

2-Deoxy-D-ribose가 췌장 베타세포의 손상을 유발하는 기전에 관한 연구

제주대학교 의과대학 내과학교실, 조직학교실¹, 경희대학교 의과대학 내분비대사내과²

고관표, 우정택², 이대호, 오승준², 김성운², 김진우², 김영설², 박덕배¹

Mechanism of 2-Deoxy-D-ribose-induced Damage in Pancreatic β -cells

Gwanpyo Koh, Jeong-taek Woo², Dae-Ho Lee, Seungjoon Oh², Sung-Woon Kim², Jin-Woo Kim², Young-Seol Kim², Deok-Bae Park¹

Department of Internal Medicine, Cheju National University College of Medicine;

Department of Medicine¹, Cheju National University College of Medicine; and

Department of Endocrinology & Metabolism², Kyung Hee University College of Medicine

Abstract

Background: Mechanism for glucose toxicity is known to be an increased oxidative stress produced by multiple pathways. In our previous report, 2-deoxy-d-ribose (dRib) promoted apoptosis by increasing oxidative stress in a pancreatic β -cell line. We performed this study to investigate the mechanism of dRib-induced damage of β -cells.

Methods: HIT-T15 cells were cultured in RPMI-1640 medium with 40 mM dRib for 24 hours after pretreatment with various concentrations of a metal chelator (DTPA) and inhibitors of protein glycation (aminoguanidine and pyridoxamine). Cell viability was determined by MTT assay. Apoptosis was analyzed by flow cytometry with annexin V/PI double staining.

Results: DTPA, which inhibits the monosaccharide autoxidation, partially reversed dRib-induced cytotoxicity in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). The cytotoxicity was also suppressed dose-dependently by aminoguanidine (AG) and pyridoxamine (PM) ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). Flow cytometric analysis showed that pretreatment of DTPA and AG also reversed the dRib-triggered apoptosis in a dose-dependent manner. We assessed the additional protective effects of inhibitors of protein glycation from dRib-induced cytotoxicity in the presence of a metal chelator. The additions of AG ($P < 0.05$) and PM ($P < 0.01$) significantly reduced the cytotoxicity compared with DTPA alone group.

Conclusion: This results suggest that dRib produce cytotoxicity and apoptosis through the mechanisms of advanced glycation endproducts (AGEs) formation including the monosaccharide autoxidation and protein glycation in pancreatic β -cell. Thus, dRib could be a surrogate for glucose in the study of glucose toxicity and chronic diabetic complications. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:105~112, 2007)

Key Words: Autoxidation, Glucose toxicity, Oxidative stress, Protein glycation, β -cell apoptosis, 2-deoxy-D-ribose

서 론

제2형 당뇨병의 병인은 말초조직의 인슐린저항성과 췌장의 베타세포부전으로 설명된다. 베타세포부전은 인슐린분비 이상뿐 아니라 세포자멸사 (apoptosis)로 인한 베타세포 용

적 (β -cell mass)의 감소도 포함한다¹⁾. 베타세포부전의 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 만성적인 고혈당, 혈중 유리 지방산의 증가, 아밀로이드 폴리펩티드 그리고 유전적 요인 등이 가설로 제기되고 있다²⁻⁵⁾. 만성적인 고혈당에 의한 비가역적인 베타세포부전을 당독성 (glucose toxicity)이라

접수일자: 2006년 10월 26일, 통과일자: 2007년 1월 15일, 책임저자: 고관표, 제주대학교 의과대학 내과학교실

* 본 연구는 2005년 대한당뇨병학회 제11회 세르비에 연구비에 의해 이루어졌음.

고 하며, 고농도 포도당에 의한 산화스트레스의 증가가 원인으로 알려져 있다⁶⁾. Polyol 경로, methylglyoxal 형성, 비효소 단백질당화 (nonenzymatic protein glycosylation), protein kinase C 활성화, hexosamine 경로, 포도당 자가산화 (glucose autooxidation) 그리고 산화적 인산화 (oxidative phosphorylation) 등이 당독성의 기전으로 받아들여지고 있다^{7,8)}.

이 중 비효소 단백질당화, 포도당 자가산화 그리고 methylglyoxal은 서로 밀접하게 연결되어 있으며 결국 최종당화산물들 (advanced glycation endproducts, AGEs)을 형성하게 된다. 비효소 단백질당화는 Maillard 반응이라고도 하며 포도당이 저질로 단백질의 아미노기와 반응하여 Schiff 염기를 형성하고 이어서 재배열 (rearrangement)되어 비가역적인 Amadori 화합물이 만들어지고 추가적인 농축 (condensation), 탈수 (dehydration) 그리고 산화분절 (oxidative fragmentation) 반응을 거쳐 최종당화산물이 형성된다^{9,10)}. Aminoguanidine과 pyridoxamine은 구체적인 기전은 다르지만 단백질당화 반응을 억제하여 최종당화산물 형성을 억제시키는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 포도당 자가산화는 전이금속 (transition metal)을 촉매로 하여 포도당이 enediol을 거쳐 α -ketoaldehyde로 변환되는 반응을 말한다. 이 반응은 금속킬레이트제 (metal chelator)인 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)에 의해 억제되며, 활성화산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 중간산물로 만들어진다. 자가산화의 종산물인 α -ketoaldehyde는 단백질과 반응하여 최종당화산물을 형성하며 이를 'autooxidative glycosylation'이라고 한다^{12,13)}. Methylglyoxal은 반응성이 매우 강한 dicarbonyl로서 해독작용의 중간산물인 dihydroxyacetone phosphate와 glyceraldehyde 3-phosphate로부터 만들어 지며 최종당화산물의 전구체로 작용한다¹⁴⁾.

알데하이드기를 가지면서 카르복실산으로 산화되는 당을 환원당 (reducing sugar)이라고 하며, 단백질 당화 능력은 glucose < mannose < galactose < xylose < fructose < arabinose < ribose < 2-deoxy-D-ribose (dRib)의 순으로 알려져 있다^{10,15)}. 이 중 포도당은 환원능이 가장 낮기 때문에 실험실에서 당독성을 관찰하기 위해서는 오랜 시간이 필요하다. Olson 등¹⁶⁾은 베타세포주를 고농도 포도당에 약 20주간 노출시켰을 때 비로서 인슐린 유전자발현이 비가역적으로 감소된다고 보고한 바 있다. 특히 고농도 포도당에 의한 베타세포의 자멸사는 실험실에서 관찰하기가 매우 어렵다. 따라서 포도당 대신 환원능이 아주 강한 dRib로 베타세포를 처리하여 당독성 연구를 진행하였다.

저자는 최근 dRib가 베타세포주인 HIT-T15 세포에서 24시간 만에 산화스트레스를 증가시켜 세포자멸사를 유발한다고 보고하였으나 그 기전에 대한 연구는 수행하지 않았다¹⁷⁾. 따라서 본 연구는 dRib가 당독성의 기전을 통해 산화스트레

스를 유발한다는 사실을 밝힘으로써 췌장 베타세포에서 dRib가 포도당 대신 당독성 연구에 쓰일 수 있는지 알아보기 위해 시행하였다.

대상 및 방법

1. 시약

2-Deoxy-D-ribose (dRib), aminoguanidine (AG), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), pyridoxamine (PM), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), RPMI-1640, Dubelco's phosphate-buffered saline (DPBS), trypsin, penicillin과 streptomycin은 GIBCO Invitrogen Co. (Grand Island, NY, USA), 그리고 fetal bovine serum (FBS)은 HyClone Co. (Logan, UT, USA)에서 구입하였다. 모든 배양접시는 BD Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA) 제품을 사용하였다.

2. 세포배양

인슐린분비 세포주인 HIT-T15 세포 (24-40 passage)를 10% FBS, penicillin 100 IU/mL, 그리고 streptomycin 100 µg/mL이 들어있는 RPMI-1640 배지로 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 세포밀도 (confluence)가 약 70%에 이르면 DPBS로 세척하고 0.05% trypsin 용액을 처리하여 계대배양하였다. 계대배양하고 2일 후에 0.5% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배지로 교체하여 하루 동안 방치하였다. 그리고 40 mM 농도의 dRib와 0.5% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배지로 다시 교체하여 24시간 동안 배양하였으며, DETAPAC, AG와 PM은 dRib 자극 30분 전에 추가하였다.

3. 세포생존율 측정

세포생존율은 잘 알려진 MTT 분석으로 측정하였다¹⁸⁾. 24-well 배양접시에 well 당 2×10^5 개의 HIT-T15 세포를 분주하여 배양하였다. 배지 1 mL 당 MTT 용액 (5 mg/mL) 100 L을 추가하여 4시간 경과 후 배양액을 버리고 각 well에 DMSO 200 µL를 가하여 세포 내 formazan crystal을 용해시켰다. 흡광도는 ELISA plate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 540 nm 파장에서 측정하였다. 세포생존율은 매 실험 때마다 dRib를 처리하지 않은 대조군의 흡광도를 100%로 하였으며 각 실험군은 이에 대한 비율로 표시하였다.

4. 세포자멸사의 측정

Annexin V와 propidium iodide (PI)로 이중염색하고 유동세포분석법 (flow cytometry)을 이용하여 생존 세포 (annexin

V-음성/PI-음성), 초기 세포자멸사세포 (annexin V-양성/PI-음성), 후기 세포자멸사 또는 괴사 세포 (annexin V-양성/PI-양성)로 구분하였으며, 총세포자멸사는 annexin V-양성/PI-음성 또는 양성 세포의 비율로 표시하였다¹⁹⁾. 6-well 배양접시에 well 당 6×10^5 개의 HIT-T15 세포를 분주하여 배양하였다. Vibrant Apoptosis Assay Kit #2 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하였으며 첨부된 설명서에 따라 이중염색을 시행하였다. 요약하면 6-well 배양접시로부터 세포를 수확하여 원심분리 한 후 세포 pellets을 DPBS에 현탁시킨다. 다시 원심분리하여 형성된 pellets을 FITC가 결합된 annexin V와 PI 염색용액에 재현탁시켜 실온에 15분간 방치하였다. 염색된 세포들은 FACScan (BectonDickinson, San Jose, CA, USA)으로 분석하고 CellQuestPro 소프트웨어 (BectonDickinson)로 각 사분획의 세포들을 계산하였다. 각 시료 당 10,000개의 세포를 사용하였다.

4. 통계분석

군 간 비교는 SPSS 11.0 for Windows (Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 비모수 검정인 Mann-Whitney test로 분석하였으며, P 값이 0.05 미만일 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준편차로 기술하였다.

결 과

1. 금속 킬레이트제와 단백질당화 억제제가 dRib에 의한 세포독성에 미치는 영향

세포독성이 dRib의 자가산화에 의한 반응인지 알아보기 위하여 금속 킬레이트제인 DTPA를 전처리 하였으며, 단백질당화 억제제로 잘 알려진 aminoguanidine과 pyridoxamine을 사용하여 Maillard 반응과의 관계를 알아보았다. DTPA, aminoguanidine과 pyridoxamine을 30분전에 처리하고 40 mM dRib와 0.5% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배지로 HIT-T15 세포를 24시간 동안 배양한 후 MTT 분석을 시행하였다. 40 mM dRib로만 자극하였을 때 33% ($P < 0.01$)까지 감소했던 세포생존율은 DTPA, aminoguanidine과 pyridoxamine을 전처리함으로써 농도의존적으로 의미있게 회복되었다. DTPA는 0.01, 0.1 그리고 0.3 mM 농도에서 세포생존율이 각각 48 ($P < 0.01$), 66 ($P < 0.01$) 그리고 71% ($P < 0.01$)로 dRib만 투여한 군에 비해 유의하게 증가되었다. Aminoguanidine은 0.5, 1 그리고 5 mM 농도로 전처리 하였을 때 세포생존율이 38 ($P < 0.05$), 39 ($P < 0.05$) 그리고 56% ($P < 0.01$)로 유의하게 증가되었으나 DTPA에 비해 효과가 작았다. Pyridoxamine은 0.5, 1 그리고 3 mM 농도에서 46 ($P < 0.01$), 53 ($P < 0.01$) 그리고 72% ($P < 0.01$)로 회복되어 DTPA와 비슷한 효과를 보였다 (Fig. 1).

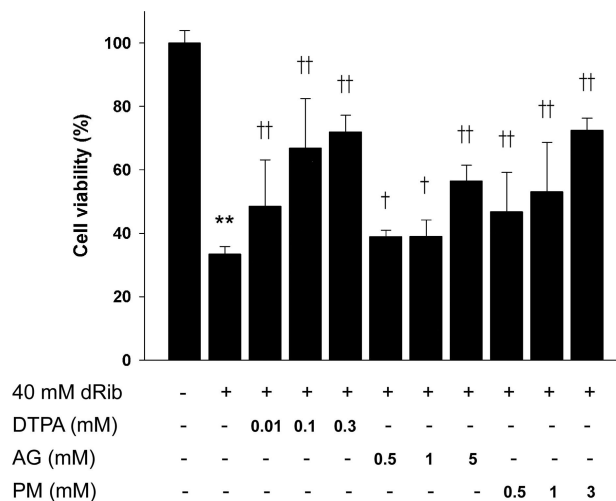


Fig. 1. Protective effects of DTPA, aminoguanidine (AG) and pyridoxamine (PM) on dRib-triggered cytotoxicity. HIT-T15 cells were preincubated with DTPA, AG and PM for 30 min at the indicated concentrations and then cultured with 40 mM dRib for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as the mean \pm SD of the percentage of viable cells relative to the untreated control. This experiment was performed twice, in quadruplicate.

** $P < 0.01$ vs. control.

† $P < 0.05$ vs. 40 mM dRib alone.

†† $P < 0.01$ vs. 40 mM dRib alone.

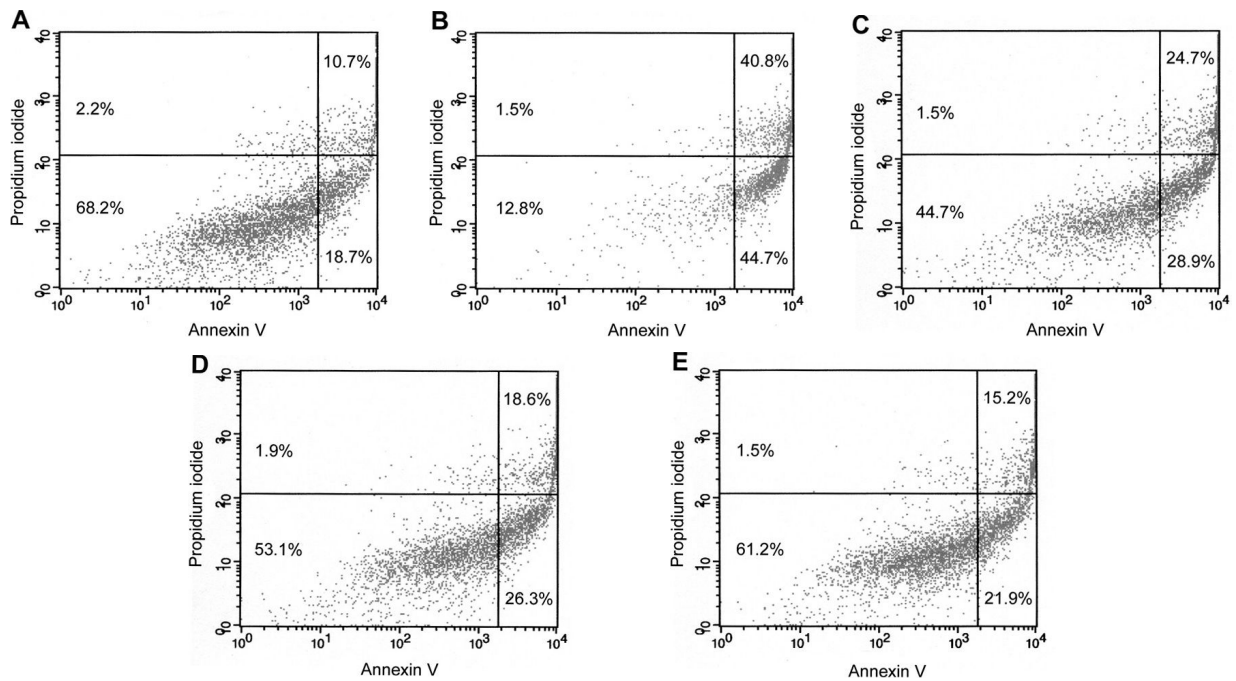


Fig. 2. Effect of DTPA on dRib-induced apoptosis of HIT-T15 cells. Cells were preincubated with 0.01, 0.1 and 0.3 mM DTPA for 30 min, then cultured with 40 mM dRib for 24 h. Cells were stained with Annexin V-FITC (horizontal axis)/PI (longitudinal axis) and analyzed by flow cytometry. The graph is representative of two independent experiments. (A) Control; (B) 40 mM dRib; (C) 40 mM dRib + 0.01 mM DTPA; (D) 40 mM dRib + 0.1 mM DTPA; (E) 40 mM dRib + 0.3 mM DTPA.

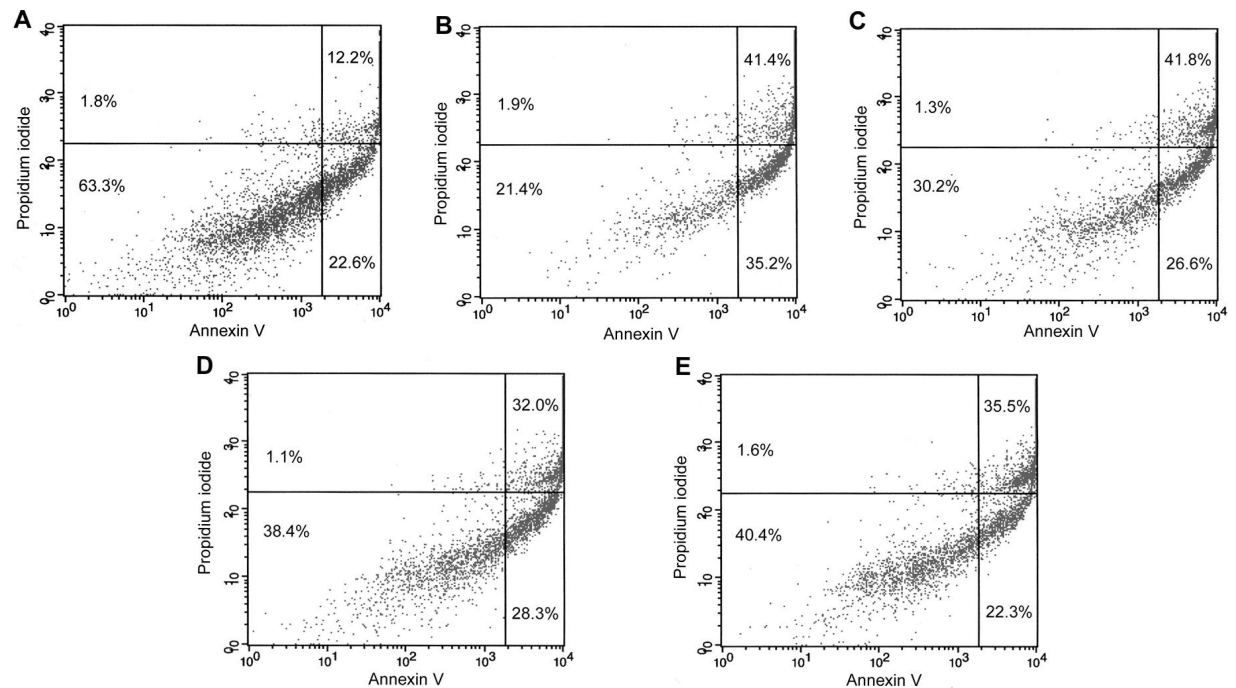


Fig. 3. Effect of AG on dRib-induced apoptosis of HIT-T15 cells. Cells were preincubated with 0.5, 1 and 5 mM AG for 30 min, then cultured with 40 mM dRib for 24 h. Cells were stained with Annexin V-FITC (horizontal axis)/PI (longitudinal axis) and analyzed by flow cytometry. The graph is representative of two independent experiments. (A) Control; (B) 40 mM dRib; (C) 40 mM dRib + 0.5 mM AG; (D) 40 mM dRib + 1 mM AG; (E) 40 mM dRib + 5 mM AG.

2. 금속 킬레이트제와 단백질당화 억제제가 dRib에 의한 세포자멸사에 미치는 영향

DTPA, aminoguanidine과 pyridoxamine이 단순한 세포 독성이 아닌 세포자멸사를 억제하는지 알아보기 위해 annexin V와 PI로 이중염색하고 유동세포분석법을 시행하였다. 생존세포 비율은 대조군이 68.2%였고 40 mM dRib 자극에 의해 12.8%로 감소되었으나, 0.01, 0.1 그리고 0.3 mM DTPA를 전처리 하였을 때는 각각 44.7, 53.1 그리고 61.2%로 농도에 비례하여 회복되었다. 총 세포자멸사 (초기와 후기 세포자멸사) 비율은 대조군 29.4%에서 dRib 자극으로 85.5%까지 증가하였으며, DTPA 전처리로 인해 각각 53.6, 44.9 그리고 37.1%로 농도의존적으로 감소되었다 (Fig. 2). 0.5, 1 그리고 5 mM aminoguanidine을 전처리 하였을 때 생존세포 비율이 대조군 63.3% 그리고 dRib군 21.4%에서 각각 30.2, 38.4 그리고 40.4%로 증가하였고, 총 세포자멸사 비율 또한 대조군 34.8%와 dRib군 76.6%에서 DTPA를 전처리 했을 때 각각 68.4, 60.3 그리고 57.8%로 농도의존적인 감소를 보였다 (Fig. 3).

3. 금속킬레이트제를 전처리하였을 때 단백질당화 억제제가 dRib에 의한 세포독성을 억제하는 효과

Aminoguanidine과 pyridoxamine을 비롯한 많은 최종당 화산물 억제제들은 금속킬레이트 효과를 가지고 있는 것으

로 보고된 바 있다²⁰⁾. 이를 배제하기 위해 금속킬레이트제인 DTPA를 전처리하고 나서 aminoguanidine과 pyridoxamine의 세포독성 억제효과를 관찰하였다. dRib에 의한 세포독성과 세포자멸사 억제효과가 가장 큰 0.3 mM 농도의 DTPA를 30분 전에 처리하고 여러 농도의 aminoguanidine과 pyridoxamine과 40 mM dRib를 자극한 후 MTT 분석을 시행하였다. dRib 자극에 의해 11%까지 감소되었던 세포생존율은 0.3 mM DTPA 전처리로 인해 41% ($P < 0.01$)로 유의하게 회복되었다. 1과 5 mM aminoguanidine을 추가하였을 때 세포생존율이 각각 51 ($P < 0.05$), 52% ($P < 0.05$)로 0.3 mM DTPA만 전처리 했을 때 보다 의미있게 증가하였다. Pyridoxamine은 0.5, 1 그리고 3 mM 농도에서 각각 72 ($P < 0.01$), 76 ($P < 0.01$) 그리고 74 ($P < 0.01$)%로 더 좋은 효과를 보였다 (Fig. 4).

고 찰

본 연구는 췌장 베타세포주인 HIT-T15 세포에서 dRib에 의한 세포독성과 세포자멸사가 금속킬레이트제인 DTPA와 단백질당화 억제제인 aminoguanidine과 pyridoxamine에 의해 부분적이지만 의미있게 억제되는 결과를 보여 주었다. 이전 연구에서 저자는 HIT-T15 세포를 dRib로 자극하였을 때 세포자멸사와 산화스트레스가 증가되며, *N*-acetyl-L-cysteine

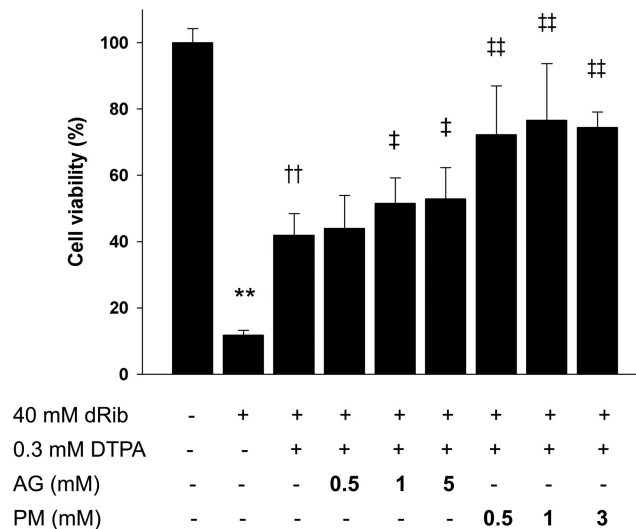


Fig. 4. Additive effects of AG and PM on DTPA-mediated protection from of dRib-induced cytotoxicity. HIT-T15 cells were preincubated with DTPA, AG and PM for 30 min at the indicated concentrations and then cultured with 40 mM dRib for 24 h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are expressed as the mean \pm SD of the percentage of viable cells relative to the untreated control. This experiment was performed twice, in quadruplicate.

** $P < 0.01$ vs. control.

†† $P < 0.01$ vs. 40 mM dRib alone.

‡ $P < 0.05$ vs. 40 mM dRib + 0.3 mM DTPA.

‡‡ $P < 0.01$ vs. 40 mM dRib + 0.3 mM DTPA.

(NAC)으로 전처리 했을 때 거의 대조군 수준으로 회복되는 결과를 보고하였다¹⁷⁾. 당시 산화스트레스 측정은 세포 내 활성화 산소종과 반응하는 dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) 염색을 이용하였고 전처리 물질인 NAC는 H₂O₂를 제거하는 glutathione의 전구체이므로 dRib는 세포 내 활성화산소종을 증가시켜 세포자멸사를 일으킨다고 결론지었다. 따라서 본 연구의 결과는 dRib가 베타세포에서 당당류 자가산화와 단백질당화기전을 통해 산화스트레스를 증가시켜 세포자멸사를 유발한다는 사실을 시사한다.

1987년까지 최종당화산물은 Maillard 반응을 통해서만 만들어진 것으로 알려졌다. 그러나 Wolff 등^{12,13)}은 포도당이 자가산화되면서 활성화산소종과 α -ketoaldehyde가 만들어지고 산소자유라디칼에 의해 변형된 단백질에 α -ketoaldehyde가 결합하여 ketoimine 부가물 (adduct)이 형성되며, 이 부가물은 Amadori 부가물보다 더 반응성이 높아 추가 Maillard 반응을 거쳐 최종당화산물이 만들어진다는 'autoxidative glycosylation'의 개념을 처음으로 주장하였다. 이후 Wells-Knecht 등²¹⁾에 의해 포도당의 autoxidative glycosylation 반응 중 만들어지는 α -ketoaldehyde가 glyoxal로 밝혀졌다. 이 자가산화 반응은 금속을 촉매로 하는 비효소 반응으로 금속킬레이트제인 DTPA에 의해 억제되며 포도당보다는 환원능이 높은 다른 당당류에 의해 잘 발생한다²²⁾. 그러나 금속을 촉매로 하는 산화반응은 당당류 자가산화에만 국한된 것이 아니며, 최종당화산물 형성 기전 중 'glycooxidation' 반응에서도 관찰된다. Glycooxidation이란 단백질당화 (glycation)에 이어 산화 (oxidation) 반응이 발생하는 것으로²³⁾, Maillard 반응 중 생성된 Amadori 화합물이 금속을 촉매로 하는 자가산화 반응을 거쳐 carboxymethyllysine (CML) 또는 pentosidine 등의 산화성 최종당화산물을 형성하게 된다^{24,25)}. 따라서 본 연구에서 관찰된 DTPA의 세포손상 억제 효과는 dRib의 자가산화 반응뿐만 아니라 Amadori 중간체의 자가산화, 즉 glycooxidation이 억제되어 나타났을 수 있다. 그러나 autoxidative glycosylation과 glycooxidation은 *in vitro*와 *in vivo*에서 주위 여건에 따라 동시에 발생할 수 있으며 부산물도 거의 유사하기 때문에 두 반응을 감별하는 것은 매우 어렵다^{25,26)}.

Aminoguanidine은 약 100년 전에 nitroguanidine을 환원시켜 개발된 물질로 hydrazine과 guanidium의 반응 부위를 가지고 있는 친핵성 (nucleophilic) 물질이다. 이 물질은 현재까지 최종당화산물 억제제로 가장 많이 쓰이고 있으며, 비효소 단백질당화의 특징경로 억제제가 아니라 여러 단계에 작용한다. Hydrazine 부위는 단백질과 반응하기 전 포도당의 carbonyl 기와 결합하여 Schiff 염기 형성을 방해하며, 또한 Amadori 화합물의 carbonyl 기와 반응하여 당화 반응의 진행을 억제한다. Guanidium 부위는 최종당화산물의 강력한 전구체인 methylglyoxal, 3-deoxyglucosone, glyoxal 등의

dicarbonyl 화합물들을 차단 (trapping)하며 aminoguanidine의 가장 중요한 작용으로 알려져 있다^{27,28)}. Aminoguanidine은 많은 동물연구에서 당뇨병성 신증, 망막병증 그리고 신경병증을 예방한다고 잘 알려져 있을 뿐만 아니라²⁷⁾ HIT-T15 세포와 Zucker 당뇨병 비만 쥐에서 당독성을 억제하여 인슐린분비능을 회복시킨다고 보고된 바 있다²⁹⁾. Pyridoxamine은 비타민 B6의 일종으로 새로운 최종당화산물 억제제로 각광 받고 있으며, aminoguanidine처럼 비효소 단백질당화과정 중에 형성되는 dicarbonyl 화합물들을 제거하는 효과가 있다³⁰⁾. 또한 aminoguanidine에서는 볼 수 없는 Amadori 이후 경로 (post-Amadori pathway)를 억제하는 작용이 있다¹¹⁾. Khalifah 등³¹⁾은 반응도가 높은 고농도의 ribose를 단백질과 반응시킨 후 유리 ribose와 Schiff 염기는 투석으로 제거하고 Amadori 화합물만 분리하여 Amadori 이후 경로에 대해서 특이적으로 연구할 수 있는 기법을 개발하였다. 이 연구에서 pyridoxamine은 Amadori 화합물이 최종당화산물로 이행되는 것을 효과적으로 억제하였으나 aminoguanidine은 효과가 없었다³²⁾. 동물연구에서도 pyridoxamine은 조직의 최종당화산물 침착을 감소시키고 당뇨병성 신증을 의미있게 지연시키는 것으로 밝혀졌다³³⁾. 그러나 dicarbonyl 화합물들을 제거하는 능력은 약하므로 aminoguanidine 보다 부작용이 적을 것으로 기대되며, 현재 당뇨병성 신증에 대한 제3상 임상연구가 진행 중이다³⁰⁾.

Price 등²⁰⁾은 많은 최종당화산물 억제제들이 금속킬레이트 작용을 가지고 있으므로 연구결과를 해석할 때 금속킬레이트 효과가 carbonyl 또는 dicarbonyl 차단 효과로 오인될 수 있다고 하였다. 그들은 aminoguanidine과 pyridoxamine이 금속을 촉매로 하는 ascorbate의 자가산화를 농도의존적으로 억제하였고 반응의 50%를 억제할 수 있는 농도 (IC₅₀)는 각각 2.5와 1 mM라고 보고하였으며, 이는 본 연구에 사용된 농도와 크게 다르지 않았다. 따라서 본 연구에서는 aminoguanidine과 pyridoxamine의 금속킬레이트 효과를 배제하기 위해 DTPA를 전처리한 후 최종당화산물 억제제들의 효과를 관찰하였다. dRib에 의한 세포손상을 최대로 억제했던 0.3 mM DTPA를 전처리 했음에도 최종당화산물 억제제들은 추가 보호작용을 나타내었다 (Fig. 4). 이는 dRib가 금속을 촉매로 하는 자가산화 반응뿐만 아니라 최종당화산물 형성과 관련된 다른 기전을 통해 세포손상을 초래한다는 사실을 시사한다. 또한 pyridoxamine이 aminoguanidine보다 dRib에 의한 세포독성을 억제하는 효과가 크기 때문에 (Fig. 1, 4) dRib는 Maillard 반응 중 Amadori 이후 경로를 거칠 가능성이 있다.

본 연구의 결과를 종합해보면 dRib는 HIT-T15 세포에서 자가산화 또는 glycooxidation 기전과 Amadori 이후 경로 등의 최종당화산물 형성 기전을 통하여 세포독성과 자멸사를 증가시키는 것으로 보이며, 이전 연구결과를 감안할 때 산

화스트레스 매개반응으로 생각된다. 그러나 세부적인 경로는 알아내지 못했으며 그 이유는 다음과 같다. 첫째 대부분의 단백질당화 연구는 화학반응을 통해 이루어졌으나 저자의 연구는 세포실험으로 중간 반응산물의 측정이 어렵다. 둘째 단백질당화는 비효소 화학반응으로 다른 효소, 수용체나 유전자 연구와는 달리 특이적 매개체로 사용할 수 있는 물질이 존재하지 않는다¹¹⁾.

결론적으로 dRib는 췌장 베타세포에서 최종당화산물 형성과 관련된 기전을 통해 세포손상을 유발하는 것으로 생각된다. 따라서 장시간이 소요되는 포도당을 대신하여 베타세포에서 당독성 연구를 간편하게 수행할 수 있으며, 더 나아가 다른 장기나 조직의 당뇨병으로 인한 만성합병증 연구에도 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: Polyol 경로, methylglyoxal 형성, 비효소 단백질당화, protein kinase C 활성화, hexosamine, 포도당 자가산화 그리고 산화적 인산화 등의 경로를 통한 산화스트레스의 발생은 췌장 베타세포에서 당독성의 원인으로 받아들여지고 있다. 저자는 최근 2-deoxy-D-ribose (dRib)가 베타세포주에서 산화스트레스와 세포자멸사를 유발한다고 보고하였으며, 그 구체적인 기전을 규명하기 위해 본 연구를 시행하였다.

방법: HIT-T15 세포를 RPMI-1640 배지로 배양하였다. 자가산화 반응을 억제하는 금속킬레이트제인 DTPA 그리고 단백질당화 억제제로 알려진 aminoguanidine (AG)과 pyridoxamine (PM)을 30분전에 자극하고 40 mM dRib를 추가하여 24시간 동안 배양하였다. 세포생존율은 MTT 방법을 이용하였고 세포자멸사는 annexin V와 PI로 이중염색한 후 유동세포분석법으로 측정하였다.

결과: 40 mM dRib (33%; $P < 0.01$)의해 감소됐던 세포생존율이 0.01, 0.1 그리고 0.3 mM DTPA를 전처리했을 때 농도의존적으로 의미있게 회복되었으며 (각각 48, 66 그리고 71%; $P < 0.01$), 0.5, 1 그리고 1 mM AG (각각 38, 39 그리고 56%; $P < 0.05$)과 0.5, 1 그리고 3 mM PM (각각 46, 53 그리고 72%; $P < 0.01$)을 전처리했을 때 농도에 비례하여 유의하게 증가되었다. 유동세포분석에서도 DTPA와 AG는 농도의존적으로 생존세포 비율을 증가시키고 dRib에 의한 세포자멸사를 억제하였다. AG와 PM의 금속킬레이트 효과를 배제하기 위하여 0.3 mM DTPA를 전처리한 실험에서도 AG ($P < 0.05$)와 PM ($P < 0.01$)은 추가보호작용을 나타내었다.

결론: dRib는 단당류 자가산화와 비효소 단백질당화를 비롯한 최종당화산물 형성과 관련된 기전을 통하여 베타세

포의 손상을 초래하는 것으로 보이며 당독성이나 만성 당뇨병합병증 연구에 쓰일 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A: *Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes*. *Diabetes* 50 Suppl 1:S154-9, 2001
2. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA: *Glucose toxicity*. *Diabetes Care* 13:610-30, 1990
3. McGarry JD, Dobbins RL: *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion*. *Diabetologia* 42:128-38, 1999
4. Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA: *Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus*. *Nature* 368:756-60, 1994
5. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI: *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus-a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance*. *N Engl J Med* 334:777-83, 1996
6. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H: *Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection*. *Diabetes* 52:581-7, 2003
7. Brownlee M: *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. *Nature* 414:813-20, 2001
8. 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
9. Hodge JE: *Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems*. *Agric. Food. Chem.* 1:928-43, 1953
10. Monnier VM: *Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process*. *J Gerontol* 45:B105-11, 1990
11. Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG: *Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions*. *Biochem Biophys Res Commun* 257:251-8, 1999
12. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: *Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing*. *Biochem J* 256:205-12, 1988
13. Wolff SP, Dean RT: *Glucose autoxidation and protein*

- modification. *The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. Biochem J* 245:243-50, 1987
14. Beisswenger PJ, Howell SK, Nelson RG, Mauer M, Szwergold BS: *Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. Biochem Soc Trans* 31:1358-63, 2003
15. Bunn HF, Higgins PJ: *Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. Science* 213:222-4, 1981
16. 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
17. Koh G, Suh KS, Chon S, Oh S, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS: *Elevated cAMP level attenuates 2-deoxy-d-ribose-induced oxidative damage in pancreatic beta-cells. Arch Biochem Biophys* 438:70-9, 2005
18. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB: *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res* 47:936-42, 1987
19. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood* 84:1415-20, 1994
20. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW: *Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. J Biol Chem* 276:48967-72, 2001
21. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW: *Mechanism of autooxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autooxidative modification of proteins by glucose. Biochemistry* 34:3702-9, 1995
22. Thornalley P, Wolff S, Crabbe J, Stern A: *The autooxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides under physiological conditions catalysed by buffer ions. Biochim Biophys Acta* 797:276-87, 1984
23. Baynes JW: *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes* 40:405-12, 1991
24. Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ: *Oxidative alterations in the experimental glycation model of diabetes mellitus are due to protein-glucose adduct oxidation. Some fundamental differences in proposed mechanisms of glucose oxidation and oxidant production. Biochem J* 291 (Pt 2):529-35, 1993
25. Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW: *Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. Diabetes* 43:676-83, 1994
26. Wells-Knecht MC, Thorpe SR, Baynes JW: *Pathways of formation of glycooxidation products during glycation of collagen. Biochemistry* 34:15134-41, 1995
27. Thornalley PJ: *Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch Biochem Biophys* 419:31-40, 2003
28. Nilsson BO: *Biological effects of aminoguanidine: an update. Inflamm Res* 48:509-15, 1999
29. 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
30. Voziyan PA, Hudson BG: *Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. Cell Mol Life Sci* 62:1671-81, 2005
31. Khalifah RG, Todd P, Booth AA, Yang SX, Mott JD, Hudson BG: *Kinetics of nonenzymatic glycation of ribonuclease A leading to advanced glycation end products. Paradoxical inhibition by ribose leads to facile isolation of protein intermediate for rapid post-Amadori studies. Biochemistry* 35:4645-54, 1996
32. Booth AA, Khalifah RG, Todd P, Hudson BG: *In vitro kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs). Novel inhibition of post-Amadori glycation pathways. J Biol Chem* 272:5430-7, 1997
33. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW: *Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. Kidney Int* 61:939-50, 2002