

OLETF 쥐에서 인슐린저항성과 인슐린 분비능에 대한 Thiazolidinediones의 효과

인제대학교 일산백병원 내분비대사내과, 성균관대학교 삼성서울병원 내분비대사내과¹, 해남병원 내분비대사내과²

노정현·홍승현¹·이경희¹·민경민¹·양태영²·이명식¹·김광원¹·이문규¹

Thiazolidinediones on Insulin Resistance and Insulin Secretion in Obese Diabetic OLETF Rats

Jung-hyun Noh, Seung-hyun Hong¹, Kyoung-hee Lee¹, Kyoung-Min Min¹, Tae-young Yang²,
Myung-shik Lee¹, Kwang-won Kim¹, Moon-kyu Lee¹

*Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Internal Medicine, Ilisan-Paik Hospital, Inje University College of Medicine;
Division of Endocrinology and Metabolism¹, Department of Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University of Medicine;
and Division of Endocrinology and Metabolism², Department of Internal Medicine, Hae-nam Hospital*

– Abstract –

Background: Thiazolidinediones are synthetic peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists that decrease insulin resistance but, as in vitro and in vivo studies suggest, may have direct beneficial effects on pancreatic beta cells. Here, we investigated the effects of thiazolidinediones (TZDs) on the insulin resistance, β -cell mass and insulin secretion in obese diabetic OLETF rats.

Methods: We studied insulin resistance (by hyperinsulinemic euglycemic clamp) and insulin secretion (by hyperglycemic clamp) in TZDs administered OLETF and LETO rats. Histologic alterations of the islets were observed and β -cell mass was also measured by point counting method.

Results: Chronic administration of troglitazone (TGZ, 0.15%) or pioglitazone (PGZ, 0.02%) prevented the development of glucose intolerance in OLETF rats, as assessed by oral glucose tolerance test. There was significant difference in submaximal glucose infusion rate between TGZ-treated and untreated OLETF rats during euglycemic clamp studies at 24 weeks of age. At 16 and 24 weeks of ages, β -cell mass significantly increased in TGZ-treated OLETF rats compared to untreated animals. At 19 weeks and 30 weeks of age, first-phase insulin secretion was not different in PGZ-treated OLETF rats from untreated OLETF rats during hyperglycemic clamp study. At 30 weeks of age, late-phase insulin secretion was decreased in PGZ-treated OLETF rats compared to untreated OLETF rats. The expression of α -smooth muscle actin, a marker of activated pancreatic stellate cells that are involved in the fibrosis of the pancreas, in the islets was suppressed by TGZ treatment at 24 weeks of age.

Conclusion: The treatment of TGZ prevented the development of diabetes, and increased insulin sensitivity and pancreatic β -cell mass in OLETF rats. These results might be related with the suppression of pancreatic stellate cells. Insulin secretion was not affected by PGZ treatment. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:33~43, 2007)

Key Words: Euglycemic clamp, Hyperglycemic clamp, OLETF rats, Thiazolidinediones

서 론

제2형 당뇨병의 발병기전은 인슐린저항성과 베타세포의 기능부전으로 설명된다. 많은 연구들에서 인슐린저항성만 단독으로 있는 경우에는 베타세포에서 이를 보상하기 위한 충분한 양의 인슐린을 분비할 수 있기 때문에 당뇨병이 발병하지 않는 결과를 보여, 당뇨병에서 베타세포의 기능부전이 고혈당의 발현에 중요한 역할을 함을 알 수 있다^{1,2)}. 당뇨병이 진행하면서 베타세포는 용적이 감소함이 증명되어 있으며³⁾, 이는 당뇨병에서 보이는 베타세포의 기능부전과 연관이 있을 것으로 생각되고 있으나 사람에서 이를 직접적으로 증명한 연구는 아직 없다.

Thiazolidinediones (TZD)계 약물은 핵내 수용체인 Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)에 반응하여 혈당을 강하시키는 작용을 한다는 것이 잘 알려져 있다. 이 약제의 혈당강하효과의 기전은 지방조직, 근육조직과 간 등에서 인슐린저항성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 지금까지 잘 알려져 있는 인슐린저항성의 개선 효과 이외에, TZD계 약물이 인슐린 분비능에 영향을 미칠 것이라는 일부 간접적 증거들이 보고되고 있다. 제2형 당뇨병 동물모델에서 TZD가 췌장 내 지방축적을 감소시키고 베타세포의 용적 감소를 예방하는 효과를 보임이 보고된 바 있다^{4,5)}. TZD의 이와 같은 효과는 고혈당을 개선함으로써 나타나는 간접적인 효과일 수도 있으며, TZD가 직접적으로 베타세포에 작용하여 나타나는 효과일 수도 있다. 실제로 초기 당뇨병에서 철저한 혈당조절이 베타세포의 기능을 향상시킨다는 보고는⁶⁾ 베타세포에 대한 TZD의 간접효과를 뒷받침한다. 반면, 일부 생체 외 실험에서는 TZD가 베타세포에서 인슐린의 분비를 증가시킨다는 보고가 있어^{7,8)} TZD의 베타세포에 대한 직접적인 효과를 뒷받침 한다.

제2형 당뇨병 동물모델 및 사람을 대상으로 한 연구에서 TZD가 인슐린저항성을 개선시키는 이미 증명되어 있으나, 베타세포의 인슐린 분비능에 대한 효과에 대해서는 TZD가 직접적으로 인슐린 분비능을 개선시켰다는 보고와^{9,10)} 그렇지 않다는 보고들이^{11,12)} 있어 논란이 있다. 특히 제2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐에서 직접적인 인슐린 분비능을 평가하는데 가장 효과적인 검사법으로 알려진 고혈당 클램프 기법으로 인슐린 분비를 평가한 연구는 아직까지 없었다.

OLETF 쥐는 유전적인 제2형 당뇨병 모델로 고혈당, 비만, 고지혈증과 고인슐린혈증 등의 제2형 당뇨병 및 대사증후군의 임상특징을 나타낸다¹³⁾. 이 연구에서는 OLETF 쥐에서 고인슐린-정상혈당 클램프 기법과 고혈당 클램프 기법을 이용한 TZD의 인슐린저항성과 인슐린분비에 대한 효과, 베타세포의 용적의 변화 및 조직학적 변화를 봄으로써 제2형 당뇨병 모델에서 TZD의 인슐린저항성 및 베타세포 기능에 대한 효과와 기전을 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 개요

실험동물로는 수컷 OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) 쥐, 대조군으로는 수컷 LETO (Long Evans Tokushima Otsuka) 쥐가 사용되었다. 이 동물은 8주령에 오즈카 제약회사 (Otsuka Pharmaceutical, Tokushima, Japan)로부터 공여 받았다. 실험 종료 시까지 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 실내온도와 12시간의 명암주기를 조절한 환경에서 사육되었으며 물과 쥐 사료 (Purina Formula, St Louis, MO)를 제한 없이 공급하였다. 1주 간격으로 체중과 식사량을 측정하여 발육상태를 점검하였다.

트로글리타존 (Troglitazone, TGZ) 투여 실험에서는 16주령과 24주령에 약제 투여한 OLETF 쥐 (16주 $n = 22$, 24주 $n = 16$)와 LETO 쥐 (16주 $n = 10$, 24주 $n = 6$), 약제를 투여하지 않은 대조군 OLETF 쥐 (16주 $n = 21$, 24주 $n = 14$)와 LETO 쥐 (16주 $n = 10$, 24주 $n = 6$)를 사용하여 경구당부하검사, 혈청 지질농도, 유리지방산, 인슐린 농도를 측정하였다. 또한 약제 투여한 OLETF 쥐 (16주 $n = 8$, 24주 $n = 4$)와 LETO 쥐 (16주 $n = 4$, 24주 $n = 6$), 약제를 투여하지 않은 OLETF 쥐 (16주 $n = 8$, 24주 $n = 4$)와 LETO 쥐 (16주 $n = 4$, 24주 $n = 6$)에서 고인슐린-정상혈당 클램프 기법으로 인슐린 감수성 정도를 측정하였고, 클램프 검사 후 조직을 적출하여 췌장조직의 형태를 관찰하고 베타세포 용적을 측정하였다.

피오글리타존 (Pioglitazone, PGZ) 투여 실험에는 16주령과 24주령에 약제 투여한 OLETF 쥐 (16주 $n = 22$, 24주 $n = 10$)와 약제를 투여하지 않은 OLETF 쥐 (16주 $n = 22$, 24주 $n = 8$)에서 경구당부하검사로 당뇨병 발생을 관찰하였고, 19주령과 30주령에 각 군당 4마리의 쥐에서 고혈당 클램프 기법으로 인슐린 분비능을 측정하였다.

2. Thiazolidinediones 투여

10주령부터 무작위로 치료군과 대조군으로 나누어, 치료군에게 TGZ (Dr. Horikoshi, Sankyo Research Institute 제공)을 1.5 g/kg chow의 농도로, 혹은 PGZ (TAKEDA Chemical Industries, Pharmaceutical Research Division, Tokyo)을 0.2 g/kg chow의 농도로 쥐 사료 (Purina Formula, St Louis, MO)에 섞어 14주간 제공하였다.

3. 혈청 지질농도, 유리지방산, 혈청 인슐린 농도 측정

트로글리타존 치료 후 16주 및 24주령에 혈청 지질농도, 유리지방산 농도와 혈청 인슐린농도의 측정을 위해 공복 혈청을 0.3 cc분리하여 -20°C 에 따로 보관하였다. 혈청 지질농도는 GPO-PAP kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하였고, 인슐린 측정은 방사면역 인슐린

kit (Linco research Inc., St. Charles, IL)를 이용하여 방사면역 방법으로 측정하였다.

4. 경구당부하검사

경구당부하검사는 TGZ 치료 후 16주령 및 24주령에 공복상태에서 실시하였다. 쥐들을 에테르로 가볍게 마취한 뒤 도관을 이용하여 25% 포도당 용액으로 2 g/kg양의 포도당을 경구로 위 내에 투입하였다. 당부하 전과 30분, 60분, 90분, 120분째 꼬리정맥에서 0.2 cc 채혈하였으며, 채혈 즉시 원심분리하여 혈청분리 후 혈당을 측정하였다. 혈청 포도당 농도는 포도당 산화효소법을 이용하여 측정하였다. 경구당부하검사 결과에 따라 1) 최고 혈당치가 > 16.7 mM이고 120분의 혈당치가 > 11.1 mM인 경우를 당뇨병으로 정의하였고 2) 내당능장애는 위 두 가지 기준 중 한 가지를 만족하는 경우로 정의하였다¹³⁾.

5. 고인슐린-정상혈당 클램프 기법

TGZ 치료 후 16주령 및 24주령에 고인슐린-정상혈당 클램프 실험을 시행하였다. 실험 1주일 전에 인슐린과 포도당 주입을 위하여 실험동물의 목정맥 (jugular vein)과 목동맥 (carotid artery)에 도관을 삽입하였다. 실험동물이 도관삽입 수술 후 체중을 회복함을 1주일간 확인한 후 클램프 실험을 시행하였다. 6시간 금식 후 인슐린 (Humulin Regular, Eli-Lilly, Indianapolis, IN)을 40 (sub-maximum)과 400 (maximum) mU/m²/min로 주입하였다. 혈청 포도당 농도를 5분 간격으로 측정을 하였고 혈청 포도당 농도가 정상혈당으로 안정된 뒤 1시간 동안 실험을 진행하였다. 혈청 인슐린, 유리지방산 및 중성지방 측정을 위해 매 20분마다 채혈하였고 검체는 -20℃에 저장하였다.

6. 고혈당 클램프 기법

PGZ 치료 후 19주령 및 30주령에 고혈당 클램프 실험을 시행하였다. 고인슐린-정상혈당 클램프 실험과 동일하게 실험 1주일 전 실험동물의 목정맥과 목동맥에 도관을 삽입하였고, 도관삽입 수술 1주일 후 실험을 진행하였다. 6시간 금식 후 혈당을 13.9 mM으로 유지하기 위하여 15분간 혈청 포도당 농도를 측정하면서 포도당을 주입하였다. 고혈당 상태에 도달한 후 포도당 농도는 13.9 mM로 유지되도록 포도당 주입 속도를 조절하였다. 혈청 포도당과 인슐린을 측정하기 위하여 실험 시작 1시간 전 채혈하였으며, 실험 0~15분 동안에는 2분 간격으로, 그 이후에는 5분 간격으로 채혈하였다. 혈청 포도당 농도는 즉시 측정하였으며 인슐린 측정을 위하여 검체를 -20℃에 저장하였다.

7. 면역조직화학검사 및 베타세포 정량

정상혈당 클램프 기법 및 고혈당 클램프 기법 후 모든 실험

견구를 희생하여 췌장을 얻었다. OLETF 쥐를 4% chloral hydrate로 복강 마취한 후 췌장을 적출하였다. 떼어낸 췌장 조직은 Bouin고정액으로 4시간 동안 고정한 후 물에 세척하여 0.1 M phosphate 완충용액에 저장하였다가 파라핀에 포매한 후 5 µm의 조직박편을 만들었다. 췌장조직에서 췌도세포 관찰을 위하여 avidin-biotin-peroxidase complex법에 의해 면역조직화학염색을 시행하였다. 1차 항체는 mouse anti-human insulin antibody (1:250)와 rabbit anti-human glucagon antibody (1:400, DAKO Corp., Carpinteria, CA), mouse anti-human α -smooth muscle actin (α -SMA) antibody (1:50, DAKO Corp., Carpinteria, CA)를 사용하였으며, 2차 항체는 biotinylated horse anti-mouse IgG를 사용하였다.

조직 내 알파세포와 베타세포의 상대적인 양은 비디오카메라가 부착된 현미경 (Olympus BH2) 하에서 400배 배율의 렌즈를 모니터에 연결하여 point count법으로 측정하였다¹⁴⁾. 각 조직표본에서 최소 200부위를 무작위로 선택하여 부위 당 90개씩의 점을 한 연구자가 전담하여 세었다. 각각 겹치지 않는 부위에서 알파세포와 베타세포 영역의 수를 측정하였다.

8. 통계 분석

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고, 통계분석은 Prism 통계 프로그램을 이용하였다. 실험군간 차이는 t-test와 ANOVA를 시행하여 검정하였다. 통계학적 유의성은 *P* 값이 0.05미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 트로글리타존 투여 후 체중과 식사량의 변화

16주 및 24주령에 체중은 LETO군에 비하여 OLETF군에서 증가하였고 (*P* < 0.01), 식사량도 LETO군에 비하여 OLETF군에서 증가하였다 (*P* < 0.01). 그러나 TGZ (n = 12)을 투여한 OLETF군과 투여하지 않은 OLETF군 (n = 12) 사이에 체중이나 식사량의 차이는 없었다 (Fig 1). PGZ을 투여한 OLETF군의 체중은 30주령에 733.8 \pm 26.6 g, 투여하지 않은 경우에는 687.3 \pm 16.7 g으로 투여군에서 높은 경향을 보였으나 통계적으로 차이는 없었다.

2. Thiazolidinediones 투여 후 당뇨병 발생률의 변화

16주령에 시행한 경구당부하검사 결과 TGZ를 투여한 OLETF 쥐의 4.5% (1/22)와 TGZ를 투여하지 않은 OLETF 쥐의 14.3% (3/21)에서 내당능장애나 당뇨병이 발생하였다 (*P* = 0.252). 또한 PGZ를 투여한 OLETF 쥐의 0% (0/22)와 PGZ를 투여하지 않은 OLETF 쥐의 18.2% (4/22)에서

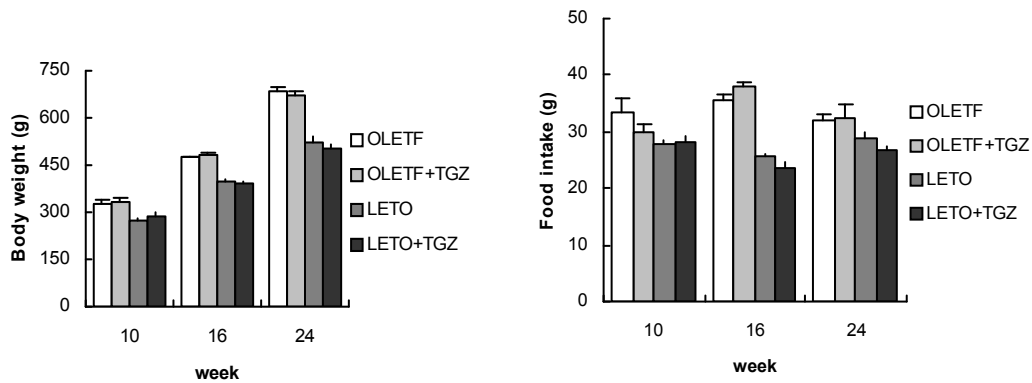


Fig. 1. Body weight and food intake in age-matched control and TGZ-treated LETO and OLETF rats. Results are the mean \pm SEM of 6~12 rats.

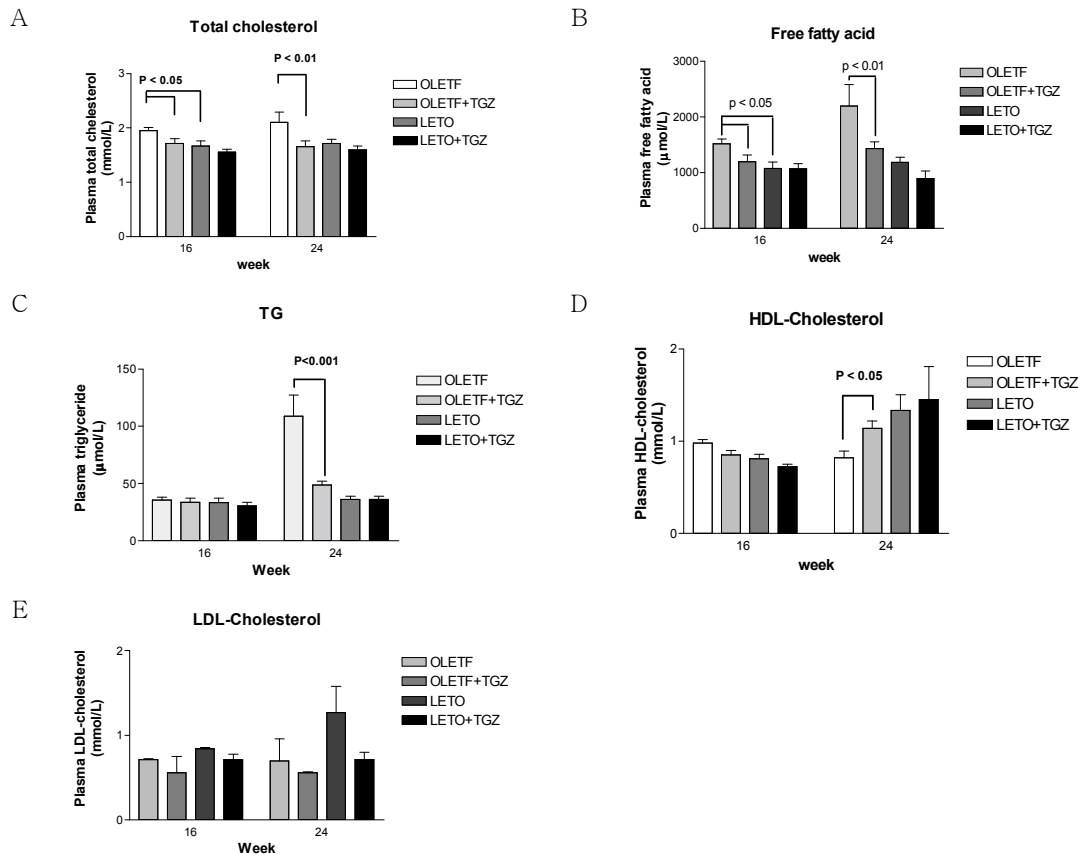


Fig. 2. Fasting plasma total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, free fatty acid and triglyceride levels at 16 and 24 weeks of age (6 and 14 weeks of treatment). Results are the mean \pm SEM of 6~12 rats.

내당능장애나 당뇨병이 발생하였다 ($P < 0.05$).

24주령에 시행한 경구당부하검사 결과 TGZ를 투여한 OLETF 쥐의 25% (4/16)와, TGZ를 투여하지 않은 OLETF 쥐의 64.3% (9/14)에서 내당능장애나 당뇨병이 발생하였다 ($P < 0.05$). 또한 PGZ를 투여한 OLETF 쥐의 20% (2/10)와, PGZ를 투여하지 않은 OLETF 쥐의 100% (8/8)에서 내당능장애나 당뇨병이 발생하였다 ($P < 0.001$).

3. 트로글리타존 투여 후 혈중 지질농도, 유리지방산 및 인슐린농도의 변화

16주 및 24주령에서 총 콜레스테롤 (1.95 ± 0.06 vs. 1.67 ± 0.01 mmol/L, $P < 0.01$, 2.10 ± 0.19 vs. 1.71 ± 0.07 mmol/L, $P < 0.01$, Fig 2A)과 유리지방산 (1517.0 ± 90.3 vs. 1153.0 ± 100.2 μ mol/L, $P < 0.01$, $2200.0 \pm$

384.3 vs. 1261.0 \pm 63.8 μ mol/L, $P < 0.01$, Fig. 2B)은 각각 치료하지 않은 OLETF군에서 모두 치료하지 않은 LETO군에 비하여 높았다. 또한 6주 및 14주간 TGZ를 투여한 OLETF군에서 TGZ를 투여하지 않은 OLETF군과 비교하여 총콜레스테롤 (1.95 \pm 0.06 vs. 1.72 \pm 0.09 mmol/L, $P < 0.05$, 2.10 \pm 0.19 vs. 1.66 \pm 0.11 mmol/L, $P < 0.01$, Fig 2A)과 유리지방산 (1517.0 \pm 90.3 vs. 1198.0 \pm 120.1 μ mol/L, $P < 0.05$, 2200.0 \pm 384.3 vs. 1581.0 \pm 78.2 μ mol/L, $P < 0.01$, Fig. 2B)의 농도가 의미 있게 낮았다.

24주령에 혈장 중성지방은 치료하지 않은 OLETF군에서 치료하지 않은 LETO군에 비하여 높았으며 (108.8 \pm 18.5 vs. 36.2 \pm 2.7 μ mol/L, $P < 0.001$, Fig 2C), TGZ를 투여한 OLETF군에서 투여하지 않은 군에 비하여 혈장 중성지방이 의미 있게 낮았다 (48.6 \pm 3.6 vs. 108.8 \pm 18.5 μ mol/L, $P < 0.001$, Fig 2C). HDL-콜레스테롤은 치료하지 않은 LETO군에서 치료하지 않은 OLETF군에 비하여 의미 있게 높았으며 (1.33 \pm 0.17 vs. 0.82 \pm 0.07 mmol/L, $P < 0.05$, Fig 2D), TGZ를 투여한 OLETF군에서 투여하지 않은 군에 비하여 의미 있게 높았다 (1.14 \pm 0.08 vs. 0.82 \pm 0.07 mmol/L, $P < 0.05$). LDL-콜레스테롤은 치료하지 않은 OLETF군과 치료하지 않은 LETO군 사이에 차이가 없었으며, OLETF 쥐에서 TGZ 투여에 따라 차이가 없었다 (Fig 2E).

4. 트로글리타존 투여 후 정상혈당 클램프 기법에서 인슐린 및 유리지방산 농도의 변화

16주령에 측정된 인슐린 농도는 4군 간에 차이가 없었다. 그러나 24주령에 측정된 인슐린 농도는 치료하지 않은 OLETF군에서 치료하지 않은 LETO군이나 (0.38 \pm 0.05 vs. 0.19 \pm 0.02 nmol/L, $P < 0.05$), TGZ를 투여한 OLETF군에 비하여 (0.38 \pm 0.05 vs. 0.23 \pm 0.04 nmol/L, $P <$

0.01) 의미 있게 높았다 (Table 1). 16주 및 24주령에 시행한 정상혈당 클램프 실험에서 최대 인슐린주입시기에는 모든 군의 혈중 인슐린 농도가 15 nmol/L를 초과하여 내인성 포도당 생성이 최대로 억제되고 있음을 나타내었다. 인슐린 주입에 의해 혈중 인슐린 농도가 증가하면서 지방분해가 억제되어, TGZ를 투여한 OLETF군, TGZ를 투여한 LETO군과 투여하지 않은 LETO군에서 모두 혈중 유리지방산의 농도가 감소하였으나, TGZ를 투여하지 않은 OLETF군에서는 유리지방산의 감소를 보이지 않았다 (Table 1).

5. 트로글리타존 투여 후 정상혈당 클램프 기법에서 포도당주입속도의 변화

실험동물의 인슐린저항성을 측정하기 위하여 고인슐린-정상혈당 클램프 기법을 시행하였다.

16주령에 시행한 고인슐린-정상혈당 클램프 실험에서 submaximal 속도의 인슐린 주입 시 포도당 주입속도 (glucose infusion rate; GIR)는 TGZ를 투여한 OLETF군 (n = 8), 치료하지 않은 OLETF군 (n = 8), TGZ를 투여한 LETO군 (n = 4), 치료하지 않은 LETO군 (n = 4)에서 각각 1768.5 \pm 387.9, 1270.7 \pm 130.9, 2907.3 \pm 167.4, 3010.1 \pm 167.1 nmol/kg/min이었다. 또한 최대속도의 인슐린 주입 시에는 GIR은 각각 3878.9 \pm 228.2, 3436.2 \pm 110.3, 5447.3 \pm 373.1, 5031.0 \pm 329.3 nmol/kg/min이었다 (Fig. 3).

24주령에 시행한 실험에서 submaximal 속도의 인슐린 주입 시 GIR은 TGZ를 투여한 OLETF군 (n = 4), 치료하지 않은 OLETF군 (n = 4), TGZ를 투여한 LETO군 (n = 6), 치료하지 않은 LETO군 (n = 6)에서 각각 1731.5 \pm 236.1, 1124.7 \pm 176.7, 2803.1 \pm 180.9, 2579.6 \pm 159.5 nmol/kg/min이었으며, 최대속도의 인슐린 주입 시의 GIR은 각각 2885.6 \pm 296.7, 2737.5 \pm 161.7, 4514.7 \pm 382.7, 4020.8 \pm 491.4 nmol/kg/min이었다 (Fig. 3). 24주령의

Table 1. Changes of Concentrations of Plasma Insulin and FFA During Hyperinsulinemic-euglycemic Clamp Studies

	Untreated-OLETF		TGZ treated OLETF		Untreated-LETO		TGZ-treated LETO	
	16 wks	24 wks	16 wks	24 wks	16 wks	24 wks	16 wks	24 wks
Insulin (nmol/L)								
Basal	0.33 \pm 0.03	0.38 \pm 0.05	0.32 \pm 0.05	0.23 \pm 0.04*	0.24 \pm 0.04	0.19 \pm 0.02*	0.29 \pm 0.06	0.20 \pm 0.07
Submaximal	0.70 \pm 0.04	0.96 \pm 0.06	0.88 \pm 0.25	1.03 \pm 0.03	0.68 \pm 0.08	0.78 \pm 0.09	0.79 \pm 0.19	0.85 \pm 0.08
Maximal	18.90 \pm 2.20	16.00 \pm 1.76	20.59 \pm 7.18	15.80 \pm 4.92	49.55 \pm 34.17	17.54 \pm 1.70	27.32 \pm 6.83	17.93 \pm 1.71
FFA (μ mol/L)								
Basal	1517.0 \pm 90.3	2200.0 \pm 384.3	1198.0 \pm 120.1	1581.0 \pm 78.2	1153.0 \pm 100.2	1261.0 \pm 63.8	1068.0 \pm 96.1	11249.0 \pm 115.1
Submaximal	1459.0 \pm 75.7	2160.0 \pm 416.8	831.9 \pm 154.9	1500.0 \pm 23.9	655.0 \pm 198.6	766.1 \pm 104.7	667.3 \pm 146.6	588.8 \pm 46.8
Maximal	1101.0 \pm 165.2	1628.0 \pm 39.1	583.9 \pm 105.3†	1048.0 \pm 242.7†	516.3 \pm 219.2†	629.4 \pm 98.8†	475.4 \pm 74.6†	544.7 \pm 77.9†

Results are the mean \pm SEM.

* $P < 0.05$ vs. untreated OLETF.

† $P < 0.05$ vs. FFA at basal infusion of insulin.

submaximal GIR은 TGZ를 투여한 OLETF군에서 투여하지 않은 OLETF군과 비교하여 의미 있게 높았으나 최대 인슐린 주입 시 GIR은 치료한 OLETF군과 치료하지 않은 OLETF군 간에 차이가 없었다.

5. 피오글리타존 투여 후 고혈당 클램프 기법 결과의 변화

고혈당 클램프 기법에서는 인슐린 분비능을 보기 위하여, 초반 10분간의 인슐린의 곡선아래면적 (area under the curve)을 계산하여 일차기 인슐린 반응 (first-phase insulin response; FPIR)을 보았다. 19주령의 FPIR은 PGZ를 투여한 OLETF군 ($n = 4$)과 투여하지 않은 OLETF군 ($n = 4$) 사이에 차이가 없었다 (61.8 ± 20.1 vs. 92.8 ± 29.4 , Fig. 4A). 30주령의 FPIR 역시 PGZ를 투여한 OLETF군 ($n = 4$)과 투여하지 않은 OLETF군 ($n = 4$) 사이에 차이가 없었다 (95.3 ± 10.8 vs. 99.5 ± 13.1).

30주령에 시행한 고혈당 클램프 기법에서 후반기 인슐린 농도는 PGZ를 투여한 OLETF군에서 투여하지 않은 OLETF군에 비하여 의미 있게 낮게 나타나 (21.8 ± 1.3 vs. 39.7 ± 5.2 , $P < 0.01$, Fig. 4B), 인슐린 감수성의 개선 소견을 보였다.

6. 트로글리타존 투여 후 췌도세포의 형태와 베타세포의 용적 변화

24주령의 TGZ을 투여하거나 투여하지 않은 LETO 쥐 모두 정상적인 췌도세포의 형태를 보였다. 췌도세포는 둥글거나 타원형이었으며, 인슐린이 염색된 베타세포는 중심부에 균등하게 분포하였다 (Fig. 5C, D, G, H). 치료하지 않은 OLETF 쥐의 췌도세포의 과형성을 보였으며 다양한 농도의 인슐린 염색을 보여 인슐린의 탈과립화가 일어남을 추측할 수 있었다. 미세한 공포형성과 베타세포의 고르지 않은 분포가 관찰되었으며 (Fig. 5A), 알파세포는 과형성 췌도세포 내에 단일세포나 작은 무리로 관찰되었다 (Fig. 5E). 이와는 대조적으로 TGZ을 투여한 OLETF 쥐의 췌장조직에서는 췌도세포의 형태가 다양한 정도의 과형성을 보이는 것 이외에는 정상소견을 보였으며, 과형성 정도는 약제를 투여하지 않은 군과 차이가 없었다 (Fig. 5B). 베타세포의 용적은 16주령과 24주령 모두에서 TGZ을 투여한 OLETF군에서 TGZ을 투여하지 않은 OLETF군에 비하여 의미 있게 컸다 (2.45 ± 0.26 vs. 4.18 ± 0.47 mg, $P < 0.01$, 2.07 ± 0.17 vs. 3.68 ± 0.26 mg, $P < 0.01$, Fig. 6). 24주령의 TGZ을 투여한 OLETF 쥐의 췌장조직에서는 TGZ을 투여하지 않

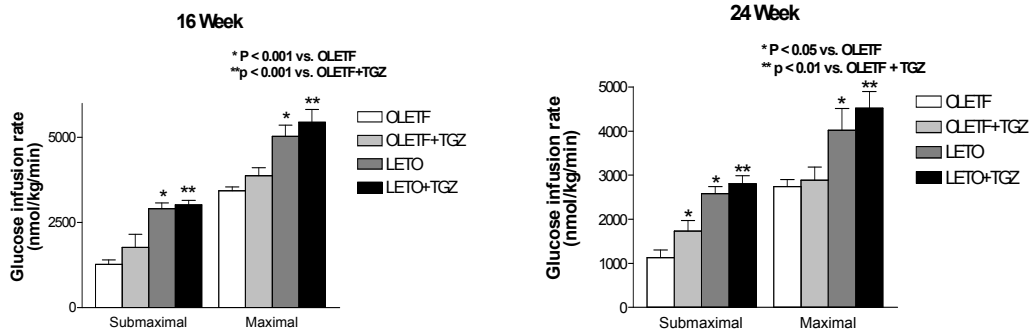


Fig. 3. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp in OLETF and LETO rats with or without TGZ treatment. Following 1 h for stabilization, the GIR necessary to maintain blood glucose at 5 to 6 mmol/L was measured. Results are the mean \pm SEM for each group over 1 h.

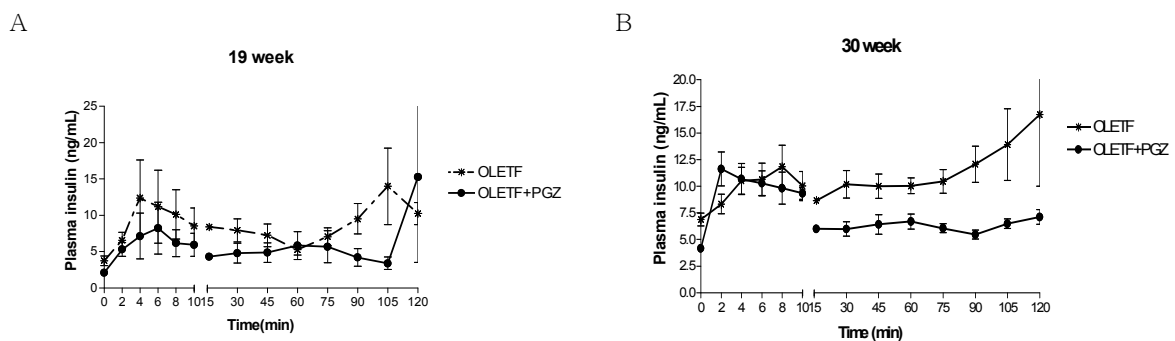


Fig. 4. Changes of concentrations of plasma insulin during hyperglycemic clamp studies. Results are the mean \pm SEM.

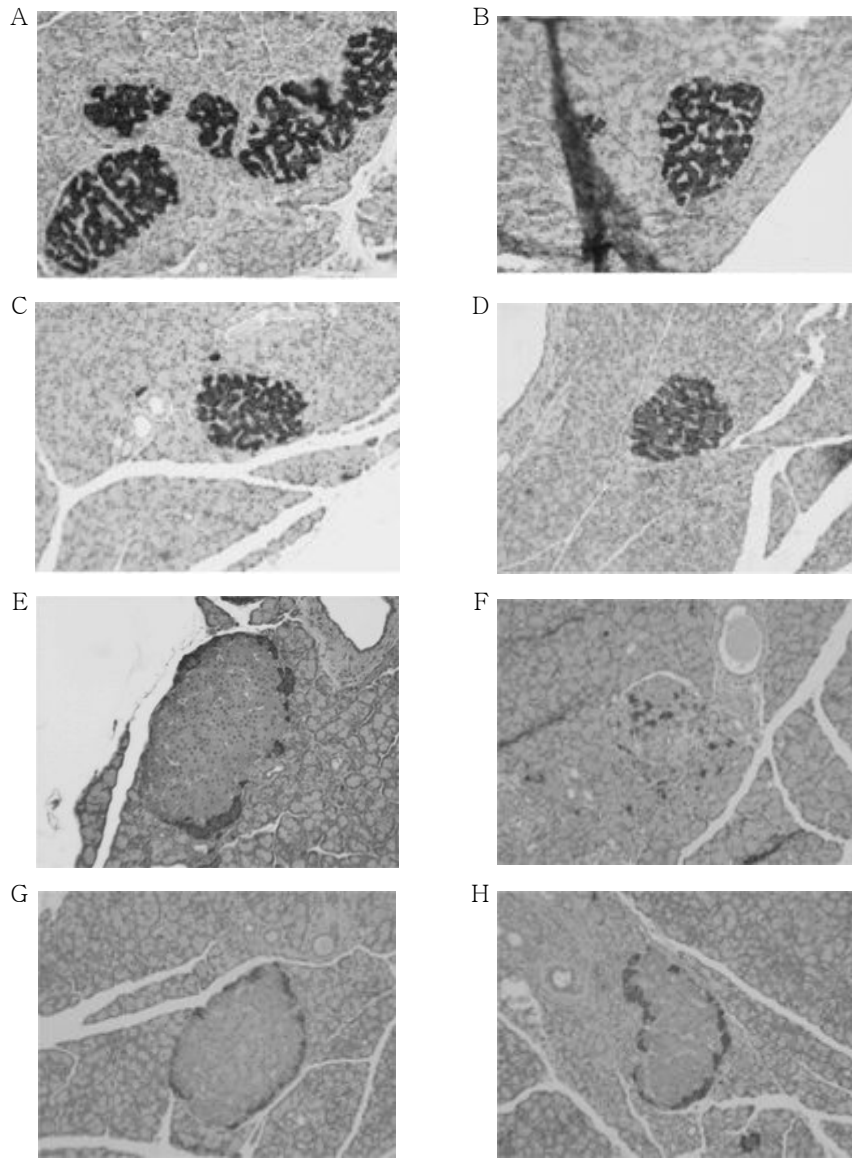


Fig. 5. Insulin staining of pancreatic islets in untreated OLETF rats (A), TGZ-treated OLETF rats (B), untreated LETO rats (C) and TGZ-treated LETO rats (D), and glucagon staining of pancreatic islets in untreated OLETF rats (E), TGZ-treated OLETF rats (F), untreated LETO rats (G) and TGZ-treated LETO rats (H) at 24 weeks of age.

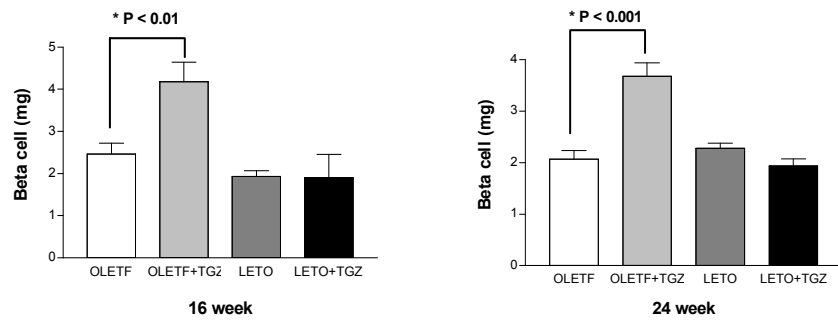


Fig. 6. Changes in pancreatic β -cell mass in OLETF and LETO groups at 16 and 24 weeks of age. Total β -cell area was measured using a point-counting procedure with a 48-point transparent overlay.

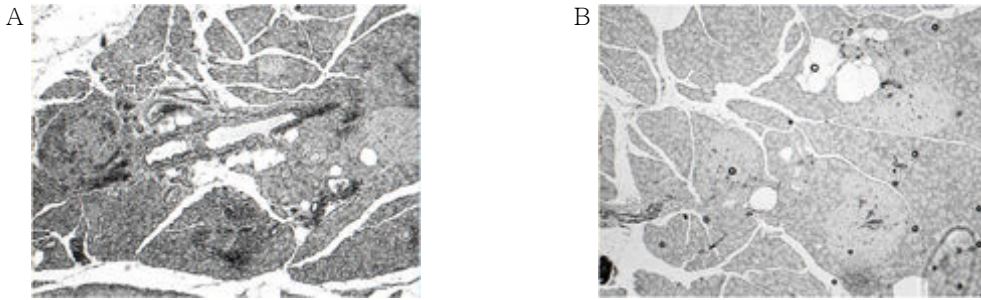


Fig. 7. α -SMA staining of pancreatic islets in untreated OLETF rats (A) and TGZ-treated OLETF rats (B) at 24 weeks of age.

은 OLETF 쥐에 비하여 α -SMA의 발현이 크게 억제됨을 보였다 (Fig 7).

고 찰

본 연구에서는 이전 연구들의 결과와 동일하게 TZD 투여 후 인슐린감수성이 개선되고 당뇨병이 예방되는 결과를 보였다. TZD의 인슐린감수성의 개선 및 동물모델에서 당뇨병의 예방효과는 이미 잘 증명되어 있다¹⁵⁾. 본 연구에서 트로글리타존에 의해 OLETF 쥐의 혈청 중성지방 및 유리지방산의 농도가 감소하여 이전 연구들의 결과와 동일하였으며¹⁶⁾, 이 소견들이 인슐린감수성 개선에 기여했을 것으로 생각된다. 본 실험에서는 이전 연구결과와는 달리 PGZ투여 여부에 따라 체중이 통계적인 차이를 보이지 않았다. 실제로 체중의 평균값은 PGZ 투여군에서 높았으나 체중을 측정 한 마리 수가 적었던 것이 통계적인 차이를 보이지 않은 하나의 원인일 가능성이 있겠다.

제2형 당뇨병 발생에서 베타세포의 기능부전이 중요한 역할을 한다. 또한, 제2형 당뇨병환자에서 췌도세포의 용적 감소와 형태변화가 관찰됨이 알려져 있다³⁾. 제2형 당뇨병에서 베타세포의 형태변화 및 기능이상을 초래하는 기전은 당독성, 지질독성, 췌도세포 내에 아밀로이드의 축적 등으로 생각되고 있다. 제2형 당뇨병 동물모델에서 TZD가 췌장 내 지방축적을 감소시키고 베타세포의 용적 감소를 예방하는 효과를 보임이 이미 보고된 바 있으며^{4,5)}, 본 연구에서도 이와 동일한 결과를 보였다.

본 연구에서는 TZD투여 후 pancreatic stellate cell (PSC)의 활성 지표인 α -SMA가 췌도세포 내에서 억제된 것을 관찰하였다. PSC는 주로 췌장 내 샘파리세포 주변부 (periacinar area)에 위치하며¹⁷⁾, 여러 성장인자, 시토킨, 산화 스트레스 등에 의해 활성화되어 췌장의 외분비선과 내분비선의 섬유화에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 이 결과는 췌도세포의 용적감소와 형태변화에 대한 TZD의 예방 효과가 PSC 억제를 통한 섬유화의 예방에 의한 것임을 나타낸다. PPAR- γ 가 PSC의 억제에 관여한다는 몇몇 연구결과가 이미 발표된 바 있다. 쥐에서 분리한 PSC를 이용한 생

체의 실험에서 TGZ이 PSC활성을 억제하였으며¹⁹⁾, PSC 세포주에 PPAR- γ 를 과발현시킨 경우 PSC의 증식이 억제되는 결과를 보였다²⁰⁾. 이러한 생체 외 실험의 결과들은 TZD가 직접적으로 PSC를 억제한다는 가능성을 제시한다. 그러나 PSC에 대한 TZD의 작용기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며, TZD의 항염증, 항산화작용 등에 의한 간접적인 효과를 배제하지 못하겠다. TGZ이 췌장염 동물모델에서 췌장의 PSC의 활성화를 억제하여 염증반응을 줄이는 효과가 있다는 생체 내 실험도 보고된 바 있다²¹⁾. 그러나 당뇨병 동물모델에서 PSC에 대한 TZD의 효과를 본 것은 본 연구가 첫 번째로, 당뇨병 개체에서 췌도세포에 대한 TZD의 효과의 기전을 규명하는데 중요하겠다.

이와 같은 TZD의 PSC 및 베타세포에 대한 효과는 고혈당 및 이상지질혈증을 개선함으로써 나타나는 간접적인 효과일 수도 있으며, TZD가 직접적으로 베타세포에 작용하여 나타나는 효과일 수도 있다. 초기 당뇨병에서 철저한 혈당 조절이 베타세포의 기능을 향상시킨다는 보고는⁶⁾ TZD의 혈당강하 효과가 베타세포에 대한 당독성을 개선시켜 베타세포에 간접적으로 영향을 줄 것이라는 가설을 뒷받침한다. 반면, peroxisome proliferator-activated receptor response element (PPRE)가 당뇨병 쥐 모델의 GLUT2 촉진유전자 (promotor)에 존재함이 확인되었으며²²⁾, PPAR- γ 가 사람과 쥐의 췌장에서 발현됨이 증명되어^{23,24)}, TZD가 인슐린저항성에 미치는 효과 이외에 췌장에서 인슐린분비에 대해 직접적인 효과를 가질 것이라는 가설을 뒷받침한다. TZD는 분리한 소도나 베타세포에서 인슐린 분비를 증가시킨다는 보고들이 있으나 이에 대한 결과는 상충되게 나타나 논란이 있다^{7,8,25)}. 또한 사람 및 동물모델의 생체 내 실험에서 인슐린 분비능에 대한 TZD의 효과도 결과가 상충되어 정확히 밝혀지지 않은 상태이다⁹⁻¹²⁾. 26주간 PGZ을 복용한 제2형 당뇨병환자에서 당부하검사에서 측정한 인슐린분비 지표 (insulinogenic index)가 증가하여 PGZ이 인슐린 분비능을 개선시켰다는 보고가 있었으며¹⁰⁾, 로지글리타존으로 치료한 당뇨병환자에서 정주 당부하검사로 측정한 베타세포 기능이 향상되었다는 연구결과가 있다²⁶⁾. 반면, 다른 연구에서는 고지혈증 당뇨병 토끼에서 TGZ 치료 후 정주 당부하검사에서

최대 인슐린 분비량이 감소한 결과를 보였다²⁷⁾. 또한 제2형 당뇨병환자에서 고혈당 클램프 기법으로 측정된 인슐린 분비능이 로지글리타존 복용 여부에 따라 차이가 없었다는 연구결과가 보고된 바 있다¹¹⁾.

본 연구에서는 관찰되는 TZD 투여에 의한 베타세포의 용적 및 형태변화가 베타세포의 기능향상과 직접적인 관계가 있는가를 고혈당 클램프 기법으로 관찰하였다. 본 연구에서는 고혈당 클램프 기법으로 관찰한 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능은 PGZ의 투여로 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 제2형 당뇨병 동물모델에서 포도당 자극에 대한 인슐린 분비능을 측정하는 가장 정밀한 실험 방법 중 하나인 고혈당 클램프 기법을 이용하여 TZD에 의한 인슐린 분비능의 변화를 관찰하였다는데 의미가 있다. 본 연구에서 TZD가 베타세포의 용적과 형태에 이로운 효과를 보였지만 인슐린 분비능에 차이를 보이지 않은 것은, 제2형 당뇨병이 진행하면서 베타세포의 형태 변화 이전에 베타세포의 기능부전이 먼저 발생하며, 본 실험의 20주 동안의 PGZ 투여가 베타세포의 형태 변화는 예방하였으나 기능부전의 발생은 예방하지 못하였을 가능성이 있겠다. 비만한 당뇨병 동물모델인 ZDF 쥐에서 PGZ이 당뇨병의 발생을 예방하였으나, 췌도세포에서 포도당 자극에 대한 인슐린의 분비능을 완전히 정상화하지 못하였다는 연구 결과는 본 연구의 결과를 뒷받침한다¹²⁾.

본 연구에서 30주령에 실시한 고혈당 클램프 실험의 후반기 혈중 인슐린 농도가 감소하였다. 이는 인슐린 감수성 개선으로 인슐린 요구량이 감소하여 고인슐린혈증이 개선된 소견으로 해석된다. 당뇨병은 없으나 인슐린저항성을 보이는 성인에서 인슐린저항성을 개선시킨 후 포도당 자극에 의한 인슐린 분비 비율이 감소한 이전 연구결과와 같은 기전으로 설명할 수 있겠다²⁸⁾.

결론적으로 본 연구에서는 제2형 당뇨병 동물모델에서 TZD계 약물은 인슐린감수성을 개선하고, 이차적으로 베타세포의 용적 및 형태 변화를 예방하였고, 고인슐린혈증을 개선하였으며, 이 효과는 염증과 섬유화를 유발하는 PSC의 활성을 억제하여 나타나는 것으로 생각된다. 그러나 이 효과가 직접적으로 인슐린 분비능을 개선시키지는 않는 것으로 나타났다. 이는 고인슐린혈증 개선효과를 보인 생체 내 TZD의 주 작용은 인슐린감수성의 개선에 의한 것이며, 이에 비하여 인슐린 분비능에 대한 효과는 크지 않음을 나타낸다.

요 약

연구배경: Thiazolidinediones (TZD)는 인슐린저항성을 개선시키는 효과를 가지는 PPAR- γ 작용제로, 여러 생체 외 및 생체 내 실험에서 인슐린저항성에 대한 효과뿐 아니라

인슐린 분비에 대한 효과를 가지고 있을 것으로 추측되나 이에 대해 명확히 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 비만한 제2형 당뇨병 동물모델인 OLETF 쥐에서 TZD의 인슐린저항성, 베타세포 용적 및 인슐린 분비능에 대한 효과를 보고자 하였다.

방법: 10주령의 OLETF 쥐에서 14주간 트로글리타존을 투여한 후 고인슐린 정상혈당 클램프 기법으로 인슐린저항성을 측정하였고, point counting법으로 베타세포의 용적을 측정하였다. 또한 20주간 피오글리타존을 투여한 OLETF 쥐에서 고혈당 클램프기법으로 인슐린 분비능을 측정하였다.

결과: 트로글리타존 혹은 피오글리타존을 투여한 OLETF 쥐에서 경구당부하검사로 당뇨병의 발생이 감소하였음을 확인하였다. 14주간 트로글리타존을 투여한 OLETF 쥐에서 약을 투여하지 않은 쥐에 비하여 고인슐린 정상혈당 클램프 검사에서 인슐린저항성이 개선된 결과를 보였으며, 베타세포의 용적이 증가하였다. 또한 트로글리타존을 투여한 OLETF 쥐의 췌도세포에서 PSC의 활성 표지자인 α -SMA의 활성이 억제된 결과를 보였다. 그러나 20주간 피오글리타존을 투여한 OLETF 쥐에서 시행한 고혈당 클램프 검사에서 인슐린 분비능의 변화는 관찰되지 않았다.

결론: 제2형 당뇨병 동물모델에서 TZD계 약물은 인슐린 감수성을 개선하고, 이차적으로 베타세포의 용적 및 형태 변화를 예방하였으며, 이 효과는 염증과 섬유화를 유발하는 PSC의 활성을 억제하여 나타나는 것으로 생각된다. 그러나 이 효과가 직접적으로 인슐린 분비능을 개선시키지는 않는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Veneman T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J: *Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. N Engl J Med* 326:22-9, 1992
2. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: *The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest* 104:787-94 1999
3. Kloppel G, Lohr M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU: *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. Surv Synth Pathol Res* 4:110-25, 1985
4. Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH: *Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. J Biol Chem*

- 273:3547-50, 1998
5. Diani AR, Sawada G, Wyse B, Murray FT, Khan M: *pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E116-22, 2004
6. Garvey WT, Olefsky JM, Griffin J, Hamman RF, Kolterman OG: *The effect of insulin treatment on insulin secretion and insulin action in type II diabetes mellitus. Diabetes* 34:222-34, 1985
7. Matsuda K, Okamoto Y, Tsuura Y, Kato S, Miura T, Tsuda K, Horikoshi H, Ishida H, Seino Y: *Effects of troglitazone (CS-045) on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets and HIT cells: an insulinotropic mechanism distinct from glibenclamide, Diabetologia* 38:24-30, 1995
8. Ohtani K, Shimizu H, Tanaka Y, Sato N, Mori M: *Pioglitazone hydrochloride stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells by inducing Ca^{2+} influx. Endocrinol* 150:107-11, 1996
9. de Souza CJ, Yu JH, Robinson DD, Ulrich RG, Meglasson MD: *Insulin secretory defect in Zucker fa/fa rats is improved ameliorating insulin resistance. Diabetes* 44:984-91, 1995
10. Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA: *Dose-response effect of pioglitazone on insulin sensitivity and insulin secretion in type 2 diabetes. Diabetes care* 25:517-23, 2002
11. Juhl CB, Hollingdal M, Porksen N, Prange A, Lonnqvist F, Schmitz O: *Influence of rosiglitazone treatment on beta-cell function in type 2 diabetes: evidence of an increased ability of glucose to entrain high-frequency insulin pulsatility. J Clin Endocrinol Metab* 88:3794-800, 2003
12. Sturis J, Pugh WL, Tang J, Polonsky KS: *Prevention of diabetes does not completely prevent insulin secretory defects in the ZDF rat. Am J Physiol* 269:E786-92, 1995
13. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T: *Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. Diabetes* 41:1422-8, 1992
14. Montana E, Bonner-Weir S, Weir GC: *β -cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozotocin diabetic C57BL/6 mice. J Clin Invest* 91:780-7, 1993
15. Koh EH, Kim MS, Park JY, Kim HS, Youn JY, Park HS, Youn JH, Lee KU: *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha activation prevents diabetes in OLETF rats: comparison with PPAR-gamma activation. Diabetes* 52:2331-7, 2003
16. Olefsky JM: *Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. J Clin Invest* 106:467-72, 2000
17. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS: *Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. Am J Pathol* 155:1087-95, 1999
18. Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Folsche UR, Schmidt WE: *TGF beta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. Regul Pept* 90:47-52, 2000
19. Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T: *Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma block activation of pancreatic stellate cells. J Biol Chem* 277:141-7, 2002
20. Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass A, Karopka T, Gierl L, Koczan D, Thiesen HJ, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. J Cell Mol Med* 9:670-82, 2005
21. van Westerloo DJ, Florquin S, de Boer AM, Daalhuisen J, de Vos AF, Bruno MJ, van der Poll T: *Therapeutic effects of troglitazone in experimental chronic pancreatitis in mice. Am J Pathol* 166:721-8, 2005
22. Im SS, Kim JW, Kim TH, Song XL, Kim SY, Kim HI, Ahn YH: *Identification and characterization of peroxisome proliferator response element in the mouse GLUT2 promoter. Exp Mol Med* 37:101-10, 2005
23. Braissant O, Fufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W: *Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR- α , - β and - γ in the adult rat. Endocrinology* 137:354-66, 1996

24. Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J: *Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in normal human pancreatic islet cells. Diabetologia 43:1165-9, 2000*
25. Nakamichi Y, Kikuta T, Ito E, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Ishida H, Nagamatsu S: *PPAR- γ overexpression suppresses glucose-induced proinsulin biosynthesis and insulin release synergistically with pioglitazone in MIN6 cells. Biochem Biophys Res Commun. 306:832-6, 2003*
26. Ovalle F, Bell D: *Effect of rosiglitazone vs insulin on pancreatic beta cell function of subjects with type 2 diabetes mellitus. Diabetes 52:Suppl. 1:A130, 2003*
27. Zhang B, Saku K, Arakawa K: *Quantification of the effects of troglitazone on insulin sensitivity and beta-cell function in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: a minimal model analysis. Metabolism 46:273-81, 1997*
28. Kim SH, Abbasi F, Chu JW, McLaughlin TL, Lamendola C, Polonsky KS, Reaven GM: *Rosiglitazone reduces glucose-stimulated insulin secretion rate and increases insulin clearance in nondiabetic, insulin-resistant individuals. Diabetes 54:2447-52, 2005*