

# 3T3-L1세포에서의 포도당 대사에 대한 D-Chiro-Inositol의 영향

을지대학교 의과대학 내과학교실, 한국건강관리협회<sup>1</sup>, 충남대학교 의과대학 내과학교실<sup>2</sup>

박강서 · 이재민<sup>1</sup> · 구본정<sup>2</sup> · 조영석 · 이성규 · 민경완 · 한경아 · 김효정 · 김현진

## The Effects of D-Chiro-Inositol on Glucose Metabolism in 3T3-L1 Cells

Kang Seo Park, Jae Min Lee<sup>1</sup>, Bon Jeong Ku<sup>2</sup>, Young Suk Jo, Seong Kyu Lee, Kyung Wan Min, Kyung Ah Han, Hyo Jeong Kim, Hyun Jin Kim

Department of Internal Medicine, Eulji University School of Medicine;

Korea Association of Health Promotion<sup>1</sup>; and

Department of Internal Medicine<sup>2</sup>, Chungnam National University School of Medicine

### Abstract

**Background:** The target of the treatment of metabolic syndrome and diabetes is an improvement of insulin resistance. D-chiro-inositol (DCI) plays a role in a phospholipid mediating intracellular insulin action. In the previous studies, the urine level of DCI were decreased in the diabetic animal with insulin resistance. Some clinical studies showed that DCI improved a glucose level and HbA1c. Therefore we studied the relationship between DCI and glucose metabolism, especially insulin resistance.

**Methods:** To investigate the mechanism of DCI affecting the glucose metabolism, we examined the effects of DCI on 2-deoxyglucose uptake, gene expression of adipocytokines and AMPK pathway by using RT-PCR and western blot in 3T3-L1 cells.

**Results:** Insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake increased in DCI-treated cells by about 1.2-fold (relative to the control) and was inhibited by phosphoinositide 3-kinase (PI3 Kinase) inhibitors (Wortmanin, LY294002) and AMPK inhibitor (STO-609). In Western blot analysis, it didn't show the difference of phosphorylation of Akt and AMPK between DCI-treated group and control in 3T3-L1 cells. However, DCI decreased the gene expression of resistin in 3T3-L1 cells.

**Conclusion:** DCI may involve other pathway of insulin signaling, but not PI3 Kinase and AMPK signaling pathways and it may be useful in managing metabolic syndrome by improving insulin resistance through increasing glucose uptake and decreasing resistin relevant to insulin resistance. (KOREAN DIABETES J 32:196-203, 2008)

**Key Words:** Adipocytokine, Diabetes, D-Chiro-Inositol, Insulin resistance, Metabolic syndrome

## 서 론

대사증후군 (Metabolic syndrome)은 인슐린저항성을 근간으로 하는 비만, 고혈압, 이상지혈증과 내당능 장애 및 당뇨병 등이 동반되어 나타나는 증후군이다<sup>1,2</sup>. 인슐린저항성

(insulin resistance)이란 조직에서 정상 인슐린 농도에서 반응을 보이지 않는 병적인 상태로 포도당과 지질 대사 유지를 하지 못하는 상태를 일컫는다<sup>3,4</sup>. 특히, 비만은 인슐린저항성을 유발하는 중요한 원인이며, 지방세포로부터의 분비되는 아디포사이토카인 (adipocytokine)도 인슐린저항성과

연관이 되어 있다<sup>5,6)</sup>. 인슐린저항성은 여러 질병 상태와 관련이 되어 있고, 특히 제2형 당뇨병의 발생에 중요한 역할을 하고 있으며, 심혈관질환의 발생에도 깊이 관여되어 있다<sup>7-11)</sup>. 현재 인슐린저항성 개선을 위한 치료법이 시행되고 있으며, 지속적으로 연구가 진행 중이다<sup>12,13)</sup>.

D-chiro-inositol (DCI)은 인슐린의 신호 전달 과정 중 존재하는 신호 전달 물질로서 glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)이 인지질 분해효소 (phospholipase)에 의해 분해되는 인지질 중의 하나이다<sup>14)</sup>. 이는 세포 내 인슐린 작용을 매개하는 인지질로 발견되었으며, 비산화과정 (non-oxidative) 및 산화 (oxidative)과정의 반응속도제한효소인 pyruvate dehydrogenase와 glycogen synthase의 탈인산화를 유도한다<sup>15-17)</sup>. 1954년 당뇨병환자에게서 신장 배출이 감소하는 것이 발견된 이후<sup>18)</sup>, 비비만 제2형 당뇨병 모델인 GK쥐에서 24시간 소변 배출이 감소<sup>19)</sup> 및 당뇨병환자에게서의 DCI의 대사 장애가 있음이 확인되었으며<sup>20)</sup>, 스트렙토조신-유발 당뇨병 쥐에게 투여 시 혈당이 개선되는 것이 보고되었다<sup>21)</sup>. 또한 인슐린저항성으로 진행시 소변 내의 배출이 감소되어, 인슐린저항성과의 연관성이 있음을 시사하였다<sup>22-25)</sup>. 그래서 DCI의 투여가 인슐린저항성을 개선시킴으로써 그로 인한 많은 병적 상태를 해결할 수 있을 것으로 생각되어진다.

기존의 연구들은 DCI 투여 후의 효과에 대한 것들이 대부분이며, 실제 포도당 대사과정과 인슐린저항성에 관여하는 인자들과의 연관성에 대한 연구는 극히 드물다. 따라서, 연구자들은 DCI의 포도당 대사, 인슐린 신호전달 과정 및 아디포사이토키닌과의 연관성에 대해서 알아보기 위해 본 연구를 수행하였다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 연구 재료

Total Akt와 phospho-Akt의 항혈청은 New England Biolab사 (Ipswich, MA)에서 구입하였으며, Wortmannin과 LY294002는 Santa cruz Biotech사 (Santa cruz, CA)로부터 구입하였다. D-chiro-inositol은 (주)바이오 솔루션 (Daejeon, Korea)으로부터 제공받았다. 이외의 모든 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO)의 제품을 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

세포는 3T3-L1 인간 지방전세포주 (American Tissue Culture Collection, ATCC)를 이용하였으며, 이들의 배양은 이미 기술된 방법을 이용하였다<sup>26)</sup>. 성장을 위한 배지는 10% 우태

혈청 (Biofluid, Rockville, MD)에 25 mM glucose, 3.7 g NaHCO<sub>3</sub>, 10 mL penicillin (10,000 U/mL), 10 mL streptomycin (10,000 µg/mL)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Life technologies, Grand Island, NY)을 사용하였으며, 신선 배양액을 2일 또는 3일마다 보충하여 계대배양 하였다. 배양조의 온도는 37°C로 유지하였으며, 95%의 산소와 5%의 이산화탄소를 공급하였다.

### 3. 포도당 이용률 (Glucose Uptake)

2-deoxyglucose (2-DOG) 이용률을 측정하기 위해 배지를 50 mM HEPES와 0.1% 지방산이 포함되지 않은 우태 혈청 알부민 (essentially fatty acid free bovine serum albumin)이 포함된 신선한 DMEM에서 포도당 농도를 동등하게 유지하고, DCI와 다른 시약을 첨가 후 실험 전 2시간을 놓아 두었다. 실제 포도당 이동을 측정하기 전에 세포는 37°C에서 HEPES-buffered Krebs 용액 (KR-H: NaCl 137 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.85 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.3 mM, KCl 4.8 mM, HEPES 50 mM)으로 세 번 세척하였다. 그런 후 약 20분간 2 mM KR-H를 첨가하여 배양하였다. 포도당 이동 시작 전 0.25 mL 1.8 mM 2-DOG (Amersham, England)를 10분간 첨가한 후 2-DOG 이용률이 차례대로 선상으로 나타났다. 포도당 이동을 종료하기 위해, 세포들을 ice-cold KR-H로 세 번 세척 후 세포들을 0.1% sodiumdodecylsulphate에 용해시킨 후 cell lysate는 10 mL 섬광용액 (scintillation fluid)에 용해 후 계산하였다.

### 4. 실시간 중합효소연쇄반응 (Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR))

DCI 투여에 따른 아디포사이토키닌에 대한 영향을 보기 위해 3T3-L1 세포에 아무것도 처리하지 않은 대조군과 DCI를 100 µM과 1 mM을 처리하고, 24 시간 후 RNA를 추출하여 RT-PCR을 시행하였다. RNA는 3T3-L1 cell에서 easy-BLUE™ Total RNA 추출 키트 (iNtRON Biotechnology Inc., Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Inc., Hanover, MD), 25 pM oligo (dT)15, PCR premix Sapphire (Super Bio Co., LTD., Suwon, Korea)로 cDNA로 변환시켰다. Real-Time PCR은 DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Finland)를 사용하여 시행하였다. 각 primer는 Bioneer사 (Korea)나 Geno Tech사 (Korea)로부터 제작 구입한 것을 사용하였다. 사용된 primer는 다음과 같다.

- 렙틴 (Leptin):  
sense 5'-GTTTGGATCTTGGGTTTTC-3'  
anti-sense 5'-ACATCACATCACCCCTCAG-3'
- 레지스틴 (Resistin):  
sense 5'-CTATTTTCAACCAGAGGCAC-3'  
anti-sense 5'-TCCTTCCACCATGTAGTTTC-3'
- 베타액틴 ( $\beta$ -actin):  
sense 5'-ACGGTCAGGTCATCACTATC-3'  
anti-sense 5'-AATGTAGTTTCATGGATGCC-3'

각각의 cDNA 1  $\mu$ L, forward primer (10 pmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, reward primer (10 pmol/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, DyNAmo<sup>TM</sup>HS SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Finland) Premix (X2) 용액 10  $\mu$ L, 증류수 7  $\mu$ L를 혼합한 후 PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research)를 사용하여 각각의 유전자 조건에 맞는 PCR을 시행하였다. PCR은 95°C에서 5분 유지 후, 첫 cycle을 95°C에서 30초, 50°C (렙틴) - 52°C (레지스틴)에서 45초, 72°C에서 45초로 하였고, 이것을 39회 더 반복한 후 72°C에서 5분 유지 후 4°C에서 종결하였다. Melting Curve 분석은 65°C에서 95°C사이에서 하였다. PCR 산물은 1% agarose 겔에서 전기영동 한 후 밴드를 확인하였다.

## 5. Western Blot Analysis

DCI의 작용 경로를 알아보기 위해 인슐린 신호전달 중간 과정에 존재하는 주요 단백질인 Akt와 포도당의 대사와 관계된 AMPK의 인산화 정도를 알아보았다. 이를 위해 대조군과 DCI만을 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM의 농도로 처리하고, 30분 후에 세포를 얻어 단백질을 분리한 후 Western blotting을 시행하였다. Western blot을 위하여 세포를 Phosphate Buffered Saline으로 잘 세척한 후 SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 30% glycerol, 125 mM DTT, 0.03% bromophenol blue)로 용해시키고, 세포를 끓은 후 21 gauge needle을 통과시켜 genomic DNA를 파괴하고 원침하여 cell lysate를 만들었다. 이것을 이용하여 biotinylated molecular weight standard marker와 함께 sodiumdodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)하고, electroblotting apparatus를 이용하여 1 시간 동안 nitrocellulose membrane으로 blot하였다. Blot된 membrane은 blocking buffer (1  $\times$  TBS, 0.1% Tween-20 with blocking reagent, 5% milk)에 담가서 일차항체 (anti-Akt, anti-phosphorylated form (Ser473, Thr308) of Akt, anti-AMPK, anti-phosphorylated form of AMPK)들과 4°C에서 밤새 반응시켰다. Membrane을 HRP가 중합된 이차항체에 120분간 반응시킨 후 세척한 다음 chemiluminescent detection

system (Phototope<sup>®</sup>-HRP Western Blot Detection Kit, New England Biolab. Beverly, MA)을 이용하여 현상하였다.

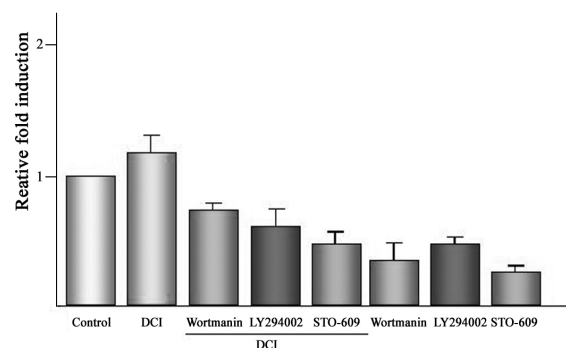
## 6. 자료처리 및 분석

단백질 정량은 Bradford법 (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하였고, 표준은 bovine serum albumin을 통해 측정하였으며, 포도당 이용률은 3회 반복하여 평균을 측정하였다. DCI 투여에 따른 아디포사이토키인의 실시간 중합효소연쇄 반응은 4회 반복하여 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 통계 처리는 일원배치 분산분석 (Analysis of variance)으로 하였다.  $P < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

### 1. DCI 투여에 따른 포도당 이용률의 변화

DCI를 투여한 군은 대조군에 비해서 상대적으로 약 1.2배 정도 포도당 이용률이 증가하였다. 또한 PI3 Kinase inhibitor (Wortmannin, LY294002)와 AMPK inhibitor (STO-609)를 DCI와 첨가하였을 경우에는 포도당 이용률이 감소함을 확인하였다 (Fig. 1). 이 결과 DCI는 3T3-L1 세포에서 포도당 이용률을 상대적으로 증가시키고, PI3 Kinase와 AMPK 하부 경로와 연관이 있을 것으로 생각하였다.



**Fig. 1.** Effect of DCI on glucose uptake. DCI-induced glucose uptake is increased and is decreased by PI3 Kinase inhibitor (Wortmannin, LY294002) and AMPK inhibitor (STO-609), relatively. After a 2 hrs starvation period, 3T3-L1 cells were preincubated with 100  $\mu$ M DCI for 10 min. 5 mM NaCl was added as control for the osmotic effect. The 3T3-L1 cells were cultured in 10% FBS-DMEM media. In glucose uptake used by 2-deoxyglucose, DCI increased about 1.2 fold relative to control and inhibited by PI3 Kinase inhibitor (Wortmannin, LY294002) and AMPK inhibitor (STO-609).

## 2. DCI의 인슐린 신호 전달 과정에 대한 작용

대조군과 비교하였을 경우 DCI는 Akt를 전체 양은 용량에 비례하여 증가를 보였으나, 인산화 (Ser473, Thr308)에는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2A). AMPK에서도 전체 양은 Akt와 마찬가지로 용량에 비례하여 증가하였으나, 인산화는 대조군과 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2B).

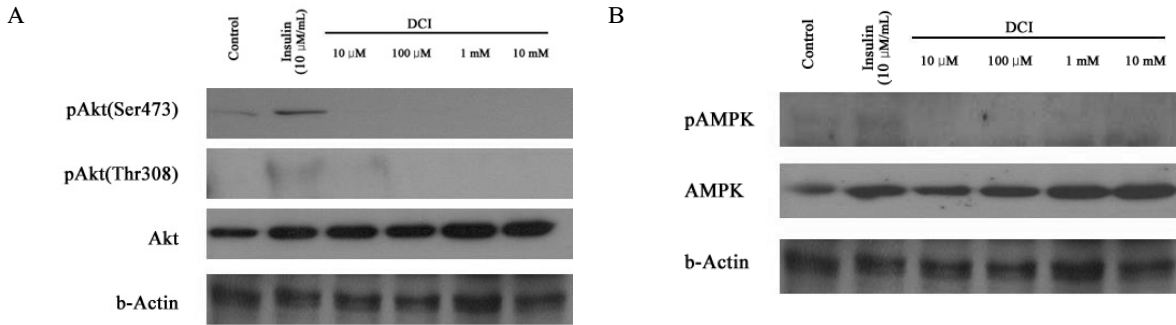
## 3. DCI 투여에 따른 아디포사이토카인의 영향

렙틴 유전자 발현의 경우, 대조군 1에 비해 DCI 100  $\mu$ M과 1 mM 각각에서 유전자 발현이  $0.93 \pm 0.09$ 와  $1.56 \pm$

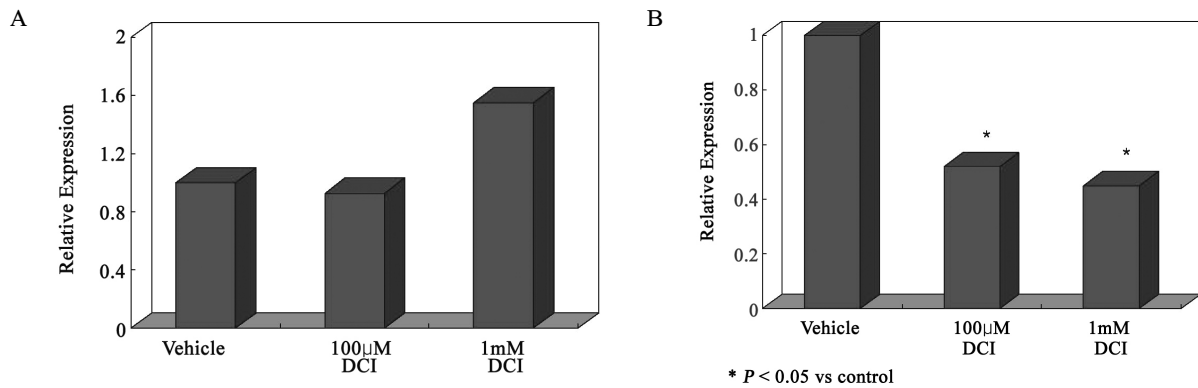
0.49로 통계적으로 유의하게 변하지 않았다 (Fig. 3A). 레지스틴 유전자 발현의 경우, 렙틴과 다르게 DCI 100  $\mu$ M과 1 mM에서 대조군 1에 비해 각각  $0.52 \pm 0.18$ 과  $0.45 \pm 0.28$ 로 두 농도 모두에서 유전자 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3B).

## 고 찰

본 연구를 통하여 3T3-L1 인간 지방전세포주에 DCI 투여를 통해 포도당 이용률 개선을 보여주었으며, 이러한 효과는 인슐린 신호 전달 경로 중 PI3 Kinase 경로와 AMPK



**Fig. 2.** Effects of DCI on Akt and AMPK. A. phosphorylation of Akt. B. phosphorylation of AMPK. It didn't show phosphorylation of Akt and AMPK between DCI-treated group and control. The 3T3-L1 cells were cultured in 10% FBS-DMEM media. At 30 minutes after insulin (10  $\mu$ g/mL) or DCI (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1 mM, 10 mM) treatment, total cell lysates were resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-Akt, anti-phospho (Ser473, Thr308), anti-AMPK, anti-phospho AMPK antibodies. The blot developed by ECL.



**Fig. 3.** Effects of DCI on adipocytokines. A. Leptin gene expression after 24 hours-treatment. B. Resistin gene expression after 24 hours-treatment. Analysis of variance (ANOVA) was done among the three groups (Vehicle, DCI 100  $\mu$ M and 1 mM groups). DCI 100  $\mu$ M or 1 mM decreased significantly ( $P < 0.05$ ) the gene expression ( $0.52 \pm 0.18$  or  $0.45 \pm 0.28$ ) of resistin in 3T3-L1 cells ( $n = 4$ ), compared to Vehicle group. DCI 100  $\mu$ M or 1 mM did not change significantly the gene expression ( $0.93 \pm 0.09$  or  $1.56 \pm 0.49$ ) of leptin in 3T3-L1 cells ( $n = 4$ ), compared to Vehicle group. Extraction of total RNA and quantitative real-time RT-PCR were performed as described under Materials and Methods. Leptin and resistin gene expression normalized to  $\beta$ -actin mRNA level is relative to untreated control (vehicle) cells.

경로가 아닌 다른 경로를 통해서 이루어짐을 유추할 수 있었으며, 인슐린저항성에 관여되는 아디포사이토카인과 관련이 있음을 확인하였다.

인슐린은 표적 세포에 각각 2개의  $\alpha$ 와  $\beta$  아단위 (subunit)로 구성된 인슐린 수용체 (insulin receptor)와 결합하여 포도당 대사에 관여한다<sup>27-29)</sup>. 이러한 결합은 인슐린수용체의 형태 변화를 유도하여, 세포 내 위치한  $\beta$ -아단위의 Tyrosine-인산화 인슐린 수용체 기질들에 의한 PI3 Kinase와 Akt 같은 인지질을 활성화시킴으로써 GLUT4의 전위 (translocation)를 유발하는데 매우 중요하다. 인슐린 자극에 의한 GLUT4 전위에 PI3 Kinase 의존성 경로 외에도 c-Cbl과 c-Cbl-associated protein (CAP) dimer complex를 통한 PI3 Kinase와 무관한 경로를 통한 것도 보고되고 있다<sup>30)</sup>. 즉, 인슐린은 여러 경로를 통한 GLUT4 전위를 유도함으로써 포도당의 조직 내 이용률을 높이고, 혈중 포도당 농도를 일정하게 유지하는데 중요한 역할을 한다.

이러한 인슐린의 작용이 저하되어 포도당의 항상성을 유지하지 못하는 상태를 인슐린저항성이라고 한다<sup>3,4)</sup>. 인슐린 저항성은 많은 질병과 연관이 있으며, 여러 가지의 요인에 의해 나타날 수 있다. 특히, 지방세포에서 분비되는 아디포 사이토카인들은 많은 기전에 의해 인슐린저항성<sup>31)</sup>이나 당뇨병<sup>32)</sup> 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 아디포카인으로는 렙틴 (leptin), 종양괴사인자 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 아디포넥틴 (adiponectin), 인터루킨-6 (interleukin-6), 유리지방산, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), 레지스틴 (resistin) 등이 있다<sup>33)</sup>.

D-chiro-inositol (DCI)은 인슐린 신호 전달 과정 중 존재하는 신호 전달의 물질로서 glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)이 여러 호르몬이나 사이토카인의 자극에 의해 수화되어 생기는 inositol phosphoglycan (IPG) 중의 하나이다<sup>14)</sup>. GPI를 수화시키는데 많은 호르몬이나 사이토카인이 존재하는데 그중 가장 대표적인 것이 인슐린이며, 이때 생성되는 IPG는 인슐린 신호 전달 체계에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>15-17)</sup>. IPG는 여러 가지의 아형이 있으며, 이중 가장 대표적인 것이 myo-inositol과 chiro-inositol이며 생리적 활성은 입체형에 따라 다른데, L-형보다는 주로 D-형이 활성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. DCI는 myo-inositol의 3번기에 hydroxyl epimerizing된 것으로 pyruvate dehydrogenase와 glycogen synthase의 탈인산화를 유도하여 작용을 나타낸다. 이는 1954년 Lerner 등<sup>18)</sup>에 의해서 당뇨병환자군과 정상인군을 비교했을 때 24시간 소변 myo-inositol 배출이 많아지는 것을 보면서 당뇨병환자군에서 myo-inositol과 chiro-

-inositol의 대사 이상이 있음을 유추하였다.

피니톨은 DCI의 메틸 유도체로 콩과 식물로부터 추출되며, 복용 시 인체에서 생리적으로 활성화 형태인 DCI로 변하는 것으로 알려져 있다<sup>34)</sup>. 포도당 대사에 대한 DCI의 효과를 알아보기 위해 피니톨을 이용한 임상연구들이 시행되었으며<sup>34-36)</sup>, 최근 구 등<sup>37)</sup>의 연구에서는 피니톨의 투여가 당화혈색소 및 공복혈당 강하에 효과가 있음을 보였다.

본 연구에서는 이전의 임상시험에서 나타난 포도당 대사의 개선이 인슐린 신호전달 체계 및 인슐린저항성과 관계된 요인들과의 관계를 알아보기 위해 3T3-L1 세포를 이용하여 실험을 하였다. Bates 등<sup>21)</sup>은 L6 근세포를 이용한 연구에서 DCI의 유도체인 피니톨을 투여 시 세포에서의 포도당 이용률이 증가하고, PI3 Kinase 억제제인 LY294002를 처치하면 세포 내 당흡수가 감소하여, PI3 Kinase 신호전달 체계와 관련이 있을 것으로 보고하였는데, 이는 본 실험에서도 유사한 결과를 나타냈다.

따라서, PI3 Kinase 하부 신호 전달 체계에 대한 영향 및 포도당 대사와 연관된 AMPK<sup>38)</sup>에 대한 영향을 알아보기 위해 3T3-L1 세포주를 DCI로 처리한 후 PI3 Kinase 신호전달체계의 중간 단계인 Akt와 AMPK의 활성화를 인산화를 통해 알아보았다. Akt의 Ser473과 Thr308은 DCI의 농도가 증가함에도 불구하고 인산화되지 못하였다. 또한 AMPK 역시 인산화를 보여주지 못하였다. 이러한 결과는 DCI가 인슐린 신호 전달 과정 중 PI3 Kinase 하향성 신호전달체계를 경유하지 않을 수 있음을 나타내주는 사실이었으며, 또한 AMPK와의 연관성도 없음을 나타내 주었다. 본 저자들은 DCI가 포도당 이용률 개선에 있어서, GLUT4 전위에 어떤 영향을 미칠 것이며, 이에 영향을 주는 PI3 Kinase-비의존 경로인 c-Cbl-CAP complex를 통한 신호전달 체계에 대한 추가적인 규명이 필요함을 확인하였다.

연구자들은 3T3-L1 세포를 이용하여 인슐린저항성과 연관된 아디포사이토카인인 렙틴과 레지스틴에 대한 유전자 발현에 대한 실험을 시행하였다. 렙틴 (leptin)은 주로 지방 조직에서 생산되어지며, 에너지 저장 상태와 지방량을 반영하는 것으로 비만 시 증가하고, 공복 시에는 감소되는 것으로 알려져 있다<sup>39)</sup>. 에너지 대사에 관여하는 렙틴은 제2형 당뇨병환자 중 고인슐린증을 보이는 환자군에서 혈중 농도가 증가가 되어 있는 것으로 알려져 있는데<sup>40)</sup>, 이러한 사실은 인슐린이 지방세포에서 렙틴생산을 자극한다는 것으로 여겨지고 있다<sup>41)</sup>. 따라서 높은 혈중 렙틴 농도는 부분적으로 고인슐린혈증과 연관이 있음을 추론할 수 있다. 하지만 증가된 렙틴 농도와 증가된 인슐린 농도와의 상호 관련성은,

인슐린에 의해 랩틴 분비가 증가하는 것인지 혹은 인슐린저항성에 의해 혈중 인슐린과 혈중 랩틴이 모두 증가하는 것 인지는 아직 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 DCI에 의해서 랩틴의 유전자 발현이 유의하게 변화하지 않았다. 레지스틴은 피하지방보다는 내장지방 (visceral fat)에서 많은 분비를 보이는 아디포사이토키인이다<sup>42)</sup>. Stepan 등<sup>43)</sup>이 비만한 쥐에서 혈중 레지스틴이 증가되어 있고, 인슐린저항성이 없는 정상쥐에 레지스틴을 주입 시 인슐린저항성이 발생하고, 인슐린감작제인 로시글리타존에 노출 시 발현이 감소되는 것을 발견하고, 레지스틴과 인슐린저항성의 연관성을 보고 하였다. 그 이후 동물 모델에서는 비만과 레지스틴의 농도가 비례하며, 항레지스틴항체 투여 시 혈당을 감소시키며, 인슐린저항성을 개선하는 보고가 많았다<sup>39,44)</sup>. 인간에서도 레지스틴이 비만과 연관된 인슐린저항성에 관여한다는 보고가 있다<sup>42)</sup>. 하지만, 인간에서 레지스틴의 생리적인 작용은 아직은 불분명하며, 비만, 인슐린저항성과 당뇨병과의 연관성은 논쟁점으로 남아있다<sup>33)</sup>. 본 연구에서는 DCI 투여군에서 대조군에 비해 용량에 비례하여 상대적으로 랩틴과 레지스틴의 유전자 발현이 감소하였다. 이는 DCI가 아디포사이토키인에 작용함으로써 포도당 대사에 관여됨을 유추할 수 있으며, 이를 통해 인슐린저항성도 개선될 수 있을 것으로 사료되었다.

본 연구는 세포 실험을 통해 DCI가 포도당 이용률, 작용 경로 및 아디포사이토키인 레지스틴에 대한 영향을 보여주었다. 특히, 처음으로 인슐린저항성과 연관된 아디포사이토키인레지스틴과의 연관성을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 유병률이 증가되고 있는 제2형 당뇨병, 비만과 대사증후군의 치료제로 DCI가 이용될 수 있는 가능성을 보여 주었다. 하지만, DCI의 작용 기전을 확인하기 위한 인슐린의 신호 전달 체계에서 PI3 Kinase 의존성 경로 외에는 확인하지 못하였으며, 랩틴과 레지스틴 이외의 아디포사이토키인에 대한 영향은 확인하지 못했다. 향후 포도당 대사에 관련된 인슐린 신호전달 경로를 더욱 더 구체적으로 규명해야 하겠다. 또한 인슐린저항성과 연관된 다른 아디포사이토키인에 대해서도 추가 연구가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

**연구배경:** D-Chiro-Inositol (DCI)은 인슐린 작용을 매개하는 인지질이다. 이전 연구에서 인슐린저항성을 나타내는 당뇨병환자나 동물 모델에서의 소변 배출이 감소하는 것이 보고되었다. 따라서, 저자들은 DCI가 포도당 대사 및 이와

관련된 인자들에 미치는 영향을 알아보고, 아디포사이토키인과의 연관성을 알아보기 위해 본 연구를 수행하였다.

**연구방법:** 3T3-L1 세포에서 2-deoxyglucose를 이용하여 DCI에 의한 포도당 이용률을 측정하고, DCI의 작용 경로를 확인하기 위해 western blot을 시행하였다. 또한 당대사와 관련된 아디포사이토키인과의 연관성을 위해 real-time PCR을 수행하였다.

**결과:** 3T3-L1 세포에서 포도당 이용률은 대조군에 비해 약 1.2배 정도 증가하였으며, 이는 PI3K 억제제와 AMPK 억제제 투여 시 감소하였다. Western blot상 DCI는 Akt와 AMPK의 인산화는 대조군과 차이를 보이지 않았다. 그리고, 레지스틴의 유전자 발현은 상대적으로 감소하였다.

**결론:** DCI는 포도당 이용률을 개선시키며, 이는 인슐린 신호 전달 과정 중 PI3 Kinase 및 AMPK 경로가 아닌 다른 경로에 관여 되어 있을 것으로 사료되었다. 또한 레지스틴을 감소시킴으로써 인슐린저항성의 개선을 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Reaven GM: *Role of insulin resistance in human disease. Diabetes* 37:1595-607, 1988
2. 장학철, 임수, 조남한: 대사증후군의 현황. *대한내과학회지* 67:528-32, 2004
3. Krentz AJ: *Insulin resistance. BMJ* 313:1385-9, 1996.
4. Cefalu WT: *Insulin resistance: cellular and clinical concepts. Exp Biol Med* 226:13-26, 2001
5. Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M: *Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. Clinica Chimica Acta* 375:20-35, 2007
6. Moller DE, Bjorbaek C, Vidal-Puig A: *Candidate genes for insulin resistance. Diabetes care* 19:396-400, 1996
7. Reaven GM: *Pathophysiology of insulin resistance in human disease. Physiol Rev* 75:473-86, 1995
8. DeFronzo RA, Bonnadonna RC, Ferrannini E: *Pathogenesis of NIDDM. A ballanced overview. Diabetes Care* 15:318-68, 1992
9. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadinna R: *Insulin resistance in essential hypertension. N Engl J Med* 317:350-7, 1987
10. Sharniss A, Carroll J, Rosenthal T: *Insulin resistance*

- in secondary hypertension. Am J Hypertens.* 5:26-8, 1992
11. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI: *Seminars in Medicine of Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. N Engl J Med.* 334:777-83, 1996
12. Bailey CJ, Turner RC: *Metformin N Engl J Med* 334:574-9, 1996
13. Olefsky JM: *Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator- activated receptor gamma agonist. J Clin Invest* 106:462-72, 2000
14. Jones DR, Varela-Nieto I: *The role of glycosyl-phosphatidylinositol in signal transduction. Int J Biochem Cell Biol.* 30:313-26, 1998
15. Alan RS, Marvin IS, Steven J, Pedero C: *Putative mediators of insulin action: Regulation of pyruvate dehydrogenase and adenylate cyclase activities. Proc Natl Acad Sci USA* 79:3513-7, 1982
16. Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC, Larnier J: *In vivo D-chiro-inositol activates skeletal muscle glycogen synthase and inactivates glycogen phosphorylase in rhesus monkeys. J Nutr Biochem* 6:499-503, 1995
17. Galasko GT, Abes S, Lilley K, Zhang C, Larnier J: *Circulating factors and insulin resistance. II The action of the novel myo-inositol cyclic 1,2-inositol phosphate phosphoglycan insulin antagonist from human in regulating pyruvate dehydrogenase phosphatase. J Clin Endocrinol Metab.* 81:1051-7, 1996
18. Daughaday WH, Larnier J: *The renal excretion of inositol in normal and diabetic human being. J Clin Invest* 33:326-32, 1954
19. Sun TH, Heimark DB, Nguyen T, Nadler JL, Larnier J: *Both myo-inositol to chiro-inositol epimerase activates and chiro-inositol to myo-inositol ratios are decreased in tissues of GK type 2 diabetic rats compared Wistar controls. Biochem Biophys Biophys Commun.* 293:1092-8, 2002
20. Kennigton AS, Hill CR, Craig J, Bogardus CR, Raz I, Ortmeyer HK: *Low urinary chiro-inositol excretion in noninsulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med* 323:373-8, 1990
21. Bates SH, Jones RB, Bailey CJ: *Insulin-like effect of pinitol. Br J Pharmacol* 130:1944-8, 2000
22. Ostlund RE JR, McGill JB, Herskowitz I, Kipnis DM, Santiago JV: *D-Chiro-Inositol metabolism in diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA* 90:9988-92, 1993
23. Shashkin PN, Shashkina EF, Fernqvist-Forbes E, Zhou YP, Grill V: *Insulin mediators in man: effects of glucose ingestion and insulin resistance. Diabetologia* 40:557-63, 1997
24. Larnier J, Allan G, Kessier C, Reamer P, Gunn R, Huang LC: *Phosphoinositol glycan derived mediators and insulin resistance. Prospects for diagnosis and therapy. J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9:127-37, 1998
25. Asplin I, Galasko G, Larnier J: *chiro-inositol deficiency and insulin resistance: A comparison of the chiro-inositol- and the myo-inositol-containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5924-8, 1993
26. Orlicky DJ, Lieber JG, Morin CL, Evans RM: *Synthesis and accumulation of a receptor regulatory protein associated with lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells. J Lipid Res* 39:1152-61, 1998
27. Nia JB, Roland G, David EJ: *Regulated transport of the glucose transporter GLUT4 Nature molecular biology* 3:267-77, 2002
28. Saltiel AR, Kahn CR: *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature* 414:799-806, 2001
29. Kido Y, Nakae J, Accili D: *The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. J Clin Endocrinol Metab* 86: 972-9, 2001
30. Robert VF: *Insulin-Sensitive Phospholipid Signaling System and Glucose Transport. Update II. Exp Biol Med Vol.* 226:283-95, 2001
31. Chen H: *Cellular inflammatory response: Novel insights for obesity and insulin resistance. Pharmacol Res* 53: 469-77, 2006
32. Zhao YF, Feng DD, Chen C: *Contribution of adipocyte-derived factors to beta-cell dysfunction in diabetes. Int J Biochem Cell Biol* 38:804-19, 2006

33. Ryu ST, Park SO, Kim SH: *The Relation of Serum Adiponectin and Resistin Concentrations with Metabolic Risk Factors. J Kor Soc Endocrinol* 20:444-51, 2005
34. Davis A, Christinansen M, Horowitz JF, Klein S, Hellerstein MK: *Effect of pinitol treatment on insulin action in subjects with insulin resistance. Diabetes Care* 23:1000-5, 2000
35. Kim JI, Kim JC, Kang MJ, Lee MS, Kim JJ: *Effects of pinitol isolated from soybeans on glycemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled study. Eur J Clin Nutr* 59:456-8, 2005
36. Kang MJ, Kim JI, Yoon SY, Kim JC, Cha IJ: *Pinitol from soybeans postprandial blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. J Med Food* 9:182-6, 2006
37. 구본정, 김현진, 박강서: 제2형 당뇨병환자에서 D-chiro-inositol의 혈당강하 효과. *대한내과학회지* 72:29-36, 2007
38. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG: *AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell metab* 1:15-25, 2005
39. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E: *The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin Endocrinol* 64:335-65, 2006
40. Widajaja A, Stratton IM, Horn M, Holman RR, Turner R: *Plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetics. J Clin Endocrinol Metab* 82:654-7, 1997
41. Tanizawa Y, Okuya S, Ishihara H, Asano T, Yada T: *Direct stimulation of basal insulin secretion from isolated rat pancreatic beta cells. Endocrinology* 138:4513-6, 1997
42. McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PI, Barnett AH: *Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. Lancet* 359:46-7, 2002
43. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR: *The hormone resistin link obesity to diabetes. Nature* 259:46-7, 2001
44. Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L: *Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. J Clin Invest* 111:225-30, 2003