사람의 섬유아세포에서 Glucose 농도가 Insulin-like Growth Factor Binding Protein-5의 발현에 미치는 영향

류혜영 · 황혜정 · 김인혜 · 류홍수 · 남택정*

부경대학교 식품생명공학부

Received July 4, 2007 / Accepted August 6, 2007

Effects of Glucose on Insulin-like Growth Factor Binding-5 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) and IGF-II have structure like insulin. In contrast to insulin, however, the bioavailability of IGFs is modulated by the IGF-binding protein (IGFBPs). Each of IGFBPs was different with molecular masses, biological characteristics, and immunological properties.. Human fibroblasts secrete IGFBPs that can modify IGF-I action. In diabetes mellitus, the most study of IGF systems have been investigated in insulin-dependent diabetes mellitus, non-insulin-dependent diabetes mellitus, and streptozotocin-induced animals *in vivo*. Recently, a little research regarding the IGFs system has been proposed in portion of cell *in vitro*. In this study, effects of low or high glucose condition on IGFBP-5 in GM10 was investigated. By western blotting analysis, IGFBP-5 level decreased in cells cultured at high glucose, but IGFBP-5 level of mRNA didn't change. IGFBP-5 protease that cleaves IGFBP-5 in conditioned medium had been inhibited by EDTA and heparin, like serine protease and metalloprotease. Furthermore, the protease activity was increased in high glucose cultivated condition. In results of gelatin zymography, molecular weight of proteolytic metalloenzymes was indentified 69-kDa and protease activity was increased in time-dependent manner. Although the mechanism has yet to be determined, IGFBP-5 proteolysis in GM10 cells cultured with high glucose may increase effects of IGFs to decrease the glucose level through dissociation of IGFs from IGFBPs. Therefore, we suggest that IGF- I and IGFBPs could be potential models in study of pathophysiology such as diabetes mellitus.

Key words – IGF- I , IGFBP-5, glucose, diabetes

서 론

경제적 생활수준의 향상과 더불어 식생활 양식이 서구화되면서 질병 발생의 유형과 사망 원인이 크게 변화되고 있다. 이러한 식생활의 패턴의 변화는 당뇨병, 심순환계 질환, 대장암 등 만성 퇴행성 질환의 발병율이 점차 증가되고 있는 것과 밀접한 관계가 있는데, 그 중 당뇨병의 유병율은 전체 인구의 약 2%를 상회하면서 현저하게 증가하고 있는 추세이다[5]. 당뇨병은 인슐린의 절대적 혹은 상대적 결핍으로 인하여 생기는 대사성 질환으로[29], 말초신경증과 관상동맥질환의 발병을 촉진하는 등 이로 인한 각종 합병증이 유발되므로 당뇨병은 국민건강에 심각한 문제로 대두되고 있다[9]. 이러한 당뇨병은 당질대사의 이상 뿐 아니라 지질 대사 및 단백질의 대사에도 이상을 초래하여, 근육 단백질을 분해시키고 지방 조직에서의 지방분해를 증가시키며, 간에서의 급속한 지방산 산화를 유도한다[28]. 당뇨병 환자의 경우 이러한 신체 내 이화작용이 급속하게 진행되므로 대사 과정상 동화작

용에 관여하는 인자들을 많이 필요로 하게 된다. 당뇨병에 있어 중요한 문제인 혈장 glucose의 조절은 근육, 지방, 간 조직에서의 인슐린 의존적인 glucose 조절과 뇌와 내장조직에서의 인슐린 비의존적인 glucose 이용을 포함하는 복잡한 현상이다[8]. 정상 혈당 상태에서 glucose 대사는 주로 췌장 인슐린 분비에 의해서 조절되어지지만, IGFs (insulin-like growth factors) 역시 인슐린과 동일하게 동화작용에 관여하는 호르몬으로 당 대사를 조절하는 작용과 세포성장을 촉진시키는 공통된 두 가지 생물학적 작용을 가지고 있다[2]. 당뇨병 환자에 있어서 혈중 IGF-I 농도는 당뇨병 환자의 경우에 낮다고 하였고[30], 인슐린 의존성 당뇨병 환자의 혈중 성장호르몬이 상승했음에도 불구하고 혈중 IGF-I은 오히려 정상인보다 낮았다고 하였다[18]. 또, 혈당 조절이 잘 되지 않는 당뇨병 환자에서 혈중 IGF-I은 감소되며[1], 당조절이 되지 않아 대사장애가 동반된 환자에서 IGFs 및 IGFBPs (IGF binding proteins)는 감소된다고 하였다[23].

IGFs는 분자량이 적은 펩타이드계 호르몬으로, prolinsulin과 구조적 유사성을 갖고 있으나, 인슐린과 다른 작용을 나타낸다. 이러한 IGFs는 내분비 기전에 의한 작용뿐만 아니라 autocrine 경로나 paracrine 경로를 통하여 대부분의 세포에 생물학적 효과를 나타낸다[17]. IGF-I system은 ligand

*Corresponding author

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

E-mail : namtj@pknu.ac.kr

(IGF-I 과 IGF-II), receptors (IGF-I R과 IGF-II R), IGFBPs 그리고 IGFBP protease로 구성된다. 이 중 IGFBPs는 IGFs의 수송과 IGFs 및 그 수용체와의 IGFs 결합을 조절하여 IGFs의 생화학적 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이 중 IGFBP-5는 extracellular matrix에 부착하거나 세포 표면에 결합하는 독특한 특징을 가지고 있는데[14], extracellular matrix에 결합할 때 섬유아세포의 성장에 있어서 IGFs의 효과를 가능하게 하는 것으로 알려져 있다[12]. 정상인[21]과 당뇨병 환자의 피부 섬유아세포에서는 IGFBP-2, -3, -4, -5가 합성·분비되며, IGFBP-5는 섬유아세포에서 대체로 높은 수준을 나타내지만, 인슐린 비의존성 당뇨병의 경우에는 감소되는 것으로 알려져 있다[26]. 이러한 IGFBP-5는 일반적으로 다른 세포에서 IGF-I의 작용을 저해시키는 효과와 촉진시키는 효과를 동시에 가진다고 알려져 있다[15]. 배양액내의 intact IGFBP-5는 적어도 IGF-I 수용체 보다 10배 이상 높은 친화력으로 IGF-I과 결합하여 IGF-I과 수용체와의 결합을 제한하는 반면[10], 그 fragments는 IGFs에 대한 친화력을 감소시키고, 주로 non-IGF-binding fragments로 존재한다[15]. 따라서 protease에 의한 IGFBP-5의 분해는 intact IGFBP-5를 감소시켜 IGFs의 활성을 증가시키는 것으로 보인다. IGFBP-5 mRNA는 신장, 뇌, 장, 자궁, 심장, 골격근을 포함한 동물의 여러 조직에 풍부하게 발현되나 간의 경우는 극미하다고 하였다[13,16,25]. 또한, 세포 종류에 따라 그 발현되는 양상이 다른데, 섬유아세포, 골격근세포, 뼈세포 등의 세포에서는 IGFBP-5 mRNA가 높은 수준으로 발현된다고 하였다[4,7]. 그러나 당뇨병 환자나 동물을 대상으로 한 연구에서 IGFBP-5 mRNA 합성 정도를 살펴본 경우는 거의 없으며, Price 등은 당뇨쥐의 신장 세뇨관에서 IGFBP-5 mRNA의 수준이 감소한다고 하였다[22].

오래전부터 당뇨병에 관한 연구는 진행되었으나, 대부분 당뇨병 환자나 당뇨 유도 쥐를 대상으로 한정되어 있다. Terry 등[27]은 돼지의 혈관내피세포를 사용하여 고농도의 glucose가 IGFBPs에 미치는 영향을 살펴보았는데, 고농도 glucose는 IGFBP-4의 단백질 분해를 촉진시켜 그 수준을 감소시키고 이로 인해 IGFs를 활성화시켰다. 이는 *in vivo* 연구[24]와 일치하는 결과로서, *in vitro* 모델의 적용 가능성을 제시하였다. 이에 본 연구에서는 당뇨병과 관련된 *in vitro* model system으로서의 활용 가능성을 검토하고자 glucose 배양 조건에 따른 IGFBP-5의 존재와 발현에 미치는 영향을 GM10 세포에서 살펴보고자 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 세포는 사람의 섬유아세포인 GM10은 5 mM(저농도) glucose DMEM 또는 25 mM(고농도) glucose DMEM에 sodium bicarbonate 3.7 mg/ml, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml와 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 처리한 후 무혈청 배지로 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 Brightline hemacytometer (Hausser Scientific, U.S.A.)를 사용하여 세포 수를 계산하였다.

IGFBP-5 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 dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리하여 Immobilon-PS^Q transfer membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)에 이동시켰다. Membrane을 3% BSA-TBS buffer(20 mM Tris-base, 137 mM NaCl, 1 M HCl, pH 7.4)에 IGFBP-5(1:1,000) 1차 항체로 하룻밤 반응시켰다. 그 후 2차 항체 (1:1,000, anti-guinea pig alkaline phosphatase conjugate)를 첨가하여 3시간 반응시킨 후에 color substrate solution (NBT/BCIP, Promega Co., WI, USA)으로 발색시켰다.

IGFBP-5 mRNA analysis

GM10 세포를 5 mM glucose와 25 mM glucose 배지에 배양한 후 90% 자라면 무혈청 배지로 교환하고 5mM 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 ml를 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 RT-PCR에 사용하였다.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)은 TAKARA one step RNA PCR kit (TAKARA Bio Inc. Japan)를 사용하였다. Total RNA(10 μ g)를 one step RNA PCR reaction buffer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mixture, 0.8 U RNase inhibitor, IGFBP-5 sense, antisense primer 각각 40 pmol, 0.1 U AMV reverse transcriptase, 0.1 U AMV-optimized Tag과 혼합하였다. 이 반응 혼합물을 PCR Thermal Cycler 480(TAKARA, Japan)를 사용하여 50℃에서 30분, 94℃에서 2분간 reverse transcription시킨 다음 94℃에서 30초, 65℃에서 30초, 72℃에서 30초간 30 cycles, 72℃에서 5분간 반응시켜 증폭시켰다. 반응 후, EtBr(10 mg/ml)을 함유하는 2% agarose gel에 RT-PCR 생성물을 전기영동하였으며, 100 bp molecular weight marker (Bio Labs, Korea)를 사용하여 크기를 확인하였다. RT-PCR에 사용한 IGFBP-5 primer는 아래와 같다.

5'- GAA GGC TGA AGC AGT GAA GAA GGA CCG -3'
(Sense)

5'- ACT CAA CGT TGC TGC TGT CGA AGG TGT -3'
(Antisense)

IGFBP-5 proteolysis

GM10 세포를 25 mM glucose 배지에서 배양하여 무혈청 배지로 교환하고 IGF-I(100 ng/ml), insulin(100 ng/ml)을 처리한 배양액 50 μ l와 5 mM glucose와 25 mM glucose 배지에서 배양한 세포배양액 50 μ l에 0.5 M tris 10 μ l, 100 mM CaCl₂를 2 μ l 첨가한 반응 혼합액에 효소의 성질을 검토하기 위해 저해제(50 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1 mM 1,10-phenanthroline, 5 mM aprotinin, 0.2 mM E64, 3 mM Benzamide, 1 μ g/ml heparin)를 처리하여 실온에서 30분 반응시킨 후에 intact IGFBP-5를 100 ng 첨가하여 37℃ water bath에서 하룻밤 반응시켰다. Sample buffer로 반응을 중지시킨 후 12.5% SDS-PAGE로 분리하여 membrane에 이동시킨 membrane을 western blot으로 IGFBP-5의 분해 정도를 확인하였으며, 또한 각각의 inhibitor에 의한 IGFBP-5의 저해정도를 확인하였다.

Gelatin zymography

GM10 세포를 5 mM glucose와 25 mM glucose 배지에서 배양한 후 무혈청 배지로 교환하고 25 mM glucose 배지에 각각 IGF-I(100 ng/ml), insulin (100 ng/ml)을 첨가하여 하룻밤 배양하였다. 또한 25 mM, 5 mM glucose 배지에서 시간별로 처리한 배양액을 회수하여 10% gelatin이 함유된 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 그런 다음 gel을 2.5% Triton

X-100으로 4℃에서 세척하고 탈이온수로 세척한 다음, 4 mM CaCl₂를 함유한 50 mM Tris buffer (pH 7.4)에 하룻밤 방치하였다. 여기에 fix solution(7% acetic acid, 40% methanol)으로 고정하고 staining solution(0.1% coomassie brilliant blue G-250, 10% acetic acid)로 염색한 후 destaining solution(7% acetic acid, 20% methanol)로 탈색시켜 확인하였다.

실험결과와 통계처리

본 연구의 모든 분석수치는 각 실험군의 평균 $\pm$ 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

Glucose 농도가 세포 증식에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도 glucose와 고농도 glucose 배지에 배양하였을 때 세포 증식에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, 저농도와 고농도 glucose 배지에 배양하였을 때 세포 수는 각각 $45.1 \pm 4.3 \times 10^4$, $47.9 \pm 5.0 \times 10^4$ cells/cm²으로 glucose 농도에 따른 세포 증식에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Table 1).

이와 유사한 연구들을 살펴보면 정상 상태, 인슐린 비의존형 당뇨병, 인슐린 의존형 당뇨병, 비만환자에 있어서 섬유아세포의 수는 각각 $3.8 \pm 0.7 \times 10^4$, $4.5 \pm 0.7 \times 10^4$, $4.1 \pm 0.6 \times 10^4$, 그리고 $3.8 \pm 0.7 \times 10^4$ cells/cm²로 세포 증식에 차이가 없다고 하였으며[26], 정상 대조군과 당뇨병의 세포 수는 각각 $19.4 \pm 0.5 \times 10^4$, $18.7 \pm 1.0 \times 10^4$ cells/cm²로 유의적인 차이가 없었다고 하여[3], 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 농도가 IGFBP-5에 미치는 영향

GM10 세포를 저농도 glucose와 고농도 glucose 배지에 배양하였을 때, glucose 농도에 따른 IGFBP-5의 단백질 발현 수준을 western blot analysis로 살펴보았다. 그 결과, 고농도 glucose 배양 조건에서 IGFBP-5 단백질 발현이 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 1). 앞선 실험에서 IGFBP-5의 단백질 수

Table 1. Effect of glucose levels on cell growth of GM10

Glucose concentration	Cell number (cells/cm ²)
5 mM	$45.1 \pm 4.3 \times 10^4$
25 mM	$47.9 \pm 5.0 \times 10^4$

• Values are the mean $\pm$ SE (n=3)

Fig. 1. IGFBP-5 western blotting of GM10 cell's lysates. After SDS-PAGE of cell lysates were electroblotted onto immobilon-PS^Q membrane and incubated with IGFBP-5 antibody. Molecular markers are indicated on the left. lane 1 : high glucose(25 mM), lane 2 : low glucose(5 mM).

준이 고농도 glucose 배양 조건에서 감소하였으므로 분자적 수준에서의 IGFBP-5 발현정도를 살펴보았다(Fig. 2). 그 결과, 고농도와 저농도 glucose 배양 조건, 그리고 고농도 glucose 배양 조건 하에서 IGF-I과 인슐린을 첨가하여 배양한 GM10세포에 있어서 IGFBP-5 mRNA 발현은 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다.

IGFBP-5의 발현이 정상인의 피부 섬유아세포에 IGF-I 첨가 시 IGFBP-5 mRNA 합성에는 protease활성의 저하로 IGFBP-5 수준이 증가한 반면[4], smooth muscle cell, chondrocytes 그리고 osteoblast[6]에서도 IGF-I 첨가 시 IGFBP-5 mRNA 발현이 현저히 증가한다고 보고하였다. 이와 같이 정상상태의 섬유아세포에 있어서 IGF-I 첨가는 단백질 수준에서뿐만 아니라 분자적 수준에서도 IGFBP-5의 합성을 증가시키지만 고농도 glucose 상태에서는 IGF-I을 첨가하더라도 IGFBP-5를 감소시킨다고 하였다. 정상상태와 비교할 때 인슐린 의존성 당뇨병, 인슐린 비의존성 당뇨병 환자의 피부 섬유아세포에 있어서 IGFBP-5는 저하되는 것으로 보고되고 있다[26]. 즉, 앞선 실험에서 IGFBP-5 단백질 수준이 약간의 감소를 보였고, IGFBP-5 mRNA의 발현은 고농도와 저농도 glucose에서 유의적인 차이가 없음을 확인하였다.

Glucose 농도가 IGFBP-5 protease에 미치는 영향

성인 혈청에서는 대부분 IGFBP-3가 IGF-IGFBP 복합체간

Fig. 2. Effects of high glucose, IGF-I, insulin low glucose on IGFBP-5 gene expression 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. Total RNA was extracted from cultures of human GM10 cells and used for RT-PCR as described in Materials and Methods. lane 1 : high glucose(25 mM), lane 2 : high glucose treated with IGF-I(100 ng/ml), lane 3 : high glucose treated with insulin(100 ng/ml), lane 4 : low glucose(5 mM).

IGFs의 분포를 변화시켜 순환하는 IGFs의 대사회전과 이용도를 변화시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 순환하는 IGFs는 IGFBPs에 의해 조절될 뿐 아니라 혈청[12]이나 세포 수준[11]에서 작용하는 특이적 IGFBPs protease에 의해서도 조절되는데, 이러한 IGFBP protease의 작용에 의해 생긴 단편은 IGFs에 대한 친화력을 크게 감소시킨다. 사람의 섬유아세포의 cell lysates에는 IGFBP-3와 IGFBP-5 mRNA가 풍부하게 존재하는 반면, 회수한 배양액에서는 intact IGFBP-5가 나타나지 않고 22 kDa의 non-IGF-I binding fragment만이 존재하였는데[4], 배양액 중에 IGFBP-5를 분해하는 protease가 존재하기 때문인 것으로 나타났다[19]. 본 연구에서도 IGFBP-5가 확인되었으며, glucose 농도에 따라 IGFBP-5의 발현이 달라짐을 확인하였다. 이에 고농도 glucose 배양 조건에서 IGFBP-5의 감소가 protease에 의한 것인지 확인하기 위해 glucose 배양 조건에 따른 IGFBP-5 protease 활성을 살펴보았다(Fig. 3). 그 결과, 고농도 glucose 배양 조건에서 30 kDa의 intact IGFBP-5가 저농도에 비해 약간 감소했으며, 22 kDa 부근의 IGFBP-5 가수분해물이 많이 생성되고 있음을 볼 때, 고농도 glucose 배양 조건에서 IGFBP-5의 단백질 분해가 촉진됨을 확인하였다.

Nam 등[19]은 사람의 섬유아세포가 IGFBP-5를 분해하는 두 종류의 protease를 분비한다고 하였는데, 그 중 하나는 aprotinin, 3,4-DCI, PMSF 등에 저해되는 92 kDa의 serin protease와 EDTA, 1,10-phenanthroline 등에 의해 저해되는 72-, 69-, 55-kDa의 metalloprotease로 알려져 있다. 특히, 사람의 섬유아세포에서는 92 kDa의 serine protease가 우세하게 작용하여 intact IGFBP-5를 22-, 17-, 16-kDa의 fragment로 분해시킨다고 하였다. 따라서, 본 실험에서 고농도 glucose

Fig. 3. Effect of glucose on IGFBP-5 protease activity in GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing high glucose and low glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) for 14 hr at 37°C, and the products were analyzed by western blotting. The relative migration position of fragments are also noted by arrows. lane 1 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) plus intact IGFBP-5, lane 2 : Conditioned medium containing low glucose(5 mM) plus intact IGFBP-5.

배양 조건에서 보여지는 IGFBP-5의 감소는 protease에 기인한 것으로 보이며 그 중에서도 serine protease에 의해 분해될 것으로 추정하였다.

Protease 저해제에 의한 IGFBP-5 protease의 특성

앞선 결과에서 고농도 glucose 배양 조건에서 IGFBP-5의 감소는 protease 활성이 증가되어 단백질 분해가 일어났으며 serine protease에 의한 것으로 추정하였다. 이에 고농도, 저농도 glucose 배양 조건과 고농도 glucose 하에서 IGF-I 또는 인슐린을 첨가한 세포 배양액 중의 IGFBP-5의 분해에 관여하는 효소의 성질을 살펴보기 위해 여러 종류의 저해제를 처리하여 proteolysis를 수행하였다. GM10 세포에 저농도 glucose, 고농도 glucose 배양 조건 하에서 IGF-I과 인슐린을 첨가하여 배양한 세포 배양액에 EDTA, PMSF, 1,10-phenanthroline, aprotinin, E64, benzamide, heparin을 처리한 뒤에 IGFBP-5 발현에 미치는 각 protease의 특성을 western blot analysis로 살펴보았다(Fig. 4~7). 그 결과, metalloprotease 저해제인 EDTA에 의해서는 거의 저해되었으며, 1,10-phenanthroline에 의해서는 약간의 저해를 볼 수 있었다. Serine protease 저해제인 PMSF의 경우는 IGF-I을 처리한 세포 배양액에서만 protease 활성을 저해시키지 못했으며(Fig. 5), aprotinin의 경우 고농도 glucose 배양 조건을 제외한 다른 조건에서 모두 protease 활성을 억제시켰다. Serine protease 및 metalloprotease를 동시에 저해시키는 저해제로 알려진 heparin의 경우 protease 활성이 모든 조건에서 저해되었다. 또한 E64와 benzamide의 경우에는 단백질 분해 억제작용이 약화되어 있음을 확인할 수 있었다. 본 결과에는 제시하지 않았지만, 고농도 glucose 배양 조건에서 IGF-I을 처리한 경우 22

Fig. 4. Effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in high glucose conditioned medium at GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 hr at 37°C, and the products were analyzed western blotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows. lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation, lane 2 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5, lane 3 : EDTA(50 mM), lane 4 : PMSF(2 mM), lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM), lane 6 : aprotinin(5 mM), lane 7 : E64(0.2 mM), lane 8 : benzamide(3 mM), lane 9 : heparin(1 µl/ml).

Fig. 5. Effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in high glucose conditioned medium treated with IGF-I at GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 hr at 37°C, and the products were analyzed by western blotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows. lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation, lane 2 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5, lane 3 : EDTA(50 mM), lane 4 : PMSF(2 mM), lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM), lane 6 : aprotinin(5 mM), lane 7 : E64(0.2 mM), lane 8 : benzamide(3 mM), lane 9 : heparin(1 µl/ml).

Fig. 6. Effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in high glucose conditioned medium treated with insulin at GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing high glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 hr at 37°C, and the products were analyzed by western blotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows. lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation, lane 2 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5, lane 3 : EDTA(50 mM), lane 4 : PMSF(2 mM), lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM), lane 6 : aprotinin(5 mM), lane 7 : E64(0.2 mM), lane 8 : benzamide(3 mM), lane 9 : heparin(1 µl/ml).

kDa와 20 kDa의 fragment만 나타났으며, 다른 조건에서와는 달리 heparin 처리 시 20 kDa의 fragment가 진하게 나타났다. 그리고 인슐린의 경우에는 22 kDa와 17-, 16 kDa의 fragment만이 확인되었다. 따라서, IGF-I과 인슐린은 IGFBP-5 protease 활성에 관여하는 것으로 여겨지며, 고농도 glucose의 배양조건 하에서 섬유아세포에서 IGFBP-5의 분해는 serine protease 뿐만 아니라 metalloprotease 역시 관여한다는 것을 확인하였다. 섬유아세포에 있어서 IGFBP-5의 분해는 serine protease와 metalloprotease가 모두 관여하며, 특히

Fig. 7. Effects of protease inhibitors on IGFBP-5 protease activity in low glucose conditioned medium at GM10 cells. Cells were cultured for 24 hr in a medium containing low glucose. Conditioned medium were incubated with intact IGFBP-5(100 ng) and various protease inhibitor for 14 hr at 37°C, and the products were analyzed by western blotting. The relative migration positions of fragments are also noted by arrows. lane 1 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5 and no incubation, lane 2 : Conditioned medium plus intact IGFBP-5, lane 3 : EDTA(50 mM), lane 4 : PMSF(2 mM), lane 5 : 1,10-phenanthroline(1 mM), lane 6 : aprotinin(5 mM), lane 7 : E64(0.2 mM), lane 8 : benzamide(3 mM), lane 9 : heparin(1 μ l/ml).

serine protease가 우세하게 작용하며, metalloprotease도 작용한다고 하였다[19]. 또한 serine protease 저해제인 aprotinin, 3,4-DC I, PMSF와 metalloprotease inhibitor인 EDTA, 10-phenanthroline 등에 의해 IGFBP-5 proteolysis 억제 효과를 나타냈으나, E64, Benzamide, NEM, iodoacetic acid 등은 protease 활성을 억제시키지 못한다고 하였다[20].

이상의 결과에서 저농도 glucose의 배양 조건에서 IGFBP-5의 분해가 약하였고, 고농도 glucose 배양 조건에서는 같은 농도의 저해제를 사용하였음에도 불구하고 IGFBP-5 분해를 크게 저해하지 못하는 것으로 보아, 고농도 glucose 배양 조건에서는 IGFBP-5를 분해시키는 효소의 활성이 강하다는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 당뇨 상태의 *in vivo* 연구에서 나타나는 결과와 일치하며, 더 나아가 glucose 농도 및 IGF-I과 인슐린의 첨가에 의해 유도되어지는 IGFBP-5 protease 활성의 변화와 관련된 작용 기전의 규명과 IGFBP-5 protease가 고농도 glucose 배양 조건에서 왜 강한 활성을 나타내는지에 대해서는 이들 효소를 분리 정제하여 다른 각도로 보다 많은 연구가 진전되어야만 해석이 가능할 것이라고 생각된다.

Glucose 농도가 IGFBP-5 protease의 크기에 미치는 영향

앞선 결과에서 IGFBP-5를 분해하는 metalloprotease가 활성화됨을 확인하였으므로 metalloprotease의 크기를 알아보기 위해 gelatin zymography를 실시하였다. 그 결과, GM10 세포에서 고농도와 저농도 glucose 배양 조건과 고농도 glucose 배양 조건 하에 IGF-I과 인슐린을 처리한 세포 배양액 중의 metalloprotease의 크기를 확인한 결과 모든 조건에서 72-, 69-, 55-kDa의 gelatinase를 확인하였다. 그 중에서도 69 kDa의 gelatinase가 가장 큰 활성을 가지고 있었으며 특히,

고농도 glucose 배양 조건에서 효소 활성이 증가함을 확인하였다(Fig. 8). 이 결과를 바탕으로 GM10 세포에서 고농도와 저농도 glucose 배양 조건에 있어서 시간의 경과에 따른 protease의 크기를 gelatin zymography로 살펴보았다. 그 결과, 고농도와 저농도 glucose 배양 조건에 있어서 protease 활성이 시간 의존적으로 증가하였으며, 앞의 결과와 마찬가지로 고농도 glucose 배양 조건에서 protease의 활성이 크게 증가함을 확인하였다(Fig. 9).

Fig. 8. Characterization of gelatin-degrading protease activity on conditioned medium 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 were analyzed by gelatin-substrate zymography. Sample were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels that contained cross-linked gelatin. After electrophoresis, the gel incubated for 14 hr at 37°C. After fixing, staining, and destaining, take a photograph of gel. Areas of lysis (clear zone) represent gelatin-degrading protease activity in the sample. Molecular markers are indicated on the left. lane 1 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM), lane 2 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) treated with IGF-I(100 ng/ml), lane 3 : Conditioned medium containing high glucose(25 mM) treated with insulin(100 ng/ml), lane 4 : Conditioned medium containing low glucose(5 mM).

Fig. 9. Time course of characterization of gelatin-degrading protease activity on conditioned medium 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 were analyzed by gelatin-substrate zymography. Sample were electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide gels that contained cross-linked gelatin. After electrophoresis, the gel incubated for 14 hr at 37°C. After fixing, staining, and destaining, take a photograph of gel. Areas of lysis (clear zone) represent gelatin-degrading protease activity in the sample. Molecular markers are indicated on the left. lane 1(24 hr), 2(72 hr), 3(120 hr) : Conditioned medium containing high glucose(25 mM), lane 4(24 hr), 5(72 hr), 6(120 hr) : Conditioned medium containing low glucose(5 mM).

이상으로 GM10 세포를 사용하여 고농도 glucose 배양 조건 하에서 protease 활성의 증가로 인해 IGFBP-5의 분해가 촉진됨을 확인하였다. 그러나 당뇨병과 같은 이화상태에서 어떤 기전을 통해 IGFBP의 분해가 촉진되는지, 여기에 관여하는 효소의 발현 및 그 분자적 수준 등에 관해서는 아직까지 밝혀진 바가 없다. 또한, 당뇨병에 관여하는 유전자 수준이다 치료의 목적으로 가능성을 제시하고 있는 효소 정제 등에 있어서 보다 효율적인 *in vitro* system을 필요로 한다. 본 연구 결과를 바탕으로 IGFs와 같은 세포 성장인자에 대한 연구는 세포수준의 당뇨병과 관련된 *in vitro* model system이 가능하리라고 여겨지며 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

요 약

사람의 섬유아세포인 GM10에서 glucose 농도에 따른 IGFBP-5의 존재와 발현에 미치는 영향을 살펴보고 당뇨병과 관련된 *in vitro* model system으로서의 활용 가능성을 검토하고자 하였다. 섬유아세포인 GM10 세포를 사용하여 glucose 배양 조건에 따른 IGFBP-5의 존재와 발현에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, IGFBP-5의 단백질 수준은 고농도 glucose 배양 조건에서 증가하였으나, IGFBP-5 mRNA 발현에는 아무런 영향을 나타내지 않았다. IGFBP-5 protease 활성은 고농도 glucose 배양 조건에서 높았다. IGF-I 과 인슐린은 IGFBP-5 protease 활성에 관여하는 것으로 보이며, GM10 세포에 있어서 IGFBP-5의 분해에는 serine protease 뿐만 아니라 metalloprotease가 관여하는 것으로 나타났다. 또한, gelatin zymography를 통한 protease 활성은 고농도 glucose 배양 조건에서 크게 나타났으며, 시간 의존적으로 증가하였다. 본 연구 결과를 바탕으로 IGFs와 같은 세포 성장인자에 대한 연구는 세포수준의 당뇨병과 관련된 *in vitro* model system이 가능하리라고 여겨지며 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 부경대학교 기성회 학술연구비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Choi, M. S., J. H. Lee, H. C. Lee and K. B. Huh. 1992. Influence of duration of diabetes on nutritional status in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* **16**, 35-44.
- Conover, C. A., J. T. Clarkson and L. K. Bale. 1995. Effect of glucocorticoid on insulin-like growth factor (IGF) regulation of IGF-binding protein expression in fibroblasts. *Endocrinology* **136**, 1403-1410.
- Conover, C. A., L. K. Bale, J. T. Clarkson and O. Torrig. 1993. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 messenger ribonucleic acid expression and protein availability in rat osteoblasts. *Endocrinology* **132**, 2525-2530.
- DeFronzo, R. A., R. C. Bonadonna and E. Ferrannini. 1992. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* **15**, 318-368.
- Diraison, F., V. Large, H. Brunengraber and M. Beylot. 1998. Non-invasive tracing of liver intermediary metabolism in normal subjects and in moderately hyperglycemic NIDDM subjects. Evidence against increased gluconeogenesis and hepatic fatty oxidation in NIDDM. *Diabetologia* **41**, 212-220.
- Duan, C. and D. R. Clemmons. 1998. Differential expression and biological effects of insulin-like growth factor-binding protein-4, -5 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 16836-16842.
- Fielder, P. J., H. Pham, E. Y. Adashi and R. G. Rosenfeld. 1993. Insulin-like growth factors (IGFs) block FSH-induced proteolysis of IGF-binding protein-5 (BP-5) in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **133**, 415-418.
- Fielder, P. J., J. Guevara-Aguirre, A. L. Rosenbloom, L. Carlsson, R. L. Hintz and R. G. Rosenfeld. 1992. Expression of serum insulin-like growth factors, IGF-binding proteins, and the growth hormone-binding protein in heterozygote relatives of Ecuadorian growth hormone receptor deficient patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 743-750.
- James, P. L., S. B. Jones, W. H. Busby, D. R. Clemmons and P. Rotwein. 1993. A high conserved insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-5) is expressed during myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **268**, 22305-22312.
- Jones, J. I. and D. R. Clemmons. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins : biological actions. *Endocr. Rev.* **16**, 3-34.
- Jones, J. L., A. Gockerman, W. H. Busby, C. Camacho-

- Hubner and D. R. Clemmons. 1993. Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5 : potentiation of the effects of IGF- I . *J. Cell Biol.* **121**, 679-687.
16. Kou, K., N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland and P. Rotwein. 1994. Organization, expression, and chromosomal location of the mouse insulin-like growth factor binding proteins 5 gene. *Genomics* **20**, 412-418.
 17. Lepu, F., J. D. Terwilliger, K. Lee, G. V. Segre and A. Efstratiadis. 2001. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor I in mouse postnatal growth. *Dev. Biol.* **229**, 141-162.
 18. Maes, M., L. E. Underwood and J. M. Ketelglesger. 1986. Low serum somatomedin-C in insulin-dependent diabetes: Evidence for a postreceptor mechanism. *Endocrinology* **118**, 377-382.
 19. Nam, T. J., H. Walker, W. H. Busby and D. R. Clemmons. 1994. Human fibroblasts secrete a serine protease that Cleaves insulin-like growth factor-binding protein-5. *Endocrinology* **135**, 1385-1391.
 20. Nam, T. J., W. H. Busby and D. R. Clemmons. 1996. Characterization and determination of the relative abundance of two types of insulin-like growth factor binding protein-5 proteases that are secreted by human fibroblasts. *Endocrinology* **137**, 5530-5536.
 21. 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.
 22. Price, G. J., J. L. Berka, G. A. Werther and L. A. Bach. 1997. Cell-specific regulation of mRNAs for IGF- I and IGF binding protein-4 and -5 in streptozotocin-diabetic rat kidney. *J. Mol. Endocrinol.* **18**, 5-14.
 23. 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.
 24. Segev, Y., D. Landau, M. Marbach, N. Shehadeh, A. Flyvbjerg and M. Phillip. 1997. Renal hypertrophy in hypercemic non-obese diabetic mice in associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I . *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 436-444.
 25. Shimasaki, S., M. Shimonaka, H. P. Zhang and N. Ling. 1991. Identification of five different insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) from adult rat serum and molecular cloning of a novel IGFBP-5 in rat and human. *J. Biol. Chem.* **266**, 10646-10653.
 26. 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.
 27. Terry, A. J. and D. R. Clemmons. 1998. Effect of glucose on insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis. *Endocrinology* **139**, 44-50.
 28. Wahren, J., P. Felig, E. Cerasi and R. Luft. 1972. Splanchnic and peripheral glucose amino acid metabolism in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **51**, 1870-1878.
 29. Wise, L. S. and H. Green. 1979. Particioation of one isozyme of cytosoloc glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 273-275.
 30. Yde, H. 1969. The growth hormone dependent sulfation factor in patients with various types of diabetics. *Acta. Med. Sand.* **186**, 293-297.