

유선발달에 있어서 cAMP, EGF, IGF-I 및 단백질 인산화 작용의 역할

II. EGF, IGF-I 및 Photoreactive Cyclic AMP의 상호작용과 단백질 인산화 작용

여 인 서

강원대학교 축산대학 낙농학과

Role of cAMP, EGF, IGF-I and Protein Phosphorylation in Mammary Development. II. Interaction Effects of EGF, IGF-I and Photoreactive Cyclic AMP on DNA Synthesis and Protein Phosphorylation

Yuh, In-Suh

Department of Dairy Science, College of Animal Agriculture,
Kangwon National University, Chuncheon

SUMMARY

Mouse mammary epithelial cells(NMuMG) were maintained onto 6-well plates (3×10^5 cells/well) or chambered slide (1×10^4 cells/well), in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. After serum starvation for 24 hours, DMNB ($1 \mu\text{M}$) was added and exposed to UV light (300nm, 3 second pulse) after 2 hours from DMNB addition in order to activate DMNB which induces a rapid transient increase in intracellular cAMP upon UV irradiation. EGF (100ng/ml) and/or IGF-I (10ng/ml) were treated at the time of UV irradiation. Nuclear labeling index was estimated as percent of nuclear labeled cells(percent of S phase of cells) by incorporation of ^3H -thymidine into DNA(1 hour pulse with $1 \mu\text{Ci/ml}$). DMNB($1 \mu\text{M}$), EGF (100ng/ml) and/or IGF-I (10ng/ml) significantly increased nuclear labeling index than those of control ($P < 0.05$). Addition of DMNB+EGF or DMNB+EGF+IGF-I showed the interaction effect in nuclear labeling index ($P < 0.05$). Protein kinase A activities by addition of EGF, IGF-I or EGF+IGF-I were 10.5, 9.8 or 9.4 unit/mg protein, respectively, and no statistical difference was found in comparison with control ($P > 0.05$). Addition of DMNB+EGF showed the moderate interaction effect on tyrosyl kinase activity ($P < 0.1$). In the fluorography analysis, there were no specific protein phosphorylation patterns were found at 1 or 15 minute by addition of DMNB, EGF and/or IGF-I. These results suggest that the interaction effect in nuclear labeling index by addition DMNB and EGF could be mediated through the modulation of tyrosyl kinase activity by cAMP.

I. 서 론

유선조직내 cyclic adenosine-monophosphate(c-AMP)의 함량과 유선상피세포의 성장과는 고도의 정
의 상관관계가 있는 것으로 보고하였다(Loizzi, 19

* 본 논문은 교육부 지원 학술진흥재단의 지방대 육성 학술연구조성비에 의해 연구되었음.

83; Rillema, 1976; Sapag-Hagar와 Greenbaum, 1974; Sheffield 등, 1987). 지금까지 보고되어온 cAMP와 세포성장에 관한 연구보고는 인위적으로 세포내 cAMP함량을 높일 수 있는 cholera toxin을 이용하거나 phosphodiesterase의 작용에 분해되지 않는 cAMP agonist를 이용함으로써 cAMP가 세포성장에 관여하는 중요한 물질임을 확인하여 왔다. 최근에 개발된 caged-cAMP(DMNB, dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine-3',5' cyclic monophosphate)는 세포내에서 단시간 동안에만 활성작용을 갖는 물질로, 본 cAMP는 정상적인 생리 조건하에서 발생될 수 있는 작용양식을 연구하기에 적합한 도구로 이용되어 왔다(Nerbonne, 1986; Nerbonne 등, 1984; Richard 등, 1985). DMNB를 유선상피세포에 첨가시킨 결과 유선상피세포의 DNA합성을 약 40~50% 증가시켰는데(여 등, 1993), 이와 같은 결과는 지금까지 cholera toxin이나 phosphodiesterase 억제인자들을 이용하여 얻은 결과들이 정상적인 생리조건 하에서 발생될 수 있는 cAMP작용 양식을 대표할 수 있는 결과임을 제시하였다.

Epidermal growth factor(EGF)를 유선상피세포 및 생쥐의 유선조직에 첨가시켰을 때 유선상피세포의 증식작용 및 유선의 발달을 유의하게 증가시켰으며(Tonelli and Sorof, 1980; Yang 등, 1980; Taketani and Oka, 1983), 생쥐에 있어서 EGF의 주요 분비기관인 침샘선(salivary gland)을 제거시킨 실험에서 EGF가 유선발달에 영향을 미치는 중요한자임이 관찰되었다(Okamoto and Oka, 1984; Sheffield and Welsch, 1987). 또한 Insulin-like growth factor-I(IGF-I)을 암컷 생쥐에서 얻은 유선상피세포에 첨가시켰을 때 유의하게 유선상피세포의 증식을 가져왔으며(Imagawa 등, 1986), 미분화된 젖소 유선상피세포의 증식작용을 가져왔다(Shamay 등, 1990). Imagawa 등(1988)은 EGF를 유선상피세포에 첨가시킨 결과 세포의 증식작용을 촉진시켰으며, cAMP를 정보전달체계로 한 PGE₂의 작용간에는 유선상피세포 증식작용에 상호작용효과가 있었다. 또한 젖소의 유선상피세포에 EGF와 IGF-I을 첨가시킨 후 phosphodiesterase inhibitor인 IBMX나 cyclic AMP analogs를 병행하여 첨가시켰을 때 세포증식작용에 상호작용 효과를 볼 수 있었다. Ethier 등(1987)과

Taylor-Papadimitriou 등(1980)은 들쥐와 사람의 유선상피세포에 cholera toxin, EGF 및 혈청을 병행하여 첨가한 결과 세포증식작용에 상호작용효과를 볼 수 있었다. 그러나 세포증식작용에 있어서 상호작용효과를 가져오는 세포내 정보전달체계에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구는 EGF, IGF-I 및 DMNB첨가에 따른 세포증식작용의 상호작용효과가 tyrosyl kinase 및 protein kinase A 활성도의 변화와 상호관계가 있는지를 검토하기 위함이다.

II. 재료 및 방법

1. 유선상피세포 배양

NMuMG(normal murine mammary epithelial cells; American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) 유선상피세포를 6-well 배양접시(Falcon, CA, USA: 3×10^5 cells/well) 또는 8-chamber plastic culture 슬라이드(Lab-Tek, Miles Scientific, IL, USA: 1×10^4 cells/well)를 이용하여 DMEM 배양액에 10% fetal calf serum(FCS)을 첨가하여 세포를 배양하였다. 유선상피세포의 배양은 5% CO₂/95% air 및 37°C 조건하에서 실시하였다. 유선상피세포를 10% FCS가 함유된 배양액으로 24시간 동안 배양접시에 집착시켰으며, 다음 24시간 동안 FCS가 결여된 배양액을 이용하여 모든 세포를 세포성장단계의 Go/G1단계에 도달하도록 하였다.

2. 처 리

Photoreactive cyclic AMP(DMNB, dimethoxy-2-nitrobenzyl adenosine-3', 5' cyclic monophosphate, Molecular Probes, Mo, USA)를 유선상피세포에 첨가한 후, 2시간 뒤에 UV를 노출시켰으며(300nm, 3초간), Epidermal growth factor(EGF) 또는 insulin-like growth factor-I(IGF-I)을 UV 노출 직후 유선상피세포에 처리하여, 세포성장효과, tyrosyl kinase 및 protein kinase A의 활성도 변화에 대한 병행효과를 측정하였다.

3. Autoradiography

UV노출 후 18시간 뒤에 ³H-thymidine(New England Nuclear, Wilmington, DE: 78.5-85.6Ci/

mmole)을 1시간 동안 첨가 배양한 후, Tris-buffered saline(TBS: 150mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5)로 3번 세척하여 10% phosphate buffered formalin으로 30분간 고정시켰으며, 70% ethanol과 증류수로 3번 세척하여 건조시켰다. 건조 후 슬라이드를 Ilford K5 용액(Polysciences, Inc., PA, USA)에 담그고 건조시켜 빛이 노출되지 않도록 슬라이드 박스에 넣고 4℃에서 9일간 노출시켰으며, Kodak D-19 developer로 현상하고, 세포를 hematoxylin으로 염색하여 현미경하에서 세포성장 주기의 S단계에 도달한 세포를 관찰하였다. S단계에 있는 세포의 비율은 현미경상에서 관찰될 수 있는 총세포중 ³H-thymidine이 DNA에 삽입되어 S단계에 도달된 세포(세포당 10개 이상의 silver grains이 관찰된 세포)수를 백분율로 계산하였으며 현미경상에서 관찰된 총세포수는 약 150~200개였다.

4. Protein kinase assay

1) Protein kinase a assay

유선상피세포(3×10^5 cells/well)에 EGF(100 ng/ml), IGF-I(10 ng/ml) 및 EGF(100 ng/ml)+IGF-I(10 ng/ml)을 첨가한 다음 1시간 동안 배양시켰으며, 4℃에서 5% sucrose와 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유되어 있는 Tris-HCl buffer(pH 7.0, 10 mM)에서 초음파 분쇄기(Sonics, USA)를 이용하여 세포를 균질화 시켰다. 미세분쇄된 세포를 원심분리(2,000 g, 10 min)시킨 후, 상청액은 Protein kinase A assay를 위하여 이용하였으며, 상청액의 단백질함량 측정은 Bradford(1976) 방법에 의하여 실시하였다. Protein kinase A assay를 위하여 1 mg/ml의 histone과 MgCl₂(10 mM) 및 10^{-4} M [γ -³²P]adenosine triphosphate(250,000 cpm/tube)가 함유되어 있는 phosphate buffer(30 mM, pH 6.8) 60 μ l와 10 μ l의 조직분쇄액을 혼합하였으며, Protein kinase A assay는 10^{-5} M cAMP를 첨가한 상태와 첨가하지 않은 상태에서 시행하였다. Kinase A반응은 assay tube에 ATP를 첨가시킴으로써 시작하였고, 각 tube마다 30℃에서 15분 동안 실시하였으며, 30 μ l의 시료를 filter paper disk(Whatman 3MM)에 옮김으로써 assay를 중단하였

다. Filter paper disk를 ice-cold 10% TCA용액에 15분 동안 담근 후, 5% TCA용액에서 3번, 95% ethanol용액에서 1번 세척하였다. Filter paper disks를 세척한 후 Beckman LS100 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능 정도를 측정하였다. Kinase A 활성도는 cAMP의 첨가 유무에 따른 기질 단백질의 인산화 정도의 차이점을 이용하여 결정하였다. Protein kinase A의 specific activity는 1 pmole phosphate가 histone/min/mg protein에 인산화 되는 정도로 나타냈다.

2) Tyrosyl kinase assay

Tyrosyl kinase activity는 G. Rijksen 등(1991)이 이용한 방법을 기초로 하였다. 유선상피세포(3×10^5 cells/well)에 DMNB(1 μ M 첨가 직후 UV를 3초 동안 노출), EGF(100 ng/ml), IGF-I(10 ng/ml), EGF+IGF-I, EGF+DMNB, IGF-I+DMNB 및 EGF+IGF-I+DMNB를 처리한 후 1시간 동안 배양시켰으며, 4℃에서 5% sucrose와 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride가 함유되어 있는 Tris-HCl buffer(pH 7.0, 10 mM)에서 초음파 분쇄기(Sonics, USA)를 이용하여 세포를 균질화 시켰다. 미세분쇄된 세포를 원심분리(2,000 g, 10 min)시킨 후, 상청액은 Tyrosyl kinase assay를 위하여 이용하였다. Incubation buffer는 Tris-HCl(pH 7.5, 50 mM), Magnesium acetate(20 mM), NaF(5 mM), EDTA-Na₂(0.2 mM), EGTA(0.8 mM), Dithiothreitol(1 mM), Na₃VO₄(30 μ M), 2 mg/ml의 Poly GluNa-Tyrosine(4:1)(Sigma, St. Louis, MO) 및 10^{-4} M [γ -³²P]adenosine triphosphate(4,000 cpm/pmole)가 함유되어 있다. Assay를 위하여 50 μ l의 incubation buffer와 10 μ l의 mammary homogenate를 혼합한 후, ATP 1mM를 첨가시키고 36℃에서 30분간 인산화 작용을 시작하였다. Assay반응은 30 μ l를 filter paper disk에 옮김으로써 중지시켰고, 이들 filter paper disks들은 4℃의 10% TCA용액에 15분간 방치한 후 5% TCA용액에서 3번, 95% ethanol용액에서 15분간 정지한 후 건조시켰으며, Beckman LS 100 liquid scintillation counter를 이용하여 방사능 정도를 측정하였다. Tyrosyl kinase의 활성도는 기질 펩타이드인, Poly Glu-Na-Ty-

ro-sine(4:1)의 인산화작용 정도와 기질 펩타이드가 없는 상태인 background상태를 감하여 줌으로써 나타났다. Tyrosyl kinase의 활성도 단위인 unit는 protein kinase A에서 타나낸 바와 동일하다.

5. SDS-PAGE 단백질 전기영동과 Autoradiography

유선상피세포(3×10^5 cells/well)를 10% FCS가 함유되어 있는 DMEM배양액에 24시간 배양시킨 후, phosphate가 없는 DMEM용액에 다시 24시간 배양시켰으며, 새로운 phosphate free media로 교환하여 준 후 orthophosphate 100 μ Ci/ml을 넣고 DMNB (1 μ M 첨가 직후 UV를 3초 동안 노출), EGF(100 ng/ml), IGF-I(10 ng/ml), EGF+IGF-I, EGF+DMNB, IGF-I+DMNB 및 EGF+IGF-I+DMNB를 첨가한 후 0, 1 또는 15분간 배양시켰다. 배양 직후 배양액을 제거시키고 1 ml의 SDS-loading buffer를 첨가하여, 5분간 steam bath에서 시료를 끓이고 냉각시켰으며, SDS-PAGE, 10% gel에서 단백질을 분리시킨 후 건조시켜, -70°C 에서 X-ray film에 노출시키고, ImageQuant v3.3으로 인산화 단백질의 종류와 형태를 판별하였다.

6. 통계 분석

실험자료 분석은 PC-SAS package를 이용하였고, 완전 임의 배치법의 ANOVA로 통계분석하였으며, 각 처리간 비교는 planned comparison에 의하여 비교하였다(Steel and Torrie, 1960).

III. 결 과

Table 1은 유선상피세포에 DMNB(1 M, 첨가 후 2시간 뒤에 UV노출), EGF(100 ng/ml), IGF-I(10 ng/ml), DMNB+EGF, DMNB+IGF-I, EGF+IGF-I 및 DMNB+EGF+IGF-I을 첨가시킨 후 DNA합성단계(S 단계)에 있는 세포들을 백분율로 나타낸 것으로, 대조구에 비교하여 모든 처리구에서 유의하게 DNA합성지수를 증가시키는 것으로 나타났다($P < 0.05$). DMNB+EGF 또는 DMNB+EGF+IGF-I구에서는 각 성장인자를 둘 또는 셋을 병용으로 첨가한 결과 DNA합성 지수에 상호작용 효과를 볼 수

Table 1. Combination effects of various mitogens(DMNB, EGF and/or IGF-I) on the percentage of S phase of cells, measured as cell nuclei labeled with ^3H -thymidine

Treatment	Nuclear labeling index (% of S phase of cells)
Control	4.8%
DMNB(1 μ M)	7.2% a
EGF(100 ng/ml)	9.5% a
IGF-I(10 ng/ml)	9.2% a
DMNB+EGF	12.9% a, b
DMNB+IGF-I	11.9% a
EGF+IGF-I	12.7% a
DMNB+EGF+IGF-I	15.5% a, b

Data are presented as the mean percentage labeled cell nuclei from at least the replicates. a: significantly different than control($P < 0.05$). b: interaction effect with combinatin of the given mitogens($P < 0.05$). Interaction effect between or among treatments were compared by orthogonal contrast. Pooled SE = 0.7%.

있었는데, 이와 같은 결과는 Ethier 등(1987)이 생쥐의 유선상피세포에 cholera toxin과 EGF를 병행하여 첨가시킨 구에서 유선상피세포의 성장에 상호작용효과를 제시한 결과와 유사하였으며, Shamay 등(1990)이 젓소의 미분화된 유선상피세포에서의 상호작용 효과보다는 적었으나 성장인자 상호작용 효과에 대하여서는 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구에 비교하여 상호작용 정도에 차이가 있었던 이유중의 하나는, Ethier 등(1987)은 cAMP 활성인자로 cholera toxin을, 그리고 Shamay 등(1990)은 phosphodiesterase 억제인자를 이용하여 세포내 cAMP함량을 장기간 고농도로 유지시켰던 데서 기인한 것으로 사료된다.

Fig. 1에서는 대조구, EGF 및 EGF+IGF-I을 첨가하였을 때 protein kinase A의 특이적 활성도(specific activity)를 나타내 주는 것으로써, 대조구에서 8.8 unit/mg protein(Pooled SE = 1.23 unit/mg protein)이었으며, EGF(100 ng/ml) 첨가구에서는 10.5 unit/mg protein 그리고 IGF-I 첨가구에서는 9.8 unit/mg protein, EGF+IGF-I에서는 9.4 unit/mg protein으로, 각 처리간의 통계적

Protein Kinase A Assay

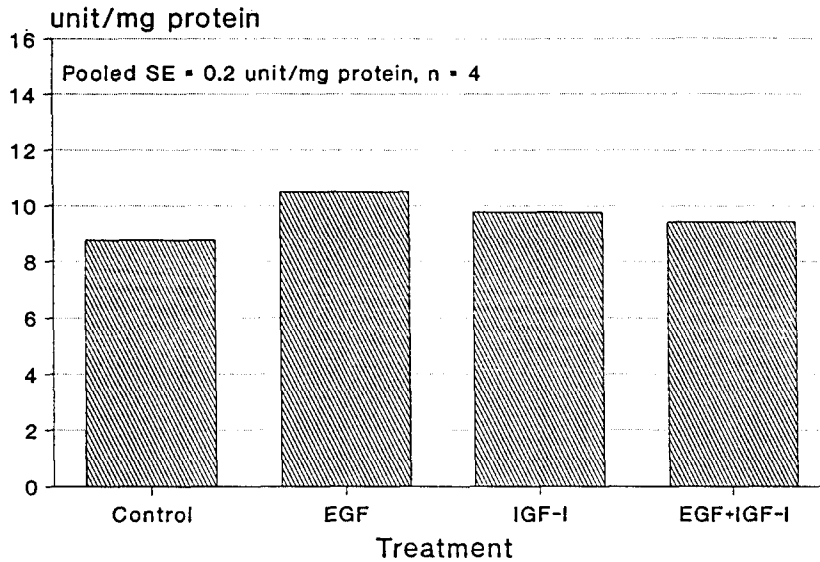


Fig. 1. Effects of EGF(100 ng/ml), IGF-I(10 ng/ml) or EGF+IGF-I on the protein kinase A activity. [1 unit = 1 pmole phosphate incorporated into histone per minute]

Tyrosyl Kinase Assay

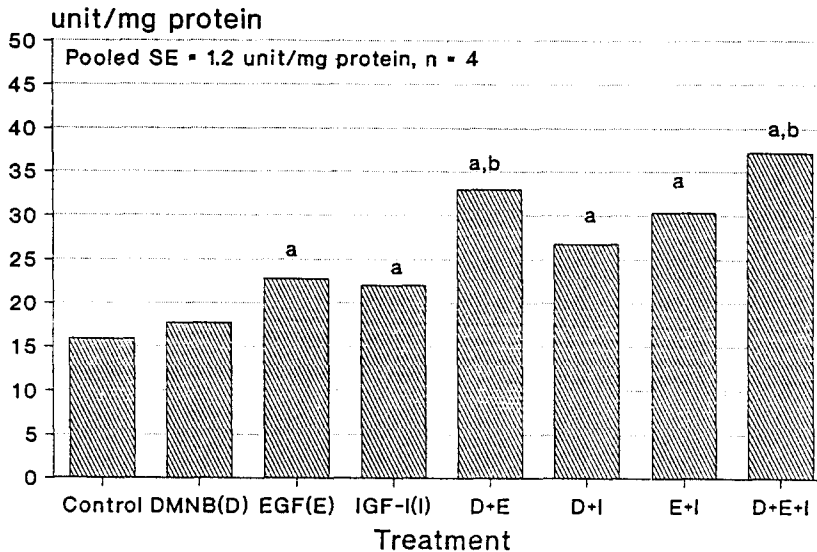


Fig. 2. Effects of combination of DMNB(1 μ M) or IGF-I (10 ng/ml) on tyrosyl kinase activity in mouse mammary epithelial cells. [1 unit = 1 pmole phosphate incorporated into poly(Glu-Na, Tyr; 4:1) per minute]. a; significantly different than control($P < 0.1$), b; significant interaction effect($P < 0.05$). Interaction effects between or among treatments were compared by orthogonal contrast.

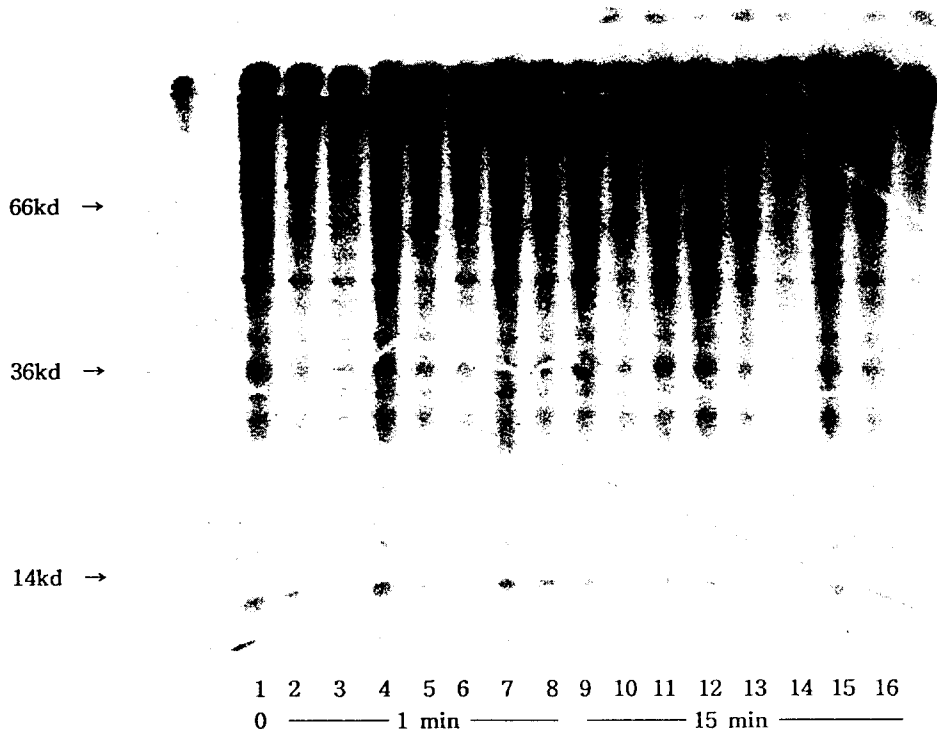


Fig. 3. Protein phosphorylation patterns by addition of various mitogens, DMNB(1 μ m), EGF(100 ng/ml) and/or IGF-I(10 ng/ml). Phosphorylations were analyzed by 1-dimensional SDS-PAGE and autoradiography. CL Control, D; DMNB, E; EGF, I; IGF-I.

인 유의성은 없었다 ($P > 0.05$).

Fig. 2는 tyrosyl kinase의 특이적 활성도를 나타내 주는 것으로 대조구가 15.9 units/mg protein, DMNB가 17.7 units/mg protein, EGF가 22.7 units/mg protein, IGF-I이 22.0 units/mg protein, DMNB+EGF가 33.0 units/mg protein, DMNB+IGF-I이 26.8 units/mg protein, EGF+IGF-I이 30.3 unit/mg protein 및 DMNB+EGF+IGF-I이 37.2 units/mg protein이었다. DMNB(1 μ M)를 단독으로 첨가시킨 구에서는 대조구(무처리구)에 비하여 tyrosyl kinase 활성도에는 영향을 미치지 않았으나, EGF(100 ng/ml) 및 IGF-I(10 ng/ml)을 단독으로 첨가시킨 구에서는 tyrosyl kinase의 활성도를 증진시키는 경향을 볼 수 있었으며($P < 0.1$), 나머지 구에서는 대조구에 비하여 유의하게 tyrosyl kinase의 활성도를 증진시키는 결과를 볼 수 있었다($P < 0.$

05). DMNB, EGF 및 IGF-I을 둘씩 또는 셋씩 복합 병행으로 처리하였을 경우, EGF와 DMNB를 병행하여 처리한 구에서는 tyrosyl kinase의 특이적 활성도에 상호작용 효과를 보이는 경향이 있었으나($P < 0.1$) 기타 병행처리구에서는 상호작용 효과를 볼 수 없었는데($P > 0.05$), DMNB, EGF 및 IGF-I을 병행으로 처리하였을 경우 DNA합성지수에 유의한 상호작용 효과를 나타낸 바와 유사한 결과를 제시하여 주고 있다.

Fig. 3은 DMNB, EGF 및 IGF-I을 단독 또는 병행으로 첨가한 후 1 또는 15분 내에 세포내에서 관찰되어지는 인산화 단백질의 종류를 나타내 주는 것으로서, 관찰시간내에서 각 처리에 따른 특이 인산화 단백질은 발견할 수 없었으며, 각 처리에 따른 인산화 단백질의 유형은 모두 유사한 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 특이 단백질의 인산화 작용이 처리 후 수초 또

는 1분내에 일어나고 빠른 시간내에 dephosphorylation 된 데서 기인하거나, 1차원 SDS-PAGE 전기영동에 의한 인산화 단백질의 분리정도(resolution)가 한정되어 있기 때문에 관찰되지 않은 것으로 사료된다. 처리에 따른 시간별 인산화 단백질의 유형에서도 특히 단백질이 관찰되지 않는데 이와 같은 이유도 위에서 제시한 바와 유사한 현상에서 기인된 것으로 사료된다. 특히 IGF-I과 EGF를 처리한 후 30분경에 관찰된 32Kd와 29Kd 인산화 단백질은 전기영동시 타처리구에 비하여 시료의 양이 많은데서 기인된 것으로 사료된다.

IV. 고 찰

지금까지 유선조직내에 존재하는 adenylyl cyclase 및 phosphodiesterase의 활성도나 조직내에 존재하는 cAMP의 함량이 가축의 생리주기에 따라 다르게 나타난다고 보고되어 왔는데, 특히 쥐의 임신말기에는 유선조직내의 cAMP의 함량이 최고에 이르고, 분만후 급격히 감소하는 것으로 나타났으며(Sapag-Hagar and Greenbaum, 1974), protein kinase A의 활성도는 임신기에 급격히 증가하는 것으로 보고되어 왔다(Majumder 등, 1971). 또한 Sharoni 등(1984)은 임신기간 동안의 protein kinase A의 활성도와 유선의 발달 정도에는 정의 상관관계가 있는 것으로 보고하였다. *In vitro* 실험에서 cAMP agonists, phosphodiesterase inhibitors(IBMx) 및 cholera toxin을 유선상피세포(Ethier 등, 1987, 1989), athymic nude mice에 이식시킨 유선조직(Sheffield and Welsch, 1986)이나 성장중인 젖소의 유선조직(Shamay 등, 1990)에 첨가하였을시 유선상피세포의 성장은 물론 유선조직의 발달을 가져왔다.

본 연구에서 DMNB가 유선상피세포의 DNA합성을 약 40~50% 증가시킨 결과는 Sheffield(1989a)가 adenylyl cyclase의 활성자인 cholera toxin을 이용하여 얻은 DNA합성 반응(대조구에 2배 증가)보다는 낮은 것으로 나타났으나, DMNB가 유선상피세포의 DNA합성지수를 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 장기간 그리고 고농도의 cAMP함량의 증가에 의하여 DNA합성이 유도된 것보다는 단시간 동안의 cAMP 노출에 의하여 야기된

DNA합성 정도가 작았지만, 유선상피세포의 DNA합성을 유의하게 증가시켰다는 점에서 매우 흥미로운 결과라 할 수 있다. 지금까지 유선 상피세포의 증식작용을 연구하기 위하여 세포내 장기간 그리고 비생리적인 cAMP의 농도를 유발시키는 생화학적 물질(예, cholera toxin 또는 phosphodiesterase 억제인자들)을 이용하여 유선발달에 관한 기전을 연구하여 왔는데, 이와 같은 생화학적 물질들을 이용하여 얻은 결과들은 cAMP가 장기간 세포내에서 고농도로 존재하기 때문에 발생될 수 있는 비생리적 반응이라 하여 cAMP에 의한 세포 증식작용에 관하여서는 많은 학자들에 의하여 의문점이 제시되어 왔다. 그러나 본 실험에서 단시간 동안의 cAMP 활성화작용이 DNA합성을 증가시켰다는 점은 지금까지 cholera toxin이나 phosphodiesterase 억제인자들을 이용하여 얻은 결과들이 정상적인 생리조건 하에서 발생될 수 있는 cAMP작용 양식을 대표할 수 있는 결과들임을 제시하여 주는 결과라 할 수 있다. DMNB와 UV노출에 의하여 증가된 DNA합성 효과는 cAMP 단독작용에 의하여 발생된 것이며 UV에 의한 작용이나, DMNB가 UV에 의하여 분해될 때 생성된 부산물에 의하여 야기된 결과가 아닐 것으로 사료된다(Kaplan 등, 1978; McCray 등, 1980).

EGF와 IGF-I을 첨가시키고 2시간 후에 cAMP작용을 활성화 시킨 실험에서는 DNA합성정도에 상호작용 효과를 얻을 수 없었으나(여 등, 1993), 세포내 cAMP를 활성화 시키고 동시에 EGF와 IGF-I을 첨가시킨 그룹에서는 DNA합성에 상호작용 효과를 얻을 수 있었는데, 이와 같은 결과는 EGF, IGF-I 및 cAMP에 의한 DNA합성 상호작용에 있어서 cAMP에 의한 정보전달 기작이 EGF와 IGF-I에 의한 정보전달 매체를 조절한 결과에서 발생된 것으로 사료된다. 본 연구에서는 Shamay 등(1990)이 젖소의 유선상피세포에서 얻은 상호작용 효과보다는 적었는데, 이와 같은 결과는 Shamay 등(1990)이 phosphodiesterase 억제인자를 이용하여 세포내 cAMP함량을 장기간 고농도로 유지시킨 결과에서 나타난 차이점으로 사료된다.

EGF, IGF-I 및 EGF+IGF-I를 처리할 때 대조구에 비교하여 protein kinase A의 활성도에는 영향을 미치지 않았다. 이와 같은 결과는 EGF가 protein ki-

nase A의 활성도에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 난소를 제거시킨 생쥐에 있어서 EGF방출의 근원조직인 침샘선(salivary gland)을 제거시킨 유선 조직과 침샘선을 제거시키지 않은 유선조직내 protein kinase A의 활성도 간에는 차이가 없는 것으로 보고되었는데(Sheffield and Kotolski, 1993) 이와 같은 결과는 본 연구의 유선상피 세포배양 결과에서와 일치하는 결과로 사료된다. 한편으로 Sheffield와 Kotolski(1993)는 난소호르몬인 progesterone과 estrogen을 병행하여 투여할시 침샘선을 제거시킨 그룹보다 제거시키지 않은 그룹에서 유의하게 protein kinase A의 활성도를 증가시켰는데, 이와 같은 결과는 EGF에 의한 단독작용이라기 보다는 난소 호르몬인 estrogen과 progesterone과의 상호작용에 의하여 protein kinase A의 활성도를 증진시키는 것으로 나타났다.

본 실험의 DMNB+EGF 및 DMNB+EGF+IGF-I 첨가구에서 유선상피세포의 증식작용에 상호작용 효과가 있었던 것은 세포내 cAMP에 의한 생리작용이 tyrosyl kinase의 활성도를 조절함으로써 유선세포 성장에 상호작용 효과를 보이는 것으로 사료된다. DMNB, EGF 및 IGF-I를 단독 또는 병행으로 처리한 후, 단시간 동안 세포내에 형성되는 인산화 단백질의 유형에는 차이가 없었는데, 본 연구에서 이용된 단백질 전기영동법이 1차원이었으며, 단백질 분리정도가 섬세하지 못했던 데서 기인된 것으로 사료된다.

V. 적 요

본 실험은 UV노출에 의하여 활성 cAMP로 전환되는 photoreactive cAMP를 이용하여 단시간 동안 세포내 cAMP함량을 증가시키고, 유선발달에 영향을 미치는 성장인자인 EGF와 IGF-I를 첨가하여 세포성장 에 미치는 이들의 상호작용 효과를 검토하고, 세포 증식 작용의 상호작용 효과가 Tyrosyl kinase 및 protein kinase A활성도의 변화와 상호관계가 있는지를 검토하기 위함이다. 생쥐의 유선상피세포를 6 또는 24 well 배양접시(1×10^5 및 3×10^5 cells/well)에 기초배양액인 DMEM과 10% FCS를 이용하여 24시간 동안 접착시키고, 다른 24시간 동안 모든 세포를 Go/G1단계에 도달시킨 후 실험 목적에 따라 Photoreactive cyclic AMP(DMNB)를 유선상피세포에

첨가한 후, 2시간 뒤에 UV를 노출시켰으며(300nm, 3 초간), Epidermal growth factor(EGF) 또는 insulin-like growth factor-I(IGF-I)를 UV 노출 직후 유선상피세포에 처리하여, 세포성장 효과, tyrosyl kinase 및 protein kinase A의 활성도 변화에 대한 병행효과를 측정하였다. DMNB($1 \mu\text{M}$), EGF(100 ng/ml) 및 IGF-I(10 ng/ml)을 단독 또는 병행으로 처리한 모든 구는 대조구에 비교하여 DNA 합성지수를 유의하게 증가시켰으며, DMNB+EGF 또는 DMNB+EGF+IGF-I구에서는 DNA합성지수에 상호작용 효과를 볼 수 있었다($P < 0.05$). 대조구, EGF, IGF-I 및 EGF+IGF-I를 첨가시킨 구에서 protein kinase A의 활성도는 각각 10.5, 10.5, 9.8 및 9.4 unit/mg protein으로, 각 처리간의 통계적 유의성은 없었다($P > 0.05$). DMNB 첨가는 tyrosyl kinase의 활성도에 영향을 미치지 않았으며, DMNB+EGF를 병행으로 처리한 구에서는 tyrosyl kinase의 특이적 활성도에 상호작용 효과를 보이는 경향이 있었다($P > 0.1$). DMNB, EGF 및 IGF-I를 단독 또는 병행으로 처리한 후, 1 차원 SDS-PAGE를 이용하여 1 및 15분내 세포내에서 형성되는 인산화 단백질은 관찰한 결과, 성장인자들의 특이 인산화 단백질은 관찰되지 않았다.

VI. 참고문헌

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
2. Ethier, S. P., A. Kudla, and K. C. Cundiff. 1987. Influence of hormone and growth factor interactions on the proliferative potential of normal rat mammary epithelial cells *in vitro*. *J. Cell. Physiol.* 132:161-167.
3. Ethier, S. P., R. M. van de Velde, and K. C. Cundiff. 1989. cAMP levels in proliferating rat mammary epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 182:653-658.

4. Greengard, P. 1978. Phosphorylated proteins as physiological effectors: Protein phosphorylation may be a final common pathway for many biological regulatory agents. *Science* 199:146-152.
5. Imagawa, W., G. K. Bandyopadhyay, D. Wallagem and S. Nandi 1988. Growth stimulation by PGE₂ and EGF activates cyclic AMP-dependent and independent pathway in primary cultures of mouse mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 135:509-515.
6. Kaplan, J. H., B. Forbush, and J. F. Hofman, 1978. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: Utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* 17:1929-1935.
7. Loizzi, R. F. 1983. Cyclic AMP changes in guinea pig mammary gland and milk. *Amer. J. Physiol.* 8:E549-E554.
8. Majumder, G. C., and R. W. Turkington, 1971. Hormonal regulation of protein kinases and adenosine 3',5'-monophosphate-binding protein in developing mammary gland. *J. Biol. Chem.* 246:5545-5554.
9. McCray, J. A., L. Herbertte, T. Kihara, and D. R. Trentham, 1980. A new approach to time resolved studies of ATP requiring biological systems: Laser flash photolysis of caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7237-7241.
10. Nerbonne, J. M. 1986. Design and application of photolabile intracellular probes. In: *Optical Methods in Cell Physiology*, edited by P. DeWeer and B. Salzberg. New York: Wiley 40:417-446.
11. Nerbonne, J. M., S. Richard, J. Nargeot, and H. Lester, 1984. New photoreactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations. *Nature* 310:74-76.
12. Okamoto, S., and T. Oka. 1984. Evidence for physiological function of epidermal growth factor: Pregestation sialoadenectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6059-6063.
13. Richard, S., J. M. Nerbonne, J. Nargeot, H. A. Lester, and D. Garnier, 1985. Photochemically produced intracellular concentration jumps of cAMP mimic the effects of catecholamines on excitation-concentration coupling in frog atrial fibers. *Pflugers Arch* 403:312-317.
14. Rijksen G., A. Brigit, van Oirschot, and G. E. J. Staal. 1991. Nonradioactive assays of protein-tyrosine kinase activity using anti-phosphotyrosine antibodies. In: T. Hunter and B. M. Sefton, eds. *Methods in enzymology* vol. 200, p.98.
15. Rillema, J. A. 1976. Cyclic nucleotides, adenylate cyclase, and cyclic AMP phosphodiesterase in mammary glands from pregnant and lactating mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151:748-751.
16. Sapag-Hagar, M., and A. L. Greenbaum. 1974. Adenosine 3', 5'-monophosphate and hormone interrelationships in the mammary gland of the rat pregnancy and lactation. *Eur. J. Biochem.* 47:303-312.
17. Shamay, A., M. Pines, M. Waksman, and A. Gertler. 1990. Proliferation of bovine undifferentiated mammary epithelial cells *in vitro* is modulated by G-proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 69:217-226.
18. Sharoni, Y., B. Feldman, I. Teuerstein, and J. Levy. 1984. Protein kinase activity in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and weaning: A correlation with growth but not with progesteron receptor levels. *Endocrinology.* 115:1918-1924.
19. Sheffield, L. G. 1989. Influence of cholera

- toxin(an adenylate cyclase activator) on deoxyribonucleic acid synthesis of bovine mammary tissue *in vitro* and in athymic nude mice. *J. Dairy Sci.* 72:41-48.
20. Sheffield L. G. and L. C. Kotolski. 1993. Epidermal growth factor modulates cholera toxin induced mammary gland development. *Endocrine Res.* 19(4): 259-271.
 21. Sheffield, L. G., and C. W. Welsch. 1986. Transplantation of bovine mammary tissue to athymic nude mice: Growth subcutaneously and in mammary gland-free fat pads. *J. Dairy Sci.* 69:1141-1147.
 22. Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
 23. Taketani, Y., and T. Oka. 1983. Epidermal growth factor stimulates cell proliferation and inhibits functional differentiation of mouse mammary epithelial cells in culture. *Endocrinol.* 113:871-877.
 24. Taylor-Papadimitriou, J., P. Purkis, and I. S. Fentiman. 1980. Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human mammary gland. *J. Cell. Physiol.* 102:317-321.
 25. Tonelli, Q. J., and S. Sorof. 1980. Epidermal growth factor requirement for development of cultured mammary gland. *Nature* 285: 250-252.
 26. Yang, J., R. Guzman, J. Richards, W. Imagawa, K. McCormic, and S. Nandi. 1980. Growth factor-and cyclic nucleotide-induced proliferation of normal and malignant mammary epithelial cells in primary culture. *Endocrinol.* 107:35-41.
 27. 여인서, 박춘근, 홍병주. 1993. 유선발달에 있어서 cAMP, EGF, IGF-I 및 단백질 인산화 작용의 역할. I. EGF, IGF-I 및 Photoreactive Cyclic AMP가 유선상피세포의 DNA합성에 미치는 효과. *한국 가축번식학회지* 17(1):49-56.