

김 영 미

국립 보건원, 특수질환부, 심장질환과

성장저해는 만성신부전 (chronic renal failure, CRF) 소아환자나 실험동물에게서 나타나는 합병증의 하나로, 그 발생기전이 잘 알려져 있지 않다. 성장저해를 일으키는 원인으로 비내분비적 요인 (metabolic acidosis, renal osteodystrophy, anemia)과 내분비적 요인의 복합적 결과로 생각하나, 비내분비적 요인들은 약물투여로 그 증세를 완화시켜도 성장저해에 대한 궁극적 치료효과는 나타나지 않는다 (1). 따라서 성장 호르몬 (Growth Hormone, GH)이 관여하는 내분비적 요인의 변화에 그 병리기전이 있을 것으로 연구되어 왔다. GH는 직접적 성장 효과와 Insulin-like growth factor-1(IGF-I)을 간으로부터 유리시켜 나타나는 간접적 성장 효과를 가지고 있다. 그런데 CRF환자의 GH 및 IGF-I 의 혈중 농도는 정상이거나, 혹은 오히려 증가상태에 있음에도 불구하고 성장저해가 일어나는 것으로 보아, 환자의 말단기관 (end-organ)에 원인을 알 수 없는 저항성 (resistance)이 있다고 추정되어진다.

현재 보고된 저항성 기전중의 하나로 생각되어지는 scheme은, CRF 환자 혈장내에 존재하여 성장인자들과 결합하는 단백질인 GH Binding Protein (GHBP)과 IGFBP의 농도가 증가됨으로써, free GH 및 IGF-I의 농도가 감소되어 성장인자의 활성도가 감소한다는 것이다 (2, 3). 또한 간에서 합성되어 GH의 활성을 매개하는 GH 수용체의 발현이 CRF환자에서 감소됨도 보고되어 있다 (4). 따라서 GHBP, IGFBP 및 GH수용체의 농도변화가 성장의 중요한 determinant로 알려진 GH/IGF-I axis의 shift를 초래하여 성장저해가 발생한다고 설명되어지고 있다. 그러나 Martin 등에 따르면 IGFBP에 대한 binding affinity를 감소시킨 IGF-I의 short analog인 des-IGF-I도 IGF-I과 같이 CRF환자의 성장을 개선하였으므로 (5), IGFBP와는 무관한 IGF-I 신호전달체계에서의 end-organ resistance 존재 가설이 설정되었다.

본 연구에서는 Growth factor에 대한 end-organ resistance 기전을 밝히기 위해 in vivo 와 in vitro의 두가지 다른방법으로 연구하였다.

#### A) In vivo approach

CRF환자의 혈중 GH 및 IGF-I 의 농도가 정상수치 이하로 저하되어 있지 않음에도 불구하고, CRF 성장저해환자의 최근 치료법으로 생리적 농도를 초과하는 양의 GH를 투여하거나, 또는 IGF-I과 GH의 병용 투여등이 제시되고, 또한 시행되고 있다 (6). 그러므로 GH 와 IGF-I의 장기 투여로인한 내분비대사 이상의 발생 가능성을 배제할 수 없으며, Free GH 농도의 만성적 증가는 glomerulosclerosis와 같은 신장 구조 및 기능에 장애를 일으킬 수 있음이 보고되어 있다. 또한 GH투여가 glucose tolerance 는 변화시키지 않으나, 혈중 insulin의 농도를 증가로 euglycemia상태를 유지하여, 장기투여로 인한 당대사 이상이 발생할 수 있음이 경고되어 왔다. 하지만 3년간 GH의 투여시, 혈액학적 변화이의 특별한 부작용이 없다고하여 현재 널리 시행되고 있다.

##### a) GH 투여효과

본 연구에서는 GH의 투여로 인한 혈액상의 변화를 조사함으로써, 성장저해가 나타나는 end-organ resistance의 기전을 규명하고자 했다. 신장의 5/6을 절제한 실험용 흰쥐군과 신장절제후 GH를 투여한 군의 성장 및 혈중 IGF-I, IGFBP4 양을 측정하고, 간에서의 GH 수용체 및 IGF-I의 mRNA 발현을 RT-PCR의 방법으로 측정하여 대조군과 비교하였다.

(표 1)에서 보여지는 것처럼, CRF군은 GH투여로 체중과 신장의 증가를 보여 대조군과 차이가

없는 성장을 나타냈다. 반면 IGF-I의 혈중 농도는 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. IGFBP4의 혈중 농도는 CRF에서 대조군에 비해 약 80% 증가하였으며 ( $p < 0.01$ ), GH의 투여로 대조군 수준으로 감소하였다. 반면에 liver에서 발현되는 GH 수용체 (GHR)의 양은 CRF에서 약 30% 감소하였으나 ( $p < 0.01$ ), GH투여로 오히려 20% 더 감소하였다. 그러므로 GHR의 발현은 성장회복반응과는 무관함을 보여 주었고, IGFBP4의 발현이 성장저해에 관련이 있을 것으로 추정되어, IGFBP4의 작용에 대해 더 연구하게 되었다.

IGFBP4는 현재까지 밝혀진 6가지 IGFBP중의 하나로 분자량이 24kDa인 glycosylated protein인데, IGF-I 또는 IGF-II와 결합한다는 성질 이외의 다른 특성은 거의 알려져 있지 않다. 그러나 IGFBP들은 BP로서의 기능 이외에, 자신이 biological effect를 나타낼 수 있음이 최근 보고되고 있는데, 특히 IGFBP4는 chicken bone growth를 억제했다는 보고가 있으므로, 성장저해인자로서의 가능성이 있다 (7).

<표 1>

Group	Growth		Serum chemistry			Liver mRNA	
	Weight Gain (g)	Length Gain (g)	Creatinine (mg/dl)	IGF-I (ng/ml)	IGFBP4 ( $\times$ Control)	IGF-I mRNA ( $\times$ Control)	GHR mRNA ( $\times$ Control)
CRF	32.2 $\pm$ 7.1*	4.3 $\pm$ 0.4*	0.6 $\pm$ 0.07*	408.8 $\pm$ 99.4	180 $\pm$ 12*	67 $\pm$ 25	71 $\pm$ 18*
CRF-GH	53.7 $\pm$ 10.9	6.7 $\pm$ 1.0	0.6 $\pm$ 0.05*	466.8 $\pm$ 89.1	101 $\pm$ 9	121 $\pm$ 39	52 $\pm$ 25*
Control	57.5 $\pm$ 4.3	6.3 $\pm$ 0.7	0.4 $\pm$ 0.04	470.7 $\pm$ 79.9	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 27	100 $\pm$ 30

(\*:  $p < 0.01$ )

#### b) Insulin 투여효과

GH의 투여로 혈중 Insulin의 농도가 증가함이 보고되었는데, IGF의 성장효과가 insulin과 상관관계를 가지는지를 살피기 위하여, GH 대신 insulin을 투여하여 성장에 미치는 효과 및 serum chemistry, liver mRNA의 발현을 측정하였다.

놀랍게도 Insulin의 투여로 GH 투여시와 마찬가지로의 성장효과를 CRF군에서 보였는데, 혈중 IGF-I의 농도는 수치의 범위가 넓어, 역시 통계적 유의성이 없었다. 또한 liver에서의 IGF-I의 mRNA 발현도 각 군간의 차이가 없었다. GH수용체의 발현은 insulin에 의해 증가하는 경향을 보였다. 따라서 insulin투여에 의한 성장회복효과는 GHR의 발현이 증가되어 liver의 GH에 대한 반응성이 증가되었기 때문일 수도 있다. 그러나 앞서 GH 투여실험에서 GHR의 end-organ resistance 기전상의 중요성은 배제되었으므로, 혈중 IGFBP4를 측정하였다 그 결과 혈중 IGFBP4의 농도는 Insulin 투여로 인해 오히려 100% 정도 더 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 만일 IGFBP4가 growth inhibitory effect를 가지고 있다면, 이것은 insulin투여군에서의 성장 결과와 상충된다. 그러므로 IGFBP4에 의한 성장저해효과로 CRF에서 growth retardation이 발생했다고는 결론지을 수 없으며, GH나 insulin이 알려지지 않은 기전으로 IGFBP4의 발현을 조절하나, 이것은 CRF의 growth retardation과는 무관하리라고 사료된다.

<표 2>

Group	Growth		Serum chemistry			Liver mRNA	
	Weight Gain (g)	Length Gain (g)	Creatinine (mg/dl)	IGF-I (ng/ml)	IGFBP4 (%Control)	IGF-I mRNA (%Control)	GHR mRNA (%Control)
CRF	27.6±4.6*	4.2±0.3*	0.6±0.07*	706.8±109.9	179±12*	160±40	86±4.5*
CRF-Ins	66.2±2.3	6.3±0.5	0.7±0.06*	882.1±143.7	245±18*	192±76	92±20
Control	57.9±10.3	6.3±0.7	0.4±0.05	581.2±112.2	100±5	100±27	100±15
Cont.-Ins	83.1±6.0	7.1±0.4	0.4±0.04	906.4±278.9	162±14*	180±42	123±19

c) methylprednisolon 투여효과

renal disease 환자에 널리 쓰이고 있는 methylprednisolon은 기전은 알 수없으나 부작용으로 growth retardation 이 나타나고, GH투여에 의해 이 부작용은 회복될 수 있다고 보고되어 있다. 앞서의 두 실험과 유사한 실험을 한 결과, 실험동물에서도 methylprednisolon에 의한 성장저해효과가 관찰되었으며, CRF군에 투여한 methylprednisolon은 성장저해(linear growth 및 weight growth)가 더 심화되었다 (p<0.01). 따라서 methylprednisolon은 CRF의 성장저해반응에 상승적으로 작용하며, 그 작용점이 CRF 와 동일한 반응체계상에 있을 것으로 추정된다.

B) In vitro approach

신장을 절제한 실험용 rat으로부터 chondrocyte를 분리, 1차 배양한 후, growth factor 에 대한 반응성을 측정하여, end-organ resistance 가설을 증명하였다.

○ 실험동물: 실험용 흰쥐 (약 100g)를 pentobarbital 로 마취한 후 오른쪽 신장과 왼쪽신장 2/3를 절제하고 (5/6 nephrectomy, CRF), 2주간 유지하였다. 대조 실험군으로 sham-operated rat 을 사용하였는데, 대조군은 CRF군과 동일한 양의 사료를 공급하였다. 실험동물의 성장도(무게 및 신장)를 측정하고, sacrifice 전에 혈액을 채취하여, 혈중 creatinine 농도와 blood urea nitrogen (BUN) 농도를 측정하였다.

○ 연골세포 배양: 실험용 흰쥐로부터 무릎 연골세포 (epiphyseal chondrocytes)를 분리한 후, collagenase로 처리하여 1차 배양하고, 각종 growth factor에 대한 반응성을 측정하였다. 성장 반응은 정확도를 위하여 hemocytometer를 사용한 세포수 측정, DNA 합성을 측정하는 <sup>3</sup>H-Thymidine Incorporation assay, 그리고 살아있는 세포만이 mitochondria가 tetrazolium을 변화시키는 성질을 이용한 methylthiazol tetrazolium (MTT) assay등 세가지 다른 방법으로 측정하였다.

○ 배양세포 확인: collagen type I 항체를 이용한 immunohistochemistry, FACS analysis, alkaline phosphatase activity 등의 방법으로 1차 연골 배양세포를 확인하였다.

○ Western Ligand blot: 배양액을 10배 농축한 후, 100μl를 12% SDS-PAGE로 분리하고, Nitrocellulose paper에 transfer한 다음, 그 paper를 <sup>125</sup>I-IGF-I 으로 incubate 하고 autoradiography한다.

○ Western Blot: 배양세포막상에 존재하는 IGF type I receptor를 정량하기위해, 세포막을 분리하고, wheat germ agarose resin을 통과시켜, 세포막 단백질을 부분정제하고, SDS-PAGE 로 분리후, IGF type I receptor 의 β-chain 항체로 Western blot 하였다.

○ Tyrosine Kinase assay: 부분 정제한 세포막 단백질의 tyrosin kinase activity를 synthetic substrate인 poly-Glu-Tyr을 사용하여 측정하였다.

(1) 실험동물의 성장 및 혈액 검사치

CRF군의 몸무게와 키의 성장이 대조군의 약 56%로 감소 하였으며 ( $p < 0.01$ ), 혈중 creatinine 과 BUN값은 약 2배가량 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 각각의 수치는 표3에 요약된다.

<표3>

Group	weight Gain (gm)	Length Gain (cm)	Serum creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Food Intake (g)	Caloric Intake (Kcal)
CRF	32.2±7.1*	4.3±0.4*	0.7±0.1*	35.8±4.4*	141±6	563±24
Sham	57.5±4.3	6.3±0.7	0.4±0.1	12.5±1.3	141±6	563±24

( $p < 0.01$ )

(2) 배양세포의 확인

각 군의 실험동물들로부터 얻은 chondrocyte가 collagen II 와 proteoglycan을 합성하는 것을 immunohistochemical staining을 통해 확인하였다. CRF 군에서 얻은 세포가 FCS 존재하에서 대조군에 비해 성장속도가 1/2 정도 되는 것을 확인하고, 세포의 chondrocyte population 이 각 군에서 동일한 지 확인하기위해, FACS analysis 및 alkaline phosphatase assay를 시행하였다. 그 결과, 두 군 모두 동일한 size의 세포들로 구성되어 있으며, alkaline phosphatase활성에 차이가 관찰되지 않았다 (8).

(3) Growth factors 에 대한 proliferation response

a) GH, IGF-I에 대한 효과

CRF chondrocyte는 GH와 IGF-I을 각각 가했을 때, 모든 농도(1 to 100 ng/ml) 에서 대조군에 비해 성장반응이 50% 이상 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 이것은 CRF chondrocyte가 생체로부터 분리된 후에도 성장인자에 대한 반응성저하가 그대로 유지됨을 보여주며, CRF환경이 chondrocyte자체에 변화를 주었음을 알 수있다. IGF-I에 의한 반응성저하가 IGFBP에 의한 것인지, 혹은 IGF 신호전달체계 이상에 기인한것인지를 살피기위해, 두가지 다른 IGF analogues (des-IGF-I 과 Long R3)를 사용하여 성장반응을 보았다. 이들은 IGF 수용체와는 결합하여 signal trasduction pathway를 활성화시키나, IGFBP와는 결합 하지않으므로, CRF 세포의 성장인자에 대한 저항성이 세포외액중의 IGFBP때문인지 아니면 수용체와의 결합이나, 결합후 발생하는 signal transduction pathway상의 변이에 의한 것인지 알 수 있다. 실험결과, CRF 세포가 des-IGF-I 과 Long R3의 자극(1 to 100 ng/ml)에 대해, IGF-I 과 마찬가지로, 대조군에 비해 성장반응이 50% 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). 따라서 CRF의 세포내적 변화로 end-organ resistance가 생김을 알 수 있었고, 변화된 지점은 IGF의 signal transduction pathway 임을 알 수 있었다.

b) Insulin 에 대한 효과

Insulin으로 성장반응을 측정하였을 때, 100 ng/ml 이하의 농도에서는 CRF 와 대조군 세포간의 성장반응 차이가 관찰되지 않았으나, 100 ng/ml 이상의 고농도에서 CRF세포의 성장이 대조군에 비해 약 50% 감소했다. 100 ng/ml 이상의 insulin 농도는 supraphysiological concentration으로 insulin이 고농도로 존재시 insulin receptor뿐만아니라 IGF type I receptor와도 결합하기

때문에, CRF chondrocyte 의 IGF type I receptor pathway에 이상이 있음을 간접적으로 시사해 주는 결과이다. 또한 insulin은 IGFBP와는 결합하지 않으므로 end-organ resistance가 IGFBP와는 무관하다는 또하나의 증거가 될 수 있다.

c) TGF- $\beta$ 1 와 FGF 에 대한 효과

CRF chondrocyte의 저항성이 GH/IGF system에만 specific한 것을 밝히기 위해, 그 성장기전이 전혀 다른 TGF- $\beta$ 1 및 FGF에 대한 성장 반응을 보았다. CRF 와 대조군의 세포간에 성장 반응이 동일하였으며, 이것으로 CRF의 성장 저항성이 GH/IGF system 에 specific 함을 알 수있었다.

(4) 세포배양액중의 IGFBP의 측정

정상세포와 CRF세포가 분비한 local IGFBP의 양을 측정하기위해 배양액으로 Western ligand blot을 시행하였을 때, CRF세포가 분비한 IGFBP의 양이 모든 성장인자들 존재하에, 대조군에 비해 감소하였다. 따라서 성장저항성에, IGFBP의 local effect도 없는 것으로 사료된다.

(5) IGF type I receptor

Chondrocyte 의 세포막에 존재하는 IGF 수용체 의 IGF-I에 대한 친화력 (binding affinity)를 affinity cross-linking 으로 측정한 결과 CRF와 대조군 간에 차이가 없었다. 그러나 Western immunoblot을 통해 세포막 상의 IGF type I receptor 의 단백질발현을 측정하니, CRF에서 약 40% 정도 감소되어 있음을 알 수 있었다. 또한 membrane protein의 kinase activity를 측정하니, CRF membrane protein의 tyrosine phosphorylation 활성이 저하되어 있었다.

결론

CRF환자의 성장저해는 아직 밝혀지지 않은 CRF환자의 혈중 인자에 의해 유도된 말단기관의 변이로 인해 발생하며, 그 변이는 혈액중의 GH/IGF axis의 shift 이외에 세포내 IGF type I receptor 의 신호 전달 체계상의 이상으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Scharer K., and Mehls, O., *Pediatric Nephrol* 5: 438, 1991
- 2) Tonshoff, B., et al., *Kid. Int.* 45: 1085-1092, 1994
- 3) Blum W. F. et. al., *Pediatr. Nephrol.* 5: 539-544, 1991
- 4) Powell, D. R., et. al., *Pediatr. Res.* 33:136-143, 1993
- 5) Martin, A. A., et. al., *Am. J. Physiol.* 261: F626-633, 1991
- 6) Tonshoff, B. et. al., *Pediatr. Nephrol.* 5: 454-460, 1991
- 7) Rechler, M. M. and Nissley, S. P., *Insulin-like growth factors, in Peptide growth factors and their receptors I*, sporn, M. B., and Roberts, A. B. eds., pp263-367, Springer-Verlag, NY, 1991
- 8) Mak, R. H. K. and Pak, Y. K. End-organ resistance to growth hormone and IGF-I in epiphyseal chondrocyte of rats with chronic renal failure, *Kid. Int.* in press, 1996