

OLETF 쥐에서 산화스트레스가 IRS-1 degradation을 통한 혈관성 인슐린저항성의 유발

부산대학교 의과대학 내과학교실, 동국대학교 의과대학 내과학교실¹

박정래·이영실¹·김보현·강양호·김인주·김용기·손석만

Oxidative Stress Causes Vascular Insulin Resistance in OLETF Rat Through Increased IRS-1 Degradation

Jung Lae Park, Young Sil Lee¹, Bo Hyun Kim, Yang Ho Kang, In Ju Kim, Yong Ki Kim, Seok Man Son

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Pusan National University; and Department of Internal Medicine, College of Medicine¹, Dongguk University

- Abstract -

Background: Insulin resistance and oxidative stress have been reported to play essential pathophysiological roles in diabetic cardiovascular complication. The relationship between insulin resistance and oxidative stress in vasculature remains unclear. The study was conducted to assess whether oxidative stress induce vascular insulin resistance in OLETF rat, a model of type 2 diabetes

Methods: We used OLETF rats (20/30/40 weeks, n = 5/5/5), as models of type 2 DM, and LETO rats (20/30/40 weeks, n = 5/5/5) as controls. Aortas of each rats were extracted. Superoxide anion production was detected by NBT assay and lucigenin assay. 8-hydroxyguanosine (OHdG) and nitrotyrosine were detected as markers of oxidative stress in 20 and 40 weeks groups. The glucose uptake of aortas was measured by detecting 2-deoxyglucose uptake in both groups. The expression of IR, IRS-1, PI3-K and Akt/PKB were detected by immuno precipitation and immunoblotting in 20, 30 and 40 weeks groups

Results: Superoxide anion production and markers of oxidative stress (8-OHdG, nitrotyrosine) were significantly increased in aortas of OLETF rats compared with controls. Aortas of OLETF rats exhibited decreased IRS-1 content and increased phosphorylation of IRS-1 at Ser307 compared with LETO rats. There were no significant differences in expressions of IR, PI3-K and Akt/PKB between two groups

Conclusion: These results suggest that oxidative stress induces insulin resistance in vasculature of OLETF rat specifically through increasing serine phosphorylation of IRS-1 and its degradation by a proteasome-dependent pathway, providing an alternative mechanism that may explain the association with insulin resistance and diabetic vascular complications. (J Kor Diabetes Assoc 31:22~32, 2007)

Key Words: Aorta, Insulin resistance, IRS-1, Oxidative stress

서 론

당뇨병환자에서 관상동맥 질환, 뇌혈관 질환 등의 혈관합병증으로 인한 사망률이 높은 것으로 알려져 있고, 고혈당이 이러한 혈관합병증과 직접적인 관계가 있다^{1,2)}. 여러 연구에서 당뇨병환자와 당뇨병 동물모델에서 고혈당이 반응성 산소유리기를 증가시킨다는 밝혀졌고³⁻⁵⁾, 이러한 산화스트레스가 당뇨병에서 혈관합병증의 발생에 중요한 원인으로 생각되고 있다⁶⁾.

최근 혈관조직의 내피세포, 평활근세포, 대동맥 외막의 섬유아세포에서 반응성 산소유리기 등의 산화스트레스가 증가됨이 밝혀졌고⁷⁻⁹⁾, 이 중 특히 superoxide 음이온은 유전자 발현의 유도, 세포의 증식, 세포의 고사, 세포의 비대 등을 야기한다고 알려져 있으며¹⁰⁻¹²⁾, 이러한 산화스트레스들이 혈관조직에서 고혈압과 죽상경화증과 같은 혈관 재형성 과정에 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다¹³⁾.

한편, 인슐린저항성은 제2형 당뇨병의 발생에 필수적인 요소이며 또한, 인슐린저항성은 심혈관 질환의 독립적인 위험인자로 알려져 있고¹⁴⁾, 혈관조직에서의 인슐린저항성이 죽상경화증과 혈관조직의 긴장도 조절능력에 관여할 것으로 생각되고 있다¹⁵⁾.

최근 산화스트레스가 인슐린저항성과 연관이 있음이 밝혀졌고¹⁶⁾, Gardner 등¹⁷⁾은 H₂O₂가 혈관 평활근세포에서 인슐린 신호전달 체계 중 Akt/PKB 이전 단계의 이상으로 인슐린저항성을 유발함을 보고하였으나, 아직까지 혈관조직에서 산화스트레스가 인슐린저항성을 유발하는 기전은 명확히 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐를 이용하여, 고혈당으로 유발된 산화스트레스가 혈관조직에서 인슐린저항성을 유도하는 기전을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 약물

본 연구에 사용된 약물은 다음과 같다: lucigenin, nitroblue tetrazolium, diphenyleneiodonium (Sigma Chemical Co., St. Louis); antibodies against IRS-1, Akt/PKB, phospho-Akt/PKB (Cell Signaling, Beverly); antibodies against phospho-IRS-1, IR, PI3-K and actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz).

2. 실험동물

제 2형 당뇨병의 자연발생 모델로 생후 20주, 30주와 40주 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐를 각각 5마리씩 사용하였고, 대조군으로 생후 20주, 30주와 40

주된 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐를 각각 5마리씩 사용하였다. 실험동물들은 일본 오즈카 제약회사 (Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd, Tokushima, Japan)로부터 생후 5주에 분양받았다.

3. 실험방법

실험기간동안 일정한 온도 (23 ± 2℃)와 일정한 습도 (55 ± 5%) 조건에서 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 최소 8시간 금식시킨 후 20주와 40주에 공복 혈당과 체중을 측정하였고, 20주, 30주와 40주에 희생시켜 LETO 쥐와 OLETF 쥐에서 대동맥을 적출하였다.

4. 혈관조직

적출한 흉부 대동맥을 Krebs/Hepes 완충액 (조성 [mmol/L]: NaCl, 99.01; KCl, 4.69; CaCl₂, 1.87; MgSO₄, 1.2; K₂HPO₄, 1.03; NaHCO₃, 25.0; Na-Hepes, 20.0; glucose, 11.1; pH 7.4)에 넣어 세척한 후 혈관조직에서 생성되는 superoxide 음이온의 양과 산화스트레스 표지자, 포도당 섭취, NBT 염색, insulin receptor (IR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K), Akt/PKB를 측정하기 위해 5 mm 간격으로 절단하여 동맥환 (aortic ring)을 만들었다.

5. 혈관조직에서 superoxide 음이온 생성량의 측정

Lucigenin assay을 이용하여 혈관의 superoxide 음이온의 생성 정도를 측정하였다. Lucigenin은 acridylum dinitrate 복합체로 superoxide 음이온과 반응하여 환원시 발광반응이 일어나며 이때 발광량을 luminometer (EG & G Berthold, Germany)로 측정하여 superoxide 음이온의 생성량을 계산하였다¹⁸⁾. 혈관조직에서 생성된 superoxide 음이온의 측정방법은 다음과 같다. 혈관조직을 Krebs/Hepes 완충액에 넣어 37℃에서 30분간 처리하여 안정시킨 후 250 μmol/L lucigenin을 첨가하고 luminometer에 넣었다. 혈관조직에서 측정되는 화학발광 (chemiluminescence)을 37℃에서 60분간 계속해서 측정하였다. 측정한 후 혈관조직을 오븐에 넣어 24시간동안 90℃에서 건조시켜 건조질량을 측정하였다. 알려져 있는 xanthine과 xanthine oxidase를 사용해서 측정된 superoxide 음이온의 표준곡선과 비교하여 superoxide 음이온의 생성량을 계산하였다¹⁹⁾.

또한, superoxide 음이온의 생성 정도를 알기위해 대동맥환을 NBT (nitroblue tetrazolium)와 incubation시켜 NBT가 superoxide 음이온과 반응하여 blue formazan으로 환원되는 정도를 이용하였고, blue formazan의 540 nm파장 하에 흡광도를 spectrophotometer로 측정하였고, NBT 환원 (reduction)은 다음과 같이 계산하였다²⁰⁾.

$$\text{NBT reduction} = A \times V / (T \times Wt \times E \times L)$$

(picomoles per minute per milligram wet weight of ring)

A: absorbance
V: volume of solubilizing solution
T: time of incubation with NBT(min)
Wt: blotted wet weight of the aortic ring
E: extinction coefficient= 0.72 mmol/min
L: length of light path

6. 혈관조직에서 산화스트레스 표지자 (oxidative stress marker)의 측정

산화스트레스 표지자로는 DNA의 산화 손상정도를 반영하는 8-OHdG (8-hydroxydeoxyguanosine)을 8-OHdG-EIA kit (Nikken SEIL Corporation, Fukuroi, Japan)를 사용하여 측정하였고, superoxide 음이온이 NO와 반응하여 생기는 peroxynitrite의 생성을 반영하는 nitrotyrosine (NT)을 NT-EIA kit (OxisResearch, Portland)를 이용하여 측정하였다.

7. 혈관조직의 NBT 염색

대동맥 환을 NBT와 반응시킨 후 4% 포르말린과 파라핀으로 고정하여 파라핀 블록을 만든 후 H&E (Hematoxylin and eosin) 염색을 하여 저배율에서 대동맥 조직의 NBT 염색 소견을 관찰하였다.

8. 혈관조직에서 포도당 섭취 (glucose uptake)의 측정

포도당 섭취 정도를 측정하기 위해 추출한 대동맥 조직을 5.6 mmol/L glucose, 0.2 $\mu\text{Ci/mL}$ 2-deoxy-D-[2,6-3H] glucose를 포함한 Krebs-Ringer buffer에 95% O₂/5% CO₂ 하에서 120 분간 incubation시켰고, 37°C와 120 rpm하에서 원심분리 후 2-deoxy-D-[2,6-3H] glucose의 섭취 정도를 liquid scintillation로 counting에 의해 측정하였다.

9. Immunoprecipitation과 Western immunoblotting

각 군의 대동맥 환을 잘게 썰어 차가운 인산 완충 용액 (phosphate buffered saline, PBS)으로 세척한 후 Triton lysis buffer [pH 7.4, 50 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitors (10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin), phosphatase inhibitors (50 mmol/L sodium fluoride, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 mmol/L sodium pyrophosphate)]을 이용하여 용해시킨 후 세포용해액을 4°C에서 14,000 \times g로 15분간 원심분리하여 상층액을 -70°C에 보관하였다. 추출된 단백질은 Bradford assay법으로 농도를 결정하였고, 각각의 검체를 SDS-PAGE (sodium dodecyl

sulfate-polyacryamide gel electrophoresis)로 전기영동 후 겔내의 단백질은 100 볼트에서 1시간 동안 Hybond-ECL nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane을 하룻밤 동안 4°C에서 5% non-fat dry milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 처리하였다. IR, IRS-1, PI3-K, Akt/PKB, phospho-Thr308-Akt/PKB, phospho-Ser473-Akt/PKB에 대한 1차 항체로 1시간동안 반응시킨 후 membrane을 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 10분간 3회 세척하였고, 1% non-fat dry milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS에 horseradish peroxidase 2차 항체를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ECL solution kit (Amersham Life Science Inc)을 이용하여 발현 정도를 측정하였다. IRS-1의 인산화를 알아보기 위해 추출한 각각의 단백질을 IRS-1에 대한 항체와 2시간 동안 반응시킨 후 4°C에서 1시간동안 15 μL 의 protein A/G agarose (Santa Cruz Biotechnology)를 첨가하여 1시간 더 반응을 시켰다. 원심분리 후 가라앉은 bead를 lysis buffer로 3회 세척하고 2번 더 세척을 하였다. 전기영동 후 겔내의 단백질은 100 볼트에서 1시간 동안 Hybond-ECL nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane을 하룻밤 동안 4°C에서 5% non-fat dry milk와 0.1% Tween 20을 함유한 PBS로 처리하였다. Phospho-tyrosine-IRS-1, phospho-Ser307-IRS-1와 phospho-Ser612-IRS-1에 대한 1차 항체로 1시간 동안 반응시킨 후 horseradish peroxidase 2차 항체를 넣어 1시간 동안 반응시킨 후 ECL solution kit을 이용하여 발현 정도를 측정하였다.

10. 통계분석

모든 실험치는 평균치 \pm 평균의 표준오차로 표시하였고 통계분석은 SPSS 11.0 프로그램 (SPSS Inc, Chicago, IL)을 사용하였다. 실험결과와 통계는 경우에 따라 Student's t-test와 ANOVA test를 적용하여 분석하여 $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 실험동물의 체중 및 혈당변화

OLETF 쥐와 LETO 쥐의 공복시 혈당과 체중의 변화는 표 1에서 보이는 바와 같았고, 20주 OLETF 쥐와 LETO 쥐 사이의 공복시 혈당과 체중의 변화는 의미있는 차이가 없었으나 40주에서는 OLETF 군에서 공복 혈당과 체중이 유의하게 증가되어 있었다 ($P < 0.01$, Table 1).

2. Superoxide 음이온 생성량의 측정

OLETF 쥐와 LETO 쥐의 대동맥 조직에서 Lucigenin assay로 NAD(P)H oxidase의 활성도를 측정하였는데, 20주

에는 두 군간의 의미있는 차이는 없었으나 40주 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서의 superoxide 음이온의 생성이 LETO 쥐에 비해 의미있게 증가했으며, NAD(P)H oxidase의 활성이 현저하게 증가된 것을 알 수 있었다 ($P < 0.01$, Fig. 1).

NBT 환원을 이용해 측정된 superoxide 음이온의 생성은 20주 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 LETO 쥐에 비해 의미있게 증가되어 있었고 ($P < 0.05$), 40주에서는 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 LETO 쥐에 비해 현저하게 증가된 소견을 보였다 ($P < 0.01$, Fig. 2).

3. NBT 염색을 통한 혈관조직의 superoxide 음이온의 생성 위치

OLETF 쥐와 LETO 쥐의 흉부 대동맥 환을 NBT와 반

응시킨 후 파라핀 블록을 만들어 두 군을 비교해 보았을 때, OLETF 쥐의 대동맥 중막에서는 LETO 쥐에 비해 NBT 염색이 감소된 소견을 보였으나, 외막에서는 LETO 쥐에 비해 현저하게 NBT 염색이 증가된 소견이 관찰되었다 (Fig. 3).

4. 산화스트레스 표지자인 8-OHdG와 nitrotyrosine의 측정

산화스트레스의 표지자로 대동맥 조직의 DNA의 산화손상 정도를 반영하는 8-OHdG의 농도를 측정하였을 때, 20주 OLETF 쥐와 LETO 쥐의 대동맥 조직사이에서는 유의한 차이가 없었으나 40주에서 두 군 간에 현저한 차이를 보였고, OLETF 쥐의 대동맥 조직의 8-OHdG의 양이 유의하게 더 높았다 ($P < 0.01$, Fig. 4A). Peroxynitrite의 생성을

Table 1. Fasting Glucose and Body Weight of OLETF and LETO Rats

Weeks	LETO		OLETF	
	20 wks	40 wks	20 wks	40 wks
Blood glucose (mg/dL)	80.7 ± 7.6	125.9 ± 15.7	118.7 ± 4.8	198.6 ± 11.8*
Body weight (g)	277.5 ± 3.2	518.0 ± 17.3	328.7 ± 8.3	618.3 ± 63.0*

* $P < 0.01$ vs. LETO at 40 weeks.

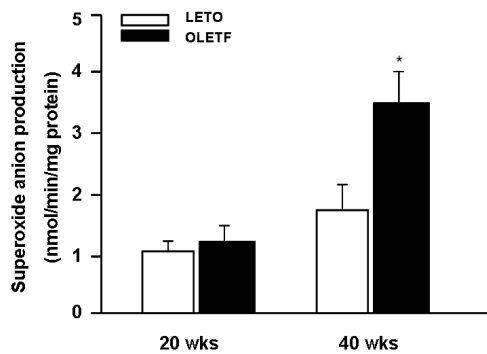


Fig. 1. Vascular superoxide production in the aortic segments from LETO and OLETF rats was assessed by lucigenin chemiluminescence assay. Data were expressed as nmol/min/mg of dry weight of vessels. Bars represent mean ± SEM of 4 experiments in each group.

* $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

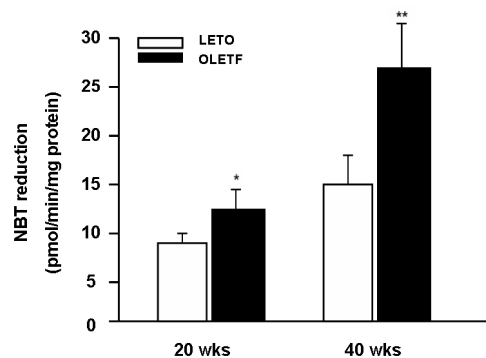


Fig. 2. NAD(P)H oxidase-stimulated superoxide production in aortic segments by NBT reduction. Bars represent mean ± SEM of 4 experiments in each group.

* $P < 0.05$ compared with LETO rats at 20 weeks.

** $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

반영하는 nitrotyrosine의 농도도 40주 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 40주 LETO 쥐에 비해 유의하게 증가된 조건을 보였다 ($P < 0.01$, Fig. 4B).

5. 2-deoxyglucose 섭취량 측정

대동맥 조직에서의 2-deoxyglucose의 섭취를 비교해 보

았을때 LETO 쥐의 대동맥 조직에서 20주에 비해 40주에서 섭취가 감소되어 있었고, 40주 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 대조군인 40주의 LETO 쥐의 대동맥 조직에 비해 2-deoxyglucose의 섭취가 현저히 감소되어 있었다 ($P < 0.01$, Fig. 5).

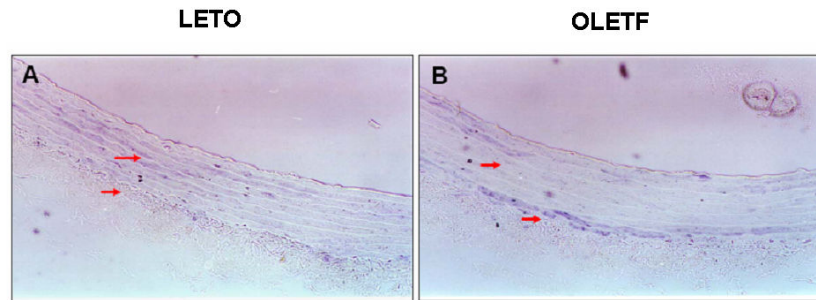


Fig. 3. Localization of superoxide anion production in aortic rings from LETO and OLETF rats by NBT reduction. Cross-sections of a rat thoracic aorta stained with NBT in LETO (A) and OLETF (B) rats were embedded in paraffin, and photographed.

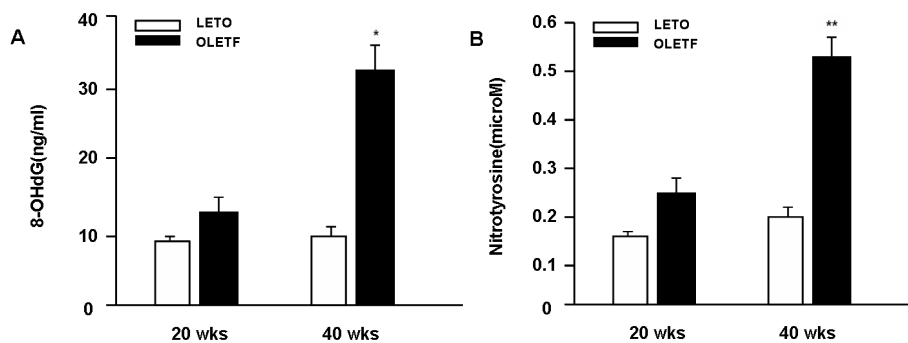


Fig. 4. 8-OHdG content in the aortic tissue DNA (A) and nitrotyrosine content in the aortic tissue lysate (B). Bars represent mean \pm SEM of 4 experiments in each group.

* $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

** $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

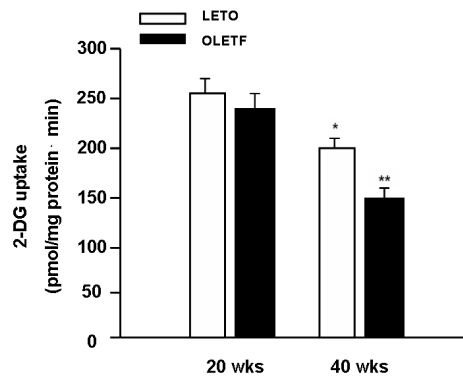


Fig. 5. Aortic tissues were exposed to 100 nmol/L insulin for 120 minutes. Uptake of 2-deoxy-D-[3H]glucose was measured. Bar graph represents means \pm SEM ($n = 4$) of percent change in 2-deoxy-D-[3H]glucose uptake.

* $P < 0.05$ compared with LETO rats at 20 weeks.

** $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

6. IR와 IRS-1의 발현

20주, 30주와 40주의 OLETF 쥐와 LETO 쥐의 대동맥 조직의 IR와 IRS-1의 발현을 확인하였는데, 두 군에서 IR의 발현은 주령에 상관없이 서로 차이를 보이지 않았으나 IRS-1의 경우 30주와 40주에서 OLETF 쥐의 IRS-1이 LETO 쥐에 비해 현저히 발현이 감소되어 있는 소견을 보였다 (Fig. 6).

7. 대동맥 조직의 IRS-1의 인산화

40주 OLETF 쥐와 LETO 쥐의 대동맥 조직에서 IRS-1의 발현과 tyrosine 인산화와 Ser612, Ser307의 인산화를 보았는데, OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 IRS-1의 tyrosine 인산화, Ser612의 인산화는 대조군인 LETO 쥐에 비해 차이가 없었으나 Ser307의 인산화가 현저히 증가된 소견을 보였다 (Fig. 7).

8. PI3-K, Akt/PKB의 발현과 Akt/PKB의 인산화

20주, 30주와 40주의 대동맥 조직에서의 PI3-K의 발현을 비교해보았을때 두 군에서 발현의 차이를 보이지 않았다 (Fig. 8A).

20주, 40주 OLETF 쥐와 LETO 쥐의 대동맥 조직에서 Akt/PKB의 발현을 보았는데 두 군에서 차이를 보이지 않았고, Threonine 308는 40주 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 약간 감소한 결과를 보였으나 Serine 473의 인산화 정도는 주령에 상관없이 두 군간에 차이가 없었다 (Fig. 8B).

고 찰

본 연구에서 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐의 혈관조직에서 산화스트레스가 인슐린저항성을 유발하는 기전을 규명하였다. 본 연구에서 관찰된 주요한 결과는 1) superoxide

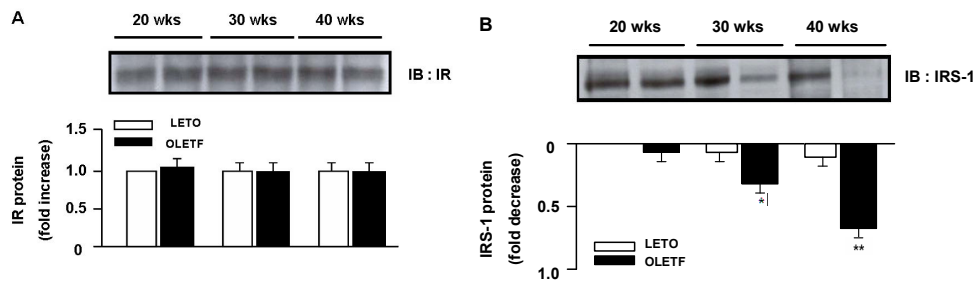


Fig. 6. IR (A) and IRS-1 (B) expressions on aortas of LETO and OLETF rats.

Western blotting with anti-IR or anti-IRS-1 antibody was performed.

Bars represent mean \pm SEM of 4 experiments in each group.

* $P < 0.05$ compared with LETO rats at 30 weeks.

** $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

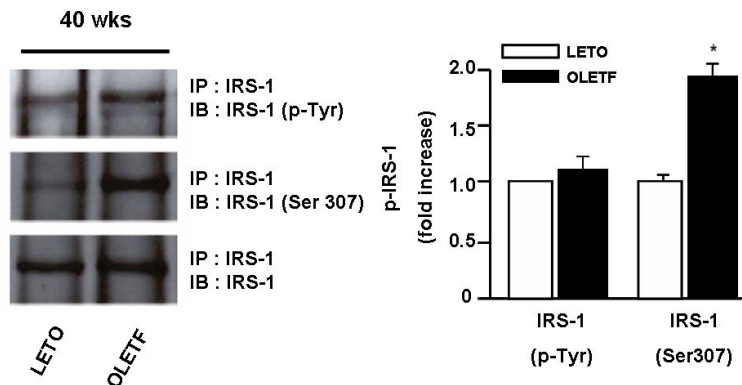


Fig. 7. Phosphorylation of IRS-1 on aorta of LETO and OLETF rats. Aortic tissues were lysed and immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody. Western analysis was performed using phospho-tyrosine-IRS-1, phospho-Ser307-IRS-1 or phospho-Ser612-IRS-1 antibody.

Bars represent mean \pm SEM of 4 experiments in each group.

* $P < 0.01$ compared with LETO rats at 40 weeks.

음이온과 8-OHdG, nitrotyrosine같은 산화스트레스의 표지자가 대조군에 비해 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 현저히 증가되어 있었다. 2) NBT 염색을 했을때 OLETF 쥐의 대동맥 중막의 염색은 LETO 쥐에 비해 감소되어 있는 소견을 보였으나, 외막에서는 LETO 쥐에 비해 현저히 염색이 증가되어 있음을 볼 수 있었다. 3) 2-deoxyglucose의 섭취가 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 현저히 감소되어 있었다. 4) OLETF 쥐와 LETO 쥐의 대동맥 조직에서의 IR, PI3-K, Akt/PKB의 발현은 차이가 없었다. 5) OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 IRS-1의 발현이 LETO에 비해 감소되어 있었고, IRS-1의 Ser307의 인산화가 증가되어 있었다.

다양한 산화스트레스들이 당뇨병에서 증가되어 있으며, 고혈당, 포도당의 자가 산화 (auto-oxidation), 비효소적 당화 (nonenzymatic glycation)의 증가, 유리 지방산이 이러한 산화스트레스의 발생에 관여한다고 알려져 있고^{21,22)}, 혈관 조직에서도 superoxide 음이온의 생성이 증가하며 증가된 superoxide 음이온은 NO와 반응하여 peroxynitrite (ONOO-)을 형성하여 혈관 이완반응의 장애, 내피세포의 고사를 야기한다고 밝혀져 있으나^{23,24)}, peroxynitrite는 생체내 반감기가 짧아 L-tyrosine과의 반응물인 3-nitrotyrosine을 측정하여 간접적으로 생성 정도를 측정하는데 당뇨병환자와 당뇨병 동물모델에서 증가하는 소견을 보이고 있으며^{25,26)}, 또한 산화스트레스는 DNA에도 손상을 가져오는데 8-deoxyguanosine 등을 측정하여 알 수 있고 당뇨병에서도 증가한다고 알려져 있다²⁷⁾. 본 연구에서 NBT 환원과 lucigenin을 사용한 화학발광 분석법으로 superoxide 음이온의 생성량을 측정하였을 때 40주에서 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 의미 있게 증가하였고, nitrotyrosine과 DNA 산화물인 2-deoxyguanosine의 생성량도 대조군인 LETO 쥐에 비해 의미있게 증가되어 있었다.

최근 연구에서 혈관조직의 superoxide 음이온의 생성이 내피세포, 평활근세포, 외막 섬유아세포 (fibroblast)에서 생

성됨이 밝혀졌고^{28,29)}, Wang 등³⁰⁾은 쥐의 대동맥 조직을 lucigenin 화학 발광 분석법으로 측정하였을 때 superoxide 음이온의 생성량이 외막에서 가장 현저함을 보였고, 또한 NBT로 대동맥 조직을 염색하였을 때 중막에서는 염색이 감소된 소견과 외막에서 현저히 염색됨을 보고하였다. 본 연구에서 NBT를 이용하여 대동맥 환을 염색하였을 때 대조군인 LETO 쥐에 비해 OLETF 쥐의 중막에서 염색이 감소한 소견과, 외막에서 염색이 현저히 유의하게 증가된 결과를 보였다. 이러한 결과는 당뇨병 환경 하에서 혈관조직의 주된 superoxide 음이온의 생성 장소가 외막임을 암시하고 있다.

인슐린저항성 발생에는 표적세포 내 여러가지 작용과 관련하여 다양한 신호전달체계와 이런 신호전달체계들 사이의 복잡한 연관성이 관찰되고 있다.

인슐린 수용체 (IR)는 인슐린과 결합하면 내재성 tyrosine kinase의 활성도를 증가시켜 수용체의 인산화를 촉진시키고 이는 IRS-1, 2를 인산화시킨다³¹⁾. 인산화된 IRS는 PI3-K를 활성화시키고, 이는 serine/threonine kinase인 Akt/PKB와 GLUT-4를 차례로 활성화시켜, 인슐린의 세포내 작용이 일어나게 된다^{31,32)}. 현재까지 많은 연구에도 불구하고 인슐린 저항성을 일으키는 세포학적 기전은 잘 알려져 있지 않은데, IRS-1의 serine 인산화의 증가가 중요한 원인이라는 보고가 있다³³⁾.

인슐린의 신호전달체계에서 IR과 IRS의 tyrosine 인산화를 억제하여 인슐린저항성을 일으키는 기전이 몇 가지 알려져 있는데, 이 중 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)에 의한 IR과 IRS의 탈인산화 (dephosphorylation) 및 IRS의 serine 인산화의 증가가 중요한 기전으로 알려져 있다³⁴⁻³⁶⁾. 특히 IRS-1의 Ser612의 인산화는 IRS-1으로부터 PI3-K의 p85 subunit의 해리 (dissociation)를 일으켜 더 이상 하부로의 신호전달이 되지 못하도록 유도하고³⁷⁾, IRS-1의 Ser307은 IR로부터 해리를 일으켜 proteasome-dependent

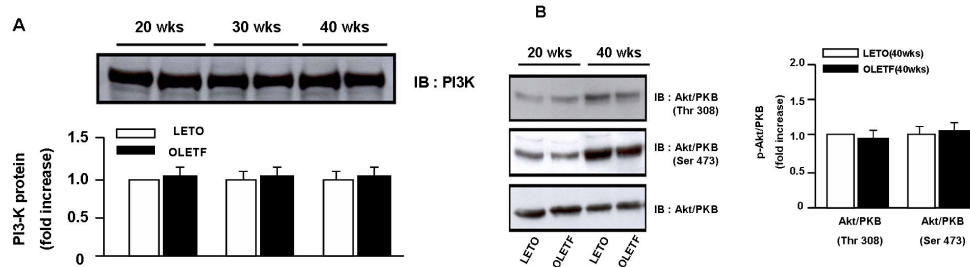


Fig. 8. PI3-K expression (A) and phosphorylation of Akt/PKB (B) on aortas of LETO and OLETF rats. Aortic tissues were lysed and immunoblotted with PI3-K, phospho-Ser473-Akt/PKB, or phospho-Thr308-Akt/PKB antibody. Bars represent mean \pm SEM of 4 experiments in each group.

degradation을 촉진함으로써 신호전달 장애를 야기하는 것으로 알려져 있다³⁸⁻⁴⁰⁾.

한편, 당뇨병에서 인슐린저항성으로 인해 말초조직으로의 포도당 수송이 감소함이 밝혀졌고, 여러 연구에서 혈관 내피세포, 평활근세포에서 고혈당의 정도와 비례해서 포도당 수송이 감소함을 보여 혈관조직이 인슐린에 민감하게 반응하는 장기임을 보고하였다^{41,42)}. 본 연구에서도 40주 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 LETO 쥐에 비해 2-deoxyglucose 섭취가 현저히 감소한 소견을 보여 주었다.

또한, 당뇨병환자에서 혈관합병증의 빈도가 증가되어 있으며, 이러한 합병증의 발생이 산화스트레스와 관련이 있음이 알려져 있고^{43,44)}, 여러 연구에서 산화스트레스가 심혈관 질환의 인슐린저항성에 관여할 것으로 보고하고 있는데⁴⁵⁾, 최근 Sprague-Dawley 쥐의 혈관 평활근을 이용한 배양실험에서 산화스트레스가 Akt 이전 단계에서 IR, IRS-1의 활성화 방해와 IRS-1의 발현 감소를 통해 인슐린저항성을 유발할 가능성을 보고하였으나¹⁷⁾, 정확한 기전에 대해서는 아직까지 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서 당뇨병 모델인 OLETF 쥐의 혈관조직에서 IR, PI3-K, Akt/PKB의 발현은 대조군과 비교해 차이가 없었고 Akt/PKB의 인산화에도 차이가 없었으나 IRS-1의 발현은 감소된 소견을 관찰할 수 있었는데, 이러한 결과는 OLETF 쥐의 혈관조직에서 인슐린저항성의 발생 원인이 IRS-1의 감소 때문임을 보여주는 것이다. 최근 연구에서 쥐의 흉부 대동맥 평활근세포를 angiotensin II로 자극시 산화스트레스가 증가하고, 증가된 산화스트레스가 IRS-1의 Ser307의 인산화 증가와 IRS-1의 감소의 원인임을 보고하였고, 또한 26S proteasome의 억제제인 lactacystin 등을 처리시 용량 의존적으로 IRS-1의 감소가 차단되는 결과를 보여주어 IRS-1의 감소의 원인이 proteasome을 통한 IRS-1의 degradation임을 보고하였다⁴⁶⁾. 본 연구에서 40주에 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 IRS-1의 발현이 대조군인 LETO 쥐에 비해 유의하게 감소되어 있었고 IRS-1의 tyrosine 인산화, Ser612의 인산화는 두 군 간에 차이가 없었으나 Ser307의 인산화가 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 현저히 증가되어 있었다. 이러한 결과는 혈관조직에서 Ser307의 인산화가 IRS-1의 감소의 원인임을 암시하는 것이다.

또한, 여러 연구에서 혈관 평활근에서 생성된 산화스트레스가 Src의 활성을 주로 자극하며 Src와 산화스트레스가 활성화 시키는 주된 효소가 PDK1 (phosphoinositide dependent kinase 1)이고, PDK1이 IRS-1과 Akt의 serine과 threonine을 인산화 시킴을 보고하였고⁴⁷⁻⁴⁹⁾, Taniyama 등⁴⁶⁾은 Src 억제제인 PP1로 전처리시와 PDK1 활성이 없는 Y9F-PDK1을 가진 평활근세포에서 IRS-1 Ser307의 인산화와 IRS-1 degradation의 감소를 보고하여 혈관조직에서 인슐린저항성에 Src, PDK1이 관여함을 제시하였으나 아직까

지 Src, PDK1, IRS-1 사이의 정확한 기전은 알려져 있지 않다.

결론적으로, 이상의 결과를 종합해 보면 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐의 혈관조직에서의 인슐린저항성은 산화스트레스로 인한 IRS-1의 Ser307 인산화의 증가로 인해 IRS-1의 proteasome-dependent degradation의 증가 때문일 것으로 생각되어 진다. 그러나 본 연구에서 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐의 혈관조직에서 산화스트레스의 증가와 IRS-1의 감소와의 관련성을 제시하였으나, N-acetylcysteine 등의 항산화제를 투여 했을때 산화스트레스의 감소와 IRS-1 degradation이 감소하는지의 여부를 관찰하지 않아 향후 산화스트레스와 IRS-1 degradation의 직접적인 연관성의 규명이 좀 더 필요할 것으로 생각되고, 또한 IRS-1의 감소가 proteasome을 통해 일어날 것으로 생각되나 proteasome 억제제의 투여가 IRS-1 degradation을 차단하는지 여부를 직접적으로 규명하지 않은 제한점이 있어 추후 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 당뇨병환자와 당뇨병 동물모델에서 산화스트레스가 증가하며 이러한 산화스트레스가 당뇨병에서 혈관합병증의 발생에 중요한 원인임이 밝혀지고 있고, 혈관조직의 인슐린저항성에 관여한다고 알려져 있다. 따라서, 본 연구에서는 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 산화스트레스가 혈관조직에서 인슐린저항성을 유도하는 기전을 알아보고자 하였다.

방법: OLETF 쥐 수컷 20주 5마리, 30주 5마리와 40주 5마리를 사용하였고, 대조군으로 LETO 쥐 수컷 20주 5마리, 30주 5마리와 40주 5마리를 사용하였고, 각 군의 대동맥을 적출하여 20주와 40주군의 superoxide 음이온, 8-OHdG, nitrotyrosine 생성량을 측정하였고, 각 군의 포도당 섭취량을 2-deoxyglucose 이용해 측정하였으며 20주, 30주, 40주군의 IR, IRS-1, PI3K, Akt/PKB의 발현 정도, Akt/PKB의 인산화와 IRS-1 Ser307의 인산화를 비교해 보았다.

결과: Superoxide 음이온과 8-OHdG, nitrotyrosine같은 산화스트레스의 표지자가 대조군에 비해 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 현저히 증가되어 있었고, NBT 염색을 했을때 OLETF 쥐의 대동맥 중막의 염색은 LETO 쥐에 비해 감소되어 있는 결과를 보였으나, 외막에서는 LETO 쥐에 비해 현저히 염색이 증가되어 있는 결과를 보였다. 또한 2-deoxyglucose의 섭취가 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 현저히 감소되어 있었으며 OLETF 쥐의 대동맥 조직에서 IR, PI3-K, Akt/PKB의 발현과 인산화에는 차이가 없었으나, IRS-1의 발현이 LETO에 비해 감소되어 있었고, IRS-1의 Ser307의 인산화가 증가되어 있는 결과를 보였다.

결론: 이상의 결과로 OLETF 쥐의 혈관조직에서 인슐린 저항성이 유발되는 기전은 산화스트레스로 인한 IRS-1의 Ser307을 인산화와 이로 인한 proteasome의 IRS-1의 degradation 증가 때문일 것으로 생각되어 진다.

참 고 문 헌

- Steiner C: *Diabetes and atherosclerosis. Diabetes 30(Suppl. 2):S1-7, 1981*
- The Diabetes Control and Complications Trial Resaerch Group: *The effect of intensive treatment of diabetes on the developmentand progression of long-term complication in insulin-dependent diabetes mellitus. N Eng J Med 329:977-86,1993*
- Nourooz-Zadeh J, Tauaddini-Surmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP: *Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. Diabetes 44:1054-8, 1995*
- Frustaci A, et al: *Myocardial cell death in human diabetes. Circ Res 87:1123-32, 2000*
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: *Hydroxy radical production and and autoxidative glycosylation: glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. Biochem J 256:205-12, 1988*
- Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautler JL, Stern D: *Cellular receptors for advanced glycation end products: implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. Arterioscle Thromb Vasc Biol 14:1521-8, 1994*
- Matsubara T, Ziff M: *Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. J Immunol 137:3295-8, 1986*
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: *Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Cir Res 74:1141-8, 1994*
- Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK: *Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. Hypertension 32:331-7, 1998*
- Sen CK, Packer L: *Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J 10:709-20, 1996*
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R: *Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. FEBS Lett 404:249-52, 1997*
- Maron BJ, Nishimura RA, McKenna WJ, Rakowski J, Josephson ME, Kieval RS: *Assessment of permanent dual-chamber pacing as a treatment for drug-refractory symptomatic patients with obstructive hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 99:2934-41, 1999*
- Westhuyzen J: *The oxidation hypothesis of atherosclerosis: An update. Ann Clin Lab Sci 27:1-10, 1997*
- Ginsberg HN: *Insulin resistance and cardiovascular disease. J Clin Invest 106:453-8, 2000*
- Freener EP, King GL: *Vascular dysfunction in diabetic mellitus. Lancet 350(Suppl 1):S19-13, 1997*
- Paolisso G, Giuglianoc D: *Oxidative stress and insulin action: Is there a relationship? Diabetologia 39:357-63, 1996*
- Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED: *Hydrogen peroxide inhibits insulin signaling in vascular smooth muscle cells. Exp Biol Med 228:836-42, 2003*
- Ohara Y, Peterson TX, Sayegh HS, Subramanian RR, Wilcox JN, Harrison DG: *Dietary correlation of hypercholesterolemia in the rabbit normalizes endothelial superoxide anion production. Circulation 92:898-903, 1995*
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: *Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest 91:2546-51, 1993*
- Pourcyrous M, Leffler CW, Bada HS, Korones SB, Busija DW: *Brain superoxide anion generation in asphyxiated piglets and the effect of indomethacin at therapeutic dose. Pediatr Res 34:366-69, 1993*
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D: *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. J Biol Chem 269:9889-97, 1994*
- Son SM, Whalin MK, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK: *Oxidative stress and diabetic vascular complications. Curr Diab Rep 4:247-52, 2004*
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species*

- production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes 49:1939-45, 2000*
24. Zou MH, Shi C, and Cohen RA: *High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with TP receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. Diabetes 51:198-203, 2002*
25. Tannous M, Rabini RA, Vignini A, Moretti N, Fumelli P, Zielinski B, Mazzanti L, and Mutus B: *Evidence for iNOS-dependent peroxynitrite production in diabetic platelets. Diabetologia 42:539-44, 1999*
26. Ceriello A, Quagliro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D: *Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. Diabetes 51:1076-82, 2002*
27. Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T: *Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. Lancet 347:444-5, 1996*
28. Kerr SM, Brosnan MJ, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA: *Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: the role of the endothelium. Hypertension 33:1353-8, 1999*
29. Miller FJ, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL: *Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. Circ Res 82:1298-305, 1998*
30. Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, Cohen RA: *Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. Circ Res 82:810-8, 1998*
31. Cheatham B, Kahn CR: *Insulin action and the insulin signaling network. Endocr Rev 16:117-42, 1995*
32. Chen R, Kim O, Yang J: *Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 276:31858-62, 2001*
33. Sykiotis GP, Papavassiliou AG: *Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1; a novel target for the reversal of insulin resistance. Mol Endocrinol 15:1864-9, 2001*
34. Ventre J, Doebber T, Wu M: *Targeted disruption of the tumor necrosis factor- α gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. Diabetes 46:1526-31, 1997*
35. Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA: *Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. J Biol Chem 278:8199-211, 2003*
36. Hirata AE, Alvarez-Rojas F, Carvalheira JB, Carvalho CR, Dolnikoff MS, Abdalla Saad MJ: *Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. Life Sci 73:1369-81, 2003*
37. De Fea K, Roth RA: *Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. Biochemistry 36:12939-47, 1997*
38. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF: *Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. J Biol Chem 277:1531-7, 2002*
39. Pederson TM, Kramer DL, Rondinone CM: *Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. Diabetes 50:24-31, 2001*
40. Greene MW, Sakaue H, Wang L, Alessi DR, Roth RA: *Modulation of insulin-stimulated degradation of human insulin receptor substrate-1 by Serine 312 phosphorylation. J Biol Chem 278:8199-211, 2003*
41. Kaiser N, Sasson S, Freener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, Davidheiser S, Przybylski RJ, King GL: *Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. Diabetes 42:80-9, 1993*
42. Banz WJ, Abel MA, Zemel MB: *Insulin regulation of vascular smooth muscle glucose transport in insulin-sensitive and resistant rats. Horm Metab Res 28:271-5, 1996*
43. Gjigliano D, Ceriello A, Paolisso G: *Oxidative stress and diabetic vascular complications. Diabetes Care 19:257-67, 1996*
44. Cai H, Harrison DG: *Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. Circ Res 87:840-4, 2000*
45. Ceriello A: *Oxidative stress and glycemic regulation. Metabolism 49:27-9, 2000*
46. Taniyama Y, Hitomi H, Shah A, Alexander W, Griending KK: *Mechanism of reactive oxygen*

- species-dependent downregulation of insulin receptor substrate-1 by angiotensin II. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25:1142-7, 2005*
47. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK: *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. Circ Res 91:406-13, 2002*
48. Taniyama Y, Weber DS, Rocic P, Hilenski L, Akers ML, Park J, Hemmings BA, Alexander RW, Griendling KK: *Pyk2- and Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK1 regulates focal adhesions. Mol Cell Biol 23:8019-29, 2003*
49. Tokor A and Newton AC: *Cellular signaling: pivoting around PDK-1. Cell 103:185-8, 2000*