

요독증에서의 Insulin-Like Growth Factor-I(IGF-I) 및 결합단백(IGFBPs)의 특성

전북대학교 의과대학 소아과학교실

이 대 열

Insulin-like growth factor-I 및 -II(IGF-IG-II)는 신장을 포함한 다양한 조직에서 mitogenic and metabolic effect를 나타낸다. 각각의 펩타이드는 친화력이 높은 수용체와 결합을 하는 이외에 일군의 IGF binding proteins(IGFBPs)과 결합하고, 이러한 IGFBPs는 IGF-I 및 -II의 효과를 조절하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 최근에는 특이한 IGFBP를 proteolysis 시키는 protease가 있다는 것이 밝혀져 있으며, 이 protease는 IGF의 bioavailability를 조절할 것으로 사료된다. 본 연구는 uremia 환자에서 IGF-IGFBP axis의 변화를 알아보고 나아가서는 IGFBP-3 protease activity를 알아보는데 있다.

재료 및 방법

1. 혈청 및 소변

급성신부전, 만성신부전 및 말기신부전환자로 부태 채취하였다.

2. Column Chromatography

1) IGFBP complex로부터 IGF를 분리시키기 위해서 혈청 700 ul을 sephadex G-50 column을 이용하여 0.25 M formic acid 하에서 chromatography 한 후 peptide 분획을 수집하여 동결건조시킨다.

2) 혈청에 존재하는 IGFBP complex중 150 kD와 50 kD를 분리하기 위하여 Sephadex G-150 column을 이용하였다. 혈청 700 ul와 [125I]-IGF-I 100,000 cpm을 실온에서 2시간 반응시킨후 tris buffer(pH=7.4)로 elution 시켜 1 ml씩 수집하여 radioactivity를 측정하였다.

3. 방사면역측정법

1) IGF-I 측정

Radioligand로 [125I]-IGF-I을 이용하였고, 항체로는 rabbit polyclonal serum (@hIGF-I antibody)을 사용하여 gamma counter로 방사능을 측정하였다.

2) IGFBP-3 측정

Radioligand로 [125I]-IGF-I-IGFBP-3 complex를 사용하였고, 항체는 rabbit polyclonal serum (@IGFBP-g)를 이용하였다.

4. Western Ligand Blot

혈청 및 소변을 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동을 실시한 후 membrane에 이전시키고, [125I]-IGF-I과 실온에서 2시간 반응시키고, 건조시킨 후 autoradiography를 실시하여 방사능을 검색하였다.

5. Protease Assay

30,000 cpm의 [125I]-IGF-I를 PBS에 부유시켜 sample를 5시간 37°C에서 반응시키고 sample buffer로 반응을 정지시킨다. 이과정에서 여러 종류의 protease inhibitor를 첨가하였다. 이와 같이 처리된 sample을 12.5% SDS-PAGE을 이용하여 전기영동을 시킨후 건조하여 autoradiography를 실시하였다.

결 과

1. 혈청 IGF-I의 변화

급성 신부전환자의 혈청 IGF-I은 정상인에 비하여 감소하였다. 만성신부전에서는 정상범위이나 말기신부전 때는 약간 감소하는 경향을 보였다. 이러한 변화는 성공적인 신장이식이후에는 정상으로 회복되었다.

2. IGFBP의 변화

1) IGFBP-3

인혈청에서 주된 IGFBP인 IGFBP-3는 IGF-I과 결합하여 주로 150 kD complex를 이루는데 uremia 시에 그 양상이 변한다.

(1) 급성 및 말기 신부전시에는 혈청 IGFBP-3는 현저하게 감소하고, 만성 신부전시는 약간 감소한다(by western ligand blot, WLB).

(2) 방사면역측정법(RIA)을 이용한 말기 신부전환자에서의 IGFBP-3치는 오히려 증가하였다.

(3) WLB과 RIA의 차이는 low molecular weight form of IGFBP-3에 기인된 것으로 사료된다.

(4) Urinary IGFBP-3는 현저하게 감소하였다.

2) IGFBP-1&-2의 변화

(1) 급성 신부전 및 말기 신부전환자의 혈청 IGFBP-1

및 -2는 증가한다.

(2) Urinary IGFBP-1은 현저하게 증가한다.

3. IGFBP-3 Protease Activity

IGF-BP complex에 결합된 IGF가 bioactivity를 나타내기 위해서는 IGF-BP complex에서 IGF가 분리되어야 한다. 확실한 기전은 밝혀져 있지는 않지만 protease가 관여되는 것으로 알려져 있다.

(1) IGFBP-3 protease activity는 신부전환자의 혈청에는 존재하지 않고 소변에만 존재하였다.

(2) 환자소변에서의 IGFBP-3의 감소는 urinary IGFBP-3 protease activity에 기인되는 것으로 사료된다.

(3) Urinary IGFBP-3 protease activity는 serine protease inhibitor에 의하여 억제된다.