

IGF-1이 인간의 음경해면체 평활근 세포의 성장에 미치는 영향

전남대학교 의과대학 비뇨기과, *미생물학교실, † 해부학교실

김민경 · 박광성 · 이현숙* · 안규윤† · 이현철*

= Abstract =

Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 on Proliferation of Human Corpus Cavernosal Smooth Muscle Cells

Min-Kyung Kim, Kwangsung Park, Hyun-Suk Lee*, Kyuyoun Ahn† and Hyun-Chul Lee*

Department of Urology, *Microbiology, † Anatomy, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Purpose: Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes the proliferation and migration of penile cavernous smooth muscle cells in the rat. The goals of this study were to evaluate the expression of IGF-1 and IGF-1 receptor (IGF-1R) in human corpus cavernosal smooth muscle cells (HCCSMCs) and to investigate the effect of IGF-1 on the proliferation of these cells in vitro.

Materials and Methods: The HCCSMCs were cultured from five impotent patients. The smooth muscle cells were identified by immunofluorescent stain. Total RNA was extracted, and IGF-1 gene expression was determined by RT-PCR. The IGF-1R immunoreactivity was examined by fluorescent immunocytochemistry. Cell growth was assessed with a novel proliferation assay based on bioreduction of the fluorescent dye, Alamar blue.

Results: Endogenous IGF-1 mRNA expression was detected by RT-PCR analysis. The HCCSMCs were positive for IGF-1R. The proliferation of HCCSMCs increased with the dose in response IGF-1 in the culture medium in concentrations up to 100 ng/ml.

Conclusions: Both IGF-1 and IGF-1R are expressed endogenously in human corpus cavernosal smooth muscle cells. IGF-1 promotes the proliferation of these cells in vitro.

Key Words: Corpus cavernosum smooth muscle, Insulin-like growth factor-1

서 론

음경의 발기는 혈관계, 신경계, 내분비계와 음경해면체 평활근이 복합적으로 작용하여 일어나는 현상이다 (1). 음경해면체 평활근은 음경발기에 중요한 역할을 하는데 음경해면체 평활근 세포의 분화와 증식에는 여러 성장인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며 최근 주목을 받고 있는 성장인자는 Vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin like

growth factor-1 (IGF-1), Growth hormone (GH), Platelet derived growth factor (PDGF), Transforming growth factor (TGF) 등이다 (2-6).

이러한 성장인자들 중 IGF-1은 세포내에서 세포의 성장과 분화에 영향을 미치며 세포막에 있는 IGF-1 수용체에 의해 기능이 유도되는 것으로 알려져 있다 (7,8). 대부분의 순환하는 IGF-1은 간에서 만들어지며 GH이 IGF-1의 합성과 분비의 조절에 관여한다 (9,10). IGF-1은 당뇨쥐에서 혈관 평활근 세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져 있는데, 정상쥐의 대동맥에서도 in vivo 실험에서 고농도의 IGF-1을 투여했을 때 혈관 평활근 세포의 증식을 자극하는 것으로 보고되고 있다 (11). Lynch (12)는 치주조직에서 IGF-1과 PDGF를 함께 투여했을 때 섬유아세포의 이동과 성장이 크게 촉진되었고 다른 어떤 단일 성장인자보다 골기질의 형

교신저자 : 박광성, 전남대학교병원 비뇨기과
광주광역시 동구 학1동 8번지 ☎ 501-757
Tel: 062-220-6703, Fax: 062-227-1643
E-mail: kpark@chonnam.ac.kr

본 연구는 2001년 전남대학교병원 임상연구소 연구비 지원으로 이루어졌음 (과제번호: CUHRI-U-200123).

성을 월등히 촉진시켰다고 하였다. 이는 성장인자들이 단독으로 혹은 서로 상호작용으로 세포의 성장에 관여함을 보여주고 있다. 음경에서 성장인자가 발기능에 미치는 영향에 대한 연구로 Jung 등 (13)은 쥐모델 실험에서 해면체신경을 절단했을 때 NOS (nitric oxide synthase) 함유신경의 재생과정에 IGF-1과 TGF- β_2 와 같은 성장인자가 음경해면체신경의 재생에 중요한 역할을 하고 있음을 보고했다.

음경해면체 평활근의 성장과 분화에는 여러 가지 성장인자가 관여하고 있는데 본 연구의 목적은 음경해면체 평활근 세포의 성장에 IGF-1이 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 인간의 음경해면체 평활근 세포를 일차 배양하여 IGF-1에 대한 음경해면체 평활근 세포의 성장과 분화를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 음경해면체 평활근 세포 배양

5명의 음경보형물 삽입 환자에서 수술시 음경해면체 조직을 떼어내 세포배양을 하였다. 먼저 수술실에서 음경해면체 조직을 떼어낸 후 저온 생리식염수에 넣어 실험실로 곧바로 옮겨 Laminar flow내에서 조직을 Hank's balanced salt solution (HBSS, Mg⁺⁺ & Ca⁺⁺ free)에 넣고 1 mm³ 크기로 잘게 잘라 2~3회 세척한 후 일차배양을 하였다. 음경해면체 평활근 세포 배양은 T-25 플라스크에 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin+streptomycin 25 units/ml, fungizon 250 μ g/ml이 포함된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)를 사용하여 5% CO₂와 37°C 온도를 유지하여 세포 배양기 (Forma Scientific, OH, USA)에서 배양하였다. 해면체 평활근 세포는 대개 7~14일이면 자라는데 2차래 계대 배양한 후 실험에 사용하였다.

배양된 음경해면체 평활근 세포는 위상차 현미경하에서 세포의 형태학적 특성 및 성장형태를 관찰하고, anti-alpha-smooth muscle actin antibody (FITC conjugate)로 면역형광염색을 하였다.

3대 계대배양을 시작하는 세포를 배양액에 단일 세포 부유물로 만들고 10% DMSO (Sigma, USA)를 첨가한 후 2시간 동안 -20°C, 하루 동안 -70°C에 방치한 후 다음 실험까지 액체질소에 보관해 두었다.

2. 인간 음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1 수용체 발현

인간의 음경해면체 평활근 세포의 표면에서 IGF-1 수용체의 존재 여부를 알아보기 위해 면역형광화학법을 이용하였다. 배양된 인간 음경해면체 평활근 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 씻고 acetone: methanol (1 : 1) 용액에

서 2분간 고정했다. PBS로 세척 후 5% normal goat serum이 포함된 PBS에서 1시간 동안 차단했다. 그리고 나서 0.3% bovine serum albumin (BSA)이 있는 PBS에서 IGF-1 수용체 antiserum (1 : 100)으로 12~14시간 동안 배양했다. 다시 PBS로 세 번 세척한 후 2차 항체인 anti-rabbit IgG-FITC (VECTOR Laboratories, USA)로 1시간 동안 배양했다. 마지막으로 세포는 형광현미경 (Olympus IX50, Japan)으로 촬영하였다.

3. 총 RNA추출과 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 IGF-1 mRNA의 발현

1) RNA의 추출: 배양된 음경해면체 평활근 세포의 발현을 알아보기 위해 Trizol (Gibco, USA)시약을 사용하여 총 RNA를 추출했다.

2) 역전사 중합효소연쇄반응을 이용한 mRNA의 발현비교: cDNA 합성을 위한 역전사 반응은 총 RNA 500 ng/ul에 random primer (1 μ g/ul), 10 mM dNTP를 포함한 완충액을 70°C에서 10분간 변성 후 얼음에서 5분간 두고 0.1 M dTT, Rnase inhibitor, superscriptase를 포함한 완충액을 혼합한 다음 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 형성한 후 95°C에서 5분간 작용시켜 반응을 중지시켰다.

중합효소연쇄반응에 사용된 염기서열은 유전자은행 (Gene-Bank) 유전자 정보 자료에 의거하여 sense primer는 5'-CGGAATTCATGGGAAAAATCAGC-3', antisense primer는 5'-GCTCTAGACTACATCCTGTAGTT-3'를 주문 합성하였다 (Bioneer Co, Korea). 각 반응은 최종 50 ul완충액 (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl₂)에 10 mM dNTPs, 30 pmol의 sense 및 antisense oligonucleotide primer, Taq polymerase를 혼합하여 DNA thermal cycler (Thechne, USA)에서 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C 1분 30초에서 35주기 후 72°C에서 10분간 연장반응을 시행하였다. 반응이 끝난 증폭 산물은 1.2% agarose gel 전기영동법으로 분석하였다.

4. IGF-1에 의한 음경해면체 평활근 세포증식 분석

세포 증식은 Alamar Blue로 시행하였다. 산화환원 척도로서 Alamar Blue (Serotec Ltd, USA)는 세포대사에 반응하여 환원되는데 이 방법을 이용하여 생선 세포수를 간접적으로 측정할 수 있었다. 96-well plate에서 하나의 flat bottom을 분석했는데 배양배지에는 0.1% BSA를 첨가한 serum-free DMEM에 0~200 ng/ml (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 0 ng/ml) 농도의 IGF-1 (Sigma, USA)을 처리하였다. 동일한 열의 well에는 같은 농도의 IGF-1을 포함한 배지 50 μ l를 넣고 세포 부유물 50 μ l를 첨가하여 각 well당 최종 세포수가

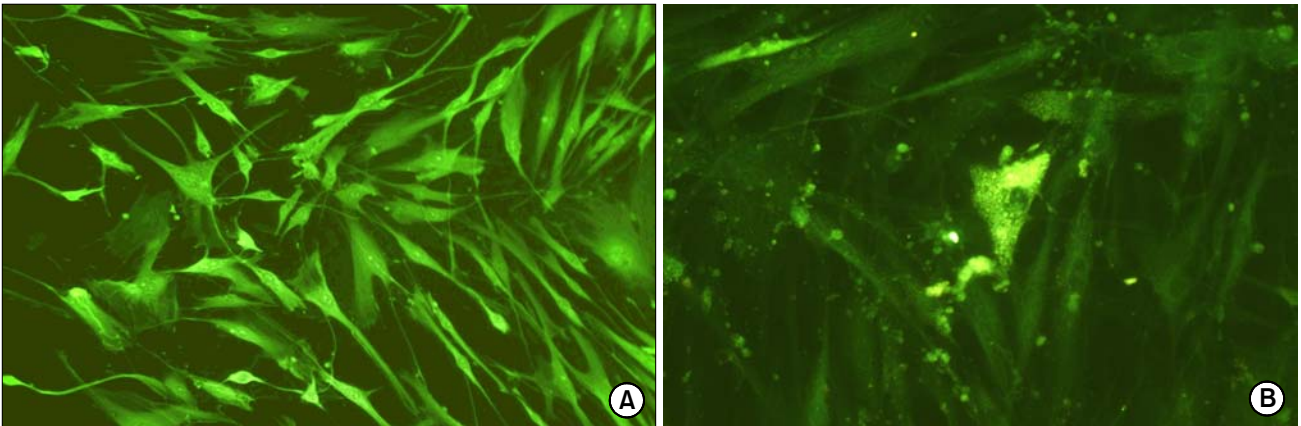


Figure 1. (A) Phase contrast micrograph of human corpus cavernosum smooth muscle cell (HCCSMCs). Note a spindle shaped morphology, cell alignment and 'hill and valley' appearance which is a typical feature of smooth muscle cells ($\times 100$). (B) IGF-1 receptor (IGF-1R) immunoreactivity in the HCCSMCs. Cultured HCCSMCs were positive for IGF-1R.

100 μ l에 5×10^3 이 되게 하였다. 5% CO₂, 37°C 조건으로 배양하고 48시간 후 Alamar Blue 10 μ l를 각 well에 첨가하였다. 4시간 배양 후 enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Molecular Device, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험에서 모든 분석은 세 번 반복했고 모든 자료는 독립된 실험의 평균값으로 나타났다. Student's test를 이용하여 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 일 때로 하였다.

결 과

1. 면역화학적 음경해면체 평활근세포 검사

인간의 음경해면체 평활근 세포는 DMEM 배지에서 약 2~3주만에 배양 용기에 뾰족하게 자랐으며 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였을 때 각각의 세포는 방추상으로 성장하는 쪽의 말단에 주름 (ruffle)이 있었고 성장시 세포들이 겹치게 되면서 이미 알려져 있는 평활근의 형태학적 특성인 'hill and valley' 형태를 보였다. 배양된 세포중 평활근 세포를 확인하기 위하여 anti-alpha-smooth muscle actin antibody로 면역형광염색을 했을 때 녹색형광을 띠어 평활근 세포임을 확인할 수 있었다 (Figure 1A).

2. 음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1 수용체 발현

면역형광화학법을 이용하여 음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1 수용체의 발현 여부를 알아보았는데 해면체 평활근 세포에서 강하게 IGF-1 수용체가 발현됨을 확인하였다 (Figure 1B).

3. 음경해면체 평활근 세포의 IGF-1 발현

일차배양된 인간의 음경해면체 평활근 세포에서 역전사

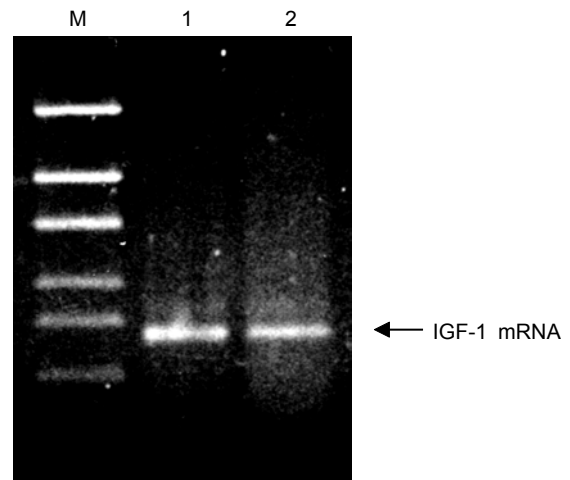


Figure 2. Identification of IGF-1 mRNA expression. Endogenous IGF-1 mRNA expression (460 bp) was detected by RT-PCR analysis using total RNA from two primary cultured HCCSMCs (M: marker, 1, 2: primary cultured HCCSMCs).

중합효소연쇄반응을 이용해서 내재성 IGF-1 mRNA의 발현을 확인하였다. 전기영동 결과 460 bp에서 강한 반응 띠가 확인되어, 인간의 음경해면체 평활근 세포에서 내재성 IGF-1 mRNA가 발현됨을 알 수 있었다 (Figure 2).

4. 음경해면체 평활근 세포증식 분석

음경해면체 평활근 세포는 IGF-1을 외부에서 투여했을 때 농도의존적으로 증식이 촉진되는 것으로 나타났는데, IGF-1을 투여하지 않는 대조군에 비해 12.5 ng/ml의 농도에서부터 유의하게 증식되었고 IGF-1의 농도가 100 ng/ml에 이를 때까지는 농도의존적으로 유의한 증식을 보인 반면 200 ng/ml에서는 증식이 감소되는 양상을 보여 인간의 음력

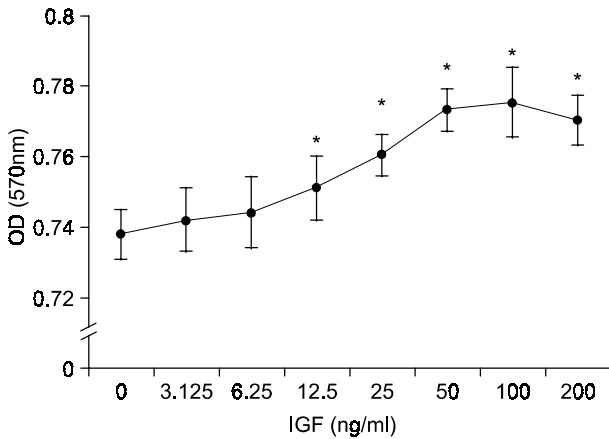


Figure 3. Effect of IGF-1 on the growth rate of HCCSMCs. Equal numbers (5×10^3) of HCCSMCs were seeded in each well of 96-well plate and allowed to grow for 3 days in media containing the indicated concentrations of IGF-1. The proliferation of HCCSMCs increased dose dependently upto 100 ng/ml with exogenous IGF-1 treatment in cultured media. *Significant different from control group ($p < 0.05$).

해면체 평활근 세포의 증식에 적절한 IGF-1의 농도는 100 ng/ml임을 알 수 있었다 (Figure 3).

고 찰

음경 내에서는 TGF- α , TGF- β , IGF 등 다양한 성장인자들이 발현되는 것으로 알려져 있는데 (14), IGF-1은 insulin과 유사하게 포도당의 유입이나 글리코젠 합성, 아미노산 수송 등 대사에 영향을 주고 세포의 성장과 분화를 촉진하며 분화된 세포 형태를 유지시킨다고 한다 (7,15,16). IGF는 남성과 여성의 생식기관에 영향을 주는데 음경은 중요한 생식기관임에도 그 역할이 간과되어 왔다 (17).

IGF-1은 GH에 의해 생리적으로 영향을 받는데 (17), GH 결핍이나 GH에 저항성을 가진 환자에서 발생하는 왜소음경의 경우 GH나 IGF-1을 단독으로 처리했을 때 성공적으로 개선되었다고 한다 (18,19). 한편 Jung 등 (13)은 쥐모델 음경에서 발기능에 미치는 영향에 대한 연구로 해면체 신경을 절단했을 때 NOS 함유 신경의 재생과정에 IGF-1과 TGF- β_2 가 음경해면체 신경을 재생하여 발기능의 회복을 가져왔다고 보고하였다. 이러한 결과는 IGF-1이 음경의 성장이나 발기능의 회복에 관련이 있는 것으로 생각되어진다.

IGF-1은 세포의 성장과 분화를 촉진시키는데 이러한 기능은 IGF-1 수용체에 의해 매개되며 IGF-1 수용체는 구조적으로 인슐린 수용체와 유사하여 수용체 수준에서 상호 반응할 수도 있다고 하는데 (20,21), Liu 등 (22)은 쥐의 음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1 수용체의 발현과 다양한 주령

에서 IGF-1 수용체 발현정도를 비교한 바 있다. 쥐의 음경해면체 평활근 세포에서 발현되는 IGF-1과 IGF-1 수용체는 젊은 쥐에서는 주령이 증가할수록 양이 증가하였지만 노화 쥐에서는 감소하였는데, 이는 IGF-1과 IGF-1 수용체 발현이 노화와 연관성이 있음을 시사한다 (22). 본 연구에서 일차 배양한 인간 음경해면체 평활근 세포에서 발현되는 IGF-1 수용체를 면역형광화학법으로 확인하였는데, 향후 인간 음경해면체 평활근 세포에서 나이나 발기능에 따른 IGF-1 수용체의 발현에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1의 역할에 대한 연구는 미미하다. 쥐의 음경조직에서 내재성 IGF-1의 발현과 함께 IGF-1의 분비가 음경해면체 평활근 세포에서 확인된 바 있는데 (14,22), 본 연구에서 저자들은 인간의 음경해면체 평활근 세포에서 발현되는 내재성 IGF-1을 처음으로 확인하였다. 이러한 결과는 IGF-1이 인간에서도 음경해면체 평활근 세포의 증식에 관련이 있음을 시사한다.

음경해면체 평활근 세포의 증식과 세포이동에 IGF-1이 미치는 영향에 대해서 쥐의 음경해면체 평활근 세포배양 실험결과가 보고된 바 있는데 (22), 쥐의 음경해면체 평활근 세포증식에 적절한 IGF-1의 농도는 성숙한 쥐의 경우 12.5 ng/ml인 반면에 28개월의 노화쥐에서 분리한 해면체 평활근 세포에서는 100 ng/ml에 이르기까지 농도의존적으로 증가하였다. 본 연구에서 인간의 음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1은 100 ng/ml까지 농도의존적으로 평활근 세포의 증식을 촉진한 것으로 보아, 인간의 음경해면체 평활근 세포증식에 적절한 IGF-1의 농도는 100 ng/ml로 여겨진다. 이러한 결과로 보아 해면체 평활근 세포의 증식에 적절한 IGF-1의 농도는 종 (species)의 차이나 세포의 노화 정도에 영향을 받는 것으로 생각된다.

IGF-1은 혈관 성장에 필수적인 VEGF의 분비를 촉진하며 (23), 때로는 IGF-1과 IGF-1 수용체의 결합은 VEGF의 발현을 증가시키기도 한다 (24). IGF-1뿐만 아니라 VEGF도 음경해면체 평활근 세포를 증식하는 것으로 알려져 있어 (25), 향후에 음경해면체 평활근 세포의 증식에 IGF-1과 VEGF가 미치는 상호관계에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 본다.

결 론

본 연구를 통해 인간 음경해면체 평활근 세포에서 IGF-1과 IGF-1 수용체가 발현됨을 확인할 수 있었고, IGF-1은 *in vitro*에서 인간 음경해면체 평활근 세포의 증식을 촉진함을 알 수 있었다. 향후에 IGF-1이 해면체 평활근 세포뿐만 아니라 내피세포의 증식에 미치는 영향과 다른 성장인자와의

상호 관계에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- 1) Newman HF, Northup JD. Mechanism of human penile erection: an over view. *Urology* 1981;17:399-408
- 2) Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:97-132
- 3) Muniyappa R, Walsh MF, Rangi JS, Zayas RM, Stanley PR, Ram JL, et al. Insulin like growth factor 1 increases vascular smooth muscle nitric oxide production. *Life Sciences* 1997; 61:925-31
- 4) Meyer NA, Barrow RE, Herndon DN. Combined insulin-like growth factor1 and growth hormone improves weight loss and wound healing in burned rats. *J Trauma* 1996;41:1008-12
- 5) Deuel TF. Growth factors. In: Principles of tissue engineering. Lanza RP, Langer R, Chick WL, eds. Austin: Academic Press, 1997;133-49
- 6) Moreland RB, Traish A, McMillin MA, Smith B, Goldstein I, Saenz de Tejada I. PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor- β_1 in human corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol* 1995;153:826-34
- 7) Lackey BR, Gray SL, Henricks DM. The insulin-like growth factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999;10:201-17
- 8) Delafontaine P. Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1995; 30:825-34
- 9) Le Loith D. Insulin-like growth factors. *N Eng J Med* 1997; 336:633-40
- 10) Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 1993;55:131-53
- 11) Chen Y, Capron L, Magnusson JO, et al. Insulin-like growth factor-I stimulates vascular smooth muscle cell proliferation in rat aorta in vivo. *Growth Horm IGF Res* 1998;8:299-303
- 12) Lynch SE. Periodondal regeneration. Current status and directions. Quintessence Publishing Co 1994;179-98
- 13) Jung GW, Kwak JY, Kim SI, Yoon JH. IGF-1 & TGF-beta2 have key role on regeneration of nitric oxide synthesis (NOS)-containing nerves after cavernous neurotomy in the rats. *Int J Impotence Res* 1998;10:S60
- 14) Dahiya R, Chui R, Perinchery G, Nakajima K, Oh BR, Lue TF. Differential gene expression of growth factors in young and old rat penile tissues is associated with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1999;11:201-6
- 15) Jacob R, Barrett E, Plewe G, Fagin KD, Sherwin RS. Acute effect of insulin-like growth factor-1 on glucose and amino acid metabolism in the awake fasted rat. *J Clin Invest* 1989; 83:1717-21
- 16) Elahi D, McAloon-Dyke M, Fukagawa NK. Hemodynamic and metabolic responses to human insulin-like growth factor-1 in men. In: Spencer EM, ed. Modern Concepts in Insulin-like Growth Factors. New York: Elsevier, 1991;219-24
- 17) Lackey BR, Gray SL, Henricks DM. Physiological basis for use of insulin-like growth factors in reproductive applications: a review. *Theriogenology* 2000;53:1147-56
- 18) Levy JB, Husmann DA. Micropenis secondary to growth hormone deficiency: dose treatment with growth hormone alone result in adequate penile growth? *J Urol* 1996;156:214-6
- 19) Laron Z, Klingler B. Effect of insulin-like growth factor-1 treatment on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). *Eur J Endocrinol* 1998;138:176-80
- 20) Czech MP. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 1989;59:235-8
- 21) Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 1995; 16:3-34
- 22) Liu X, Lin CS, Spencer EM, Lue TF. Insulin-like growth factor-I promotes proliferation and migration of cavernous smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280:1307-15
- 23) Dunn SE. Insulin-like growth factor 1 stimulates angiogenesis and the production of vascular endothelial growth factor. *Growth Horm IGF Res* 2000;suppl A:S41-2
- 24) Punglia RS, Lu M, Hsu J, Kuroki M, Tolentino MJ, Keough K, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes* 1997;46: 1619-26
- 25) Liu X, Lin CS, Graziottin T, Resplande J, Lue TF. Vascular Endothelial Growth Factor promotes proliferation and migration of cavernous smooth muscle cells. *J Urol* 2001;166: 354-60