

당지질 독성에 의한 베타세포 기능장애에 대하여 PPAR- γ -coactivator-1 (PGC-1) 억제를 통한 AICAR의 개선 효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실¹, 의학연구소²

권혁상¹, 김지원², 박현석², 고승현¹, 차봉연¹, 손호영¹, 윤건호^{1,2}

AICAR Reversed the Glucolipotoxicity Induced β -cell Dysfunction through Suppression of PPAR- γ -coactivator-1 (PGC-1) Overexpression

Hyuk-Sang Kwon¹, Ji-Won Kim², Heon-Seok Park², Seung-Hyun Ko¹, Bong-Yun Cha¹, Ho-Young Son¹, Kun-Ho Yoon^{1,2}

Department of Internal Medicine¹, Catholic Research Institutes of Medical Science², The Catholic University of Korea

Abstract

Background: Glucolipotoxicity plays an important role in the progression of type 2 diabetes mellitus via inducing insulin secretory dysfunction. Expression of insulin gene in pancreatic beta cell might be regulated by AMP-activated protein kinase (AMPK), which is recognized as a key molecule of energy metabolism. We studied the effects of AMPK on glucolipotoxicity-induced β -cell dysfunction by suppression of PPAR- γ -coactivator-1 (PGC-1) *in vitro* and *in vivo*.

Method: Glucolipotoxicity was induced by 33.3 mM glucose and 0.6 mM (palmitate and oleate) for 3 days in isolated rat islets. Messenger RNA (mRNA) expressions of β -cell specific gene like insulin, BETA2/NeuroD and PGC-1 induced by glucolipotoxic condition and their changes with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-ribofuranoside (AICAR) treatment were investigated using RT-PCR. We also examined glucose stimulated insulin secretion in same conditions. Furthermore, SD rats were submitted to a 90% partial pancreatectomy (Px) and randomized into two groups; Ad-GFP-infected Px rats (n = 3) and Ad-siPGC-1-infected Px rats (n = 3). Then, the Px rats were infected with Ad-GFP or Ad-siPGC-1 (1×10^9 pfu) via celiac artery. After 12 days of viral infection, we measured body weight and performed the intraperitoneal glucose tolerance test (IP-GTT).

Results: Glucolipotoxicity resulted in blunting of glucose-stimulated insulin secretion, which was recovered by the AICAR treatment *in vitro*. Suppression in their expressions of insulin and BETA2/NeuroD gene by glucolipotoxic condition were improved with AICAR treatment. However, PGC-1 α expression was gradually increased by glucolipotoxicity, and suppressed by AICAR treatment. Overexpression of PGC-1 using an adenoviral vector in freshly isolated rat islets suppressed insulin gene expression. We also confirmed the function of PGC-1 using an Ad-siPGC-1 *in vivo*. Direct infection of Ad-siPGC-1 in 90% pancreatectomized rats significantly improved glucose tolerance and increased body weight.

Conclusion: AMPK could protect against glucolipotoxicity induced β -cell dysfunction and the suppression of PGC-1 gene expression might involved in the insulin regulatory mechanism by AMPK. (J Kor Diabetes Assoc 31:310~318, 2007)

Key Words: AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-ribofuranoside), AMP-activated protein Kinase (AMPK), Pancreatectomy, PPAR- γ -coactivator-1 (PGC-1)

접수일자: 2006년 10월 2일, 통과일자: 2007년 7월 3일, 책임저자: 윤건호, 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실

* 본 논문은 2004년 대한당뇨병학회 세르비에연구비 수혜에 의해 수행되었습니다.

서 론

최근 제2형 당뇨병의 급증화 추세는 비만인구의 증가와 더불어 전 세계적인 사회문제로 대두되고 있는데 우리나라의 경우도 현재의 증가추세라면 2030년경에는 전체 당뇨병 환자수가 약 722만명(전 국민의 14.37%)으로 늘어날 것이라고 추정한 바 있다¹⁾. 제2형 당뇨병의 병인을 설명하는 가설로 최근에 제시되는 개념인 당지질독성(glucolipotoxicity)이 있는데 이는 정상 포도당 농도 하에서 세포 내 유리지방산이 증가하면 지질산화과정을 통하여 즉시 이용되므로 세포 기능 이상을 초래하지 않지만 포도당과 유리지방산이 동시에 증가된 상황에서는 세포 내에서 이들 두 영양소의 처리가 동시에 저하됨으로 각 세포의 기능부전 및 세포 사멸이 유발된다는 것이다²⁾. 이러한 과정에는 포도당 대사과정에서 생성된 malonyl-CoA와 지질산화과정의 중간산물인 fatty acyl CoA가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 따라서 당지질 독성조건 하에서의 체도를 배양할 경우 제2형 당뇨병의 병인과 유사한 체도 손상을 유발시키므로 이러한 시험관내 제2형 당뇨병모델을 이용하여 당지질독성에 의해 유발된 에너지 대사 이상을 정상화함으로써 당뇨병을 치료하는 새로운 시도가 이루어지고 있다³⁾.

AMPK-activated protein kinase (AMPK)는 multimeric serine/threonine protein kinase에 속하며 주로 세포 내의 AMP/ATP 비율이 높을 때와 세포 내 에너지 이용률이 낮을 때 인산화되면서 활성화되는 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 이러한 AMPK는 ATP 생성경로와 소비경로를 조절하면서 세포 내의 에너지 항상성을 유지시키는데 핵심적인 역할을 한다⁸⁾. 지금까지 보고된 바에 따르면 췌장 내 베타세포에서의 AMPK 활성화는 다른 조직들과는 조금 다르게 조절된다. 즉 간, 근육, 그리고 지방조직과는 달리 췌장 베타세포에서의 AMPK 활성화도는 대개 5.5 mmol/L 포도당 농도에서 정상치를 유지하며⁹⁻¹¹⁾ 포도당 농도가 그 이상으로 증가할 경우 빠르게 감소한다¹²⁾. 한편 낮은 포도당농도에 의해 증가된 AMPK 활성화는 MIN6 세포와 췌도^{10,11)} 뿐만 아니라 INS1⁹⁾ 세포에서 포도당에 의한 인슐린분비를 억제하지만 AMPK의 dominant-negative form은 낮은 포도당 농도에서 인슐린분비를 증가시킨다. 또한 AMPK의 활성화제인 5-aminoimidazole-4-carboxy-amide-1-D-ribofuranoside (AICAR)를 생체 외에서 급성으로 처리하거나, ZDF rat에 AICAR를 만성적으로 투여하면 인슐린분비작용 능력을 가지는 베타세포의 양이 보존된다고 보고되었다¹³⁾. 그러나 Diraison 등¹⁴⁾은 AMPK의 활성화제인 AICAR에 의하여 인슐린분비가 감소된다고 보고하기도 하였지만 아마도 이는 단기간 노출로 인한 현상으로 생각되며 만성적인 당지질독성 조건에서의 AICAR의 역할은 이와 다를 것으로 생각된다.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-

γ coactivator-1 (PGC-1)은 미토콘드리아의 생합성과 호흡에 관여하는 다양한 전사조절인자의 활성을 촉진시키며 지방산 대사에 있어서도 중요한 역할을 한다. 또한 지방과 근육에서 열 생산과 미토콘드리아의 산화조절 및 간에서의 당 신생과정에도 관여하는 것으로 알려져 있어 비만 및 당뇨병 등의 대사질환 분야에서 PGC-1에 대한 많은 연구가 이루어져왔다¹⁵⁾. 한편 당뇨병 모델에서 췌장 베타세포 내 PGC-1의 발현이 증가된다고 알려져 있으나¹⁶⁾ PGC-1의 기능 및 신호전달 체계에 대해서는 아직까지 구체적으로 알려진 바가 없다.

따라서 본 저자들은 AMPK 활성화제인 AICAR가 당지질 독성 조건하에서의 베타세포 기능장애를 회복시키는지의 여부와 이러한 AICAR의 회복기전에 PGC-1이 관여하는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 췌장적출술

무게가 180~200 g되는 수컷 흰쥐를 ketamin (염산 케타민, 유한양행)과 rumpun (럼폰, 바이엘)를 사용하여 마취한 뒤 췌장의 1~2 mm 정도만을 남기고 나머지 췌장을 모두 제거하는 방법인 부분적(90%) 췌장적출술(Px)을 수행하였다^{17,18)}.

췌장적출술 후 celiac artery에 26게이지 바늘을 이용하여 Ad-GFP 혹은 Ad-siPGC-1 각각 1×10^9 pfu를 300 μ L의 양으로 주입시키는 방법으로 감염시켰고 12일간 혈당을 측정하였다. 감염시킨지 12일 후에 복강 내 당부하검사를 실시하고, 몸무게를 측정하였다.

2. 복강 내 당부하검사

10일째 생리식염수와 AICAR를 주입하고 16시간이 지난 후에 0시간의 혈당을 측정하고 20% 포도당용액을 2 kg/kg body wt으로 계산하여 복강 내에 주입한 뒤 30, 60, 90, 120 분 때의 혈당을 측정하였다. 또한 포도당 곡선하 면적(area under the glucose curve, AUCg)를 계산하였다. 혈당측정은 Beckman glucose analyzer (Roche, Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다.

3. RNA 분리와 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

각각의 조건에서 배양된 췌도 또는 MIN 세포에서 총 RNA를 분리하기 위하여 Trizol 용액을 이용하였다. 각 시기의 시료들에서 분리한 RNA 2 μ g을 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer, dNTP Mix (10 mM each)와 혼합하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 얼음에서 식힌다. 여기에 5 \times strand buffer, 100 mM dithiothreitol (DTT), RNase OUT™ (40 units/ μ L), 그리고 SuperScript™ II RT (200 units; 이상 모두 Invitrogen, Carlsbad, CA)를 차례로 넣어 잘 섞은 후 42°C에서 1시간 동안 반응시켰으며 역전사 효소를 불활성화하기 위하여 7

Table 1. Primer sequences for RT-PCR or real-time PCR amplification

	Primers	Sequences	Annealing Temp. (°C)
Insulin	Forward	5'-TCCTGCCCTGCTGGCCCTGCT-3'	55.5
	Reverse	5'-CTAGTTGCAGTAGTTCTCCAG-3'	
BETA2/NeuroD	Forward	5'-CTCCGGGGTTATGAGATCGTCAC-3'	55.5
	Reverse	5'-GCCTTCATGCGCCTTAATTT-3'	
PGC-1	Forward	5'-GGAGCCGTGACCACTGACA-3'	55
	Reverse	5'-TGGTTTGCTGCATGGTTCTG-3'	
GAPDH	Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	55
	Reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

0°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 본 연구를 위한 PCR sequence는 Table 1과 같다. *Perfect PreMix* (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan)를 사용하여 PCR를 수행하고 반응물의 일부를 agarose gel에서 전기영동하여 반응 산물의 위치를 확인한 뒤 밝기 정도를 densitometer VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 측정하였다.

4. Real-Time PCR

cDNA 합성은 앞에서의 RT-PCT 방법과 동일하게 하였다. PCR 반응은 PCR 화합물에 1 × SYBR Green dye (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 추가하였고, 산물은 MyiQ Single color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, California)로 측정하고 cycle values (Ct) 값을 얻었다.

5. SD rat을 이용한 췌도 분리 (Islet Isolation)

250 g의 수컷 쥐를 마취한 뒤 절개부위를 소독하고 복강을 연 후 십이지장 쪽을 들어 올려 췌관의 주행을 확인한 후 duodenal opening 부위를 찾아 silk suture로 묶는다. 간 (liver) 방향에서 췌관의 시작부위를 박리시킨 후 칼집을 내어 PE50 tube를 삽입하고, collagenase P (1 mg/mL) 7 mL를 채운 주사기와 연결한 뒤 이를 천천히 주입한다. 췌장이 잘 부풀면 십이지장쪽부터 박리하여 50 mL tube에 넣고 37°C에서 25분간 digestion한 후에 10% FBS가 포함되어 있는 차가운 M199 media를 첨가한 뒤 20회 정도 hand shaking한다. 그 후 500 µm mesh에 이를 통과시키고 원심 분리한 뒤 상층액을 완전히 제거하고 histopaque 1077을 넣어 pellet과 완전히 섞은 후에 M199 media를 넣은 후 원심분리한다. 이렇게 해서 얻어진 중간층의 세포를 추출해서 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 media에 넣고 배양하였다.

6. 당-, 지질-, 당지질독성 유도를 위한 조건

포도당 독성은 10% FBS가 포함된 DMEM에 600 mg/dL

포도당에서, 지방독성은 0.2 mM의 oleate와 0.4 mM palmitate를 1:2로 혼합하여 처리하여 3일 동안 배양하는 방법으로 유도하였다.

7. 통계적 검정

각각의 실험은 3회 이상 반복하였고 실험결과는 평균 ± 표준편차(mean ± SD)로 표시하였다. 통계적인 유의성 검정은 one way ANOVA 및 unpaired Student's t-test를 이용하였으며 유의성은 $P < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 포도당 자극에 의한 인슐린분비에 AICAR의 영향

흰쥐에서 분리한 췌도를 저농도의 포도당에서 배양하였을 때 포도당 자극에 의한 인슐린분비는 증가하는 정상적인 인슐린분비를 보였으나 당-지질독성 조건에서는 포도당-자극에 의한 인슐린분비능이 감소되었다. 하지만 당-지질독성 조건에서 3일동안 AICAR를 처리한 췌도에서의 포도당 자극에 의한 인슐린분비는 다시 증가하였다(Fig. 1)

2. 인슐린 발현에 AICAR가 미치는 영향

저농도의 포도당에서 배양한 췌도에서의 인슐린유전자의 발현은 순차적으로 증가하였으나 당-지질독성에 노출 시 점차적으로 감소하였고 AICAR를 처리하였을 때 인슐린유전자의 발현이 증가함을 보였다(Fig. 2).

3. 베타세포 특이인자들의 발현에 AICAR가 미치는 영향

흰쥐의 췌도에서 당-지질독성에 의해 감소된 인슐린과 BETA2/NeuroD 유전자의 발현이 AICAR 처리에 의해 증가하였으나, PGC-1 유전자의 발현은 당-지질독성에서 증가하고 AICAR 처리 시에는 감소하였다. 따라서 PGC-1 유전자의 발현은 인슐린 및 BETA2/NeuroD 유전자 발현양상과는 상반됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

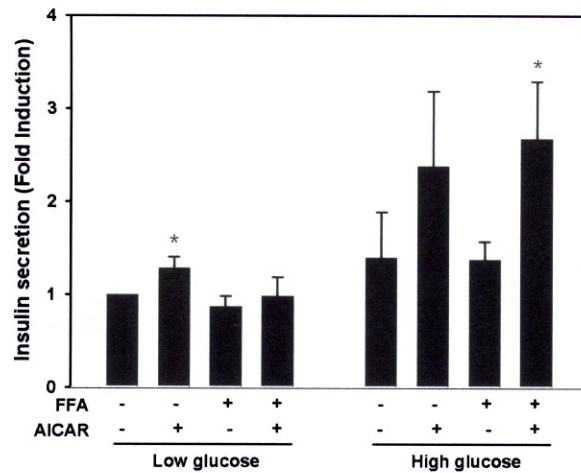


Fig. 1. Change of insulin secretion by glucolipotoxicity and chronic AICAR treatment. Islets were isolated and subsequently cultured at the indicated glucolipotoxicity with or without AICAR treatment, prior to assay of insulin secretion. After incubation with each condition for 3 days, Cultured islets were washed in KRB washing buffer and incubated in KRB buffer containing 5.5 mM glucose for 1 h. And then, islets were stimulated for 1 h in KRB buffer containing 17.7 mM glucose. Results are expressed as means S.D. for five independent experiments (* $P < 0.05$).

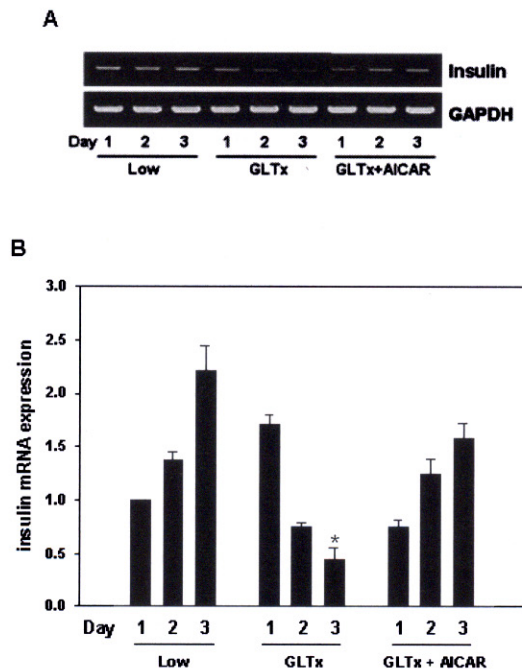


Fig. 2. Change of insulin gene expression by glucolipotoxicity and chronic AICAR treatment. A, islets were incubated with or without 0.6 mM FFA (a mixture of palmitate and oleate) in the presence of a high concentration of glucose (33.3 mM) for 3 days. Induction of glucolipotoxicity was confirmed by measuring insulin mRNA level using RT-PCR; B, The bar graphs show quantification of the results of PCR of rat islet extracts. Insulin gene expression was suppressed in a time-dependent manner and was notably increased by AICAR treatment at 3 day. Results are expressed as means S.D. for five independent experiments (* $P < 0.05$).

4. PGC-1의 과발현에 AICAR의 영향

아데노 바이러스를 이용하여 PGC-1를 과발현시킨 후

이를 PGC-1 유전자 발현으로 확인하였으며, AICAR를 처리한 후 인슐린유전자의 발현양상을 관찰한 결과 AICAR에 의한 인슐린유전자의 발현양상에는 변화가 없었다

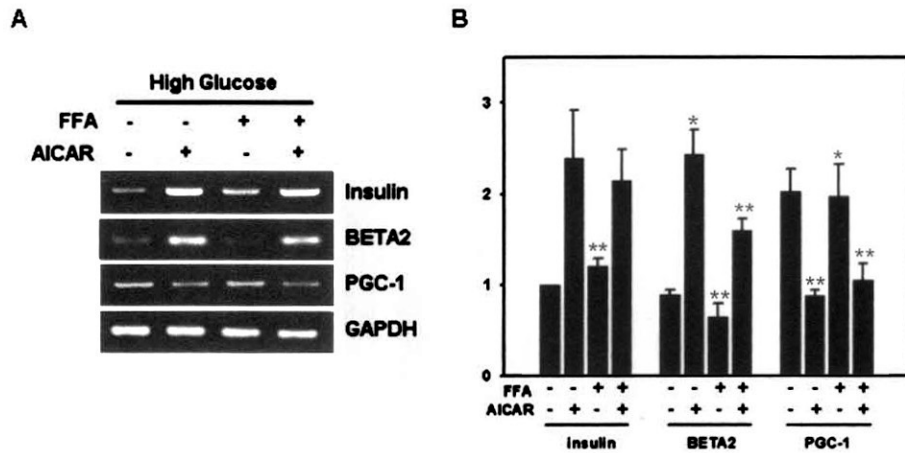


Fig. 3. Expressions of beta-cell specific gene by glucolipotoxicity and chronic AICAR treatment. A, rat islets were cultured in suspension for three days in 5 mM or 33.3 mM glucose and 0.6 mM FFA or in the presence of 400 μ M AICAR. Insulin, BETA2 and PGC-1 were estimated by semi-quantitative RT-PCR; B, The bar graphs show quantification of the results of PCR of rat islet extracts. Expression of glucose-induced insulin and BETA2 genes were repressed by glucolipotoxicity but rescued by AICAR treatment. However, PGC-1 The mRNA levels of these genes were normalized to GAPDH mRNA, and the RT-PCR data from the three independent experiments were summarized as means standard errors relative to those of untreated islets (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

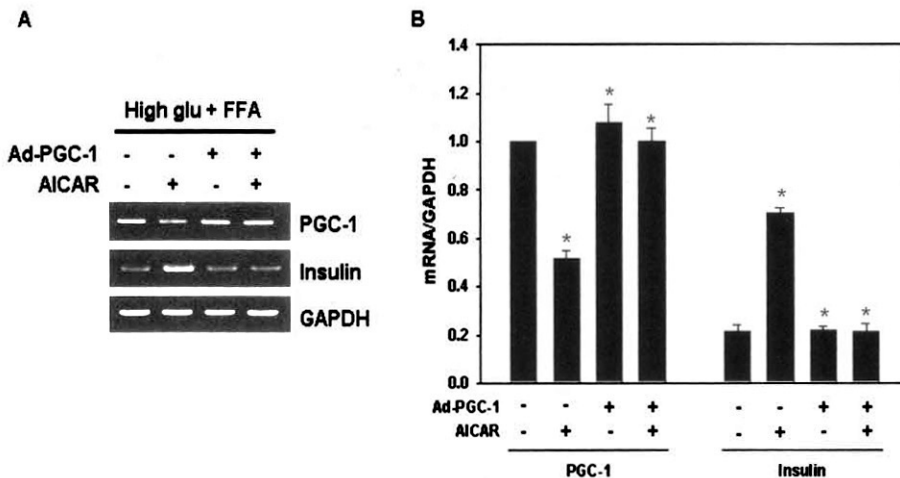


Fig. 4. Adenovirus-mediated expression of PGC-1 reduces expression of the insulin gene. A, After infection with the indicated adenovirus at 100 MOI and culture for 24 h at 11 mM glucose, isolated rat islets were infected with PGC-1-expressing adenovirus. After infection with the indicated adenovirus 100 MOI for 2 h, islets were cultured at low or high glucose levels with or without FFA, and/or AICAR treatment for 72 h. Overexpression of PGC-1 induced by the glucolipotoxic condition was clearly suppressed by AICAR co-treatment and the expression of the insulin gene was normalized. In contrast, overexpression of PGC-1 induced by the adenoviral vector was not suppressed by AICAR treatment. Results are expressed as means S.D. for five independent experiments (* $P < 0.05$).

(Fig. 4).

5. Ad-siPGC-1 처리에 의한 혈당 및 체중의 변화

90% 부분적 췌장적출술 후 celiac artery를 통해 Ad-GFP 또는 Ad-siPGC-1를 주입하고 12일동안 혈당을 측정한다 결과 Ad-siPGC-1군에서 6일째부터 유의하게 혈당이 감소하였다(data not shown). 바이러스를 주입한지 12일째에 몸무

게를 측정한다 결과 Ad-siPGC-1을 주입한 군에서 유의하게 증가하였다(Fig. 5A). Area under the curve of glucose (AUCg)를 서로 비교한 결과 복강 내 당부하 검사결과와 유사하게 Ad-GFP 주입군의 AUCg가 Ad-siPGC-1 주입군에 비해 감소되었다(Fig. 5B). 90% 부분적 췌장적출술에 Ad-GFP 주입군에서는 PGC-1의 발현이 보여지나(Fig. 5C), Ad-siPGC-1 주입군에서는 PGC-1 발현이 억제되었다(Fig. 5D).

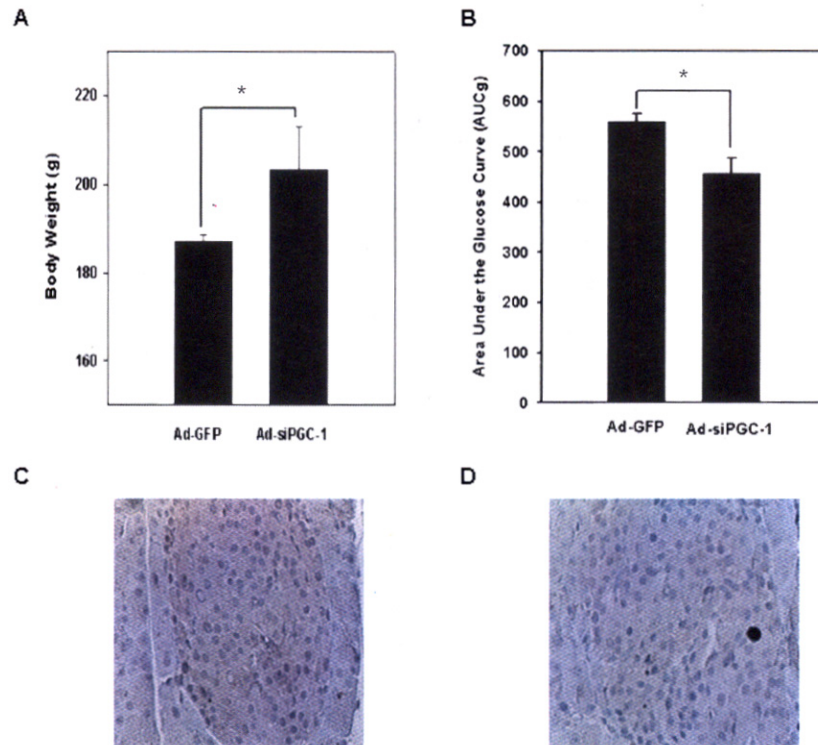


Fig. 5. Body weight and blood glucose change during the 12-day study period. Hyperglycemic Px rats were infected with a celiac artery of Ad-GFP or Ad-siPGC-1 (1×10^9 pfu/ 300 μ L, $n = 3$) for 12 days. The morning nonfasting glucose values of the Ad-siPGC-1 group were significantly lower than those of the Ad-GFP group 6 days after Ad-siPGC-1 infection. A, Body weight did not differ between Ad-GFP and Ad-siPGC-1-infected Px rats; B, IPGTT was performed using a 20% glucose solution and a dose rate of 2 g/kg. The mean AUCg was elevated in the AICAR-treated Px rats. Data are expressed as means S.D., $n = 6$ (* $P < 0.05$). (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); C and D, PGC-1 was expressed in islets of pancreas tissue of Ad-GFP-infected (C) Px rat but PGC-1 was remarkably decreased in islet of Ad-siPGC-1-infected Px rat (D). (400X).

고 찰

지금까지 췌장에서의 에너지 대사 이상으로 발생하는 포도당-지방독성에 의한 베타세포의 기전연구는 췌장 베타세포의 특이적인 성격으로 인해 시험관 내에서 배양 및 독성에 대한 반응을 관찰하는 것이 쉽지 않았다. 하지만 최근에 다른 조직 즉, 간과 근육에서 전반적인 에너지 대사 불균형에 의한 연구가 많이 보도되고 췌장에서의 신호전달에 관한 연구가 활발해지면서 췌장 베타세포의 기능회복 및 기전에 관한 연구가 활발히 진행되는 가운데 본 연구자는 이를 유도하는 인자를 찾고자 하였다.

AMP-activated protein Kinase (AMPK)는 세포의 영양상태나 스트레스 등에 의해 변화된 세포내의 에너지상태를 감지하는 "fuel gauge"로써 ATP/AMP ratio에 반응하는 인산화 효소로 알려져 있고⁷⁾, 당뇨병 치료제로 사용되는 Metformin의 경우, AMPK의 upstream signaling에 영향을 줌으로써, AMPK의 활성화증가를 유발한다¹⁹⁾. 또한 포도당-지방독성을

유발하는 에너지 대사의 변화로 인해 Malonyl-CoA가 증가하는데 이를 AMPK가 활성화되면서 Malonyl-CoA가 감소하므로 포도당-지방 독성으로 인한 에너지 대사를 정상으로 돌리는데 AMPK가 중요한 역할을 할 것이라 사료되었다. 또한 보고된 논문에 의하면 췌장 베타세포사멸은 AMPK에 의해 유도되고, JNK와 Caspase-3 경로를 통한 AMPK에 의해 유도된다고 알려져 있으나 이는 모두 정상 베타세포에서의 기능이다²⁰⁾.

본 연구에서 베타세포의 기능적인 면을 확인하기 위하여 당-지질독성 조건에서 포도당 자극에 의한 인슐린분비를 확인한 결과 당-지질독성에 의해 감소한 인슐린의 분비가 AMPK의 활성화제인 AICAR 처리에 의해 회복되었고 유전자 수준에서 당-지질독성에 의해 감소한 인슐린과 BETA2/NeuroD 유전자의 발현이 AICAR에 의해 증가됨을 확인하였다. 따라서 AICAR는 당-지질독성에 의한 베타세포의 기능 저하 및 베타세포 특이적인 유전자들의 발현이 회복됨을 확인하였다. 또한 재조합 아데노바이러스에 의한 PGC-1의 과발현과 저해를 통하여 PGC-1이 AMPK가 인슐린을 조절

하는데 중요한 매개자 역할을 하였다.

보고된 바에 의하면 transgenic KKAY-CETP²¹⁾, db/db, 그리고 ob/ob mice²²⁾와 같은 인슐린저항성을 가진 동물모델에 AICAR를 투여함으로써 간에서의 포도당 생성의 감소와 근육에서의 포도당 섭취 강화를 통해 내당능이 개선되었다²³⁾. 이 모델에 AICAR를 장기 투여함으로써 의미있게 내당능을 향상시켰고 포도당 자극에 대한 인슐린의 분비를 유지시켰다. 또한 혈중 지질의 농도를 측정했을 때 AICAR 투여한 군에서 유리지방산, 중성지방과 콜레스테롤이 생리식염수를 투여한 군과 대조군에 비해 모두 높게 측정되고, 고밀도지단백 콜레스테롤이 낮게 측정되었다. 이러한 결과는 췌장뿐 아니라 지질 대사에 관련되는 다른 장기들에 대한 AMPK의 효과를 간접적으로 반영하는 것이라고 생각된다 (data not shown). 더구나 지질대사 이상이 정상혈당을 유지시킨 대조군에 비하여도 좋은 효과를 보였기 때문에, AMPK가 혈당개선 이외에 지질독성을 개선시킬 수 있는 좋은 치료목표가 될 것으로 예상된다. 앞의 결과와는 달리 AICAR를 급성으로 처리했을 때 인슐린의 분비와 인슐린유전자 발현에 상반되는 결과를 보이는데 이것은 세포의 환경이 당뇨병을 유도하는 조건으로 진행될 때 이를 조절하는 다른 인자들이 매개가 되어 나타나는 결과라 여겨진다.

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ coactivator-1 (PGC-1)는 PPAR γ ²⁴⁾, GR²⁵⁾, RXR α ²⁶⁾, ER²⁷⁾의 보조 활성인자로 알려지고 있다. PGC-1은 에너지 항상성, 체온 조절, 당대사에 관련된 여러 가지 생리적인 반응들에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 streptozotocin-induced mice나 ob/ob mice와 같은 인슐린이 결여되어 있는 동물모델들을 통한 연구에서 PGC-1 유전자의 발현이 증가하였다²⁸⁾.

본 연구에서는 당-지질독성 조건에서의 PGC-1 유전자의 발현 증가를 확인하고, 부분적 췌장 절제술로 유발한 당뇨 쥐 모델에 Ad-siPGC-1에 의한 PGC-1의 발현을 저해시키는 방법으로 PGC-1의 기능을 확인하고자 하였다. PGC-1 유전자의 발현은 인슐린유전자의 발현양상과 상반되게 나타났다. 당-지질독성 및 Ad-PGC-1에 의한 과발현에 의해 PGC-1의 발현은 증가하였고 AICAR 처리에 인슐린의 발현은 차이를 보이지 않았다. 따라서 PGC-1은 AMPK의 아래에서 인슐린유전자를 조절하는데 주요인자로 작용함을 알 수 있다. PGC-1은 당뇨쥐 모델에서 발현이 증가한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 부분적 췌장절제술을 이용한 당뇨쥐 모델에서 증가된 PGC-1의 발현을 Ad-siPGC-1을 주입하여 저해시키고 혈당 및 체중 등을 확인하였다. 부분적 췌장절제술에 의해 증가한 혈당은 대조군에 비해 Ad-siPGC-1 주입군에서 유의한 혈당 감소와 체중 증가를 보였다.

결론적으로 AMPK는 세포 내의 당 대사를 조절할 뿐 아니라 AMPK의 활성화가 당-지질독성에 의해 발현이 저하

된 인슐린과 BETA2/NeuroD와 같은 베타세포의 특이적인 유전자들의 발현을 유지시킴으로 베타세포의 기능장애를 극복하는데 영향을 줄 것이라고 생각된다. 또한 PGC-1 유전자 발현양상은 AMPK가 인슐린을 조절을 조절하는데 핵심 역할을 하면서 in vitro뿐만 아니라 in vivo에서도 베타세포의 기능을 회복하는데 PGC-1의 발현억제가 필요함을 확인할 수 있었다.

최종적으로 당-지질독성 상태에서 췌장에 대한 AMPK 활성화 및 PGC-1 발현 억제에 관여하는 정확한 기전연구는 혈당개선 효과 및 당뇨병 원인기전을 밝히고 베타세포의 기능강화 세포를 개발하는데 계속되어야 할 것이다.

요 약

연구배경: 당지질독성은 제2형 당뇨병의 주요 병인인 인슐린분비기능이상을 유발하는 요인으로써 당뇨병의 병인을 연구하는데 중요한 역할을 한다. AMPK는 췌장 내 베타세포 내에서의 에너지 대사과정의 중요한 조절인자로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 당지질독성에서의 AMPK의 역할과 이를 조절하는데 PGC-1이 관여하는지 알아보려고 하였다.

방법: 당지질독성은 쥐에서 분리해낸 췌도세포를 33.3 mM의 포도당과 0.6 mM 지방산에 3일간 배양하여 유도하였고, 여기에 AMPK 활성제인 AICAR를 처리하여 베타세포 특이적 인자들인 인슐린, BETA2/NeuroD, PGC-1의 발현양상과 포도당 자극에 의한 인슐린분비를 측정하였다. 또한 흰쥐에 부분적(90%) 췌장적출술을 수행하고 celiac artery에 Ad-GFP 또는 Ad-siPGC-1을 주입한 지 12일 후에 복강 내 당부하검사 및 체중을 측정하였다.

결과: 당지질독성에 의한 인슐린분비의 감소는 AICAR 처리 3일째에 정상상태의 인슐린분비량으로 개선되었다. 또한 당지질독성조건에서 감소되었던 인슐린, BETA2/NeuroD 유전자들의 발현이 AICAR 처리에 의해 개선되었으며, PGC-1의 발현은 이와 상반된 결과를 보였다. 한편 당지질독성 조건하에서는 PGC-1의 발현이 증가하였으며, 부분적 췌장적출술을 시행한 당뇨쥐에 Ad-siPGC-1을 주입하여 내당능 및 체중의 변화를 살펴본 결과 혈당이 개선되었고, 체중이 증가함을 확인하였다.

고찰: AICAR는 포도당지방독성에 의해 유도되는 베타세포의 기능장애를 막을 수 있는 중요한 인자로 생각되며, PGC-1의 발현 억제가 AMPK가 인슐린을 조절하는데 중요한 매개자로 작용할 가능성이 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 2005 당뇨병기초통계연구 TFT (대한당뇨병학회, 건강

보험심사평가원) 자료

2. Roche E, Maestre I, Martin F, Fuentes E, Casero J, Reig JA, Soria B: *Nutrient toxicity in pancreatic beta-cell dysfunction. J Physiol Biochem* 56(2):119-28, 2000
3. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R: *Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. Diabetes* 51(Suppl 3):S405-13, 2002
4. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky K: *Role of apoptosis in failure of β -cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetes fatty rat. Diabetes* 47:358-64, 1998
5. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG: *Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. Diabetes* 50:1771-7, 2001
6. Rutter GA, da SilvaXavier G, Leclerc I: *Roles of 5'-AMP-activated protein kinase(AMPK) in mammalian glucose homeostasis. Biochem J* 375:1-16, 2003
7. Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA: *Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. Trends Biochem Sci* 24(1):22-5, 1999
8. Hardie DG: *The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. J Cell Sci* 117(Pt 23):5479-87, 2004
9. Salt I.P, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG: *AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. Biochem J* 335:533-9, 1998
10. da SilvaXavier G, Leclerc I, Varadi A, Tsuboi T, Moule SK, Rutter GA: *Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. Biochem J* 371:761-74, 2003
11. Diraison F, Motakis E, Parton LE, Nason GP, Leclerc I, Rutter GA: *Impact of adenoviral transduction with SREBP1c or AMPK on pancreatic islet gene expression profile: analysis with oligonucleotide microarrays. Diabetes* 53(Suppl. 3):S84-91, 2004
12. Leclerc I, Woltersdorf WW, Da Silva Xavier G, Rowe RL, Cross SE, Korbitt GS, Rajotte RV, Smith R, Rutter GA: *Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E1023-31, 2004
13. Pold R, Jensen LS, Jessen N, Buhl ES, Schmitz O, Flyvbjerg A, Fujii N, Goodyear LJ, Gotfredsen CF, Brand CL, Lund S: *Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. Diabetes* 54(4):928-34, 2005
14. Diraison F, Parton L, Ferre P, Foufelle F, Briscoe CP, Leclerc I, Rutter GA: *Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c(SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside(AICAR). Biochem J* 378:769-78, 2004
15. Puigserver P, Spiegelman BM: *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha(PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. Endocr Rev* 24:78-90, 2003
16. Yoon JC, Xu G, Deeney JT, Yang SN, Rhee J, Puigserver P, Levens AR, Yang R, Zhang CY, Lowell BB, Berggren PO, Newgard CB, Bonner-Weir S, Weir G, Spiegelman BM: *Suppression of beta cell energy metabolism and insulin release by PGC-1alpha. Dev Cell* 5:73-83, 2003
17. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC: *Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. J Clin Invest* 71:1544-53, 1983
18. Ko SH, Suh SH, Kim BJ, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Son HS, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Bonner-Weir S, Weir GC, Yoon KH, Park CG: *Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells. Pancreas* 22(2):121-8, 2004
19. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest* 108:1167-74, 2001
20. Kefas BA, Cai Y, Kerckhofs K, Ling Z, Martens G, Heimberg H, Pipeleers D, Van de Casteele M: *Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis. Biochem Pharmacol* 68: 409-16, 2004
21. Fiedler M, Zierath JR, Selen G, Wallberg-Henriksson H, Liang Y, Sakariassen KS: *5-aminoimidazole-4-*

- carboxy-amide-1-beta-D-ribofuranoside treatment ameliorates hyperglycaemia and hyperinsulinaemia but not dyslipidaemia in KKAY-CETP mice. Diabetologia* 44:2180-6, 2001
22. Halseth AE, Ensor NJ, White TA, Ross SA, Gulve EA: *Acute and chronic treatment of ob/ob and db/db mice with AICAR decreases blood glucose concentrations. Biochem Biophys Res Commun* 294:798-805, 2002
 23. Song XM, Fiedler M, Galuska D, Ryder JW, Fernstrom M, Chibalin AV, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR: *5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside treatment improves glucose homeostasis in insulin-resistant diabetic(ob/ob) mice. Diabetologia* 45(1): 56-65, 2002
 24. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: *A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. Cell* 92:829-39, 1998
 25. Knutti D, Kaul A, Kralli A: *A tissue-specific coactivator of steroid receptors, identified in a functional genetic screen. Mol Cell Biol* 20:2411-22, 2000
 26. Delerive P, Wu Y, Burris TP, Chin WW, Suen CS: *PGC-1 functions as a transcriptional coactivator for the retinoid X receptors. J Biol Chem* 277:3913-7, 2002
 27. Tcherepanova I, Puigserver P, Norris JD, Spiegelman BM, McDonnell DP: *Modulation of estrogen receptor-alpha transcriptional activity by the coactivator PGC-1. J Biol Chem* 275:16302-8, 2000
 28. Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM: *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. Nature* 413:131-8, 2001