Insulin-Like Growth Factor-I Induces Androgen Receptor Coactivator Expression in Skeletal Muscle Cells through the p38 MAPK and ERK1/2 Pathways

Chan Ho Park², Hye Jin Kim¹, Tae Un Kim² and Won Jun Lee^{1*}¹Department of Exercise Science, College of Health Sciences, Ewha Womans University, 120-750 Seoul, Korea²Department of Physical Education, Pusan National University, Busan 609-736, Korea

Received October 15, 2010 / Accepted November 17, 2010

Although insulin-like growth factor-I (IGF-I) and androgen receptor (AR) coactivators are well known effectors of skeletal muscle, the molecular mechanism by which signaling pathways integrating AR coactivators and IGF-I in skeletal muscle cells has not been previously examined. In this study, the effects of IGF-I treatment on the gene expression of AR coactivators in the absence of AR ligands and the roles of the p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in IGF-I-induced AR coactivators induction were examined. C2C12 cells were treated with 250 ng/ml of IGF-I in the presence or absence of specific inhibitors p38 MAPK (SB203580) or ERK1/2 (PD98059). Treatment of C2C12 cells with IGF-I resulted in increased in GRIP-1, SRC-1, and ARA70 protein expression. The levels of GRIP-1, SRC-1, and ARA70 mRNA were also significantly increased after 5min of IGF-I treatment. IGF-I-induced AR coactivator proteins were significantly blocked by pharmacological inhibitors of p38 MAPK and ERK1/2 pathways. However, there was no significant effect of those inhibitors on IGF-I-induced mRNA level of AR coactivators, suggesting that AR coactivators are post-transcriptionally regulated by IGF-I. Furthermore, the present results suggest that IGF-I stimulates the expression of AR coactivators by cooperative activation of the p38 MAPK and ERK1/2 pathways in C2C12 mouse skeletal muscle cells.

Key words : IGF-I, androgen receptor coactivator, p38 MAPK, ERK1/2, C2C12 skeletal muscle cell

서론

엔드로젠(androgen)은 근육과 뼈를 비롯한 체내의 다양한 조직들에 있어 동화작용(anabolic effect)을 하며 특히 골격근의 발달, 크기 및 부피 유지에 매우 중요한 물질이다 [1,3]. 엔드로젠 수용체는 핵 수용체과(nuclear receptor super-family)의 하위구성원인 스테로이드 수용체(steroid receptor)에 속하며[23], 대표적인 리간드 의존적 전사인자(ligand-dependent transcriptional factor)로써 자신의 리간드인 엔드로젠과의 결합 이후 그 생물학적 기능을 수행한다 [3]. 엔드로젠 수용체는 비활성 상태, 즉 리간드와 결합 전 상태에는 복합체(complex)를 형성하여 세포질(cytoplasm)에 존재하고 있다가 리간드와 결합 이후 HSPs를 분리시키고 핵으로 이동(translocation)하여 DNA 내에 엔드로젠 수용체를 인지하는 특정 염기서열인 엔드로젠 반응요소(androgen response elements, ARE)에 결합하게 된다[30,37]. 이러한 엔드로젠 수용체의 활성화는 골격근 관련 전사인자들과의 상호 작용을 촉진시켜 근 비대 기전에 중요한 역할을 하는 유전자들의 발현을 증가시키는 것으로 보고되고 있다[24].

엔드로젠 수용체의 스테로이드는 노인들이나, 장기간 침상 생활로 인해 근 부피가 소실된 환자들, 또는 알레르기, 염증 질환, 자가 면역질환의 면역 억제요법 등에 널리 이용 되어 왔으나 스테로이드의 이화작용(catabolism)에 의해 오히려 체중저하와 근 질량이 감소되는 근 위축을 유발시킨다고 보고되었다[34]. 이와 같은 각종 동화작용 스테로이드 주입의 부작용에 대한 심각성 제기 연구 있으며, 스테로이드 치료에 있어 다양한 성장인자들과 같은 대체 물질과 운동 중재의 필요성이 제기되고 있다. 이에 관련하여 최근에는 엔드로젠 수용체가 전립선 암 세포에서 리간드 비의존적(ligand-independent)으로 epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I), keratinocyte growth factor (KGF) 등의 성장인자들에 의해 활성화 된다는 연구가 보고된바 있고[7,10,16], 근육 세포인 C2C12 세포에서도 엔드로젠 물질 없이 IGF-I에 의해 엔드로젠 수용체가 리간드 비의존적으로 활성화 되었다는 연구가 보고되었다[21].

엔드로젠 수용체가 리간드와 결합하여 근육 세포 내에서 활성화되고, 엔드로젠 수용체 목표 유전자들의 발현을 조절하는 일련의 분자적 기작에 있어 중요한 역할을 하는 것이 엔드로젠 수용체 보조인자(coregulator)이며[28], 약 130여 개 이상의 coactivator 또는 corepressor로 구성되어있다. 그 중 coactivator는 엔드로젠 수용체 전사인자들의 전사 개시

*Corresponding author

Tel : +82-2-3277-2563, Fax : +82-2-3277-2846

E-mail : jun@ewha.ac.kr

전(pre-initiation) 단계에서 리간드와 결합한 엔드로젠 수용체 이합체(dimer)의 결합을 안정화(stabilization) 시키고 전사 활성화를 촉진시키는 역할을 한다[18,23,24].

p160 coactivators는 steroid receptor cofactor family로도 불리며, 크기가 160 kDa인 3가지 coactivator들을 일컫는데, steroid receptor coactivator 1 (SRC-1), glucocorticoid receptor interacting protein-1 (GRIP-1/TIF2/SRC-2), amplified in breast cancer-1 (AIB-1/SRC-3)으로 구성되어있다[2,33]. SRC-1은 엔드로젠 수용체와의 결합을 통해 엔드로젠 수용체를 리간드 비의존적으로도 활성화 시킨다고 보고되어있다[32]. GRIP-1 역시 엔드로젠 수용체의 전사 활성화에 필수적인 요소이며, 엔드로젠 수용체의 활성화와 상관없이 엔드로젠 수용체 비의존적(AR-independent)으로도 사람의 전립선 암 세포의 증식에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다[18]. Androgen receptor associated protein 70 (ARA70)은 다른 coactivator에 비해 엔드로젠 수용체와 가장 긴밀한 상호작용을 하는 유전자로 명확하게 밝혀져 있어, 엔드로젠 수용체의 가장 특이적인 coactivator로 잘 알려져 있다. 관련 선행 연구들에 따르면 dominant negative ARA70 또는 ARA70-specific siRNA가 전립선 암 세포의 증식을 현저하게 억제시켰다는 결과를 제시하면서 ARA70가 엔드로젠 수용체의 활성화 기전에 매우 중요한 역할을 한다고 보고하였다[15,29]. 이러한 coactivator들이 근육 세포 내에서 엔드로젠 수용체 활성화와 엔드로젠 수용체 목표 유전자들의 발현을 조절하는 분자적 기작에 있어 중요한 역할을 함에도 불구하고 관련 연구가 전립선 암세포를 중심으로 활발히 이루어지고 있으나, 근육에서 이들의 분자적 기전에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다.

IGF-I은 뇌하수체에서 분비되는 성장호르몬의 자극으로 간에서 생성된다[19,27]. 그러나 골격근에서도 국부적(locally)으로 생산되어 자기 자신(autocrine)이나 주변 세포들에(paracrine) 영향을 미치기도 한다[19]. 또한 IGF-I은 골격근 세포의 증식을 돕고, 근단백질 합성을 증가시키며, 근단백질의 분해를 막아주는 역할을 하여 근 비대에 필수적인 요소로 알려져 있다[6,8,11,14,17,22,25]. Mitogen activated protein kinase (MAPK)는 IGF-I에 의해 활성화되는 주요 하부 신호전달 경로이자 근 비대 관련 신호전달 체계에 있어 중요한 경로로 잘 알려져 있으며[4,5,12,20,26], MAPK 중 p38 MAPK와 extracellular regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2)는 PI3K/Akt 경로와 함께 주요 IGF-I 하부 신호전달 경로로 잘 알려져 있다. IGF-I이 근비대를 유도하는데 있어 ERK1/2 경로가 활성화되며[12], 과부하로 유도된 근비대에 있어서도 p38 MAPK의 활성이 증가하였다고 보고되어 있다[5].

이와 같이 많은 선행 연구들에서 엔드로젠 수용체와

IGF-I은 근부피 유지 및 증대에 있어 필수적인 요소로 언급 되어 왔고, 이들 각각이 근육에 미치는 영향 및 신호전달 경로에 대한 연구는 매우 활발히 이루어져 왔다. 그러나 최근 엔드로젠 수용체의 리간드인 스테로이드 물질들에 대한 문제점과 대체 물질에 관한 필요성이 언급되고 있고, 그에 따라 IGF-I 등과 같은 다양한 성장인자들에 의한 엔드로젠 수용체의 리간드 비의존적 활성화에 대한 가능성 및 연구 결과들이 제시되고 있다. 따라서 엔드로젠 수용체 활성화의 보조 역할을 하는 엔드로젠 수용체 coactivator에 있어서도 비리간드에 의한 활성화에 관한 연구가 필요하다고 사료된다.

따라서 본 연구에서는 C2C12 근육 세포에서 IGF-I이 리간드 비의존적으로 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현에 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다. 비록 p38 MAPK, ERK1/2 신호전달 경로가 IGF-I의 중요 하부신호전달 경로임은 매우 잘 알려져 있지만, 근육 세포에서 엔드로젠 수용체 coactivator의 발현에 있어 이들 경로의 역할에 관한 연구는 전무한 실정이기 때문에 위 신호전달 경로를 차단하는 SB203580과 PD98059 억제제를 각각 IGF-I과 함께 처리시켜봄으로써 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현에 있어 p38 MAPK, ERK1/2 경로의 역할도 확인해 보고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약 처리

C2C12 세포는 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml의 penicillin G, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate (Welgene, KOREA)를 함유하고 있는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Welgene, KOREA) 을 이용하여 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였다. 세포는 6-well plate에 2 ml 당 5×10⁵ 세포를 분주하고 48 시간 후 2% horse serum (HS) (Hyclone, Logan, UT)이 함유된 분화배지에 분화를 유도하면서 250 ng/ml의 IGF-I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)을 처리하거나 250 ng/ml의 IGF-I을 p38 MAPK 억제제인 10 µM의 SB203580, 또는 ERK1/2 억제제인 30 µM의 PD98059와 함께 5 분 또는 30 분간 처리하였다. SB203580과 PD98059는 Sigma Aldrich사로부터 구입하였다.

Western blot

단백질을 추출하기 위하여 cell lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, and complete protease inhibitor cocktail)를 처리한 후 scraper를 이용해 세포를 긁어낸 후 4°C에서 13,000 rpm으로 15 분

간 원심분리 하였다. 분리된 단백질을 얻어낸 뒤 Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 60 µg의 단백질을 8% SDS-PAGE gel에서 150 V로 1 시간 동안 전기 영동 한 뒤, PVDF membrane으로 transfer 하였다(12 V, 1 hr). 또한 Ponceau S로 모든 lane의 동량의 단백질을 확인한 후 각각의 membrane을 5% skim milk로 1 시간 blocking 한 뒤 0.1% TBST로 5 분씩 3번 씻어내었다. 다음으로 GRIP-1 (polyclonal rabbit antibody, 1:1,000), SRC-1 (monoclonal mouse antibody, 1:1,000), ARA70 (polyclonal rabbit antibody, 1:2,000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 그리고 α -tubulin (monoclonal mouse antibody, 1:2,500) (Calbiochem, Gibbstown, NJ) 1차 항체를 5% bovine serum albumin (BSA)에 희석하여 4°C 에서 12 시간 반응시켰다. 그 후, 0.1% TBST로 5 분씩 3번 씻어낸 뒤 2차 항체(anti-rabbit or mouse IgG horse-radish peroxidase-linked secondary antibody, 1:5,000) (Cell signaling, Beverley, MA)를 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 위와 동일한 방법으로 씻어낸 뒤, enhanced chemiluminescent (ECL) (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK) 용액을 1:1 비율로 섞어 1 분 동안 반응 시킨 뒤 LAS-3000 imaging system (Fuji Film, Tokyo, Japan)으로 단백질 발현을 확인하였다. 모든 coactivator들의 단백질 발현량은 각각의 α -tubulin의 단백질 양으로 보정하여 densitometry (Scion image)를 이용하여 수치화 하였다.

RNA 추출 및 cDNA 합성

RNA를 추출하기 위하여 TRIzol 용액(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 이용한 phenol-chloroform 추출 기법을 사용하였다. TRIzol 용액을 well당 각각 1 ml 씩 넣고, 200 µl의 chloroform을 처리하여 잘 섞어준 뒤 4°C, 13,000 rpm에서 15분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 분리하여 isopropanol과 1:1 비율로 섞어준 뒤, 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 생성된 pellet을 DEPC로 희석한 75% ETOH에 씻어내고, 4°C, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하였다. 최종 추출된 pellet을 상온에서 10분간 말린 뒤 ultra pure water 60 µl에 녹인 후, UV 흡광도 260 nm에서 농도를 측정하였다. cDNA를 합성하기

위해 1 µg/µl의 RNA를 5× buffer 4 µl, random primer 2 µl, 2.5 mM dNTP 2 µl, Rnase inhibitor 0.5 µl, 그리고 reverse transcriptase 0.25 µl (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)와 혼합하여 25°C 10 분, 42°C 60 분, 그리고 95°C 5 분간 PCR을 이용해 cDNA를 합성하였다.

Real-time quantitative PCR

GRIP-1과 SRC-1, 그리고 ARA70 messenger RNA (mRNA) 발현을 측정하기 위하여 double-stranded DNA dye인 SYBR Green PCR master mix (Finnzyme, Espoo, Finland)를 이용하여 real-time PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 primer sequence는 Table 1에 제시하였으며, 모든 Primer는 코스모사(Cosmo Genetech, KOREA)에서 제작 및 구입하여 사용하였다. 모든 real-time PCR 분석은 ABI PRISM 7700 system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA)을 이용하였으며, 모든 샘플은 3회 반복 실험하여 합성 시킨 cDNA를 각각 2회 이상 반복 측정하였다. 95°C 15초, 60°C 1분간 40 cycle 을 측정하여 CT 값을 구하고, 용해 곡선 확인을 위해 40 cycle 이후 dissociation stage를 추가하여 95°C 15초, 60°C 1분의 조건을 2번 반복하여 현광 signal의 크기를 측정하였다. 반응이 완료된 후 증폭곡선의 S 커브가 급격히 올라가는 지점과 CT 값이 추출된 지점이 일치하였음을 확인하고, 용해 곡선 그래프에서 단일 산물이 증폭 되었음을 확인한 뒤 최종적으로 CT 값을 데이터로 처리 하였다. 결과는 상대 정량법인 단순 CT값 비교 분석 방법을 사용하였다. 따라서 target mRNA 발현량은 house keeping gene으로 많이 사용되고 있는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 CT 값으로 상대 정량 하여 보정하였다.

자료처리

IGF-I 처리와 p38 MAPK 억제제인 SB203580, ERK1/2 억제제인 PD98059 처리에 따른 C2C12 세포에서의 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자들의 단백질 발현과 mRNA 발현의 유의성 검증을 위하여 SPSS 12.0 for window를 이용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 집단 간에 유의한 차이가 있는지를 검증하기 위하여 Tukey's 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
ARA70	CAAGCCTGACTCCTGTACCAACTG	GGCTTCCTTCTCACAGTTGTCATC
GRIP-1	AGAACCAGCCAAACCAAC	TGGTIGAGGATTTCCCTCTG
SRC-1	GCTCCAGCAAACCTCCACCTACTT	AATGTTTGCGTTTCCACCTG
GAPDH	ATGACAATGAATACGGCTACAGCAA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT

결 과

단백질 발현

IGF-I이 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자의 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 C2C12 세포에 분화를 유도하면서 IGF-I을 처리하고, IGF-I에 의한 엔드로젠 수용체 coactivator 단백질 발현의 변화에 있어 p38 MAPK와 ERK1/2의 역할을 알아보기 위해 IGF-I 과 SB203580, 또는 PD98059를 각각 함께 처리하여 western blot을 실시하였다. 그 결과 Fig. 1에 제시된 바와 같이 통제군과 비교하였을 때 GRIP-1의 단백질 발현이 IGF-I에 의해 45% 증가하였다. 그러나 p38 MAPK와 ERK1/2 경로 억제제인 SB203580과 PD98059를 각각 IGF-I과 함께 처리한 결과 IGF-I에 의한 GRIP-1 단백질 발현의 증가가 현저히 감소되었다. 엔드로젠 수용체의 또 다른 coactivator 중 하나인 SRC-1의 단백질 발현을 알아본 결과 IGF-I을 처리하였을 때 SRC-1의 단백질 발현은 통제군에 비해 45% 증가하였다. 반면에 SB203580과 PD98059를 각각 IGF-I과 함께 처리한 결과 IGF-I만을 처리한 그룹에 비해 단백질 발현이 현저하게 감소되었다 (Fig. 2). Fig. 3에 제시된 바와 같이 C2C12 세포에 IGF-I을 처리하자 엔드로젠 수용체의 가장 특이적인 coactivator로 알려진 ARA70의 단백질 발현은 통제군과 비교하였을 때 85% 유의하게 증가하였다. 그러나 SB203580과 PD98059를

Fig. 1. GRIP-1 expression in C2C12 cells treated with IGF-I (250 ng/ml) for 30 min in the absence or presence of 10 μ M SB203580 or 30 μ M PD98059. Sixty micrograms of total protein were resolved on 8% SDS-PAGE gel, followed by immunoblot with GRIP-1 and α -tubulin antibodies. *Inset*: Western blot image of GRIP-1 and α -tubulin detection. Values are means $\pm$ SE with n=3 for each condition. * p <0.05 vs. control. # p <0.05 vs. IGF-I.

Fig. 2. Effect of treatment with 250 ng/ml IGF-I for 30 min in the absence or presence of 10 μ M SB203580 or 30 μ M PD98059 on the SRC-1 protein level in C2C12 cells. Sixty micrograms of protein were fractionated by 8% SDS-PAGE, followed by immunoblot with SRC-1 and α -tubulin antibodies. *Inset*: Images of Western blot analysis conducted using SRC-1 and α -tubulin detection. Values are means $\pm$ SE with n=3 for each condition. * p <0.05 vs. control. # p <0.05 vs. IGF-I.

Fig. 3. ARA70 expression in C2C12 cells treated with IGF-I (250 ng/ml) for 30 min in the absence or presence of SB203580 (10 μ M) or PD98059 (30 μ M). Cell lysates were fractionated by 8% SDS-PAGE, followed by immunoblot with ARA70 and α -tubulin antibodies. *Inset*: Western blot image of ARA70 and α -tubulin detection. Values are means $\pm$ SE with n=3 for each condition. * p <0.05 vs. control. # p <0.05 vs. IGF-I.

각각 IGF-I과 함께 처리하자 IGF-I에 의해 발현이 증가된 ARA70 단백질 발현이 현저히 감소되었다.

mRNA 발현

IGF-I이 엔드로젠 수용체 coactivator mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 C2C12 세포에 분화를 유도하면서 250 ng/ml의 IGF-I을 5 분간 처리하였다. 또한 IGF-I에 의한 coactivator mRNA 발현의 변화에 있어 IGF-I의 하부신호전달 경로 중 하나인 p38 MAPK와 ERK1/2 신호전달 경로의 역할을 알아보기 위해 IGF-I을 SB203580, 또는 PD98059와 함께 각각 5 분간 처리하여 real-time PCR 분석을 실시하였다. Fig. 4에 제시된 바와 같이 IGF-I을 처리한 세포에서는 통제군과 비교하였을 때 GRIP-1의 mRNA 발현이 64% 유의하게 증가 하였다. 그러나 SB203580과 PD98059를 각각 IGF-I과 함께 처리하였을 때에는 IGF-I만을 처리한 그룹에 비해 GRIP-1 mRNA 발현이 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이를 보이지는 않았다. Fig. 5에 제시된 바와 같이 IGF-I을 처리하자 SRC-1의 mRNA 발현은 통제군에 비해 36% 유의하게 증가하였다. 반면에, SB203580과 PD98059를 각각 IGF-I과 함께 처리한 결과 IGF-I에 의해 발현이 증가된 SRC-1의 mRNA 발현을 감소시켰으나 유의한 차이를 보이지 않았다. IGF-I에 의한 ARA70 mRNA 발현의 변화를 살펴보기 위해 C2C12 세포에 IGF-I을 처리한 결과 통제군에 비해 발현이 50% 유의하게 증가하였다. 그러나 SB203580, PD98059를 각각 IGF-I과 함께 처리한 결과 IGF-I만을 처리하였을 때 유도된 ARA70 mRNA 발현 증가 수준이 감소하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 볼 수 없었다.

Fig. 4. Real-time PCR analysis of GRIP-1 mRNA after treatment with 250 ng/ml IGF-I for 5 min in the absence or presence of 10 μ M SB 203580 or 30 μ M PD98059. Target mRNA values are shown normalized to the GAPDH mRNA level for each sample. Samples were analyzed in duplicate in parallel with GAPDH. Values are means $\pm$ SE with $n=3$ for each condition. * $p<0.05$ vs. control.

Fig. 5. Real-time PCR analysis of SRC-1 mRNA after treatment with 250 ng/ml IGF-I for 5 min in the absence or presence of 10 μ M SB 203580 or 30 μ M PD98059 in C2C12. Target mRNA values are shown normalized to the GAPDH mRNA level for each sample. Samples were analyzed in duplicate in parallel with GAPDH. Values are means $\pm$ SE of three independent experiments. Values are means $\pm$ SE with $n=3$ for each condition. * $p<0.05$ vs. control.

Fig. 6. Real-time PCR analysis of ARA70 mRNA after treatment with 250 ng/ml IGF-I for 5 min in the absence or presence of 10 μ M SB 203580 or 30 μ M PD98059. Target mRNA values are shown normalized to the GAPDH mRNA level for each sample. Samples were analyzed in duplicate in parallel with GAPDH. Values are means $\pm$ SE of three independent experiments. Values are means $\pm$ SE with $n=3$ for each condition. * $p<0.05$ vs. control.

고 찰

IGF-I과 엔드로젠 수용체는 근 비대 기전에 있어 매우 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있으며, 엔드로젠 수용체 coactivator는 엔드로젠 수용체 활성화 및 발현에 중요한

보조자 역할을 한다[18]. 최근 보고되고 있는 스테로이드 물질들의 각종 부작용에 관한 연구들은 엔드로젠 수용체의 비리간드 물질에 대한 연구의 필요성을 제기하였으며, 본 연구에서 사용한 IGF-I이 EGF, KGF 등의 성장인자들과 함께 전립선 암 세포에서 엔드로젠 수용체를 리간드 비의존적으로 활성화 시킬 수 있다는 가능성이 제시된 바 있다 [7,10,16]. 또한 최근에는 근육 세포인 C2C12 세포에서도 엔드로젠 물질 없이 IGF-I에 의해 엔드로젠 수용체가 활성화되었다는 연구가 보고되었다[21]. 이러한 선행 연구들을 바탕으로 본 연구에서는 IGF-I이 리간드 비 의존적으로 엔드로젠 수용체 활성화 단계에서의 안정화 및 발현 조절에 중요한 보조자 역할을 하는 엔드로젠 수용체 coactivator 발현에 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보았으며, 이 과정에서 IGF-I의 하부신호전달 경로인 p38 MAPK, ERK1/2의 역할도 알아보았다.

IGF-I에 의한 AR coactivator 유전자 발현

본 연구에서 첫 번째로 확인할 수 있었던 중요한 사실은 IGF-I을 처리하였을 때 엔드로젠 수용체 coactivator들의 단백질과 mRNA의 발현이 리간드 비의존적으로도 증가하였다는 사실이다. 본래 엔드로젠 수용체 coactivator들은 엔드로젠 수용체와 마찬가지로 자신의 리간드인 엔드로젠에 의해 활성화 되고 발현이 증가한다[35]. GRIP-1은 엔드로젠에 의해 발현이 증가하는데, C2C12 골격근 세포에 엔드로젠 물질 중 하나인 테스터스테론을 처리하자 GRIP-1의 mRNA의 발현이 유의하게 증가하였다고 보고된 바 있다 [9]. 또한 SRC-1은 엔드로젠 수용체의 전사 활성화(transcriptional activity)에 매우 중요한 요소로 잘 알려져 있으며, ARA70은 아주 낮은 농도의 엔드로젠 처리에 의해서도 발현이 증가하며, 엔드로젠 수용체 목표 유전자들의 발현을 촉진시킨다[38]. Sirienn 등[31]은 골격근 증식을 억제시키는 유전자인 myostatin의 발현을 억제시키자 ARA70의 발현이 증가하였음을 보고하였는데, 이는 myostatin의 발현이 억제되어 근육의 증식이 활발하게 일어나는 과정에서 ARA70이 발현되어 엔드로젠 수용체의 발현에 영향을 미쳤다고 생각해 볼 수 있다. 이와 같이, 엔드로젠 수용체의 기능 및 세포 증식, 발달과 엔드로젠 물질에 의한 엔드로젠 수용체 coactivator들의 역할 규명에 대한 연구는 이루어졌지만, 비리간드 물질인 IGF-I과 같은 성장인자들에 의한 근육세포에서의 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현 변화에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서 엔드로젠 수용체 활성화 이전에 중요한 역할을 하는 coactivator들이 골격근 세포에서 리간드 비의존적으로 IGF-I에 의해 발현이 증가되었다는 결과를 제시하였다는 점에 의의가 있다고 생각된다.

IGF-I 하부신호 전달 경로가 IGF-I에 의한 AR coactivator 유전자 발현에 미치는 영향

두 번째로 본 연구를 통해 확인한 사실은 p38 MAPK 와 ERK1/2 억제제를 IGF-I과 함께 처리하였을 때는 IGF-I에 의해 유도된 엔드로젠 수용체 coactivator들의 단백질 및 mRNA 발현이 억제되었다는 것이다. p38 MAPK와 ERK1/2는 IGF-I에 의해 활성화되는 IGF-I의 주요 하부 신호전달 경로이며 근 비대에 관련된 신호전달 체계와 골격근 관련 유전자의 발현을 조절하는데 있어 매우 중요한 경로로 잘 알려져 있다[4,26]. 앞선 연구 결과들을 살펴보면 p38 MAPK 억제제인 SB203580을 근육세포에 처리하자 근육세포의 증식이 현저히 억제되고 세포주기 조절인자인 p21을 비롯한 myogenic regulatory factors (MRFs), myogenin, 그리고 myosin heavy chain 등 골격근 관련 유전자들의 발현이 거의 이루어지지 않았다고 보고하였다[36,39]. 또한 Hao 등[13]에 따르면 ERK1/2의 억제제인 PD98059를 C2C12 myotube에 처리하자 myotube의 직경이 감소하고, Akt와 GSK3 α/β 의 단백질 인산화가 현저히 억제되었다고 보고하였다. 이와 같은 선행 연구들에서 IGF-I의 하부신호전달 경로인 p38 MAPK와 ERK1/2 경로가 근육세포의 증식 및 분화에 미치는 영향을 고찰한 것과는 달리, 본 연구에서는 p38 MAPK, ERK1/2 경로를 차단해봄으로써 IGF-I이 리간드 비의존적으로 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현을 증가 시킴에 있어 위 경로가 필수적임을 확인하였다. 그러나 위 결과들에서 볼 수 있듯이 IGF-I에 의한 coactivator의 발현에 있어 p38 MAPK, ERK1/2 억제제를 각각 처리하였을 때 coactivator 단백질의 발현은 현저히 억제 되었음에도 불구하고 mRNA 수준에 있어서는 약간의 발현이 감소되었을 뿐 단백질 수준만큼 현저하게 발현이 억제되는 결과는 볼 수 없었다. 이는 실험을 실시함에 있어 mRNA 발현 측정은 IGF-I과 억제제들의 처리시간을 5 분으로, 단백질 발현 측정은 IGF-I과 억제제들의 처리시간을 30 분으로 설정한 실험 조건의 차이를 생각해 볼 수도 있으며, 다른 한편으로는 일반적인 실험 상황에 있어 전사 수준과 단백질 발현 수준의 정도가 일치하지 않는 경우, 혹은 정반대 경향의 결과가 나타나는 많은 경우들을 고려하여 해석해봤을 때 IGF-I에 의한 coactivator 단백질 발현 증가는 단백질의 안정화(stability) 및 번역의 능력(capacity) 및 효율성(efficiency) 증대와 같은 전사 후(post-transcription) 단계에서 유전자의 발현이 조절되었을 것으로 사료된다.

IGF-I과 엔드로젠 수용체 coactivator의 향후 연구 방향

결론적으로, 본 연구에서는 C2C12 골격근 세포에서 IGF-I이 리간드 비의존적으로 엔드로젠 수용체 coactivator인 GRIP-1, SRC-1, ARA70의 유전자 발현에 유의한 영향을

미쳤다는 사실을 확인하였다. 또한 IGF-I이 이들 coactivator의 발현을 증가시킴에 있어서 p38 MAPK, ERK1/2 신호전달 경로가 중요한 역할을 한다는 사실도 확인하였다. 비록 IGF-I의 하부 신호전달 경로로 p38 MAPK와 ERK1/2 경로는 매우 잘 알려져 있지만 근육 세포 내에서 IGF-I과 엔드로젠 수용체 coactivator와 관련하여 위 신호전달 경로에 연관된 연구는 아직 부족한 것이 사실이다. 본 연구에서 제시한 결과들이 골격근에서 엔드로젠 물질들이 없이도 IGF-I에 의해 엔드로젠 수용체 coactivator 발현에 영향을 미쳤다는 것을 보여주었기 때문에 근비대 기전에 있어 성장인자, 운동 중재의 필요성 증명을 위한 중요한 단서가 될 것이라 생각되지만, 이와 관련한 다른 수 많은 coactivator들에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것이다. 또한 이를 바탕으로 IGF-I에 의한 엔드로젠 수용체 corepressor들의 유전자 발현 억제와 신호전달 억제 등의 기능을 규명할 수 있다면, 근육에서 IGF-I과 엔드로젠 수용체 유전자 간의 분자적 기전을 보다 자세하게 설명할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 생각된다. 더 나아가, 이러한 향후 관련 연구들에 있어 IGF-I의 하부 신호 전달 경로인 p38 MAPK와 ERK1/2를 비롯한 다른 신호전달 경로들과 상, 하부 신호전달 경로에 관한 연구도 함께 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2009년도 부산대학교 박사후연수과정지원사업에 의하여 연구되었음.

References

- Antonio, J., J. D. Wilson, and F. W. George. 1999. Effects of castration and androgen treatment on androgen-receptor levels in rat skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* **87**, 2016-2029.
- Anzick, S. L., J. Kononen, R. L. Walker, D. O. Azorsa, M. M. Tanner, X. Y. Guan, G. Sauter, O. P. Kallioniemi, J. M. Trent, and P. S. Meltzer. 1997. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**, 965-968.
- Bhasin, S., L. Woodhouse, and T. W. Storer. 2003. Androgen effects on body composition. *Growth Horm. IGF Res.* **13**, S63-S71.
- Butler, A. A., S. Yakar, I. H. Gewolb, M. Karas, Y. Okubo, and D. LeRoith. 1998. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. *Comp. Biochem. Mol. Biol.* **121**, 19-26.
- Carlson, C. J., Z. Fan, S. E. Gordon, and F. W. Booth. 2001. Time course of the MAPK and PI3-kinase response within 24 h of skeletal muscle overload. *J. Appl. Physiol.* **91**, 2079-2087.
- Coleman, M. E., F. DeMayo, K. C. Yin, H. M. Lee, R. Geske, C. Montgomery, and R. J. Schwartz. 1995. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 12109-12116.
- Culig, Z., A. Hobisch, M. V. Cronauer, C. Radmayr, J. Trapman, A. Hittmair, G. Bartsch, and H. Klocker. 1994. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* **54**, 5474-5478.
- Florini, J. R., D. Z. Ewton, and S. A. Coolican. 1996. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr. Rev.* **16**, 481-517.
- Francesca, W., C. Massimillino, G. Lucia, F. Andrea, B. Sergio, and M. Costanzo. 2008. Androgen receptor expression during C2C12 skeletal muscle cell line differentiation. *Mol. Cell Endocrinol.* **292**, 11-19.
- Francesco, O. Jr., T. Beatrice, G. Virginie, L. Serge, A. Christophe, S. Christian, and S. Charles. 2002. Potential action of IGF-I and EGF on androgen receptor nuclear transfer and transactivation in normal and cancer human prostate cell lines. *Mol. Cell Endocrinol.* **198**, 105-114.
- Galvin, C. D., O. Hardiman, and C. M. Nolan. 2003. IGF-I receptor mediates differentiation of primary cultures of mouse skeletal myoblasts. *Mol. Cell Endocrinol.* **200**, 19-29.
- Haddad, F. and G. R. Adams. 2004. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *J. Appl. Physiol.* **96**, 203-210.
- Hao, S., M. S. Jason, W. Caiyun, M. P. Jonatha, M. H. Kevin, L. G. Alan, and E. G. David. 2009. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am. J. Physiol.* **296**, C1040-1048.
- Hill, M. and G. Goldspink. 2003. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J. Physiol.* **549**, 409-418.
- Hu, Y. C., S. Yeh, S. D. Yeh, R. S. Erick, J. Huang, P. Li, C. L. Hsu, H. J. Ting, H. K. Lin, L. Wang, E. Kim, J. Ni, and C. Chang. 2004. Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **279**, 33438-33446.
- Jennifer, D. W., H. Kathy, W. Libby, N. Peter, C. Ilsa, and R. P. Stephen. 2006. Interaction of IGF Signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. *J. Cell Biochem.* **99**, 392-401.
- Jennische, E. and H. A. Hansson. 1987. Regenerating skeletal muscle cells express insulin-like growth factor I. *Acta*

- Physiol. Scand* **130**, 327-332.
18. Joanne, E. and M. S. John. 2005. The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: androgen receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int.* **95**, 1327-1335.
 19. Jones, J. I. and D. R. Clemmons. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological action. *Endocr. Rev.* **16**, 3-34.
 20. Keren, A., Y. Tamir, and E. Bengal. 2006. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. *Mol. Cell Endocrinol.* **252**, 224-230.
 21. Kim, H. J. and W. J. Lee. 2009. Insulin-like growth factor-I induces androgen receptor activation in differentiating C2C12 skeletal muscle cells. *Mol. Cells* **28**, 189-194.
 22. Lewis, M. I., G. D. Horritz, D. R. Clemmons, and M. Fournier. 2002. Role of IGF-I and IGF-binding proteins within diaphragm muscle in modulating the effects of nandrolone. *Am. J. Physiol.* **282**, E483-490.
 23. Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R. M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
 24. McKenna, N. J., R. B. Lanz, and B. W. O'Mally. 1999. Nuclear receptor coregulators; cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* **20**, 321-344.
 25. McLellan, A. S., T. Kealey, and K. Langlands. 2006. An E box in the exon 1 promoter regulates insulin-like growth factor-I expression in differentiating muscle cells. *Am. J. Physiol.* **291**, C300-C307.
 26. Meng, D., X. Shi, B. H. Jiang, and J. Fang. 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) induces epidermal growth factor receptor transactivation and cell proliferation through reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1651-1660.
 27. Park, P. and P. Cohen. 2005. Insulin-like growth factor I (IGF-I) measurements in growth hormone (GH) therapy of idiopathic short stature (ISS). *Growth Horm. IGF Res.* **15**, S13-20.
 28. Powell, S. M., V. Christiaens, D. Voulgaraki, J. Waxman, F. Claessens, and C. L. Bevan. 2004. Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor co-activator-1 in prostate. *Endocr. Relat. Cancer* **11**, 117-130.
 29. Rahman, M. M., H. Miyamoto, H. Takatera, S. Yeh, S. Altuwaijri, and C. Chang. 2003. Reducing the agonist activity of anti-androgens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 19619-19626.
 30. Roy, A. K., R. K. Tyagi, C. S. Song, Y. Lavrovsky, S. C. Ahn, T. S. Oh, and B. Chatterjee. 2001. Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann. NY. Acad. Sci.* **949**, 44-57.
 31. Siriatt, V., G. Nicholas, C. Berry, T. Watson, A. Hennebry, M. Thomas, N. Ling, M. Sharma, and R. Kambadur. 2006. Myostatin negative regulates the expression of the steroid receptor co-factor ARA70. *J. Cell Physiol.* **206**, 255-263.
 32. Suzuki, H., T. Ueda, T. Ichikawa, and H. Ito. 2003. Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **10**, 209-216.
 33. Takeshita, A., G. R. Cardona, N. Koibuchi, C. S. Suen, and W. W. Chin. 1997. TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 27629-27634.
 34. Touno, M., M. Senda, K. Nakago, Y. Yokoyama, and H. Inoue. 1996. Muscle fiber changes of the vastus medialis in rheumatoid patients. *Acta. Medica. Okayama.* **50**, 157-164.
 35. Ueda, T., D. T. Max, N. Bruchovsky, and M. D. Sadar. 2002. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor co-activator-1 in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 38087-38094.
 36. Wu, Z., P. J. Woodring, K. S. Bhakta, K. Tamura, F. Wen, J. R. Feramisco, M. Karin, J. Y. Wang, and R. L. Puri. 2000. p38 and extra cellular signal regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell Endocrinol.* **20**, 3951-3964.
 37. Xu, L., C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 140-147.
 38. Yeh, S. and C. Chang. 1996. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 5517-5521.
 39. Zester, A., E. Gredinger, and E. Bengal. 1999. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J. Biol. Chem.* **274**, 5193-5200.

초록 : C2C12 세포에서 insulin-like growth factor-I이 p38 MAPK, ERK1/2 신호전달 경로를 통해 엔드로젠 수용체 coactivator 발현에 미치는 영향

박찬호² · 김혜진¹ · 김태운² · 이원준^{1*}

(¹이화여자대학교 건강과학대학 체육학과, ²부산대학교 체육교육학과)

본 연구에서는 C2C12 근육 세포에서 IGF-I이 리간드 비의존적으로 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 그 결과 IGF-I 이 리간드 비의존적으로 엔드로젠 수용체의 coactivator인 GRIP-1, SRC-1, ARA70 유전자들의 단백질과 mRNA 발현을 증가시켰으며, p38 MAPK와 ERK1/2 신호전달 경로 억제제인 SB203580과 PD98059를 IGF-I과 함께 처리한 결과 IGF-I에 의한 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현의 증가를 감소시켰음을 알 수 있었다. 엔드로젠 수용체 coactivator가 엔드로젠 물질이 없이도 IGF-I에 의해 발현이 증가하였다는 사실은 운동에 의해 근육에서 분비가 증가하는 IGF-I이 리간드 비의존적으로 근육 세포에서 엔드로젠 수용체 활성화 안정에 기여하는 엔드로젠 수용체 coactivator를 활성화 시킬 수 있다는 사실을 증명하였다는데 의의가 있다고 사료된다. 또한, IGF-I의 하부신호전달 경로로 잘 알려진 p38 MAPK와 ERK1/2 신호전달 경로를 차단하였을 때는 발현이 억제되었는데 이를 통해 IGF-I이 근육세포 내에서 p38 MAPK, ERK1/2 경로를 통해 엔드로젠 수용체 coactivator 발현에 중요한 역할을 한다는 사실을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 근육에서 중요한 기능을 담당하는 IGF-I이 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현을 조절하는 기능이 있으며 이러한 IGF-I에 의한 리간드 비의존적인 엔드로젠 수용체 coactivator 유전자 발현 조절에 있어 p38 MAPK와 ERK1/2는 필수적인 신호전달 경로임을 확인하였다는 데서 그 의의가 있다고 할 수 있겠다. 향후 다양한 성장인자들에 의한 coactivator 발현에 관한 연구를 비롯하여, corepressor의 발현 억제 기능 및 신호전달 경로에 관한 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것이다.