Tuberculosis and Respiratory Diseases
□원 저□
결핵 및 호흡기질환, Vol. 50, No. 5, May, 2001

마우스 폐암 세포에서 Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) 및 IGF Binding Protein (IGFBP)의 역할†

인하대학교 의과대학 내과학교실[1], 연세대학교 의과대학 내과학교실[2], 폐질환연구소[3], 흉부외과학 교실[4]

조철호[1], 김세규[2,3], 곽승민[1], 장 준[2,3], 김성규[2,3], 정경영[4]

= Abstract =

The Role of Insulin-like Growth Factor I(IGF-I), and IGF Binding Protein (IGFBP) in Mouse Lung Cancer Cells

Chul Ho Cho, M.D.[1], Se Kyu Kim, M.D.[2,3], Seung Min Kwak, M.D.[1], Joon Chang, M.D.[2,3], Sung Kyu Kim, M.D.[2,3], Kyung Young Chung, M.D.[4]

Department of Internal Medicine, Inha University College of Medicine[1], Kyunggi-do, Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine[2], The Institutes of Chest Diseases[3], Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery[4], Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : IGF-I is an important mitogen in many types of malignancies. Tumors also express many IGF binding proteins, which modulate IGF action. The purpose of this study was to evaluate the effect of IGF-I and IGFBP on cell proliferation in mouse lung cancer cells (3LL).

Methods : The cellular proliferation of 3LL with the treatment of growth factors was evaluated using MTT assay. Western ligand blot was performed in order to determine whether 3LL cells secrete IGFBPs and we evaluated the effect of IGFBP on cellular proliferation.

Results : The treatment of 3LL cells with IGF-I increased cellular proliferation in a serum free media. Western ligand blot of conditioned medium of 3LL with ^{125}I-IGF-I demonstrated one single major band with an estimated molecular mass of 24 kDa. This band was identified as IGFBP-4 with immunoblot analysis using antisera.

†본 연구는 1999학년도 연세대학교 의과대학 일반교수연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence :
Kyung Young Chung, M.D.
Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Yonsei University College of Medicine
CPO BOX 8044, Seoul, Korea
Phone : 82-2-361-5595 Fax : 82-2-393-6012 E-mail : kychu@yumc.yonsei.ac.kr

The addition of anti-IGFBP-4 antibody to abrogate the effect of IGFBP-4 resulted in increased cellular proliferation suggesting that IGFBP-4 inhibits cell growth.

Conclusion : IGF-I increases cellular proliferation, however the secreted IGFBP-4 has an inhibitory function on cell growth in 3LL. These findings suggest that IGF-I and IGFBP are involved in the cell proliferation. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 549-556)

Key words : Insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-binding protein (IGFBP), Cell proliferation.

서 론

암세포의 성장은 체내에 있는 세포증식(cell proliferation)과 세포사망(cell death)의 균형에 의해 이루어지는데 이것은 세포증식이 많거나 혹은 세포사망이 적게 발생하는 경우에 암이 성장하는 것을 의미한다[1]. 이런 세포증식에 필요한 인체 내의 여러 가지 성장 요소에는 insulin-like growth factor-I(IGF-I), epidermal growth factor(EGF), platelet-derived growth factor(PDGF), fibroblast growth factor(FGF) 등이 있는데 이들 성장요소는 실질세포(parenchymal cells) 혹은 지지세포(mesenchymal cell)에 의해 분비되어 endocrine 혹은 paracrine effect로[2-4] 또는 암세포 자체에 의한 autocrine effect로 세포증식에 관여한다[5].

IGF-I은 ligand로서 그의 수용체인 IGF-I receptor(IGF-IR)에 반응함으로써 유사분열효과(mitogenic effect)[6,7], 형질변환(transformation) 및 종양발생(tumorigenesis)을 유발하고[8] apoptosis를 방지하는 역할을 한다[9-13].

IGF binding proteins(IGFBPs)은 혈액[14,15] 및 조직 내에서 IGF-I과 결합하여[16-19] IGF-I의 반감기를 증가시켜 주고 IGF-I을 운반하는 단백질로 알려져 있다. 최근에는 IGFBP이 세포증식을 억압하고[20] apoptosis를 유발시켜 IGF-I의 역할과는 반대되는 항암효과를 나타낸다는 보고가 있다[21,22].

이에 저자 등은 마우스 폐암세포주(3LL)에서 IGF-I을 투여하여 세포성장을 관찰하였으며, 또한 IGFBP를 추출하고 그 기능을 확인하여, IGF-I 및 3LL 세포에서 분비되는 IGFBP이 3LL 세포의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

3LL (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)은 C57BL/6 마우스의 폐암세포로, 세포의 배양은 Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY, USA)에 5% fetal bovine serum(FBS), sodium pyruvate, nonessential amino acids, L-glutamine과 2배의 vitamin solution (Gibco, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 5% CO_2 세포배양기에 37℃에서 배양하였다.

2. 세포증식

세포의 증식정도는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포는 96 well 세포배양용기에 2,500 cells/well로 분주한 후 12시간 이상 배양하여 부착시키고, FBS가 없는 세포 배양액에서 24시간 배양하였다. 그 후 serum free 혹은 serum containing media에서 IGF-I, IGF-II, des-IGF-I 및 anti-IGFBP-4 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)를 처리하고 3일간 배양한 후, MTT(최종농도 : 80 μg/ml)를 첨가하여 2내지 3시간 배양한 다음 배양액을 제거하였다.

세포의 증식정도는 100 $\mu\ell$의 dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 각 well에 첨가한 후, spectrophotometer (Dynatech, Inc., Alexandria, VA, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. Western ligand blot과 Western immunoblot

Conditioned medium을 얻기 위해 세포를 6-well 세포 배양용기에 5×10^4 cells/well로 분주하고 약 12시간 배양하여 부착시킨 후, 세포배양액을 제거하고 FBS가 없는 세포 배양액에서 24시간 배양하였다. 단백은 protease inhibitors(2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 μM leupeptin, 0.15 U/ml aprotinin)를 첨가하여 Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA, USA)을 이용하여 농축하였고, 12.5% SDS-PAGE로 전기영동한 후, nitrocellulose membrane (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)에 전이시켰다. Ligand blotting을 위해 membrane을 0.1% Tween-20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 ^{125}I-IGF-I (1.5×10^6 cpm) (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 4℃에서 18시간 배양하고 자가방사선으로 판독하였다. Immunoblotting을 위해 membrane을 일차항체인 rabbit anti-human IGFBP-2, -3, -4 antisera (UBI, Lake Placid, NY, USA)로 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 이차항체인 peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척하였고, ECL (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)를 실행하였다.

4. 통계 분석

모든 실험 결과값은 평균값±표준편차(mean±SD)로 표현하였고, 통계학적 분석은 Student's t-test로 검증하였으며, p값이 0.05 이하일 때를 통계학적으로 유의한 결과로 규정하였다.

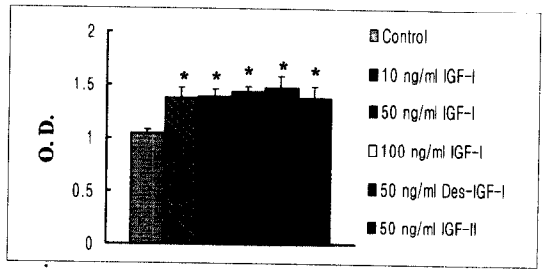

Fig. 1. The Effects of IGFs on Cellular Proliferation. Cells were plated at 2,500 cells/well overnight and then serum-starved for 24 h in serum free media. Media were aspirated and cells were treated with serum free media in the presence or absence of different doses of IGF-I, 50 ng/ml Des-IGF-I and 50 ng/ml IGF-II for 72 h. The cellular proliferation was checked by MTT assay.
*$p<0.05$ vs control.

결 과

1. IGF-I의 세포증식에 대한 영향

IGF-I에 의한 세포증식 여부를 알아보기 위해 MTT assay를 시행하였다. 0% serum media 인 대조군에 비해 여러 농도의(10, 50, 100 ng/ml) IGF-I을 투여시 세포증식이 의의있게 증가하였으며($p<0.05$), IGF-I의 유도체인 des-IGF-I과 IGF-II을 투여시 대조군에 비해 의의있는 세포증식을 보였다($p<0.05$) (Fig. 1)

2. 마우스 폐암세포(3LL)에서 IGFBP의 분비

마우스 폐암세포(3LL)에서 분비되는 IGFBP를 확인하기 위해 serum free media를 24시간 처리 후 conditioned media를 추출하고 원심분리하였다. ^{125}I-IGF-I을 이용하여 Western ligand blot을 시행한 결과 분자량 24 kDa의 단일 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 분비된 24 kDa의 IGFBP는 anti-IGFBP-4 antibody로 Western immunoblot을 시행한 결과 IGFBP-4인 것이 확인되었다.

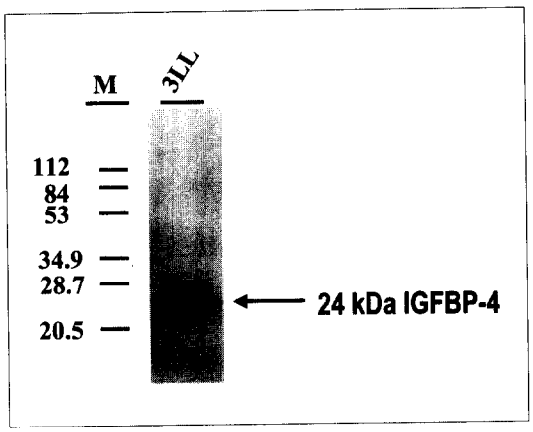

Fig. 2. Secretory IGFBP-4 from Conditioned Media (CM).
Cells were incubated in 6 well plate. Cells were treated in serum free media for 24 h and conditioned media (CM) were collected. IGFBPs in CM were concentrated and separated by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred to nitrocellulose, incubated with ^{125}I-IGF-I and detected by autoradiography. A 24 kDa IGFBP was specifically recognized by an antibody to IGFBP-4.

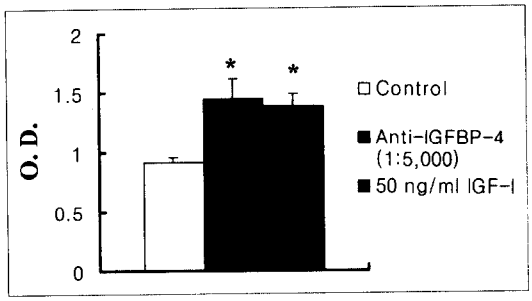

Fig. 3. The Effect of IGFBP-4 on Cellular Proliferation.
Cells were plated at 2,500 cells/well overnight and then serumstarved for 24 h in serum free media. Media were aspirated and cells were treated with serum free media in the presence or absence of anti-IGFBP-4 (1 : 5,000 dilution of lyophilized whole antiserum) or 50 ng/ml IGF-I for 72 h. The cellular proliferation was checked by MTT assay.
*$p<0.01$ vs control.

3. 세포증식에 대한 IGFBP-4의 역할

IGFBP-4가 세포증식에 미치는 영향을 보기 위해 anti-IGFBP-4 antibody를 첨가한 후, 마우스 폐암세포(3LL)의 세포증식을 MTT assay로 측정하였다. Serum free conditioned media에서의 수치는 0.91±0.4이었고, 1:5000으로 희석한 anti-IGFBP-4 antibody를 투여했을 때 144±0.17로 유의하게 세포증식이 증가되는 소견을 관찰할 수 있었다($p<0.01$) (Fig. 3). 이러한 결과로 IGFBP-4는 세포증식을 억제하는 기능을 가지고 있음을 간접적으로 알 수 있었다.

고 찰

Insulin-like growth factor(IGF) system은 ligand, receptor, binding protein으로 구성되는 복합성장인자계이다. Ligand인 IGF-I과 IGF-II는 인슐린과 구조적 상동성(homology)을 가지고 있고[23,24], 세포성장과 분화를 조절하는데 중요한 역할을 하며[7,25] 각각의 수용체와 결합하는 것 이외에도 일군의 IGFBPs과 높은 친화성 및 특이성을 갖고 결합한다. IGFs는 여러 종류의 정상 조직에서 합성될 뿐 아니라 여러 암조직 및 암세포에서 유래된 세포주에서도 합성됨이 보고되었다[26-28].

본 실험에서는 IGF-I이 세포증식에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위해 MTT assay를 시행하였는데, 3LL 세포에서 serum free media(0% serum)에서는 IGF-I 첨가 시 대조군에 비해 세포증식이 증가하였으나, 1% 및 5% serum containing media에서는 세포증식에 영향을 미치지 않았다. 따라서 1% 및 5% serum media, 즉 IGF-I이 기존에 존재하는 배지에 IGF-I을 첨가 시에는 세포증식에 변화가 없었으나, serum free media, 즉 IGF-I이 존재하지 않는 배지에 IGF-I을 첨가 시에는 세포증식의 증가를 관찰할

수 있었다. 즉 1% 및 5% serum containing media에는 기존의 IGF-I에 의해 세포주기가 진행되고 있어서 여기에 IGF-I을 첨가하더라도 세포주기의 진전을 통한 세포증식에는 큰 영향이 없었던 반면, IGF-I이 없는 free media에 IGF-I을 첨가 시에는 비로소 세포주기가 진행되어 세포증식이 증가된 것으로 생각된다. 따라서 IGF-I이 유사분열물질(mitogen)임을 확인할 수 있었다.

IGF-I 및 IGF-II는 각각의 수용체와 결합하는 것 이외에도 일군의 IGFBPs과 높은 친화성 및 특이성을 갖고 결합한다[29]. 지금까지 여섯 종류의 IGFBPs (IGFBP-1~6)가 증명되었으며 이들 IGFBPs는 세포에 대한 IGFs의 작용을 조절하는 것으로 알려져 있다[19]. IGFBPs의 각 단백질들은 서로 구조적으로 비슷하지만 또한 각각의 특별한 특징을 가지고 있다. IGFBPs 역시 여러 암세포주와 종양에서 생성됨이 밝혀져 암 조절인자로서의 역할을 한다고 하였다[30-33]. 그러나 그 조절기능에 대해서는 논란이 있어서 IGFBPs는 IGFs의 생물학적 활성을 증강시키기도 하고[34,35] 저하시키기도 한다고 하였다[36].

본 실험에서는 3LL 폐암세포주에서 IGFBP-4 분비를 Western ligand blot, Western immunoblot으로 확인하였다. Conditioned media에서 분비된 IGFBP를 각각의 anti-IGFBP antibody로 Western immunoblot을 시행한 결과 관찰된 IGFBP는 IGFBP-4임이 확인되었다. 또한 분비된 IGFBP-4가 세포증식에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 IGFBP-4의 antibody를 투여하여 세포증식의 변화를 관찰하였다. Serum free media에 비하여 anti-IGFBP-4 antibody를 첨가하였을 때 세포증식이 약 50% 증가하는 소견을 보였다. 따라서 본 실험의 결과에서 보듯이 anti-IGFBP-4 antibody를 처리하였을 때 세포증식이 증가하는 것으로 보아 분비된 IGFBP-4는 세포증식을 억제하는 기능을 가지고 있다는 것을 간접적으로 알 수 있었다.

현재까지 밝혀진 IGFBPs 중 IGFBP-3가 인간에게 주된 단백질로 알려졌다. Oh 등은 Hs578T 인간 유방암세포에서 transforming growth factor-β(TGF-β)에 의한 세포성장 억제가 IGFBP-3 생성에 의해 매개된다는 것을 관찰하여 IGFBP-3가 일차적인 성장저해인자로서의 역할을 한다고 하였다[20]. 또 Nickerson 등은 MCF7 유방암세포에서 IGFBP-3는 IGF-I의 IGF-IR에 대한 생물활성을 감소시킴으로써 apoptosis를 항진시키므로 IGFBPs가 apoptosis에 대한 조절기능을 가진다고 보고하였다[37].

IGFBP에 결합되어 있는 IGF가 방출되어 조직의 IGF receptor에 도달하는 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않으며, 혈중 총 IGFs의 60~90%가 저장된 150 kDa IGFBP-3 complex로부터 어떻게 IGF가 방출되는지가 관심의 대상이지만 아직 확실히 밝혀져 있지 않다. 다만 쥐에서 혈중에 존재하는 IGFBP-3 protease activity가 150 kDa complex 내에서 IGFBP-3를 부분 분해하여 IGF ligand의 affinity를 떨어뜨림으로써 IGF를 방출한다는 보고가 있으나[38], IGFBP-3 protease activity가 거의 없는 인간 혈장에서의 IGF 방출 기전은 확실하지 않다. 최근 특정 IGFBP는 IGF와 무관하게 그 자체로서 생물학적 작용이 있다고 하였는데, Jones 등은 IGF-I이 CHO 섬유모세포에서 IGF ligand의 존재와 관계없이 $\alpha5\beta1$ integrin에 결합하여 세포이동을 자극한다고 보고하였고[39], Oh 등은 Hs578T 인간 유방암세포에서 IGFBP-3는 IGFBP-3 수용체에 결합하여 세포증식을 방해한다고 보고하였다[40]. 그러나 IGFBP 수용체의 존재여부는 확실하지 않아 향후 수용체의 완전한 정제와 신호전달체계를 완전히 밝히는 연구가 있어야 하겠다.

마우스 폐암 세포 (3LL)에서 IGF-I은 세포성장을 증가시키며, 3LL은 IGFBP-4를 생성하며, 이는 3LL의 세포성장을 억제하였다. 그러나 IGFBP-4은 IGF-I와 결합하여 IGF-I이 그 수용체와 반응하는 것을 저해할 수 있고, 세포표면과의 관계, 세포 외 기질(extracellular matrix)과의 관계, 인산화 또는 단백질분해 등과 같은 여러 가지 요소들에 의해서 각각의 IGFBP는 ligand에 대한 친화력과 표적세포에 대한

작용을 변화시킬 수 있다. 현재는 생체 내 연구가 부족하고 IGFBPs이 IGF의 세포성장에 대한 증가 및 감소효과가 모두 보고되고 있어서 향후 더 많은 연구가 있어야 하겠으며, 특별한 IGFBP 유전자를 결손시키는 유전자 표적 연구(gene targeting study)가 이러한 의문을 해결하는 데 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

연구배경 :
세포성장에 관여하는 여러 growth factor중 IGF-I은 IGF-IR와 결합하여 세포증식을 유발하는 mitogen으로 알려져 있다. 대부분의 정상세포 및 암세포는 IGFBPs을 분비하는데 이들은 IGF-I과 결합하여 IGF-I의 세포증식 효과를 증가 혹은 억제시킨다. 마우스 폐암세포주 (3LL)에서 IGF-I이 세포성장에 미치는 효과를 보고, 3LL 세포에서 분비되는 IGFBP을 추출 확인하고, IGFBPs이 세포 성장에 미치는 영향을 관찰하였다.

방 법 :
마우스 폐암세포주 (3LL)를 이용하여, IGF-I을 투여하여 세포성장을 MTT assay로 측정하였고, 3LL에서 분비되는 IGFBP을 추출하여 Western ligand blot 및 western immunoblot으로 확인하였다. 또한 분비된 IGFBP이 세포성장에 미치는 영향을 보기위해, anti-IGFBP antibody을 첨가하여 이의 기능을 억제하여 세포성장에 관한 기능을 관찰하였다.

결 과 :
IGF-I은 serum free media에서 3LL 세포성장을 증가시켰다. 3LL 세포는 IGFBP-4를 생성하는 것을 확인하였고, anti-IGFBP-4 antibody를 첨가시 세포성장이 증가된 소견이 관찰되어 IGFBP-4는 세포증식을 억제하는 기능을 가지고 있음을 간접적으로 알 수 있었다.

결 론 :
이상의 실험 결과로 3LL 마우스 폐암세포에서 IGF-I은 세포성장을 증가시키며, 3LL에서 생성된 IGFBP-4는 세포증식을 억제하는 기능을 가지고 있다는 것을 관찰하였다. 향후 IGF-I과 IGFBPs이 암 성장에 미치는 기전과 임상적 적용에 대한 연구가 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bresciani F, Paoluzi R, Benassi M, Nervi C, Casale C, Zaparo E. Cell kinetics and growth of squamous cell carcinomas in man. Cancer Res 1974;34:2405-15.
2. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:935-9.
3. Underwood LE, D'Ercole AJ, Clemmons DR, Van Wyk JJ. Paracrine functions of somatomedins. Clin Endocrinol Metab 1986;15:59-77.
4. Long L, Nip J, Brodt P. Paracrine growth stimulation by hepatocyte-derived insulin-like growth factor-I : a regulatory mechanism for carcinoma cells metastatic to the liver. Cancer Res 1994;54:3732-7.
5. Herlyn M, Kath R, Williams N, Valyi-Nagy I, Rodeck U. Growth-regulatory factors for normal, premalignant, and malignant human cells in vitro. Adv Cancer Res 1990;54:213-34.
6. Clemmons DR, Van Wyk JJ. Somatomedin-C and platelet-derived growth factor stimulate human fibroblast replication. J Cell Physiol 1981;106:361-7.
7. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. Cell 1993;75:73-82.
8. Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola

D, DeAngelis T, et al. Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. Mol Cell Biol 1994;14:3604-12.

9. Lyons RM, Smith GL. Characterization of Multiplication-Stimulating Activity (MSA) carrier protein. Mol Cell Endocrinol 1986;45:263-70.
10. Geier A, Beery R, Haimsohn M, Karasik A. Insulin-like growth factor-1 inhibits cell death induced by anticancer drugs in the MCF-7 cells : involvement of growth factors in drug resistance. Cancer Invest 1995;13:480-6.
11. Resnicoff M, Abraham D, Yutanawiboonchai W, Rotman HL, Kajstura J, Rubin R, et al. The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo. Cancer Res 1995; 55:2463-9.
12. Resnicoff M, Burgaud JL, Rotman HL, Abraham D, Baserga R. Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. Cancer Res 1995;55:3739-41.
13. Sell C, Baserga R, Rubin R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. Cancer Res 1995; 55:303-6.
14. Martin JL, Baxter RC. Insulin-like growth factor -binding protein from human plasma. Purification and characterization. J Biol Chem 1986;261: 8754-60.
15. Binoux M, Hossenlopp P. Insulin-like growth factor(IGF) and IGF-binding proteins: comparison of human serum and lymph. J Clin Endocrinol Metab 1988;67:509-14.
16. Lyons RM, Smith GL. Characterization of Multiplication-Stimulating Activity (MSA) carrier protein. Mol Cell Endocrinol 1986;45:263-70.
17. Zapf J, Froesch ER. Insulin-like growth factors/somatomedins : structure, secretion, biological actions and physiological role. Horm Res 1986; 24:121-30.
18. Baxter RC. Insulin-like growth factor binding proteins : Biochemical characterization. In Muller EE, Cocchi D, Locatelli V, editors. Growth hormone and somatomedins during lifespan. Berlin, Springer-Verlag ; 1993. p. 100-8
19. Clemmons DR. IGF binding proteins and their functions. Mol Reprod Dev 1993;35:368-74.
20. Oh Y, Muller HL, Ng L, Rosenfeld RG. Transforming growth factor-β-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. J Biol Chem 1995;270:13589-92.
21. Sheikh MS, Shao ZM, Hussain A, Clemmons DR, Chen JC, Roberts CT Jr, et al. Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1, 2, 3, 4, 5, and 6 : synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells. J Cell Physiol 1993;155:556-67.
22. Valentinis B, Bhala A, DeAngelis T, Baserga R, Cohen P. The human insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 inhibits the growth of fibroblasts with a targeted disruption of the IGF-I receptor gene. Mol Endocrinol 1995;9:361-7.
23. Rinderknecht E, Humble RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth -promoting activities : evidence for structural homology with insulin B chain. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:4379-81.
24. Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell growth promoting activities in human serum : isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. Proc Natl Acad Sci

USA 1976;73:2365-9.

25. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. Endocr Rev 1989;10:68-91.
26. Blatt J, White C, Dienes S, Friedman H, Foley TP. Production of an Insulin-like growth factor by osteosarcoma. Biochem Biophys Res Commun 1984;123:373-6.
27. Tricoli JV, Rall LB, Karakousis CP, Herrera L, Petrelli NJ, Bell GI, et al. Enhanced levels of insulin-like growth factor messenger RNA in human colon carcinomas and liposarcomas. Cancer Res 1986;46:6169-73.
28. Gloudmans T, Prinsen I, Van Unnik JA, Lips CJ, Den Otter W, Sussenbach JS. Insulin-like growth factor gene expression in human smooth muscle tumors. Cancer Res 1990;50:6689-95.
29. Rechler MM. Insulin-like growth factor binding proteins. Vitam Horm 1993;47:1-114.
30. Moses AC, Freinkel AJ, Knowles BB, Aden DP. Demonstration that a human hepatoma cell line produces a specific insulin-like growth factor carrier protein. J Clin Endocrinol Metab 1983;56: 1003-8.
31. Jaques G, Rotsch M, Wegmann C, Worsch U, Maasberg M, Havemann K. Production of immunoreactive insulin-like growth factor I and response to exogenous IGF-I in small cell lung cancer cell lines. Exp Cell Res 1988;176:336-43.
32. Clemmons DR, Camacho-Hubner C, Coronado E, Osborne CK. Insulin-like growth factor binding protein secretion by breast carcinoma cell lines : correlation with estrogen receptor status. Endocrinology 1990;127:2679-86.
33. Pratt SE, Pollak MN. Estrogen and antiestrogen modulation of MCF7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. Cancer Res 1993;53:5193-8.
34. Elgin RG, Busby WH Jr, Clemmons DR. An insulin-like growth factor(IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:3254-8.
35. Blum WF, Jenne EW, Reppin F, Kietzmann K, Ranke MB, Bierich JR. Insulin-like growth factor (IGF-I) binding protein complex is a better mitogen than free IGF-I. Endocrinology 1989; 125:766-72.
36. Zapf J, Schoenle E, Jagars G, Sand I, Grunwald J, Froesch ER. Inhibition of the action of nonsupressible insulin-like activity on isolated fat cells by binding to its carrier protein. J Clin Invest 1979;63:1077-84.
37. Nickerson T, Huynh H, Pollak M. Insulin-I like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 1997;28:690-3.
38. Lee CY, Rechler MM. Proteolysis of insulin-like growth factor(IGF)-binding protein-3(IGFBP-3) in 150-kilodalton IGFBP complexes by a cation-dependent protease activity in adult rat serum promotes the release of bound IGF-I. Endocrinology 1996;137:2051-8.
39. Jones JI, Gockerman A, Busby WH Jr, Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg -Gly-Asp sequence. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:10553-7.
40. Oh Y, Muller HL, Pham H, Rogenfeld RG. Demonstration of receptors for insulin-like growth factor binding proteins-3 on Hs578T human breast cancer cells. J Biol Chem 1993;268:26045 -8.