

설치류에서 췌도 이식이 부분췌장절제 후 내인성 β -세포의 재생에 미치는 영향성균관의대 삼성서울병원 내과, 삼성생명과학연구소¹정혜승, 안유란¹, 오승훈¹, 정정화, 김태현, 황유철, 강미라, 배용석¹, 김영석, 정재훈, 민용기, 이명식, 이문규, 김광원Effects of Islet Transplantation on Endogenous β -cell Regeneration after Partial Pancreatectomy in RodentsHye Seung Jung, You-Ran Ahn¹, Seung-Hoon Oh¹, Jung Hwa Jung, Tae Hyun Kim, You-Cheol Hwang, Mira Kang, Yongsuk Bae¹, Young-seok Kim, Jae-Hoon Chung, Yong-Ki Min, Myung-Shik Lee, Moon-Kyu Lee, Kwang-Won KimSamsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine; and Samsung Biomedical Research Institute¹

Abstract

Background: Islet transplantation is one of regimens supplying the deficient insulin in diabetes patients, but the effects of islet grafts on the changes of endogenous β -cells are not clear. In the present study, we examined the changes of endogenous β -cell mass after islet transplantation in partially pancreatectomized mice.

Methods: Balb/c mice were 70% pancreatectomized, transplanted with syngeneic islets (group IV), and were compared with pancreatectomized mice treated with insulin (group III) or no insulin (group II). Blood glucose levels and body weight were monitored. Remnant pancreas was obtained at 6 or 10 days after pancreatectomy, and immunohistochemical staining was done for the evaluation of β -cell mass changes.

Results: Hyperglycemia and weight loss were induced after pancreatectomy. After islet transplantation or insulin treatment, blood glucose levels recovered to normal, and body weight started to increase. Plasma insulin levels were higher and β -cell mass was larger in group IV than in group II ($P < 0.05$). Especially, the difference of β -cell mass between them was more evident at 7 days as compared to at 3 day after transplantation. When compared to group III, group IV showed larger individual β -cell area after 7 days and larger β -cell mass after 3 days of islet transplantation ($P < 0.05$).

Conclusion: These observations indicate that islet transplantation plays a role in enhancing remnant β -cell regeneration after partial pancreatectomy in rodents. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:113~122, 2007)

Key Words: Islet transplantation, Pancreatectomy, β -cell regeneration

서 론

당뇨병은 1형과 2형 모두에 있어서 인슐린결핍이 주요한 병인으로 알려져 있다. 췌장소도 (pancreatic islet, 췌도)의 인슐린분비 세포인 β -세포는 증식 (proliferation)이나 신생 (neogenesis)을 통해 재생 (regeneration)함이 잘 알려져 있

는데¹⁾, 따라서 부족한 β -세포 공급의 한 방법으로서 β -세포의 재생에 관여하는 인자를 밝히는 것은 당뇨병의 완치라는 과제를 해결하기 위한 필수적인 단계라고 할 수 있다.

당뇨병 완치를 위해 현재 이루어지고 있는 노력 중 하나는 췌장 혹은 췌도 이식이다. 췌장 혹은 췌도이식은 단순히 부족한 인슐린을 공급하여 혈당을 조절하는 것 이외에도 당뇨병의 만성 합병증에 대한 긍정적인 효과가 보고되기도 하

접수일자: 2006년 11월 21일, 통과일자: 2007년 2월 6일, 책임저자: 김광원, 성균관대학교 의과대학 내과

* 본 연구는 2005년 추계 대한당뇨병학회 연구비 및 삼성생명과학연구소 (SBRI, 과제번호 C-A6-405-1)의 지원으로 수행된 연구임.

었다^{2,4)}. 그러나 일반적으로 췌도이식편은 시간이 지남에 따라 면역 작용과 허혈에 의하여 점차 감소할 뿐만 아니라, 지속적으로 고혈당에 노출될 경우 인슐린분비 기능 역시 감소하는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁷⁾. 췌도이식편이 기능을 유지하려면, 정상혈당을 유지할 정도로 충분한 양의 췌도를 이식하는 것이 중요하다는 것은 여러 차례 보고된 바 있다^{5,8,9)}. 한편 췌도이식이 내인성 β 세포에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 이루어진 바가 없다. Hamamoto 등은 스트렙토조토신으로 당뇨병이 유발된 백서에게 췌도이식을 할 경우 내인성 β 세포의 기능 및 수가 회복됨을 보고하였다¹⁰⁾. 이 연구는 당뇨병 유발 1개월 후의 결과를 관찰한 것이다. β 세포의 재생 (regeneration)은 손상 직후가 가장 활발하다고 알려져 있지만, 당뇨병 유발 직후의 β 세포 양에 대한 변화는 기술하고 있지 않다. 또한 이러한 변화가 췌도이식 후에 유도된 정상혈당의 효과인지, 췌도이식편 자체에 의한 효과인지, 둘다의 효과인지에 대한 정보를 얻을 수 없었다.

본 연구에서는 췌도이식이 내인성 β 세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 70% 췌장절제된 생쥐를 이용하여 이식 직후인 3일과 7일째에 잔여 췌장의 조직학적 소견을 조사하고, 이를 인슐린 투여에 의하여 정상혈당을 유지한 군이나, 수술 후 아무 치료 없이 고혈당을 유지한 군과 비교하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

10~12주령의 balb/c mouse를 4개의 군으로 나누었다. Sham Operation 군 (I, n = 2), 70% 췌장 절제군 (II, n = 3), 70% 췌장 절제 3일 후부터 인슐린 (0.4 u/kg of human NPH, Eli Lilly, IN, USA)을 피하 주사한 군 (III, n = 4), 그리고 70% 췌장 절제 3일 후에 췌도이식을 시행한 군 (IV, n = 4)이다. 실험은 절제 후 6일 (치료 시작 후 3일)까지 관찰한 경우와 절제 후 10일 (치료 시작 후 7일)까지 관찰한 경우가 각각 한 차례씩 시행되었다. 관찰이 끝나는 날까지 매일 대상의 혈당 및 체중을 측정하고, 췌장을 적출하기 직전 복강내 당부하검사를 실시하였다.

2. 실험 방법

1) 70% 췌장 절제술

Ketamine (45 mg/kg)과 xylazine (2.5 mg/kg)을 혼합하여 조제한 ketamine combination을 복강 내로 투여하고 마취가 된 생쥐의 복부를 절개한 후 생리식염수에 적신 멸균 거즈를 절개한 오른쪽 간 위에 두었다. 다음으로 비장을 멸균된 면봉을 이용하여 밖으로 꺼내어 준비된 거즈위에 두었다. 출혈 가능성이 높은 큰 혈관들을 묶은 뒤 췌장을 절제하고, 보비를 이용하여 작은 혈관들을 지혈하였다. 십이지장의 첫번째 루프에 연결되어 있는 총담관에서 양 쪽에 30% 가

량의 췌장을 남기고 나머지는 제거하였다. 이 모든 과정에서 최대한 출혈이 발생하지 않도록 하는 것을 원칙으로 하였다. 생쥐가 수술도중 체온의 저하로 사망할 수 있기 때문에 모든 수술은 적절한 체온을 유지할 수 있는 열판 (heating pad) 위에서 진행하였다. 수술 후에는 피부를 봉합하고 멸균된 방포를 깐 열판 위에서 회복시켰다. 수술한 생쥐를 회복시키는 과정에서 수술 당일부터 gentamicin (3 mg/kg)과 ampicillin (20 mg/kg), cloxacillin (20 mg/kg)을 복강 내로 투여하여 염증을 최소화하였다. 그리고 봉합을 한 부위는 멸균된 거즈를 이용하여 베타딘으로 수시 소독하였다.

2) 췌도 세포 이식

Syngeneic mouse를 같은 방법으로 마취한 후, 복부를 절개하여 췌관 내로 0.8 mg/mL의 collagenase P 용액을 주입한 뒤 췌장을 적출하였다. 적출한 췌장에서 췌도 세포를 분리하여 포도당 농도가 200 mg/dL인 M-199 배양액으로 37°C, CO₂ 5%에서 24시간 배양한 후, 300 EIN (islet equivalents)의 췌도를 선별하여 췌장절제 후 3일이 지난 생쥐에게 이식을 시행하였다. 이식받는 생쥐도 같은 방법으로 마취한 후 등 쪽을 절개하여 신장을 노출시킨 후 미세한 유리봉을 이용하여 신장피막을 분리하였다. 췌장소도세포를 이식하고 다시 신장을 원위치로 복원시킨 후 절개된 피부를 봉합하였다. 그 후 멸균된 방포를 깐 열판 위에서 충분히 회복시켰다.

3) 혈당 및 체중 측정

매일 같은 시간에 생쥐의 꼬리정맥에서 혈당을 측정하고 체중을 측정하였다.

4) 복강 내 당부하 검사

(IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test)

관찰 마지막 날 복강 내 당부하 검사를 시행하였다. 16시간 금식 후 오전 중에 2 mg/kg의 포도당을 복강 내로 투여 후 0, 15, 30, 60, 90, 120분 단위로 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 0분에는 인슐린 농도 측정을 위하여 retro-orbital sinus에서도 모세유리봉으로 200 μ L를 채혈하였다.

5) BrdU 처리

IPGTT 후 BrdU (100 mg/kg)를 복강 내로 투여하고 6시간이 경과되면 췌장조직을 적출하였다.

6) 면역조직화학염색검사

(Immunohistochemical staining)

적출한 췌장 조직의 주변의 림프절 또는 지방조직들을 깨끗이 제거한 후 Bouin 용액에 고정하고 순차적 농도의 에

탄올을 이용하여 탈수시킨 후, 투명과정을 거쳐 파라핀을 침투시켰다. 준비된 조직을 파라핀에 포매하여 순차적으로 박절 (4 μ m)하였다. 각 개체의 조직마다 임의로 슬라이드 7장을 선택하여 xylene으로 탈파라핀한 후 다시 함수 과정을 거쳤다. 단백질을 분해효소에 의한 항원성의 부활과 열처리에 의한 항원성의 회복 방법을 이용하여 항원성을 충분히 부활시킨 후, 메탄올에 3% 농도가 되게 과산화수소를 넣은 혼합 용액을 만들어 절편에 처리함으로써 내인성 효소활성을 제거하였다. 그 다음 2% goat serum을 30분간 처리하여 IgG의 비특이적 결합을 차단시켰다. 인슐린항체 (DAKO, Glostrup, Denmark)와 4°C에서 하루 밤 반응시킨 후 PBS로 5분씩 3회 수세하고, peroxidase가 결합되어 있는 anti-IgG로 반응시킨 후 다시 수세과정을 거쳐 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 발색시켰다. Hematoxylin으로 대조염색을 실시하고 탈수과정을 거친 후 커버 슬라이드를 덮어 봉입하였다. BrdU 염색을 위해서는 RPN 20 Cell Proliferation Kit (Amersham,UK)를 이용하였다.

7) β -세포의 측정

(1) 각각의 베타세포의 면적 (Individual β cell area)

각각의 조직 중 임의의 슬라이드에서 electronic planimetry program (Sigma Scan)을 이용하여 β 세포의 면적을 측정하고, β 세포의 핵 수를 측정하였다. 측정이 끝난 후, β 세포의 면적을 β 세포 핵의 수로 나누게 되면 각각의 β 세포의 크기를 측정할 수 있다.

(2) 잔여 췌장에 대한 β 세포의 상대적 용적 (relative volume)

각각의 조직 중 임의로 선택한 슬라이드 7장에서 56-point

grid를 이용하여 point counting morphometry를 실시하였다. 즉, β 세포와 겹치는 point 수와 모든 조직 면적이 겹치는 point 수를 측정하여 전자를 후자로 나누면 된다.

(3) β 세포의 절대적 질량 (absolute β -cell mass)

β 세포의 상대적 용적에 적출 당시의 췌장조직의 무게를 곱하였다.

8) 통계적 분석

그룹 간의 통계적 비교에는 Student's t-test를 사용하였고 $P < 0.05$ 일 때 의미있는 차이로 결정하였다. 모든 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다.

결 과

1. 수술 후 혈당과 체중 변화

Sham operation을 시행한 I군에서는 혈당과 체중의 변화가 관찰되지 않았다. 췌장절제군 (II)은 수술 후 고혈당이 지속되었고, 인슐린 치료군 (III)과 췌도이식군 (IV)은 수술 후 고혈당이 발생하였으나 인슐린 투여 혹은 췌도이식을 시행한 후 정상 혈당을 유지하였다 (Fig. 1A). 고혈당이 지속된 II군은 수술 직후 급격한 체중 감소가 나타난 후 수술 3일 후부터는 더 이상의 감소를 보이지는 않았다. 그러나 III, IV군에서는 췌장절제술 후 감소된 체중의 점진적인 회복소견을 보였다 (Fig. 1B).

2. 수술 후 복강 내 당부하 검사 소견

수술 6일 후에 (치료 후 3일) 시행한 복강 내 당부하검사

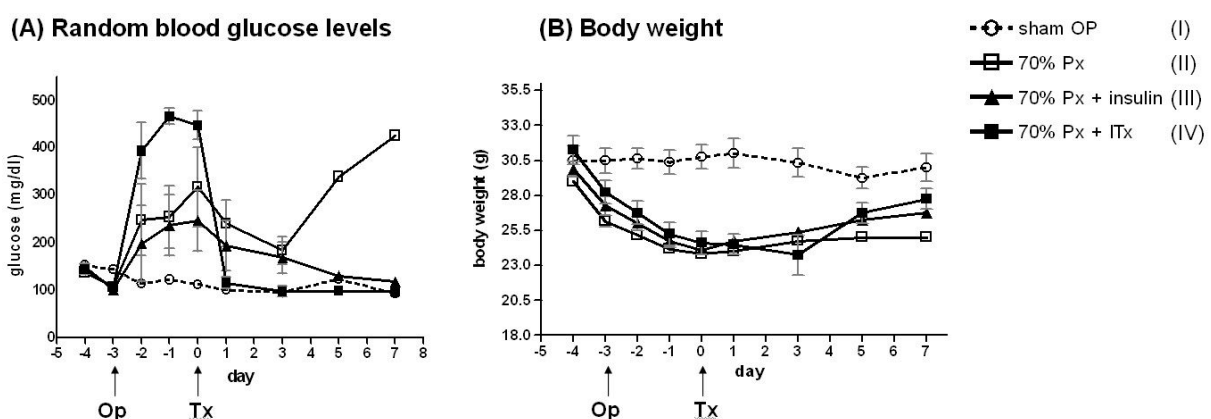


Fig. 1. Changes in blood glucose levels and body weight.

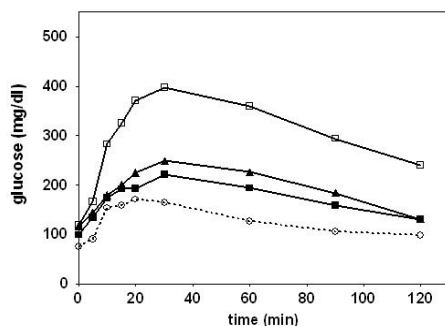
Balb/c mice aged 10~12 weeks were allocated to 4 groups: sham operation (sham OP, I), 70% pancreatectomy (Px, II), 70% pancreatectomy with subsequent insulin treatment (Px + insulin, III) and 70% pancreatectomy with islet transplantation (Px + ITx, IV). Group II showed abrupt hyperglycemia and weight loss after Px, but the weight was stationary since 3 days after operation (open square). In group III (triangle) and IV (solid square), hyperglycemia developed after Px, but hyperglycemia became euglycemic with treatment (Tx: insulin administration or islet transplantation), and body weight started to recover after then.

에서, 인슐린 치료군 (III)과 췌도이식군 (IV)은 비슷한 양상의 혈당 상승 및 회복을 보였고 (Fig. 2A), sham operation 군 (I)과 비교할 때 당내성은 저하되어 있었다. 그러나 수술 10일 후 (치료 후 7일)의 복강 내 당부하검사에서 췌도이식군 (IV)은 sham operation군 (I)에 유사한 결과를 보인 반면, 인슐린 치료군 (III)은 I, IV군과 차이를 보였다 (Fig. 2B). 물론 III군은 췌장절제군 (II)에 비하면 당내성이 유지되어, 수술 후 정상혈당을 유지하는 것이 당내성에 중요함을 보였지만, 그 효과가 췌도이식보다는 작음을 알 수 있다.

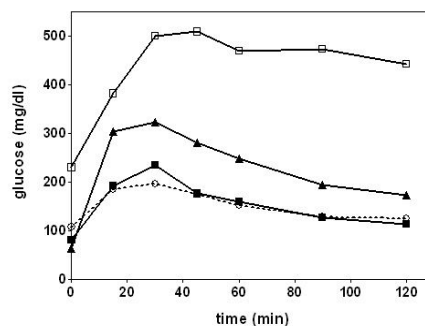
3. 수술 후 혈장 인슐린 농도의 변화

수술 3일 후 공복 혈장 인슐린 농도는 10% 가량으로 저하되었으나 수술 6일 후에는 모두 50% 이상으로 증가되어 있었고, 이는 이식군 (IV)이 II, III군에 비하여 두드러졌으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 당부하 소견과 마찬가지로, 수술 10일 후 (치료 후 7일)에는 췌도이식군 (IV)이 췌장절제군 (II)이나 인슐린 치료군 (III)과 비교하여 유의하게 인슐린분비가 증가되어 있었고, 이는 수술 전과 거의 같은 정도였다. 오히려 II, III군은 수술 6일 후에 비하여 상대

(A) IPGTT at 6th day after Px



(B) IPGTT at 10th day after Px



●○ sham OP (I)
 ■□ 70% Px (II)
 ▲ 70% Px + insulin (III)
 ■ 70% Px + ITx (IV)

Fig. 2. Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) after Px.

(A) At 6 days after Px (3 days after Tx), IPGTT was performed in each group. The pattern of glucose levels was similar in group III (triangle) and IV (solid square), however, the patterns of group III and IV were intolerant compared to group I (open circle).

(B) At 10 days after Px (7 days after Tx), group IV showed comparable results with group I. However, group III showed less glucose tolerance, and the difference with group IV was definite at that time.

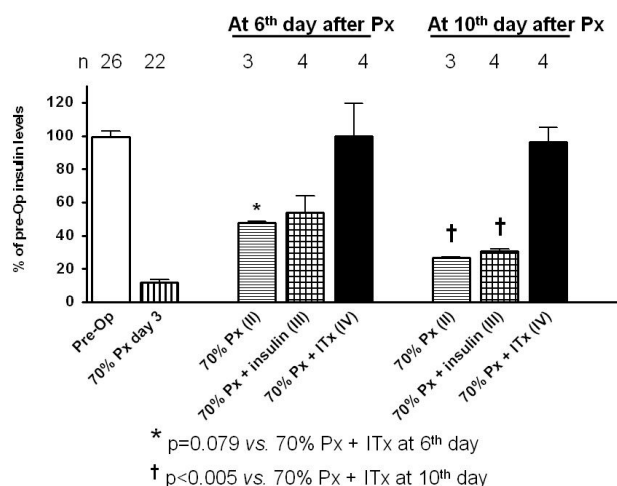


Fig. 3. Fasting plasma insulin concentrations after Px.

Fasting plasma insulin was measured before and after operation with/without treatment. Subject number of each group (n) is shown on the graph. Insulin concentrations decreased to 10% at 3 days after Px. They increased at 6 days after Px (at 3 days after Tx). Although those of group IV tended to be higher than other groups, no statistical difference was observed. At 10 days after Px (at 7 days after Tx) insulin levels in group IV were higher than in group II and III, by more than two times ($P < 0.005$).

적으로 인슐린분비가 감소한 경향을 보였다.

4. 세포 증식률의 차이

BrdU 염색으로 증식 중인 세포 수를 각 군에서 비교한 결과, 수술 6일 후 (치료 후 3일)에는 II, III, IV군에서 I군 보다 증가되어 있었는데, 인슐린 치료군인 III군에서는 II, IV군만큼 증가 정도가 크지 않았다. 수술 10일 후 (치료 후

7일)에는 III, IV군이 비슷하였고 II군에 비하여 유의하게 세포증식이 증가되어 있었으나, 6일째에 비하면 감소하는 추세였다 (Fig. 4A). 이러한 세포의 증식은 Fig. 4B에서 보듯이 β -세포가 존재하는 췌도보다는 췌관과 외분비 세포에서 주로 관찰되었다.

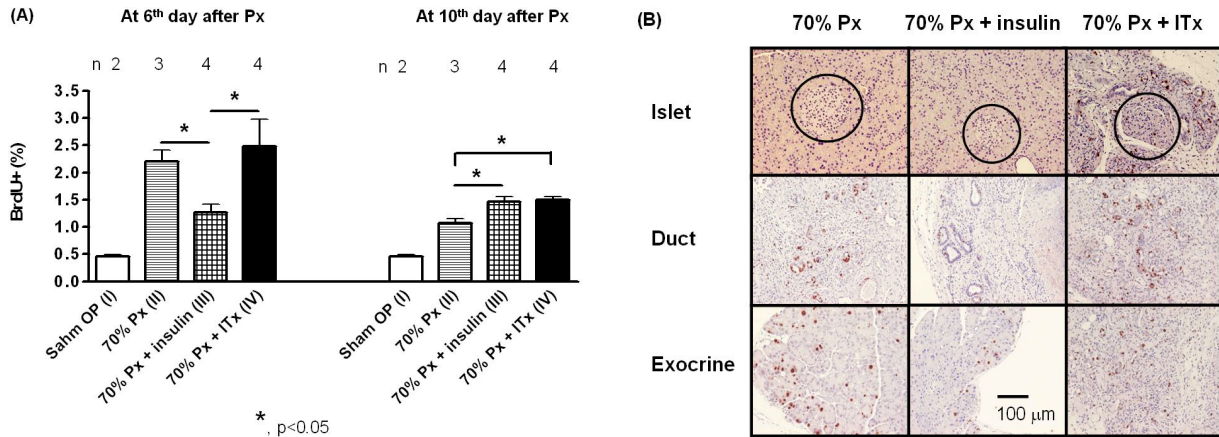


Fig. 4. Cell proliferation in remnant pancreas after Px.

(A) BrdU was injected before the mice were sacrificed, and then anti-BrdU staining was done with the remnant pancreas tissue. Subject number of each group (n) is shown on the graph. BrdU-positive cells were more prevalent in all the Px groups than in group I. At 6 days after Px (at 3 days after Tx), cell proliferation index was higher in group II and IV than in group III. At 10 days after Px (at 7 days after Tx), BrdU-positive cells were significantly higher in group III and IV than in group II. However, they were relatively decreased compared to each counterpart at 6 days after Px. Therefore, it suggests that cell proliferation is more prominent within 10 days after Px.

(B) Remnant pancreas tissues sections from group II ~ IV showing BrdU-positive cells indicate that cell proliferation occurred in all part of the pancreas, namely, islet, duct and exocrine tissue. However, it was not prominent in islets.

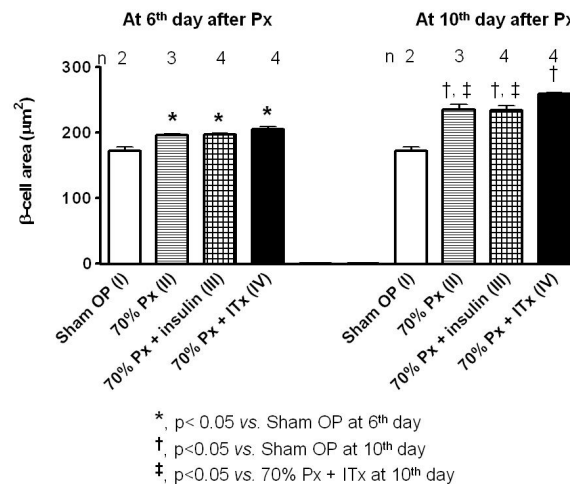


Fig. 5. Individual β -cell area in remnant pancreas.

Remnant pancreas tissue from each group was stained with anti-insulin antibody and individual β -cell area was measured as described in method section. It was increased after Px. At 6 days after Px (at 3 days after Tx), it was similar among group II, III and IV. At 10 days after Px (at 7 days after Tx), the increase progressed. Especially, the β -cell area was largest in group IV ($P < 0.05$).

5. β -세포의 크기, 전체 부피 및 인슐린 함량

인슐린 염색 후 β -세포를 계수하여 각 세포의 크기를 대조군 (I)과 비교하였을 때, 수술 후 6일째 (치료 후 3일)에 관찰된 β -세포 크기의 증가는 절제 후 10일째 (치료 후 7일) 더욱 진행되었고, 특히 췌도이식군 (IV)은 II, III군에 비하여 유의하게 증가하였다 (Fig. 5).

잔여 췌장에서 β -세포가 차지하는 상대적 부피를 계산하였을 때에, II군에 비하여는 III군에서, III군에 비하여는 IV군에서 유의하게 증가된 것을 관찰하였다. 절제 후 10일째

에는 같은 소견이었으나 III군과 IV군 사이에서 통계적 유의성이 사라졌다 (Fig. 6A). 이러한 경향은 β -세포 전체의 절대적 질량을 계산하였을 때에도 마찬가지였다 (Fig. 6B). Fig. 6B에서 알 수 있듯이, 70%의 췌장이 절제되었음에도 불구하고 IV군의 β -세포 질량은 절제 후 10일째에 대조군 (I)의 80% 정도까지 회복되는 것을 관찰하였다. IV군의 인슐린 염색 소견에 의하면 (Fig. 6C), 인슐린을 생성하는 세포는 췌도 내에만 있는 것이 아니라 외분비조직과 췌관 근처 (화살표) 중에도 존재하였다.

한편 췌장절제 후에는 췌도의 인슐린 함량을 시사하는

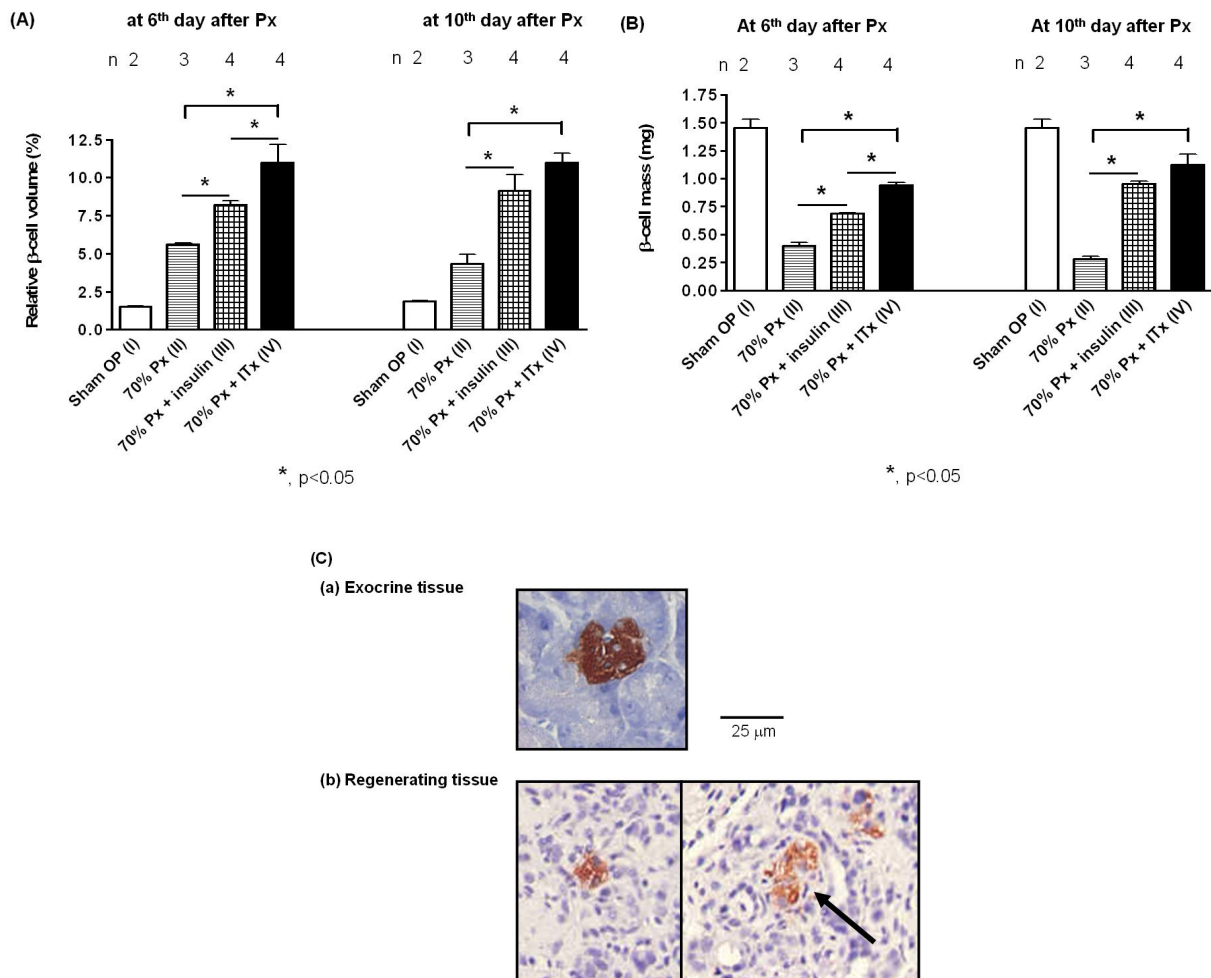


Fig. 6. β -cell amount in remnant pancreas.

(A) Relative β -cell volume was calculated by point counting as described in method section. It increased after Px compared to group I. At 6 days after Px (at 3 days after Tx), the volume was larger in group III than in II, and larger in group IV than in III. Although these tendency was maintained At 10 days after Px (at 7 days after Tx), the statistical significance between group III and IV was disappeared.

(B) Absolute β -cell mass was calculated with relative β -cell volume and weight of remnant pancreas. The pattern among group II-IV was similar with relative β -cell volume as in figure 6(A). β -cell mass in group IV at 10 days after Px (at 7 days after Tx) was increased upto 80% of group I.

(C) Insulin-positive cells in group IV (70% Px + ITx) were located not only in the islets but also in the exocrine and pancreatic duct (arrow). The upper panel was obtained from remnant pancreatic exocrine tissue, and the lowers were from the resection margin where active regeneration occurred.

인슐린 염색 정도가 감소하고 불규칙해지는 것을 관찰하였다 (Fig. 7). 이는 인슐린 치료군 (III)에서 가장 심하였으며 췌도이식군 (IV)에서 가장 덜하였다.

고 찰

본 연구에서는 부분췌장절제술을 시행받은 생쥐에서, 인슐린 치료나 췌도이식이 내인성 β -세포의 재생에 미치는 영향을 조직학적 소견에 근거하여 조사하였다. IV군에서 췌도이식 직후 혈당이 정상화되고 체중이 증가하기 시작하였으며, 복강내 당부하 검사와 혈장 인슐린 농도가 정상대조군 (I)과 거의 비슷한 결과를 보이므로, 이식된 췌도는 정상내당능을 유지하기에 충분한 양이었음을 알 수 있다. 그러나 인슐린 치료군 (III)은 수술 후 혈당의 상승이 다른 군에 비하여 심하지 않고, 치료 이후 혈당의 회복 역시 비교적 천천히 나타났다. 또한 췌도이식군 (IV)에서는 수술 직후 혈당의 상승이 다른 군에 비하여 심한 편이었다. 따라서, 전반적인 혈당 변화의 양상은 같지만, 그 정도에 있어서 관찰된 다소간의 차이는 III, IV군의 조직염색 결과의 해석에 있어서 고려해야 할 사항이라고 여겨진다.

β -세포 각각의 크기와 전체 β -세포 부피 모두, 치료에 의해 정상혈당이 유지된 군 (III, IV)에서 증가하는 소견을 보였다. 이는 설치류에서 정상혈당이 결핍된 β -세포 재생에 중요하다는 이전의 보고들과 부합하는 소견이다¹⁰⁻¹⁴⁾. 한편 BrdU 염색으로 관찰한 세포 증식은 췌도에서는 그다지 활

발하지 않아, 본 연구에서 β -세포의 재생이 세포 증식에 주로 의존한 것은 아님을 간접적으로 유추할 수 있다. Fig. 6(C)에서 보는 것처럼, 인슐린항체로 염색되는 세포들은 췌도뿐만 아니라 기존의 췌장의 외분비조직 (6C(a))과 새로 재생하고 있는 조직 중 (6C(b)) 외분비조직이나 췌관의 양상을 띄고 있는 부분 (화살표)에서도 일부 관찰되었다. 이는 기존의 β -세포 증식보다는 다른 세포가 β -세포로 분화하였을 가능성을 시사한다. 특히 인슐린 치료군 (III)은 수술 6일 후의 세포 증식이 췌장절제군 (II)보다도 낮지만, 이 때의 β -세포 부피는 II군보다 높은 소견도 이러한 가정에 부합한다. 추후 인슐린과 BrdU를 동시에 염색함으로써 이러한 사실을 확인할 수 있을 것이며, β -세포 분화와 관련된 인자들에 대한 조사 역시 이루어져야 할 것이다. β -세포의 재생이 주로 증식에 의한 것인지, 분화에 의한 것인지, 둘 다에 기인하는지에 대해서는 논란이 있다¹⁵⁻¹⁸⁾.

절제 10일 후 각각의 β -세포 면적은 췌도이식군 (IV)에서 인슐린 투여군 (III)보다 유의하게 증가되어 있었다 (Fig. 5). 전체 β -세포 양의 차이는 절제 6일 후가 더 뚜렷하였지만, 절제 10일 후에도 경향은 유지되었다 (Fig. 6). 한편 췌도이식군 (IV)은 내인성 β -세포 뿐만 아니라 이식된 β -세포도 가지고 있으므로, IV군에서 관찰된 당내성이나 인슐린분비능 (Fig. 2, 3)을 III군과 직접적으로 비교할 수는 없다. 따라서, 본 연구에서 *in vivo*상으로는 췌도이식의 내인성 β -세포 기능에 대한 영향은 알기 어렵다. 그러나 인슐린염색 정도로 췌도의 인슐린 함량을 정성적으로 비교하였을 때, IV군은

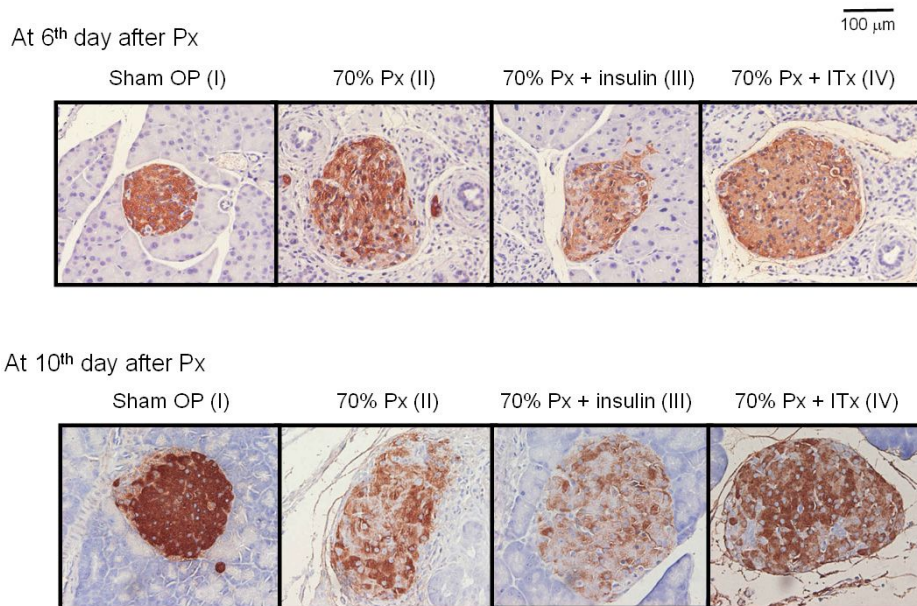


Fig. 7. Intensity of insulin staining within islets.

Remnant pancreas tissue from each group was stained with anti-insulin antibody and the islets are presented. After Px, staining intensity became faint and uneven, which indicates insulin content in the islets were decreased. The degree of staining intensity was Sham OP (I), 70% Px + ITx (IV), 70% Px (II), and 70% Px + insulin (III) in the order named.

III군에 비하여 인슐린 함량이 증가되어 있었다 (Fig. 7). 이러한 결과들은 부분췌장절제 후 내인성 β 세포의 재생과 기능 유지에 있어서, 단지 인슐린으로 정상혈당을 유지하는 것 뿐만 아니라 췌도이식편 자체의 영향도 있음을 시사한다. Hamamoto 등은 스트렙토조토신으로 당뇨병이 유발된 백서에서 췌도이식이 내인성 β 세포의 기능과 질량을 향상시킨다고 보고하였는데¹⁰⁾, 이 연구에서는 치료를 하지 않아 고혈당이 지속된 대상과 비교하였으므로, 정상혈당의 영향과 이식편 자체의 영향을 감별할 수 없다.

정상혈당의 유지라는 역할 이외에 췌도이식편이 낼 수 있는 효과로, 먼저 일종의 성장인자인 인슐린의 분비를 생각할 수 있다. β 세포에는 인슐린수용체가 존재하여 β 세포의 재생 및 기능에 영향을 미친다¹⁹⁾. 따라서, Fig. 3에서 볼 수 있듯이 췌도이식군 (IV)에서의 풍부한 인슐린은 β 세포에 추가적인 영향을 끼쳤을 것이다. 인슐린 치료군 (III)은 공복 혈장 인슐린 농도가 대조군 (II)보다 유의하게 높지 않지만, 인슐린이 투여된 후에는 혈중 농도가 증가되어 있을 것이다. β 세포의 기능이나 재생에 중요한 것이 단지 정상혈당만은 아니라는 것이 과거에도 보고된 바 있다. Serradas 등은 인슐린 비의존성 당뇨병 백서모델에서, 장기간 인슐린으로 정상혈당을 유지하면 정상으로 회복되던 arginine에 대한 β 세포의 과반응이, phlorizin이나 vanadate으로 정상혈당을 유지하면 회복되지 않음을 보고하였다²⁰⁾. 이는 arginine에 대한 β 세포의 반응을 정상화하는 데에 인슐린이 필요함을 시사한다. 인슐린저항성이 동반된 일부 설치류 모델 (Wistar fatty rats, OLETF rats)에서는 부분췌장절제 후에도 β 세포의 질량의 증가가 뚜렷하지 않은 것으로 관찰되었는데, 이는 phlorizin을 투여하여 정상혈당을 유도하여도 마찬가지로 나타났다^{21,22)}. Phlorizin은 요중 포도당 배설을 증강시킴으로써 혈당을 강하시키는 물질이다. Phlorizin으로 정상화한 혈중 포도당 농도는 부분췌장절제 후 β 세포의 증식과 분화에 각각 다른 영향을 주는 것처럼 보이기도 한다²³⁾. 어쨌든, 혈당의 정상화뿐 아니라, 인슐린 자체의 공급이 β 세포 재생이나 기능 회복에 중요한 요소라면, 이를 위한 가장 이상적이고 생리적인 방법은 Fig. 2와 3에서 알 수 있듯이 췌도이식이라고 할 수 있다.

한편 인슐린 치료군(III)과 췌도이식군 (IV) 사이에도 각각의 β 세포 면적, 전체 β 세포 부피, 췌도 내 인슐린 함량 등에서 차이가 관찰되므로, 췌도이식편에는 인슐린 이외에도 β 세포에 영향을 끼치는 요인이 있을 것으로 추정된다. *In vivo*로 투여하거나 발현을 증가시켰을 경우 β 세포의 재생이 촉진되는 것으로 관찰된 물질로는 epidermal growth factor, gastrin, glucagons-like peptide-1, betacellulin, activin A, 그리고 펩타이드 INGAP 등이 있다²⁴⁾. 췌도이식과 이러한 물질들의 관계 역시 향후 연구되어야 할 것이다.

본 연구에서 생쥐에서 부분 췌장절제술 후 췌도이식을

시행하여 정상혈당을 유지할 경우, 잔여 β 세포의 재생이 촉진되고 췌도 내 인슐린 함량이 증가되는 것을 관찰하였다. β -세포의 재생은 주로 췌관 등으로부터의 분화에 기인한 것으로 유추되나, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 췌도이식편이 잔여 췌도의 재생에 미치는 영향은 아직 자세히 보고된 바가 없는데, 이러한 기전의 규명으로 면역억제제의 향상과 췌도분리기술의 발달에 힘입어 최근 당뇨병 완치의 희망으로 떠오르고 있는 췌도이식은 그 당위성이 더해질 것이다.

요 약

연구배경: β 세포의 부족은 당뇨병의 주요 병인이며, 이의 해결은 당뇨병의 치료방법으로서 중요하다. 췌도이식이 단순히 인슐린을 공급하는 것 이외에, 내인성 β 세포의 재생에 관여하는지 여부는 확실하지 않다. 본 연구에서는 췌도이식의 β 세포 재생에 대한 영향을 인슐린 치료와 비교하여 관찰하였다.

방법: 70%의 췌장을 절제해 낸 10~12주령 Balb/c mouse를 β 세포 재생 모델로 이용하였다. Sham operation (I)군, 70% 췌장절제군 (II), 절제 후 인슐린 치료군 (III), 절제 후 췌도이식 시행군 (IV)으로 나누어 시간 경과에 따라 혈당과 체중, 복강 내 당부하 검사를 시행하였고, 절제 6일 (치료 후 3일)과 10일 후 (치료 후 7일)에 잔여 췌장을 적출하여 세포 증식과 β 세포의 질량을 측량하였다. 여기에는 면역조직화학염색을 이용하였다.

결과: 70% 췌장절제 후 고혈당과 체중감소가 발생하였으며, 인슐린치료군, 췌도이식군은 치료 후 정상혈당을 회복하고 체중이 증가하기 시작하였다. 공복 혈장 인슐린 농도, β 세포 각각의 면적 및 전체 β 세포의 질량이 II군에 비하여 IV군에서 유의하게 증가되어 있었고 ($P < 0.05$), 특히 이식 3일 후보다는 7일 후에 그 차이가 분명하였다. III군과 비교하였을 때에, IV군의 β 세포 각각의 면적은 이식 7일 후에 유의하게 증가되어 있었고, 전체 β 세포 질량은 이식 3일 후가 더욱 뚜렷하게 증가되어 있었다 ($P < 0.05$).

결론: 본 연구의 결과는, 설치류에서 부분췌장절제술 후에 정상혈당을 유지할 수 있는 정도의 췌도를 이식할 경우, 잔여 췌장조직으로부터 β 세포의 재생을 촉진시킴을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Bouwens L, Rooman I: Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 85:1255-70, 2005
2. Navarro X, Sutherland DE, Kennedy WR: Long-term

- effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. Ann Neurol* 42:727-36, 1997
3. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M: *Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. N Engl J Med* 339: 69-75, 1998
4. Fiorina P, Folli F, Zerbini G, Maffi P, Gremizzi C, Di Carlo V, Socci C, Bertuzzi F, Kashgarian M, Secchi A: *Islet transplantation is associated with improvement of renal function among uremic patients with type I diabetes mellitus and kidney transplants. J Am Soc Nephrol* 14:2150-8, 2003
5. Korsgren O, Jansson L, Andersson A: *Effects of hyperglycemia on function of isolated mouse pancreatic islets transplanted under kidney capsule. Diabetes* 38:510-5, 1989
6. Kilpatrick ED, Robertson RP: *Differentiation between glucose-induced desensitization of insulin secretion and beta-cell exhaustion in the HIT-T15 cell line. Diabetes* 47:606-11, 1998
7. Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC: *Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion. Diabetes Care* 15: 442-55, 1992
8. Montana E, Bonner-Weir S, Weir GC: *Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice. J Clin Invest* 91:780-7, 1993
9. Juang JH, Bonner-Weir S, Wu YJ, Weir GC: *Beneficial influence of glycemic control upon the growth and function of transplanted islets. Diabetes* 43:1334-9, 1994
10. Hamamoto Y, Tsuura Y, Fujimoto S, Nagata M, Takeda T, Mukai E, Fujita J, Yamada Y, Seino Y: *Recovery of function and mass of endogenous beta-cells in streptozotocin-induced diabetic rats treated with islet transplantation. Biochem Biophys Res Commun* 287:104-9, 2001
11. Plachot C, Movassat J, Portha B: *Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. Histochem Cell Biol* 116:131-9, 2001
12. Miao G, Ito T, Uchikoshi F, Tanemura M, Kawamoto K, Shimada K, Nozawa M, Matsuda H: *Beneficial effects of pancreas transplantation: regeneration of pancreatic islets in the spontaneously diabetic Torii rat. Transplant Proc* 37:226-8, 2005
13. Movassat J, Portha B: *Beta-cell growth in the neonatal Goto-Kakisaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. Diabetologia* 42:1098-106, 1999
14. Yamamoto M, Jia DM, Fukumitsu K, Otsuki M: *Treatment for hyperglycemia promotes pancreatic regeneration in rats without CCK-1 receptor gene expression. Pancreas* 26:368-74, 2003
15. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA: *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. Nature* 429: 41-6, 2004
16. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D: *Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. Nat Biotechnol* 22:1115-24, 2004
17. Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H: *Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. Diabetes* 53:2143-52, 2004
18. Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM: *Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. Science* 306:2261-4, 2004
19. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR: *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. Cell* 96:329-39, 1999
20. Serradas P, Bailbe D, Blondel O, Portha B: *Abnormal B-cell function in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin: effect of in vivo insulin, phlorizin, or vanadate treatments. Pancreas* 6:54-62, 1991
21. Zhu M, Noma Y, Mizuno A, Sano T, Shima K: *Poor capacity for proliferation of pancreatic beta-cells in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rat: a model of spontaneous NIDDM. Diabetes* 45:941-6, 1996
22. Ogino T, Zhu M, Murakami T, Kuwajima M, Shima K: *Effect of partial pancreatectomy on beta-cell mass in the remnant pancreas of Wistar fatty rats. J Med Invest* 45:103-10, 1998
23. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patane

G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC: *Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. J Biol*

Chem 274:14112-21, 1999

24. Bonner-Weir S, Weir GC: *New sources of pancreatic beta-cells. Nat Biotechnol* 23:857-61, 2005