理學碩士　學位論文

Human fibroblasts에서 glucose농도가 물질대사 및 Insulin-like growth factor binding protein-3와 -5의 발현에 미치는 영향

2002年　2月

釜慶大學校　大學院

食品生命科學科

柳　惠　英

理學碩士 學位論文

Human fibroblasts에서 glucose농도가 물질대사 및 Insulin-like growth factor binding protein-3와 -5의 발현에 미치는 영향

指導敎授 南 澤 正

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함

2002年 2月

釜慶大學校 大學院

食品生命科學科

柳 惠 英

柳惠英의 理學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月 26 日

主 審 공학박사 류 홍 수 ㊞

委 員 의학박사 변 대 석 ㊞

委 員 농학박사 남 택 정 ㊞

목 차

Effects of glucose on nutrients metabolism and Insulin-like growth factor binding protein-3 and -5 expression in human fibroblasts

Hye-Young Ryu

Department of Food and Life Science, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Insulin-like growth factor-I(IGF-I) and IGF-II are peptides structurally related to insulin. They exert a wide variety of metabolic and mitogenic effects, acting in autocrine, paracrine, and endocrine manners through specific IGF receptors as well as insulin receptors. In contrast to insulin, however, the bioavaility of IGFs to target cells is modulated by the IGF-binding protein(IGFBPs). Six human IGFBPs with different molecular masses, biological characteristics, and immunological properties have been characterized. IGFBPs affect the actions of IGF in both

a positive and negative manner. The level of IGFBP expression is modulated by a variety of systemic and local factors.

In diabetes, most study of the study of IGF systems have been investigated in insulin-dependent diabetes mellitus(IDDM), non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), and streptozotocin-induced diabetes animals *in vivo*. Recently, little research regarding the IGFs system has been proposed in a portion of cells *in vitro*.

Human fibroblasts secrete IGFBPs that can modify IGF-I action. Previous to our study using either Northern blotting, and immunoblotting have shown that fibroblasts express mRNA IGFBP-3, -4, -5 and synthesize these proteins. In addition, fibroblast cell lysates revealed that the IGFBP-3 and IGFBP-5 were most abundant. For these reasons, we undertook to gain further insight into the effects of high and low glucose on metabolism and IGFBP-3, IGFBP-5 expression.

IGFBP-3 and -5 level are more decreased in cell lysates cultured at a high glucose level. IGFBP-3 mRNA of fibroblast cultured in low glucose is increased, whereas IGFBP-5 mRNA remained constant. Although high glucose and low glucose cultures expressed similar levels of IGFBP-5 mRNA, *in vitro* protease assays demonstrated an increase in IGFBP-5 proteolysis in high glucose compared with low glucose cultures. In contrast, IGFBP-3 is not affected by proteolysis. In summary, high glucose acts on human fibroblast to induce a change in IGFBP-3 and -5

mRNA abundance or peptide stability. Our study may be used as a model to investigate the potential roles of IGF-I and IGFBPs in pathophysiologic processes such as diabetes mellitus.

제 1장 서 론

경제적 생활수준의 향상과 더불어 식생활이 개선되고 생활양식이 서구화되면서 영양과잉, 운동부족, 흡연, 음주 및 스트레스 등으로 비만증, 당뇨병, 고혈압, 관상동맥성 질환 등의 만성퇴행성 질환이 증가하는 추세이다(1 3). 그 중에서도 국가적인 차원에서 관심을 가지고 있는 당뇨병은 체내 혈당 조절기관인 췌장 내에 존재하는 랑게르한스 섬의 β세포에서 분비되는 인슐린 분비량의 부족, 인슐린 작용 및 기능 저하로 당의 이동이 감소되어 혈당이 높아지는 질병으로서 이로 인해 심혈관계질환, 신경질환 등 복합적인 만성합병증이 유발된다(4).

일반적으로 당뇨병은 크게 두 가지 형태로 분류되고 있는데, 인슐린의존형 당뇨병(Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM)과 인슐린비의존형 당뇨병(Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM)으로 나눌 수 있다. 인슐린의존형 당뇨병은 소아, 청소년 및 젊은 성인에서 주로 나타나는 당뇨병으로 인슐린을 생산하는 췌장 베타세포의 파괴로 인하여 인슐린이 절대적으로 부족하여 발생한다. 인슐린비의존형 당뇨병은 근육세포나 지방세포의 인슐린 수용체의 복합적 결함, 미토콘드리아 유전자 결함, 포도당 전달체 등의 이상에 의한 복합적인 요인으로 생각되고 있으며, 우리나라의 경우 대부분의 당뇨병 환자가 이에 속한다고 알려져 있다.

당뇨병은 에너지 생성의 주역인 당질의 대사장애를 일으키는 것이며, 그리고 지질대사 또는 단백질대사도 이상을 초래한다(5 7). 이와 같은 대사이상은 기본적으로 인슐린 부족에 의해 일어나며, 인슐린은 근육조직과 지방조직의 포도당 이용을 촉진시키고, 간장에서는

당 신생 및 포도당의 방출억제, 글리코겐 합성 및 포도당 이용의 촉진, 단백질과 지방합성을 촉진한다. 한편 Insulin-like Growth Factors(IGFs) 역시 insulin과 화학적 구조가 유사하기 때문에 당 대사를 조절하는 작용과 세포성장을 촉진시키는 공통된 두 가지 생물학적 작용을 가지고 있다(8 12). 그러나 인슐린은 혈액 내에서 자유형의 형태로 존재하므로 체내 대사상태에 따라 혈중 농도의 변화를 초래하며, 주로 급성 당 대사 조절작용에 관여한다. IGFs는 혈액 내에서 운반단백질(IGF Binding proteins, IGFBPs)과 비전자공유 결합에 의하여 고분자 결합체로 존재하기 때문에 항상 일정한 수준의 농도를 유지하므로 동화작용 중 주로 세포 성장을 촉진시키는 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다.

IGF-I과 IGF-Ⅱ는 분자량이 적은 펩타이드계 호르몬으로, 세포성장 및 대사에 관여하는 중요한 분열원질성(mitogenic) 인자 및 대사성 인자이며, 이들은 prolinsulin과 구조상 아주 많은 유사성을 갖고 있다(13,14). IGFs는 내분비 기전에 의한 작용뿐만 아니라 자가분비(autocrine) 경로나 방계분비(paracrine) 경로를 통하여 대부분의 세포에 생물학적 효과를 나타낸다(15,16). 이들 호르몬은 거의 모든 조직에서 생성되나 혈중에 존재하는 대부분의 IGF-I은 간에서 합성되며 성장호르몬 의존성이다. IGF-I은 성장호르몬의 성장 촉진작용을 중재하는 중요한 매개체이고, 탄수화물 및 지방대사에도 인슐린과는 다른 작용을 나타낸다. 최근에는 recombinant human IGF-I(rhIGF-I)을 이용한 임상적 실험이 가능해지면서 IGF-I의 metabolic, anabolic 효과와 인슐린 및 성장호르몬과의 관계를 직접 연구할 수 있게 되었다. I 인슐린과 성장호르몬은 간에서 IGF-I의 지속적인 분비를 촉진시킨 반면, IGF-I은 인슐린 분비를 억제시킨다. 따라서 사람에 있어서 적

은 양의 rhIGF-I 투여는 혈중 glucose에는 변화 없이 인슐린 분비를 감소시킨다.

당뇨병 환자에 있어서 혈중 IGF-I 농도에 관한 연구들을 살펴보면, Yde H(1969)는 혈중 IGF-I 농도는 당뇨병 환자의 경우에 낮다고 보고하였다(17,18). Maes M등은 인슐린의존형 당뇨병 환자의 혈중 성장호르몬이 상승했음에도 불구하고 혈중 IGF-I은 오히려 정상인보다 떨어져 있음을 보고하였다(19). 또한 Baxter(20)에 의하면 혈당 조절이 잘 되지 않는 당뇨병 환자에서 혈중 IGF-I은 감소되어 있고, Rieu와 Binous(21)는 당조절이 되지 않아 대사장애가 동반된 환자에서 IGFs 및 IGFBPs는 감소된다고 하였다..

최근에 IGFs에 높은 특이성 및 친화력을 갖는 일군의 Insulin-like growth factor binding proteins(IGFBPs)이라는 단백질이 밝혀진 후 지금까지 여섯 개의 IGFBPs(IGFBP-1 6)이 증명되었다(22). 이들 IGFBPs는 모두 비슷한 구조와 특성을 갖고 있는데, IGFBP-1, 3 및 4는 IGF-I과 IGF-II에 비슷한 친화력을 갖고 있고, IGFBP-2, 5 및 6는 IGF-I 보다는 IGF-II에 더 높은 친화력을 갖고 있다(23). IGFBPs의 가장 중요한 기능은 여러 체액과 조직에 IGFs를 운반해주고 수용체와의 IGFs 결합을 조절하는 것이다. IGFBPs의 합성과 분비의 조절은 미세환경에서의 세포증식을 조절하고, IGFs의 반감기를 조절할 수 있다(24 28). 이러한 IGFBPs 중 특히 IGFBP-1은 free IGF-I의 효과 조절에 관여하여 IGFBP-1이 과다하면 IGF의 인슐린 작용이 억제된다(29,30). 또한 IGFBP-1은 IGFs의 hypoglycemic activity를 조절하여 glucose 대사에 관여하는 것으로 확인되었으며(29 32), 성장호르몬에 비의존적이고, insulin에 의해 조절을 받으며(33), glucose(34)와 인슐린(35) 사이에 IGFBP-1은 역상관관계가 있는 것으로 알려져 있다(20,27,36,37).

NIDDM 환자에서 IGFBP-1은 증가하며(38 43), 다른 이화상태에서도 증가함을 보고하였다(43 46). IGFBP-2는 급성대사조절 영향을 거의 받지 않으며(47), 당뇨병에서는 증가하지 않는다(48)고하였으나, streptozotocin(STZ)로 유도한 당뇨쥐에서 IGFBP-2 mRNA 수준이 6 8배 증가하였으며(49), NIDDM 환자에서도 그 양이 증가하였고, GH과 IGF-I처리에 의해 감소된다고 한다(50). IGFBPs 중 혈중에서 가장 높은 농도를 차지하고 있는 IGFBP-3는 IGF-I과 결합하여 150kDa의 복합체를 형성하여 IGF-I의 반감기를 연장시키며, IGF의 저장소로서의 역할을 한다(20,51). 인슐린의존형 당뇨병 환자들은 insulin 결핍으로 catabolic상태이기 때문에 혈중 IGF-I 농도는 감소하며 IGFBP-3 proteolytic activity는 증가되어 free IGF-I 농도가 증가된다고 하였다. 또한 인슐린 치료시 IGF-I의 증가 및 IGFBP-3 proteolytic activity가 정상화되고 인슐린과 IGFBP-3 proteolytic activity는 역상관관계가 있다. 혈당조절이 불완전한 당뇨환자에서 IGFBP-3는 감소되어 있으며(52,53), 당뇨쥐에서도 IGFBP-3는 낮았다(54). 이밖에도 NIDDM과 IDDM 환자의 human skin fibroblast에 있어서 IGFBP-2, -3, -5는 감소하였으며, IGFBP-4는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(55). 또한 당뇨상태에서 IGFBP-1, -2 mRNA는 증가한 반면, IGFBP-3 mRNA는 감소하였으며, IGFBP-4는 당뇨병과 정상 상태 모두 변화가 없었다(38). Heo YR 등(56)은 STZ로 유발된 당뇨쥐에 있어서 IGFBP-3는 감소하였고 IGFBP-2는 증가하였으며, 혈중 IGFBP-4는 유의적인 차이가 없다고 하였다.

지금까지 당뇨병과 관련된 연구는 당뇨병 환자나 당뇨병을 유발시킨 쥐를 대상으로 하는 *in vivo* 연구가 거의 대부분이었으며, 당뇨병

이 가지는 생리적 작용에 관한 *in vitro* 연구는 대단히 부족한 실정이다. 본 연구의 선행연구에서는 glucose 농도를 달리한 조건에서 배양한 GM10 세포의 배양액 중에는 IGFBP-3가 가장 많이 존재하고 IGFBP-4와 -5는 미미하게 존재하는 것으로 나타난 반면, cell lysate 중에서는 IGFBP-3와 -5가 양적으로 많이 분포하고 있었으며, IGFBP-4는 아주 적은 양이 존재한다고 보고하였다(57). 이에 본 연구에서는 human fibroblast(GM10)에서 glucose 농도에 따른 물질대사 및 IGFBP-3 와 -5의 존재와 발현에 미치는 영향에 대하여 살펴보았으며, GM10 세포를 이용한 실험결과를 토대로 당뇨병과 관련된 *in vitro* model system으로서의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

제2장 실험방법

1. 재료

1.1 세포 및 세포배양

Human fibroblasts인 GM10 세포를 사용하였다. GM10 세포를 고농도 glucose DMEM(25 mM glucose, Gibco)과 저농도 glucose DMEM(5 mM glucose, Gibco)에 sodium bicarbonate 3.7 ㎎/㎖, penicillin 100 U/㎖, streptomycin 100 ㎍/㎖와 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다. 세포가 90% confluent되면 무혈청 DMEM으로 배지를 교환하고 시간별(24 h, 72 h, 120 h)로 배양한 후 세포배양액을 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 그 상층액을 시료로 사용하였다. 또한 IGF-I(100 ng/㎕), insulin(100 ng/㎕)를 처리하여 24시간 배양한 후 배양액을 회수하여 원심분리(3,000 rpm, 15 min)하고 그 상층액을 취해 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 배양액을 회수하고 남은 세포는 PBS로 2번 세척한 후, cell lysis buffer(100 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 mM benzamidin, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)를 넣고 스크래핑하여 원심분리(12,000 rpm, 4℃, 3 min)하였다. 원심분리 후 얻어진 cell lysates 상층액은 -70℃에 보관하면서 triglycerides(TG) 농도, total protein(TP) 농도 측정에 사용하였고, 1×sample buffer를 넣고 스크래핑하여 회수한 cell lysate는 IGFBP-3와 IGFBP-5 immunoblotting 실험에 사용하였다.

2. 실험방법

2.1 시약 및 기구

DMEM(Dulbeco's Modified Eagle Medium), FBS(fetal bovine serum)은 Gibco 제품을 사용하였으며, sodium bicarbonate, penicillin 100 U/㎖과 streptomycin 100 ㎍/㎖을 포함하는 antibiotics solution, BSA(bovine serum albumin), 1×Trpsin-EDTA, insulin, TRI-reagent, cell extraction buffer에 사용된 시약은 Sigma제품을 사용하였다. Rainbow high molecular marker는 Amersharm(RPN756), BCIP, NBT는 Promega(S3771) 제품을 사용하였으며, 전기영동에 사용되는 모든 시약은 Sigma 전기영동용 시약을 사용하였다. 전기영동은 Mighty Small Ⅱ gel device(Hoefer Scentific Instruments, CA, U.S.A.)를 이용하여 행하였으며, 젤 중의 단백질은 Immobilon-PS^{Q} transfer menbrane(Millipore, pore size; 0.1 ㎛, U.S.A)위에 Hoefer semidary electroblotter(Hoefer Scentific Instruments, CA, U.S.A.)로 이동 고정시켰다.

2.2 세포수 측정

Human fibroblast(GM10)를 고농도 glucose(25 mM) DMEM과 저농도 glucose(5 mM) DMEM에서 배양한 후, 90% confluent되면 무혈청 배지로 처리하여 하룻밤 배양하였다. 배양액 제거 후 세포 monolyer를 PBS-EDTA로 2회 세척하고 trypsin 처리한 후 무혈청 배지로 세포를 회수하였다. 회수한 세포의 수는 Brightline hemacytometer(Hausser Scientific. U.S.A.)를 사용하여 현미경으로 측정하였다.

2.3 Glucose 농도 측정

실험방법 1.1에서 설명한 바와 같이 GM10 human fibroblast를 glucose농도에 따라 시간별로 배양한 후 세포 배양액을 10 μℓ 취해 혈당 측정용 GLZYME kit를 이용하여 glucose 농도를 측정하였다. Kit의 menual에 따라 효소시액을 조제하였으며, kit내 표준액을 standard로 하여 37℃에서 15분 가온 후 500 nm에서 배양액 내 함유된 glucose 양을 UV-visible spectrophotometer(Varian 1C cary 300. U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

2.4 Triglycerides(TG) 농도 측정

Human fibroblast(GM10)를 glucose 농도에 따라 시간별로 배양한 후 세포 monolayer를 PBS-EDTA로 2회 세척하고 trypsin 처리 후 PBS로 cell를 모은 다음 원심분리(3,000 rpm, 4℃, 3 min)하여 상층액을 제거하고 남은 세포에 methanol : chloroform : H_2O = 2 : 1 : 8 용액을 가하여 세포 내 TG를 추출하였다. 세포 내 TG농도는 트리글리자임 브이 kit를 이용하여 UV-visible spectrophotometer (Varian 1C cary 300. U.S.A.)로 505 nm에서 측정하였다.

2.5 총 단백질 농도 측정

Human fibroblast를 glucose 농도에 따라 시간별로 배양한 후 cell lysate를 회수하였다. 25 μℓ의 cell lysate를 취해 시크디아 총단백 시약을 사용하여 Biuret법으로 세포 내 총단백질량을 측정하였다. UV-visible spectrophotometer(Varian 1C cary 300. U.S.A.)를 이용하여 450 nm에서 측정한 후 단백질 함량을 계산하였다.

2.6 유리아미노산 분석

GM 10 세포를 고농도 glucose(25 mM)과 저농도 glucose(5 mM) DMEM에 배양한 후 세포가 90% confluent되면 무혈청 DMEM으로 배지를 교환하고 5일(120 h)동안 배양한 세포배양액을 lithum loading buffer(pH 2.2)로 정용(10 ml)하여 아미노산 전용분석기 (Sykam amino acid analyzer. S433)로 분석하였다.

2.7 IGFBP-3 mRNA 분석

2.7.1 Total RNA 추출

각 처리조건별로 배양한 human fibroblast는 배양액을 제거한 다음, TRI reagent(Sigma) 1 ㎖을 첨가하고 스크래핑하여 cell lysate를 회수하였다. Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 200 ㎕를 첨가하여 실온에서 30분간 방치하였다가 원심분리(4℃, 12,000 rpm, 15분)하여 RNA가 포함된 상층을 멸균한 새 튜브에 옮겼다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -70℃에서 overnight 침전시키고 원심분리하여 상층을 제거한 후, 남아있는 total RNA를 70% ice-cold ethanol로 2번 세척하여 건조시켰다. 건조된 total RNA는 0.1% DEPC로 처리한 물에 녹여서 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정 정량한 다음, 3 ㎍을 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동하여 total RNA band를 확인하였다.

2.7.2 Total RNA의 전기영동

Total RNA 10 ㎍에 RNA loading buffer(Sigma, USA)를 첨가하여 65℃에서 10분간 변성시키고 얼음에서 식힌 후 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동 후, transilluminater (VILBER LOURMAT, FRANCE)에서 UV로 RNA band를 확인하고 nylon membrane(ICN BIOTRANS™)에 18시간동안 transfer 하였다. Transfer가 끝난 membrane은 75℃에서 2시간동안 baking하여

hybridization에 사용하였다.

2.7.3 Probe labeling

실험에 사용한 IGFBP-3 DNA는 미국 North Carolina 대학교 의과대학 내분비 연구실 David R. Clemmons 박사로부터 제공받았으며, probe 제조에는 PCR DIG Probe synthesis Kit(Boehringer Mannheim)를 사용하였다. $MgCl_2$를 포함하는 1× PCR reaction buffer, 200 ㎛ dNTP mixture, PCR DIG-dUTP mixture, 2.6 U enzyme mixture(Expand^{TM} High Fidelity), IGFBP-3 sense, antisense primer 각각 40 pmol, 0.1 U AMV-optimized Tag, IGFBP-3 DNA를 함유하는 PCR 반응 혼합물은 PCR Thermal Cycler 480(TAKARA)를 사용하여 PCR을 행하였다. PCR 프로그램은 95℃에서 45초, 55℃에서 45초, 72℃에서 2분간 10 cycles, 95℃에서 45초, 55℃에서 45초, 72℃에서는 2분을 시작으로 1 cycle 돌 때마다 20초씩 늘어나도록 20 cycles을 구성하였다. PCR 후, EtBr(10 mg/ml)을 함유하는 2% agarose gel에 전기영동하여 PCR 생성물의 band를 확인하고 gel에서 잘라내었다. QIAEXII Gel Extraction Kit(QIAGEN)를 사용하여 잘라낸 gel로부터 DIG-dUTP label된 probe DNA를 추출하였다.

2.7.4 Hybridization

Baking한 membrane은 68℃에서 1시간동안 pre-hybridization(30% formamide, 0.15 M NaCl, 0.12 M Na_2HPO_4, 7% SDS, 1 mM EDTA)한 다음 pre-hybridization 용액에 DIG-dUTP label된 DNA 20 ㎕를 첨가한 hybridization 용액으로 68℃에서 18시간동안 hybridization 하였다.

2.7.5 Washing과 blocking

Hybridization이 끝난 membrane을 0.1% SDS를 함유하는 2×SSC 용액으로 실온에서 15분간 2회, 68℃에서 0.5×SSC 용액으로 15분간 2회 세척하고 washing buffer(0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5; 0.3%(v/v) Tween 20)로 실온에서 5분간 세척하였다. hybridization 후, blocking buffer(0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5; 1%(w/v) blocking reagent)를 사용하여 실온에서 30분간 membrane을 blocking시켰다.

2.7.6 Detection

Anti-Digoxigenin-AP를 75 mU/㎖(1:10000)의 농도로 blocking buffer(0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5; 1%(w/v) reagent)에 희석하여 실온에서 30분간 shaking incubation한 후, washing buffer(0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl; pH 7.5; 0.3%(v/v) Tween 20)로 실온에서 15분간 2회 세척하였다. 세척한 membrane은 detection buffer(0.1 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5)에 담궈 5분간 평형화시킨 다음, detection buffer에 1:100의 농도로 희석한 chemiluminescence substrate CSPD solution으로 5분간 반응시켰다. luminescent 반응 후, 물기를 제거한 membrane을 37℃에서 30분 1시간정도 방치하였다가 X-ray 필름에 노출시켰다.

2.8 IGFBPs 분석

GM10 human fibroblast를 glucose 농도에 따른 처리조건별로 배양한 후 cell lysate를 회수하였다. 회수한 cell lysate에 4×Laemmli sample buffer(13.3% SDS, 0.4 M Tris, 0.013% bromophenol blue, 40% glycerol pH 6.5)를 1×의 농도가 되도록 1M DDT(최종농도 0.1 M)와 함께 첨가하여 Mighty Small II Apparatus(Hofer Science

Instrument)로 12.5% nonreducing SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 전기영동 시의 표준분자량 maker로는 Rainbow high molecular marker(Amersham)를 사용하였다. 전기영동 후 gel상에 분리되어진 단백질은 Hoefer Semi-dry Transfer Unit를 사용하여 Immobilon-PS^{Q} transfer membrane(Millipore, pore size; 0.1 ㎛, U.S.A.)으로 transfer하였다.

2.8.1 IGFBP-3 western immunoblot

Transfer한 membrane은 5% non fat dry milk TBS-T buffer (20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1 M HCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)로 실온에서 1시간동안 blocking한 다음 TBS-T로 10분간 3번 세척하였다. 세척한 membrane은 TBS-T에 1:1,500으로 희석한 IGFBP-3 anti-rabbit 1차 항체로 실온에서 1시간 반응시켰다. 1차 항체 반응 후, TBS-T로 10분간 3번 세척하고 TBS-T에 1:15,000으로 희석한 anti-rabbit IgG-conjugated horseradish peroxidase 2차 항체를 사용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 10분간 3번 세척하고 enhanced chemiluminiescence sustrate (ECL Western blotting detection reagent, Amersham, RPN 2209)를 사용하여 IGFBP-3의 존재를 확인하였다.

2.8.2 IGFBP-5 western immunoblot

Transfer한 menbrane을 1×TBS로 실온에서 10분간 세척한 다음, 3% BSA가 함유된 1×TBS에 IGFBP-5 (1:1,000) 1차 항체로 하룻밤 반응시켰다. 1×TBS ＋ 0.1% IGEPAL CA-630 ＋ 0.03% TritonX-100으로 세척하고 1×TBS로 세척한 후 2차 항체 (1:1,000, anti-guina pig alkaline phosphase conjugate)를 넣어 3시간 반응시켰다. 1×TBS ＋ 0.1% IGEPAL CA-630 ＋ 0.03% TritonX-100,

AP buffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9.5) 순으로 세척한 후 color substrate solution(NBT/BCIP, Promega)으로 발색하였다. 보라색 밴드를 확인한 후, stop buffer (20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0)로 반응을 종결하였다.

2.9 IGFBPs proteolysis

2.9.1 IGFBP-3 proteolysis

GM10 human fibroblasts를 저농도 glucose(5 mM)와 고농도 glucose(25 mM)에 배양한 후 90% confluent되면 무혈청 DMEM으로 배지를 교환하고 고농도 glucose DMEM에 IGF-I(100 ng/ml), insulin(100 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양한 세포배양액 50 ㎕를 취해서 0.5 M tris 10 ㎕와 100 mM $CaCl_2$ 2 ㎕를 첨가하고 intact IGFBP-3 100 ng을 혼합한 후 37℃ water bath에서 하룻밤 반응시킨다. 4×sample buffer로 반응을 중지시켜 시료로 이용하였다. 12.5% nonreducing SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 전기영동 후 transfer한 membrane을 1×TBS로 5분간 세척하고 3% BSA를 함유한 1×TBS로 30분 blocking 시켰다. 1×BSA가 함유된 1×TBS에 IGFBP-3(1:1500) 1차 항체로 하룻밤 반응시켰다. 1×TBS ＋ 0.1% IGEPAL CA-630 ＋ 0.03% TritonX-100으로 세척하고 1×TBS로 세척한 후 2차 항체(1:2000, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate)를 넣어 3시간 반응시켰다. 1×TBS ＋ 0.1% IGEPAL CA-630 ＋ 0.03% TritonX-100, 1×TBS, AP buffer(100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9.5) 순으로 세척한 후 color substrate solution(NBT/BCIP, Promega)으로 발색하였다. 보

라색 band를 확인한 후 stop buffer(20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0)로 반응을 종결하였다. membrane은 건조하여 보관하였다.

2.9.2 IGFBP-5 proteolysis

고농도 glucose(25 mM)에서 배양하여 90% confluent되면 무혈청 배지로 교환하고 IGF-I(100 ng/ml), insulin(100 ng/ml)을 처리한 배양액 50 ㎕와 저농도 glucose(5 mM)와 고농도 glucose(25 mM)에서 배양한 세포배양액 50 ㎕에 0.5 M tris 10 ㎕, 100 mM $CaCl_2$ 2 ㎕를 첨가한 반응 혼합액에 효소의 성질을 검토하기 위해 저해제(50 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 mM 1,10-phenathroline, 5 mM aprotinin, 0.2 mM E64, 3 mM Benzamide, 1 ㎍/㎖ heparin)를 처리하여 실온에서 30분 반응시킨 후 intact IGFBP-5를 100 ng 첨가하여 37℃ water bath에서 하룻밤 반응시켰다. 4×sample buffer로 반응을 중지시킨 후 12.5% nonreducing SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 transfer한 membrane을 western immunoblot으로 IGFBP-5의 분해 정도를 확인하였으며, 또한 각각의 inhibitor에 의한 IGFBP-5의 저해정도를 확인하였다.

2.10 IGFBP-5 mRNA 분석

2.10.1 Total RNA 추출

각 처리조건별로 배양한 GM10 human fibroblast는 배양액을 제거한 다음, TRI reagent(Sigma) 1 ㎖을 첨가하고 scrapping하여 cell lysate를 회수하였다. Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 200 ㎕를 첨가하여 실온에서 30분간 방치하고 원심분리(4℃, 12,000 rpm, 15분)한 다음 멸균한 새 튜브에 RNA가 포함된 상층을 옮기고 동량의

isopropanol을 첨가하여 -70℃에서 overnight 침전시켰다. overnight 후, 원심분리하여 상층을 제거하고 남은 total RNA는 70% ice-cold ethanol로 2번 세척한 후 건조시켰다. 건조된 total RNA는 0.1% DEPC로 처리한 물에 녹여서 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정 정량한 다음, 3 μg을 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동하여 total RNA band를 확인하고 -70℃에 보관하면서 RT-PCR에 사용하였다.

2.10.2 Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)은 TAKARA one step RNA PCR kit를 사용하였다. Total RNA(10 μg)를 1×one step RNA PCR reaction buffer, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP mixture, 0.8 U RNase inhibitor, IGFBP-5 sense, antisense primer 각각 40 pmol, 0.1 U AMV reverse transcriptase, 0.1 U AMV-optimized Tag과 혼합하였다. 이 반응 혼합물을 PCR Thermal Cycler 480(TAKARA)를 사용하여 50℃에서 30분, 94℃에서 2분간 reverse transcription 시킨 다음 94℃에서 30초, 65℃에서 30초, 72℃에서 30초간 30 cycles, 72℃에서 5분간 반응시켜 증폭시켰다. RT-PCR에 사용한 IGFBP-5 sense, antisense primer는 아래와 같다.

5‘- GAA GGC TGA AGC AGT GAA GAA GGA CCG -3' (Sense)
5'-ACT CAA CGT TGC TGC TGT CGA AGG TGT -3' (Antisense)

RT-PCR 반응 후, EtBr(10 mg/ml)을 함유하는 2% agarose gel에 RT-PCR 생성물을 전기영동하여 양을 비교하고, 100 bp molecular

weight marker(Bio Labs, 100 bp DNA Ladder)를 사용하여 크기를 확인하였다.

2.11 Gelatin zymography

GM10 human fibroblast를 고농도(25 mM)와 저농도(5 mM)의 glucose가 포함된 DMEM에서 배양하여 90% confluent되면 무혈청 DMEM으로 교환하고 고농도 glucose DMEM에 각각 IGF-I(100 ng/ml), insulin(100 ng/ml)을 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 또한 고농도와 저농도 glucose에서 시간별로 처리한 배양액을 회수하여 4×sample buffer와 섞어 60℃에서 10분간 열 변성시킨 후 10% gelatin이 함유된 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 2.5% Triton X-100으로 4℃에서 10분간 4회 세척하고 탈 이온수로 2분간 5-6회 세척한 다음, 4 mM $CaCl_2$를 함유한 50 mM Tris buffer(pH 7.4)에 담궈 37℃에서 하룻밤 방치시킨 후 fix solution(7% acetic acid, 40% methanol)으로 고정하고 staining solution(0.1% coomassie brilliant blue G-250, 10% acetic acid)로 염색한 후 destaining solution(7% acetic acid, 20% methanol)로 탈색시켰다.

제3장 결과 및 고찰

1. Glucose 농도가 세포증식에 미치는 영향

Human fibroblast를 저농도 glucose(5 mM)와 고농도 glucose(25 mM)로 처리하였을 때의 세포수를 측정한 결과, 고농도와 저농도 glucose에 있어서 세포 수는 각각 $47.9\pm5\times10^4$, $45.1\pm4.3\times10^4$ cells/㎠으로 glucose 농도에 따른 cell growth에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 1).

Stefano Giannini등(55)은 정상상태, 인슐린비의존형 당뇨병(Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM), 인슐린의존형 당뇨병(Insulin-Dependent Diabetes Mellitus, IDDM), 그리고 비만환자로부터 얻은 fibroblasts의 세포 수는 각각 $3.8\pm0.7\times10^4$, $4.5\pm0.7\times10^4$, $4.1\pm0.6\times10^4$, 그리고 $3.8\pm0.7\times10^4$ cells/㎠로 cell growth에 차이를 나타내지 않았으며, Busiguina S 등(58)도 정상대조군과 당뇨쥐의 세포수는 각각 $19.4\pm0.5\times10^4$, $18.7\pm1.0\times10^4$ cells/㎠으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하고 있어, 본 연구의 결과와 거의 일치함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 두 그룹에 있어서 glucose 농도 차이 외에 기초영양소는 모두 조건이 동일하기 때문에 짧은 시간 내에 glucose 농도만으로는 세포증식에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되어진다.

Table 1. Effect of glucose levels on cell numbers

Glucose concentration	Cell number (cells/㎠)
5 mM	$45.1 \pm 4.3 \times 10^4$
25 mM	$47.9 \pm 5.0 \times 10^4$

- Values are the mean ± SE (n=3)
- Cell : Human fibroblast (GM10)

2. Glucose 농도가 세포배양액 중의 물질대사에 미치는 영향

2.1 당질 대사

Figure 1은 human fibroblast(GM10)를 고농도 glucose(25 mM)와 저농도 glucose(5 mM)에서 배양했을 때, 시간의 경과에 따른 glucose의 소비를 살펴보았다(Figure 1). 그 결과 고농도 glucose에서 72시간 배양했을 때 glucose 농도는 24시간 배양했을 때 보다 약 10% 감소하였으며, 배양 120시간째에는 약 25%의 감소를 나타냈다. 그러나 저농도 glucose에서 배양한 경우 배양 72시간째 약 35% 감소하였고, 배양 120시간에서는 약 84%감소를 나타냈다. 실제 감소되는 경향은 상대적으로 저농도 glucose군에서 많이 소모되는 것 같지만, 절대적인 값으로 보면 고농도 glucose에서 더 많은 glucose를 소비한 것으로 나타났다. Henry RP 등(59)은 당뇨병 상태에서 인슐린이 생성되지 않거나 그 기능이 저하될 때 glycogen 형성이 감소하며, 말초조직에 있어 포도당의 유용률이 저하되어 각종 급원에서 혈류로 들어온 포도당은 서서히 제거되고 고혈당이 뒤따른다고 하였으며, Kahn CR(60)은 streptozotocin(STZ)을 처리한 당뇨쥐에서 고혈당이 일어나는데, 이는 STZ이 췌장 Langerhan's 섬의 β-세포를 손상시킴으로써 인슐린 분비가 감소되며, 이로 인해 당질대사가 비정상화되어 당 이용은 줄어드는 대신 당신생이 증가되어 발생하는 것으로 보고하였으며, 이수자 등(61)은 STZ-diabetic rats에 있어서 정상대조군과 비교할 때, 혈당수준은 유의적으로 높은 수준을 나타낸다고 하였다. 또한 Luclano R 등(62)은 정상상태의 쥐에 있어서 IGF-I은 glucose uptake와 같은 대사적 효과를 가지지만 당뇨가 유발된 쥐의 경우 IGF-I의 감소로 glucose 이용이 줄어든다고 보고하였다. 결론적으로 본 연구 결과는 당

뇨상태에서 혈당 수준이 유의적으로 높게 나타나는 *in vivo*의 결과와 일치함을 알 수 있다.

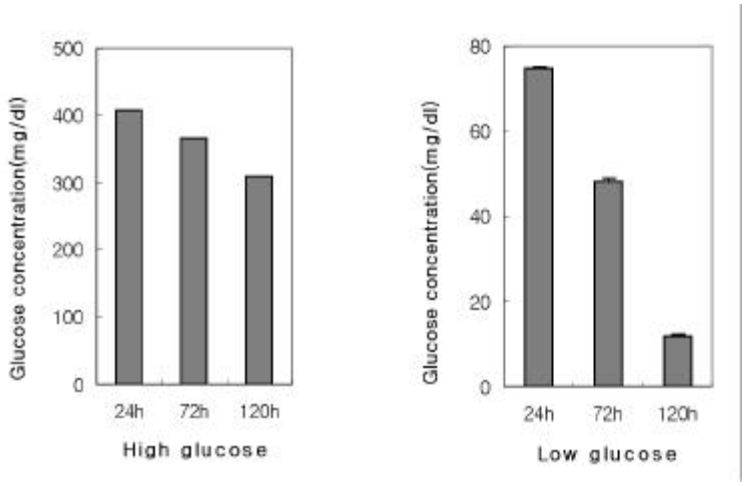

Figure 1. Time course of glucose consumption in conditioned medium of human fibroblast.

Cells were cultured for 24, 48, and 120 h in a medium containing either high glucose(25 mM) and low glucose(5 mM). conditioned medium were collected after the indicated hours of cultures and analysed by GLZYME kit as described in materials and methods.

2.2 지질 대사

Figure 2에서는 Figure 1에서와 마찬가지로 고농도와 저농도 glucose에서 시간의 경과에 따른 triglyceride의 수준를 나타낸 것이다. 그 결과 고농도 glucose에서 보다 고농도 glucose에서 배양했을 때 triglyceride가 많이 생성됨을 알 수 있다. 이는 고농도 glucose 조건에서 저농도 조건에 비해 보다 많이 흡수되어진 glucose는 세포 내에서 triglyceride(TG)로 축적되며, 시간의 경과에 따른 TG의 증가는 고농도 glucose 조건의 지속에 의해 일어나는 것으로 생각된다. Mardar Z 등(65)은 당뇨병이 유발된 쥐들은 정상 쥐보다 혈중 중성지방의 수준이 높아지고 총콜레스테롤 수준이 낮아진다고 보고한 바 있으며, Niall 등(66)의 연구에서도 고혈당일 때 매우 높은 혈장 중성지방함량을 보였다고 하였다. 인슐린의존형(IDDM)당뇨병에서는 인슐린 결핍에 따른 lipoprotein lipase의 활성 감소로 인하여 중성지방의 가수분해가 저하되어, 중성지방을 주로 포함하고 있는 VLDL 및 chyromicron이 축적된다고 보고하였으며(67), 당뇨병 환자의 약 90% 이상을 차지하는 인슐린비의존형 환자에서 가장 많은 지질대사이상은 중성지방의 증가 및 HDL-콜레스테롤의 감소이며(62,63), 이와 같은 고중성지방혈증과 혈장 HDL-콜레스테롤 농도의 감소는 주요 합병증인 관상동맥질환의 위험을 높이는 요인으로 확인되었다(64). 결론적으로, 본 연구 결과는 *in vivo*에서 나타나는 고혈당 상태와 유사하게 세포에서도 지질대사는 어느 정도 glucose에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

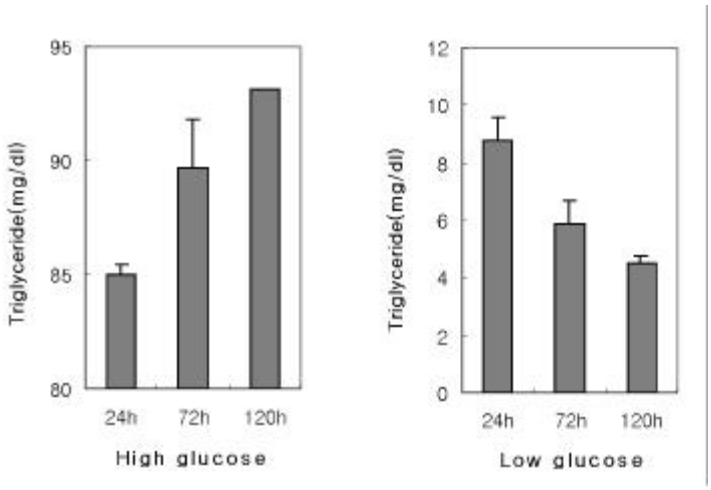

Figure 2. Time course of triglyceride levels in human fibroblast.

Cells were cultured for 24, 48, and 120 h in a medium containing either high glucose(25 mM) and low glucose(5 mM). cell lysate were collected after the indicated hours of cultures and analysed TRIGLYZYME-V kit as described in Materials and Methods.

2.3 단백질 대사

Figure 3에서는 GM10 세포를 고농도와 저농도 glucose 조건에서 total protein 농도 변화를 측정한 결과, 저농도 glucose에서 배양한 경우 세포내 total protein 함량이 시간에 의존적으로 증가한 반면, 고농도 glucose는 반대의 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다. Insulin 작용 부족에 의한 당뇨병에서는 조직의 포도당 이용이 낮아져서 해당계에서 얻어진 자유에너지가 부족하게 된다. 이와 같은 상태가 지속되면 단백질 분해가 일어나 그 에너지 부족을 보상하려는 현상이 생긴다. 즉 인슐린 작용부족으로 포도당의 대사장애가 단백질분해 촉진을 일으키며, 인슐린 작용부족이 단백질 대사를 glucogenesis의 방향으로 유도하여 결국은 단백질 합성장애를 가져오게 된다(68). Green M 등(69)은 STZ을 투여하여 당뇨병을 유발시킨 쥐의 경우 insulin 결핍에 의한 체 단백질 분해 항진과 함께 근육에서 아미노산 방출이 촉진된다고 하였다. 또한 당뇨병 발병 때 단백질 합성이 저하된다고 보고하였다(70 72). 따라서, 본 연구 결과는 과다한 glucose로 인해 단백질 합성장애가 일어나 단백질 대사가 이화작용으로 기울어진 것으로 생각된다.

Table 2에서는 고농도와 저농도 glucose 조건에서 5일(120 h)동안 배양하였을 때, 세포 배양액 내에 함유된 유리아미노산을 살펴본 결과, 저농도 glucose를 함유하는 배지의 총 유리아미노산 함량은 고농도 glucose에 비해 매우 낮게 나타났다. 이는 에너지원으로 이용할 수 있는 glucose 양이 부족한 저농도 glucose 조건에서는 고농도 glucose 조건에서 보다 아미노산을 에너지원으로서 더 많이 소모하기 때문에 나타나는 결과로 앞서 살펴본 저농도 glucose 조건에서 총 단백질의 축적과 관련되는 것으로 생각된다. 따라서 단백질 대사

에 미치는 glucose의 영향은 지질대사에 비해 절대적이지 않음을 알 수 있다. 또한 아미노산중 cystine, glutamine, serine 등은 고농도 glucose에서 각각 58%, 80%, 49%의 감소를 나타냈으며, 저농도 glucose에서도 각각 60%, 81%, 61%의 감소로 고농도와 저농도 glucose 모두에 있어서 크게 감소하였다. 이는 cystine, glutamine, serine 등의 아미노산이 에너지원으로 많이 이용되었음을 알 수 있다. 반면, control과 비교하였을 때 glycine, phenylalanine, threonine 등의 아미노산은 고농도와 저농도 glucose에서 증가를 나타냈다.

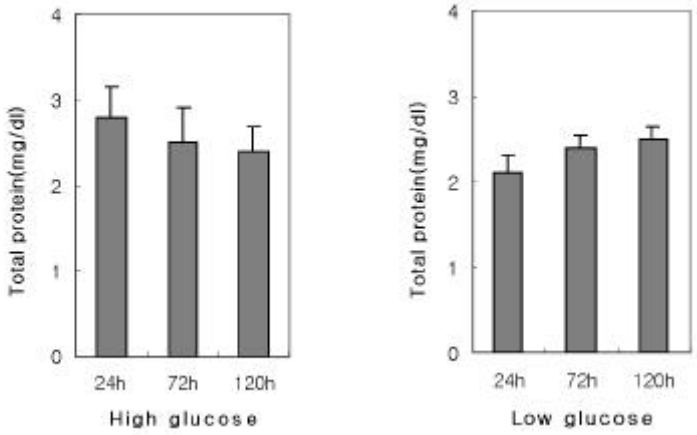

Figure 3. Time course of total protein concentration in cell lysate of human fibroblast.

Cells were cultured for 24, 48, and 120 h in a medium containing either high glucose(25 mM) and low glucose(5 mM). Cell lysate were collected after the indicated hours of cultures and analysed by TP-M kit as described in materials and methods.

Table 2. Free amino acid composition of human fibroblast high and low glucose conditioned medium.

(㎎/ℓ)

Amino acid	Sample		
	Control	High(120h)	Low(120h)
Arginine	84	68	61
Cystine	63	27	25
Glutamine	584	114	111
Glycine	30	55	54
Histidine	42	28	26
Leucine	105	97	84
Lysine	146	125	117
Methionine	30	29	27
Phenylalanine	66	73	68
Serine	42	21	16
Threonine	95	107	102
Tryptophan	16	-	-
Tyrosine	104	73	67
Valine	94	95	88
Total	**1,501**	**912**	**846**

3. Glucose 농도가 IGFBP-3에 미치는 영향

Figure 4에서는 GM10 세포에 있어서 고농도와 저농도 glucose 조건에 따른 단백질 수준에서 IGFBP-3를 살펴본 결과, 고농도 glucose에서 다소 감소를 보였다. Baxter와 Martin(20)은 혈당조절이 되지 않은 당뇨병 환자에서 IGFBP-3는 정상인에 비해 감소되어 있다고 보고하였고, Rine와 Binoux(76)는 혈당조절이 불완전한 당뇨병 환자에서 IGFBP-3가 감소되어 있으며, 고혈당 상태와는 역상관관계를 관찰한 바 있으며, IGFBP-3는 임신(77)이나 수술 후 또는 당뇨병(20)과 같은 특정 병리상태에서 부분적으로 분해되는 것으로 보고되고 있다(78 82). 또한 STZ을 투여하여 당뇨병을 유발시킨 쥐의 경우 혈장이나 간에서 IGFBP-3는 감소되어 있었으며(54,56), 인슐린의존형 당뇨병에 있어서 혈중 IGFBP-3 protease activity 증가로 intact IGFBP-3가 감소되어 있으며(83), GH 결핍시(84)나 당뇨병(54)이나 식이 단백질 제한(85)과 같은 이화상태에서 IGFBP-3가 감소하였다. 이러한 *in vivo*의 연구 결과와 본 논문에서 살펴본 고농도 glucose에서 IGFBP-3의 수준의 감소와 일치함을 알 수 있었다.

Figure 5에서는 고농도와 저농도 glucose 조건에서 IGFBP-3 mRNA의 발현정도를 살펴본 결과, 고농도 glucose에서 IGFBP-3 mRNA 수준이 다소 감소되었음을 확인할 수 있었다. 당뇨병을 유발시킨 쥐에 있어서 IGFBP-3 mRNA 발현이 저하된다고 보고하였으나(38) Spoerri PE 등(86)은 당뇨병 환자에서 IGFBP-3 mRNA 수준에는 거의 변화가 없다고 보고하였다.

Figure 6에서는 고농도와 저농도 glucose 조건에서와 고농도 glucose 상태에서 IGF-I과 insulin을 처리한 세포배양액에 있어서

IGFBP-3 proteolysis의 결과를 나타낸 것으로 human fibroblast (GM10)의 세포배양액에서 IGFBP-3 protease의 영향을 받지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. Clemmons(81)는 human dermal fibroblasts와 porcine aortic smooth muscle cells을 배양한 세포배양액에서 IGFBP-3는 안정하며, IGFBP-3 proteolytic의 활성이 나타나지 않는다고 보고하였는데 이는 본 논문의 결과와 일치함을 알 수 있다. 이상의 결과로서 IGFBPs 중에서 양적으로 가장 많이 분비되고 있는 IGFBP-3의 경우, glucose가 단백질 수준뿐만 아니라 분자적 수준에 있어서 보여지는 IGFBP-3의 감소는 protease 활성과 관련한 것이 아니라, 분자적 수준의 전사단계에서부터 glucose에 의해 조절되어진 것임을 알 수 있다.

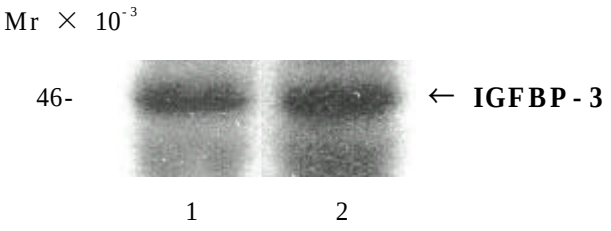

Figure 4. IGFBP-3 ECL western immunoblotting of human fibroblast cell lysates.

Collected cell lysates from medium containing either high glucose or low glucose, after 48 h culture, were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto a nitrocellulose membrane, and analyzed ECL immunoblotting, as described in *Materials and Methods*. Molecular marker are indicated on the *left*.

lane 1 : High glucose(25 mM)
lane 2 : Low glucose(5 mM)

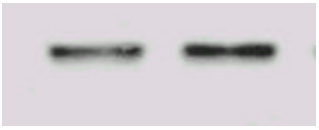

Figure 5. Effect of glucose on IGFBP-3 gene expression.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose and low glucose. Total RNA was extracted from clultures of human fibroblast(GM10) and was analyzed by northern blotting using a specific IGFBP-3 cDNA as described in *Materials and Methods*.

lane 1 : high glucose(25 mM)
lane 2 : low glucose(5 mM)

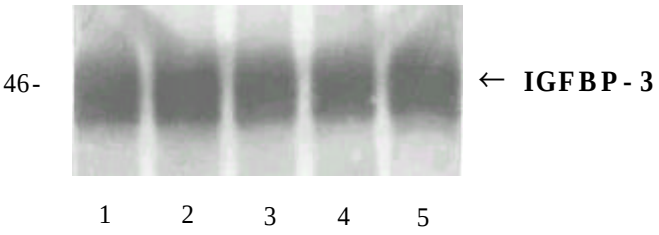

Figure 6. Effects of high glucose, IGF-I, insulin low glucose on IGFBP-3 protease activity.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose, high glucose treated with IGF-I, high glucose treated with insulin and low glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-3(100 ng) for 14 h at 37℃, and the products were analyzed by immunoblotting.

lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-3 and no incubation
lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-3
lane 3 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) treated with IGF-I(100 ng/㎖) plus intact IGFBP-3
lane 4 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) treated with insulin(100 ng/㎖) plus intact IGFBP-3
lane 5 : Conditioned medium containing low glucose(5 mM) plus intact IGFBP-3

4. Glucose 농도가 IGFBP-5에 미치는 영향

고농도와 저농도 glucose 조건에서 배양한 human fibroblast의 cell lysate에 있어서 IGFBP-5의 단백질 수준을 살펴본 것으로 고농도 glucose에서 IGFBP-5 수준이 감소되어 있음을 볼 수 있었다(Figure 7). 정상인의 human fibroblast에 IGF-I과 IGF-Ⅱ 첨가시 IGFBP-5 mRNA 합성에는 protease활성의 저하로 IGFBP-5 수준이 증가한 반면(73), IGFBP-5 mRNA의 발현은 증가하였으며(74,75), 또한 smooth muscle cell(88), chondrocytes 그리고 osteoblast(89)에서도 IGF-I 첨가시 IGFBP-5 mRNA 발현이 현저히 증가한다고 보고하였다. 이와 같이 정상상태의 human fibroblast에 있어서 IGF-I 첨가는 단백질 수준에서뿐만 아니라 분자적 수준에서 IGFBP-5의 합성을 증가시키지만 고농도 glucose 상태에서는 IGF-I을 첨가하더라도 IGFBP-5를 감소시킨다고 하였다. 정상상태와 비교할 때 인슐린의존형 당뇨병(IDDM), 인슐린비의존형 당뇨병(NIDDM) 환자의 human skin fibroblast에 있어서 IGFBP-5는 저하되는 것으로 나타났다(55).

Figure 8은 분자적 수준에서의 IGFBP-5 발현정도를 살펴본 결과, 고농도와 저농도 glucose, 그리고 고농도 glucose하에서 IGF-I과 insulin을 첨가하여 배양한 GM10세포에 있어서 IGFBP-5 mRNA 발현에는 IGFBP-3와는 달리 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 당뇨병 쥐의 신사구체에 있어서 IGFBP-5 mRNA의 발현은 증가하였으며(14), 당뇨쥐의 신장세뇨관에서는 IGFBP-5 mRNA 수준이 감소한다고 보고하였다(90). Figure 7에서 IGFBP-5가 약간의 감소를 나타냈으며, Figure 8에서는 IGFBP-5 mRNA의 발현은 고농도와 저농도 glucose에서 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 또한 Nam 등(91)

은 human fibroblast에 있어서 IGFBP-5를 분해시키는 protease가 분비된다고 보고함에 따라 본 연구에서는 고농도 glucose 상태에서 IGFBP-5의 감소가 protease에 의한 것인지를 통해 IGFBP-5 protease activity에 미치는 glucose의 영향을 살펴보았다(Figure 9). 그 결과, 고농도 glucose 조건에서 30 kDa의 intact IGFBP-5가 저농도에 비해 약간 감소했으며, 22 kDa 부근의 IGFBP-5 가수분해물이 많이 생성되고 있음을 볼 때, 고농도 glucose에서 IGFBP-5의 단백분해가 촉진됨을 확인할 수 있었다. 따라서 고농도 glucose에서 보여지는 IGFBP-5의 감소는 IGFBP-3와는 달리 protease에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

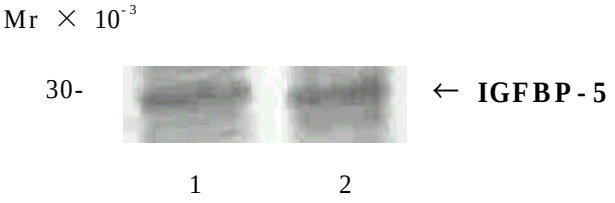

Figure 7. IGFBP-5 western immunoblot of human fibroblast cell's lysates.

After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12.5% SDS-PAGE) of cell lysates were electroblotted onto immobilon-PS^{Q} membrane and incubated with IGFBP-3 antibody. Molecular markers are indicated on the *left*.
lane 1 : high glucose(25 mM)
lane 2 : low glucose(5 mM)

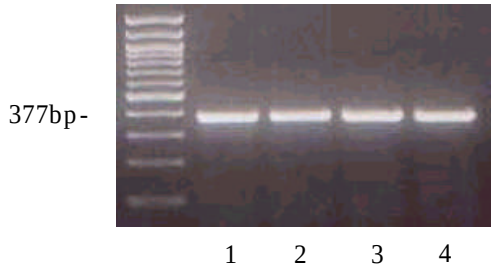

Figure 8. Effects of high glucose, IGF-I, insulin low glucose on of IGFBP-5 gene expression.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose, high glucose treated with IGF-I, high glucose treated with insulin and low glucose. Total RNA was extracted from clultures of human fibroblast(GM10) and used for RT-PCR as described in *Materals and Methods*.

lane 1 : high glucose(25 mM)
lane 2 : high glucose treated with IGF-I(100 ng/㎖)
lane 3 : high glucose treated with insulin(100 ng/㎖)
lane 4 : low glucose(5 mM)

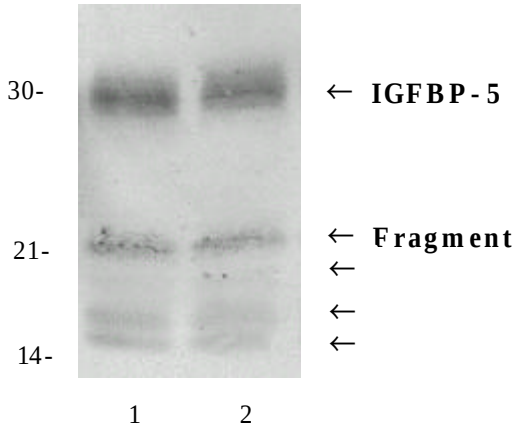

Figure 9. Effect of glucose on IGFBP-5 protease activity.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose and low glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) for 14 h at 37℃, and the products were analyzed by immunoblotting. The relative migration position of fragments are also noted by arrows.

lane 1 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-5

lane 2 : Conditioned medium containing low glucose(5 mM) plus intact IGFBP-5

5. Protease inhibitor에 의한 IGFBP-5 protease의 특성

앞에서 살펴본 결과에서 고농도 glucose 조건에서 IGFBP-5의 감소가 protease activity의 증가로 인해 단백질 분해가 일어났음을 확인할 수 있었다. 따라서 고농도, 저농도 glucose와 IGF-I, insulin을 첨가한 세포배양액에 있어서 IGFBP-5의 분해에 관여하는 효소의 성질을 살펴보고자 다양한 inhibitor를 처리하여 proteolysis 실험을 통해 검토하였다.

Figure 10 13에서는 고농도와 저농도 glucose 조건 하에서 IGF-I과 insulin을 첨가하여 배양한 세포배양액에 EDTA, PMSF, 1,10-phenathroline, aprotinin, E64, benzamide, heparin를 처리하여 protease의 특성을 western immunoblot으로 확인하였다. 그 결과, metalloprotease inhibitor인 EDTA에 의해서는 거의 저해되었으며, 1,10-phenathroline에 의해서는 약간의 저해를 볼 수 있었다. Serine protease inhibitor인 PMSF의 경우는 IGF-I을 처리한 세포배양액에서만 protease 활성을 저해시키지 못했으며, aprotinin의 경우 고농도 glucose 조건을 제외한 다른 조건에서 모두 protease 활성을 억제시켰다. serine protease 및 metalloprotease를 동시에 저해시키는 inhibitor로 알려진 heparin에 의해서는 protease 활성이 모두 저해되었다. 또한 E64, benzamide의 경우에는 단백질분해 억제작용이 약화되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 어떤 기전을 통해 고농도 glucose에서 IGF-I과 insulin이 IGFBP-5 protease에 작용하는지는 알 수 없지만, 본 논문에서는 고농도 glucose에서 IGF-I을 처리한 경우 22 kDa과 20 kDa의 fragment만 나타났으며, 다른 조건에서와는 달리 heparin 처리시 20 kDa의 fragment가 진하게 나타났다. 그리고

Insulin의 경우에서는 22 kDa과 17, 16 kDa의 fragment만이 확인되었다. 따라서, IGF-I과 insulin은 IGFBP-5 protease activity에 관여하는 것으로 생각되어지며, human fibroblast에 있어서 IGFBP-5를 분해시키는데는 serine protease 뿐만 아니라 metalloprotease 역시 관여함을 확인할 수 있었다. Human fibroblast에 있어서 IGFBP-5를 분해시키는데는 serine protease와 metalloprotease가 모두 관여하며, 특히 serine protease가 우세하게 작용하여 22, 17, 16 kDa의 fragment로 분해시킨다고 보고하였으며, metalloprotease가 작용하여 20 kDa fragment로 분해시킨다고 보고하였다. 또한 serine protease inhibitor인 aprotinin, 3,4-DCI, phenylmethyl-sulfonyl fluoride(PMSF)와 metalloprotease inhibitor인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 10-phenathroline 등에 의해 IGFBP-5 proteolysis 억제 효과를 나타냈으나, E64, Benzamide, NEM, iodoacetic acid등은 protease 활성을 억제시키지 못한다고 하였다(91,92)

이상의 결과에서 저농도 glucose의 배양에서 IGFBP-5의 분해가 약하였으며, 고농도 glucose 조건의 배양에서는 같은 농도의 inhibitor를 사용하였음에도 불구하고 IGFBP-5 분해를 크게 저해하지 못하고 있음을 볼 때, 고농도 glucose 조건에서는 IGFBP-5를 분해시키는 효소의 활성이 강하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 당뇨상태의 *in vivo* 연구에서 나타나는 결과와 일치하였으며, 더 나아가서 glucose 농도, IGF-I과 insulin의 첨가에 의해 유도되어지는 IGFBP-5 protease activity의 변화와 관련된 작용 기전의 규명과 IGFBP-5 protease가 고농도 glucose 조건에서 왜 강한 활성을 나타내는지에 대해서는 이들 효소를 분리 정제하여 다른 각도로 보다 많은 연구가 진전되어야만 해석이 가능할 것이라고 생각된다.

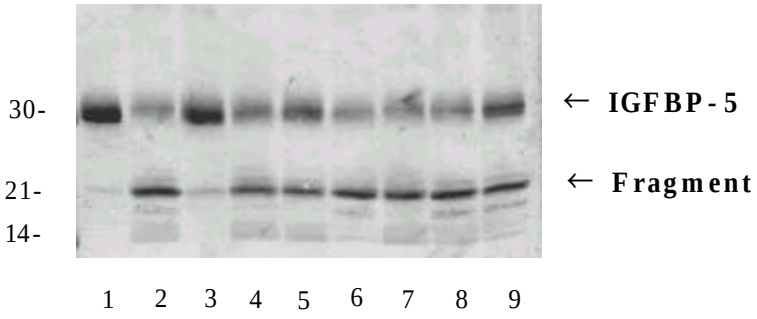

Figure 10. Analysis of effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in high glucose conditioned medium.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 h at 37℃, and the products were analyzed by immunoblotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows.

lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation
lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-5
lane 3 : EDTA(50 mM)
lane 4 : PMSF(2 mM)
lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM)
lane 6 : aprotinin(5 mM)
lane 7 : E64(0.2 mM)
lane 8 : benzamide(3 mM)
lane 9 : heparin(1 μℓ/mℓ)

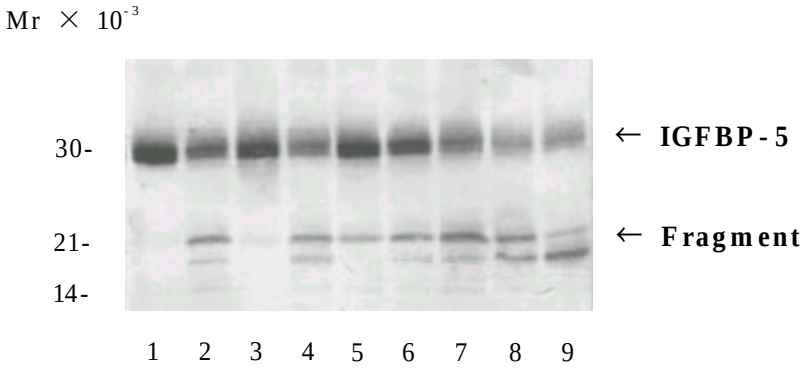

Figure 11. Analysis of effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in human fibroblast high glucose conditioned medium treated with IGF-I.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 h at 37℃, and the products were analyzed by immunoblotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows.

lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation
lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-5
lane 3 : EDTA(50 mM)
lane 4 : PMSF(2 mM)
lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM),
lane 6 : aprotinin(5 mM)
lane 7 : E64(0.2 mM)
lane 8 : benzamide(3 mM)
lane 9 : heparin(1 ㎕/㎖)

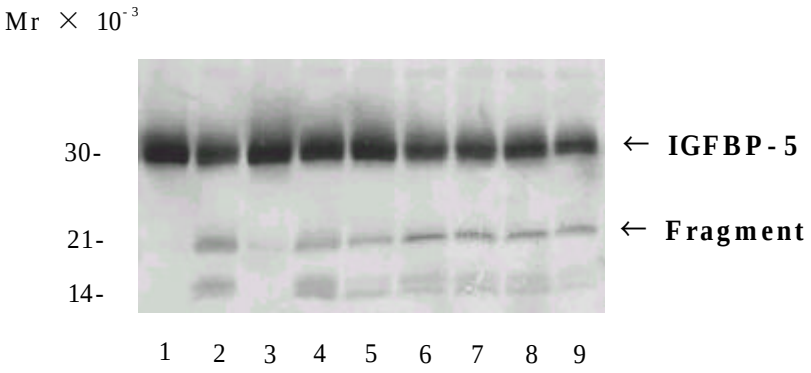

Figure 12. Analysis of effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in human fibroblast high glucose conditioned medium treated with insulin.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 h at 37℃, and the products were analyzed by immunoblotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows.

lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation
lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-5
lane 3 : EDTA(50 mM)
lane 4 : PMSF(2 mM)
lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM)
lane 6 : aprotinin(5 mM)
lane 7 : E64(0.2 mM)
lane 8 : benzamide(3 mM)
lane 9 : heparin(1 ㎕/㎖)

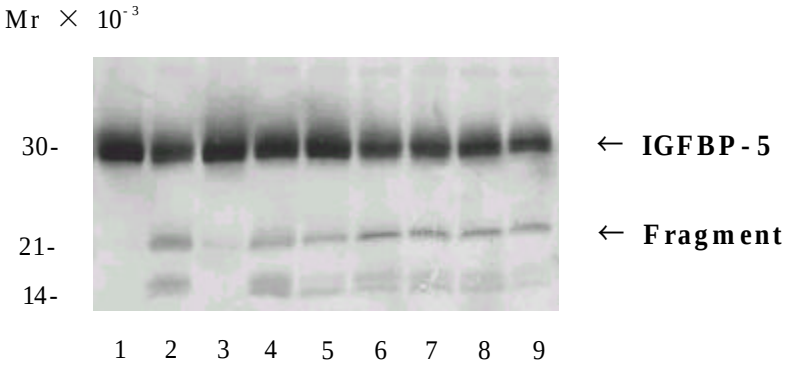

Figure 13. Analysis of effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in human fibroblast low glucose conditioned medium.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 h at 37℃, and the products were analyzed by immunoblotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows.

lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation
lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-5
lane 3 : EDTA(50 mM)
lane 4 : PMSF(2 mM)
lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM),
lane 6 : aprotinin(5 mM)
lane 7 : E64(0.2 mM)
lane 8 : benzamide(3 mM)
lane 9 : heparin(1 ㎕/㎖)

6. IGFBP-5 Protease의 크기

앞서 살펴본 결과에서 IGFBP-5를 분해하는 metalloprotease가 활성화됨을 확인하였으므로 metalloprotease의 크기를 알아보기 위해 gelatin zymography를 실시하였다. 또한 고농도와 저농도 glucose 조건에 있어서 시간의 경과에 따른 protease의 크기를 확인하였다. Figure 14에서는 고농도와 저농도 glucose 조건에서와 고농도 glucose하에 IGF-I과 insulin를 처리한 세포배양액에 있어 metalloprotease의 크기를 확인한 결과 모든 조건에서 72, 69, 55 kDa의 gelatinase를 가지며, 그 중에서도 69 kDa의 gelatinase가 가장 큰 활성을 가짐을 알 수 있었다. 또한 탈색된 band의 면적으로 보아 고농도 glucose 조건에서 효소활성이 크게 나타남을 확인하였다. Figure 15에서는 고농도와 저농도 glucos에 있어서 시간의 경과에 따라 protease의 크기를 gelatin zymography로 살펴본 결과, 고농도와 저농도 glucose에 있어서 시간의 경과에 따른 protease 활성이 점점 증가함을 볼 수 있었으며, Figure 14에서의 결과와 마찬가지로 고농도 glucose상태에서 protease의 활성이 크게 나타남을 확인 할 수 있었다.

이러한 결과는 정상인과 비교할 때 당뇨환자에서 metalloprotease의 활성이 높게 나타난다(93)는 *in vivo* 결과들과 마찬가지로 고농도 glucose에서 IGFBPs protease의 활성은 비슷한 현상을 나타내었다.

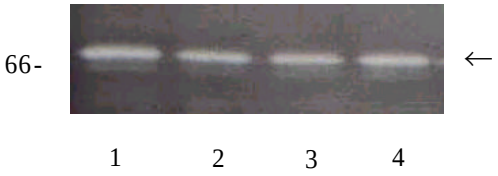

Figure 14. Characterization of gelatin-degrading protease activity in human fibroblast conditioned medium

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose, high glucose treated with IGF-I, high glucose treated with insulin and low glucose. Conditioned medium were analyzed by gelation-substrate zymography. Sample were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels that contained cross-linked gelatin. After electrophoresis, the gel incubated for 14 h at 37℃. After fixing, staining, and destaining, take a photography of gel. Areas of lysis(*clear zone*) represent gelatin-degrading protease activity in the sample. Molecular markers are indicated on the *left*.

lane 1 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM)
lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) treated with IGF-I(100 ng/㎖)
lane 3 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) treated with insulin(100 ng/㎖)
lane 4 : Conditioned medium containing low glucose(5 mM)

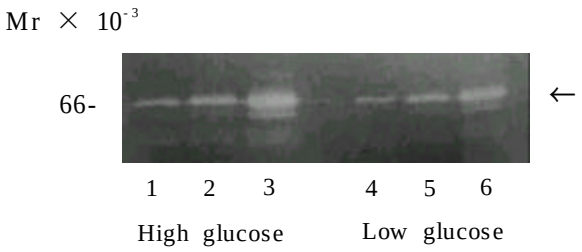

Figure 15. Time course of characterization of gelatin-degrading protease activity in human fibroblast conditioned medium.

Cells were cultured for 24 h in a medium containing high glucose, high glucose treated with IGF-I, high glucose treated with insulin and low glucose. Conditioned medium were analyzed by gelation-substrate zymography. Sample were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels that contained cross-linked gelatin. After electrophoresis, the gel incubated for 14 h at 37℃. After fixing, staining, and destaining, take a photography of gel. Areas of lysis(*clear zone*) represent gelatin-degrading protease activity in the sample. Molecular markers are indicated on the *left*.

lane 1(24 h), 2(72 h), 3(120 h) : Conditioned medium containing high glucose(25 mM)

lane 4(24 h), 5(72 h), 6(120 h) : Conditioned medium containing low glucose(5 mM)

제4장 요 약

Human fibroblasts에서 glucose농도가 물질대사 및 IGFBP-3와 -5 발현에 미치는 영향을 살펴본 결과는 다음과 같다.

1. GM10 human fibroblast에 있어서 glucose 농도에 따른 세포 수에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

2. 고농도 glucose(25 mM)와 저농도 glucose(5 mM) 조건하에서 시간의 경과에 따른 glucose 농도측정 결과, 저농도 glucose에 비해 고농도 glucose에서 절대적인 소비량이 많았다.

3. 시간의 경과에 따른 triglyceride 수준은 고농도 glucose에서 증가한 반면, 저농도 glucose에서는 반대의 경향을 나타냈다.

4. 고농도 glucose 조건에서 총단백질 농도는 감소한 반면, 저농도 glucose에서는 시간의 경과에 따라 단백질 수준이 증가하였다.

5. 고농도와 저농도 glucose 조건에서 5일 동안 배양한 세포배양액 내에 함유된 유리아미노산은 저농도 glucose에서 소비량이 증가하였다.

6. 저농도 glucose와 비교할 때, 고농도 glucose에서 IGFBP-3는 단백질뿐만 아니라 분자적 수준에서 감소되어 있으며, human fibroblast의 세포배양액에서 IGFBP-3 protease 활성은 일어나지 않았다.

7. 고농도 glucose에서 IGFBP-5 수준은 감소한 반면 IGFBP-5

mRNA 발현에는 유의적인 차이가 없었다.

8. 고농도 glucose에서 IGFBP-5의 분해가 더욱 촉진되었으며, GM10 human fibroblast에 있어서 IGFBP-5 분해에는 serine protease 뿐만 아니라 metalloprotease 역시 관여한다.

9. Gelatin zymography를 통한 protease 활성은 고농도 glucose에서 크게 나타났으며, 시간의 경과에 따라 점차 증가하였다.

이상의 결과에서 물질대사는 부분적으로 세포를 이용한 당뇨병 모델 실험에서 *in vivo*와 같은 결과를 얻지 못하였으나, IGFs와 같은 세포성장인자에 대한 연구는 세포수준의 당뇨병 모델화가 가능하다고 생각된다.

제5장 참고문헌

1. **허갑범**. 1995 **한국인 당뇨병의 특성**. **당뇨병의 오늘과 내일**(심포지엄)
2. **이광우**, **손호영**, **강성구**, **박병기**, **박두호**, **민병석**. 1984 **한국인 18,201명에서 당뇨병과 관련질환에 관한 역학적 연구**. *Diabetes* 8:23
3. Annual report on the cause of death statistics, korean statistical association 1991
4. Robbins SL & Kumar V. 1987 Basicpattiolagy 4th ed. *Philadelphia, saunders:*86
5. Cook DL Taborsky GJ Jr. 1990 β-cell funcion and insulin secreion. In Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus:theory and practice. Rifkin H, Porte D Jr., Eds. *New York, Elsevier*:89-103
6. Wahren J, Felig P, Cerasi E & Luft R. 1972 Splanchnic and peripheral glucose amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest* 51:1870
7. Saudek CD & Eder HA. 1979 Lipid Metabolism in diabetes mellitus. *Am J Med* 66:843-852
8. Rinderknech E, Humble RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *Journal of Biological Chemistry* 253:2769-2776
9. Rindeknecht E, Humble RE. 1978 Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Letters* 89:283-286
10. Boulware SD, Tamborlane WV, Matthews LS, Sherwin RS. 1992 Direrse effects of insulin-like growth factors I on glucose, lipid, and amino acid metabolism. *Am J Physiol*

262:E130-133
11. Rinderknech E, Humble RE. 1978 The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. *J Biological Chemistry* 253:2769-2776
12. Rinderknecht E, Humble RE. 1978 Primary structure of human insulin-like growth factor **II**. *FEBS Letters* 89:283-286
13. Nissely SP, Rechler MM. 1985 Insulin-like growth factors. Biosynthesis receptors and carrier proteins. In: Li CH, ed: Hormonal protein and pepteides. *New York : Academic Press* 12:128-203
14. Daughaday WH, Rotwein P. 1989 Insulin-like growth factors I and **II** peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. *Endocr Rev* 10:68-91
15. Salmon WD, Daughaday WH. 1957 A hormonally-controlled serum factor which stimulates sulfate incorporatrion by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med* 49:825-836
16. Underwood LE, D'E rcole AJ, Clemmons DR, Van Wyk JJ. 1986 Paracrine functions of somatomedins. *J clin Endocrinol Metab* 15:59-77
17. Yde H. 1969 The growth hormone dependent sulfation factor in serum of untreated diabetics. *Lancet* 2:624
18. Yde H. 1969 The growth hormone dependent sulfation factor in patients with various types of diabetics. *Acta Med Sand* 186:293
19. Maes M, Underwood LE, Ketelglesger JM. 1986 Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes:Evidence for a postreceptor mechanism. *Endocrinology* 118:377-382
20. Baxter RC, Martin JL. 1986 Radioimmunoassay of growth

hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. J Clin Invest 78:1504-1512

21. Rjeu M, M Binoux. 1985 Setum levels of insulin-like growth factor(IGF) and IGF binding protein in insulin-dependent diabetics during an episode of severe metabolic decompensation and the recovery phase. J clin Endocrinol Metab 60:781-785
22. Dro SLS, Schuller AGP, Lindenbergh-Kortleve DJ, Groffen C, Brinkman A, Zwarthoff EC. 1992 Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regulation* 80-97
23. Mohan S, Bautista CM, Wergedal J, Baylink DJ. 1989 Isolation of an inhibitory insulin-like growth factor(IGF) binding protein from bone cell-conditioned medium: A potential local regulator of IGF action. *Proc natl Acad Sci USA* 86:8338-8342
24. Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, et al. 1990 Insulin-like growth factor-binding proteins. *Recent Prog Horm Res* 46:99-159
25. Dae-Yeol Lee, M. D. The erolution of Insulin-like growth factor binding familly. *Journal of Korean Society Endocrinology*.
26. Rechler MM, Nisslely SP. 1990 Insulin-like growth factors. In: Sporn MB, Roberts AB, ed: peptide Growth Factors and Their Receptors I *Berlin, Springer-Verlag* 263-276
27. Rechler MM, Nissley SP. 1990 Insulin-like growth factors. In: Spron MB, Roberts AB, ed: Peptide Growth Factors and Their Receptors I Berlin, Springer-Verlag 263-276
28. Baxter RC, and Martin JL. 1989 Binding proteins for the Insulin-like growth factors:structure, regulation and function. *Prog Growth Factor Res* 1:49-68
29. Drop SLS, Valiquette G, Guyda HJ, Corvol MT, Posner BI. 1979

Partial purification and characterization of a binding protein for insulin like activity in human amniotic fluid:a possible inhibitor of insulin like activity. *Acta Endocrinol* 90:505-518

30. Ritvos O, Ranta T, Jalkanen J, Suikkari AM, Voutilainen R, Bohn H, Rutanen EM. 1988 Insulin-like growth factor binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122:2150-2157
31. Villafuerte BC, Goldstein S Murphy LJ, Phillips LS. 1991 Nutrition and somatomedin. XXV. Regulation of insulin-like growth facor binding protein 1 in primary cultures of normal rat hepatocytes. *Diabetes* 40:837-841
32. Lewitt MS, Baxter RC. 1989 Regulation of growth hormone independent insulin-like growth factor-binding protein (BP-28) in cultured human fetal liver explants. *J Clin Endocrinol Metab* 69:246-252
33. Merrimi TJ, Zapf J, Froesch ER. 1983 Insulin-like growth factors: Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med* 309:527-530
34. Conover CH, Butler P, Wang M, Rizza R, Lee P. 1990 Lack of growth hormone effect on insulin-associated suppression of insulin-like growth factor binding protein-1 in humans. *Diabetes* 39:1251-1256
35. Kerstin Brismar, Eva Fernqvist-Forbes, John Wahren, Kerstin Hall. 1994 Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor-binding protein-1(IGFBP-1), IGFBP-3, and IGF-I in insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 79:872-878
36. Ross RJM, Borges F, Grossman A, et al. 1987 Growth

hormone pretreatment in man blocks the response to growth n hormone-releasing hormone: Eridence for a direct effect of growth hormone. *Clin Endocrinol* 26:117-123

37. Zapf J, Schmid C, Kiefer M, Guler HP, Froesch ER. 1991 In vivo models of IGF binding protein regulation with possible relevance to their physiological roles. In:Spencer EM, ed:Modern concepts of insulin-like growth factors. *New York, Elsevier Science Publ Co* PP 591-605
38. Luo J, Murphy LJ. 1992 Differential expression of the insulin-like growth factor binding proteins in spontaneously diabetic rats. *J Mol Endocrinol* 8(2):155-63
39. Brismar K, Gutniak M, Povoa G, Werner S & Hall K. 1988 Insulin regulates the 35kDa IGF binding protein in patients with diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 11:599-602
40. Holly JMP, Biddlecombe RA, Dunger DB, Edge JA, Amiel SA, Howell R, Chard T, Ress LH & Wass JAH. 1988 Circadian variation of GH-independent IGF-binding protein in diabetes mellitus and its relationship to insulin. A new role for insulin? *Clin Endocrinol* 29:667-675
41. Unterman TG, Oehler DT & Becker RE. 1989 Production of the rat type I insulin-like growth factor binding protein in serum from rats with diabetes mellitus. *Bichem Biophys Res Commun* 163:882-887
42. Unterman TG, Patel K, Mahathre VK, Rajamohan G, Oehler DT, Becker RE. 1990 Regulation of low molecular weight insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetes mellitus. *Endocrinol* 126:2614-2624
43. Oci GT, Orlowski CC, Brown AL, Becker RE, Unterman TG

& Rechler MM. 1990 Different tissue distribution and hormonal regulation of messenger RNAs encoding rat insulin-like growth factor-binding proteins-1 and -2 Mol *Endocrinol* 4:321-328

44. Busby WH, Snyder DK &Clemmons DR. 1988 Radioimmunoassay of a 26000-dalton plasma insulin-like growth factor-binding protein : control by nutritional variables. *J Clin Endocrinol Metab* 67:1225-1230

45. Counts DR, Gwirtsman H, Carlsson LMs, Lesem M & Cutler Jr GB. 1992 The effect of anorexia nervosa and refeeding on growth hormone-binding protein and the insulin-like growth factor(IGFs) and the IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 75:762-767

46. Ross RJ, Miell JP, Holly JM, et al. 1991 Levels of GH binding activity, IGFBP-1, insulin, blood glucose and cortisol in intensive care patients. *Clin Endocrinol(Oxf)* 35:361-367

47. Clemmons DR, Snyder DK, Busby WH, Jr. 1991 Variables controlling the secretion of insulin-like growth factor binding protein-2 in nomal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 73:727-733

48. Unterman TG, Pater K, Mahathere VK, Rajamohan G, Oehle DT, Becker RE. 1990 Regulation of low molecular weight insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetes mellitus. *Endocrinology* 126:2614-2619

49. Snyder DK & Clemmons DR. 1991 Insulin dependent regulation of IGFBP-1. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1632-1636

50. Cohick WS, McGuire MA, Clemmons DR & Bauman DE. 1992 Regulation of IGFBP binding proteins in serum and lymph of lactating cows by somatotropin. *Endocrinology* 130:1508-1514

51. Zapf J, Froesch ER. 1986 Insulin-like growth factors/somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res* 24:121-130

52. D.H. Kin, K.S. Rho and S.C. Chung. 1998 Effects of glycemic control on growth and IGF-I, IGF-Ⅱ, IGFBPs in insulin dependent Diabetic children. *Diabetes* 22:392-402

53. Albertson WK, Rosberg S. 1988 Analysis of 24 hour growth hormone profiles in children : Relation to growth. *J Clin Endocrinol Metab* 67:493-500

54. Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, et al. 1989 Recombinant human insulin-like groeth factor I induces its own specific carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3813-3817

55. Stefano G, Subburaman M, Junko K, Gianna G, Carlo M·R, Thomas R. L, and Yoko F. 1994 Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins with non-insulin dependent diabetes mellitus, insulin-dependent diabetes mellitus, or obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 79:1824-2830

56. Heo YR, Jin SJ, Kim JS, Kang CW. 2000 Changes of insulin-like growth factor-I, IGF binding proteins, and IGF-I carrier protein in streptozotocin-induced diabetic rat. *Korean J Vet Res* 40(3):489-496

57. You Hwa Park. 2001 Effects of glucose on insulin-like growth factor binding proteins in human fibroblasts.

58. Busiguina S, Chowen JA, Argente J, Torres-Aleman I. 1996 Specific alterations of the insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. Endocrinology 137:4980-4987

59. Kahn CR. 1985 The molecular mechanism of insulin action.

Ann Rev Med 36: 249-251

60. Lee, Su-Za, Lee Hye-Sung. 1999 Changes in plasma lipid patterm in streptozotocin-induced diabetic rats: A time course study. *The Korean Nutrition Society* 32(7): 767-774
61. Luclano Rossetti, Simona Frontoni, Richard Dimarchi, Ralph A. Defronzo, Andrea Giaccari. 1991 Metabolic effects of IGF-I in diabetic rats. *Diabetes* 40:444-448
62. Goldberg RB. 1981 Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 4:561-572
63. West KM, Ahuja MMS, Bennett PH, et al. 1983 The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interaction with other "risk factors" as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO multinational study. *Diabetes Care* 6:361-369
64. Reaven GM. 1987 Abnormal lipoprotein metabolism in noninsulin dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 83:31-40
65. Madar Z. 1983 Glucose and lipid metabolism in diabetic rats. Am *J Clin Nutr* 38:388-393
66. Niall MG, Rosaleen AM, Daphne O, Patrick BC, Alan HJ, Gerald HT. 1990 Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* 39:626-636
67. Ginberg, H. 1987 Very low density lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *Diabetes Meta Rev*. 3:571
68. Wahren J, Felig P, Cerasi E & Left R. 1972 Splanchnic and peripheeal glucose, amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J Clin Invest* 51:1870
69. Green M, and Miller L·L. 1990 Protein catabolism and protein synthesis in perfused livers of normal and

alloxan-diabetic rats. *J Biol Chem* 235:3202

70. Pain VM, Garlick PJ. 1974 Effect of streptozotocin diabetes and insulin treatment on the rate of protein synthesis in tissues of the rat *in vivo*. *J Biol Chem* 249:4501

71. Millward DJ, Garlick PJ, Nnaayelugo DO, Waterlow JC. 1976 The relative importance of muscle protein synthesis and breakdown in the regulation of muscle mass. *J Biochem* 156:185

72. Pain VM, Albertse EC, Garlick PJ. 1983 Protein metabolism in skeletal muscle, diaphragm and heart of diabetic rats. *Am J physiol* 245:E604

73. Camacho-Hubner C, Busby WH, McCusker RH, Wright G, Clemmons DR. 1992 Identification of the forms of insulin-like growth factor binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. *J Biol Chem* 267:11949-11956

74. Conover CA, Clarkson JT, Bale LK. 1995 Effect of glucocorticoid on insulin-like growth factor(IGF) regulation of IGF-binding protein expression in fibroblasts. *Endocrinology* 136:1403-1410

75. Cheryl A. Conover. 1990 Regulation of insulin-like growth factor(IGF)-binding protein synthesis by insulin and IGF-I in cultured bovine fibroblasts. *Endocrinology* 126:3139-3145

76. Lewis BM, Dieguez C, Inglesias R, et al. 1987 Effect of glucose on SS and TRH release in hypothalamus. J Endocrinol Invest 10: (Suppl 3) 31

77. Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M and Binoux M. 1990 Evidence of enzymatic degradation of

insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complexduring pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 71:797-805

78. Hossenlopp P, Bredon M, Frankenne F & Binoux M.1998 IGF circulants et grossess:Destabilisationdes complexes 150K par inactivation enzymatique des proteines de liaison(abstract). *Ann Endocrinol(paris)* 49:18C
79. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G & Rosenfeld RG. 1990 Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium:Effect of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 71:806-816
80. Davenport ML, Clemmons DR, Miles MV, Camacho-Hubner D'Ercole AJ & Underwood LE. 1990 Regulation of serum insulin-like growth factor-I(IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocrinology* 127:1278-1286
81. Davies SC, Wass JA, Ross RJ, Cotterill AM, Buchanan CR, Coulson VJ & Holly JM. 1991 The induction of a specific proteinase for insulin-like growth factor binding protein-3 in the circulation during severe illness. *J Endocrinol* 130:469-473
82. Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, Beaty Pemberton L, Lyman B, Underwood LE & Clemmons DR. 1992 Insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis is induced following elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 75:590-595
83. Hanaire-Broutin H, Sallerin-Caute B, Poncet MF, Tauber M, Bastide R, Chale JJ, Rosenfeld R, Tauber JP. 1996 Effect of intraperitioneal insulin delivery on growth hormone binding protein, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding protein-3 in IDDM. *Diabetologia* 39:1498-1504

84. Blum WF, Ranke MB, Kietzmann K, Ganggel E, Zeisel HJ & Bierich JR. 1990 A specific radioimmunoassay for the growth hormone(GH)-dependent somatomedin-binding protein : its use for diagnosis of GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1292-1298

85. Clemmons DR, Thissen JP, Maes M, Ketelslegers JM & Underwood LE. 1989 Insulin-like growth factor-I(IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum. *Endocrinology* 125:2967-2972

86. Spoerri PE, Ellis EA, Tarnuzzer RW, Grant MB. 1998 Insulin-like growth factor: receptor and ginding proteins in human retinal endothelial cell cultures of diabetic and non-diabetic origin. *Growth Horm IGF Res* 8:125-132

87. Clemmons DR. 1998 Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140:19-24

88. Duan, C., Hawes, S., Prevette, T., Clemmons, D.R. 1996 Insulin-like growth factor-I(IGF-I) stimulates IGF binding protein-5 synthesis through transcriptional activation of the gene in aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem* 271:4280-4288

89. Conover, C.A., Bale, L.K., Clarkson, J.T., Torrig, O. 1993 Regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 messenger ribonucleic acid expression and protein availability in rat osteoblasts. *Endocrinology* 132:2525-2530

90. Price GJ, Berka JL, Werther GA, Bach LA. 1997 Cell-specific regulation of mRNAs for IGF-I and IGF bibding proteins-4 and -5 in streptozotocin-diabetic rat kidney. *J Mol*

Endocrinol 18:5-14

91. NAM TJ, Walker H, Busby, JR and Clemmons DR. 1994 Human fibroblasts secrete a serine protease that Cleaves insulin-like growth factor-binding protein-5. Endocrinology 135:1385-1391

92. Nam TJ, Busby WH, Clemmons DR. 1996 Characterization and determination of the relative abundance of two types of insulin-like growth factor binding protein-5 proteases that are secreted by human fibroblasts. *Endocrinology* 137:5530-5536

93. Lee HJ. 1997 **인슐린비의존형 당뇨병 환자의 혈청내** insulin-like growth factor binding proteins(IGFBPs)**의 분포 및** IGFBP-3**의 분해**. p27