

골감소증 환자의 혈청중 Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-5의 변화

김 영 · 남택정*

부경대학교 식품생명공학부

Changes in Serum Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-5 of Osteopenia

Young Kim and Taek-Jeong Nam*

Faculty of Food science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Insulin-like growth factor (IGF)-I and II are important mitogenic and anabolic peptides and are thought to be involved in regulating the proliferation and differentiation of a number of cell types *in vitro* and *in vivo*. IGFs exist in serum and other biological fluids, as complexes bound to a family of structurally related proteins, termed IGF-binding proteins (IGFBPs). A family of structurally related IGFBPs, different from the IGF receptors, is believed to be involved in the modulation of IGF action in different tissues, including bone tissue. Of the several IGFBPs, stimulatory IGFBP-5, which has a strong affinity for hydroxyapatite, is the major IGFBP stored in human bone. In this study, I investigated the changes of IGFBP-5 in serum from osteopenia patients. The amounts of IGFBP-5 in osteopenia were reduced when they were compared with normal standards. These changes were activated by IGFBP-5 proteases. IGFBP-5 protease that cleaves IGFBP-5 in osteopenia serum had properties which were serine protease and metalloprotease, because EDTA and 1,10-phenanthroline (both are metalloprotease inhibitors), aprotinin, heparine, heparine cofactor 2 (HC2), and heparine+HC2 (those are serine protease inhibitors) had inhibitory activities. IGF-I, IGF-II and insulin showed no inhibitory effects on the IGFBP-5 proteases. Gelatin zymography showed that 66 kDa and 97 kDa bands were identified in normal standards, and 69 kDa band was identified in osteopenias.

Key words: insulin-like growth factors (IGFs), IGF binding protein-5, osteopenia

서 론

Insulin-like growth factors(IGF-I과 IGF-II)는 구조상으로는 proinsulin과 비슷하며, 주로 간 또는 신체 각 부위에서 국소적으로 생성되어 각종 세포의 증식과 분화를 조절하고, 세포성장에도 관여한다(1-3). 혈청과 조직액에서 IGFs는 높은 친화력을 가진 결합단백질(IGF binding proteins; IGFBPs)과 복합체로 존재하며, 이들 결합단백질의 1차구조와 유전자 배열이 밝혀져서 IGFBP-1부터 IGFBP-6까지 명명되어 있다(4-11). IGFBPs는 IGFs의 유사분열 촉진작용과 다른 생물학적 작용들을 촉진하거나 억제하는데(6-8,12,13) 이것은 인산반응과 관계없이 존재하는 IGFBPs의 종류와 관련된 특별한 표적세포에 의존한다(14). 순환계내에서 IGFBPs는 혈관내피세포층을 통과하는 IGF peptide의 통행을 제한하거나 조절하고 IGF-I의 반감기를 연장시킨다(14,15). IGFBP-5는 사람

의 유사 조골세포(human osteoblastic like cells)와 뼈세포의 추출물에서(6) 분리되었고, IGF가 유도하는 뼈세포 증식의 촉진제이다(7). IGFs는 뼈에서 스스로 collagen이나 hydroxyapatite에 대하여 강한 결합친화력을 나타내지 않는 반면에 IGFBP-5는 hydroxyapatite와 IGFs 양쪽에 대하여 높은 친화력으로 결합되므로서 IGFs가 IGFBP-5에 의하여 작용이 증가된다(6). 또한 IGFBP-5는 bone (6), human fibroblasts(16), MC3T3-E1 osteoblasts의 외세포 간질에 결합하여 matrix-bound-IGFBP-5가 외세포 간질에서 IGFs의 저장소 역할을 하기도 한다(17). 사람의 뼈세포와 섬유아세포, 조골세포, 혈청은 IGFBP-5에 상대적으로 특이적인 단백질분해효소를 생산하고 이것은 다른 IGFBPs는 분해하지 않고 IGFBP-5만 분해한다(18-22) 본 연구는 IGFBP-5가 골감소증 환자에 있어서 어떤 변화를 보이는가를 살펴보고 또 그 영향이 어떤 효소에 의해 조절되고 있는가를 검토하였다.

*To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

대상

연세대학교 의과대학 내분비연구소로부터 골감소증 환자 9명(환자군)과 7명의 정상인(대조군) 혈청을 받았으며, 환자군과 대조군 모두 여성이었다. 이들은 생리적 시험, 소변검사, 그리고 일반적인 임상검사에 의한 중요한 골감소증 외에 다른 질병은 없었다. 그리고 이들의 평균 연령은 환자군은 55.6 ± 4.9 (n=9)세이었고, 정상 대조군은 51.6 ± 3.6 (n=7)세이었다.

시약 및 기구

전기 영동에 사용된 시약은 모두 Sigma사(USA) 제품을 사용하였으며, PVDF membrane은 Immobilon-PS^Q transfer membrans(Millipore, pore size : 0.1 μ m, USA), 전기 영동장치는 Mighty Small II Apparatus(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA), electroblotter는 Janssen Life Sciences, autoradiography-용 film은 Eastman Kodak, 요오드화된 IGF-I, IGFBP-5 및 정제된 IGFBP-5와 IGFBP-5 항체는 미국 North Carolina 대학교 의과대학 내분비 연구실의 David R. Clemmons 박사의 연구실에서 일부 제공받아 사용하였다. 저해제인 EDTA는 Fisher Scientific제품을, PMSF, benzamidine, aprotinin은 Sigma사 제품을 사용하였다.

혈액 채취 및 처리

9명의 골감소증(osteopenia) 환자군은 모든 혈액 채취 전날밤 12시간동안 금식한 뒤 각 환자들의 정맥혈에서 4~5 mL씩 채취하였다. 또한 7명의 정상 대조군은 식후 2시간이 경과한 뒤 혈액을 함께 채취하였다. 병실에서 채취한 혈액은 즉시 3000 rpm으로 5분동안 원심분리하여 혈청만 분리하여 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Human IGF-I 및 IGFBP-5의 요오드화 (iodination)

Human IGF-I의 요오드화는 chloramine-T법(Greenwood 등, 1963; Rand-Weaver 등, 1992)을 변형하여 실시하였다. 즉 h-IGF-I을 pH 7.5인 0.5 M sodium phosphate buffer(PB)에 용해시켜 1 μ g/10 μ L의 최종 농도로 만들고, 5 μ L chloramine-T(80 μ g/mL in PB)와 ¹²⁵I-Na(0.5 mCi/5 μ L, Amersham Corp., Chicago, IL) 5 μ L의 용액을 첨가함으로써 요오드화 시킨 다음 sodium metabisulfate(80 μ g/mL in PB) 5 μ L와 10 mM PB 100 μ L의 첨가로 반응을 중단시켰다. 유리 요오드와 ¹²⁵I-labeled h-IGF-I의 분리는 Bio-Gel PGDG(Bio-Rad, Richmond, CA)의 칼럼(1×20 cm)을 이용하였다. 혼합 용액은 140 mM NaCl과 0.2%(w/v) bovine serum albumin(BSA; RIA급, Sig-

ma)을 함유하는 pH 7.5의 20 mM sodium phosphate buffer로 용출시켜서, 각 획분(0.5 mL)은 polyethylene tubes로 모으고, ¹²⁵I-labeled h-IGF-I을 함유하는 획분들을 모두 혼합한 다음 50% glycerol과 섞은 후 -70°C에서 사용할 때까지 저장하였다.

IGFBP-5의 정제

기능성 세포인 Chines Hamster Ovary Cell에서 human IGFBP-5를 생산시켜 그 배양액을 phenyl sepharose L-4B column과 IGF-I affinity column, 그리고 Reverse-phase HPLC C-4 column으로 정제한 것을 사용하였다. 이 정제 방법은 미국 North Carolina 대학교 의과대학 내분비 연구실 David R. Clemmons 박사의 연구실에서 이용하고 있는 방법이며, 본 연구에서도 그 곳 연구실에서 정제한 IGFBPs를 일부 제공받아 사용하였다.

IGFBP-5의 항체 조제

Human-IGFBP-5에 대한 항체는 guinea pig로 조제하였다. 항원(4~5 μ g)을 증류수 50 μ L에 용해시켜, 0.9% NaCl로 1 mL로 희석한 후 complete Freud's adjuvant 1 mL(Sigma)로 유화하여 guinea pig에 3주 간격으로 6회 피하주사하였다. 항 h-IGFBP-5 혈청 titers 측정을 위한 test bleeding을 세 번, 네 번, 다섯 번의 주사후에 실시하였다. Guinea pig는 마지막 주사후 2주 사육하고, 혈청은 사용될 때까지 -70°C에서 저장하였다.

IGF-I 농도 측정

IGF-I IRMA kit 시약(Nichols Institute, California)을 사용하여 사람 혈청내 IGF-I의 양을 radioisotopic assay로 측정하였다. 시약을 설명서에 따라 조제한 후 acidification buffer로 sample을 acidification시켰다. 표식한 튜브에 표준용액(Reagent C-H), control(Reagent J, K), 산성화한 시료를 각각 50 μ L 넣었다. 여기서 사용된 표준 용액은 각각 0, 30, 95, 275, 560, 1000 ng/mL의 농도를 나타내고 control은 75~135, 200~352 ng/mL의 농도범위를 가진다. Biotin 항체용액 B1 100 μ L와 ¹²⁵I 항체용액 B2 100 μ L를 넣은 후, avidin coated bead 시약 A를 튜브당 1개씩 넣었다. 18~25°C 실온에서 180±10 rpm으로 4시간동안 반응시킨 후 beads는 세척용액 12 mL로 3회 세척하고 γ -counter(Wallac 1470 Wizard Pharmacia)로 측정하였다.

Western ligand blot

Hossenlopp 등의 방법(23)을 일부 변형하여 분석하였다. 시료 1 μ L를 비환원 sodium sulfate(SDS) sample buffer(0.5 mol/L Tris, pH 6.8; 69% glycerol, 4% SDS)

에 희석하고 12.5% discontinuous SDS-polyacrylamide gel에 loading시킨 후 30 mA에서 Might Small II Apparatus(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA)로 전기영동하였다. 분리된 단백질은 Hoefer Semi-dry Electrobloetter에서 58mA, 90분간 Immobilon-PS^Q transfer membrane(Millipore Corp., pore size; 0.1 μm MA, USA)에 옮겼다. 이 때 표준 분자량은 rainbow marker (Amersham, U.K)를 이용하였다. Membrane을 건조한 후 3% Nonidet P-40을 넣은 LBB A(Ligand Blot Buffer A)로 15분, 1% BSA를 넣은 LBB B로 blocking하였다. ¹²⁵I-IGF-I 또는 ¹²⁵I-IGF-II (500,000 cpm)로서 incubation (저온실, overnight)시킨 후 LBB C에서 10분간 3회(저온실), LBB(10mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% mg/mL Na azide, pH 7.4)로 15분간 2회(저온실) 세척하여 건조시켰다. 건조된 membrane은 autoradiography로 band를 확인하였다.

Western immunoblot

Western ligand blot과 같은 방법으로 전기영동을 실시한 후 membrane을 1× Tris-buffered saline(TBS; 50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4)으로 세척하고, 3% BSA로 blocking하여 1 : 1000으로 희석한 1차 항체로 하룻밤 반응시켰다. 1X TBS+0.1% IGEPAL CA-630(Sigma I 302)+0.03% Triton X-100으로 세척하고 1×TBS로 세척후 1 : 2000으로 희석한 2차 항체(anti-guinea pig IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)와 반응시켰다. 1X TBS+0.1% IGEPAL CA-630(Sigma I 3021)+0.03% Triton X-100으로 세척하고 1×TBS로 세척후 color substrate solution(NBT/BCIP, Promega)으로 발색하였다. 보라색의 band를 확인한 후 stop buffer(20 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0)를 넣어 반응을 종결시켰다

Gelatin zymography

Gelatin이 gel당 10 mg 함유된 10% SDS-polyacrylamide gel을 전기영동하여 4 mM CaCl₂가 함유된 50mM Tris buffer(pH 7.4)에 gel을 넣어 37°C에서 하룻밤 방치시켰다. Gel을 고정액(7% acetic acid, 40% methanol)으로 고정시키고 0.1% coomassie brilliant blue로 염색한 후 탈색시켜(7% acetic acid, 20% methanol) band를 확인하였다.

통계처리

측정된 결과는 means±SE로 나타내었고, 두 군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

IGF-I의 농도 비교

Table 1은 정상 대조군과 골감소증 환자군의 혈청내 IGF-I의 농도를 비교한 것이다. 정상 대조군에서는 7.76 ± 1.44로 골감소증 환자군에서는 8.24±1.08로 정상 대조군에 비해 골감소증 환자군에서 약간 높게 나타났으나 유의성이 없어 두 군 간의 농도 차이가 없는 것으로 보인다.

Western ligand blot에 의한 혈청 IGF-BPs의 분석

Fig 1의 lane 1~4는 정상 대조군을, lane 5~9는 골감소증 환자군을 나타낸다. 여기서 IGFBP-5는 IGFBP-1과 같은 크기로 band가 겹쳐있을 가능성도 크다. 정상 대조군에 비해 IGFBP-4는 39%, IGFBP-3는 28%, IGFBP-2는 28%, IGFBP-1은 23%가 감소하여, 골감소증 환자의 혈청내에 존재하는 IGF-BPs의 양이 전반적으로 감소하였다. 이 감소 현상은 IGF-BPs를 분해시키는 단백질분해효소의 영향일 것으로 생각된다. IGF-BPs는 IGFs와 혈액내에서는 결합하여 안정된 상태로 존재하고 있고(24,25), 순환중인 IGFs를 표적세포로 운반해 주는 역할도 하고 있다(26) 그러므로 Table 1에서 정상 대조군이나 골감소증 환자나 IGF-I의 값이 거의 같게 나타나는데도 불구하고 골감소증 환자의 경우에 혈액내의 IGF-BPs의 양이 부족하여 IGFs의 세포내 이동량의 감소로 IGF-I의 뼈세포에 대한 작용이 감소되는 것으로 보인다. 그러나 IGF-BPs는 특별한 IGFBP, 세포종류, 생리적 상태, IGF-BPs에 특이적인 단백질분해효소에 따라 IGFs의 증식작용과 유사 분열 촉진작용을 증진시키거나 억제시키는 작용을 하는

Table 1. Insulin-like growth factor-I level in serum of osteopenia patients

Samples	IGF-I (μg/mL) ¹⁾
Control	7.76±1.14 (n=7)
Osteopenia	8.24±1.08 (n=8)

¹⁾Values are means ± SE

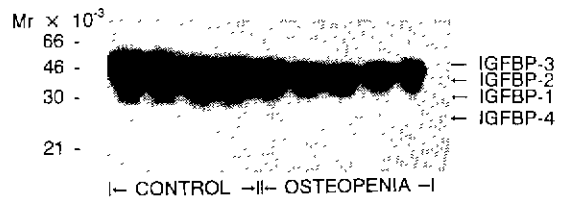


Fig 1. Western ligand blot analysis of serum IGF-BPs in normal adults and osteopenia patients. Following SDS-PAGE (12.5% gel, 1 μL pooled serum samples per slot) and transfer to immobilon-PS^Q membrane, IGF-BPs were detected by incubation with ¹²⁵I-IGF-I to identify the different forms of IGFBP (see Materials and Methods). Molecular markers are indicated on the left.

데(27-29), 골감소증 환자 혈청내의 IGFBP5의 양이 전반적으로 감소된 것에 대해서는 앞으로 더 검토되어야 할 것으로 생각한다

Serum pool에 대한 western immunoblot 분석

Fig 2는 IGFBP-5에 대한 western immunoblot 분석 결과이며, lane 1은 대조군, lane 2는 골감소증 환자군을 나타낸다. 30kDa의 IGFBP-5는 정상인의 혈청에서 관찰할 수 있지만 골감소증 환자는 90%가 감소되었다. 즉 IGFBP-5가 골감소증 환자의 혈청내에서 단백질분해효소의 작용으로 분해되어 양적으로 감소된 것을 의미한다. 실제로 Fig. 3A의 ¹²⁵I-IGFBP-5와 함께 배양한 autoradiography 중에서 골감소증환자의 혈청중 저해제를 포함하지 않는 lane 1의 대조군에서 IGFBP-5 band와 함께 21kDa와 14 kDa 부근에서 단백질분해효소의 작용에 의한 fragments를 볼 수 있었다. 이것은 human osteosarcoma(21), 사람의 뼈세포(30), MC3T3-E1 murine osteoblast(29,31)가 IGFBP-5를 분해하는 단백질분해효소를 생성한다는 보고들과 같은 결과이다. Intact IGFBP-5는 뼈세포 간질에 고정되고(18), 또 IGFBP-5는 뼈세포 간질에 IGFs를 결합시키면서 조골세포의 성장에 대한 IGFs의 작용을 촉진시킨다(7). 그러므로 골감소증 환자의 IGFBP-5의 감소는 뼈세포 간질에 IGFs의 결합을 감소시키고, 뼈세포에 대한 IGFs의 성장 촉진 작용도 감소시키게 된다. 그러나 IGFBP-5가 단백질분해효소의 작용으로 감소되는 경우에 골감소증 환자는 어떻게 해서 정상 대조군보다 단백질분해효소의 활성이 높게 나타난 이유는 아직 확실하지 않다.

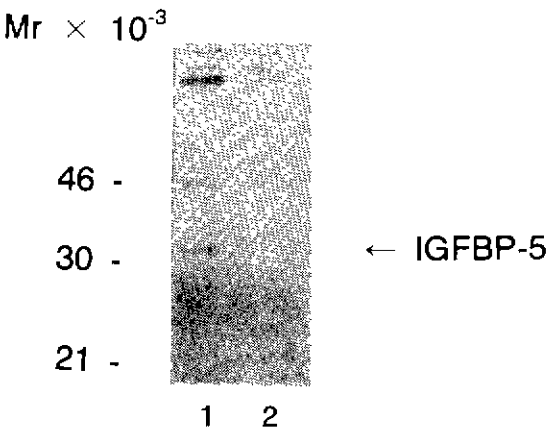


Fig. 2. Western immunoblot of osteopenia serum. Pooled serum samples (1 m 5 μL per slot) were submitted to SDS-PAGE (12.5% gels) and then transferred onto immobilon-PS^Q membrane. The membranes were incubated with each anti-IGFBP antibodies, and the protein-antibody complexes were detected by immunoenzymatic reaction. Molecular markers are indicated on the left. Lane 1: control, lane 2: osteopenia.

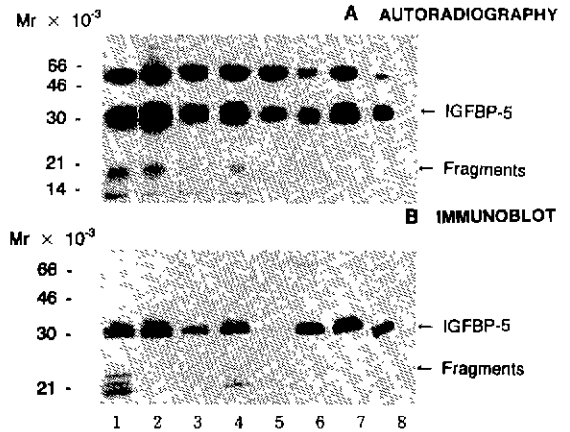


Fig. 3. Protease inhibitor profiles for IGFBP-5 protease. A, Serum (1 μL) was incubated with ¹²⁵I-IGFBP-5 at 37°C in presence of various protease inhibitors. The products were analyzed by autoradiography. B, serum (1 μL) was incubated at 37°C in presence of various protease inhibitors. The products were analyzed by immunoblotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows. Lane 1, control, lane 2, EDTA (5 mM); lane 3, PMSF (1.5 mM); lane 4, 1,10-phenanthroline (2.16 mM); lane 5, PMSF (3 mM); lane 6, 3,4-DCI (1.12 mM); lane 7, aprotinin (1 mM); lane 8, benzamidine (1.5 mM)

Proteolysis에 대한 단백질분해효소 저해제의 영향

Fig. 3의 A는 serum 1 μL를 Tris buffer에 ¹²⁵I-IGFBP-5와 함께 37°C에서 반응한 것으로 각 lane마다 저해제를 달리하여 반응시킨 후 sample buffer로 반응을 정지시키고 나서 12.5% SDS-PAGE방법으로 전기영동한 후 PVDF membrane에 옮겨 autoradiography로 관찰한 것이다. Lane 1은 대조군 serum pool이고, lane 2는 저해제로 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 5 mM, lane 3은 phenylmethyl-sulfonyl fluoride(PMSF) 1.5 mM, lane 4는 1, 10-phenanthroline 2 mM, lane 5는 PMSF 3 mM, lane 6은 3,4-dichloroisocoumarin(DCI) 1 mM, lane 7은 aprotinin 1 mM, lane 8은 benzamidine 1.5 mM을 사용한 경우이다. Lane 1의 정상 대조군에서는 IGFBP-5의 fragments들을 볼 수 있다. 여기서 metallo계인 lane 2의 EDTA와 lane 4의 1,10-phenanthroline 및 serine계인 lane 7의 aprotinin의 경우는 IGFBP-5의 양이 각각 36%, 16%, 4%씩 증가하여 저해효과를 가지며 lane 3의 PMSF 1.5mM과 lane 5의 PMSF 3 mM, lane 6의 3,4-DCI, lane 8의 benzamidine의 경우에는 IGFBP-5의 양에 대한 분해효소의 작용에 저해효과가 미약한 것으로 나타났다. Fig. 4의 A는 peptide A(peptide A는 IGFBP-5내에 존재하는 18개 아미노산으로 구성된 peptide이다), α-anti-chymotrypsin inhibitor, heparin, heparin cofactor 2(HC2), heparin + HC2를 저해제로 사용한 결과이다. Lane 1은 peptide A, lane 2는 α-anti-chymotrypsin inhibitor, lane 3은 heparin, lane 4는 heparin cofactor 2(HC2), lane 5는 heparin

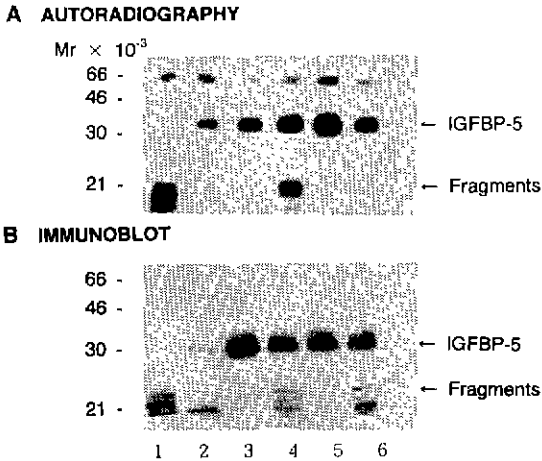


Fig. 4. Effects of peptide A, α -antichymotrypsin inhibitor, heparin, HC2 on IGFBP-5 protease activity. A, serum (1 μ L) was incubated with 125 I-IGFBP-5 at 37 $^{\circ}$ C in presence of various protease inhibitors. The products were analyzed by autoradiography B, serum (1 μ L) was incubated at 37 $^{\circ}$ C in presence of various protease inhibitors. The products were analyzed by immunoblotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows. Lane 1, peptide A (1 μ g); lane 2, α -antichymotrypsin inhibitor (0.1 μ g); lane 3, heparin (2.8 μ g); lane 4, HC 2 (1.02 μ g); lane 5, heparin+HC 2 (3.1 μ g); lane 6. control

+HC2, lane 6은 대조군을 나타낸다. 여기서 serine계 protease인 lane 3의 heparin과 lane 5의 heparin+HC2의 경우 intact IGFBP-5가 각각 12%와 57%의 증가효과를 보였고 lane 2의 α -antichymotrypsin inhibitor와 lane 4의 HC2는 약한 저해효과를 보였다. 그러므로 Fig. 4A의 경우와 함께 설명한 metalloprotease이면서 serine protease의 성질을 가지는 효소들이 IGFBP-5에 작용하는 것으로 생각된다.

Fig. 3의 B는 IGFBP-5 proteolysis에 대한 단백질분해 효소 저해제의 효과를 알아보기 위하여 western-immunoblot를 실시한 결과이다. 시료 조제는 serum pool에 대한 western-immunoblot에서 설명한 바와 같으며, lane 1은 control serum pool, lane 2는 저해제로 EDTA 5mM, lane 3은 PMSF 1.5 mM, lane 4는 1,10-phenanthroline 2 mM, lane 5는 PMSF 3 mM, lane 6은 3,4-DCI 1 mM, lane 7은 aprotinin 1 mM, lane 8은 benzamidin 1.5 mM이다. 이 결과에서도 역시 125 I-IGFBP-5를 사용한 결과와 유사한 결과를 보였다. Lane 2 EDTA와 lane 4 1,10-phenanthroline, 그리고 lane 7 aprotinin의 저해제의 경우에 대조군보다 intact IGFBP-5가 각각 27%, 2%, 37%가 증가하였고 fragments는 각각 79%, 32%, 88%가 저해되어 IGFBP-5 protease에 대해 완전한 저해효과를 나타내었고, lane 3, 5, 6, 8의 저해제는 약한 저해효과만을 보였다. Fig. 4의 B는 peptide A, α -antichymotrypsin inhibitor, heparin, heparin cofactor 2(HC2), heparin+HC2를

저해제로 사용한 결과이다. 역시 각 lane은 Fig. 4A와 같은 저해제를 이용한 것이다. Lane 3의 heparin의 경우 intact IGFBP-5가 55% 증가, fragments는 81% 저해효과를 보이고 lane 4의 HC2와 lane 5의 heparin+HC의 경우 fragments가 각각 54%, 80%의 저해효과를 보였다. lane 2의 α -antichymotrypsin inhibitor는 아무런 저해효과도 보이지 않았다. Western immunoblot 결과 역시 autoradiography의 결과와 함께 IGFBP-5에 작용하는 효소들은 metalloprotease이면서 serine protease 성질을 가지고 있음을 알 수 있다. Fig. 5A는 저해제로 IGF-I과 IGF-II 그리고 insulin의 영향을 western ligand blot으로 살펴본 결과이다. 이들 모두 IGFBP-5가 뚜렷하게 관찰되는 것으로 보아 IGF-I, IGF-II 그리고 insulin에 의한 IGFBP-5 protease 작용에 아무런 영향이 없는 것으로 여겨진다. 이것은 앞에서 설명한 바와 같이 IGF-I의 농도는 정상군이 나 골감소군에서 거의 비슷한데도 불구하고 IGFBPs의 값은 감소한 것으로도 설명이 가능하다. Fig 5의 B는 IGF-I, IGF-II 그리고 insulin에 대한 저해효과를 immunoblot로 실시한 결과로서 역시 효소 작용에는 아무런 영향이 없었다.

Gelatin zymography

Fig. 6은 metalloprotease의 종류를 확인하기 위해 gel-

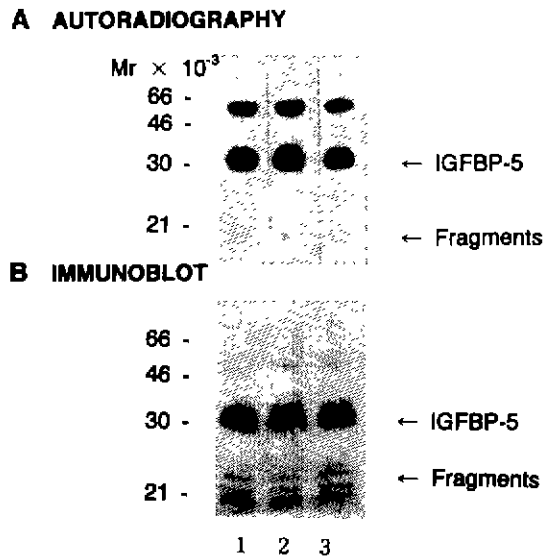


Fig. 5. Effects of IGF-I, IGF-II and insulin on IGFBP-5 protease activity. A, serum (1 μ L) was incubated with 125 I-IGFBP-5 at 37 $^{\circ}$ C in presence of IGF-I, IGF-II and insulin. The products were analyzed by autoradiography. B, serum (1 μ L) was incubated at 37 $^{\circ}$ C in presence of IGF-I, IGF-II and insulin. The products were analyzed by immunoblotting, and the relative migration positions of fragments are also noted by arrows. Lane 1, IGF-I (10 ng); lane 2, IGF-II (10 ng); lane 3, insulin (10 ng).

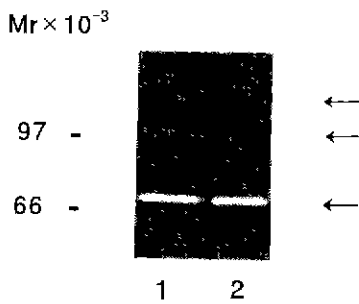


Fig. 6. Gelatin zymography.

Serum was electrophoresed on 10% SDS-PAGE that contained cross-linked gelatin. After electrophoresis, the gel was rinsed multiple times in 2.5% Triton X-100 to remove SDS and then incubated for an additional 24h at 37°C. Gel was fixed with fixing solution, stained with staining solution and destained. Lane 1, control; lane 2, osteopenia.

atin zymography로 관찰한 결과이다. Lane 1은 정상 대조군이며, lane 2는 골감소증 환자군을 나타낸 것이다. Human fibroblast에서는 92 kDa 단백질분해효소가 IGFBP-5를 분해시키는데(31), MC3T3-E1 osteoblast cell은 52-72 kDa과 97 kDa의 단백질분해효소가 IGFBP-5 분해에 관여한다고 보고되었다(30). 본 실험에서는 정상 대조군에서는 97 kDa과 69 kDa의 band가 확인되었고 골감소증 환자에서는 69 kDa의 band만이 확인되었다. 정상인에서 나타난 97 kDa 부근의 band가 환자군에서 왜 나타나지 않는지에 대해서는 다시 검토해야 할 과제라고 생각한다.

요 약

골감소증 환자의 혈청중에 존재하는 IGFBP-5의 존재와 변화를 검토한 결과, 골감소증 환자에서는 정상 대조군에 비해 IGFBP-5가 감소하였는데 이 변화는 IGFBP-5의 분해효소가 작용하기 때문인 것으로 나타났다. IGFBP-5에 작용하는 단백질분해효소 저해제중 metallo제인 EDTA 및 1,10-phenanthroline과 serine제인 aprotinin, heparin, heparin cofactor 2(HC2), heparine+HC2가 IGFBP-5에 대해 저해효과가 크므로 metalloprotease이면서 serine protease의 성질을 가지는 효소들이 IGFBP-5에 작용하였다. IGF-I과 IGF-II 그리고 insulin은 효소 활성에 아무런 영향이 없었다. IGFBP-5의 zymography에서 정상인과 골감소증 환자에서 180 kDa 크기의 band가 나타났고, gelatin zymography에서 정상 대조군의 경우 66 kDa과 97 kDa 정도의 band가 확인되었고 골감소증 환자의 경우는 69 kDa의 band가 확인되었다.

문 헌

1. Daughaday, W H and Rotwein, P. : Insulin-like growth

factors 1 and 2. Peptide messenger ribonucleic acid, gene structures, and serum and tissue concentrations. *Endocr. Rev.*, **10**, 68-91 (1989)

2. Daughaday, W H . A personal history of the origin of the somatomedin hypothesis and recent challenges to its validity. The somatomedin hypothesis. *Perspect. Biol Med.*, **32**, 194-211 (1989)

3. Hock, J.M., Centrella, M. and Canalis, E. : Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology*, **122**, 254-260 (1988)

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

5. Shimasaki, S., Gao, L., Shumonaka, M. and Lmg, N . Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factors binding protein 6. *Mol. Endocrinol.*, **5**, 938-941 (1991)

6. Bautista, C.M., Baylink, D.J. and Mohan, S. ' Isolation of a novel insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human bone' a potential candidate for fixing IGF-II in human bone *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 756-763 (1991)

7. Andress, D.L. and Birnbaum, R.S. : Human osteoblast-derived insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 stimulates osteoblast mitogenesis and potentiates IGF action. *J. Biol. Chem.*, **267**, 22467-22472 (1992)

8. Mohan, S., Bautista, C.M., Wergedal, J. and Baylink, D.J. : 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 (1989)

9. Amarnani, S., Merriman, H.L., Linkhart, T A , Baylink, D.J. and Mohan, S. : Autocrine regulators of MC3T3-E1 cell proliferation *J. Bone Min. Res.*, **8**, 157-165 (1993)

10. Kiefer, M.C., Ioh, R.S., Bauer, D. and Zapf, J . Molecular cloning of a new human insulin-like growth factor binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **176**, 219-225 (1991)

11. Wilson, E.M., Oh, Y. and Rosenfeld, R.G . Generation and characterization of an IGFBP-7 antibody ' Identification of 31 kDa IGFBP-7 in human biological fluids and Hs578T human cancer conditioned media *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1301-1303 (1997)

12. Feyen, J.H.M., Evans, D.B, Binkert, C., Heinrich, G.F., Geisse, S. and Kocher, H.P. ' Recombinant human [Cys 281]insulin-like growth factor-I stimulated proliferation and collagen synthesis in fetal rat calvariae. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19469-19474 (1991)

13. Campbell, G. and Novak, J.F . Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) inhibits IGF action on human osteosarcoma cells. *J. Cell. Physiol.*, **149**, 293-300 (1991)

14. McCusker, R.H. and Clemmons, D.R. : The insulin-like growth factor binding proteins' structure and biological functions. In *The insulin-like growth factors. structure, and biological functions*. Schofield, P.N (ed), Oxford University Press, Oxford, p.110-150 (1992)

15. Martin, J.L. and Baxter, R.C. : Insulin-like growth factor binding protein-3 ' biochemistry and physiology. *Growth Regul.*, **2**, 88-99 (1992)

16. Jones, J.I, Gockerman, A., Busby, Jr.W H. Camacho-Hubner, C. and Clemmons, D.R. : Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5 potentiation of the effects of IGF-I. *J. Cell. Biol.*, **121**,

- 679-687 (1993)
- 17 Hakeda, Y., Kawaguchi, H., Hurley, M., Pilbeam, C.C., Abreu, C., Linkhart, T., Mohan, S., Kumegawa, M. and Raisz, L.G.: Intact insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) associates with bone matrix and the soluble fragments of IGFBP-5 accumulated in culture medium of neonatal mouse calvariae by parathyroid hormone and prostaglandin E2 treatment. *J. Cell. Physiol.*, **166**, 370-379 (1996)
 - 18 Andress, D.L. and Birnbaum, R.S.: A novel human insulin-like growth factor binding protein secreted by osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 213-218 (1991)
 - 19 Nam, T.J., Busby, W.H. JR. and Clemmons, D.R.: Human fibroblasts secrete a serine protease that cleaves insulin-like growth factor-binding protein-5. *Endocrinology*, **135**, 1385-1391 (1994)
 - 20 Mohan, S. and Baylink, D.J.: Characterization of the IGF regulatory system in bone Dept of Medicine, biochem and physiol. Loma Linda Univ and Pettis VA medical center, p.397-406 (1994)
 - 21 Conover, C.A. and Kiefer, M.C.: Regulation and biological effect of endogenous insulin-like growth factor binding protein-5 in human osteoblastic cells *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **76**, 1153-1159 (1993)
 - 22 Kiefer, M.C., Schmid, C. and Waldvogel, M.: Characterization of recombinant human insulin-like growth factor binding proteins 4, 5 and 6 produced in yeast. *J. Biol. Chem.*, **267**, 12692-12699 (1992)
 - 23 Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin and Binoux, M.: 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 (1986)
 - 24 Report on the nomenclature of the IGF binding proteins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **70**, 817-818 (1990)
 - 25 Baxter, R.C.: Circulating binding proteins for the insulinlike growth factors *Trans. Endocrinol. Metab.*, **4**, 91-96 (1993)
 - 26 Elgin, R.G., Busby, W.H.J. and Clemmons, D.R.: An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc. Acad. Sci. USA*, **84**, 3254-3258 (1987)
 - 27 Rutanen, E.M., Pekonen, F. and Makinen, T.: Soluble 34 K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor-I to its cell receptors in human secretory phase endometrium: Evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66**, 173-180 (1988)
 - 28 Clemmons, D.R., Elgin, R.G., Han, V.K.M., Casella, S.J., D'Ercole, A.J. and Van Wyk, J.J.: Cultured fibroblast monolayers secrete a protein that alters the cellular binding of somatomedin-C/insulin-like growth factor I. *J. Clin. Invest.*, **77**, 1548-1556 (1986)
 - 29 Kanzaki, S., Hilliker, S., Baylink, D.J. and Mohan, S.: Evidence that human bone cells in culture produce insulin-like growth factor-binding protein-4 and -5 proteases. *Endocrinology*, **134**, 383-392 (1994)
 - 30 Thrallkill, K.M., Quarles, L.D., Nagase, H., Suzuki, K., Serra, D.M. and Fowlkes, J.L.: Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation *Endocrinology*, **136**, 3527-3533 (1995)
 - 31 Nam, T.J., Busby, W.H. Jr and Clemmons, D.R.: Characterization and determination of the relative abundance of two types of insulin like growth factor binding protein-5 proteases that secreted by human fibroblasts. *Endocrinology*, **137**, 5530-5536 (1996)

(2000년 3월 24일 접수)