

INS-1 세포의 IRS-2 발현과 인산화에 대한 Exendin-4의 효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 내분비내과

김지현 · 김지원 · 전성윤 · 박헌석 · 함동식 · 유영혜 · 이승환 · 조재형 · 강미자 · 이강우 · 권혁상 · 윤건호
차봉연 · 이광우 · 강성구 · 손호영

The Effects of Exendin-4 on IRS-2 Expression and Phosphorylation in INS-1 Cells

Ji-Hyun Kim, Ji-Won Kim, Sung-Yoon Jeon, Heon-Seok Park, Dong-Sik Ham, Young-Hye You, Seung-Hwan Lee, Jae-Hyoung Cho, Mi-Ja Kang, Kang-Woo Lee, Hyuk-Sang Kwon, Kun-Ho Yoon, Bong-Yun Cha, Kwang-Woo Lee, Sung-Koo Kang, Ho-Young Son

Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea

Abstract

Background: Insulin receptor substrate 2 (IRS-2) is a key regulator of beta cell proliferation and apoptosis. This study was aimed to investigate effect of the glucolipotoxicity on apoptosis in INS-1 cell, and the effect of Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, on IRS-2 expression in the glucolipotoxicity induced INS-1 cell. The goal was to discover the new action mechanism and function of Exendin-4 in beta cell apoptosis.

Method: INS-1 cells were cultured in glucolipotoxic condition for 2, 4 or 6 days and were categorized as G groups. Another group in which 50 nM Exendin-4 was added to INS-1 cells, cultured in glucolipotoxic condition, were named as Ex-4 groups. We investigated the expression of IRS-2 by RT-PCR, phosphorylated IRS-2 and phosphorylated Akt protein levels by western blot. We measured the apoptosis ratio of INS-1 cell in glucolipotoxic condition by TUNEL staining in both groups.

Result : IRS-2 expression of INS-1 cells decreased with correlation to the time of exposure to glucolipotoxic condition. pIRS-2 and pAkt protein levels decreased in the similar pattern in glucolipotoxicity group. However, this effect of glucolipotoxicity on INS-1 cell was inhibited by the Exendin-4 treatment. In the Ex-4 groups, IRS-2 expression, pIRS-2 and pAkt protein levels remained at the similar level to low glucose condition state. Also, apoptosis induced by glucolipotoxicity was suppressed by Exendin-4 treatment significantly.

Conclusion: We showed that the long-term treatment of Exendin-4 inhibited the apoptosis of beta cells significantly in glucolipotoxic condition and that this effect of Exendin-4 was related with IRS-2 and Akt among the beta cell's intracellular signal transduction pathway. (KOREAN DIABETES J 32:102-111, 2008)

Key Words: Exenatide, Insulin receptor substrate 2, INS-1 cell

서 론

당뇨병은 포도당 감각 조절의 이상, 인슐린분비장애, 자가면역 기전에 의한 베타세포의 파괴, 말초 인슐린저항성에

대한 부적절한 보상 등의 여러 가지 원인에 의해 베타세포가 인슐린을 부적절하게 분비하여 결과적으로 지속적인 고혈당 상태를 나타내는 질환으로 이러한 만성적인 고혈당으로 인해 고지혈증, 고혈압 등의 전신질환이 발생한다^{1,2)}. 이

러한 당뇨병을 치료하기 위해서 20세기 후반부터 단순한 인슐린의 투여 이외에 근본적으로 베타세포의 보존과 회복을 유도할 수 있는 다양한 치료 방법에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 제2형 당뇨병에서 췌장의 베타세포 기능은 진단 시 이미 정상치의 50% 이하로 감소되어 있으며³⁾ 시간이 지날수록 점차 악화된다고 이미 알려져 있다^{4,5)}. 또한, 사람의 췌장 조직을 이용한 연구에서 제2형 당뇨병환자의 베타세포 용적은 정상 대조군에 비해 60% 이상 감소되어 있으며 이는 베타세포의 형성이나 복제에 비해 세포사멸이 증가하는 기전으로 설명되고 있다⁶⁾. 이와 같이 베타세포의 기능과 용적의 감소가 제2형 당뇨병의 발생과 관련되어 있기 때문에 이러한 과정을 조절할 수 있는 약제에 주목하게 되었고 최근에는 베타세포의 기능과 용적의 감소를 예방하거나 진행을 늦출 수 있는 여러 가지 약물 치료를 개발되고 있으며 이들을 제2형 당뇨병의 초기 치료에 이용할 수 있다고 제시되었다⁷⁾.

1980년대 후반에 Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)이 제1형 당뇨병과 제2형 당뇨병 모델에서 단기적으로 혈당을 낮추는 기능을 가진 잠재적인 insulintropic 호르몬이라는 것이 밝혀졌다. 이 호르몬은 소장에서 분비되어 포도당 농도의 증가에 따른 인슐린분비를 자극하여 식후 혈당을 조절하는 효과가 있다⁸⁾. 최근에는 특정 동물에서 GLP-1의 급속투여가 감소된 베타세포의 기능을 어느 정도 회복시키는 것으로 발표되었지만^{9,11)} GLP-1은 생체 내 dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV)라는 효소에 의해 빠르게 분해되어 반감기가 2~6분 정도로 짧기 때문에 장기간의 효과에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 이에 비해 GLP-1 수용체 작용제인 Exendin-4는 도마뱀(*Gila monster*)의 침샘에서 분리되었으며 NH₂-말단 두 번째 위치의 알라닌이 글리신으로 대체되면서 DPP IV에 대한 저항성을 가지게 되어 반감기가 3시간 정도로 연장된 물질이다¹²⁻¹⁴⁾. 이렇게 지속되는 효과로 인해 Exendin-4는 이미 식후 혈당을 조절하는 약제로 만들어져 임상에서 사용되고 있으며 이러한 세포 내 작용 기전은 췌도세포와 베타세포주인 MIN6 세포에서 세포 내 칼슘 유입과 cAMP 수치를 증가시키고 이를 통해 인슐린의 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다^{15,16)}.

인슐린수용체 기질 2 (Insulin receptor substrate 2 (IRS-2))는 인슐린과 인슐린 유사 성장인자-1 (Insulin like growth factor-1) 신호전달 과정의 기질로 대사성 스트레스 환경에서 베타세포의 증식과 기능, 생존을 증진시켜 당뇨병을 예방하는 역할을 한다. 앞서 언급한 Exendin-4는 IRS-2의 발현을 증진시킬 수 있는 물질로 베타세포에서 IRS-2 신

호전달 과정을 통해 초기 인슐린분비와 함께 베타세포 용적을 증가시키고 말초 인슐린저항성에 대한 보상적인 기능을 한다¹⁷⁻¹⁹⁾.

Exendin-4의 베타세포 내 작용 기전을 좀 더 자세히 살펴보면 우선 GLP1 수용체에 결합한 다음 Gs단백을 통해 adenyl cyclase와 연결되어 cAMP 농도를 증가시키고 이로 인해 protein kinase A (PKA)가 활성화된다. 이렇게 활성화된 PKA는 K_{ATP}와 Ca²⁺ 채널을 활성화시켜 빠르게 인슐린분비를 촉진한다. 이 과정에서 PKA의 주요 기질이자 전사 인자인 cAMP-responsive element-binding protein (CREB)도 활성화되어 cAMP-responsive gene promotor에 있는 CRE 부위와 상호작용하여²⁰⁾ 포도당 농도의 감지와 인슐린분비에 직접적인 역할을 하는 다양한 유전자의 발현을 자극하는데 IRS-2 또한 이러한 과정을 통해 발현이 증가된다^{15,21,22)}. IRS-2 신호전달 과정은 Exendin-4의 장기적인 효과와 연관되어 베타세포의 성장과 생존을 촉진시키고²²⁻²⁶⁾ 세포사멸을 억제하는데 이는 IRS-2가 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase)의 활성화 과정을 통해 Ser/Thr kinase Pdk1과 Akt를 형질막으로 순환시키고 이 과정에서 Akt가 인산화되면서 활성화되어 전사조절 인자인 FOXO1이 핵에서 세포질로 빠져나가는 과정을 통해 나타난다^{27,28)}.

이와 같이 IRS-2가 베타세포의 성장과 생존, 인슐린분비와 관련된 작용을 하며 IRS-2의 상향 조절이 당뇨병을 예방할 수 있다는 연구 결과를¹⁶⁾ 고려해보면 IRS-2의 발현 감소가 당뇨병의 발생과 진행에 영향을 미칠 수 있다고 생각되며, Exendin-4가 IRS-2 신호 전달 과정을 통해 베타세포의 성장과 기능을 향상시킬 수 있다는 결과를²³⁾ 토대로 임상에서 단순한 혈당 조절만이 아니라 근본적인 베타세포의 기능 향상을 위한 당뇨병 치료의 하나로 Exendin-4를 사용할 수 있다.

최근에는 Exendin-4가 정상 베타세포에서 수용체와 결합한 다음 IRS-2의 mRNA 발현과 인산화를 증진시켜 Akt 인산화를 유도한다는 새로운 작용기전에 대한 보고가 있었으나²³⁾ 당뇨병 상태에서 관찰되는 포도당-지방 독성 상태에서의 작용에 대한 연구는 보고된 바 없다.

포도당-지방 독성은 제2형 당뇨병의 병인을 설명하는 가설로 최근에 제시되었고 당뇨병 상태와 가장 유사한 조건으로 생각된다. 이는 세포 내 포도당과 지방과다에 의해 에너지 대사에 이상을 초래하여 인슐린의 저항성과 함께 베타세포의 기능저하 및 세포사멸을 유도하고 인슐린분비를 감소시켜 당뇨병의 원인으로 작용할 수 있으며 당뇨병의 진행을 가속화시키는 중요한 기전의 하나이다²⁹⁻³¹⁾.

따라서 본 연구는 제2형 당뇨병의 중요한 원인 기전으로

알려진 포도당-지방 독성 상태에서 IRS-2의 발현과 인산화 정도를 관찰하고 포도당-지방 독성에 노출된 베타세포에 Exendin-4의 처리가 IRS-2의 발현과 인산화에 미치는 영향을 규명하여 실제로 IRS-2가 감소된 당뇨병 모델에서 Exendin-4의 세포 내 작용 기전과 효과에 대하여 알아보고 현재 임상에서 사용되고 있는 GLP-1 작용제의 새로운 세포 내 작용기전을 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1. INS-1 세포의 배양 조건

베타세포주인 INS-1 세포(passage 21~30)는 10 mM HEPES, 5.6 mM D-glucose, 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol과 항생제(100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin; 이상 Sigma Chemical, St. Louis, MO)가 포함되어 있는 RPMI 1640 배양액으로 5% CO₂를 포함한 습기가 있는 공기 내에서 37°C로 배양하였다.

2. 췌도 분리(Islet Isolation)와 배양 조건

쥐의 췌장에서 췌도를 분리하기 위해 Hanks' balanced salt solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 이상 GIBCO, Grand Island, NY), 그리고 Collagenase P (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)를 사용하였다.

250 g의 수컷 쥐를 마취한 후 절개부위를 소독한 후 복강을 열고 십이지장 쪽을 들어 올려 췌관의 주행을 확인한 후 십이지장의 개구 부위를 찾아 전사로 묶었다. 간 방향으로 췌관의 시작부위를 박리시킨 후 췌관에 칼집을 내어 PE-50 tube (Becton Dickinson)를 삽입하고, collagenase P (1 mg/mL)를 7 mL를 채운 주사기와 연결하여 천천히 주입하였다. 췌장이 잘 부풀면 췌장을 십이지장 쪽부터 잘 떼어 내어 50 mL 튜브(cornical tube, TPP®, Switzerland)에 넣고 37°C에서 25분간 소화시킨 후에 10% FBS가 포함되어 있는 차가운 M199 배지(M199, GIBCO)를 첨가하여 20회 정도 손으로 흔들었다. 이를 500 μ m 그물망(Sigma-Aldich)에 통과시키고 원심분리로 상층액을 완전히 제거한 다음 histopaque 1077 (Sigma-Aldich)을 넣어 침전물과 완전히 섞은 후에 M199 배지를 넣은 후 원심 분리하였다. 이렇게 해서 얻어진 중간층의 세포를 추출해서 nicotinamide, HEPES, bicarbonate, L-arginin, 10% FBS, 항생제(penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL; 이상 Sigma Chemical)

가 포함된 DMEM (5.6 mM glucose) 배양액을 이용하여 2 일 간격으로 배양액을 교체하면서 5% CO₂를 포함한 습기가 있는 공기 내에서 37°C로 배양하였다.

3. 포도당-지방독성의 유도

포도당 독성은 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 (INS-1 세포) 혹은 DMEM (분리 췌도) 배양액에 포도당을 추가하여 포도당 농도가 33.3 mM이 되도록 만들고 지방 독성은 0.2 mM oleate와 0.2 mM palmitate를 1대 2로 혼합하여 처리하였다. 포도당-지방 독성은 위의 두 가지 독성조건을 합하여 유도하였다.

4. 췌장 베타세포의 생존률 비교 및 관찰

췌도 세포 수는 췌도 직경 150 μ m를 기준(Islet Equivalent number, IEq)으로 환산하여 계산하였으며, 췌도 세포의 생존률은 AO (acridine orange: 0.67 M)/PI (propidium iodide: 75 M)를 9:1로 췌도 세포에 떨어뜨린 후 살아있는 췌도를 백분율로 표시하였다.

5. TUNEL (Terminal Deoxy nucleotidyl Transferase-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling) 염색

AopTag™ In Situ Apoptosis Detection Kit (Oncor, Gaithersburg, MD)를 사용하여 동정하는데 각 군의 세포 배양액을 제거한 후 PBS (pH 7.4)로 세척하였다. 조직 내의 단백질을 분해하기 위하여 proteinase K (20 μ g/mL)로 37°C에서 15분간 처리하고 증류수로 세척하였다. Equilibration buffer로 5~10분간 처리하고 TdT enzyme과 reaction buffer 혼합액으로 37°C에서 15시간 처리하여 염색질 분절에 의해 형성된 3'-OH DNA 말단을 digoxigenin으로 표지하였다. Working strength stop/wash buffer로 37°C에서 30분간 처리하여 반응을 종결시킨 후 PBS로 2번 세척하였다. Anti-digoxigenin-peroxidase을 30분간 실온에서 반응시키고, Tris buffer (pH 7.4)를 이용하여 3번 세척한 후 0.05% 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride와 0.033% H₂O₂ 혼합액(0.01 M TB, pH 7.6)으로 발색시킨 후 hematoxyline으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 이때 사멸된 세포의 숫자는 200배율 하에서 20군데를 관찰하여 그 합을 숫자로 나타내었다.

6. RNA 분리 및 RT-PCR 분석

각 시기의 시료들을 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 용액을 이용하여 총 RNA를 분리하였고 정량(UV/VIS

Table 1. PCR primer sequences and their product size

Primer		Sequences (5'~3')	Product size (bp)	Annealing (°C)
IRS-2	Sense	AGCTGGTGGTAGTCATACCC	390	54
	Antisense	CAGGTTCATATAGTCAGA		
Insulin	Sense	CAAGCAGGTCCTCACCCC	151	58
	Antisense	CACACCAGGTACAGCGCC		
GAPDH	Sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	60
	Antisense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA		

Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop)하였다. 시료들에서 분리한 RNA 2 µg을 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer, dNTP Mix (10 mM each)와 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음에서 식혔다. 여기에 5 × strand buffer, 100 mM dithiothreitol (DTT), RNase OUTTM (40 units/µL), 그리고 SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (200 unit; Invitrogen)로 cDNA를 합성시켰다. 본 연구를 위한 PCR primer 서열은 Table 1과 같다. Perfect PreMix (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan) 10 µL, template cDNA < 500 ng, 25 pM primer를 이용하여 PCR을 실행하였다. RT-PCR 산물은 반응물의 일부를 1.5% 한천겔에서 전기 영동하여 측정하였다. mRNA 발현 수준을 비교하기 위하여 GAPDH와의 상대적인 비율을 확인하였다.

7. Western Blot

세포를 RIPA 완충용액(50 mM Tris-Cl, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL leupeptin, 1 mM Na₂CO₃, 1 mM NaF)을 이용하여 단백질을 추출하고, Bradford assay를 이용하여 정량화 한 후에 SDS-PAGE로 전이시키고, 5% 탈지유를 이용하여 반응을 차단하였다. 이후 각각의 특이항체들(pIRS-2, pAKT, 최종 희석 1:1000)을 이용하여 반응시키고 HRP-conjugated 이차항체를 반응시킨 후에 ECL (Enhanced chemiluminescence) kit를 이용하여 X-ray 필름에 노출시켰다.

8. 포도당-지방독성 노출기간 결정 및 인슐린유전자 발현 비교

실험에서 포도당-지방 독성 조건은 33.3 mM의 포도당과 0.6 mM의 지방산 혼합액에서 배양된 경우로 G군(Glucolipotoxicity)으로 표기하였고 대조군으로 5.6 mM의 정상 포도당 농도에서 배양된 경우 L군(Low glucose)으로 표기하였다.

실험은 우선 포도당-지방 독성 노출 기간의 적절한 시점

을 결정하기 위해 분리 채도를 포도당-지방 독성 조건의 배양액에서 각각 2일, 4일, 8일간 노출시킨 다음(G군) 포도당-지방 독성으로 인한 세포사멸 효과를 확인하기 위하여 AO/PI 염색을 시행하였고 이와 같은 조건에서 배양한 INS-1 세포는 TUNEL 염색을 시행하였다(Fig. 1A). 또한 G군에서 1일, 2일, 3일 동안 노출시킨 분리 채도 세포를 정상 포도당 농도의 배양액에서 자란 분리 채도 세포(L군)와 비교하여 인슐린유전자 발현의 변화를 확인하기 위해 RT-PCR을 시행하였다(Fig. 1B).

9. Exendin-4 처리 농도 결정: Cyclic AMP Assay

Cyclic AMP ParameterTM (R&D Systems, TECHNE Corporation, MN)을 이용하여 측정하였으며 INS-1 세포를 6 well 배양용기(NUNCTM, Roskilde, Denmark)에 3×10^5 개 세포를 분주하여 1일간 배양한 다음 세 군으로 나누어 Exendin-4 (Sigma Chemical)를 각각 0 nM, 10 nM, 100 nM 농도로 15분간 처리하여 각 군의 시료를 모으고 이를 시약 및 표준시료와 함께 일차항체용액과 반응시킨 다음 cAMP와 결합시켰다. 이후 3시간 동안 반응시킨 후 45 nm에서 파장을 읽어 cAMP 농도를 계산하였다(Fig. 1C).

10. INS-1 세포의 조건 처리

INS-1 세포를 시험관 하에서 포도당-지방 독성조건으로 각각 2일, 4일, 6일간 노출시킨 군(G군)과 이와 같은 조건에 50 nM Exendin-4를 처리한 군(G + Ex군)에서 IRS-2와 인슐린 발현 정도를 RT-PCR로 확인하고 western blot을 이용하여 인산화된 IRS-2 단백질과 인산화된 Akt 단백질을 확인하였다. 또한 정상 포도당 농도 조건에서 배양한 세포(L군)들도 이와 같은 조건에서 2일, 4일, 6일간 Exendin-4를 처리한 군(L + Ex군)의 세포들과 비교하여 IRS-2와 인슐린 발현 정도와 인산화된 IRS-2 및 Akt 단백질을 확인하였다(Fig. 1D). 이후 INS-1 세포를 G군과 G + Ex군에서 각각 2일, 4일, 6일간 배양하고 각 군의 세포를 TUNEL 염색하여 현미경으로 세포사멸을 관찰하였다(Fig. 1E).

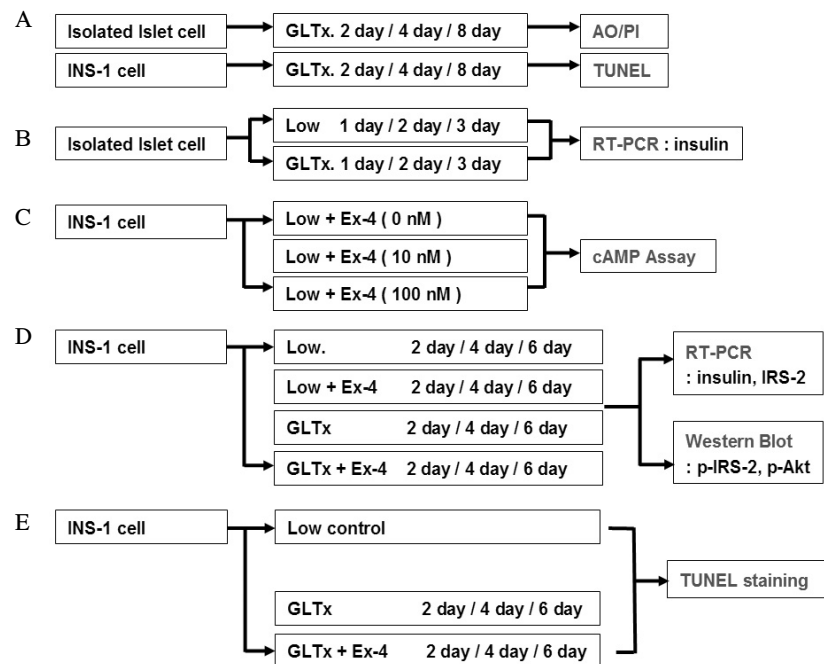


Fig. 1. Schematic of experimental design. A. Apoptosis measurement of isolated islet cell and INS-1 cell in glucolipotoxicity condition by AO/PI and TUNEL staining. B. Insulin gene expression of isolated islet cell in glucolipotoxicity condition. C. Confirmation of Exendin-4 concentration for INS-1 cell treatment using cAMP assay in three concentration group (Ex-4 0, 10, 100 nM). D. General scheme of INS-1 cell culture were separated into four groups: low glucose condition, low glucose + 50 nM Exendin-4, Glucolipotoxic condition (GLTx.), GLTx + 50 nM Exendin-4. Insulin and IRS-2 gene expression was measured by RT-PCR and phosphorylated IRS-2 and Akt protein was measured by western blot. E. Apoptosis of INS-1 cell in GLTx group and GLTx + 50 nM Exendin-4 group were measured by TUNEL staining.

11. 통계분석

각 실험은 3회 이상 반복하였고 실험 결과는 평균 \pm 표준오차(standard error)로 표시하였으며 통계 분석은 SPSS 11.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, Illinois)을 사용하였다. 각 군 간의 비교는 paired t-test를 이용하여 검정하였으며 통계적인 유의 수준은 P 값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 포도당-지방 독성 조건에서 췌도 세포사멸과 인슐린 유전자의 발현

포도당-지방 독성이 세포사멸에 미치는 효과를 확인하기 위해 G군의 췌도 세포를 AO/PI 염색한 결과 노출 시간이 각각 2일, 4일, 8일로 증가하면 이에 비례하여 췌도 세포사멸도 증가하였고 8일째에는 세포가 포도당-지방 독성으로 인해 췌도 세포 중심부터 사라져 거의 모든 세포가 사멸하였다(Fig. 2A). 이는 G군의 INS-1 세포의 TUNEL 염색에서도 마찬가지로 나

타나 포도당-지방 독성 조건에 노출이 길어질수록 갈색으로 나타나는 세포사멸이 증가하였다(Fig. 2B). 이에 비해, 같은 방법으로 정상 포도당 농도에 노출시킨 대조군인 L군에서는 노출 시간이 증가하여도 세포사멸이 증가하지 않았다.

또한 G군의 췌도 세포들은 각각 1일, 2일 3일간 배양했을 때 L군과 달리 노출 기간이 길어질수록 인슐린유전자 발현 정도가 점차 감소하였다(Fig. 3).

2. 적절한 Exendin-4의 농도 결정

베타세포에서 Exendin-4의 여러 작용 기전과 인슐린분비량이 cAMP 농도의 증가와 관련이 있음을 고려하여 INS-1 세포를 배양할 때 Exendin-4를 처리한 군(G+Ex군, L+Ex군)의 배양 조건으로 적절한 농도를 결정하기 위해 cAMP Assay를 시행하였다. 그 결과 Exendin-4의 농도 0 nM과 10 nM에서는 cAMP의 농도가 큰 차이를 보이지 않았으나 100 nM의 농도에서 측정된 cAMP 수치는 월등히 높아지는 것을 확인하여(Fig. 4) 중간 농도인 50 nM의 Exendin-4를 투여하여 각 실험을 진행하였다.

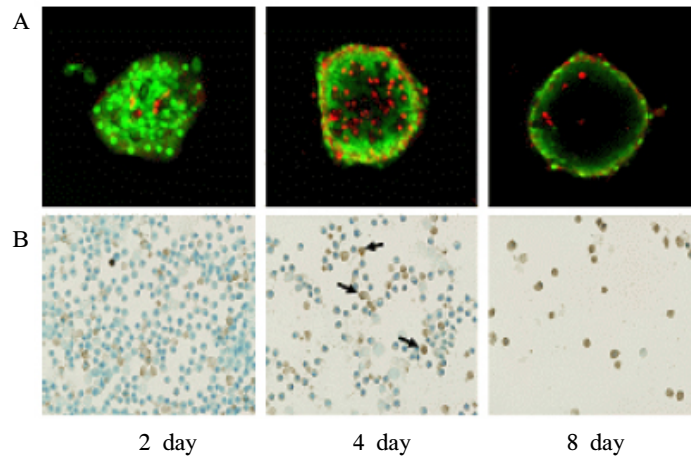


Fig. 2. Apoptosis of the isolated islet cell in glucolipotoxic condition. A. Apoptosis according to the exposure time (2, 4, 8 days) in AO/PI. B. Apoptosis of INS-1 cell in TUNEL staining (arrow: apoptotic cells). Few islet cells were survived in glucolipotoxic condition during 8 days in glucolipotoxic condition ($\times 400$).

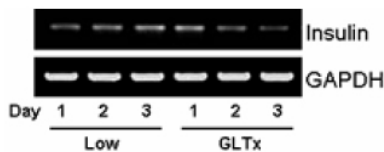


Fig. 3. Effect of the glucolipotoxic condition on insulin gene expression in isolated islet cells. Insulin was estimated by RT-PCR. GLTx: glucolipotoxicity.

3. Exendin-4가 IRS-2 유전자 발현에 미치는 영향

INS-1 세포를 L군과 L + Ex군에서 각각 2일, 4일, 6일 동안 배양한 후 RT-PCR을 시행하여 유전자 발현을 비교한 결과 L군에서는 그림에 나타나지 않았지만 배양 기간이 길어져도 유전자 발현에 차이가 없는데 반해 L+Ex군에서는 Exendin-4에 대한 노출 기간이 길어짐에 따라 IRS-2와 인슐린유전자 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

같은 기간 동안 각각 G군과 G + Ex군에서 배양한 INS-1 세포들도 마찬가지로 RT-PCR을 시행한 결과 G군의 INS-1 세포는 노출 기간이 길어짐에 따라 인산화된 IRS-2 발현이 L군과는 달리 지속적으로 감소하며 앞서 확인한 바와 같이 인슐린유전자의 발현 역시 감소하였다. 이에 비해 G + Ex군의 세포들은 G군에서 나타난 인슐린과 IRS-2 발현 감소가 억제되어 L군과 비슷한 정도의 유전자 발현을 나타내었다. 그리고 이러한 포도당-지방 독성조건으로 인한 인슐린 및 IRS-2의 발현 감소를 보호하는 Exendin-4의 효과는 기간이 길어짐에 따라 더 뚜렷하게 나타났다(Fig. 5).

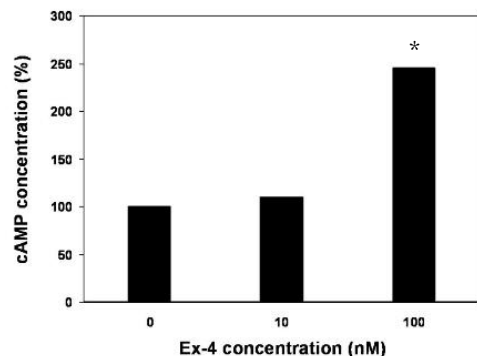


Fig. 4. Effect of exendin-4 concentration on Cyclic AMP levels in INS-1 cells. There was little difference in mean value of cAMP levels between 0 nM and 10 nM of Exendin-4 concentration. But, the mean value of cAMP levels in 100 nM of Exendin-4 was significantly higher than that of 10 nM of Exendin-4 concentration. * $P < 0.05$ vs. Ex-4 0 nM.

4. Exendin-4가 인산화된 IRS-2와 Akt 단백질에 미치는 영향

INS-1 세포를 L군과 L + Ex군에서 각각 2일, 4일, 6일 동안 배양한 후 Western blot으로 INS-1 세포의 단백질 변화를 확인한 결과 L군에서 2일, 4일, 6일 동안 배양된 군 간에는 변화가 없었으나 L+Ex군에서는 L군에 비해 시간이 지남에 따라 인산화된 IRS-2와 Akt 단백질의 수준도 RNA 발현과 마찬가지로 증가하였으며(Fig. 6A) G군의 세포들은 노출 기간이 길어질수록 인산화된 IRS-2와 Akt 단백질이 점차로 감소하였다. 그러나 G + Ex군의 경우 인

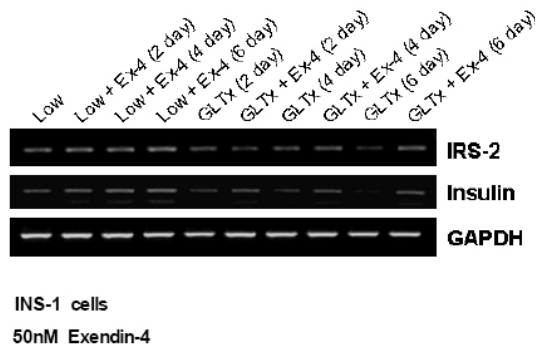


Fig. 5. IRS-2 and insulin gene expression on glucolipotoxic condition vs 50 nM exendin-4 treatment group in INS-1 cells. IRS-2 and insulin gene expression were increased in Exendin-4 treatment group compared with control and glucolipotoxic condition.

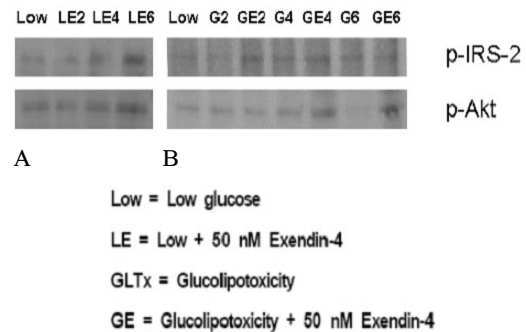


Fig. 6. Phosphorylated IRS-2 and pAkt protein levels in glucolipotoxic condition and effect of the exendin-4 on pIRS-2 and pAkt. A. pIRS-2 and pAkt were increased in Exendin-4 treatment group according to the exposure duration compared with the control group. B. Protective effect of the Exendin-4 treatment that inhibited pIRS-2 and pAkt protein reduction in glucolipotoxic condition.

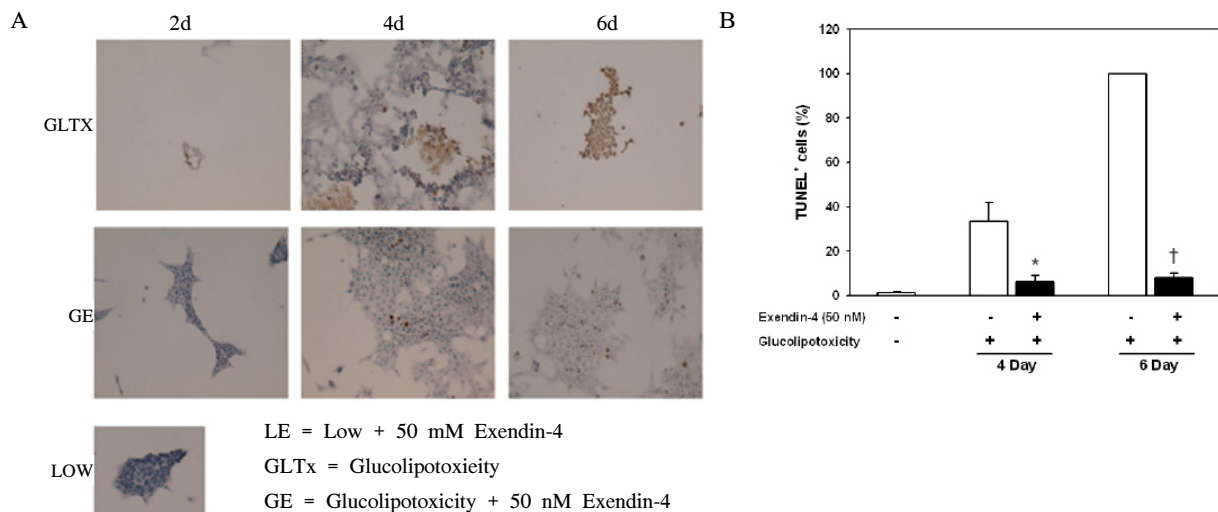


Fig. 7. The effect of Exendin-4 on apoptosis in glucolipotoxic condition. A. INS-1 cell apoptosis was progressed in glucolipotoxic condition according to prolongation of exposure but, Exendin-4 treatment in the same condition inhibited apoptosis in TUNEL staining ($\times 400$). B. The apoptosis rate was decreased in Exendin-4 treatment condition significantly (* $P < 0.05$, † $P < 0.01$).

산화된 IRS-2 단백질량은 정도가 미약하지만 증가하는 경향을 보였으며 인산화된 Akt는 단백질량의 증가가 저명하게 나타났다(Fig. 6B).

5. 포도당-지방 독성조건에서 Exendin-4가 세포사멸에 미치는 영향

세포사멸을 확인하기 위해 G군에서 2일, 4일, 6일 동안 배양한 INS-1 세포와 G + Ex군의 세포를 TUNEL 염색을

시행하여 비교한 결과 G군에서는 노출기간이 길어짐에 따라 세포사멸이 증가하여 6일째 군에서는 거의 모든 세포가 사멸하였으나 G + Ex군에서는 앞서 나타난 세포사멸이 확연히 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 7A). 이러한 결과로부터 전체 세포 중에 사멸한 세포의 백분율을 계산하여 세포사멸 비율을 구한 결과 G + Ex군에서 G군에 비해 4일군($P < 0.05$)과 6일군($P < 0.01$) 모두에서 세포사멸이 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 7B).

고 찰

베타세포에서 인슐린의 세포 내 신호전달에 중요한 역할을 하는 기질 중 하나인 Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)는 외부 환경에 대한 베타세포의 보상적 증식과 기능항진 및 생존을 증진시켜 당뇨병을 예방하는 역할을 할 수 있으며 IRS-2의 발현 감소는 당뇨병의 발생과 진행에 영향을 미칠 수 있다.

Exendin-4는 이러한 IRS-2의 발현을 증진시킬 수 있는 물질로 베타세포에서 다양한 신호전달 체계를 통해 작용하는데 이는 크게 인슐린의 분비, 베타세포의 증식 유도 및 사멸 억제 세 가지 기능으로 구분된다. 포도당 부하에 의한 인슐린분비는 IRS-2 신호 전달체계와는 독립적으로 cAMP의 작용기전에 의하여 나타나는데²⁰⁾ Exendin-4가 GLP1 수용체에 결합하여 빠르게 인슐린분비를 촉진하면 이렇게 분비된 인슐린의 자가조절 기전으로 인해 다시 insulin/IGF-1 수용체 신호전달 과정을 통한 IRS-2의 활성화가 유도된다. 또한 이러한 인슐린분비 과정에서 PKA의 주요 기질이자 전사 인자인 CREB이 활성화되어 포도당 농도의 감지와 인슐린분비에 직접적인 역할을 하는 다양한 유전자와 IRS-2의 발현이 증가한다^{15,21,22)}. 이러한 IRS-2의 발현 증가와 활성화는 베타세포의 증식을 유도하고 사멸을 억제하는 작용을 나타내는데 이는 PI3-kinase의 활성화 과정을 통해 Akt가 인산화되고 FOXO1이 핵에서 세포질로 빠져나가는 과정을 통해 나타나며^{27,28)} 이는 c-src kinase를 통한 표피 성장 인자 수용체(Epidermal growth factor receptor)의 상호 활성화 과정과도 관련되어 나타난다³²⁾. 또한 IRS-2는 직접적으로 설치류와 사람의 베타세포에서 세포의 증식과 사멸을 조절하는 PDX-1의 발현 증가를 유도한다³³⁾. Exendin-4는 이와 같은 다양한 과정을 통해 초기 인슐린분비와 베타세포 용적을 증가시키고 말초 인슐린저항성을 보상하는 기능을 하여¹⁷⁻¹⁹⁾ 베타세포의 작용 증진과 내당능 향상을 유도하고 베타세포의 성장과 생존을 촉진시킨다²⁴⁻²⁶⁾.

Exendin-4에 의한 베타세포의 성장에는 IRS-2 신호전달 체계가 중요한 역할을 한다는 것이 확인되었으며²³⁾ 본 연구에서는 GLP-1 수용체 작용제의 이러한 다양한 작용 중에서 당뇨병 상태에서의 베타세포의 사멸과 관련하여 Exendin-4의 효과와 작용 기전을 확인하고자 하였다.

본 연구는 베타세포의 기능 이상과 사멸을 유도함으로써 제2형 당뇨병 발생에 중요한 병인의 하나로 알려진 포도당-지방 독성 상태에서 IRS-2의 발현과 인산화 정도를 관찰하였으며 정상 포도당 농도의 배양 조건에서도 Exendin-4의

투여로 인슐린분비 증가, 세포의 성장 및 증식과 관련된 인자인 IRS-2가 증대됨을 확인하였고 이는 당뇨병의 예방에도 중요하게 이용될 수 있다고 생각한다. 포도당-지방 독성을 이용한 베타세포 사멸에 관한 여러 가지 실험을 위해서는 4일 이상의 노출이 적합하다는 것을 먼저 확인하였고 이에 따라 실험을 진행한 결과 실제 포도당-지방 독성조건에서 노출이 길어짐에 따라 IRS-2의 발현이 감소하고 세포사멸이 증가한다는 것을 확인하였으며 이와 함께 인슐린의 발현도 감소하는 것을 확인하였다. 인산화된 IRS-2와 Akt 단백질도 이러한 조건에서 점차 감소함으로 인해 IRS-2에서 Akt로 이어지는 신호전달 과정이 세포사멸과 관련이 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 포도당-지방 독성에 노출된 베타세포에서 Exendin-4의 처리가 IRS-2의 발현과 인산화에 미치는 영향에 대한 실험에서 Exendin-4가 포도당-지방 독성으로 인한 IRS-2의 발현 감소를 유의하게 보호하는 효과가 있음을 확인하였고 이는 같은 조건에서 인산화 된 IRS-2와 Akt 단백질의 감소도 마찬가지로 억제하여 IRS-2와 Akt 단백질이 증가하는 것을 관찰함으로써 당뇨병 상태에서 Exendin-4의 효과를 확인할 수 있었다. 결과적으로 Exendin-4가 당뇨병 상태에서 발생하는 베타세포 사멸을 감소시킨다는 것을 보여주었으며 이러한 기전의 하나로 IRS-2와 Akt 경로가 이와 관련되어 작용하는 것임을 확인할 수 있었다. 또한 Exendin-4의 투여로 인해 인슐린발현이 증가하는 것을 확인하였으며 이러한 기전은 앞서 언급한 바와 같이 IRS-2와는 독립적인 경로를 통해 나타나는데 포도당-지방 독성조건에서 억제된 인슐린의 발현이 Exendin-4의 처리로 인해 회복되는 것도 확인되어 현재 그 기전을 정확히 알지 못하지만 향후 이러한 과정에 대한 규명이 필요하다고 생각한다.

결론적으로 포도당-지방 독성상태로 인한 당뇨병 상태에서 GLP-1 수용체 작용제인 Exendin-4의 투여 시간이 길어짐에 따라 베타세포의 사멸이 감소하는 효과를 확인하였고 이것이 베타세포 내 신호전달 과정 중 IRS-2와 Akt에 관련된 경로를 통해 나타나는 효과임을 알 수 있었다. 이미 임상에서 이 약제를 당뇨병의 치료제로 사용하고 있지만 당뇨병 모델에서 베타세포 사멸에 대해 앞서 결과와 같은 보호 효과를 갖는 것을 고려한다면 임상적으로 장기적인 치료의 효과를 기대할 수 있을 것으로 보이며 당뇨병 이외에도 내당능 장애 혹은 공복혈당 장애에서도 효과가 있을 것으로 생각된다. 다만 INS-1 세포를 이용한 In vitro 실험임을 감안할 때 향후 In vivo 실험에서도 이와 같은 효과를 규명해야 하겠으며 이러한 세포전달과정 이외에도 여러 가지 경로를 통해 베타세포의 성장, 작용, 생존이 일어날 수 있음을 생각하

여 그 경로에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

연구배경: 베타세포에서 Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)는 외부 환경에 대한 베타세포의 보상적 증식과 기능항진 및 생존을 증진시키는 역할을 한다. 본 연구는 포도당-지방 독성이 유도된 베타세포 주에서 IRS-2 발현 정도를 관찰하고 이 조건하에서 GLP-1 수용체 작용제인 Exendin-4의 투여가 IRS-2 발현에 미치는 영향을 관찰하여 이 약제의 새로운 효과와 세포 내 작용 기전을 밝히고자 하였다.

방법: 베타세포주인 INS-1 세포를 고농도 포도당과 지방산이 함유된 배양액에서 각각 2일, 4일, 6일 동안 배양하여 포도당-지방 독성에 노출시킨 군과 이와 같은 조건에 Exendin-4를 추가하여 지속적으로 배양액에 처리한 군 간에 IRS-2의 발현 정도를 비교하였다. IRS-2는 RT-PCR로 측정하였으며 인산화된 IRS-2와 Akt 단백질의 정량은 western blot을 이용하여 확인하였다. 또한 베타세포 사멸에 대한 포도당-지방 독성과 Exendin-4의 효과를 TUNEL 염색으로 비교하였다.

결과: INS-1 세포는 포도당-지방 독성 조건에서 노출 기간이 길어짐에 따라 IRS-2의 발현이 점차 감소하고 인산화된 IRS-2와 Akt 단백질량도 감소하였다. 이런 효과는 같은 조건에서 Exendin-4를 투여한 경우 IRS-2 발현과 이로 인한 인산화된 IRS-2 단백질의 감소가 모두 억제되었으며 인슐린 유전자 발현의 감소 및 세포사멸도 Exendin-4 투여로 인해 뚜렷하게 억제되는 것을 확인하였다.

결론: 포도당-지방 독성으로 유도된 당뇨병 상태에서 GLP-1 수용체 작용제인 Exendin-4는 투여 시간이 길어짐에 따라 베타세포의 사멸을 뚜렷하게 감소시키는 효과가 있으며 이것이 베타세포 내 신호전달 과정 중 IRS-2와 Akt에 관련된 경로를 통해 나타나는 효과임을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW: *Type 2 diabetes. principles of pathogenesis and therapy.* Lancet 365:1333-46, 2005
2. Reaven G, Tsao PS: *Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: the key player between cigarette smoking and cardiovascular disease?* J Am Coll Cardiol 41:1044-7, 2003

3. Holman RR: *Assessing the potential for α -glucosidase inhibitors in prediabetic states.* Diabetes Res Clin Pract 40(Suppl):S21-S25, 1998
4. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).* Lancet 352:837-53, 1998
5. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34).* Lancet 352:854-65, 1998
6. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: *β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.* Diabetes 52:102-10, 2003
7. Wajchenberg BL: *β -Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment.* Endocrine Reviews 28:187-218, 2007
8. Creutzfeldt W: *The incretin concept today.* Diabetologia 16:75-85, 1979
9. 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 49:741-8, 2000
10. Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB: *The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab 283:E745-52, 2002
11. Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM: *Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats.* Endocrinology 141:4600-5, 2000
12. De Fronzo RA, Ratner RE, Han J, Kim D, Fineman MS, Baron AD: *Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care 28:1092-100, 2005
13. Giannoukakis N: *Exenatide. Amylin/Eli Lilly.* Curr

- Opin Investig Drugs* 4:459-65, 2003
14. Drucker DJ: *Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. Diabetes Care* 26:929-40, 2003
 15. Jhala US, Canettieri G, Srean RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White MF, Montminy M: *cAMP promotes pancreatic-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. Genes Dev* 17:1575-80, 2003
 16. Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, Schubert M, Fisher TL, Dow MA, Leshan R, Zakaria M, Mossa-Basha M, White MF: *Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β cells prevents diabetes. J. Clin. Investig* 112:1521-32, 2003
 17. Doyle ME, Egan JM: *Glucagon-like peptide-1. Recent Prog Horm Res* 56:377-99, 2001
 18. Kjems LL, Holst JJ, Volund A, Madsbad S: *The Influence of GLP-1 on Glucose-Stimulated Insulin Secretion Effects on β -Cell Sensitivity in Type 2 and Nondiabetic Subjects. Diabetes* 52:380-6, 2003
 19. Holst JJ: *Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1. Diabetes Metab. Res. Rev* 18:430-41, 2002
 20. Habener JF, Kemp DM: *Diabetes Mellitus. In LeRoith D, Teylon SI, Olefsky JM. A Fundamental and Clinical Text. 3rd Ed. p. 99-113. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004*
 21. Chepurny OG, Hussain MA, Holz GG: *Exendin-4 as a Stimulator of Rat Insulin I Gene Promoter Activity via bZIP/CRE Interactions Sensitive to Serine/Threonine Protein Kinase Inhibitor Ro 31-8220. Endocrinology* 143:2303-13, 2002
 22. Holz GG: *Epac: A New cAMP-Binding Protein in Support of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Mediated Signal Transduction in the Pancreatic β -Cell. Diabetes* 53:5-13, 2004
 23. Park SM, Dong X, Fisher TL, Dunn S, Omer AK, Weir G, White MF: *Exendin-4 Uses Irs2 Signaling to Mediate Pancreatic Cell Growth and Function. J. Biol. Chem* 281:1159-68, 2006
 24. Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M: *Protein Kinase C Activation Mediates Glucagon-Like Peptide-1 -Induced Pancreatic β -Cell Proliferation. Diabetes* 50:2237-43, 2001
 25. Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE, Polonsky KS, Naji A, Birnbaum MJ: *Regulation of pancreatic-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKB. Nat. Med* 7:1133-7, 2001
 26. Buteau J, El Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M: *Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. Diabetologia* 47:806-15, 2004
 27. Lawlor MA, Alessi DR: *PKB/Akt, a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? J. Cell Sci* 114:2903-10, 2001
 28. Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, Wright CV, White MF, Arden KC, Accili D: *The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. J. Clin. Investig* 110:1839-47, 2002
 29. Roche E, Maestre I, Martin F, Fuentes E, Casero J, Reig JA, Soria B: *Nutrient toxicity in pancreatic beta-cell dysfunction. J Physiol Biochem* 56:119-28, 2000
 30. Robertson RP: *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. J Biol Chem* 279:42351-4, 2004
 31. Rossetti L, Giaccari A, De Fronzo RA: *Glucose toxicity. Diabetes Care* 13:610-30, 1990
 32. Jhala US, Canettieri G, Srean RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J: *cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. Genes Dev* 13:1575-80, 2003
 33. Giorgino F, Laviola L, Leonardini A, Natalicchio A: *GLP-1: a new approach for type 2 diabetes therapy. Diabetes Res. Clin. Prac* 74:S152-5, 2006
- lyceridemia. Metabolism* 28:901-7, 1979