

## Insulin-like growth factor가 소장 점막 세포 증식에 미치는 영향

윤정한

한림대학교 자연과학대학 식품영양학과

Park, Jung Han Yoon

Department of Food Sciences and Nutrition, Hallym University, Chunchun, Korea

### Abstract

Growth hormone (GH) plays a key role in regulating postnatal growth and can stimulate growth of animals by acting directly on specific receptors on the plasma membrane of tissues or indirectly through stimulating insulin-like growth factor (IGF)-I synthesis and secretion by the liver and other tissues. IGF-I and IGF-II are polypeptides with structural similarity with proinsulin that stimulate cell proliferation by endocrine, paracrine and autocrine mechanisms. The initial event in the metabolic action of IGFs on target cells appears to be their binding to specific receptors on the plasma membrane. Current evidence indicates that the mitogenic actions of both IGFs are mediated primarily by binding to the type I IGF receptors, and that IGF action is also mediated by interactions with IGF-binding proteins (IGFBPs). Six distinct IGFBPs have been identified that are characterized by cell-specific interaction, transcriptional and post-translational regulation by many different effectors, and the ability to either potentiate or inhibit IGF actions. Nutritional deficiencies can have their devastating consequence during growth. Although IGF-I is the major mediator of GH's action on somatic growth, nutritional status of an organism is a critical regulator of IGF-I and IGFBPs. Various nutrient deficiencies result in decreased serum IGF-I levels and altered IGFBP levels, but the blood levels of GH are generally unchanged or elevated in malnutrition. Effects of protein, energy, vitamin C and D, and zinc on serum IGF and IGFBP levels and tissue mRNA levels were reviewed in the text. Multiple factors are involved in the regulation of intestinal epithelial cell growth and differentiation. Among these factors the nutritional status of individuals is the most important. The intestinal epithelium is an important site for mitogenic action of the IGFs in vivo, with exogenous IGF-I

stimulating mucosal hyperplasia. Therefore, the IGF system appears to provide an important mechanism linking nutrition and the proliferation of intestinal epithelial cells. In order to study the detailed mechanisms by which intestinal mucosa is regulated, we have utilized IEC-6 cells, an intestinal epithelial cell line and Caco-2 cells, a human colon adenocarcinoma cell line. Like intestinal crypt cells analyzed *in vivo* or freshly isolated intestinal epithelial cells, IEC-6 cells and Caco-2 cells possess abundant quantities of both type I and type II IGF receptors. Exogenous IGFs stimulate, whereas addition of IGFBP-2 inhibits IEC-6 cell proliferation. To investigate whether endogenously secreted IGFBP-2 inhibit proliferation, IEC-6 cells were transfected with a full-length rat IGFBP-2 cDNA anti-sense expression construct. IEC-6 cells transfected with anti-sense IGFBP-2 cDNA contain less IGFBP-2 mRNA and secrete lower amounts of IGFBP-2 protein in medium. These cells grew at a rate faster than the control cells indicating that endogenous IGFBP-2 inhibits proliferation of IEC-6 cells, probably by sequestering IGFs. IEC-6 cells express many characteristics of enterocyte, but do not undergo differentiation. On the other hand, Caco-2 cells undergo a spontaneous enterocyte differentiation after reaching confluency. We have demonstrated that Caco-2 cells produce IGF-II, IGFBP-2, IGFBP-3, and an as yet unidentified 31,000 M<sub>r</sub> IGFBP, and that both mRNA and peptide secretion of IGFBP-2 and IGFBP-3 increased, but IGFBP-4 mRNA and protein secretion decreased after the cells reached confluency. These changes occurred in parallel to and were coincident with differentiation of the cells, as measured by expression of sucrase-isomaltase. In addition, Caco-2 cell clones forced to overexpress IGFBP-4 by transfection with a rat IGFBP-4 cDNA construct exhibited a significantly slower growth rate under serum-free conditions and had increased expression of sucrase-isomaltase compared with vector control cells. These results indicate that IGFBP-4 inhibits proliferation and stimulates differentiation of Caco-2 cells, probably by inhibiting the mitogenic actions of IGFs.

### Insulin-like growth factors (IGFs)

IGF-I과 IGF-II는 단 한 개의 사슬로 이루어진 polypeptide로서 proinsulin의 아미노산 구조와 비슷하고 포유류의 여러 가지 세포들의 증식을 촉진하는 강한 성장 요소이다 (Cohick and Clemmons, 1993; Jones and Clemmons, 1995). Somatomedin이라고도 부르는 인간의 IGF-I과 IGF-II는 각각 70개와 67개의 아미노산들로 구성되어 있다. A, B, C, D라고 칭하는 4개의 domain으로 구성되어 있는데 A와 B domain은 각각 insulin의 A와 B chain과 비슷하다. 생성된 IGF는 세포 안에 저장되지 않고 생성되는 대로 분비되므로 다른 peptide hormone들과는 달리 높은 농도의 IGF를 유지하는 기관은 체내에 존재하지 않는다. 혈액에서 순환되는 IGF 농도가 가장 높으며, 이는 주로 간에서 합성되어 분비된다고 믿고 있다.

## IGF receptors

IGF의 효과는 세포 표면의 plasma membrane에 존재하는 특이한 수용체들 (receptors)에 IGF들이 결합되어 그 작용이 세포 내에 전달되므로서 이루어진다 (Czech, 1989; Rosen, 1987; Rechler and Nissley, 1985). Type I IGF receptor는 insulin receptor와 그 구조가 비슷한 glycoprotein으로  $\alpha_2\beta_2$  형의 heterotetramer로 이루어져있다.  $\alpha$ -subunit과  $\beta$ -subunit의 분자량은 각각 130,000과 90,000 정도 되고  $\beta-\alpha-\alpha-\beta$ 의 순서로 disulfide bond들로 연결되어 있다. IGF는 extracellular domain인  $\alpha$ -subunit에 결합하고 이 subunit에는 cysteine-rich domain도 포함되어있다. 세포막을 통과하는  $\beta$ -subunit에는 cytoplasmic tyrosine-specific protein kinase domain을 포함하고 있다 (Massague and Czech, 1982; Rechler and Nissley, 1985; Czech, 1989). 이 kinase domain은 다른 hormone receptor들의 tyrosine kinase domain과 아미노산 sequence가 비슷하고 tyrosyl autophosphorylation sites와 다른 단백질의 tyrosine 잔기를 인산화 시킬 수 있는 촉매자리를 가지고 있다. 이 tyrosine kinase domain은 epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor 그리고 insulin receptor와 같은 growth factor receptor의 기능에도 필수적임이 증명되었다 (Olson and Lane, 1989). IGF가 extracellular domain인  $\alpha$ -subunit에 결합하면 intrinsic kinase에 의해 receptor 자신이 autophosphorylation되어 세포내의 다른 단백질을 phosphorylation 시키는 tyrosine kinase로 활성화된다. Type I IGF receptor는 IGF-I 뿐만 아니라 IGF-II, insulin과도 결합한다. IGF-II나 insulin은 IGF-I보다 친화력은 적지만 이 receptor와 결합 시에 IGF-I과 같은 작용을 한다. 사실상 IGF-I, IGF-II, insulin에 의해서 이루어지는 성장 작용은 이 type I IGF receptor를 통해서 이루어진다고 볼 수 있다. Type II IGF receptor는 분자량이 약 275,000인 한 개의 사슬로 이루어진 세포막을 통과하는 glycoprotein으로 분자 내에 tyrosine kinase를 가지고 있지 않다 (Czech, 1989; Roth, 1988). Type II IGF receptor는 다양한 기능을 가진 단백질로서 IGF-II에 결합할 뿐 아니라 lysosomal enzyme과 같은 mannose-6-phosphate를 포함한 ligands에도 결합한다. 이 receptor는 새로 합성된 lysosomal enzyme들을 trans Golgi network로부터 lysosome으로 옮겨 주거나 세포 밖의 lysosomal enzyme들을 endocytosis과정을 통해서 lysosome으로 옮겨주는 역할을 한다 (Kiess et al., 1988; MacDonald et al., 1988; Morgan et al., 1987; Roth, 1988; Tong et al., 1988). Type II IGF receptor는 IGF-II에 친화력이 가장 크고, IGF-I과는 결합하지만 친화력이 낮고, Insulin과는 결합하지 않는다. 하지만 type II IGF receptor가 IGF-II의 작용을 전달하는 것 같지는 않다. 위에서 언급한대로 IGF-II의 세포 증식 작용은 type I IGF receptor에 결합하므로 전달되는 것 같다 (Korner et al., 1995).

## IGFBP의 구조적인 특색

IGF들은 insulin과는 달리 혈액 농도가 매우 높고 혈액이나 extracellular fluid에 free form으로 존재하는 것이 아니고 IGF에 친화력이 아주 강한 IGF-binding proteins (IGFBPs)에 결합하여 순환되고 존재한다. 현재까지 흰쥐와 인간의 조직과 extracellular fluid로부터 여섯 가지 IGFBP가 순수 분리되었고 complementary DNA도 clone 되었다

(Drop et al., 1992; Rechler and Brown, 1992; Shimasaki and Ling, 1991). 이 여섯 가지 IGFBP들은 각각의 특유한 분자량, 생화학적 특성, 그리고 면역 특성을 가지고 있고 모두 soluble protein으로서 세포 내에 축적되지 않고 생성되는 대로 분비된다. 적어도 18개의 cysteine 잔기를 가지고 있고 각 peptide 내에 cysteine들의 위치들은 일정하다 (Clemmons, 1993). 이 6가지 IGFBP들간에 cysteine이 풍부한 amino 또는 carboxyl 말단 부분의 amino acid sequence는 서로 비슷하나 중앙의 cysteine이 없는 부분은 서로 다르다. IGFBP-1과 IGFBP-2는 carboxyl기 말단에  $\alpha_5\beta_1$  integrin에 결합할 수 있는 능력을 가지고 있는 Arg-Gly-Asp (RGD) sequence를 하나 씩 가지고 있다 (Hynes, 1987). IGFBP-3에는 3 개의 N-glycosylation consensus sequence가 존재하는데 적어도 하나는 glycosylated되어 있다 (Wood et al., 1988). IGFBP-4도 N-glycosylation site들을 가지고 있고 IGFBP-5와 IGFBP-6는 N-glycosylation대신 O-glycosylation site를 가지고 있다.

### IGFBP의 기능

IGFBP-3는 혈청의 IGF-I과 IGF-II의 주요 운반체이다. 혈청에 존재하는 IGF중에서 적어도 95%가 IGFBP-3에 결합되어 순환되고 있다. 나머지 5%는 IGFBP-1, -2, 그리고 -4에 결합되어 순환되고 오직 1% 미만만 free form으로 존재한다. IGF가 모세혈관의 barrier를 통과하는데 IGFBP가 필요하다는 연구 결과가 발표되었지만 (Bar et al., 1990) 확실한 기전은 알려져 있지 않다. 또 한가지 종류의 세포에서 생성된 IGF를 조직 내에서 다른 종류의 세포의 표면으로 옮겨주는 역할을 한다고 추측하고 있다. 예를 들면 IGF peptide는 대부분 connective tissue 세포들에 의해 생성되는데 이 IGF peptide들을 IGFBP가 epithelial cell 표면이나 epithelial cell과 connective tissue junctions에 옮겨 주는 것이 아닌가 생각하고 있다. 순환되거나 각 조직에서 생성된 IGFBP는 IGF가 receptor에 결합하는 것을 증가 또는 감소시키므로서 실험 조건이나 조직 또는 세포에 따라 IGF의 작용을 촉진하기도 억제하기도 한다 (Rosenfeld et al., 1990). 특히 세포 표면에 결합하는 IGFBP-1과 IGFBP-3는 IGF를 IGF receptor에 가깝게 공급하므로서 IGF의 작용을 촉진시키는 것으로 생각된다 (Clemmons, 1993; Clemmons et al., 1993). IGFBP-5도 extracellular matrix와의 상호 작용에 의해서 비슷한 방법으로 작용하는 것 같다 (Camacho-Hubner et al., 1992). 세포 표면에 결합하는 IGFBP와는 달리 soluble IGFBP는 IGF와 결합한 후 점차적으로 풀어놓는 저수지의 역할을 함으로서 IGF에 대한 세포의 반응을 줄이는 것으로 보인다 (Clemmons, 1993; Clemmons et al., 1993).

### Endocrine, paracrine, autocrine mechanisms of IGF action

IGF는 간에서 생성 분비되어 전통적인 endocrine hormone의 역할을 한다. 혈액의 IGF 농도는 다른 어느 endocrine hormone보다 더 높고 간에서의 IGF 생성은 growth hormone에 의해서 조절을 받는다. 또한 IGF나 IGFBP는 Insulin이나 다른 전통적인 endocrine hormone들과는 달리 체내 여러 조직에서 생성되어 autocrine이나 paracrine mechanism으로 다양한 세포들의 성장과 분화를 조절한다는 사실이 최근의 연구에 의하여 밝혀졌다 (Jones and Clemmons, 1995). 다른 여러 조직 세포들과 같이 장의

점막 조직도 IGF-I, IGF-II 그리고 IGFBP mRNA들을 발현한다 (Shimasaki and Ling, 1991; Lund et al., 1986; Han et al., 1987; Han et al., 1988).

### 영양상태에 따른 체내의 IGF와 IGFBP의 변화

성장기의 어린이가 protein-calorie 결핍증에 걸리면 여러 가지 증세가 나타나지만 가장 두드러진 증세는 성장 부진이다. GH이 성장 hormone의 대표적인 것이므로 많은 연구자들이 영양 불량 환자의 혈청의 GH의 농도를 측정하였다. 그러나 이 환자들의 혈청의 GH의 농도는 변화가 없거나 정상보다 높고 IGF-I 농도는 낮은 것으로 볼때 (Hintz et al., 1978) 조직에서 GH에 대한 resistance가 일어난 것으로 생각된다. GH은 IGF-I의 생성 분비를 촉진하고 IGF-I이 GH의 작용을 증대한다고 (Rechler and Nissley, 1990) 믿고 있으므로 영양 상태와 혈청의 IGF-I 농도와와의 관계에 대한 여러 가지 연구가 수행되어졌다. 몇 가지 예를 들어보자.

Clemmons group (1981)은 비대한 사람들이 단식을 하는 동안 plasma IGF-I 농도를 측정하였다. 소변의 urea nitrogen 배설량은 단식을 시작하기 전에 제일 높아서 이때의 질소 배설량은 일일 섭취 량인 12 g에 도달했다. 단식 첫날 질소의 배설은 최고치를 기록했고 그 후 4 일 동안 계속되다가 점차적으로 줄어드는 경향을 보였다. 9 일 후에 단식을 끝내고 다시 식사를 시작했을 때 nitrogen balance는 positive로 전환되었다. 혈액의 IGF-I 농도는 단식이 진행되는 동안 감소되다가 식사 재 개시 후에 증가되는 것을 볼 수 있었다. 식사 재 개시 때에 음식의 영양소 구성이 혈액의 IGF-I 회복 속도에 영향을 미친다. 만약에 단 식후에 low protein, isocaloric diet을 먹었을 때의 혈액의 IGF-I level은 normal diet에 비해 회복이 느렸고 low protein, low energy diet의 refeeding은 IGF-I의 지속적인 감소를 가져왔다 (Isley et al., 1983).

동물 실험의 결과를 살펴보면 Straus와 Takemoto (1990a)는 흰쥐의 단식 시에 간의 IGF-I과 Growth hormone receptor mRNA의 감소와 refeeding시의 증가를 보여주는 결과를 발표하였다. 하지만  $\beta$ -actin mRNA와 serum albumin mRNA는 단식과 refeeding 동안에 변하지 않았다. 또 자유 급식으로 섭취한 energy 량의 70, 60, 또는 50%로 흰쥐의 energy 섭취 량을 제한했을때 IGF-I mRNA의 양은 energy 섭취 량에 비례하여 감소하였다 (Straus and Takemoto, 1991). Straus와 Takemoto (1990b)는 단백질의 함량이 다른 isocaloric diet을 Sprague-Dawley rats에 먹었을 때 간의 mRNA의 농도를 측정하였다. Table 1에 요약한 바에 의하면 IGF-I mRNA의 경우 식이 단백질이 감소할 때 같이 감소하는데 7.7-kb species의 변화가 0.9-kb species보다 식이 단백질의 함량의 변화에 더 민감하게 감소하고 IGF-II mRNA는 4% 단백질을 포함한 식이를 먹인 쥐에서만 유의 적으로 감소하였다. 이 paper에 발표된 흥미로운 data는 간의 IGFBP-2 mRNA는 20%와 12% 단백질을 포함한 식이를 먹은 흰쥐의 간에서는 검출하기가 어려웠으나 8%와 4% group에서는 쉽게 검출할 수 있었다는 사실이다.

Table 1. Effect of dietary protein deprivation on hepatic mRNA levels. Summary of the densitometric scans of Northern blots<sup>1</sup>.

| Group       | IGF-I                    |                          | IGF-II                   | IGFBP-2        |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
|             | 7.7-kb species           | 0.9-kb species           |                          |                |
| 20% protein | 3.30 ± 0.45              | 12.43 ± 1.49             | 4.07 ± 0.38              | 0 <sup>b</sup> |
| 12% protein | 2.24 ± 0.31 <sup>a</sup> | 11.28 ± 1.66             | 4.00 ± 0.21              | 0 <sup>b</sup> |
| 8% protein  | 0.46 ± 0.10 <sup>a</sup> | 8.08 ± 0.40 <sup>a</sup> | 3.44 ± 0.42              | 4.67 ± 1.83    |
| 4% protein  | 0.44 ± 0.09 <sup>a</sup> | 6.66 ± 0.65 <sup>a</sup> | 1.76 ± 0.33 <sup>a</sup> | 6.45 ± 0.35    |

<sup>1</sup>Results from Straus and Takemoto (1990b). <sup>a</sup>Significantly lower than 20% protein group at  $\alpha = 0.05$  level. <sup>b</sup>Not detectable.

이렇게 동물의 영양상태는 IGF의 생성에만 영향을 미치는 것이 아니고 IGFBP의 생성에도 영향을 미쳐 IGF의 성장 촉진 작용을 조절하는 것을 볼 수 있다. 흰쥐에게 단백질이 결핍된 식이를 10 일간 먹었을 때 간의 IGFBP-1 mRNA의 양이 현저히 증가한 것도 보고되었다 (Straus et al., 1993). 20% 단백질을 포함한 식이를 먹은 쥐와 비교하여 간의 IGFBP-1 mRNA level은 8% 단백질 식이를 먹은 쥐에서는 14 배, 4% 단백질 식이 group에서는 33배 증가되었다. 이에 비해 IGFBP-1 primary nuclear transcript는 각각 8배, 14배 증가한 것으로 보아 IGFBP-1 mRNA의 증가는 대부분이 transcription의 증가로 이루어 졌다고 볼 수 있다. 하지만 primary transcript의 증가가 mRNA 증가만큼 크지 않은 것은 transcription 이후에도 조절작용이 있으리라는 결론을 낳게 되었다. 이와 같이 단백질 결핍 시에 일어나는 IGFBP-1 mRNA 증가가 기질의 부족 때문이라는 가설을 시험하기 위해 한 개의 필수 아미노산 결핍시의 IGFBP-1 mRNA level의 변화를 H4-II-E rat hepatoma cell을 이용하여 조사하였다. 세포 배양액에 한 개의 필수 아미노산이 제외된 경우 IGFBP-1 mRNA level은 4-5 배 증가하였고 좀 적은 정도의 IGFBP-1 primary transcript의 증가를 관찰하였다. 따라서 단백질 결핍시 IGFBP-1 mRNA 증가는 transcription과 post-transcriptional mechanism이 작용한다고 결론을 내릴 수 있다.

Protein과 energy외 다른 영양소도 IGF system에 영향을 미친다. 그 예로는 Vitamin D의 활성형인 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)는 뼈세포를 포함한 많은 세포들의 증식을 억제하고 분화를 촉진시킨다. 이 과정에 여러 가지 다른 factor들도 관계가 되겠지만 이 vitamin의 작용을 IGF system이 중계한다는 연구 결과가 보고되었다. Mouse의 osteoblast culture에 이 vitamin을 첨가하면 세포의 증식과 IGF-I의 분비를 감소시키고 IGFBP-3의 분비를 증가시키는 것을 볼 수 있었다 (Scharla et al., 1991).

또 다른 예는 Guinea pig에게 vitamin C가 결핍된 식이를 3-4 주일 먹인 경우 collagen과 cartilage proteoglycan 합성의 감소를 보인다는 것이다. 이와 같은 감소는 collagen의 proline residue들의 hydroxylation 보다는 몸무게의 감소와 상관관계가 큰 것을 관찰하였다. 이 결과는 괴혈병에 걸린 혈액에 동물의 성장과 세포 증식을 방해하는 inhibitor가 존재하는 것을 암시하는데 분열이 멈춘 3T3 cell을 이용한 실험

결과에 의하면 괴혈병에 걸린 guinea pig의 혈청에 IGF-I을 첨가하므로써 정상적인 동물의 혈청처럼 3T3 cell의 증식을 촉진시킬 수 있었다. 따라서 괴혈병에 걸린 동물의 혈청에는 IGF-I의 작용을 inhibit하는 물질이 존재한다는 가설을 세울 수 있다.

Peterkofsky et al. (1991)은 vitamin C가 결핍되거나 굶은 Guinea pig에서 29-kD 과 35-kD IGFBP의 농도가 현저히 증가하는 것을 관찰하였다. 건강한 동물 혈액의 이 두 binding protein (IGFBP-1과 IGFBP-2)의 농도는 분자량이 큰 IGFBP-3에 비해 매우 낮지만 이 두 가지 상태에서는 순환하는 IGFBP의 40%에 도달하였다. 건강한 동물의 혈청과 괴혈병 혈청이 인간의 fibroblast의 collagen 합성을 촉진하는 능력을 비교하였을때 괴혈병 혈청의 촉진 능력은 건강한 혈청에 비해 50% 정도밖에 안되나 IGF-I이나 [1-27,Gly<sup>4</sup>,38-70]hIGF-I을 첨가했을때 정상보다 높게 회복되었다. [1-27,Gly<sup>4</sup>,38-70]hIGF-I는 IGF-I의 C domain의 28-37 아미노산 잔기 대신에 4 개의 glycine이 삽입된 것으로 type I IGF receptor에 대한 친화력은 30배 감소했으나 IGFBP에 대한 친화력은 변함이 없다고 보고되었다 (Bayne et al., 1989). Vitamin C가 결핍된 guinea pig에서는 피부와 뼈의 collagen mRNA 발현이 현저히 감소되었고 간의 IGFBP-1과 IGFBP-2 mRNA 발현이 현저히 증가된 것도 보고되었다 (Gosiewska et al., 1994). 이와 같은 결과로부터 vitamin C 결핍된 동물의 혈액의 IGFBP-1과 IGFBP-2의 농도가 증가되어 IGF-I의 작용을 block함으로써 collagen의 유전자 발현을 억제한다고 결론을 내릴 수 있다.

Zinc가 결핍된 동물이나 인간의 성장이 지연되는 것은 잘 알려진 사실이다 (Hambidge et al., 1986; O'Dell and Reeves, 1989). GH이 출생후 동물의 성장에 주요 역할을 담당하므로 (Lewis, 1992) zinc 결핍증은 GH 자체나 GH signaling pathway에 이상을 초래한다는 가설을 세울 수 있다. 하지만 zinc 결핍상태에서는 somatotrophs로부터의 GH의 분비나 (Focht et al., 1991) 혈청의 GH 농도는 (Dorup et al., 1991) 변하지 않는 것으로 보고되었다. 그러나 혈청의 IGF-I 농도는 zinc가 결핍된 상태에서 현저히 감소되는 것을 관찰하였다 (Bolze et al., 1987; Dorup et al., 1991; Droke et al., 1993; Oner et al., 1984). McNall et al. (1995)의 최근 연구에 의하면 이와 같은 IGF-I 농도 감소는 IGF-I과 GH receptor 유전 인자의 발현 감소 때문인 것 같다. IGF-I인 경우 간에서 7.5-kb mRNA transcript는 *ad libitum* group에 비해 zinc가 결핍된 group에서는 86% 감소되었고 pair-fed group에서는 69%가 감소되었다. 0.8-1.2-kb IGF-I transcript는 *ad libitum* group에 비해 각각 40%, 25% 감소되었고 1.8-kb transcript에는 변화가 없었다. GH receptor mRNA transcript도 zinc 결핍시 83%, pair-feeding시 50% 감소하였고 GH binding protein mRNA인 경우 각각 54%, 35% 감소를 보여주었다. 이 결과로부터 zinc 결핍 시에 동물의 성장 저하는 GH receptor signaling pathway의 이상으로 인한 IGF-I 생성분비의 감소 때문이라는 결론을 얻게 된다.

위의 결과들은 동물의 영양 상태의 변화가 IGF나 IGFBP 생성 분비를 조절하므로써 각 조직이나 동물의 성장 발달을 조절한다는 결론을 가져온다.

## 소장점막

소장 점막은 분화되지 않고 증식하는 세포들로 구성되는 crypt와 고도로 분화된 세포들로 덮여있는 villus들로 구성되어 있다 (Madara and Tier, 1987; Gordon, 1989; Cheng and Leblond, 1974). Villus epithelium에서 발견되는 4가지 종류의 세포들 중에서 enterocyte라고 불리는 columnar epithelial cell이 93%를 차지한다. 이 상피 세포들은 crypt에서 분열되어 villus tip을 향하여 이동하면서 여러 가지 소화 흡수 능력을 갖춘다. 이 상피 세포들이 villus 끝에 도달하면 lumen으로 떨어져 나가고 새로 분열된 세포가 이동하여 이 자리를 채운다. 이러한 과정으로 소장 점막은 일정한 소화와 흡수능력을 유지하는데 이 과정이 장의 부위에 따라 다르지만 보통 3-5일 걸린다. 여러 가지 요인들이 enterocyte의 증식과 분화에 영향을 미치지만 동물의 영양상태가 가장 중요한 요인이라고 할 수 있다 (Johnson, 1987; Lipkin, 1987). 영양소의 공급은 직접적으로는 소장 상피세포의 증식과 분화에 필요하고 간접적으로는 gastrointestinal peptide를 비롯한 여러 가지 hormone과 growth factor, 혈액액과 담즙의 분비, 또는 신경의 자극에 변화를 가져오므로써 소장점막에 중요한 영향을 미친다 (Bragg et al., 1991). 이렇게 동물의 영양 상태가 소장 상피 세포에 중요한 영향을 미치지만 소화 흡수 능력이 저하된 경우 건전한 영양 상태를 이루기 어려운 것은 언급할 필요가 없다. 물론 소장을 통과하지 않고 영양을 공급하는 total parenteral nutrition 기술이 급속히 발달되고 있지만 이런 형태의 영양공급은 간 기능의 부전을 가져오기 쉽다. 따라서 소장 세포의 성장 분화에 대한 이해가 시급히 요구되고 있지만 어떤 요소나 인자가 이 과정을 조절하는지 아직 잘 모르고 있다.

### *In vivo* effects of IGFs and IGFbps on intestinal mucosa in rats

앞에서 언급한 것처럼 IGF system이 동물의 영양 상태에 따라 민감하게 변하고 동물의 영양 상태가 소장 점막 세포의 증식 분화에 절대적인 역할을 하므로 지난 수년동안 우리의 실험실에서는 insulin-like growth factor가 소장점막에 미치는 영향을 연구하였다. 첫 번째 실험은 소장의 80%를 절제한 흰쥐를 이용했다 (Vanderhoof et al., 1992). 이 수술은 공장의 시작부분 4 cm와 회장의 말단 12 cm 만을 남기고 80%의 소장을 제거하는 수술이다. 80% 소장 절제는 극심한 소화 흡수 면적의 감소를 유발하며 표면적을 증가하기 위한 적응 책으로 남아있는 소장 점막 세포의 hyperplasia가 일어난다. IGF-I이나 des-(1-3)-IGF-I (des-IGF-I)이 소장점막의 hyperplasia를 증진시키는지 보기 위해서 소장 절제후 쥐에게 mini-osmotic pump를 피하에 삽입하여 IGF-I이나 IGF-I 유도체인 des-IGF-I을 하루에 체중 1 kg당 1.5 mg을 주입했다. 이 mini-pump는 1 시간에 1  $\mu$ l의 용액을 계속해서 7 일 동안 pump할 수 있는 장치이다. Des-IGF-I은 IGF-I의 N-terminal 말단에서 glycine, proline, 그리고 glutamic acid가 단절된 것으로 IGFbp에 대한 친화력이 원래의 IGF-I에 비해 아주 낮기 때문에 (Ballard et al., 1987; Francis et al., 1986; Francis et al., 1988; Ross et al., 1989; Szabo et al., 1988; Carlsson-Skwirut et al., 1989) 성장 또는 증식 촉진 능력이 더 강하다고 생각하고 있다. 동물의 성장 곡선을 살펴보면 모든 쥐들이 수술후 24 시간 후까지 체중이 감소했는데 그 이유는 수술 전후 72 시간 동안은 동물들을 굶겼기 때문이다. 그 뒤로는 모든 동물의 체중이 증가했으나 기대한 대로 수술 받지 않은



group이 제일 빠르게 자랐고 IGF-I이나 des-IGF-I을 주입받은 group들이 buffer만 받은 group보다 성장 속도가 빠른 것을 볼 수 있었다. IGF-I과 des-IGF-I을 비교했을 때는 des-IGF-I의 효과가 IGF-I보다 훨씬 좋았다. 이렇게 IGFBP에 친화력이 감소된 des-IGF-I의 증가된 효력은 체내에서 생성되는 IGFBP들이 IGF-I에 결합하여 IGF-I이 receptor에 결합하는 것을 방지하므로써 IGF-I의 작용을 감소한다는 가설을 설립하게 해준다. 수술 후 7 일이 경과한 후에 동물을 죽여서 장 점막의 상태를 조사하였다. Mucosal DNA data를 보면 남아있는 십이지장과 공장에서는 IGF-I이나 des-IGF-I이 mucosal hyperplasia를 증진시켰는데 이 두개의 peptide의 효과가 서로 비슷하였다. 회장에서는 IGF-I이나 des-IGF-I이나 둘 다 hyperplasia 증진 효과가 없었다. Serum IGF-I 농도를 살펴보면 예상한 대로 resected control group에서 현저히 감소된 것을 알 수 있다. 이 실험에서는 IGF-I이 endocrine mechanism으로 mucosal hyperplasia를 증진시킨다고 결론을 내릴 수 있다.

그 다음 실험으로는 (Park et al., 1995) IGF-I을 IGFBP-1과 같이 주입했는데 이 실험은 원래 IGFBP-1이 IGF-I의 작용을 증진시킬 것이라는 가설에서 시작되었다.

Synergen이란 제약 회사에서 protein-calorie malnourished 환자에게 IGF-I과 같이 투여하면 이 환자들의 회복을 촉진시킬 수 있을까 하여 recombinant DNA technology를 이용하여 생산해 내고 있었다. 우리의 소장 절제한 동물 model이 protein-calorie malnourished 환자의 좋은 model 이므로 우리 동물 model에 IGFBP-1 효과를 시험하기 위해서 4 group의 Sprague-Dawley rats을 사용했다. 모든 동물을 80% 소장 절제한 후에 첫째 group에게는 buffer, 두 번째 group에게는 IGF-I, 세 번째 Group에게는 IGF-I과 IGFBP-1을 동일 molar 비율로, 그리고 마지막 group은 IGF-I과 IGFBP-1을 1:5 molar 비율로 섞어서 mini-osmotic pump를 이용하여 주입했다. Mucosal hyperplasia는 IGFBP-1을 함께 주입한 group에서 IGF-I만 주입한 group과 비교하여 훨씬 감소되었으므로 IGFBP-1은 소장 점막에서 IGF-I의 endocrine 작용을 억제한다고 말할 수 있다.

위에서 언급한 바와 같이 anterior pituitary hormone인 GH은 간에서 IGF-I의 생성을 촉진하여 혈액의 IGF-I의 농도를 높여주는 작용이 있어 GH의 성장 촉진 작용은 IGF-I에 의해서 전달된다고 생각되고 있다 (Rechler and Nissely, 1990). GH을 소장 절제한 흰쥐에게 주입한 경우 혈액의 IGF-I을 높이고 그 결과로 mucosal hyperplasia를 촉진시킬 것이라는 가설 하에 다음 실험을 시행하였다. 이번에는 두 group은 위에서 언급한 대로 80% resection을 받고 다른 두group은 sham operation 을 받았다. Sham operation은 공장 시작 부분으로부터 4 cm 되는 부분과 회장의 말단으로부터 12 cm 되는 부분을 잘랐다가 다시 연결하는 수술이었다. 결과를 간단하게 살펴보면 GH의 주입은 mucosal hyperplasia에 아무런 효과도 없었고 혈액의 IGF-I 농도에도 변화가 없었다. 이 결과는 소장 절제한 흰쥐의 섭취, 소화, 흡수 능력의 부족에 의한 영양 부족 상태가 GH에 대한 저항 상태를 초래하였다는 사실을 암시한다.

## Effect of exogenous IGFs and insulin on the proliferation of IEC-6 cells in serum-free medium

동물 실험은 전체적인 생물학적인 효과를 관찰할 때 필수적인 실험 도구이지만 정확한 mechanism을 연구하기에는 이상적인 도구가 아니다. 특히 소장 점막의 구조가 아주 복잡하고 여러 가지 요인이 상피세포의 증식분화를 조절하기 때문에 정확한 기전을 연구하는 데는 *in vitro* model이 필요하다. 우리가 과거 수년간 사용한 model은 흰 쥐의 소장 crypt에서 유래한 IEC-6 cells이라고 부르는 intestinal epithelial cell line이다 (Quaroni et al., 1979; Quaroni and May, 1980). 이 세포들을 serum-free medium에 배양할 때 배양액에 IGF-I을 첨가하면 [<sup>3</sup>H]thymidine이 DNA에 삽입되는 것을 증가시키는 것을 관찰하였다. Insulin과 IGF-II도 IEC-6 cell의 DNA 합성을 촉진시켰으나 그 효력이나 효능이 IGF-I에 비해 훨씬 떨어지는 것을 관찰하였다 (Park et al., 1992, Table 1). 이 결과는 IGF-II와 insulin도 type I IGF receptor에 결합하므로써 그들의 작용을 전달한다는 가설을 세울 수 있다.

Human GH을  $2 \times 10^{-8} - 1 \times 10^{-5}$  M의 농도에서 serum-free medium에 첨가했을 때 IEC-6 cell의 [<sup>3</sup>H]thymidine이나 [<sup>14</sup>C]leucine incorporation에 아무런 영향도 미치지 않았다. 이 결과들은 *in vivo*에서와 같이 *in vitro*에서도 IGF가 소장점막 상피 세포 증식을 직접적으로 촉진시키는 것을 보여준다.

## Characterization of the type I and type II IGF receptors in IEC-6 cells

IEC-6 cell의 증식이 IGF나 insulin에 의해서 촉진되므로 동물의 소장 상피 세포들처럼 (Laburthe et al., 1988) 이 세포들도 IGF receptor들을 가지고 있는지 분석하였다 (Park et al., 1990). 세포들을 6-well plate에 길러 배양 접시에 부착된 세포에 다양한 농도 (0.2 nM - 0.5  $\mu$ M)의 [<sup>125</sup>I]-IGF-I을 넣어 3°C에서 16 시간 incubate 했다. [<sup>125</sup>I]-IGF-I binding data의 Scatchard plot (Scatchard, 1949; Munson and Rodbard, 1980)은 직선이었는데 그것은 IEC-6 cell이 한 가지 종류의 binding site를 가진 것을 의미하고  $K_D$ 는  $3.1 \pm 0.35$  nM이고  $B_{max}$ 는  $51 \pm 6$  fmol/ $10^6$  cell로서 세포 한 개당 약 30,000 개의 IGF-I binding site를 가진 것으로 추정된다. 이와 같은 세포 표면의 [<sup>125</sup>I]-IGF-I의 결합은 방사능을 띠지 않은 IGF-I을 첨가하여 효과적으로 방지할 수 있었고 IGF-II는 IGF-I보다는 약하지만 효과가 있었으나 insulin은  $5 \times 10^{-7}$  M 농도에서 겨우 18%의 감소를 보여주었다. IEC-6 cell의 membrane을 분리해서 receptor를 [<sup>125</sup>I]-IGF-I과 cross-linking한 다음 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 (Laemmli, 1970) 분석하면 환원된 상태에서  $M_r$  270,000, 245,000, 133,000의 3 개의 band가 나타나는데 가장 뚜렷한 band는 133,000  $M_r$  band였다. 133,000과 270,000  $M_r$  band들의 강도는  $10^{-7}$  M unlabeled IGF-I과 같이 incubate 했을 때 80%나 감소되었고 효력은 적었지만 IGF-II에 의해서도 감소되었으나 insulin은 별 효과가 없었다. 따라서 133,000 species는 type I IGF-I receptor의  $\alpha$ -subunit이고 270,000 species는  $\alpha_2$ -dimer인 것 같았다.

[<sup>125</sup>I]-IGF-II의 세포표면의 binding data의 Scatchard plot은 곡선으로서 high affinity,

low capacity binding site와 low affinity, high capacity binding site의 두 가지 종류의 binding site를 가진 것처럼 보였다. High affinity, low capacity site는  $K_D = 0.87 \pm 0.08$  nM,  $B_{max} = 28 \pm 2.5$  fmol/ $10^6$  cell이었고 low affinity, high capacity site는  $K_D = 60 \pm 8.8$  nM,  $B_{max} = 1780 \pm 230$  fmol/ $10^6$  cell이었다. [ $^{125}$ I]-IGF-II의 결합은 방사능을 띠지 않은 IGF-II를 첨가하여 효과적으로 방지할 수 있었고 IGF-I이나 insulin은 첨가했을 때는 별 효과가 없었다. [ $^{125}$ I]-IGF-II를 이용한 membrane receptor의 affinity cross-linking에 의하면 주요 band는 245,000  $M_r$  species였는데 이 band가 type II IGF receptor의 특성을 나타내었다. 위에 언급한 두 가지 방법을 이용하여 IEC-6 cell의 [ $^{125}$ I]-insulin의 binding site를 찾으려는 노력은 별로 성공적이지 못했다. Affinity cross-linking 결과를 보면 매우 희미한 131,000  $M_r$  species를 관찰할 수 있었는데 이것은 type I IGF receptor에 [ $^{125}$ I]-insulin이 결합한 것으로 추측되었다. 이 결과는 IEC-6 cell은 풍부한 양의 type I IGF receptor와 type II IGF receptor를 가지고 있고 IGF의 작용은 type I IGF receptor를 통해서 세포 안으로 전달되어진다는 것을 암시하였다.

#### Characterization of IGF-II and IGFBP-2 secreted by IEC-6 cells

IEC-6 cell은 serum-free medium에서 growth factor 첨가 없이 단 기간 동안 증식된다. IEC-6 cell이 serum-free medium에서 증식하므로 이 세포들이 growth factor들을 만들어서 자기 자신의 증식을 촉진시키는 autocrine 기능을 가지고 있다고 생각할 수 있다. 따라서 이 세포들이 IGF를 생성 분비하는 가능성을 protein chemistry techniques를 이용하여 탐지하였다. 먼저 세포들을 serum-free medium에 incubate하여 세포가 growth factor를 만들어 medium을 condition 하게 한 다음 conditioned medium을 농축시키고 dialyze하고 gel filtration chromatography (Bio-Gel P-10 column)을 이용하여 molecular size에 따라서 분리하였다. Column으로부터 분리된 각 fraction 중 aliquot을 건조시켜 IGF-I 과 IGF-II radioimmunoassay (RIA)를 시행하였다. 이 fraction들을 IGF-II RIA로 분석했을 때 Bio-Gel P-10 fraction중 3 가지 두드러진 peak가 나타났다. IGF-I, IGF-II, 그리고 Buffalo rat liver cell이 분비하는 순수 분리된 IGFBP-2를 같은 column에 load하여 이 세 가지 peak가 각각 IGFBPs, high molecular weight IGF-II, 그리고 mature IGF-II라고 잠정적으로 결정하였다 (Marquardt et al., 1981; Mottola et al., 1986). Column의 void volume으로 elute한 peak 1 물질은 냉동 건조하여 IGF-I-Sepharose affinity chromatography와 reverse phase HPLC를 이용하여 더욱더 순수 정제하였다. SDS-PAGE 분석에 의하면 34,000  $M_r$  을 가진 buffalo rat liver cell로부터 순수 분리한 IGFBP-2와 나란히 같은 위치로 이동했으며 automated Edman degradation에 의한 N-terminal amino acid sequence 분석에 의하면 이 물질은 IGFBP-2임에 의심할 여지가 없었다. Reverse phase HPLC로 더 순수 분리하여 N-terminal amino acid sequence를 분석한 결과 peak 2 는 IGF-II의 high molecular form이고 peak 3는 IGF-II의 mature form이라고 결론을 내렸다. Peak 1의 진위를 재확인할 필요는 없었지만 [ $^{125}$ I]-IGF-II를 이용한 ligand blot (Hossenlopp et al., 1987) 이나 bovine IGFBP-2를 토끼에게 주사하여 얻은 polyclonal antiserum을 이용하는 immunoblot analysis가 우리에게 이용가능하고 또 이 방법이 위에 열거한 방법보다 훨씬 간편했으므로 이 두 가지 analysis를 시행하였는데 그 결과는 IEC-6 cell은 IGFBP-2를

분비한다는 것을 재확인하였다. IGF-I RIA에 의해서는 Bio-Gel P-10 column의 void volume으로 elute한 IGFBP peak만 검출되었으므로 IEC-6 cell은 IGF-I은 분비하지 않는다고 결론지었다.

### Effect of IGFBP-2 on DNA synthesis and proliferation of IEC-6 cells

IEC-6 cell에 의해서 생성되는 IGFBP-2의 역할을 조사하기 위해서 IGFBP에 친화력이 현저히 감소된 IGF-I 유사체, des-IGF-I 과 [Gln<sup>3</sup>,Ala<sup>4</sup>,Tyr<sup>15</sup>,Leu<sup>16</sup>]IGF-I [(QAYL)-IGF-I], 의 효력을 IGF-I과 비교하였다. (QAYL)-IGF-I은 원래의 IGF-I의 아미노산 잔기 3, 4, 15, 16대신에 glutamine, alanine, tyrosine, leucine이 삽입된 IGF-I의 유사체이다 (Bayne et al., 1988; Cascieri et al., 1989). Des-IGF-I과 같이 이 IGF-I 유사체는 IGFBP에 대한 친화력이 매우 낮다고 보고되었다. 이 연구에서는 [<sup>3</sup>H]thymidine이 세포의 DNA에 삽입되는 것을 DNA 합성을 측정하는 방법으로 사용하였다. Des-IGF-I과 (QAYL)-IGF-I은 IGF-I에 비해 IEC-6 cell 의 DNA 합성을 아주 낮은 농도에서 촉진시킬 수 있었다. 이 결과는 IEC-6 cell에 의하여 생성되는 IGFBP-2가 IGF-I의 작용을 방해하는 것을 암시해준다.

두 번째 실험에서는 IEC-6 cell이 분비하는 IGFBP-2를 순수 분리하여 serum-free 배양액에 직접 첨가하였다. IGFBP-2는 IEC-6 cell의 DNA 합성을 억제할 뿐만 아니라 실제로 세포 증식도 억제하였다. 이 두 실험의 결과는 IEC-6 cell이 분비하는 endogenous IGFBP-2나 exogenous IGFBP-2 모두 IEC-6 cell의 증식을 억제하는 기능을 가졌다는 것을 암시한다.

### Stimulation of IEC-6 cell proliferation by expression of a reverse IGFBP-2 cDNA construct

위에 열거한 두 실험 방법은 IGFBP-2의 역할을 알아내는 방법으로는 간접적이거나 IGFBP-2를 과량으로 첨가했기 때문에 세포가 생성 분비하는 endogenous IGFBP-2의 역할을 알아내는 직접적인 방법이 아니라고 비난을 받을 수 있다. 따라서 세 번째 실험에서는 (Corkins et al., 1995) recombinant DNA technology를 이용하여 IEC-6 cell의 IGFBP-2 생성을 감소시키는 방법을 사용했다. 원리를 살펴보자면 정상적인 유전인자를 방향을 바꾸어 expression vector에 삽입하여 이 vector를 세포에 삽입시키면 세포 안에서 정상적인 mRNA에 상보적인 anti-sense mRNA가 생성되게 된다. 이렇게 생산된 anti-sense mRNA가 상보적인 sense mRNA에 hybridized 되어 hybrid를 생성하면 translation이 불가능하게 되거나 double stranded RNA에 작용하는 nuclease에 의해서 쉽게 분해되므로서 protein의 translation을 방지한다는 가설에서 실험을 시작하였다. 첫째 스위스 Basel의 Dr. J. Swander가 보내준 rat IGFBP-2 cDNA를 (Margo et al., 1989) pcDNA3 라는 eucaryotic expression vector에 anti-sense orientation으로 삽입시켰다. 이 vector는 효능이 아주 강한 human cytomegalovirus promotor를 가지고 있을 뿐 아니라 여러 가지 restriction endonuclease를 포함한 polylinker site를 가지고 있어 원하는 유전인자를 삽입하기가 편리한 vector이다. 또 이 vector는 mRNA를 완성하기 위한 bovine growth hormone의 polyadenylation signal을

포함하고 있다. 또한 항생제인 G418에 견딜 수 있게 neomycin resistance marker를 가지고 있기 때문에 이 vector가 transfect된 세포들을 G418 sulfate가 포함된 medium에서 선택할 수 있다. 이렇게 reverse IGFBP-2 cDNA를 가진 vector를 competent *E. coli*, Max Efficiency DH5  $\alpha$  F'IQ에 transform시킨 다음 ampicillin이 포함된 agar plate에 spread하여 37°C에서 18 시간 동안 incubated한 다음 독립된 colony를 선택하여 reverse IGFBP-2 cDNA가 삽입된 plasmid를 순수 분리하였다. 이 plasmid를 Lipopectin reagent (Gibco/BRL)을 이용하여 (Whit et al., 1989) 세포 안에 삽입시켰다. Plasmid를 포함한 세포를 G418 sulfate가 포함된 medium에서 2 주일 간 선택하였다. Control IEC-6 cell은 pcDNA3 vector만이 삽입된 세포들로서 G418 sulfate가 포함된 medium에서 2 주일간 선택하였다.

Reverse IGFBP-2 cDNA를 가진 세포에 실제로 IGFBP-2 mRNA가 감소되었는지 보기 위해서 Northern blot analysis를 시행하였다. 예상한대로 pcDNA3 vector만 transfect한 세포들에 비해 reverse IGFBP-2 cDNA를 가진 세포들의 IGFBP-2 mRNA 양이 현저히 감소하였다. 실제로 IGFBP-2 peptide 생성에도 변화가 있는지 보기 위해 ligand blot을 시행했는데 reverse IGFBP-2 cDNA를 가진 세포의 conditioned medium의 IGFBP-2의 농도도 현저히 감소했다. 무엇보다도 흥미 있는 결과는 이 세포들의 증식 속도였는데 IGFBP-2를 감소하여 생산하는 세포들이 정상 세포들 보다 더 빨리 자라는 것을 알 수 있었다. 이 결과로부터 장의 상피세포가 생산하는 IGFBP-2는 세포에서 생성되는 IGF-II 나 bovine fetal serum에서 유래된 IGF들의 증식 작용을 방해한다는 결론을 얻을 수 있다.

#### Identification and characterization of IGFbps secreted by Caco-2 cells as a function of differentiation

IEC-6 cell은 흰쥐의 소장의 crypt로부터 유래한 세포인데 소장 상피세포의 여러 가지 특성들을 가지고 있으나 배양 중에 villus cell로는 분화하지 않는다 (Quaroni et al., 1979; Quaroni and May 1980). 이 cell line이 설립된 뒤에 많은 연구자들이 이 세포를 villus epithelial cell로 분화시키려는 노력을 하였으나 아직까지 성공한 적이 없다. 우리 실험실에도 여러 가지 방법으로 IEC-6 cell을 분화시키려고 했지만 실패하였다. Caco-2 cell은 인간 대장의 adenocarcinoma에서 유래한 cell line으로 세포를 plate하여 접시를 완전히 덮기 전까지는 미분화된 crypt의 세포의 특성을 가지고 있다가 접시 표면을 세포가 가득 덮어서 세포끼리 서로 접촉하게 되면 자연적으로 분화되어 소장의 villus 상피 세포막이 보유하는 소화요소들을 갖춘다. 분화된 Caco-2 cells은 체내의 villus 상피세포만이 가진 (Leeper and Henning, 1990; Lorenzsonn et al., 1987; Chandrasena et al., 1992) sucrase-isomaltase를 가지고 있다 (Pinto et al., 1983; Grasset et al., 1984). 그리고 이 세포들은 IGF-I, IGF-II, insulin receptor들을 가지고 있다 (Guo et al., 1992; MacDonald et al., 1993). 비록 Caco-2 cell이 대장암에서 기원해서 암세포이기는 하지만 소장의 상피조직의 증식과 분화를 연구하기 위해 현재까지 이용 가능한 것 중에서 제일 적절한 *in vitro* 실험 model이다 (Evans et al., 1994).

Caco-2 cell의 증식이 IGF에 의해서 촉진되는지 알기 위해서 Caco-2 cell을 혈청을

첨가하지 않은 medium에서 IGF-I을 첨가하고 배양하였다. Caco-2 cell은 serum-free medium에서 growth factor 없이 증식하고 혈청이나 IGF-I을 첨가하면 성장 속도가 증가되었으나 증가는 그리 크지 않았다. 이와 같은 결과는 Caco-2 cell이 growth factor들을 생성 분비하여 자신의 증식을 autocrine mechanism으로 촉진한다고 생각할 수 있다. IGF-II RIA로 Caco-2 cell conditioned medium에서 IGF-II peptide를 측정할 수 있었고 <sup>32</sup>P-labeled IGF-II cDNA probe을 (Whitfield et al., 1984) 이용한 Northern blot analysis 결과를 살펴보면 Caco-2 cell의 IGF-II mRNA level은 seeding후 3일에서 5일 사이에 증가했다 따라서 Caco-2 cell이 만드는 IGF-II가 이 세포 증식을 촉진시킬 가능성을 제시해준다. Northern blot analysis나 IGF-I RIA로 Caco-2 cell의 IGF-I의 생성여부를 조사했으나 IGF-I mRNA나 protein을 검출할 수 없었으므로 Caco-2 cell은 IGF-I을 생성하지 않는다는 결론을 내렸다.

소장 상피세포 분화의 지표로서 sucrase-isomaltase activity와 그 mRNA level을 측정했다. 혈청이 포함된 medium에서 100 mm 접시에 배양했을 때 Caco-2 cell은 보통 5일이 지나면 confluent 된다. Sucrase-isomaltase mRNA level은 세포 seeding후 3일과 5일 사이에 64% 증가했고 5일과 16일 사이에 12배 증가하였다. 실제의 Sucrase activity도 seeding후 3일과 6일을 비교할 때 3배가 증가하고 14일에 가장 높았는데 3일과 14일간에는 10배의 차이가 있었다. 따라서 Caco-2 cell은 세포가 confluent한 뒤에 분화하는 것을 볼 수 있었다. mRNA 분석을 위한 Human pSI2 sucrase-isomaltase cDNA (Green et al., 1987; Chantret et al., 1992)는 London의 Dallas Swallow 박사가 보내 주었다.

Northern blot analysis로 IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 mRNA를 검출했고 ligand blot analysis와 immunoblot analysis를 이용하여 IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4 protein이 Caco-2 cell에 의해서 분비되는 것을 확인했는데 ligand blot에 나타난 31,000 Mr species가 무엇인지는 아직 확인할 수 없었다. 한가지 재미있는 관찰은 IGFBP-2와 IGFBP-3 mRNA 그리고 protein은 Caco-2 cell이 분화하는 동안에 증가하는 반면에 IGFBP-4 mRNA와 그 protein은 감소하는 것이었다. 그리고 IGF-II mRNA와 peptide는 Caco-2 cell 분화 도중 별 변화를 보여주지 않았다. Northern blot analysis를 위한 human IGFBP-2와 IGFBP-4 cDNA는 Dr. Shimasaki로부터 (Shimasaki et al., 1990) human IGFBP-3 cDNA는 San Francisco의 Genentech Company (Wood et al., 1988)로부터 공급받았다. 이와 같은 관찰은 Caco-2 cell이 IGF-dependent autocrine mechanism에 의해 세포의 증식과 분화를 조절한다는 가설을 세우게 되었다. 그 가설을 증명하기 위한 실험의 하나가 IGFBP-4를 overexpress하는 Caco-2 cell의 clone을 만드는 것이었다. 이 실험에서는 1267 bp rat IGFBP-4 cDNA (Shimasaki et al., 1990)를 pcDNA3의 EcoRI site에 sense orientation 으로 삽입한 다음 위의 IEC-6 cell에 사용했던 비슷한 방법으로 Caco-2 cell에 transfect 하였다. 이 실험에서도 G418 sulfate (0.4 mg/ml)를 이용하여 transfected된 세포들을 2 주일 동안 선택하였다. Transfected된 단일 세포로부터 유래된 clone들을 cloning cylinder를 이용하여 분리한 다음 이 세포들을 0.2 mg/ml의 G418 sulfate이 포함된 medium에서 증식시켜서 liquid nitrogen에 저장하였다. IGFBP-4 cDNA가 transfected된 clone들은 IGFBP-4 mRNA의 발현이 증가되었을 뿐만 아니라 실제 IGFBP-4 분비도 두 배 이상 증가되었다. 더욱더

흥미로운 것은 IGFBP-4를 과량으로 생성하는 clone들은 serum-free medium에서 자라는 속도가 현저히 감소했을 뿐 아니라 sucrase-isomaltase mRNA 발현은 pcDNA3 만 transfect한 clone들에 비해 증가하였다. 이 결과는 IGFBP-4는 Caco-2 cell의 세포 증식을 억제하고 분화를 촉진한다는 것을 보여준다.

## 참고 문헌

- Ballard FJ, Francis GL, Ross M, Bagley CJ, May B, Wallace JC 1987 Natural and synthetic forms of insulin-like growth factor I (IGF-I) and the potent derivative, destriptide IGF-I: biological activities and receptor binding. *Biochem Biophys Res Commun* 149: 398-404.
- Bar RS, Boes M, Clemmons DR 1990 Insulin differently alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2, and endothelial cell IGF binding proteins in rat heart. *Endocrinology* 127: 497-499.
- Bayne ML, Applebaum J, Chicchi GG, Hayes NS, Green BG, Cascieri MA 1988 Structural analogs of human insulin-like growth factor I with reduced affinity for serum binding proteins and the type II insulin-like growth factor receptor. *J Biol Chem* 263: 6233-6239.
- Bayne ML, Applebaum J, Underwood D, Chicchi GG, Green BG, Hayes NS, Cascieri MA 1989 The C region of human insulin-like growth factor (IGF) I is required for high affinity binding to the type I IGF receptor. *J Biol Chem* 264: 11004-11008.
- Binkert C, Landwehr J, Mary J-L, Schwander J, Heinrich G 1989 Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-2). *EMBO J* 8: 2497-2502.
- Bolze MS, Reeves RD, Linbeck FE, Elders J 1987 Influence of zinc on growth, somatomedin and glycosaminoglycan metabolism in rats. *Endocrinol Metab* 15: E21-E26.
- Bragg LE, Thompson JS, Rikkers LF 1991 Influence of nutrient delivery on gut structure and function. *Nutrition* 7: 237-243.
- Camacho-Hubner C, Busby WH, McCusker RH, Wright G, Clemmons DR 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.
- Carlsson-Skwirut C, Lake M, Hartmanis M, Hall K, Sara VR 1989 A comparison

of the biological activity of the recombinant intact and truncated insulin-like growth factor I (IGF-I). *Biochim Biophys Acta* 1011: 192-197.

Cascieri MA, Hayes NS, Bayne ML 1989 Characterization of the increased biological potency in BALB/C 3T3 cells of two analogues of human insulin-like growth factor I which have reduced affinity for the 28K cell-derived binding protein. *J Cell Physiol* 139: 181-188.

Chandrasena G, Sunitha I, Lau C, Nanthakumar NN, Henning SJ 1992 Expression of sucrase-isomaltase mRNA along the villus-crypt axis in the rat small intestine. *Cell Mol Biol* 38: 243-254.

Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MC, Zweibaum A 1988 Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 48: 1936-1942.

Cheng H, Leblond CP 1974 Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* 141: 461-480.

Clemmons DR 1993 IGF binding proteins and their functions. *Mol Reprod Dev* 35: 368-375.

Clemmons DR, Hones JI, Busby WH, Wright G 1993 Role of insulin-like growth factor binding proteins in modifying IGF actions. In: *The Role of Insulin-like Growth Factors in the Nervous System*. *Ann NY Acad Sci* 692: 10-21.

Clemmons DR, Klibanski A, Underwood LE, McArthur JW, Ridgway EC, Beitins IZ, Van Wyk JJ 1981 Reduction of plasma immunoreactive somatomedin C during fasting in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 1247-1250.

Cohick WS, Clemmons DR 1993 The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55:131-153.

Corkins MR, Vanderhoof JA, Slentz DH, MacDonald RG, Park JHY 1995 Growth stimulation by transfection of intestinal epithelial cells with an antisense insulin-like growth factor binding protein-2 construct. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 707-713.

Czech MP 1989 Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell* 59: 235-238.



- Dorup I, Flybjerg A, Everts ME, Clausen T 1991 Role of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in growth inhibition induced by magnesium and zinc deficiency. *Br J Nutr* 66: 505-521.
- Drop SLS, Schuller GP, Lindenberg-Kortleve, DJ, Groffen C, Brinkman A, Zwarthoff EC 1992 Structural aspects of the IGFBP family. *Growth Regulation* 2: 69-79.
- Droke EA, Spears JW, Armstrong JD, Kegely EB, Simpson RB 1993 Dietary zinc affects serum concentrations of insulin and insulin-like growth factor I in growing lambs. *J Nutr* 123: 13-19.
- Dull TJ, Gray A, Hayflick JS, Ullrich A 1984 Insulin-like growth factor II precursor gene organization in relation to insulin gene family. *Nature* 310: 777-781.
- Evans GS, Flint N, Potten CS 1994 Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 56: 399-417.
- Focht S, Fosmire G, Hymer W 1991 Effect of zinc deficiency on pituitary somatographs. *FASEB J* 5: A940 (abs).
- Francis GL, Read LC, Ballard FJ, Bagley CJ, Upton FM, Gravestock PM, Wallace JC 1986 Purification and partial sequence analysis of insulin-like growth factor I from bovine colostrum. *Biochem J* 233: 207-213.
- Francis GL, Upton FM, Ballard FJ, McNeil KA, Wallace JC 1988 Insulin-like growth factors I and II in bovine colostrum. Sequences and biological activities compared with those of a potent truncated form. *Biochem J* 251: 95-103.
- Gordon JI 1989 Intestinal epithelial differentiation: New insights from chimeric and transgenic mice. *J Cell Biol* 108: 1187-1194.
- Gossen M, Bujard H 1992 Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5547-5551.
- Gosiewska A, Wilson S, Kwon D, Peterkofsky 1994 Evidence for an *in vivo* role of insulin-like growth factor-binding protein-1 and -2 as inhibitors of collagen gene expression in vitamin C-deficient and fasted guinea pigs. *Endocrinology* 134: 1329-1339.
- Grasset E, Pinto M, Dussaulx E, Zweibaum A, Desjeux JF 1984 Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco 2: electrical parameters. *Am J Physiol* 247: C260-C267.

- Green F, Edwards Y, Hauri H-P, Povey S, Ho MW, Pinto M, Swallow D 1987 Isolation of a cDNA prob for a human jejunal brush border hydrolase, sucrase-isomaltase, and assignment of the gene locus to chromosome 3. *Gene* 57: 101-110.
- Guo Y-S, Narayan S, Chandrasekhar Y, Singh P 1992 Characterization of insulin-like growth factor I receptors in human colon cancers. *Gastroenterology* 98: 703-707.
- Hambidge KM, Casey CM, Krebs NF 1986 Zinc. In: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, edited by W Mertz. Vol 2, 5th ed., Orlando FL: Academic Press, p. 1-137.
- Han VKM, D'Ercole AJ, Lund PK 1987 Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236: 193-197.
- Han VKM, Lund PK, Lee DC, D'Ercole AJ 1988 Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 422-429.
- Hintz RL, Suskind R, Amatayakul K, Thanangkul O, Olson R 1978 Plasma somatomedin and growth hormone values in children with protein-calorie malnutrition. *J Pediatr* 92: 153-156.
- Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Portolan G, Binoux M 1987 Heterogeneity of insulin-like growth factor binding proteins between structure and affinity. 2. Forms released by human and rat liver in culture. *Eur J Biochem* 170: 133-142.
- Hynes RO 1987 Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554.
- Isley WC, Underwood LE, Clemmons DR 1983 Dietary components that regulate serum somatomedin-C concentrations in humans. *J Clin Invest* 71: 175-182.
- Johnson LR 1987 Regulation of gastrointestinal growth. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by LR Johnson. New York: Raven Press, p. 169-196.
- Jones JI and Clemmons DR 1995 Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 16: 3-34.

Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP, Sahagian GG 1988 Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 263: 9339-9344.

Korner C, Nurnberg B, Uhde M, Braulke T 1995 Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. *J Biol Chem* 270: 14029-14038.

Laburthe M, Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S 1988 Receptors for insulin-like growth factors I and II in rat gastrointestinal epithelium. *Am J Physiol* 254 (Gastrointest Liver Physiol 17): G457-G462.

Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Leeper LL, Henning SJ 1990 Development and tissue distribution of sucrase-isomaltase mRNA in rats. *Am J Physiol* 258: G52-G58.

Lewis UJ 1992 Growth hormone what is it and what does it do? *Trends in Endocrinol Metab* 3: 117-121.

Lipkin M 1987 Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells in normal and disease states. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by LR Johnson. New York: Raven Press, p. 255-284.

Lorenzsonn V, Korsmo H, Olsen WA 1987 Localization of sucrase-isomaltase in the rat enterocyte. *Gastroenterology* 92: 98-105.

Lund PK, Moats-staats BM, Hynes MA, Simmons JG, Jansen M, D'Ercole AJ, Van Wyk JJ 1986 Somatomedin-C/insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J Biol Chem* 261: 14539-14544.

MacDonald RG, Pfeiffer SR, Coussens L, Tepper MA, Brocklebank CM, Mole JE, Anderson JK, Chen E, Czech MP, Ullrich A 1988 A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate. *Science* 239: 1134-1137.

MacDonald RS, Thornton Jr WH, Bean TL 1993 Insulin and IGF-I receptors in a human intestinal adenocarcinoma cell line (Caco-2): Regulation of Na<sup>+</sup> glucose transport across the brush border. *J Receptor Res* 13: 1093-1113.

- Madara JL, Trier JS 1987 Functional morphology of the mucosa of the small intestine. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by LR Johnson. New York: Raven Press, p. 1209-1249.
- Margot JB, Binkert C, Mary J-L, Landwehr J, Heinrich G, Schwander J 1989 A low molecular weight insulin-like growth factor binding protein from rat: cDNA cloning and tissue distribution of its messenger RNA. *Mol Endocrinol* 3: 1053-1060.
- Marquardt H, Todaro GJ, Handerson LE, Oroszlan S 1981 Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulating activity from rat liver cell cultures. Homology with human insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 256: 6859-6865.
- Massague J, Czech MP 1982 The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem* 257: 5038-5045.
- McNall AD, Etherton TD, Fosmire GJ 1995 The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes. *J Nutr* 125: 874-879.
- Mohan S, Bautista CM, Wergedal J, Baylink DJ 1989 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.
- Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ 1987 Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 329: 301-307.
- Mottola C, MacDonald RG, Brackett JL, Mole JE, Anderson JK, Czech MP 1986 Purification and amino-terminal sequence of an insulin-like growth factor-binding protein secreted by rat liver BRL-3A cells. *J Biol Chem* 261: 11180-11188.
- Munson PJ, Rodbard D 1980 Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239.
- O'Dell BL, Reeves PG 1989 Zinc status and food intake. In: *Zinc in Human Biology*, edited by CF Mills. London: Springer-Verlag, p. 173-181
- Olson TS, Lane MD 1989 A common mechanism for posttranslational activation of plasma membrane receptors? *FASEB J* 3: 1618-1624.

Oner G, Bhaumick B, Bala M 1984 Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats. *Endocrinology* 114: 1860-1863.

Park JHY, Vanderhoof JA, Blackwood D, MacDonald RG 1990 Characterization of type I and type II insulin-like growth factor receptors in an intestinal epithelial cell line. *Endocrinology* 126: 2998-3005.

Park JHY, McCusker RH, Vanderhoof JA, Mohammadpour H, Harty RF, MacDonald 1992 Secretion of insulin-like growth factor II (IGF II) and IGF-binding protein-2 by intestinal epithelial (IEC-6) cells: implications for autocrine growth regulation. *Endocrinology* 131: 1359-1368.

Park JHY, McDermott MJ, Cox GN 1995 Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 attenuates the growth stimulating effect of IGF-I in 80% jejunioleal resected rats. *FASEB J* 9: A554 (abs).

Park JHY, Corkins MR, Vanderhoof JA, Caruso NM, Hrbek MJ, Schaffer S, Slentz DH, McCusker RH, MacDonald RG 1996 Expression of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF binding proteins during Caco-2 cell proliferation and differentiation. *J Cell Physiol*, in Press.

Peterkofsky B, Palka J, Wilson S, Takeda K, Shah V 1991 Elevated activity of low molecular weight insulin-like growth factor-binding proteins in sera of vitamin C-deficient and fasted guinea pigs. *Endocrinology* 128: 1769-1779.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay M-D, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simmon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A 1983 Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47: 323-330.

Quaroni A, May RJ 1980 Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Methods Cell Biol* 21B: 403-427.

Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ 1979 Epithelioid cell cultures from rat small intestine. *J Cell Biol* 80: 248-265.

Rechler MM, Brown AL 1992 Insulin-like growth factor binding protein: gene structure and expression. *Growth Regulation* 2: 55-68.

Rechler MM, Nissley SP 1985 The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 47: 425-442.

Rechler MM, Nissley SP 1990 Insulin-like growth factors. In: Peptide Growth Factors and Their Receptors I, edited by MB Sporn and AB Robert Berlin: Springer-Verlag, p. 263-280.

Ritvos O, Ranta T, Jalakanen J, Suikkari A-M, Voutilainen R, Bohn H, Rutanen E-M 1988 Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultures choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122: 2150-2157.

Rosen OM 1987 After insulin binds. *Science* 237: 1452-1458.

Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Oh Y, Conover C, De Leon DD, Domovan SM, Ocrant I, Giudice L 1990 Insulinlike growth factor binding proteins. *Rec Pro Horm Res* 46: 99-163.

Ross M, Francis GL, Szabo L, Wallace JC, Ballard FJ 1989 Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the biological activities of IGF-I and IGF-II but not des-(1-3)-IGF-1. *Biochem J* 258: 267-272.

Rousset M 1986 The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2 in vitro model for the study of intestinal epithelial differentiation. *Biochimie* 68: 1035-1040.

Rousset T, Trugnan G, Brun J-L, Zweibaum A 1986 Inhibition of the post-transnational processing of microvillar hydrolases is associated with a specific decreased expression of sucrase-isomaltase and increased turn-over of glucose in Caco-2 cells treated with monensin. *FEBS Lett* 208: 34-38.

Roth RA 1988 Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 239: 1269-1271.

Rutanen E-M, Pekonen F, Makinen T 1988 Soluble 34k 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.

Sara VR, Hall K 1990 Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 70: 591-614.

Scharla SH, Strong DD, Mohan S, Mohan S, Baylink DJ, Linkhart TA 1991 1,25-Dihydroxyvitamin D3 differentially regulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein-4 in mouse osteoblasts. *Endocrinology* 129: 3139-3146.

Scatchard G 1949 The attractions of protein for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672.

Shimasaki S, Uchiyama F, Shimonaka M, Ling N 1990 Molecular cloning the cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein from rat and human. *Mol Endocrinol* 4: 1451-1458.

Shimasaki S, Ling N 1991 Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5, and -6). *Prog Growth Factor Res* 3: 243-266.

Straus DS, Takemoto CD 1990a Effect of fasting on insulin-like growth factor-I (IGF-I) and growth hormone receptor mRNA levels and IGF-I gene transcription in rat liver. *Mol Endocrinol* 4: 91-100.

Straus DS, Takemoto CD 1990b Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat. *Endocrinology* 127: 1849-1860.

Straus DS, Takemoto CD 1991 Specific decrease in liver insulin-like growth factor-I and brain insulin-like growth factor-II gene expression in energy-restricted rats. *J Nutr* 121: 1279-1286.

Straus DS, Burke EJ, Marten NW 1993 Induction of insulin-like growth factor binding protein-1 gene expression in liver of protein-restricted rats and in rat hepatoma cells limited for a single amino acid. *Endocrinology* 132:1090-1100.

Szabo L, Mottershead DG, Ballard FJ, Wallace JC 1988 The bovine insulin-like growth factor (IGF) binding protein purified from conditioned medium requires the N-terminal tripeptide in IGF-I for binding. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 207-214.

Takenaka A, Hirokawa M, Mori M, Yamada S, Miura Y, Kato H, Takahashi S-I, Noguchi T 1993 Effect of protein nutrition on the mRNA content of insulin-like growth factor-binding protein-1 in liver and kidney of rats. *Br J Nutr* 69: 73-82.

Tong PY, Tollefsen SE, Kornfeld S 1988 The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 263: 2585-2588.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J 1979 Electrophoretic transfer of proteins from

polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4356.

Traber PG 1990 Regulation of sucrase-isomaltase gene expression along the crypt-villi axis of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 675-773.

Underwood LE, Clemmons DR, Maes M, D'Ercole AJ, Ketelslegers JM 1986 Regulation of somatomedin-C/insulin-like growth factor I by nutrients.. *Hormone Res* 24: 166-176.

Vanderhoof JA, McCusker RH, Clark R, Mohammadpour H, Blackwood DJ, Harty RF, Park JHY 1992 Truncated and native insulinlike growth factor I enhance mucosal adaptation after jejunoileal resection. *Gastroenterology* 102: 1949-1956.

Whitfield HJ, Bruni CB, Frunzio R, Terrel JE, Nissley SP, Rechler MM 1984 Isolation of a cDNA clone encoding rat insulin-like growth factor II precursor. *Nature* 312: 277-280.

Whitt MA, Buonocore L, Rose JK 1987 Liposome-mediated transfection. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by K Janssen. New York: John Wiley & Sons, p. 941-944.

Wood WI, Cachianes G, Henzel WJ, Winslow GA, Spencer SA, Hellmiss R, Martin JL, Baxter RC 1988 Cloning and expression of the growth hormone dependent insulin-like growth factor binding protein. *Mol Endocrinol* 2: 1176-1185.