

Insulin-like growth factor-I (IGF-I)이 조피볼락의 체중 및 혈액중 IGF binding proteins에 미치는 영향

남택정 · 이상민* · 변재형
부경대학교 식품생명과학과, *강릉대학교 해양생명공학부

Effects of Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) on Body Weight and the Cocentration of Serum IGF Binding Proteins in Korean Rockfish (*Sebastes schlegeli*)

Taek-Jeong NAM, Sang-Min LEE* and Jae-Hyeung PYEUN

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

*Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

The effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on circulating insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in the Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*, was assessed after injected of recombinant human IGF-I (6 µg/100 g body weight). Growth and metabolic status of each fish were assessed by determining body length and body weight changes, and serum glucose concentration. Serum IGF binding proteins concentrations were assessed by the Western ligand blot procedure using ¹²⁵I-labeled human IGF-I tracer. The fish received IGF-I were heavier than the saline-injected control fish after 2 weeks of treatment. Plasma IGFBP-3 concentration increased, but plasma IGFBP-1 and glucose levels decreased significantly after administration. Taken together, the findings of this study suggest that human IGF-I is biologically active in Korean rockfish and may be of significance in metabolic and growth-related processes.

Key words: insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, rockfish (*Sebastes schlegeli*)

서 론

Insulin-like growth factors (IGFs, IGF-I과 IGF-II)는 70개의 아미노산을 가진 폴리펩타이드로 동물의 성장과 발육에 중요하다 (Cohich and Clemmons, 1993; Baker et al., 1993). IGFs는 주로 간에서 분비되며, 다른 기관에서도 양적으로 적지만 분비되고 있다. 또 IGFs는 혈액 내에서는 IGF binding proteins (IGFBPs)과 결합하여 존재하고 있으며, IGFBPs의 종류와 생물학적인 기능은 기원에 따라 다르다 (Johns and Clemmons, 1995). IGF-BPs는 현재까지 6종류가 보고되고 있으며, 주된 역할은 IGFs의 half-life를 연장시키고, IGFs를 표적세포까지 운반하는 작용을 맡고 있다 (Baxter, 1993; Rechler, 1993). IGFs의 생물학적 작용을 검토하기 위해서는 IGFBPs의 작용도 함께 검토하는 것이 바람직하며, 특히 살아있는 동물을 이용하는 연구에서는 IGFBPs의 분포를 분석하여 IGFs의 작용과 함께 IGFBPs의 역할을 검토하는 것이 필요하다.

따라서 현재까지 어류에 IGF-I를 직접 체내에 투여

하여 IGF-I의 작용을 검토한 것으로는 혈액중 glucose의 농도저하와 함께 체장 및 체중이 증가하였다는 보고 (McCormick, 1992)는 있지만, IGF-I이 혈액중에 존재하는 IGFBPs에 미치는 영향에 대한 보고는 거의 없다. IGFBPs이 가지는 생리적 중요성에 비추어 볼 때, 이와 같은 연구가 필요하므로 조피볼락에 IGF-I을 투여하여 체중 및 혈액중 IGFBPs의 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

실험어 및 사육방법

실험어인 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)은 20~30 g 정도의 크기의 것을 구입하여 2 ton FRP수조에서 어분 50%를 함유한 moist pellet으로 순치시켰다. 실험수조는 300 ℓ원형 FRP수조에 40마리씩 2개 수조를 사용하여 1개월간 사육하였다. 그리고 14일간 절식시키면서 recombinant human IGF-I (rhIGF-I, 일본 후지자와제약회사 제공)을 2일 마다 6 µg/100 g 체중 농도로 투여하였다. 절

식 직전 실험어의 평균체중은 47 g 정도였으며, 사육에 사용된 해수는 고압모래 여과장치로 여과시켜 각 실험수조마다 10 l/min씩 유수시켰다.

Blood glucose 측정

GL ZYME "Eiken" Enzymatic GOD-POD법 (Bergmeyer, H. U. and Bernt E., 1974) 에 준하여 실시하였다. standard는 glucose표준액 (포도당 400 mg/dl) 10 µl, 검체에는 혈청 10 µl를 tube에 취하고 효소시약 1.5 ml를 각 tube마다 취한 다음 vortex하여 37°C water bath에서 15 분간 incubation시켰다. 60분 이내에 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하여 (Ultrospec 2000, Pharmacia) 혈당값을 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{Glucose (mg/dl)} = (\text{검체의 흡광도} / \text{표준액의 흡광도}) \times 400^*$$

*표준액의 농도

IGF-I의 요오드화

rhIGF-I은 chloramine-T법 (Greenwood et al, 1963 ; Rand-Weaver et al, 1992)을 변형하여 요오드화시켰다. 즉, rhIGF-I을 pH 7.5인 0.5 M sodium phosphate buffer (PB)에 용해시키고 1 µl/10 µl의 최종 농도로 만든다. 요오드화는 5 µl chloramine-T (80 µg/ml in PB)와 ¹²⁵I-Na (0.5 mCi/5 µl, Amersham Corp., Chicago, IL, USA) 5 µl의 용액을 첨가한 후 Sodium metabisulfate (80 µg/ml in PB) 5 µl와 10 mM PB 100 µl의 첨가로 반응을 중단시켰다. 유리 요오드와 ¹²⁵I-labeled rhIGF-I의 분리는 Sephadex 75~120의 칼럼 (1×20 cm)을 이용하였다. 혼합 용액은 140 mM NaCl과 0.2% (w/v) bovine serum albumin (BSA ; RIA급, Sigma)를 함유하는 pH 7.5의 20 mM Sodium phosphate buffer로 gravity flow에 의해 용출시켰다. 각 획분 (0.5 ml)은 polyethylene tubes로 모으고, ¹²⁵I-labeled rhIGF-I을 함유하는 획분들을 합한 다음, 50% glycerol과 혼합한 후 -20°C에 사용할 때까지 저장하였다.

Western-ligand blot analysis

혈액중에 존재하는 IGF-BPs를 분석하기 위해 Hosselopp의 방법 (1986)을 이용하였다. 즉 혈장 약 2 µl 취하여 전기영동용 sample buffer (Laemmli, 1970)에 혼합한 후 12.5% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동하였다. 전기영동 후 분리된 단백질을 Immobilon filter (Millipore Corp., MA, U.S.A.)로 semidry electroblotter를 이용하여 옮겼다. 이때 표준 분자량은 Rainbow marker (Amersham, U.K.)를 이용하였다. Membrane을 건조

한 후 ¹²⁵I-IGF-I (500,000 cpm)로 incubation (저온실, overnight)시킨 후, ligand blot buffer (LBB, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5 mg/ml Na azide; pH 7.4)와 LBB + 0.1% Tween 20으로 세척하여 건조시켰다. 건조된 membrane을 autoradiography로 IGF binding proteins의 bands을 확인하였다.

¹²⁵I-IGF-I과 혈액중 IGF-BPs과의 Cross-linking

¹²⁵I-IGF-I (100,000 cpm)을 혈청 20 µl와 혼합하여 4°C에서 16시간 incubation시킨 후 1% disuccimydyl substrate (DSS) solution을 첨가하여 상온에서 30분 incubation하였다. 이 혼합물을 12.5% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하였다. 그리고 gel-dryer로 건조시킨 후 autoradiography로 gel의 radioactivity를 측정하였다.

결과 및 고찰

IGF-I의 투여에 의한 체중변화

조피볼락을 30일간 예비사육한 후 14일간 절식시키면서 recombinant human IGF-I을 투여한 실험군과 생리식염수만 투여한 대조군의 체중변화를 비교한 결과, 대조군에서는 체중의 감소현상이 뚜렷하게 일어나고 있지만, IGF-I을 투여한 실험군에서 미미하지만 체중증가현상을 보였다 (Table 1). 이것은 IGF-I이 동물의 체내에서 동화작용을 촉진시키든가 아니면 체내 구성성분들의 분해를 어느 정도 억제시키고 있음을 나타내고 있다. 절식을 시키는 조건에서 체중의 감소가 없는 것은 실험어에 급이를 하면서 IGF-I을 투여하면 체중증가를 촉진시킬 것으로 생각된다. 본 실험에서 절식을 시킨 이유는 대조군과 조건을 거의 같이 만들기 위해 절식 조건을 택하였다. 포유류 척추 동물에서 뇌하수체 절제 또는 당뇨병을 유발시켜 성장을 거의 중단 시킨 조건하에서 흰쥐에 IGF-I을 투여하였을 때 성장을 촉진시켰다는 보고 (Skottner et al., 1987; Scheiwiller et al., 1986; Guler et al., 1989)와 정상상태의 흰쥐에 IGF-I을 투여한 결과에서

Table 1. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on the body weight of rockfish

	Body weight (g) ¹	
	Before treatment	After treatment
Control	47.0 ± 8.6	41.5 ± 5.9
rhIGF-I ²	47.9 ± 8.0	49.4 ± 6.8

¹ Each values represents mean and SD of 20 fish.

² Recombinant human insulin-like growth factor-I.

약 22%의 성장을 있다는 보고 (Hizuka et al., 1986)들과 함께 고찰할 때, 본 실험에서도 IGF-I은 실험어 체내에서 anabolic effects를 나타내는 것으로 생각된다.

IGF-I의 투여에 의한 혈액중 glucose의 변화

IGF-I은 insulin과 마찬가지로 체내에서 혈당저하작용을 가진다 (Skyrud et al., 1989). 본 연구에서도 생리식염수만 투여한 대조군의 혈액중 glucose농도는 56.6 mg/dl 이고 IGF-I을 투여한 실험군은 30.0 mg/dl로 약 46% 혈액중 glucose농도를 저하시키고 있음을 알 수 있다 (Table 2). 즉 IGF-I은 insulin과 같이 혈당저하작용 (hypoglycemia)을 가진다는 보고 (Guler et al., 1988)와 같은 결과를 나타내고 있다. 이러한 현상은 유리형의 IGF-I이 insulin receptor에 작용하여 insulin과 같은 역할을 담당할 것으로 추측된다 (Froesch & Zapf, 1985). 그리고 포유류에서도 투여된 IGF-I에 의해 체중증가와 함께 혈액중의 glucose를 감소시키는 효과가 있다고 보고되고 있다 (Zapf et al., 1986, McCormick et al., 1992, Lewitt et al., 1993).

IGF-I의 투여에 의한 혈액중 IGF-BPs에 미치는 영향

혈액중에 존재하는 IGF-BPs는 40 K 부근의 IGFBP-3와 30 K의 IGFBP-2 그리고 24 K의 IGFBP-1이 검출되었으며, IGF-I의 투여에 의해 IGFBP-3는 증가하였으나 IGFBP-1은 감소하였다 (Fig 1, 2). IGF-BPs의 변화를 검토하기 위해 2가지 실험방법을 적용시켰는데, western ligand blots에서는 IGFBP-3가 2중밴드를 나타내어 IGF-I에 의해 양적으로 증가함을 알 수 있었다. 이것은 Kelley et al. (1992)의 연구보고와 같은 결과이며, 특히 IGFBP-3는 영양상태가 좋을 때나 GH (growth hormone) 및 IGF-I과 같은 호르몬 등에 의해 체내 생성량이 증가한다고 보고 되고 있다. 그리고 IGF-I이 혈액중에 존재할 때 IGF-BPs과 결합한 형태로 존재하는 것이 그의 대부분이며 그중에서도 IGFBP-3가 가장 많은 비율로

Table 2. Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on the concentration of plasma glucose of rockfish

	Plasma glucose (mg/dl) ¹
Control	56.6 ± 10.3
rhIGF-I ²	30.0 ± 7.3 ²

¹ Each values represents mean and SD of 20 fish.

² Significantly different from control group (p<0.05, Student's test).

³ Recombinant human insulin-like growth factor-I.

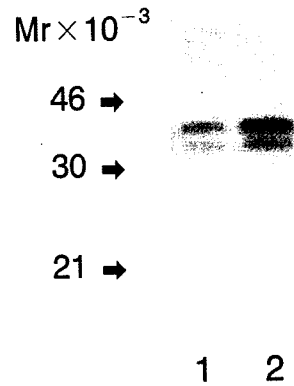


Fig. 1. Western ligand blots of insulin-like growth factor binding proteins in rockfish using ¹²⁵I-hIGF-I. Lane 1, saline-injected plasma ; lane 2, IGF-I-injected plasma. Arrows indicate location of molecular weight markers.

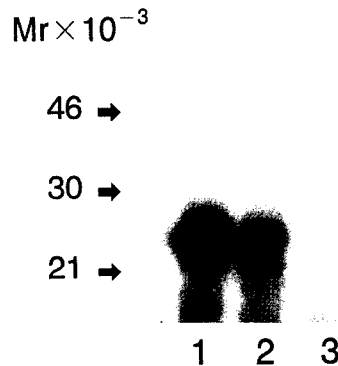


Fig. 2. Cross-linking analysis of plasma from rockfish using ¹²⁵I-IGF-I. Lane 1, saline-injected plasma ; lane 2, IGF-I-injected plasma ; lane 3, excess of cold hIGF-I. Arrows indicate location of molecular weight markers.

결합하고 있다. 따라서 본 연구의 결과에서 확인된 IGF-BP-3의 증가는 IGF-I의 투여에 의한 효과라는 것을 알 수 있었다. 그리고 ¹²⁵I-IGF-I을 이용한 cross-linking법의 실험 결과에서는 IGFBP-3의 증가현상이 희미하게 나타났으며, IGF-BPs의 밴드 또한 western ligand blots의 결과와 비교하였을 때 약하게 검출되고 있다. 이러한 차이는 실험방법의 차이에 의하여 IGF-BPs의 성질이 일부 변화되었거나 아니면 사람의 IGF-I을 사용하였기 때문에 친화성의 강도와도 관련이 있을 것으로 생각된다. 이러한 현상은 IGFBP-1과 IGFBP-2의 결과에서도 동일하게 나타나고 있다. IGFBP-1과 IGFBP-2에 대한 IGF-I의 작용은 혈액중 IGFBP-1과 IGFBP-2의 농도를 감소시키고 있음을 알 수 있다. 이 결과는 지금까지 insulin이나 IGF-

I을 작용시키면 IGFBP-1의 혈중농도가 감소현상을 보인다는 보고 (Bar et al., 1990)와 절식을 시킬 경우 증가한다는 보고와 일치하고 있다 (Tseng et al., 1992, Straus et al., 1993). 이상과 같은 결과에서 IGF-I은 포유류에서 가지는 생물학적 효과를 조피볼락에서도 나타내었으므로 앞으로 IGFBP를 분리 정제하여 IGF-I과 함께 어류 체내에서 작용하는 생물학적 효과를 보다 더 연구할 필요가 있다고 생각한다.

요 약

동물성장인자인 insulin-like growth factor-I (IGF-I)이 조피볼락의 성장 및 혈액중에 존재하는 IGF binding proteins (IGFBPs)에 미치는 영향을 검토하기 위하여 human recombinant IGF-I을 투여하여 분석한 결과, 절식중의 조피볼락 체중은 IGF-I투여군이 생리식염수만 투여한 대조군 보다 체중 증가효과가 있었으며, 혈액중 glucose농도는 IGF-I의 투여군이 혈당저하효과를 나타내었다. 그리고 혈액중 IGFBP-3는 IGF-I투여군에서 증가하였으며, IGFBP-1은 감소하였다.

참 고 문 헌

Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson and A. Efstratiadis. 1993. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75, 73~82.

Bar, R. S., M. Boes and D. R. Clemmons. 1990. Insulin differentially alters transcapillary movements of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2, and endothelial cell IGF binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 127, 497~499.

Baxter, R. C. 1993. Circulating binding proteins for the insulin-like growth factors. *Trends Endocrinol. Metab.* 4, 91~96.

Bergmeyer, H. U. and E. Bernt, 1974. Determination with glucose oxidase and peroxidase. In "Methods of Enzymatic Analysis", (Bergmeyer, H.U) Vol. 3, PP 1205~1215, Academic press, New York and London.

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.

Cohick, W. S., and D. R. Clemmons. 1993. The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.*, 55, 131~153.

Froesch, E. R. and J. Zapf. 1985. Insulin-like growth factors and insulin: Comparative aspects. *Diabetologia*, 28, 485~493.

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.

Guler, H. P., J. Zapf, E. Scheiwiller and E. R. Froesch. 1988. Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4889~4893.

Guler, H. P., J. Zapf, K. Binz and E. R. Froesch. 1989. Growth promotion using recombinant insulin-like growth factor-I. In "Biotechnology in Growth Regulation" (R. B. Heap, C. G. Prosser, and G. E. Lamming, Eds.), pp. 119~122. Butterworths, Stoneham.

Hizuka, N., K. Takano, K. Shizume, K. Asakawa, M. Miyakawa, I. Tanaka and R. Horikawa. 1986. Insulin-like growth factor I stimulates growth in normal growing rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 125, 143~146.

Hossenlopp, P., D. Seurin, B. Segovia-Quinson, S. Hardouin and M. Binoux. 1986. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: Use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal. Biochem.*, 154, 138~143.

Kelley, K. M., K. Siharath and H. A. Bern. 1992. Identification of insulin-like growth factor-binding proteins in the circulation of four teleost fish species. *J. Exp. Zool.*, 263, 220~224.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680~685.

Lewitt, M. S., H. Saunders, G. J. Cooney and R. C. Baxter. 1993. Effect of human insulin-like growth factor-binding protein-1 on the half-life and action of administered insulin-like growth factor-I in rats. *J. Endocrinol.*, 136, 253~260.

McCormick, S. D., K. M. Kelley, G. Young, R. S. Nishioka and H. A. Bern. 1992. Stimulation of coho salmon growth by insulin-like growth factor I. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 86, 398~406.

Rand-Weaver, M. and H. Kawauchi. 1992. A rapid procedure for the isolation of bioactive growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 58, 436~442.

Scheiwiller, E., H. P. Guler, J. Merryweather, C. Scandella, W. Maerki, J. Zapf and E. R. Froesch. 1986. Growth restoration of insulin-deficient diabetic rats by recombinant human insulin-like growth factor I. *Nature*, 323, 169~174.

Skyrud, T., O. Anderson, P. Alestrom and K. M. Gautvik. 1989. Effects of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I on body growth and blood metabolites in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 75, 247~255.

Straus, D. S., E. J. Burke and N. W. Marten. 1993. Induction

- of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology*, 132, 1090~1100.
- Tseng, L. Y.-H., G. T. Ooi, A. L. Brown, S. S. Straus and M. M. Rechler. 1992. Transcription of insulin-like growth factor-binding protein-2 gene is increased in neonatal and fasted adult rat liver. *Mol. Endocrinol.*, 6, 1195~1201.
- Rechler, M. M. 1993. Insulin-like growth factor binding proteins. In "Vitamins and Hormones" (G.D. Aurbach and D.B. McCormick, Eds.) Vol. 47, pp 1~114, Academic Press, New York.
- Zapf, J., M. Hauri, C. Waldvogel and E. R. Froesch. 1986. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factor I and II in normal and hypophysectomized rats, *J. Clin. Invest.*, 77, 1768~1775.

1998년 8월 15일 접수

1998년 9월 16일 수리