

# INS-1 세포에서 항산화 효과를 통한 Quercetin의 세포 보호 효과

인제대학교 의과대학 내분비대사내과<sup>1</sup>, 백인제 임상의학연구소 분자치료 실험실<sup>2</sup>, 메리놀병원 내분비대사내과<sup>3</sup>

권민정<sup>1,2</sup> · 정혜숙<sup>2</sup> · 김미경<sup>1</sup> · 강성훈<sup>1</sup> · 서광욱<sup>1</sup> · 송재광<sup>1</sup> · 윤태연<sup>1</sup> · 전민경<sup>1</sup> · 하태환<sup>1</sup> · 윤창신<sup>2</sup>  
 김미경<sup>2,3</sup> · 이우제<sup>1</sup> · 노정현<sup>1</sup> · 권수경<sup>1</sup> · 김동준<sup>1</sup> · 고경수<sup>1</sup> · 이병두<sup>1</sup> · 임경호<sup>1</sup> · 이순희<sup>1,2</sup> · 박정현<sup>1,2</sup>

## Cytoprotective Effect by Antioxidant Activity of Quercetin in INS-1 Cell Line

Min Jeong Kwon<sup>1,2</sup>, Hye Sook Jung<sup>2</sup>, Mi Kyung Kim<sup>1</sup>, Seong Hoon Kang<sup>1</sup>, Gwang Wook Seo<sup>1</sup>, Jae Kwang Song<sup>1</sup>,  
 Tae Yeon Yoon<sup>1</sup>, Min Kyeong Jeon<sup>1</sup>, Tae Hwan Ha<sup>1</sup>, Chang Shin Yoon<sup>2</sup>, Mi Kyung Kim<sup>2,3</sup>, Woo Je Lee<sup>1</sup>,  
 Jeong Hyun Noh<sup>1</sup>, Soo Kyung Kwon<sup>1</sup>, Dong Joon Kim<sup>1</sup>, Kyung Soo Koh<sup>1</sup>, Byung Doo Rhee<sup>1</sup>, Kyung Ho Lim<sup>1</sup>,  
 Soon Hee Lee<sup>1</sup>, Jeong Hyun Park<sup>1</sup>

Department of Internal Medicine, College of Medicine<sup>1</sup>, Molecular Therapy Lab, Paik Memorial Institute for Clinical Research<sup>2</sup>,  
 Inje University; and Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, Maryknoll General Hospital

### Abstract

**Background:** Oxidative stress is induced under diabetic conditions and causes various forms of tissue damages in the patients with diabetes. Recently, pancreatic beta cells are regarded as a putative target of oxidative stress-induced tissue damage, and this seems to explain in part the progressive deterioration of beta cell function in type 2 diabetes. The aim of this study was to examine the potential of Quercetin (QE) to protect INS-1 cells from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress and the effects of QE on the glucose-stimulated insulin secretion in INS-1 cells.

**Methods:** To study the cell viability, cells were incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or QE at the various concentrations. To confirm the protective effect by QE in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the levels of antioxidant enzymes were assessed by RT-PCR and Western blot, and glutathione peroxidase activities were quantified by spectrophotometrical method. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was measured by ELISA.

**Results:** Cell incubations were performed with 80 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 hours to induce 40 - 50% of cell death. QE gradually showed protective effect (IC<sub>50</sub> = 50 μM) in dose-dependent manner. Superoxide dismutase (SOD) mRNA level in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + QE group was increased as compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, but catalase did not changed. And the QE recruited glutathione peroxidase activity against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injuries in INS-1 cells.

**Conclusion:** In conclusion, these findings suggest that QE might have protective effect on beta cells by ameliorating oxidative stress and preserving insulin secretory function. (*J Kor Diabetes Assoc* 31:383-390, 2007)

**Key words:** Antioxidant effect, Diabetes mellitus, INS-1 cell, Oxidative stress, Quercetin

## 서 론

세포에서의 에너지 생산에서는 미토콘드리아 호흡에 의한 부산물인 반응성 산소기(ROS, reactive oxygen species)의 생성이 수반되며 이것은 단백질, 지방 및 핵산에 손상을

가져온다. 이러한 손상으로부터 세포 자체를 보호하기 위해 세포 내의 방어체계가 작동을 하지만 유리 라디칼의 생성과 항산화 체계의 균형이 깨어지면 산화스트레스가 세포에 작용하게 된다<sup>1)</sup>. 산화 스트레스의 원인으로는 나이에 따른 변화와 만성 질병들을 들 수 있다<sup>2-7)</sup>. 당뇨병은 심각한 대사불균형으로 인해 여러 조직에 비정상적인 변화가 초래되는 병

적 상태로 산화 스트레스가 병태생리의 주요 부분을 차지한다<sup>8)</sup>. 췌장 베타세포는 유리 산소 라디칼을 제거하는 효소가 부족하여 산화 스트레스에 특히 더 취약하다고 알려져 있다<sup>9)</sup>. Ihara 등<sup>10)</sup>은 당뇨병 쥐에서 산화 스트레스의 표지자를 평가하여 췌장세포에서 반응성 산소기가 증가한 것을 확인하였다. 고혈당 상태에서는 또한 소비톨과 폴리올의 증가로 인해 NADPH/NADP<sup>+</sup> 비가 감소하고 산화 스트레스가 유발된다<sup>11)</sup>.

유리 라디칼 제거제와 항산화 효과를 가지는 화학물질들이 당뇨병 유발 모델에 사용하는 스트렙토조토신이나 알록산과 같은 물질들에 의한 췌장 세포의 세포 독성을 예방하였다는 것을 생체 내 실험으로 증명한 결과도 있다<sup>12)</sup>.

플라보노이드는 채소, 과일, 차와 와인과 같은 음료에 천연적으로 존재하는 폴리페놀 항산화제이다. 이러한 플라보노이드의 일종인 Quercetin (QE, 3,5,7,3,4-pentahydroxyflavone)은 강력한 항산화제로 직접적으로 유리 라디칼을 제거하고<sup>13)</sup>, xanthine oxidase와 lipid peroxidation을 억제하여<sup>14,15)</sup> 항산화 방어 체계를 향상시킨다. 세포 내 항산화 방어기전의 상태가 산화 스트레스에 의한 세포 손상의 정도를 결정할 수 있기에 이러한 물질을 사용한 방어기전의 증가는 산화 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있을 것으로 예측할 수 있다. 당뇨병에서의 산화 스트레스에 의한 손상을 예방하기 위한 천연 항산화제에 대한 관심이 최근 높아지고 있으며 산화 스트레스로 야기된 당뇨병의 만성합병증들에는 그 효과가 이미 부분적으로 입증되어 있다<sup>16,17)</sup>.

저자들은 본 연구에서 포도당의 농도에 따라 인슐린분비가 증가하는 췌장 베타세포 모델인 INS-1 cell line에서 QE의 항산화 효과를 통한 세포보호 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

INS-1 세포<sup>18)</sup>는 37°C, 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 10% 우태아 혈청, 11 mM 포도당, 10 mM HEPES, pH 7.4, 50 μM 2-mercaptoethanol을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였고, passage 30 - 40의 세포를 이용하였다.

### 2. 산화 스트레스 환경 설정

과산화수소에 의해 50%의 세포 사멸을 보이는 산화 스트레스의 조건(IC<sub>50</sub>)을 설정하기 위하여 안정화된 INS-1 세포에 10 μM에서 100 μM의 다양한 농도의 과산화수소가 포함된 배지로 교환하여 5시간 뒤 MTT법(Amresco, Ohio, USA)으로 세포 생존율을 측정하였다.

### 3. QE에 의한 세포 생존능 평가

산화 스트레스 조건(IC<sub>50</sub>)에서 세포 손상을 억제하기 위한 QE (Sigma, Missouri)의 농도를 결정하기 위해 5시간 동안 과산화수소와 0 μM에서 100 μM의 다양한 농도의 QE이 포함된 배지에 배양한 후 MTT법으로 세포 생존율을 확인하였다. 세포 생존율의 적당한 조건으로 향후의 실험들을 계획하였다.

### 4. 항산화 효소 활성도 측정

1) QE의 SOD (Superoxide Dismutase)와 Catalase에 대한 효과

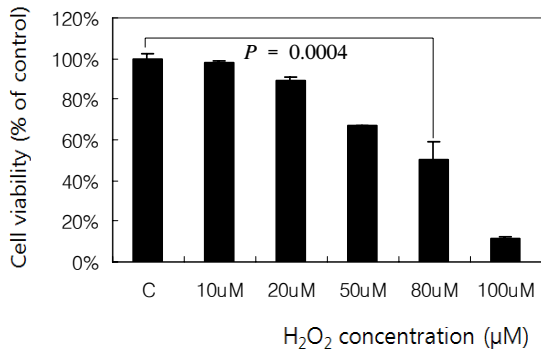
INS-1 세포에서 산화 스트레스에 대한 QE의 항산화 효과를 확인하기 위해 5시간 동안 80 μM의 과산화수소나 30 μM의 QE을 첨가한 각각의 군에 항산화 효소인 SOD와 catalase의 mRNA와 단백질을 semi-quantitative RT-PCR과 Western blot 방법으로 측정하였다.

대조군, 과산화수소만을 첨가한 군과 QE을 함께 첨가한 군 모두에 TRIzol을 사용하여 RNA를 분리하고 AccuPower RT/PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea)로 프라이머들 (Table 1)을 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. 42°C에서 1분간, 94°C에서 2분간 예비 변성시킨 후 94°C에서 30초 변성, 48°C에서 1분 결합, 그리고 68°C에서 1분 신장의 총 30회를 반복하고 68°C에서 7분간 신장 반응하였다. 증폭산물은 1.5% 아가로스 겔상에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 밴드를 관찰하고, GelDoc densitometry로 반정량 측정하였다.

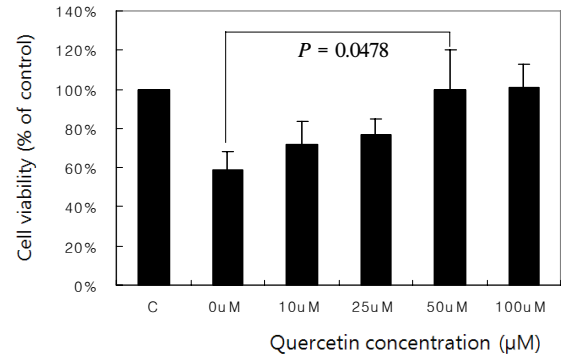
각각의 군의 세포에서 추출한 단백질을 5분간 끓여 변성시키고 8% SDS-polyacrylamide 겔에서 전기영동을 시행한 후 nitrocellulose (Amersham, Arlington Heights, IL)막으로 이동시켰다. 항체와 단백질간의 비특이적인 결합을 방지하기 위해 1시간 동안 상온에서 5% 탈지분유가 포함된

Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene (bp)	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
Catalase (395)	5'-GTGAGAACATTGCCAACCAC-3'	5'-CTCGGGAATGTCATCAAAAG-3'
Cu/Zn-SOD (383)	5'-GCCGTGTGCGTGCTGAA-3'	5'-TTTCCACCTTTGCCCAAGTCA-3'
Mn-SOD (385)	5'-GACCTGCCTTACGACTATGG-3'	5'-GACCTTGCTCCTTATTGAAGC-3'
GAPDH (308)	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'



**Fig. 1.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity in INS-1 cells. INS-1 cells exposed to various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0, 10, 20, 50, 80 and 100 µM) for 5 hours, and then, cell viability was measured by MTT method.



**Fig. 2.** Effect of quercetin on INS-1 cells. INS-1 cells were treated with 80 µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(IC<sub>50</sub>) and various concentration of quercetin (0, 10, 25, 50 and 100 µM) for 5 hours, and then, cell viability was measured with MTT method.

TTBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 용액에 반응시켰다. 이후 1차 항체를 4°C에서 밤 동안 반응시킨 후 2차 항체를 실온에서 한 시간 반응시켰다. Alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody로 목표 단백질의 존재를 확인하였다. 또한 각 실험군에서 동량의 단백질로 Western blot을 시행한 것을 확인하기 위하여 β-actin항체를 사용하였다.

2) Glutathione 관련 효소 활성도(GPx (Glutathione Peroxidase) activity)

Glutathione 관련 효소 활성도를 측정하기 위하여 각 군의 세포를 분쇄하여 4°C에서 10분간 12000 × g에 원심 분리하여 상층액을 사용하였다. Glutathione 관련 효소 활성도를 측정하기 위해 Total Glutathione Quantification Kit (Calbiochem, Germany)를 사용하였다.

5. 포도당 자극에 의한 인슐린분비능(GSIS, Glucose Stimulated Insulin Secretion)의 측정

포도당 자극에 의한 인슐린분비능은 각각의 실험 환경에서 Krebs-Ringer buffer (119 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.54 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM HEPES, pH 7.4)이 포함된 4 mM 포도당과 16 mM 포도당에 1시간 배양 후 배지를 Rat/Mouse Insulin ELISA kit (LINCO Research, Missouri)로 측정하였다.

6. 통계적 분석

실험결과는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며 대조군과 실험군들 사이의 비교는 Student t-test를 사용하였으며 통계적인 유의 수준은 P값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

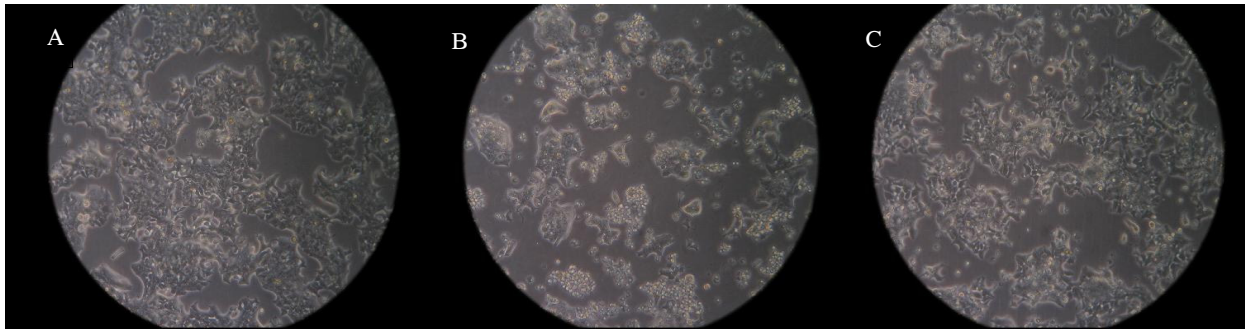
1. 산화스트레스의 세포독성과 QE의 세포보호 효과

INS-1 세포에 10 µM에서 100 µM의 다양한 농도의 과산화수소가 포함된 배지로 교환하여 5 시간 뒤 세포 생존율을 측정한 결과 50% 이상의 세포 사멸을 보이는 80 µM의 과산화수소 농도(IC<sub>50</sub>)를 산화스트레스의 조건으로 설정하였다(Fig. 1, P = 0.0004). 이 산화스트레스 조건에서 다양한 농도의 QE이 포함된 배지에 배양하여 측정한 결과 QE 농도에 비례하여 세포 보호 효과가 나타났으며 50 µM의 QE 농도에서 50% 이상의 세포 보호 효과를 보였다(Fig. 2, P = 0.0478). 대조군, 80 µM의 과산화수소만 첨가한 군과 80 µM의 과산화수소에 30 µM의 QE을 같이 첨가한 군 각각의 INS-1 세포의 모양을 광학현미경으로 관찰하였다(200 배, Fig. 3). 정상적인 대조군의 세포 모양은 죽돌기를 가지며 배양판에 견고하게 붙어 있는 형상을 보이나 과산화수소만 첨가한 군에서는 죽돌기가 사라져 둥근 모양으로 변하며 세포 수도 감소한 것을 직접 관찰할 수 있었다. QE을 같이 첨가한 군에서는 대조군과 유사하게 형태도 보존되어 있는 것을 확인하였다.

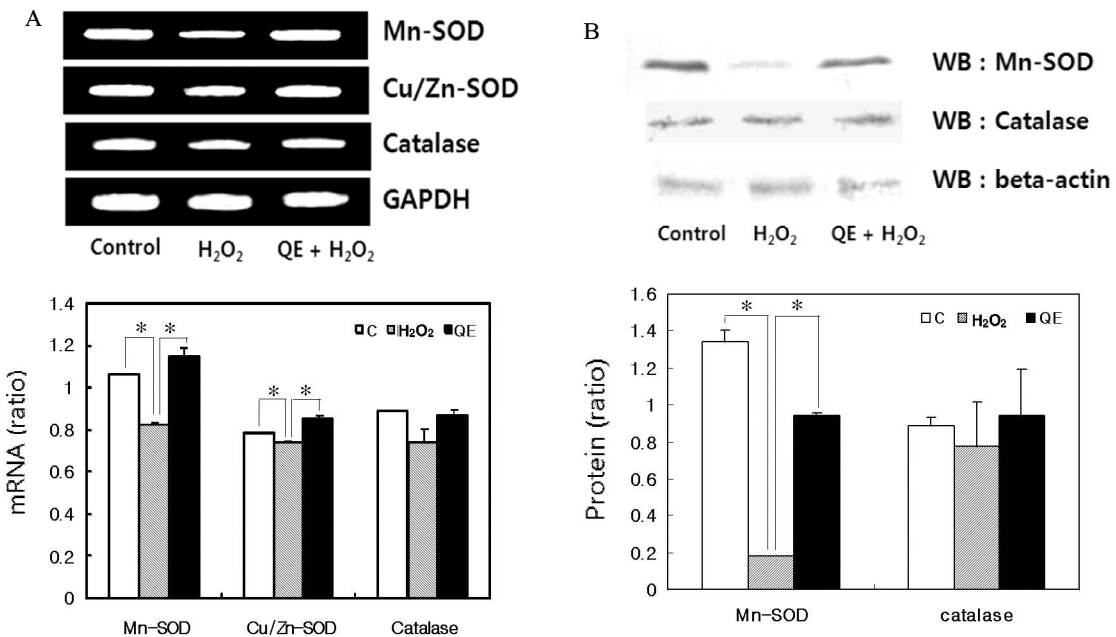
2. 항산화 효소의 활성도

1) QE의 SOD와 Catalase에 대한 효과

RT-PCR의 결과(Fig. 4A)에서 Mn-SOD mRNA는 대조군에 비해 과산화수소군에서 낮게 측정되었으며(P = 0.0003) QE 첨가군에서는 대조군과 유사한 정도로 증가하였다(P = 0.0107). 하지만 Cu/Zn SOD는 Mn-SOD보다는 유의도가 떨어지기는 하였지만 QE 첨가군에서는 과산화수소군에 비해 증가하였다(P = 0.0220). Catalase는 SOD와 비슷한 추세를 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(P =



**Fig. 3.** The effects of quercetin (QE) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage in INS-1 cells. Morphology of INS-1 cells of control (A) and treated with 80 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) or 80 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 50 μM QE (C) for 5 hours was observed by optical microscope (× 200).



**Fig. 4.** The effect of quercetin on SOD and catalase expression in INS-1 cells. A, SOD and catalase mRNA expression in INS-1 cells of control and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or Quercetin for 5 hours was evaluated by RT-PCR; B, Expression of SOD and catalase in INS-1 cells of all groups was detected by western blotting. C, control; QE, quercetin; WB, western blotting. \* *P* < 0.05.

0.1401).

Western blotting 결과(Fig. 4B)에서도 Mn-SOD는 대조군에 비해 과산화수소균에서 낮게 측정되었으며(*P* = 0.0013) QE 첨가군에서는 유의하게 증가하였다(*P* = 0.0003). Catalase도 RT-PCR의 결과와 비슷하게 통계적으로 유의하지 않음을 확인하였다(*P* = 0.5659).

2) Glutathion 관련 효소 활성도(GPx activity)

과산화수소균에서 GPx activity는 대조군에 비해 55%이상 감소하였고(*P* = 0.0037) QE 첨가군에서는 76%로 활성도가 증가하였다(*P* = 0.0462)(Fig. 5). 이는 QE 첨가군에서 과산화수소균에 비해 활성도가 상대적으로(38%) 높음을

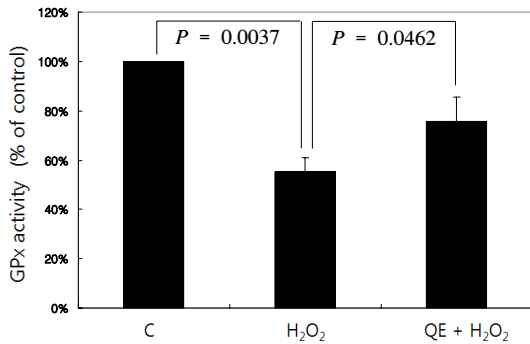
보여준다.

3. 포도당 자극에 의한 인슐린분비능

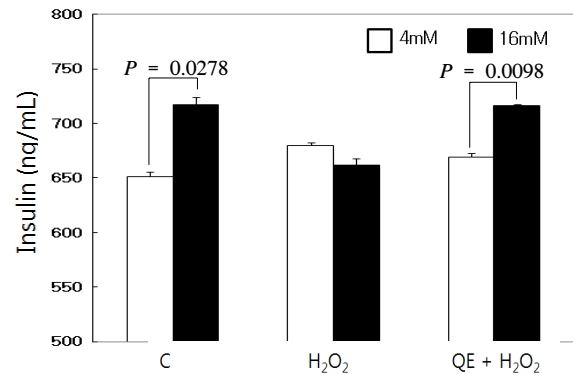
INS-1 세포는 포도당 농도에 따라 인슐린분비가 증가하는 세포종으로 대조군에서는 이러한 반응이 관찰되었으나(*P* = 0.0278) 과산화수소균에서는 관찰되지 않았고(*P* = 0.2140) QE 첨가군에서는 반응이 보존되어 있음을 확인하였다(*P* = 0.0098) (Fig. 6).

고찰

고혈당이 당뇨병의 만성 합병증의 주요 원인이라는 사실



**Fig. 5.** The effect of quercetin (QE) on GPx activity. The GPx activity in contol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + QE group was measured by Total Glutathione Quantification Kit and determined the change in absorbance per minute. C, control; GPx, Glutathione peroxidase; QE, quercetin.



**Fig. 6.** GSIS in Contol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + QE Group. Insulin secretion depended on glucose concentration was detected by ELISA in INS-1 cells of control and treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and/or Quercetin for 5 hours. C, control; GSIS, glucose-stimulated insulin secretion; QE, quercetin.

은 잘 알려져 있으며 고혈당으로 인한 반응성 산소기 생성의 증가 및 불충분한 제거로 인해 야기된 산화스트레스가 중심적인 역할을 한다는 여러 보고가 있다. 이러한 만성적인 고혈당에 의한 독성은 혈관 내피, 신경, 신장 세포에 작용을 할 뿐만 아니라 췌장 세포에도 직접적인 작용을 한다<sup>16,19</sup>. Robertson 등<sup>20</sup>은 HIT-T15 세포를 6개월간 11.1 mM의 포도당에서 배양하였을 때에는 인슐린 mRNA와 포도당 자극에 의한 인슐린분비능이 사라졌지만 6개월간 0.8 mM의 포도당에서 배양하였을 때는 그 기능이 보존되어 있음을 확인하여 포도당 독성에 대한 개념을 제시하였다. 포도당 독성과 산화스트레스에 관한 연관성으로 Wolff 등<sup>21</sup>에 의하면 당뇨병으로 인한 포도당의 산화와 그로 인한 반응성 산소기의 생성을 제시하였으며 Hunt 등<sup>22</sup>은 포도당 산화가 수산화 라디칼을 생성하고 수산화 라디칼 제거인자가 고혈당으로 인한 단백질의 분해를 보호할 수 있다고 제시하였다. Grankvist 등<sup>8</sup>은 췌장 소도에 Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase와 glutathione peroxidase 등의 항산화 효소가 다른 조직에 비해 적게 존재한다고 보고하여 췌장 세포의 산화스트레스 취약성을 제시하였다. 또한 췌장 베타세포는 항산화 효소의 상대적인 부족뿐만 아니라 미토콘드리아 호흡에 관련된 에너지 생산에 관점에서도 산화스트레스에 취약하다. Suarez-Pinzon 등<sup>23</sup>은 췌장 소도에서 DNA 장애를 일으키는 반응성 산소기와 nitric oxide (NO) 중 NO의 억제로 사이토카인, 4-HNE, hexanal, MDA 등을 억제할 수 없는 것을 제시하고 췌장 소도 기능 장애에 있어 반응성 산소기의 중요성을 확인하였다. 김 등<sup>24</sup>은 과산화수소를 췌장 소도에 직접 주입하여 포도당 자극에 의한 인슐린분비가 감소함을 확인하였다. 은 등<sup>25</sup>은 INS-1 세포, HIT-T15 세포 및 벅서 췌도 세포에서 배양 배지에 고농도 포도당을 첨가한 경우와 과산화수소를 첨가한 경우 모두에서 세포 내 peroxide가 증

가하고 인슐린 mRNA 및 포도당 자극에 의한 인슐린분비능이 감소함을 확인하였다.

고혈당에 의한 산화스트레스의 기전으로 포도당의 자가산화, protein kinase C의 활성화, methylglyoxal 형성과 glycation, 소비톨 형성, 핵소아민 대사와 산화 인산화 등 포도당 대사에 관여하는 대부분의 경로에서 반응성 산소기가 생성되어 췌장 소도 세포에 손상을 준다고 알려져 있으며<sup>26</sup> 항산화효소의 과발현이나<sup>13,27-29</sup> 항산화제로 이러한 손상을 보호한다는 여러 증거가 발표되고 있다. 항산화제의 사용의 예로 ZDF 쥐와 HIT-T15 세포에 Tanaka 등<sup>30</sup>이 N-Acetylcysteine을 사용하여 산화스트레스에 대한 보호 효과를 입증하였으며 Kaneto 등<sup>31</sup>은 N-Acetylcysteine으로 db/db 생쥐에서 확인하였다. Ihara 등<sup>32</sup>은 비타민 E를 사용하여 GK 쥐에서 혈당 조절의 효과를 확인하였다.

본 실험에 사용된 QE<sup>33</sup>은 식물에 풍부한 폴리페놀 구조물을 포함하는 강력한 항산화물질로 베리류<sup>34,35</sup>, 적포도주, 사과, 양파<sup>36</sup>, 루이보스 차<sup>37</sup> 등에 함유되어 있다고 알려져 있다. QE과 같은 폴리페놀 구조물들을 가진 flavonoid 들은 유리 산소기를 직접적으로 상쇄시키는 제거자(scavenger) 및 반응성 산소의 생성을 억제시킬 뿐만 아니라<sup>8,38</sup> 항산화 효소들을 활성화하여 항산화 효과를 나타낼 수 있다<sup>39,40</sup>. QE은 소수성(hydrophobic)을 띠며 세포막에 많이 존재한다. 일반적인 음식으로의 섭취량은 매일 약 20~1000 mg 정도이며 체내 반감기는 11~28시간으로 길고 반복적으로 섭취하면 누적 효과를 볼 수 있다<sup>41</sup>. 50 mg의 QE으로 0.75~1.5 μM/L의 혈중 농도를 낼 수 있으나<sup>42,43</sup> 음식으로 섭취하는 경우 장내 흡수가 조금 떨어지는 단점이 있다. 하지만 소수성으로 체내 비교적 오래 잔존하고 누적효과가 있어 실험의 농도인 30 μM의 농도를 얻기 위해서는 QE 풍부한 음식의 반복적인 섭취로 어느 정도의 효과를 나타낼 수 있을 것이

다.

Vessal 등<sup>44)</sup>과 Coskun 등<sup>45)</sup>은 streptozotocin으로 유발된 당뇨병 쥐 모델에서 QE을 이용하여 산화스트레스 감소에 의한 당뇨병에 대한 보호 효과에 대한 *in vivo* 결과를 발표하였다. 이는 저자들의 *in vitro* 결과와 일치하는 내용으로 QE에 의한 당뇨병의 보호 효과가 QE의 사용에 따른 다른 요인들에 의한 것이라기 보다 췌장 소도 세포에 작용한 직접적인 항산화 효과에 의한 것이라고 추측할 수 있다.

이번 실험에서의 QE의 INS-1 세포에서의 항산화 효과의 결과 중 Mn-SOD, Cu/Zn-SOD와 GPx 활성도는 통계적으로 유의한 차이를 보인 반면 catalase에서는 반응 추세만 관찰할 수 있었다. 그 이유로 QE는 소수성이며 catalase의 등전위점이 5.4로 배지에서 음전하를 띠므로 반응이 적었을 가능성이 있다. 그리고 Mn-SOD는 미토콘드리아에 주로 존재하고 Cu/Zn-SOD는 세포질에 존재하며 catalase는 페록시솜(peroxisome)에 GPx는 세포질과 미토콘드리아에 모두 분포하는 것을 고려해 볼 때 신장세포나 간세포 등에 비해 췌장세포에 페록시솜이 부족하여 반응이 떨어졌음도 생각해 볼 수 있다. 또한 이번 실험의 결과만으로 QE의 항산화 효과에 있어서 유리 산소기의 직접적인 제거자의 역할이 중점적인지 항산화효소의 활성화의 증가로 인한 결과가 주된 역할을 했는지 명백히 입증하기는 어렵다. 그러나 QE에 의한 항산화효과는 이전 다른 보고들과 같이 복합적으로 나타났을 가능성이 높으며 배양 시간이 짧아 유리 산소기의 직접적인 제거에 의한 효과가 우세하였을 가능성이 높다. 하지만 어떤 기전이 우세하던 저자들은 QE이 췌장 베타 세포에 직접적인 항산화 효과를 보임을 확인하였다. 대규모의 역학 조사와 계획적인 연구가 필요하겠지만 본 실험의 결과는 인슐린저항성에 따른 이차적인 베타세포의 손실을 가져오는 제2형 당뇨병과 당뇨병 전단계에서 QE의 충분한 섭취가 당뇨병 진행의 예방에 도움이 될 것으로 기대한다.

## 요 약

**배경:** 고혈당에 의한 산화 스트레스는 당뇨병환자에서 만성합병증을 보이는 여러 조직 손상의 원인 중의 하나로 알려져 있다. 제1형 당뇨병뿐만 아니라 인슐린저항성을 중심으로 한 제2형 당뇨병 역시 결국 베타세포 기능의 장애로 인해 발병한다. 최근 췌장베타 세포 자체에 대한 산화 스트레스가 당뇨병 발병의 원인일 것이라는 연구가 보고되고 있으며 항산화제의 당뇨병 예방에 대한 역할에 관심이 기울어지고 있다. 우리는 양파, 포도 등에 있는 강력한 항산화제의 일종인 Quercetin (QE)을 사용하여 인슐린을 분비하는 베타 세포 모델(INS-1 cell)에서 보호효과를 알아보고자 하였다.

**방법:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화스트레스를 주고 QE 첨가 정도에 따른 세포 생존능을 MTT를 이용하여 측정하였다. 세포 보호에

관한 작용이 항산화 효과에 의한 것임을 확인하기 위하여 SOD와 catalase를 Western blot으로 확인하고 RT-PCR로 mRNA를 측정하였으며 Total Glutathione Quantification Kit로 glutathione peroxidase 활성을 측정하였다. 기능 보존을 알아보기 위하여 고혈당 자극에 의한 인슐린분비능을 ELISA로 측정하여 확인하였다.

**결과:** 세포 생존능에 있어 QE은 농도에 비례하여 산화스트레스에 대한 보호 효과를 보였다. SOD는 QE 첨가군에서 증가하였지만 catalase는 변화가 없었고 산화스트레스만 받은 INS-1 cell에 비해 QE 첨가군에서 유의하게 glutathione peroxidase 활성의 개선을 보였다. 고혈당 자극에 의한 인슐린분비능 또한 QE 첨가군에서 높게 나타났다.

**결론:** QE은 INS-1 cell에서 강력한 항산화 효과를 나타내었으며 이는 QE이 췌장 세포 손상에 의한 당뇨병 예방에 도움이 될 것임을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Kumar V, Fausto N, Abbas A: *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease: free radical induced cell injury*. 7th ed. p. 16-8, Philadelphia, W.B. Saunders, 2004
2. Tiwari AK: *Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders*. *Curr Sci* 86:1092-1102, 2004
3. Cui K, Luo XL, Xu KY, Ven Murthy MR: *Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:771-99, 2004
4. Ceriello A, Motz E: *Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:816-23, 2004
5. Klaunig JE, Kamendulis LM: *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:239-67, 2004
6. Ballinger SW: *Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease*. *Free Radic Biol Med* 38:1278-95, 2005
7. Gibson GE, Huang HM: *Oxidative stress in Alzheimer's disease*. *Neurobiol Aging* 26:575-8, 2005
8. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB: *CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse*. *Biochem J* 199:



- 393-8, 1981
9. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S: *The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. Free Radic Biol Med* 6:845-53, 1994
  10. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y: *Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats a model of type 2 diabetes. Diabetes* 48:927-32, 1999
  11. Baynes JW: *Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. Diabetes* 40:405-12, 1991
  12. Szkudelski T: *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res* 50:536-46, 2001
  13. Kubisch HM, Wang J, Bray TM, Phillips JP: *Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic b-cells against oxidative stress. Diabetes* 46:1563-6, 1997
  14. Plumb W, Price KR, Williamson G: *Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. Redox Rep* 4:123-7, 1999
  15. Fiorani M, Sanctis R, Menghinello P, Cucchiariini L, Cellini B, Dacha M: *Quercerin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells. Free Radic Res* 34:639-48, 2001
  16. Baynes JW, Thorpe SR: *The role of oxidative stress in diabetic complications. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 3:277-84, 1996
  17. Ceriello A: *New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a causal antioxidant therapy. Diabetes Care* 26:1589-96, 2003
  18. Lawrence MC, Bhatt HS, Watterson JM, Easom RA: *Regulation of insulin gene transcription by a  $Ca^{2+}$  responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. Mol Endocrinol* 15:1758-67, 2001
  19. West IC: *Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabet Med* 17:171-80, 2000
  20. Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, Walseth TF: *Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentration. J Clin Invest* 90:320-5, 1992
  21. Wolff SP, Dean RT: *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. Biochem J* 245:243-50, 1987
  22. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: *Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation, Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. Biochem J* 256:205-12, 1988
  23. Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Rabinovitch A: *Destruction of rat pancreatic islet beta-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. Endocrinology* 137:5290-6, 1996
  24. 김철희, 김찬희, 박형규, 서교일, 이기엽:  $H_2O_2$ 가 정상 백서 췌장소도의 인슐린 분비에 미치는 영향. *당뇨병* 26:265-73, 2002
  25. 은미정, 원규장, 문준성, 문선중, 이지은, 윤지성, 천경아, 조인호, 이형우: *INS-1 세포, HIT-T15 세포 및 백서 췌도 세포에서 포도당 독성의 원인으로 산화 스트레스 당뇨병* 29:393-400, 2005
  26. Robertson RP: *Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. J Biol Chem* 279:42351-4, 2004
  27. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB: *Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. Nature* 294:158-60, 1981
  28. Benhamou PY, Moriscot C, Richard MJ, Beatrix O, Badet L, Pattou F, Kerr-Conte J, Chroboczek J, Lemarchand P, Halimi S: *Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. Diabetologia* 41:1093-100, 1998
  29. Moriscot C, Pattou F, Kerr-Conte J, Richard MJ, Lemarchand P, Benhamou PY: *Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islets and INS-1 insulin-secreting cells. Diabetologia* 43:625-31, 2000
  30. Tanaka Y, Gleason CE, Trans PO, Harmon JS, Robertson RP: *Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10857-62, 1999
  31. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M: *Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic  $\beta$ -cells against glucose toxicity. Diabetes* 48:2398-406, 1999
  32. Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S, Miyawaki K, Ban

- N, Adachi T, Kuroe A, Iwakura T, Kubota A, Hiai H, Seino Y: *Antioxidant  $\alpha$ -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. FEBS Lett 473:24-6, 2000*
33. Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad M, Blomhoff R: *Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich food. Mech Ageing Dev 125:315-24, 2004*
34. William M, Amanda JS, Michael EJL, Peter G, Garry GD, Alan C: *Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. J Agric Food Chem 50:5197-201, 1999*
35. Hakkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen IM, Mykkanen HM, Torronen AR: *Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. J Agric Food Chem 47:2274-9, 1999*
36. Formica JV, Regelson W: *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food Chem Toxicol 33:1061-80, 1995*
37. Gadow AV, Joubert E, Hansmann CF: *Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea(Aspalathus linearis),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. J Agric Food Chem 45:632-8, 1997*
38. Pietta PG: *Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod 63:1035-42, 2000*
39. Ferguson LR: *Role of plant polyphenols in genomic stability. Mutat Res 475:89-111, 2001*
40. Nagata H, Takekoshi S, Takagi T, Honma T, Watanabe K: *Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. Tokai J Exp Clin Med 24:1-11, 1999*
41. Chen TJ, Jeng JY, Lin CW, Wu CY, Chen YC: *Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. Toxicology 223:113-26, 2006*
42. Scalbert A, Williamson G: *Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr 130:2073S-85S, 2000*
43. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C: *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr 81:230S-42S, 2005*
44. Vessal M, Hemmati M, Vasei M: *Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 135:357-64, 2003*
45. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S: *Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res 51:117-23, 2005*