

## 인슐린 수용체 이상 (요정증) 환자 섬유아세포를 이용한 인슐린 작용 연구

성균관의대 삼성의료원 소아과학교실<sup>1</sup>, 삼성생명과학연구소 임상의학연구센터<sup>2</sup>, 이화여자대학교 신호전달체계연구소<sup>3</sup>고시환<sup>1</sup>·오유정<sup>2</sup>·장미경<sup>2</sup>·배윤수<sup>3</sup>·진동규<sup>1</sup>

A Study on Insulin Action Using Fibroblast of Leprechaunism Patients

Si Whan Koh<sup>1</sup>, Yoo Joung Oh<sup>2</sup>, Mi Koung Chang<sup>2</sup>, Yun Soo Bae<sup>3</sup>, Dong-Kyu Jin<sup>1</sup>*Department of Pediatrics, Sungkyunkwan University School of Medicine, Samsung Medical Center<sup>1</sup>, Clinical Research, Samsung Biomedical Research Institute<sup>2</sup>, Division of Molecular Life Sciences, Center for Cell Signaling Research, Ewha Womans University, Seoul, Korea<sup>3</sup>.*

## - Abstract -

**Background:** Leprechaunism, which is caused by insulin receptor defect, is clinically characterized by hyperinsulinemia, stunted growth, dysmorphic somatic abnormalities, lipodystrophy and early death around 2~3 years of age.**Methods:** In this study we describe 2 cases of Korean leprechaunism patients. In addition, the disturbed insulin induced effects such as glucose uptake, insulin binding assay, thymidine uptake and PDGF stimulated phosphorylation change were investigated using the fibroblasts from 1 Korean patient and those from 4 foreign leprechaunism patients.**Results:** The morphologic study of fibroblasts derived from patient suggests that the fibroblasts of patient are less differentiated than the fibroblasts of control. Moreover, insulin induced pathways as well as PDGF stimulated phosphorylation change were disturbed in the fibroblasts of the patient.**Conclusion:** Our results suggest that the signal transduction in the fibroblasts of leprechaunism is reduced not only by insulin stimuli but also by other growth factors like PDGF (**J Kor Diabetes Assoc 30:39~46, 2006**).**Key Words:** Leprechaunism, Insulin receptor defects, Insulin signal transduction

## 서 론

인슐린은 당 및 기타 영양분의 저장 및 사용을 지시하는 호르몬으로서 주 작용기관은 근육, 간, 지방조직 등으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 인슐린이 표적세포에서 그 작용이 감소한 상태를 인슐린 저항성이라 정의하며 이는 주로 성인에 발병하는 제 2형 당뇨병의 발병요인으로 생각되어지고 있다<sup>2,3)</sup>. 인슐린 저항성에 대한 명확한 기전은 밝혀진 바 없으나, 세포수준에서의 인슐린 저항성은 크게 인슐린 표적세포에서 인슐린과 인슐린 수용체와의 결합이 감소하는 수용체 결함 (receptor defect)과 수용체 결합 이후의 인슐린 작용의 결함인 수용체후 결함 (post-

receptor defect)의 두 가지로 나누어 설명되어지고 있다<sup>4)</sup>.

인슐린 수용체는  $\alpha$ 와  $\beta$  두개의 subunit으로 구성되며 세포 표면에는  $\alpha$ -subunit이 주로 존재하여 insulin binding domain으로 작용하고  $\beta$ -subunit은 tyrosine kinase에 의해 autophosphorylation이 일어나고 인슐린 수용체 기질 단백질과 Shc을 인산화 시킨 후 다양한 하위의 신호 단백질과 결합하여 대사 작용과 세포증식효과를 나타낸다<sup>5)</sup>. 세포막 수용체와 결합함으로써 시작되는 인슐린 신호 전달체계는 동물의 거의 모든 장기세포에 발견되며 특히 지방조직, 간, 및 근육에 고농도로 존재하는 인슐린 수용체는 인슐린과 결합 후 유의한 생물학적 반응이 이루어지게 된다.

인슐린 수용체에 돌연변이가 생겨 인슐린 수용체가 기능을 잃는 질환인 leprechaunism (요정증, Type A 인슐린저항성증후군)는 매우 희귀하게 발견되는 질환으로서<sup>6)</sup>, 마치 인슐린 저항성이 있는 knockout mice model과 같은 양상을 보이므로 그들로부터 분리한 섬유아세포를 이용한 세포계 연구는 제2형 당뇨병 연구 특히 인슐린저항성연구의 하나의 모델이 될 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구자는 한국인에서 요정증 환자 2례를 발견하였으며, 이 환자들은 정상 소아보다 혈중 인슐린의 양이 10~100배 이상 증가되어 심한 인슐린 저항성을 보였고, 또한 외관상 외국에서 보고된 요정증 환자와 외모가 매우 흡사하였다. 또한 내분비적으로 심한 인슐린 저항성으로 인하여 자궁 내 성장 지연 및 이상한 얼굴모양(큰 귀, 돌출한 눈, 소하악증, 넓은 외비공, 치은 비후 등), 흑색 극세포 증가증, 지방이영양증 등과 통상적인 인슐린 치료에 반응하지 않는 당뇨병의 특징을 나타냈다. 이밖에도 다모증, 성기 및 유방의 비후 및 직장 탈출, 난소의 낭종등을 동반하였다.

본 연구는 이러한 인슐린 수용체의 이상이 있을 것으로 추

정되는 요정증 환자의 섬유아세포를 모델로 이용하여 세포수준에서 인슐린 저항성을 증명하고 인슐린저항성이 없는 섬유아세포와의 인슐린 작용에 대한 차이점을 알아 보았다.

## 대상 및 방법

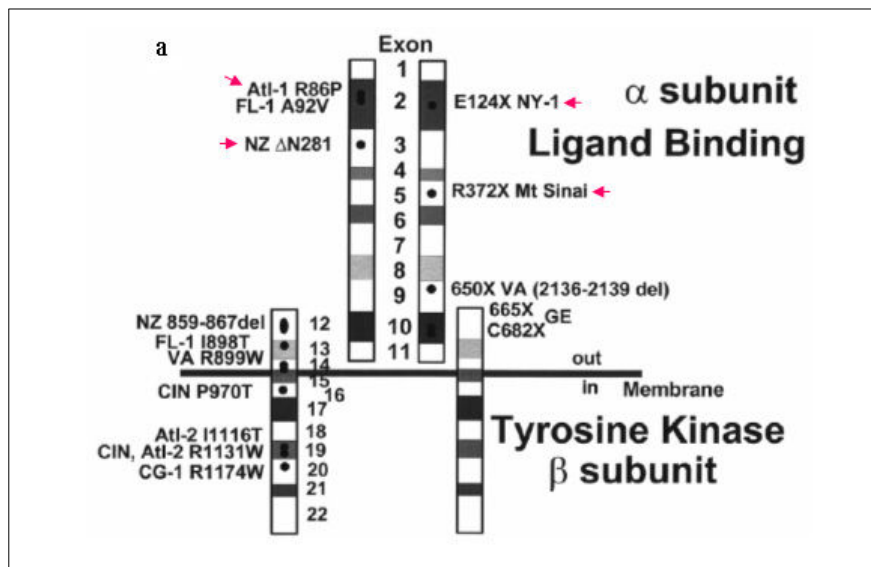
### 1. 연구대상

요정증으로 추정되는 2례의 환자의 섬유아세포와 Dr. Longo<sup>7)</sup>로부터 분양 받은 인슐린 수용체 이상 환자의 섬유아세포 ATL-1, NY-1, NZ와 Mt-Sinai를 연구에 사용 하였다. Longo 등에 의해 연구에 사용되어진 섬유아세포의 특성과 인슐린 수용체 이상에 대한 실험적인 검증 결과는 각각 Table 1과 Fig.1에서 보여주고 있다. 대조군으로는 2세 남아에서 서혜부탈장 수술시에 피부를 적출하여 배양한 2례의 섬유아세포를 사용하였다.

증례 1은 2년 4개월된 여아로 직장탈출 (rectal prolapse) 및 심한 성장 및 발달장애를 주소로 입원하였다. 환아는 재태

**Table 1.** Characteristics of Fibroblasts Derived from Patients with Leprechaunism

Patient	Sex	Birth weight (kg)	Gestational age (weeks)	Survival (months)	Specific binding of insulin (fmol/mg cell protein)	Mutation
ATL-1	M	1.9	40	6	0.07 ± 0.04	R86P/R86P
Mt-Sinai	F	1.9	35	7	0.05 ± 0.05	R372X/Low RNA
NZ	M	1.9	40	24	0.02 ± 0.02	(N281/859-867
NY-1	F	-	36	4	0.01 ± 0.01	E124X/E124X
Control	-	-	-	-	1.52 ± 0.15	-



**Fig. 1.** Reported mutations in the insulin receptor gene in patients with leprechaunism.

기간 34주 6일에 1.52 kg으로 제왕절개술로 분만되었으며, 출생 후 잦은 감염과 고혈당증 및 성장장애로 외부병원 중환자실에 자주 입원을 하였었고, 가족력상 형제는 없었으며, 외조부가 고혈압, 외삼촌과 그의 자녀 2명에서 자궁 내 성장지연이 있었다. 입원시 신장은 60 cm (SDS: -6.13), 체중은 7 kg (SDS: -3.36)으로 심한 성장장애와 발달장애를 보이고 있었다. 전신적으로 흑색 극세포 증가증, 지방이영양증 및 심한 다모증이 있었으며, 이상한 얼굴 모양 (크고 두꺼운 귀, 크고 넓은 외비공, 두꺼운 입술 및 치은 비후)을 하고 있었으며, 제대 및 서혜부 탈장, 직장 탈출 및 손발톱의 비후가 관찰되었고, 이 밖에도 Tanner stage 2 정도의 유방 발달과 음핵의 비후가 있었다. 공복시 혈당: 287 mg/dL, HA1C: 7.5%, insulin: 960.7 uIU/mL, C-peptide: 23.97 ng/mL로 고인슐린, 고혈당증을 보이고 있었으며, 호르몬 검사상 FSH: 1 mIU/mL, LH: 1 mIU/mL, estradiol: 7 pg/mL, progesterone: 1.14 ng/mL, testosterone: 0.08 ng/mL로 정상 소견을 보였다. 복부 초음파 검사상 난소에 낭종 등의 소견은 없었으며, 신석회침착증이 있었다. 입원하여 직장 탈출 및 제대 및 서혜부 탈장을 교정 후 관찰 중 패혈증 및 전해질 불균형으로 사망하였다.

증례 2는 8개월 된 남아로 색소 침착과 다모증을 주소로 내원하였다. 환아는 재태기간 40주에 2.45 kg으로 정상분만 하였으며, 출생 100일경부터 경부, 액와부, 서혜부 등에 색소 침착의 증가를 보이기 시작하였다. 가족력 상 형제는 없었으며, 성장 지연이나 발달 장애는 없었다. 입원시 신장은 68 cm (SDS: -1.56), 체중은 8 kg (SDS: -1.14)이었고, 전신적으로 흑색 극세포 증가증, 지방이영양증 및 심한 다모증이 있었으며, 이상한 얼굴 모양 (크고 두꺼운 귀, 크고 넓은 외비공, 두꺼운 입술)을 하고 있었으며, 손발톱과 유두의 비후가 관찰되었다. 공복시 혈당: 69 mg/dL, HA1C: 4.8%, insulin: 554.6 uIU/mL, C-peptide: 13.81 ng/mL, estradiol: 3.0 pg/mL, progesterone: 0.32 ng/mL의 소견을 보였다. 복부 초음파 검사는 정상 소견이었고, IVGTT and minimal model analysis 결과는 SI (insulin sensitivity index):  $0.22 \pm 23.3\%$ , SG (glucose effectiveness):  $0.0172 \pm 163.4\%$ , AIRg (acute insulin response): 26687.2로 age와 BMI-matched control과 비교하지 못하지만 성인에 비하여도 SI 및 SG가 매우 감소하였고, AIRg는 매우 증가한 결과였다. 증례 2는 진단초기에는 요정증 환자의 외모와 일치하지 않았으나 차츰 전형적인 요정증 환자의 외모를 보였으며 심한 인슐린 내성을 나타냈다.

증례 1 환자의 세포배양은 실패하였고, 증례 2 환자의 피부에서 섬유아세포를 배양해 으며 이를 연구에 사용하였다.

## 2. 연구방법

### 1) 섬유아세포 배양

섬유아세포는 20% fetal bovine serum (JRH Bioscience) 이 함유된 DMEM (Dulbeco's Modified Eagle's Medium,

Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.)을 사용하여 5% 이산화탄소 배양기에 37°C에서 3~5일간 배양하여 배양기 (Φ100 mm) 바닥에 부착하여 자라는 세포가 80~90% 정도 바닥을 채운 상태로 배양한 단층의 섬유아세포를 사용하였다.

### 2) Glucose uptake assay

섬유아세포는 24-multiwell dish에 배양하여 본 실험에 들어가기 전 날 새로운 배지로 교체했다. 배지를 제거한 후 섬유아세포를 1% BSA 함유한 37°C Hepes/ salts (pH 7.4) 완충용액으로 3회 세척하였다. 각 well 당 2 mL의 Hepes/ salts (pH 7.4) 완충용액을 넣고 인슐린과 저해제 5 mM cytochalasin B 용액 (최종 농도 10 μM)을 각기 해당하는 well에 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Glucose가 첨가되지 않은 24°C Hepes/ salts (pH 7.4) 완충용액으로 각 well 당 1 mL씩 3회 세척한 후 각 well 당 1 mL의 Hepes/salts (pH 7.4) 완충용액을 넣고 5 mM cytochalasin B 용액을 최종 농도 10 μM 되도록 해당 well에 첨가하였고 0.2 μCi <sup>3</sup>H-deoxy-D-Glucose (New England Nuclear Life Science)을 최종농도가 0.1 mM 되도록 첨가하였다. 24°C에서 5분간 반응시킨 후 반응액을 제거하여 반응을 종료시켰다. 각 well을 4°C phosphate buffered saline (PBS)로 5회 세척한 후 각 well 당 0.1 N NaOH 1 mL을 넣고 37~55°C에서 30~60분간 교반시켜 세포를 녹인 후 각 well의 추출액을 scintillation 용액 5 mL과 혼합하여 β-counter (Tri-Carb 2500TR, Packard)를 사용하여 측정하였다.

### 3) Thymidine incorporation assay

섬유아세포는 24-multiwell dish에 배양하여 본 실험에 들어가기 전 날 새로운 배지로 교체했다. 혈청이 함유되지 않은 0.1% bovine serum albumin (BSA) DMEM 배지를 사용하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. Insulin 첨가량을 증가시키며 0.3% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C에서 12~16시간 배양하였다. 각 well 당 0.5 μCi의 <sup>3</sup>H-thymidine (New England Nuclear Life Science)을 첨가하고 37°C에서 4시간 반응시킨 후 반응액을 제거하여 반응을 종료시켰다. 각 well은 차가운 PBS와 10% Trichloric acid (TCA) 그리고 80% 에탄올을 사용하여 순차적으로 세척한 후 1N NaOH 용액을 사용하여 세포를 녹였다. 각 well의 세포 추출액은 HCl로 중화시킨 후 scintillation 용액 5 ml과 혼합하여 β-counter (Tri-Carb 2500TR, Packard)를 사용하여 측정하였다.

### 4) Immunoblot analysis of tyrosine phosphorylation by PDGF

섬유아세포는 20% fetal bovine serum (JRH Bioscience) 이 함유된 DMEM을 사용하여 5% 이산화탄소 배양기에 37°C에서 3~5일간 배양하여 배양기 (Φ100 mm) 바닥에 부착하여

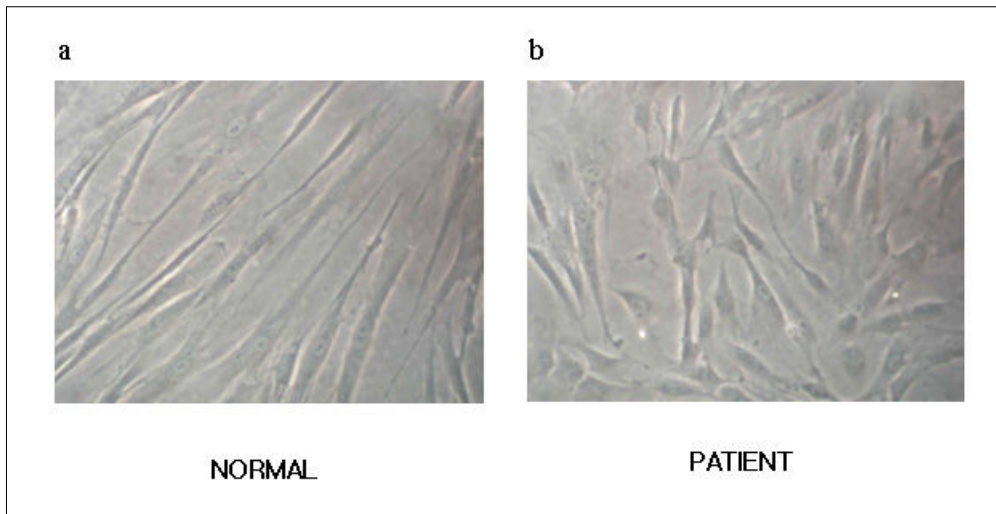


Fig. 2. Phase contrast microscopy of cultured fibroblasts, a) from a normal control and b) from a patient with leprechaunism.

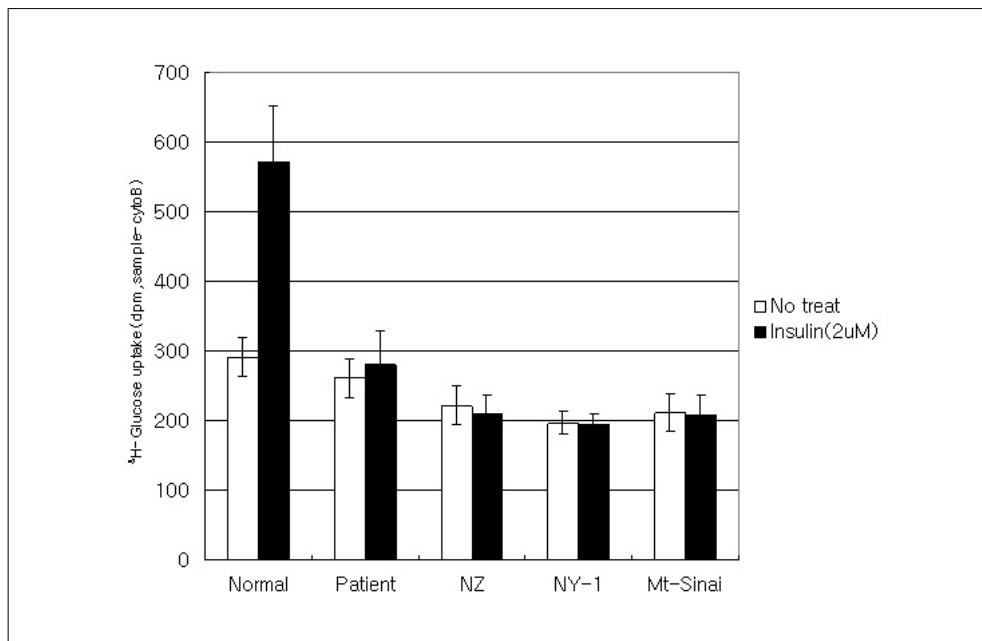
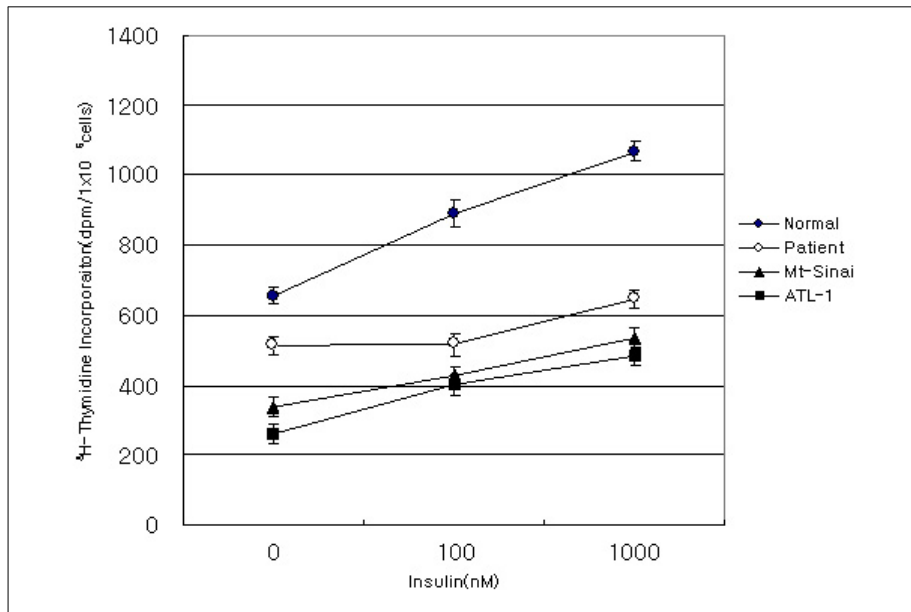


Fig. 3. Stimulation of glucose uptake by insulin in normal controls and patients fibroblasts. Glucose uptake was measured as described in the Materials Method. Data are represented mean ( $\pm$  S.D. Significant differences in insulin-stimulated glucose uptake were not noted between all leprechaunism patient fibroblasts (Normal:  $P < 0.05$ , Patient:  $P < 0.001$ ). Statistical comparisons between the means were made with t-test.

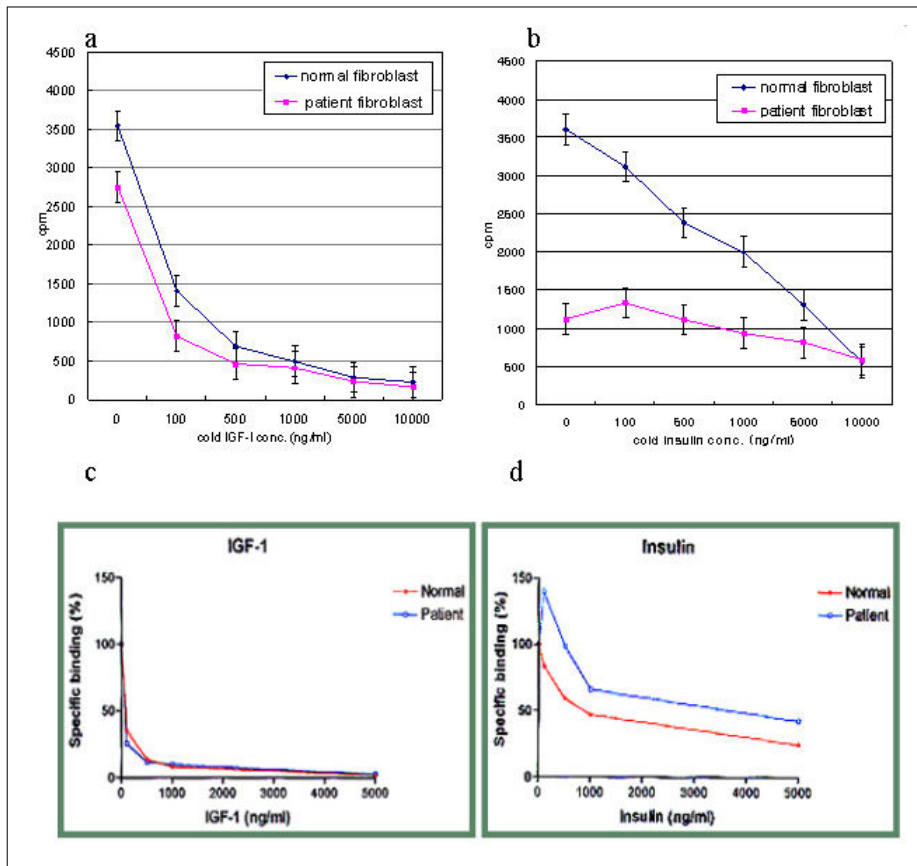
자라는 세포가 80~90 % 정도 바닥을 채운 상태로 배양한 단층의 섬유아세포를 6 well plate에 각 well 당  $1 \times 10^5$ 개의 세포를 접종하여 serum이 결핍된 상태에서 16시간 동안 배양한 후 PDGF (50 g/mL)을 첨가 혹은 첨가하지 않고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% NP40, 150 mM NaCl, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 2  $\mu$ g/mL leupeptin)를 첨가하여 반응을 종료시켰다.

세포 분해액의 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electro-

phoresis (SDS-PAGE)에 의하여 분리하였으며 PVDF membrane (Millipore)에 이동시켰다. 1% bovine serum albumin으로 1시간 blocking 한 후, anti-phosphotyrosine (4G10, Upstate Biotechnology)을 1시간 반응시켰다. 10분씩 세 번 세척하였고, horse-radish peroxidase가 접합된 2차 항체를 50분간 반응시켰다. 10분씩 다섯번 세척하고 Enhanced Chemi-Luminescence kit를 사용하여 현상하였다.



**Fig. 4.** Insulin stimulation of thymidine incorporation in the fibroblasts derived from patients and normal control. Cells were growth-arrested by incubating the cells in serum-free DMEM for 48 h. The cells were incubated with increasing concentrations of insulin. After 16 h of incubation, cells were labeled with 0.5  $\mu$ Ci/ml of [ $^3$ H]thymidine for another 4h. The radioactivity was counted using a scintillation counter. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons between the means were made with Mann-Whitney test.



**Fig. 5.** Receptor binding assay. a, c) Binding of  $^{125}$ I-IGF-1; b, d) binding of  $^{125}$ I-insulin. In receptor binding assay, the cell extracts were incubated with increasing concentrations (a, 0-10000ng/ml, c, 0-5000ng/ml) of  $^{125}$ I-IGF-I and  $^{125}$ I-insulin (b, 0-10000ng/ml, d, 0-5000ng/ml). Data are represented mean  $\pm$  S.D. Statistical comparisons between the means were made with Mann-Whitney test.

#### 5) Receptor binding assay

섬유아세포는 24-multiwell dish에 배양하여 본 실험에 들어가기 전 날 새로운 배지로 교체했다. 각 well 당 1 mL의 Earle's balanced salt solution (EBSS) buffered with tris (hydroxymethyl) aminomethane (26 mM, pH 7.4)배지와  $^{125}$ I-insulin 혹은  $^{125}$ I-insulin-like growth factor-I를 첨가한 후 4℃에서 16시간 반응시킨 후 반응액을 제거하여 반응을 종료시켰다. 각 well은 0.1 N NaOH 용액을 사용하여 세포를 녹인 후 세포 추출액은 scintillation 용액 5 mL과 혼합하여  $\gamma$ -counter (WAL-LAC)를 사용하여 측정하였다.

#### 6) Data calculation and statistical analysis

각각의 표에서 실험값들의 mean  $\pm$  SD를 표시하였다. 평균값의 통계적 비교는 정규분포의 경우 t-test를 사용하였고, 비정규분포의 경우 Mann-Whitney test를 사용하였다.

#### 7) 인슐린 수용체 유전자의 돌연변이 검색

배양한 섬유아세포에서 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, Wisc., USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 22개 exon 전체에 대해 ABIPRISM Dye Terminator Cycle Sequencing core kit (Applied Biosystems, Division of Perkin-Elmer, Foster city, CA)를 이용하여 염기서열 분석을 시행하였다.

### 결 과

배양된 섬유아세포는 정상 대조군과 요정증 환자군 간에 형태적인 차이를 보였으며 (Fig. 2), 요정증 환자로부터 분리한 섬유아세포의 증식 속도가 정상 대조군에 비해 현저히 감

소되었다.

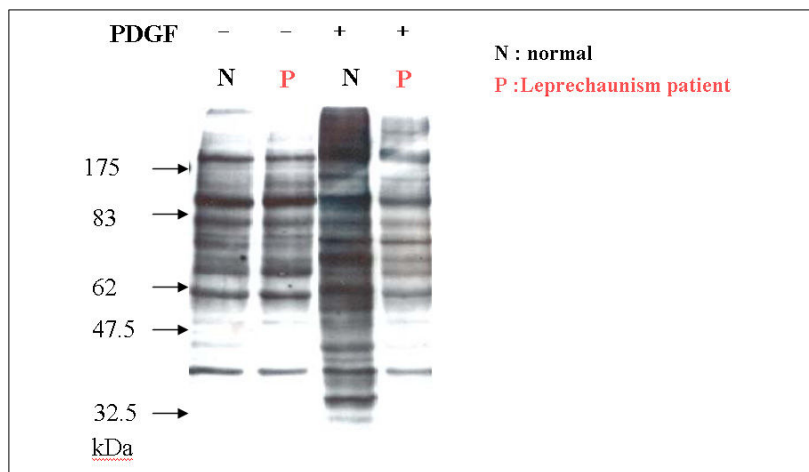
세포 수준에서의 glucose uptake assay 결과에서 정상 대조군은 인슐린 자극 후에 glucose 획득 능력이 증가되었으나 ( $P < 0.05$ ), 환자군의 세포에서는 인슐린 자극 후에 전후 glucose 획득 능력이 유의한 차이를 보이지 않았다 ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3). 그리고 thymidine incorporation assay결과에서도 환자군 세포들이 인슐린 자극에 대하여 정상 대조군과 비교했을 때 확연히 낮은 결과치를 나타냄으로써 정상 대조군과의 유의적인 차이를 보였다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4).

인슐린 수용체 이상에 대한 검증을 위하여 인슐린 수용체와의 결합 능력을 알아 보았다. 인슐린 및 IGF-I와의 결합 반응을 시행한 결과, 환자의 섬유아세포에서 인슐린 결합의 감도가 감소되는 것을 알 수 있었던 반면 IGF-I의 결합에 대한 감도는 환자군과 정상군 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5).

이상의 결과에서 인슐린 수용체 이상이 있는 환자의 섬유아세포에서 PDGF와 같은 growth factor에 의한 단백질의 인산화 차이를 알아보기 위하여 정상 대조군과 환자의 섬유아세포에 PDGF 자극을 준 후 이에 대한 tyrosine 인산화 정도를 immunoblotting을 통해 알아보았다. 그 결과 환자의 섬유아세포가 정상 대조군의 섬유아세포에서보다 tyrosine의 인산화 정도가 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

### 고 찰

고인슐린혈증과 인슐린저항성과 연관해서 그 기전연구로는 knockout mouse model을 들 수 있다. 지금까지 발표된 모델들을 살펴보면 인슐린수용체 (IR)의 knockout mouse model (IR-/-)는 출생시 정상이나 1주일후에 심한 당뇨병성酮



**Fig. 6.** Reduced tyrosine phosphorylation by PDGF in the fibroblast cells from leprechaunism patients. The cells were seeded in 6-well plates and serum starved for 16 hours before receiving 50 ng/ml PDGF for the 10min. Fibroblast cell lysates were immunoblotted with anti-phosphotyrosine.

산 혈증으로 사망하는 것으로 보고되었고, IR+/-인 heterozygous mutant는 중간 정도의 고인슐린혈증을 보이거나 10% 정도에서만 경한 당뇨병을 나타내는 것으로 보고되고 있다<sup>8)</sup>. 사람에게 있어서는 인슐린 immunoblotting을 mutation이 있는 일부 요정증의 경우 당뇨병성 혈증 없이 사람의 모델과 서로 일치하지 않고 있다.

최근 간이나 근육이 당뇨의 인슐린저항성에 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있는데 이와 연관해서 간이나 근육에 발현되는 인슐린수용체의 knockout mouse model이 알려져 있다. 간에서만 인슐린수용체가 발현되지 않는 LIRKO의 경우는 심한 고인슐린혈증과 인슐린저항성이 2개월 때 나타나는데 4개월이 되면 공복시 고혈당이 나타나는 현상이 사라지는 것으로 보아 간에서의 인슐린 저항성만으로는 인슐린 비의존성 당뇨병이 초래되지 않는 것으로 판단되고 있다<sup>9)</sup>. 근육에서만 knockout이 일어나는 MIRKO의 경우는 근육에서 인슐린에 의해 유발되는 당흡수가 저하되어 있음에도 불구하고 혈중 인슐린수치가 정상이고 인슐린저항성이 나타나지 않는다고 한다<sup>10)</sup>. 이 mouse model을 통해 역시 근육의 인슐린 저항성만으로는 인슐린 비의존성 당뇨병이 초래되지 않는 것으로 판단되고 있다.

따라서 인슐린 수용체 아래의 신호전달체계에 관여하는 인산화 단백질에 관심이 모아지게 되었고 IRS-1 knockout mouse model (IRS-1 -/-)이 보고되었다. 이 경우 분명한 당뇨병은 발생하지 않지만 혈중 인슐린 수치가 5~50배 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>11)</sup>. 이와 함께 lipoprotein lipase 활성이 감소되고 혈관내피세포의 이완장애등으로 hypertriglycercemia와 고혈압이 초래되는 것으로 판명되었다. Heterozygote IRS-1 knockout mouse model (IRS-1 +/-)는 별 증상이 보고되고 있지 않다. GLUT4 -/- mouse도 보고되어 있으며 역시 심한 인슐린 저항성이 있고 지방분포에도 이상이 있어서 향후 증례 2의 경우 GLUT4 유전자의 염기서열 확인이 필요할 것이다<sup>12)</sup>. 이러한 knockout mouse model에서의 중요한 교훈은 double heterozygous mutant mice 예를 들어 IRS-1 -/IR-의 경우는 분명한 당뇨병의 증상을 보이는 점이며 이는 당뇨병의 발생기전이 단일 유전자의 결함이 아닌 여러 유전자 결함에 결함에 의해 초래됨을 시사하고 있다<sup>13)</sup>.

이러한 점에서 본 연구의 모델이 된 요정증 환자의 임상증상을 살펴보면 증례 1, 2 모두 심한 고인슐린 혈증을 보이고 있고 비록 증례 1에서는 HA1C는 7.5%로 분명한 당뇨를 보였지만, 증례 2의 경우 정상의 수습배 이상의 고인슐린 혈증을 보이고 있으며 HA1C: 4.7% (생후 1세경), 5.6% (생후 1년 4개월)을 보이고 있어서 제2형 당뇨병에서 인슐린 저항성 이외에도 상대적인 인슐린 부족이 얼마나 중요한 요인 인가를 보여 주고 있다.

이와 함께 이 환자의 주요한 특징으로 지방분포의 이상을 들 수 있다. 즉 두 환자 모두에서 정상적으로 지방이 있을 것으로 추측되는 둔부나 팔 다리 부위, 피하지방에 지방이 정상에 비해 덜 만져지는 점이다. 지방이영양증이 인슐린저항성과 연

관된다는 보고는 과거에서부터 있어 왔다<sup>14)</sup>. 특히 전신적 혹은 국소적으로 지방이영양증이 있는 경우 인슐린 저항성이 있다는 보고들이 있는데 향후 본 환자에서 지방세포를 분리 배양하여 세포내의 변화를 볼 수 있다면 흥미로운 연구가 될 것으로 보인다.

증례 1, 2의 환자에 대해 유전자 수준에서 연구를 시도하였으며, 증례 둘 모두에서 돌연변이 검색을 시행하였다. 증례 1 환아에서 돌연변이 검색을 시행하여, 인슐린 수용체의  $\beta$  chain 유전자에 Gly877→Cys877 (GGC→TGC)의 돌연변이를 발견하였는데, 이는 exon 14 (extra cellular domain)에 해당되었다. 증례 2의 경우는 5군데의 염기서열 변화를 발견하였다 (미발표자료). 3곳은 이미 보고된 알려진 polymorphism이고 2곳은 아미노산의 변화를 가져오지 않는 silent mutation으로 판명되어 아직 보고가 없는 single nucleotide polymorphism으로 판단된다.

본 연구에서와 같이 요정증 환자의 섬유아세포를 이용한 연구는 전에 보고된 바가 있는데<sup>15,16)</sup> 그 보고에는 인슐린 수용체의 tyrosine kinase의 활성화가 감소된 듯이 보고되어 있어 본 연구에서도 같은 방식의 접근을 시도하였다. 그러나 본 예에서는 심한 인슐린저항성과 인슐린과 인슐린 수용체의 결합의 저하에도 불구하고, 예상과 달리 인슐린에 의한 단백질의 인산화 변화가 미약하여 이를 통한 세포내 신호전달계 기전연구로는 적합치 않다. 그러나 PDGF-A를 처리한 실험의 결과에 의하면 환자에서 현저히 인산화가 감소되어 있어 이 환자의 인슐린 저항성과 함께 전반적인 세포의 활성화가 감소되어 있는 상태임을 분명히 보여주고 있다.

본 연구에서 요정증 환자의 섬유아세포는 비교적 분화정도가 감소한 양상을 보였으며, 인슐린 자극에 의한 당 운반능력, 인슐린에 의한 인슐린 수용체 결합능력, 세포증식 활성도와 PDGF 자극에 의한 인산화 등이 모두 감소하였다. 이에 반해, IGF-1의 결합능력은 대조군과 차이가 없었다. 본 연구에서 특이한 점은 인슐린에 의한 작용을 조사하였을 때뿐 아니라, PDGF에 대한 인슐린 수용체의 tyrosine 인산화도 감소되어 있어서 인슐린뿐만 아니라 다른 성장인자들에 대한 반응도 감소되어 있을 것으로 생각된다. 이에 대한 자세한 실험적인 증거는 별도의 논문에서 제시하고자 하며 본 연구에서는 상기의 연구결과를 토대로 인슐린저항성의 기전연구에 기본 자료로서 제시하고자 한다.

## 요 약

연구배경: 요정증 (leprechaunism)은 유전적으로 인슐린 수용체의 이상에 의해 초래되며, 고인슐린혈증, 특징적인 외모, 지방위축증이 특징이며 2~3세경에 사망하는 것으로 보고되고 있다.

방법: 본 연구에서는 한국인 요정증 환자 2례를 소개하고



이중 1례의 환자와 외국에서 보고된 4례의 요정증 환자의 섬유아세포를 배양하여 세포의 형태학적 특징, 인슐린 자극에 의한 당운반능력, IGF-I과 인슐린에 의한 결합능력, 세포증식 활성도와 PDGF 자극에 의한 인산화의 변화 등을 2례의 정상 섬유아세포와 비교조사 하였다.

**결과:** 요정증환자의 섬유아세포는 비교적 분화정도가 감소한 양상을 보였으며, 인슐린 자극에 의한 인슐린 자극에 의한 당운반능력, 인슐린에 의한 결합능력, 세포증식 활성도와 PDGF 자극에 의한 인산화등이 모두 감소하였으나 IGF-I 결합능력은 대조군과 차이가 없었다.

**결론:** 한국인에서 발생한 요정증 2례를 보고하였으며, 이중 1례와 외국에서 발생한 4례의 섬유아세포를 대상으로 인슐린에 의한 작용을 조사하였을 때, 당운반능력, 세포증식 활성도의 감소뿐 아니라 PDGF 자극에 의한 인산화가 감소하는 것으로 보아 인슐린 작용이 감소되어 있음을 확인할 수 있었다.

#### 감사의 글

본 연구는 2000년도 당뇨병 연구비 (제1회 오츠카 연구비)와 인성(제)의과학연구재단의 연구비로 지원된 과제임

#### 참 고 문 헌

- Cohen P, Nimmo HG, Proud CG: *How does insulin stimulate glycogen synthesis?* Biochem Soc Symp 43:69-95, 1978
- Olefsky JM, Ciaraldi TP, Kolterman OG: *Mechanisms of insulin resistance in non-insulindependent (type II) diabetes.* Am J Med 20:79: 12-22, 1985
- Lyen KR: *The insulin receptor.* Ann Acad Med Singapore 14:364-73, 1985
- Tan MH, Bonen A: *Insulin receptors: their roles in the pathogenesis and management of type II diabetes mellitus.* Ann Acad Med Singapore 14:360-3, 1985
- Takahashi Y, Tobe K, Kadowaki H, Katsumata D, Fukushima Y, Yazaki Y, Akanuma Y, Kadowaki T: *Roles of insulin receptor substrate-1 and Shc on insulin-like growth factor I receptor signaling in early passages of cultured human fibroblasts.* Endocrinology 138:741-50, 1997
- Tsujino G, Yoshinaga T: *A case of leprechaunism and an analysis of some clinical manifestations of this syndrome.* Z Kinderheilk 118:347-445, 1975
- Longo N, Wang Y, Smith SA, Langley SD, DiMeglio LA, Giannella-Neto D: *Genotype-phenotype correlation in inherited severe insulin resistance.* Hum Mol Genet 11:1465-75, 2002
- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H: *Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene.* Nat Genet 12:106-9, 1996
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR: *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction.* Mol Cell 6:87-97, 2000
- Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T: *Insulin signaling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1 deficient mice.* Mol Cell Biol 16:3074-84, 1996
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR: *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles.* Cell 88:561-72, 1997.
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ: *Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4.* Nature 377:151-5, 1995
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR: *A muscle specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance.* Mol Cell 2:559-69, 1998
- Garg A, Wilson R, Barnes R, Arioglu E, Zaidi Z, Gurakan F, Kocak N, O'Rahilly S, Taylor SI, Patel SB, Bowcock AM: *A gene for congenital general lipodystrophy maps to human chromosome 9q34.* J Clin Endocrinol Metab 84:3390-4, 1999
- Nakae J, Kato M, Murashita M, Shinohara N, Tajima T, Fujieda K: *Long-term effect of recombinant human insulin-like growth factor I on metabolic and growth control in a patient with leprechaunism.* J Clin Endocrinol Metab 83:542-9, 1998
- Takahashi Y, Tobe K, Kadowaki H, Katsumata D, Fukushima Y, Yazaki Y, Akanuma Y, Kadowaki T: *Roles of insulin receptor substrate-1 and Shc on insulin-like growth factor I receptor signaling in early passages of cultured human fibroblasts.* Endocrinology 138:741-50, 1997