

GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone)에 의한 자궁내막암 유래 세포주의 세포 증식 억제 기전에 있어서 Integrin, FAK (Focal Adhesion Kinase) 및 ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase)의 역할

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 아주대학교 분자과학기술학과²

최종락¹ · 박동욱² · 최동순² · 민철기²

Role of Integrin, FAK (Focal Adhesion Kinase) and ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) on the Suppressed Cell Proliferation of Endometrial Cancer Cells by GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone)

Jong Rak Choi¹, Dong Wook Park², Dong Soon Choi², Churl K. Min²

¹Department of Clinical Pathology, Yonsei University, Seoul, Korea,

²Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon, Korea

Objective: To investigate new signal transduction cascade through integrin, FAK and ERK in the suppressed cell proliferation by GnRH-I and -II.

Method: Human endometrial cancer cells (HEC1A) were cultured under the following condition: DMEM/F12 (10% FBS). GnRH-I and -II were treated time (0, 5, 10, 15, 20, 30 min; 100 nM) and dose (10 nM or 100 nM; 20 min) dependent manner according to experimental purposes. Cell proliferation was measured using [³H] thymidine incorporation assay. Immunoblotting was utilized to detect proteins.

Results: GnRH-I and -II inhibited proliferation of HEC1A cells and induced expression of integrin $\beta 3$. Phosphorylation of FAK and ERK were induced by GnRH-I and -II.

Conclusion: GnRH inhibited cell proliferation via the expression of integrin and FAK, ERK phosphorylation.

Key Words: GnRH, Integrin, FAK, ERK, Phosphorylation

성선자극 호르몬 방출 호르몬 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)은 시상하부로부터 분비되어 생식선에서 다양한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 시상하부로부터 분비된 GnRH는 뇌하수체 전엽 (anterior pituitary)에 있는 수용체와 결합하여 성선자극 호르몬 (gonadotropins), 황체화 호르몬 (luteinizing hormone, LH) 및 난포자극 호르몬 (follicle-stimulating hormone, FSH)의 분비를 촉진한다.^{1,2} 이 외에도 GnRH의 유사체 (Gonadotropin-releasing hor-

mone analogue, GnRHa)는 다양한 여성 생식기 질환에 치료제로 이용되고 있다.^{3,4} 시상하부 이외에도 GnRH-I은 자궁내막, 태반, 유방, 정소 및 전립선에서 관찰된다.⁵⁻⁸ 이와 더불어 자궁내막 조직 및 자궁근층에서 GnRH의 수용체가 발현 한다는 보고가 있다.⁹ 뇌하수체에서 FSH와 LH의 분비를 조절하는 잘 알려진 역할 이외에도 GnRH는 다양한 인간 종양 유래 세포주의 증식을 억제한다는 보고가 있었다.¹⁰⁻¹³

주관책임자: 박동욱, 우) 443-749 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5, 아주대학교 분자과학기술학과
Tel: (031) 219-2608, Fax: (031) 219-1885, e-mail: parker@ajou.ac.kr

GnRH는 배양된 자궁내막 세포에서 Smad의 발현 및 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁴ 이와 더불어 자궁내막증을 가진 여성으로부터 배양된 자궁내막 세포의 세포 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 뿐만 아니라 다양한 인간 암 세포주에 있어서 GnRH 유사체 및 길항제 (antagonist)의 처리가 농도 및 시간 의존적으로 세포 증식을 억제한다는 보고가 있다. 김 등¹⁶은 배양된 난소암 세포주에 GnRH를 처리한 결과 난소암 세포주의 증식이 억제되었으며 이러한 GnRH의 억제 작용은 extracellular signal regulated protein kinases (ERK) 및 p38의 활성화를 통해 일어남을 보고한 바 있다. 이전의 다양한 연구 결과에서 GnRH 유사체 및 길항제가 Ishikawa, HEC1A와 같은 자궁내막암 세포주 및 일차 배양된 자궁내막암 세포의 증식을 억제 한다는 보고가 있었다.^{17,18} Davidson 등은¹⁹ 이러한 GnRH의 세포 증식 억제 효과를 좀 더 명확히 증명하기 위하여 GnRH 수용체를 인간 태자유래 신장세포주 (HEK-293)에 과발현 (overexpression) 시킨 후 GnRH를 배양액에 10^{-7} M의 농도로 첨가 하였다. 이 결과 focal adhesion kinase (FAK), c-Src, ERK 등의 활성화를 관찰할 수 있었으며 결과적으로 세포골격 (cytoskeleton)의 개작 (remodeling)을 가져왔음을 보고 하였다. 이러한 세포내 신호전달 과정은 일반적으로 알려진 phospholipase C를 통하는 GnRH 수용체의 세포내 신호전달 과정과는 다르다는 결론을 내렸다.

Integrin은 당단백질 (glycoproteins)의 일종인 이형이합체 (heterodimer)로 세포의 접합 (adhesion)에 관여 하며 세포의 사멸, 증식, 이동 (migration)과 조직개작 (tissue remodeling)에 관여하는 것으로 알려져 있다. Integrin 분자는 일반적으로 α 와 β 소단위 (subunit)가 비공유 결합 (noncovalent link)에 의하여 연결 되어 있으며, 각 소단위는 거대한 세포외 영역 (extracellular domain), 한 개의 세포막 영역 (membrane spanning domain), 및 짧은 비촉매성 세포질 꼬리 (noncatalytic cytoplasmic tail)로 이루어져 있다. 현재까지 18종류의 α 및 β 소단위가 알려졌으며 이들은 최소 25가지의 이형이합체를 형성하는 것으로 알려져 있다.^{20,21} Integrin은 세포의 접합 이외에도 다양한 성장인자 또는 FAK와 Src와 같은 비수용체 tyrosine kinase를 통한 다양한 세포내 신호전달을

매개 하는 것으로 알려져 있다.²²

인간 자궁내막 조직에 대한 면역조직화학 연구들 (Immunohistochemical studies)에서 $\beta 3$ -integrin 소단위의 발현이 생리기간 중 중기 분비기의 기질 세포 및 과립 상피세포에서 증가 한다는 보고가 있다.^{23,24} 더욱이 Kamonari 등은²⁵ integrin $\beta 3$ 소단위의 과발현이 종양의 증식을 억제함을 보고 하였다. 이러한 연구 결과는 integrin $\beta 3$ 소단위가 자궁 내막의 증식 억제 및 분화에 중요한 역할을 할 가능성을 시사 한다.

따라서 본 연구를 통하여 GnRH가 배양된 자궁내막암 세포주 (HEC1A)에서 세포의 증식을 억제하는지를 관찰 하였으며 이러한 과정이 integrin $\beta 3$ 소단위의 발현을 증가 및 이 결과 FAK의 활성화 및 ERK의 활성화를 통하여 일어남을 증명하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 시 약

A GnRH-I analog, Trp(6)는 Sigma사를 통하여 구입 하였다 (Ontario, Canada). A GnRH-II 유사체 d-Arg(6)-Azagly(10)-NH₂는 Peninsula Laboratories (Belmont, CA)사로부터 구입하여 실험에 사용 하였다.

2. 항 체

Polyclonal anti-integrin $\beta 3$, polyclonal anti-phospho-FAK (Ser-722)와 monoclonal anti-FAK antibodies는 Santa cruz biotechnology, Inc. (Santa cruz, CA)사로부터 구입 하였다. Monoclonal anti-phospho-ERK 및 polyclonal anti-ERK antibodies는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)사로부터 구입하여 사용 하였다.

3. 세포주

성질이 잘 알려진 인간 자궁내막암 세포주 (HEC-1A)는 American Type Culture Collection (ATCC, HTB-112 Manassas, Va)로부터 구입하여 사용 하였다. 세포는 DMEM/F12 (without phenol red, Invitrogen, Ontario, Canada)에 10% 우태아 혈청 (FBS, Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Ontario, Canada)을 첨가한 배양액에서 배양 하였다.

4. Immunoblot analysis

GnRH-I 또는 -II를 연구 목적에 따라 처리한 세포를 얼음 위에서 PBS로 2회 세척하였다. 그 후에 100 μ l의 ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml leupeptin, and 100 μ g/ml aprotinin)를 이용하여 세포를 녹였다. 세포 용액을 10분간 얼음 위에서 방치 후 1.5 ml 시험관으로 옮겨 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리 하였다. 상층액을 새로운 시험관으로 옮겨 Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada)를 이용하여 단백질 농도를 결정 하였다. 35 μ g의 단백질을 6 X sample buffer (75 mM Tris-HCl of pH 6.8, 15% SDS, 0.15% bromophenol blue, 15% glycerol, and 37.2% 2-mercapthoethanol)와 잘 섞은 후 10분간 끓였다. 시료 혼합액을 10% SDS-PAGE gels (acrylamide: bisacrylamide, 29:1)를 이용하여 1 X gel running buffer (25 mM Tris/250 mM glycine, pH 8.3/0.1% SDS)내에서 100 V 조건으로 2.5시간 동안 전기영동을 수행 하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane (Hybond C, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Oakville, Ontario, Canada)으로 100 V에서 1.5시간 동안 transfer를 수행 하였다. Membrane은 일차항체로 하루 밤 동안 처리 하였다. 그 후 membrane을 TBS-T (0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)로 15분간 3차례 세척 하였다. 신호는 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)와 enhanced chemiluminescence system (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)을 이용하여 가시화 하였다. 신호의 강도는 densitometry (Bio-DocAnalyze, Biometra, Germany)를 이용하여 정량화 하였다.

5. Proliferation assay

세포의 증식은 [3 H] thymidine incorporation assay를 이용하여 정량적으로 측정 하였다. 20,000개의 세포를 24-well plates 상에 접종하여 0.5 ml의 배지에서 배양 하였다. 연구 목적에 맞게 희석된 GnRH-I와 -II를 첨가한 후 24시간 동안 배양 하였다. 처리 후 세포를 1 μ Ci [3 H] thymidine (0.5 Ci/mmol; Amersham

Pharmacia Biotech Inc.)가 함유된 배지로 교체하여 6시간 동안 배양 하였다. 세포를 PBS로 세 번 세척 후 0.5 ml 10% trichloroacetic acid를 첨가 하여 20 동안 4°C에 보관 하였다. 그 후에 methanol로 2번 세척 후 0.5 ml의 0.1 N sodium hydroxide를 이용하여 액화 시켰다. 방사능의 세기는 Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer (model 2100TR, Packard Instrument Co., Meriden, CT)를 이용하여 정량적으로 측정 하였다.

6. 통계분석

각각의 연구는 독립적으로 3회 반복하였으며 모든 데이터는 ANOVA, Tukey's multiple comparison test를 이용하여 분석 하였다. 3회의 독립 실험 데이터는 평균을 계산하여 평균 \pm S.D.으로 표시 하였다. 단백질의 발현 정도는 대조군과 비교하여 배율 차이로 나타내었다. [3 H] Thymidine incorporation assay는 대조군과 백분율의 차이로 나타내었으며 평균 \pm S.E로 나타내었다. $p < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정 하였다.

결 과

1. GnRH에 의한 integrin β 3의 발현

GnRH-I과 -II의 integrin β 3 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여, HEC1A 세포를 GnRH-I과 -II (100 nM)로 24시간 동안 처리 하였다. GnRH-I과 -II의 처리 후 모두 HEC1A 세포로부터 integrin β 3의 발현을 증가 시켰다 (Figure 1).

2. GnRH에 의한 세포 증식의 억제

GnRH-I과 -II의 세포 증식에 미치는 효과를 확인 하기 위하여 HEC1A 세포를 10 nM과 100 nM의 농도로 GnRH-I과 -II를 각각 24시간 동안 처리 하였다. 처리 결과 GnRH-I과 -II 모두 HEC1A 세포의 증식을 억제 하는 것을 알 수 있었다. 세포 증식은 GnRH-I과 -II 모두에 대하여 농도 의존적으로 감소 하였다. GnRH-I을 24시간 처리 하였을 경우 처리 하지 않은 대조군에 비하여 10 nM에서 $89.8 \pm 1.1\%$, 100 nM에서 $79.2 \pm 2.1\%$ 의 세포 증식 정도를 관찰 할 수 있었다. 또한 GnRH-II의 경우 대조군과 비

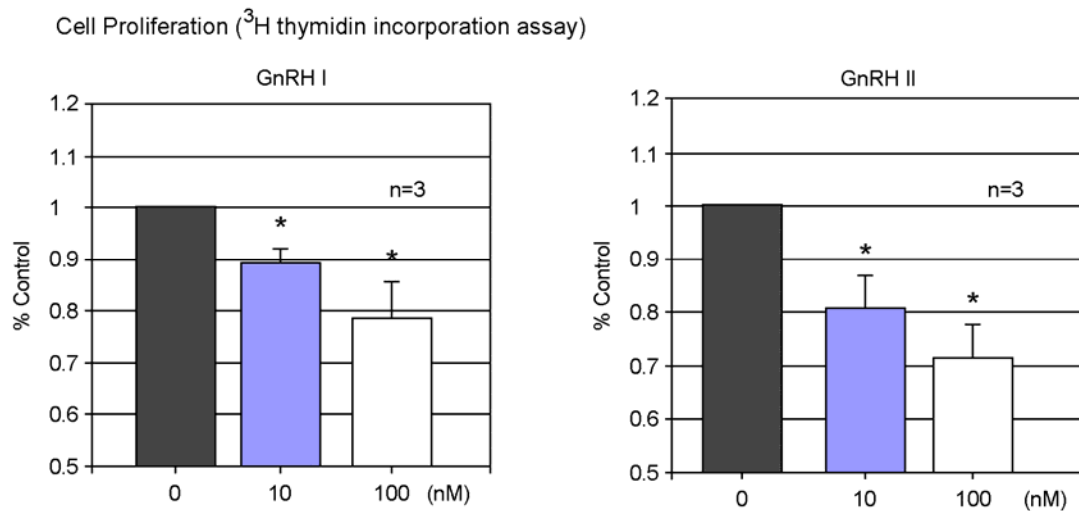


Figure 1. Effect of GnRH-1 and GnRH-2 analog on cell growth in HEC1A endometrial cancer cells. HEC1A cells were maintained for 24 hours in serum-free medium in the absence or presence of GnRH-1 and GnRH-2 analog (10 nM or 100 nM). Cell proliferation was determined by ³H thymidin incorporation assays. Values are the mean cell number (\pm S.E.) from three independent experiments. 10 measurements were performed per experiment for each condition. The error bars represent the mean \pm S.E. from three independent experiments. * indicates $p < 0.05$.

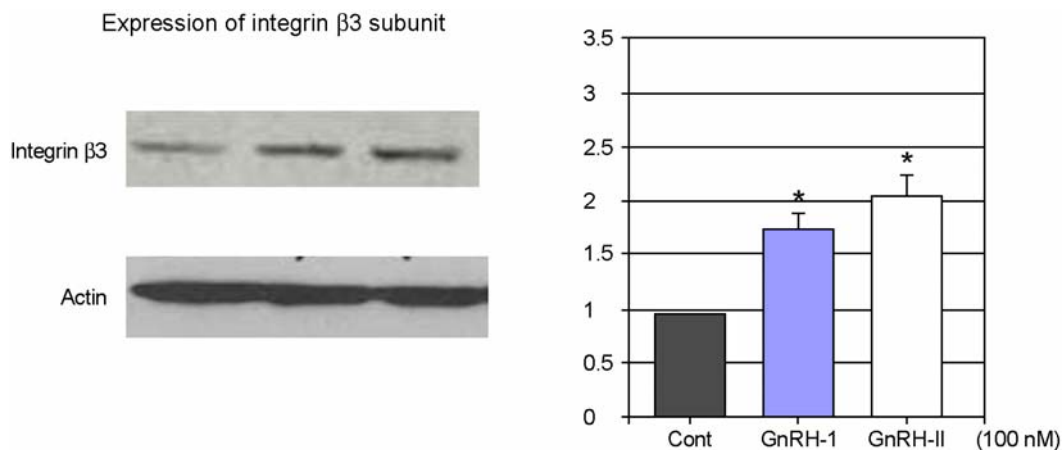


Figure 2. Effect of GnRH-1 and GnRH-2 analog on expression of integrin β 3 subunit on HEC1A endometrial cancer cells. HEC1A cells were maintained for 24 hours in serum-free medium in the absence or presence of GnRH-1 and GnRH-2 analog (100 nM). Expression of integrin β 3 subunit was determined by western blotting. Values are the mean cell number (\pm S.E.) from three independent experiments. The error bars represent the mean \pm S.E. from three independent experiments. * indicates $p < 0.05$.

교하여 10 nM에서 $80.2 \pm 1.8\%$, 100 nM에서 $71.2 \pm 2.2\%$ 의 세포 증식 정도를 보였다 (Figure 2).

3. GnRH에 의한 FAK의 활성화

Integrin에 의한 세포내 신호전달 기전의 하위 분자인 FAK의 활성화가 GnRH-I과 -II에 의하여 유도

되는 것을 관찰 하였다. GnRH-I과 -II를 각각 100 nM의 농도로 HEC1A 세포에 0, 5, 10, 15, 20, 30과 60분간 처리 하여 FAK의 인산화 정도를 Western blotting을 이용하여 측정 하였다. 측정 결과 GnRH-I의 경우 5분에서 20분 사이에 FAK의 인산화가 대조군과 비교하여 유의하게 증가 하였으며 그 이후

에는 감소하는 양상을 보였다. GnRH-II의 경우에는 처리 5분 후부터 증가 하여 처리 후 20분에 최대의

FAK 인산화 정도 (4.7 ± 0.26)를 보였으며 처리 후 60분까지도 지속적인 인산화를 보였다 (Figure 3).

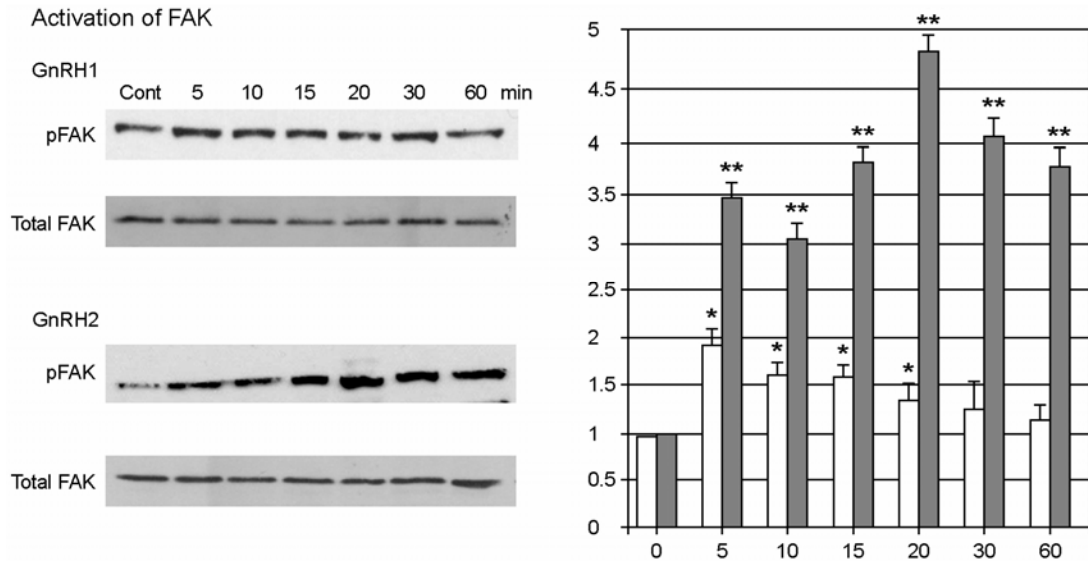


Figure 3. Effect of GnRH-1 and GnRH-2 analog on activation of FAK in HEC1A endometrial cancer cells. HEC1A cells were treated with GnRH-I and II (100 nM) in a time-dependent manner. Phosphorylation of FAK was determined by western blotting. Values are the mean cell number (\pm S.E.) from three independent experiments. The error bars represent the mean \pm S.E. from three independent experiments. * indicates $p < 0.05$ in GnRH-I treatment, GnRH-II treatment. □, GnRH-1 treatment; ■, GnRH-2 treatment.

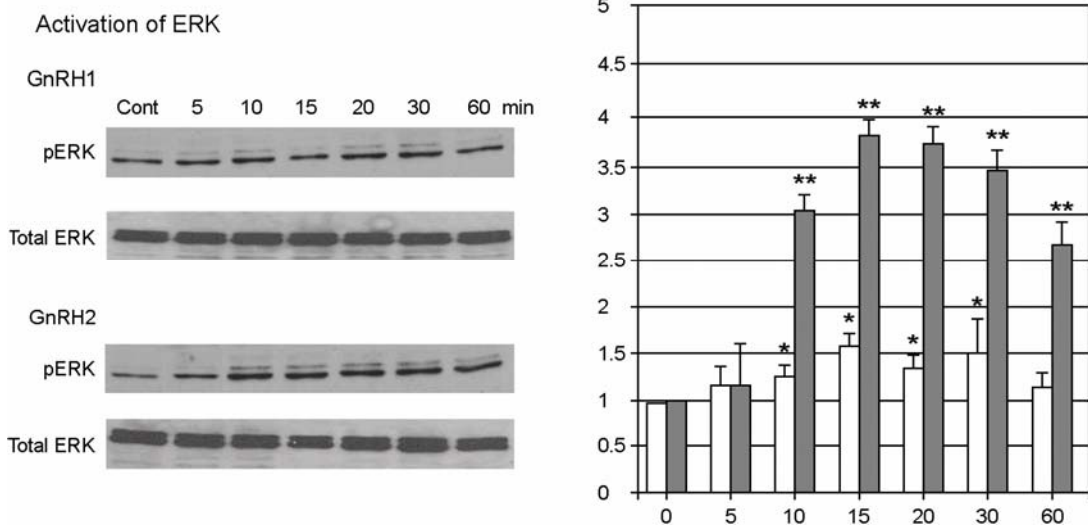


Figure 4. Effect of GnRH-1 and GnRH-2 analog on activation of ERK in HEC1A endometrial cancer cells. HEC1A cells were treated with GnRH-I and II (100 nM) in a time-dependent manner. Phosphorylation of ERK was determined by western blotting. Values are the mean cell number (\pm S.E.) from three independent experiments. The error bars represent the mean \pm S.E. from three independent experiments. * indicates $p < 0.05$ in GnRH-I treatment, GnRH-II treatment. □, GnRH-1 treatment; ■, GnRH-2 treatment.

4. GnRH에 의한 ERK의 활성화

세포내 ERK의 활성화가 GnRH-I과 -II에 의하여 유도되는 지를 관찰 하였다. GnRH-I과 -II를 각각 100 nM의 농도로 HEC1A 세포에 0, 5, 10, 15, 20, 30 과 60분간 처리 하여 ERK의 인산화 정도를 Western blotting을 이용하여 측정 하였다. GnRH-I의 경우 처리 후 10분경부터 ERK의 인산화가 증가하기 시작하여 15분에 최대 측정값 (1.51 ± 0.2)을 보였으며 이후 점차 감소하였다. GnRH-II의 경우에는 처리 10분 후부터 ERK의 인산화가 증가 하여 처리 후 15분에 최대 측정값 (3.75 ± 0.2)을 보였다 (Figure 4).

고 찰

호르몬, 성장인자 및 다양한 세포의 조절자들은 그들의 수용체와 결합한 후 세포질에 존재하는 mitogen-activated protein kinase (MAPK)들과 같은 분자들의 연속적인 인산화 과정을 통하여 신호를 핵으로 전달한다.²⁶

G protein 연관 수용체들 (G protein coupled receptors, GPCRs)은 잘 알려진 세포막 유래 수용체 무리 중 하나이다. GPCRs은 그들의 신호를 일차적으로 GTP-binding protein들 (G-proteins)을 통하여 전달하는 것으로 알려져 있으며 일반적으로 α , β 와 γ 소단위로 이루어진 이형삼합체 (heterotrimer) 구조로 이루어져 있다. G-protein은 일반적으로 α 소단위의 종류에 따라 G_s , G_i , G_q 및 G_{12} 로 구분한다. 현재까지 알려진 다양한 GPCRs의 세포내 신호전달 기작 이외에도 GPCRs는 ERK-MAP kinase와 같은 단백질의 tyrosine phosphorylation을 통하여 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹

FAK (focal adhesion kinase)는 비수용체 (non-receptor) tyrosin kinase로서 세포막의 접합 복합체 (plasma membrane focal adhesion complex)의 한 부분을 이룬다. 세포막에 존재하는 integrin의 활성화와 연이은 FAK의 auto-phosphorylation은 c-Src 및 Grb2와 같은 다양한 신호전달 분자의 접합부위를 제공하는 것으로 알려져 있다.²⁷ 뿐만 아니라 다양한 세포에서 $G_{\alpha i}$ 와 $G_{\alpha q}$ 와 같은 GPCRs의 활성화는 FAK의 활성화를 유도 한다는 보고가 있다.^{28,29}

백서의 L β T2 성선 세포주에서 발현하는 GnRH-I 수용체는 $G_{\alpha q}$ G protein과 연계하여 다른 GPCRs와 마찬가지로 protein kinase C (PKC)를 활성화 하며 세포내 Ca^{2+} 의 이동을 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁰

본 연구를 통하여 GnRH 수용체의 활성화에 의한 세포내 신호전달 기전이 다른 GPCRs와 마찬가지로 MAPK의 활성화를 통하여 이루어짐을 증명하였으며 더 나아가 integrin 및 FAK의 활성화에도 관여함을 관찰 하였다.

GnRH-I과 -II를 배양된 자궁내막암 세포주 (HEC-1A)에 10 nM 및 100 nM의 농도로 24시간 동안 처리한 후 세포 증식의 변화를 관찰 하였다. 관찰 결과 GnRH-I과 -II 모두 HEC1A 세포주의 증식을 억제 하였으며 100 nM의 농도로 처리 하였을 경우 억제 효과가 10 nM에 비하여 더 큰 것을 알 수 있었다 (Figure 1).

Integrin $\beta 3$ 소단위 및 $\alpha v\beta 3$ integrin은 신경교종 (glioma)을 포함한 각종 고형암에서 과발현 된다는 보고가 있으며 이러한 integrin 분자의 과발현은 종양의 성장과 침윤을 조절하는 것으로 알려져 있다. Kanamori 등은²⁵ 신경교종 세포에서 과발현된 integrin $\beta 3$ 가 in vivo에서 신경교종의 성장을 촉진하는 것이 아니라 오히려 신경교종 세포의 증식을 억제함을 보고한 바 있다. 이 외에도 다양한 연구에서 백서에 이식된 종양의 증식 및 전이 과정에서 integrin 또는 selectin과 같은 세포접합 수용체의 발현이 억제됨을 보고한 바 있다.³¹⁻³³ 뿐만 아니라 정상 인간 자궁내막 조직에 대한 면역조직화학 연구에서 $\beta 3$ integrin 소단위의 발현이 생리기간 착상기 자궁내막의 기질 세포 및 과립 상피세포에서 증가 한다는 보고가 있다.²⁴ 본 연구에서도 GnRH-I과 -II가 HEC1A 세포의 integrin $\beta 3$ 의 발현을 증가 시켰다 (Figure 2). 따라서 GnRH는 HEC1A 세포의 증식을 억제하며 이러한 억제 기전은 integrin과 같은 세포접합 수용체 분자와 연관된 세포내 신호전달 기전에 의하여 일어날 가능성을 시사한다.

다른 GPCRs와 마찬가지로 GnRH 수용체는 monomeric G protein의 활성을 유도하는 것으로 알려져 있다. 이들 monomeric G protein의 활성화는 성선에서 다양한 성선호르몬 분자의 전사를 조절하는 것

으로 알려져 있다.³⁰ 다양한 세포를 이용한 이전의 연구 결과에서 G_i 또는 G_q 연관 수용체의 경우 FAK의 활성을 유도한다는 보고가 있다.³⁴ 이와 더불어 GnRH는 활성화된 FAK를 통해 ERK와 c-Src의 활성화에도 관여 하는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 본 연구에서도 GnRH가 FAK의 인산화를 증가 시키는 것을 관찰할 수 있었다. Figure 3에 나타난 바와 같이 FAK의 인산화가 GnRH-I에 의하여 증가 하며 처리 후 5분에 최고조로 증가하여 점차적으로 감소하는 양상을 보였다. GnRH-II에 의한 FAK의 인산화는 처리 후 20분경에 최고치를 보였으며 전 관찰 시간 동안 비교적 높은 인산화 정도를 보였다. FAK는 다양한 세포에서 ERK 활성화의 조절자로 알려져 있다.³⁵ 본 연구에서도 GnRH-I과 -II를 처리 10분 후부터 ERK의 인산화가 증가하는 양상을 보였다. ERK의 인산화는 GnRH-I과 -II에서 모두 처리 후 15분경에 최대치를 나타내었다.

본 연구를 통하여 GnRH-I에 비하여 GnRH-II가 세포 증식 억제 및 integrin $\beta 3$ 의 발현, FAK 활성화, ERK의 활성화에 있어서 더욱 큰 효과를 보였다. GnRH 수용체의 길항제로 알려진 antide의 경우 세포의 증식 억제 기전에 어떠한 영향을 주지 못하였으며 GnRH와의 공동 투여에 있어서도 일정한 길항 효과를 얻을 수 없었다 (data not shown). 이러한 결과는 GnRH의 영향이 자궁내막암 세포주에서는 기존에 알려진 GnRH 수용체 type 1 보다는 type 2를 통하여 일어날 가능성을 시사하며 이를 밝히기 위한 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

결론적으로 본 연구자들은 자궁내막암 세포주를 이용한 연구에서 GnRH 수용체의 활성화를 통한 세포의 증식 억제 효과가 기존에 알려진 IP3 및 PKC를 통한 세포내 신호전달 기전 이외에도 integrin $\beta 3$ 의 발현 증가와 이에 따른 FAK 및 ERK의 활성화를 통하여 일어남을 증명하였다. 이러한 연구 결과는 GnRH를 이용한 자궁 내막증 및 자궁암 치료제 개발에 좋은 기초 자료를 제공 하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산자부, 경기도지원 지자체주도 연구 개발사업 (과제명: B-IT 융합 바이오 테크놀로지첨단화 사업; 과제번호: RTI04-03-05)을 통하여 이루어

어졌습니다.

참 고 문 헌

1. Wierman ME, Bruder JM, Kepa JK. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in hypothalamic neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15(1): 79-88.
2. Neill JD. GnRH and GnRH receptor genes in the human genome. *Endocrinology* 2002; 143(3): 737-43.
3. Takeuchi H, Kobori H, Kikuchi I, Sato Y, Mitsuhashi N. A prospective randomized study comparing endocrinological and clinical effects of two types of GnRH agonists in cases of uterine leiomyomas or endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 2000; 26(5): 325-31.
4. Grimbizis G, Tsalikis T, Tzioufa V, Kasapis M, Mantalenakis S. Regression of endometrial hyperplasia after treatment with the gonadotrophin-releasing hormone analogue triptorelin: a prospective study. *Hum Reprod* 1999; 14(2): 479-84.
5. Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr Rev* 1981; 2(2): 186-209.
6. Wierman ME, Bruder JM, Kepa JK. Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in hypothalamic neuronal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1996; 15(1): 79-88.
7. Huime JA, Lambalk CB. Gonadotropin-releasing-hormone-receptor antagonists. *Lancet* 2001; 358(9295): 1793-803.
8. Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M. The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24(4): 279-95.
9. Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function.

- Endocr Rev 1981; 2(2): 186-209.
10. Schally A. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis. *Peptides* 1999; 20(10): 1247-62.
 11. Schally A, Nagy A. Targeted cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone: a reply. *Eur J Endocrinol* 2001; 144(5): 559.
 12. Savino L, Baldini B, Susini T, Pulli F, Antignani L, Massi GB. GnRH analogs in gynecological oncology: a review. *J Chemother* 1992; 4(5): 312-20.
 13. Santen RJ. Clinical review 37: Endocrine treatment of prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(3): 685-9.
 14. Luo X, Xu J, Chegini N. Gonadotropin releasing hormone analogue (GnRHa) alters the expression and activation of Smad in human endometrial epithelial and stromal cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 16: 125.
 15. Meresman GF, Bilotas M, Buquet RA, Baranao RI, Sueldo C, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist induces apoptosis and reduces cell proliferation in eutopic endometrial cultures from women with endometriosis. *Fertil Steril* 2003; 80(2): 702-7.
 16. Kim KY, Choi KC, Park SH, Auersperg N, Leung PC. Extracellular signal-regulated protein kinase, but not c-Jun N-terminal kinase, is activated by type II gonadotropin-releasing hormone involved in the inhibition of ovarian cancer cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1670-7.
 17. Emons G, Schroder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz KD, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1458-64.
 18. Noci I, Borri P, Bonferraro G, Chieffi O, Arcangeli A, Cherubini A, et al. Longstanding survival without cancer progression in a patient affected by endometrial carcinoma treated primarily with leuprolide. *Br J Cancer* 2001; 85: 333-6.
 19. Davidson L, Pawson AJ, Millar RP, Maudsley S. Cytoskeletal reorganization dependence of signaling by the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 2004; 279: 1980-93.
 20. Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 91-100.
 21. Pereira JJ, Meyer T, Docherty SE, Reid HH, Marshall J, Thompson EW, et al. Bimolecular interaction of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 with alphavbeta3 negatively modulates IGF-I-mediated migration and tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64(3): 977-84.
 22. Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 19): 3729-38.
 23. Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 188-95.
 24. Lessey BA, Castelbaum AJ, Buck CA, Lei Y, Yowell CW, Sun J. Further characterization of endometrial integrins during the menstrual cycle and in pregnancy. *Fertil Steril* 1994; 62(3): 497-506.
 25. Kanamori M, Vanden Berg SR, Bergers G, Berger MS, Pieper RO. Integrin beta3 overexpression suppresses tumor growth in a human model of gliomagenesis: implications for the role of beta3 overexpression in glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 2004; 64(8): 2751-8.
 26. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; 9(9): 726-35.
 27. Del Pozo MA, Kiosses WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM, Schwartz MA. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 2002; 4(3): 232-9.
 28. Hordijk PL, Verlaan I, van Corven EJ, Moolenaar WH. Protein tyrosine phosphorylation induced by lysophosphatidic acid in Rat-1 fibroblasts. Evidence that phosphorylation of map kinase is mediated by

- the Gi-p21ras pathway. *J Biol Chem* 1994; 269(1): 645-51.
29. Luttrell LM, Daaka Y, Della Rocca GJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptors mediate two functionally distinct pathways of tyrosine phosphorylation in rat 1a fibroblasts. Shc phosphorylation and receptor endocytosis correlate with activation of Erk kinases. *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31648-56.
30. Kraus S, Naor Z, Seger R. Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res* 2001; 32(6): 499-509.
31. Kim WH, Lee BL, Jun SH, Song SY, Kleinman HK. Expression of 32/67-kDa laminin receptor in laminin adhesion-selected human colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 1998; 77(1): 15-20.
32. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6): 3352-7.
33. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4): 2193-8.
34. Levi NL, Hanoch T, Benard O, Rozenblat M, Harris D, Reiss N, et al. Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol* 1998; 12(6): 815-24.
35. Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM. Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* 2004; 165(3): 371-81.

= 국문초록 =

목적: 본 연구를 통해 GnRH 의한 세포 분열의 억제제는 integrin, FAK 및 ERK를 통한 세포 내 신호전달 기전을 통하여 일어남을 규명하고자 하였다.

연구방법: 연구에 사용된 인간자궁내막암 세포주는 DMEM/F12 (10% FBS)의 조건에서 배양 하였다. GnRH-I과 -II는 실험 목적에 따라 100 nM 농도로 0, 5, 10, 15, 20, 30분간 또는 10 nM or 100 nM의 농도로 20분간 처리 하였다. 세포의 분열 정도는 [³H] thymidine incorporation assay를 이용하여 정량적으로 측정 하였으며, Immunoblotting 방법을 이용하여 단백질의 발현을 확인 하였다.

결과: GnRH-I과 -II 모두 HEC1A 세포의 세포분열을 억제하였으며 integrin β3의 발현을 증가 시켰다. GnRH-I과 -II를 처리 후 FAK 및 ERK의 인산화가 증가됨을 관찰할 수 있었다.

결론: GnRH에 의한 세포분열의 억제는 integrin의 발현과 FAK 및 ERK의 인산화 과정을 통하여 일어남을 알 수 있었다.

중심단어: GnRH, Integrin, FAK, ERK, Phosphorylation