

INS-1 세포에서 소포체스트레스에 대한 만성 고농도 포도당의 효과

계명대학교 의과대학 내과학교실, 경북대학교 의과대학 내과학교실¹

김미경 · 서혜영¹ · 윤태승 · 김남경 · 하유진 · 김윤정 · 조호찬 · 장영운 · 김혜순 · 류성열 · 이인규¹ · 박근규

The Effect of Chronic High Glucose Concentration on Endoplasmic Reticulum Stress in INS-1 Cells

Mi Kyung Kim, Hye Young Seo¹, Tae Sung Yun, Nam Kyung Kim, Yu Jin Hah, Yun Jung Kim, Ho Chan Cho, Young Yun Jang, Hye Soon Kim, Seong Yeol Ryu, In Kyu Lee¹, Keun Gyu Park

Department of Internal Medicine, Keimyung University School of Medicine; and
Department of Internal Medicine, Kyungpook National University School of Medicine¹

Abstract

Background: The highly developed endoplasmic reticulum (ER) structure is one of the characteristic features of pancreatic β -cells. Recent study showed that ER stress causes β -cell dysfunction. However, little is known about the effects of high glucose concentration on induction of ER stress in pancreatic β -cells. Therefore, this study was designed to evaluate whether exposure of high glucose concentration in rat insulinoma cell line, INS-1 cell induces ER stress and whether ER stress decreases insulin gene expression.

Methods: The effect of 30 mM glucose on insulin expression and secretion in INS-1 cells was evaluated by Northern blot analysis and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Cell viability was evaluated by XTT assay. The effect of 30 mM glucose on phosphorylation of eIF2 α and CHOP expression, which are markers of ER stress were evaluated by Western blot analysis. RT-PCR analysis was performed to determine whether high glucose concentration induces XBP-1 splicing. To investigate whether ER stress decreases insulin gene expression, the effect of tunicamycin on insulin mRNA expression was evaluated by Northern blot analysis.

Results: The prolonged exposure of INS-1 cells with the 30 mM glucose concentration decreased insulin mRNA expression in a time dependent manner and impaired GSIS while did not influence on cell viability. 30 mM glucose increased phosphorylation of eIF2 α , XBP-1 splicing and CHOP expression in INS-1 cells. Tunicamycin-treated INS-1 increased XBP-1 splicing and decreased insulin mRNA expression in a dose dependent manner.

Conclusion: This study showed that prolonged exposure of INS-1 with high glucose concentration induces ER stress and ER stress decreases insulin gene expression. Further studies about underlying molecular mechanism by which ER stress induces β -cell dysfunction are needed. (KOREAN DIABETES J 32:112~120, 2008)

Key Words: Diabetes, Endoplasmic reticulum stress, Hyperglycemia, INS-1 cell, Insulin

접수일자: 2007년 11월 13일, 통과일자: 2008년 3월 24일, 책임저자: 박근규, 계명대학교 의과대학 내과학교실

* 본 연구는 2007년 대한당뇨병학회 연구비(제14회 바이엘 연구비)의 보조를 받았음.

서 론

소포체는 호르몬과 같은 단백질을 분비하는 내분비세포에서 잘 발달해있다. 대부분의 단백질은 3차 혹은 4차 구조가 되어야 제 기능을 할 수 있는 활성형 단백질이 되는데 리보솜에서 만들어진 단순한 아미노산 서열 상태의 펩타이드는 소포체에서 폴딩(folding)과 조립(assembly), 당화(glycation) 및 이황화결합(disulfide bond) 등의 과정을 통해 활성형 단백질 구조가 된다. 이밖에도 소포체는 세포 내 칼슘 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다^{1,2)}. 그러나 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈 되면 소포체기능에 장애가 발생하는데 이를 소포체스트레스(ER stress)라고 한다^{2,4)}. 소포체스트레스가 발생하면 세포는 생존하기 위해 자가 방어기전을 가지는데 이를 소포체스트레스반응(ER stress response)이라고 하고 소포체 막에 존재하는 세 가지의 신호전달체계인 pancreatic ER kinase (PERK), inositol-requiring 1 α (IRE-1 α)/X-box binding protein 1 (XBP-1) 및 activating transcription factor 6 (ATF6)에 의해 매개된다.

췌장베타세포는 소포체가 잘 발달되어 있는 것이 중요한 특징 중의 하나이다. 활성형 인슐린이 만들어지기 위해서는 전전구인슐린(preproinsulin)이 소포체에서 번역 후 수정(posttranslational modification)의 과정을 통해 이황화결합(disulfide bond)을 이룬 전구인슐린(proinsulin)으로 바뀌고 이후 C-펩타이드가 분리되어야 한다^{5,6)}. 따라서 소포체는 췌장베타세포가 활성형 인슐린을 만들고 분비하는데 아주 중요한 기능을 함을 알 수 있다.

최근의 여러 연구들은 췌장베타세포의 기능 장애 유발과 제2형 당뇨병의 발병에 소포체스트레스의 증가가 중요한 역할을 함을 보고하고 있다⁷⁻⁹⁾. Harding 등⁸⁾은 소포체 막단백질인 PERK와 아미노산 합성(translation)의 시작과 관련된 인자인 eIF2 α 유전자의 돌연변이를 유발한 마우스에서 췌장베타세포의 기능이상과 자멸사가 유발됨을 보고하였다. 또한 Oyadomari 등⁹⁾은 인슐린-2 유전자의 96번째 아미노산인 시스테인을 타이로신으로 치환(Cys96Tyr)시킬 경우 인슐린의 이황화결합이 되지 않고 췌장베타세포의 소포체스트레스가 증가하여 세포자멸사가 발생함을 보고하였다. 그러나 현재까지 고혈당에 의한 포도당독성이 췌장베타세포에서 소포체스트레스를 유발하는지와 소포체스트레스가 인슐린 유전자의 발현에 미치는 효과에 대한 연구는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구자들은 고혈당이 쥐의 인슐린종 세포주

(rat insulinoma cell line, INS-1 cell)에서 소포체스트레스를 유발하는지와 소포체스트레스 유발이 인슐린유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보았다.

대상 및 방법

1. 재료

웨스턴 블롯에 사용한 p-eIF2 α 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA)에서 구입하였고, CHOP 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서, rabbit 항체는 Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)에서 구입하였다. 방사선 표지 소식자(radiolabelled probe, [α -³²P]dCTP)는 Amersham Bioscience에서 구입하였다.

2. 세포 배양

쥐의 인슐린종 세포주인 INS-1 세포는 계대 번호가 20에서 30번 사이의 것을 사용하였고, RPMI 1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 배지에 10% 소혈청(fetal bovine serum), 1 mM pyruvate, 10 mM HEPES, 50 mM 2-mercaptoethanol, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 혼합하여 5% CO₂ -95% air, 37°C에서 배양하였다. 배양액은 3~4일 간격으로 교대하였고 trypsin-EDTA로 계대배양 하였다.

3. 노던 블롯(Northern Blot) 분석

노던 블롯에 사용된 인슐린에 대한 방사선 표지 소식자는 [α -³²P]dCTP를 이용한 임의 프라이머 라벨링법(Amersham, Arlington Heights, IL)으로 제작하였다. 방사선 표지 소식자는 NAP-1 칼럼(Pharmacia, Uppsala, Sweden)으로 정제하였다. 노던 블롯에 사용된 RNA는 Trizol 용액(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 추출하였고 20 μ g의 RNA를 1% 포름알데하이드-아가로스 겔에서 전기영동을 시행한 후 나일론 막으로 이동시켰다. 나일론 막을 방사선 표지 소식자와 함께 Express HybTM 용액에서 2시간동안 65°C에서 보합결합(hybridization) 시킨 후 mRNA발현을 밀도계측기(densitometer)를 이용하여 분석하였다.

4. 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석

IPH완충액(5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 100 μ M PMSF)에 1 μ g/mL 단백질 분해효소 억제제, 1 mM DTT를 첨가하여 전체 단백질을 용해시켰다. 용해된 세포를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취하여 전체 단백질을 분리하였다.

각 시료를 시료 완충액과 섞어 5분간 끓인 후 얼음위에서 식히고 SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하여 크기별로 분리한 후 Immobilon-P transfermembrane (Millipore, Billerica, MA)으로 전기를 이용하여 옮겼다. 차단 완충액(blocking buffer)으로 차단시키고 각각의 일차항체와 반응하였다. 이후 다시 horseradish peroxidase-conjugated 이차 항체에 반응시킨 후 ECL plus (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK)를 사용하여 발색시켰다. Membrane을 actin 항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

5. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)

각 조건에 따라 배양한 INS-1 세포에서 Trizol용액 (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 추출하고, 총 RNA (2 µg)와 first-strand cDNA kit (Fermentas, Hanover, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. mRNA의 발현정도는 β -actin과 비교하여 보정하였다. RT-PCR에 사용된 primer는 다음과 같다: XBP-1, 5'-AAA CAG AGT AGC AGC GCA GAC TGC-3' (forward) and 5'-GGA TCT CTA AAA CTA GAG GCT TGG TG-3' (reverse) β -actin, 5'-GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC-3' (forward), and 5'-CGA TTT CCC GCT CCG TGG-3' (reverse). PCR조건은 92°C에서 3분간 denature 시킨 후 92°C, 52°C, 72°C에서 각각 45초로 40회 반복하고 마지막으로 72°C에서 10분간 유지 후 4°C로 냉각시켰다. PCR product는 제한효소(Pst1)를 처리하여 37°C에서 5시간 반응한 후 2% 아가로스 겔에서 전기영동 하였다.

6. XTT 분석

INS-1 세포를 96 well plate에 well당 1×10^3 cells/100 µL가 되도록 배양한 후 30 mM 포도당을 처리한 다음 48시간, 96시간 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 모두 제거하고 실험당일 제조한 XTT working solution (WEL GENE, Seoul, Korea)을 배양용기에 주입하여 2시간에서 4시간 동안 배양한 다음 450 nm와 690 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

7. 인슐린분비 측정

INS-1 세포를 12-well plate에 분주하여 5 mM과 30 mM 포도당을 함유한 배지에서 96시간 배양 후 Krebs's ringer buffer (114 mM NaCl, 4.4 mM KCL, 1 mM MgSO₄, 1.28 mM CaCl₂, 29.5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.1% BSA, pH 7.4)로 2회 세척하고 5 mM 포도

당을 함유한 KRBB로 5시간 동안 배양하였다. 포도당 5 mM 과 16.7 mM을 함유한 KRBB로 교체하고 1시간 배양 후, 상층액을 취하여 rat insulin RIA kit로 측정하였다.

8. 통계학적인 처리

결과들은 평균 \pm 표준오차로 표시하고, 변수의 분석들은 student T-test를 사용하였다. P값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의 하다는 판정을 하였으며, 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 실시하여 통계 처리를 하였다.

결 과

1. 고농도 포도당이 인슐린 mRNA 발현에 미치는 효과

고농도 포도당이 인슐린 mRNA의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 INS-1 세포를 30 mM 농도의 포도당에 24, 48, 72 및 96시간별로 배양하고 인슐린 mRNA의 발현변화를 노던 블롯을 통해 확인하였다. 기저농도 포도당(5 mM) 조건에서 인슐린 mRNA는 높게 발현이 되었고 이전 연구를 통해 5 mM 농도의 포도당으로 96시간동안 배양할 경우 인슐린유전자의 발현에는 변화가 없었음을 확인하였다¹⁰⁾. 그러나 INS-1 세포를 30 mM 농도의 포도당에 노출시킨 후 24시간째 인슐린 mRNA의 발현이 감소하였고 시간이 지날수록 점차 감소하여 96시간째에는 인슐린 mRNA의 발현이 거의 발현이 되지 않았다(Fig. 1A, 1B). 다음으로 INS-1 세포가 만성적으로 고농도 포도당에 노출되었을 때 인슐린분비에 미치는 효과를 알아보기 위해 포도당 자극 인슐린분비(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)를 측정하였다. 정상 포도당 농도에서 배양된 INS-1 세포는 16.7 mM 포도당 농도에 인슐린분비가 현저하게 증가되었으나 96시간 동안 30 mM 농도의 포도당에 배양한 INS-1 세포는 16.7 mM의 포도당자극에 인슐린분비 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 1C). 고농도 포도당 노출이 INS-1 세포의 세포사멸(apoptosis)에 미치는 영향을 XTT 분석을 통해 알아본 결과 30 mM 포도당에 96시간까지 노출되더라도 INS-1 세포 생존력에는 영향을 주지 않았다(Fig. 1D).

2. 고농도 포도당이 eIF2 α 인산화에 미치는 효과

고농도 포도당이 췌장베타세포에서 소포체스트레스를 유발하는지를 알아보기 위해 INS-1 세포를 30 mM 농도의 포도당에 24, 48, 72 및 96시간별로 배양하고 소포체스트레스 반응을 매개하는 PERK 신호전달체계의 하부신호단체인 eIF2 α 의 인산화 정도를 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 기

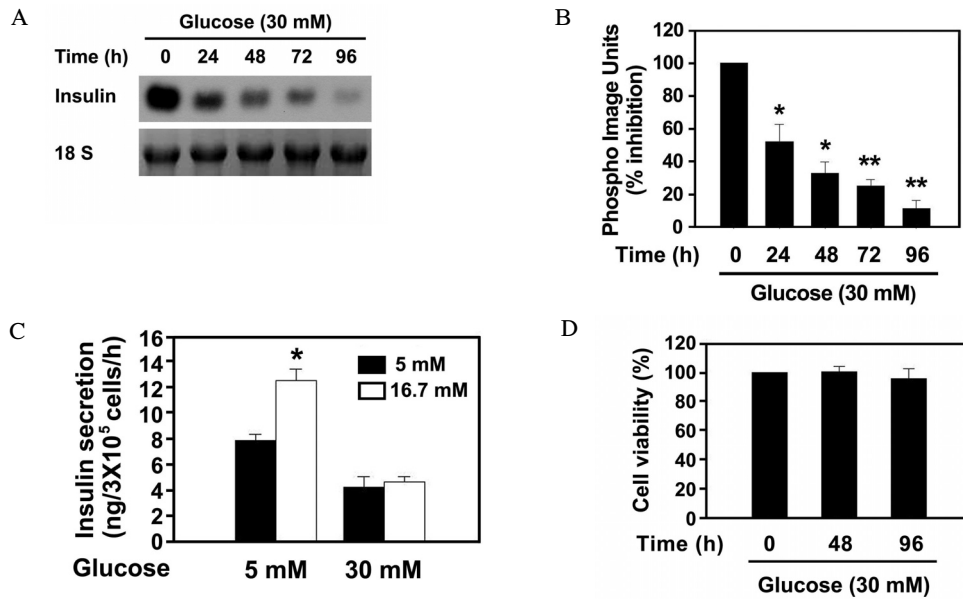


Fig. 1. Effect of high glucose concentration on insulin mRNA expression. A. Northern blot analysis of insulin expression in the presence of high glucose. INS-1 cells were incubated with 30 mM glucose for increasing lengths of time, and mRNAs of the insulin gene were examined. 18S rRNA levels were analyzed as an internal control. B. Data represents the means \pm SE of three independent measurements. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ compared to 0 h. C. Effect of chronic exposure to high glucose on glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). INS-1 cells were incubated with 5 mM and 30 mM glucose for 96 h, and then GSIS was measured as described in methods. * $P < 0.01$ compared to 5 mM glucose. D. INS-1 cells were treated with 30 mM glucose for increasing lengths of time and cell viability was determined by XTT assay.

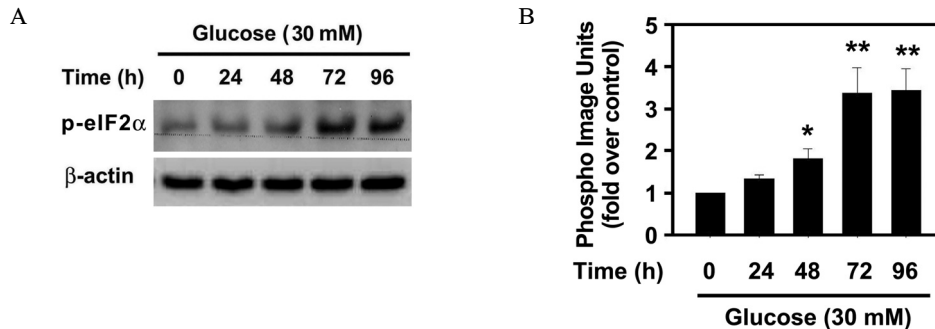


Fig. 2. Effect of high glucose concentration on phosphorylation of eIF2 α . A. Western blot analysis of phosphorylated eIF2 α in the presence of high glucose. INS-1 cells were incubated with 30 mM glucose for the indicated times. β -actin protein levels were analyzed as an internal control. B. Data represents the means \pm SE of three independent measurements. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ compared to 0 h.

저농도의 포도당 조건에서 eIF2 α 의 인산화는 약하게 측정되었으나 30 mM의 포도당에 노출시킨 후 eIF2 α 의 인산화는 시간이 지남에 따라 증가하였다(Fig. 2).

3. 고농도 포도당이 XBP-1 Splicing에 미치는 효과

고농도 포도당이 소포체스트레스반응을 매개하는 IRE1

신호전달체계의 활성을 유발하는지를 알아보기 위해 INS-1 세포를 30 mM 농도의 포도당에 배양하고 XBP-1의 splicing이 유발되는지를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 기저 농도의 포도당 조건에서 XBP-1의 splicing은 미약하게 일어났으나 30 mM 농도의 포도당에 배양 후 24시간에 XBP-1의 splicing이 증가하였고 이후 XBP-1의 splicing의

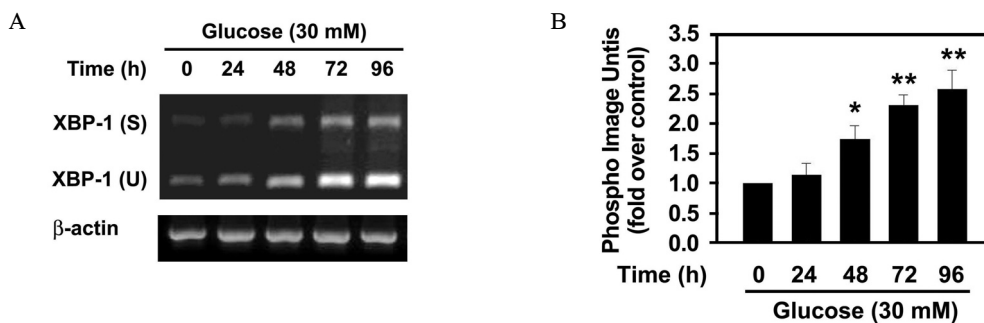


Fig. 3. Effect of high glucose concentration on XBP-1 splicing. A. RT-PCR analysis of XBP-1 splicing in the presence of high glucose. INS-1 cells were incubated with 30 mM glucose for the indicated time and mRNA levels at each time point were assessed. β -actin mRNA levels were analyzed as an internal control. B. Data represents the means \pm SE of three independent measurements. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ compared to 0 h.

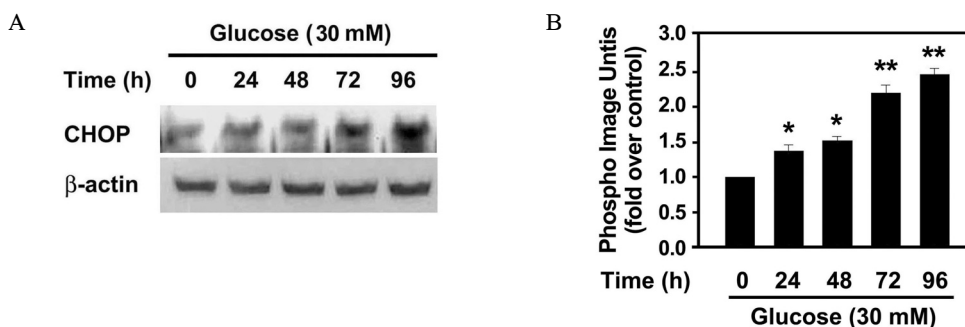


Fig. 4. Effect of high glucose concentration on CHOP expression. A. Western blot analysis of CHOP in the presence of high glucose. INS-1 cells were incubated with 30 mM glucose for the indicated times. B. Data represents the means \pm SE of three independent measurements. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$ compared to 0 h.

증가가 96시간까지 유지되었다(Fig. 3).

4. 고농도 포도당이 CHOP 발현에 미치는 효과

다음으로 고농도 포도당이 소포체스트레스반응에 의한 세포자멸사를 유발하는 CHOP의 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. CHOP의 단백 발현 또한 저농도의 포도당 조건에서는 약하게 발현되었으나 30 mM 농도의 포도당에 노출시킨 후 24시간째에 증가하여 96시간까지 지속되었다(Fig. 4).

5. ER Stress 유발이 인슐린유전자의 발현에 미치는 효과

췌장베타세포에 소포체스트레스의 유발이 인슐린유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 소포체스트레스를 유발하는 물질인 tunicamycin을 INS-1 세포에 처리하고 인슐린 mRNA의 발현변화를 노던 블롯을 통해 알아보았다. INS-1 세포에 tunicamycin을 처리할 경우 XBP-1의 splicing

이 일어나는 것을 통해 소포체스트레스가 유발된 것을 확인하였다. INS-1 세포에 tunicamycin을 처리할 경우 인슐린 mRNA의 발현이 농도 의존적으로 현저히 감소하였다(Fig. 5).

고 찰

최근의 연구를 살펴보면 당뇨병을 유발하는 다양한 위험 인자들이 췌장베타세포에서 소포체스트레스를 유발함을 알 수 있다¹¹⁻¹⁴). Laybutt 등¹¹)은 마우스의 인슐린종 세포주인 MIN6 세포에 포화지방산인 palmitate를 처리할 경우 소포체스트레스가 발생하여 췌장베타세포의 세포자멸사를 유도한다고 보고하였다. Oyadomari 등¹²)은 과다한 산화질소가 소포체 내의 칼슘을 고갈시켜 소포체스트레스가 유발하고 CHOP의 발현을 유도함으로써 췌장베타세포의 자멸사가 일어남을 보고 하였다. Cardozo 등¹³)은 IL-1 β 와 IFN- γ 와 같은 1형 시토키인이 sacroendoplasmic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b (SERCA2b)의 발현을 감소시켜 소포체의 칼슘

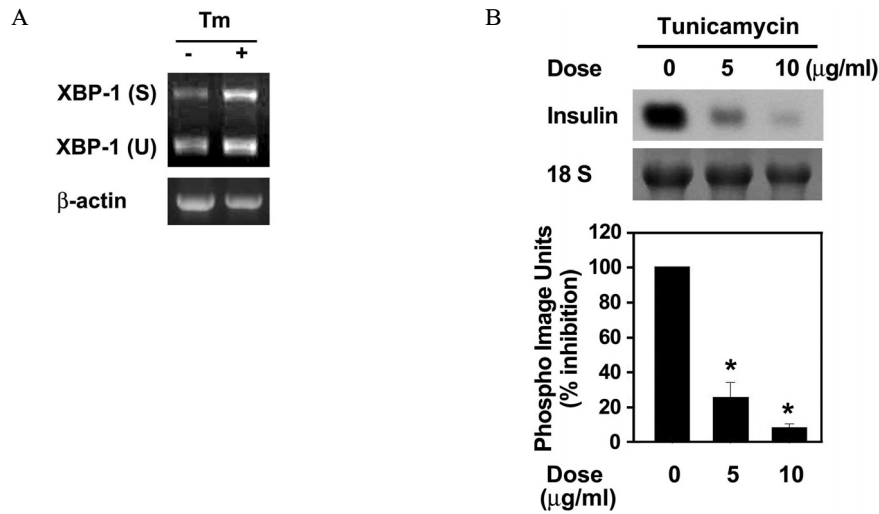


Fig. 5. Effect of tunicamycin on insulin mRNA expression. A. RT-PCR analysis of XBP-1 splicing in the presence of tunicamycin. INS-1 cells were incubated with 10 ug/mL of tunicamycin for 24 h. β -actin mRNA levels were analyzed as an internal control. B. Northern blot analysis of insulin mRNA expression in cells treated with tunicamycin. INS-1 cells were incubated with indicated concentrations of tunicamycin for 24 h. 18S rRNA levels were analyzed as an internal control. Data represents the means \pm SE of three independent measurements (lower panel). * $P < 0.001$ compared to untreated cells.

을 고갈시키고 소포체스트레스반응에 작용하는 IRE1 α , PERK 및 CHOP의 발현을 증가시킨다고 보고하였다. 또한, Wang 등¹⁴⁾은 만성적인 고혈당이 소포체스트레스를 일으키고 sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c)를 활성화시켜 당지질독성이 유발됨을 보고하였다.

본 연구에서 INS-1 세포에 고농도 포도당을 노출시킬 경우 소포체스트레스 표지자인 eIF2 α 의 인산화, XBP-1 splicing과 CHOP의 발현이 증가되는 것을 관찰함으로써 고농도 포도당이 베타세포에서 소포체스트레스를 유발함을 알 수 있었다. 고농도 포도당이 베타세포에서 소포체스트레스를 유발하는 가능성이 있는 기전으로 고농도 포도당에 의한 산화스트레스의 증가를 들 수 있다. Xue 등¹⁵⁾의 연구에 의하면 murine fibrosarcoma L929 세포에서 종양괴사인자- α 에 의해 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 축적되고 활성 산소종에 의존적으로 eIF2 α 인산화, ATF6, XBP-1 splicing이 증가함을 보여주었다. 그러나 H₂O₂나 arsenite에 의한 산화 스트레스에는 eIF2 α 인산화만 유도됨이 관찰되어 각각의 산화 스트레스가 특이적으로 하부 소포체스트레스 신호 전달체계에 영향을 줄 수 있음을 보고하였다. 반대로 소포체스트레스가 산화스트레스를 유발한다는 보고도 있는데, Hsieh 등¹⁶⁾은 마우스 NIH3T3 세포에 소포체스트레스를 유발하는 tunicamycin과 thapsigargin을 처리하였을 때 산화스트레스가 유도 되는 것을 확인하였다.

본 연구에서는 tunicamycin을 사용하여 INS-1 세포에서 소포체스트레스를 유발할 경우 인슐린유전자의 발현이 감소되는 것을 확인하였는데 최근 연구를 살펴보면 소포체스트레스가 인슐린유전자의 발현에 중요한 영향을 주는 기전으로 IRE1의 활성화가 관여함을 알 수 있다^{17,18)}. Lipson 등¹⁷⁾은 베타세포가 고농도 포도당에 만성적으로 노출될 경우 소포체스트레스가 유발되고 IRE1의 활성화 및 인슐린유전자의 발현이 억제됨을 증명함으로써 소포체스트레스 발생 시 활성화된 IRE1 신호전달체계가 인슐린 생합성 조절에 있어 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다. 또한 Pirot 등¹⁸⁾은 소포체스트레스 유발 물질인 cyclopiazonic acid (CPA)를 투여하고 인슐린유전자의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. INS-1 세포에 CPA를 투여하였을 때 인슐린유전자의 전사활성(transcription)에는 영향이 없지만 인슐린 mRNA의 안정성(stability)이 감소하고 이와 동시에 XBP-1 splicing이 증가하는 것을 보여 줌으로써 소포체스트레스에 의한 인슐린유전자의 발현 감소에 IRE1/XBP-1 경로의 활성화가 관여함을 보고하였다. IRE1/XBP-1 경로 이외에도 소포체 막 단백질인 SREBP-1c가 소포체스트레스가 포도당-지질 독성을 매개함이 보고되었다. Wang 등¹⁴⁾의 연구를 살펴보면 INS-1 세포를 고혈당 조건에서 배양하였을 때 세포 내 지질이 축적되고 포도당 자극 인슐린분비의 감소, IRS2, Pdx 1 유전자 발현 감소와 세포자멸사가 증가함을 알 수 있다. 이의 기

전으로는 고농도 포도당에 의한 소포체스트레스 증가가 지질합성에 중요한 전사인자인 SREBP-1c가 소포체 막에서 활성화되어 핵 내로 이동함으로써 지질 독성을 유발하기 때문이라고 하였다. 이상의 연구결과는 비록 세포수준에서 증명된 것이긴 하나 만성적인 고혈당 상태는 소포체스트레스를 유발하고 베타세포에서 소포체스트레스가 유발되면 인슐린 발현에 장애가 발생할 수 있음을 보여 주고 있다.

소포체의 기능이 심각하게 손상되면 개체를 보호하기 위해서 세포사멸 과정이 작동하여 손상된 세포를 제거 한다²⁾. 이 과정은 C/EBP family에 속하는 C/EBP homologous protein (CHOP) 유전자의 활성화에 의해 이루어진다. CHOP 유전자의 전사활성은 소포체스트레스반응 시 나타나는 상위의 신호전달체계인 PERK¹⁹⁾, ATF6²⁰⁾ 및 Ire1²¹⁾의 조절을 받는다. CHOP^{-/-} 세포는 소포체스트레스 유도 세포사멸에 저항적이며^{22,23)} CHOP 과발현은 세포사멸을 촉진한다¹²⁾. Oyadomari 등^{9,24)}은 Akita mouse를 통하여 이항화결합이 되지 않은 전구인슐린이 췌장베타세포의 소포체에 과부하되면 소포체스트레스가 유발되고 CHOP의 발현이 유도되어 세포사멸사가 일어남을 보고하였다. 본 연구에서 INS-1 세포를 고농도 포도당에 노출시켰을 때 CHOP의 발현은 증가하였으나 자멸사에는 영향이 없었다. 그러나 Mohanty 등²⁵⁾의 연구에서 INS-1 세포를 33.3 mM 포도당에 4일간 배양하였을 때 5.5 mM 포도당에서 배양하였을 때 보다 세포사멸사가 약 3배 정도 증가한 것을 관찰할 수 있다. 따라서 좀 더 장기간 고농도 포도당에 INS-1 세포를 노출시킬 경우 세포사멸사가 일어나는지와 이때 세포사멸사가 소포체스트레스와의 상관성, 특히 CHOP과 관련이 있는지를 알아보는 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

결론적으로 본 연구를 통해 INS-1 세포에 고농도 포도당을 노출시킬 경우 소포체스트레스가 유발되고 인슐린유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 또한 INS-1세포에 소포체스트레스를 증가시킬 경우 인슐린유전자의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 따라서 향후 동물실험을 통해 고혈당이 췌장 베타세포에서 소포체스트레스를 증가시키는지 확인하고 어떠한 기전으로 소포체스트레스가 인슐린유전자의 발현 감소 및 베타세포의 사멸 등에 영향을 주는지에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 최근의 연구들은 췌장베타세포의 기능장애 유발과 제2형 당뇨병의 발병에 소포체스트레스의 증가가 중요

한 역할을 함을 보여주고 있다. 그러나 현재까지 고혈당에 의한 포도당 독성이 췌장베타세포에서 소포체스트레스를 유발하는지와 소포체스트레스가 인슐린유전자의 발현에 미치는 효과에 대한 연구는 미진한 상태이다. 따라서 본 연구자들은 고혈당이 쥐의 인슐린종 세포 주에서 소포체스트레스를 유발하는지와 소포체스트레스 유발이 인슐린유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보았다.

방법: 쥐의 인슐린종 세포주인 INS-1 세포를 고농도 포도당에 노출시켰을 때 인슐린 발현과 포도당 자극 인슐린분비에 미치는 효과를 측정하였다. 고농도 포도당이 INS-1 세포의 사멸에 미치는 영향은 XTT 분석을 통해 확인하였다. 고농도 포도당이 INS-1 세포에서 소포체스트레스를 유발하는 지를 eIF2 α 의 인산화 정도와 CHOP의 발현 변화를 웨스턴 블롯을 통해 확인하고 XBP-1의 splicing을 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다. 소포체스트레스의 유발이 인슐린유전자 발현에 미치는 영향 알아보기 위해 INS-1 세포에 tunicamycin을 처리하고 인슐린 mRNA의 변화를 노던 블롯을 통해 확인하였다.

결과: INS-1 세포에 고농도 포도당을 처리하였을 때 인슐린 mRNA 발현은 시간이 지날수록 감소하였으며 포도당 자극에 의한 인슐린분비가 증가되지 않았다. 그러나 고농도 포도당의 노출에 의해 INS-1 세포의 생존력은 변화가 없었다. INS-1 세포에 고농도 포도당을 처리하였을 때 eIF2 α 의 인산화와 CHOP 단백질의 발현이 시간이 경과함에 따라 증가하였다. XBP-1의 splicing 또한 고농도의 포도당에 의해 증가하였다. INS-1 세포에 tunicamycin을 처리할 경우 인슐린 mRNA 발현은 tunicamycin의 농도에 비례하여 감소하였다.

결론: INS-1 세포가 고농도 포도당에 노출될 경우 소포체스트레스가 유발되고 인슐린유전자의 발현이 감소하였다. INS-1 세포에 소포체스트레스를 증가시킬 경우 인슐린유전자의 발현이 감소하였다. 향후 고농도 포도당에 의한 소포체스트레스의 발생기전과 소포체스트레스에 의한 인슐린유전자의 발현 감소 기전에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Schröder M, Kaufman RJ: *The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem* 74:739-89, 2005
2. Oyadomari S, Araki E, Mori M: *Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic β -cell. Apoptosis* 7:335-45, 2002

3. Mori K: *Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum*. *Cell* 101:451-4, 2000
4. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM: *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3:411-21, 2002
5. Kenneth LB: *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. 3rd ed. P 1296, Philadelphia, W.B. Saunders, 2001
6. Dodson G, Steiner D: *The role of assembly in insulin's biosynthesis*. *Curr Opin Struct Biol* 8:189-94, 1998
7. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS: *Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes*. *Science* 306:457-61, 2004
8. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D: *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in Perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival*. *Molecular Cell* 7:1153-63, 2001
9. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M: *Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes*. *J Clin Invest* 109:525-32, 2002
10. Park KG, Lee KM, Seo HY, Suh JH, Kim HS, Wang L, Won KC, Lee HW, Park JY, Lee KU, Kim JG, Kim BW, Choi HS, Lee IK: *Glucotoxicity in the INS-1 rat insulinoma cell line is mediated by the orphan nuclear receptor small heterodimer partner*. *Diabetes* 56:431-7, 2007
11. Laybutt DR, Preston AM, Akerfeldt MC, Kench JG, Busch AK, Biankin AV, Biden TJ: *Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes*. *Diabetologia* 50:752-63, 2007
12. Oydomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M: *Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic β cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10845-50, 2001
13. Cardozo AK, Ortis F, Storling JS, Feng YM, Rasschaert J, Tonnesen MT, Eylon FV, Mandrup-Poulsen T, Herchuelz A, Eizirik DL: *Cytokines Downregulate the Sarcoendoplasmic Reticulum Pump Ca2ATPase 2b and Deplete Endoplasmic Reticulum Ca2, Leading to Induction of Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β -Cells*. *Diabetes* 54:452-61, 2005
14. Wang H, Kouri G, Wolheim CB: *ER stress and SREBP-1 activation are implicated in β -cell glucolipotoxicity*. *J Cell Sci* 118:3905-15, 2005
15. Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, Yagita H, Okumura K, Harding H, Nakano H: *Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNF alpha*. *J Biol Chem* 280:33917-25, 2005
16. Hsieh YH, Su IJ, Lei HY, Lai MD, Chang WW, Huang W: *Differential endoplasmic reticulum stress signaling pathways mediated by iNOS*. *Biochem Biophys Res Commun* 359:643-8, 2007
17. Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, Rossini AA, Urano F: *Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1*. *Cell metabolism* 4:245-54, 2006
18. Pirot P, Naamane N, Libert F, Magnusson NE, Orntoft TF, Cardozo AK, Eizirik DL: *Global profiling of genes modified by endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta cells reveals the early degradation of insulin mRNAs*. *Diabetologia* 50:1006-14, 2007
19. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, David R: *Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response*. *Molecular cell* 5:897-904, 2000
20. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K: *ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y(CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response*. *Molecular and Cellular Biology* 20:6755-67, 2000
21. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM,

- Kuroda M, Ron D: *Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress response: EMBO* 19:5708-17, 1998
22. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D: *CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev* 12:982-95, 1998
23. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ: *Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol Cell Biol* 21:1249-59, 2001
24. Araki E, Oyadomari S, Mori M: *Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic β -cells and diabetes mellitus. Exp Biol Med* 228:1213-17, 2003
25. Mohanty S, Spinas GA, Maedler K, Zuellig RA, Lehmann R, Donath MY, Trüb T, Niessen M: *Overexpression of IRS2 in isolated pancreatic islets causes proliferation and protects human beta-cells from hyperglycemia-induced apoptosis. Exp Cell Res* 1:68-78, 2005