Cancer Research and Treatment 2001;33(3):256-263

Study on the Expression of Insulin-like Growth Factor II (IGF-II) in Hepatocellular Carcinoma Cells and Developing Rat Embryos

Byung Kun Lee[1], Seung-Geun Shin[1], Jin Hye Seo[1], Myung-Ho Bae[2], You Mie Lee[2], Seun-Ja Park[1], Byung Chae Park[1], Kyu-Won Kim[3] and Ja-Young Koo[1]

[1]Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kosin University, Busan; [2]Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan; [3]College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Korea

Purpose: **The insulin-like growth factor II (IGF-II) gene expresses a family of transcripts in embryonic/fetal tissue, and also highly was expressed during hepatocellular carcinogenesis. In this study, we showed that IGF-II mRNA and protein levels are detected in rat embryo, HepG2 human hepatoma cells and Chang liver cells.**

Materials and Methods: **This study included sections of rat embryos 7 17 days post coitum (d.p.c), HepG2 cells and Chang liver cells. Using immunohistochemistry, Northern blotting and Western blotting, we observed the expression of IGF-II in the rat embryo, HepG2 cells and Chang liver cells.**

Results: **We localized IGF-II gene products in sections of rat embryo 7 17 d.p.c by performing immunohistochemistry. The IGF-II was mainly expressed in the proximal endoderm and ectoplacental cone between 7 and 9 d.p.c. At 10 d.p.c. the expression was localized at the heart primodium as well as the proximal endoderm, and at 11 d.p.c. the IGF-II was expressed in the liver and heart. After 12 d.p.c. and 14 d.p.c., the expression was also detected in the brain, muscle and bone, and head mesenchyme, respectively. While the expression of IGF-II protein was not detected in the normal adult liver, intense staining was detected in the heart, liver and choroids plexus at 17 d.p.c.**

Conclusion: **These results suggest that IGF-II may act as an oncofetal protein during hepatocellular carcinogenesis and embryogenesis.** ***(Cancer Research and Treatment 2001;33:256-263)***

Key Words: **IGF-II, Hepatocellular carcinogenesis, Embryogenesis, HepG2**

서 론

Insulin-like growth factor II (IGF-II)는 proinsulin과 구조적인 상동성을 가지며 여러 세포에서 증식과 분화를 조절하는 인자로 알려져 있다(1). IGF-II는 insulin과는 달리 인체 대부분의 조직에서 생산되고 있으며, 상당히 높은 혈중농도를 유지하고 있다. 이러한 IGF-II의 활성은 자가분비/주위분비 또는 내분비의 기전으로 조절되고 있다. 정확한 발생과정에서의 역할은 알 수 없지만 IGF-II가 태생기의 somatomedin이란 사실은 쥐를 이용한 실험을 통해 밝혀진 바 있고(2), 여러 세포주 실험을 통해 IGF-II가 DNA합성 및 세포증식을 유도하는 인자임이 알려져 있다(3-8). 뿐만 아니라 IGF-II는 발생과정중에 mesodermal origin 세포의 분화를 유도하고(4,5), 암화과정에서는 혈관신생인자로도 작용함이 알려져 있다(9,10). 특히, 종양의 성장은 혈관신생과정과 밀접한 관계가 있으며, 이 혈관신생과정은 많은 혈관신생인자 및 억제인자의 균형에 의해 조절된다. 이러한 인자들로는 vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transfoming growth factor β1 (TGF β1) 등 여러 가지 성장인자들이 알려져 있다(11 15). 이 중, 최근 혈관신생인자로 보고된 IGF-II는 간암에서 그 발현이 증가하는 단백질로 알려져 있다(16). 간암은 한국인의 사망률에 있어서 높은 비율을 차지하고 있지만 진행된 경우에는 아직까지 적절한 치료방법이 거의 없으며, 유전자 수준에서 국내외적으로 많은 연구가 이루어져 있지 않은 암종이다. 특히, 간암은 조직주위로 과도한 혈관신생을 보이고 있으며, 이러한 간암의 혈관신생과정을 유도하는 혈관신생인자로서 IGF-II가 작

책임저자 : 구자영, 부산시 서구 암남동 34
㉾ 602-030, 고신대학교 의과대학 내과
Tel: 051-240-6203, Fax: 051-248-5686
E-mail: jykoo@ns.kosinmed.or.kr
접수일 : 2000년 11월 29일, 게재승인일 : 2001년 6월 21일

용할 뿐만 아니라 정상간에 비해 간암조직에서 그 발현이 현저히 증가한다는 보고가 있다(16). 따라서 간암발생과정에서 증가하는 IGF-II의 발현은 간암의 악성화 및 전이에 있어서 필수적인 조건으로 생각된다. 혈관신생은 암화과정 뿐만 아니라 초기발생과정, 상처치유 등 정상적인 상태에서도 중요한 역할을 담당하고 있다. 이 중 초기발생과정에서 혈관생성이 일어나는 과정은 두 가지 다른 경로에 의해 일어난다고 알려져 있다. 하나는 혈관형성(vasculogenesis)으로서 혈관전구세포인 angioblast의 분열과 분화에 의해 혈관과 혈구세포들이 만들어지는 *de novo* 혈관생성과정이다(17). 이 과정은 초기발생과정에서만 일어나며 초기 혈관망을 구성하는 역할을 하고 성인에서는 일어나지 않는다. 또다른 경로는 혈관신생으로서 혈관생성자극에 의해 기존의 혈관으로부터 발아가 일어나서 새로운 혈관이 생성되는 과정이다. 이 혈관신생은 발생과정에서 기관이 형성되고 조직이 성장하는 동안 매우 활발하게 일어나며 출생후, 성인에 이르기까지 이 기전이 혈관생성을 담당한다.

이와 같이 암화과정과 초기발생과정에서 모두 혈관신생과정은 존재하며, 매우 중요한 단계임을 알 수 있다. 이러한 발생단계와 암화과정의 유사성은 세포의 지속적인 분열과 활발한 이동 등에 의해 특징적으로 나타나며, 이와 관련된 유전자들도 공통적으로 발현이 될 것으로 예상이 된다. 이와 관련해 많은 단백질들이 발생 및 발암과정에서 작용하여 태생기 발생과 발암과정에 모두 관여하는 oncofetal 단백질로 보고되고 있다(18 20). 이미 본 연구에서 사용된 IGF-II의 mRNA가 초기 발생단계 및 조직에 따라 달리 조절된다는 사실은 알려져 있다(21). 따라서 암화과정 뿐만 아니라 초기발생과정에서도 IGF-II가 혈관신생과정의 중요한 인자로 사용될 가능성이 있으며 이러한 IGF-II의 생물학적 활성조절기작은 암화과정과 발생과정을 동시에 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

IGF-II의 생물학적 활성의 조절은 type-I, II receptor 및 insulin receptor와의 상호작용, 혹은 6종의 IGF binding protein을 통해서도 조절된다(1). 이 중 인간의 IGF-II는 태생기 발생과정에서 발견되는 IGF의 주된 형태이며 서로 다른 4개의 촉진자(P1-P4)에 의해서 유전자 발현이 조절되는 것으로 보고되어 있다(21). 따라서 인간의 IGF-II 유전자는 다양한 생리적 조건에서 이들 촉진자에 의해 조절받게 된다. 즉, 4개의 촉진자는 발생과정과 조직에 따라 활성이 조절되어 다른 크기의 IGF-II mRNA를 생성할 수 있다(Fig. 1). 이전의 보고에서 P2, P3, P4 촉진자는 많은 태생기 조직과 비간장성 조직에서 쓰이며, 성인의 간에서는 P1 촉진자만이 활성화 될 뿐 나머지 촉진자들은 완전히

Fig. 1. The location of promoters within IGF-II gene (P: promoter, E: exon).

자는 태생기 조직 및 몇몇 악성종양에서 공히 상당한 활성을 보이고 있다(21,22). P3 촉진자에 의해 생성되는 IGF-II mRNA의 크기는 약 6.0 kb이고 이것이 간암생성과정과 초기발생단계에서 공통적으로 활성이 된다. 따라서 이미 태생기 발생과 발암과정에 모두 관여하는 많은 oncofetal 단백질들이 보고되고 있는 상태이므로, IGF-II의 발현 또한 발생 및 발암과정에서 상당히 높은 정도를 보일 것이며, 이러한 IGF-II는 발생 및 발암과정 모두에서 중요한 oncofetal 단백질로서의 역할을 수행할 것임을 추측할 수 있다.

본 연구에서는 HepG2 인간 간암세포주로부터 IGF-II mRNA의 발현정도를 Northern을 통해서 알아보았고, HepG2의 conditioned media내에서 IGF-II 단백질의 함유정도를 Western blotting을 통해 살펴보았다. 뿐만 아니라 쥐의 각 발생조직 및 발생단계상에서 IGF-II의 발현을 면역조직화학적 방법으로 살펴보았다.

재료 및 방법

1) HepG2 및 Chang liver 세포의 배양

American Type Culture Collection에서 구입한 HepG2 cell (HB-8065)을 Gibco BRL에서 구입한 fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Minimal Essential Medium (MEM)에 배양하였다. 분말상태의 배지를 2차 증류수 1 L로 녹인 후 sodium bicarbonate 2.2 g을 첨가하여 HCl로 pH 7.2를 맞추었다. 0.22 μm Millipore filter로 이를 여과한 다음, 사용직전에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin (P-S)를 첨가하였다. Chang liver cell (CCL-13) 역시 American Type Culture Collection에서 구입하여 Gibco BRL에서 구입한 FBS를 첨가한 Dulbeco's modified eagle's medium (DMEM)에 배양하였다. 분말상태의 배지를 2차 증류수 1 L로 녹인 후 sodium bicarbonate 3.7 g을 첨가하여 HCl로 pH 7.2를 맞추고 0.22 μm Millipore filter로 이를 여과한 다음, 사용직전에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin (P-S)를 첨가하였다.

2) Northern blot analysis(23)

(Molecular Research Center, Inc.) 5×10^6 세포당 1 ml을 처리하여 세포를 분쇄한 다음, 1.5 ml 원심분리용 튜브에 옮겼다. 여기에 0.2 ml의 chloroform을 첨가한 후 잘 흔들고 이것을 상온에서 10분간 보관하였다. 두 개의 층으로 나뉘어진 시료를 4°C, 15분간 12,000 g에서 원심분리하였다. 수층을 조심스럽게 새 튜브에 옮기고, 여기에 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하고 잘 섞은 다음 상온에서 10분동안 반응시킨 후 12,000 g에서 4°C, 15분간 원심분리하였다. RNA pellet에 75% 에탄올 1 ml을 첨가한 후 7,500 g에서 5분 동안 4°C를 유지하면서 원심분리하였다. 에탄올을 조심스럽게 버리고 pellet을 완전히 말린 다음 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수로 녹여서 −70°C에 보관하였다. 분리한 RNA 20 μg을 1% formaldehyde agarose gel에서 전기영동한 다음, Gel을 조심스럽게 옮겨 50 mM NaOH, 1X SSC 용액에 30분간 반응시키고, Zeta probe membrane에 transfer시켰다. RNA가 붙은 면에 조심하여 18 S와 28 S rRNA의 위치를 표시한 후 UV crosslinker로 crosslinking을 실시하였다. 탐침자로 사용할 DNA fragment를 5분 동안 끓인 다음 반응액(Rediprime kit, Amersham)을 상온에서 첨가하여 잘 섞은 다음 ^{32}P를 3 μl 첨가하고, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 random primer labelling mixture를 5분간 끓였다. 이렇게 하여 만들어진 isotope이 붙은 cDNA 탐침자를 hybridization에 사용하였다. RNA가 붙어 있는 Zeta probe membrane에 prehybridization 용액을 처리하여, 42°C에서 4 24시간 반응시킨 다음, 용액을 새롭게 갈아준 뒤 열 변성시킨 탐침자를 첨가하여 42°C에서 16 24시간 반응시켰다. 반응이 끝난 filter는 상온에서 2X SSC, 0.1% SDS 용액에 4번 세척한 후 X-ray 필름에 감광시켜 IGF-II 유전자의 발현을 조사하였다.

3) HepG2 및 Chang liver 세포의 conditioned medium 준비

HepG2 및 Chang liver 세포를 70 80% confluent한 상태로 배양한 다음 10% FBS가 첨가된 배지로 세 번 세척하였고, 세척한 세포에 serum-free 배지를 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 세포의 배양이 끝나면 배지를 수거한 다음 5,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 바닥의 세포를 제거한다. 세포가 제거된 배지를 13,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 세포의 불순물을 제거한다. 이렇게 준비된 conditioned media를 Millipore에서 구입한 한외여과장치(Ultrafree-15)에 부은 뒤, 원심분리기에 넣어 2,000 g에서 회전시키면 농축이 완료된다. 농축된 conditioned media로 Western blot analysis를 수행한다.

4) Western blot analysis

농축된 conditioned media 50 μg을 gel loading buffer 20 μl에 녹여 3분간 boiling한 뒤 SDS-PAGE를 행하였다. Gel로부터 NC filter로의 transfer는 transfer kit를 사용하고 transfer가 끝난 filter는 3% BSA가 들어 있는 PBS buffer로 하루동안 blocking시킨 뒤 충분한 washing하였다. 항원항체 반응은 filter에 anti-rat IGF-II primary antibody (Upstate Biotechnology Inc., New York, NY)를 적당량(대략 1 : 1,000 정도) 첨가하여 상온에서 1 2시간 정도 반응을 진행시켰다. 이어 반응이 끝나면 washing을 한 후 anti-mouse secondary antibody를 처리하여 상온에서 1 2시간 동안 반응시켰다. PBS-T (PBS/0.1% Tween 20)으로 washing을 한 filter는 Amersham에 구입한 ECL Western blotting detection reagent로 반응을 끝낸 뒤 X-ray film에 감광하여 signal을 조사하였다.

5) Immunoprecipitation (IP)

HepG2 conditioned media에 단클론 anti-rat IGF-II antibody (Upstate Biotechnology Inc., New York, NY)와 12시간 반응시킨 후 protein A-agarose (Sigma chemical Co., St Louis, MO)로 immunoprecipitate를 얻었다. 이렇게 얻은 immunoprecipitate로부터 Western blotting를 수행하였다.

6) 동물관리 및 교배

특정병원체 부재(SPF)의 Sprague Dawley (SD) 쥐를 사용하여 암컷과 수컷을 1 : 1로 교배시켰다. 다음날 질전(vaginal plug)이 있거나 질도말법으로 정자가 확인된 암컷을 임신동물로 하고 교배 확인일을 임신 0일로 간주하였다. 동물은 실험동물용 고형사료 및 수돗물을 자유롭게 섭취시켰으며, 23±2°C의 사육온도와 55±5%의 상대습도를 유지하였고 명암은 1일 12시간씩 교대하였다.

7) Embryo 및 fetus의 분리

임신 7 19일째 되는날 임신 암컷을 경추탈구(cervical dislocation)시켜 복부를 절개하여 임신자궁으로부터 embryo와 fetus를 분리하여 중성 포르말린(pH 7.4)에 고정시켰다.

8) IGF-II 면역조직화학 검사

면역조직화학 검사를 위하여 포르말린에 고정되고 파라핀에 포매된 조직을 4 μm 두께로 절편한 후 60°C 오븐에서 한시간 동안 가열하고 탈파라핀화 과정을 거쳐 함수시켰다. 내재성 페록시다제의 활성을 없애기 위해 0.3%

였다. 이후 blocking antibody를 30분간 작용시킨 후 anti-rat IGF-II antibody (Upstate Biotechnology Inc., New York, NY)를 30분간 처리하여 세척하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)을 chromogen으로 사용하여 10분간 처리하였고, 증류수로 세척한 후에 Mayer hematoxylin으로 대조염색을 하고 세척하였다. 수성매체로 봉입하고 건조시켰다.

결 과

1) Northern blotting상 확인한 HepG2 cell에서 IGF-II의 발현

인간 간암세포주인 HepG2 세포로부터 RNA를 분리하여 IGF-II mRNA의 발현정도를 살펴보았다(Fig. 2). IGF-II P3 촉진자의 조절을 받는 것으로 알려진 약 6.0 kb의 IGF-II mRNA를 확인할 수 있었다. 반대로 정상간세포인 Chang liver cell에서는 전혀 IGF-II mRNA의 발현을 볼 수 없었다.

2) Western blotting상 확인한 HepG2 conditioned media에서 IGF-II의 발현

인간 간암세포주인 HepG2 conditioned media 내에 간암의 대표적인 혈관신생촉진인자로 알려져 있는 IGF-II가 다량 존재할 것이라는 판단하에 HepG2 conditioned media내의 IGF-II 단백질량을 Western blot analysis를 통하여 조사하였다. 그 결과 HepG2 conditioned media 내에는 상당한 양의 IGF-II가 검출된 반면, Chang liver cell conditioned media에는 IGF-II가 거의 검출되지 않았다. HepG2 condi-

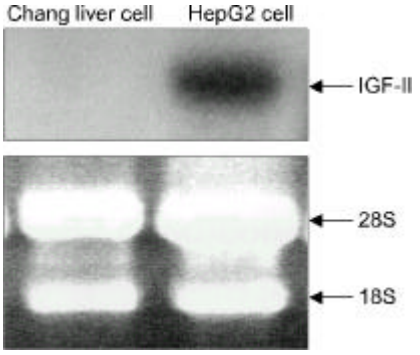

Fig. 2. Expression of IGF-II mRNA in the HepG2 human hepatocellular carcinoma cell lines. RNAs were isolated and Northern blot analysis was performed as described under Materials and Methods. 18S and 28S rRNA were dipicted at the bottom of the figure.

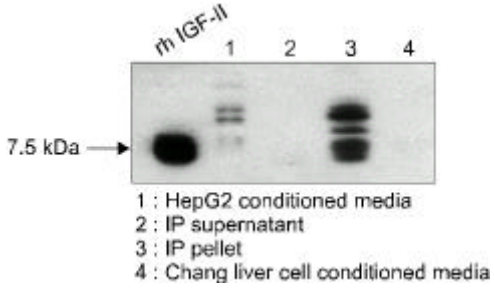

Fig. 3. Identification of IGF-II protein in the conditioned media of HepG2 and Chang liver cell cultures by Western blot analysis. IP pellet and supernatant indicated the immunoprecipitated conditoned media of HepG2 cell cultures by anti-IGF-II monoclonal antibody. Recombinant human IGF-II (rh IGF-II, 7.5 kDa) was used as a positive control and is indicated by arrow.

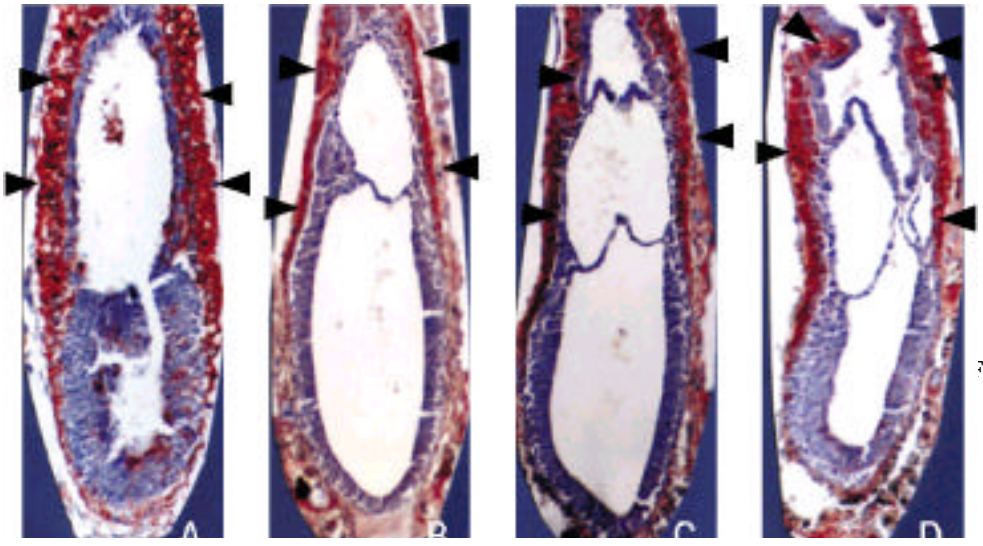

Fig. 4. Immunohistochemical staining of rat embryo using anti-IGF-II monoclonal antibody. A: rat embryonic day 7, B: rat embryonic day 8, C: rat embryonic day 9, D: rat

tioned media에서 검출된 IGF-II는 7.5 kDa의 크기로 positive control로 쓰인 recombinant IGF-II의 크기와 일치하였다. 뿐만 아니라 hypoglycemia와 같은 병적상태에서 발현증가를 보이는 10 kDa 이상의 IGF-II의 거대형태도 발견할 수 있었다. 또한 단클론 항IGF-II 항체를 이용한 IP 방법에 의해 IGF-II를 제거시킨 conditioned media 내에는 IGF-II가 검출되지 않았고, IP에 의한 pellet에는 다량의 정상 IGF-II와 거대형태의 IGF-II가 검출되어 HepG2로부터 상당한 양의 IGF-II가 분비되고 있음을 확인하였다(Fig. 3).

3) Rat 발생조직에서 IGF-II의 발현

발생단계별로 IGF-II의 발현을 보기 위해 7, 8, 9, 10일된 쥐의 egg cylinder 시기에 IGF-II의 발현을 살펴보았다(Fig. 4). 그 결과 화살표에 표시된 바와 같이 내배엽 및 원시태반에서 균일하게 IGF-II가 발현되고 있음을 확인하였다. Egg cylinder 시기인 7일에는 IGF-II의 발현이 주로 proximal endoderm과 ectoplacental cone에 나타났으나 mesoderm이나 embryonic ectoderm에는 발현되지 않았다(Fig. 4). Post amniotic fold가 생성되고 ectoplacental cavity가 생성되는 8일에는 proximal endoderm에만 발현이 강하게 나타났으나 ectodermal cone에서의 발현은 미약하게 나타났다(Fig. 4). Neural plate가 두터워지고 chorion이 형성되는 9일에도 8일과 유사한 발현양상을 나타내었다(Fig. 4). 10일에는 심장과 체절 그리고 foregut에 나타나게 되고 그 이외의 부위는 이전 시기와 유사한 양상을 나타내었다(Table 1). 11일 이후에는 somite와 심장부위에만 국한되는 양상을 보이다가 12일 이후에는 뇌와 head mesenchyme, somite 유래의 근육의 원기, 뼈의 원기, 간 등에도 나타나기 시작하여 모든 내, 외, 중배엽 유래의 조직에서 균일하게 나타났다.

발생조직별로 IGF-II의 발현을 보기 위하여 쥐의 배자를 이용한 면역조직화학적 방법을 사용하였다. 17일된 쥐의 배자를 sagital section한 뒤, 항IGF-II 항체로 염색하였다. 그 결과 Fig. 5의 화살표(▶)와 같이 심장과 간의 조직에서 강하게 IGF-II가 발현이 되었다. 그러나 Fig. 5와 같이 정상 간조직에서는 IGF-II의 발현이 면역조직화학적 방법으로는 검출되지 않은 반면에 발생 17일 태자의 심실의 myocardium과 간에서는 강하게 염색이 되었다. 또한 IGF-II는 17일 태자의 뇌의 맥락막층에서도 강하게 발현이 되었다(Fig. 5). 위의 결과들을 종합하여 각 발생조직 및 단계별로 IGF-II의 발현을 정리하면, Table 1에서 보는 바와 같이 발생 7일부터 9일까지 ectoplacental cone 및 proximal endoderm에서 IGF-II의 발현이 우세하였고, 10일부터는 원시심장에도 발현이 되었으며 발생 11일부터는 간과 심장에서 발생 19일까지 계속 발현되었다. 발생 12일 이상에서는 뇌와 mesenchyme 그리고 근육과 뼈(원시근육 및 연골포함)에도 강한 발현을 나타내었다.

고 찰

IGF-II는 다양한 태아조직에서 높은 농도로 발현되는 태생기 성장인자(24)로서 이러한 IGF-II의 발현은 mRNA 뿐만 아니라 단백질 수준에 이르기까지 공통적으로 발견이 된다. 따라서 여러 보고를 통하여 IGF-II가 발생과정 및

Table 1. Tissue distribution of IGF II embryonic rat

Age (day)	Ectoplacental cone	Proximal endoderm	Brain	Head mesenchyme	Muscle & bone	Liver	Lung	Heart
7	+	+						
8	+	+						
9	+	+						
10	+	+						+
11						+		+
12			+		+	+		+
13			+		+	+		+
14			+	+	+	+	−	+
15			+	+	+	+	−	+
16			+	+	+	+	−	+
17			+	+	+	+	+	+
18			+	+	−	+	+	+
19			+	+	−	+	+	+

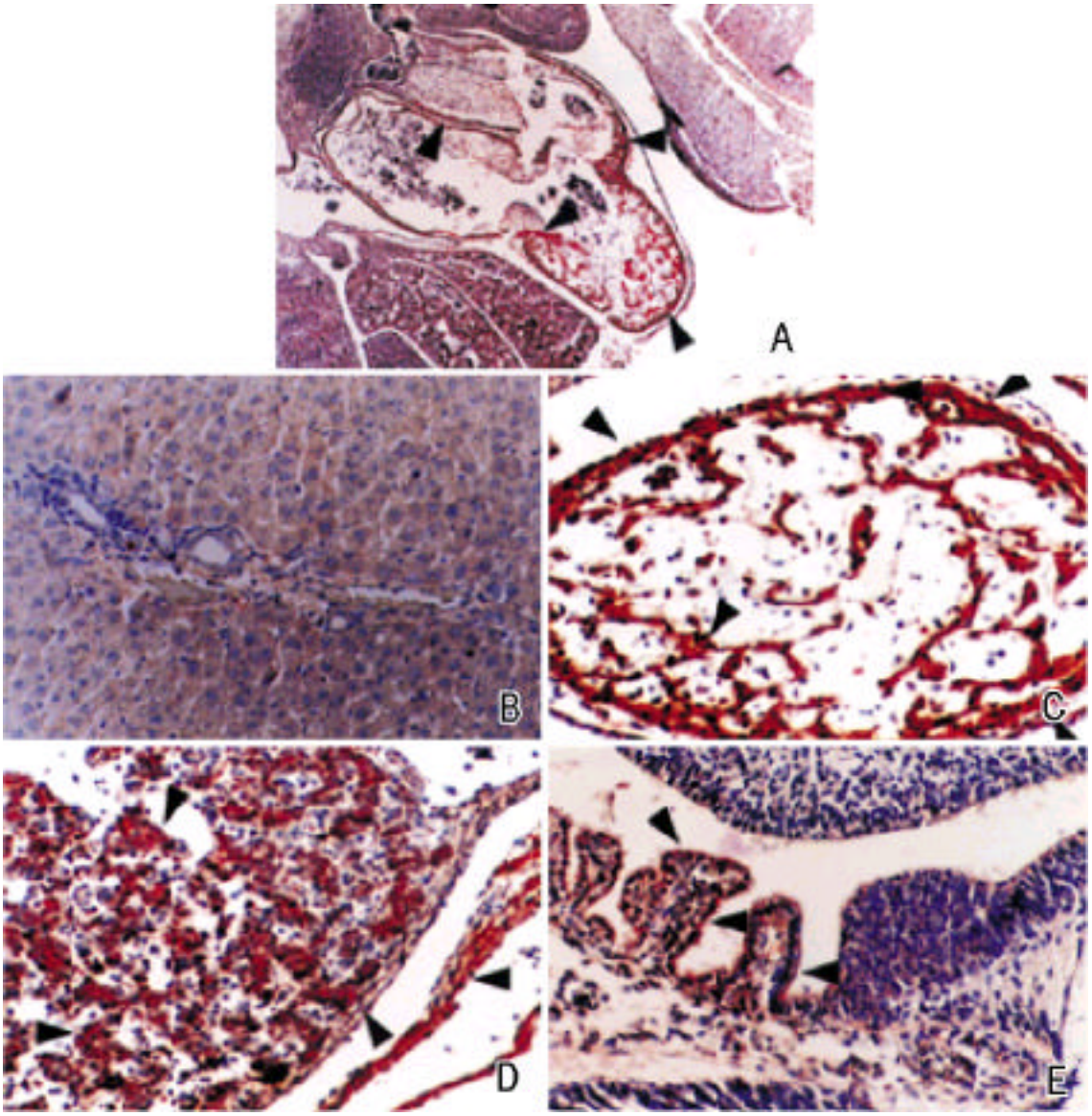

Fig. 5. Immunohistochemical staining of rat embryo using anti-IGF-II monoclonal antibody at rat embryonic day 17. A: Sagital section of trunk region, B: Normal adult liver, C: Heart, D: Liver, E: Choroid plexus

태생기 성장과정에서 중요한 역할을 할 것임이 추측되고 있다(1). 또한 간암과 같은 혈관신생이 왕성한 악성종양에서 IGF-II의 발현이 급격히 증가하는 것으로 보아 IGF-II는 발암 및 발생과정의 혈관신생활성에 모두 영향을 미치는 인자로 생각할 수 있다.

혈관신생은 발생초기에 시작되면서 일생동안 그 촉진과 퇴행과정이 적절하게 조절되어야 인체가 정상적인 기능을 유지할 수 있다. 따라서 혈관신생조절의 이상은 발생과정 중에는 선천성 기형, 발육부진, 유산 등을 유발하고 성인에서는 비정상적으로 혈관신생이 과다하게 될 경

양한 질병들의 발병과 밀접하게 관련이 있다(25). 특히, 암조직에서의 혈관신생 관련인자들의 검색과 그 작용기전에 대한 연구는 상당히 진척되어 있는 상태이다. 본 연구에 사용된 IGF-II 역시 간경변증에서 간암으로의 진행단계에서 급격한 발현증가를 보이는 성장인자로서 직접 또는 간접적인 혈관신생인자로 알려져 있다(9,16). 이와 같이 IGF-II는 암화과정 및 초기발생과정에서 유사한 발현을 보이며 두 과정에 중요한 단계인 혈관신생에 관여함을 알 수 있으므로 암화과정 및 초기발생이 상당히 유사함을 추정할 수 있다.

유사한 특징을 가진다. 그 중 여러 유전자와 단백질의 발현이 발암 및 발생과정에서 공통적으로 발견된다는 사실은 이미 알려지고 있으며(18 20), 특히 몇몇 oncogene의 발암과정중의 과다한 발현은 초기발생과정에서도 보이는 현상중의 하나이다(18). 따라서 정상적인 발생과정 동안은 발암과정과 매우 유사하다 할 수 있으며, 성체가 된 뒤부터는 유전자와 단백질의 발현조절이 철저히 이루어져 비정상적인 발암과정 및 병적상태를 억제할 수 있다. 즉 위와 같은 성질을 지니는 단백질을 oncofetal 단백질이라 하며, 이들 단백질은 발암 및 발생과정에서 공통적으로 발현증가를 보여 두 과정을 함께 조절할 수 있는 인자라 하겠다.

본 연구에서는 HepG2 인간 간암세포에 IGF-II mRNA 양을 Northern blotting analysis를 통하여 살펴보았고, HepG2 conditioned media내에 IGF-II 단백질이 상당히 함유되어 있을 것이라는 생각하에 Western blotting을 통해 IGF-II의 발현을 살펴보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 HepG2 세포에서 분리한 RNA로부터 상당한 양의 IGF-II mRNA 발현을 볼 수 있다. 반면 정상 간세포인 Chang liver cell에서는 전혀 IGF-II mRNA의 발현을 찾아 볼 수 없었다(Fig. 2). 즉, IGF-II의 발현은 정상상태에서는 억제 혹은 조절되다가 암화과정 중에 비정상적인 발현증가를 보인다고 할 수 있다. 정상세포가 악성암 세포로 진행되려면 비정상적인 세포의 증식 및 유전자 발현변화가 필수적으로 요구된다. 이러한 조건하에서 결국 혈관신생현상이 일어나게 되고 암전이가 일어나 암의 악성화가 일어나게 된다. 따라서 Nothern blotting analysis에서 나온 것처럼 IGF-II 유전자의 발현은 암화과정 중에 급속도로 유발되어 정상세포의 악성화를 유발한다고 할 수 있다. 그렇다면 이렇게 유발된 유전자의 발현이 단백질로의 번역으로 까지 이어지는지를 보기 위해 HepG2 conditioned media 내에 존재하는 IGF-II 단백질의 양을 볼 필요가 있다. IGF-II는 분비단백질로서 세포내에서 합성이 된 후 세포밖으로 분비되어 세포자신을 스스로 활성화시키거나 주변세포를 활성화 혹은 혈류를 따라 이동하는 도중에 특정 조직을 활성화시키는 등 3가지의 활성기작을 가지고 있다(1). 따라서 간암세포로부터 상당한 양의 IGF-II 단백질의 분비가 예상되며 이렇게 분비된 단백질에 의해 암화과정의 촉진이 일어날 것이다. 본 연구의 결과 역시 HepG2 conditioned media 내에는 상당히 많은 IGF-II 단백질을 볼 수 있었으나 정상 간세포인 Chang liver cell에서는 전혀 IGF-II를 찾아 볼 수 없었다(Fig. 3). 또한 IP를 수행하여 IGF-II를 제거한 군에서도 IGF-II가 사라짐을 보아 Western blotting상에서 나온 단백질이 IGF-II임을 다시 한번 증명하였

증가를 보이는 IGF-II의 거태형태가 다량 존재함이 추측된다(Fig. 3). 따라서 IGF-II의 발현은 정상 간조직에 비해 간암조직에 특이적으로 발현되고, 정상 혹은 비정상적인 IGF-II의 다양한 형태로 존재함을 알 수 있다. 즉, 간암발생과정에서 급격히 발현이 증가되는 IGF-II는 간암의 형성과정중 간암세포로부터 분비되어 간암의 성장을 유도하는 혈관신생활성을 가짐으로서 악성종양으로의 유도를 촉진하고 암전이를 일으킴을 추측할 수 있다. 그러나, 이러한 현상은 HepG2 세포에서 보이는 현상이므로 이러한 결과가 간암세포의 보편적인 현상으로 확인되기 위해서는 다른 간암 세포주들을 이용한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

또한 쥐의 발생조직으로부터 IGF-II의 발현을 면역조직화학적 방법으로 살펴보았을 때 다양한 발생단계 및 조직에서 IGF-II가 발현되고 있음을 알 수 있었다. 특히 발생 10일 이후부터 간과 심장에서 IGF-II의 발현이 강하게 보임을 알 수 있다. IGF-II mRNA의 발현조절은 4개의 촉진자에 의해 발생단계 및 조직에 따라 조절되고 있다. 즉, 발생시기에 따라 서로 다른 촉진자에 의해 IGF-II mRNA의 발현조절이 이루어짐을 말한다. 따라서 본 실험에 의해 IGF-II의 발현은 조직 및 발생시기에 따라 조절되고 있으며 이러한 조절기작에 의해 정상적인 발생이 일어날 수 있음을 알 수 있다.

IGF-II가 태생기 발생과정동안에도 급격한 발현증가를 보인다는 사실은 간경변증에서 간암으로의 이행시 IGF-II의 발현이 증가되는 것과 매우 유사하며, 이러한 IGF-II는 발암 및 발생과정에서 모두 중요한 oncofetal 단백질로서의 성질을 지님을 알 수 있다. 또한 IGF-II가 암화과정 및 발생과정에서 중요한 단계중 하나인 혈관신생단계를 조절하여 두 과정에 관여할 수 있는 인자임을 추측할 수 있다.

결 론

이상의 결과에 의해 암화과정 뿐만 아니라 초기발생의 각 조직 및 단계에 따라서 IGF-II가 조절되고 있음을 시사하고 있다. 향후 암조직 및 발생조직에서의 IGF-II 작용에 관한 연구와 발현 기작에 관한 연구가 진행되면 악성암을 포함한 초기발생과정의 이상에 의한 각종 병적상태에서의 IGF-II의 역할을 이해할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 보건복지부 암정복추진연구개발사

진 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. Annu Rev Physiol 1993;55:131-153.
2. Moses AC, Nissley SP, Short PA, Rechler MM, White RM, Knight AB, Higa OZ. Elevated levels of insulin-like growth factor, multiplication stimulatory activity in fetal rat serum. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77:3649-3653.
3. Hill DJ, Milner RDG. Somatomedins and fetal growth. In the fetus and independent life, Ciba foundation symposium. London: Pitman, 1981;86:124-151.
4. Milner RDG, Hill DJ. Fetal growth: The role of insulin and related peptides. Clin Endocrinol 1984;21:415-433.
5. Underwood LE, D'Ercole AJ. Insulin and somatomedins/insulin-like growth factors in fetal and neonatal development. In Clinics in Endocrinology and Metabolism, vol. 13, Tissue Growth Factors (ed. Daughaday WH), East Essex, England: Saunders WB Co, Ltd., 1984:68-89.
6. Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of insulin-like growth factors. A Rev Phsiol 1985;47:443-467.
7. Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors/somatomedins: Struture, secretion, biological actions and physiological role. Homone Res 1986;24:121-130.
8. Baxter RC. The somatomedins: Insulin-like growth factors. Adv Clin Chem 1986;25:49-115.
9. Kim KW, Bae SK, Lee OK, Bae MH, Lee MJ, Park BC. Insulin-like growth factor II induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of human hepatocellular carcinoma. Cancer Res 1998;58:348-351.
10. Bae MH, Lee MJ, Bae SK, Lee OK, Lee YM, Park BC, Kim KW. Insulin-like growth factor II (IGF-II) secreted from HepG2 human hepatocellular carcinoma cells shows angiogenic activity. Cancer Lett 1998;128:41-46.
11. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992;359:843-845.
12. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential factor in human gliomas in vivo. Nature 1992;359:845-848.
13. Nabel EG, Yang Z, Plautz, G, Forough R, Zhan X, Haudenschild DD, Maciag T, Nabel GJ. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. Nature 1993;362:844-846.
14. Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor β1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. J Cell Biol 1990;111:731-741.
15. Pepper MS, Montesano, R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor beta-1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. J Cell Biol 1990;111:743-754.
16. Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellualr carcinoma. J Hepatol 1995;22:286-294.
17. Risau W. Differentiation of endothelium. FASEB J 1995;9:926-933.
18. Ariel I, Ayesh S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N, Hochberg A. The product of the imprinted H19 gene is an oncofetal RNA. Mol Pathol 1997;50:34-44.
19. Myers KA, Rahi-Saund V, Davison MD, Young JA, Cheater AJ, Stern PL. Isolation of a cDNA encoding 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein. An antigen associated with metastasis contains leucine-rich repeats. J Biol Chem 1994;269:9319-9324.
20. Wilkinson MF, Kleeman J, Richards J, MacLeod CL. A novel oncofetal gene is expressed in a stage-specific manner in murine embryonic development. Dev Biol 1990;141:451-455.
21. Hothuizen PE, Rodenberg RJT, Van Dijk MA, Koonen-Reemst AMCB, Charnay P, Sussenbach JS. Transcriptional regulation of the human IGF-II gene. Ann NY Acad Sci 1993;684:214-217.
22. Sussenbach JS, Holthuizen P, Steenbergh PH. Structure and expression of the human insulin like growth factor genes. Growth Regulation 1992;2:1-9.
23. Kwon YW, Bae SK, Kim JA, Kim KW, Park BC. Studies on the mechanism of hypoxic increase of VEGF expression in the Hep3B human hepatoma cells. J Korean Cancer Assoc 1997;29(2):220-226.
24. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. Nature 1990;345:78-80.
25. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem 1992;267:10931-10934.