

고농도 포도당에 노출된 INS-1세포와 백서 췌도 세포에서 포도당 산화 및 Reactive Oxygen Species (ROS) 생성

영남대학교 의과대학 내과학교실

윤지성 · 원규장 · 이형우

Glucose Oxidation and Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in INS-1 Cells and Rat Islet Cells Exposed to High Glucose

Ji Sung Yoon, Kyu Chang Won, Hyoung Woo Lee

Department of Internal Medicine, Yeungnam University College of Medicine

- Abstract -

Background: Chronic exposure of pancreatic islets to supraphysiologic concentrations of glucose causes beta cell dysfunction that is a process known as glucose toxicity. It has been reported that hyperglycemia increases the production of reactive oxygen species (ROS) in human islets and that ROS accumulation causes beta cell dysfunction associated with low capacity of intrinsic antioxidant enzymes. Also it has been postulated that this increase in ROS is prevented by an inhibitor of electron transport chain complex. The purpose of this study were to determine whether prolonged exposure of pancreatic islets to supraphysiologic glucose concentrations disrupts the intracellular balance between ROS thereby causing defective insulin secretion and to evaluate the site of hyperglycemia-induced ROS production.

Methods: INS-1 cells & rat islets were incubated in increasing concentrations of glucose and either an inhibitor of complex I & II (TTFA), an uncoupler of oxidative phosphorylation (CCCP), aCCA, etc and also incubated in increasing concentration of glyceraldehyde and N-acetylcystein. Then intracellular peroxide levels by flow cytometric analysis and glucose induced insulin secretion were detected.

Results: We observed that incubation with 30 mM glucose increased intracellular peroxide levels but decreased glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) ($P < 0.05$). Exposure to TTFA, CCCP, aCCA did not reduce this increased intracellular peroxide levels, and did not increase GSIS ($P < 0.05$). 24-h incubation with glyceraldehyde at 5.6 mM glucose increased intracellular peroxide levels and decreased insulin content.

Conclusion: These observations indicate that there might be other origins in which ROS species are produced besides electron transport chain in mitochondria and glyceraldehyde may be a key molecule to produce ROS, and induce beta cell dysfunction. (*J Kor Diabetes Assoc* 30:246~253, 2006)

Key Words: Diabetes Mellitus, Glucose toxicity, Glyceraldehyde, Oxidative stress, Reactive oxygen species

서 론

당뇨병에서 만성적인 고혈당 상태는 여러 기관의 구조적, 기능적 독성 작용을 일으키게 되어 당뇨병성 망막병증, 신병증, 신경병증, 대혈관 질환 등의 합병증을 유발하고, 베타 세포 또한 이차적 합병증의 목표가 되어 고혈당이 지속되고 높아질수록 베타세포 기능이 악화되고 인슐린 분비가 점점 줄어들면서 결국 그 기능을 상실하게 된다¹⁾. 이처럼 췌장 소도베타세포가 장기간 고혈당에 노출되었을 때 인슐린 mRNA, 및 인슐린유전자 전사인자, 인슐린 분비능 등이 감소하는 것을 포도당 독성 (glucose toxicity)이라고 하며²⁻⁷⁾, 그 기전으로는 포도당 자가산화, 당화작용에 의한 최종당화산물 형성, c-myc 유도과 PKC 활성화, glyceraldehyde-3-P, dihydroxyacetone phosphate와 같은 반응성 해당 중간 산물의 증가, hexosamine 경로, 솔비톨 형성 등이 있으며⁸⁻¹⁴⁾, 이 과정들은 공통적으로 포도당 대사 과정에서 세포 내 반응성 산소기 (ROS)의 생성을 증가시키고 이에 의한 산화스트레스가 세포 기능을 저하시켜 포도당 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. ROS는 생리적 농도에서는 항상성을 유지시키지만¹²⁾, 장기간 과도하게 축적이 되면 만성적인 산화 스트레스와 부작용을 유발하게 되는데, 특히 자체의 항산화 방어기전이 약한 췌장소도세포에 상당히 민감한 반응을 유발하여, 인슐린 유전자 발현에 필수적인 전사인자인 PDX-1¹⁵⁾이나 MafA^{6,16-18)} 등의 결핍으로 인한 인슐린 mRNA 발현 저하 및 인슐린 분비능 저하, apoptosis 증가를 야기한다고 한다. 최근 여러 세포들에서 고농도 포도당에 의해 생성된 ROS는 항산화제의 투여⁷⁾나 항산화 효소¹⁹⁾ 및 heat shock protein 70²⁰⁾ 등의 발현증가를 통해 포도당 독성을 일부 방지할 수 있었다는 보고들이 있고, 또한 미토콘드리아의 전자전달계 복합체 저하에 의해 감소된다는 보고들도 있다^{11,14)}.

또한 glyceraldehyde는 포도당 대사과정에서 형성되어 단기적으로는 인슐린 분비를 증가시키는 것으로 알려져 있지만²¹⁻²⁴⁾, 장기간 고농도의 glyceraldehyde에 노출될 경우 일부는 enediol radical anion을 형성하게 되어 췌장 소도세포의 인슐린 분비능을 감소시킨다는 보고도 있어^{12,21,25)} glyceraldehyde의 정확한 작용에 대해서는 자세히 알려져 있지 않다.

이에 저자들은 췌장 소도세포가 장기간 고농도의 포도당이나 glyceraldehyde에 노출되었을 때 ROS 생성과 인슐린 분비에 미치는 영향을 알아보고, 세포 내 ROS 생성 위치를 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

1) INS-1 세포 배양

INS-1 세포²⁶⁾는 37°C, 90% 공기 및 10% CO₂상태에서 10% 우태아 혈청, 11.1 mM 포도당, 10 mM HEPES, pH 7.4, 10.2 mM L-glutamine, 50 mM sodium pyruvate, 2.5 mM β-mercaptoethanol, streptomycin (0.1 mg/mL) 그리고 penicillin (100 U/ml)을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 전 배양하였고 passage 21 - passage 29를 이용하였다. 각각의 실험 조건을 위해 포도당 농도를 조절하였다.

2) 백서 췌장 소도의 분리 및 배양

췌장 소도의 분리는 이전에 보고된 바와 같이^{27,28)} 180 - 250 g의 Wistar 수컷 백서에서 collagenase와 Ficolll 농도차를 이용하여 췌장 소도를 분리하였다. 먼저 실험동물을 마취시킨 후 준비된 4°C HBSS 배지를 담관 내로 주입하고 팽창된 췌장을 취하여 4°C HBSS 배지를 포함한 petri dish에서 안과용 가위로 5분간 잘게 썰고, 잘게 썬 췌장은 collagenase (2.5 mg/mL)로 37°C 항온 수조에 20분간 방치한 후, 10% 우태아 혈청이 포함된 HSSS 배지를 섞어 1,200 rpm으로 2분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 침전된 조직액을 취하였다. 침전된 조직액에 다시 10% 우태아 혈청이 포함된 HSSS 배지를 섞어 원심분리를 반복한 후 침전된 조직액 2.5 mL를 취하여 Ficolll density gradient (density 1.085, 1.075, 1.045)상태의 50 mL 시험관에서 1,500 rpm으로 25분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 시험관의 윗부분 2개 층에서 췌장소도를 수거하여 10% 우태아 혈청이 포함된 4°C RPMI-1640 배지를 섞어 다시 1,200 rpm 으로 5분간 원심분리한 후 상층액은 버리고 침전된 췌장 소도를 취하였다. 이 과정을 반복한 후 분리된 췌장 소도를 저배율 입체 현미경하에서 파이펫으로 채취하여 준비된 접시로 옮겼다. 기저 배양액으로 RPMI-1640 배지를 사용하며, 포도당 농도는 3 mM 또는 11 mM로 하였고, 배양액에는 10% 우태아 혈청 및 1% penicillin과 streptomycin을 함유시켰다. 37°C, 95% 공기 및 5% CO₂ 상태에서 24시간 췌장 소도를 전 배양한 후, 췌장 소도를 실험에 사용하였다. 이후 췌장 소도 100개를 저배율 입체 현미경하에서 파이펫으로 채취하여 24-well plate의 각 well로 분주하였다.

2. 고농도의 포도당 노출에 의한 ROS 생성 및 인슐린 분비능 측정

백서 췌장소도 세포와 INS-1 세포주를 사용하였다. INS-1 세포주는 11.1 mM 포도당이 포함된 RPMI에서 전 배양 후 사용하였다. INS-1 세포는 5.6 mM, 30 mM의 포

도당에서, 백서 췌장소도 세포는 11.1 mM, 30 mM 포도당에서 72시간 배양한 후 각각의 flow cytometer에 의한 peroxide fluorescence intensity와 세포 내 peroxide치, 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능 (GSIS, glucose stimulated insulin secretion)을 rat insulin ELISA kit (Mercodia, Sweden)로 측정하였다.

1) Flow cytometer에 의한 세포 내 peroxide치 측정

세포 내 peroxide는 oxidant-sensitive fluorescein-labeled dye인 carboxy-H₂DCFDA (Molecular Probe, Eugene, USA)를 이용하여 flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, USA)로 측정하였다. 측정하고자 하는 세포들은 5 μ M carboxy-H₂DCFDA로 30분간 염색해 사용하였다. INS-1 세포의 경우, 5.6 mM 포도당, 30 mM 포도당에서 72시간 배양 후 각각 세포 내 peroxide 치를 측정하였고, 백서 췌장소도 세포에서는 11.1 mM 포도당과 30 mM 포도당에서 72시간 배양하여 세포 내 peroxide 치를 측정하였다. 또한, 각각의 세포에서 측정된 peroxide fluorescence intensity를 수치로 정량화하였다.

2) 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능의 측정 및 측정

포도당 자극에 의한 인슐린 분비능 (GSIS, glucose stimulated insulin secretion)은 각각의 실험 환경에서 10개의 분리된 백서 췌장소도 세포 또는 10⁶개의 세포 주를 이용하여 Krebs-Ringer buffer (118.5 mM NaCl, 2.54 mM CaCl₂, 1.19 mM KHP₂O₄, 4.74 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.19 mM Mg SO₄, 10 mM HEPES, 0.1% BSA, pH 7.4)에서 INS-1 세포에서는 4 mM 포도당과 16.7 mM 포도당에서 2시간 배양하여 측정하였다. 백서 췌장소도 세포에서는 5.6 mM 포도당과 16.7 mM 포도당에서 1시간 배양하여 측정하였다.

3) D-Glyceraldehyde 노출에 의한 ROS 생성 및 인슐린 분비능, 인슐린 양 (content) 측정

분리된 백서 췌장소도 세포를 0, 0.1 mM, 0.5 mM, 1.0 mM, 2.5 mM, 5 mM의 glyceraldehyde 및 5 mM의 glyceraldehyde와 N-acetylcysteine (NAC)를 함께 24시간 배양시켜 상기 방법으로 세포 내 peroxide를 측정하고, 95:5 ethanol/acetic acid 용액을 이용하여 췌장소도에서 추출된 것으로 10 소도 세포 단위당 인슐린 양을 측정하였다. 그리고 각각 5.6 mM과 30 mM의 포도당에 노출시켜 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능을 측정하여 glyceraldehyde의 농도의존적인 영향 및 NAC의 효과에 대해 살펴보았다.

4) 세포 내 ROS 생성의 억제

INS-1 세포주를 glucokinase 억제제인 Mannoheptulose

(MH), TCA 회로 매개성 포도당 이용률을 증가시키는 Methylsuccinate, 해당작용에 의해 생성된 pyruvate의 미토콘드리아 내 운반을 억제하는 aCCA (a-cyano-4-hydroxycinnamic acid), 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I의 억제제인 Rotenone, 복합체 II의 억제제인 TTFA (Thenoyltrifluoroacetone), 미토콘드리아막의 양성자 전기화학 경사도를 해제시키는 산화성 인산화 반응 억제제인 CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone), hexosamine 생합성 경로에서 rate limiting enzyme인 GFAT (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase) 억제제인 Azaserine을 각각 처리하여 세포 내 peroxide 치를 측정하였다. 상기 약물들은 Sigma (Saint Louis, USA) 제품을 사용하였다.

3) 통계적 분석

실험결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며 통계분석은 Window용 SPSS 11.0 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)을 사용하였다. 대조군과 실험군 사이 비교는 one-way ANOVA와 Student t-test를 사용하였으며 통계적인 유의 수준은 *P*값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 포도당 농도에 따른 세포 내 peroxide 치의 변화

INS-1 세포주에서 30 mM 포도당에 노출된 경우 세포 내 peroxide 형광강도가 증가함을 볼 수 있었고 정량화 한 peroxide 치도 5.6 mM 포도당과 비교 시 유의하게 높았다 (*P* < 0.05) (Fig. 1A). 백서 췌장소도 세포에서도 11 mM 포도당에 비해 30 mM 포도당에 노출된 경우 세포 내 peroxide 치가 유의하게 높은 것이 관찰되었다 (*P* < 0.05) (Fig. 1B).

2. 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능 (GSIS)

INS-1 세포에서 5.6 mM 및 11.1 mM 포도당에 노출된 것과 비교 시 30 mM 포도당이 노출된 경우 기저 인슐린 분비의 감소 및 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능의 더욱 유의한 감소가 관찰되었고 (*P* < 0.05) (Fig. 1C), 백서 췌장소도 세포에서도 30 mM 포도당 배지에서 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능이 유의하게 감소하였다 (*P* < 0.05) (Fig. 1D).

3. 고농도 포도당에 노출된 INS-1 세포주에서 세포 내 peroxide 생성 억제

INS-1 세포에서 10 mM methylsuccinate와 mannoheptulose를 처리한 경우 고농도 포도당에 의한 peroxide 생성이 각

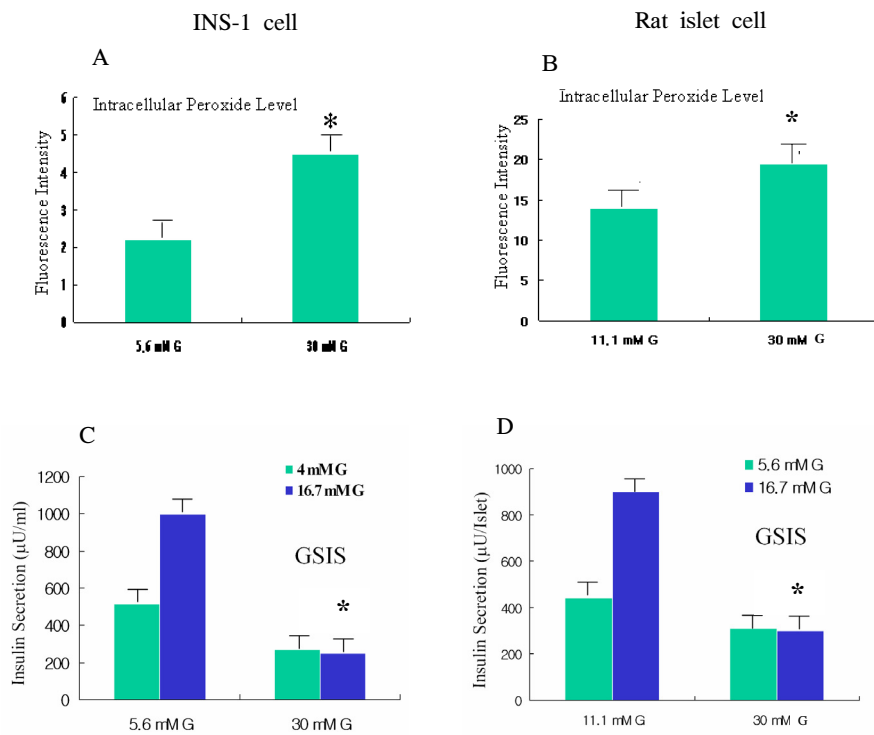


Fig. 1. Intracellular peroxide level (A, B) and GSIS (C, D) in INS-1 cells and rat islet cells after 3 days subculture. Data are mean \pm SE from 3 separate experiments.

* $P < 0.05$.

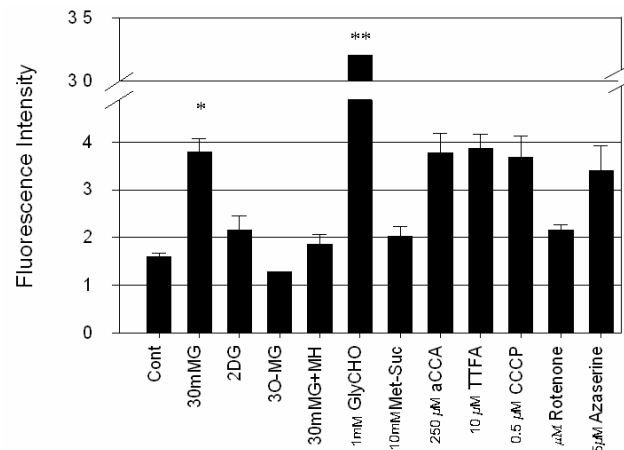


Fig. 2. Effects of several agents that affect mitochondrial metabolism on formation of hyperglycemia-induced intracellular peroxide in INS-1 cells. Cells were incubated in 5.6 mM glucose, 30 mM glucose alone, and 30 mM glucose plus either Mannoheptulose (MH), Methylsuccinate, aCCA (a-cyano-4-hydroxycinnamic acid), Rotenone, TTFA (Thenoyltrifluoroacetone), CCCP (Carbonyl cyanide chlorophenyl hydrazone), Azaserine, and intracellular peroxide levels were quantified. Data are mean \pm SE from 3 separate experiments.

* $P < 0.05$ vs control.

** $P < 0.05$ vs 30 mM glucose.

각 억제되었다 ($P < 0.05$). 1 μ M rotenone를 처리한 경우 세포 내 peroxide 증가가 억제된 반면 ($P < 0.05$), 10 μ M

TTFA, 0.5 μ M CCCP, 250 μ M aCCA에 의해서는 peroxide 생성이 억제되지 않았다. 또한 hexosamine 생합성 경로 억

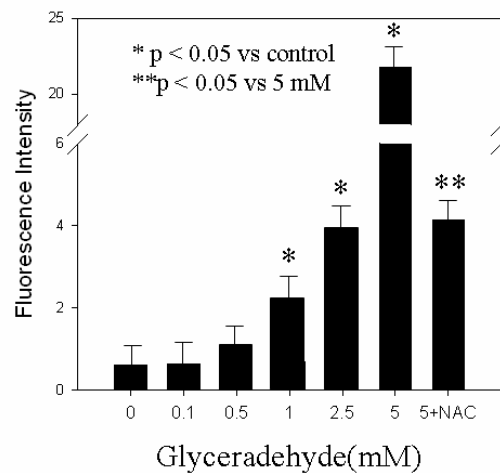


Fig. 3. Intracellular peroxide level in islets after 24 h culture with glyceraldehyde. Data are mean \pm SE from 3 separate experiments.

* $P < 0.05$ vs control.

** $P < 0.05$ vs 5 mM.

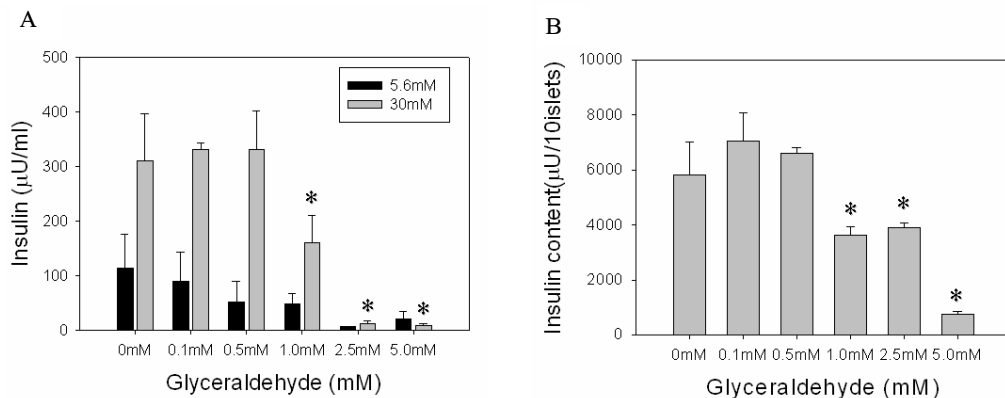


Fig. 4. GSIS (A) & Insulin content (B) in islets after 24 h culture with glyceraldehyde. Data are mean \pm SE from 3 separate experiments.

* $P < 0.05$ vs 0 mM.

제제인 azaserine 5 μ M을 투여 시에도 고농도 포도당에 의한 세포 내 peroxide 생성이 감소하지 않았다 (Fig. 2).

4. Glyceraldehyde에 노출된 백서 췌장소도 세포에서 세포 내 peroxide 생성 및 인슐린 분비능

분리된 백서 췌장소도 세포를 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5 mM의 glyceraldehyde에 배양하였을 때 대조군에 비해 1.0 mM 이상의 농도에서 농도 의존적으로 세포 내 peroxide가 증가하였고 ($P < 0.05$), NAC에 의해 유의하게 ROS 생성이 감소하였다 (Fig. 3) ($P < 0.05$).

또한 각각을 5.6 mM과 30 mM의 포도당에 노출시켜 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능을 측정한 결과 1.0 mM 이상의 glyceraldehyde에 노출된 경우 유의하게 포도당 자극

성 인슐린 분비능이 감소하였다 (Fig. 4A) ($P < 0.05$). 또한 10 소도세포단위당 인슐린 양 (content)도 1 mM 이상의 glyceraldehyde에 노출된 경우에서 유의하게 감소되었다 (Fig. 4B) ($P < 0.05$).

고 찰

ROS가 염증성 질환, 자가 면역질환, 암, 당뇨병 등의 여러 질병의 병인에 있어 중요한 역할을 하는 것은 잘 알려져 있으며²⁹⁾, ROS에 의한 세포 손상 정도는 각 조직에서 항산화 효소의 분포량에 의해 좌우되는데, 췌장소도세포에서 항산화효소의 발현은 종류에 따라 간조직의 5~40% 정도로 존재하는 것으로 알려져 있으며^{19,30)}, Tiedge 등은 30 mM의

고농도 포도당, 70%의 고농도 산소를 투여한 스트레스에도 췌장소도세포에서 항산화 효소의 mRNA, 단백질 및 효소활성화가 증가되지 않았고, 항산화효소를 과발현 시킨 경우에는 ROS에 의한 췌장소도세포 손상을 유의하게 억제할 수 있었다고 보고하였다¹⁹⁾. 따라서 췌장소도세포는 항산화효소의 세포 내 발현이 아주 낮을 뿐 아니라 여러 세포성 스트레스에 의한 항산화효소 발현의 적응이 이루어지지 않아 ROS에 의한 세포 독성에 특히 민감하여 포도당 독성 등이 유발되는 것으로 보고되고 있다.

이전 연구에서 인슐린 분비 세포에 고농도의 H_2O_2 를 직접 주입하여 산화스트레스를 유발한 경우에서와 같이 고농도 포도당에 노출 시 세포 내 peroxide가 증가하고 인슐린 분비능이 감소함을 보고하였고³¹⁾, Tanaka 등³²⁾은 인간 췌장소도세포를 고농도의 포도당에 노출시켰을 때 세포 내 peroxide가 증가하고 이로 인해 베타세포 기능이 저해함을 보고하였는데, 본 연구에서도 INS-1 세포, 백서 췌장소도세포를 고농도의 포도당에 노출시킨 경우 세포 내 ROS 생성이 유의하게 증가하였고, 증가된 ROS로 인해 포도당 유발성 인슐린 분비 기능이 현저히 감소됨을 볼 수 있었다.

Nishikawa 등¹⁴⁾은 bovine aortic endothelial cell을 30 mM의 고농도 포도당에서 배양한 경우 세포 내 ROS 생성이 증가하였고, ROS의 증가는 미토콘드리아 전자전달계 복합체 II, 산화성 인산화 반응 해제제, UCP-1, MnSOD 등에 의해 억제되었으며, ROS 생성이 정상화 되면서 포도당에 의해 유발되는 protein kinase C의 활성화, 최종 당화 산물의 형성, 슬비톨의 축적 및 NFkB의 활성화를 예방할 수 있었음을 보고하면서 고혈당에 의해 유발된 세포 내 ROS 증가는 미토콘드리아 전자전달계에 의한 양성자 전기화학 경사도에 의해 생성된다고 하였다. 반면 본 연구에서는 INS-1 세포에서 고혈당에 의한 세포 내 ROS 생성 부위를 알아보기 위한 실험에서 glucokinase 억제제인 mannoheptulose을 처리한 경우 고농도 포도당 노출에 의한 ROS 생성증가를 억제할 수 있었고, TCA 회로 매개성 포도당 이용률을 증가시키는 methylsuccinate에 의해서도 세포 내 peroxide가 감소하여 포도당 대사가 ROS 생성에 필수적이라는 것을 보여주었지만, 미토콘드리아 전자전달계 복합체 I의 억제제인 Rotenone에 의해서는 세포 내 ROS 생성이 억제된 반면, 복합체 II의 억제제인 TTFA, 미토콘드리아막의 양성자 전기화학 경사도를 해제시키는 산화성 인산화 반응 해제제인 CCCP에 의해서는 ROS 생성이 억제되지 않아 Nishikawa 등에 의한 보고와는 상반된 결과를 보였다. 또한 해당작용에 의해 생성된 pyruvate의 미토콘드리아 내 운반을 억제하는 aCCA도 ROS 생성을 억제하지 못하였다. 물론 모든 약물 억제제들이 절대적인 한부위의 세포 표적에만 특이적으로 작용하진 않으므로 본 연구의 한계가 있으나, 인슐린 분비세포에서 고농도의 포도당에 의한 ROS 증가는 미토콘드

리아 전자전달계 외에도 다른 origin이 있을 것으로 생각된다.

또한 인슐린 분비 장애 및 합병증 유발 경로 중의 하나로 알려진 hexosamine 생합성 경로에서 rate limiting enzyme인 GFAT (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase) 억제제인 azaserine을 투여 시 세포 내 ROS 생성이 감소하지 않았는데, 이는 Du 등¹¹⁾이 bovine aortic endothelial cell에서 고농도의 포도당에 의해 증가된 peroxide가 hexosamine 경로를 활성화시키고 peroxide 생성을 억제시킴으로써 hexosamine 경로가 차단되어 ROS 증가와 hexosamine 경로에 의한 당뇨병성 합병증의 병인을 보여주었으나 hexosamine 경로의 차단으로 ROS생성이 억제되지 않았다는 보고와 일치한다. 따라서 고혈당 유발성 ROS 생성에 hexosamine 경로가 병인으로 관여하진 않음을 나타내었다.

Glyceraldehyde는 포도당 대사과정에서 형성되고 대개 인슐린분비를 자극하는 것으로 알려져 있는데²¹⁻²⁴⁾, 췌장소도세포가 glyceraldehyde에 일시적으로 노출되면 인슐린 분비를 자극하지만 장시간 고농도에 노출 시에는 ROS 생성을 증가시켜 인슐린 분비능을 감소시킨다는 보고^{12,21,25)}도 있다. 본 연구에서 rat islet을 glyceraldehyde에 배양 시 농도 의존적으로 peroxide 분비가 증가하였고, 1 mM 이상의 glyceraldehyde에 노출된 경우 인슐린 분비능이 유의하게 감소함을 보여주어 고농도의 glyceraldehyde가 ROS 생성과 베타세포 기능 부전에 중요한 역할을 할 가능성을 나타내었다. 이와 같은 glyceraldehyde의 작용기전으로는 대부분의 glyceraldehyde는 인산화되어 중간산물인 Glyceraldehyde 3-Phosphate를 형성한 후 해당경로를 거치게 되는데 일부가 glyceraldehyde 자가산화 경로로 우회되어 α -ketoaldehyde와 hydroxyl radical을 형성하여 세포독성을 유발하게 된다¹²⁾. 또한 장시간 고농도의 포도당에 노출 시 GAPDH가 억제되어 glyceraldehyde가 인산화를 통한 정상적인 해당경로를 통과하지 못하고 축적되게 되며 또한 당화경로 및 PKC 활성화, hexosamine 경로, NFkB 활성화 등으로 연결되어 베타세포 기능 부전을 일으키게 되는 것으로 알려져 있다³³⁾.

따라서 포도당 독성에 의한 베타세포 기능 부전에 glyceraldehyde가 세포 내 ROS 증가에 중요한 역할을 할 것으로 보이며, 고농도 포도당에서 ROS 생성은 미토콘드리아 전자 전달 체인 외에 enolization에 의한 포도당 자가산화, glycation시 Schiff 반응, protein kinase 활성화, methylglyoxol 형성, hexosamine 대사 등과 같은 복합적 기전에 의해 생성됨을 추측할 수 있으며 향후 이에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 췌장 소도 베타 세포가 장기간 고혈당에 노출

되었을 때 인슐린 분비능, 인슐린 mRNA 및 인슐린 gene transcription factor 등이 감소하는 것을 포도당 독성이라고 하며, 췌장 소도 내의 낮은 항산화 효소 및 포도당 대사 과정에서 reactive oxygen species (ROS)의 증가가 그 원인으로 보고되고 있고, 고농도 포도당에 의해 생성된 ROS는 미토콘드리아의 electron transport chain complex 저하제에 의해 감소된다는 보고들도 있다. 이에 연자 등은 고혈당에 노출된 췌장 소도에서 세포 내 ROS 생성장소를 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

방법: INS-1 세포주 및 백서 췌장소도 세포를 고농도의 포도당에서 배양하고, 또한 미토콘드리아 전자전달계 복합체 저하제 및 산화성 인산화 반응 억제제인 TTFA, CCCP, α CCA 등을 처리한 뒤 flow cytometer를 이용하여 세포 내 peroxide치를 측정하고, 인슐린 분비능 등을 측정하였다. 그리고 INS-1 세포주에 glyceraldehyde를 농도별로 24시간 배양하고 N-acetylcystein을 처리하여 세포 내 peroxide 및 인슐린 분비능을 측정하였다.

결과: INS-1 세포를 고농도 포도당 배지 (30 mM 포도당)에 배양하였을 때 세포 내 peroxide치는 증가하였고, 인슐린 분비능은 감소하였다 ($P < 0.05$). INS-1 세포를 고농도 포도당 배지(30 mM 포도당)에 전자전달계 복합체 저하제인 TTFA, CCCP, α CCA 등과 함께 배양하였을 때 세포 내 peroxide는 감소하지 않았고, 인슐린 분비능도 회복되지 않았다 ($P < 0.05$). INS-1 세포를 포도당 대사과정에서 미토콘드리아 진입 전구물질인 glyceraldehyde와 함께 5.6 mM 포도당 농도에서 배양하였을 때 세포 내 peroxide는 증가하였고, 인슐린 분비능은 감소하였다 ($P < 0.05$).

결론: 췌장 소도 세포의 포도당 독성에 ROS 생성이 중요한 역할을 하고, ROS 생성 장소로 미토콘드리아 이외에도 있다고 보여지며, glyceraldehyde는 이러한 ROS 생성 및 베타세포 기능 저하에 영향을 미치는 물질로 생각할 수 있다.

참 고 문 헌

- 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
- Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA: Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13:610-30, 1990
- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF: Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations *J Clin Invest* 90:320-25, 1992
- Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP: Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 92:514-9, 1993
- Robertson RP, Olson LK, Zhang HJ: Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes* 43:1085-9, 1994
- Poitout V, Olson LK, Robertson RP: Chronic Exposure of β TC-6 Cells to Supraphysiologic Concentrations of Glucose Decreases Binding of the R1PE3b1 Insulin Gene Transcription Activator. *J Clin Invest* 97:1041 -6, 1996
- Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP: Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10857-62, 1999
- Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-12, 1991
- Kaneto H, Sharma A, Suzuma K, Laybutt DR, Bonner-Weir S, Weir GC: Induction of c-Myc Expression Suppresses Insulin Gene Transcription by Inhibiting NeuroD/ETA2-mediated Transcriptional Activation. *J Biol Chem* 277:12998-3006, 2002
- Kaneto H, Suzuma K, Sharma A, Bonner-Weir S, King GL, Weir GC: Involvement of Protein Kinase C β 2 in c-myc Induction by High Glucose in Pancreatic β -Cells. *J Biol Chem* 277:3680-5, 2002
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M: Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12222-6, 2000
- Wolff SP, Dean RT: Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 245:243-50, 1987
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: Hydroxyl radical production and autooxidative glycosylation. Glucose autooxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 256:205-12, 1988
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates

- PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature* 404:787-90, 2000
15. Kajimoto Y, Watada H, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, Miyazaki J, Yamasaki Y: *Suppression of transcription factor PDX-1/IPF1/STF-1/IDX-1 causes no decrease in insulin mRNA in MIN6 cells. J Clin Invest* 100:1840-6, 1997
16. Olbrot M, Rud J, Moss LG, Sharma A: *Identification of β -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6737-42, 2002
17. Kataoka K, Han SI, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H: *MafA is a glucose-regulated and pancreatic β -Cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. J Biol Chem* 277:49903-10, 2002
18. Matsuoka TA, Zhao L, Artner I, Jarrett HW, Friedman D, Means A, Stein R: *Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet β Cells. Mol Cell Biol* 23:6049-62, 2003
19. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S: *Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Diabetes* 46:1733-42, 1997
20. Welsh N, Margulis B, Borg LA, Wiklund HJ, Saldeen J, Flodstrom M, Mello MA, Andersson A, Pipeleers DG, Hellerstrom C, et al: *Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. Mol Med* 1:806-20, 1995
21. Hellman B, Idahl LA, Lernmark A, Sehlin J, Taljedal IB: *The pancreatic beta-cell recognition of insulin secretagogues. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone. Arch Biochem Biophys* 162:448-57, 1974
22. Taniguchi S, Okinaka M, Tanigawa K, Miwa I: *Difference in mechanism between glyceraldehyde- and glucose-induced insulin secretion from isolated rat pancreatic islets J Biochem(Tokyo)* 127:289-95, 2000
23. MacDonald MJ, Mertz RJ, Rana RS: *Glyceraldehyde phosphate: an insulin secretagogue with possible effects on inositol phosphate formation in pancreatic islets. Arch Biochem Biophys* 269:194-200, 1989
24. Alcazar O, Gine E, Qiu-Yue Z, Tamarit-Rodriguez J: *The stimulation of insulin secretion by D-glyceraldehyde correlates with its rate of oxidation in islet cells. Biochem J* 310:215-20, 1995
25. Takahashi H, Tran PO, LeRoy E, Harmon JS, Tanaka Y, Robertson RP: *D-Glyceraldehyde causes production of intracellular peroxide in pancreatic islets, oxidative stress, and defective beta cell function via non-mitochondrial pathways. J Biol Chem* 279:37316-23, 2004
26. Lawrence MC, Bhatt HS, Watterson JM, Easom RA: *Regulation of insulin gene transcription by a Ca^{2+} -responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. Mol Endocrinol* 15:1758-67, 2001
27. 이기업, 임성희, 이문규, 이병두, 이흥규, 고창순, 민현기: *총담관내 콜라겐분해 효소 주입법에 의한 벡서 웨장 소도의 분리. 당뇨병* 12:147-51, 1988
28. 원규장, 은미정, 이시형, 김재홍, 오정현, 남상엽, 윤지성, 윤현대, 조인호, 이형우: *Interleukin-1 β 에 노출된 흰 쥐 웨장소도의 nitric oxide생성, 인슐린 분비 및 heat shock protein 70 발현에 미치는 aminoguanidine의 효과. 당뇨병* 25:273-85, 2001
29. Halliwell B: *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet* 344:721-4, 1994
30. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M: *Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. Free Radic Biol Med* 20:463-6, 1996
31. 은미정, 원규장, 문준성, 문선중, 이지은, 윤지성, 천경아, 조인호, 이형우: *INS-1 세포, HIT-T15 세포 및 벡서 웨도 세포에서 포도당 독성의 원인으로 산화 스트레스 당뇨병* 29:393-400, 2005
32. Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP: *A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12363-8, 2002
33. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M: *Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. J Clin Invest* 112:1049-57, 2003