

고혈당과 Interleukin-1 β (IL-1 β)가 분리된 백서췌도의 인슐린 분비에 미치는 영향

경희대학교 의과대학 내과학교실

김광원 · 김덕윤 · 서광식 · 고은미 · 우정택
김성운 · 양인명 · 김진우 · 김영설 · 최영길

서 론

포도당은 인슐린 분비의 가장 강한 자극물질일 뿐 아니라, 췌도베타세포의 증식과 활동도를 촉진시킨다. 따라서 췌도세포를 혈당결핍상태에 노출시키면 췌도세포를 위축시켜 인슐린 분비능력이 저하된다. 적당한 포도당의 자극이 췌도세포기능을 유지하는 필수적인 인자이다. 췌도세포기능이 떨어져 있는 당뇨병에서는 고혈당이 생기고, 고혈당은 췌도세포의 인슐린 분비를 더욱 강하게 자극하고 세포의 증식을 촉진하지만, 손상된 췌도세포는 이를 따라 주지 못하는 것으로 알려졌다. 고혈당은 췌도세포에 있는 베타세포의 기능손상의 결과일 뿐 아니라, 고혈당이 계속되면 베타세포의 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다¹⁻³⁾. 고혈당이 베타세포기능에 미치는 영향은 매우 복잡하여 하나의 기전으로 설명할 수는 없다.

고혈당이 계속되면 인슐린 분비를 계속 자극하여 결국은 베타세포를 피로하게 만들어서 지쳐버릴 것이라는 설명이다. 그러나 포도당은 베타세포의 인슐린 분비의 가장 강력한 자극물질일 뿐 아니라, 세포증식의 촉진자이기 때문에 포도당의 베타세포에 대한 영향은 두가지 면에서 동시에 고려해야 한다. 베타세포의 기능을 촉진하는 정도의 포도당 농도와 포도당에 노출되는 기간을 확인해야 하며, 포도당의 농도와 고농도에 노출되는 기간이 지나쳐서 베타세포에 나쁜 영향을 미칠 수 있는 가를 확인해야 한다.

한편 베타세포의 기능 및 인슐린 분비에 포도당이 가장 강력한 영향을 미치는 물질임은 확실하나, 포도당이

외에도 많은 물질이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 물질들은 포도당과 협동하여 베타세포를 자극하거나, 손상을 주리라고 생각된다. 이들 물질중 탐식세포에서 생산되는 interleukin-1 β (IL-1 β)는 베타세포에 큰 영향을 미치는 것으로 최근에 많은 연구의 대상이 되고 있다. IL-1 β 를 소량 첨가하면 췌도 베타세포의 기능을 강화시켜 주는 것으로 알려졌다⁴⁻⁷⁾. 그러나 IL-1 β 의 농도가 높거나 장시간 노출시키면 베타세포의 기능은 오히려 손상을 입을 것이라는 보고도 있다^{8,9)}. 제 1형 당뇨병의 초기 췌도 병리변화는 췌도주위의 탐식세포침윤을 특징으로 하고 있다^{10,11)}. 탐식세포에서 분비된 IL-1 β 가 췌도손상을 유발할 것이라는 주장도 있다^{12,13)}.

이에 저자는 포도당이 췌도세포의 인슐린 분비능에 어떠한 영향을 미치는 가를 관찰하기 위하여 포도당의 농도를 저농도에서 고농도까지 다양하게 변화시켰으며, 포도당에 노출시키는 시간을 2주까지 연장시켰다. 또한 IL-1 β 가 췌도세포의 인슐린 분비능에 미치는 추가적인 영향을 관찰하기 위하여, 포도당에 여러 농도의 IL-1 β 를 첨가하여 이에 따른 췌도 인슐린 분비능을 연구 관찰하기 위하여 본 연구를 시작하였다.

대상 및 방법

1. 백서 췌도 분리

췌도 분리실험에는 100~150 그램의 숫컷 Sprague-Dawley (SD) rat를 사용하였다. Pentotal(60 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 다음, 개복하여 총담관을 노출시킨다. 총담관에 삼침하여 collagenase(Type IV, Worthington Biochemical Co.)를 7~10 ml(1 mg/ml)주입하면 췌장을 충분히 부풀리게 할 수 있다. 부풀은 췌장을 적출하여 37°C 수욕에 약 15분간 담궈두면 췌

본 연구는 과학재단 연구비의 지원으로 이루어졌음.

장의 외분비선이 알맞게 소화되어 세포와 분리된다. 끝이 넓은 피펫를 이용하여 세포를 격렬하게 상하 진탕시킨다. 분리되어 나온 세포와 소화된 외분비선이 혼재된 분쇄세포를 자당농도차(Ficoll density gradient)를 이용하여 세포를 집적하고 원심분리한다.

20.3%와 11.0% 자당농도 사이에 세포가 선택적으로 모이게 됨으로, 쉽게 세포를 순수 분리할 수 있다. 한마리의 백서로부터 300개 전후의 세포를 얻을 수 있다.

2. 세포 배양

세포의 입체구조를 유지하기 위하여 돼지 피하를 건조시킨 스폰지 조직(Spongostan; Ferrosan, Denmark)을 이용하였다. 스폰지를 이용한 세포의 입체배양의 특징 및 장점에 대해서는 본 교실에서 이미 보고한 바 있다¹⁴⁾. 스폰지 조직을 24-구멍 배양 플라스크(24-well culture flask)의 구멍크기에 맞는 넓이와 1 mm 두께로 잘라서 배양 플라스크에 넣는다. 37°C의 RPMI-1640 배양액에 24~36시간 부유시키면, 스폰지 조직은 적당하게 부풀어서 스폰지의 공간이 열리게 된다. 배양 플라스크 매 구멍마다 5개의 세포를 스폰지위에 얹혀 놓았다.

3. 고농도의 포도당에 수일간 노출시킬 때

세포를 5% FBS(fetal bovine serum), 항생제(페니실린 100 IU/ml, 스트렙토마이신 100 µg/ml), HEPES (10 mM/L), 글루타민(2 mM/L), Na-bicarbonate (2 g/L), non-essential amino acid (10 mM/L), sodium pyruvate (10 mM/L)를 첨가한, 포도당 11.1 mM가 들

어 있는 RPMI-1640 배양액을 이용하여, 5% CO₂가 포함된 완전습윤 조건하의 배양기에서 2일간 배양한다. 이후에 27.7 mM의 포도당에 2일 또는 3일간 노출시킨다. 노출시킨 다음 11.1 mM의 포도당이 포함된 배양액으로 교환한다. 매일 배양액을 교환하고, 수거한 배양액의 인슐린 농도를 측정하여 세포 배양세포의 하루 인슐린 생산량을 산정하였다. 처음 2일 동안 포도당 11.1 mM/L에서 배양하는 동안 분비된 인슐린 양을 기저치로 하고, 그 이후에 분비된 인슐린 양은 기저치와 비교한 백분율로 표시하였다. 인슐린 측정은 Novo사에서 기증한 쥐 인슐린킷(NOVO, Ins, Denmark)을 이용한 방사면역 측정법으로 하였다.

4. 세포 배양액에 여러 농도의 포도당과 IL-1β를 첨가할 때

세포의 스폰지 입체 배양액 RPMI-1640에 2.8 mM, 5.5 mM, 11.1 mM과 22.2 mM의 포도당으로 각각의 포도당농도에 0.5 pM과 2 nM의 IL-1β를 첨가하였다. 각각의 배양액에서 2시간, 6시간 그리고 24시간이 될 때 마다 200 µl의 배양액을 채취하여 인슐린 분비량을 측정하였으며 200 µl의 배양액을 채취한 후에는 동량의 배양액을 보충하여 주었다. 이후에는 2일, 3일, 6일, 8일, 10일, 12일과 14일째에 배양액을 200 µl씩 채취하여 배양액에 방출된 인슐린 분비량을 측정하였으며 동량의 배양액을 보충해 주었다. 모든 인슐린 분비량은 일일 분비량으로 환산하여 표시하였다.

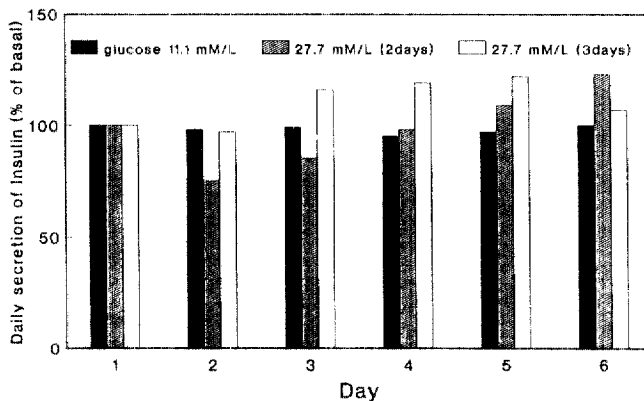


Fig. 1. Effect of a few days exposure to high glucose on the insulin secretion of islets.

5. 통계 처리

각각의 실험은 5회 실시하였으며 통계처리는 paired Student-t 검정을 이용하였고, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

결 과

1. 고농도 포도당에 수일간 노출시켰을 때 (Fig. 1)

27.7 mM 포도당에 2일간 노출시킨 경우에 5일간의 평균 분비량은 $97.3 \pm 5.1\%$ 이고 3일간 노출시킨 경우에

는 $103.3 \pm 4.3\%$ 였다. 11.1 mM에 계속 노출시켰을 때와 2일간 또는 3일간 고혈당에 노출시켰을 때와는 인슐린 분비량에 차이를 발견할 수 없었다.

2. IL-1 β 에 2시간 노출시켰을 때 (Fig. 2)

IL-1 β 가 없이 혈당농도만 변화시켰을 때 (Fig. 2의 왼쪽 그래프) 2.8 mM과 5.5 mM에서는 2시간 인슐린 분비량이 각각 70 ± 4 pM, 87 ± 4 pM 이고 11.1 mM과 22.2 mM에서는 545 ± 13 pM, 755 ± 30 pM였다. 5.5 mM의 포도당 단독으로는 인슐린 분비를 자극하지 않았다. 11.1 mM이 넘으면서 부터 인슐린 분비량이 많아지

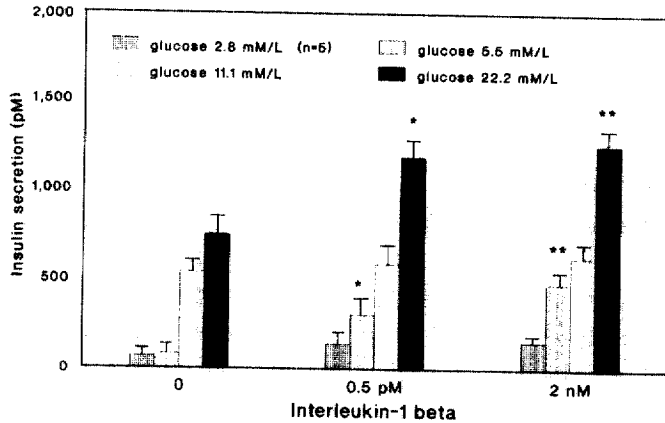


Fig. 2. Combined effects of glucose and IL-1 β on insulin secretion of islets at 2 hour.

* : without IL-1 β vs 0.5 pM IL-1 β ($p < 0.05$)

** : without IL-1 β vs 2 nM IL-1 β ($p < 0.05$)

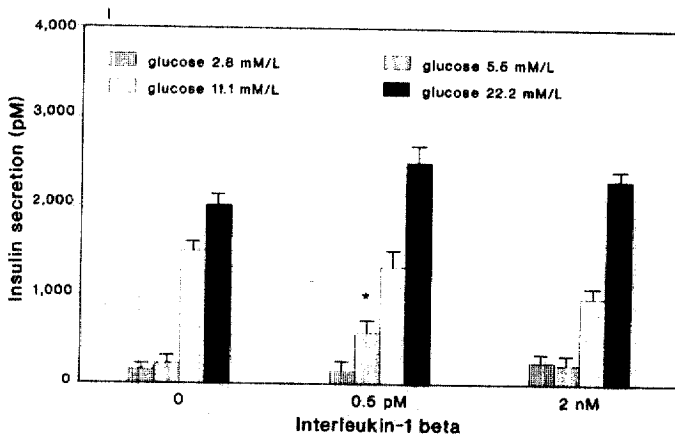


Fig. 3. Combined effects of glucose and IL-1 β on insulin secretion of islets at 6 hour.

* : without IL-1 β vs 0.5 pM IL-1 β ($p < 0.05$)

고($p < 0.05$), 22 mM에서는 인슐린 분비량이 더욱 증가하였다($p < 0.05$).

0.5 pM의 저농도 IL-1 β 에 포도당을 함께 노출시키면, IL-1 β 가 없을 때에 비하여 인슐린 분비량이 대체로 증가하였다. IL-1 β 가 없을 때는 자극이 되지 않던 5.5 mM 포도당(87 \pm 4 pM) 농도에서도 IL-1 β 가 추가되면 인슐린 분비량은 309 \pm 6 pM로 증가되었고($p < 0.05$) 22.2 mM에서는 755 \pm 30 pM에서 1,194 \pm 61 pM로 증가되었다($p < 0.05$).

IL-1 β 를 2 nM로 더 이상 증가시켜도 2.8 mM 포도당(158 \pm 8 pM)에서는 여전히 인슐린 자극 분비가 없었고 5.5 mM, 11.1 mM과 22.2 mM의 포도당에서도 더 이상의 자극 분비는 없었다.

3. IL-1 β 에 6시간 노출시킬 때(Fig. 3)

IL-1 β 가 없을 때 2.8 mM과 5.5 mM 포도당에서는 여전히 인슐린은 자극분비되지 않았다. 0.5 pM의 IL-1 β 를 첨가하면, 인슐린 자극분비가 없었던 5.5 mM 포도당에서 581 \pm 7 pM의 인슐린을 분비하여 IL-1 β 가 없을 때(229 \pm 7 pM)에 비하여 증가되었다($p < 0.05$). 포도당 11.1 mM과 22.2 mM에서도 인슐린 자극분비가 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 2 nM의 IL-1 β 에서는 5.5 mM, 11.1 mM과 22.2 mM 포도당에서 통계적으로 유의하지는 않았으나, 세 농도 모두에서 감소하는 경향을 보였다.

4. IL-1 β 에 24시간 노출시킬 때(Fig. 4)

0.5 pM의 IL-1 β 와 11.1 mM 포도당에 노출시키면 5,816 \pm 65 pM로 IL-1 β 가 없을 때(3,631 \pm 59 pM)에 비하여 유의하게 증가($p < 0.05$)되었고, 22.2 mM 포도당에서도 12,845 \pm 509 pM에 15,118 \pm 680 pM로 증가했으나 통계적인 유의성은 없었다. 그러나 2 nM의 IL-1 β 에 노출시키면, 11.1 mM 포도당에서 1,176 \pm 37 pM로 IL-1 β 가 없을 때(3,631 \pm 59 pM)와 IL-1 β 0.5 pM(5,816 \pm 65 pM)에 비하여 현저히 감소($p < 0.05$)하였고, 22.2 mM 포도당에서도 2,529 \pm 53 pM로 IL-1 β 가 없을 때(12,845 \pm 509 pM)와 IL-1 β 0.5 pM(15,118 \pm 680 pM)에 비하여 더욱 현저한 감소($p < 0.05$)를 나타냈다.

5. 2.8 mM 포도당에 장기간 노출시킬 때

IL-1 β 를 첨가하지 않으면 1일에 441 \pm 22 pM, 2일에 527 \pm 9 pM, 10일에 1,043 \pm 21 pM로 증가하는 폭이 거의 무시될 정도였다. 0.5 pM의 IL-1 β 를 첨가하여도 14일을 통하여 뚜렷한 자극증가를 인지 할 수 없었다. 2 nM의 고농도의 IL-1 β 를 추가하여도 인슐린을 자극분비하는 정도는 매우 미약하였다.

6. 5.5 mM 포도당에 장기간 노출시킬 때(Fig. 5)

IL-1 β 가 없을 때는 인슐린 분비자극은 현저하지는 않

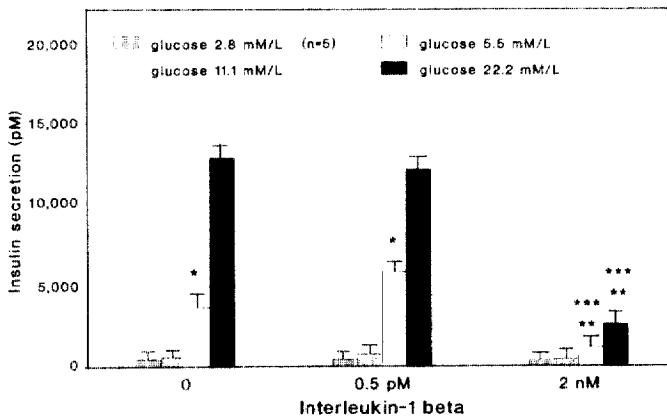


Fig. 4. Combined effects of glucose and IL-1 β on insulin secretion of islets at 24 hour.

* : without IL-1 β vs 0.5 pM IL-1 β ($p < 0.05$)

** : without IL-1 β vs 2 nM IL-1 β ($p < 0.05$)

***: 0.5 pM IL-1 β vs 2 nM IL-1 β ($p < 0.05$)

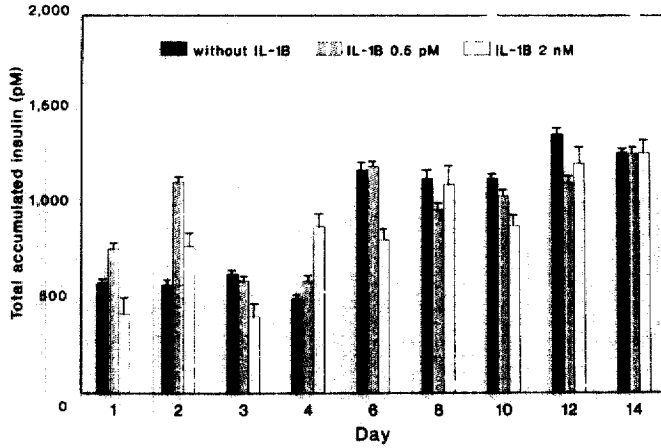


Fig. 5. Insulin secretion of islets during long-term culture with different IL-1 β concentrations in 5.5 mM/L glucose

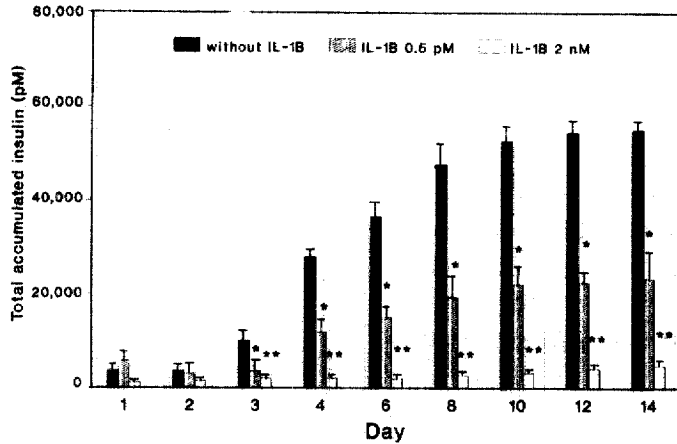


Fig. 6. Insulin secretion of islets during long-term culture with different IL-1 β concentrations in 11.1 mM/L glucose.

*: without IL-1 β vs IL-1 β 0.5 pM on the same day

** : without IL-1 β vs IL-1 β 2 nM on the same day

지만, 2.8 mM일 때에 비하여 어느 정도 자극이 있는 듯하다. 0.5 pM과 2 nM의 IL-1 β 를 첨가하여도 2.8 mM에 비하여 자극분비가 증가되나, 모든 경우에 일정하지는 않았다.

7. 11.1 mM 포도당에 장기간 노출시킬 때 (Fig. 6)

IL-1 β 가 없을 때는 1일에 3,631 \pm 60 pM, 2일에 9,633 \pm 58 pM, 3일에 10,086 \pm 56 pM로 증가하여 10일에 52,815 \pm 1,228 pM 까지 증가한 후 12일 이후에는 더 이상의 증가는 없었다. 0.5 pM의 IL-1 β 를 넣을 때 1일,

2일, 3일에는 큰 변화가 없었으나, 4일에는 11,832 \pm 93 pM로 증가된 후에 10일에 22,056 \pm 502 pM로 자극분비된 후, 그 이후에는 더 이상의 증가는 없었다. IL-1 β 를 넣지 않은 상태와 비교하면, 3일 이후에는 전 실험기간을 통하여 인슐린 분비량이 저하되어 있었다. 2 nM의 IL-1 β 를 추가하면 전체적으로 인슐린 분비량이 0.5 pM의 IL-1 β 에 비하여 약간 감소하는 경향을 보이고 있으나 유의한 차이는 없었다.

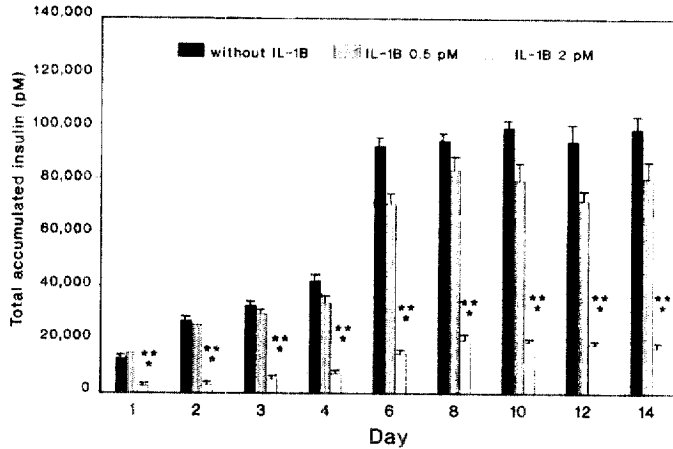


Fig. 7. Insulin secretion of islets during long-term culture with different IL-1 β concentrations in 22.2 mM/L glucose.

* : without IL-1 β vs IL-1 β 2 nM on the same day

** : IL-1 β 0.5 pM vs IL-1 β 2 nM on the same day

8. 22.2 mM의 포도당에 장시간 노출시킬 때(Fig. 7)

22.2 mM의 고농도 포도당에 노출시키면, 11.1 mM의 포도당에 비하여 인슐린 분비자극은 훨씬 강하였다. 1일에는 22.2 mM에서 12,845±509 pM이고 11.1 mM에서 3,631±60 pM이었고, 2일에는 27,136±626 pM과 3,633±58 pM이었고, 3일에는 32,763±464 pM과 10,086±56 pM이었고, 6일째는 92,249±1,187 pM과 36,560±482 pM로 모든 경우에서 11.1 mM의 포도당 자극보다 현저히 높은(p<0.05) 인슐린 분비자극을 나타냈다. 또한 22.2 mM의 포도당에 노출되었을 때, 인슐린 자극분비는 6일까지 계속 증가되었으나, 그 이후에는 더 이상의 증가는 없었다. 11.1 mM 포도당에서는 10일까지 인슐린 분비가 계속 증가되는 것에 비하여 22.2 mM 포도당에서는 초기에 강한 인슐린 분비 자극과 함께 최고치에 도달하여 더 이상 분비가 일어나지 않았다.

0.5 pM의 IL-1 β 에 노출시킬 때와 노출시키지 않을 때를 비교해 보면 1일, 2일과 3일에 각각 15,118±680 pM과 12,845±509 pM, 25,644±545 pM과 27,136±626 pM이고 29,611±1,045 pM과 32,736±464 pM로서 0.5 pM의 IL-1 β 에 노출시킬 때와 그렇지 않은 실험 사이에 인슐린 분비량의 차이를 보이지 않았다. 6일 이후에는 0.5 pM의 IL-1 β 에 노출시킨 췌도세포의 인슐린 분비량이 노출시키지 않은 군에 비하여 유의하게(p<0.

05) 저하되어 있었다. 2 nM의 고농도의 IL-1 β 에 노출시키면, 실험 1일에 2,590±53 pM, 2일에 3,085±100 pM, 4일에 7,390±62 pM, 8일에 20,054±557 pM, 14일에 17,206±214 pM 등으로 IL-1 β 를 넣지 않은 군과 0.5 pM의 IL-1 β 를 넣은 군, 모두에 비하여 전 실험기간 동안 인슐린 분비에 현저한 저하(p<0.001)가 있음이 관찰되었다.

고 안

포도당이 췌도 베타세포에 미치는 상반성은 매우 이해하기 어렵다. 포도당은 베타세포의 활동과 증식에 긍정적인 반응도 있고, 베타세포를 과다하게 자극하여 결국은 기능부전에 이르게 할 수 있으리라고 생각된다. 본 연구에서 실행한 수일간의 노출은 그 이후의 인슐린분비에 영향을 미치지 않았다. 48시간 또는 72시간의 단기간의 고혈당은 베타세포의 인슐린분비를 증가시키지도 않았고 억제시키지도 않았다. 베타세포를 고농도의 포도당에 노출시키면 인슐린 mRNA의 반감기를 길게하고, mRNA의 합성도 증가시킨다. 48시간 내지 72시간 노출시키면 mRNA의 총량은 자극전에 비하여 15배까지 증가되는 것으로 알려졌다¹⁵⁻¹⁷⁾. mRNA가 증가되어도 인슐린 분비량이 증가되지 않은 것은 인슐린 분비와 mRNA의 증가와 항상 일치하지 않을 가능성을 시사해 준다. 고혈당에 일단 노출된 mRNA는 혈당에 의한 인

슐린의 합성반응이 낮아져서, 결국은 동일한 농도의 포도당 자극에 대한 인슐린 합성양이 동일해진다고 생각할 수도 있다. 수분내지 수신편간격으로 췌도를 자극하면 동일한 농도의 포도당에 대해서도 인슐린 분비자극이 계속 증가되는 반응도 증가 효과가 있음은 잘 알려져 있다^{18,19}. 그러나 이러한 반응도 증가효과는 매우 짧은 시간 간격을 두고 일어날 뿐이지 시간을 더 이상 길게하면 상황은 달라진다. 본 실험에서와 같이 48시간 내지 72시간의 노출에서는 인슐린의 분비능에 큰 차이가 없었다. 이것은 인슐린 분비능에서 차이가 없는 사실만을 말해줄 뿐이지, 췌도에 변화가 없음을 증명하는 것이 아닐 것이다. 고혈당에 베타세포를 짧은 시간 노출시키면 인슐린 분비에 일시적인 장애가 있을 뿐이지, 짧은 시간내에 곧 회복될 수 있다는 보고가 많다^{20,21}. 따라서 짧은 시간의 고혈당 노출에 대해서는 베타세포가 충분히 극복할 수 있는 적응력이 있음을 시사해 준다.

췌도 베타세포의 기능과 행태에 가장 큰 영향을 주는 인자는 포도당이라는 사실을 재론할 필요는 없다. 그러나 베타세포에 영향을 주는 인자는 포도당 이외에도 많은 인자들이 있는 것으로 알려져 있다. 이들 중 IL-1 β 는 특히 관심의 대상이 되고 있다. IL-1 β 는 탐식세포에서 생산되어 면역기능의 연쇄반응을 일으키는데 작용할 뿐 아니라, IL-1 β 단독으로도 고유한 생물학적 반응을 나타낸다²². 췌도손상의 초기 변화는 췌도주위의 탐식세포 침윤을 특징으로 한다. 탐식세포의 침윤은 다음 단계의 면역 반응을 유도할 뿐 아니라, 진행된 면역반응이 일어나기 전에 탐식세포가 직접 췌도세포기능에 영향을 줄 수 있으리라는 가정이 있었다²³.

Mandrup-Poulsen¹³은 IL-1 β 가 췌도 베타세포에 직접적인 세포독성을 나타냄을 보고하였다. 그러나 이런 생각은 IL-1 β 의 베타세포에 대한 매우 단순한 이해의 결과였다. IL-1 β 에 췌도를 장시간 노출시키면 인슐린 분비능이 현저히 저하됨은 대체로 인정되고 있다. 그러나 만일 IL-1 β 에 단시간 노출시킬 때는 장시간 노출시킬 때와 매우 다른 결과를 나타낸다. 즉 단시간에 노출된 경우에 인슐린 분비는 오히려 증가되었으며 이러한 결과는 다른 보고들과 일치한다. IL-1 β 에 단시간 노출시킬 때는 베타세포의 DNA 합성을 증가시킨다는 보고가 있다. 단시간에는 IL-1 β 는 오히려 췌도 베타세포의 기능을 증강시키리라 추정된다²⁴. IL-1 β 에 단시간 노출시킬 때도 항상 췌도 베타세포의 인슐린 분비능을 증가시키는

것은 아니다. 0.5 pM의 IL-1 β 에 노출시킬 때는 인슐린 분비가 증가되었지만 2 nM일 때는 단시간의 노출에서도 인슐린 분비가 억제되었다. IL-1 β 는 미토콘드리아내의 산화과정에 관여하는 것으로 알려졌다²⁵. 최근에는 IL-1 β 의 베타세포에 대한 인슐린 억압효과를 nicotinamide를 통하여 방지할 수 있다는 보고가 있다²⁶. 그러나 IL-1 β 의 농도에 따른 베타세포에 대한 생화학적 영향을 분명하게 밝힌 보고가 없다.

IL-1 β 에 장시간 노출시키면 베타세포의 인슐린 분비능은 현저히 억제된다. 이러한 억제효과는 IL-1 β 의 농도가 높을수록 더욱 뚜렷함을 알 수 있다. IL-1 β 에 장시간 노출된 베타세포의 전자현미경 소견상 세포면성의 초기 변화가 관찰된다. 그러나 이러한 초기 변화가 결국은 비가역적인 세포손상으로 이어지지는 않는다고 한다. 수일간 IL-1 β 에 노출되어 베타세포의 인슐린 분비능이 일시적으로 저하되고, 베타세포의 전자현미경적 변화가 있어도, IL-1 β 를 제거한 정상 배지에서 배양을 계속하면, 베타세포의 인슐린 분비능이 IL-1 β 노출전의 상태로 회복됨을 보고하고 있다²⁷.

췌도세포에 대한 IL-1 β 의 영향이 IL-1 β 의 농도와 노출시간에 따라 동적인 변화를 하고 있는 것에 대한 기전을 설명하고, 가역적 혹은 비가역적 변화를 주는 단계를 결정하는 일은 췌도손상의 병인을 설명할 수 있는 하나의 단서를 얻을 수 있는 계기가 될 것이다.

한편 췌도 베타세포의 기능에 가장 중요한 자극자인 포도당의 베타세포에 대한 영향은 이미 많은 보고가 있다. 본 연구에서도 2.8 mM의 포도당을 22.2 mM 까지 차츰 증가시키면 인슐린 분비량도 증가된다. 그러나 2.8 mM과 5.5 mM의 포도당 농도에서는 인슐린의 분비량은 매우 적어서 11.1 mM에 비해서는 3%정도이고, 22.2 mM에 비해서는 1%정도였다. 베타세포의 인슐린 분비역치(threshold value)는 적어도 포도당 5.5 mM 이상임을 알 수 있었다. 포도당 11.1 mM에서는 인슐린 분비량이 급격히 증가되고 22.2 mM에서는 분비량이 더욱 증가되었다. 22.2 mM의 고농도의 포도당일지라도 일주일까지는 인슐린 분비의 억제가 없이 계속 증가 되는 것으로 보아서, 적어도 7일까지는 베타세포의 포도당 독성(glucotoxicity)이 나타나지 않을 가능성을 시사해준다.

Eizirik²⁸은 고농도의 포도당에 수시간 내지 수일간 췌도를 노출시키면 인슐린 분비가 일시적으로 억제되

나, 수시간내에 인슐린 분비능이 회복될 뿐 아니라, 체도의 형태에도 변화가 없으리라 시사하고 있다.

포도당 농도, IL-1 β 농도 및 이들에 대한 노출시간에 변화를 줄 때는 실로 매우 복잡한 동적인 변화를 보였다. 2시간의 짧은 시간동안 노출시킨 경우에 포도당 5.5 mM 단독자극에서는 미미한 인슐린 분비였지만, 0.5 pM 또는 2 nM의 IL-1 β 를 추가했을 때는 11.1 mM의 포도당 자극에 맞먹는 인슐린 분비량이었다. 역치근방 또는 역치이하의 포도당 자극일지라도 IL-1 β 를 더해주면 포도당자극 인슐린 역치를 낮출 수 있음을 시사해 준다. 6시간의 노출에서 더 이상의 IL-1 β 의 효과는 더 이상 나타나지 않았고, 24시간에서는 추가적인 효과가 농도에 따라 상반되게 나타났다. 5.5 mM의 포도당에서는 IL-1 β 에 대한 인슐린분비 억제효과가 현저하였고, 22.2 mM 포도당에 대한 인슐린 분비의 억제효과는 뚜렷하지 않았다. 즉 약한 포도당 자극에 대해서는 IL-1 β 의 효과가 우세하였으나, 높은 포도당 농도에 대해서는 강한 억제효과가 있었다. 그러나 IL-1 β 를 2 nM 까지 증가시키면 고농도의 포도당일지라도 IL-1 β 의 인슐린 분비억제 효과가 더욱 강하였다. 이는 체도베타세포의 기능장애 또는 형태학적인 변화가 베타세포를 자극하는 가장 중요한 인자인 포도당 단독으로 결정하는 것이 아니고 부가되는 추가 인자가 있으면, 베타세포에 대한 영향이 더욱 커짐을 시사하는 소견이다.

IL-1 β 에 체도세포를 24시간 동안 비교적 오랜시간 노출시키면 포도당 농도와 IL-1 β 농도에 따라 매우 다양한 인슐린 분비양상을 나타낸다. 저농도의 포도당에 대해서는 24시간의 단기 노출에서 보였던 자극 효과가 없어져 보였다. 그러나 11.1 mM과 22.2 mM의 비교적 높은 농도에 대한 인슐린 분비자극은 IL-1 β 에 노출된 상태에서도 여전히 작동하고 있었다. IL-1 β 가 2 nM의 고농도에 노출될 때는 높은 농도의 포도당 자극일지라도 더 이상 인슐린 분비자극 효과는 없어지고, 현저한 억압반응이 일어나고 있었다. 이러한 현상을 잘 설명하는 것은 쉽지 않다. 체도 베타세포를 자극하는 인자들은 항상 자극자만으로 작용하는 것이 아니고, 자극과 억압을 그들에 노출된 시간과 농도에 따라 상반 작용을 할 수 있으리라 추정된다.

현재 많은 학자들이 주장하는 베타세포에 대한 포도당 독성은 광범위한 지지를 받고 있는 것은 사실이지만, 그 정확한 기전에 대해서는 불분명하다. 그러나 적어도 수

일간의 단기간 노출에는 큰 영향을 받지 않은 것으로 보아서, 베타세포는 고농도의 포도당에 대한 내인성이 매우 강한 것으로 생각된다.

IL-1 β 의 체도 베타세포에 대한 영향은 포도당과 비교하면 매우 짧은 시간에 변화가 일어난다. 2시간 정도의 짧은 시간에는 오히려 인슐린 분비자극이 일어나지만 이러한 반응은 쉽게 없어지고, 오히려 억압되는 양상을 나타내는 것으로 보아서, IL-1 β 는 포도당에 비하여 베타세포에 쉽게 독성을 나타낸다고 설명할 수 있다.

IL-1 β 의 베타세포 독성은 인슐린 분비를 억제시키는 작용 뿐만 아니라, 형태에도 변화를 가져오는 것으로 알려졌다. 그러나 이러한 변화들이 체도세포의 비가역적인 기능변화까지 올 것이라는 견해에 대해서는 아직 잘 모른다. IL-1 β 에 수시간 노출시킬 때에는, 수일 내에 체도 베타세포의 기능이 회복됨을 보고하고 있다²⁷⁾. 따라서 IL-1 β 의 베타세포 독성에 대한 가역반응은 앞으로 계속 추구해야 될 과제로 생각된다.

체도세포 배양기간을 14일까지 연장시키면 단시간 노출에서 나타내는 양상이 더욱 뚜렷하게 강화되기도 하고, 상반되는 반응을 나타내기도 하였다. 이와 같은 현상도 포도당과 IL-1 β 농도에 따른 변화였다.

IL-1 β 를 첨가하지 않을 때, 체도 인슐린 분비는 포도당 농도가 높을 수록 더욱 높아짐을 볼 수 있다. 포도당 2.6 mM과 5.5 mM에서는 인슐린 분비자극이 없는 것으로 보아서 백서 체도의 인슐린 분비 포도당 자극역치는 5.5 mM 이상임이 다시 한번 확인되었다. 한편 포도당 22.2 mM 정도의 고농도일지라도 다른 추가적인 인자가 없을 때는, 손상되지 않은 온전한 체도에 비가역적인 손상은 주지 않을 것으로 생각된다.

11.1 mM 포도당 농도에 IL-1 β 를 함께 추가하면 3일째부터 IL-1 β 의 체도세포 인슐린 분비억압효과가 생기면서 14일까지 계속 억압효과가 지속되고 있다. 22.2 mM의 고농도 포도당에 노출시키면 IL-1 β 의 농도에 따라 매우 다른 양상을 보인다. IL-1 β 가 0.5 pM의 저농도에서는 배양 4일까지는 IL-1 β 를 넣지 않은 체도 세포와 비교해서 큰 차이가 없었다. 6일후에도 약간 억압되는 경향을 보였으나, 포도당 11.1 mM에 IL-1 β 0.5 pM 배양액에서 현저한 억압효과를 나타내는 것에 비하면 큰 차이가 있음을 알 수 있다. IL-1 β 가 있어도 고농도의 포도당이 있으면, IL-1 β 의 인슐린 억압효과를 어느 정도 상쇄할 수 있음을 암시한다. IL-1 β 가 미토콘드리아의

산화과정을 차단하여 에너지 생산에 장애를 준다는 보고가 있다²⁶⁾. 고농도의 포도당 배지에서는 상당량의 포도당을 공급함으로써 IL-1 β 의 포도당 산화 차단효과를 경감시킬 수 있으리라는 추정도 가능하나 증명된 바가 없다. 또 하나의 설명으로 IL-1 β 의 인슐린분비 자극을 차단한 상태이지만, 포도당의 자극이 너무 강력하여 베타세포가 인슐린 분비를 극대화시킨 결과로 추정해 볼 수 있다. 전자의 경우는 포도당이 IL-1 β 의 체도에 미치는 영향을 방어하여 체도의 기능을 보호한다고 생각할 수 있으나, 후자의 가정은 체도세포를 피로하게 만들어 결국은 베타세포에 손상을 줄 수 있으리라 가정할 수 있다. 앞으로 이에 대해서도 연구가 필요하리라 생각된다.

IL-1 β 의 농도를 2nM로 높이면, 포도당의 농도를 22.2 mM의 높은 상태에서도 현저하게 억압시킨다. 이는 포도당의 베타세포 인슐린 분비자극의 한계를 나타내는 것으로 생각된다. 포도당으로 베타세포의 인슐린 분비자극은 2nM의 IL-1 β 에 노출된 첫날부터 억압되고, 이러한 현상은 실험의 마지막 날까지 계속되고 있다. 다량의 IL-1 β 에서는 체도세포특성을 나타낼 수 있음을 암시한다.

정상인에서 IL-1 β 의 농도는 1 pM에서 1 nM 사이에서 생물학적 효과가 나타난다고 한다. IL-1 β 는 급성 염증과 같은 응급상황에서 증가되는 cytokine으로 알려졌다. 따라서 급성염증과 같은 상태에서 일시적으로 인슐린 분비가 증가되는 현상을 IL-1 β 로 설명할 수 있다. 한편 체도 세포의 면역손상의 초기 변화로 체도주위에 탐식세포의 침윤이 선행됨은 여러 보고에 의하여 증명되었다. 따라서 체도세포 주변의 IL-1 β 농도는 전신순환에서 보이는 IL-1 β 농도에 비하여 매우 높을 가능성이 있다.

또한 면역반응에서 생기는 tumor necrosis factor (TNF), 감마인터페론등도 체도세포의 손상에 관여할 것이라는 보고도 있다. 포도당, IL-1 β , TNF와 감마인터페론등이 체도세포에 미치는 상호작용은 계속 추구해야 될 문제이다.

이상의 사실을 종합하면, 첫째, 체도베타세포의 인슐린 분비자극 포도당 역치는 5.5 mM 이상이다. 둘째, 손상되지 않은 체도는 수일간의 고농도 포도당에서는 비가역적인 손상이 생기지 않을 것이다. 셋째, IL-1 β 는 포도당 인슐린 자극역치를 낮추어 줄 가능성이 있다. 넷째, IL-1 β 는 단시간에는 체도 인슐린 분비를 자극한다.

다섯째, IL-1 β 에 장기간 노출되면 체도 인슐린 분비를 억제한다. 여섯째, 고농도 포도당은 IL-1 β 의 인슐린 분비억제효과를 어느 정도 극복할 수 있다. 이상의 결과로 미루어 보아서 IL-1 β 가 포도당 자극에 의한 인슐린 분비에 심대한 영향을 미치며, 이러한 영향은 포도당 농도, IL-1 β 농도와 이들에 노출된 시간에 따라 자극과 억압이 교차되는 상반반응이 나타남을 알 수 있다.

요 약

연구배경 : 고혈당은 체도세포에 있는 베타세포의 기능손상의 결과일 뿐 아니라, 고혈당이 계속되면 베타세포의 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 포도당 이외에도 많은 물질이 베타세포의 기능 및 인슐린 분비에 영향을 미치며 이들중 탐식세포에서 생산되는 Interleukin-1 β (IL-1 β)은 농도 및 노출시간에 따라 베타세포의 기능에 미치는 영향이 다른 것으로 알려져 있어 최근에 많은 연구의 대상이 되고 있다.

이에 저자들은 포도당의 농도 및 노출시간에 따른 인슐린 분비능의 변화를 관찰하고 IL-1 β 가 체도세포의 인슐린 분비에 미치는 추가적인 영향에 대하여 알아보았다.

방법 : 숫컷 Sprague-Dawley rat에서 collagenase 방법과 Ficoll density gradient centrifugation 방법에 의해 소도세포를 분리하고 11.1 mM과 27.7 mM의 포도당이 포함되어 있는 RPMI 1640 배양액에서 2~3일간 배양한 후 11.1 mM 농도의 포도당 조건하에서 6일간 배양하였다. 매일 배양액을 교환하여 검체는 RIA 방법에 의해 인슐린 농도를 측정하였다. 배양액의 포도당 농도를 달리하여 (2.8, 5.5, 11.1, 22.2 mM/L) 베타세포의 인슐린 분비반응을 14일 동안 관찰하였으며 IL-1 β 를 첨가하여 (0.5 pM, 2 nM) IL-1 β 에 의한 베타세포의 기능 변화를 관찰하였다.

결 과 :

- 1) 체도베타세포의 인슐린 분비반응의 포도당 역치는 5.5 mM 이상이다.
- 2) 손상되지 않은 체도는 수일간의 고농도 포도당에서는 비가역적인 손상이 관찰되지 않았다.
- 3) 포도당과 IL-1 β 에 노출된 첫 2시간내에는 인슐린 분비가 농도에 비례하여 증가하였으나 24시간에는 고농도의 IL-1 β 에 의해 인슐린 분비가 현저하게 억제되었

다.

4) IL-1 β 에 장기간 노출되면 인슐린 분비를 억제하며 고농도 포도당은 인슐린 분비 억제효과를 어느 정도 극복할 수 있다.

결론: IL-1 β 가 포도당 자극에 의한 인슐린 분비에 심대한 영향을 미치며, 이러한 영향은 포도당 농도, IL-1 β 농도와 이들에 노출된 시간에 따라 자극과 억압이 교차되는 상반반응이 나타남을 알 수 있다.

== Abstract ==

Combined Effect of Hyperglycemia and Interleukin-1 Beta (IL-1 β) on the Insulin Secretion of Isolated Rat Islets

Kwang-Won Kim, M.D., Deog-Yoon Kim, M.D.

Kwang Sik Seo, M.S., Eun-Mi Koh, M.D.

Jeong Taek Woo, M.D., Sung Woon Kim, M.D.

In Myung Yang, M.D., Jin Woo Kim, M.D.

Young Seol Kim, M.D. and Young Kil Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Background: Recently, there are several reports that diabetic hyperglycemia is not only the consequence of insulin deficiency but also affects the functions of pancreatic islets. The controversies of hyperglycemic effects on islet function are mainly due to the duration of exposure to hyperglycemia and other modifying factors such as interleukin-1 beta which may influence the islet functions.

In the present study, we observed the effect of hyperglycemia and combined effect of hyperglycemia and interleukin-1 beta on the insulin secretion of rat islets for short-term and long-term period by long-term culture system which we have recently established.

Method: We obtained pancreatic islets of male Sprague-Dawley rats, weighing 80~100 g, isolated by collagenase method and Ficoll density gradient centrifugation method. To observe the effect of a few days exposure to hyperglycemia, islets were cultured for 2 or 3 days in culture medium RPMI 1640 containing 11.1 or 27.7 mM/L glucose. Thereafter islets were cultured for 6 days with daily change of culture media with 1.1 mM/L glucose.

To investigate the relationship between dose of IL-1 β and various glucose concentrations, islets were cultured

in medium RPMI 1640 containing various concentrations of glucose (2.8, 5.5, 11.1 and 22.2 mM/L), with or without IL-1 β (0.5 pM, 2 nM) for 14 days. We measured total accumulated insulin secretion every day by RIA method.

Result:

1) Threshold level of glucose stimulated insulin secretion of islets is above 5.5 mM.

2) A period of three days exposure to high glucose concentration did not seem to impair the function of islets in terms of insulin secretion.

3) Glucose and IL-1 β stimulated the insulin secretion of islets as dose dependent manner for the first 2 hours. But, insulin secretion was markedly suppressed by high dose of IL-1 β at 24 hours.

4) In a low dose of IL-1 β , glucose was dominant stimulator on the insulin secretion of islets and that in high dose of IL-1 β , marked inhibitory action on the insulin secretion of islets was evident regardless of glucose concentrations during long-term culture.

Conclusion: Glucose concentration is thought to be an important determinant of interleukin-1 beta effect on insulin secretion and bimodal effect of interleukin-1 beta on the glucose stimulated insulin secretion of islets was evident. The effect of interleukin-1 beta on the insulin secretion of islets depend on its concentration, duration of exposure and concentration of glucose. Further studies are needed to understand underlying mechanisms of these effects of interleukin-1 beta and glucose on the islets in vitro.

Key Words: Hyperglycemia, Interleukin-1 β , Islets

REFERENCES

- 1) DeFronzo RA: *The triumvirate; B-cell, muscle, liver; A collusion responsible for NIDDM. Diabetes* 37:667-687, 1987
- 2) Bedoya FJ, Jeanrenaud B: *Evolution of insulin secretory response to glucose by perfused islets from lean (FA/FA) rats chronically infused with glucose. Diabetes* 40:7-14, 1991
- 3) Rossetti L, Shulman GI, Zawulich W, DeFronzo RA: *Effect of hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. J Clin Invest* 80: 1037-1044, 1987
- 4) Wogensen LD, Mandrup-Poulsen T, Markholst H, Molvig J, Lernmark A, Holst JJ, Dinarello CA,

- Nerup J: *Interleukin-1 potentiates glucose stimulated insulin release in the isolated perfused pancreas. Acta Endocrinol (Copenh)*, 117:302-306, 1988
- 5) Spinas GA, Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Bak L, Bendtzen K, Dinarello CA, Nerup J: *Low concentrations of interleukin 1 stimulate and high concentrations inhibit insulin release from isolated rat islets of Langerhans. Acta Endocrinol (Copenh)* 113:551-558, 1986
 - 6) Comens PG, Wolf BA, Unanue ER, Lacy PE, McDaniel ML: *Interleukin 1 is a potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. Diabetes* 36:963-970, 1987
 - 7) Zawulich WS, Zawulich KC: *Interleukin 1 is a potent stimulator of islets insulin secretion and phosphoinositide hydrolysis. Am J Phy* 256:E19-E24, 1989
 - 8) Spinas GA, Palmer JP, Mandrup-Poulsen T, Andersen H, Nielsen JH, Nerup J: *The bimodal effect of interleukin 1 on rat pancreatic beta cells stimulated followed by inhibition depends upon dose, duration of exposure, and ambient glucose concentration. Acta Endocrinologica*, 119:307-311, 1988
 - 9) Zawulich WS, Diaz VA: *Interleukin-1 inhibits insulin secretion from isolated perfused rat islets. Diabetes* 35:1119-1123, 1986
 - 10) Lee KU, Kim MK, Amano K, Pak CY, Jarworski VA, Mehta JG, Yoon J-W: *Preferential infiltration of macrophages during early stages of insulinitis in diabetes-prone BB rats. Diabetes* 37:1053-1058, 1988
 - 11) Walker R, Bone AJ, Cooke A, Baird JD: *Distinct macrophage subpopulations in pancreas of prediabetic BB/E rats: Possible role for macrophages in pathogenesis of IDDM. Diabetes* 37:1301-1304, 1988
 - 12) Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Hoiriis Nielsen J, Bendixen G, Nerup J: *Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. Allergy* 40:424-429, 1985
 - 13) Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Egeberg J, Nielsen JH: *Mechanisms of pancreatic islet cell destruction. Dose-dependent cytotoxic effect of soluble blood mononuclear cell mediators on isolated islets of Langerhans. Allergy* 41:250-259, 1986
 - 14) 김덕운, 서광식, 고은미, 우정택, 김진우, 김영설, 김광원, 최영걸: *임체구조 세포배양을 통한 백서췌장 소도세포의 장기 배양. 제 6 회 대한 당뇨병학회 춘계 학술대회 초록집* p 46-47, 1991
 - 15) Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF: *Control of insulin gene expression in pancreatic B-cells and in an insulin producing cell line, RIN-5F cell I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. J Biol Chem* 260:13585-89, 1985
 - 16) Welsh M, Nielsen DA, MacKrell AJ, Steiner DF: *Control of insulin gene expression in pancreatic B-cells and in an insulin producing cell lines, RIN-m5F cells. II. Regulation of insulin mRNA stability. J Biol Chem* 260:13590-94, 1985
 - 17) Brnstedt J, Chan SJ: *Direct effect of glucose on the preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets. Biochem Biophys Res Commun* 106:1383-89, 1982
 - 18) Cerasi E: *Potential of insulin release by glucose in man. Acta Endocrinol* 79:483-501, 1975
 - 19) Ashby JP, Shirling D: *Evidence for priming and inhibitory effects of glucose on insulin secretion from isolated islets of Langerhans. Diabetologia* 18:417-421, 1980
 - 20) Vague J-P, Moulin JP: *The defective glucose sensitivity of the B cell in non insulin dependent diabetes mellitus: Improvement after twenty hours of normoglycemia. Metabolism* 31:139-142, 1985
 - 21) Laury MC, Takao F, Bailbe D, Pennicaud L, Portha B, Picon L, Ktorza A: *Differential effects of prolonged hyperglycemia on in vivo and in vitro insulin secretion in rats. Endocrinology* 128:2526, 1991
 - 22) Dinarello CA: *Biology of interleukin 1: FASEB J* 2: 108-115, 1988
 - 23) Ihm S-H, Lee K-U, Yoon J-W: *Studies on autoimmunity for initiation of B-cell destruction. VII. Evidence for antigenic changes of B-cells leading to autoimmune destruction of B-cells in BB rats. Diabetes* 40:269-274, 1991
 - 24) Fizirik DL, Strandell E, Bendtzen K, Sandler S: *Functional characteristics of rat pancreatic islets maintained in culture after exposure to human interleukin-1. Diabetes* 37:916-919, 1988
 - 25) Sandler S, Bendtzen K, Hakan-Borg LA, Eizirik DL, Strandell E, Welsh N: *Studies on the mechanisms causing inhibition of insulin secretion in rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1 beta indicate a perturbation in the mitochondrial function. Endocrinology* 124:1492-1501, 1989
 - 26) Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster

- JR, McDaniel ML: *IL-1 β -induced nitric oxide formation mediates islet beta cell dysfunction. The 52th ADA annual meeting, Abstract No 49, 1992.*
- 27) Wogensen LD, Kolb-Bachofen V, Christensen P, Dinarello CA, Mandrup-Poulsen T, Martin S, Nerup J: *Functional and morphological effects of interleukin-1 β on the perfused pancreas. Diabetologia* 33:15-23, 1990
- 28) Eizirik DL, Sandler S: *Human interleukin-1 β induced stimulation of insulin release from rat pancreatic islets is accompanied by an increase in mitochondrial oxidative events. Diabetologia* 32:769-773, 1989