C superfamily. Biochem J 1998, **332,** 281-292.
24. **Muindi J.F., Frankel SR, Huselton, C.** Clinical pharmacology of oral all-trans-retinoic acid in patient with acute promyelocytic leukemia. Canncer Res 1992, **52,** 2138-2142.
25. **Newton AC.** Regulation of protein kinase C. Curr Opin Cell Biol 1997 **9,** 161-167.
26. **Oh Y, Muller HL, Lamson G, Rosenfeld RG.** Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. Biol Chem 1993, **15,** 14964-14971.
27. **Ortiz MA, Bayon Y, Franciso J. Lopez-Hernandez, Piedrafita FJ.** Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives. Drug resistance updates 2002, **5,** 162-175.
28. **Pattison ST, Fanayan S, Martin JL.** Insulin-like growth factor binding protein-3 is secreted as a phosphoprotein by human breast cancer cells. Mol Cell Endocrinol 1999, **156,** 131-139.
29. **Sani, BP, Meek RG.** Subacute toxicity of all-trans- and

13-cis-isomers of N-ethyl retinamide, N-2-hydroxyethyl retinamide, and N-4-hydroxyethyl retinamide. Toxicol Appl Pharmacol 1983, **70,** 228-235.

30. **Shang Y, Baumrucker CR, Green MH.** Signal relay by acid receptors alpa and beta in the retnoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 breast cancer cells. J Biol Chem 1999, **274,** 18005-18010.
31. **Sporn, MB, Roberts AB.** Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 1984, **73,** 1381-1387.
32. **Stephen R, Darbre PD.** Loss of growth inhibitory effects of retinoic acid in human breast cancer cells following long-term exposure to retinoic acid. British J Cancer 2000, **83,** 1183-1191.
33. **Stewart CE, Rotwein P.** Growth, differentiation, and survival. multiple physiological functions of insulin-like growth factors. Physiol Rev 1996, **76,** 1005-1026.
34. **Zhou Q, Stetler-Stevenson M, Steeg PS.** Inhibition of cyclin D expression in human breast carcinoma cells by retinoids in vitro. Oncogene 1997, **3,** 107-115.