

넙치 (*Parlichthys olivaceus*) 혈액중 Insulin-like growth factor-I 의 함유수준

남택정 · 박기영* · 이영돈** · 김용억***
부산수산대학교 식품생명과학과 · *강릉대학교 수산자원개발학과
제주대학교 해양연구소 · *부산수산대학교 해양생물학과

Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor-I in Flounder, *Parlichthys olivaceus*

Taek-Jeong NAM, Kie-Young PARK*, Young-Don LEE** and Yong-Uk KIM***

Department of Food and Life Science, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*Department of Fisheries Resources Development, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

**Marine Research Institute, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

***Department of Marine Biology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

Insulin-like growth factor-I (IGF-I) is a mitogenic peptide with molecular mass of 7kDa. It is produced mainly in the liver and has important functions in the regulation of development and somatic growth. Recently, several investigations were undertaken to examine the biological actions and structures of IGF-I in fish. In this study, the serum levels of IGF-I were estimated from flounder, *Parlichthys olivaceus*, before, during and after fasting, and the levels were accounted for 47 ng/ml, 40 ng/ml and 45 ng/ml, respectively. These results suggest that food deprivation primarily reduces IGF-I level in the blood.

Key words : insulin-like growth factor-I, flounder, *Parlichthys olivaceus*,

서 론

Insulin-like growth factors (IGFs, IGF-I과 IGF-II)는 70개의 아미노산을 가지는 polypeptides로서 proinsulin과 구조적으로 비슷하다 (Morell and Froesch, 1973; Rinderknecht and Humbel, 1976, 1978). IGFs는 포유류 또는 척추동물에서 growth hormone의 매개로 생성되어 동물의 성장, 발달에 중요한 역할을 하고 있으며, 세포의 성장, 분화, 대사에 다양한 효과를 보여주고 있다 (Froesch and Zapf, 1985; Clemmons, 1993). IGFs는 혈액중에서 결합단백질 (binding proteins, IGFBPs)과 결합하여 존재하며, IGFBPs의 종류와 기

원에 따라 그 생물학적 기능도 다르다 (Cohick and Clemmons, 1993; Jones and Clemmons, 1995).

동물의 성장에 중요한 역할을 맡고 있는 IGFs가 어류에서도 어느 정도 생물학적 기능을 발휘하고 있는가에 관하여 많은 연구자들이 관심을 가지고 있으나, 어종별 IGFs의 분리 정제가 되어 있지 않은 현 상태에서는 연구의 어려움도 뒤따르고 있다.

일반적으로 사람의 IGF-I을 이용한 RIA측정 방법은 IGF의 항체가 갖는 동물상호간의 면역적각, 즉 IGF구성 아미노산의 구조적 유사성에 의한 반응에서 얻어진 결과이므로 정확한 양적 평가에는 많은 문제점을 갖고 있다. 따라서 Furlanetto et al. (1977)이 최초로

본 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비(해양수산과학분야)에 의해 연구되었음

대서양 전갱이, 그리고 Wilson and Hintz (1982) 또한 이너 척추동물들의 혈청중 IGF양을 확인하였으나 검출하기가 어려웠다. 그러나 Daughaday et al. (1985)은 여러 종류의 척추동물에서 acid gel filtration과 isoelectric focusing 전처리 후, RIA방법으로 IGF-I의 존재를 확인한 결과 무지개 송어에서 9 ng/ml의 농도를 확인하였다. 그 이후 Funkenstein et al. (1989)에 의하여 도미의 혈청에서 일정 수준의 IGF-I검출이 가능하였다. 이와 같이 연구 초기 RIA 방법에 의한 IGF-I의 측정이 어려웠던 것은 혈액중에서 결합하고 있는 IGF-BPs과 면역학적 반응에 의해 방해요인으로 작용한 것이 그 원인으로 추정되고 있다. 최근에는 recombinant coho salmon IGF-I을 정제하여 anti-serum을 만들었고 (Moriyama et al., 1994), 대서양산 먹장어의 recombinant IGF-I을 대장균으로 부터 생산하게 되었으므로 (Upton et al., 1994) 어류 혈액중 IGF-I의 농도 측정은 곧 확립될 것이며, 그로 인한 IGFs가 가지는 성장 촉진작용에 대한 연구는 더욱 발전될 것으로 기대 된다. 본 연구는 우리나라 해산 양식어 중에서 가장 많이 생산되고 있는 넙치 (수산연감, 1993)를 실험어로 하여 IGF-I의 혈액중 존재량을 검토하였다. 즉, 수역성 있는 어종에 대한 IGF-I의 작용기구를 밝히는 연구의 기초자료를 얻고자 시도한 것이다.

재료 및 방법

실험어 및 사육방법 : 실험어는 넙치, *Parlichthys olivaceus*를 사용하였으며, 50마리의 넙치를 육상 유수조 (10톤)에 10일간 순치시킨 후 14일간 절식을 시켰다. 그리고 20일간 다시 재급이를 하여 먹이 섭취 유무에 의한 IGF-I의 변화를 보았다 (Fig. 1). 이때 사료는 생사료를 사용하였으며, 먹이는 매일 2회 급여하였다.

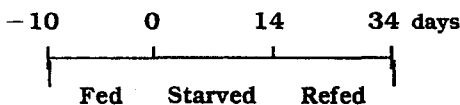


Fig. 1. Experimental design.

혈액채취 : 채취한 혈액은 원심분리 (3,000 rpm, 4°C)하여 얻은 혈청을 -80°C에 보관하면서 실험하였다.

Serum IGF-I의 분리 : 혈청 시료들은 Breier et al. (1990)의 방법에 따라 추출하였다. 혈장 100 μ l를 1:4의 비율로 acid-ethanol (87.5% ethanol과 12.5% 2N HCl, v/v)에 완전히 혼합시킨 후 실온에서 30분간 방치하였다. 그리고 4°C에서 원심분리 (3000 \times g, 20 min)하여 상층액을 취하여 0.855M Tris base나 0.2 N NaOH (v/v, 5:2)로 중화한 후, -20°C에서 1시간 방치하고 다시 4°C에서 20분간 원심분리 (3000 \times g, 20 min)하여 얻어진 상층액을 IGF-I분석용으로 사용하였다.

rsIGF-I의 요오드화 : Recombinant salmon IGF-I을 chloramine-T법 (Greenwood et al., 1963; Rand-Weaver and Kawachi, 1992)에 의해 요오드화시켰다. 즉, rsIGF-I을 pH 7.5인 0.5M sodium phosphate buffer (PB)에 용해시키고 1 μ g/10 μ l의 최종 농도로 만들었다. 요오드화는 5 μ l chloramine-T (80 μ g/ml in PB)와 ¹²⁵I-Na (0.5mCi/5 μ l, Amersham Corp., Chicago, IL) 5 μ l의 용액을 첨가함으로써 시작되었고, sodium metabisulfate (80 μ g/ml in PB) 5 μ l와 10mM PB 100 μ l의 첨가로 반응을 중단시켰다. 유리 요오드와 ¹²⁵I-labeled rsIGF-I의 분리는 Bio-Gel PGDG (Bio-Rad, Richmond, CA)의 칼럼 (1 \times 20 cm)을 이용하였다. 혼합용액은 140mM NaCl과 0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA; RIA급, Sigma)를 함유하는 pH 7.5의 20mM Sodium phosphate buffer로 gravity flow에 의해 용출시켰다. 각 획분 (0.5ml)은 polyethylene tubes로 모으고, ¹²⁵I-labeled rsIGF-I을 함유하는 획분들을 취하였다.

rsIGF-I의 항체조제 : Recombinant salmon IGF-I에 대한 항체는 토끼 (New Zealand, 2 kg정도의 무게)로부터 조제하였다. 항원 (15~20 μ g)을 증류수 50 μ l에 용해시켜, 0.9% NaCl로 1가로 희석한 후 complete Freund's adjuvant (1ml)로 유화하여 토끼에 3주 간격으로 6회 피하주사 하였다. 항-rsIGF-I 혈청 titers 측정을 위한 test bleeding은 세 번, 네 번, 다섯 번의

주사 후에 실시하고, 혈청은 사용될 때까지 -70°C 에 저장하였다.

IGF-I의 측정을 위한 RIA법: RIA assay buffer는 140mM NaCl, 1.0% BSA, 0.05% (v/v) Triton-X, 0.05% (w/v) sodium azide를 함유하는 pH 7.5의 20mM phosphate buffered saline(PBS)이다. Standards, test hormones, plasma의 최종 부피가 100 μl 되게 PBS buffer로 희석하였다. 1:10에서 1:20까지 희석된 standards (0.012~12.5ng/100ml)나 plasma samples은 polyethylene tubes (12 \times 75-mm)에 옮기고 항-rsIGF-I 혈청 (assay buffer로 1:5000으로 희석된 것) 100 μl 를 각 assay tube에 첨가하였다. 그리고 24시간 배양한 후, 각 tube는 이온화된 rsIGF-I 100 μl 를 얻고 (대략 6000~7000 cpm), 24시간 더 배양하였다. 항체와 결합된 호르몬 복합체들은 0.5% pansorbin (Calbiochem Behring Corp., La Jolla, CA; Goding, 1978; Yang et al., 1989) 100 μl 의 첨가로 free tracer로부터 분리시켰다. Pansorbin으로 24시간 배양 후 assay buffer (250 μl)를 각 tube에 첨가하였다. 그리고 원심분리 (3000 \times g, 20.min)하였으며, 모든 배양과 원심분리는 4°C 에서 수행하였다. 상층액은 aspirator로 흡입 제거시키고 침전된 pellet는 gamma counter로 측정하였다.

혈중 유리아미노산의 분석: 혈액을 150 μl 취하여 15% sulfosalysilic acid 100 μl 로 제단백한 후, 0.75N LiOH 50 μl 가하여 중화시키고 아미노산 자동분석기 (Hitachi 835)로 분석하였다.

통계처리: 실험결과를 ANOVA-test를 실시하여 Duncan's multiple range test (Snedecor and Cochran, 1967)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

IGF-I의 함량과 측정방법: 넙치의 혈액중에 존재하는 IGF-I 함량은 평균체중 560.7 \pm 15.5 g (n=10)에서 47 ng/ml로 나타났다 (Fig. 3). 연어과의 어류에서 측정하여 보고된 (Moriyama et al., 1994) IGF-I의 혈액 중 함량은 약 45 ng/ml로 본 연구결과의 넙치의

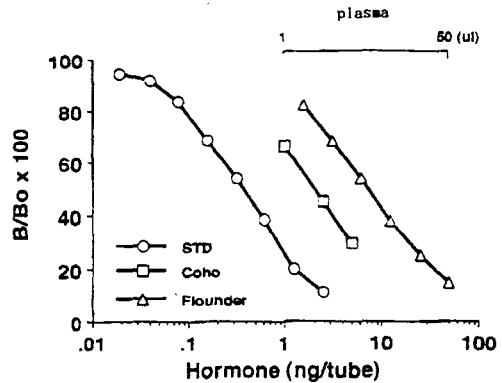


Fig. 2. Binding inhibition curves for recombinant coho salmon IGF-I standards and serial dilutions of serum samples from coho salmon (□) and flounder (△). Each point represents the mean of duplicate determinations.

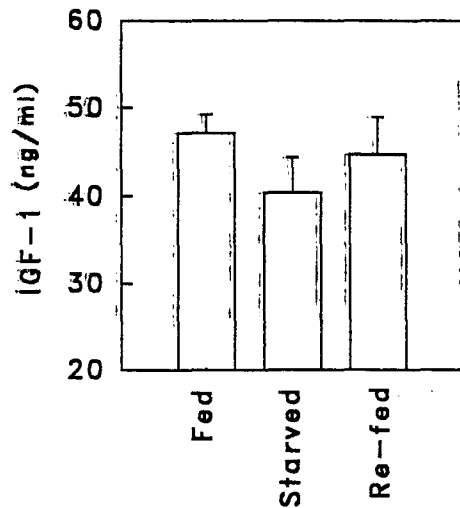


Fig. 3. Effects of starvation and refeeding on serum insulin-like growth factor-I levels in flounder. Values are mean \pm SEM (n=5-10).

IGF-I 혈액중 함량과 비슷하다. 넙치 중의 IGF-I함량 측정은 넙치의 IGF-I를 분리 정제하여 표준품으로 하여 만든 RIA (Radioimmunoassay)법으로 측정한 것이 아니고 recombinant salmon IGF-I를 표준품으로 하여 만든 RIA법으로 분석한 것이다. 즉 homologous piscine IGF-I RIA법을 이용한 것이다. Fig. 2에서 볼수 있듯이 RIA표준곡선에서 넙치의 혈액을 1.56 μl , 3.125 μl , 6.25 μl , 12.5 μl , 25 μl , 50 μl 씩 취하여 recombinant

Table 1. Free amino acid composition in serum from flounder

(Unit : nmol/ml)

Amino Acid	Condition of status		
	Fed	Starved	Re-fed
Tau	1.782 ± 0.172	1.808 ± 0.270	6.274 ± 1.458
Asp	1.124 ± 0.174	1.222 ± 0.189	2.354 ± 0.358
Thr	5.769 ± 1.494	5.370 ± 1.059	6.573 ± 1.174
Ser	3.311 ± 0.838	3.270 ± 0.666	5.114 ± 0.602
Glu	1.641 ± 0.336	1.465 ± 0.235	2.701 ± 0.304
Pro	0.370 ± 0.073	0.267 ± 0.047	0.301 ± 0.042
Gly	1.567 ± 0.294	0.993 ± 0.295	2.264 ± 0.312
Ala	3.727 ± 0.839	4.138 ± 0.778	7.243 ± 0.723
Cys	0.339 ± 0.038	0.245 ± 0.041	0.293 ± 0.011
Val	3.267 ± 0.907	2.422 ± 0.746	5.136 ± 0.580
Met	2.228 ± 0.854	2.156 ± 0.450	2.538 ± 0.222
Ile	1.323 ± 0.454	1.188 ± 0.224	1.909 ± 0.263
Leu	5.617 ± 1.806	5.594 ± 1.190	7.732 ± 0.767
Tyr	4.527 ± 1.642	3.704 ± 0.679	3.731 ± 0.187
Phe	3.728 ± 0.942	2.909 ± 0.407	3.299 ± 0.257
Lys	6.100 ± 1.562	6.246 ± 0.981	6.754 ± 0.523
His	1.211 ± 0.337	1.113 ± 0.146	1.366 ± 0.109
Arg	4.134 ± 0.720	3.776 ± 0.503	4.116 ± 0.310

Values are mean ± SE (n=5-10).

salmon IGF-I의 표준품의 표준 곡선과 비교하면 양적으로 많이 나타나고 있다. 이것은 연어의 IGF-I보다 감도가 높은 것인지 아니면 실제로 IGF-I의 혈액중 함량이 많은 때문인지에 대해서는 앞으로 더 검토해야 할 과제이다. 한편 heterologous (mammalian) IGF-I RIA 법으로 어류의 IGF-I의 혈액중 농도를 측정 (Daughaday et al., 1985; Drakenberg et al., 1989; Funkenstein et al., 1989; Bautista et al., 1990; Anderson et al., 1993; Niu et al., 1993)을 시도하였으나 homologous RIA법에 의해 구한 값과 비교하면 약 100배 정도 적게 측정되었다 (Moriyama, 1994). 그렇지만 다수의 포유류종에 존재하는 IGF-I을 측정하기 위해 heterologous mammalian RIA법이 사용되고 있다. 예를 들면 rat의 혈청에 존재하는 IGF-I을 사람 IGF-I RIA를 사용하여 검출하였다 (Furlanetto et al., 1977). 그것은 rat IGF-I과 사람 IGF-I과는 단지 세계의 아미노산이 구조적으로 달랐기 때문이다. 따라서 어류의

혈액중 IGF-I의 양적 측정은 가능하면 포유류 IGF-I의 RIA법을 피하는 것이 바람직하다고 본다.

식이 섭취유무에 의한 영향 : Fig. 3에 나타난 바와 같이 15일간 절식을 시키고 다시 20일간 재급이를 하였을 때 넙치 혈액중 IGF-I의 함량 변화를 보면 40.4 ng/ml에서 44.7 ng/ml로 절식때 감소되어 간 IGF-I의 혈액중 함량이 재급이에 의해 약간 회복되고 있음을 알 수 있다. 이것은 Moriyama et al. (1994)이 보고한 내용과 일치하는 경향을 보이고 있지만, 본 연구에서는 식이에 대한 엄격한 관리가 더 필요해야 될 것으로 생각된다. 즉 혈액 중의 IGF-I은 단백질 영양에 크게 영향을 받고 있으므로 (Nam et al., 1990) 이에 대한 실험 계획이 별도로 필요한 것이다. 한편, 혈액중의 유리아미노산을 측정하여 혈액중에 존재하는 lysine이 IGF-I의 혈액중 존재량에 영향을 미칠 것인가를 보기위해 분석한 결과 (Table 1), 식이 섭취유무

에 관계없이 혈액중의 양은 비슷하였다. 이것은 혈액 중의 존재량 보다 섭취하는 단백질 중의 lysine 양이 더 영향이 큼을 추정할수 있다.

크기에 의한 영향 : IGF-I의 혈액중 함량은 포유류에서는 나이에 의존하여 변화하는 것으로 알려져 있다. 동물의 성장이 성장호르몬 의존성일 때 혈액중 IGF-I의 함량은 증가한다 (Sara and Hall, 1990). 본 연구에서는 넙치의 크기를 달리하여 두 군으로 나눠 혈액중 IGF-I의 함량을 측정된 결과 체중 299.2 ± 48.0 g에서 33.8 ng/ml이고 체중 560.7 ± 15.5 g에서는 47.1 ng/ml의 함량을 보였다 (Fig. 4). 이것은 동물의 성장인자로 알려진 IGF-I이 넙치에서도 성장에 관여하고 있을 것이라는 것을 의미한다. 이 결과는 두 군간 체중차이에서 함량차이를 보여주고 있을 뿐 어류의 성장 단계별로 IGF-I의 함량 변화를 검토한 것은 아니다. 그러므로 어류의 life cycle 동안 혈액 중 IGF-I 함량 변화를 검토하는 연구가 더 요구된다.

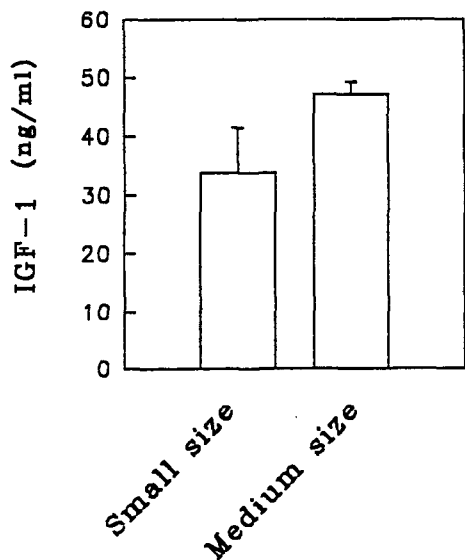


Fig. 4. Effect of growth stage on serum insulin-like growth factor-I levels in flounder. Values are mean \pm SEM (n=5-10). Small size; 299.2 ± 48.0 g (n=10). Medium size; 580.7 ± 15.5 g (n=10).

운동에 의한 영향 : Fig. 5에서 알수있는바와 같이 넙치를 강제로 운동시킨 후 혈액중 IGF-I의 함량을

검토한 결과 운동을 하지 않은 것에 비해 약 13% 감소함을 알수 있다. 이것은 운동에 의한 혈중 당농도가 감소하면서 insulin의 함량도 서서히 감소할것으로 예상되며 이로 인한 IGF-I의 함량도 약간 감소한것으로 추정된다.

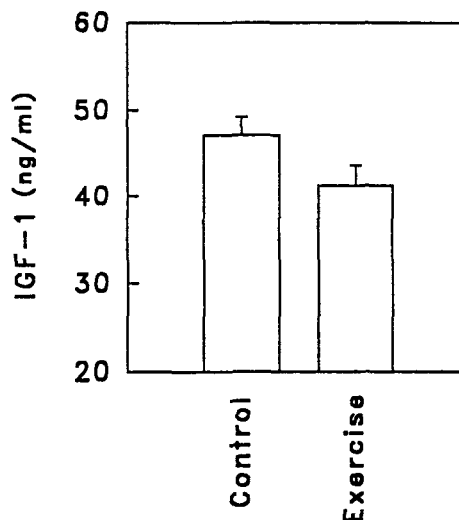


Fig. 5. Effect of exercise on serum IGF-I level in flounder. Values are mean \pm SEM (n=5-10).

요 약

양식 넙치, *Paralichthys olivaceus*를 실험어로 하여 동물 성장인자중의 하나인 insulin-like growth factor-I (IGF-I)의 함량을 검토하였다. 넙치의 혈액중에 존재하는 IGF-I의 양은 47 ng/ml이고, 절식을 할 경우 식이를 섭취한 것에 비해 약 15% 감소하였으며, 운동에 의해서는 약 13%의 감소를 보였다. 혈액중 IGF-I의 농도는 어체의 크기에 따라서도 영향이 있음을 알수 있었다.

謝 辭

혈액중의 IGF-I 측정에 도움을 주신 일본 양식연구소 S. Moriyama박사께 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Anderson, T.A., L.R. Bennette, M.A. Conlon and P.C. Owens. 1993. Immunoreactive and IGF-binding protein in blood plasma from the freshwater fish *Macqaria ambigua* (golden perch). *J.Endocrinol.* 136, 191~198.
- Bautista, C.M., S. Mohan and D.J. Baylink. 1990. Insulin-like growth factor-I and II are present in the skeletal tissues of ten vertebrates. *Metab. Clin. Exp.* 39, 6~100
- Breier, B.H., B.W. Gallaher and P.D. Gluck. 1990. Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I: Solutions to some potential problems and pitfall. *J. Endocrinol.* 128, 347~357.
- Clemmons, D.R. 1993. IGF binding proteins and their functions. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 368~375.
- Cohick, W.S. and D.R. Clemmons. 1993. The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 131~153.
- Daughaday, W.H., M. Kapadia, C.E. Tanow, K. Fabrick and I.K. Mariz. 1985. Insulin-like growth factor-I and II of nonmammalian sera, *Gen. Endocrinol.* 59, 316~325.
- Delahunty, G., C. Jedrick and A. Jedlicka. 1993. Insulin-like growth factor-I and Insulin-like growth factor binding protein in the channel fish, *Ictalurus punctatus*. Abstracts, II Int. Symp. Fish Endocrinol. (St. Malo), p.L-58.
- Drakenberg, K., V.R. Sara, S. Falkmer, S. Gammeltoft and C. Maake. 1993. Identification of IGF- I receptors in primitive vertebrates. *Regul. Peptides*, 43, 73~81.
- Drakenberg, K., V.R. Sara, K.I. Lindahl and B. Kewish. 1989. The study of insulin-like growth factors in tilipia. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 74, 173~180.
- The Fisheries Association of Korea. 1993. Korean fisheries yearbook, Dongyang Moonhua Inshai Co. Ltd., Seoul, Korea, pp 216.
- Froesch, E.R. and J. Zapf. 1985. Insulin-like growth factor and insulin: comparative aspects. *Diabetologia.* 28, 485~493.
- Funkenstein, B., A. Silbergeld, B. Cavari and Z. Laron. 1989. Growth hormone increase plasma level of insulin-like growth factor(IGF-I) in a teleost, the gilthead bream, *J. Endocrinol.* 120, R19~R21.
- Furlanetto, R.W., L. Underwood, J.J. Van Wyk and D'Ercole. 1977. Estimation of Somatomedin-C level in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.* 60, 648~657.
- Goding, J. W. 1978. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *J. Immunol. Methods* 20, 241~253.
- Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.F. Glover. 1963. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89, 114~123.
- Jones, J.I. and D.R. Clemmons. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions, *Endocrine Reviews* 16, 3~34.
- Morell, B. and E.R. Froesch. 1973. Fibroblasts as an experimental tool in metabolic and hormone studies. I. Growth and glucose metabolism of fibroblasts in culture. *Eur. J. Clin. Invest.* 3, 119~123.
- Moriyama, S., P. Swanson, M. Nishii, A. Takahashi, H. Kawauchi, W.W. Dickhoff and E.M. Plisetskaya. 1994. Development of a homologous radioimmunoassay for coho salmon insulin-like growth factor-I, *General and Comp. Endocrinol.* 96, 149~161.
- Nam, T.J., T. Noguchi, R. Funabiki, H. Kato, Y. Miura and H. Naito. 1990. Correlation between the urinary excretion of acid-soluble peptides, fractional synthesis rate of whole body proteins, and plasma immunoreactive insulin-like growth factor-I/somatomedin C concentration in the rat, *British J. of Nutrition* 63, 515~520.
- Niu, P.D. and P.Y. Bail. 1993. Presence of insulin-

- like growth factor binding protein (IGFBP) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) serum. *J. Exp. Zool.* 265, 627~636.
- Rand-Weaver, M. and H. Kawauchi. 1992. A rapid procedure for the isolation of bioactive growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 436~442.
- Rinderknecht, E. and R.E. Humbel. 1976. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities.: Evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 4379~4381.
- Rinderknecht, E. and R.E. Humbel. 1978. Primary structure of insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* 89, 283~286.
- Rinderknecht, E. and R.E. Humbel. 1978. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253, 2769~2776.
- Sara, V.R. and K. Hall. 1990. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol. Rev.* 70, 591~614.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. One-way classification. Analysis of variance. In *Statistical Methods*, 6th ed, Ames, Iowa State Univ. Press. pp. 271~273.
- Upton, Z., S.J. Chan, D.F. Steiner, G.L. Francis and F. J. Ballard. 1994. Recombinant hagfish IGF exhibits both IGF-I and IGF-II-like characteristic. *Growth Regul.* 4, 41.
- Wilson, D.M. and R.L. Hintz. 1982. Inter-species comparison of somatomedin structure using immunological probes. *J. Endocrinol.* 95, 59~64.
- Yang, Y.W.H., J.F. Wang, C.C. Orłowski, S.P. Nissley and M.M. Rechler. 1989. Structure, specificity, and regulation of the insulin-like growth factor-binding proteins in adult rat serum. *Endocrinology* 125, 1540~1555.

1995년 11월 24일 접수
1996년 2월 10일 수리