

## 주산기 랫드 모체에서 Insulin-like Growth Factor System의 변동

진송균, 박수현, 조남표<sup>1</sup>, 강창원\*

전북대학교 생체안전연구소, <sup>1</sup>전북대학교 치과대학

(게재승인: 2003년 6월 17일)

### Changes of the Maternal Insulin-like Growth Factors System in Pregnant Rats During Perinatal Periods

Song-jun Jin, Soo-hyun Park, Nam-pyo Cho<sup>1</sup> and Chang-won Kang

*Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

<sup>1</sup>*School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea*

(Accepted: June 17, 2003)

**Abstract:** Insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins (IGFBPs) are important regulators on the development of maternal tissues during pregnancy. This study was performed to examine the relationship between maternal IGFs/IGFBPs system (i.e. IGF-I, II, their receptors, and IGFBPs) in pre- and post-partum rats. The liver and kidney are important organs for the synthesis of IGFs and IGFBPs in adults. The levels of maternal IGFs and IGFBPs in serum, liver, and kidney were examined at 14 and 21 days of gestation and at 3, 7, 11, and 14 days after birth. The expression of IGFs and their receptors mRNA was also examined in fetal and maternal rat liver, kidney.

IGF-I concentrations in maternal serum and liver were decreased during pregnancy. However, IGF-I concentration in maternal kidney was increased, having maximal effect at 14 days of gestation. IGF-I concentrations were decreased in serum, liver, and kidney of postpartum rat, compared to control ( $p < 0.05$ ). On the other hand, IGF-II concentrations in serum, liver, and kidney were increased during pregnancy ( $p < 0.05$ ) and gradually decreased to control level in postpartum period.

The levels of IGFBP-3 and IGFBP-2 are expressed in serum, liver, and kidney. However, IGFBP-3 is mainly expressed in serum and liver, and IGFBP-2 in kidney. The levels of IGFBP-3 and IGFBP-2 in maternal serum were markedly decreased during pregnancy and gradually recovered to control level during postpartum period by western ligand blotting. However, there was no change of IGFBP-3 and IGFBP-2 levels by western immunoblotting. The levels of IGFBP-3 and IGFBP-2 in maternal liver and kidney also showed the same pattern of serum, although the main IGFBP is different.

In normal rat serum, IGF-I 150 kDa and 50 kDa carrier proteins were detected. The level of IGF-I 150 kDa carrier proteins in pregnant rat was decreased compared to normal rat, but that of 50 kDa carrier proteins was increased. IGFBP-3 protease activity was identified in pregnant rat serum and maternal placenta, and it was inhibited by EDTA ( $\text{Ca}^{2+}$  chelating agent) and aprotinin (serine proteinase inhibitor).

Taken together, these results suggest that the changes of IGFs and IGFBPs in maternal rats are regulated by liver and kidney IGFs and their receptors mRNA during the pregnancy.

**Key words:** pregnancy, IGFs, liver, kidney

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구사업 (R01-2001-000-00180-0)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

\* Corresponding author: Chang-won Kang

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea  
Tel: +82-63-270-3715, E-mail: cwkwang@chonbuk.ac.kr

## 서 론

임신에 있어서 성선 자극 호르몬과 스테로이드 호르몬은 여포와 난포의 성숙, 배란과 착상, 임신 유지와 태아의 발육, 분만 후 유선 발육과 비유 등 임신과 분만 전·후의 생식현상에 있어서 중추적인 역할을 담당한다. 이와 같은 생식기능의 조절 및 발현에는 성장인자가 관련되어 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되고 있다 [15, 16, 21]. 이와 같은 성장인자들로는 insulin-like growth factor (IGF), 표피세포 성장인자(EGF), 형질전환 성장인자(TGF- $\alpha$  and  $\beta$ ), 섬유아 세포 유래 성장인자(FGF) 및 혈소판 유도 성장인자(PDGF) 등을 들 수 있다 [15, 16]. 이들중 IGF는 수정 후 착상 전·후의 시기에 배의 생존과 임신 유지기능에 매우 중요한 역할을 담당한다.

IGF는 IGF-I과 IGF-II로 크게 구분되며 이들은 한줄기 폴리펩티드로서 분자량은 각각 7,649와 7,471이며 그 구조는 유사하다 [17]. IGF-I은 성장 호르몬에 의하여 조절되고 대부분 간에서 합성되며 [28], 일부분은 신장과 같은 다른 조직에서 autocrine와 paracrine에 의해 분비되어 세포의 분열과 증식을 촉진한다 [18]. 이와 같이 IGF는 포유동물 및 가금 등에서 생체 및 조직 성장에 관여하고, glycogen 합성, 단백질 합성, 체중 증가, 창상 개선 효과, 신장의 여과율을 촉진하는 것으로 보고되고 있다 [20]. IGF의 생물학적 작용은 세포막의 두 가지 형태의 수용체에 의하여 조절되며 [25], 두 가지 형태의 수용체의 발현 현상 역시 임신 중 태아, 모체 및 태반내의 기능발현에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 [27, 29].

임신중 IGF axis의 규명에 있어서 IGF binding proteins(IGFBPs)들은 IGF를 조절하는 중요한 결합 단백질로 6 종이 존재하며 이들은 조직 특이적인 반응을 보인다 [23]. 이들 IGFBP의 기능 중 IGFBP-1 및 -3는 IGF의 작용을 억제 또는 촉진하는 반면에, IGFBP-4와 IGFBP-5는 IGF의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다 [20]. 그러나 각각의 IGFBP가 랫드의 생체에 어떠한 기능을 가지고 있는지는 아직 명확하지 않다.

혈중에 가장 많이 존재하는 IGFBP-3는 대부분의 IGF와 분자량이 85 kDa 불안전성 subunit (acid labile subunit)(ALS)가 결합된 분자량 150 kDa의 복합체 형태로 존재하며, IGF의 일부는 분자량이 작은 IGFBP-1, IGFBP-2 및 IGFBP-4와 결합하여 분자량 50 kDa의 복합체 형태로 존재한다. 순환 혈액내 이들 복합체들은 IGF의 활성을 조절하며, 반감기를 증대시키고 보호하는 기능을 가지고 있어 생체내 IGF axis의 조절을 통하여 생

체의 증식에 관여한다 [20]. 순환 혈액내 IGFBP-3는 복합체 형태로 존재하므로 모세관 관문(capillary barrier)를 통과하지 못하기 때문에 조직내 IGFs의 이용율에 영향을 미친다 [4]. 그러나 임신중 모체에서 임신주기별 IGFs의 변동과 이에 수반하는 IGFs/IGFBPs axis가 어떻게 변동하는지는 아직 명확하게 밝혀지지 않고 있다.

따라서 이 연구는 랫드에서 임신 기간별로 모체의 IGF 작용의 중요기관인 혈액, 간장 및 신장에서 IGF/IGFBP system 변화에 대해 알아보고자 이 연구를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물과 시료의 채취

18주령 랫드 Sprague - Dawley 암컷 30두(체중 200 - 220g)를 임신시켜 임신 7, 14, 및 21일 때 랫드를 희생시켜 모체로부터 혈액, 신장 및 간장을 분리하였으며, 분만 후 3, 7, 11 및 14일째 모체를 희생시켜 각각의 실험시료를 위와 같이 분리하여 -70°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

### 시료의 전 처리

시료중 IGF들은 대부분 IGFBP와 결합된 형태로 존재하므로 IGFBP로부터 IGFs를 분리하기 위하여 acid-ethanol extraction [10]와 formic acid extraction [5] 방법에 의하여 분리하였다. IGF-I의 분리는 혈청 200  $\mu$ l에 acid-ethanol(2 M HCl : ethanol = 1 : 7) 800  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치하여 유리형과 결합형을 분리시켰다. 그 후 3000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 유리 IGF-I을 함유하는 상층액 500  $\mu$ l에 0.855 M trizma base를 200  $\mu$ l 넣어 분석에 사용하였다. 간장, 신장 및 태반 조직은 각 조직 0.25 g에 1% trifluoroacetic acid (TFA) 2 ml를 넣어 균질마쇄기(Polytron Co, U.S.A)로 마쇄 후 원심분리하여 상층액을 취한 다음 acid-ethanol 추출법으로 IGFBP로부터 IGF-I을 분리하여 농도를 측정하였다.

IGF-II의 분리는 혈청 50  $\mu$ l에 0.5% Tween 20을 함유하는 8.0 M formic acid 100  $\mu$ l를 넣어 진탕하고 350  $\mu$ l의 acetone 첨가하였다. 그 후 3500  $\times$  g에서 15분간 4°C에서 원심분리하여 상층액 200  $\mu$ l에 1.75 M trisma base 85.7  $\mu$ l를 넣어 분석에 사용하였다. 간장, 신장 및 태반조직은 각 조직 0.25 g을 1% TFA 2 ml에 넣어 균질마쇄기(Polytron Co., USA)로 마쇄하고 원심분리하여 상층액을 취한 다음 formic acid-acetone 추출법으로 IGFBPs로부터 IGF-II를 분리하여 농도를 측정하였다.

### IGFs(IGF-I과 II) 추적자 제조

Chloramin-T [22]방법을 약간 변형시켜 제조하였다. 이를 요약하면, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 10  $\mu$ l에 recombinant human IGFs 1  $\mu$ g을 첨가한 후 [<sup>125</sup>I] (Amersham Life Science, ILL, USA) 1 mCi를 첨가하고 0.04 mg/ml의 chloramin-T 10  $\mu$ l를 넣어서 신속히 교반한 후 IGFs 추적자를 분리하였다. IGF-I 추적자 [<sup>125</sup>I]IGF-I의 분리는 cellulose CF-II column (Bio-Rad, CA, USA)에 혼합물을 가한 다음 20.6 mg/ml barbital buffer로 column을 세척하였다. 그 후 12% bovine serum albumin (BSA) 용액으로 용출시켜 분획 수집기(20 drops)로 받아서 gamma counter (Packard, ILL, USA)로 cpm을 측정하고 방사능이  $3 \times 10^6$  cpm이 되도록 각각 분주하여 -70°C에 냉동보관 하였다. [<sup>125</sup>I]IGF-II 추적자는 sephadex G-50 (Pharmacia LKB., Biotechnology AB, Sweden) column을 통하여 0.2 M sodium phosphate buffer (0.2% BSA 포함)에 용출시켜 위와 같은 방법으로 분획 수집하여 방사능을 측정하여 -70°C에 냉동보관 하였다.

### IGFs 방사면역 측정법

혈청내 IGF-I과 IGF-II의 농도 측정은 [<sup>125</sup>I]-IGFs에 polyclonal anti-IGFs를 사용한 방사면역 측정법 (radioimmunoassay, RIA)을 이용하였다. 이를 요약하면, IGFs의 측정RIA 완충액은 0.5% BSA, 0.12 M NaCl, 0.1% sodium azide를 함유한 0.04 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)을 사용하였다. IGFs 표준액과 시료에 1000배 희석시킨 polyclonal anti-IGF 50  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 시험관에 [<sup>125</sup>I]-IGFs (20000 cpm/100  $\mu$ l)을 첨가하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 그 후 말 혈청 50  $\mu$ l와 12% polyethylene glycol #8000 1 ml를 첨가하여 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter (Packard, ILL, USA)로 측정하였다.

### Western Ligand Blot (WLB)

IGFBP 분석은 Hossenlopp 등 [19]의 방법에 준하여 시행하였다. 이를 요약하면, 혈청을 sample buffer로 30배 희석한 후 10  $\mu$ l를 12% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m pore size)에 이전시킨 후 3% NP 40을 함유한 tris buffer saline (TBS)으로 30분 세척하였다. 1% BSA를 함유한 TBS로 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 0.1% tween 20을 함유한 TBS로 10분간 세척하였다. 이를 1% BSA와 0.1% tween 20을 함유한 TBS 용액에 IGF-I과 II가 혼합된 [<sup>125</sup>I]-IGFs ( $1 \times 10^6$

cpm)을 첨가하여 4°C에서 18시간 배양하였다. 그 다음 0.1% tween 20을 함유한 TBS로 3회 세척한 후 TBS로 3회 세척하고 실온에서 건조시켰다. 건조시킨 nitrocellulose membrane을 암실에서 X-ray film과 함께 cassette에 넣어 -70°C에서 7일간 방치하였다.

### RNA 분리

Total RNA를 분리하기 위하여 조직(50~100mg)에 TRI reagent (MRC Co., USA) 1 ml을 첨가한 후 균질마쇄기(Polytron Co., USA)를 이용하여 5000 rpm에서 30초 동안 분쇄하였다. 분쇄된 조직을 eppendorf tube에 옮겨 상온에서 5분간 정지한 다음 chloroform (Fisher Co., USA)을 200  $\mu$ l 첨가하여 15초간 진탕한 다음 상온에서 15분간 정지시켰다. 정지 후 14,000 rpm (4°C)에서 20분간 원심분리하여 조직내의 DNA, 단백질 등을 제거하였다. Total RNA가 들어있는 상층액을 분리하여 새로운 eppendorf tube에 옮기고, 500  $\mu$ l의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 5분방치 후 14,000 rpm (4°C)에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 수득하였다. RNA pellet에 75%의 ethanol(1ml)을 첨가하여 세척한 후 상온에서 건조시킨 다음 DEPC (diethylpyrocarbonate; Sigma, USA)를 처리한 증류수에 용해시키고 -70°C에 보관하였다.

### RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)

각각의 조직으로부터 분리된 total RNA 3  $\mu$ g을 역전사 시켜서 cDNA를 제작하였다. 반응조성은 3  $\mu$ g total RNA를 DEPC-D.W.로 4.1  $\mu$ l 되게 희석시키고, 65°C에서 10분간 변성시켰다. 여기에 역전사 효소반응액 5.9  $\mu$ l [ $5 \times$  RT buffer(2  $\mu$ l), 0.1 M DTT(1  $\mu$ l), 500uM dNTP (1  $\mu$ l), random primer(1  $\mu$ l, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l), RNase inhibitor(0.4  $\mu$ l, 40 U/1  $\mu$ l), Reverse transcriptase (0.5  $\mu$ l, 200 U/1  $\mu$ l)]을 첨가하여 상온에서 10분간 방치하고 이어서 40°C에서 60분간, 그리고 95°C에서 10분간의 연속적인 반응을 automatic thermocycler에서 실시하였다.

합성된 IGFs cDNA 10  $\mu$ l에 Taq-polymerase 효소반응액(10 $\times$  buffer(5  $\mu$ l), 500  $\mu$ M dNTP(5  $\mu$ l), 25 mM MgCl<sub>2</sub>(3  $\mu$ l), Taq-polymerase(0.25  $\mu$ l, 5 U/1  $\mu$ l)]을 첨가하고 IGF-I cDNA에 특이적으로 반응하는 primer 5'-CAC AGG CTA TGG CTC-3' (sense)와 5'-CTT CTG AGT CTT GGG-3' (anti-sense)를 각각 1  $\mu$ l (10 pM) 첨가하여 94°C/1 min, 56°C/1 min, 72°C/1 min 조건에서 30 cycles로 증폭하였으며, IGF-II cDNA에 특이적으로 반응하는 primer 5'-CGA TGT TGG TGC TTC TCA-3' (sense)와 5'-GGG GTC TTT GGG TGG TAA-3' (anti-sense)를 각

각 1  $\mu$ l (10 pM) 첨가하여 94°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min 조건에서 30 cycles로 증폭하였다. IGF-I 수용체 cDNA에 특이적으로 반응하는 primer 5'-AGA AAG AGG AAT AAC AGC-3' (sense)와 5'-CGT GTC ATA CCA AAA TCT-3' (anti-sense)를 각각 1  $\mu$ l (10 pM) 첨가하여 94°C/1 min, 54°C/1 min, 72°C/1 min 조건에서 30 cycles로 증폭하였으며, IGF-II 수용체 cDNA에 특이적으로 반응하는 primer 5'-TTT GGG GCT TGT TCA TAC-3' (sense)과 5'-CGT GGA GGA AGA GGT AAA-3' (anti-sense)를 각각 1  $\mu$ l (10 pM) 첨가하여 94°C/1 min, 61°C/1 min, 72°C/1 min 조건에서 30 cycles로 증폭한 후 2% agarose gel 상에서 발현량을 조사하였다.

### Competitive - RTPCR

IGF-I의 정량 PCR은 랫드 IGF-I exon-3 codon에 해당하는 아미노산 유전자 영역을 선정하여 실시하였다. 이 영역의 cloning을 위한 sense primer로는 5'-CAC AGG CTA TGG CTC-3'와 antisense primer로 5'-CTT CTG AGT CTT GGG-3'를 사용하였고, 유전자의 판단은 제한효소의 절단 표현 길이와 DNA sequence로 확인하였다. Standard IGF cDNA의 제작은 RT-PCR로 증폭된 175 bp의 중간부분 53 bp를 제거하였고, 이를 T-easy cloning vector (Promega Co., USA)에 재조합시켰다.

역전사 산물 cDNA 10  $\mu$ l와 제작된 standard IGF cDNA를 1 ng을 같은 PCR tube에 넣은 후 전 과정은 위의 RT-PCR과 같은 조건으로 중합효소연쇄반응을 시켰으며, 증폭된 산물은 2% agarose gel 상에서 발현량을 조사하였다.

### 통계처리

이 실험에서 측정된 결과는 mean  $\pm$  S.E로 나타내었고 group간의 차이는 Student's *t*-test 및 Analysis of Variance (ANOVA)를 이용하였으며,  $p < 0.05$ 의 경우 유의한 차이로 인정하였다.

## 결 과

### 모체 혈액, 간장 및 신장에서의 IGF-I 농도 및 mRNA 변화

대조군의 혈중 IGF-I 농도는  $212.80 \pm 8.04$  ng/ml이며, 분만 전 7, 14, 및 21일과 분만 후 3, 7, 11, 및 14일 모체의 혈 중 IGF-I 농도는 각각  $205.50 \pm 5.51$ ,  $122.63 \pm 3.69$ ,  $78.42 \pm 3.23$ ,  $64.4 \pm 4.45$ ,  $77.0 \pm 5.30$ ,  $102.2 \pm 7.08$  및  $159.6 \pm 11.08$  ng/ml이다 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). 이 때 간장 IGF-I 농도를 살펴보면 대조군은  $288.43 \pm 26.87$  ng/g이며, 분만전

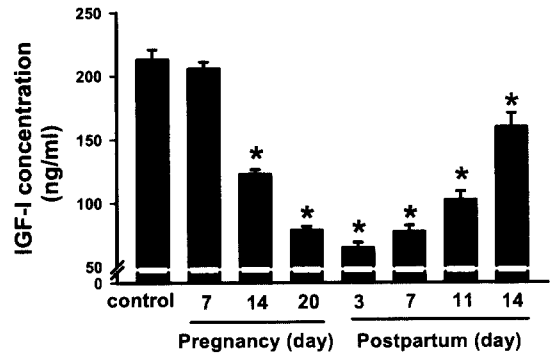


Fig. 1. Change of IGF-I concentrations in pre-postpartum rat serum. Statistical comparisons were done by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA). Values are means  $\pm$  SE (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control.

7, 14, 및 21일과 분만 후 3, 7, 11, 및 14일 모체의 간장 IGF-I 농도는 각각  $280.02 \pm 29.4$ ,  $124.16 \pm 16.99$ ,  $89.63 \pm 7.92$ ,  $34.72 \pm 6.79$ ,  $49.27 \pm 6.42$ ,  $68.16 \pm 5.98$  및  $95.23 \pm 5.96$  ng/g이다 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2). 이는 간장에서의 IGF-I 농도는 혈액에서의 IGF-I 농도의 변화양상과 일치한다는 것을 시사해준다. RT-PCR 방법에서 의해서 모체 간장 IGF-I mRNA를 분석한 결과 임신 7일부터 분만 후 3일까지 감소하다가 분만 후 7일부터 증가함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3A, C). 모체 간장에서 IGF-I 수용체 mRNA는 임신기에 감소하였고 분만 후 7일부터 증가하였다 (Fig. 3B, C).

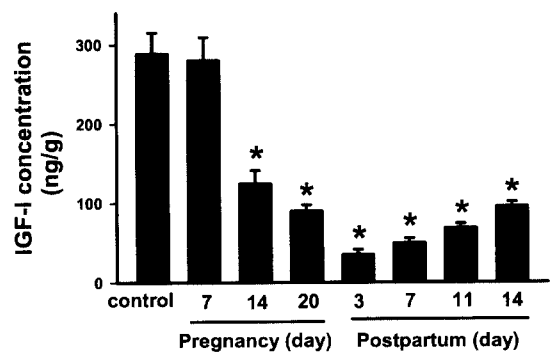
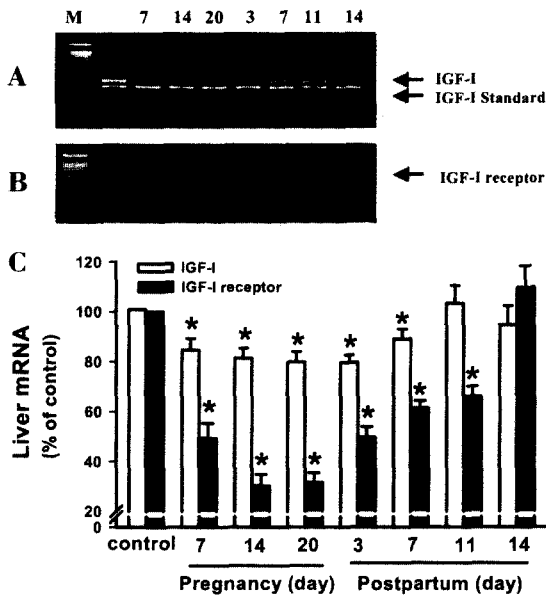


Fig. 2. Change of IGF-I concentrations in pre-postpartum rat liver. Statistical comparisons were done by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA). Values are means  $\pm$  SE (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control.

한편, 신장에서의 IGF-I 농도는 대조군에서  $131.39 \pm 10.32$  ng/g이며, 분만 전 7, 14 및 21일과 분만 후 3, 7, 11

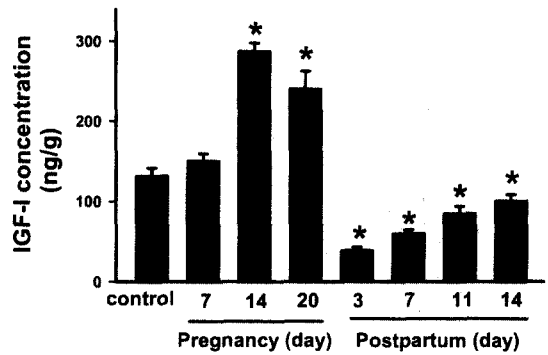


**Fig. 3.** Expression of IGF-I (A) and receptor (B) mRNA in pre-postpartum maternal rat liver. Control, 7, 14, 21 days of gestation and 3, 7, 11, 14 days of postpartum. The example shown is a representative of four independent experiments. C represents the mean values of SE (n=4), \*p<0.05 vs. control.

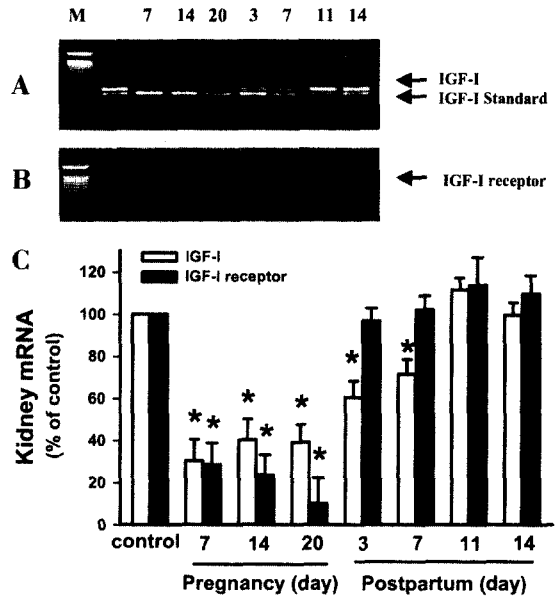
및 14일 모체의 신장 IGF-I 농도는 각각  $149.88 \pm 9.42$ ,  $287.01 \pm 10.73$ ,  $239.84 \pm 22.64$ ,  $38.45 \pm 4.14$ ,  $59.41 \pm 4.89$ ,  $84.34 \pm 9.62$  및  $100.29 \pm 8.58$  ng/g으로 나타났다(p<0.05) (Fig. 4). 신장의 IGF-I 농도는 임신 14일과 21일째 대조군에 비하여 오히려 증가하였으나, 분만을 기점으로 극적인 감소현상을 보였으며 이후 대조군 수준으로 회복되는 것으로 나타났다. 신장에서 IGF-I mRNA를 분석한 결과 임신기간 동안에는 감소하였으나, 분만 후에는 이와 반대로 증가하였다 (Fig. 5A, C). IGF-I 수용체의 경우도 IGF-I mRNA 수준과 같은 결과를 볼 수 있었다 (Fig. 5B, C).

**모체 혈액, 간장 및 신장에서의 IGF-II 농도 및 mRNA 변화**

혈중 IGF-II 농도는 대조군에서  $20.13 \pm 1.05$  ng/ml이며, 임신 7, 14 및 21일과 분만 후 3, 7, 11 및 14일 혈중 IGF-II 농도는 각각  $20.14 \pm 0.78$ ,  $27.81 \pm 3.17$ ,  $41.83 \pm 4.96$ ,  $32.49 \pm 1.88$ ,  $30.92 \pm 2.33$ ,  $28.83 \pm 1.60$  및  $24.59 \pm 1.35$  ng/ml로 나타나 임신 21일의 경우가 가장 농도가 높게 나타났으며 이후 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다(p<0.05) (Fig. 6). 대조군 간장 IGF-II 농도는 임신 14일 째에 가장 높게 나타났으며 이후 점차적으로 감소



**Fig. 4.** Change of IGF-I concentrations in pre-postpartum rat kidney. Statistical comparisons were done by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA). Values are means  $\pm$  SE (n=5). \*p<0.05 vs. control.



**Fig. 5.** Expression of IGF-I (A) and receptor (B) mRNA in pre-postpartum maternal rat kidney. Control, 7, 14, 21 days of gestation and 3, 7, 11, 14 days of postpartum. The example shown is a representative of four independent experiments. C represents the mean values of SE (n=4). \*p<0.05 vs. control.

하여 분만 후부터는 대조군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다(Fig. 7). 또한 RT-PCR 방법에서 의해서 모체 간장 IGF-II mRNA를 분석한 결과 간장 IGF-II mRNA는 임신기간 동안 감소하다가 분만 후 약간 증가하는 것으로 나타났으나 대조군 수준까지는 미치지 않

았다(Fig. 8A, C). 이에 반하여 IGF-II 수용체 mRNA 수준은 모든 실험군에서 별다른 차이는 인정되지 않았다(Fig. 8B, C). 한편 신장에서의 IGF-II 농도는 대조군에서  $56.31 \pm 2.94$  ng/g이며, 임신 7, 14, 및 21일과 분만 후 3, 7, 11, 및 14일 신장의 IGF-II 농도는 각각  $59.22 \pm 1.68$ ,  $79.16 \pm 1.95$ ,  $69.45 \pm 2.04$ ,  $64.29 \pm 3.65$ ,  $61.58 \pm 3.3$ ,  $57.56 \pm 2.68$  및  $56.67 \pm 2.75$  ng/g으로 나타나, 임신 14일째 최고 농도를 보였으며 이후 점차적으로 감소하여 분만후 7일 부터는 대조군과 유의성있는 차이는 인정되지 않았다( $p < 0.05$ )(Fig. 9). 신장에서 IGF-II mRNA 수준은 임신 7일부터 증가하다가 분만 후 3일부터 다시 억제되었다(Fig. 10A, C). IGF-II 수용체 mRNA의 경우 임신 기간 동안에는 증가하였으나 분만후에는 현저히 감소하여 대조군과 별다른 이상이 없었다(Fig. 10B, C).

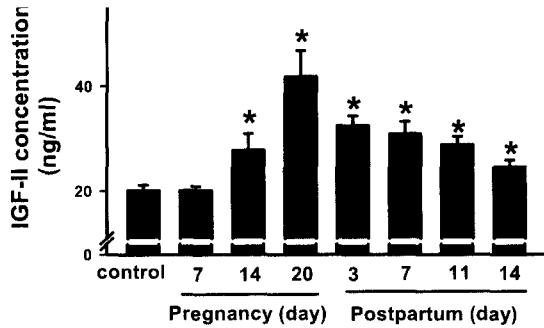


Fig. 6. Change of IGF-II concentrations in pre-postpartum rat serum. Statistical comparisons were done by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA). Values are means  $\pm$  SE (n=5). \* $p < 0.05$  vs. contro.

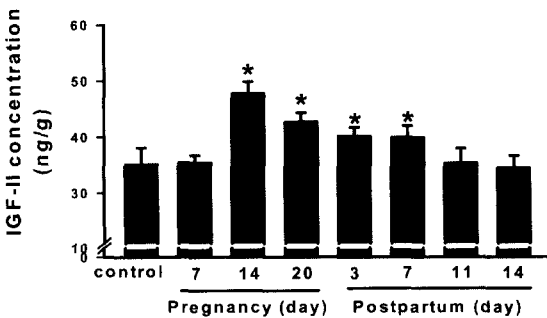


Fig. 7. Change of IGF-II concentrations in pre-postpartum rat liver. Statistical comparisons were done by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA). Values are means  $\pm$  SE (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control.

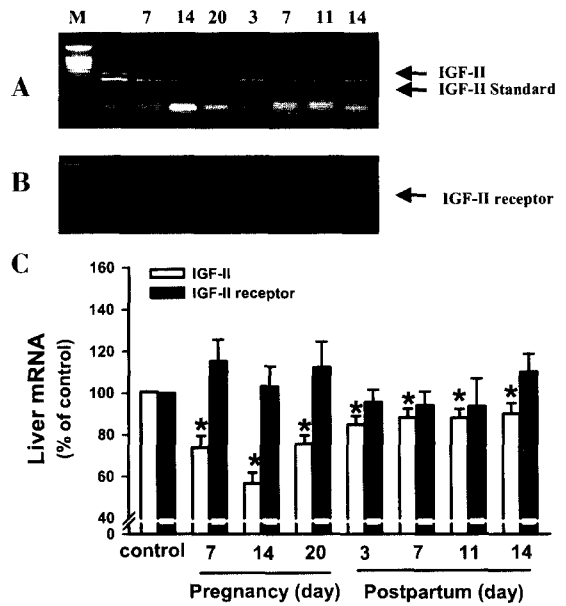


Fig. 8. Expression of IGF-II (A) and its receptor (B) mRNA in pre-postpartum maternal rat liver. Control, 7, 14, 21 days of gestation and 3, 7, 11, 14 days of postpartum. The example shown is a representative of four independent experiments. C represents the mean values of SE (n=4). \* $p < 0.05$  vs. control.

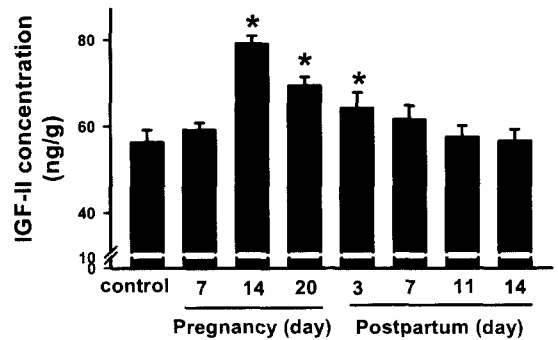
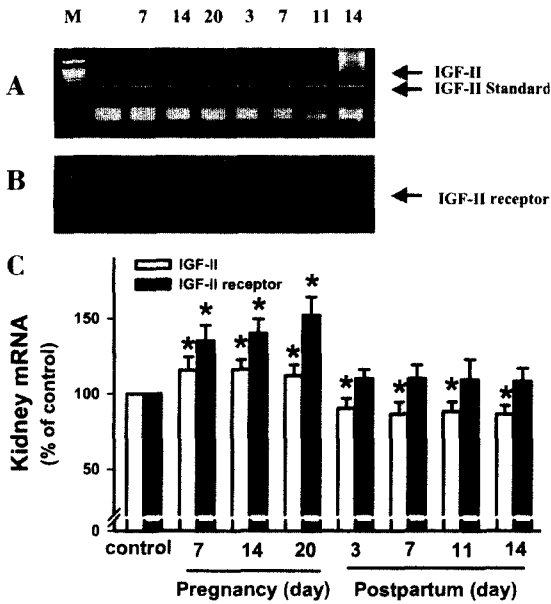


Fig. 9. Change of IGF-II concentrations in pre-postpartum rat kidney. Statistical comparisons were done by Student's *t*-test and analysis of variance (ANOVA). Values are means  $\pm$  SE (n=5). \* $p < 0.05$  vs. control.

모체 혈액, 간장 및 신장에서의 IGF-BP의 변화

Western ligand blotting 방법에 의하여 IGF-BPs를 분석한 결과 혈중에는 주로 IGF-BP-3가 발현 되었으며 다음으로 IGF-BP-2가 발현되었다. 이후 시간의 경과에 따라 모체의 IGF-BPs의 발현도를 조사한 결과, 임신기 혈중

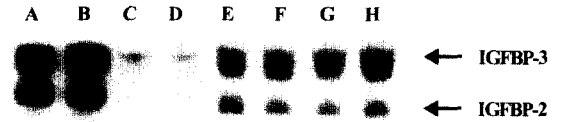


**Fig. 10.** Expression of IGF-II (A) and its receptor (B) mRNA in pre-postpartum maternal rat kidney. Control, 7, 14, 21 days of gestation and 3, 7, 11, 14 days of postpartum. The example shown is a representative of four independent experiments. C represents the mean values of SE (n=4). \*p<0.05 vs. control.

IGFBP-3와 2는 감소하였고 분만 후 다시 증가하였다 (Fig. 11). 이 때 모체 간장에서의 결과는 western ligand blotting에서 임신기 IGFBP-3와 2는 감소하였고 분만 후 증가하였다 (Fig. 12). 이러한 변화는 혈액에서의 변화와 일치하였다. 한편, 신장에서는 IGFBP-3에 비하여 IGFBP-2가 주로 발현되었으며, 임신기에는 IGFBP-2 및 IGFBP-3의 분비가 감소하였으며 분만 후에는 분만 전에 비하여 증가하는 것으로 나타났다.

### 고 찰

이 연구의 결과에서 임신기간 모체내 혈액 IGF-I 농도는 임신 7일에는 대조군과 차이가 없었으나, 임신 14일과 21일에는 현저하게 감소하였으며, 분만 후에는 다시 증가하였다. 이러한 변화는 간장에서의 변화와 일치하였다. 이러한 간장에서의 IGF-I의 증가는 혈 중 IGF-I의 대부분은 간장에서 합성 및 분비된다는 사실과 동일한 결과로 보인다 [8]. 이 때 간장에서 IGF-I mRNA 발현은 임신 7일부터 분만 후 3일까지 감소하다가 분만 후 7일부터 회복되는 것으로 나타났다. IGF-I 수용체



**Fig. 11.** The IGFFBPs pattern of pregnant maternal rat serum by western ligand blotting. A, control; 7(B), 14(C), 21(D) days of gestation and 3 (E), 7 (F), 11 (G), and 14 (H) days of postpartum rat. IGFBP-3, 42 kDa; IGFBP-2, 34 kDa.



**Fig. 12.** The IGFFBPs pattern of pregnant maternal rat liver by western ligand blotting. A, control; 7(B), 14(C), 21(D) days of gestation and 3 (E), 7 (F), 11 (G), and 14 (H) days of postpartum rat. IGFBP-3, 42 kDa; IGFBP-2, 34 kDa.



**Fig. 13.** The IGFFBPs pattern of pregnant maternal rat kidney by western ligand blotting. A, control; 7(B), 14(C), 21(D) days of gestation and 3 (E), 7 (F), 11 (G), and 14 (H) days of postpartum rat. IGFBP-3, 42 kDa; IGFBP-2, 34 kDa.

mRNA 발현도 같은 양상을 볼 수 있었다. 이 결과는 시간적 단계에서 IGF-I 수준 보다 한 단계 더 빨리 IGF-I mRNA 발현이 억제되는 것으로 보아, 이 간장에서 역시 IGF-I mRNA 발현의 감소가 간장 IGF-I 농도를 감소시키며 이들이 혈중 IGF-I의 농도 감소에 기여하는 것으로 사료된다. 분만 후의 경우는 랫드 임신기간에 모체로부터 태자로의 영양공급이 활성화됨에 따라 IGF-I의 분비가 억제되었다가 분만 후 태자의 배출에 의하여 정상으로 회복되는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 임신 랫드 혈청에서 IGF-I 농도가 임신 중기 및 말기에서 현저하게 감소하다가 분만 후 혈중 IGF-I 농도가 증가한다는 보고와 일치하였다 [11]. Escalada 등 [14]의 임신 말기 랫드의 간장에서 IGF-I mRNA 발현이 감소했다는 보고 역시 이 실험 결과를 뒷받침 해주고 있다. 몇몇 연구자들 [9, 30]은 임신한 랫드와 마우스에서 임신 초기 혈중 IGF-I 농도는 증가하다가 임신 중기에 감소한다고

하였으나 이 실험에서는 임신 초기 혈중 IGF-I 농도는 대조군과 유의성 있는 변화는 인정되지 않았다. 이러한 차이는 이 연구에서는 임신 초기라고 선정하는 7일째만을 실험에 이용하였기 때문인 것으로 추측된다.

한편, 신장에서는 혈중 및 간장에서와 달리 오히려 임신 14일 및 21일째 IGF-I 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 신장이 조직 특이적으로 작용하고 있다는 것을 시사해준다. 특히 이 연구에서 특이적인 것은 임신 14일 및 21일 째 신장내 IGF-I 수준은 증가하였지만 IGF-I mRNA 및 IGF-I 수용체 mRNA의 경우는 오히려 감소하였다는 것이다. 이러한 결과는 임신기 모체 신장의 IGF-I 농도는 혈중 IGF-I의 농도변동에 영향을 미치지 않음을 의미하며, 이는 신장에서는 내분비보다는 autocrine이나 paracrine의 형식으로 IGF 조절이 이루어지고 있음을 의미한다. 따라서, 신장의 IGF-I의 농도의 증가 자체는 항상성 기전으로 down regulation 작용을 통한 IGF-I mRNA 및 IGF-I 수용체 mRNA 수준을 억제하게 되는 것으로 보인다.

혈중 IGF-II 농도는 임신 7일과 14일 째 차이가 없었으나 임신 21일에서는 증가하였고 분만 후에는 점차적으로 감소하여 대조군 수준으로 되었다. 간장에서 IGF-II 농도는 혈중 농도보다 한 단계 빠르게 임신 14일 째 증가하다가 그 후 점차적으로 대조군 수준으로 감소하였다. 이러한 결과는 신장에서도 같은 양상을 보였다. 따라서, 간장 및 신장 같은 조직의 IGF-II 농도가 먼저 변동을 야기하여 직접적으로 혈중 농도에 영향을 미치는 것 같다. 그러나 간장 IGF-II mRNA 발현은 임신 7일부터 21일까지 감소하다가 분만 후 증가하였다. IGF-II 수용체 mRNA 발현의 경우에는 시간의 변화에 따라 변동되지 않았다. 한편, 신장에서는 IGF-II mRNA 발현은 임신 7일부터 증가하다가 분만 후 억제되었다. IGF-II 수용체 mRNA의 발현 역시 IGF-II mRNA와 같은 양상을 보였다. 모체의 IGF-II 발현은 설치류에서 각 조직에 다양하게 분포되어 있지만 특히 CNS에 많이 분포하고 혈중 IGF-II 합성에 직접 관여하고 있는 간장 및 신장 등에서도 아주 미약하게 발현하고 있다 [7, 26]. 한편, IGF-II 수용체는 mannose-6-phosphate 수용체이며 IGF-II에 친화력을 갖지만, 세포의 사멸 및 종양 억제에 관여하는 것으로 알려져 있다 [6]. 따라서 이 연구에서 임신기에 모체의 혈중 IGF-II 농도의 증가는 단백질 수준에서 판단했을 때 간장 및 신장에 부분적으로 기인하는 것으로 사료되나, 간장보다 신장에서 IGF-II mRNA 발현이 증가되는 것을 판단해 볼 때 신장의 합성에 의하여 더 많이 이루어지는 것으로 생각된다. 임신말기 신장의 IGF-II 수용체 mRNA 증가는 임신기에 체내 생리

활성 물질의 영향에 의하여 간장보다 신장에서 세포의 사멸이 초래될 것으로 사료되며, 임신말기 신장에서 IGF-II 농도의 증가 역시 신장 세포의 사멸에 따른 세포의 재구성을 위한 세포의 생리학적 작용으로 사료된다.

생체 내 IGFs 분비 조절, 활성도 및 수명 등에 관여하는 IGFFBPs의 특성을 규명하기 위하여 western ligand blotting 방법으로 분석한 결과 모체 혈액에서 IGFBP-3 및 2가 관찰되었다. 이 중 모체의 혈액에서 IGFBP-3와 2 농도는 임신기에 현저하게 감소하였으며 분만 후 혈액내 농도는 점차 증가되었다. 간장에서의 IGFBP-3와 2의 농도는 western ligand blotting시 혈중과 비슷한 양상을 보였다. 임신기에 모체의 신장에서는 IGFBP-2가 주로 발현되었으며 IGFBP-3가 약하게 발현되었다. 신장에서도 역시 간장에서와 같이 IGFBP-3와 2는 임신기에 억제되고 분만 후 증가하였다. 생체에 존재하는 6종 IGFFBPs 중 순환 혈액내의 대부분은 IGFBP-3이고, 이들 대부분이 간장에서 합성되며 특히 간장에서 IGFBP-3 합성 증가가 혈중 IGFBP-3 농도를 증가시킨다고 알려져 있다 [1]. 이 같은 보고들은 이 실험결과들을 뒷받침해주고 있다. 또한 임신한 랫드의 혈중 IGFBP-3는 감소하고 분만 후 1시간부터 증가하였다 [11]. 이러한 임신 혈중 IGFBP-3의 현저한 감소는 IGFFBPs protease에 의하여 분해된 것으로 사료된다. IGFFBPs를 분해하는 protease는 영양결핍, 스트레스, 수술, 암, 당뇨, 및 임신시에 혈청에서 존재하며 [2, 3], 특히 임신기 모체 혈청에 많이 존재하고 양수, 태반, 혈청, 및 자궁에도 존재하는 것으로 알려져 있다 [12]. Donovan 등 [13] 역시 임신 랫드의 혈중 IGFBP-3 감소는 간장의 IGFBP-3 mRNA 발현과는 연관성이 없으며, 혈중 protease 활성에 의하여 감소한다고 하였다. 이러한 결과는 다른 연구자들에 의해서도 많이 보고되고 있는 실정이다.

혈중 IGFs를 보호, 저장 및 혈관 내 투과력에 영향을 주는 혈액내 carrier proteins는 150 kDa 복합체와 50 kDa 복합체로 존재한다 [20]. 이 연구에서 임신기에 랫드 혈청에서 150 kDa 복합체는 감소한 반면 50 kDa 복합체는 증가하였다. 혈중에 존재하는 대부분 IGFs는 IGFBP-3 및 85 kDa ALS (Acid labile subunit)과 결합하여 150 kDa 복합체로 형태로 존재하며, 일부는 분자량이 작은 IGFBP-1, -2 및 -4와 결합하여 50 kDa 복합체의 형태로 존재한다 [24]. 150 kDa 복합체는 IGFs의 활성을 조절하며, 반감기를 연장하고, 보호하는 기능을 가지고 있어 생체내 IGFs/axis를 조절한다 [20]. 따라서 임신기에 모체의 IGFFBPs의 변동은 IGFs에 영향을 미치며 그 효과가 임신기에 모체의 생리학적 변동에 영향을 미칠 것으로 사료된다.



**결 론**

Insulin-like growth factors(IGFs)는 세포 유사분열 및 분화를 촉진하며, 임신 모체 조직성장에 중요한 역할을 담당한다. 이러한 IGFs는 IGFbPs에 의하여 조절되며 IGFs의 생물학적 작용은 IGF-I 및 IGF-II 수용체에 의하여 조절된다. 따라서 분만 전·후 모체 IGFs/IGFBPs system 관하여 연구한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

분만 전·후 모체 혈액에서 임신 7일 째 혈중 IGF-I 농도는 대조군과 차이가 없었으나 14 및 21일 째 대조군에 비하여 현저한 감소를 보였으며, 분만 후 혈중 IGF-I 농도는 시간의 경과에 따라 대조군과 비슷하게 회복되었다. 이러한 변화는 간장에서의 변화와 비슷한 양상을 보였으나, 신장에서는 오히려 임신 14일 및 21일째 오히려 증가하는 것으로 나타나 임신기에 조절은 endocrine system에 의한 조절보다는 paracrine 또는 autocrine에 의한 조절에 의한 것으로 추측된다. 분만 후에 간장 및 신장에서는 모체의 혈액에서 보다 한 단계 빠르게 증가 및 감소가 일어나는 것으로 나타났다. 분만 전·후 모체 간장에서 IGF-I mRNA는 임신 7일부터 분만 후 3일까지 감소하고 이후 점차적으로 증가하는 것으로 나타났다. 이 때 IGF-I 수용체 mRNA의 경우도 같은 양상을 볼 수 있었다. 한편, IGF-II mRNA는 임신 7일부터 21일까지 감소하고 분만 후 점차적으로 회복되었다. 그러나 IGF-II 수용체 mRNA의 변화는 인정되지 않았다. 분만 전·후 모체 신장에서 IGF-I mRNA 및 IGF-I 수용체 mRNA는 간장에서와 같은 양상을 볼 수 있었다. 그러나 IGF-II mRNA는 간장에서와는 달리 임신 7일에 증가하다가 점점 감소하였다. 그리고 IGF-II 수용체 mRNA는 임신 7일부터 약간 증가하다가 분만 후 3일부터 억제되는 것으로 나타났다.

분만 전·후 western ligand blotting을 실시하였을 때 모체 혈액내 IGFBP-3 및 2는 분만 전 대조군에 비하여 감소하였고 분만 후 증가하였다. 그러나 western immunoblotting을 실시하였을 때 IGFBP-3 및 2는 차이가 없었다. 간장에서도 혈액과 같은 양상을 보였으나 western immunoblotting에서는 임신기에는 감소하다가 분만 후 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 신장에서는 IGFBP-3에 비해 IGFBP-2가 주요하게 발현되었으며 IGFBP-2 및 -3는 임신기에 감소하다가 분만후에 회복되는 것으로 나타났다.

따라서 이상의 결과를 종합하여 보면, 임신기에 랫드의 IGFs는 모체에서 모체의 간장 및 신장의 유기적인 관계에 의하여 변동되는 것으로 나타났다. 이러한 변화는 IGFBPs protease에 의하여 조절되어 임신 유지에 관

여하는 것으로 사료된다.

**참고문헌**

1. Albiston, A. L. and Herington, A. C. Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid(mRNA) in the rat: comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology*. 1992, **130**, 497-502.
2. Bang, P., Brismar, K. and Rosenfeld, R. G. Increased proteolysis of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3) in noninsulin- dependent diabetes mellitus serum, with elevation of a 29-kilodalton (kDa) glycosylated IGFBP-3 fragment contained in the approximately 130- to 150-kDa ternary complex. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994, **78(5)**, 1119-1127.
3. Bereket, A., Lang, C. H., Blethen, S. L., Fan, J. and Frost, R. A. 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.* 1995, **80**, 2282-2288.
4. Binoux, M., Roghani, M., Hossenlopp, P., Hardouin, S. and Gournelen M. Molecular forms of human IGF-binding proteins: physiological iourmemplications. *Acta Endocrinologica*. 1991, **124**, 41-47.
5. Bowsher, R. R., Lee, W. H., Apathy, J. M., O'Brien, P. J., Ferguson, A. L. and Henry, D. P. Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. I. An improved extraction procedure and radioimmunoassay for human and rat fluids. *Endocrinology*. 1991, **128**, 805-814.
6. Braulke, T. Type-2 IGF receptor: a multi-ligand binding protein. *Horm. Metab. Res.* 1999, **31**, 242-246.
7. Brown, A. L., Graham, D. E., Nissley, S. P., Hill, D. J., Strain, A. J. and Rechler, M. M. Developmental regulation of insulin-like growth factor-II mRNA in different rat tissues. *J. Biol. Chem.* 1986, **261**, 13144-13151.
8. Collet-Solberg, P. F. and Cohen, P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF actions. *In* *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. Vassallo, J. (eds.), pp. 591-614 Growth and Growth Disorders, W. B. Saunders, Philadelphia, 1996.

9. **D'Ercole, A. J. and Underwood, L. E.** Ontogeny of somatomedin during development in the mouse. *Dev. Biol.* 1980, **79**, 33-45.
10. **Daughaday, W. H. and Rotwein, P.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structure serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 1989, **10**, 68-91.
11. **Davenport, M. L., Clemmons, D. R., Miles, M. V., Camacho-Hubner, C., D'Ercole, A. J. and Underwood, L. E.** Regulation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding proteins during rat pregnancy. *Endocr.* 1990, **127**, 1278-1286.
12. **Davenport, M. L., Pucilowska, J., Clemmons, D. R., Lundblad, R., Spencer, J. A. and Underwood, L. E.** Tissue-specific expression of insulin-like growth factor binding protein-3 protease activity during rat pregnancy. *Endocr.* 1992, **130(5)**, 2505-2512.
13. **Donovan, S. M., Giudice, L. C., Murphy, L. J., Hintz, R. L. and Rosenfeld, R. G.** Maternal insulin-like growth factor-binding protein messenger ribonucleic acid during rat pregnancy. *Endocr.* 1991, **129(6)**, 3359-3366.
14. **Escalada, J., Sanchez-Franco, F., Velasco, B. and Cacicedo, L.** Regulation of growth hormone (GH) gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of insulin-like growth factor-I, somatostatin, and GH-releasing hormone. *Endocr.* 1997, **138(8)**, 3435-3443.
15. **Giordano, G., Barreca, A. and Minuto, F.** Growth factors in the ovary. *J. Endocr. Invest.* 1992, **15**, 689-707.
16. **Giudice, L. C. and Saleh, W.** Growth factors in reproduction. *Trends Endocr. Metab.* 1995, **6**, 60-69.
17. **Guler, H. P., Zapf, J. and Froesch, E. R.** Short-term metabolic effects of recombinant insulin-like growth factor in healthy adults. *N. Eng. J. Med.* 1987, **317**, 137-140.
18. **Holly, J. M. and Wass, J. A.** Insulin-like growth factors: autocrine, paracrine or endocrine? New prospective of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *J. Endocrinol.* 1989, **122**, 611-618.
19. **Hossenlopp, P., Seurin, D., Segovia-Quinson, B., Hardouin, S. 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.* 1986, **154**, 138-143.
20. **Jones, J. I. and Clemmons, D. R.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 1995, **16**, 3-34.
21. **Lee, C. Y., Bazer, F. W., Etherton, T. D. and Simmen, F. A.** Ontogeny of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in porcine serum during fetal and postnatal development. *Endocr.* 1991, **128**, 2336-2344.
22. **Lee, C. Y. and Henricks, D. M.** Comparisons of various acidic treatments of bovine serum on insulin-like growth factor-I immunoreactive and binding activity. *J. Endocr.* 1990, **127**, 139-148.
23. **Lee, C. Y.** The insulin-like growth factor system at the interface of growth, metabolism and nutrition. *J. Anim. Sci. Technol (Kor.)*. 2000, **42**, 795-816.
24. **Martin, J. L. and Baxter, R. C.** Insulin-like growth factor binding protein-3: biochemistry and physiology. *Growth. Regul.* 1992, **2**, 88-99.
25. **Nissley, P. and Lopaczynski, W.** Insulin-like growth factor receptors. *Growth. Factors.* 1991, **5**, 29-43.
26. **Rotwein, P., Burgess, S. K., Milbrandt, J. D. and Krause, J. E.** Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, **85(1)**, 265-269.
27. **Rutanen, E. M.** Insulin-like growth factors in endometrial function. *Gynecol. Endocr.* 1998, **12(6)**, 399-406.
28. **Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J. and Froesch, E. R.** Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocr.* 1983, **133**, 297-305.
29. **Schwartzbauer, G. and Menon, R. K.** Regulation of growth hormone receptor gene expression. *Mol. Genet. Metab.* 1998, **63(4)**, 243-53.
30. **Sheppard, M. S. and Bala, M.** Profile of serum immunoreactive insulin-like growth factor I during gestation in Wistar rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1986, **64**, 521-524.