

백서 간 관류모델에서 forskolin이 Insulin like growth factor-I의 분비에 미치는 효과

강창원 · 이대열* · 이호일

전북대학교 생체안전성연구소
전북대학교 의과대학 소아과학교실*
(1999년 2월 8일 접수)

Effects of forskolin on secretion of insulin like growth factor-I in the perfused rat liver model

Chang-won Kang, Dae-yeol Lee*, Ho-il Lee

*Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University
Department of Pediatrics, Chonbuk National University Medical School, Chonju, Korea**
(Received Feb 8, 1999)

Abstract : The insulin-like growth factor-I(IGF-I) is an important metabolic factor involved in cell growth and metabolism. Although secretion of IGF-I in rat liver is regulated by growth hormone, the effects of forskolin, adenylate cyclase activator, on secretion of IGF-I have not been reported. Therefore, a modified perfused rat liver model was used to investigate the regulatory effects of forskolin on IGF-I secretion in this experiment. The results were summarized as follows :

1. Modified perfused rat liver model was not changed to aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) and lactic dehydrogenase(LDH) secretion in time.
2. The IGF-I secretion in hepatic cell was increased by forskolin(10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} M) in a dose-dependent manner as compared with those of the controls, and significantly increased by 10^{-5} and 10^{-6} M forskolin($p < 0.05$).
3. Secretion of glucose in hepatic cell significantly was decreased by 10^{-5} M forskolin as compared with those of controls($p < 0.05$).

These results suggest that forskolin may be involved in the regulation of IGF-I secretion in the perfused rat liver.

Key words : IGF-I, forskolin, liver, cAMP.

본 연구는 전북대학교 생체안전성연구소의 일부 지원을 받아 수행되었음(CNU-BSRI, NO 99-4).
Address reprint requests to Dr. Chang-won Kang, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Republic of Korea.(Tel : 82-652-270-3715)

서 론

Insulin-like growth factor-I(IGF-I)은 중요한 분열원질성 작용과 대사성 작용^{1,2}이 있는 호르몬으로서 sulphate factor에 의해서 IGF-I 분비가 조절된다고 최초로 보고되었다³. 그후 IGF-I은 세포내 glucose 섭취증가, glycolysis 증가 및 glycogen 합성을 자극하여 포도당대사, 지방대사, 단백질 합성 및 신장기능 등에 관여하는 것으로 알려져 있다⁴.

IGF-I의 구조는 insulin과 흡사한 아미노산 염기서열로 이루어져 있으며 분자량은 7,648 dalton이고 3개의 disulfated bond로 구성되어 있음이 밝혀졌다⁵.

포유동물류에 존재하는 IGF-I은 거의 모든 조직세포로부터 분비되지만 특히 간세포, 뼈모세포, 연골세포, 섬유모세포 및 내피세포 등에서 많이 분비된다^{6,7}. 이 중 간세포가 가장 많은 혈중 IGF-I의 합성 및 분비를 담당하고 있음이 간 관류모델을 통하여 밝혀졌으며⁸, 간세포로부터 분비된 혈중 IGF-I은 endocrine, autocrine 및 paracrine 경로를 통하여 표적장기에 작용하는 것으로 알려져 있다⁹.

혈중 IGF-I의 분비조절에 영향을 미칠수 있는 인자로 노화, 성장호르몬, 영양상태, estrogen, 당뇨병, 손상 및 종양 등¹⁰⁻¹²이 있을 뿐만 아니라 뇌하수체를 제거한 백서에서는 간세포의 IGF-I 분비를 감소됨을 보고¹³한 바 있어 뇌하수체가 혈중 IGF-I의 분비조절에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

이 등¹⁴은 간세포내 저Ca²⁺ 농도변화가 IGF-I와 glucose 분비를 억제하며 이러한 IGF-I의 분비억제는 세포 성장에 영향을 미칠수 있음을 보고하였다. 세포전달계에서 second messenger인 cyclic AMP 활성화는 백서 schwann 세포에서 IGF-I 분비를 증가시키며¹⁵, insulin과 부갑상선 호르몬 자극은 역시 IGF-I 분비를 증가시킨다^{16,17}. 또한 혈중 IGF-I의 증가는 간세포의 glucose 분비조절에 영향을 미치는 것으로 잘 알려져 있다⁴.

이러한 IGF-I의 작용과 분비조절인자에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으나 간 관류모델을 이용한 간 세포의 cAMP 분비경로에 대해서는 아직도 연구진전이 없는 상태이다.

따라서 이 연구는 간 관류모형에 adenylate cyclase를 활성화시키는 forskolin을 사용하여 간세포에서 IGF-I 분

비양상과 glucose 분비에 대한 cAMP의 효과를 관찰하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

간 관류모형 : 숫컷의 백서(Sprague-Dawley, 250~300g)를 마취시키기 20분전에 우선 복강에 500 IU heparin을 주사하고 pentobarbital sodium(50mg/ml) 0.2ml로 마취시킨 다음 신속하게 복강과 횡격막을 절개하였다. 복대정맥을 개방한 상태에서 수입관을 전대동맥에 삽입하고 간관류 완충액을 6.4ml/min으로 3분간 관류시켰다. 그후 수출관을 간문맥에 삽입한 다음 하대정맥, 담관 간 정맥, 하대정맥순서로 절찰하였다. 이때 수입관으로 CO₂ 5%, O₂ 95% 가스가 포화된 관류액(37°C, pH는 7.2~7.4)을 관류시켰다. 사용한 관류액은 Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) 완충액이며 그 조성은 NaCl 118mM, KCl 4.7mM, CaCl₂ 2.5mM, KH₂PO₄ 1.2mM, MgSO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM 및 glucose 10mM가 함유되었으며 이 관류액에 bovine serum albumin을 5% 첨가하여 사용하였다(Fig 1).

Fig 1. A schematic illustration of the perfused rat liver. The cannulated rat liver was perfused with Krebs-Henseleit Bicarbonate* KHB) buffer solution. I; interior Vena Cava, P; Posterior Vena Cava, V: Portal Vein.

초기 관류액은 간 실질조직에서의 IGF-I 분비를 일정하게 유지시키기 위하여 약 30분동안 6.4ml/tube 속도로 관류시켜 간조직에 있는 혈액을 세척한 후 실험을 위하여 120분간 관류액을 취하였다. 관류액 내의 glucose, IGF-I의 농도는 총 관류액의 용적을 곱하였으며, µg/tube/liver 무게를 g으로 표시하였고, IGF-I의 농도는 ng/tube/g으로 표시하였다.

시료의 전처리 : 관류액은 이 등¹⁴의 방법에 의하여 전

처리하였다. 즉, insulin-like growth factor binding protein로부터 IGF-I을 분리하기 위하여 Sep-pak C₁₈ cartridge(Waters, Miliford, MA, USA)를 이용하였다. Sep-pak extraction은 우선 관류액 0.2ml에 1.3ml의 1% trifluoacetic acid(TFA)를 첨가하여 10분간 정체시켜 free form과 bounding form을 분리시킨 다음 4ml의 100% acetonitrile과 4ml의 0.1% acetonitrile과 4ml의 0.1% TFA로 활성화시킨 Sep-pak C₁₈ cartridge에 시료를 서서히 가하고 이 cartridge를 4ml의 0.1% acetonitrile과 0.1% TFA 용액으로 용출시켰다. 용출된 시료를 Speed-Vac concentrator(Savant, Hicksville, NY, USA)를 이용하여 건조시켰고 실험시에는 이를 방사면역완충액으로 재조성하였다.

IGF-I 추적자 조제 : Chloramine-T 방법을 약간 변형시킨 이 등¹⁴의 방법으로써 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 10 μ l에 rhIGF-I(recombinant human insulin-like growth factor-I) 1 μ g을 첨가한 후 동위원소인 I¹²⁵(Amersham, Buckinghamshire, England) 1mCi를 첨가하고, chloramin-T (Kodac, USA) 0.04mg/10 μ l를 넣어서 신속히 혼합한 후 cellulose CF-II(Bio-Rad, CA, USA) column에 이 혼합물을 가한 다음 barbital buffer로 column을 세척하였다. 그후 12% bovine serum albumin을 column에 용출시켜 시험관 당 20방울씩 받아서 감마-counter(Packard, ILL, USA)로 cpm을 측정하였다. 높은 방사선 활성도에 의한 rhIGF-I의 파괴를 방지하기 위하여 각각 분획한 시험관의 용출 용액을 3 \times 10⁶cpm이 되도록 각각 분주하여 -70 $^{\circ}$ C에 냉동 보관하였다.

방사 면역측정법 : 방사 면역측정을 위한 완충액의 조성은 0.02M NaH₂PO₄, 0.15M NaCl, 0.1% sodium azide 및 0.5% bovine serum albumin이 함유되어 있는 0.02% sodium phosphate buffer 용액을 사용하였다.

전처리하여 추출한 시료를 100 μ l의 RIA 완충용액에 재조성하고 미국 National Hormone and Pituitary Program을 통하여 공급받은 polyclonal IGF-I antibody를 1,250배로 희석하여 50 μ l를 첨가한 후 1시간동안 실온에서 반응을 유도하였다. 그후 100 μ l에 20,000cpm 되게 시험관에 tracer를 첨가한 후 20% polyethylene glycol(PEG #8,000, Sigma, MO, USA)을 1ml 첨가하여 3,000rpm에 30분간 원심분리함으로써 bound form과 free form을 분리하였다. 분리된 bound form은 감마-counter로 방사면역활성도를 측정하였다.

Glucose, lactic dehydrogenase, alanine amino-

transferase 및 aspartate aminotransferase 측정 : 관류액내 LDH는 Kit(Sigma, USA)를 사용하여 측정하였으며 glucose, AST와 ALT는 자동 생화학분석기(Hitachi 747, Japan)를 이용하여 측정하였다.

통계처리 : Adenylate cyclase을 활성화 시키는 forskolin (RBI, USA)을 이용하여 통계처리한 결과는 mean \pm S.D.로 표시하였으며 두 군간의 통계적 차이는 Student's *t*-test 값이 0.05% 이하인 경우를 유의한 차이로 인정하였다.

결 과

간관류 모형의 확립 : 이 연구에서 Krebs-Henseleite bicarbonate(KHB)을 간 관류액에 bovine serum albumin을 5% 첨가하여 사용하였다. 처음의 관류액은 간 실질조직에서의 IGF-I의 분비를 일정하게 유지시키기 위하여 약 30분동안 관류액 1.5ml/min을 관류시켜 간조직에 있는 혈액을 세척한 다음 120분간 1.5ml/min으로 관류액을 취하였다. 이때의 AST, ALT 그리고 LDH가 120분간 변화가 없었다(Fig 1).

IGF-I의 방사 면역측정법의 확립 및 IGF-I의 확인 : 간 관류액의 IGF-I 농도를 측정하기 위하여 우선 cellulose CF-II column을 사용하여 건강한 tracer를 만들었다. 이를 IGF-I의 항체와 경쟁적으로 결합(B/Bo)한 결과 rhIGF-I 농도의 변화에 따른 표준 곡선과 희석한 간 관류용액이 평행함을 관찰할 수 있었다(Fig 2).

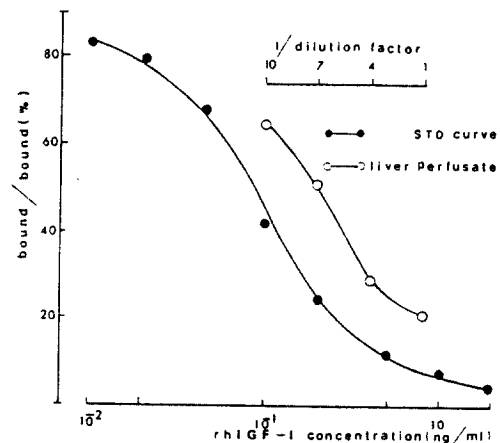


FIG 2. Standard curve and serial dilution curve of rat liver perfusate. bound/bound₀(%), competitive bound amount of antigen and I¹²⁵-antigen/I¹²⁵-antigen and antibody bound amount X 100. rhIGF-I; recombinant human insulin-like growth factor-I.

Forskolin에 의한 IGF-I의 분비효과 : 간세포에서 forskolin이 IGF-I 분비조절에 미치는 효과를 관찰하기 위하여 10^{-5} , 10^{-6} 과 10^{-7} M forskolin을 3% BSA가 함유된 KHB에 혼합하여 4ml/tube씩 용출한 결과 농도의존적인 IGF-I 분비의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig 3). 이때의 10^{-5} M forskolin에서 IGF-I 농도는 13.58 ± 0.72 ng/tube/g으로 대조군의 10.58 ± 0.75 ng/tube/g에 비하여 유의성 있는 증가($p < 0.05$)를 관찰할 수 있었다(Fig 3). 10^{-6} M forskolin에서는 12.82 ± 0.69 ng/tube/g으로 역시 대조군에 비하여 유의성 있게 IGF-I 분비의 증가($p < 0.05$)를 관찰할 수 있었다(Fig 3). 그러나 10^{-7} M forskolin에서는 10.62 ± 0.84 ng/tube/g로서 대조군에 비하여 분비의 증가를 관찰할 수 없었다(Fig 3).

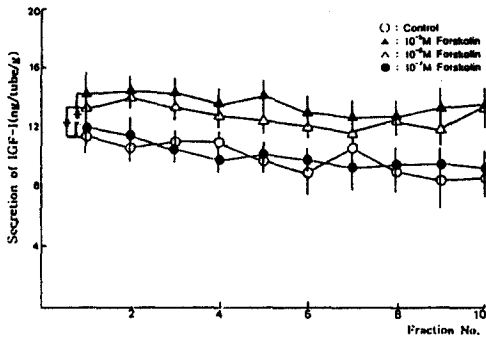


Fig 3. Effect of forskolin(10^{-5} , 10^{-6} and 10^{-7} M) on the IGF-I secretion in the perfused rat liver model($n=7$). IGF-I; insulin-like growth factor-I. Statistical comparisons were done by Student's paired *t*-test. These results are shown as mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

Forskolin이 glucose 분비에 미치는 효과 : 5% BSA가 함유된 KHB의 glucose 농도는 3.23 ± 0.47 ng/tube/g이었다. 반면에 10^{-6} M forskolin에서는 glucose 농도가 2.82 ± 0.32 ng/tube/g이었으며, 10^{-5} M forskolin에서는 2.12 ± 0.62 ng/tube/g으로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 억제되었다. 이 중 10^{-5} M forskolin에서 유의성 있게 억제($p < 0.05$)됨을 관찰할 수 있었다(Fig 4).

Forskolin이 ALT, AST 그리고 LDH에 미치는 효과 : 간 관류에 의한 간세포의 영향을 관찰하기 위하여 ALT와 AST의 변동을 관찰한 결과 대조군인 5% BSA가 함유된 KHB로 120분간 관류시킬 때 대조군이나 10^{-5} M forskolin을 혼합한 관류액 모두에서 영향을 받지 않았다(Fig 5). 또한 LDH 역시 대조군과 10^{-5} M forskolin 처리군에서 변동이 없었다(Fig 6).

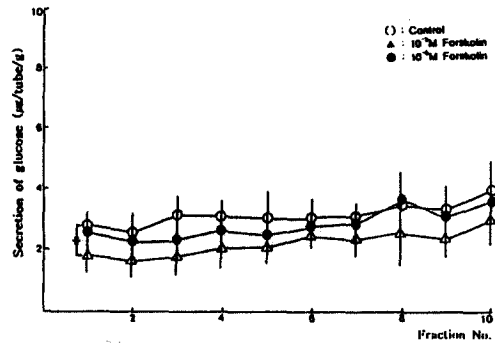


Fig 4. Effect of forskolin(10^{-5} M, 10^{-7} M) on the glucose secretion in the perfused rat liver model($n=7$). Statistical comparisons were done by Student's paired *t*-test. These results are shown as mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

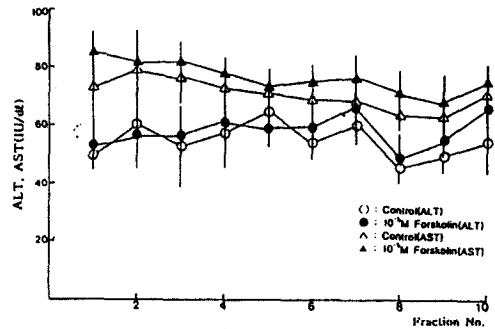


Fig 5. Effect of forskolin(10^{-5} M) and control buffer(KHB buffer) on the ALT and AST secretion in the perfused rat liver model ($n=7$). ALT: Alanine Aminotransferase, AST: Aspartate Aminotransferase. These results are shown as mean \pm S.D.

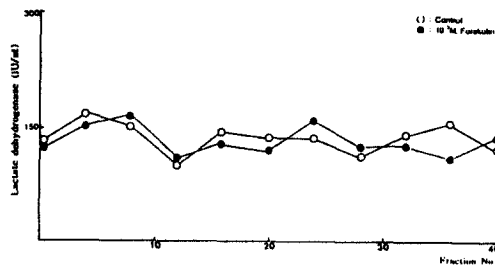


Fig 6. Effect of forskolin(10^{-5} M) on the LDH secretion in the perfused rat liver model.

고찰

성장호르몬의 조절에 의하여 분비된 IGF-I은 골격조

직, 간 및 신장을 포함한 연부조직 등에서 합성 또는 분비하는 것으로 알려져 있다¹². 이러한 포유동물류의 혈중에 순환되고 있는 IGF-I의 대부분을 간 세포에서 합성 및 분비되고 그 일부는 각각의 조직세포에서 생성된다고 보고되었다^{12,18-21}.

따라서 이 연구는 간 관류모형을 사용하여 간세포의 신호전달계중 하나인 cAMP 활성화에 대한 IGF-I 및 glucose 분비효과를 관찰하였다.

간 관류모형에서 중요한 것은 실험시간동안 간세포의 기능이 정상으로 유지되는 것이다. 이 연구결과에서는 간 세포의 생존에 관여하고 있는 ALT, AST 및 LDH를 2시간동안 관찰하였으나 변동은 관찰할 수 없었으며 이는 이 등(1996)¹⁴의 연구결과와 일치하였다. 이러한 결과는 간 세포가 손상되지 않았음을 의미하며 이 연구는 간 관류모형이 이상적임을 확인할 수 있었다.

간 관류모형을 통하여 분비되는 IGF-I 분비방식에는 간세포내 저장된 peptide를 분비하는 방식 및 간 세포내에서 새로이 합성된 peptide가 분비된 것이 있을 수 있으며 2가지 분비방식이 복합적으로 작동할 가능성이 있을 것으로 추측된다. 이는 여러 연구자들에 의하여 간 관류액에 존재하는 IGF-I은 초기에 이미 간에서 합성되어 있는 IGF-I을 분비시키지만 30분후부터는 간세포에서 새로이 합성된 IGF-I이 관류액내로 분비됨을 보고되었다^{6,13,20}. 따라서 본 연구의 간 관류모형에서 IGF-I의 분비양상은 30분간 preincubation 하였기 때문에 간세포내에서 새로이 합성된 IGF-I이 분비되었을 것으로 추측된다.

간 관류모형에서 IGF-I의 분비양상에 대해서는 Siess *et al*⁶에 의하여 처음 보고된 이후 Schwander *et al*¹³은 240분간 KHB 관류액을 이용하여 간 관류를 시킨 결과 IGF-I 분비의 지속적인 증가를 보고하였다. 또한 Schlich *et al*²²은 간 관류모형을 이용하여 12시간동안 KHB 관류액을 이용하여 간에 관류시킨 바 IGF-I이 처음 5시간동안 분비증가하다가 일정하게 유지됨을 보고하였다. 그러나 이 연구결과에서는 120분간 KHB 용액을 관류하였을 경우 IGF-I 분비 증가효과를 관찰할 수 없었다. 이는 상기 연구자에 비하여 짧은 관류시간, 관류액내 BSA 농도 및 시간당 관류액의 용출량 변동에 의한 간세포 압력 변동이 간세포의 생리적 기능에 영향을 주지 않았을 것으로 생각된다. 이러한 현상의 입증으로 이 연구와 동일한 관류액과 관류속도를 유지한 이 등¹⁴의 간 관류모형에서도 IGF-I 분비 양상은 이 연구와 일치함을 관찰할

수 있었다.

포유동물류의 IGF-I 분비조절에 있어서는 영양상태, 성장호르몬, glucose 및 갑상선 호르몬 등에 따라 혈중 IGF-I 분비증가 및 간세포의 IGF-I mRNA 증가가 보고되었다^{10,11,23,24}. 또한 insulin과 부갑상선 호르몬 투여후 IGF-I 분비증가는 세포내 cAMP-dependent protein kinase의 활성화에 의하여 이루어진다고 알려져 있다^{17,21}. 이와같은 분비조절인자에 의하여 IGF-I의 분비가 조절되고 있으나 간 관류모형을 사용한 IGF-I의 분비기전에 대한 연구는 아직 진전이 없는 상태이다. 따라서 재확립한 간 관류모형을 사용하여 간 세포내 cAMP 활성물질인 forskolin 의한 IGF-I 분비효과를 관찰한 결과 간세포에서 IGF-I 분비의 증가효과를 관찰할 수 있었다. 이는 Schumacher *et al*¹⁵의 보고에서와 같이 배양한 Schwann cell에서 cAMP 활성화는 IGF-I 분비증가를 유발시켰다고 하였다. 또한 Raper *et al*²⁵의 보고에서는 배양된 간세포에서 cAMP 활성화가 간 세포증가, IGF-I 분비증가 및 IGF-I mRNA를 자극한 것으로 설명하였다. 이 연구의 결과에서는 간 관류모형이기 때문에 세포증식의 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 IGF-I 분비가 증가된 점으로 미루어 보아 상기의 연구결과와 일치하였다. 또한 인간과 백서에 IGF-I을 직접 투여한 연구에서 혈중 glucose 분비억제를 관찰할 수 있었으며^{26,27} 간 관류모형을 사용한 이 연구에서도 역시 glucose 분비억제시킴을 관찰할 수 있었다. 이는 간세포의 cAMP 활성화에 의한 IGF-I의 증가가 glucose의 분비를 억제시킨 것으로 생각되며 이러한 결과는 간 관류모형을 이용한 간세포에서 cAMP 활성화가 IGF-I과 glucose 분비조절에 관여하고 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

IGF-I은 거의 모든 조직에서 생성되나 특히 혈중에 존재하는 대부분의 IGF-I은 간에서 합성된다. 일반세포의 신호전달물질중 second messenger인 cAMP의 활성화가 호르몬 분비 및 합성에 중요한 조절인자임은 이미 알려져 있다. Adenylate cyclase를 활성화시키는 약물인 forskolin을 사용하여 간 관류모형에서 간세포의 IGF-I 분비양상과 glucose 분비효과를 관찰하고자 이 실험을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 수정보환된 간관류모형에서 간세포의 ALT, AST 및 LDH 분비가 시간의 변동에 따라 변동하지 않았다.

2. Adenylate cyclase을 활성화시키는 약물인 forskolin (10^{-5} , 10^{-6} 및 $10^{-7}M$)을 이용하여 cAMP을 활성화시킴으로써 IGF-I 분비의 증가가 농도의존적으로 증가하였다. 그러나 10^{-5} 과 $10^{-6}M$ Forskolin에서만 유의성 있는 분비의 증가($p < 0.05$)를 관찰할 수 있었다.

3. Forskolin($10^{-5}M$)은 간관류액내 glucose 분비를 억제 ($p < 0.05$) 시켰다.

이상의 결과로 보아 간 관류모형을 사용한 간 세포에서 cAMP 활성이 IGF-I 및 glucose 분비조절에 관여하고 있음을 추측할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Nissley SP, Rechler MM. Insulin-like growth factors. Boissynthesis, receptors and carrier proteins. In: Li CH, ed. *Hormonal protein and peptides*, New York, Academic Press, 128-203, 1985.
2. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors-I and II, Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structure, serum and tissue concentration. *Endo Res*, 10:68-91, 1989.
3. Salmon WD, Daughaday WH. A hormonally control serum factor which stimulates sulphate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med*, 49:825-836, 1957.
4. John JJ, David RC. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological Action. *Endocrine Review*, 16:3-34, 1995.
5. Jakob A, Hauri CH, Froesch ER. Nonsuppressible insulin-like growth factor activity in human serum. III. Differentiation of two distinct molecules with non-suppressible IIA. *J Clin Invest*, 12:231-245, 1968.
6. Miller LL, Schalch DS, Draznin B. Role of the liver in regulating somatomedin activity: effects of streptozocin diabetes and starvation on the synthesis and release of IGF and its carrier protein by the isolated perfused rat liver. *Endocrinology*, 113:297-305, 1987.
7. McConaghey P, Sledge CB. Production of sulphation factor by the perfused liver. *Nature*, 225:1249-1250, 1970.
8. Siess E, Teinzer A, Struck E, et al. Bildung eines in-

sulinartigen Wirkstoffes durch die isolierte Rattenleber. *Diabetologia*, 1:21-29, 1965.

9. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin-C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Prac Natl Acad Sci*, 81:935-939, 1984.
10. Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG. Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol*, 1:445-450, 1987.
11. Clemmon DR, Klibanski A, Underwood LE, et al. Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in human. *J Clin Endocrinol Metab*, 53:1247-1250, 1981.
12. Murphy LJ, Friesen HG. Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor-I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology*, 122:325-332, 1988.
13. Schwander JC, Hauri C, Zape J, et al. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology*, 113:297-305, 1983.
14. 이대열, 강창원, 김정수. 백서의 간관류 모델에서 Ca^{2+} 이 Insulin-like growth factor(IGF)-I과 IGF-Binding Protein 합성 및 분비에 미치는 영향. 대한내분비학회지, 11(2):189-198, 1996.
15. Sahumacher M, Jung I, Rebel P, et al. Insulin-like growth factor I: a mitogen for rat schwann cells in the presence of elevated levels of cAMP. *Glia*, 8:232-240, 1993.
16. Claes BW, Geoffrey WG. Regulation of insulin release by Ca^{2+} . *Physiological Reviews*, 61:915-1011, 1981.
17. McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Parathyroid hormone enhances the transcript and polypeptide levels of insulin-like growth factor-I in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology*, 124:1247-1253, 1989.
18. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin-C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine

- mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci*, 81:935-939, 1984.
19. Miller LL, Schalch DS, Draznin B. Role of the liver in regulating somatomedin activity: effects of streptozocin diabetes and starvation on the synthesis and release of IGF and its carrier protein by the isolated perfused rat liver. *Endocrinology*, 113:297-305, 1987.
 20. McConaghey P, Sledge CB, Protection of sulphation factor by the perfused liver. *Nature*, 225:1249-1250, 1970.
 21. Bruce A, Dennis B, Julian L, *et al.* *Molecular Biology of The Cell*. Garland publishing, Inc. New York and London, 736-742, 1994.
 22. Schalch DS, Heinrich U, Draznin B, *et al.* Role of the liver in regulating somatomedin activity: hormone effects of the synthesis and release of insulin-like growth factor and its carrier protein by the isolated rat liver. *Endocrinology*, 104:1143-1152, 1979.
 23. Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD. Regulation of insulin-like growth factor-I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci*, 83:9343-9347, 1992.
 24. Wolf M, Ingbar SH, Moses AC. Thyroid hormone and growth hormone interact to regulate insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid and circulating level in the rat. *Endocrinology*, 125:2905-2914 1994.
 25. Raper S, Kothary P, Ishoo E, *et al.* Divergent mechanisms of insulin-like growth factor I and II on rat hepatocyte proliferation. *Regul Pept*, 58:55-62, 1995.
 26. Mauras N, Horber FF, Haymond MW. Low dose recombination human insulin-like growth factor-I fails to affect protein anabolism but inhibits islet cell secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 75:1192-1197, 1992.
 27. Zenobi PD, Graf S, Ursprung H, *et al.* Effects of insulin-like growth factor-I on glucose tolerance, insulin level and insulin secretion. *J Clin Invest*, 89:1908-1913, 1992.
-