

MIN6 세포에서 저산소 손상시 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)의 발현

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 내분비대사내과

고승현 · 김승범 · 류경열 · 김지원 · 안유배 · 문성대 · 김성래 · 이정민 · 권혁상 · 윤건호 · 송기호

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in the Hypoxic Injury to Pancreatic Beta (MIN6) Cells

Seung-Hyun Ko, Seung-Bum Kim, Kyung-Ryul Ryu, Ji-Won Kim, Yu-Bai Ahn, Sung-Dae Moon, Sung-Rae Kim, Jung-Min Lee, Hyuk-Snag Kwon, Kun-Ho Yoon, Ki-Ho Song

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

- Abstract -

Background: Islet transplantation is an alternative potential strategy to cure type 1 diabetes mellitus. However, two or more donors are usually needed for one recipient because a substantial part of the graft becomes nonfunctional due to several factors including hypoxia. Though hypoxic exposure of pancreatic beta cells has been reported to induce apoptotic cell death, the molecular processes involved in hypoxia-induced cell death are poorly understood. In type 1 diabetes, Nitric Oxide (NO) is known as an important cytokine, involved in the pathogenesis of beta cell dysfunction. Pancreatic beta cells are sensitive to the induction of inducible nitric oxide synthase (iNOS) when stimulated by TNF- α or IL-1 β . But contribution of iNOS in response to hypoxia is not yet fully understood.

Methods: Mouse insulinoma cells (MIN6) were incubated in an anaerobic chamber (75% N₂/15% CO₂/5% H₂) for up to 12 hours. Cell viability was measured after AO/PI staining. Caspase-3 activation was also determined using Western blot analysis. Nitric Oxide (NO) release into culture medium was measured using a Griess reagent. The expression of iNOS and PDX-1 mRNA and iNOS protein was examined using real time PCR and Western blot analysis.

Results: Marked cell death was observed within 6 hours after hypoxic exposure of MIN6 cells (control, < 5%; 2 hr, 11.0 \pm 7.6%; 6 hr, 46.2 \pm 12.8%, P < 0.05). Immunoreactivity to activated caspase-3 was observed at 2, 4 and 6 hrs. NO production was increased in a time dependent manner. Expression of iNOS mRNA and protein was significantly increased at 4 and 6 hour after hypoxia. iNOS expression was confirmed by immunostaining. Of note, Pdx-1 mRNA expression was markedly attenuated by hypoxic treatment. Pretreatment with a selective iNOS inhibitor, 1400 W, significantly prevented beta cell death induced by hypoxic injury.

Conclusion: Our data suggest that iNOS-NO play an important role in hypoxic injury to MIN6 cells. Therefore, iNOS-NO might be a potential therapeutic target for improving

접수일자: 2006년 6월 26일, 통과일자: 2006년 9월 1일, 책임저자: 송기호, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 내분비대사내과

* 본 연구는 2005년도 당뇨병학회 연구비와 2004년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구됨 (과제번호: KRF-2004-003-E00095).

engraftment of the transplanted islets and suppression of iNOS would be helpful for prevention of beta cells damage to hypoxic injury. (J Kor Diabetes Assoc 30:336~346, 2006)

Key Words: Caspase-3, Cell death, Diabetes mellitus, Hypoxia, Inducible nitric oxide synthase (iNOS), Islet transplantation

서 론

최근 당뇨병 환자는 전 세계적으로 폭발적으로 증가하고 있으며 이에 따른 각종 당뇨병성 급성 또는 만성 합병증의 발생으로 인한 사망률도 이에 비례하여 증가하고 있다. 엄격한 혈당조절만이 이러한 합병증을 예방할 수 있으나, 실제 목표혈당에 도달하는 환자는 전체 당뇨병 환자의 40% 수준에 미치지 못한다¹⁾. 따라서 상당수의 당뇨병 환자에서 당뇨병성 합병증의 발생은 필연적인 문제가 되고 있으며, 따라서 당뇨병을 완치하기 위한 획기적인 치료법이 요구되고 있다. 현재로서는 췌도 또는 췌장이식이 당뇨병의 완치를 위한 이상적인 치료 방법이다²⁾. 또한 베타세포 기능부전이 주요한 병인이 되는 제2형 당뇨병의 경우에서도 베타세포 질량이 50% 정도 감소되므로, 베타세포 보충치료는 자가면역 기전에 의해 베타세포가 파괴되는 제1형 당뇨병 외에 제2형 당뇨병환자에게도 치료의 대안이 될 수 있으며^{3,4)} 베타세포의 보충은 췌장 또는 췌도 이식술로 가능하다.

Edmonton protocol이 발표된 이후 췌도이식의 성적이 현저히 향상되었으나, 공여 췌도의 부족, 이식거부반응, 면역억제제의 사용 등이 성공적인 이식에 있어서 해결되어야 할 문제로 남아 있으며⁵⁾, 췌도를 분리 및 이식하는 과정에서 혈류공급의 차단으로 인한 저산소 손상과 IL-1b, TNF-a, IFN-r, 일산화질소 (nitric oxide, NO) 등의 다양한 염증성 cytokine 에 의한 췌도 손상이 췌도이식의 성적과 함께 이식편 생존에 큰 영향을 미친다^{6,7)}. 여러 염증성 cytokine 중 NO는 반감기가 짧은 자유 유리기로서 L-arginine에서 L-citrulline으로 산화되는 과정에서 생기며 일산화질소 합성효소 (Nitric Oxide Synthase, NOS)에 의해 생성된다^{8,9)}. 3가지 형태의 NOS 중 inducible NOS (iNOS)는 cytokine, 산화스트레스 및 염증성 반응에 의해 유발되어 NO를 생산하는데 NO는 제1형 당뇨병의 병인에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{10,11)}. iNOS는 IL-1, IFN-r와 TNF-a 등의 처리 후에 쥐나 사람의 췌도에서 유도되며, NO는 또한 인슐린 합성을 감소시키고 베타세포 사멸을 일으키는데¹²⁻¹⁴⁾, 베타세포 기능의 저하와 cytokine 에 의한 베타세포의 파괴에 있어서 NO가 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

일반적으로 세포가 저산소 상태에 노출 되었을 때 세포의 반응과 생존에 필요한 다양한 유전자들이 전사인자들의

표적이 된다^{15,16)}. 그 중 특히 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)은 저산소 상태에 대하여 일련의 세포의 반응을 유도하는 중심적인 역할을 하는데, HIF-1은 베타세포주나 분리한 쥐와 사람의 췌도에도 존재한다¹⁷⁾. HIF-1의 주된 표적 유전자들은 에너지 대사, 철 항상성, 혈관 생성, 세포의 증식과 생존 등 스트레스에 대한 적응에 관련되어 있는데, 이 중 iNOS도 HIF-1에 의해서 유도된다¹⁸⁾.

췌도가 저산소 상태에 노출되어 이로 인한 손상을 받을 경우에도 cytokine과 관련된 염증성 반응이 관련될 것으로 추정되나, 췌장 베타세포에서 저산소 손상과 NO 및 iNOS과의 관계에 대한 연구는 아직 많이 알려져 있지 않다. 따라서 이러한 연구를 통하여 췌도이식 과정 중에 분리된 췌도에서 저산소 손상에 대한 기전을 밝히고 표적 유전자를 발굴 한다면 췌도이식 성적을 향상시키기 위한 시도가 가능할 것으로 생각된다. 이에 베타세포주에 저산소 손상을 유발하여 췌도 사멸을 유도하였을 때 NO 및 iNOS의 발현에 대하여 연구하였다.

대상 및 방법

1. 저산소 배양 (Culture in the Anoxic Chamber)

MIN6 세포는 12 well plate에 well 당 5×10^5 cells씩 분주하였으며 10% FBS를 지닌 DMEM배양액 (10% FBS, penicillin G 100 U/mL, streptomycin 100 mg/mL)으로 CO₂ 배양기 (95% air/5% CO₂)에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 자라면 FBS가 없는 배지로 교체하여 16시간 정도 배양하였다. 이 후 실험조건에 따라 시간별로 무산소 배양기 (75% N₂/15% CO₂/5% H₂, ThermoForma 1025 Anaerobic system, Waltham, MA)에서 배양함으로써 저산소 처치를 하였다. 정상 배양조건을 대조군으로 하였고, 무산소 배양기에서 각각 2, 4, 6, 12 시간동안 배양하였다.

저산소 상태에서 세포에 대한 NO의 영향을 보기 위하여 iNOS (inducible nitric oxide synthase)의 특이 억제제인 1400W (N-(3-(amino-methyl)benzyl)acetamide, 100 uM/L, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)와 nitric oxide donor인 DETA-NO (Diethylenetriamine/nitric oxide adduct, 500 uM, Sigma)를 무산소 조건에서 배양하기 전에 전처리하여 세포를 관찰하였다.

2. 세포 생존율 (Cell viability)

무산소 배양 조건에서 베타세포의 생존율을 조사하기 위하여 무산소 처리 후 Acridine orange (AO)/ Propidium iodide (PI) 염색을 시행하여 현미경에서 관찰하였다. 세포 생존율은 전체 베타세포 수에 대하여 PI 염색된 세포 수의 비로 계산하였다 (생존율 = [(PI 염색된 세포 수) / (전체 세포 수)] × 100).

3. 질산 생성 (Nitrite production in culture media)

배양한 MIN6 세포를 무산소 배양기에서 시간별로 배양하여 저산소 처리 후 배지 상층액을 수거하여 nitric oxide (NO) 농도를 측정하였다. NO는 Griess reagent법을 이용하여 측정하였고 (Promega, Madison, WI), 양성 대조군으로 IL-1b (10 ng/mL, Pierce, Rockford, IL)을 배지에 전처리 하였으며, 모든 검체는 3회 반복측정 하였다.

4. Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

총 RNA를 조건에 맞게 배양한 베타세포에서 Trizol 용액 (Gibco BRL, Grand Island, NY) 을 이용하여 추출하고 총 RNA를 전기영동으로 확인 후 spectrophotometer 를 이용하여 정량하였다. 총 RNA (2 µg)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다 (SuperScript Preamplification system, Gibco BRL, Grand Island, NY). 총 RNA를 0.5 µg oligo (dT)12-18 primer와 85°C에서 3분간 반응시킨 후, 5 × first strand buffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 포함), 10 mM DTT (dithiothreitol), 0.5 mM DNTP (deoxynucleotide phosphate)와 총 20 µL 되도록 반응시켰다. 발현정도는 cyclophilin gene과 비교하였고 Primer는 각각 구입하였다

(iNOS, sense 5'-CACCTTGGAGTTCACCCAGT-3', antisense 5'-ACCACTCGTACTTGGGATGC-3'; PDX-1, sense 5'-GAAATCCACAAAGCTCACG-3', antisense 5'-TTCAACATCACTGCCAGCTC-3'; Insulin, sense 5'-GACCAGCTATAATCAGAGACC-3', antisense 5'-AGTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG-3'; Cyclophilin, sense 5'-GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC-3', antisense 5'-GATGCCAGGACCTGTATGCT-3').

PCR 조건은 다음과 같다, 95°C 10분 가열, 증폭 30 cycles, 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 1분, 72°C 10분. PCR product는 1.5% agarose 겔 전기영동으로 확인하고, ethidium bromide 염색으로 관찰한 후 densitometer VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 로 측정하였다.

5. Real-time PCR

총 RNA 분리는 PicoPure RNA isolation kit와 RiboAmp HS RNA amplification kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 시행하였고, cDNA는 총 RNA (2 µg)과 superscript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 합성하였다. Primer는 RT-PCR과 동일한 것을 사용하였다.

PCR은 cDNA template 2 µL, 각 primer 10 pM, CYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA)을 총 20 µL되도록 반응시켰다. PCR product는 MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)으로 검출하고, cycle threshold (Ct) 값을 사용하여 GAPDH gene에 대한 상대적인 양을 구하였다.

6. Western blot analysis

각 시간별로 저산소 처리한 후 세포를 수거하여 1 mL 용해 완충액 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 2 mM EDTA, 1% NP-40, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM PMSF, 10 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin, 0.1 mg/mL soybean inhibitor)으로 용해시켰다. 용해된 세포를 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. BSA를 표준 시료로 사용하여 각각의 단백질을 Bradford법으로 정량하였다. 단백질은 Laemmli sample buffer (0.625 M Tris-HCl, pH 6.8, 5% β-mercaptoethanol, 2% SDS)로 녹여 10% SDS-PAGE를 실시한 다음, 젤을 0.45 µm hydrophobic polyvinylidene difluoride 막 (Hybond-P, Amersham Pharmacia)에 전이시켰다. PVDF는 5% 탈지분유를 함유한 Tris buffered saline (TBS; 20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, pH 7.6)으로 1시간 동안 차단시킨 다음, anti-iNOS mouse monoclonal 항체 (1:500, BD transduction Lab, San Jose, CA)와 anti-caspase-3 mouse monoclonal 항체 (1:500, Cell Signaling Technology, Danver, MA)에 넣어 약 2시간 상온에서 배양한 후 TBS로 2회 세척하였다. 그 이후 HRP-conjugated anti-rabbit과 anti-mouse 이차 항체 용액 (Amersham-Pharmacia Co., Buckinghamshire, England, 희석비율 1:1,000)으로 1시간 동안 상온에서 배양하였으며, 상기와 동일하게 다시 세척한 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England)를 사용하여 발색시켰다. 단백질 발현 강도는 VSD densitometer (Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 측정하였다.

7. 면역형광염색

각 실험조건에 따라 MIN6 cell에 저산소 처리 후 배양액을 제거한 뒤 2 mL methanol: acetone 용액 (1:1, v/v)으로 -20°C에서 20분간 고정시켰다. PBS로 세척을 한 후에 비특

이 결합을 막기 위하여 10% anti-goat serum (Zymed Laboratories, San Francisco, CA)으로 상온에서 20분간 반응시켰다. 일차반응 용액인 anti-iNOS rabbit polyclonal 항체 (1:500, BD transduction Lab), PDX-1 항체 (Kaneto Hideyaki, Osaka University, Japan)으로 밤새 4℃에서 16시간 반응시켰다. PBS로 3번 세척한 후에 이차항체인 Rabbit Texas red (Jackson Immnuoresearch Laboratories, West Grove, PA, 1:100) 또는 anti Guinea Pig FITC (Jackson Immnuoresearch Laboratories)로 상온에서 20분간 반응시켰다. 위와 동일하게 세척한 후에 DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)로 대조 염색하여 공초점 현미경 (Confocal microscopy, Bio-Rad)으로 관찰하였다.

8. 통계적 검정

각각의 실험은 3회 이상 반복하였고 실험결과는 평균 \pm 표준편차 (mean \pm SD)로 표시하였다. 통계적인 유의성 검정은 one way ANOVA 및 unpaired Student's t test를 이용하였으며 통계프로그램은 SAS version 8.01을 사용하였고, 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 세포 생존율

무산소 배양기에서 실제로 MIN6 cell에 저산소 손상이 유발되는지 확인하기 위하여 무산소 배양 후 세포 배양액 내에서 산소분압을 측정하였다. 그 결과 무산소 상태에서 배지내 산소 분압은 2시간 내 20 mmHg 정도까지 감소되었으며, 이후 감소된 상태로 유지되었다 (Fig. 1A). 배지 내 산소 분압의 감소는 세포 생존율에도 영향을 주었는데, 저산소 손상 후 Acridine orange (AO, 녹색)와 Propidium iodide (PI, 빨간색) 염색으로 세포 생존율을 측정한 결과, MIN6 세포에서 무산소 배양한지 2시간 ($11.0 \pm 7.6\%$), 6시간 ($46.2 \pm 12.8\%$) 및 12시간째에 ($90.0 \pm 8.2\%$) 정상산소 배양 조건 ($< 5\%$)에 비하여 처리 시간과 비례해서 현저하게 세포가 사멸되는 것을 관찰할 수 있었다 ($P < 0.05$, Fig. 1B, C).

2. Nitrite production

배양한 MIN6 cell에 저산소 손상을 준 후 배양액을 수거하여 nitric oxide (NO) 농도를 측정하였다. MIN6 cell 은 DNA 양으로 보정하였고, Griess reagent를 이용하여 측정

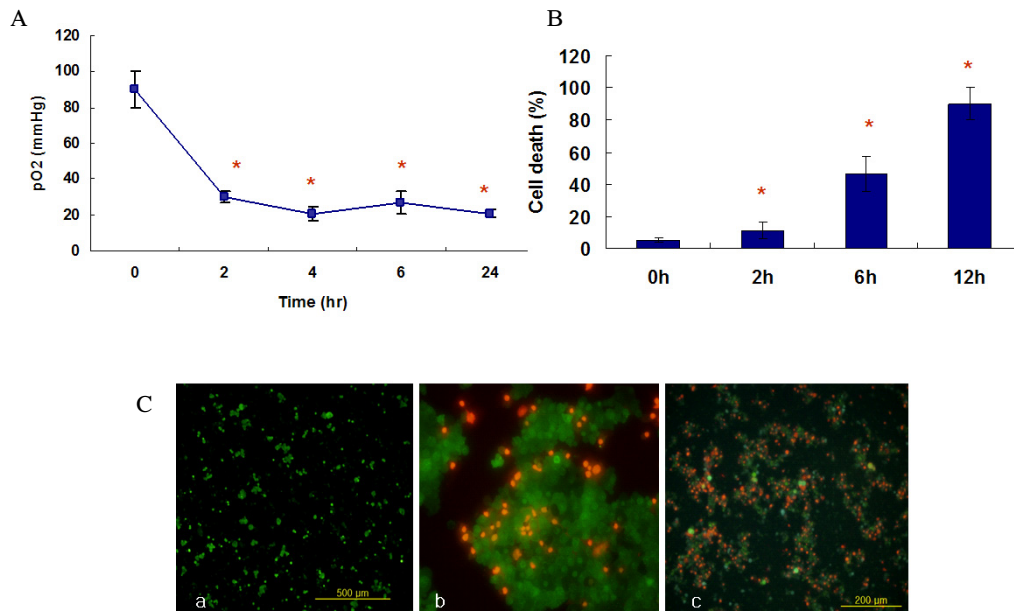


Fig. 1. (A) Under hypoxic condition, oxygen concentration in culture media dropped to 20 mmHg within 2 hr. (B) AO/PI staining of the MIN6 cells showed remarkable cell death in time dependent manner. Six hours after anaerobic culture, cell death rate of MIN6 cells was more than 50%. (C) Effect of hypoxia on cell viability in cultured MIN6 cells using AO (Acridine orange, green) and PI (Propidium iodide, red) stain. Compared to normoxic condition, prominent cell death was demonstrated under anoxic culture for 2 and 6 h (a, normoxic condition; b, 2 hrs after anaerobic culture; c, 6 hrs after anaerobic culture. $\times 200$).

* $P < 0.05$ vs. normoxic culture condition.

한 결과 저산소 상태에서 시간 경과에 비례하여 배양액 내 NO 농도가 의미있게 증가되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 2).

3. iNOS 와 PDX-1 mRNA 발현

MIN6 cell에 저산소 처리했을 때 iNOS와 PDX-1 mRNA 발현의 변화를 조사하였다 (Fig. 3). 무산소 배양기에 배양 시 2시간 후부터 iNOS mRNA 발현이 증가되었으며, 6시간까지 시간과 비례하여 증가되었다 (fold change compared to normoxic culture; 2 hr, 3.4 ± 0.2 vs. 4 hr, 5.6 ± 2.6 vs. 6 hr, 11.0 ± 2.1 , $P < 0.05$, Fig 3B). 그러나 PDX-1 mRNA 발현은 저산소 손상 시 시간이 증가하면서

발현이 현저히 감소되는 양상을 보였고, Realtime PCR로 정량 시 2시간째 50% 정도 감소되었다 (Fig. 3C). 반면 insulin mRNA 발현은 6시간 처리 동안 의미있는 변화가 관찰되지 않았다.

4. Western blot 분석

저산소 처리 후 Western blot법으로 iNOS 단백질의 발현을 관찰하였다. 저산소 후 2시간째부터 iNOS 단백질의 발현이 증가하였으며, 4시간째는 정상 산소군에 비해 발현이 의미있게 더 증가되었다 (Fig. 4A). 역시 iNOS에 특이한 억제제인 1400 W를 전처리 하였을 때도, 하지 않았을 때보

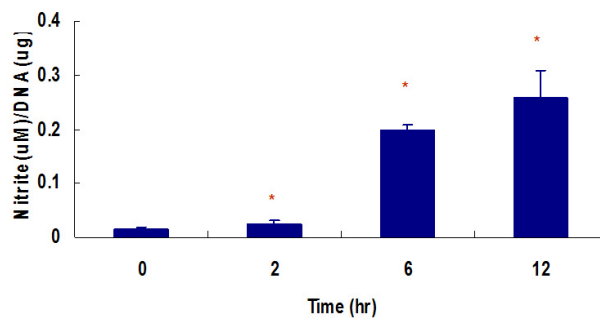


Fig. 2. Hypoxia-induced nitric oxide (NO) production, measured by accumulated nitrite concentration in culture medium. Hypoxia increased nitrite concentration in culture media in time-dependent manner in MIN6 cells. Nitrite production was measured using the Griess reagent method in the culture medium.

* $P < 0.05$ vs. in normoxic culture.

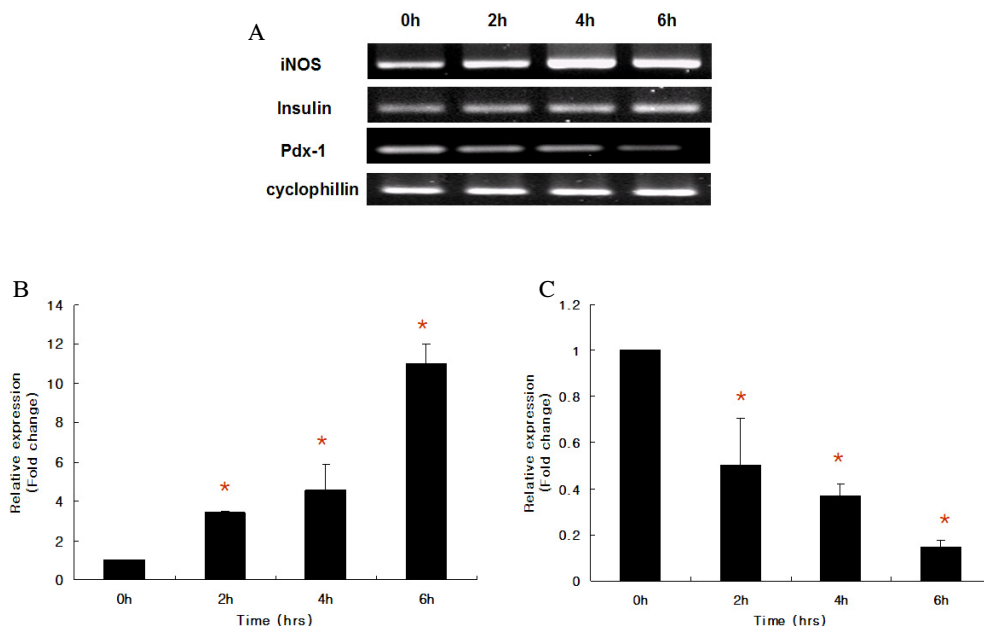


Fig. 3. Changes of the iNOS and PDX-1 mRNA expressions in response to hypoxic injury in MIN6 cells (A). Hypoxia increased iNOS mRNA expression (B) in the cultured MIN6 cells after 2 hrs. However, PDX-1 mRNA expression (C) was significantly decreased when they had been exposed to prolonged hypoxia.

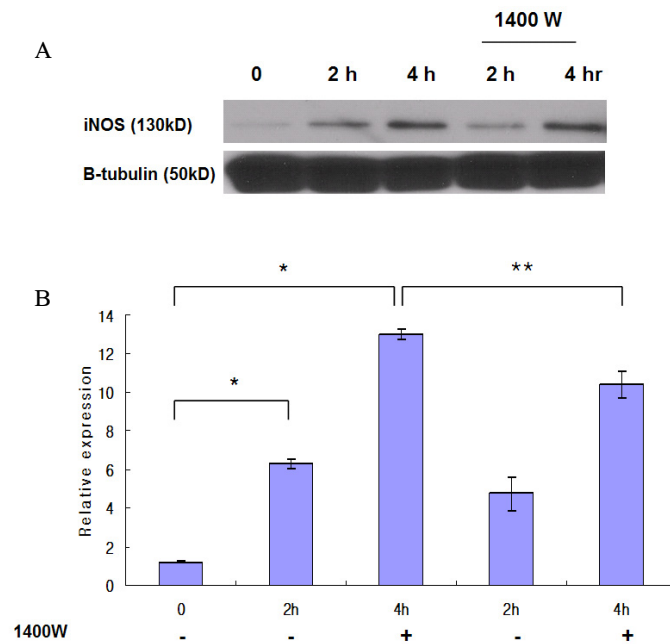


Fig. 4. Hypoxia induced the iNOS protein expression (130 kd) in MIN6 cells. The iNOS protein expression was detected at 2 h of hypoxic treatment and peaked at 4 h (A). But specific iNOS inhibitor (1400 W) pretreatment effectively attenuated the iNOS expression after hypoxic injury (B).

* $P < 0.05$ vs. normoxic culture.

** $P < 0.05$ vs. hypoxic treatment for 4 hrs without 1400 W.

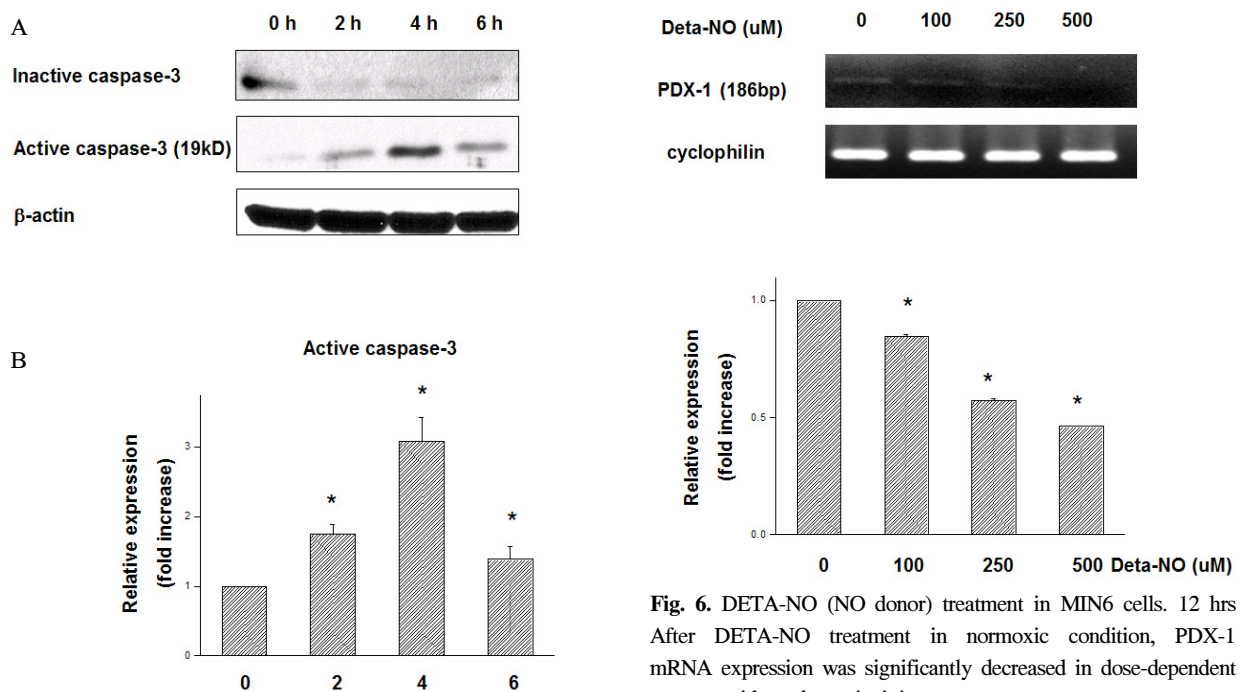


Fig. 5. Caspase-3 activity was significantly increased in response to hypoxic injury in MIN6 cells.

* $P < 0.05$ vs. normoxic culture.

Fig. 6. DETA-NO (NO donor) treatment in MIN6 cells. 12 hrs After DETA-NO treatment in normoxic condition, PDX-1 mRNA expression was significantly decreased in dose-dependent manner without hypoxic injury.

* $P < 0.05$ vs. normoxic culture.

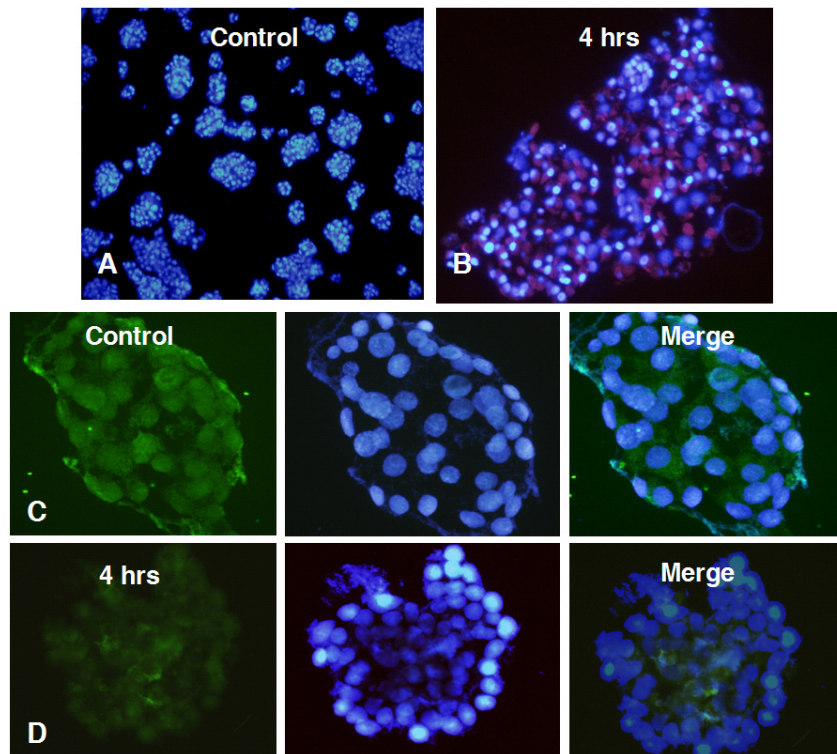


Fig. 7. iNOS and PDX-1 immunostaining after hypoxic culture in MIN6 cells. Compared to normoxic culture condition (A), red-colored iNOS staining was remarkably increased after 4 hrs of hypoxic treatment (B). PDX-1 immunostaining (green) in the MIN6 cells showed that PDX-1 expression was significantly decreased after 4 hrs of hypoxic treatment (D), compared to normoxic cultured cells (C). Nuclear staining of PDX-1 was rarely seen at 4 hrs. Blue color; DAPI staining. A, B; $\times 400$, C, D; $\times 1000$.

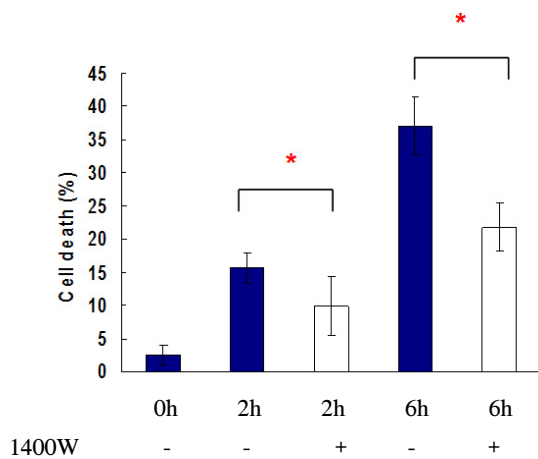


Fig. 8. This is cell viability using staining after 1400W treatment. Cell death rate at 2 and 6 hrs after hypoxic injury was significantly increased. But 1400W (specific iNOS inhibitor) pretreatment significantly decreased PI staining area at 2 and 6 hrs. 1400W pretreatment significantly attenuated the cell death rate.

다 저산소 자극 시 iNOS 발현이 의미있게 감소되었다 (relative protein expression compared to normoxic culture,

4 hrs of hypoxic culture vs. 1400 W pretreatment; 13.0 ± 0.5 vs. 10.4 ± 1.36 , $P < 0.05$) (Fig. 4B).

저산소 손상시 아포토시스 발생을 관찰하기 위하여 caspase-3를 본 결과, caspase-3 activity는 무산소 배양기에서 배양한지 2시간째부터 정상산소 배양 시보다 cleaved form의 단백질 발현이 의미있게 증가하였고 4시간째 가장 증가되었다가 6시간째 감소되었다 (Fig. 5A, B).

또한 NO 농도의 상승과 함께 PDX-1의 발현이 감소되었으므로, NO에 대한 PDX-1 발현의 직접적인 변화를 보기 위하여 NO 공여물질인 DETA-NO를 정상 산소 상태에서 12시간 동안 전처리 하여 PDX-1 mRNA의 변화를 관찰하였다. 저산소 자극이 없는 상태에서 DETA-NO를 전처리 할 경우 PDX-1 mRNA 발현이 농도와 비례하여 현저하게 감소되는 양상을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6).

5. 면역 염색

MIN6 cell을 무산소 배양기에서 4시간 배양한 후 iNOS 항체로 면역염색을 시행하였다. 4시간 저산소 처리 후 정상 산소 배양 시에 비하여 (Fig. 7A) 세포질 내 iNOS 단백질 발현이 현저하게 증가되었다 (Fig. 7B). 반면 PDX-1 염색

시 저산소 처리 후 핵에서의 PDX-1 염색이 현저하게 감소되어, 정상 산소 배양 시에 비하여 (Fig. 7C) 4시간 처리 시 핵에서의 PDX-1 발현은 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 7D).

6. iNOS 억제제 전처리 후 세포 생존율

세포 사멸에 대한 iNOS의 역할을 확인하기 위하여 배양한 MIN6 cell에 1400 W를 저산소 손상을 주기 전에 배양액에 전처치를 하고나서 2시간과 6시간 동안 무산소 배양기에서 배양하였다. 전처치를 시행하지 않은 군과 비교하기 위해 AO/PI 염색을 시행하여 세포 생존율을 구하였다. 그 결과 저산소 손상 시 시간에 비례하여 증가되었던 세포 사멸이 1400 W 전처리 후에 의미있게 감소되었다 (cell death rate; 6 h vs. 6 h +1400 W, 37.1 ± 8.9 vs. 21.8 ± 7.4 %, $P < 0.05$) (Fig. 8).

고 찰

본 연구에서는 베타세포에 저산소 자극을 유발할 경우 베타세포 사멸과 함께 아포토시스가 발생되었으며, 이러한 기전에 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 중요한 역할을 하는 것을 관찰하였다.

현재 폭발적으로 증가하는 당뇨병환자의 수와 함께, 새로운 당뇨병 약제들의 개발에도 불구하고 꾸준히 늘어나는 당뇨병성 만성합병증의 유병률 추세를 보면, 기존의 치료법 이외에 당뇨병을 이상적으로 완치할 수 있는 획기적인 방법이 요구된다. 자가면역 기전에 의해 베타세포가 선택적으로 파괴되는 제1형 당뇨병의 경우는 베타세포의 치환술 (Beta cell replacement therapy)이 유일한 완치 방법이며, 췌도이식이 대표적인 방법이다. 그러나 제2형 당뇨병의 경우에도, 당뇨병 발병 당시 이미 베타세포의 질량이 50% 정도 감소되어 있으므로, 췌도 이식술이 좋은 대안이 될 수 있다²⁵⁾.

현재로서는 췌도이식이 당뇨병을 완치할 수 있는 이상적인 방법이라고 하더라도, 공여 췌도의 부족, 면역거부 반응 및 면역억제제의 사용 등 해결해야 할 문제가 남아있다. 무엇보다도 췌도를 분리하고 이식하는 과정 중에 췌도에 발생하는 저산소 손상 및 염증반응은 그나마 부족한 췌도의 양적인 손실을 초래하며 췌도 생존에 절대적인 영향을 끼쳐 결과적으로는 췌도이식의 성적을 좌우하게 된다. 동물시험의 결과에서도 보면, 이식 초기에 산소 공급의 부족은 아포토시스에 의한 이식 췌도의 손실을 일으키며 결국은 초기의 이식편 기능저하를 유발한다^{19,20)}. 실험동물 모델에서도 췌도이식 후 이식된 베타세포 양의 약 60% 정도에서 아포토시스가 일어났으며 이러한 베타세포 손실의 절반 정도가 이식 후 첫 3일 이내에 발생하였다²¹⁾. 또한 임상적으로 췌도를 이식하는 부위인 간문맥 내 산소분압은 5 mmHg 정도로 보고 되었다²²⁾. 따라서 성공적인 췌도이식을 위해서는 이식

하는 과정 중 초기에 혈액공급의 일시적인 중단 및 이식편 이 혈관재생 (revascularization)의 과정을 거쳐 생착될 동안 발생하는 저산소 상태 및 다양한 염증반응으로부터 췌도를 보호하는 방안을 모색하는 것이 췌도이식의 성적을 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서 무산소 상태에서 베타세포를 배양할 경우 2시간째부터 뚜렷한 세포 손상이 관찰되었으며 6시간째 약 50% 정도의 베타세포가 사멸과 함께 caspase-3 활성의 증가가 관찰되었다. 저산소 자극에 대한 세포의 반응은 세포의 생존을 위해 다양한 전사인자들이 활성화 되는데, 특히 Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)가 대표적인 조절인자로서 사람이나 쥐의 췌도 및 베타세포에도 존재함이 알려져 있다¹⁷⁾. HIF-1은 세포 증식, 혈관생성, 아포토시스 등의 다양한 유전자의 발현을 조절하는데, 이 중 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 역시 HIF-1에 의해 유도된다²³⁾.

iNOS에 의해 생성되는 NO는 제1형 당뇨병의 병인인 자가면역 기전에 의한 베타세포의 파괴에 있어서 중요한 매개인자로 역할을 하며, cytokine에 의해 생성된 NO는 인슐린 합성을 감소시키고^{13,24,25)}, 미토콘드리아 손상, 활성산화종 생성 증가 및 DNA 구조를 파괴하여 아포토시스를 유발한다²⁴⁾. iNOS는 정상상태에서는 발현되지 않고 있다가 염증 반응과 같은 세포에 유해한 자극이 가해질 경우 이에 대한 세포반응을 조절하는 것으로 알려져 있는데, iNOS의 산물인 NO는 Bcl-2를 억제하고 p53을 증가시킴으로써 caspase 활성을 유도하여 아포토시스를 유발한다고 한다²⁶⁾. 그러나 베타세포에서 급성 저산소 손상과 iNOS 발현의 관련성은 아직 알려져 있지 않다.

본 실험에서 저산소 손상 후 iNOS의 유전자 및 단백질의 발현은 시간경과에 따라 증가하였고, iNOS의 선택적인 억제제인 1400 W를 전처리 하였을 때 iNOS 단백질의 발현이 감소하였다. 저산소 손상에 따른 NOS 발현의 증가는 세포 배양액 내 NO 농도의 증가와 함께 면역염색 시 세포질 내 iNOS 염색의 결과와도 일치하였다. 저산소 자극 시 NO가 유도되는 기전에 있어서 제1형 당뇨병의 병인에서와 같이 cytokine이 중요한 역할을 하는지는 아직 확실치 않다. 저자들은 저산소 자극 시 배양한 MIN6 cell의 배지 내 iNOS를 자극하는 대표적인 cytokine인 IL-1b 농도가 2시간째 증가되는 것을 관찰하였다 (Data not shown). 또한 iNOS promoter 부위에 HIF-1의 결합부위인 HIF-1 response element (HRE)가 존재하므로 이 경로를 통해서도 iNOS 발현이 유도될 수 있으며, 저산소 손상 시 유발되는 산화 스트레스 역시 iNOS를 활성화 시킬 수 있을 것으로 추정되나 이러한 기전에 대하여는 추가 연구가 필요하다.

또한 저산소 자극 후 6시간까지는 인슐린 유전자의 발현에는 큰 변화가 관찰되지 않았으나 시간 경과에 비례하여 PDX-1 유전자의 발현이 감소되는 양상을 보였는데, 면역염

색에서도 저산소 자극 후 4시간째 및 정상 산소 조건에서 NO donor를 처리하여 베타세포 핵 내의 PDX-1 발현이 현저히 감소되었다. 따라서 베타세포에 급성으로 저산소 손상을 가할 경우 나타나는 급격한 세포사멸의 과정에 iNOS가 관련이 있었고 PDX-1 발현에도 연관이 있음을 관찰하였다. 이번 연구 결과만으로 NO가 PDX-1 발현을 직접적으로 조절하는 것으로 단정 짓기는 어려우나, NO donor 처리 시 발현이 감소되고 iNOS 억제제 처리 시 PDX-1 발현의 감소가 상쇄되었으므로 iNOS 활성화에 의해 PDX-1 발현이 조절되는 것으로 추정할 수 있었으며, 이 기전에 대하여는 추가 연구가 필요할 것이다. 또한 저산소 손상으로 인한 세포사멸은 iNOS의 선택적인 억제제의 전처치로 의미있게 감소되었으므로, iNOS 발현을 억제시킴으로써 베타세포의 손상을 예방할 수 있을 것으로 기대된다²⁷⁻²⁹⁾.

결론적으로 iNOS 활성화는 저산소 자극으로 유발된 베타세포의 손상 기전에 기여하는 것을 알 수 있었고, 따라서 iNOS 발현을 조절하는 것을 목표로 하는 치료법이 저산소 자극에 대한 베타세포의 기능 및 생존을 유지시키는데 도움이 될 것이다. 추후 저산소 손상 시 iNOS 발현이 유도되는 세포 내 신호전달 기전의 연구 및 iNOS 발현을 억제함으로써 췌도이식의 성적을 개선시키거나 베타세포의 아포토시스와 사멸을 억제할 수 있을지에 대한 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 상당수의 당뇨병환자에서 당뇨병성 합병증의 발생은 필연적인 문제가 되고 있으며, 기존의 당뇨병 치료법만으로는 완벽한 수준의 혈당조절에 도달하기 어렵기 때문에 당뇨병을 완치하기 위한 획기적인 치료법이 요구되고 있다. 현재로서는 췌도 또는 췌장이식이 당뇨병의 완치를 위한 이상적인 치료 방법이다. 그러나 췌도를 분리 및 이식하는 과정에서 혈류공급의 차단으로 인한 저산소 손상과 다양한 염증성 cytokine에 의한 췌도 손상이 췌도이식의 성적과 함께 이식편 생존에 큰 영향을 미친다. 특히 nitric oxide (NO)는 또한 인슐린 합성을 감소시키고 베타세포 사멸을 일으키는데, 췌도가 저산소 상태에 노출되어 이로 인한 손상을 받을 경우에도 cytokine과 관련된 염증성 반응이 관련될 것으로 추정되나 췌장 베타세포에서 저산소 손상과 NO 및 iNOS 과의 관계에 대한 연구는 아직 많이 알려져 있지 않다.

방법: MIN6 세포를 실험조건에 따라 시간별로 무산소 배양기 (75% N₂/15% CO₂/5% H₂)에서 배양하여 저산소 처치를 하였다. 베타세포의 생존율은 저산소 처리 후 Acridine orange (AO)/Propidium iodide (PI) 염색을 시행하였고, 저산소 처리 후 배지 상층액을 수거하여 Griess

reagent법으로 nitric oxide (NO)농도를 측정하였다. 저산소 손상 시 유전자 발현의 변화는 realtime PCR을 이용하여 iNOS, PDX-1, Insulin 발현을 관찰하였고 cyclophillin gene과 비교하였다. 항 iNOS mouse monoclonal 항체와 항 caspase-3 mouse monoclonal 항체를 이용하여 Western blot 분석을 하였으며 iNOS와 PDX-1에 대한 면역염색을 시행하였다. 저산소 조건이 PDX-1 유전자 발현에 직접적인 영향을 주는지 보기위해 1400W를 전처치 하였고 실험 조건에 따라 iNOS의 선택적인 억제제인 1400W를 배지에 전처치하여 유전자 및 단백질 발현의 변화를 관찰하였다.

결과: MIN6 세포에서 저산소 손상 후 2시간 및 6시간째에 정상산소 배양 조건에 비하여 처리 시간과 비례해서 현저하게 세포가 사멸되는 것을 관찰할 수 있었다. 저산소 손상을 준 후 배양액을 수거하여 NO 농도를 측정한 결과 시간의 경과에 따라 배양액 내 NO 농도가 의미있게 증가되었다. 또한 무산소 조건에서 2시간 후부터 iNOS mRNA 발현이 증가되었으며, 6시간까지 시간과 비례하여 증가되었다. 그러나 PDX-1 mRNA 발현은 시간이 증가하면서 발현이 현저히 감소되었다. 4시간째는 정상 산소군에 비해 iNOS 단백질의 발현이 의미있게 증가되었으며 1400W를 전처치 하였을 때도 하지 않았을 때보다 iNOS 발현이 현저하게 감소되었고 iNOS에 대한 면역염색 결과도 같은 양상을 보였다. 반면 PDX-1의 면역염색 시 저산소 처리 후 핵에서의 PDX-1 염색이 현저하게 감소되었다. 저산소 손상시 아포토시스 발생을 관찰하기 위하여 caspase-3를 본 결과, caspase-3 activity는 무산소 배양기에서 배양한 지 2시간째에 정상산소 배양시보다 cleaved form의 단백질 발현이 의미있게 증가하였다. 저산소 손상 시 시간에 비례하여 증가되었던 세포 사멸이 1400W 전처치 후에 의미있게 감소되었다.

결론: 본 연구 결과로 MIN6 세포에서 저산소 손상을 줄 경우 베타세포의 사멸과 함께 베타세포의 아포토시스가 관찰되었다. iNOS가 이 과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 추가 연구를 통하여 iNOS 발현을 조절함으로써 췌도이식의 과정에서 발생하는 베타세포에 대한 저산소 손상을 줄일 수 있는 방안을 모색할 수 있을 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 당뇨병학회 연구비와 2004년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구됨 (과제번호: KRF-2004-003-E00095).

참 고 문 헌

1. Saaddine JB, Cadwell B, Gregg EW, Engelgau MM,

- Vinacor F, Imperatore G, Narayan KM: *Improvements in diabetes processes of care and intermediate outcomes: United States, 1988-2002. Ann Intern Med* 144:525-7, 2006
2. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med* 343:230-8, 2000
3. Weir GC: *Can we make surrogate beta-cells better than the original? Semin Cell Dev Biol* 15:347-57, 2004
4. Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S: *Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. J Clin Endocrinol Metab* 88:2300-8, 2003
5. Robertson RP: *Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress. N Engl J Med* 350:694-705, 2005
6. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA: *Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. J Leukoc Biol* 77:587-97, 2005
7. Linn T, Schmitz J, Hauck-Schmalenberger I, Lai Y, Bretzel RG, Brandhorst H, Brandhorst D: *Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets. Clin Exp Immunol* 144:179-87, 2006
8. Kroncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V: *Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. Int Immunopharmacol* 1:1407-20, 2001
9. Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, Pfeilschifter J: *Inducible NO synthase: role in cellular signalling. J Exp Biol* 202:645-53, 1999
10. Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR Jr, McDaniel ML: *Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1731-5, 1993
11. Eizirik DL, Pavlovic D: *Is there a role for nitric oxide in beta-cell dysfunction and damage in IDDM? Diabetes Metab Rev* 13:293-307, 1997
12. Welsh N, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S: *Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. Endocrinology* 126:3167-73, 1991
13. Steller H: *Mechanisms and genes of cellular suicide. Science* 267:1445-9, 1995
14. Henningsson R, Salehi A, Lundquist I: *Role of nitric oxide synthase isoforms in glucose-stimulated insulin release. Am J Physiol Cell Physiol* 283:C296-304, 2002
15. Postovit LM, Sullivan R, Adams MA, Graham CH: *Nitric oxide signalling and cellular adaptations to changes in oxygenation. Toxicology* 208:235-48, 2005
16. Semenza GL: *Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. Trends Mol. Med.* 7:345-350, 2001
17. Moritz W, Meier F, Stroka DM, Giuliani M, Kugelmeier P, Nett PC, Lehmann R, Candinas D, Gassmann M, Weber M: *Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression. FASEB J* 16:745-7, 2002
18. Keinänen R, Vartiainen N, Koistinaho J: *Molecular cloning and characterization of the rat inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. Gene* 234:297-305, 1999
19. Dionne KE, Colton CK, Yarmush ML: *Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. Diabetes* 42:12-21, 1993
20. Davalli AM, Scaglia L, Zangen DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC: *Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. Diabetes* 45:1161-7, 1996
21. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E: *Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short-and long-term hyperglycemia. Diabetes* 51:66-72, 2002
22. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P: *Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. Diabetes* 50:489-95, 2001
23. Zagorska A, Jozef Dulak: *HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. Acta Biochimica Polonica.* 51:563-85, 2004

24. McCabe C, Samali A, O'brien T: Beta cell cytoprotective strategies: *establishing the relative roles for iNOS and ROS*. *Biochem Biophys Res Commun* 342:1240-8, 2006
25. Stoorling J, Binzer J, Andersson AK, Zullig RA, Tonnesen M, Lehmann R, Spinas GA, Sandler S, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T: *Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt*. *Diabetologia* 48:2039-50, 2005
26. Brune B, von Knethen A, Sandau KB: *Nitric oxide and its role in apoptosis*. *Eur J Pharmacol* 351:261-72, 1998
27. Beeharry N, Chambers JA, Faragher RG, Garnett KE, Green IC: *Analysis of cytokine-induced NO-dependent apoptosis using RNA interference or inhibition by 1400W*. *Nitric Oxide* 10:112-8, 2004
28. Rydgren T, Sandler S: *Efficacy of 1400 W, a novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in preventing interleukin-1beta-induced suppression of pancreatic islet function invitro and multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in vivo*. *Eur J Endocrinol* 147:543-51, 2002
29. Kato Y, Miura Y, Yamamoto N, Ozaki N, Oiso Y: *Suppressive effects of a selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor on pancreatic beta-cell dysfunction*. *Diabetologia* 46:1228-33, 2003