

고농도 포도당에 노출된 INS-1 세포와 제2형 당뇨병환자에서 γ -glutamylcysteine Synthetase (γ -GCS) mRNA의 발현

영남대학교 의과대학 내과학교실

김재홍, 이찬희, 문준성, 윤지성, 원규장, 이형우

γ -glutamylcysteine Synthetase (γ -GCS) mRNA Expression in INS-1 Cells and Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Jae Hong Kim, Chan Hee Lee, Jun Sung Moon, Ji Sung Yoon, Kyu Chang Won, Hyung Woo Lee

Department of Internal Medicine, The Youngnam University of Korea

Abstract

Background: Hyperglycemia is a well-recognized pathogenic factor of long term complications in diabetes mellitus and hyperglycemia also generates reactive oxygen species (ROS) in β cells when ROS accumulate in excess for prolonged periods of time, they cause chronic oxidative stress and adverse effects. Unfortunately, the islet contacts low capacity of endogenous antioxidant effects. But, γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), the rate-limiting enzyme for glutathione synthesis, is well represented in islets.

Methods: This study is to evaluate the changes in the activity of γ -GCS, glutathione in β -cells exposed to high glucose, in pancreatic tissue of OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) and LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) rats, in leukocytes from patients with Korean type 2 DM (T2DM) and to disclose the effects of high blood glucose on this impairment in patients with T2DM. We divided our patients into 3 groups by HbA1c (controls: n = 20, well controls diabetes: n=24, poorly controlled diabetes: n = 36).

Results: We observed that decreased glutathione level, γ -GCS expression, glucose-stimulated (GSIS) and increased intracellular peroxide level in the INS-1 cells exposed to 30 mM glucose condition. Also decreased glutathione level at erythrocytes, γ -GCS expression at leukocytes and increased oxidized LDL, MDA (malondialdehyde) level at plasma from patients with T2DM compared to controls (esp, poorly controlled patients).

Conclusion: These results suggest that insufficient antioxidant defenses by the glutathione pathway may be one of the factors responsible for development of complications in T2DM. (J Kor Diabetes Assoc 31:302~309, 2007)

Key Words : γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) mRNA, glutathione (GSH), INS-1 Cells, Insulin secretion, Type 2 Diabetes Mellitus

서 론

당뇨병에서 만성적인 고혈당 상태는 여러 세포와 조직에 구조적, 기능적 독성 작용을 일으키는데 이를 포도당 독성 (glucose toxicity)이라고 하며, 이는 베타세포에도 나쁜 영향을 주어 베타세포 사멸과 함께 인슐린분비능을 감소시켜

이차적으로는 당뇨병의 진행을 가속화 시키게 되는 중요한 기전의 하나로 알려져 있다¹⁻³⁾. 알려진 기전으로는 포도당 자가산화, 당화작용에 의한 최종당화산물 형성, c-myc 유도과 PKC 활성화, glyceraldehyde-3-P, dihydroxyacetone phosphate 와 같은 반응성 해당 중간 산물의 증가, hexosamine 경로, 술비톨 형성 등이 있으며⁴⁻⁶⁾, 이 경로들은 공통적으로 포도

당 대사 과정에서 세포 내 반응성 산소기(ROS)의 생성을 증가시키게 된다. 장기간 과도하게 축적된 ROS는 특히 자체의 항산화 방어기전이 약한 췌장소도세포에 민감한 반응을 유발하여, 인슐린 유전자 발현에 필수적인 전사인자인 PDX-1과 MafA 등을 감소시키고⁷⁾, 따라서 인슐린 mRNA 발현저하 및 인슐린분비를 저하시킨다⁸⁾. 저자 등은 췌장소도세포를 고혈당에 장기간 노출 시 ROS생성이 증가하고 베타세포 부전을 야기함을 보고한 바 있다⁹⁾. 한편, γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS)는 다른 조직에 비해 췌장 소도에서 특이하게 감소되어 있는 항산화 효소들과는 다르게 췌장 소도에서도 잘 발현된다고 보고되고 있다¹⁾. 또한, glutathione (γ -glutamylcysteinyl glycine, GSH)은 직접적인 항산화작용 및 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소의 기질로 작용하여 세포내 ROS를 감소시키고 산화스트레스에 의한 내인성 세포반응의 중추적 역할을 한다¹⁰⁻¹²⁾. 따라서 GSH 감소나 제2형 당뇨병환자의 적혈구에서 측정된 환원된 oxidized glutathione의 비(GSH/GSSG)가 감소되는 것이 당뇨병 상태의 악화와 상호연관이 있으며 임상적으로 중요하다¹³⁻¹⁵⁾. 이에 저자 등은 고혈당에 노출된 INS-1 세포, OLETF 쥐 및 제2형 당뇨병환자에서 γ -GCS의 발현과 GSH, 산화 스트레스 표지자 등을 알아보기 위해 본 연구를 시행하였다.

대상, 재료 및 방법

1. INS-1 세포 배양

INS-1 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% 우태아 혈청, 11.1 mM 포도당, 10 mM HEPES, pH 7.4, 10.2 mM L-glutamine, 50 mM sodium pyruvate, 2.5 mM β -mercaptoethanol, streptomycin (0.1 mg/mL), penicillin (100 U/mL)을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 전 배양하였고, 2~3일마다 β -mercaptoethanol을 신선한 상태로 첨가하여 배양액을 교체하였다. 세포는 5~7일마다 trypsin-EDTA를 이용하여 계대 배양하고, passage 21~29를 사용하였다. 각각의 실험 조건을 위해 배지 내의 포도당 농도를 조절하였다.

전배양한 INS-1 세포주를 각각 5.6 mM, 30 mM의 포도당에서 72시간 배양한 후 세포 내 peroxide 수치 및 포도당 자극에 의한 인슐린분비능(GSIS, glucose stimulated insulin secretion)을 측정하였다.

2. 포도당 자극에 의한 인슐린분비능(GSIS, Glucose Stimulated Insulin Secretion)

각각의 실험 환경에서 배양한 세포를 12-well plate에 각 well당 2.5×10^5 개로 분주한 후 Krebs-Ringer buffer (118.5 mM NaCl, 2.54 mM CaCl₂, 1.19 mM KHP₂O₄,

4.74 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.19 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 0.1% BSA, pH 7.4)에서 30분간 배양하고 두 차례 세척한 후, 포도당 농도를 4 mM과 16.7 mM로 높인 KRB 용액에서 2시간 배양하여 rat insulin ELISA kit (Mercodia, Sweden)로 측정하였다.

3. Flow Cytometer에 의한 세포 내 Peroxide치 측정

세포 내 peroxide는 oxidant-sensitive fluorescein-labeled dye인 carboxy-H₂DCFDA (Molecular Probe, Oregon)를 이용하여 flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson)로 측정하였다. 측정하고자 하는 세포들은 5 mM carboxy-H₂DCFDA로 30분간 배양하여 사용하였다. 또한, 각각의 세포에서 측정된 peroxide fluorescence intensity를 수치로 정량화하였다.

4. 실험동물

실험동물로는 제2형 당뇨병 동물모델인 생후 30주된 수컷 Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐와 비당뇨병 대조군으로 생후 30주된 수컷 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐를 사용하였다. 실험동물들은 한국 오츠카 제약회사의 도움으로 생후 4주에 분양을 받았다. 실험기간 동안 일정한 온도($23 \pm 2^\circ\text{C}$)와 일정한 습도($55 \pm 5\%$) 조건에서 사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 생후 30주 후 수컷 OLETF 쥐의 혈당을 측정하여 당뇨병 상태를 확인 후 대조군인 생후 30주된 수컷 LETO 쥐와 함께 실험을 위해 각각 5마리의 췌장 조직을 제거하였다. 경구당부하검사 결과에 최고 혈당치가 16.7 mM 이상이고 식후 120분 혈당치가 11.1 mM 이상인 경우 당뇨병으로 정의하였다¹⁶⁾.

5. γ -GCS 발현을 보기 위한 Real Time RT-PCR

RNA 추출을 위해 모아둔 세포 및 환자의 백혈구를 700 μL TRI-reagent로 용해시켰다. 용해시킨 용액을 200 μL 의 chloroform을 넣고 15 초간 세게 흔들어줬다. RNA 용액을 실온에서 5분간 반응시킨 뒤, 4°C, 13,200 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상청액을 조심스레 새로운 tube로 옮긴 뒤, isopropanol을 같은 부피로 넣고 RNA를 침전시켰다. 10분간 상온에서 반응시킨 후, 4°C, 13,200 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전물은 차가운 75% ethanol 1 mL을 넣고 세척한 뒤 4°C, 13,200 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상청액을 완전히 제거하고 실온에서 RNA를 건조시킨 후, 남은 RNA를 RNA분해효소가 제거된 DEPC 처리된 멸균수 30 μL 에 녹여 -70°C 에서 보관하였다. RNA 농도는 Nano-drop을 이용하여 260 및 280 nm 파장에서 측정하였다. 분리한 RNA 1 μg 을 70°C에서 5분 반응시킨 뒤, M-MuLV Reverse Transcriptase와 dNTP, oligo (dT) primer를 넣어(First Strand

Table 1. Real-time PCR primer sequence

		Sequence	Tm	Extension time
β -actin	F	5'-tac tgc cct ggc tcc tag ca-3'	60°C	, 4 sec
	R	5'-tgg aca gtg agg cca gga tag-3'		
Insulin	F	5'-ata gac cat cag caa gca gg-3'	55°C	14 sec
	R	5'-ctc cag ttg tgg cac ttg cg-3'		
PDX-1	F	5'-ggc tta acc taa acg cca ca-3'	55°C	10 sec
	R	5'-ggg acc gct caa gtt tgt aa-3'		
MafA	F	5'-gac atc tcc cca tac gaa gtg-3'	60°C	16 sec
	R	5'-ccg cta cta cgt ttc tta tct-3'		
Gamma-GCS	F	5'-gaa ggg gga aag gac aaa c-3'	60°C	12 sec
	R	5'-aga tga gca aca tgc tgg-3'		

cDNA Synthesis Kit, Fermentas) 37°C에서 60분, 70°C에서 10분 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 그리고 FastStart Taq DNA polymerase와 3 mM MgCl₂, (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I, Roche), 0.4 μ M primer (Table 1)를 가지고 LightCycler 1.5 Instrument에서 합성하였다.

6. GSH, Malondialdehyde (MDA)와 Oxidized LDL (ox-LDL)의 측정

GSH 측정을 위하여 당뇨병환자 및 대조군의 혈액은 EDTA에 채취한 후 원심분리하여 백혈구층(white buffy layer)을 제거하고, HPLC-grade water에서 적혈구를 용해시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 각 조건에서 배양된 INS-1 세포는 1,500 \times g로 10분간 원심분리한 후 cold buffer로 분해하고 다시 10,000 \times g로 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며, OLETF 쥐와 LETO 쥐의 췌장조직은 분리 전 PBS를 관류시킨 후 cold buffer로 분해하고 이후 상기와 같은 과정을 거쳐 상층액을 취하였다. GSH 측정은 Glutathione Assay Kit (Cayman Chemical Co., MI)를 이용하였으며, 각 샘플은 phosphoric acid로 단백질을 제거한 후 405 nm에서 5-thio-2-nitrobenzoic acid 흡광도를 5분 간격으로 6회 측정하였다. 단백질 보정을 위해 Bradford protein assay (Sigma, St. Louis, MO) 법을 이용하여 595 nm 파장에서 단백질을 양을 측정하였다.

Malondialdehyde (MDA)는 lipid peroxidation assay kit (Calbiochem-Novabiochem, San Diego)를 이용하여 colorimetric method로 측정하였다. 우선 환자 및 대조군의 혈액을 EDTA 튜브에 채취하고 원심분리하여 상층액을 취한 다음 kit에 포함된 R1 시약(0.65 mL 10.3 mM N-methyl-2-phenyl-indole in acetonitrile)을 첨가하여 섞은 후 37% HCl 150 μ L을 넣어 잘 섞어 45°C에서 60분간 배양 후 식힌 다음 586 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈중 oxidized LDL은 Mercodia Oxidized LDL ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 측정하였는데 이는 두 종류의 oxidized apolipoprotein B 단클론성 항

체를 사용한 샌드위치 면역측정방법 원리를 이용한 것이다.

7. 대상군

20명의 건강 대조군과 60명의 제2형 당뇨병환자를 대상으로 하였고, 당뇨병환자군은 당화혈색소 수치에 따라 7% 미만으로 조절이 잘되는 군(n = 24)과 7% 이상으로 조절이 잘 되지 않는 군(n = 36)으로 나누어, 혈중 GSH, ox-LDL, MDA 등을 측정하였다. 당뇨병환자 중 말기 신부전환자 및 대혈관 합병증 등이 있는 군은 제외하였다.

8. 통계적 분석

실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며 통계분석은 Window용 SPSS 11.0 프로그램(SPSS Inc., Chicago, Illinois)을 사용하였다. 대조군과 실험군 사이 비교는 one-way ANOVA와 Student t-test를 사용하였으며 통계적인 유의 수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 포도당 농도가 INS-1 세포 내 Peroxide의 Fluorescence Intensity 및 GSIS에 미치는 영향

72시간 배양한 INS-1 세포주에서 세포 내 peroxide 수치는 5.6 mM 포도당과 30 mM의 포도당에 노출된 경우 각각 2.3과 4.5로 30 mM의 포도당 배지에서 유의하게 높았으며, GSIS는 30 mM 포도당 농도에 노출된 경우 유의한 감소를 보였다(P < 0.05, Fig. 1A). 또한, 30 mM 포도당 배지에서 PDX-1, Maf-A, insulin mRNA 등의 intensity는 각각 35.7, 30.2, 12.3으로 5.6 mM의 포도당에 노출된 경우의 intensity인 75, 43.2, 25.7보다 유의하게 낮았다(P < 0.05, Fig. 1B).

2. 포도당 농도가 INS-1 세포의 γ -GCS mRNA와 GSH 수치에 미치는 영향

INS-1 세포주가 5.6 mM과 30 mM의 포도당에 각각 72시간 노출된 경우 5.6 mM의 포도당에서는 γ -GCS mRNA

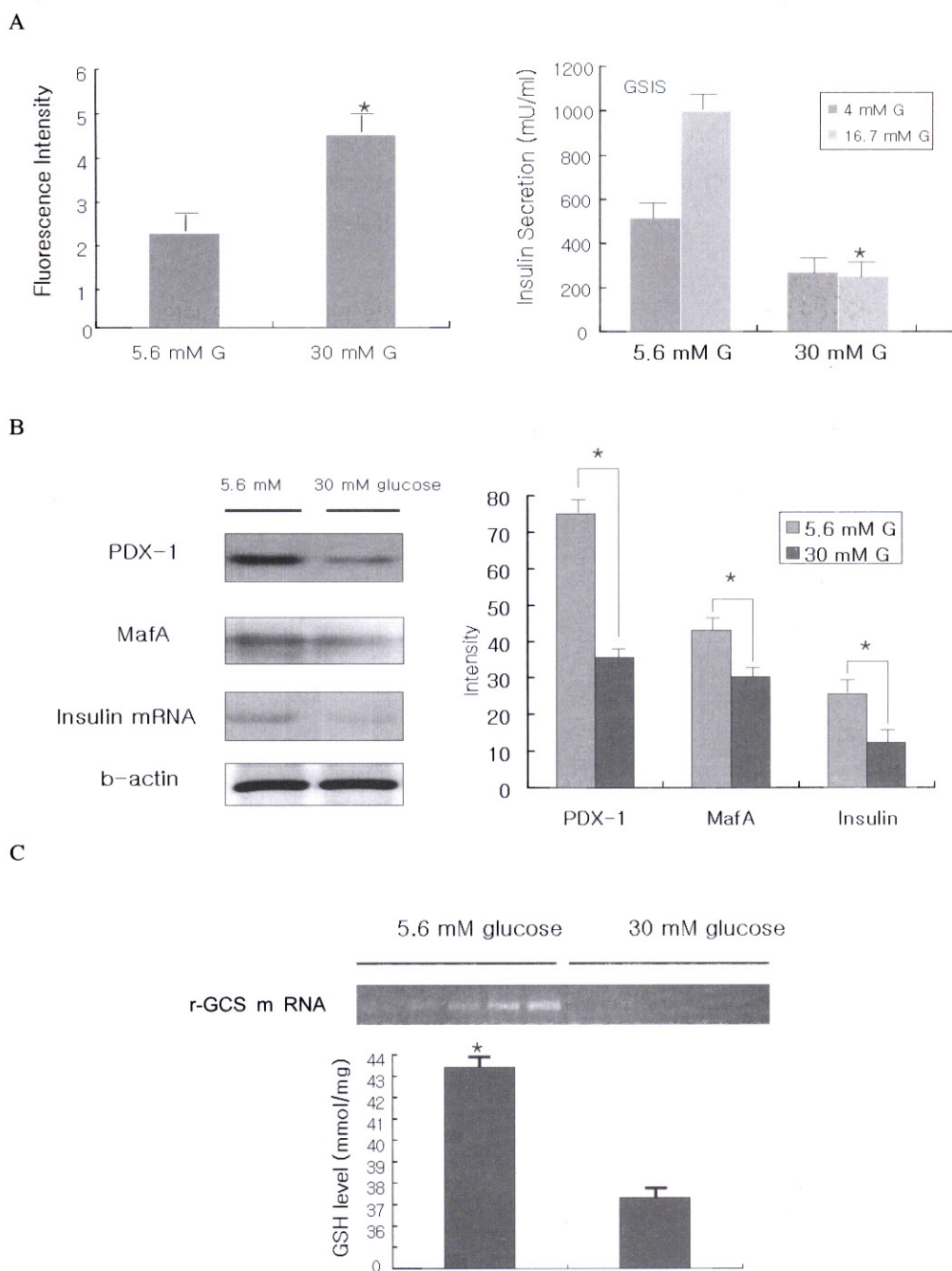


Fig. 1. The effects of high glucose on the intracellular peroxide level, PDX-1, MafA, insulin mRNA and glucose stimulated insulin secretion (GSIS) in the INS-1 cells. A, INS-1 cells incubated for 72 hours at 30 mM glucose increased levels of intracellular peroxides compared with the 5.6 mM glucose ($P < 0.05$). And, INS-1 cells incubated at 30 mM glucose decreased GSIS compared with the 5.6 mM glucose. * $P < 0.05$ vs. 5.6 mM glucose; B, INS-1 cells incubated for 72 hours at 30 mM glucose decreased PDX-1, MafA, insulin mRNA compared with the 5.6 mM glucose. * $P < 0.05$; C, INS-1 cells incubated for 72 hours at 30 mM glucose decreased the expression of γ -GCS mRNA and GSH level compared with the 5.6 mM glucose in INS-1 cell ($P < 0.05$). * $P < 0.05$ vs. 30 mM glucose. Data are mean \pm SE from 3 separate experiments.

가 검출되었으나, 30 mM의 포도당에서는 발현되지 않았고, GSH 농도도 5.6 mM 포도당에서 43.4 μ mol/mg 비해 30 mM 포도당에서 37.5 μ mol/mg으로 유의한 감소를 보였다 ($P < 0.05$, Fig. 1C).

3. OLETF 쥐와 LETO 쥐의 췌장조직에서 GSH

각각 5마리의 췌장조직에서 GSH 치는 LETO 쥐의 0.375 μ mol/mg에 비해 OLETF 쥐에서 0.325 μ mol/mg으로 유의

Table 2. Main characteristics of the subjects

	Controls (n = 20)	Diabetics (n = 24)
Age (yr)	55 ± 6	54 ± 8
Female/male	12/8	33/27
BMI (kg/m ²)	22.7 ± 1.2	23.5 ± 0.9
Duration of diabetes (yrs)	-	11.7 ± 1.3
FPG (mg/dL)	86 ± 11	177 ± 45*
HbA _{1c} (%)	5.4 ± 0.4	7.7 ± 1.6*
LDL Cholesterol (mg/dL)	113.5 ± 27.9	119.5 ± 23.6
TG (mg/dL)	140.5 ± 37.4	156.7 ± 45.3
Creatinine (mmol/L)	65.3 ± 2.1	85.2 ± 4.4*

* HbA_{1c} < 7%; ** HbA_{1c} 7%; # P < 0.05 vs Controls.

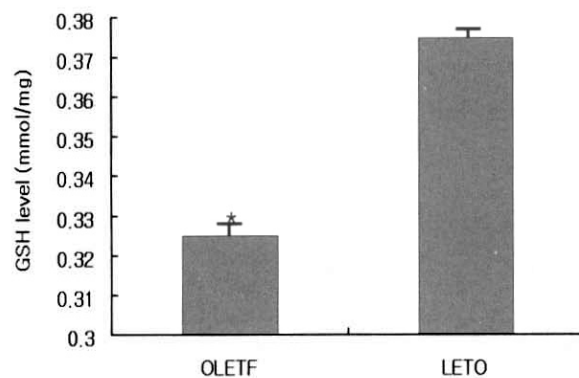


Fig. 2. GSH level at pancreatic tissues in OLETF (n = 5) and LETO rats (n = 5). GSH level at pancreatic tissues in OLETF rats was significantly decreased compared with LETO rats. * P < 0.05 vs. LETO rats.

하게 적었다 (P < 0.05, Fig. 2).

4. 대상군의 특성

대조군과 당뇨병환자군의 나이는 각각 55 ± 6세와 54 ± 8세, 체질량지수(Body mass index, BMI)는 각각 22.7 ± 1.2 kg/m²과 23.5 ± 0.9 kg/m², LDL 콜레스테롤 수치는 각각 113.5 ± 27.9 mg/dL와 119.5 ± 23.6 mg/dL로 두 군 간의 차이는 없었다. 당뇨병환자군에서 평균 당뇨병 이환기간은 11.7년이었고 평균 당화 혈색소는 7.7 ± 1.6%이었다 (Table 2).

5. 대조군과 제2형 당뇨병환자에서 γ-GCS mRNA 발현 및 GSH

당뇨병군은 대조군에 비해 백혈구 γ-GCS mRNA 발현이 감소되어 있고, 적혈구 GSH치도 당뇨병환자군에서 6.71 ± 1.97 μmol/mg과 대조군에서 9.14 ± 0.02 μmol/mg으로 당뇨병환자군에서 유의하게 낮았다 (P < 0.05, Fig. 3). 당뇨병환자군을 혈당조절 정도에 따라 나누어 비교해 보았을 때, 혈당조절이 불량한 당뇨병환자군과 대조군의 GSH치는 각

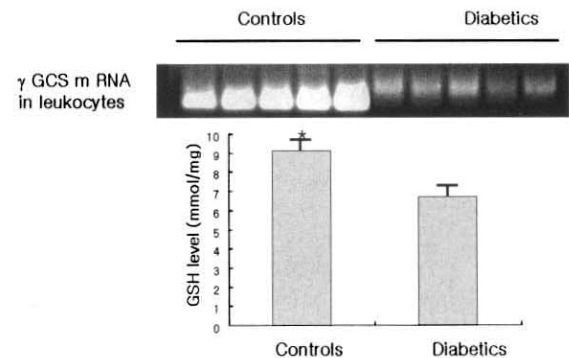


Fig. 3. Expression of γ-GCS mRNA in leukocytes and GSH level in erythrocytes from patients with T2DM. Expression of γ-GCS mRNA in leukocytes and GSH level in erythrocytes from patients with T2DM (n = 60) were significantly decreased compared with controls (n = 20). * P < 0.05 vs. Diabetics.

각 6.41 ± 0.01 μmol/mg과 9.14 ± 0.02 μmol/mg으로 당뇨병환자군에서 대조군에 비해 유의하게 낮았으며, 혈당조절이 불량한 당뇨병환자군의 혈장 ox-LDL치와 MDA치는 각각 6.29 ± 0.03 mU/L, 121.62 ± 7.23 μmol/L로 대조군에 비해 유의하게 높았다 (P < 0.05, Table 3, Fig. 4).

고 찰

고혈당 상황에서는 ROS가 증가하게 되고³⁾ 특히 자체의 항산화 방어기전이 약한 췌장소도세포에 상당히 민감한 반응을 유발하여 PDX-1 mRNA의 processing 이 억제되면서 인슐린 유전자 발현과 포도당 유발성 인슐린분비가 감소하게 된다⁴⁾. 저자들의 연구에서도 INS-1 세포를 고농도의 포도당에 노출시킨 경우 세포 내 ROS 생성이 유의하게 증가하였고, 증가된 ROS로 인해 포도당 유발성 인슐린분비 기능이 현저히 감소됨을 보고한 바 있다⁹⁾. 한편 과다 생성된 H₂O₂에 대한 2가지 주된 방어기전은 catalase와 glutathione peroxidase (GPx)에 의한 것으로, GPx의 작용에는 GSH가

Table 3. GSH level, ox LDL and MDA of the subjects

	Controls (n = 20)	Well-Controlled Diabetics* (n = 24)	Poorly Controlled Diabetics** (n = 36)
Age (yr)	55 \pm 6	53 \pm 8	57 \pm 10
Female/male	12/8	13/11	20/16
FPG (mg/dL)	86 \pm 11	127 \pm 45 [#]	207 \pm 90 [#]
HbA _{1c} (%)	5.4 \pm 0.4	6.3 \pm 0.6 [#]	9.7 \pm 2.2 [#]
GSH (mmol/mg)	9.14 \pm 0.02	7.24 \pm 0.03	6.41 \pm 0.01 [#]
Ox-LDL (mU/L)	5.04 \pm 0.08	5.95 \pm 0.11	6.29 \pm 0.03 [#]
MDA (mmol/L)	111.61 \pm 5.71	118.90 \pm 6.71	121.62 \pm 7.23 [#]

* HbA_{1c} < 7%; ** HbA_{1c} 7%; # P < 0.05 vs Controls.

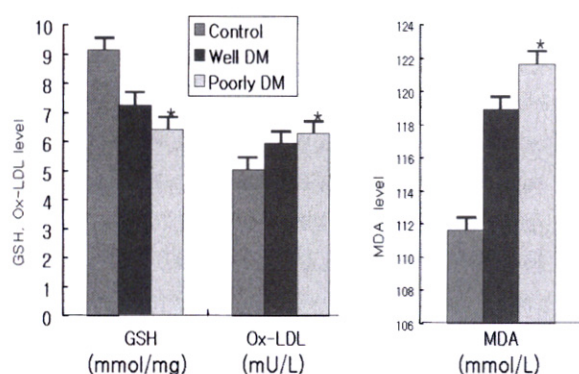


Fig. 4. GSH, ox LDL and MDA of the subjects (controls: n = 20, well controlled diabetics: n = 24, poorly controlled diabetics: n=36). GSH was significantly decreased and ox LDL and MDA levels were significantly increased compared with controls. * P < 0.05 vs. Controls.

필요하다. GSH는 세포 내 자유산화기를 제거하고 hydrogen peroxide를 감소시킴으로써 산화스트레스를 예방하도록 한다. GSH는 ATP 의존성 효소인 γ -GCS와 glutathione synthetase에 의해 glutamate, cysteine, glycine으로부터 합성되며, γ -GCS는 GSH합성의 속도조절효소이다¹⁷⁾. 산화 스트레스 상황에서 GSH는 GPx에 의해 glutathione disulphide (GSSG)로 산화되고 GSSG는 NADPH와 함께 glutathione reductase에 의해 GSH로 환원된다. 따라서 GSH는 산화환원 반응성 전사인자의 활성화 조절, 특정 유전자의 전사, 세포증식 및 apoptosis 조절 등의 여러 생화학적 기능에 중요하다¹⁸⁻²⁰⁾.

한편, 여러 연구들에서 고혈당에 의해 γ -GCS가 감소한다는 것을 보고해왔는데, Tanaka 등은⁸⁾ HIT-T15 세포와 백서 소도세포에서 buthionine sulfoximine으로 γ -GCS를 억제하여 췌장소도 내 GSH를 감소시키면 ROS의 증가와 함께 인슐린 mRNA 및 인슐린분비가 저하되었고, GPx를 과발현시키면 고혈당 유발성 ROS 증가에 의한 베타세포 기능부전을 예방할 수 있었다고 하였다. 또한, γ -GCS는 다른 조직에 비해 췌장 소도에서 특이하게 감소되어 있는 항산화 효소들과는 다르게 췌장 소도에서도 잘 발현된다고 보고되고 있다¹⁾.

본 연구에서도 INS-1 세포를 고농도 포도당에 노출 시 peroxide의 증가와 함께 γ -GCS 발현과 GSH 수치가 감소하고, 포도당 유발성 인슐린분비가 감소함을 보여 주었다. 반면 Tran 등²⁰⁾은 소도세포에서 IL-1 β 를 노출 시 p38 MAPK와 NF κ B 활성화를 통해 glutamylcysteine ligase (GCL) 발현 및 GSH의 증가를 유발하는 동시에 세포 내 ROS 생성을 증가시켜 베타세포기능에 긍정적 작용과 부정적 작용을 동시에 나타내는데, GCL의 과발현으로 IL-1 β 에 의한 ROS 생성 및 GSIS 감소효과를 충분히 억제하지 못함을 보고하였고, Urata 등은²²⁾ 사이토카인에 의한 γ -GCS 발현증가는 고혈당에 노출 시 억제됨을 보고하여, 모든 당뇨병의 병태생리에 있어서 만성적 고혈당과 국소적 사이토카인 생성의 영향이 γ -GCS와 관련되어 지속적인 베타세포 파괴에 기여한다는 것을 시사한다.

GSH는 실제 당뇨병환자의 적혈구, 혈장, 백혈구, 혈소판에 결핍되어 있으며²³⁻²⁵⁾, Yoshida 등은¹⁵⁾ 당뇨병환자의 적혈구에서 GSH수치가 대조군의 77%라고 보고하였다. 본 연구에서도 췌장 조직에서의 GSH 농도는 LETO 쥐에 비해 OLETF 쥐에서 현저히 감소되어 있었다. 또한, 당뇨병환자에서 비당뇨병환자에 비해 백혈구 γ -GCS mRNA 발현이 감소되어 있고, GSH 농도가 낮게 측정되었다. 혈당조절이 불량한 당뇨병환자에서 GSH가 유의하게 낮았으며, lipid peroxidation의 중요한 표지자로서²⁶⁾ 산화스트레스에 의한 동맥경화증의 진행과 관련이 있는 MDA^{27,28)} 및 ox LDL²⁹⁻³¹⁾은 의미 있게 높아 GSH 감소가 당뇨병 상태의 악화와 상호연관이 있으며 임상적으로 중요할 것으로 보인다. Mesangial 세포와 망막 Muller 세포 등 다른 세포들에서도 장기간의 고혈당에 의해 γ -GCS 발현이 감소하고 GSH 수치가 감소됨이 보고되었고^{32,33)}, 쥐의 내피세포를 22 mM 포도당에 7일간 배양 시 정상포도당군에 비해 GSH 수치가 59% 감소하였고²²⁾, 인간혈관평활근세포(HVSMC)를 27.5 mM 포도당에 10일간 배양 시 20% 감소하였다³⁴⁾는 여러 연구도 발표되고 있다.

이상의 결과에서 고농도 포도당에 노출된 INS-1 세포에서 γ -GCS mRNA 발현 감소로 GSH수치가 감소하였고 당뇨병 쥐인 OLETF 쥐의 췌장 조직에서도 GSH치가 감소하

였으며, 제2형 당뇨병환자의 백혈구 γ -GCS mRNA 발현과 적혈구 GSH수치가 감소하였다. 본 연구는 제2형 당뇨병환자에서 직접적으로 췌장 조직이나 췌도 세포에서의 γ -GCS mRNA 발현과 GSH수치를 보지 못한 제한점이 있으나, 이와 같은 GSH 경로에 의한 항산화 방어기전의 약화가 제2형 당뇨병환자에서 산화 스트레스에 의한 베타세포기능 부전 및 당뇨병성 혈관 합병증의 발생을 이해하는 데 중요하며, 향후 γ -GCS 조절을 통한 세포내 GSH의 조절이 당뇨병환자에서 산화스트레스에 의한 이차적인 베타세포의 파괴 및 합병증을 예방할 수 있는 치료방침을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 고혈당은 당뇨병 만성 합병증의 잘 알려진 원인이다. 또한, 고농도 포도당에 노출된 췌장 소도에서는 포도당 대사과정에서 reactive oxygen species (ROS)를 증가시키고, 이 과정에서 glutathione이나 항산화 효소가 작용하여 산화 스트레스를 막는다고 알려져 있다. 이러한 glutathione은 산화 물질의 scavenger로 작용하며, 당뇨병환자에서는 세포 내 glutathione이 감소한다는 보고도 있다.

방법: 고농도 포도당(30 mM 포도당, 3~7일)에 노출된 INS-1 cell 과 정상대조군 20명 제2형 당뇨병환자 60명을 대상으로 항산화 조절기능을 알아보기 위해 glutathione 합성을 조절하는 γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS)의 mRNA 발현, glutathione, 산화 스트레스 표지자인 malondialdehyde (MDA) 등을 측정하였다.

결과: 30 mM 포도당 배지의 INS-1 cell에서 5.6 mM 포도당 배지와 비교해서 intracellular peroxide level은 유의하게 증가하였고, PDX-1, MafA, insulin mRNA 및 GSIS 등은 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$). 30 mM 포도당 배지에서 INS-1 cell의 γ -GCS 발현과 glutathione은 5.6 mM포도당 배지와 비교해서 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$). LETO 쥐와 비교 하였을 때 OLETF 쥐의 췌장 조직에서 GSH 치는 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$). 제2형 당뇨병환자의 백혈구에서 γ -GCS발현과 적혈구의 glutathione은 정상인과 비교해서 유의하게 감소하였으며, MDA는 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). 또한 제2형 당뇨병환자에서 혈당 조절이 안 될수록 혈청 GSH는 유의하게 감소 하였으며, 산화 스트레스 표지자인 ox LDL과 MDA 등은 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$).

결론: 이상의 결과에서 고농도 포도당에서 INS-1 cell 및 제2형 당뇨병환자에서 glutathione 감소는 γ -GCS의 mRNA 발현 저하로 발생한다고 생각되며, 당뇨병환자에서는 이러한 glutathione 합성의 감소로 인한 결과로 산화스트레스가 증가되리라 생각된다.

참 고 문 헌

- 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
- Rossetti L, Giaccari A, De Fronzo RA: Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13:610-30, 1990
- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF: Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90:320-5, 1992
- 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
- Robertson RP, Olson LK, Zhang HJ: Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes* 43:1085-9, 1994
- Poitout V, Olson LK, Robertson RP: Chronic Exposure of β TC-6 Cells to Supraphysiologic Concentrations of Glucose Decreases Binding of the RIPE3b1 Insulin Gene Transcription Activator. *J Clin Invest* 97:1041-6, 1996
- Harmon JS, Stein R, Robertson RO: Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J Biol Chem* 280:11107-13, 2005
- Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP: A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12363-8, 2002
- 윤지성, 원규장, 이형우: 고농도 포도당에 노출된 INS-1 세포와 백서 췌도 세포에서 포도당 산화 및 reactive oxygen species(ROS) 생성. *당뇨병* 30:246-53, 2006
- Griffith OW, Mulcahy RT: The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73:209-67, 1999
- Hayes JD, McLellan LI: Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31:273-300, 1999

12. Adams JD Jr, Lauterburg BH, Mitchell JR: *Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. J Pharmacol Exp Ther* 227:749-54, 1983
13. Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y: *Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus. Metabolism* 38:753-8, 1989
14. Sharma A, Kharb S, Chugh SN, Kakkar R, Singh GP: *Evaluation of oxidative stress before and after control of glycemia and after vitamin E supplementation in diabetic patients. Metabolism* 49:160-2, 2000
15. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T: *Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. Diabetologia* 38:201-10, 1995
16. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications, OLETF strain. Diabetes* 42:1422-8, 1992
17. Richman PG, Meister A: *Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. J Biol Chem* 250:1422-6, 1975
18. Sen CK, Packer L: *Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J* 10:709-20, 1996
19. Ginn-Pease ME, Whisler RL: *Optimal NF kappa B mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent on intracellular glutathione and costimulatory signals. Biochem Biophys Res Commun* 226:695-702, 1996
20. Arrigo AP: *Gene expression and the thiol redox state. Free Radic Biol Med* 27:936-44, 1999
21. Tran PO, Parker SM, LeRoy E, Franklin CC, Kavanagh TJ, Zhang T, Zhou H, Vliet P, Oseid E, Harmon JS, Robertson RP: *Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. J Biol Chem* 279:53988-93, 2004
22. Urata Y, Yamamoto H, Goto S, Tsushima H, Akazawa S, Yamashita S, Nagataki S, Kondo T: *Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells. J Biol Chem* 271:15146-52, 1996
23. Seltzer HS: *Blood glutathione in mild diabetes mellitus before treatment and during sulfonylurea-induced hypoglycemia. Proc Soc Exp Biol Med.* 95(1): 74-6, 1957
24. Chari SN, Nath N, Rathi AB: *Glutathione and its redox system in diabetic polymorphonuclear leukocytes. Am J Med Sci* 287:14-5, 1984
25. Thomas G, Skrinska V, Lucas FV, Schumacher OP: *Platelet glutathione and thromboxane synthesis in diabetes. Diabetes* 34:951-4, 1985
26. Raharjo S, Sofos JN, Schmitt GR: *Solid phase acid extraction improves thiobarbituric acid methods to determine lipid oxidation. J Food Sci* 58:921-32, 1993
27. Belch JJ, Mackay IR, Hill A, Jening SP: *Oxidative stress is present in atherosclerotic peripheral arterial disease and further increased by diabetes mellitus. Int-Angiol* 14:385, 1995
28. Eander RC: *Tocopherol influences in vivo induce of lipid peroxidation in post menopausal woman given fish oil. J Nutr* 126:643-52, 1996
29. Goldstein JL, Brown MS: *Molecular medicine: the cholesterol quartet. Science* 292:1310-2, 2001
30. Mertens A, Holvoet P: *Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. FASEB J* 15:2073-84, 2001
31. Ross R: *Cell biology of atherosclerosis. Annu Rev Physiol* 57:791-804, 1995
32. Lu SC, Bao Y, Huang ZZ, Sarthy VP, Kannan R: *Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression in retinal Muller cells by oxidative stress. Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1776-82, 1999
33. Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER: *Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. Kidney Int* 61:599-608, 2002
34. Tachi Y, Okuda Y, Bannai C, Okamura N, Bannai S, Yamashita K: *High concentration of glucose causes impairment of the function of the glutathione redox cycle in human vascular smooth muscle cells. FEBS Lett* 421:19-22, 1998