

마우스 섬유아세포 (3T3 fibroblast cells)에서
Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) 및 IGF Binding
Protein-3 (IGFBP-3)이 세포증식에 미치는 영향

인하대학교 의과대학 내과학교실

조철호, 곽승민, 문태훈, 조재화, 류정선, 이흥렬

= Abstract =

The Effect of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and
IGF Binding Protein-3 (IGFBP-3) on Cellular Proliferation
in Mouse 3T3 Fibroblast Cells

Chul Ho Cho, M.D., Seung Min Kwak, M.D., Tae Hun Moon, M.D.,
Jae Hwa Cho, M.D., Jeong Seon Ryu, M.D., Hyong Lyeol Lee M.D.

Department of Internal Medicine, Inha University College of Medicine, Sunnam, Kyunggi-Do, Korea

Background : Cell growth is a balance between cell proliferation and cell death. Insulin-like growth factor-I (IGF-I), which binds IGF-I receptor (IGF-IR), mediates cellular proliferation as a potent mitogen. IGF binding protein-3 (IGFBP-3) as a circulating major IGFBP can inhibit or enhance the effects of IGF-I on cellular growth by binding IGFs.

Methods : We investigated the expressions of mRNA of IGF-I and IGF-IR by northern blot and phosphorylation of IGF-IR with the treatment of IGF-I by western blot in 3T3 fibroblast cells. The cellular proliferations of 3T3 cells with the treatments of IGF-I were evaluated using ³H-thymidine incorporation and MTT assay. Also to observe the effect of IGFBP-3 on cellular proliferation, 3T3 cells were treated with anti-IGFBP-3 and α IR₃ (monoclonal antibody to IGF-IR) alone or in combination.

Results : Our results demonstrated that 3T3 cells showed mRNA expressions of IGF-I and IGF-IR and the IGF-I increased phosphorylation of IGF-IR. The treatments of 3T3 cells with IGF-I increased cellular prolifera-

Address for correspondence :

Chul Ho Cho, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Inha Hospital.

Taepyung-dong, Sujung-ku, Sunnam, Kyunggi-Do, Korea

Phone : 82-2-342-720-5319 Fax : 82-2-342-755-2812 E-mail : ch4cho@chollian.net

tion in 5 % and 1 % seruma-containing media, not in serum-free media. The addition of anti-IGFBP-3 to neutralize IGFBP-3 showed 2-fold increase of cellular proliferation, and also co-incubation of anti-IGFBP-3 and α IR₃ together showed similar increase of cellular proliferation in 3T3 cells. Interestingly, when the cells were pretreated with α IR₃ for 4 hr, prior to the simultaneous addition of α IR₃ and anti-IGFBP-3, anti-IGFBP-3-mediated cellular proliferation was decreased to control level. All of these results suggest that free IGF-I released from IGF-I/IGFBP-3 complex would be involved in the cellular proliferation.

Conclusion : IGF-I is a mitogen through the activation of IGF-IR in 3T3 cells, and IGFBP-3 could be a potent inhibitor for IGF-I action by binding IGF-I. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 618-628)

Key words : Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP), Mitogen.

서 론

세포성장은 cell proliferation과 cell death의 균형에 의해 이루어지고 있다. 세포증식에 필요한 인체내의 여러 가지 성장 요소(growth factor)에는 insulin-like growth factor-I (IGF-I), epidermal growth factor (EGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF) 등이 있는데 mesenchymal 혹은 parenchymal cells에 의해 분비되어 endocrine 혹은 paracrine effect로, 또 암세포 자체에 의한 autocrine effect로 세포 증식에 관여한다.

IGF-I는²⁻⁸ 특히 세포성장에 관여하는 성장 요소로, 그의 receptor인 IGF-I receptor (IGF-IR)^{9,10}에 결합함으로써¹¹, mitogenic effect^{12,13}를 나타내고, apoptosis (세포사멸)를 억제할 뿐만 아니라¹⁴⁻¹⁷ 세포의 transformation 및 tumorigenicity를¹⁸ 유발하는 것으로 알려져 있다.

IGF-I과 결합하는 IGFBPs은 대부분의 정상세포 및 암세포에서 분비되는데, IGF-I의 기능인 세포성장의 촉진 및 억압에 관여하고 있으며¹⁹, 그 중 IGFBP-3은 혈액 내에 약 가장 많이 차지하고 있다.

이에 저자 등은 3T3 fibroblast cells을 이용하여, IGF-I에 의한 세포성장 효과를 보기 위해, 3T3의 IGF-I과 IGF-IR의 mRNA expression을 관찰하였

으며, IGF-I에 의한 IGF-IR의 활성화를 보기 위해 IGF-IR의 tyrosine kinase domain의 phosphorylation을 관찰하였다. 또한 IGF-I이 세포증식에 미치는 효과와 IGFBP-3이 세포성장에 관여하는 것을 보기 위해, anti-IGFBP-3 및 α IR₃ (monoclonal antibody to IGF-IR)를 단독 혹은 병용투여하여 세포 성장을 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

3T3 fibroblast cells (섬유아 세포)는 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) Balb/c 마우스의 세포주로서, 세포배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY, USA)에 5% fetal bovine serum (FBS), sodium pyruvate, nonessential amino acids, L-glutamine과 2배의 vitamin solution (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 5% CO₂ 세포 배양기에 37°C에서 배양하였다.

2. Northern blot analysis of IGF-I and IGF-IR

3T3 세포는 oligo(dT)-cellulose chromatography

로 poly (A⁺) mRNA을 추출한 후, 1% denaturing formaldehyde agarose gel을 이용하여, 0.6 Amp로 전기영동 후 Genescreen nylon membrane (DuPont Co., Boston, MA, USA)에 transfer 후, UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)으로 120,000 uJ/cm²로 UV cross-link하였다. Filter는 60℃하에 30 mM NaCl/3 mM sodium citrate, pH 7.2/0.1% sodium dodecyl sulfate (W/V)로 2-3 차례 씻었다.

Probe는 human IGF-IR의 cDNA fragment (from Baserga R, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA)와 human IGF-I의 cDNA fragment (from Baserga R, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA)에 해당되는 probe를 사용하였다. 각 cDNA fragment는 agarose gel 전기영동과, GeneClean (BIO 101, Inc., La Jolla, CA, USA)으로 분리 후, ³²P-deoxyribonucleotide triphosphates 동위원소를 이용하여 random primer 방법으로 label하였다.

3. Cellular proliferation assay by ³H-thymidine incorporation

세포는 96 well 세포배양용기에 2,500/well로 분주한 후 12시간 이상 배양하여 부착 후, FBS이 없는 세포 배양액에서 24시간 배양하였다. 그 후 세포배양액을 제거하고, serum-free, 1%, 5% serum-containing media하에서 여러 농도의 IGF-I (10-100 ng/ml) (UBI, Lake Placid, NY, USA) 및 Anti-IGFBP-3 (1 : 5,000 dilution of whole antiserum IGFBP-3) (UBI, Lake Placid, NY, USA), αIR3 (specific antibody to IGF-IR) (Oncogene Science, Manhasset, NY, USA)를 투여 후, 2-3 일간 배양하며, 배양 마지막 약 18시간은 1 μCi/ml ³H-thymidine를 투여하였다. 그 후 배양액을 제거후 0.1 M KOH로 세포를 분해시키고, 세포 증식에 의한 DNA 합성은 scintillation counter를 이용하여 방사능을 측정하였다.

4. Cell viability assay

세포성장 측정은 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 이용하여 dye reduction assay로 하였다. 세포는 96 well 세포배양용기에 2,500/well로 분주한 후 12시간 이상 배양하여 부착 후, serum-free media에서 24시간 배양하였다. 그 후 세포배양액을 제거하고, serum-free, 1%, 5% serum-containing media하에서 여러 농도의 IGF-I (10-100 ng/ml) (UBI, St. Louis, MO, USA)를 투여 후 3일간 배양하였다. 그 후 MTT (최종농도 : 80 g/ml)을 투여 후 약 2-3시간 배양한 다음, 배양액을 제거하였다. 세포는 100 μl의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 첨가하여 분해한 후, spectrophotometer (Dynatech, Inc., Alexandria, VA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Phosphorylation of tyrosine kinase domains in IGF-IR by western blot

세포는 6 well 세포배양용기에 500,000/well로 분주한 후 12시간 이상 배양하여 부착 후, serum-free medium에서 약 24 시간 배양한다. IGF-I에 의한 tyrosine kinase의 인산화를 보기 위해 serum-free media 단독 혹은 IGF-I (50 ng/ml) 병용투여하에 10분간 처리한 후, protein은 protease inhibitors하에 추출하고, Bradford 방법으로 측정하여 각 well 당 30 μg을 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 전기영동후 nitrocellulose membrane (Corning Incorporated, Acton, MA, USA)에 전이시켰다. Tris-buffered saline-Tween (TBS-T)에 희석한 3% non-fat milk로 차단한 후 일차항체로 horseradish peroxidase로 conjugation된 monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (UBI, Lake Placid, NY, USA)로 4℃에서 밤사이 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척한 다음 10,000배 희석한

이차항체 (peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody) (Amersham, Buckinghamshire, Illinois, USA)로 실온에서 1시간 반응 후 세척하고, enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham, Buckinghamshire, Illinois, USA)을 실행하였다.

6. Statistical Analysis (통계학적 분석)

통계학적 분석은 Student's t-test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Expression of IGF-I and IGF-IR mRNA

3T3 세포에서 IGF-I mRNA expression을 관찰하기 위해 IGF-I cDNA를 이용한 northern blot을 시행한 결과, 모두 5개의 IGF-I mRNA expression을 관찰할 수 있었는데, 이중 9.5 kb, 6.3 kb에서는 2개의 뚜렷한 밴드를 보였고, 8.0 kb, 4.5 kb, 2.2 kb에서는 이보다 희미한 밴드를 나타내었다(Fig. 1). 한편, IGF-I과 반응하는 IGF-IR의 mRNA expression을 보기 위해 IGF-IR cDNA를 이용하여 northern blot을 시행한 결과 11 kb와 6 kb의 IGF-IR mRNA expression을 보였다(Fig. 2). 이상의 결과로 3T3 세포는 IGF-I과 IGF-IR의 mRNA를 갖고 있는 것을 알 수 있었다.

2. Phosphorylation of tyrosine kinase domain in IGF-IR with IGF-I

IGF-IR의 ligand인 IGF-I에 의한 IGF-IR의 활성화를 보기 위해서, serum-free media하에서 IGF-I을 약 10분간 투여 후, 세포 단백질을 추출하여 reducing condition에서 IGF-IR의 intracellular subunit인 β -subunit의 인산화를 anti-phosphotyrosine antibody를 이용하여 western blot으로 관찰하

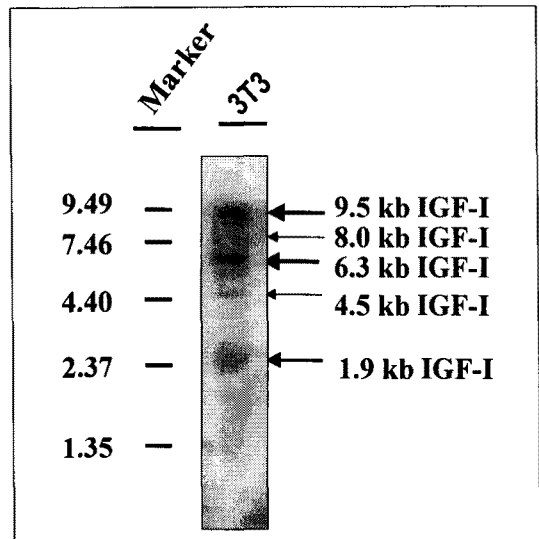


Fig. 1. mRNA expression of IGF-I in 3T3 fibroblast cells using Northern analysis. Poly (A)+mRNA of 3T3 cells was prepared from 3T3 fibroblast cells by oligo(dT)-cellulose chromatography, fractionated on a 1% denaturing formaldehyde agarose gel, electrotransferred and UV cross-linked to nylon membrane. Sizes of the IGF-I mRNA bands are shown on the right in kilobases (kb).

였다. Serum-free media에서 50 ng/ml IGF-I을 첨가시, IGF-I이 없는 대조군보다 95 kDa 단백질의 phosphorylation이 증가하는 것을 보였다(Fig. 3). 이 95 kDa의 단백질은 IGF-IR의 intracellular subunit인 β -subunit의 phosphorylation이 증가된 것이므로 IGF-I에 의해 IGF-IR가 활성화되는 것을 알 수 있다.

3. Effect of IGF-I on cellular proliferation in 3T3 mouse fibroblast cell

IGF-I에 의한 세포증식 여부를 알아보기 위해 서로 다른 농도의 serum (5%, 1%, 0%)에서 IGF-I를 준 후 3일간 배양후, MTT assay와 ^3H -Thymidine

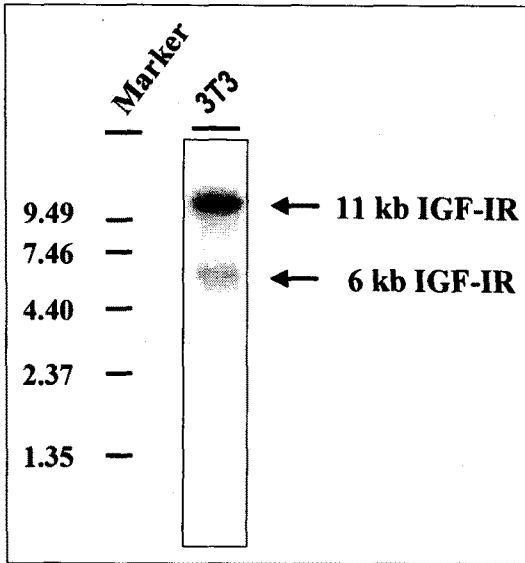


Fig. 2. mRNA expression of IGF-I in 3T3 fibroblast cells using Northern analysis. Poly (A)⁺mRNA of 3T3 cells was prepared from 3T3 fibroblast cells by oligo(dT)-cellulose chromatography, fractionated on a 1% denaturing formaldehyde agarose gel, electrotransferred and UV cross-linked to nylon membrane. Sizes of the IGF-IR mRNA bands are shown on the right in kilobases (kb).

incorporation assay를 시행하였다. 3T3 세포의 세포증식은 serum-free media (0% serum)보다 serum이 있는 5%, 1% serum-containing media에서 높은 세포증식을 보였다(Fig. 4, 5). 또한 IGF-I을 투여시 대조군에 비해 5%, 1% serum-containing media에서 세포증식을 증가시켰으며, IGF-I의 농도에 따라 증가하는 것을 보였다(Fig. 4, 5). 그러나 serum-free media에서는 IGF-I이 세포증식을 증가시키지 않았다(Fig. 4, 5).

4. The role of IGFBP-3 on cellular proliferation in 3T3 mouse fibroblast

IGF-I은 체내에서 약 90% 이상이 IGFBP_s과 결합

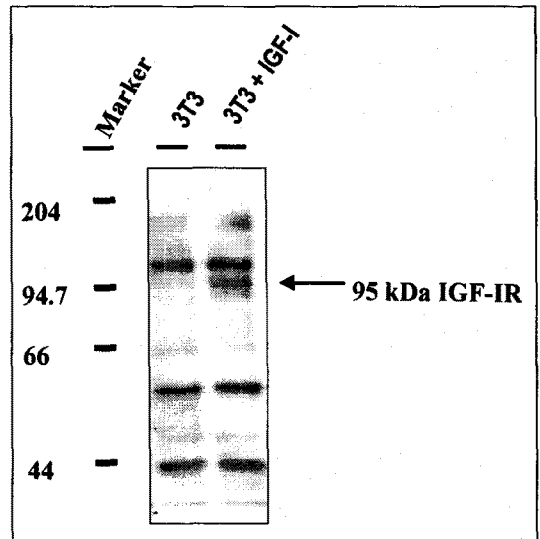


Fig. 3. Increased phosphorylation of phosphotyrosine-containing proteins with the treatment of IGF-I. Cells were treated in the presence or absence of IGF-I (50 ng/ml) after starvation in the serum-free media for 24 hr. Soluble proteins from total cell lysates (30 ug/lane) were separated by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing condition, and transferred to nitrocellulose membrane. The immunoreactive bands were detected by incubating blots with anti-phosphotyrosine antibody and visualized using enhanced chemiluminescence kit system. Sizes of band is shown on the right in kilodaltons (kDa).

하는데, 이중 IGFBP-3이 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 그러므로 IGFBP-3가 3T3 세포의 세포증식에 미치는 영향을 보기 위해 IGFBP-3의 antibody (항체)로 처리후 세포증식을 관찰하였다. 또한 anti-IGFBP-3을 투여시 IGFBP-3와 결합함으로써, IGF-I/IGFBP-3의 결합형에서 free IGF-I이 분리되어 세포표면의 IGF-IR와 결합하여, 세포증식을 증가시킬 수 있으므로, free IGF-I이 IGF-IR와 결합하는 것을 억제시키기 위해 αIR_3 (specific anti-

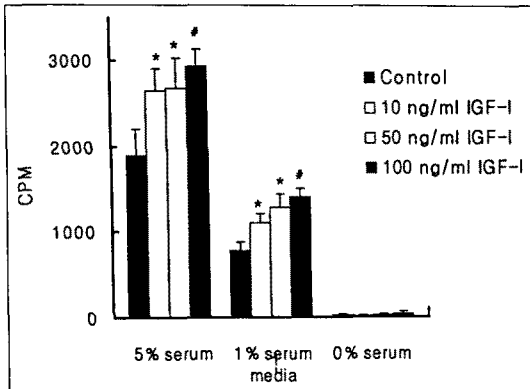


Fig. 4. Cellular proliferation with IGF-I in 3T3 cells by ³H-thymidine incorporation assay 3T3 cells were treated with different doses of IGF-I (10-100 ng/ml) for 72 hr under different concentrations in serum-containing media. DNA syntheses were evaluated by ³H-thymidine incorporation. All values are the means and standard deviations determined from quadruplicate wells for each conditions.

*p<0.05, #p<0.01 versus control.

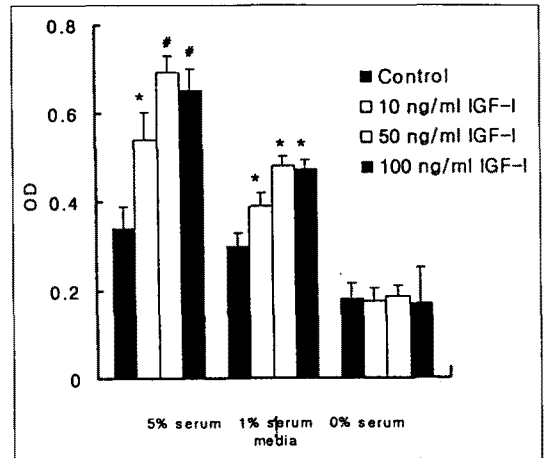


Fig. 5. Cellular proliferation with IGF-I in 3T3 cells by MTT assay 3T3 cells were treated with different doses of IGF-I (10-100 ng/ml) for 72 hr under different concentrations of serum-containing media. Cell viabilities were evaluated by MTT assay. All values are the means and standard deviations determined from quadruplicate wells for each conditions.

*p<0.05, #p<0.01 versus control.

body to IGF-IR)를 전처치 및 병용 투여하여 2 일간 배양후 세포증식을 관찰하였다. Anti-IGFBP-3 및 α IR₃을 단독 및 병용투여시 5% serum-containing media에서는 세포성장이 대조군과 비교하여 별 변화를 나타내지 않았다(Fig. 6B). 그러나 serum-free media에서는 anti-IGFBP-3를 투여시 대조군에 비해 세포성장이 약 2배 이상 증가하였다(Fig. 6A). IGF-IR에 결합하는 monoclonal antibody인 α IR₃을 단독 혹은 4시간 전처치 후 anti-IGFBP-3를 투여시는 대조군과 비교하여 비슷한 세포성장을 보였으나, α IR₃을 anti-IGFBP-3와 병용투여시는 대조군에 비해 2배이상 증가하였다(Fig. 6A). 이는 anti-IGFBP-3에 의해 IGFBP-3와 결합하여, IGF-I과 IGFBP-3의 결합에서 IGF-I이 분리되어 세포표면의 IGF-IR와 결합할 수 있으나, α IR₃로 전처치로 IGF-IR에 결합하여 free IGF-I이 세포표면의 IGF-IR

에 결합하지 못하여 세포성장을 증가시키지 못하나, α IR₃과 anti-IGFBP-3를 병용투여시는 free IGF-I이 α IR₃과 competition하여 IGF-IR를 활성화시켜 세포증식을 증가시키는 것으로 생각된다.

고 찰

IGF family는 IGF-I (전에는 somatomedin이라 불림), IGF-II로 이루어진 polypeptides로 insulin과 매우 유사한 구조적 상동성을 가졌다. IGF-I과 (70개의 amino acid, MW 7649), IGF-II는 (67개의 amino acid, MW 7471)은 single chain의 polypeptide로 서로 70%의 염기서열의 상동성을 갖고 있으며, proinsulin과는 약 50%가 구조적으로 비슷하다. IGFs는 3개의 disulfide bond로 연결되어 A, B, C, D의 4개의 domain으로 이루어져 있다². 혈

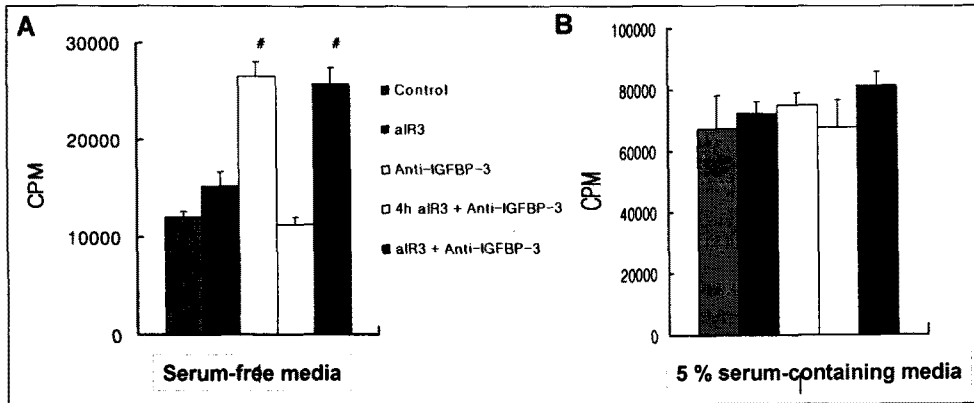


Fig. 6. Cellular proliferation with treatment of anti-IGFBP-3. DNA synthesis of 3T3 cells were evaluated with treatment of control (serum free media), α IR₃ (1 ug/ml α IR₃), anti-IGFBP-3 (1 : 5,000 dilution of whole antiserum), 4h α IR₃+Anti-IGFBP-3 (4 hr pre-treatment of 1 ug/ml α IR₃ following coincubation α IR₃ and anti-IGFBP-3), and α IR₃+anti-IGFBP-3 (coincubation of α IR₃ and anti-IGFBP-3) in serum-free (A) or 5% serum-containing media (B) for 48 hr. DNA syntheses were evaluated by 3H-thymidine incorporation. The data are presented as the means and standard deviations (SD) from quadruplicate wells for each conditions. [#]p<0.01 versus control.

액내 IGF-I은 폐, 신장등 장기에서 생성되나, 주로 간에서 생성되며⁴, 혈액내 농도는 간에서의 생성과 growth hormone에 의해 좌우된다^{1,20}. IGF-I의 기능은 지방조직, 근육, 간 등에서 insulin의 작용과 같은 metabolic effect (gluconeogenesis, lipogenesis, glycogenesis등)을 나타낼 뿐만 아니라^{2,21}, chondrocyte 및 다른 mesenchymal 세포를 포함한 정상세포의 강력한 mitogen으로서¹², 세포주기에서 DNA 합성을 관여하는 G1 주기에서 S 주기로 이행하게 하는 progression factor로 알려져 있다.

IGF-I은 세포표면의 IGF-IR와 결합하는데²², IGF-IR는 insulin receptor와 비슷하며, 3개의 disulfide bond로 이루어진 heterotetrameric $\alpha 2\beta 2$ complex로 이루어 졌다. Extracellular α -subunit (MW 130,000)는 ligand인 IGF-I과 결합하는 domain을 갖고 있으며, intracellular portion인 β -subunit (MW 98,000)는 tyrosine kinase domain 을 갖고 있다²³. IGF-IR의 작용은 IGF-I과 결합하여

mitogenic effect^{12,13}, transformation과 tumorigenicity를¹⁸ 유발하며, apoptosis (세포사멸)를 방지하는데¹⁴⁻¹⁷, 이는 IGF-I는 IGF-IR의 intracellular β -subunit인 cytoplasmic domain의 tyrosine kinase를 phosphorylation에 의해 활성화시켜²⁴ signal transduction을 유발하는데, insulin receptor subunit-I (IRS-I) 및 Shc, Grb-2등 여러 가지 intracellular signalling protein들을 활성화시키는 것으로 보고되고 있다. 본 실험에서 serum-free media 하에서 IGF-I을 투여시 대조군보다 95 kDa protein의 phosphorylation이 증가하였는데, 이는 IGF-IR의 intracellular subunit인 β -subunit의 tyrosine kinase domain의 phosphorylation이 증가된 것으로 알려져 있다. 또한 폐암과 대장암세포를 이용하여 anti-IGF-IR antibody로 immunoprecipitation 후 western blot을 시행시 역시 95 kDa IGF-IR을 볼 수 있어 (unpublished data), IGF-I이 IGF-IR를 활성화시키는 것을 알 수 있다.

본 연구에서 3T3는 serum이 있는 media에서 (5%, 1% serum-containing media) 세포증식이 높고, serum이 없는 serum-free media에서는 세포증식이 낮은 것을 보였다. 또한 IGF-I을 투여시 5%와 1% serum-containing media에서 IGF-I의 양에 따라 세포증식이 증가하는 것을 보였으나, serum-free media에서는 IGF-I에 의한 세포 증식효과가 없었다. 이는 암세포는 세포자체에서 growth factor를 분비하여, paracrine 혹은 autocrine 효과로 세포 증식이 이루어지지만, 정상세포는 growth factor를 분비하지 않아 세포 증식이 일어나지 않는 것으로 생각되며, 또한 IGF-I에 의한 세포 증식은 모든 세포에 균일하게 나타나지 않는 것으로 알려져 있다.

IGF-I의 messenger RNA는 간 등 여러 장기에서 보고되고 있으며^{25, 26}, 특히 대장암 및 liposarcoma에서 높게 발현되는 것으로 보고되고 있다²⁷. 또한 IGF-I transcript는 expression의 유무와 크기 분포 등이 서로 다른 것으로 보고되는데, 본 실험에서 3T3 세포는 9.5 kb, 6.3 kb에서는 2개의 major transcripts와 8.0 kb, 4.5 kb, 2.2 kb의 3개의 minor transcript를 보였다. Tricoli등은²⁷ 대부분의 대장암 세포에서 8.0 kb의 단일 전사체와 2.5 kb와 1.7 kb의 희미한 밴드를 관찰하였고, 반면 Rotwein은²⁸ 사람의 간에서 1.1 kb의 major IGF-I transcript와 6.3, 3.7, 1.7 kb의 minor transcripts를 보고하여 서로 다른 transcriptional pattern을 보고하였는데, IGF-I mRNA가 달리 나타나는 기전은 확실하지 않으나, transcription의 processing에 따른 다양한 변화에 의한 것으로 생각된다.

정상세포 뿐만 아니라 암세포의 대부분 세포들이 IGFBPs을 분비하는데, IGFBPs의 역할은 IGF-I의 biologic effect를 조절할 뿐만 아니라, 스트레스 상황에서 건널 수 있는 reservoir pool의 역할을 한다²⁹. 또한 IGFBPs의 역할은 IGFs에 결합하는 단백질로, 혈액내에서 IGFs를 운반하고, 혈청내의 IGFs의 반감기를 증가시켜 준다. 또한 IGFBPs이 IGFs와 결합하여 특정 장거나 조직에 국한시킬 뿐만 아니라, 세

포 표면의 receptor에 결합을 조절하는 기능을 갖고 있다³⁰⁻³². IGFBPs은 IGF-I의 mitogenic effect를 증가 혹은 감소시키는 것으로 알려져 있으며¹⁹, 이중 특히 혈액내에서 가장 많이 분포하고 있는 IGFBP-3는 trimeric complex (MW 140,000)로 acid stable β -subunit (glycoprotein, MW 47,000-53,000), acid labile α -subunit (MW 84,000-86,000)와 γ -subunit (one IGF-I or IGF-II)로 이루어지고^{33, 34}, 이 trimeric complex의 IGFBP-3는 혈액내에서 이동하나 capillary barrier는 통과하지 못한 다³⁵.

본 실험에서 IGFBP-3를 중화시키기 위해 anti-IGFBP-3를 투여시 5% serum-containing media에서는 세포증식이 대조군에 비해 증가하지 않았으나, serum-free media에서는 대조군에 비해 약 2배 이상 증가하였다. 5% serum-containing media에서는 serum 자체의 IGFBP-3가 양이 많아 anti-IGFBP-3로 중화하는 것이 충분치 않을 것으로 생각되나, serum-free media에서는 anti-IGFBP-3로 충분히 중화시킨 것으로 생각되며, 이로 인해 세포증식이 증가하였는데, 다음의 2가지 기전으로 고려될 수 있다. 첫째는 IGFBP-3가 직접 세포증식을 억제하는 경우로 anti-IGFBP-3로 인해 세포증식의 억제가 완화되어 세포증식의 결과로 나타난 경우이며, 다른 기전으로는 IGF-I/IGFBP-3의 결합형이 anti-IGFBP-3를 투여시 IGFBP-3/anti-IGFBP-3의 결합으로 IGF-I이 IGFBP-3로 부터 분리되어 free IGF-I이 직접 세포증식을 유발시키는 경우이다. 이 기전을 보기 위해 αR_3 (monoclonal antibody to IGF-IR)를 anti-IGFBP-3와 병용투여시 세포증식이 anti-IGFBP-3를 단독 투여군 만큼 증가하였다. 그러나 αR_3 을 4시간 전처치 후 αR_3 과 anti-IGFBP-3를 병용투여시는 anti-IGFBP-3 단독투여시에 보이는 세포증식이 보이지 않고, 대조군과 비슷하게 나타났다. 이것은 αR_3 과 anti-IGFBP-3 병용투여시는 free IGF-I가 αR_3 과 competition하나 세포표면의 IGF-IR에 결합하여 세포증식을 유발시켰으

나, αR_3 을 전처리하는 αR_3 이 세포표면의 IGF-IR와 결합하여 free IGF-I이 IGF-IR와 결합하지 못하여 세포증식이 억제되는 경우로 생각된다. 이상의 결과로 보아 3T3세포의 경우 anti-IGFBP-3투여시 세포증식효과는 IGFBP-3의 세포증식의 억제를 완화하기 보다는, IGF-I/IGFBP-3 결합형에 의해 anti-IGFBP-3투여시 IGF-I이 IGFBP-3로부터 분리되어 세포표면의 IGF-IR를 활성화시켜 세포증식이 발생한 것으로 생각된다.

본 실험의 결과로 3T3 세포는 IGF-I과 IGF-IR transcripts를 갖고 있으며, IGF-I을 투여시 IGF-IR의 β -subunit의 tyrosine kinase domain의 phosphorylation시켜 활성화시키며, IGF-I은 serum-containing media에서 세포증식을 증가시켰다. 또한 anti-IGFBP-3에 의한 3T3 세포증식효과는 IGF-I/IGFBP-3 결합형으로부터 free IGF-I이 분리되어 세포표면의 IGF-IR를 활성화시켜 나타난 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :

세포성장은 세포증식과 세포죽음의 균형에 의해 이루어진다. 세포성장에 관여하는 여러 growth factor 중 IGF-I은 IGF-IR와 결합하여 세포증식을 유발하는 mitogen으로 알려져 있다. 또한 IGF-I에 결합하는 IGFBPs중에 IGFBP-3는 혈액내에 가장 많은 carrier protein으로, IGF-I과 결합하여 IGF-I의 세포증식 효과를 증가 혹은 억제시킨다.

방 법 :

3T3 fibroblast 세포를 이용하여 IGF-I과 IGF-IR transcripts를 northern blot으로 확인하고, IGF-I에 의한 mitogenic effect를 MTT assay 및 3H -thymidine incorporation test로 관찰하고, IGF-I의 receptor인 IGF-IR의 활성화를 보기 위해 intracellular β -subunit의 tyrosine kinase domain의 phosphorylation을 western blot으로 관찰하였다.

또한 IGFBP-3가 3T3 세포에서 mitogenic effect에 미치는 영향을 보기 위해 anti-IGFBP-3와 αR_3 을 단독 및 병용투여하여 관찰하였다.

결 과 :

3T3 세포는 IGF-I과 IGF-IR의 mRNA expression을 보였으며, IGF-I을 투여시 IGF-IR의 intracellular cytoplasmic protein인 β -subunit의 tyrosine kinase domain을 phosphorylation시켜 활성화시키며, 5%, 1% serum-containing media에서 세포증식을 보였으나, serum-free media에서는 세포증식을 보이지 않았다. 또한 anti-IGFBP-3 투여와 αR_3 과 anti-IGFBP-3를 병용투여시는 세포증식이 각각 2배이상 증가하였으나, αR_3 을 4 시간 전처리 후 αR_3 과 anti-IGFBP-3를 병용투여시는 anti-IGFBP-3에 의한 세포증식이 보이지 않은 것으로 보아 IGF-I/IGFBP-3 결합에서 분리되는 free IGF-I에 의해 세포증식이 유도된 것으로 생각된다.

결 론 :

IGF-I은 IGF-IR를 phosphorylation시켜 mitogenic effect를 보이며, IGFBP-3는 IGF-I의 mitogenic effect를 억제하는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Underwood LE, D'Ercole AJ, Clemmons DR and Van Wyk JJ: Paracrine functions of somatomedins. Clin Endocrinol Metab 1986;15:59-77.
2. Barreca A, Minuto F: Somatomedins: Chemical and functional characteristics of the different molecular forms. J Endocrinol Invest 1989;12:279-93.
3. Daughaday WH, Hall K, Rabin MS, Salmon WD, Van Den Brande JL, Van Wyk JJ: Somatomedin: Proposed designation for sulphation factor. Nature 1972;235:107.
4. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE: Tissue concentrations of somatomedin C: further evi-

- dence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984;81:935-39.
5. Froesch ER, Burgi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A: Antibody-suppressible and nonsuppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J Clin Invest* 1963;42:1816-34.
 6. Rinderknecht E, Humbel RE: Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2365-69.
 7. Rinderknecht J, Humbel RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978;253:2769-76.
 8. Salmom WD, Daughaday WH: A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957;49:825-36.
 9. Sundaresan S, Francke U: Insulin-like growth factor I receptor gene is concordant with C-fes protooncogene and mouse chromosome 7 in somatic cell hybrids. *Somat Cell Mol Genet* 1989; 15:373-6
 10. Gammeltoft S, Haselbacher GK, Humbel RE, Fehlmann M, Van Obberghen E: Two types of receptor for insulin-like growth factors in mammalian brain. *EMBO J* 1985;4:3407-12.
 11. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Herzog W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi Y: Insulin like growth factor-I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 1986;4:2503-12.
 12. Clemmons DR, Van Wyk JJ: Somatomedin-C and platelet-derived growth factor stimulate human fibroblast replication. *J Cell Physiol* 1981; 106:361-7.
 13. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993;75:73-82.
 14. Geier A, Beery M, Haimsohn M, Karasik A: Insulin-like growth factor-1 inhibits cell death induced by anticancer drugs in the MCF-7 cells: involvement of growth factors in drug resistance. *Cancer Invest.* 1995;13:480-6.
 15. Sell C, Baserga R, Rubin R: Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995; 55:303-6.
 16. Lyons R.M and Smith G.L: Characterization of multiplication-stimulating activity (MSA) carrier protein. *Mol Cell. Endocrinol* 1986;45:263-70.
 17. Baxter RC, Martin JL, Wood MH: Two immunoreactive binding proteins for insulin-like growth factors in human amniotic fluid: relationship to fetal maturity. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:423-31.
 18. Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga R: Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994;14:3604-12.
 19. DeMellow JS, Baxter RC: Growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein both inhibits and potentiates IGF-I-stimulated DNA synthesis in human skin fibroblasts.

- Biochem Biophys Res Commun 1988;156:199-204.
20. Zapf J, Froesch ER: Insulin-like growth factors/somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res* 1986;24:121-3020.
 21. Guler HP, Zapf J, Froesch ER: Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults. *NEJM* 1987; 317:137-40.
 22. Rechler MM, Nissley SP: Insulin-like growth factor (IGF)/somatomedin receptor subtypes: Structure, function, and relationships to insulin receptors and IGF carrier proteins. *Hormone Res* 1986;24:152-9.
 23. Massague J, Cech MP: The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem* 1982;257:5038-45.
 24. Lammers R, Gray A, Schlessinger J, Ullrich A: Differential signalling potential of insulin- and IGF-I-receptor cytoplasmic domains. *EMBO J* 1989;8:1369-75.
 25. Sandberg AC, Engberg C, Lake M, von Holst H, Sara VR: The expression of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neurosci Lett* 1988;31:93, 114-9.
 26. Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG: Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 1987;120:1279-82.
 27. Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell G, Shows TB: Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. *Cancer Res* 1986;46:6169-73.
 28. Rotwein P: Two insulin-like growth factor I messenger RNAs are expressed in human liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:77-81.
 29. Hamon GA, Hunk TK, Spencer EM: In vivo effects of systemic insulin-like growth factor-I alone and complexed with insulin-like growth factor binding protein-3 on corticosteroid suppressed wounds. *Growth Regulation* 1993;3:53-6.
 30. Clemmons DR: IGF binding proteins and their functions. *Mol Reprod Dev* 1993;35:368-74.
 31. Clemmons DR, Busby WH, Wright G: Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. *Ann NY Acad Sci* 1993;692: 10-21.
 32. Rechler MM: Insulin-like growth factor binding proteins. *Vitamins Horm* 1993;47:1-114.
 33. Martin JL, Baxter RC: Insulin-like growth-factor binding protein from human plasma. Purification and characterization. *J Biol Chem* 1986;261: 8754-60.
 34. Baxter RC, Martin JL: Structure of the Mr 140,000 growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex: Determination by reconstitution and affinity-labeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6898-902.
 35. Binoux M, Hossenlopp P: Insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins: Comparison of human serum and lymph. *J Clin Endo Metab* 1988;67:509-14.