

## 2-deoxy-D-glucose에 의해 유도된 소포체 스트레스에서 글루카곤양 펩티드-1의 HIT-T15 베타세포 사멸 보호효과

울지대학교 의과대학 생화학교실, 울지대학병원 내분비내과<sup>1</sup>

김주영 · 이성규 · 백행운 · 이기호 · 김현진<sup>1</sup> · 박강서<sup>1</sup> · 김병준<sup>1</sup>

Protective Effects of Glucagon Like Peptide-1 on HIT-T15  $\beta$  Cell Apoptosis *via* ER Stress Induced by 2-deoxy-D-glucose

Ju-Young Kim, Seong-Kyu Lee, Haing-Woon Baik, Ki-Ho Lee, Hyun-Jin Kim<sup>1</sup>, Kang-Seo Park<sup>1</sup>, Byung-Joon Kim<sup>1</sup>

Department of Biochemistry and Molecular Biology Eulji University School of Medicine,

Division of Endocrinology<sup>1</sup>, Department of Internal Medicine, Eulji University School of Medicine

### Abstract

**Background:** The characteristic feature of pancreatic  $\beta$  cells is highly developed endoplasmic reticulum (ER) due to a heavy engagement in insulin secretion. The ER serves several important function, including post-translational modification, folding, and assembly of newly synthesized secretory proteins, and its proper function is essential to cell survival. Various stress conditions can interfere with ER function. Pancreatic  $\beta$  cells may be particularly vulnerable to ER stress that causes to impair insulin biosynthesis and  $\beta$  cell survival through apoptosis. Glucagon like peptide-1 (GLP-1) is a new drug for treatment of type 2 diabetes and has effects on stimulation of insulin secretion and  $\beta$  cell preservation. Also, it may have an antiapoptotic effect on  $\beta$  cells, but detailed mechanisms are not proven. Therefore, we investigated the protective mechanism of GLP-1 in  $\beta$  cells through ER stress response induced by 2-deoxy-D-glucose (2DG).

**Methods:** For induction of the ER stress, HIT-T15 cells (hamster  $\beta$  cell line) were treated with 2DG (10 mM). Apoptosis was evaluated with MTT assay, hoechst 33342 staining and Annexin/PI flow cytometry. Expression of ER stress-related molecules was determined by real-time PCR or western blot. For blocking ER stress, we pretreated HIT-T15 cells with exendin-4 (Ex-4; GLP-1 receptor agonist) for 1 hour before stress induction.

**Results:** After induction with ER stress (2DG),  $\beta$  cells were lost by apoptosis. We found that Ex-4 had a protective effect through ER stress related molecules (GRP78, GRP94, XBP-1, eIF2 $\alpha$ , CHOP) modulation. Also, Ex-4 recovered the expression of insulin2 mRNA in  $\beta$  cells.

**Conclusion:** These results suggest that GLP-1 may protect  $\beta$  cells apoptosis through ER stress modulation. (KOREAN DIABETES J 32:477-487, 2008)

**Key Words:** Apoptosis,  $\beta$  cells, ER stress, Exendin-4, GLP-1, Protective effect

접수일자: 2008년 9월 24일, 통과일자: 2008년 11월 20일, 책임저자: 김병준, 울지대학병원 내분비내과

\* 이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2007-313-E00228).

\* 이 논문은 2006년 대한당뇨병학회 사노피 연구비의 지원을 받아 연구되었음.

## 서 론

제2형 당뇨병은 말초조직의 인슐린저항성과 베타세포의 보상부전에 의해 발생하는 대사질환이다. 인슐린저항성이 증가된 내당능장애의 경우 베타세포에서 부족한 인슐린을 보상하기 위해 인슐린 분비가 증가되고 이와 더불어 베타세포가 증식하여 혈당의 상승을 억제하지만, 보상에 실패하여 베타세포부전이 발생하면 인슐린 분비는 감소되고, 여러 원인에 의해 증가된 세포자연사(apoptosis)로 인해 베타세포 용적( $\beta$  cell mass)이 감소하여 혈당이 증가되고 당뇨병으로의 진행이 가속화 된다<sup>1)</sup>. 이러한 베타세포부전의 정확한 원인은 알려져 있지 않으나 만성적인 고혈당으로 인한 당독성, 혈중 유리지방산 증가로 인한 지질독성 등이 원인으로 제시되고 있으며, 최근 소포체 스트레스(ER stress)의 증가 또한 이들과 함께 가능성이 높은 원인으로 제시되고 있다<sup>2-4)</sup>.

췌장 베타세포는 인슐린을 생산 분비하는 세포로, 소포체가 잘 발달되어 있는 것이 중요한 특징 중의 하나이다. 소포체는 지질과 스테롤의 합성장소이며 칼슘 저장소로 세포 내 칼슘 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 또한 mRNA에서 생산된 단백질을 번역 후 수정(posttranslational modification) 과정 즉, 폴딩과 조립, 당화 및 이황화결합 등의 과정을 통해 활성형 단백질 구조로 만드는 곳으로, 인슐린을 합성, 분비하는 베타세포에서 소포체는 중요한 기능을 하고 있다. 제2형 당뇨병의 전단계인 내당능장애에서 말초조직에서의 인슐린저항성을 극복하고 정상혈당을 유지하기 위해 고인슐린혈증이 관찰된다. 장기적인 인슐린저항성이 있는 경우 포도당 대사의 항상성을 유지하기 위해 인슐린 합성이 지속적으로 증가하게 되고 이로 인하여 소포체 내로 인슐린 전구체의 유입이 증가하여 소포체 스트레스가 발생하게 된다<sup>5)</sup>. 따라서 소포체의 원활한 기능은 베타세포의 기능 유지에 중요한 역할을 할 것이고, 소포체 스트레스의 발생은 베타세포의 기능에 영향을 주어 당뇨병을 유발시킬 수 있을 것이다.

소포체 스트레스가 발생하면 소포체 샤페론인 GRP78과 GRP94 등의 발현이 증가되어 단백질의 폴딩을 도와준다. 또한 ATF6, PERK, IRE1 $\alpha$  등이 동원되어 소포체 샤페론을 증가시키거나 단백질의 전사 감소, 또는 잘못 만들어진 단백질을 없애는 과정이 일어난다. 이러한 일련의 과정을 소포체 스트레스 반응(ER stress response)이라 하고, 소포체 스트레스가 적절히 조절되면 세포는 정상 기능을 유지하며, 이를 극복하지 못하면 세포자연사 과정이 시작된다<sup>6-8)</sup>. 최근 당뇨병 치료를 위해 소포체 스트레스에 의한 베타세포의 손

상을 예방하고 치료하는 방법이 많이 연구되고 있으나, 아직 실제 사용까지는 많은 제한을 가지고 있다.

당뇨병에 대한 새로운 치료로 췌장 이식, 줄기세포에서 베타세포로의 분화, 약물을 이용한 췌장 및 베타세포의 증식 등이 제기되고 있다. 이러한 치료 중의 한 가지가 인크레틴(incresin) 호르몬이다. 혼합 식사나 경구 포도당 투여 후에 장점막의 L세포에서 분비되는 글루카곤양 펩티드-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)은 대표적인 인크레틴 호르몬으로 알려져 있고<sup>9)</sup>, 최근 GLP-1이 인슐린의 분비와 생산뿐만 아니라 췌장의 베타세포 증식에도 영향을 준다는 연구가 많이 보고되고 있다<sup>10-12)</sup>. 도마뱀의 침샘에서 분비되는 GLP-1 수용체 자극제인 exendin-4 (Ex-4)는 체내에서 GLP-1의 불활성에 관여하는 dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)의 작용을 받지 않아 반감기가 길고, GLP-1 수용체에 결합하여 cAMP를 증가시켜 인슐린 분비 및 생산을 증가시킨다. 또한 베타세포의 증식에도 영향을 주어 당뇨병 치료가능 물질로 알려져 있다<sup>13-15)</sup>. GLP-1과 Ex-4는 인슐린의 분비와 합성, 베타세포의 증식뿐만 아니라, 베타세포의 사멸에도 관여한다고 알려져 있으나 이 기전에 대해서는 많은 논란을 가지고 있다.

일반적으로 직접적인 소포체 스트레스를 유도하는 물질로 소포체 내 glycosylation 저해제인 tunicamycin, glucosamine 이나 소포체내 칼슘 결핍을 유도하는 A23187, thapsigargin 등이 사용된다. 2-deoxy-D-glucose (2DG)는 포도당의 유도체로써 포도당 대사과정에 있어서 glycolysis를 막고, 소포체내 단백질의 glycosylation을 저해하여 소포체 스트레스를 유도하게 된다<sup>16)</sup>. 이는 고혈당이 산화스트레스를 유도하여 간접적으로 소포체 스트레스를 주는 것과는 달리 당 유도체로 직접적인 소포체 스트레스를 유도하게 된다.

따라서 본 연구에서는 2DG 처리를 통해 직접적으로 유도된 소포체 스트레스를 통한 HIT-T15 베타세포주 자연사에 있어서 Ex-4의 처리 시, 보호효과를 가지는지와 이에 따른 보호 효과의 기전을 연구하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

2-deoxy-D-glucose (2DG), MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)와 hoechst 33342는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)제품을 구입하였으며, Ex-4는 Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA), Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis

detection kit는 Beckton Dickinson Bioscience Inc. (San Jose, CA)로부터 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA 및 penicillin-streptomycin 등은 Gibco-BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Western blot을 위한 일차항체로 mouse monoclonal anti-KDEL (GRP78, GRP94; StressGen, Victoria, British Columbia, Canada), rabbit anti-eIF2 $\alpha$ , rabbit anti-Ser51 phospho specific eIF2 $\alpha$  (Cell signaling, Beverly, MA), rabbit anti-GADD 153 (CHOP) 및 anti- $\beta$ -actin (internal control) (Sigma, St. Louis, MO) 등을 사용하였고, 이차항체는 Amersham Pharmacia Biotechnology Inc. (Tokyo, Japan) 구입하여 사용하였다. 그 외 전기영동에 필요한 시약은 Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA)에서 구입하였다.

## 2. 세포주 및 배양

본 실험에는 햄스터 유래의 인슐린 분비 세포주인 HIT-T15 세포 (72~80 passage)를 사용하였다. 사용된 배지는 RPMI-1640에 10% FBS 및 100 unit/mL의 penicillin, 100 mg/mL의 streptomycin을 첨가하여 사용하였고, 95%의 습도가 유지되는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 배양하였다. 세포밀도(confluence)가 약 70~80%에 이르면 PBS로 세척하고 0.05% Trypsin을 처리하여 계대배양 하였다. 계대배양하고 2일 후에 0.5% FBS가 들어있는 RPMI-1640 배지로 교체하여 12시간 배양한 후, 주어진 시간과 농도에 따라 실험하였다.

## 3. MTT 분석을 통한 세포 생존율 측정

세포생존율을 측정하기 위하여 MTT reduction assay를 실시하였다<sup>17)</sup>. 세포주를 24-well plate에  $1 \times 10^5$  cells/mL로 분주하고, 48시간 동안 배양한 후, 2DG (10 mM)을 시간에 따라 처리하였다. Ex-4 (25 nM)는 2DG처리 1시간 전에 전처리하여 반응시킨다. 각 well에 PBS 완충액에 녹인 MTT (5 mg/mL) 용액을 첨가하여 4시간 동안 반응 후, well 바닥에 형성된 formazan이 흩어지지 않게 상등액을 제거하고 DMSO 250  $\mu$ L 첨가하여 녹이고 ELISA reader (Molecular Devices Emax, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm (ref. 650 nm)에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 세포수를 100%로 하였을 때 상대적인 세포성장 억제율을 구하였다.

## 4. Hoechst 33342 염색

6-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 48시간 동안 배양하

여 Ex-4를 1시간 동안 처리한 후, 10 mM 2DG를 주어진 시간에 따라 반응하였다. PBS 완충액으로 2회 세척하고 10% formalin을 처리하여 4시간 고정된 후 다시 PBS로 세척하고 hoechst 33342 (Sigma, MO)로 30분 동안 염색하였다. 염색 후 PBS로 세척하고 형광 현미경 (OlympusBX51; Olympus Corp., Tokyo, Japan) 하에서 400배로 관찰하였다.

## 5. Flow Cytometric Analysis

세포의 apoptosis 여부를 확인하기 위해, annexin V와 propidium iodide (PI)로 이중염색하고 flow cytometry를 이용하여 생존 세포 (annexin V-음성/ PI-음성), 초기 apoptosis 세포 (annexin V-양성/ PI-음성), 후기 apoptosis 또는 necrosis 세포 (annexin V-양성/PI-양성)로 구분하였으며, 총 apoptosis 세포는 annexin V-양성/ PI-음성 또는 양성 세포의 비율로 표시하였다<sup>18)</sup>. 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 배양하였다. Annexin V-FITC and PI apoptosis detection kit (Beckton Dickinson, San Diego, CA)를 사용하여 첨부된 설명서에 따라 이중염색을 시행하였다. 요약하면 6-well plate로부터 세포를 회수하여 원심분리 한 후, 세포 pellets을 PBS로 현탁시킨다. 다시 원심분리하여 형성된 pellets을 FITC가 결합된 annexin V와 PI 염색 용액에 재현탁시켜 암실, 실온에서 15분간 반응하였다. 염색된 세포들은 FACScan (Beckton Dickinson)으로 분석하고, Cell Quest Pro 소프트웨어로 각 사분획의 세포들을 계산하였다. 각 시료 당 10,000개의 세포를 사용하였다.

## 6. Real-time PCR

Total RNA는 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 설명서에 따라 추출하였다. 동등한 양의 total RNA는 ImProm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)와 oligo (dT)<sub>15</sub> primer (Promega)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR primer는 GenBank의 염기서열을 기준으로 100 bp 내외로 합성하였다 (Table 1). Real-time PCR은 cDNA 1  $\mu$ g, forward primer 2 pmol, reverse primer 2 pmol, SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 10  $\mu$ L를 혼합하여 총 20  $\mu$ L 반응용액으로 Opticon System (MJ Research Inc., CA)을 사용하여 시행하였다. 반응 조건은 95°C에서 5분 동안 초기 denaturation 시키고, PCR 3단계 (95°C, 1분 denaturation, 55°C, 30초 annealing, 72°C, 1분 extension)로 40 cycle 반복하였다. Melting curve 분석은 65°C에서 95°C사이에서 하였고, 각각 Ct값은 GAPDH mRNA 값으로 보정하여 계산하였다.

**Table 1.** Real-time PCR primer sequence

Genes	Primers		Size
	Forward	Reverse	
rGAPDH <sup>1</sup>	5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAA-3'	5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3'	119
rGRP78 <sup>2</sup>	5'-ATTCCTGCGTCGGTGTATTC-3'	5'-AGGAGTGAAGGCCACATAACG-3'	95
rGRP94 <sup>3</sup>	5'-TGATGATGAAGCCGACAGTAG-3'	5'-AAGTTCCCAGTCCCACACAG-3'	88
rCHOP <sup>4</sup>	5'-CACCACACCTGAAAGCAGAA-3'	5'-ATCCTCATACCAGGCTTCCA-3'	110
rinsulin2 <sup>5</sup>	5'-TGTGGTTCTCACTTGGTGGGA-3'	5'-GCTCCAGTTGTGCCACTTGT-3'	112

GenBank No.: 1. NM-017008, 2. BC062017, 3. BC081917, 4. U36994, 5. NM-019130.

### 7. XBP-1 Splicing

Total RNA 추출과 cDNA 합성은 real-time PCR과 동일한 방법을 이용하였다. cDNA는 활성화된 IRE1 $\alpha$ 의 intron에서 유래된 XBP-1 cDNA의 단편 사이를 증폭시키기 위한 PCR의 template로 사용된다. XBP-1 PCR을 위한 primer 서열은 forward primer, 5'-GAGCAGCAAGTGGTGGATTT-3'와 reverse primer, 5'-TCTCAATCACAAGCCCATGA -3'이다. PCR 조건은 95°C에서 1분동안 denaturation, 60°C에서 30초 동안 annealing, 그리고 72°C에서 1분 동안 extension 반응을 35 cycles로 하여 증폭시켰다. PCR 산물은 3.5% agarose gel에서 분리하였고, unspliced XBP-1은 289 bp, spliced XBP-1은 263 bp이다<sup>19)</sup>.

### 8. Western Blot Analysis

배양된 세포는 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, proprep-protein extraction solution (Intron Biotechnology, Seoul, Korea) [10 mM sodium phosphate (pH 7), 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1 mM sodium vanadate, 4 µg/mL leupeptin, 1 mM PMSF]으로 용해시킨다. 용해된 단백질은 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)로 정량하였다. 동량의 단백질 (20 µg)은 4~20% SDS-PAGE에서 분리하고, 크기별로 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 항체와 단백질 간의 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% skim milk in PBST (0.01% tween 20 in PBS))에서 실온, 1시간 동안 교반하였다. Blocking 시킨 membrane은 PBST로 5분 동안 2회씩 세척하고, 1차 항체를 실온에서 2시간 동안 (anti-KDEL은 1:1000, anti- $\beta$ -actin은 1:5000 그리고 그 외 다른 항체는 1:500으로 blocking buffer에 희석) 반응하였다. 반응 후, 5분씩 2회 세척하고 2차 항체 (anti-mouse IgG HRP, anti-rabbit IgG HRP)를 blocking buffer에 1:500 비율 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응하였다. PBST로 충분한 세척 후, 반응

된 단백질은 chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech)으로 X-ray 필름에 감광시켜 특이적 band를 확인하였다. 단백질 loading에 있어서 internal control로  $\beta$ -actin을 이용하였다.

### 9. 통계처리

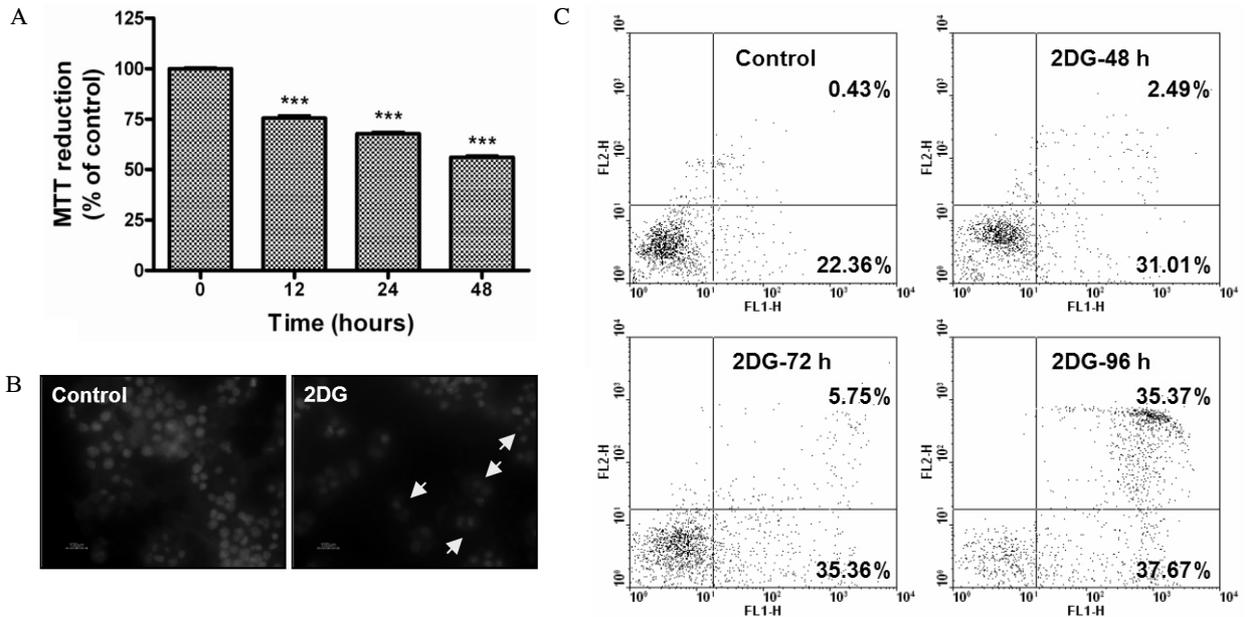
모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package (Version 14.0, Chicago, IL)를 사용하여 처리하였다. 각 실험은 3회 이상 반복하였으며, 항목에 따라 백분율과 평균치  $\pm$  표준오차 (SE)를 구하고, 각각의 조건에서 비교하기 위해 ANOVA를 시행하여 F값을 구하고 posthoc으로 대조군과 각 구간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은  $P < 0.05$  수준에서 평가하였다.

## 결 과

### 1. 2DG가 베타세포의 자연사에 미치는 영향

2DG에 의해 유도되는 HIT-T15 베타세포의 사멸에 있어서 적절한 농도 및 시간을 결정하기 위해 MTT assay를 시행한 결과는 Fig. 1A와 같다. 10 mM 농도에서 시간이 경과 (12, 24, 48시간)함에 따라 75.5, 67.8, 56.1%의 세포생존율을 보였다. 따라서 가장 적당한 2DG 처리 조건으로 56.1%의 생존율을 보인 10 mM의 2DG를 48시간 처리하는 것으로 결정하였고, 세포사멸 분석은 모두 2DG 10 mM에 48시간 이상 처리하여 시행하였다.

조건 결정의 정확성과 이러한 조건에서 일어나는 세포사멸이 세포 자연사에 의한 것인지 확인하기 위해 HIT-T15 베타세포주는 10 mM 2DG, 48시간 조건에서 hoechst 33342 (10 mM) 염색을 시행하였다 (Fig. 1B). 그 결과, 정상 세포의 핵은 타원형의 온전한 핵 모양을 나타낸 반면 소포체 스트레스로 인해 손상을 입은 세포의 핵은 응축과 분절로 인한 세포사멸체가 핵 주변에 나타나는 전형적인 자가사멸의 특징을 나타내었다. 또한 이를 더 확실하게 증명하기 위해 annexin V/PI 이중 염색을 통한 FACS 분석



**Fig. 1.** 2DG-induced apoptosis in HIT-T15  $\beta$  cells. After exposure to 10 mM 2DG, HIT-T15 cells apoptosis increased by time. A. Cells viability was measured with the MTT assay. B. HIT-T15 cells were exposed to 2DG (10 mM) for 48 hours. Apoptotic nuclei was stained with hoechst 33342 and examined by fluorescence microscope. Photographs were taken using a blue filter at a magnification of  $\times 400$ . C. Apoptotic cells were measured by FACS analysis after Annexin V/PI staining. Data are shown as the means  $\pm$  S.E. of six independent experiments. \*\*\*significant vs. control cells ( $P < 0.001$ ).

을 시행한 결과 2DG (10 mM) 48시간 이상 (48, 72, 96시간) 처리함에 따라 세포 자연사의 정도가 의미있게 증가하였다 (Fig. 1C).

## 2. 2DG에 의해 유도되는 소포체 스트레스에 미치는 GLP-1의 영향

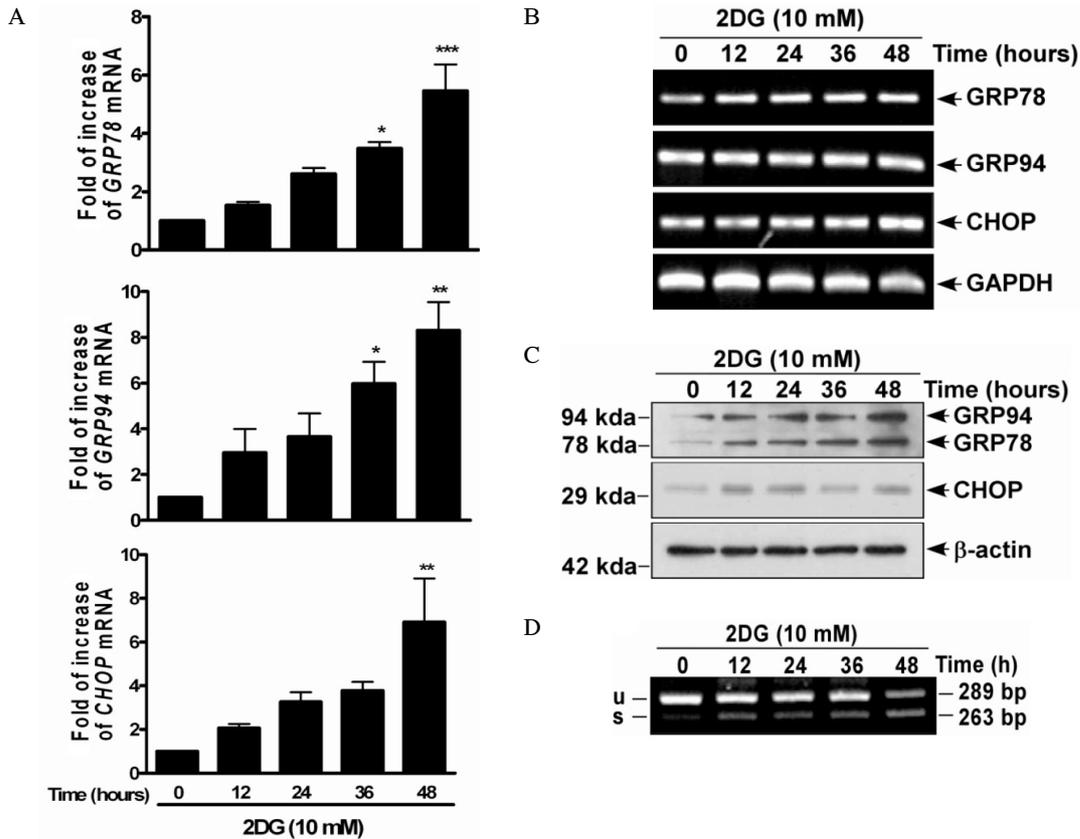
2DG에 의해 유도되는 소포체 스트레스의 조건을 결정하기 위해 real-time PCR과 western blot 분석을 통하여 소포체 샤페론 GRP78, 94, 세포사멸과 관련된 전사유전자 CHOP의 발현 변화와 XBP-1 splicing 정도를 이용하였다. 시간이 경과함에 따라 GRP78 mRNA, GRP94 mRNA와 CHOP mRNA는 유의하게 증가하였고 (Fig. 2A, B), 이러한 결과는 단백질 발현 변화를 통해서도 비슷한 결과를 확인할 수 있었다 (Fig. 2C). 또한 2DG에 의해 유도되는 소포체 스트레스의 경로를 확인하기 위해 소포체 스트레스의 전사인자 중 하나인 XBP-1의 splicing 유무를 확인해 본 결과, 시간이 증가 할수록 XBP-1 splicing이 유도되고 특히, 48시간 2DG를 처리했을 때 가장 XBP-1 splicing 정도가 증가하였다 (Fig. 2D).

이러한 소포체 스트레스 조건에서 GLP-1의 세포보호 작용여부를 알아보기 위해 GLP-1 수용체 자극제인 Ex-4 (25

nM)를 1시간 전에 전처리하여 소포체 스트레스 관련 단백질들의 변화를 확인하였다. GRP78, GRP94와 CHOP은 2DG를 처리함에 따라 유의적으로 증가하였다가 Ex-4를 처리하게 되면 대조군과 동일한 발현 양으로 감소하였다 (Fig. 3A). 특히 소포체 스트레스에 의해 유도된 CHOP이 Ex-4를 처리에 의해 유의하게 감소함에 따라 Ex-4는 CHOP에 의한 베타세포의 사멸을 억제하는 보호효과를 가진다는 것을 알 수 있다. 다음으로 소포체 스트레스와 Ex-4의 작용 경로를 증명하기 위해 eIF2 $\alpha$ 와 XBP-1의 활성을 확인하였다. Fig. 3B와 같이 2DG를 처리하게 되면 phospho-eIF2 $\alpha$ 가 증가하게 되고, 이는 Ex-4에 의해 통계적으로 유의하게 감소하게 된다. 또한 IRE1 $\alpha$ 를 경유하는 XBP-1은 소포체 스트레스에 의해 splicing이 증가하다가 Ex-4에 의해 감소됨으로써 해서 소포체 스트레스로부터 벗어나게 됨을 알 수 있다 (Fig. 3C).

## 3. 소포체 스트레스에 의한 베타세포의 자연사에 대한 Ex-4의 보호효과

Real-time PCR과 western blot으로부터 얻어낸 소포체 스트레스로부터 유도되는 베타세포의 자연사에 대한 Ex-4의 효과를 확인하기 위하여 MTT 분석, hoechst 33342 염



**Fig. 2.** ER chaperone (GRP78 and GRP94) and CHOP significantly increased by 2DG (ER stress). A, B. Expression levels of GRP78, GRP94 and CHOP were examined by real time PCR and densitometry analysis. Data were expressed as the rates to the expression levels to GAPDH in the same sample. GAPDH used for loading control. C. Western blotting of GRP78, GRP94 and CHOP,  $\beta$ -actin used for loading control. D. XBP-1 mRNA splicing was determined by RT-PCR. Unsplicing (u) and splicing (s) XBP-1 mRNA products are indicated. Data are shown as the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*  $P < 0.05$ . \*\*  $P < 0.01$ . \*\*\*  $P < 0.001$ .

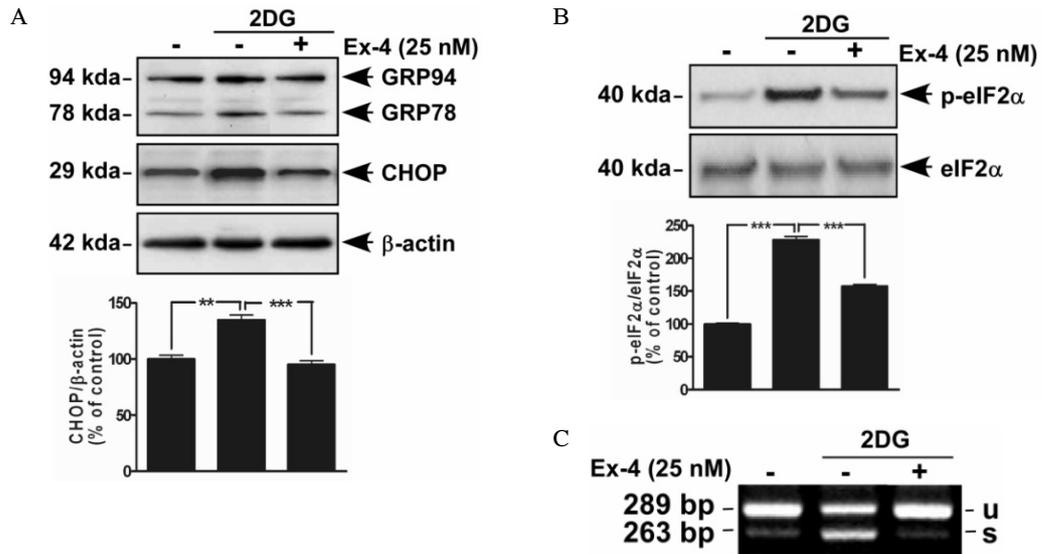
색과 FACS 분석을 시행하였다. MTT assay 결과, 2DG 단독 처리 시에는 대조군에 비해 49.0% 세포생존율을 보이는데 반해 같은 스트레스 조건에서 Ex-4를 처리하게 되면 72.9%로 유의하게 회복됨을 알 수 있다(Fig. 4A). 이러한 Ex-4에 의한 세포 사멸에 대한 회복능은 hoechst 33342 염색 시 2DG 처리 했을 때 관찰되던 세포사멸체가 Ex-4 처리에 의해 관찰되지 않음에 의해서도 확인할 수 있다(Fig. 4B). 더욱 확실한 결과는 Fig. 4C의 FACS 분석을 통해서 증명된다. Annexin V와 PI 이중 염색 후, FACS 분석을 했을 때, 대조군은 29.46% 비율로 분포하는 것에 반해 2DG 처리했을 때 총 apoptosis 세포는 46.73%로 증가하고, Ex-4를 함께 처리했을 때는 39.41%로 감소하였다. 특히, 후기 apoptosis 비율이 Ex-4를 처리했을 때 2DG 단독 처리 시보다 의미 있게 감소함을 알 수 있다(Fig. 4C).

다음으로 소포체 스트레스를 통해 유도되는 베타세포의

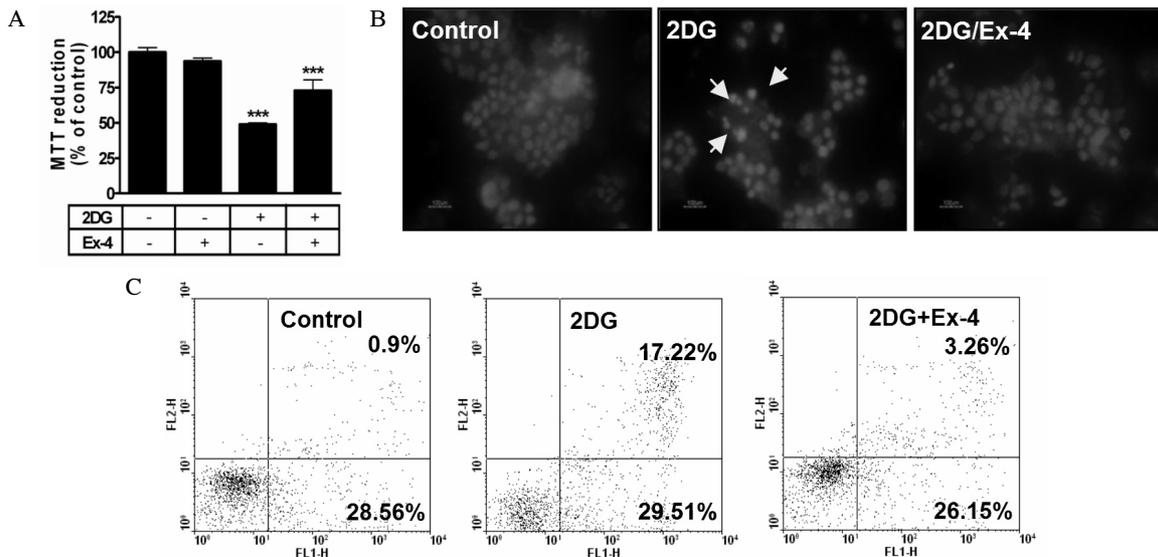
자연사에 대한 보호효과를 가지는 Ex-4가 실질적으로 인슐린 분비능을 회복시킬 수 있는지 확인하기 위해 insulin2 mRNA의 변화를 real-time PCR를 통해 증명하였다. Fig. 5와 같이 insulin2 mRNA는 2DG를 처리했을 때 현저히 감소되지만 이 때, Ex-4를 처리하게 되면 의미있게 회복됨을 알 수 있다.

## 고 찰

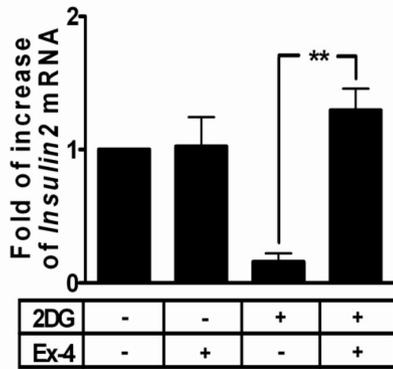
본 연구는 2DG에 의한 소포체 스트레스에 의해 유도되어지는 HIT-T15 베타세포주 자연사에 대한 GLP-1 (Ex-4)의 보호효과와 이에 따른 보호 기전을 증명하고자 하였다. 베타세포 사멸의 정확한 기전은 알려져 있지 않지만 만성적인 고혈당, 혈중 유리 지방산의 증가, 아밀로이드 폴리펩티드 침



**Fig. 3.** Effects of the exendin-4 (Ex-4) on ER stress-induced ER chaperone (GRP78 and GRP94) and CHOP. HIT-T15 cells were pretreated with Ex-4. After 1 hour, HIT-T15 cells were treated with 2DG (10 mM) for 48 hours. A. After treated of 2DG, effects of the Ex-4 on GRP78, 94 and CHOP were determined by western blot.  $\beta$ -actin used for loading control. CHOP expression levels were detected by densitometry analysis. B. Changed-expression levels of phospho-eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\alpha$  were evaluated by western blot and densitometry analysis. C. Effects of the Ex-4 on XBP-1 mRNA splicing were detected by RT-PCR. Data are shown as the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ . \*\*\*  $P < 0.001$ .



**Fig. 4.** Effects of the exendin-4 (Ex-4) on ER stress-induced apoptosis. HIT-T15 cells were pretreated Ex-4 for 1 hour before stress induction. A. After treated of 2DG (10 mM, 48 hours), effects of the Ex-4 on cell viability were measured by MTT assay. B. 2DG (10 mM, 48 hours)-induced apoptotic nuclei reduced *via* Ex-4. Fixed cells were stained with hoechst 33342 and examined by fluorescence microscope. Photographs were taken using a blue filter at a magnification of  $\times 400$ . C. Flow cytometric analysis of apoptosis of HIT-T15 cells exposed to 72 hours. Apoptotic cells were measured by FACS analysis after Annexin V/PI staining. Data are shown as the means  $\pm$  S.E. of six independent experiments. \*\*\*significant vs. control cells ( $P < 0.001$ ).



**Fig. 5.** Effects of the exendin-4 (Ex-4) on insulin secretion. HIT-T15 cells were pretreated with Ex-4. After 1 hour, HIT-T15 cells were treated with 2DG (10 mM) for 48 hours. Expression levels of insulin2 mRNA were examined by real time PCR. Data were expressed as the rates to the expression levels to GAPDH in the same sample. GAPDH used for loading control. Data are shown as the means  $\pm$  S.E. of four independent experiments. \*\*  $P < 0.01$ .

착 그리고 유전적 요인 등이 가설로 제기되고 있다<sup>3,20</sup>. 또한 최근에는 여러 가지 원인으로 인해 유도되는 소포체 스트레스가 베타세포의 자연사를 유발하는데 중요한 기전으로 보고되고 있다<sup>4,5,21,22</sup>. 고혈당 조건에서 쥐의 인슐린종 세포주인 INS-1 세포를 배양하게 되면, 세포 내 지질이 축적되고 포도당 자극 인슐린 분비 (glucose-stimulated insulin secretion)의 감소와 세포자연사가 관찰되고, Bip과 CHOP 유전자의 발현이 증가되었다<sup>23</sup>. 다른 연구에서도 베타세포가 고혈당에 만성적으로 노출될 경우 소포체 스트레스가 유발되고 IRE1의 활성화 및 인슐린 유전자의 발현이 억제됨을 증명하였다<sup>24</sup>. 또한 유리지방산이 베타세포의 소포체 스트레스를 증가시키고 베타세포의 자연사를 유발한다는 연구<sup>25</sup>와 db/db 마우스의 췌도세포에서 XBP-1 mRNA의 분할이 증가되는 등<sup>26</sup> 소포체 스트레스가 발생하는 것으로 보아 제2형 당뇨병의 발생과 베타세포 부전에 소포체 스트레스가 관여함을 알 수 있다. 당독성 혹은 지질독성을 통한 소포체 스트레스 유도는 산화스트레스를 통한 간접적인 방법이나, 본 연구에서 처리한 2DG는 당 유도체이며 직접적인 소포체 스트레스 유발 방법이며, 산화 스트레스를 통한 간접적인 유발이 아닌 직접적인 스트레스 유발 또한 베타세포의 자연사를 유도한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 1, 2). 또한 본 연구에서 사용된 2DG는 포도당 대사과정에 있어서 해당작용을 저해하거나 소포체 내 단백질의 당화를 저해하여 소포체 스트레스를 유도하기에<sup>6</sup> 다른 직접적인 소포체 스트레

스 유도제 (당화를 저해하는 tunicamycin, glucosamine이나 소포체 칼슘 결핍을 유도하는 A23187, thapsigargin)들과는 다르게 베타세포에 적합한 스트레스를 일으킬 것으로 생각된다.

소포체는 막 단백질이나 분비 단백질 등 세포 내 총 단백질의 약 1/3이 합성되는 세포 내 기관인데 콜레스테롤, 스테로이드, 지질의 합성장소이고 calcium의 저장 장소이기도 하다. 세포질에 비해 산화적 환경을 가진 소포체의 내부에서는 소포체 사멸론과 폴딩 효소의 작용으로 단백질의 구조 변경, 폴딩, 올리고머화 등이 이루어진다<sup>27</sup>. 그러나 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되면 소포체 기능에 장애가 발생하는데 이러한 상태를 소포체 스트레스라고 한다<sup>28,29</sup>. 소포체 스트레스가 발생하면 세포는 생존하기 위한 방어기전을 가동하게 되는데 이를 소포체 스트레스반응 (ER stress response)라 하고, 이는 다음과 같은 네 가지 기전에 의해 일어난다. 첫째, PERK 신호전달체계가 작동함으로 해서 리보솜에서 mRNA로부터 단백질로 번역되는 것을 억제하여 소포체 내로 새로운 단백질이 유입되는 것을 감소시킨다. 둘째, IRE1 $\alpha$ 와 ATF6의 작용으로 인해 단백질을 폴딩 시키는데 필요한 Bip과 같은 소포체 사멸론의 발현을 유도하여 소포체 폴딩 능력을 향상 시킨다. 셋째, 소포체 스트레스 관련 분해 (ER stress-associated degradation, ERAD)로 소포체에서 폴딩되지 못하거나 잘못 폴딩된 단백질을 세포질 내 ubiquitin-proteasome system을 통해 분해하여 제거시킨다. 마지막으로 소포체 스트레스가 위의 세 가지 반응으로 제거되지 못할 정도로 심각하게 되고, 소포체가 제 기능을 회복할 수 없을 때는 세포 자연사 경로가 활성화되어 손상된 세포를 제거한다<sup>6-8,27</sup>. 이와 같은 소포체 스트레스 반응은 특히 단백질을 합성하여 분비하는 기능이 활발한 형질세포, 췌장의 베타세포, 간세포, 조골세포와 같은 곳에서 잘 관찰되고 있으며 최근 많은 연구들은 소포체 스트레스가 당뇨병을 포함한 여러 질환의 병인으로 작용함을 보여주고 있다<sup>27</sup>. 따라서 소포체 스트레스를 제거하거나 세포 자연사를 유도하는 소포체 스트레스 반응을 억제하는 치료제를 탐색하는 것이 당뇨병 치료에 효과적일 수 있을 것이다.

최근 5~10여 년 동안 당뇨병 치료제의 개발이 본격화되고 있으며, 특히 제2형 당뇨병에 효과적인 새로운 치료제로서 GLP-1 유사체, DPP IV 저해제 등이 주목을 받고 있다. GLP-1은 장내 분비 세포인 L세포에 의해 분비되는 인크레틴 호르몬으로 식욕억제 중추에 작용하여 식욕을 억제시킴

으로 해서 장운동을 감소시키는 작용과 당뇨병에서 증가된 글루카곤의 분비를 감소시키는 작용이 알려져 있다<sup>13)</sup>. 뿐만 아니라 최근에는 베타세포의 인슐린 분비를 자극 시키고, 인슐린의 생합성 증가와 베타세포의 증식에도 관여한다는 연구가 보고됨에 따라 당뇨병 치료에 많은 역할을 할 것으로 생각되어지고 있다<sup>10-12,14,15)</sup>. 또한 GLP-1의 베타세포의 사멸에 대한 보호효과 연구가 계속 진행되어지고 있지만 그 기전에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 최근 INS-1 세포주에서 소포체 스트레스를 증가시키는 물질을 처리한 경우 소포체 스트레스가 증가하고 세포 자연사가 증가한 반면, GLP-1 처리 시 단백질кина아제-A (protein kinase-A, PKA)에 의해 증가된 ATF4의 발현증가로 소포체 스트레스로부터 벗어난다는 보고가 있으나 아직까지는 명확하게 밝혀진 것이 적어 GLP-1과 소포체 스트레스의 기전에 대한 연구는 더 필요할 것으로 생각된다<sup>30)</sup>. 본 연구에서 2DG 처리에 의해 스트레스를 유도하고, GLP-1 수용체 자극제인 Ex-4를 처리하였을 때, 소포체 스트레스에 의해 증가된 phospho-eIF2 $\alpha$ 와 XBP-1 splicing이 Ex-4의 처리 후 감소하고, 소포체 샤페론인 GRP78과 GRP94도 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이로 인해 Ex-4의 소포체 스트레스 반응의 제어 효과는 PERK 신호전달 체계와 IRE1 $\alpha$ 를 통한 XBP-1 전사 인자의 조절로 인해 유도됨을 알 수 있다. 또한 베타세포의 사멸과 관련된 CHOP 유전자의 발현 또한 소포체 스트레스 동안에 증가하였다가 Ex-4의 처리에 의해 감소한다 (Fig. 4). 즉 2DG에 의해 증가된 소포체 스트레스는 정상적인 세포의 소포체 스트레스 반응에 의해 해결되어 정상화되지 못하여 세포 사멸을 일으키게 된다. GLP-1 수용체 자극제인 Ex-4의 치료는 증가된 세포 내 소포체 스트레스 반응을 강화시켜 소포체 스트레스에 효과적으로 대처하여 세포의 사멸을 방지한다.

Ex-4는 베타세포 자연사에 대한 보호효과뿐만 아니라 소포체 스트레스에 의해 유도되어 감소한 인슐린 분비능을 회복시키는 역할을 한다. 비록 mRNA 수준이지만 소포체 스트레스를 유도했을 때 감소했던 insulin2 mRNA가 Ex-4를 함께 처리하게 되면 통계적으로 유의하게 발현이 증가하였다 (Fig. 5). 이는 소포체 스트레스에 의해 소포체에서 인슐린 단백질의 구조 변경에 이상이 생겨 줄어들었던 인슐린 유전자의 발현이 Ex-4 처리에 따라 소포체 스트레스가 줄어들면서 인슐린의 생산이 재개되었다고 생각된다.

결론적으로 2DG에 의한 소포체 스트레스에 의해 유도된 베타세포의 자연사는 GLP-1 수용체 자극제인 Ex-4에 의해 보호효과를 가지며 이는 소포체 샤페론, phospho-eIF2 $\alpha$

XBP-1과 CHOP 등 소포체 스트레스 반응을 제어함으로 나타나게 되고, 이는 인슐린 유전자의 발현 또한 향상시킨다. 이러한 연구결과는 GLP-1의 기능이 소포체 스트레스를 조절하여 당뇨병 발생을 예방하고, 당뇨병으로 인한 합병증의 치료하는데도 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

## 요 약

**연구배경:** 췌장 베타세포는 인슐린 분비 작용으로 인해 소포체가 잘 발달되어 있다는 것이 중요한 특징 중의 하나이다. 소포체는 번역 후 수정, 폴딩, 새롭게 합성된 분비 단백질의 재배열 등 중요한 기능을 담당하고, 세포의 생존에 있어서도 중요한 역할을 담당한다. 소포체는 다양한 생리, 병리학적 자극에 의한 스트레스를 받게 되는데 이를 소포체 스트레스라 하고, 이러한 소포체 스트레스에 베타세포는 취약하며, 소포체 스트레스에 의해 베타세포는 인슐린의 합성 및 생존에 문제가 발생하여 세포 자연사를 일으킨다. 글루카곤양 펩티드-1 (GLP-1)은 제2형 당뇨병의 새로운 치료제로 인슐린 분비와 베타세포 증식의 촉진한다고 알려져 있다. 또한 이는 베타세포의 사멸에 있어 보호효과를 가지지만, 이에 대한 자세한 기전은 밝혀지지 않았다. 따라서 2-deoxy-D-glucose에 발생된 소포체 스트레스를 통한 베타세포 사멸에 있어서 GLP-1의 보호효과와 기전을 연구하고자 한다.

**방법:** 인슐린 분비 베타세포로 햄스터에서 유래된 HIT-T15 세포주를 사용하였다. 소포체 스트레스를 유도하기 위해서 HIT-T15 세포에 2-deoxy-D-glucose (2DG, 10 mM)를 처리하였다. 베타세포의 자연사는 MTT 분석, hoechst 33342 염색과 annexinV/PI 이중염색을 통한 FACS 분석을 통해 시행하였고, 소포체 스트레스 관련 유전자 및 단백질은 real-time PCR과 western blot으로 분석하였다. GLP-1 수용체 자극제인 Ex-4를 이용하여 세포 자연사에 대한 보호효과를 증명하기 위해 스트레스 유도 1시간 전에 전처리하였다.

**결과:** 2DG (10 mM)에 의한 소포체 스트레스를 유도했을 때, 시간이 경과함에 따라 베타세포의 세포사멸이 증가된다. 이 때, Ex-4 (25 nM)를 처리하게 되면 GRP78, GRP94, eIF2 $\alpha$ , XBP-1과 CHOP 등을 조절함으로써 베타세포의 세포사멸에 대한 보호효과를 가지고, insulin2 mRNA의 발현 증가로 인해 인슐린 합성능을 증가시킨다.

**결론:** GLP-1은 소포체 스트레스 반응 조절을 통하여 베타세포의 세포사멸에 대한 보호효과를 가지며 인슐린 mRNA

발현도 향상시켰다. 이는 GLP-1이 당뇨병 발생을 예방하고 치료하는데 중요한 역할을 할 수 있음을 제시한다.

## 참 고 문 헌

1. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A: *Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. Diabetes 50(Suppl 1):S154-9, 2001*
2. Poitout V, Robertson RP: *Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology 143:339-42, 2002*
3. Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA: *Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. Nature 368:756-60, 1994*
4. Harding HP, Ron D: *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. Diabetes 51(Suppl 3):S455-61, 2002*
5. Oyadomari S, Araki E, Mori M: *Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. Apoptosis 7:335-45, 2002*
6. Schröder M, Kaufman RJ: *The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem 74:739-89, 2005*
7. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D: *Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. Annu Rev Cell Dev Biol 18:575-99, 2002*
8. Araki E, Oyadomari S, Mori M: *Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. Exp Biol Med 228:1213-7, 2003*
9. Orskov C: *Glucagon-like peptide-1, a new hormone of the entero-insular axis. Diabetologia 35:701-11, 1992*
10. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM: *Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. Diabetes 49:741-8, 2000*
11. Yusta B, Baggio LL, Estall JL, Koehler JA, Holland DP, Li H, Pipeleers D, Ling Z, Drucker DJ: *GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. Cell Metab 4:391-406, 2006*
12. De León DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA: *Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. Diabetes 52:365-71, 2003*
13. Perfetti R, Merkel P: *Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic beta-cell function. Eur J Endocrinol 143:717-25, 2000*
14. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S: *Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes 48:2270-6, 1999*
15. Wajchenberg BL: *beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. Endocr Rev 28:187-218, 2007*
16. Kang HT, Hwang ES: *2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. Life Sci 78:1392-9, 2006*
17. Twentyman PR, Luscombe M: *A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. Br J Cancer 56:279-85, 1987*
18. Steensma DP, Timm M, Witzig TE: *Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. Methods Mol Med 85:323-32, 2003*
19. Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P: *IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. Science 318:944-9, 2007*
20. Polonsky KS, Sturis J, Bell GI: *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus-a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. N Engl J Med 334:777-83, 1996*
21. Orsäter H, Sjöholm A: *A busy cell-endoplasmic reticulum stress in the pancreatic beta-cell. Mol Cell Endocrinol 277:1-5, 2007*
22. Scheuner D, Kaufman RJ: *The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. Endocr Rev 29:317-33, 2008*

23. Wang H, Kouri G, Wollheim CB: *ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. J Cell Sci 118:3905-15, 2005*
24. 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 Metab 4:245-54, 2006*
25. Kharroubi I, Ladrière L, Cardozo AK, Dogusan Z, Cnop M, Eizirik DL: *Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress. Endocrinology 145:5087-96, 2004*
26. 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*
27. Kaufman RJ: *Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev 13:1211-33, 1999*
28. Mori K: *Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. Cell 101:451-4, 2000*
29. Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM: *The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol 3:411-21, 2002*
30. Hui H, Nourparvar A, Zhao X, Perfetti R: *Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. Endocrinology 144:1444-55, 2003*