

전염증성 사이토카인에 의해 유도된 베타세포 자연사에 대한 유비퀴틴화를 통한 GLP-1의 보호효과

임동미* · 김주영* · 이강우 · 박근용 · 김병준

건양대학교 의과대학 내과학교실, 명곡의과학연구소

GLP-1 Can Protect Proinflammatory Cytokines Induced Beta Cell Apoptosis through the Ubiquitination

Dong Mee Lim*, Ju Young Kim*, Kang Woo Lee, Keun Young Park, Byung Joon Kim

Department of Internal Medicine, Konyang University Myunggok Medical Research Institute, Daejeon, Korea

Background: Proinflammatory cytokines are one of the causes of diabetes mellitus. However, the exact molecular mechanism by which proinflammatory cytokines induce β -cell death remains to be clearly elucidated. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) affects the stimulation of insulin secretion and the preservation of β -cells. Additionally, it may exert an antiapoptotic effect on β cells; however, the mechanism underlying this effect has yet to be demonstrated. Therefore, we investigated the protective effects of GLP-1 in endoplasmic reticulum (ER)-mediated β -cell apoptosis using proinflammatory cytokines.

Methods: To induce ER stress, hamster insulin-secreting tumor (HIT)-T15 cells were treated using a mixture of cytokines. Apoptosis was evaluated via MTT assay, Hoechst 33342 staining, and annexin/propidium iodide (PI) flow cytometry. The mRNA and protein expression levels of ER stress-related molecules were determined via PCR and Western blotting, respectively. Nitric oxide was measured with Griess reagent. The levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA and protein were analyzed via real-time PCR and Western blot, respectively. iNOS protein degradation was evaluated via immunoprecipitation. We pretreated HIT-T15 cells with exendin (Ex)-4 for 1 hour prior to the induction of stress.

Results: We determined that Ex-4 exerted a protective effect through nitric oxide and the modulation of ER stress-related molecules (glucose-regulated protein [GRP]78, GRP94, and CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein [CHOP]) and that Ex-4 stimulates iNOS protein degradation via the ubiquitination pathway. Additionally, Ex-4 also induced the recovery of insulin2 mRNA expression in β cells.

Conclusion: The results of this study indicate that GLP-1 may protect β cells against apoptosis through the ubiquitination pathway. (*Endocrinol Metab* 26:142-149, 2011)

Key Words: Beta cell, ER stress, Incretin, Proinflammatory cytokine

서 론

비만은 당뇨병의 가장 중요한 환경적 요인이며, 특히, 복부비만은 인슐린 저항성 유발의 가장 중요한 원인이다. 증가된 지방세포에 대식세포 침윤과 활성화된 대식세포에서 분비되는 염증인자와 inter-

leukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) 같은 사이토카인의 분비 증가로 염증반응을 자극하며, 이에 따른 T 세포 활성화는 다시 TNF- α , interferon- γ (IFN- γ) 같은 사이토카인 분비를 자극하여 결국에는 췌장세포에서의 자연사(apoptosis)를 유도한다. 전염증성 사이토카인은 산화질소(nitric oxide, NO) 생성과 산화스트레스 증가 및 소포체 스트레스 증가 등 여러 가지 기전에 의해 베타세포 부전을 유발하나 확실한 기전은 알려져 있지 않으며, 제1형 당뇨병 역시 사이토카인과 관련된 여러 가지 염증 반응 및 면역 반응이 관계되어 있으나 확실한 기전은 알려져 있지 않다[1].

최근 새로 개발된 glucagon-like peptide-1 (GLP-1)은 인크레틴 호르몬으로 영양분이 장관 내에서 흡수되는 동안 소화기관에서 분비

Received: 3 December 2010, Accepted: 11 April 2011

Corresponding author: Byung-Joon Kim

Department of Internal Medicine, Konyang University Hospital, 685 Gasuwon-dong, Seo-gu, Daejeon 302-718, Korea

Tel: +82-42-600-8857, Fax: +82-42-600-9090, E-mail: kbjoon4u@hananet.net

※ 이 논문은 2010년도 건양대학교 명곡의과학연구소의 부분적인 지원에 의하여 이루어진 것임.

* These authors contributed equally to this work.

되어 혈당 의존적 인슐린 분비(glucose dependant insulin secretion) 작용을 한다. GLP-1은 혈당 강하 작용 외에도 췌장의 베타세포 증식이나 췌도 사멸에도 영향을 주어 베타세포의 양을 유지시키는 역할을 가진다[2]. 본 연구팀의 이전 연구[3,4]에서 햄스터 유래 베타세포 주에 2-디옥시글루코스(2-deoxy-D-glucose) 처리를 통한 소포체 스트레스를 유발하여 베타세포 자연사를 유도하였으나, GLP-1을 전처리한 베타세포주에서는 소포체 스트레스를 감소시켜 베타세포 보호효과를 보여, 인크레틴 호르몬이 소포체 스트레스에도 보호작용이 있음을 증명하였다.

GLP-1의 처리가 산화스트레스에 의한 소포체 스트레스 반응의 해소나 고혈당에 의한 산화스트레스의 해소에도 관여하기에 본 연구는 당뇨병 유발 원인 물질 중 하나인 전염증성 사이토카인이 베타세포 부전을 일으키는 기전과 새로운 당뇨병 치료제인 GLP-1의 사이토카인에 의한 췌장보호효과 여부와 기전을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

전염증성 사이토카인(TNF- α , INF- γ , IL-1 β)은 R&D system (Minneapolis, MN, USA) 제품을 구입하였고, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)와 hoechst 33342는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였으며, exendin (Ex)-4는 Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA, USA), Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis detection kit는 Becton Dickinson Bioscience Inc. (San Jose, CA, USA)로부터 구입하였다. 세포 배양을 위해 필요한 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 웨스턴 블롯(western blot) 분석을 위한 일차항체로 mouse monoclonal anti-KDEL (GRP78, GRP94; StressGen, Victoria, BC, Canada), rabbit anti-eIF2 α , rabbit anti-Ser51 phospho specific eIF2 α (Cell Signaling, Beverly, MA, USA), rabbit anti-GADD 153 (CHOP), anti-inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-ubiquitin 및 anti- β -actin (internal control) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 등을 사용하였고, 이차항체는 Amersham Pharmacia Biotechnology Inc. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 전기영동에 필요한 시약은 Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포주 및 배양

본 연구에는 햄스터 유래의 인슐린분비세포주인 HIT-T15 세포 (74-80 passage)를 사용하였다. 사용된 배지는 RPMI-1640에 10% FBS 및 100 unit/mL의 penicillin, 100 mg/mL의 streptomycin을 첨

가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 세포밀도(confluence)가 약 70-80%에 이르면 PBS로 세척하고 0.05% Trypsin을 처리하여 계대배양하였다. 계대배양하고 2일 후에 0.5% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배지로 교체하여 12시간 배양한 후, 주어진 시간과 농도에 따라 실험하였다.

3. 세포 생존 및 유세포 분석

MTT 분석은 세포주를 24-well plate에 1×10^5 cells/mL로 분주하고, 48시간 동안 배양한 후, 혼합된 사이토카인을 농도에 따라 처리하였다. Ex-4 (25 nM)는 혼합된 사이토카인 처리 1시간 전에 처리하여 반응시킨다. 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흡수되지 않게 상층액을 제거한 후 DMSO 250 μ L를 첨가하여 용해 후 ELISA reader (Molecular Devices Emax, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm (ref. 650 nm)에서 흡광도를 측정하였다. Hoechst 33342 염색은 6-well plate에 2×10^5 cells/well로 48시간 동안 배양하여 Ex-4를 1시간 동안 전처리한 후 혼합된 사이토카인을 투여하였다. PBS완충액으로 2회 세척하고 10% formalin을 처리하여 4시간 고정 후 다시 PBS로 세척하고 hoechst 33342로 30분 동안 염색하였다. 염색 후 PBS로 세척하고 형광현미경(Olympus BX51; Olympus Corp., Tokyo, Japan)하에서 400배로 관찰하였다. 유세포 분석은 세포(1×10^6 cells/well)를 회수하여 원심 분리한 후, 세포 pellets을 PBS로 현탁시킨 뒤 원심 분리하여 형성된 pellets을 FITC가 결합된 annexin V와 PI 염색용액에 재현탁시켜 암실, 실온에서 15분간 반응하였다. 염색된 세포들은 FACS can (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)으로 분석하고, Cell Quest Pro 소프트웨어로 각 사분획의 세포들을 계산하였다.

4. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응

(Real-time reverse transcription PCR)

Total RNA는 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 추출 후 동등한 양의 total RNA는 ImProm-IITM reverse transcriptase (Promega Corp., Madison, WI, USA)와 oligo (dT) primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응을 위한 primer는 GenBank의 염기서열을 기준으로 100 bp 내외로 합성하였다. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응은 cDNA 1 μ g, forward primer 2 pmol, reverse primer 2 pmol, SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 10 μ L를 혼합하여 총 20 μ L 반응용액으로 Opticon System (MJ Research Inc., Waltham, CA, USA)을 사용하여 시행하였다.

5. 웨스턴 블롯 분석

웨스턴 블롯 분석은 배양된 세포 배지를 제거하고 PBS로 2회 세

적한 후, Proprep-protein extraction solution (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)으로 용해시켰다. 동량의 단백질을(20 µg)을 4-20% SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 전개시킨 후에 크기 별로 분리된 단백질은 니트로셀룰로소막으로 이동시켰다. 항체와 단백질 간의 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% skim milk in PBST [0.01% Tween 20 in PBS])에서 실온 1시간 동안 교반하였다. Blocking시킨 membrane은 일차 항체를 실온에서 2시간 동안(anti-KDEL은 1:1000, anti-β-actin은 1:5000, 그리고 그 외 다른 항체는 1:500으로 blocking buffer에 희석) 반응시킨 후, HRP가 연결되어 있는 이차 항체(anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG; 1:500 희석)를 실온에서 1시간 동안 반응하였다. 반응된 단백질은 HRP Chemiluminescent Substrate Reagent 키트(Millipore Corp., Billerica, MA, USA)를 이용하여 X-ray 필름에 감광시켜 특이적 band를 확인하였다.

6. 질소 생성 측정

본 연구에서는 Griess reagent system kit (Promega Corp., Madison, WI, USA)를 이용하여 질소의 활성도를 측정하였다. 96-well에 배양된 세포의 상등액을 50 µL씩 넣은 후, sulfanilamide 용액을 50 µL를 가하고 10분간 실온에서 빛을 차단하여 반응시켰다. 그 후 0.1% N-naphthylendiamine 2 HCl액 50 µL를 각 well에 넣고, 10분 후 ELISA reader (Molecular Devices Emax, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm의 파장에서 측정하였다. 질소의 생성은 질소표준곡선을 기준으로 산출하였다.

7. 면역 침강법

배양된 세포로부터 추출한 총 1,000 µg 단백질은 단백질 분해 제해제들을 첨가한 lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyro-

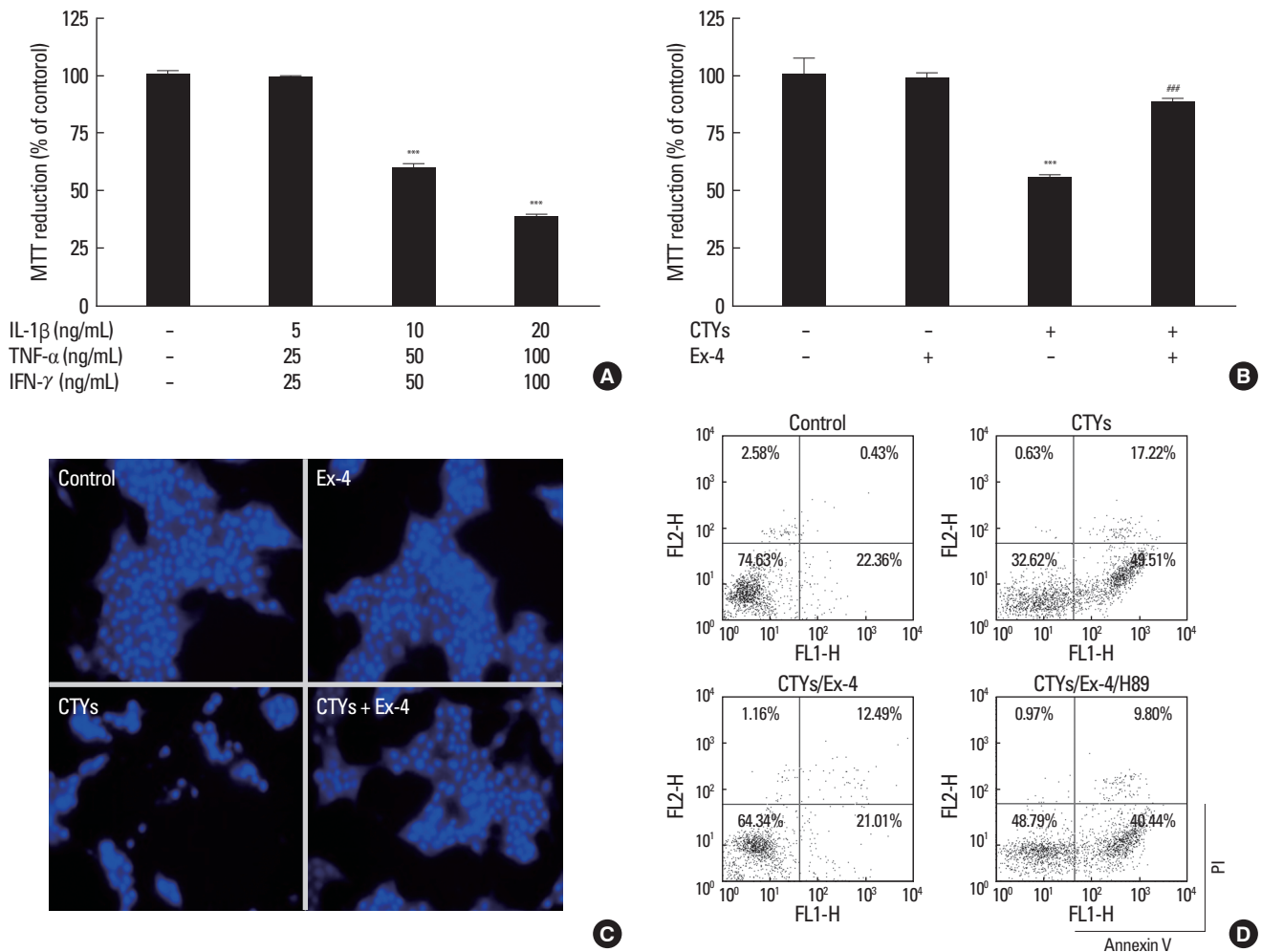
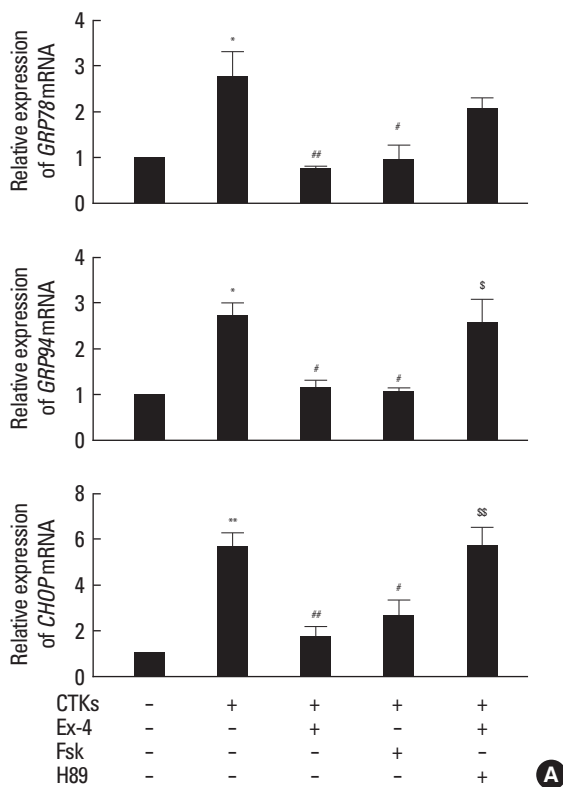


Fig. 1. After exposure to mixture of cytokines, HIT-T15 cells apoptosis increased by doses of cytokines mixture. A. Cells viability was measured with the MTT assay. HIT-T15 cells were pretreated Ex-4 for 1 hour before mixture of cytokines treatment. B. After treated of mixture of cytokine, effects of the Ex-4 on cell viability were measured by MTT assay. C. Proinflammatory cytokines induced apoptotic nuclei reduced via Ex-4. Fixed cells were stained with hoechst 33342 D. Flow cytometric analysis of apoptosis of HIT-T15 cells exposed to 72 hours. *** < 0.001 vs. control cells; ### < 0.001 vs. CTYs alone.

phosphate, 1 mM-glycerol phosphate) 200 μ L와 Protein A/G 아가로스(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 섞어 1시간 동안 부드럽게 교반하면서 반응시켰다. 5000 rpm에서 1분간 원심분리하여 침전물을 제거함으로써 아가로스에 비특이적으로 결합하는 단백질을 제거하였다. 그 후, 단백질들은 1차 항체(anti-ubiquitin [Sigma, St. Louis, MO, USA], 1:500)와 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후, Protein A/G 아가로스를 넣어 다시 4°C에서 1시간 반응시켰다. 세척 후, 2500 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 얻어낸 immune-complex에 2 protein sample buffer (300 mM Tris [pH 6.8], 4% SDS, 20% glycerol, 10% mercaptoethanol)를 넣고 100°C에서 5분간 끓인 후, Anti-iNOS 항체로 웨스턴 블롯 분석을 하였다. 웨스턴 블롯 분석은 앞의 재료 및 방법 부분에 설명한 것과 동일하게 하였다.

8. 통계 분석

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package (Version 14.0, Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 각 실험은 3회 이상 반복하였으며, 항목에 따라 백분율과 평균치를 \pm 표준편차(SD)를 구하고 각각의 조건에서 비교하기 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 시행하여 값을 구하고 post-hoc으로 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 평가하였다.



결 과

1. 전염증성 사이토카인에 의한 베타세포주의 자연사에 대한 Ex-4 보호효과

전염증성 사이토카인을 각각 저농도(TNF- α : 25 ng/mL, INF- γ : 25 ng/mL, IL-1 β : 5 ng/mL), 중간농도(TNF- α : 50 ng/mL, INF- γ : 50 ng/mL, IL-1 β : 10 ng/mL), 고농도(TNF- α : 100 ng/mL, INF- γ : 100 ng/mL, IL-1 β : 20 ng/mL)로 18시간 동안 처리하였을 때, 각각 98%, 59.4%, 38%의 생존율을 보여 중간 농도를 베타세포의 세포사멸 실험을 위한 농도로 결정하였다(Fig. 1A).

전염증성 사이토카인에 의해 유도되는 베타세포 자연사에 대한 GLP-1의 보호효과를 알아보고자, GLP-1 수용체 작용제인 Ex-4 (25 nM)를 1시간 전에 전처리하여 MTT 분석, hoechst 33342 염색과 유세포 분석을 시행하였다. MTT 분석 결과 전염증성 사이토카인 처리 후 대조군에 비해 55.4%의 생존율을 보이는데 반해 Ex-4 투여 시 87.9%로 유의하게 생존율이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1B). Ex-4의 세포사멸에 대한 보호효과를 다시 확인하기 위해 hoechst 33342 염색을 시행하였고, 전염증성 사이토카인에 의해 유발된 베타세포 자연사가 Ex-4 처리하였을 때 줄어들음을 다시 한번 확인하였다(Fig. 1C). 세포 자연사 및 괴사를 더 자세히 확인하고자 Annexin V와 PI 이중 염색 후, 유세포 분석을 시행한 결과 대조군의 세포사멸은 25.37%이었으나 전염증성 사이토카인 처리 후 67.36%로 증가

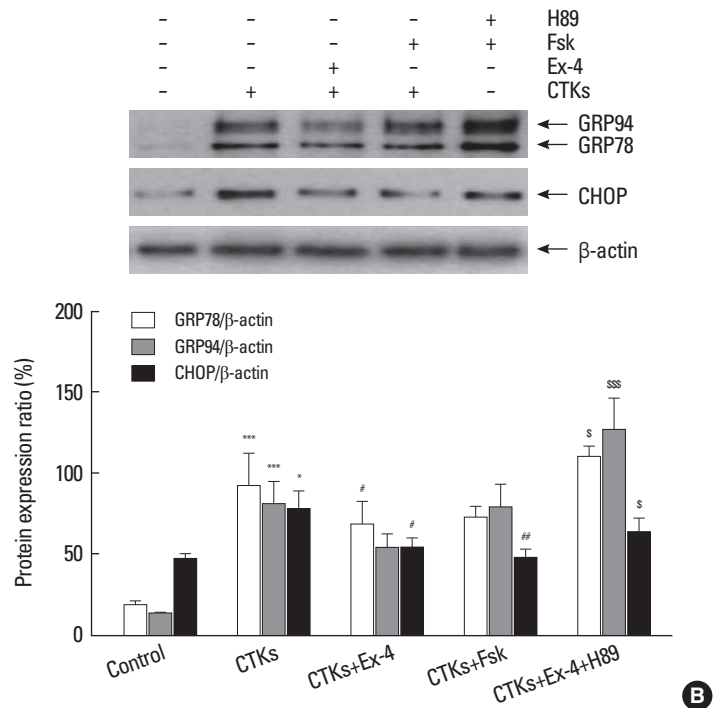


Fig. 2. HIT-T15 cells were pretreated with Ex-4, forskolin, H89. After 1 hour, HIT-T15 cells were treated with mixture of cytokines for 48 hours. A. After treated of mixture of cytokines, effect of the Ex-4, forskolin, H89 on GRP 78, 94 and CHOP were determined by densitometry analysis. B. Western blotting of GRP78,94 and CHOP. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 vs. control cells; # < 0.05, ## < 0.01 vs. CTYs alone; ^s < 0.05, ^{ss} < 0.01, ^{sss} < 0.001 vs. Ex-4 in treated CTYs.

하였으며, Ex-4 처리 후 세포 자연사가 34.66%로 감소하였다(Fig. 1D). Ex-4의 주된 경로인 PKA를 저해하는 H89를 전염증성 사이토카인과 Ex-4를 같이 처리한 경우엔 Ex-4 처리 전의 상태인 51.21%로 세포사멸이 다시 증가하여, Ex-4의 베타세포 보호효과는 PKA 경로를 통해서 이루어짐을 확인하였다(Fig. 1D).

2. 전염증성 사이토카인에 의해 유도되는 소포체 스트레스

전염증성 사이토카인에 의한 세포의 자가사멸에 소포체 스트레스가 관여하는지 알아보기 위해 소포체 샤페론 GRP78, 94 및 세포사멸과 관련된 전사유전자인 CHOP (C/EBP homologous protein)의 발현을 확인하였다. 전염증성 사이토카인 처리 시 GRP78, 94, CHOP mRNA 발현이 증가하였고 이러한 결과는 단백질 발현 변화를 통해서도 확인하였다(Fig. 2). 전염증성 사이토카인에 의해 유발된 소포체 스트레스에 대한 Ex-4의 보호효과를 확인하기 위해 Ex-4 (25 nM)를 1시간 전에 전처리 한 후 전염증성 사이토카인을 처리하여 소포체 스트레스와 관련된 단백질 변화를 보았다. Ex-4 투여 시, 사이토카인에 의해 증가된 GRP 78, 94, CHOP의 발현이 대조군과 비슷한 수준으로 감소하였으며, 이는 단백질 발현 변화에서도 비슷하였다. Ex-4의 주된 경로인 cAMP를 자극하는 forskolin을 Ex-4 대신 사용한 경우 GRP 78, 94, CHOP의 발현이 Ex-4 투여했을 때와 비슷하게 감소하였고, 단백질 발현 역시 감소하여 Ex-4의 베타세포 보호효과

가 cAMP를 통해 이루어짐을 확인하였다. 다음으로, PKA 경로를 저해하는 H89를 사이토카인, Ex-4와 함께 처리한 경우, 소포체 샤페론이 Ex-4 투여 전의 수준으로 다시 증가하였고, CHOP의 발현 역시 증가하였다(Fig. 2).

3. iNOS 발현 및 산화질소에 대한 Ex-4의 효과

전염증성 사이토카인에 의한 소포체 스트레스에 산화질소가 관여되는지 알아보기 위해 NO, iNOS mRNA, iNOS 단백질의 발현 변화를 실시간 역전사 증합 효소 연쇄 반응과 웨스턴 블롯 분석을 통하여 확인하였다. 사이토카인 처리 시 대조군에 비해 iNOS mRNA, iNOS 단백질, NO의 발현은 의미 있게 증가하였다. Ex-4를 투여했을 경우엔 iNOS 단백질, NO는 감소하였으나, iNOS mRNA는 변화 없었고(Fig. 3), forskolin 처리 후에도 iNOS mRNA 양에는 변화를 보이지 않아, Ex-4의 소포체 스트레스에 대한 보호효과는 iNOS mRNA 수준에서 일어나기보다는 iNOS 단백질 분해와 관련됨을 확인하였다.

4. iNOS 단백질 분해에 대한 Ex-4의 효과

Ex-4가 iNOS 단백질 분해를 증가시켜 소포체 스트레스를 감소시키는 지 확인하고자, iNOS 단백질 분해와 관련된 유비퀴틴화를 확인하였다. 전염증성 사이토카인으로 증가되었던 iNOS 단백질은 Ex-4 사용 시 iNOS 단백질의 유비퀴틴화가 증가되어 단백질이 분해됨을

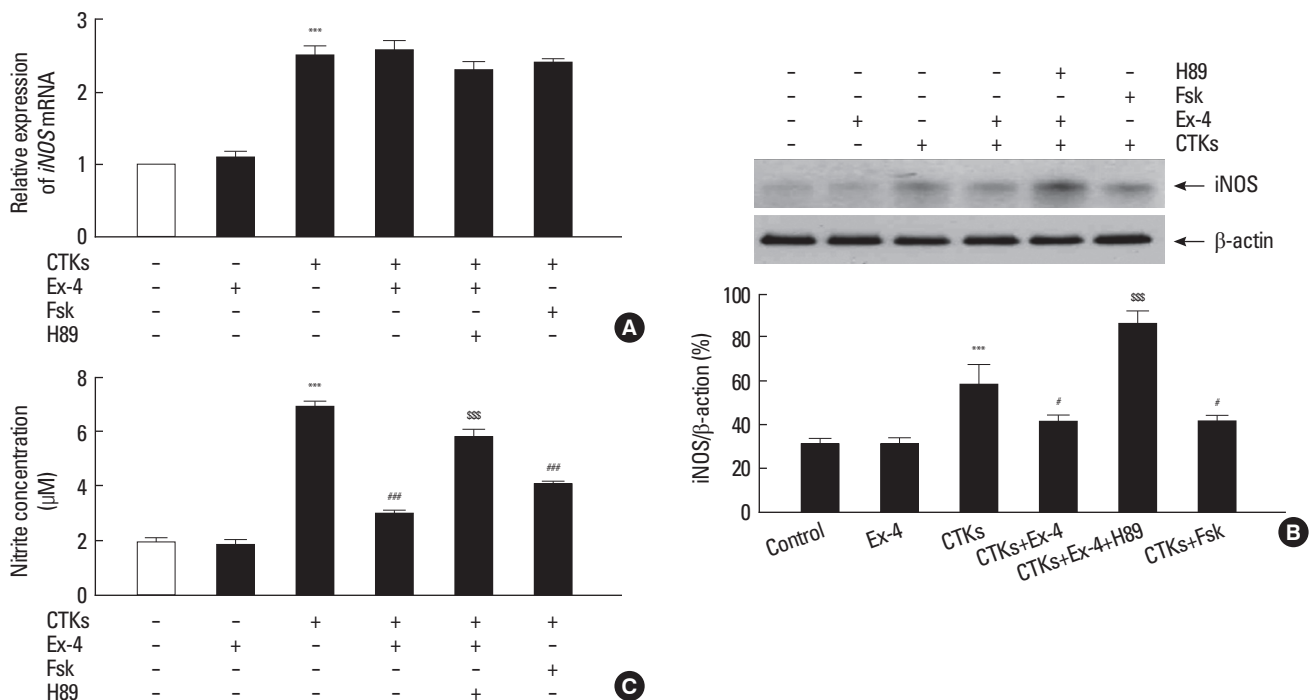


Fig. 3. HIT-T15 cells were pretreated with Ex-4, forskolin, H89. After 1 hour, HIT-T15 cells were treated with mixture of cytokines for 48 hours. A. After treated of mixture of cytokines, effect of the Ex-4, forskolin, H89 on nitric oxide were determined by densitometry analysis. B. Western blotting of iNOS protein. C. After treated of mixture of cytokines, effect of the Ex-4, forskolin, H89 on iNOS mRNA were determined by densitometry analysis. *** < 0.001 vs. control cells; # < 0.05, ## < 0.001 vs. CTYs alone; SSS < 0.001 vs. Ex-4 in treated CYTs.

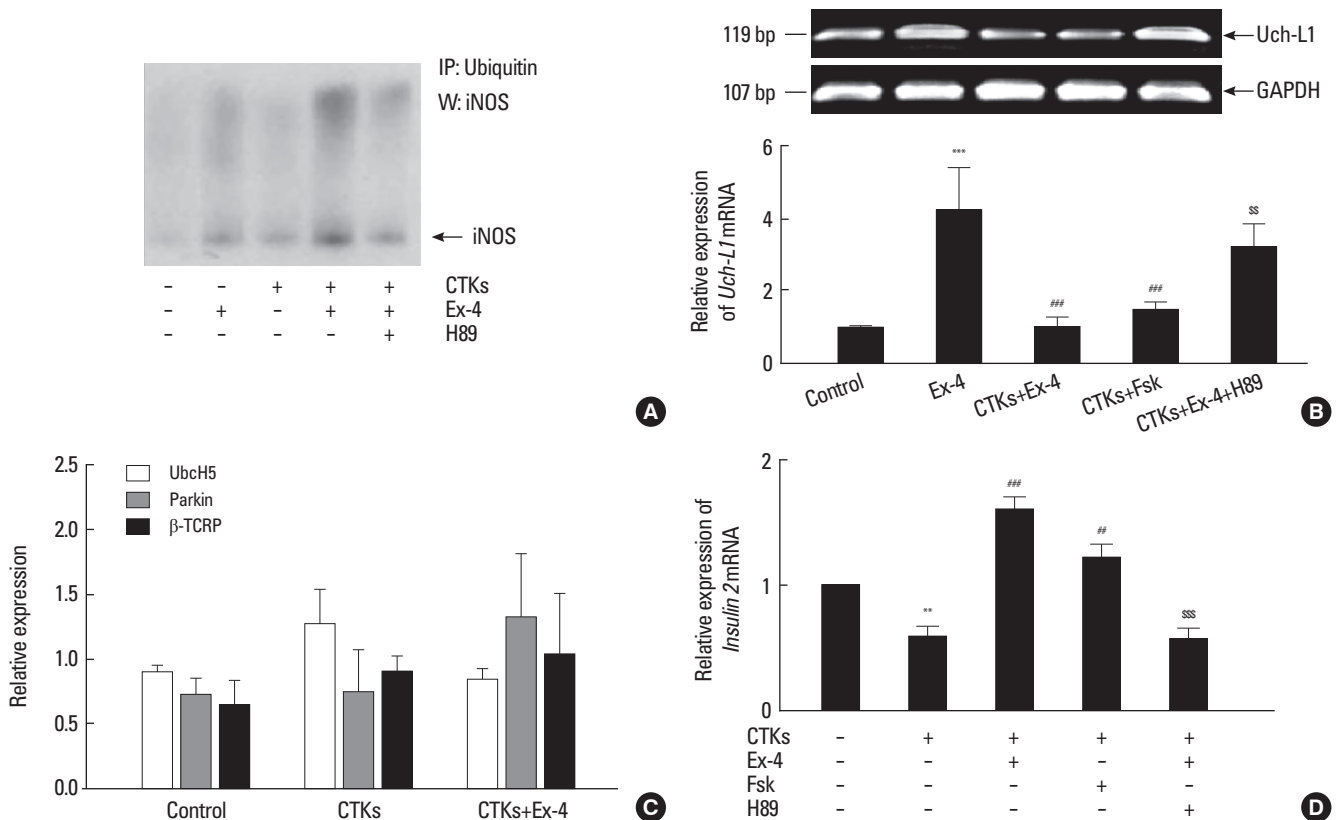


Fig. 4. HIT-T15 cells were pretreated with Ex-4. After 1 hour, HIT-T15 cells were treated with mixture of cytokines for 48 hours. A. iNOS protein ubiquitination was increased by Ex-4. B. Expression levels of deubiquitination enzyme were examined by real-time PCR and western blot. C. real-time PCR of ubiquitin enzyme after treatment cytokines or Ex-4. D. Expression levels of insulin2 mRNA were examined by real-time PCR. ** < 0.01, *** < 0.001 vs. control cells; # < 0.01, ## < 0.001 vs. CTYs alone; ss < 0.01, sss < 0.001 vs. Ex-4 in treated CTYs.

확인할 수 있었고, 이는 H89을 통해서도 다시 한번 확인하였다(Fig. 4A). 다음으로 Ex-4가 유비퀴틴화 및 탈유비퀴틴화(deubiquitination)와 관련된 효소의 발현을 통해 단백질 분해를 조절하는지 알아보았다. 사이토카인은 탈유비퀴틴화 효소(deubiquitination enzyme)인 Uch-L1 mRNA 발현을 증가시켜 iNOS 단백질의 유비퀴틴화를 감소 시킴으로 인해 산화질소가 증가되어 소포체 스트레스를 유발하고, Ex-4는 탈유비퀴틴화 효소인 Uch-L1 mRNA 발현을 감소시켜 iNOS 단백질의 분해를 증가시켜 산화질소 감소에 따른 베타세포의 소포체 스트레스를 줄였다(Fig. 4B). 이는, cAMP 자극제인 forskolin이나 GLP-1의 경로 억제제인 H89을 통해서도 다시 한번 확인하였다. 그러나, 탈유비퀴틴화 효소인 UbcH5, Parkin은 Ex-4의 처리 시 변화를 보이지 않았다(Fig. 4C). 세포자멸사에 대한 Ex-4의 인슐린 분비 회복여부를 확인하고자 insulin2 mRNA 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응을 시행하였다. Ex-4의 투여는 사이토카인 처리 후 줄어들었던 인슐린분비를 다시 회복시킴을 insulin2 mRNA를 통해 확인하였다(Fig. 4D).

고 찰

본 연구는 베타세포주인 HIT-T15 세포주를 이용하여 전염증성 사이토카인 처리시 iNOS의 발현 증가 및 산화질소생성 증가를 통해 소포체 스트레스가 유발되며, 이에 의해 베타세포주의 자연사가 증가됨을 관찰하였으며, 베타세포 보호효과가 있는 GLP-1수용체 유사체인 Ex-4를 전처리하였을 때 전염증성 사이토카인에 의한 유발된 베타세포주의 자연사가 억제되는 것을 확인하였다. 또한 전염증성 사이토카인에 의한 베타세포의 자연사에 있어 Ex-4의 보호효과와 기전을 소포체 스트레스에 연관하여 증명하고자 하였다.

베타세포주의 사멸에 대한 사이토카인의 영향을 보기 위해서는 사이토카인의 사용은 단독이나 두 가지 사이토카인 처리하는 것은 세포사멸 유도가 적절치 않아[5], 세 가지의 사이토카인 혼합을 사용하여 강한 상승효과(synergy effect)를 얻을 수 있다[6]. 따라서 본 연구에서는 전염증성 사이토카인에 의한 베타 세포주의 자연사를 확인하기 위하여 TNF- α , IL-1 β 와 IFN- γ 를 혼합하여 사용하였다.

혼합된 사이토카인은 소포체 스트레스와 관련된 분자인 GRP78, GRP 94의 발현을 증가시켜, 이를 통해 소포체 스트레스가 유발되었

고, proapoptotic 경로에 관여하는 CHOP 발현을 증가시켜 베타세포 사멸을 유발하였다. 그러나 Ex-4를 베타세포주에 전처리한 경우, 소포체 스트레스 인자(GRP78, 94)와 CHOP의 발현이 감소되었고(Fig. 2), MTT, hoechst 33342 및 유세포 분석에서도 베타세포 사멸이 줄어들음을 알 수 있다(Fig. 1). Ex-4의 효과를 다시 증명하기 위해 Ex-4의 효과를 나타내는 이차 전령사인 cAMP를 직접적으로 자극하는 forskolin을 사용하였을 때도 같은 결과가 확인됨으로써 Ex-4가 사이토카인에 의한 베타세포 사멸에 대한 보호 효과가 있음을 세포수준에서 확인하였다. 췌장의 베타세포는 소포체가 잘 발달되어 있는 것이 특징으로 사이토카인은 주로 소포체 스트레스를 통해 베타세포 자연사를 유발하나, 그 외 다른 기전으로는 소포체 칼슘 농도를 조절하는 SERCA2b (sarcoendoplasmic reticulum pump Ca^{2+} ATPase 2b) 유전자 발현을 감소시켜, 소포체의 칼슘 고갈을 유도하여 소포체 스트레스를 유발하거나[7], chemokine ligand인 CXCL10 (chemokine ligand 10)을 발현시켜 STAT-1 (signal transducers and activation of transcription)을 통해 염증과 베타세포 자연사를 유도하여 당뇨병을 유발한다[8].

다음 실험으로, 사이토카인에 의한 소포체 스트레스에 NO의 생성 증가와 iNOS의 발현증가가 관련이 있는지 확인하고자 웨스턴 블롯 분석과 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응을 시행하였다. 사이토카인은 소포체 스트레스와 연관된 iNOS와 NO 생성을 증가시키며 Ex-4와 cAMP 자극제인 forskolin의 전처리는 iNOS, NO의 양을 감소시켜 소포체 스트레스로부터 벗어났다. Kharroubi 등[7]은 사이토카인이 NF- κ B (nuclear factor κ B)를 통한 iNOS와 MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)의 발현을 증가시키고 NO의 양을 증가시켜 소포체 스트레스 유발을 보고하였다. 다른 연구에서 사이토카인과 소포체 스트레스의 관계를 보면, INF- γ 와 IL-1 β 는 iNOS의 존적 SERCA2b의 발현을 억제함으로써 소포체 스트레스를 유도하며[9], TNF- α 는 NF- κ B를 활성화시켜 세포질에서 핵 내로의 이동을 촉진시키며[10], 쥐의 췌장에 IL-1 β 와 TNF- α 를 같이 처리한 경우 베타세포 자연사를 유발하였는데, 두 사이토카인 모두 NO 발현이 증가됨을 확인하였다[11]. INF- γ 와 IL-1 β 역시 췌도 세포에서 NO 의존적 베타세포 부전을 유발한다[5]. 즉, 이 세가지 사이토카인의 공통된 베타세포 부전 경로는 NO 의존적이며, 단일 사이토카인의 사용보다는 혼합된 사이토카인의 사용이 NO의 생산 및 베타세포 부전 유발을 촉진시킬 수 있다. 본 연구는 Ex-4를 전 처리했을 때 소포체 스트레스를 유발하는 NO의 생성을 감소시켜 사이토카인에 의한 베타세포 보호효과를 확인하였다. 이는 Ex-4뿐만 아니라, forskolin의 사용 시도 NO를 감소시켜, 산화스트레스로부터 베타세포를 보호하는 효과를 보였으며, Ex-4는 사이토카인에 의해 줄었던 인슐린 분비도 다시 증가시켰다.

Ex-4의 베타세포 보호효과는 iNOS, NO의 단백질 양의 감소에 기인한 것이며, iNOS mRNA 발현에는 모두 영향이 없었다. 따라서 단

백질 분해와 관련된 유비퀴틴화에 대해 면역 침강법을 시행하였고, Ex-4가 유비퀴틴화를 증가시켜 iNOS 단백질 분해를 증가시킴을 확인하였다. 이는 최근 보고된 연구결과[12]와 일치하는 것으로, RINm5F 베타 세포주에 IL-1 β 처리 시 iNOS 발현이 증가하였고, Ex-4를 전처리한 경우는 iNOS 발현이 줄어들었으나, iNOS mRNA에는 변화가 없었고 iNOS 단백질의 양이 감소되어 Ex-4가 단백질의 분해와 연관성이 있음을 보고하였다. 이 연구 결과는 Ex-4의 베타세포 보호효과를 전사수준에서가 아니라 전사 후 과정에 Ex-4가 관여함을 증명하여, Ex-4는 iNOS의 단백질 분해에 연관성이 있음을 알 수 있었다. 본 연구 역시 Ex-4에 의한 산화질소 감소가 전사 후 과정에서 관여됨을 확인하여 단백질 수준에서의 NO의 조절이 일어남을 확인하였다.

유비퀴틴-프로테아좀 경로(Ubiquitin-proteasome pathway)는 단백질 조절에 있어서 중요한 역할을 한다. 이러한 경로를 통해 증식, 분화, 신호전달, 전사조절과 스트레스 반응을 조절하여 세포 내 단백질 전달과정을 조절하는 것으로 알려져 있다[13]. 유비퀴틴 시스템은 유비퀴틴이 표적 단백질과 결합하여 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 통해 단백질의 분해 통해 표적 단백질량을 감소시키고, 탈유비퀴틴화는 유비퀴틴과 반대 작용으로 탈유비퀴틴 효소에 의해 단백질에 붙어 있는 유비퀴틴들을 떼어내어 목표 단백질이 분해되지 않도록 단백질을 조절하는 중요한 시스템이다. 90%의 부분 췌장 절제술 (partial pancreatectomy) 시행 후 만성 고혈당에 노출되면 이러한 유비퀴틴화와 관련된 유전자 발현이 감소한다. 베타세포는 고혈당이나 산화 스트레스에 민감하여 이러한 인자들은 베타세포의 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 활성화시켜 베타세포 기능이상에 중요한 역할을 한다. 췌도에는 UbcH5, Parkin, β -TCRP 같은 유비퀴틴 효소와, Uch-L1 같은 탈유비퀴틴 효소가 존재한다. 본 연구에서처럼 사이토카인은 탈유비퀴틴 효소의 발현을 증가시켜 iNOS 단백질의 유비퀴틴화를 억제하여 분해를 막지만, UbcH5, Parkin, β -TCRP 같은 유비퀴틴 효소 발현에는 영향을 미치지 않았다. 즉, Ex-4는 Uch-L1 같은 탈유비퀴틴 효소의 발현을 감소시켜 iNOS 단백질의 유비퀴틴화를 증가시켜 산화질소 감소를 통해 베타세포를 보호하였다.

결론적으로 전염증성 사이토카인에 의한 HIT-T15 베타세포주의 소포체 스트레스는 산화질소의 증가를 통해 유발되었고, 소포체 스트레스에 의한 소포체 샤페론 GRP78, 94와 CHOP의 증가는 베타세포주의 사멸을 유도하였다. 이는 GLP-1 수용체 자극제인 Ex-4에 의해 소포체 샤페론의 감소 및 Uch-L1 같은 탈유비퀴틴 효소의 발현을 감소시켜 다유비퀴틴화에 따른 iNOS 단백질 분해로 인한 산화질소 양의 감소는 소포체 스트레스 반응을 제어하는 것으로 나타나게 되고, 이는 인슐린 유전자의 발현 또한 향상시킨다. 이러한 연구 결과는 GLP-1이 소포체 스트레스를 유발할 수 있는 여러 단계의 과정을 조절하여 소포체 스트레스에 따른 베타세포의 보호효과를 기대해 볼 수 있으며, 당뇨병의 예방 및 치료에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

참고문헌

1. Ronn SG, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T: Diabetes and suppressors of cytokine signaling proteins. *Diabetes* 56:541-548, 2007
2. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM: Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741-748, 2000
3. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM: The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:411-421, 2002
4. Kim JY, Lee SK, Baik HW, Lee KH, Kim HJ, Park KS, Kim BJ: Protective effects of glucagon like peptide-1 on HIT-T15 beta cell apoptosis via ER stress induced by 2-deoxy-D-glucose. *Korean Diabetes J* 32:477-487, 2008
5. Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW: Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes* 51:311-316, 2002
6. Sarkar SA, Kutlu B, Velmurugan K, Kizaka-Kondoh S, Lee CE, Wong R, Valentine A, Davidson HW, Hutton JC, Pugazhenth S: Cytokine-mediated induction of anti-apoptotic genes that are linked to nuclear factor kappa-B (NF-kappaB) signalling in human islets and in a mouse beta cell line. *Diabetologia* 52:1092-1101, 2009
7. Kharroubi I, Ladriere L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL: Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. *Endocrinology* 145:5087-5096, 2004
8. Pugazhenth S, Velmurugan K, Tran A, Mahaffey G, Pugazhenth S: Anti-inflammatory action of exendin-4 in human islets is enhanced by phosphodiesterase inhibitors: potential therapeutic benefits in diabetic patients. *Diabetologia* 53:2357-2368, 2010
9. Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman R, Orntoft T, Eizirik DL: Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes* 50:909-920, 2001
10. Parkash J: Inflammatory cytokine signaling in insulin producing beta-cells enhances the colocalization correlation coefficient between L-type voltage-dependent calcium channel and calcium-sensing receptor. *Int J Mol Med* 22:155-163, 2008
11. Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL: TNF-alpha and IFN-gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine* 6:399-406, 1994
12. Kang JH, Chang SY, Jang HJ, Kim DB, Ryu GR, Ko SH, Jeong IK, Jo YH, Kim MJ: Exendin-4 inhibits interleukin-1beta-induced iNOS expression at the protein level, but not at the transcriptional and posttranscriptional levels, in RINm5F beta-cells. *J Endocrinol* 202:65-75, 2009
13. Weissman AM: Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:169-178, 2001