

사람의 섬유아세포에서 glucose 농도가 물질대사 및 Insulin-like growth factor binding protein-3의 발현에 미치는 영향

류혜영 · 황혜정 · 김인혜 · 류홍수 · 남택정*

부경대학교 식품생명공학부

Received March 29, 2007 / Accepted April 20, 2007

Effects of glucose on metabolism and Insulin-like growth factor binding-3 expression in human fibroblasts. Hye Young Ryu, Hye Jung Hwang, In Hye Kim, Hong Soo Ryu and Taek Jeong Nam*. Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea - Insulin-like growth factor-I (IGF-I) has significant insulin-like anabolic effects which include the stimulation of glucose and amino acid uptake, as well as protein and glycogen synthesis. IGFs exist in serum and other biological fluids as complexes bound to a family of structurally related insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs). Six human IGFBPs can modulate the effects of IGFs on target tissues by several mechanisms, including altering the serum's half-life and the transcapillary transport of IGFs, as well as changing the availability of IGFs to specific cell surface receptors. Human fibroblasts secrete IGFBPs that can modify IGF-I action. Previous to our study using either Northern blotting, and Western blotting have shown that fibroblasts express mRNA IGFBP-3, -4, and -5, and synthesize these proteins. In addition, fibroblast cell lysates revealed that the IGFBP-3 was most abundant. For these reasons, we undertook to gain further insight into the effects of high and low glucose incubation condition on metabolism and IGFBP-3 expression. In results of metabolites and IGFBP-3 expression in GM10 cells cultivated with various glucose concentration, the consumption of glucose and accumulation of triglyceride were increased in condition of high glucose, and total protein level was decreased in the course of time. After 5 days incubation, levels of free amino acid in medium containing glucose of high concentration glucose were higher than in conditions of low glucose. Although the levels of IGFBP-3 protein and mRNA levels were increased in low glucose, and IGFBP-3 was not affected by any protease. Taken together, we suggest that the study of growth factors, like IGFs, might be a possible model of diabetes militus in cell, although the results in cell models were not in accord with *in vivo*.

Key words - IGFs, IGFBP-3, glucose, diabetes

서 론

경제적 생활수준의 향상과 더불어 식생활과 생활양식이 서구화되면서 각종 성인병이 증가하는 추세이다. 그 중에서도 당뇨병은 주된 에너지 생성 원료인 당질의 대사장애를 일으키는 것이며, 지질대사 또는 단백질대사도 이상을 초래한다고 알려져 있다[24]. 이같은 대사이상은 기본적으로 인슐린 부족에 의해 일어나는데, 인슐린은 근육조직과 지방조직의 포도당 이용을 촉진시키고, 간장에서는 당 신생 및 포도당의 방출억제, 글리코젠 합성 및 포도당 이용의 촉진, 단백질과 지방합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. Insulin-like Growth Factors (IGFs) 역시 인슐린과 동일하게 당 대사를 조절하는 작용과 세포성장을 촉진시키는 공통된 두 가지 생물학적 작용을 가지고 있다[3]. IGF-I은 분자량이 적은 펩타

이드계 호르몬으로, 세포 성장 및 대사에 관여하는 중요한 mitogenic 인자 및 대사성 인자이며, 이들은 proinsulin과 구조상 아주 많은 유사성을 갖고 있으나, 탄수화물 및 지방 대사에도 인슐린과는 다른 작용을 나타낸다. IGFs는 여섯 종류의 고친화성 결합단백질인 IGFBPs와 결합하여 순환한다. 이들 IGFBPs은 IGFs의 수송과 IGFs 및 그 receptor와의 결합을 조절하여 IGFs의 생화학적 활성을 조절하는데, 정상인 [18]과 당뇨병환자[23]의 피부 섬유아세포에서는 IGFBP-2, -3, -4, -5가 합성·분비되는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 사람의 혈청에서 가장 많이 존재하는 IGFBP-3는 IGFs 및 acid liable subunit과 함께 150 kDa의 복합체를 이루고 있는데, 이 IGFBP-3의 단백질 분해 활성은 임신[12]이나 수술 후 이화상태, 심각한 질환[8] 및 인슐린 비의존성 당뇨병[5], 인슐린 의존성 당뇨병[1]과 같이 인슐린에 대한 내성을 지닌 상태에서 증가한다. *In vivo*에서 IGFBP-3의 분해는 150 kDa의 복합체로부터 분리되는 것이 아니라[16] 그 복합체 내에서 부분적으로 해리됨을 의미하는 것으로, 복합체를 불안정화 시

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-6337, Fax : +82-51-620-6330

E-mail : namtj@pknu.ac.kr

키고 인산화된 IGFBP-3로부터 IGF의 해리를 10배나 증가시키게 된다[15]. 즉, IGFBP 단백질 분해 활성은 복합체로부터 IGF의 해리를 증가시켜 그 bioavailability를 증가시키고 이로 인해 *in vivo* 및 대다수의 *in vitro* 세포계에 있어서 세포 성장을 촉진시킬 뿐만 아니라, IGFs의 tissue availability를 증가시킨다[15]. 이와 같이 당뇨병을 환자나 동물의 IGFBP-3 수준의 저하의 원인은 대부분 단백질 분해의 증가 때문인 것으로 추정하고 있다[5].

혈당조절이 불완전한 당뇨병환자에서 IGFBP-3는 감소되어 있으며[14], 당뇨병에서도 IGFBP-3는 낮았으며[26], 이밖에도 NIDDM과 IDDM 환자의 human skin fibroblast에 있어서 IGFBP-2, -3, -5는 감소하였으나, IGFBP-4는 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 하였다[24]. 또, Heo 등[11]은 streptozotocin (STZ)으로 유발된 당뇨병에 있어서 IGFBP-3는 감소하였고 IGFBP-2는 증가하였으며, 혈중 IGFBP-4는 유의적인 차이가 없다고 하였다.

오래전부터 당뇨병에 관한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나, 이들 연구는 대부분 당뇨병 환자나 인위적으로 당뇨병을 유도한 동물을 대상으로 한 *in vivo* 연구가 거의 대부분이었으며, 당뇨병이 가지는 생리적 작용에 관한 *in vitro* 연구는 대단히 부족할 실정이다. 본 연구의 선행연구에서는 glucose 농도를 달리한 조건에서 배양한 GM10 세포의 배양액 중에는 IGFBP-3가 가장 많이 존재하고 IGFBP-4와 -5는 미미하게 존재하는 것으로 나타난 반면, cell lysate 중에서는 IGFBP-3와 -5가 양적으로 많이 분포하고 있었으며, IGFBP-4는 아주 적은 양이 존재한다고 보고하였다. 이에 본 연구에서는 사람의 섬유아 세포인 GM10에서 glucose 농도에 따른 물질대사 및 IGFBP-3 존재와 발현을 살펴보고, 실험결과를 토대로 당뇨병과 관련된 *in vitro* model system으로서의 활용 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS)은 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Sodium bicarbonate, antibiotics solution, bovine serum albumin (BSA), insulin, TRI-reagent, cell extraction buffer에 사용된 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. 기타 세포 배양용 시약 및 추출용 유기용매는 특급시약을 사용하였다.

세포 배양

본 실험에 사용된 GM10 세포는 5 mM(저농도) glucose DMEM 또는 25 mM(고농도) glucose DMEM에 3.7 mg/ml sodium bicarbonate, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml strep-

tomycin와 10% FBS를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

세포 수 측정

GM10 세포를 5 mM glucose 배지 또는 25 mM glucose 배지에서 배양한 후, 90%정도 자라면 무혈청 배지로 교환하여 24시간 배양하였다. 배양액 제거 후 세포를 PBS로 2회 세척하고 trypsin-EDTA 처리한 후 무혈청 배지로 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 Brightline hemacytometer (Hausser Scientific, USA)를 사용하여 세포 수를 계산하였다.

Glucose 농도 측정

GM10 세포를 5 mM glucose 배지 또는 25 mM glucose 배지에서 24, 72시간 배양한 후 세포 배양액을 10 µl 취해 혈당 측정용 GL ZYME "Eiken" kit (Shinyang chemical Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 500 nm에서 측정하였다.

Triglycerides 농도 측정

GM10 세포를 5 mM glucose 배지 또는 25 mM glucose 배지에서 24, 72시간 배양한 후 PBS로 세척하고 trypsin-EDTA 처리하였다. 세포를 PBS로 모은 다음 원심분리(3,000 rpm, 4°C, 3 min)하여 상층액을 제거하고 남은 세포에 extraction buffer (methanol : chloroform : H₂O = 2 : 1 : 8)를 가하여 세포 내 triglyceride를 추출하였다. 세포 내 triglyceride 농도는 TRIGLYZYME-V kit(Shinyang chemical Co. Ltd.)를 이용하여 505 nm에서 측정하였다.

Total protein 농도 측정

GM10 세포를 5 mM glucose 배지 또는 25 mM glucose 배지에서 24, 72시간 배양한 후 cell lysis buffer(100 mM NaF, 10 mM EDTA, 1 mM benzamidin, 1 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5)로 회수하여 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 3 min)하였다. 상층액을 회수하여 Biuret법으로 세포 내 총 단백질량을 450 nm에서 측정하였다.

유리아미노산 분석

GM10 세포를 5 mM glucose 배지 또는 25 mM glucose 배지에 배양한 후 무혈청 배지로 교환하고 5일(120시간)동안 배양한 세포 배양액을 lithum loading buffer (pH 2.2)로 정용하여 아미노산 전용분석기(Sykam amino acid analyzer, S433)로 분석하였다.

IGFBP-3 Western blot analysis

GM10 세포를 5 mM glucose 배지 또는 25 mM glucose 배지에 배양한 후 세포를 회수하였다. 회수한 cell lysate에 sample buffer를 첨가하여 12.5% sodium docdecyl sulfate

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하여 Immobilon-PS^Q transfer membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane을 5% non fat dry milk TBS-T buffer(20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1 M HCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6)로 실온에서 1시간 동안 blocking한 다음, TBS-T에 IGFBP-3(1:1,500) 1차 antibody로 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후 2차 항체(1:15,000, anti-rabbit IgG-conjugated horseradish peroxidase)를 첨가하여 1시간 반응시키고 enhanced chemiluminescence substrate (ECL Western blotting detection reagent, Amersham, England)를 사용하여 확인하였다.

IGFBP-3 mRNA analysis

GM10 세포를 5 mM glucose와 25 mM glucose 배지에 배양한 후 90% 자라면서 무혈청 배지로 교환하고 5 mM glucose 배지에 배양하거나, 25 mM glucose 배지에 IGF-I(100 ng/ml) 또는 insulin(100 ng/ml)을 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 제거한 다음, TRI reagent(Sigma) 1 ml을 첨가하여 회수하였다. Chloroform : isoamyl alcohol(24 : 1)을 첨가하여 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 15분)한 다음 RNA가 포함된 상층액을 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 -70°C에서 침전시켰다. 원심분리하여 상층을 제거하고 남은 total RNA에 70% ice-cold ethanol로 2번 세척한 후 건조시켰다. 건조된 total RNA는 0.1% DEPC로 처리한 물에 녹여서 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 10 µg의 total RNA를 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동 하고 nylon membrane (ICN BIOTRANSTM)에 18시간 동안 transfer 하였다. Membrane은 75°C에서 2시간 동안 baking하고 68°C에서 1시간 동안 pre-hybridization(30% formamide, 0.15 M NaCl, 0.12 M Na₂HPO₄, 7% SDS, 1 mM EDTA)한 다음 pre-hybridization 용액에 DIG-dUTP가 label된 DNA 20 µl를 첨가한 hybridization 용액으로 68°C에서 18시간 동안 hybridization하였다. Hybridization 후, membrane을 세척하고 실온에서 30분간 blocking시켰다. Anti-Digoxigenin-AP를 75 mU/ml(1:10,000)의 농도로 희석하여 실온에서 30분간 교반 후 세척하였다. Membrane은 detection buffer(0.1 M Tris HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5)에 담귀 5분간 평형화시킨 다음, detection buffer에 1:100의 농도로 희석한 chemiluminescence substrate CSPD solution으로 5분간 반응시켰다. Luminescent 반응 후, 물기를 제거한 membrane을 37°C에서 1시간 방치한 뒤 필름에 노출시켰다.

IGFBP-3 probe labeling

실험에 사용한 IGFBP-3 DNA는 미국 North Carolina 대학교 의과대학 내분비 연구실 David R. Clemmons 박사로부터 제공받았으며, probe 제조에는 PCR DIG Probe synthesis

Kit (Boehringer Mannheim)를 사용하였다. MgCl₂를 포함하는 1× PCR reaction buffer, 200 µM dNTP mixture, PCR DIG-dUTP mixture, 2.6 U enzyme mixture (ExpandTM High Fidelity), IGFBP-3 sense, antisense primer 각각 40 pmol, 0.1 U AMV-optimized Tag, IGFBP-3 DNA를 함유하는 PCR 반응 혼합물은 PCR Thermal Cycler 480(TAKARA, Japan)를 사용하여 PCR을 행하였다. PCR 프로그램은 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 2분간 10 cycles, 95°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서는 2분을 시작으로 1 cycle 돌 때마다 20초씩 늘어나도록 20 cycles을 구성하였다. PCR 후, EtBr (10 mg/ml)을 함유하는 2% agarose gel에 전기영동하여 PCR 생성물의 band를 확인하고 gel에서 잘라내었다. QIAGEN Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 잘라낸 gel로부터 DIG-dUTP label된 probe DNA를 추출하였다.

IGFBP-3 proteolysis

GM10 세포를 25 mM glucose 배지에서 배양하여 무혈청 배지로 교환하고 IGF-I(100 ng/ml), insulin(100 ng/ml)을 처리한 배양액 50 µl와 5 mM glucose와 25 mM glucose 배지에서 배양한 세포배양액 50 µl에 0.5 M tris 10 µl, 100 mM CaCl₂ 2 µl 첨가하고 intact IGFBP-3를 100 ng을 혼합한 후 37°C water bath에서 하룻밤 반응시켰다. Sample buffer로 반응을 중지시킨 후 12.5% SDS-PAGE로 분리하여 Immobilon-PS^Q transfer membrane (Millipore)에 이동시킨 membrane을 3% BSA가 포함된 TBS로 30분 blocking시켰다. 1% BSA가 함유된 TBS에 IGFBP-3(1:1,500) 1차 antibody로 하룻밤, 2차 antibody(1:2,000, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate)에서 3시간 반응시킨 후에 세척하고 color substrate solution (NBT/BCIP, Promega)으로 발색하여 IGFBP-3의 분해 정도를 확인하였다.

실험결과와 통계처리

본 연구의 모든 분석수치는 각 실험군의 평균±표준편차로 나타내었고, 결과는 SPSS PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군간의 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 분석하였다.

결과 및 고찰

세포 증식에 미치는 영향

GM10 세포를 5 mM glucose(저농도)와 25 mM glucose(고농도) 배지에 배양하였을 때 세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, 저농도와 고농도 glucose 배지에 배양하였을 때 세포 수는 각각 $45.1 \pm 4.3 \times 10^4$, $47.9 \pm 5 \times 10^4$ cells/cm²으로 glucose 농도에 따른 세포 증식에는 유의적인 차이가

Table 1. Effect of glucose levels on cell numbers in GM10

Glucose concentration	Cell number (cells/cm ²)
5 mM	45.1±4.3×10 ⁴
25 mM	47.9±5.0×10 ⁴

· Values are the mean ± SE (n=3)

나타나지 않았다(Table 1).

이와 유사한 연구들을 살펴보면 정상 상태, 인슐린 비의존형 당뇨병(NIDDM), 인슐린 의존형 당뇨병(IDDM), 그리고 비만환자로부터 얻은 섬유아 세포 수는 각각 3.8±0.7×10⁴, 4.5±0.7×10⁴, 4.1±0.6×10⁴, 그리고 3.8±0.7×10⁴ cells/cm²로 세포증식에 차이가 없다고 하였으며[23], 정상 대조군과 당뇨쥐의 세포 수는 각각 19.4±0.5×10⁴, 18.7±1.0×10⁴ cells/cm²로 유의적인 차이가 없었다고 하여[4], 본 연구 결과와 동일한 경향을 보여주었다. 이는 두 그룹에 있어서 glucose 농도 차이 외에 기초영양소는 모두 조건이 동일하기 때문에 짧은 시간 동안의 glucose 농도만으로는 세포 증식에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 보여진다.

glucose 소비에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도 glucose와 고농도 glucose 배지에서 배양하여 시간의 경과에 따른 glucose의 소비 수준을 살펴보았다(Fig. 1). 그 결과 고농도 glucose에서 배양한 경우 24시간보다 72시간 배양했을 때 10% 정도 감소하였으며, 결과에 제시하지는 않았지만 배양 120시간에는 25% 감소하였다. 그러나 저농도 glucose에서 배양한 경우 72시간 배양 시 35% 감소하였고, 결과에 제시하지는 않았지만 배양 120시간에서는 84% 감소하는 것으로 나타났다. 실제 감소되는 수준은 상대적으로 저농도 glucose군에서 많이 소모되는 것 같지만, 절대적인 값으로 보면 고농도 glucose에서 더 많은 glucose

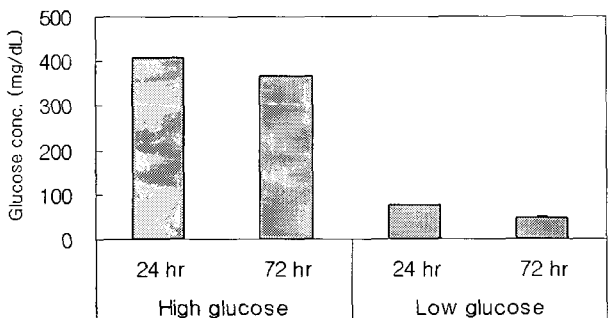


Fig. 1. Time course of glucose consumption in conditioned medium of GM10 cells. Cells were cultured for 24 and 72 hr in a medium containing either high glucose (25 mM) and low glucose (5 mM). Conditioned medium were collected after the indicated hours of cultures and analysed by GLZYME kit as described in Materials and Methods.

를 소비하는 것으로 나타났다. Kahn[13]은 STZ를 처리한 당뇨쥐에서 고혈당이 일어나는데, 이는 STZ이 췌장 랑게르한스섬의 β-세포를 손상시킴으로써 인슐린 분비가 감소되며, 이로 인해 당질대사가 비정상화되어 당 이용은 줄어드는 대신 당신생이 증가되어 발생한다고 하였다. 또한, Lee 등[16]은 STZ-diabetic rats에 있어서 정상 대조군과 비교할 때, 혈당 수준은 유의적으로 높은 수준을 나타낸다고 하여, 본 결과와 같이 당뇨상태에서 혈당 수준이 유의적으로 높게 나타나는 *in vivo*의 결과와 일치함을 알 수 있다.

Triglyceride의 축적에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도와 고농도 glucose 배지에서 배양하여 시간의 경과에 따른 triglyceride의 수준을 살펴보았다(Fig. 2). 그 결과 고농도 glucose에서 배양한 경우 triglyceride가 많이 생성되는 것으로 나타났다. 이는 저농도 보다 고농도 조건에서 많이 흡수되어진 glucose가 세포 내에서 triglyceride로 축적되며, 시간의 경과에 따른 triglyceride의 증가는 고농도 glucose 조건의 지속에 의해 일어나는 것으로 보여진다. Mardar 등[17]은 당뇨병 유발쥐들은 정상 쥐보다 혈중 triglyceride의 수준이 높아진다고 하였으며, Niall 등[19]은 고혈당일 때 혈장 triglyceride가 높아졌다고 하여, 본 연구 결과는 *in vivo*에서 나타나는 고혈당 상태와 유사하게 세포에서도 triglyceride 농도는 어느 정도 glucose에 의해 영향을 받는 것으로 보인다.

총 단백질 함량에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도와 고농도 glucose 배양 조건에서 총 단백질 함량 변화를 살펴본 결과, 저농도 조건에서 배양한 경우 세포 내 총 단백질 함량이 증가하는 경향을 보인 반면, 고농도 조건에서는 감소하는 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다(Fig. 3). Insulin 작용 부족에 의한 당뇨병에서는 조직의 포도당 이용이 낮아져서 해당계에

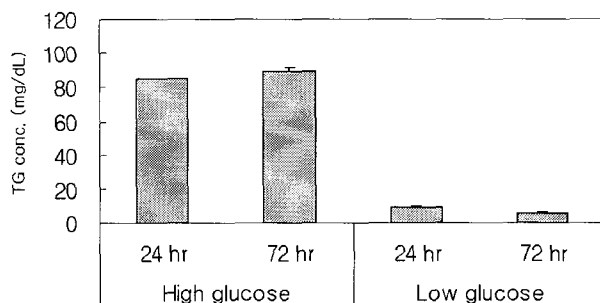


Fig. 2. Time course of triglyceride levels in GM10 cells. Cells were cultured for 24 and 72 hr in a medium containing either high glucose (25 mM) and low glucose (5 mM). Cell lysate was collected after the indicated hours of cultures and analysed TRIGLYZYME-V kit as described in Materials and Methods.

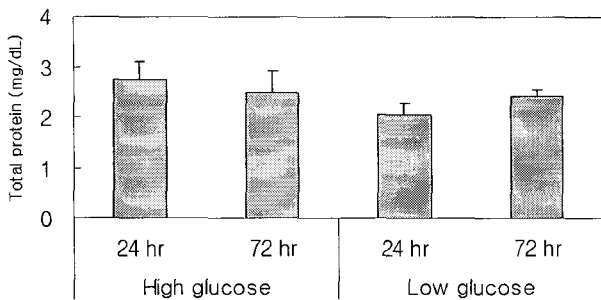


Fig. 3. Time course of total protein concentration in cell lysate of GM10 cells. Cells were cultured for 24 and 72 hr in a medium containing either high glucose (25 mM) and low glucose (5 mM). Cell lysate was collected after the indicated hours of cultures and analysed as described in Materials and Methods.

서 얻어진 자유에너지가 부족하게 된다. 이와 같은 상태가 지속되면 단백질 분해가 일어나 그 에너지 부족을 보상하려는 현상이 생긴다. 즉 인슐린 작용부족으로 포도당의 대사장애가 단백질 분해 촉진을 일으키며, 인슐린 작용부족이 단백질 대사를 gluconeogenesis의 방향으로 유도하여 결국은 단백질 합성장애를 가져오게 된다고 하였다[24]. 또, STZ을 투여하여 당뇨유발 쥐의 경우 insulin 결핍에 의한 체단백질 분해항진과 함께 근육에서 아미노산 방출이 촉진된다고 하였으며[9], 당뇨병 발병 때 단백질 합성이 저하된다고 보고하였다[21]. 따라서, 이 결과는 과도한 glucose로 인해 단백질 합성장애가 일어나 단백질 대사가 이화작용으로 기울어진 것으로 보여진다.

배양액 중 유리 아미노산의 함량에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도와 고농도 glucose 배양 조건에서 5 일(120 hr)동안 배양하였을 때, 세포 배양액 내에 함유된 유리아미노산 함량을 살펴보았다(Table 2). 저농도 glucose 배양 조건에서는 배지의 총 유리아미노산 함량이 고농도 glucose 배양 조건에 비해 매우 낮게 나타났다. 이는 에너지원으로 이용할 수 있는 glucose 양이 부족한 저농도 glucose 배양 조건에서는 고농도 glucose 배양 조건보다 아미노산을 에너지원으로서 더 많이 소모하기 때문인 것으로 보여지며, 앞서 살펴본 저농도 glucose 배양 조건에서 총 단백질 함량의 축적과 연관되는 것으로 여겨진다. 따라서 총 단백질 함량에 미치는 glucose의 영향은 triglyceride 축적에 비해 절대적이지 않은 것으로 보인다. 또한 아미노산중 cystine, glutamine, serine 등은 저농도 glucose 배양 조건에서는 각각 60%, 81%, 61%로 감소하였고, 고농도 glucose 배양 조건에서도 각각 58%, 80%, 49%로 감소를 보여, 저농도와 고농도 glucose 배양 조건 모두에 있어서 크게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 cystine, glutamine, serine 등의 아미노산이 에너지원으로 이용되는 것으로 보이며 반면, 대조군과 비교하였을 때 glycine,

Table 2. Free amino acid composition of GM10 cells on high and low glucose conditioned medium (mg/l)

Amino acid	Sample		
	Control	High (120 hr)	Low (120 hr)
Arginine	84	68	61
Cystine	63	27	25
Glutamine	584	114	111
Glycine	30	55	54
Histidine	42	28	26
Leucine	105	97	84
Lysine	146	125	117
Methionine	30	29	27
Phenylalanine	66	73	68
Serine	42	21	16
Threonine	95	107	102
Tryptophan	16	-	-
Tyrosine	104	73	67
Valine	94	95	88
Total	1,501	912	846

phenylalanine, threonine 등의 아미노산은 저농도와 고농도 glucose 배양 조건에서 증가하는 것으로 나타났다.

IGFBP-3에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도와 고농도 glucose 배양 조건에 따른 IGFBP-3의 단백질 수준을 살펴본 결과, 고농도 glucose 배양 조건에서 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). Baxter와 Martin [2]은 혈당조절이 되지 않은 당뇨병 환자에서 IGFBP-3는 정상인에 비해 감소되어 있다고 보고하였고, Rjeu와 Binoux [21]는 혈당조절이 불완전한 당뇨병 환자에서 IGFBP-3가 감소되어 있으며, 고혈당 상태와는 역상관관계를 관찰한 바 있으며, IGFBP-3는 임신[12]이나 수술 후 또는 당뇨병과 같은 특정 병리상태에서 부분적으로 분해되는 것으로 보고되고 있다[8]. 또한 STZ을 투여하여 당뇨병을 유발시킨 쥐의 경우 혈장이나 간에서 IGFBP-3는 감소되어 있었으며[26], 본 연구에서 살펴본 고농도 glucose 배양 조건에서 IGFBP-3가 감소한다는 결과와 일치하였다.

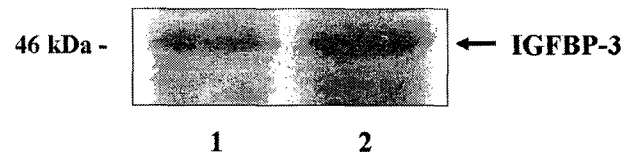


Fig. 4. IGFBP-3 ECL Western blotting of GM10 cell lysate. Collected cell lysate from medium containing either high glucose or low glucose, after 48 hr culture, was subjected to SDS-PAGE and analyzed ECL blotting, as described in Materials and Methods. Molecular marker is indicated on the left. lane 1 : High glucose (25 mM), lane 2 : Low glucose (5 mM).

GM10 세포에서 저농도와 고농도 glucose 배양 조건 시 IGFBP-3 단백질 수준이 변하였으므로 IGFBP-3 mRNA의 발현 정도를 살펴본 결과, 고농도 glucose에서 IGFBP-3 mRNA 수준이 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 5). 당뇨병을 유발시킨 쥐에 있어서 IGFBP-3 mRNA 발현이 저하된다고 보고하였으나[10] Spoerri 등[22]은 당뇨병 환자에서 IGFBP-3 mRNA 수준에는 거의 변화가 없다고 보고하였다.

Fig. 6은 저농도와 고농도 glucose 배양 조건과 고농도 glucose 배양 상태에서 IGF-I과 insulin을 처리한 세포 배양액 중의 IGFBP-3 proteolysis를 살펴보았다. 그 결과, GM10 세포는 IGFBP-3 protease의 영향과 관련이 없다는 것을 확인할 수 있었다. Clemmons 등[7]은 human epidermal fibroblasts와 porcine aortic smooth muscle cells을 배양한 세포 배양액에서 IGFBP-3는 안정하며, IGFBP-3 proteolytic의 활성이 나타나지 않는다고 하여 본 연구 결과와 일치하는 것으로 나타났다.

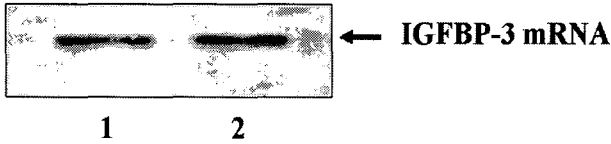


Fig. 5. Effect of glucose on IGFBP-3 gene expression in GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing high glucose and low glucose. Total RNA was extracted from cultures of GM10 and was analyzed by Northern blotting using a specific IGFBP-3 cDNA as described in Materials and Methods. lane 1 : high glucose (25 mM), lane 2 : low glucose (5 mM).

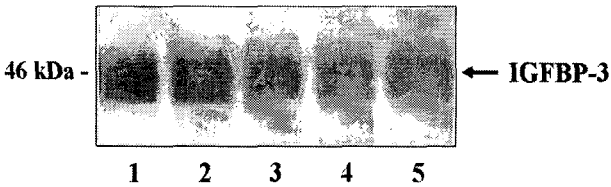


Fig. 6. Effects of high glucose, IGF-I, insulin low glucose on IGFBP-3 protease activity in GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing high glucose, high glucose treated with IGF-I, high glucose treated with insulin and low glucose. Conditioned medium was incubated with intact IGFBP-3 (100 ng) for 14 hr at 37°C, and the products were analyzed by Western blotting. lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-3 and no incubation, lane 2 : Conditioned medium containing high glucose (25 mM) plus intact IGFBP-3, lane 3 : Conditioned medium containing high glucose (25 mM) treated with IGF-I (100 ng/ml) plus intact IGFBP-3, lane 4 : Conditioned medium containing high glucose (25 mM) treated with insulin (100 ng/ml) plus intact IGFBP-3, lane 5 : Conditioned medium containing low glucose (5 mM) plus intact IGFBP-3.

이상의 결과로서 IGFBP-3 중에서 양적으로 가장 많이 분비되고 있는 IGFBP-3의 경우, glucose가 단백질 수준뿐만 아니라 분자적 수준에 있어서 보여지는 IGFBP-3의 감소는 protease 활성과 관련한 것이 아니라, 분자적 수준의 전사단계에서부터 glucose에 의해 조절되는 것으로 보여진다.

요 약

사람의 섬유아세포인 GM10을 사용하여 glucose의 배양 조건에 따른 물질대사 및 IGFBP-3 발현을 살펴본 결과, glucose 농도에 따른 glucose 소비와 triglyceride 축적 수준은 고농도 glucose 배양 조건에서 증가한 반면, 총 단백질 함량은 고농도 glucose 배양 조건에서 시간의 경과에 따라 감소하였다. 또한 고농도 glucose 배양 조건에서 5일 동안 배양한 세포 배양액내의 유리아미노산 함량은 저농도보다 고농도 glucose 배양 조건에서 높게 나타났다. IGFBP-3 단백질 수준과 mRNA 수준은 저농도 glucose 배양 조건에서 증가하였으나, IGFBP-3 단백질 분해효소에 따른 영향은 없었다. 이상의 결과에서 glucose 배양조건에 따른 물질대사는 부분적으로 세포를 이용한 당뇨병 모델 실험에서 *in vivo*와 같은 결과를 얻지 못하였지만, IGFs와 같은 세포 성장인자에 대한 연구를 통해 세포수준의 당뇨병 모델화가 가능하다고 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 부경대학교 기성회 학술연구비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Abdullah, B., H. Charles, L. Sandra, L. Blethen and F. Jie. 1995. Insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis in children with insulin-dependent diabetes mellitus : a possible role for insulin in the regulation of IGFBP-3 protease activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 2282-2288.
2. Baxter, R. C. and J. L. Martin. 1986. Radioimmunoassay of growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein in human plasma. *J. Clin. Invest.* **78**, 1504-1512.
3. Boulware, S. D., W. V. Tamborlane, L. S. Matthews and R. S. Sherwin 1992. Diverse effects of insulin-like growth factors I on glucose, lipid, and amino acid metabolism. *Am. J. Physiol.* **262**, E130-133.
4. Busiguina, S., J. A. Chowen, J. Argente and I. Torres-Aleman. 1996. Specific alterations of the insulin-like growth factor I system in the cerebellum of diabetic rats. *Endocrinology* **137**, 4980-4987.
5. Camacho-Hubner C., W. H. Busby, R. H. McCusker, G. Wright, and D. R. Clemmons. 1992. Identification of the

- forms of insulin-like growth factor binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. *J. Biol. Chem.* **267**, 11949-11956.
6. Clemmons, D. R. 1998. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Molecular and Cellular Endocrinology* **140**, 19-24.
 7. Clemmons, D. R., J. P. Thissen, M. Maes, J. M. Ketelslegers and L. E. Underwood. 1989. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) infusion into hypophysectomized or protein-deprived rats induces specific IGF-binding proteins in serum. *Endocrinology* **125**, 2967-2972.
 8. Davies, S. C., J. A. Wass, R. J. Ross, A. M. Cotterill, C. R. Buchanan, V. J. Coulson and J. M. Holly. 1991. The induction of a specific proteinase for insulin-like growth factor binding protein-3 in the circulation during severe illness. *J. Endocrinol.* **130**, 469-473.
 9. Green, M. and L. L. Miller. 1990. protein catabolism and protein synthesis in perfused livers of normal and alloxan-diabetic rats. *J. Biol. Chem.* **235**, 3202.
 10. Hanaire-Broutin, H., B. Sallerin-Caute, M. F. Poncet, M. Tauber, R. Bastide, J. J. Chale, R. Rosenfeld and J. P. Tauber. 1996. Effect of intraperitoneal insulin delivery on growth hormone binding protein, insulin-like growth factor (IGF)-1, and IGF-binding protein-3 in IDDM. *Diabetologia* **39**, 1498-1504.
 11. Heo, Y. R., S. J. Jin, J. S. Kim and C. W. Kang. 2000. Changes of insulin-like growth factor-I, IGF binding proteins, and IGF-I carrier protein in streptozotocin-induced diabetic rat. *Korean J. Vet. Res.* **40**, 489-496.
 12. Hossenlopp, P., B. Segovia, C. Lassarre, M. Roghani, M. Bredon and M. Binoux. 1990. Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 797-805.
 13. Kahn, C. R. 1985. The molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. Med.* **36**, 249-251.
 14. Kin, D. H., K. S. Rho and S. C. Chung. 1998. Effects of glycemic control on growth factor I induces its own specific carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3813-3817.
 15. Lassarre, C. and M. Binoux. 1994. Insulin-like growth factor binding protein-3 is functionally altered in pregnancy plasm. *Endocrinology* **134**, 1254-1262.
 16. Lee, S. Z. and H. S. Lee. 1999. Changes in plasma lipid pattern in streptozotocin-induced diabetic rats: A time course study. *Kor. Nutr. Soc.* **32**, 767-774.
 17. Madar, Z. 1983. Glucose and lipid metabolism in diabetic rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **38**, 388-393.
 18. Neely, E. K. and R. G. Rosenfeld. 1992. Insulin-like growth factors reduce IGF-binding protein-4 concentration and stimulate IGFBP-3 independently of IGF receptors in human fibroblasts and epidermal cells. *Endocrinology* **130**, 985-993.
 19. Niall, M. G., A. M. Rosaleen, O. Daphne, B. C. Patrick, H. J. Alan, H. T. Gerald. 1990. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* **39**, 626-636.
 20. Pain, V. M., E. C. Albertse, and P. J. Garlick 1983. Protein metabolism in skeletal muscle, diaphragm and heart of diabetic rats. *Am. J. physiol.* **245**, E604.
 21. Rjeu, M. and M. Binoux 1985. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein in insulin-dependent diabetics during an episode of severe metabolic decompensation and the recovery phase. *J. clin. Endocrinol. Metab.* **60**, 781-785.
 22. Spoerri, P. E., E. A. Ellis, R. W. Tarnuzzer and M. B. Grant. 1998. Insulin-like growth factor: receptor and binding proteins in human retinal endothelial cell cultures of diabetic and non-diabetic origin. *Growth Horm. IGF Res.* **8**, 125-132.
 23. Stefano, G., M. Subburaman, K. Junko, G. Gianna, M. R. Carlo, R. L. Thomas and F. Yoko 1994. Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins with non-insulin dependent diabetes mellitus, insulin-dependent diabetes mellitus, or obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 1824-1830.
 24. Wahren, J., P. Felig, E. Cerasi and R. Luft. 1972. Splanchnic and peripheral glucose, amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **51**, 1870.
 25. Zapf, J. and E. R. Foresch. 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins : Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res.* **24**, 121-130.
 26. Zapf, J., C. Hauri and M. Waldvogel. 1989. Recombinant human insulin-like growth factor I induces its own specific carrier protein in hypophysectomized and diabetic rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3813-3817.