

의학 석사학위 논문

INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한  
포도당 자극 인슐린분비 감소 기작 연구

아주대학교 대학원

의학과

김효은

INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한  
포도당 자극 인슐린분비 감소 기작 연구

지도교수 강 엽

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 8월

아주대학교 대학원

의학과

김효은

김효은의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 강 엽 인

심사위원 이 관 우 인

심사위원 장 영 주 인

아주대학교 대학원

2005년 6월 22일

## - 감사의 글 -

이곳 아주대와 인연을 맺은지도 벌써 2년이 훌쩍 지났습니다.  
이 졸업 논문이 완성되기까지 힘들었던 고비도 많았는데 정말 많은 분들의 도움으로 지금의 제가 있을 수 있었다고 생각합니다.  
다시 공부할 수 있는 기회를 주셨고 또한 제가 발전할 수 있도록 이끌어 주신 강엽 선생님께 제일 먼저 감사드립니다. 그리고 논문 지도 위원이셨고 많은 조언을 해주신 이관우 선생님, 장영주 선생님께 깊은 감사드립니다.  
그리고 처음 실험실에 왔을 때부터 모든 면에서 많은 힘이 되어주셨던 최성이 선생님, 제가 실험하는데 가장 중요한 INS-1세포를 끊임없이 공급해 주셨던 신하철 선생님 진짜 고마운거 알죠? 두분 다 부자 되세요~  
그리고 밝은 미소로 맞아주시던 황윤정 선생님, 도시락 정말 맛있었어요.  
그리고 우리의 깜찍이 세희 언니, 울 실험실 막둥이 수진이, 실험실 왕언니 진희 언니, 귀여운 은선 언니, 동그란 신영희 선생님, 시큰둥 달래, 깔끔한 영주씨, 웰빙 소녀 미라씨 다들 모두 좋은 결과 있길 바랍니다.  
내분비 II의 은희, 미애, 희수, 석순 선배, 용규씨, 엄영우 선생님 그리고 면역방 권용순 선생님, 은정씨, 영은씨도 많이 생각합니다.  
멀리서 많은 격려 해주었던 내 영원한 벼들 수진이, 혜진이, 미래 모두 잘될꺼야. 곁에 있는 것만으로도 유쾌해지는 친구들 은희와 수경이. 마지막으로 귀여운 동생들 효진이, 은지, 성수, 언제나 날 믿어주고 사랑해주시는 엄마, 내 든든한 기둥이 되어준 아빠에게 감사드립니다.

2005. 06. 김효은 드림

## INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 포도당 자극 인슐린 분비 저해 기작 연구

**배경 및 목적 :** 췌장 소도의 베타 세포는 인슐린을 합성, 분비하여 포도당 자극에 따라 혈당을 조절하는 역할을 한다. 베타 세포에서의 인슐린 분비는 포도당의 유입, 포도당 대사, TCA 회로, 산화적 인산화과정을 거쳐 ATP/ADP 비율이 증가되면  $K_{ATP}$  channel이 닫히고 그에 따른 탈분극에 의해 전압 의존적인  $Ca^{2+}$  channel이 열려서  $Ca^{2+}$  유입되는 경로와 증가한  $[Ca^{2+}]_i$ 에 의한 인슐린 분비의 효율을 높이는 신호 전달 경로가 생성되어 이루어진다. 그런데 제 2형 당뇨병에서는 이러한 인슐린 분비가 감소되어 있다. 포도당 자극 인슐린 분비 (GSIS) 저하의 원인은 여러 가지로 생각되지만 비만형 제 2형 당뇨병 환자에게 증가되어 있는 Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 베타 세포에서 포도당 자극 인슐린 분비를 감소시키는 하나의 요인으로 생각되어지고 있다. 그러나 그 TNF- $\alpha$ 가 어떻게 베타 세포의 포도당 자극 인슐린 분비 저하를 일으키는지 아직 자세히 연구되어 있지 않았다. 그래서 우리는 TNF- $\alpha$ 에 의한 포도당 자극 인슐린 분비 저해 기작을 알아보려고 본 연구를 수행하였다.

**결 과 :** 우선 INS-1 베타 세포에 TNF- $\alpha$ 를 전처리한 후, 인슐린 분비 저해 효과를 조사하여 보았다. INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 를 농도별, 시간별로 전처리하였을 때, 포도당 자극 인슐린 분비는 농도, 시간에 따라 각각 감소하는 양상을 보였다. 감소한 포도당 자극 인슐린 분비는 TNF- $\alpha$ 를 제거하면 정상으로 회복되었다. 에너지 합성 대체 물질인 Leucine과 Glutamine,  $K_{ATP}$  channel을 닫음으로서 인슐린 분비를 일으키는 것으로 알려져있는 sulfonylurea류 및 imidazolin류에 의한 인슐린 분비 정도도 TNF- $\alpha$  전처리에 의해서 40~50%까지 감소하는 것으로 나타났다.  $Ca^{2+}$  channel을 열게하여 인슐린 분비를 일으키는 Bay K8644에 의한 인슐린 분비도 TNF- $\alpha$  전처리에 의해서 50%까지 감소하였다. 탈분극을 일으켜 인슐린 분비를 일으키는 고농도의 KCl에 의한 인슐린 분비도 약간 감소하는 경향을 나타냈고,  $K_{ATP}$  channel과 독립적으로 인슐린 분비를 촉진하는 물질인 PMA, forskolin에 의한 인슐린 분비는 TNF- $\alpha$ 의

전처리에도 불구하고 저해 받지 않았다. INS-1 베타 세포에 TNF- $\alpha$ 를 24시간 동안 처리하였을 때 인슐린 및 GLUT2와 Glucokinase의 mRNA와 단백질 발현량은 감소하지 않았다. 그리고 K<sub>ATP</sub> channel을 닫는데 필요한 ATP 합성량도 변화가 없었다. 이 결과로 TNF- $\alpha$ 가 인슐린 생합성 및 포도당 유입, 포도당 대사에 큰 영향을 끼치지 않았음을 확인하였다. TNF- $\alpha$ 의 전처리는 베타 세포에서 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup> 유입량과 박동성을 감소시켰다. INS-1 세포에서 TNF- $\alpha$ 는 단독으로 세포 내 기저 Ca<sup>2+</sup> 농도를 약간 증가시키는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$  전처리에 의해 감소된 포도당 자극 인슐린 분비가 L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker인 Nifedipine과 K<sub>ATP</sub> channel opener인 Diazoxide에 의해서 100% 회복되었다. 이 결과로 TNF- $\alpha$ 에 의한 기저 Ca<sup>2+</sup>농도의 증가가 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup> 유입량의 감소를 일으키는 것으로 생각되고 TNF- $\alpha$ 에 의한 기저 Ca<sup>2+</sup>농도의 증가는 L-type Ca<sup>2+</sup> channel을 통해 유입되는 것으로 생각된다. 그러나 Ca<sup>2+</sup>유입량을 조절하는 K<sub>ATP</sub> channel 과 L-type Ca<sup>2+</sup> channel의 mRNA 및 단백질 발현량은 TNF- $\alpha$  전처리에 의해 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화되는 신호 전달 물질이 포도당 자극 인슐린 분비의 저하와 관련되어있는지 알아보려고 ERK, p38, JNK, NFkB의 활성화가 미치는 영향을 조사해보았다. TNF- $\alpha$  전처리에 의해 감소되었던 포도당 자극 인슐린 분비는 NFkB 저해제인 SN50에 의해서 회복되었다. TNF- $\alpha$ 에 의한 NFkB의 활성화가 포도당 자극 인슐린 분비를 저해하는데 일부 관여할 것으로 생각된다.

**결론 및 의의 :** INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 전처리는 포도당 자극 인슐린 분비 뿐 아니라 그 외 분비 자극 물질에 대한 인슐린 분비도 현저하게 감소시켰다. INS-1 베타 세포에서 이러한 인슐린 분비 감소 현상의 원인으로서는 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup>유입량의 감소 때문으로 생각되며 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화된 NFkB의 신호 전달 체계가 포도당 자극 인슐린 분비 저하에 관련된 것으로 생각된다. 우리의 연구를 통해서 NFkB의 활성화가 제 2형 당뇨병의 병인중 하나인 인슐린 분비 저해를 유도할 수 있음을 보여주었다.

---

핵심어: Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 포도당 자극 인슐린 분비 (GSIS), K<sub>ATP</sub> channel, L-type Ca<sup>2+</sup> channel, NFkB, SN50

# 차 례

국문 요약 .....	i
차 례 .....	iii
그림 차례 .....	v
약 어 표 .....	vii
I. 서 론 .....	1
A. 당뇨병의 정의 및 분류 .....	1
B. 제 2형 당뇨병 .....	2
C. 인슐린 분비 .....	2
1. 인슐린 생합성 및 분비 .....	2
2. 이상성과 박동성 인슐린 분비 양상 .....	3
3. 인슐린 분비 기작 .....	5
D. 제 2형 당뇨병에서 인슐린 분비 이상 .....	9
E. TNF- $\alpha$ 의 신호 전달 경로 .....	10
F. 연구목적 .....	11
II. 재료 및 방법 .....	13
A. 재 료 .....	13
1. 재 료 .....	13
B. 방 법 .....	15
1. 세포주 및 세포 배양 .....	15
2. 췌장 소도 세포 (Pancreas islet) 분리 .....	15
3. MTT 측정 .....	15
4. 인슐린 정량 .....	16
5. RT-PCR .....	16
6. 세포 내 Ca <sup>2+</sup> 량 측정 .....	17
7. 세포 내 ATP량 측정 .....	18

8. Western blotting .....	18
9. 세포막 단백질 분리 .....	19
10. Transfection .....	19
III. 결 과 .....	21
A. INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 가 GSIS에 미치는 영향 .....	21
B. TNF- $\alpha$ 가 인슐린 분비 자극 물질에 의한 인슐린 분비에 미치는 영향 .....	26
C. TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 생합성량 변화 .....	32
D. TNF- $\alpha$ 가 베타 세포 당대사에 미치는 영향 .....	32
E. TNF- $\alpha$ 가 포도당 자극 Ca <sup>2+</sup> 유입량에 미치는 영향 .....	37
F. TNF- $\alpha$ 에 의한 Ca <sup>2+</sup> 유입량의 감소 작용점 조사 .....	40
G. TNF- $\alpha$ 가 Channel의 양적 변화에 미치는 영향 .....	42
H. TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 분비저해에 관련된 신호전달 물질 조사 .....	46
I. I $\kappa$ B $\alpha$ 유전자 과발현 세포주 .....	50
IV. 고 찰 .....	52
참고 문헌 .....	57
영문 요약 .....	65



## 그림 차례

Fig. 1. Granule pools in the $\beta$ -cell .....	4
Fig. 2. Schematic representation of insulin secretion pathways in $\beta$ -cell .....	8
Fig. 3. TNF- $\alpha$ activated signaling pathway .....	12
Fig. 4. Pattern of TNF- $\alpha$ - induced GSIS inhibition in INS-1 cell	24
Fig. 5. Effect of TNF- $\alpha$ on INS-1 cell viability .....	25
Fig. 6. Effect of TNF- $\alpha$ on ATP generating agent-stimulated insulin secretion .....	28
Fig. 7. Effect of TNF- $\alpha$ on $K_{ATP}$ channel closing agent-stimulated insulin secretion .....	29
Fig. 8. Effect of TNF- $\alpha$ on $Ca^{2+}$ releasing agent-stimulated insulin secretion .....	30
Fig. 9. Effect of TNF- $\alpha$ on on PKC, PKA activating agent-stimulated insulin secretion .....	31
Fig. 10. Effect of TNF- $\alpha$ treatment on insulin expression .....	34
Fig. 11. Effect of TNF- $\alpha$ on glucose metabolism related molecules .....	35
Fig. 12. Effect of TNF- $\alpha$ on ATP production in INS-1 cell .....	36
Fig. 13. Effect of TNF- $\alpha$ on glucose-induced $Ca^{2+}$ influx .....	39
Fig. 14. Diazoxide and Nifedipine protect against impaired insulin secretion elicited by TNF- $\alpha$ .....	41
Fig. 15. Effect of TNF- $\alpha$ on gene expression of $K_{ATP}$ channel and L-type $Ca^{2+}$ channel .....	43
Fig. 16. Effect of TNF- $\alpha$ on protein expression of $K_{ATP}$ channel and L-type $Ca^{2+}$ channel. ....	44

Fig. 17. Involvement of PKC and PKA in GSIS inhibition by TNF- $\alpha$ .....	47
Fig. 18. Involvement of TNF- $\alpha$ -mediated signaling pathway in GSIS inhibition by TNF- $\alpha$ .....	48
Fig. 19. Involvement of TNF- $\alpha$ -induced ROS and NO in GSIS inhibition by TNF- $\alpha$ .....	49
Fig. 20. Establishment of cell lines stably overexpressing I $\kappa$ B $\alpha$ .....	51

## 약 어 표

IDDM	Insulin Dependent Diabets Mellitus
NIDDM	Non Insulin Dependent Diabets Mellitus
GLUT2	Glucose Transporter 2
GPCR	G -Protein Coupled Receptor
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trisphosphate
DAG	Diacylglycerol
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
FFA	Free fatty acid
GSIS	Glucose stimulated insulin secretion
NF $\kappa$ B	Nuclear factor- Kappa B
JNK	Jun N-terminal kinase
NIK	NF $\kappa$ B Inducing Kinase
I $\kappa$ B	Inhibitory Kappa B
ERK	Extracellular signal-related kinase
Kir6.2	inward rectifier K channel subunits 6.2
SUR1	Sulfonylurea receptor 1
K <sub>ATP</sub> channel	ATP dependent K channel

# I. 서 론

## A. 당뇨병의 정의 및 분류

우리의 인체는 음식물을 통해 에너지를 얻어 살아가고 그 에너지의 대부분은 포도당을 통해 만들어진다. 포도당이 체내에 흡수되면 혈중 포도당 (혈당)이 증가하고 증가된 혈당은 췌장에서 분비되는 호르몬인 인슐린에 의해 간, 골격근, 지방 조직으로 흡수되어 에너지로 사용된다. 에너지로 사용하고 남은 포도당은 인슐린에 의해 간에 흡수되어 글리코겐 (glycogen)이라 불리는 물질로 바뀌어 저장된다. 식사를 하지 않은 상태에서 세포가 에너지를 필요로 하게 되면 간에 저장되어 있던 글리코겐은 포도당으로 바뀌어 다시 혈관으로 내보내져서 다른 세포가 이용할 수 있게 된다. 이렇게 인슐린은 체내 혈당을 조절하여 대사의 항상성을 유지시키는데 중요한 역할을 한다.

그러므로 이러한 인슐린의 분비 및 작용이 저하되거나 글루카곤의 분비가 증가해서 혈중 포도당 농도가 기저농도에 비해 높은 상태로 지속적으로 유지되면 복합적인 병증을 나타내는데 그러한 상태를 당뇨병이라 한다. 당뇨병은 그 발병원인에 따라서 두 가지로 나뉘어진다. 첫째가 인슐린 의존형인 제1형 당뇨병 (Insulin Independent Diabetes Mellitus: IDDM)인데 이는 유전적 감수성 및 여러 환경인자가 작용하여 자가 면역반응을 일으켜 베타 세포가 파괴되어 인슐린 분비가 절대적으로 부족하게 되어 당뇨병에 걸린 경우이다. 둘째는 인슐린 비의존형인 제 2형 당뇨병 (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus : NIDDM)이다. 이는 인슐린 분비는 되지만 인슐린 저항성과 함께 상대적인 인슐린 분비 결핍으로 인해 혈당 조절이 안 되서 당뇨병에 걸린 경우이다.

## B. 제 2형 당뇨병

제 2형 당뇨병을 유발하는 원인은 인슐린 저항성과 인슐린의 상대적인 분비 결핍이다 (Kahn 등, 2003). 인슐린 저항성이란 주어진 인슐린 농도 하에서 인슐린에 대한 반응이 정상보다 감소되어 있는 상태를 지칭한다. 즉, 인슐린 작용에 결함이 생긴 것을 의미하는데 제 2형 당뇨병 환자에서 인슐린 저항성은 대표적인 인슐린 표적 기관인 간, 근육, 지방조직에서 모두 나타난다. 표적 기관들에 대한 인슐린 작용에 이상이 생기면 우선 혈당이 지속적으로 증가하게 되어 고혈당을 나타내고 고혈당을 극복하기 위해 고인슐린혈증을 나타내게 된다. 이러한 인슐린 저항성의 원인으로서는 인슐린 수용체 감소 및 기능이상 (Withers 등, 1998), 신호전달체계 생성의 결함 (Zierath 등, 1998), 포도당 수송체와 세포 내 포도당대사의 이상을 들 수 있다 (Abel 등, 2001; Ohneda 등, 1993).

## C. 인슐린 분비

### 1. 인슐린 생합성 및 분비

췌장 소도의 베타 세포는 체내의 대사상태에 따라 인슐린을 합성하고 분비하는 역할을 한다. 소도세포에는 펩타이드를 분비하는 내분비 세포들이 밀집되어 있는데 그 중 70%~90%를 차지하고 있는 것은 인슐린을 분비하는 베타 세포 ( $\beta$  cell)이다. 그 외 글루카곤을 분비하는 알파 세포 ( $\alpha$  cell), 소마토스타틴을 분비하는 델타 세포 ( $\delta$  cell), 췌장 폴리펩타이드를 분비하는 PP 세포 이렇게 4가지 세포로 구성되어있다.

인슐린은 췌장의 베타 세포에서 생성 분비되는 펩타이드 호르몬으로서 포도당, 단백질, 지질등의 동화작용을 촉진하여 대사의 항상성을 유지시키는 중요한 생리적 역할을 한다. 베타 세포에서 인슐린 생합성의 전반적인 과정을 살펴보면 포도당 자극에 의해서 인슐린 유전자에서 전전구인슐린 (preproinsulin)이 만들어지

고 전전구인슐린에서 24개의 아미노산이 잘려나가 전구인슐린 (proinsulin)이 되고, 전구인슐린에서 다시 4개의 아미노산이 잘려나가면서 51개의 아미노산을 가진 인슐린과 31개의 아미노산을 갖는 C-peptide로 변환된다.

## 2. 이상성과 박동성 인슐린 분비 양상

베타 세포에서 포도당에 의한 인슐린 분비는 1차 분비와 2차 분비로 나뉘어 지는 이상성 분비 양상을 나타낸다 (Straub 등, 2002). 1차 분비는 베타 세포에 포도당 농도를 급격히 올렸을 때 인슐린 분비가 일시적으로 급격히 상승하는 시기를 말하며 대개 10분내에 인슐린 분비가 기저치로 회복된다. 제 2차 분비는 포도당 농도를 서서히 증가시킬 때 포도당에 노출된 이후 25분에서 30분 이후부터 약 4시간 까지 점진적으로 인슐린 분비가 이루어지는 시기이다. 이러한 현상은 in vitro에서 perfusion 실험을 통해서 알 수 있으며 in vivo의 경우 포도당의 정맥 주입을 통해서 알 수 있었다 (Curry 등, 1968). 이러한 이상성 인슐린 분비 양상은 인슐린당의 구별된 pool의 존재와 포도당에 의해 활성화되는 신호들의 kinetics의 차이로 나타난다 (Henquin 등, 2003). 이렇게 합성된 인슐린은 Reserve pool, Docked pool, Readily releasable pool이라 불리는 인슐린 priming 과정을 통해서 분비된다 (Fig. 1) (Bratanova-Tochkova 등, 2002).

베타 세포에서의 포도당 자극 인슐린 분비의 또 다른 특징은 포도당 대사과정, 세포 내  $Ca^{2+}$  유입, 세포막 전위차가 박동함 (oscillation)에 따라 인슐린 분비 형태에 박동성이 나타나는 것이다 (Porksen 등, 2002). 포도당에 대한 1, 2차 인슐린 분비의 감소와 박동성 인슐린 분비 형태에 이상이 생기는 것은 제 2형 당뇨병의 원인 중 하나이다.

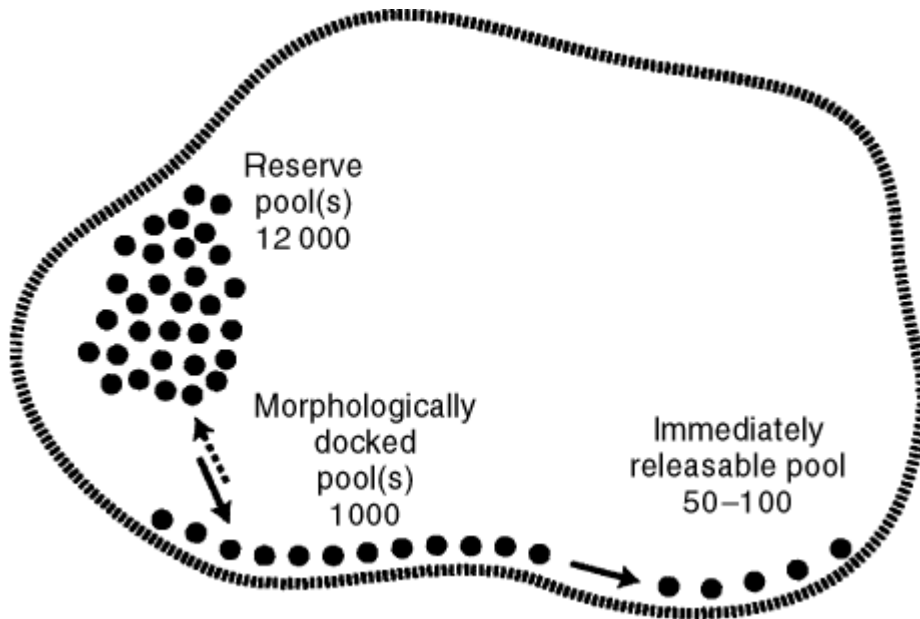


Fig. 1. Granule pools in the  $\beta$ -cell.

### 3. 인슐린 분비 기작

#### (1) Triggering 경로

베타 세포에서 인슐린 분비를 위해서는 일차적으로 세포 내  $Ca^{2+}$ 이 증가하는 것이 필수적이다. (Fig. 2)의 Site1 에서 보듯이 포도당이 베타 세포에 있는 GLUT2 (glucose transporter 2)라고 하는 포도당 수송체에 의해 세포 내로 들어가면 해당작용과 TCA cycle을 통해서 ATP를 만들어낸다 (Site 2). 증가된 ATP/ADP 비율은  $K_{ATP}$  channel을 닫음으로서 세포막의 탈분극을 일으킨다 (Cook 등, 1984). 이때 생긴 막전위 차에 의해 전압 의존적인  $Ca^{2+}$  channel 이 열리게 되고 (Site 3) 세포외부의  $Ca^{2+}$ 이 대량으로 세포 내부로 유입되어 인슐린 분비를 유발시킨다 (Site 5) (Ashcroft 등, 1984; Wollheim, 1981) .

$K_{ATP}$  channel은 Kir 6.2 (inward rectifier potassium channel subunits 6.2) 와 SUR1 (Sulfonylurea receptor 1)과 같은 하위구조 단백질로 구성되어 있다.  $K_{ATP}$  channel을 닫음으로서 인슐린을 분비하는 물질로는 Glimpiride, Tolbutamide같은 Sulfonylurea류 제제와 Efaroxan, Phentolamine과 같은 Imidazoline 화합물등이 알려져있는데 Sulfonylurea류 제제와 Imidazoline 화합물은 각각  $K_{ATP}$  channel의 하위구조 중 하나인 SUR1과 Kir 6.2와 상호작용하여 인슐린 분비를 일으키는 것으로 밝혀져 있다 (Hoenig 등, 1986; Korytkowski 등, 2004; Ball 등, 2004; Efendic 등, 2002). 포도당 이외에도 고농도의 KCl은 세포 내로 유입되면서 세포막의 탈분극을 유발시켜서 인슐린 분비를 일으킬 수 있다 (Liu 등, 2003). 또한 세포 외부에 Arginine의 농도가 증가하면 cationic amino acid transporter (CAT2A)를 경유하여 베타 세포 내로 양이온이 유입되면서 탈분극을 유도하여 인슐린 분비를 유발시킬 수 있다 (Smith 등, 1997). 즉, 베타 세포 내에  $Ca^{2+}$ 을 급속히 증가시키는 경로가 1차 인슐린 분비를 일으키는 Triggering 경로이다.

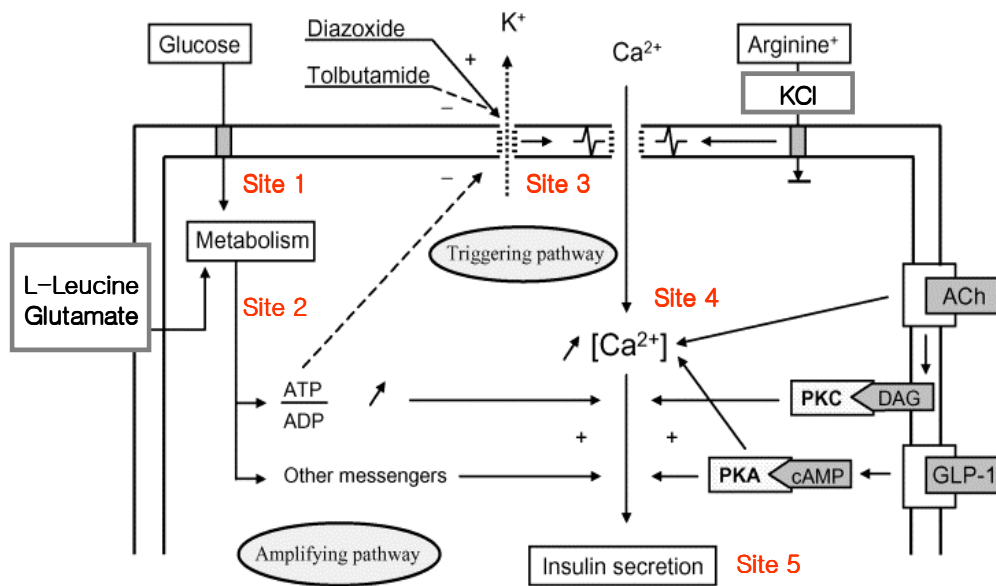


## (2) Amplifying 경로

포도당은 베타 세포에서 Triggering 신호와 함께  $Ca^{2+}$ 에 의한 인슐린 분비 효율을 증가시키는 Amplifying 신호를 만들어낸다. 이 경로는 주로 2차 분비에 관련된 신호 전달 경로 알려져 있다. 이 Amplifying 경로를 통한 인슐린의 지속적인 분비는 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 증가를 유발시키는 Triggering 신호가 필수적이다 (Henquin 등, 2003).

Amplifying 신호를 활성화시키는 매개체는 아직까지 분명하게 밝혀져 있지는 않으나 몇 가지 대사 중간 산물이나 신호 전달 물질들로 생각하고 있다. 그 중 첫 번째는 malonyl co-A/long chain acyl-coA 가설로서 지속적인 포도당의 유입은 mitochondrial citrate의 양을 증가시키고 이것은 세포 내 citrate의 양을 증가시킨다. 그로 인해 malonyl co-A의 양이 증가하는데 이것이 CPT-1을 저해해서 지방산의 베타 산화를 감소시킨다. 결과적으로 세포 내 long chain acyl-coA가 양적으로 증가하여 인슐린 분비를 증가시킨다는 설이다 (Straub 등, 2002). 두번째 가설은 포도당에 의해 증가된 glutamate가 인슐린낭에 직접적으로 작용함으로써 인슐린 분비를 증가시킨다고 한다 (Corkey 등, 2000). 세 번째는 베타 세포 내의 ATP/ADP, GTP/GDP Level의 변화가 인슐린 분비를 조절하는 주요 요인이라고 주장하고 있다 (Bertrand 등, 2002). 그 외 Amplifying 신호로 PKC, PKA, Phospholipase A2, nitric oxide 생성, PI3Kinase 등이 알려져 있다 (Fig. 2의 Site4) (Detimary P 등, 1996). Protein kinase C (PKC)의 활성화에 따른 인슐린 분비는 Acetylcholine과 같은 호르몬에 의해 활성화 되는 신호 전달 경로가 대표적이다. G-protein coupled receptor가 호르몬에 의해 활성화 되면 phospholipase C가 활성화되어 Inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ )와 Diacylglycerol (DAG)이 생성된다. 이때 생성된  $IP_3$ 는 소포체 막에 존재하는  $IP_3$  수용체 (Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor)와 작용하여 세포 내로  $Ca^{2+}$ 을 방출한다. 또 증가된 DAG는 PKC isoform을 활성화시켜서 인슐린을 분비한다 (Troitzta 등, 2002). DAG

analogue인 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)는 PKC를 활성화시켜서 인슐린을 분비하는 것으로 알려져 있다 (Lee 등, 2003). Protein Kinase A (PKA)의 활성화에 따른 인슐린 분비는 GLP-1이나 GIP같은 장관 내 호르몬에 의해 Adenylnyl cyclase가 활성화되는 신호 전달 경로이다. 장관 내 호르몬에 의해 GPCR이 활성화되면 Adenylnyl cyclase가 활성화 되어 cyclic AMP (cAMP)가 다량 생산된다. 이 cAMP는 PKA와 cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors (Epac)과 같은 신호 전달 물질들을 활성화시켜 인슐린 분비를 촉진시킨다 (Troitzka 등, 2002; Holz 등, 2004). Forskolin은 베타 세포에서 PKA를 활성화시켜 인슐린 분비를 일으키는 것으로 알려져 있다 (Lee 등, 2003).



**Fig. 2. Schematic representation of insulin secretion pathways in  $\beta$ -cell.**

site1: Glucose transport.

site2: Oxidative metabolism in  $\beta$ -cell

site3: Increase of  $\beta$ -cell  $[Ca^{2+}]_i$  by blockade of  $K_{ATP}$  channels

site4: Stimulation of amplifying pathways in  $\beta$ -cell

site5: Exocytosis of insulin by  $Ca^{2+}$

#### D. 제 2형 당뇨병에서 인슐린 분비 이상

췌장 베타 세포의 주요 기능은 체내 혈당의 항상성을 유지하기 위해서 인슐린을 합성하고 분비하는 것이다. 이러한 베타세포가 지속적인 고혈당 상태에 노출되어있으면 포도당과 그 외 인슐린 분비 자극에 대한 1,2차 분비의 감소와 박동성 인슐린 분비 형태에 이상이 유발된다고 보고되어 있다 (Henquin 등, 2003). 베타 세포가 포도당 또는 그 외 인슐린 분비 자극에 지속적으로 노출되어 있으면 그 인슐린 분비 자극에 대한 베타세포의 인슐린 분비 반응이 감소한다. 그리고 인슐린 분비 자극을 제거하게 되면 인슐린 분비 반응이 정상으로 회복되는데 이러한 상태를 인슐린 분비의 Desensitization이라한다. 이때 인슐린 분비 반응의 감소가 세포 내 인슐린의 양적 감소를 동반하는 경우는 베타 세포 Exhaustion이라 일컫는다 (Rustenbeck 등, 2004). 당뇨병이 오랜기간 지속되면 인슐린 분비 자극을 제거함에도 불구하고 인슐린 분비 반응이 더 이상 회복되지 않는 상태에 이르게 되고 이 상태는 베타 세포 기능이상과 구조의 변화를 동반한다. 즉, 베타 세포의 양적 감소로 이어져 되돌릴 수 없는 완전한 당뇨병으로 진행되는 것으로 알려져 있다(Weir 등, 2001).

이러한 인슐린 분비 감소의 원인으로 밝혀져 있는 물질은 지속적인 고혈당과 증가된 FFA에 의해 생성된 ROS와 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등의 cytokine이 있다 (Evans 등, 2003). 베타 세포가 지속적인 고혈당에 노출되면 세포 내 ROS, 단백질의 nonenzymatic glycation (Brownlee 등, 2000), 포도당 자가산화등에 의해서 산화스트레스가 유발된다 (Wolff 등, 1991). 또한 베타 세포가 유리지방산 (free fatty acid : FFA)에 지속적으로 노출되어 있으면 mitochondrial uncoupling, 베타 산화가 증가하여 산화스트레스를 유발한다 (Wojtczak 등, 1993; Carlsson 등, 1999). 이와 더불어 고혈당과 유리 지방산에 의한 산화스트레스는 스트레스 자극 신호 전달 경로를 활성화시켜 인슐린 분비를 저해한다. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 는 활성화된 면역세포에서 분비되는 세포독성 cytokine으로서

당뇨병을 일으키는데 관여하고 있다는 사실이 알려져 있다 (Evans 등, 2003). 그 중 비만형 제 2형 당뇨병 환자에게서 증가되어있는 adipokine중의 하나인 TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )는 INS-1 베타 세포에서 포도당에 의한 인슐린 분비 (Glucose stimulated insulin secretion: GSIS)를 저해하는 것으로 밝혀져 있다 (Zhang S 등, 1995). 그러나 그 기작은 확실히 밝혀져 있지 않다.

#### E. TNF- $\alpha$ 의 신호 전달 경로

TNF- $\alpha$ 는 TNFR1과 TNFR2의 2개의 수용체와 결합한다. 그 중 TNFR1이 대표적인데 TNF- $\alpha$ 와 TNFR가 결합하여 활성화되면 TNFR의 cytosolic domain인 death domain이 adaptor protein인 TRADD (TNFR associated DD protein)를 Recruiting한다. 그리고 TRADD는 TRAF-2와 FADD (FAS associated DD protein)를 recruit한다. 이 경로는 세포사와 관련되어있다 (Z.G. Liu 등, 1996). 반면 TRAF2는 NIK (NF $\kappa$ B Inducing kinase)를 recruiting하여 NF $\kappa$ B를 활성화 시키고 세포 생존에 관련하는 것으로 알려져 있다. 이 경로와는 별도로 TNF- $\alpha$ 는 TRAF2를 통해 JNK와 SAPK를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. TNF- $\alpha$ 가 활성화 시키는 신호전달 물질에는 대표적으로 Nuclear factor Kappa B (NF $\kappa$ B), Jun N-terminal kinase (JNK), p38, Extracellular signal-related kinase (ERK)등이 알려져 있다 (Wulczyn 등, 1996). 이 중 Nuclear factor Kappa B (NF $\kappa$ B)는 innate & adaptive immunity, inflammation, stress response, B cell development, lymphoid organogenesis등 여러 방면의 유전자 발현에 관여하는 전사인자로 알려져 있다 (Hsu 등, 1996). 평소에 NF $\kappa$ B는 I $\kappa$ B에 의해 비활성화 상태로 존재하다가 NIK에 의해 활성화된 IKK (I $\kappa$ B kinase)가 I $\kappa$ B를 인산화시키고 인산화된 I $\kappa$ B는 NF $\kappa$ B에서 떨어져 나가 분해되고 NF $\kappa$ B는 활성화 상태로 바뀌어 핵 안으로 이동하여 전사인자로서 작용하게 된다 (Gutian 등, 2004). SN50은 NF $\kappa$ B

의 하위 구조인 p50의 nuclear localization sequence에 작용하는 Cell-permeable synthetic peptide로서 NF $\kappa$ B가 핵으로 이동하는 것을 특이적으로 저해하며 NF $\kappa$ B의 DNA 결합을 막는 것으로 알려져 있다 (Lin 등, 1995).

## F. 연구목적

INS-1 베타 세포가 TNF- $\alpha$ 에 노출되어 있을 때 GSIS가 감소되어 있었다. 그래서 본 연구는 TNF- $\alpha$ 가 어떻게 베타 세포에서의 GSIS를 감소시키는지 그 기작을 밝히고자 한다. 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 GSIS가 저하되는 기작을 밝힌다면 인슐린 비의존형 당뇨병 (NIDDM)의 병인 중 하나인 인슐린 분비 결핍에 대해 이해하는데 도움이 될 것이다.

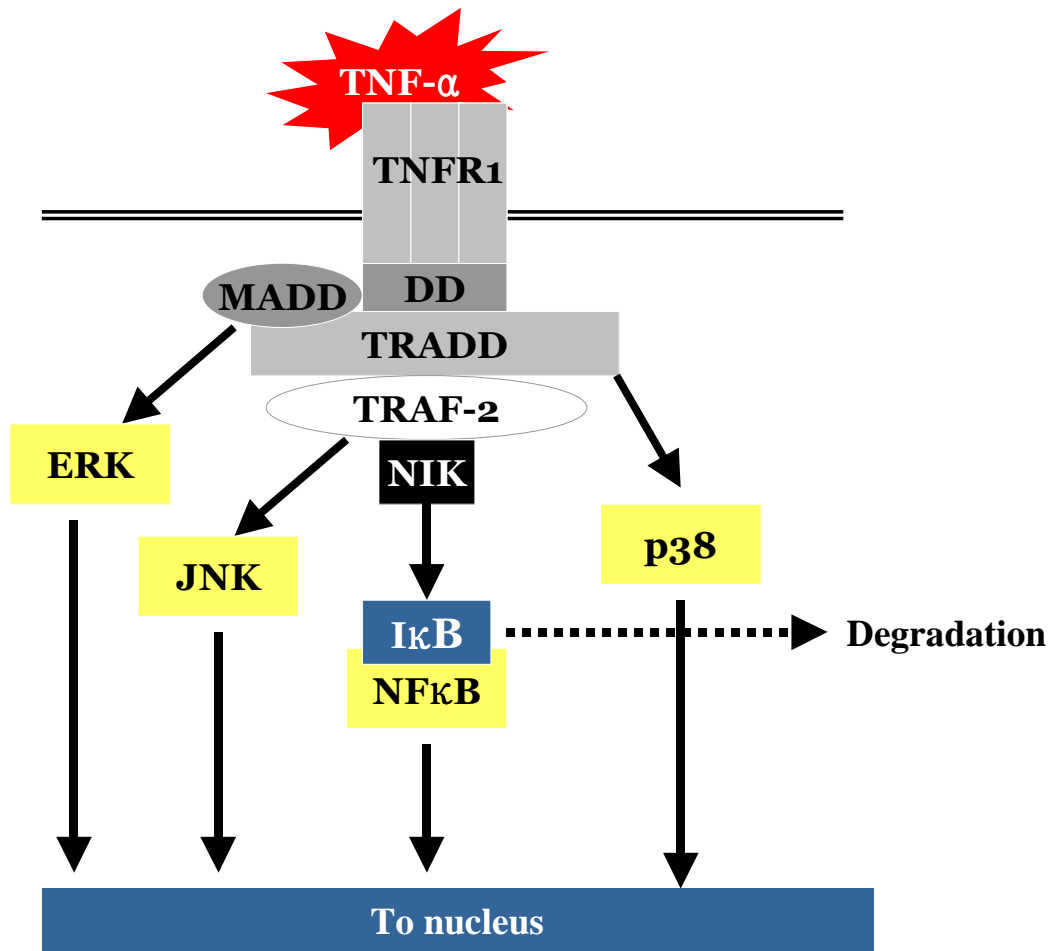


Fig. 3. TNF- $\alpha$  activated signaling pathway

## II. 재료 및 방법

### A. 재료

#### 1. 재료

세포 배양에 사용하는 Fetal bovine serum ( GibcoBRL, Life Technology, NY)과 antibiotics antimycotics (GibcoBRL, Life Technology, NY)는 GibcoBRL, Life Technology에서 구입하였다. 세포 배양에 사용하는 RPMI 1640은 sigma(sigma, St. Lois)에서 구입하였다. 췌장 소도세포 분리에 사용한 Collagenase P는 Roche(Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)에서 구입하였고, Ficoll은 sigma에서 구입하였다. Recombinant Murine TNF- $\alpha$ 는 R&D systems 에서 구입하였다. Dantrolene, Xestospongine C (XeC), Nifedipin, Diazoxide, KN93, EGTA/AM, BAPTA/AM, H89, GF109203X, GO6976, GO6983, PD98059, SB203580, SP600125, SN50, NMMA등의 저해제들은 Calbiochem (Calbiochem, Germany)에서 구입하였다. L-leucine, Glutamate, pyruvate, Glimepiride, Tolbutamide, Phentolamine, Efaroxan등은 sigma에서 구입하였다. Western blot에 사용된 Kir 6.2와 SUR 1의 항체는 Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA)에서 구입하였고  $\alpha$ 1D의 항체는 (Calbiochem, Germany)에서, 그리고 I $\kappa$ B $\alpha$  항체는 Cell signaling (Cell signaling Technology, USA)에서 구입하였다. 세포 내 ATP측정에 사용되었던 Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit는 Promega에서 구입하였다. 인슐린 측정에 사용되었던 Rat insulin assay Kit (Linco Research, St. Louis, MO)는 Linco에서 구입하였다.



## 저해제 (Inhibitor)

Dantrolene	RyR inhibitor
Diazoxide (DZX)	K <sub>ATP</sub> channel opener
H89	PKA inhibitor
GF109203X	Pan PKC inhibitor
GO6976	cPKC inhibitor
GO6983	cPKC, nPKC inhibitor
PD98059	ERK inhibitor
SB203580	p38 inhibitor
SP600125	JNK inhibitor
SN50	NFκB inhibitor
NMMA	iNOS inhibitor
Bay K8644	L-type Ca <sup>2+</sup> channel agonist
KN93	CaM kinase II inhibitor
Xestospongine C	IP <sub>3</sub> inhibitor
Nifedipine	L-type Ca <sup>2+</sup> channel blocker
BHA	anti-oxidant
NAC	anti oxidant

## B. 방법

### 1. 세포주 및 세포 배양

INS-1 세포주와 췌장 소도 세포는 11mM 포도당이 포함된 RPMI 1640 배지에 10% Fetal bovine serum과 100IU/ml penicillin과 100  $\mu$ g/ml streptomycin의 항생제를 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>와 37°C의 온도를 유지하면서 배양하였다.

### 2. 췌장 소도 세포 (Pancreas islet) 분리

췌장 소도 세포는 collagenase digestion 방법으로 분리하였다. 8~10주된 웅성 Sprague-Dawley 쥐 (300g)의 common bile duct에 0.75mg/ml의 collagenase 를 10ml 주사하고 췌장을 분리하였다. 37°C water bath에서 약10분 정도 두면서 digestion 시킨 후, 차가운 HBSS를 20ml 넣어 효소의 작용을 중지 시키고 나서 pipetting을 세차게 20회 정도 해준 후, 600 $\mu$ m mesh에 걸러서 digestion되지 않은exocrine 세포들을 제거하였다. 걸러진 용액은 50g로 원심 분리하여 상등액을 버리고 침전물을 HBSS를 넣고 섞어 50g로 원심 분리하여 씻어내는 과정을 3회 반복하였다. 남은 침전물은 25% 용액에 섞은 후, 그 위로 23%, 21.5%, 20.5%, 11%의 ficoll층을 만들고 3500rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 11%와 20.5% 사이 층에 걸린 췌장 소도 세포를 분리하여 RPMI 1640로 세척한 후, RPMI 1640 (10% fetal bovine serum과 1%항생제 포함) 배지로 배양기에서 12시간 배양하였다.

### 3. MTT 측정

INS-1 베타 세포를 96Well plate에 well당  $5 \times 10^4$ 로 분주하고 24시간 동안 배양 한 후, TNF- $\alpha$ 를 농도별로 24시간 처리하였다. MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 - (diphenylte-trazollium)를

0.5mg/ml 농도로 3시간동안 37℃에서 반응시킨 후, 상등액을 버리고 isopropanol로 2 분 동안 녹였다. Microplate Reader Benchmark (Bio Rad , Japan)로 흡광률 측정하였다.

#### 4. 인슐린 정량

INS-1 세포는 RPMI 1640 (10% fetal bovine serum과 1% 항생제 포함) 배지로 24well dish에  $1.5 \times 10^5$ 개를 깔고 24시간 배양하였다. TNF- $\alpha$ 와 각각의 저해제들을 함께 24시간 처리한 후에 인슐린 분비량을 조사하였다. 0.2mM 포도당이 첨가된 KRB buffer (NaHCO<sub>2</sub> 24mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2mM, Hepes 1mM, NaCl 129mM, KCl 4.8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, 0.2% BSA)로 1 시간 동안 전배양을 수행한 후, 먼저 TNF- $\alpha$ 와 저해제들이 포함된 준비해 두었던 배지를 1ml씩 각 well에 넣어주었다. 2시간 동안의 배양이 끝난 뒤, 각상등액을 200 $\mu$ l씩 모아 Rat insulin assay kit로 Radioimmunoassay 방법을 통해 인슐린량을 측정하였다. 세포 내 존재하는 인슐린량을 측정하기 위해서 acid-ethanol (ethanol/H<sub>2</sub>O/1M의HCl, 790:10:100)을 각 well당 200 $\mu$ l씩 넣고 4℃에서 12시간 동안 두었다. 그 추출물을 모아서 700g에서 3분간 원심분리 후 Rat insulin assay Kit 를 사용하여 Radioimmunoassay법으로 인슐린을 측정하였다.

#### 5. RT-PCR

INS-1 세포를 RPMI 1640 (10% fetal bovine serum과 1% 항생제 포함) 배지로 12well plate에  $3.1 \times 10^5$ 개씩 분주해서 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 에서 20시간 동안 배양한 후, 각각의 약제들을 처리하였다. 18~24시간 이후에 세포를 PBS로 2회 씻어준 후, RNA Zol-B를 이용해 전체 RNA를 뽑고 정량하였다. 1 $\mu$ g의 RNA를 1000U AMV 0.5 $\mu$ l, 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l, Random 9mer 1 $\mu$ l, RNase inhibitor 0.5 $\mu$ l, Mgcl2 4 $\mu$ l, 10배 RT buffer를 이용해서 30℃ 10분, 42℃ 30

분, 99°C 5분 동안 역전사 반응을 시킨다. 이렇게 얻어진 cDNA로 PCR을 수행하였다. 사용한 primer는

Cyclophilin (Foward) : 5'-CCA AAg ACA gCA gAA AAC TT3'

Cyclophilin (Reverse) : 5'-gAA ATT AgA gTT gTC CAC Ag3'

iNOS (Foward) : 5'-gCA gAA TgT gAC CAT CAT gg3'

iNOS (Reverse) : 5'-ACA ACC TTg gTg TTg AAg gC3'

GLUT2(Foward) : 5'-Tgg gTT CCT TCC AgT TCg-3'

GLUT2(Reverse) : 5'-Agg CgT CTg gTg TCg TAT g-3'

Glucokinase (Foward) : 5'-TgA Cag AgC CAg gAT ggA g-3'

Glucokinase (Reverse) : 5'-TCT TCA CgC TCC ACT gCC-3'

Kir6.2 (Foward) : 5'-CCA TgT CCT TCC TgT gCA gCT g3'

Kir6.2 (Reverse) : 5'-CCg CAA CTC Agg ACA Agg AAT C-3'

Sur1 (Foward) : 5'-TTg CTg AAA CTg Tgg AAg gAC TCA C-3'

Sur1 (Reverse) : 5'-TTC Agg ACC ATC ACT Agg TCT gCA C-3'

$\alpha$  1D (Foward) : 5'-gAg gCA AAC TAT gCA AgA ggC AC-3'

$\alpha$  1D (Reverse) : 5'-CTg ACT CAg ATA TAg TAg CTg AAg-3'

$\beta$  3 (Foward) : 5'-CCA TCC CTg gAC TTC Ag-3'

$\beta$  3 (Reverse) : 5'-CTA ACg CCA ATC TAA CTC C -3' 이다.

0.8% agarose gel에서 PCR 반응물을 전기영동하여 EtBr로 염색하여 사진을 찍었다.

## 6. 세포 내 $Ca^{2+}$ 량 측정

세포 내  $Ca^{2+}$  측정은 fura 2와 dual excitation wavelength fluorescence microscopy를 이용했다. INS-1세포를 staining buffer에 1  $\mu$ M Fura -2AM (sigma, St Lois), Me2SO 0.09g/l, Pluronic F-127 0.018g/l (molecular Probe, Eugene, OR)로 30분 동안 염색한 후 세포를 Nikon Diaphot-300

inverted microscopy의 perfusion chamber에 올려놓았다. Delta Scan dual monochromator system (Photon Technology International, Monmouth Junction, NJ) 을 이용해 세포를 340nm, 380nm의 파장으로 excitation시켜서 방출되는 형광을 510nm 파장으로 측정했다.

## 7. 세포 내 ATP량 측정

INS-1 세포를 24well plate에  $2 \times 10^5$ 으로 분주한 후, 20시간동안 배양했다. 비교군에 TNF- $\alpha$ 를 농도별로 24시간 동안 처리했다. 그 후 포도당이 없는 KRB buffer로 세포를 3회 씻어준 후, 0.2mM 포도당이 포함된 KRB buffer로 1시간 동안 전배양을 했다. 각각 0.2mM, 16.7mM 포도당이 들어있는 KRB buffer를 well당 1ml씩 처리한 후, 적정 시간 후 상등액을 모두 거둬들이고 ATP합성관련 효소 활성을 억제하기 위해서 5% trichloroacetic acid in PBS를 0.5ml 첨가했다. 세포들을 pipetting하여 모으고 5분간 300g로 원심분리하여 상등액을 버리고 침전된 세포에 5% trichloroacetic acid in PBS 0.2ml을 넣고 sonication한 후에 얼음에 두었다. 10분간 13000rpm으로 원심분리하고 0.1ml의 상등액을 Ependorf tube에 옮긴 후, trichloroacetic acid를 제거하기 위해서 1ml의 diethyl ether를 섞은 후 상등액을 제거하였다. 위 과정을 3회 시행하여 trichloroacetic acid를 완전히 제거하였다. 0.1ml의 sample을 buffer A (20mM HEPES, 3mM MgCl<sub>2</sub>, KOH로 PH7.75) 에 희석하여 Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega) 을 사용하여 ATP량을 측정하였다.

## 8. Western blotting

INS-1 세포를 6 well plate에 well당  $1 \times 10^6$ 개씩 분주하고 20시간 동안 배양하였다. TNF- $\alpha$ 와 약제들을 24시간 처리한 후 각각의 세포들을 수거하여 RIPA buffer (1% triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 50mM NaCl<sub>2</sub>,

50mM tris-HCl, 1mM sodium vanadate, 2mM PMSF)를 이용하여 세포로부터 단백질을 분리, 정량하여 sample buffer (187mM tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 30% glycerol, 100mM DTT, 0.3% bromophenol blue)에 희석하여 5분간 끓인 다음 8% SDS-polyacrylamid gel에서 전기영동 하였다. Gel에서 NC membrane으로 이동시키고 5% skim milk로 blocking하였다. 각각의 항체와 반응시키고 horseradish peroxidase linked 2차 항체로 반응시켜서 ECL system으로 조사하였다.

## 9. 세포막 단백질 분리

INS-1 세포를 60mm dish plate에 well당  $1.5 \times 10^6$ 개씩 분주하고 20시간 동안 배양하였다. TNF- $\alpha$ 는 농도별로 24시간 처리하였다. 각각의 세포들을 수거하여 Lysis buffer (1% triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 50mM NaCl<sub>2</sub>, 50mM tris-HCl, 1mM sodium vanadate, 2mM PMSF, protease inhibitor cocktail)를 이용하여 세포로부터 단백질을 분리한다. Sonication (10%로 5초씩 5번: bubble이 생기지 않도록 주의)후, 얼음에 5분간 둔다. 700g로 원심분리 하여 침전물 (핵, 분해되지않은 세포등)은 버리고 상등액을 거둬 8000g로 원심분리 한 후에 침전물 (세포막 단백질)을 정량하여 2X sample buffer (187mM tris-HCl(pH6.8), 10% SDS, 30% glycerol, 100mM DTT, 0.3% bromophenol blue)에 희석하여 5분간 끓인 다음 8% SDS-polyacrylamid gel에서 전기영동 한다. 남은 상등액은 단백질을 침전시킨 후, 정량하여 조사하였다.

## 10. Transfection

INS-1 세포를 6well plate에 well당  $8 \times 10^5$ 개씩 분주하고 20시간 동안 배양하였다. Eppendorf tube에 serum 없는 RPMI 600ul를 넣고 원하는 DNA

4.5 $\mu$ g을 섞어준 다음 9ul의 lipofectamine을 더해 pipet으로 부드럽게 섞어준 후, 30분 정도 상온에 두었다. Transfection 시킬 세포를 serum 없는 RPMI로 2회 씻어준 다음, serum free RPMI를 well당 1.4ml씩 분주하고 준비해둔 DNA와 lipofectamine이 혼합된 배지를 세포위로 천천히 골고루 뿌려주었다. 4~6시간 배양시키고 나서 RPMI 1640 (10% FBS 포함)으로 교체하였다. 48~72시간 내에 세포를 100mm culture dish로 옮겨서 24시간 배양한 후, 배지에 63.8mg/ml 의 G418 을 넣어서 48시간 배양하였다. 그 이후에 살아남은 세포들을 배양하여 stable clone 세포를 얻었다.

### III. 결 과

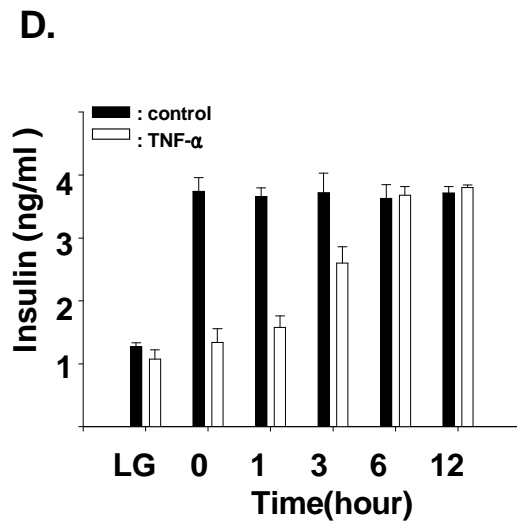
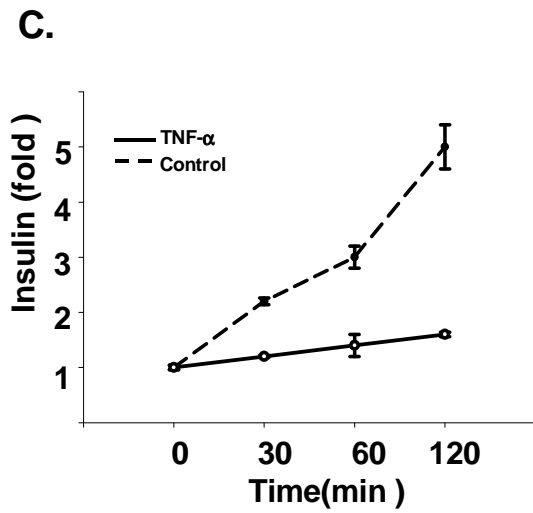
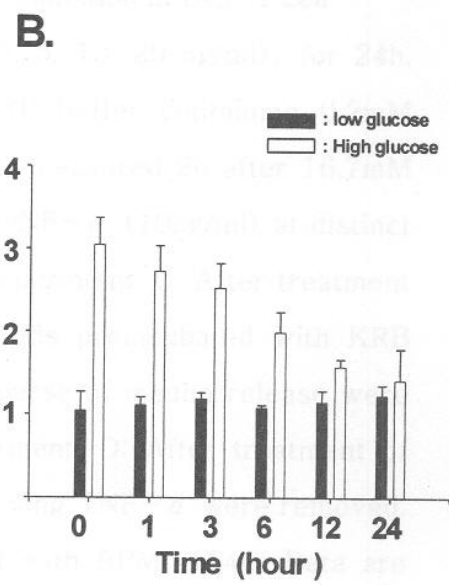
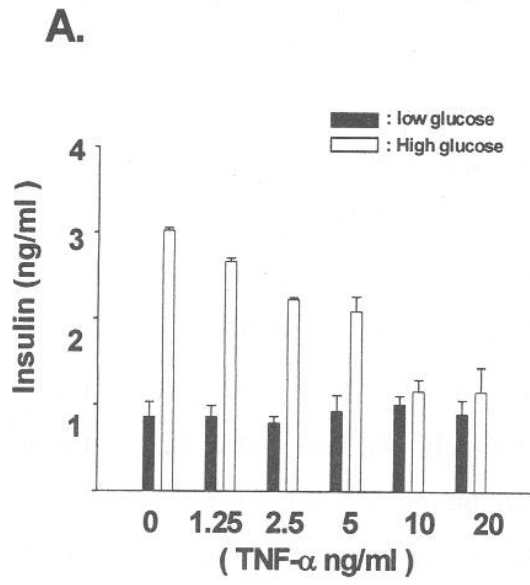
#### A. INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 가 GSIS에 미치는 영향

INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 가 GSIS를 감소시킨다는 사실은 이미 밝혀져 있다 (Zhang 등, 1995). 우리 실험체제에서도 TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS의 감소 양상을 확인해보고자 농도별, 시간별 인슐린 분비 양상을 조사해 보았다. (Fig. 4A)에서 보는 바와 같이 TNF- $\alpha$ 를 1.25ng/ml, 2.5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml 농도로 24시간 동안 처리한 후, 2시간 동안의 GSIS를 조사했다. 1.25ng/ml의 TNF- $\alpha$  농도부터 그 농도가 증가함에 따라 GSIS가 감소됨을 확인했다. TNF- $\alpha$  농도를 10ng/ml을 처리하였을 때는 GSIS가 50%이상 감소되어 있었고 그 이상의 농도에서는 동일하게 GSIS가 감소됨을 확인했다 (Fig. 4A). (Fig. 4B)에서는 TNF- $\alpha$ 에 의해 GSIS가 감소되는 시간을 알아보기 위해서 시간별로 10ng/ml의 농도의 TNF- $\alpha$ 를 처리해보았다. 그 결과, TNF- $\alpha$ 를 처리하고 1시간 이후부터 12시간까지 GSIS가 시간에 비례하여 감소되었고 TNF- $\alpha$ 를 처리한 12시간 이후부터는 GSIS가 50%이상 감소되어있는 것을 확인하였다. 24시간 이후부터는 12시간째의 감소된 GSIS양상과 동일한 결과를 얻었다 GSIS를 수행하는 2시간 동안에 인슐린 분비양상을 조사하기 위해서 0분, 30분, 60분, 120분 에 각각 인슐린을 얻어서 시간별 분비량을 조사해 보았다. TNF- $\alpha$ 를 처리한 INS-1 세포에서의 GSIS는 대조군에 비해 분비초기부터 후반까지 전체적으로 감소되어 있었다 (Fig. 4C). 그리고 이러한 GSIS의 감소 현상은 TNF- $\alpha$ 를 제거한 뒤 6시간 후에 회복되었다 (Fig. 4D).

TNF- $\alpha$ 는 IL-1 $\beta$  ( Interleukin-1 $\beta$ ), IFN- $\gamma$  ( Interferon- $\gamma$ )와 같은 cytokine과 같이 베타 세포에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. (Mandrup-Poulsen T, 2003) 따라서 우리가 처리한 20ng/ml의 TNF- $\alpha$ 의

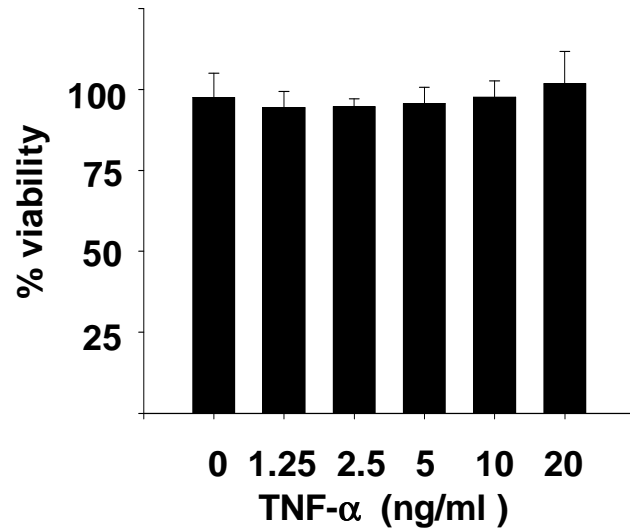


세포독성을 MTT 분석을 통한 세포 활성도를 조사해 보았더니 TNF- $\alpha$ 는 단독으로 INS-1 베타 세포에 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 5).



**Fig. 4. Pattern of TNF- $\alpha$  - induced GSIS inhibition in INS-1 cell**

A: After treatment of TNF- $\alpha$  (1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/ml) for 24h, INS-1 cells were preincubated with KRB buffer containing 0.2mM glucose for 1h. Insulin concentration were measured 2h after 16.7mM glucose treatment. B: After treatment of TNF- $\alpha$  (10ng/ml) at distinct time, Which was performed in the same experiment. C: After treatment of TNF- $\alpha$  (10ng/ml) for 24h, INS-1 cells preincubated with KRB buffer containing 0.2mM glucose. Time course of insulin release were measured 2h after 16.7mM glucose treatment. D: After treatment of TNF- $\alpha$  (10ng/ml) for 24h, medium containing TNF- $\alpha$  were removed. INS-1 cells were washed and incubated with RPMI 1640. Data are representative of five independent experiments and are expressed as mean  $\pm$  SD.

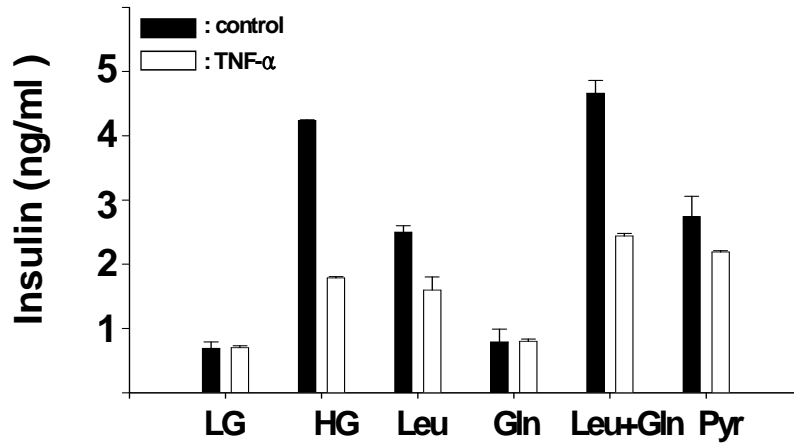


**Fig. 5. Effect of TNF- $\alpha$  on INS-1 cell viability** After TNF- $\alpha$  (1.25, 5, 10, 20 ng/ml) treatment on INS-1 cell for 36h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean  $\pm$  SD.

## B. TNF- $\alpha$ 가 인슐린 분비 자극 물질에 의한 인슐린 분비에 미치는 영향

TNF- $\alpha$ 가 포도당 이외에 인슐린 분비 자극 물질들에 의한 인슐린 분비에 어떤 영향을 미칠 것인지 알아보하고자 이 실험을 수행하였다. INS-1 베타 세포를 10ng/ml의 TNF- $\alpha$ 로 24시간 동안 처리하였다. 베타 세포 포도당 대사 과정 중에 바로 TCA 회로에 에너지 합성 대사물질로 사용되는 것으로 알려져 있는 L-leucine과 Glutamate를 각각 또는 동시에 같이 처리해서 2시간 동안의 인슐린 분비를 조사했다. (Fig. 6)에서 결과와 같이 L-leucine단독에 의한 인슐린 분비는 TNF- $\alpha$ 에 의해 저해받았으며 Glutamate 단독에 의해서는 인슐린 분비가 되지 않았다. 이 두 물질을 동시에 처리해서 인슐린 분비를 조사해보았더니 포도당에 의한 인슐린 분비 양상과 동일하게 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 분비가 50% 이상 감소되었다. 포도당 대사과정 중의 중간산물인 Pyruvate의 경우에도 인슐린분비가 TNF- $\alpha$ 에 의해 20~30%까지 감소됨을 확인하였다 (Fig. 6). 포도당 대사과정에 의한 ATP 생성과정을 거치지 않고 바로  $K_{ATP}$  channel을 닫음으로서 인슐린 분비를 자극하는 Sulfonylurea류의 일종인 Glimpiride와 Tolbutamide도 TNF- $\alpha$ 에 의해 인슐린 분비가 저해되었다. Imidazoline계열인 Phentolamine과 Efaroxan에 의한 인슐린 분비도 약 50%정도 저해되었다 (Fig. 7). L-type  $Ca^{2+}$  channel에 직접 작용하여 세포내  $Ca^{2+}$  유입을 증가시킴으로서 인슐린 분비를 유발시키는 Bay K8644에 의한 인슐린 분비 또한 감소하는 것으로 나타났다. 반면 (Fig.8)에서 보는 것처럼 고농도의 KCl에 의해서 인슐린 분비를 유발 시켰을 경우에는 인슐린 분비는 TNF- $\alpha$  전처리에 의해 인슐린 분비 저해 현상이 약간 나타났다. 이 KCl이 고농도여서 세포입장에서는 과탈분극상태로 인슐린 분비를 유발할 수도 있으므로 KCl이 탈분극을 통해 인슐린 분비를 일으킬 수 있는 더 낮은 KCl 농도하에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 분비 저해 효과를 조사해 보았다. 그 결과 (Fig. 8)에서

15mM의 KCl에 의한 인슐린 분비는  $\text{TNF-}\alpha$ 에 의해 저해 받는 것을 확인하였다. 그리고 (Fig. 9)에서 PKC, PKA의 활성화에 의해서 인슐린 분비를 유발시켰을 경우에는  $\text{TNF-}\alpha$ 의 전처리는 인슐린 분비를 저해시키지 않았다.



**Fig. 6. Effect of TNF- $\alpha$  on ATP generating agent – stimulated insulin secretion** INS-1 cells were cultured for 24h in TNF- $\alpha$  (10ng/ml) containing medium. Following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose (LG), effect of 16.7mM glucose (HG), 20mM L-Leucine (Leu), 10mM glutamate(Gln), 20mM sodium pyruvate (Pyr) on insulin secretion were investigated after 2h incubation.

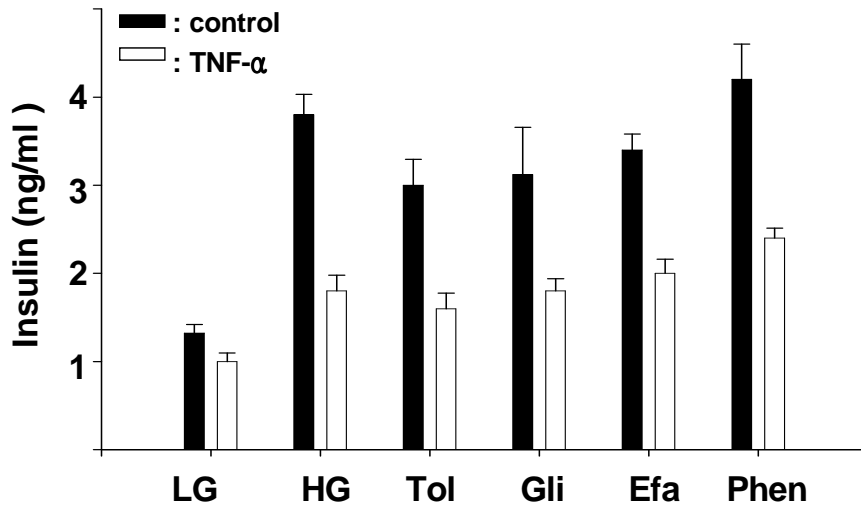
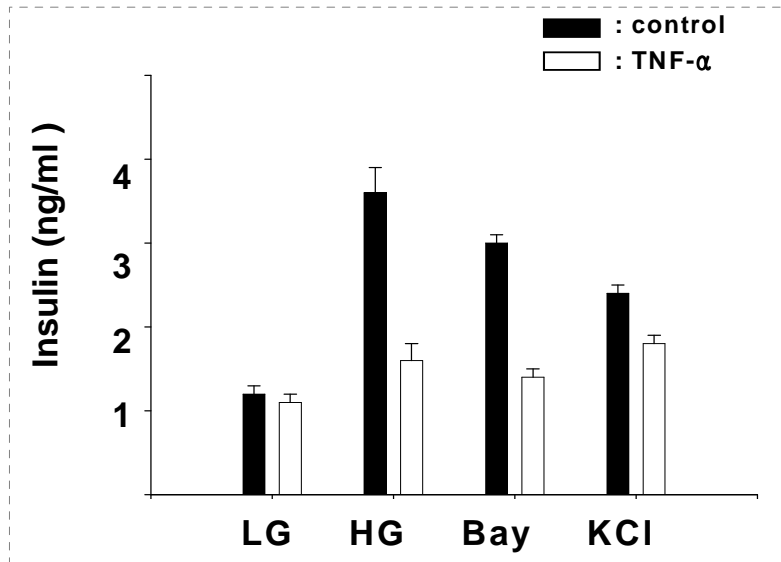


Fig. 7. Effect of TNF- $\alpha$  on  $K_{ATP}$  channel closing agent-stimulated insulin secretion. INS-1 cells were cultured for 24h in TNF- $\alpha$  (10ng/ml) containing medium. Following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose (LG), effect of 16.7mM glucose (HG), 300  $\mu$ M Tolbutamide (Tol), 3  $\mu$ M Glimepiride (Gli), 200  $\mu$ M Efaroxan (Efa), 50  $\mu$ M Phentolamine (Phen) on insulin secretion were investigated after 2h incubation.





**Fig. 8. Effect of TNF- $\alpha$  on Ca<sup>2+</sup> releasing agent-stimulated insulin secretion** INS-1 cells were cultured for 24h in TNF- $\alpha$  (10ng/ml) containing medium. Following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose (LG), effect of 16.7mM glucose (HG), 15mM KCl, 10  $\mu$  M Bay K8644 on insulin secretion were investigated after 2h incubation.

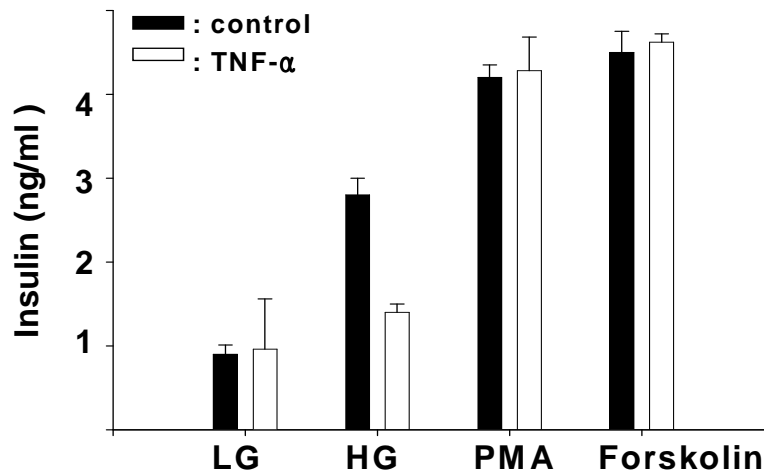


Fig. 9. Effect of TNF- $\alpha$  on PKC, PKA activating agent-stimulated insulin secretion INS-1 cells were cultured for 24h in TNF- $\alpha$  (10ng/ml) containing medium. Following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose (LG), effect of 16.7mM glucose (HG), 500nM PMA, 20  $\mu$  M Forskolin on insulin secretion were investigated after 2h incubation.

### C. TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 생합성량 변화

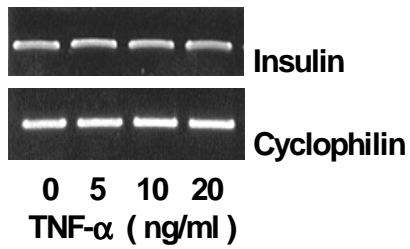
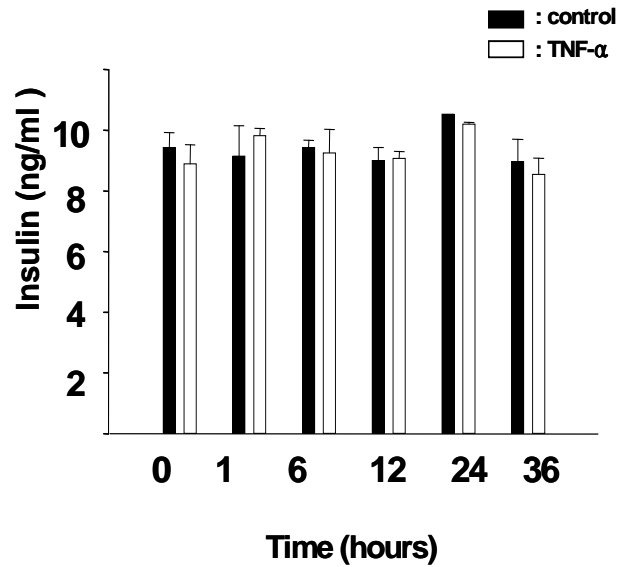
INS-1 베타 세포가 TNF- $\alpha$  전처리에 의해 인슐린 분비가 현저하게 감소되는 것으로 나타났는데 감소되는 기작을 알고자 먼저 인슐린 생합성량의 변화를 mRNA와 단백질 수준에서 조사해 보았다. (Fig. 10A)에서와 같이 TNF- $\alpha$ 를 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 후, 인슐린 유전자 발현량을 RT-PCR 방법으로 조사해 보았다. 그리고 TNF- $\alpha$ 가 세포에 농도별로 정확히 작용했는지 알아보기 위해서 iNOS 유전자를 대조군으로 사용하였다. 그 결과 iNOS 유전자 발현량은 TNF- $\alpha$ 의 농도에 따라 현저하게 증가한 반면 인슐린 유전자 발현량은 변화가 없었다. (Fig. 10B)에서 세포 내 존재하는 인슐린의 양에 변화가 있는지 조사해 보기 위해서 시간에 따른 세포 내 인슐린량을 측정하여 보았다. 각각 0, 1, 6, 12, 24, 36 시간에 따라 10ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 처리한 후, 세포 내 인슐린량을 측정하였다

이 실험결과 TNF- $\alpha$ 는 세포 내 인슐린량에는 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 이에 따라 INS-1 베타세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS의 감소는 인슐린 생합성량의 변화와는 관계가 없음을 확인하였다.

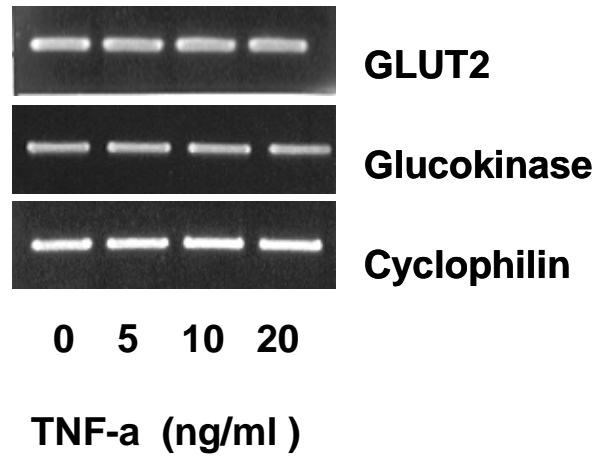
### D. TNF- $\alpha$ 가 베타 세포 당대사에 미치는 영향

포도당에 의한 인슐린 분비는 포도당 대사를 통한 INS-1 베타세포에서 포도당 대사의 변화가 TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS의 저해에 관련되어있는지 알아보기 위해서 포도당을 세포 내로 유입시키는 포도당 수송체인 GLUT2와 대표적인 당 대사 조절 물질인 Glucokinase의 유전자 발현량을 조사해 보았다. TNF- $\alpha$ 를 5ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml 농도로 INS-1 세포에 24시간 동안 처리한 후, 각각의 유전자 발현량을 조사하였다. 그 결과 TNF- $\alpha$ 가 고농도일 때도 Glucokinase와 GLUT2의 유전자 발현량에는 변화가 없는 것으로 나타났다

(Fig. 11). 베타 세포에 유입된 포도당이 해당과정을 거쳐 만들어내는 ATP/ADP 비율의 변화는 인슐린 분비의 조절에 중요하므로 TNF- $\alpha$ 가 ATP의 합성에 영향을 미치는지 알아보려고 세포 내 ATP량을 측정하여 보았으나 (Fig. 12)에서 보는 바와 같이 변화가 없었다. 결과적으로 INS-1 세포에서 포도당 유입으로부터 해당과정을 거쳐 ATP를 생성하는 당대사 경로의 이상과 TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS이 감소와는 관련이 없음을 확인하였다.

**A.****B.**

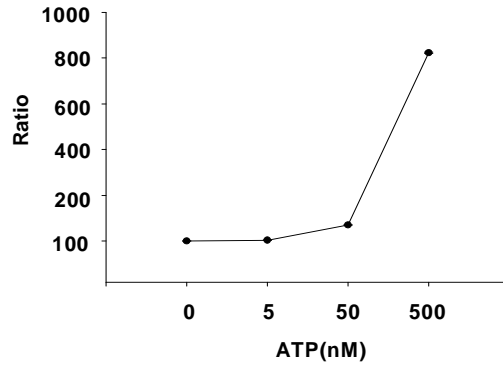
**Fig. 10. Effect of TNF- $\alpha$  treatment on insulin expression** A: After TNF- $\alpha$  (5,10,20 ng/ml) treatment on INS-1 cell for 24h, total RNA was isolation and subjected to RT-PCR with the primers specific for cyclophilin, iNOS, insulin. The PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. B: After TNF- $\alpha$  (10ng/ml) treatment on INS-1 cell for 24h, The cellular insulin content was extracted by incubation in 1ml acid-ethanol. Assays were performed by I<sup>125</sup> radioimmunoassay method. Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean  $\pm$  SD.



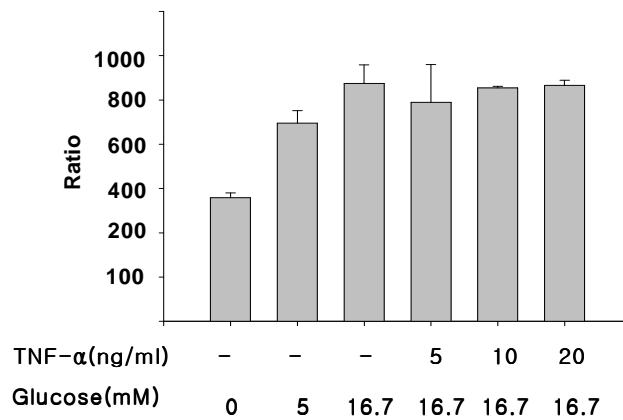
**Fig. 11. Effect of TNF- $\alpha$  on glucose metabolism related molecules**

After TNF- $\alpha$  (5, 10, 20 ng/ml) treatment on INS-1 cell for 24h, total RNA was isolation and subjected to RT-PCR with the primers specific for cyclophilin, glucokinase, GLUT2. The PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Data are representative of five independent experiments and are expressed as mean  $\pm$  SD.

**A.**



**B.**



**Fig. 12. Effect of TNF- $\alpha$  on ATP production in INS-1 cell.**

A: ATP level were measured by Luminescent assay method dose dependently . B: INS-1 cell treated with and without TNF- $\alpha$  (10ng/ml) incubated for 24h in RPMI 1640 medium. INS-1 cells were treated with or without glucose containing KRB buffer. After incubation for 5min, the ATP concentration of the cellular extracts

were measured by Luminescent assay method.

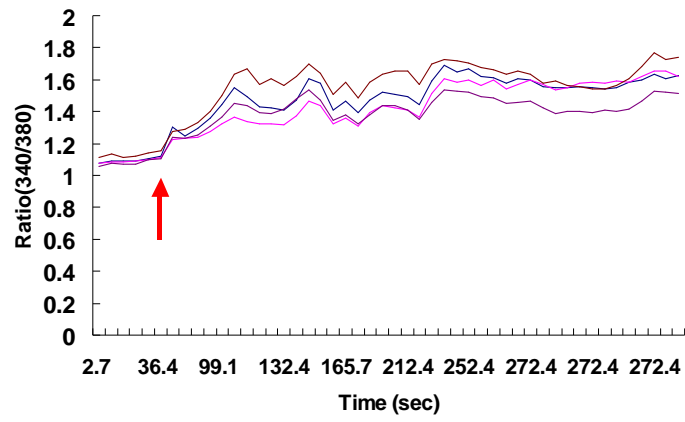
#### E. TNF- $\alpha$ 가 포도당 자극 $Ca^{2+}$ 유입량에 미치는 영향

INS-1 베타 세포가 포도당 자극을 받아 인슐린을 분비하기까지는 세포 내  $Ca^{2+}$ 양의 조절이 매우 중요하다. 그래서 TNF- $\alpha$ 가 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 유입량에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해서 Delta Scan dual monochromator system (Photon Technology International, Monmouth Junction, NJ)을 이용하여 세포 내  $Ca^{2+}$ 유입량을 측정하였다.

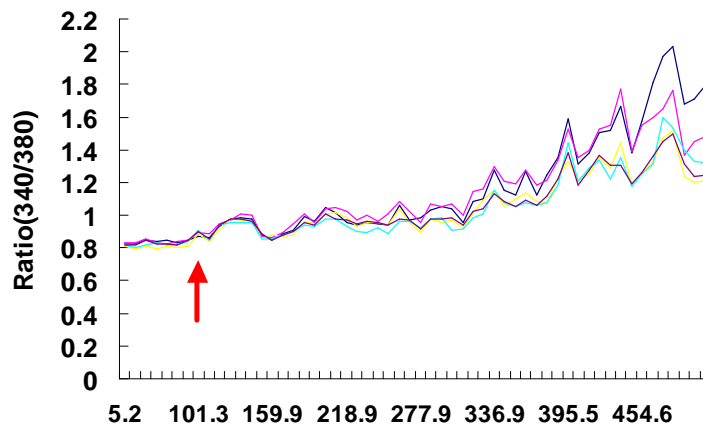
(Fig. 13A)는 INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 가 단독으로 어떤 영향을 주는 지 알아보려고 실험해보았다. 그 결과 TNF- $\alpha$ 가 단독으로 세포 내  $Ca^{2+}$ 유입량을 증가시키는 것을 확인하였다. (Fig. 13B-up)는 대조군으로서 INS-1 베타 세포에 0.2mM 포도당을 포함한 배지에서 16.7mM의 포도당을 포함한 배지로 교체하여 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 유입량을 측정한 것이다. 세포 내  $Ca^{2+}$ 농도가 5분여 만에 기저치에 비해서 약 2.5배 이상 증가함을 알 수 있다. 반면 (Fig. 13B-down)에서 보듯이 10ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 24시간 처리한 경우 세포 내 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 유입량 증가율이 대조군에 비해 현저하게 감소하였음을 확인하였다. 여기서 특이할 점은 TNF- $\alpha$ 에 의해 전체적인 세포 내 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 유입량도 감소하였지만 그에 따른 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 유입의 박동성도 감소하였다는 것이다. 이 결과로 TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 분비 저해 기작은 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 유입량의 감소와 관련있음을 알 수 있었다.



**A.**



**B.**



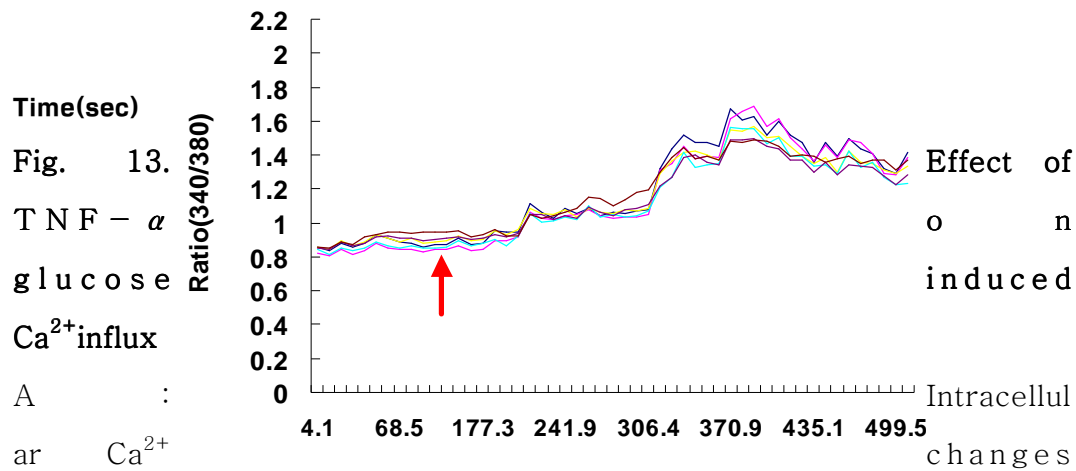


Fig. 13. TNF- $\alpha$  glucose Ca<sup>2+</sup> influx

A : Intracellular Ca<sup>2+</sup> changes were assessed by Fura-2 fluorescence measurements in cells maintained in normal Ca<sup>2+</sup>-containing medium. INS-1 cells stained with Fura-2AM of 50  $\mu$ M for 1h. The data represent intracellular Ca<sup>2+</sup> change with time course. show the point for the addition of 10ng/ml TNF- $\alpha$ . B(up) : The data represent intracellular Ca<sup>2+</sup> change with time course. show the point for the addition of 16.7mM glucose The red arrow show the point for the addition of 16.7mM glucose. B(down) : After TNF- $\alpha$  (10ng/ml) treatment on INS-1 cell for 24h, Intracellular Ca<sup>2+</sup> changes were measured by equal method. Data are representative of three independent experiments and are expressed as mean  $\pm$  SD.

## F. TNF- $\alpha$ 에 의한 $Ca^{2+}$ 유입량의 감소 작용점 조사

앞서 실험에서 보았듯이, TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS의 감소 기작은 세포 내 포도당 자극  $Ca^{2+}$ 의 유입량의 감소와 관련이 있다. 베타 세포의 세포 내  $Ca^{2+}$ 을 증가시키는 경로는  $Ca^{2+}$ 이 세포 외부에서 유입되는 경로와 세포 내에 존재하는 소포체나 미토콘드리아와 같은 세포 내 소기관에서 세포내부로 유입되는 경로로 나누어진다. 그래서 증가된 기저  $Ca^{2+}$ 농도가 어디로부터 유입된 것인지 알아보기 위해서 각각의 저해제를 사용하여 실험하였다.

5  $\mu$ M의 Dantrolene (RyR inhibitor)과 20  $\mu$ M의 Xestospongine C ( $IP_3$ R inhibitor), 300  $\mu$ M의 Diazoxide ( $K_{ATP}$  channel opener), 10  $\mu$ M의 Nifedipine (L-type  $Ca^{2+}$  channel blocker)을 각각 10ng/ml의 TNF- $\alpha$ 와 함께 24시간 처리한 후, GSIS를 조사하였다. Diazoxide와 Nifedipine을 처리한 세포는 TNF- $\alpha$ 에 의해 감소되었던 인슐린 분비가 100% 회복됨을 확인했다 (Fig.14). 이 결과로 TNF- $\alpha$ 에 의한  $Ca^{2+}$ 의 유입량의 감소는  $K_{ATP}$  channel이 닫힘으로서 그에 따른 세포막의 탈분극에 의해 열리게 되는 L-type  $Ca^{2+}$  channel을 통한 기저  $Ca^{2+}$ 농도의 증가때문임을 확인하였다.

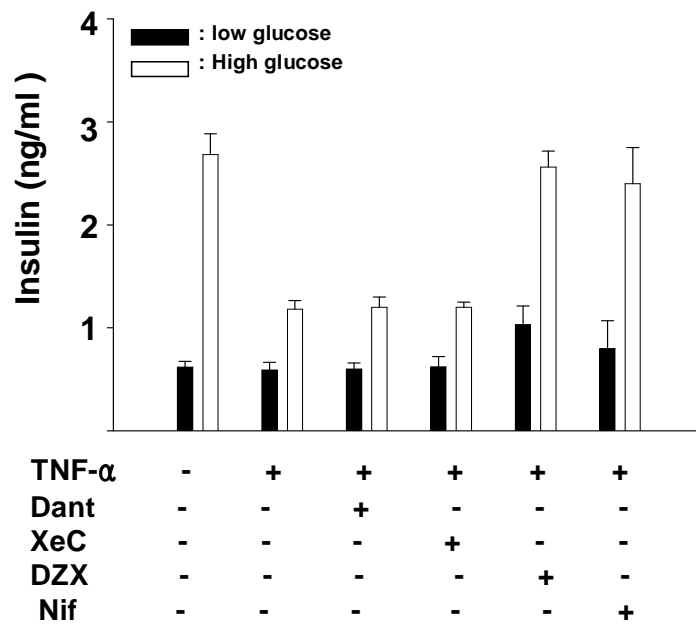


Fig. 14. Diazoxide and Nifedipine protect against impaired insulin secretion elicited by TNF- $\alpha$  INS-1 cells were cultured for 24h at

11mM RPMI medium with or without TNF- $\alpha$  (10ng/ml) , 5  $\mu$ M Dantrolrene (Dant), 20  $\mu$ M Xestospongine C (XeC), 300  $\mu$ M Diazoxide (DZX), 10  $\mu$ M Nifedipine (Nif). Following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose, GSIS were investigated after 2h incubation.

### G. TNF- $\alpha$ 가 Channel의 양적 변화에 미치는 영향

INS-1 베타 세포에서 전압 의존적인 L-type Ca<sup>2+</sup> channel을 통한 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입량의 감소가 TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS의 감소에 중요한 현상으로 확인되었으므로 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입에 관련된 Channel의 양적인 변화를 조사했다.

TNF- $\alpha$ 를 0, 2.5, 5, 10ng/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고 K<sub>ATP</sub> channel을 구성하고 있는 하위 구조인 Kir 6.2, SUR 1과 전압 의존적인 L-type Ca<sup>2+</sup> channel을 구성하고 있는  $\alpha$ 1D,  $\beta$ 3의 유전자 발현량을 조사하였다. (Fig.15)에서 보는 바와 같이 이들 channel 유전자 발현량에는 변화가 없는 것으로 나타났다. 그리고 이들의 총단백질량은 Western blotting 방법을 통해서 조사하였다 (Fig.16). TNF- $\alpha$ 를 0, 2.5, 5, 10ng/ml의 농도로 처리하고 총 K<sub>ATP</sub> channel 단백질의 양을 조사하여 보았으나 변화가 없었다. 결과적으로 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 전압 의존적인 L-type Ca<sup>2+</sup> channel을 통한 외부 Ca<sup>2+</sup> 유입량의 감소는 channel의 양적인 변화와는 관련이 없는 것으로 확인되었다.

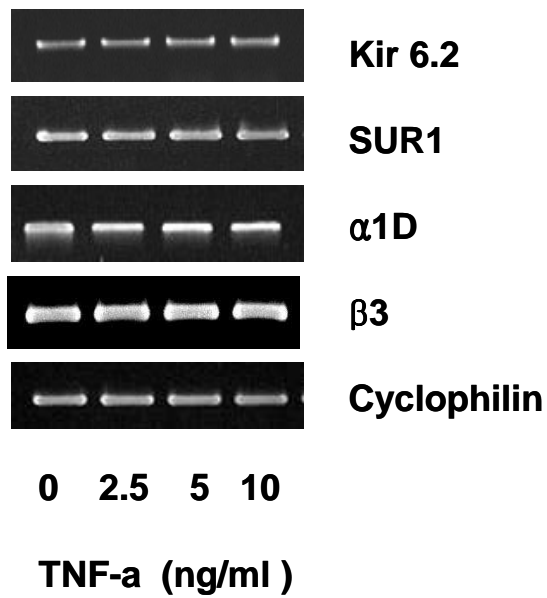
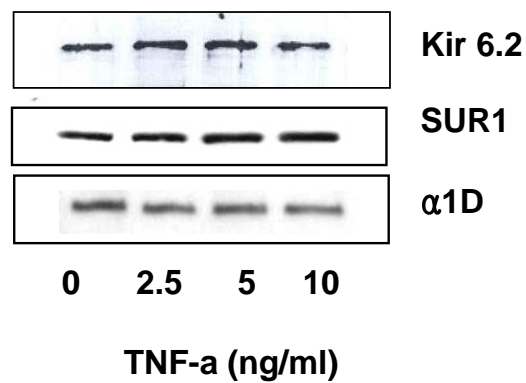


Fig. 15. Effect of TNF- $\alpha$  on gene expression of K<sub>ATP</sub> channel and L-type Ca<sup>2+</sup> channel After treatment of (2.5, 5, 10 ng/ml) TNF- $\alpha$  in INS-1 cell for 24h, total RNA was isolation and subjected to RT-PCR with the primers specific for cyclophilin, Kir 6.2, SUR 1,  $\alpha$  1D,  $\beta$  3. The

PCR products were separated on a 1.2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.



**Fig. 16. Effect of TNF- $\alpha$  on protein expression of  $K_{ATP}$  channel and L-type  $Ca^{2+}$  channel** INS-1 cells were incubated in TNF- $\alpha$  of distinct concentration for 24h. Cell lysates were made, and equivalent amounts of cellular proteins were separated by 10% SDS-PAGE, blotted, and then

probed with the Kir 6.2, SUR 1,  $\alpha$  1D antibody.

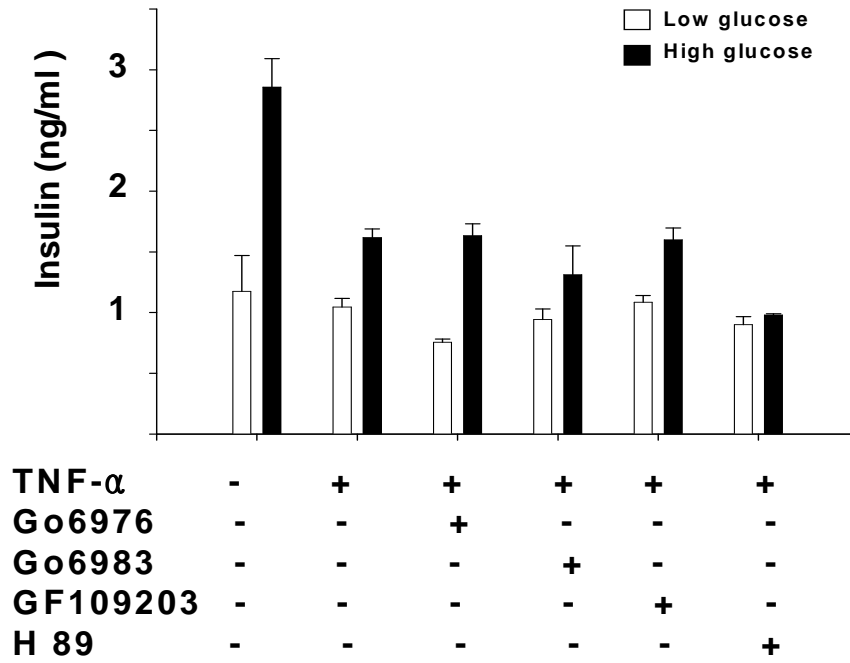
## H. TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 분비저해에 관련된 신호전달 물질 조사

베타 세포에서 인슐린이 분비되기까지는 많은 신호전달 물질이 존재한다. TNF- $\alpha$ 가 활성화 시키는 신호 전달 물질과 TNF- $\alpha$ 가  $Ca^{2+}$  channel 활성도를 조절하는 신호 전달 물질에 미치는 영향이 GSIS 감소 기작에 관련되어 있는지 확인해 보고자 저해제로 실험을 수행하였다. 기존 논문에 의하면 심장 세포에서는 PKA나 PKC가  $Ca^{2+}$  Channel이 열리고 닫히는 것을 조절하는 것으로 밝혀져 있다 (Sener 등, 1981). 그래서 TNF- $\alpha$ 가 이들 신호 전달 물질을 지속적으로 활성화시켜  $Ca^{2+}$  Channel에 영향을 미치는 지 알아보고자 PKC의 모든 isoform을 저해하는 것으로 알려져 있는 GF109203X 과 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ 를 저해하는 Go6983과 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 를 특이적으로 저해하는 Go6976을 TNF- $\alpha$ 와 같이 동시에 24시간 처리해보았으나 감소된 인슐린 분비에는 변화가 없었다. 그리고 PKA의 활성을 억제하는 저해제인 H-89를 처리했을 때에는 인슐린 분비가 TNF- $\alpha$  단독에 의해 감소된 GSIS보다 오히려 더욱 감소되는 것으로 나타났다 (Fig.16).

TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화되는 신호 전달물질로 P38, JNK, NFkB, ERK등이 지금까지 밝혀져 있다. 그래서 이들 물질의 저해제인 SB203580, SP600125, SN50, PD98059를 농도별로 10ng/ml 의 TNF- $\alpha$ 와 동시에 처리하여 24시간

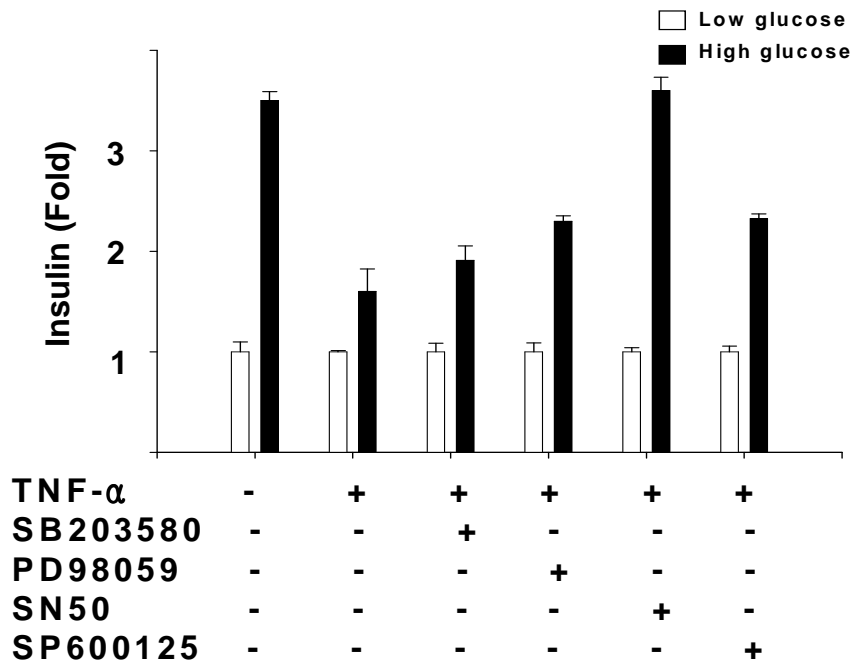


배양 후, GSIS를 조사해보았다. 이 중에서 P38과 ERK, JNK를 각각 저해시켰더니 감소되었던 GSIS 반응이 평균 10~20%정도 회복이 되었으며 NFkB를 저해시켰더니 기저 인슐린 농도는 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 기저 인슐린 농도에 비해 GSIS의 반응성이 가장 높게 나타났다. 그래서 GSIS 회복률이 가장 높은NFkB가 TNF- $\alpha$ 에 의한 GSIS 감소 기작에 중요한 역할을 하는 신호 전달 물질로 생각된다 (Fig.17). TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine들은 베타 세포 내에서 NO 나 ROS 같은 물질을 만들어내서 베타 세포의 기능이상을 유발하는 것으로도 알려져 있기 때문에 이들의 관련성을 알아보기 위해서 항산화제인 NAC과 NMMA를처리하여 보았으나 감소된 인슐린 분비에 변화가 없었다 (Fig.18).

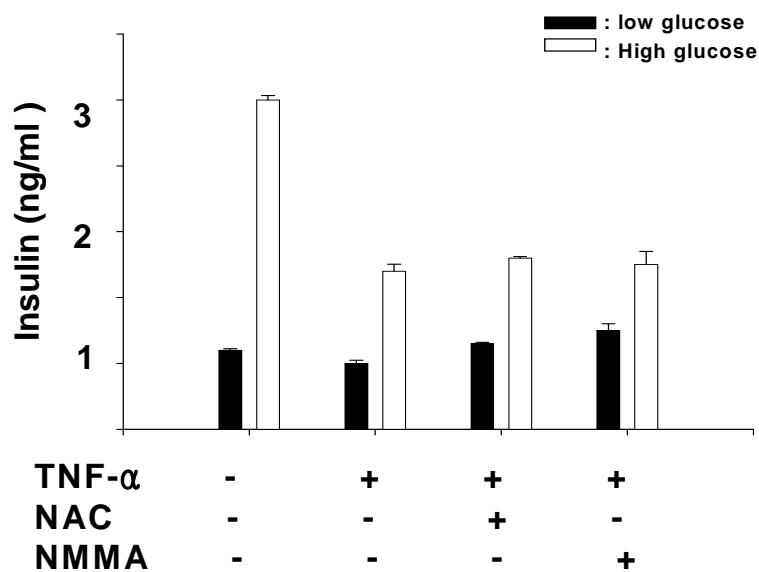


**Fig. 17. Involvement of PKC and PKA in GSIS inhibition by TNF- $\alpha$**

INS-1 cells were cultured for 24h in medium contained with TNF- $\alpha$  or in medium supplemented with GF109203X (1  $\mu$ M), Go6976(1  $\mu$ M), Go6983 (1  $\mu$ M), H-89 (20  $\mu$ M). Following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose. GSIS were investigated after 2h incubation.



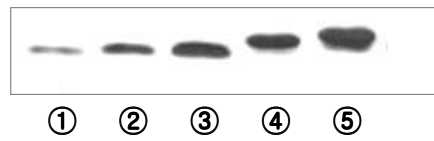
**Fig. 18. Involvement of TNF- $\alpha$  mediated signaling pathway in GSIS inhibition by TNF- $\alpha$**  INS-1 cells were cultured for 24h in medium contained TNF- $\alpha$  with or in medium supplemented with SB203580 (10  $\mu$ M), SP600125 (20  $\mu$ M), SN50 (20  $\mu$ M). following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose. GSIS were investigated after 2h incubation.



**Fig. 19. Involvement of TNF- $\alpha$  induced ROS and NO in GSIS inhibition by TNF- $\alpha$**  INS-1 cells were cultured for 24h in medium contained with TNF- $\alpha$  or in medium supplemented with NAC (2  $\mu$ M) , NMMA (100  $\mu$ M). following 1h preincubation with buffer containing 0.2mM glucose. GSIS were investigated after 2h incubation.

## I. I $\kappa$ B $\alpha$ 유전자 과발현 세포주

(Fig. 18)에서 보았듯이 INS-1 세포에서 TNF- $\alpha$ 에 의해 GSIS가 저하되는 것을 NF $\kappa$ B 저해제인 SN 50이 회복시키는 것을 확인하였다. SN 50에 의한 인슐린 분비 회복 효과를 재확인하기 위해서 I $\kappa$ B  $\alpha$  유전자를 과발현시킨 INS-1 세포주를 만들었다. (Fig. 20)에서와 같이 I $\kappa$ B  $\alpha$  유전자를 과발현 시킨 세포주에서 그 단백질량을 Western blot으로 확인하였다. 대조군으로는 pc DNA3를 transfection 시킨 세포를 이용하였다. 여러 clone 세포 중에서 I $\kappa$ B  $\alpha$  단백질 발현량이 많은 4가지 clone 세포를 골랐다. clone #1와 clone #2는 western blot 결과가 예상대로 나타난 반면 clone #3와 clone #4는 I $\kappa$ B  $\alpha$ 의 단백질 size가 높게 나타났다.



**Fig. 20. Establishment of cell lines stably overexpressing  $I\kappa B \alpha$**

INS-1 cells were transfected with a cDNA construct encoding  $I\kappa B \alpha$ , and stable cell lines were selected. Enhanced expression of  $I\kappa B \alpha$  was confirmed by western blot analysis. ①→pcDNA3 ②→clone #1 ③→clone #2 ④→clone #3 ⑤→clone #4

## IV. 고 찰

제 2형 당뇨병의 주요 병인 중 하나는 베타 세포의 기능이상에서 비롯된 인슐린 분비 결핍이다. 지속적인 고혈당과 증가된 유리지방산에 의해 생성된 ROS와 같은 free radical과  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ 와 같은 세포독성 cytokine등이 인슐린 분비 감소의 원인으로 보고되어있다 (Evans 등, 2003). 제 2형 당뇨병 환자에게서 증가되어있는 Proinflammatory cytokine인  $TNF-\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )는 INS-1 베타 세포에서 GSIS를 저해하는 것으로 이미 밝혀져 있다 (Zhang 등, 1995).

본 실험에서는 INS-1 베타 세포에서  $TNF-\alpha$ 가 GSIS에 미치는 영향을 조사하여보았다. (Fig. 4)에서 보는 바와 같이  $TNF-\alpha$ 는 농도와 시간에 비례해서 GSIS를 50%이상 감소시켰고 배양액에서  $TNF-\alpha$  제거 후, 6시간 만에 감소되어있던 GSIS가 정상으로 회복되는 것이 확인되었다. 그렇다면  $TNF-\alpha$ 가 포도당 이외의 인슐린 분비 자극 물질들에 의한 인슐린 분비에는 어떤 영향을 미칠 것인지 알아보하고자 (Fig. 6, 7, 8)의 실험을 수행하였다.  $TNF-\alpha$ 가 포도당 이외의 인슐린 분비 자극 물질들에 의한 인슐린 분비에 나타내는 영향에 대해서는 연구 결과가 아직 없는 것으로 보인다. 베타 세포에 L-leucine과 Glutamate를 동시에 같이 처리하면 포도당 자극에 대한 1, 2차 인슐린 분비 반응과 유사하게 나타난다 (Sener 등, 1981). (Fig.6)에서 L-leucine과 Glutamate를 각각 또는 동시에 처리하여 보았는데 각각 처리하였을 때 보다 둘을 동시에 처리하였을 때 인슐린 분비 저해 현상이 더욱 뚜렷히 나타났으며 포도당 자극 인슐린 분비 저해 효과와 비슷한 양상으로 인슐린 분비가 50%이상 감소하는 것을 확인하였다. (Fig.7)에서는  $K_{ATP}$  channel의 하위구조 중 하나인 SUR1과 결합하여 인슐린 분비를 일으키는 것으로 알려져 있는 Sulfonylurea (Glimepiride와 Tolbutamide)에 의한 인슐린 분비와 Kir 6.2에 결합하여 인슐린 분비를 유발하

는 것으로 알려져 있는 Imidazolin (Phentolamine과 Efaroxan)에 의한 인슐린 분비가 TNF- $\alpha$ 에 의해서 감소되었다. L-type Ca<sup>2+</sup> channel의 agonist인 Bay K8644는 단독으로 세포 내 Ca<sup>2+</sup>량을 증가시켜 인슐린 분비를 일으킨다 (Minami 등, 2002). 그래서 (Fig. 8A)에서 이 약제에 의한 인슐린 분비를 조사해 보았더니 이 역시 TNF- $\alpha$ 에 의해서 인슐린 분비가 50% 정도 감소되었다. 반면 고농도의 KCl에 의한 인슐린 분비는 약간 감소하는 것으로 보인다. 그리고 (Fig. 8C)에서 보듯이 K<sub>ATP</sub> channel 독립적으로 인슐린을 분비를 촉진하는 물질인 PMA, Forskolin등을 처리하여 인슐린 분비를 비교하여 보았는데 이들 물질에 의한 인슐린 분비는 TNF- $\alpha$ 에 의해 영향을 받지 않았다. 이러한 결과들은 제 2형 당뇨병 베타 세포에서 포도당 자극 인슐린 분비 반응의 감소 모델로서 인슐린 분비의 desensitization현상과 비슷한 것으로 생각되어진다.

그래서 우리는 TNF- $\alpha$ 가 포도당 자극 인슐린 분비를 저해하는 작용점과 신호전달과정을 알아보고자 포도당 자극 인슐린 분비과정에 관련된 경로를 크게 4가지로 구분하여 조사해보았다. 첫째 TNF- $\alpha$ 가 INS-1 베타 세포 내 인슐린 생합성량에 영향을 주어서 포도당 자극 인슐린 분비 저해를 일으키는지 알아보고자 (Fig. 9)의 실험을 수행하였다. 베타 세포에서 인슐린 생합성이 감소하는 것은 당뇨병에서 인슐린 분비 감소를 일으키는 현상중 하나이다. 이 결과에서 보여주듯이 INS-1 베타 세포에서 TNF- $\alpha$ 는 인슐린 유전자 발현량과 세포 내 인슐린 단백질 발현량을 감소시키지 않았다. 이와 같은 결과는 기존에 밝혀진 결과와 동일하였다 (Zhang 등, 1995). 두 번째는 TNF- $\alpha$ 가 포도당의 유입으로부터 해당과정을 거쳐 ATP를 생성해내는 대사과정에 미치는 영향을 조사하였다. TNF- $\alpha$ 가 베타세포에서 포도당 운반체인 GLUT 2와 해당과정에 중요한 효소인 Glucokinase의 유전자 발현을 억제한다고 보고되어 있다 (Park 등, 1999). 그래서 (Fig.10)에서 이들의 mRNA 유전자 발현량을 확인하여 보았으나 우리의 실험에서는 감소하지 않는 것으로 나타났다. 그리고 포도당이 해당과정을 거쳐 만들어진 ATP/ADP 비율의 증가는 GSIS에 매우 중요하다 (Henquin 등,



2003). 그래서 세포 내 ATP량을 측정하여 보았다. TNF- $\alpha$ 가 Glucokinase의 활성도를 떨어뜨려서 ATP 합성량이 감소되는 것이 GSIS감소의 원인으로 보고 되어있다. (Park 등, 1999 ). 하지만 우리 실험에서는 TNF- $\alpha$ 에 의한 ATP의 양적인 감소는 없는 것으로 조사되었다. 또한 (Fig. 7)의 결과에서 ATP 합성과 상관없이 인슐린 분비를 유발하는 것으로 알려져 있는 Sulfonylurea류 (Tolbutamide와 Glimepiride)와 Imidazolin (Phentolamine과 Efaroxan)에 의한 인슐린 분비가 TNF- $\alpha$ 에 의해 감소되는 것으로 봐서 ATP 합성량 변화와 GSIS 감소와는 상관이 없는 것으로 생각된다. 셋째로 인슐린 분비에 결정적으로 중요한 역할을 하는 Ca<sup>2+</sup>의 유입량의 변화를 조사해보았다. TNF- $\alpha$ 는 단독으로 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시켰고 (Fig. 12A), (Fig. 12B)의 결과에서 보여주듯이 TNF- $\alpha$ 는 INS-1 베타 세포에서의 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup>의 유입량과 그 박동성을 현저하게 감소시켰다. MIN 6 베타 세포에서 포도당에 대한 인슐린 분비 반응성이 감소되어 있는 세포의 경우에 세포 내 Ca<sup>2+</sup>량이 증가되어 있었고 이 Ca<sup>2+</sup>량을 Nifedipine과 Diazoxide로 정상화 시켰을 때 포도당에 대한 인슐린 분비 반응이 회복된다는 연구 결과가 있었다 (Minami 등, 2002). INS-1 베타 세포에서 GSIS에 필요한 외부 Ca<sup>2+</sup>은 L-type Ca<sup>2+</sup> channel 을 통해 유입되며 Nifedipine은 이 channel을 막는 저해제이다 (Liu 등, 2003). 그래서 본 실험에서도 세포 내 Ca<sup>2+</sup>유입에 관련된 저해제들 - Nifedipine, Diazoxide, Dantrolene, Xe C-을 이용하여 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 정상화 시켜보았더니 Nifedipine, Diazoxide에 의해 GSIS가 100% 회복되는 결과를 얻었다. TNF- $\alpha$ 는 단독으로 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시켰으나 TNF- $\alpha$ 가 단독으로 인슐린 분비를 일으키지는 못했다. 그 이유는 아직 모르지만 TNF- $\alpha$ 에 의한 세포 내 기저 Ca<sup>2+</sup>농도의 증가가 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup> 유입량의 감소와 관련되어 있을 수도 있다. 그리고 (Fig. 8A)에서 Bay K8644에 의한 인슐린 분비가 감소된 것으로 보아 L-type Ca<sup>2+</sup> channel의 이상이 직접적으로 TNF- $\alpha$ 에 의한 인슐린 분비 저해에 관여할 가능성도 있다. 이상의 실험들로 미루어보아 GSIS의 저해 기작은

$K_{ATP}$  channel이 닫힘으로서 L-type  $Ca^{2+}$  channel이 열려서 일어나는  $Ca^{2+}$ 의 유입에 이상 때문으로 생각되어진다.

MIN6 베타 세포에서는 세포 내  $Ca^{2+}$  농도가 지속적으로 증가되어있으면 channel 하위구조의 유전자 및 단백질 발현량이 감소한다고 보고되어 있다 (Minami 등, 2002). 그래서  $K_{ATP}$  channel과 L-type  $Ca^{2+}$  channel의 발현량을 조사하기 위해서 각각의 하위 구조인 Kir 6.2, SUR 1,  $\alpha 1D$ ,  $\beta 3$ 의 mRNA 발현량과 총 단백질량을 확인해 보았다. (Fig. 14과 15)에서 보듯이 Channel의 유전자 발현량과 총 단백질의 양적 변화는 없는 것으로 나타났다. 그리고 INS-1 베타세포에서도 세포 내 증가된  $Ca^{2+}$ 이 L-type  $Ca^{2+}$  channel 하위구조인  $\alpha 1D$ 의 이동을 조절한다고 보고되어있다 (Huang 등, 2004). 그래서 세포 내 소기관의 막구조에서 세포막으로의 Channel의 이동 여부를 조사해 보았다. (Fig. 16)에서 보듯이 이 역시 변화가 없는 것으로 나타났다. 네번째로 증가한  $Ca^{2+}$ 으로부터 인슐린 분비까지의 과정에  $TNF-\alpha$ 의 영향을 조사해 보았다.  $K_{ATP}$  channel과 독립적으로 즉,  $Ca^{2+}$  유입량의 변화와는 상관없이 인슐린 분비를 유발하는 PMA, Forskolin과 같은 약제에 의한 인슐린 분비가 정상적으로 이루어진 것으로 미루어 인슐린이 분비되는 insulin secretory machinery 에는 이상이 없다고 짐작할 수 있겠다 (Fig. 8C).

PKA나 PKC는 베타 세포에서 L-type  $Ca^{2+}$  Channel의 활성도를 조절하는 것으로 보고되어 있다 (Arkhammar 등, 1994). 그래서  $TNF-\alpha$ 가 이들 신호 전달 물질을 지속적으로 활성화시켜 L-type  $Ca^{2+}$  Channel에 영향을 미치는지 알아보려고 각각의 저해제를 사용하여 실험해 보았으나 감소된 GSIS에는 아무런 영향이 없었다 (Fig. 17). (Fig. 18)에서는  $TNF-\alpha$ 가 활성화 시키는 신호 전달 물질들을 저해시켜 보았다.  $TNF-\alpha$ 와 JNK 저해제를 동시에 24시간 처리한 후, GSIS를 조사해 본 결과 감소되었던 GSIS가 대조군에 비해 더욱 증가하였다. 그러나 JNK 저해제 경우에는 그 단독 처리만으로도 기저 인슐린 농도가 두 배 이상 증가하였다. NF $\kappa$ B를 저해시켰을 때는 감소되었던 GSIS가 70~80%정

도 회복되었다. 반면 기저 인슐린 분비는 감소하여 결국 포도당에 대한 인슐린 분비 반응이 JNK를 저해시켰을 때 보다 높게 나타났다. TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화된 NFkB는 GSIS를 저해하는데 관여하는 것으로 생각된다. TNF- $\alpha$ 는 또한 IL-1 $\beta$ 와 같은 cytokine들과 같이 베타 세포 내에서 NO나 ROS와 같은 free radical 물질을 만들어내서 베타 세포의 기능 이상을 유발하는 것으로도 알려져 있다. 하지만 본 실험의 (Fig. 19)에서는 이러한 이 베타 세포의 기능 이상을 일으키는데 영향이 없는 것으로 조사되었다. MIN6 베타 세포에서 cytokine에 의해 유발되는 세포의 기능 이상이 NO와 독립적으로 일어난다는 보고도 있었다 (Wu 등, 2001).

MIN6 베타세포에서 탈분극과 세포 내 Ca<sup>2+</sup>의 유입에 의해서 NFkB가 활성화되고 (Bernal-Mizrachi 등, 2002) 베타 세포에서 NFkB의 활성화도가 GSIS에 필요하다고 보고되어 있다 (Norlin 등, 2005). 그러나 우리의 실험에서는 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화된 NFkB를 저해시켰을 때 감소되었던 GSIS가 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 TNF- $\alpha$ 에 의한 NFkB의 활성화가 GSIS를 저해하는데 일부 관여할 것으로 생각된다. 기존 연구 결과에 따르면 제 2형 당뇨병 모델 동물인 ZDF 쥐의 췌장 소도세포에서 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup> 유입량의 감소가 유발되는데 이는 포도당 자극 인슐린 분비 반응의 감소에 중요한 원인이 된다고 보고되어 있다 (Roe MW외, 1996). 결과적으로 우리의 실험에서도 관찰되었던 세포 내 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup> 유입량의 감소가 INS-1 베타 세포에서 인슐린 분비 반응을 감소시키는 주요 원인으로 생각되어지며 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화된 NFkB가 일부 역할을 할 것으로 생각된다. 그러나 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화된 NFkB와 TNF- $\alpha$ 에 의해 감소된 포도당 자극 Ca<sup>2+</sup> 유입량과의 관계는 아직 규명하지 못하였다. 그래서 우리는 NFkB를 활성화 시키는 NIK와 NFkB를 저해하는 I $\kappa$ B를 과발현 시킨 세포주를 구축하여 이를 연구해볼 계획이다. 앞으로 우리의 연구는 제 2형 당뇨병 환자에게서 나타나는 인슐린 분비 결핍현상을 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 당뇨병학  
대한당뇨병학회 (1998)
2. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB., Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 8;409(6821):729-33, 2001
3. Arkhammar P, Juntti-Berggren L, Larsson O, Welsh M, Nanberg E, Sjöholm A, Kohler M, Berggren PO Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels. *J Biol Chem*. 28;269(4):2743-9, 1994
4. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH: Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 312:446-448, 1984
5. Ball AJ, McCluskey JT, Flatt PR, McClenaghan NH. Chronic exposure to tolbutamide and glibenclamide impairs insulin secretion but not transcription of K(ATP) channel components. *Pharmacol Res* 50(1):41-6, 2004
6. Bernal-Mizrachi E, Wen W, Shornick M, Permutt MA. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B by depolarization and  $Ca^{2+}$  influx in MIN6 insulinoma cells. *Diabetes* 51 Suppl 3:S484-8, 2002  
Dec.50(1):41-6, 2004
7. Bertrand G, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Henquin JC. The

- elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *J Biol Chem* 277: 32883-91, 2002
8. Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H, Sharp GW. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes. Review*, Feb;51 Suppl 1:S83-90, 2002
  9. Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 49(2 Suppl 1):9-13. Review, 2000
  10. Carlsson C, Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140(8):3422-8, 1999
  11. Cook DL, Hales CN: Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 311:271273, 1984
  12. Corkey BE, Deeney JT, Yaney GC, Tornheim K, Prentki M. The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J Nutr* 130 (Suppl.):299S-304S, 2000
  13. Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology*; 83(3):572-84, 1968
  14. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14(3-4):193-209, Review, 2003
  15. Detimary P, Van den Berghe G, Henquin JC. Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and

- guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271: 20559–65, 1996
16. Efendic S, Efanov AM, Berggren PO, Zaitsev SV. Two generations of insulinotropic imidazoline compounds. *Diabetes* 51 Suppl 3:S448–54, Review, 2002
  17. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52(1):1–8, 2003
  18. Gutian Xiao, Abraham Fong, and Shao-Cong Sun. Induction of p100 Processing by NF- $\kappa$ B-inducing Kinase Involves Docking I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$  (IKK  $\alpha$ ) to p100 and IKK  $\alpha$ -mediated Phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, Vol. 279, Issue 29, 30099–30105, July 16, 2004
  19. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest.* 33(9):742–50. Review, 2003
  20. Hoenig M, Sharp GWG: Glucose induces insulin release and a rise in cytosolic calcium concentration in a transplantable rat insulinoma. *Endocrinology* 119:2502–2507, 1986
  21. Henquin JC, Ravier MA, Nenquin M, Jonas JC, Gilon P. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. *Eur J Clin Invest.* 33(9):742–50, Review, 2003
  22. Hsu, J. Huang, H.B. Shu, V. Baichwal and D.V. Goeddel, TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4, pp. 387–396, 1996

23. Huang L, Bhattacharjee A, Taylor JT, Zhang M, Keyser BM, Marrero L, Li M.  $[Ca^{2+}]_i$  regulates trafficking of Cav1.3 (alpha1D  $Ca^{2+}$  channel) in insulin-secreting cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286(2):C213–21, 2004
24. Holz GG. Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53(1):5–13, 2004
25. Kahn SE., The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46(1):3–19, 2003
26. Korytkowski MT. Sulfonylurea treatment of type 2 diabetes mellitus: focus on glimepiride. *Pharmacotherapy* May;24(5):606–20, 2004
27. Lee IS, Hur EM, Suh BC, Kim MH, Koh DS, Rhee IJ, Ha H, Kim KT. Protein kinase A- and C-induced insulin release from  $Ca^{2+}$ -insensitive pools. *Cell Signal* 15(5):529–37, 2003
28. Liu YJ, Cheng H, Drought H, MacDonald MJ, Sharp GW, Straub SG. Activation of the  $K_{ATP}$  channel-independent signaling pathway by the nonhydrolyzable analog of leucine, BCH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2):E380–9, 2003
29. Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* Jun 16;270(24):14255–8, 1995
30. Liu G, Dilmac N, Hilliard N, Hockerman GH. Cav 1.3 is preferentially

- coupled to glucose-stimulated insulin secretion in the pancreatic beta-cell line INS-1. *J Pharmacol Exp Ther* 305(1):271-8, 2003
31. Mandrup-Poulsen T. Beta cell death and protection. *Ann N Y Acad Sci* 1005:32-42. Review, 2003
32. Minami K, Yokokura M, Ishizuka N, Seino S. Normalization of intracellular Ca(2+) induces a glucose-responsive state in glucose-unresponsive beta-cells. *J Biol Chem* 277(28):25277-82, 2002
33. Norlin S, Ahlgren U, Edlund H. Nuclear factor- $\kappa$ B activity in  $\beta$ -cells is required for glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 54(1):125-32, 2005
34. Ohneda M, Johnson JH, Inman LR, Chen L, Suzuki K, Goto Y, Alam T, Ravazzola M, Orci L, Unger RH. GLUT2 expression and function in beta-cells of GK rats with NIDDM. Dissociation between reductions in glucose transport and glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*;42(7):1065-72, 1993
35. Park C, Kim JR, Shim JK, Kang BS, Park YG, Nam KS, Lee YC, Kim CH. Inhibitory effects of streptozotocin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$  on glucokinase activity in pancreatic islets and gene expression of GLUT2 and glucokinase. *Arch Biochem Biophys* 15;362(2):217-24, 1999
36. Porksen N, Hollingdal M, Juhl C, Butler P, Veldhuis JD, Schmitz O. Pulsatile insulin secretion: detection, regulation, and role in diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 1:S245-54, 2002
37. Roe MW. NIDDM is associated with loss of pancreatic beta-cell



- L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity. *Am J Physiol*. Jan;270(1 Pt 1):E133–40, 1996
38. Rustenbeck I, Wienbergen A, Bleck C, Jorns A. Desensitization of insulin secretion by depolarizing insulin secretagogues. *Diabetes* 53 Suppl 3:S140–50, Review, 2004
39. Rustenbeck I. Desensitization of insulin secretion. *Biochem Pharmacol*. 1;63(11):1921–35, Review, 2002
40. Sener A, Somers G, Devis G, Malaisse WJ. The stimulus–secretion coupling of amino acid–induced insulin release. Biosynthetic and secretory responses of rat pancreatic islet to L–leucine and L–glutamine. *Diabetologia* 21(2):135–42, 1981
41. Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, Ashcroft FM: Electrogenic arginine transport mediates stimulus–secretion coupling in mouse pancreatic  $\beta$ –cells. *J Physiol* 499:625635, 1997
42. Straub SG, Sharp GW. Glucose–stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6):451–63, 2002
43. Straub SG, Sharp GW. Glucose–stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6):451–63, 2002
44. Troitza K. Bratanova–Tochkova, Haiying Cheng, Samira Daniel, Subhadra Gunawardana, Yi–Jia Liu, Jennifer Mulvaney–Musa, Thomas Schermerhorn, Susanne G. Straub, Hiroki Yajima, and Geoffrey W.G. Sharp. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* Feb;51 Suppl

1:S83–90, Review, 2002

45. 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. Review, 2001
46. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner–Weir S, White MF., Disruption of IRS–2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 26:391 (6670):900–4, 1998
47. Wollheim CB, Sharp GWG: The regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 61:914973, 1981
48. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10(5):339–52. Review, 1991
49. Wojtczak L, Schonfeld P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2:1183(1):41–57, 1993
50. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF–kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 74(12):749–69. Review, 1996
51. Wu JJ, Chen X, Cao XC, Baker MS, Kaufman DB. Cytokine–induced metabolic dysfunction of MIN6 beta cells is nitric oxide independent. *J Surg Res.* 101(2):190–5, 2001
52. Zhang S, Kim KH. TNF–a inhibits GSIS in pancreatic INS–1 cell. *FEBS Letter* 377:237–239, 1995

53. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H., Insulin action in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Mol Cell Biochem.* 182(1-2):153-60, 1998
54. Z.G. Liu, H. Hsu, D.V. Goeddel and M. Karin, Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* 87 pp. 565-576, 1996

- ABSTRACT -

## Studies of TNF- $\alpha$ -induced GSIS Inhibition in INS-1 $\beta$ -cell

Hyo-Eun Kim

Department of medical sciences  
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Yup Kang)

**Background and aims** : Pancreatic  $\beta$ -cell which produce and secrete insulin, is responsible for regulation of plasma glucose concentration. GSIS depends on coordinated glucose uptakes, oxidative metabolism and  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered insulin exocytosis. Impaired GSIS is a hallmark of type II Diabetes. It has been reported that TNF- $\alpha$ , proinflammatory cytokine, was increased in obese type II Diabetes states and it inhibits GSIS in INS-1  $\beta$ -cell. This mechanism has not been examined in detail. So we investigated the mechanism which TNF- $\alpha$  inhibits GSIS in INS-1  $\beta$ -cell.

**Result** : TNF- $\alpha$  suppressed significantly GSIS on dose and time dependent manner. When TNF- $\alpha$  has been removed from medium, the decreased GSIS was recovered completely. Insulinotropic stimuli -aminoacid, sulfonylurea, imidazolin-induced insulin secretion was also decreased about 40-50% by TNF- $\alpha$  (10ng/ml) treatment for 24 hours. Bay K8644,  $\text{Ca}^{2+}$  channel agonist, induced insulin secretion

decreased about 50% by pretreatment of TNF- $\alpha$  in INS-1 cell. But KCl-induced insulin secretion, evoked by depolarization, was decreased a little. And PMA, forskolin induced insulin secretion was not decreased by TNF- $\alpha$ . This indicates that insulin secretory machinery did not affect by TNF- $\alpha$ .

After pretreatment of TNF- $\alpha$  for 24h, expression of insulin, GLUT2 and GK did not affect. ATP production didn't, neither. This indicates that insulin biosynthesis, glucose uptake and oxidative metabolism have no effect by TNF- $\alpha$  treatment. Glucose stimulated Ca<sup>2+</sup> influx and Ca<sup>2+</sup> oscillation was decreased by TNF- $\alpha$  treatment. Both DZX, K<sub>ATP</sub> channel opener, and Nifedipine, L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker, markedly improved the decreased GSIS by TNF- $\alpha$ . This indicates that the decrease of Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channel could be involved in TNF- $\alpha$ -induced GSIS inhibition. Thus we investigated both expression and trafficking of channels but didn't change.

We tested whether TNF- $\alpha$  activated signal molecule is related in the TNF- $\alpha$ -induced GSIS inhibition. Decreased GSIS was recovered by SN50, NF $\kappa$ B inhibitor. TNF- $\alpha$ -induced NF $\kappa$ B activation is thought to be responsible for TNF- $\alpha$ -induced GSIS inhibition.

**Conclusion** : Glucose and insulinotropic stimuli-aminoacid, sulfonylurea, imidazolin-induced insulin secretion was significantly suppressed by TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  inhibited glucos-stimulated Ca<sup>2+</sup> influx and oscillation through L-type Ca<sup>2+</sup> channel. The decreased GSIS was recovered by inhibition of NF $\kappa$ B. Thus TNF- $\alpha$ -induced NF $\kappa$ B activation decreased GSIS with abnormality of

glucose-stimulated  $[Ca^{2+}]_i$  influx in INS-1 cell. Our studies indicated that elevation of basal  $Ca^{2+}$  and decrease of glucose induced  $Ca^{2+}$  influx by  $TNF-\alpha$  may contribute to insulin secretion deficiency, pathogenesis of type II Diabetes.

---

Key words : Tumor necrosis factor- $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ), Glucose stimulated insulin secretion (GSIS),  $K_{ATP}$  channel, L-type  $Ca^{2+}$  channel, NF $\kappa$ B