

방선균에서 유래한 YHB-2017 (Genistein)의 인슐린 분비 촉진 작용 기전

곽원재 · 박유회 · 박준철 · 이병규 · ¹강엽 · †²최태부
(주)유한양행 중앙연구소, ¹아주대학교 의과학연구소, ²건국대학교 미생물공학과
(접수 : 2006. 8. 30., 게재승인 : 2006. 10. 23.)

Mechanisms of Insulinotropic Effect of YHB-2017 (Genistein) Isolated from Fermentation Broths of *Streptomyces* sp.

Won Jae Kwag, You Hoi Park, Jun Chul Park, Byung Kyu Lee, Yup Kang¹, and Tae Boo Choe^{2†}

Yuhan Research Institute, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-902, Korea

¹Institute for Medical Science, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

²Department of Microbial Engineering, KonKuk University, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

(Received : 2006. 8. 30., Accepted : 2006. 10. 23.)

Impaired insulin secretion from pancreatic beta-cells in response to glucose is an important feature in the pathology of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). In the course of screening for useful insulin secretagogues, we have isolated and identified YHB-2017 (Genistein) as a insulin secretion potentiator from fermentation broths of our in-house microbial library. The insulinotropic activity of YHB-2017 in isolated rat pancreatic islets was exerted only at high concentration of glucose (8.3-16 mM) but not at low concentration of glucose (3.3-5.5 mM). Also, in perfusion study with isolated rat pancreatic islets, YHB-2017 stimulated insulin secretion in a time-dependent manner when YHB-2017 was added to KRB buffer containing 16 mM glucose. In the presence of 200 μ M diazoxide and 35 mM KCl, which stimulates maximum Ca^{2+} influx independently of KATP channel, YHB-2017 enhanced KATP channel-independent insulin secretion at high concentration glucose (16 mM). To elucidate the mechanisms of the glucose-dependent potentiation effect of YHB-2017, pharmacologic inhibitors for protein kinase A, protein kinase C and calcium/calmodulin kinase II were pre-treated and then the potentiation effect of YHB-2017 on insulin secretion was investigated. Pre-treatment of H89 as a PKA inhibitor had a significant inhibitory effect on YHB-2017-induced potentiation effect. Furthermore, western immunoblotting analyses revealed that YHB-2017 increased phosphorylation of PKA substrates and cAMP response element-binding protein (CREB) under high concentration of glucose. These results demonstrated that the insulinotropic effect of YHB-2017 is mediated through PKA signal pathway and activated amplifying K_{ATP} channel-independent insulin secretion pathway.

Key Words : Insulin secretion, beta-cell, insulinotropic activity, genistein, PKA substrate phosphorylation

서론

당뇨병은 혈중 당 (glucose) 농도가 높아 생기는 만성 대사 질환으로 고혈당이 오랜 기간 지속되면 눈, 신장 및 신경 손상 뿐 아니라 중풍, 협심증 또는 심근경색증, 동맥경화증 등의 심각한 합병증을 초래하게 된다. 혈당 상승이 공통 특징인 당뇨병은 복합적인 병인학적 기작에 의해 발생되는데 췌장 베타세포 파괴로 인해 인슐린이 절대적으로

부족해서 발병하는 인슐린 의존성 당뇨병 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM, type I)과 췌장 베타세포의 인슐린 분비 기능 이상으로 인슐린 생산능력이 상대적으로 적거나, 인슐린 분비는 정상적으로 이루어지지만 인슐린 표적 세포인 adipocytes와 muscle cell에서 인슐린의 생물학적 기능 저하로 인해 인슐린 저항성이 유발되는 인슐린 비의존성 당뇨병 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM, type II)으로 분류된다(1-3).

췌장베타세포에서의 정상적인 인슐린 분비 과정은 혈당이 증가되면 glucose transport (GLUT-2)를 통해 glucose가 베타세포내로 유입되고 일련의 glucose 대사과정에서 ATP가 생성되어 세포내 ATP/ADP 비율이 증가되면 ATP-sensitive K^+ channel의 pore channel subunit (Kir6.2)를

† Corresponding Author : Department of Microbial Engineering, KonKuk University, Kwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel : +82-2-450-3523, Fax : +82-3436-5594
E-mail : tchoe@konkuk.ac.kr

차단하여 세포막 탈분극을 일으키고 탈분극에 따른 막전압 변화는 전위차에 민감한 voltage-gated calcium channel (VDCC)을 열어 칼슘 이온의 세포내 유입이 촉진된다. 세포내 칼슘 이온 농도의 증가는 triggering 신호를 자극하여 1차 인슐린 분비를 촉진하는 K_{ATP} -channel dependent 경로를 활성화시키며, 지속적인 칼슘 이온의 증가는 PKA (cAMP-dependent protein kinase), PKC (protein kinase C) 등의 인산화 효소를 활성화시키고, amplifying 신호를 자극하여 2차 인슐린 분비를 촉진하는 K_{ATP} -channel independent 경로가 인슐린 분비 촉진 주요 경로로 알려져 있다 (4-6).

베타세포의 인슐린 분비 기능이 저하된 제 2형 당뇨병을 치료하는데 임상에서 주로 사용되는 인슐린 분비 촉진 약물은 sulfonylurea 계열 약물이다. 이 약물들은 베타세포의 세포막에 있는 ATP-sensitive K^+ channel를 구성하고 있는 sulfonylurea receptor subunit에 직접 결합하여 ATP-sensitive K^+ channel를 차단함으로써 세포내로 칼슘 이온을 유입시켜 인슐린 분비를 촉진하여 혈당을 낮추는 약리 작용을 나타낸다. 이러한 sulfonylurea 계열 약물의 부작용으로는 체내 혈당 농도와는 무관하게 인슐린 분비를 촉진시켜 저혈당의 위험이 있으며, 지속적인 자극에 의해서 베타세포의 인슐린 분비가 저하되고 탈감작 현상이 나타나는 현상들이 보고되고 있다. 따라서 glucose 농도에 의존적으로 베타세포에 작용하여 인슐린 분비를 제어하고 베타세포를 보호할 수 있는 새로운 당뇨병 치료 약물 개발이 임상적으로 요구되고 있다(7-10).

본 연구에서는 미생물 대사산물 및 천연물로부터 새로운 기전의 당뇨병 치료제를 개발하고자 베타세포에서 glucose 의존적인 인슐린 분비 촉진 활성을 보이는 물질을 방선균 배양액 library로부터 검색하여 YHB-2017를 선별하였으며, YHB-2017에 대해 구조분석을 실시한 결과 genistein과 동일한 물질임이 확인되었다.

Genistein은 콩에서 발견되는 soy isoflavone의 일종으로, 콩에서는 주로 당이 결합된 glycosidic conjugate 형태인 genistin으로 발견되며, 발효과정에서 β -glucosidase에 의해 특이적으로 당이 끊어져 생리활성을 갖는 genistein으로 전환된다. Genistein은 protein tyrosine kinase inhibitor 활성이 있어 암세포의 성장을 억제하는 항암 특성이 보고되고 있으며(11), 여성호르몬인 에스트로젠과 유사한 특성을 갖고 있어 여성의 폐경기 증상과 골다공증에도 효과가 있고(12, 13), 항산화 활성을 갖고 있어 노화, 염증, 동맥경화와 같은 질병에도 유용한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 (14, 15). 또한 최근 연구에서는 genistein이 AMPK (AMP-activated protein kinase)를 활성화하여 지방 세포의 분화를 저해하고, PPAR α 를 활성화시켜 지방산 대사에 관여하는 유전자 발현을 유도하여 비만 조절에도 유용하게 이용될 수 있음을 제시하고 있다(16, 17). 한편 당뇨병과 관련된 연구에서 genistein은 췌장베타세포에서의 인슐린 분비 촉진에 영향을 주는 것으로 1993년 Ohno 등이 보고한(18-20) 이후 Persaud 등은 오히려 베타세포에서 인슐린 분비를 억제시킨다는 결과를 보고 하였으며(21, 22), 최근에는 Liu 등이 cAMP/PKA 경로를 통해 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 촉진시킨다는 연구결과를 발표하였다(23). 이와 같

이 연구 그룹에 따라서 상이한 인슐린 분비 촉진 활성을 보고하는 것은 실험에 사용된 세포의 종류, 베타세포의 분화 정도, genistein 처리 농도와 시간에 차이가 있어 나타난 현상인 것으로 추정되지만, 근본적인 이유는 genistein의 인슐린 분비 촉진 작용 기전이 명확하게 밝혀지지 않았기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 방선균 배양액으로부터 고 순도로 정제한 YHB-2017 (genistein)의 인슐린 분비 촉진 활성 특성을 조사하고 베타세포에서 인슐린 분비 촉진 작용 기전을 조사하여 당뇨병 치료제의 새로운 소재로 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 YHB-2017는 신규한 인슐린 분비 촉진 작용 기전을 갖는 활성물질 검색을 통해 600여 종의 토양에서 분리된 방선균으로부터 선별하였다. *Streptomyces sp.* YHB-2017 균주 배양액으로부터 인슐린 분비 촉진 활성을 보이는 물질을 유기용매 추출법, silica gel 크로마토그래피를 수행한 후 동결 건조하여 순도 98% 이상의 물질로 정제하였다. 정제한 물질을 LC/MS, IR, UV, HNMR 등 다양한 방법으로 구조분석을 실시하였으며, 그 결과 genistein과 동일한 것으로 확인되었다. 본 실험에서는 정제한 YHB-2017 (genistein)을 DMSO에 녹여 사용하였다.

Diazoxide, H89, IBMX, Collagenase (type IV), KN93, GF109203X, DMSO, Bovine serum albumin (BSA), Ficoll, Foskolin, GLP-1, Glucose 등은 Sigma (USA)사로부터 구입하여 사용하였으며, [3 H]Gliabenclamide은 Perkin Elmer (USA) 제품을 구입하여 사용하였고, western immunoblot 실험에 사용한 antibody는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하였다.

세포 배양

Mouse insulinoma 세포주인 MIN6 (insulin-producing beta cell)은 15% fetal bovine serum (JRH, USA), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM (Gibco BRL, USA) 배지를 사용하여 2×10^5 cells/ml 농도로 현탁한 후 75cm² T-flask에 20 ml를 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하면서 5~6일마다 trypsinization 방법으로 계대 배양을 실시하였다.

췌장소도 분리

췌장소도는 총담관 내 collagenase 주입법과 Ficoll density gradient centrifugation 방법으로 분리하였다. 7주령의 Sprague-Dawley 수컷 백서 (체중 200~300 g)를 경추 탈구법으로 희생시켜 개복한 후 총담관을 통하여 collagenase 용액 (0.75 mg/ml) 10 ml을 천천히 주입해 췌장을 팽창시켜 장기에서 분리하였다(24). 분리한 췌장을 50 ml centrifuge tube로 옮겨 37°C 항온조에서 8~9분간 배양시킨 후 냉각된 HBSS 용액을 첨가해 반응을 종료시키고 pipette를 사용하여 조직을 잘게 부숴다. 혼탁액을 4°C에서 1,000 rpm으

로 3분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 침전된 췌장 조직에 25% Ficoll 용액 4 ml를 첨가하여 vortex로 잘 섞은 다음 그 위에 23%, 21.5%, 20.5%, 11% Ficoll 용액을 순서대로 각각 2 ml씩 첨가하여 Ficoll density gradient를 제조하고, 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 11~20.5% 사이의 경계 면에 존재하는 췌장소도를 회수하였다. 회수한 췌장소도는 RPMI 1640 (Gibco BRL, USA) 배지가 담겨 있는 배양 용기로 옮기고, 입체 현미경하에서 micropipette을 이용하여 순수한 췌장소도만을 분리하였다. 분리한 췌장소도는 10% fetal bovine serum (JRH, USA), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지에 현탁시켜 37°C, 5% CO₂ incubator에서 16시간 동안 배양한 후 인슐린 분비 실험에 사용하였다.

인슐린 분비 측정

계대 배양 중인 MIN6 세포를 회수하여 48-well culture plate에 1×10^5 cells/well이 되게 세포를 plating하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2일간 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배양이 끝난 후 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 2회 세척하고, 0.5 g/L glucose가 포함된 Krebs-Ringer bicarbonate (KRB, 115 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4) buffer를 0.5 ml/well로 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간씩 2회 전배양하였다. DMSO에 용해되어 있는 시험물질이 0.5% 첨가된 KRB buffer를 0.5 ml/well로 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간동안 배양한 후 buffer를 회수하여 원심 분리한 다음 상층액을 인슐린 함량 측정 때까지 냉동 보관하였다. 췌장 베타세포에서 인슐린 분비가 K_{ATP}-channel에 비의존적인지 여부를 확인하기 위해 베타 세포에 35 mM KCl과 200 μM Diazoxide를 동시에 처리하여 베타 세포막의 탈분극화를 배제시킨 상태에서 세포내로의 Ca²⁺ 유입을 최대한 유도한 후 시험물질에 의해서 인슐린 분비가 촉진되는지를 측정하였다.

분리한 췌장 소도에서의 인슐린 분비 측정을 위하여 입체 현미경하에서 췌장소도를 hand picking 방법으로 크기별로 분류하여 48-well plate에 15-20개씩 분주한 후 0.5 g/L glucose가 포함된 KRB buffer를 0.5 ml/well로 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간동안 전배양 하였다. 원심 분리로 췌장소도를 침전시키고 상층액을 제거한 후 DMSO에 용해되어 있는 시험물질이 0.5% 첨가된 KRB buffer를 0.5 ml/well로 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1시간동안 배양하여 인슐린 분비를 유도하고 원심 분리하여 상층액은 인슐린 함량을 측정할 때까지 냉동 보관하였다. 인슐린 분비를 실시간으로 측정하기 위해 perfusion 실험을 실시하였다. 분리한 췌장 소도 100개를 perfusion chamber에 넣고 37°C 항온조 내에서 KRB buffer를 1 ml/min 속도로 연속으로 흘러주면서 chamber를 통과하는 buffer를 2분마다 수집하여 인슐린 함량을 측정하였다.

인슐린 함량은 insulin ELISA kit (Merckodia, Sweden)를 사용하여 메뉴얼 방법에 따라 측정하였다.

Sulphonyl urea receptor (SUR) binding 분석

MIN6 세포를 6-well culture plate에 2×10^6 cells/well로 plating하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2일간 배양하여 세포를 안정화시켰다.

배양이 끝난 세포는 반응완충액 (10 mM HEPES, 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.4 mM MgSO₄, 2.5 mM NaH₂PO₄, 3 mM Glucose, 1 mM EGTA, pH 7.4) 2 ml로 2회 세척한 후 1 nM [³H]Glibenclamide가 포함된 반응완충액 2 ml에 YHB-2017를 농도별로 첨가하고 4°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 후 세포를 반응완충액 2 ml로 3회 세척하여 결합하지 않은 [³H]Glibenclamide를 제거하고, 0.1 N NaOH 용액 2 ml을 첨가하여 세포를 lysis시켰다. Cell lysate에 9배 용량의 ultima gold LSC cocktail (Packard, USA)를 첨가하여 혼합한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 MIN6 세포 SUR에 결합한 [³H]Glibenclamide의 방사능을 측정하였다. YHB-2017의 SUR 결합 능력은 [³H]Glibenclamide의 결합을 저해하는 비율로 산출하였다 (25).

Western immunoblot 분석

MIN6 세포를 2×10^5 cells/ml 정도로 현탁한 후 25 cm² T-flask에 4 ml씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 3일간 배양하였다. 배양한 세포는 냉각한 PBS 용액으로 2회 세척한 후 0.5 g/L glucose 포함된 KRB 용액 3 ml를 넣고 1시간동안 37°C에서 전배양하였다. YHB-2017을 비롯한 시험 물질이 첨가된 KRB 용액을 2 ml씩 넣어 37°C에서 40분간 반응시켰다. 시험 물질 처리가 완료된 세포는 냉각한 PBS 용액으로 2회 세척한 후 1x SDS-PAGE sample buffer를 300 μl 첨가해 세포를 빠르게 lysis시켜 회수한 후 -20°C에 보관하였다. SDS-PAGE는 cell lysate를 95°C에서 5분간 끓인 후 10% acrylamide-bis gel에 20 μl씩 로딩하여 120 voltage 조건으로 전기영동을 실시해 세포 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 단백질을 semi-dry transfer cell (Bio-Rad) 시스템을 사용하여 20 V로 40분간 nitrocellulose membrane (0.45 μm, Bio-Rad)으로 electrotransfer하였다. Nitrocellulose membrane을 blocking 용액 (TBS-T with 5% skim milk)으로 실온에서 1시간 반응하여 block시켰다. Primary antibody는 rabbit phospho-(Ser/Thr) PKA substrate antibody, rabbit phospho-(Ser) PKC substrate antibody, rabbit phospho-CREB (Ser133) antibody, rabbit CREB antibody를 각각 5% BSA가 포함된 TBS-T 용액에 1 : 1000이 되게 희석한 후 4°C에서 15시간 반응시켰다. TBS-T 용액으로 3회 세척한 후 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugated antibody (Bio-Rad)를 blocking 용액에 1 : 2000으로 희석하여 실온에서 1시간 반응을 실시하였다. 반응이 끝난 후 TBS-T 용액으로 5분씩 5회 세척하고, 단백질 band를 ECL western blotting detection system (Amersham Biosciences, UK)과 photographic film (Kodak, UK)을 이용하여 검출하였다.

RNA 분리 및 RT-PCR

MIN6 세포를 6-well cluster plate에 5×10^5 cells가 되게 plating하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 2일간 배양하였다. 시험물질이 첨가되지 않은 것을 control로 하고 YHB-2017이 10, 25, 50, 100 μM 농도로 포함된 배지를 각각 첨가하

고 2시간동안 추가 배양하였다. Total RNA 추출은 TRIzol-Qiagen combination 방법을 이용하였다. 처리가 완료된 세포를 냉각한 PBS 용액으로 세척한 후 TRIzol 용액 (Invitrogen, USA) 1 ml를 첨가하고 15분간 실온에 정치하여 세포를 용해시킨 후 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 chloroform 용액 200 μ l를 첨가한 후 가볍게 혼합해주고 10분간 정치한 후 4 $^{\circ}$ C, 14,000 rpm에서 30분간 원심분리를 실시하여 최상층을 500 μ l 회수하였다. 70% ethanol 용액을 동량 첨가하여 혼합한 다음 Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen; Germany)에서 제공된 column에 통과시켜 RNA를 결합시킨 후 RNase free water 30 μ l로 회수하였다. cDNA 합성은 2 μ g의 total RNA를 사용하여 cDNA cycling kit (Invitrogen, USA) 방법에 따라서 합성하였다. PCR (Polymerase Chain Reaction)은 cDNA로부터 insulin, GAPDH을 증폭하기 위하여 합성한 cDNA 1 μ l, forward Primer 및 reverse primer 각각 1 μ l, 10x PCR buffer 5 μ l, 100 μ M dNTP, 2.5 unit Tag polymerase (Qiagen, Germany)를 섞고 distilled water로 전체 부피를 50 μ l로 맞추는 다음 PCR 반응을 실시하였다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C 1.5분, 53 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1.5분, 30 cycles로 반응하였으며, PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 유전자 발현을 확인하였다. Insulin 유전자의 oligonucleotide 서열은 forward 5'-TTTGTCAAGCAGCACCTTTG, reverse 5'-GCTGGTAGAGGGAGCAGATG이며, GAPDH 유전자의 oligonucleotide 서열은 forward 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC, reverse 5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTT이다.

자료분석 및 통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였고 통계처리는 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

Glucose 의존적 인슐린 분비 촉진 활성

SD 수컷 백서에서 분리한 췌장 소도가 glucose 농도에 의존적으로 인슐린을 분비하는지 여부를 확인하기 위해 3 mM glucose 조건과 16 mM glucose 조건을 비교한 결과 16 mM glucose 조건에서 인슐린 분비를 5배 이상 증가시켜 분리한 췌장 소도는 정상적인 glucose 의존적인 인슐린 분비 촉진 기능을 나타내었다. YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성을 조사하기 위해 16 mM glucose가 포함된 조건에서 YHB-2017를 2.5 μ M부터 100 μ M까지 농도별로 처리하였다. Fig. 1의 A에서와 같이 YHB-2017 5 μ M 농도부터 인슐린 분비 촉진 효과가 나타나 100 μ M 농도까지 지속적으로 인슐린 분비를 증가시켰으며, 100 μ M에서는 control에 비해 최고 2.5배까지 인슐린 분비를 증가시키는 효과를 나타내었다 (EC₅₀; 25 μ M). 이러한 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성이 glucose 농도 의존적으로 일어나는지를 확인하기 위해 3 mM부터 16 mM glucose 농도까지 KRB buffer에 포함시킨 후 25 μ M YHB-2017를 처리하였다. YHB- 2017는 5.5 mM

glucose 이하 조건에서는 거의 인슐린 분비 촉진 활성이 없으며, glucose 농도가 8.3 mM 이상부터 인슐린 분비 촉진 활성을 나타내 glucose 농도 의존적인 인슐린 분비 촉진 활성임을 확인할 수 있었다(Fig. 1의 B). YHB-2017의 처리 시간에 따른 인슐린 분비 촉진 활성을 측정하기 위해 실시한 perfusion 실험 결과 YHB-2017를 처리한 후 10분부터 인슐린 분비가 촉진되어 30여분간 지속되었다(Fig 1. 의 C). 이러한 결과들로부터 YHB-2017의 활성은 glucose 농도에 의존하며, 베타세포의 amplifying pathway 인슐린 분비 경로를 활성화하는 것으로 사료된다.

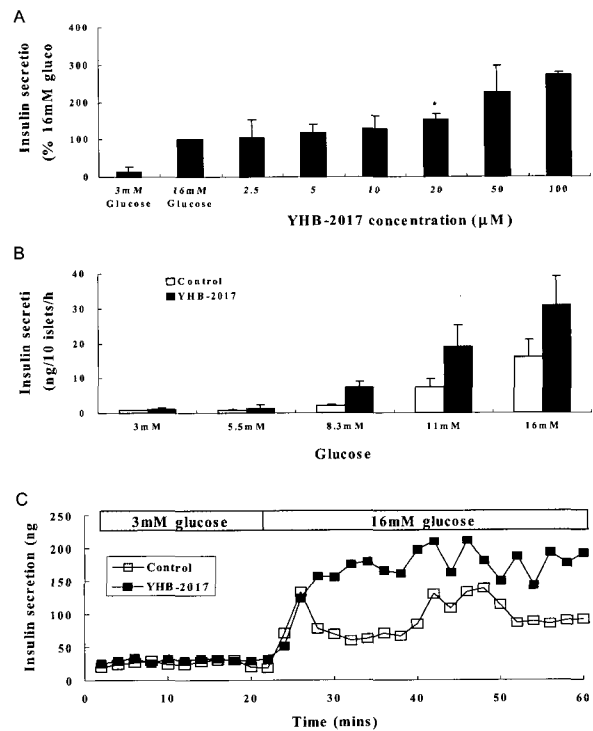


Figure 1. Effect of YHB-2017 on glucose stimulated insulin secretion in isolated rat islets. Isolated islets were preincubated with KRB buffer containing 3 mM glucose for 60 min and then were incubated with KRB buffer containing 16 mM glucose and various concentrations of YHB-2017 for 60 min (A), or were incubated with KRB buffer containing various concentrations of glucose with 25 μ M YHB-2017 (B). Isolated islets were perfused with KRB buffer containing 3 mM glucose for 20 min and then were stimulated with KRB buffer containing 16 mM glucose in the presence or absence of 50 μ M YHB-2017 (C). *, $p < 0.05$ vs. 16 mM glucose.

칼슘이온의 영향

YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성이 세포외부의 칼슘이온에 대해서 영향을 받는지 여부를 조사하기 위해 MIN6 세포를 48-well에 2일간 전배양한 후 KRB buffer에 EGTA를 처리하여 세포외부 칼슘 이온을 완전히 제거한 조건 및 sulfonylurea 수용체와 결합하여 KATP-channel을 열어 세포내로 칼슘 이온이 유입되는 것을 차단하는 diazoxide 약물을 처리한 조건에서 YHB-2017의 활성을 각각 측정하였다. YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성은 EGTA 처리 및 100 μ M diazoxide 처리 조건에서 모두 저해되는 결과를 보였다(Fig 2). 이러한 결과는 YHB-2017이 베타세포에서

인슐린 분비 촉진 활성을 유지하기 위해서는 베타세포 내부로 칼슘 이온 유입이 절대적으로 필요하다는 것을 알 수 있었다.

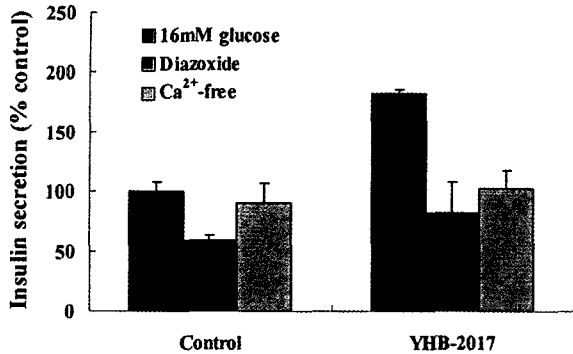


Figure 2. Effect of 100 μM diazoxide and extracellular Ca²⁺-free on 25 μM YHB-2017-induced insulin secretion in MIN6 cells.

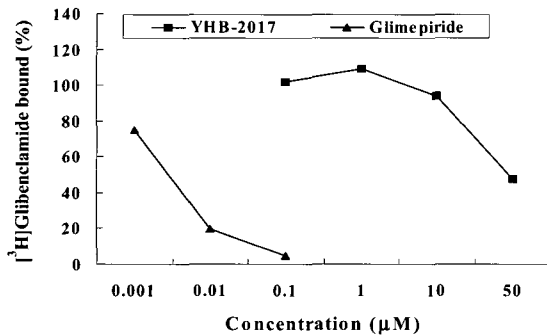


Figure 3. Inhibition of [3H]glibenclamide binding to MIN6 cell membrane by YHB-2017 and glimepiride.

Sulfonylurea receptor (SUR) 결합

인슐린 분비 촉진 활성에 칼슘 이온의 세포내 유입이 필요한 것으로 나타났으므로 YHB-2017이 SUR에 직접 결합하여 potassium channel를 차단함으로써 칼슘 이온이 유입되는지 여부를 확인하기 위해 SUR에 결합 특이도가 높은 약물인 [3H]glibenclamide를 사용하여 competition binding assay를 실시하였다. YHB-2017는 50 μM 농도에서 glibenclamide의 세포막 SUR 결합을 약 50% 정도 저해하였다. 대조물질로 사용한 인슐린 분비 촉진 기전의 대표적 당뇨병 치료 약물인 glimepiride는 10 nM 농도에서도 glibenclamide의 SUR 결합을 80% 정도 저해하여 YHB-2017보다 5000배 이상 강한 결합력을 나타내었다(Fig. 3). YHB-2017이 SUR에 약한 결합을 하는 것으로 나타났으나 potassium channel를 차단하여 세포막 탈분극을 유도해 칼슘 이온을 유입시킬 만큼의 결합 강도에는 미치지 못하는 것으로 사료되어 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성은 베타세포의 SUR 결합 후 potassium channel를 차단하는 기전과는 무관한 것으로 볼 수 있다.

K_{ATP}-channel 비의존 인슐린 분비

YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성이 기존의 당뇨병 치

료 약물인 sulfonylurea 계열과는 달리 potassium channel를 차단하지 않으면서 칼슘 이온 유입을 요구하는 것으로 나타났으므로 K_{ATP}-channel 비의존 인슐린 분비 촉진 활성을 확인하였다. 200 μM diazoxide와 35 mM KCl를 동시에 처리하여 세포막의 K_{ATP}-channel을 열고 단순히 칼슘 이온의 유입을 최대로 촉진시킨 상태에서 인슐린 분비 촉진 활성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. YHB-2017 이외에 강력한 SUR 결합 약물인 glimepiride와 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포내 cAMP 농도를 증가시켜 인슐린 분비를 촉진시키는 약물인 forskolin를 대조 약물로 비교하였다(26). 시험물질을 첨가하지 않고 diazoxide와 KCl를 처리하여 단순히 칼슘이온을 유입시켰을 때 처리하지 않은 control에 비해 인슐린 분비가 약 5배 정도 증가되었으며 glucose 농도가 높으면 인슐린 분비량이 더욱 늘어났다. Diazoxide와 KCl이 포함된 조건에 시험물질을 첨가한 경우는 YHB-2017 및 Forskolin에 의해서 인슐린 분비가 증가되었으나 glimepiride는 매우 미약하였다. 이러한 인슐린 분비 증가 양상은 glucose 가 높은 농도에서 보다 더 촉진되어 16 mM glucose 조건에서 control에 비해 YHB-2017는 약 40%, forskolin는 약 30% 정도까지 인슐린 분비를 증가시키는 활성을 보였다. 외부에서 유입된 과량의 칼슘이온이 1차적인 인슐린 분비를 촉진시키는 중요한 요인이지만 YHB-2017는 ATP를 생성하는 glucose 농도가 높을 경우 K_{ATP}-channel 비의존적인 경로를 활성화시켜 인슐린 분비를 보다 촉진시키는 것이라 사료된다.

Table 1. Effects of YHB-2017, Glimepiride, and Forskolin on insulin secretion in the presence of low and high glucose with both 200 μM diazoxide and 35 mM KCl.

Condition			Insulin secretion (ng/ml)			
Diazoxide (mM)	KCl (mM)	Glucose (mM)	Control	YHB-2017 (25 μM)	Glimepiride (3 μM)	Forskolin (10 μM)
0	4.7	3	10 ± 2 ^a	11 ± 4	19 ± 3	14 ± 6
200	35	3	45 ± 2 ^b	53 ± 5 ^c	44 ± 1	57 ± 10 ^c
0	4.7	16	24 ± 3 ^c	46 ± 8	33 ± 10	60 ± 13
200	35	16	124 ± 31 ^d	172 ± 22 ^{**}	137 ± 13	164 ± 24 ^{**}

Values are means of triplicate determinations ± standard deviation

a, 3 mM glucose

c, 16 mM glucose

*, p<0.05 vs. b

** , p<0.05 vs. d

Kinase 저해제의 영향

베타 세포의 amplifying pathway (K_{ATP}-channel 비의존 경로)에 의한 인슐린 분비에 관여하는 인산화 효소는 PKA (cAMP-dependent protein kinase), PKC (protein kinase C), CaMKII (Ca²⁺/calmodulin kinase II) 등이 밝혀졌으나 작용 경로에 대해서는 아직까지 명확하지가 않다(27, 28). YHB-2017이 어떤 인산화 효소의 활성화에 관여하는지를 조사하기 위해 각 인산화 효소에 대해 특이적으로 저해 작용을 하는 저해제를 처리한 후 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성을 측정하였다(Fig. 4). PKA 저해제인 H89를 처리한 경우 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성은 완전히 저해되는 결과를 나타냈으며, PKC 저해제 (GF109203X)에 의

해서는 40% 정도 저해되었고, CaMKII 저해제 (KN93)는 YHB-2017의 활성에 별다른 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성이 PKA 경로와 관련되어 있음을 나타내 주는 것으로 추정된다.

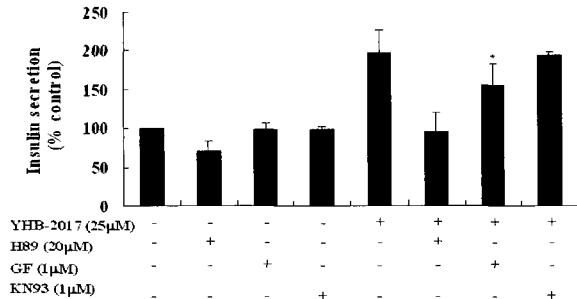


Figure 4. Effect of the PKA inhibitor, H89, the PKC inhibitor, GF, and the CaMK II inhibitor, KN93, on YHB-2017-induced insulin secretion in MIN6 cell. The results were expressed as the average of triple determination with S.D. *, $p < 0.05$ vs. control (16 mM glucose).

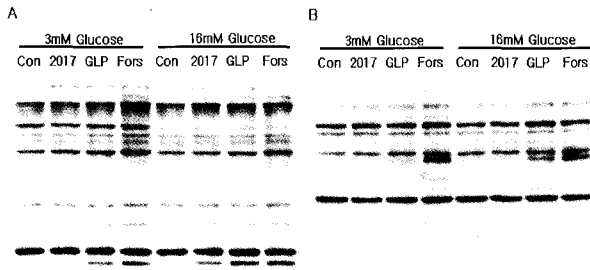


Figure 5. Effect of YHB-2017, GLP-1, and Forskolin on the phosphorylation of PKA substrate (A) and PKC substrate (B) in the presence of low (3 mM) or high (16 mM) glucose. MIN6 cells were treated without (control) or 25 µM YHB-2017, 100 nM GLP-1, 10 µM forskolin for 40 min.

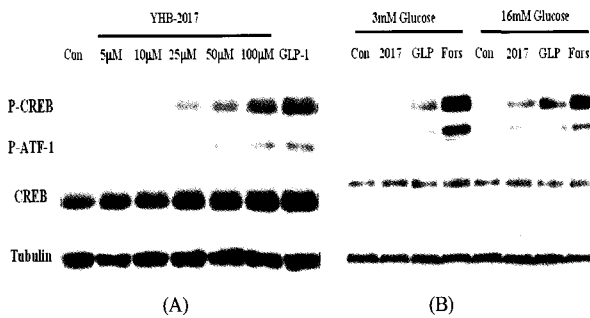


Figure 6. Effect of YHB-2017, GLP-1, and Forskolin on the phosphorylation of CREB in MIN6. (A) MIN6 cells were incubated with KRB buffer containing 16 mM glucose and various concentrations of YHB-2017 for 40 min. (B) MIN6 cells were treated with KRB buffer containing 3 mM glucose or 16 mM glucose with 25 µM YHB-2017 100 nM GPL-1, and 10 µM Forskolin for 40 min.

단백질 인산화 영향

위에서 설명한 대로 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성이 K_{ATP} -channel 비의존 경로를 통하여 PKA 경로와 관련되어 있는 것으로 추정되어 실제 YHB-2017에 의해 PKA 및 PKC 인산화 효소가 활성화되어 기질의 인산화가 증가되었

는지를 확인하기 위해 western-immunoblot를 실시해 단백질 인산화를 조사하였다. Glucose 농도 3 mM과 16 mM를 control로 하고 YHB-2017 이외에 PKA 경로를 활성화 시키는 대조약물로 GLP-1과 forskolin를 대조 물질로 비교하였다. 항-phospho PKA substrate 항체를 이용한 인산화 검출 결과(Fig. 5의 A), YHB-2017는 3 mM glucose 조건에서는 PKA 기질 인산화에 전혀 영향이 없었으나 16 mM glucose 조건에서는 PKA 기질 인산화를 증가시켰다. 항-phospho PKC substrate 항체를 이용한 인산화 검출 결과(Fig. 5의 B)에서는 YHB-2017에 의한 PKC 기질 인산화가 전혀 관찰되지 않았다. 대조 물질로 처리한 GLP-1과 forskolin는 glucose 농도에 무관하게 PKA 및 PKC 기질 인산화를 증가시켰다. 이와 같은 결과는 YHB-2017의 glucose 농도의 의존적인 인슐린 분비 촉진 활성 및 PKA 저해제인 H89 처리시 활성이 저해되는 현상과 일치하는 것이다. PKA 기질에 대한 인산화 증가를 보다 더 증명해 보이기 위해 cAMP에 의해서 활성화된 PKA 경로의 최종 단계인 전사인자 CREB (cAMP response element-binding protein)의 인산화 영향을 조사하였다. Fig. 6에서와 같이 YHB-2017는 농도 의존적으로 CREB 인산화를 증가시켰으며 (A), glucose가 고농도인 경우에만 CREB 인산화가 증가되는 결과를 나타내었다(B). GLP-1과 forskolin는 PKA 기질 인산화와 동일하게 glucose 농도와는 관계없이 CREB 인산화를 증가시켰다. 이와 같은 YHB-2017, GLP-1, Forskolin에 의한 PKA 기질 인산화 및 CREB 인산화는 PKA 저해제 H89를 처리하면 크게 감소되는 것으로 나타났(Fig. 7). 이상과 같이 YHB-2017는 glucose 농도 의존적으로 PKA를 활성화 시켜 PKA 기질 인산화를 증가시키며, 전사인자인 CREB 인산화에 영향을 주는 것으로 나타났으므로 베타세포에서 단순히 인슐린 분비 촉진 활성 뿐만 아니라 PKA 경로를 통한 다양한 세포내 신호 전달에도 영향을 줄 수 있을 것으로 추정된다.

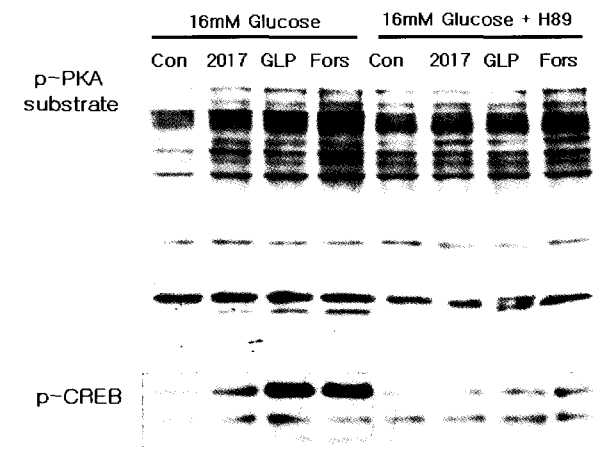


Figure 7. Effect of H89 (20 µM) on the phosphorylation of PKA substrate and CREB in MIN6 cells treated with 25 µM YHB-2017, 100 nM GPL-1, and 10 µM Forskolin for 40 min.

인슐린 유전자 발현 영향

YHB-2017이 베타 세포에서 인슐린 유전자 발현에 영향

을 주는지를 조사하기 위해 YHB-2017를 농도별로 첨가하고 2시간동안 배양하여 RT-PCR로 유전자 발현을 확인한 결과 인슐린 유전자 발현에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Fig. 8). 또한 YHB-2017를 25 μ M 첨가하고 18시간동안 추가 배양한 경우에도 인슐린 유전자의 발현에는 차이가 없었다. 따라서 YHB-2017는 베타세포에서 인슐린 분비를 촉진시키는 기전에만 영향을 주며 인슐린 합성에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

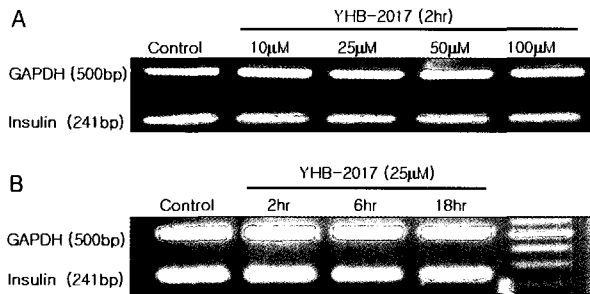


Figure 8. Effect of YHB-2017 on the insulin gene expression in MIN6 cells treated with YHB-2017 (10 - 100 μ M) for 2 hrs (A) and for increasing periods of time (2, 6, 18 hrs) at 25 μ M YHB-2017 (B).

요약

본 연구에서는 췌장 베타세포의 인슐린 분비 촉진 물질로 선별된 방선균 배양액에서 유래한 YHB-2017 (genistein)의 인슐린 분비 촉진 활성의 특성을 조사하고 그 작용 기전을 밝히고자 하였다. YHB-2017는 췌장소도에서 glucose 농도가 16 mM일 때 농도 의존적으로 인슐린 분비를 대조군에 비해 2배 이상 촉진시켰으며, 5.5 mM 이하의 glucose 농도에서는 인슐린 분비 촉진 활성이 거의 없는 것으로 나타났다. MIN6 세포를 이용한 YHB-2017의 인슐린 분비 촉진 활성 특성을 분석한 결과, PKA inhibitor (H89)에 의해서 활성이 저해되었으며, 세포막의 K_{ATP} channel를 배제하고 단순히 칼슘이온을 최대로 세포내로 유입시킨 조건인 diazoxide (200 μ M)와 KCl (35 mM)를 첨가한 경우에 YHB-2017는 인슐린 분비 촉진 활성을 나타내 K_{ATP} channel-independent pathway를 통한 인슐린 분비 촉진 기전을 추정할 수 있었다. 베타세포의 단백질 인산화에 대한 영향을 조사한 결과 YHB-2017는 고농도 glucose 조건에서만 PKA 기질과 cAMP response element-binding protein (CREB)의 인산화를 증가시키는 것으로 나타났고, PKC 기질의 인산화에는 영향을 없었다. 또한, YHB-2017를 18시간동안 베타세포에 처리하였으나 인슐린 유전자 발현에는 영향을 주지 않았다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 YHB-2017는 기존의 sulphonylurea 계열 약물과는 다른 작용 기전에 의해 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 촉진시키며, 그 기전은 PKA 경로를 통해 amplify 신호를 활성화시키는데 관여하는 것으로 추정된다.

감사

본 연구는 보건복지부 신약개발연구지원 당뇨병 치료제 신약특성화센터 (02-PJ2-PG6-DC03-001)의 지원에 의한 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Porte, D. Jr. and S. E. Khan (2001), β -cell dysfunction and failure in type 2 diabetes, *Diabetes* **50**(Suppl 1), S160-S163.
- Chatterjee, M. and I. Scobie (2002), The pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, *Pract. Diab. Int.* **19**, 255-257.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001), Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature* **414**, 799-806.
- Henquin, J. C. (2000), Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose, *Diabetes* **49**, 1751-1760.
- Bratanova-Tochkova, T. K., H. Cheng, S. Daniel, S. Gunawardana, Y. J. Liu, J. M. Musa, T. Schermerhorn, S. G. Straub, H. Yajima, and G. W. G. Sharp (2002), Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion, *Diabetes* **51**(Suppl 1), S83-S90.
- Thams, P., M. R. Anwar, and K. Capito (2005), Glucose triggers protein kinase A-dependent insulin secretion in mouse pancreatic islets through activation of the K_{ATP} channel-dependent pathway, *Eur. J. Endocrinology* **152**, 671-677.
- Morral, N. (2003), Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes, *Trends Endoc. Metab.* **14**, 169-175
- Henquin, J. C. (2004), Pathways in β -cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues, *Diabetes* **53**(Suppl 3), S48-S58.
- Rustenbeck, I., A. Wienbergen, C. Bleck, and A. Jörms (2004), Desensitization of insulin secretion by depolarizing insulin secretagogues, *Diabetes* **53**(Suppl 3), S140-S150.
- Nagashima, K., A. Takahashi, H. Ikeda, A. Hamasaki, N. Kuwamura, Y. Yamada, and Y. Seino (2004), Sulphonylurea and non-sulphonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity, *Diab. Res. Clin. Prac.* **66**(Suppl 1), S75-S78.
- Kim, E. J., H. K. Shin, and J. H. Park (2005), Genistein inhibits insulin-like growth factor-1 receptor signaling in HT-20 human colon cancer cells: A possible mechanism of the growth inhibitory effect of genistein, *J. Med. Food* **8**, 431-438.
- Bhathena, S. J. and M. T. Velasquez (2002), Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 1191-1201.
- Wang, S. F., Q. Jiang, Y. H. Ye, Y. Li, and R. X. Tan (2005), Genistein derivatives as selective estrogen receptor modulators: Sonochemical synthesis and in vivo anti-osteoporotic action, *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 4880-4890.
- Vedavanam, K., S. Srijayanta, J. O'Reilly, A. Raman, and H. Wiseman (1999), Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE), *Phytother. Res.* **13**, 601-609.
- Ambra, R., G. Rimbach, D. Fuchs, U. Wenzel, H. Daniel, and F. Virgili (2006), Genistein affects the expression of genes involved in blood pressure regulation and angiogenesis in primary human endothelial cells, *Nut. Meta. Card. Diseases* **16**, 35-43.
- Kim, S., H. J. Shin, S. Y. Kim, J. H. Kim, Y. S. Lee, D. H. Kim, and M. O. Lee (2004), Genistein enhances expression of genes involved in fatty acid catabolism through activation of PPAR α , *Mol. Cell. Endocr.* **220**, 51-58.
- Hwang, J. T., I. J. Park, J. I. Shin, Y. K. Lee, S. K. Lee, H. W. Baik, J. Ha, and O. J. Park (2005), Genistein, EGCG, and

- capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 433-440.
18. Ohno, T., N. Kato, C. Ishii, M. Shimizu, Y. Ito, S. Tomono, and S. Kawazu (1993), Genistein augments cAMP accumulation and insulin release in MIN6 cells, *Endocrine Res.* **19**, 273-285.
 19. Jonas, J. C., T. D. Plant, P. Gilon, P. DeTimary, M. Nenquin, and J. C. Henquin (1995), Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets, *Br. J. Pharmacol.* **114**, 872-880.
 20. Sorenson, R. L., T. C. Brelje, and C. Roth (1994), Effect of tyrosine kinase inhibitors on islets of langerhans: Evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion, *Endo.* **134**, 1975- 1978.
 21. Persaud, S. J., T. E. Harris, C. J. Burns, and P. M. Jones (1999), Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult rat islets, *J. Mol. Endo.* **22**, 19-28.
 22. Zhao, Y. F., D. J. Keating, M. Hernandez, D. D. Feng, Y. Zhu, and C. Chen (2005), Long-term inhibition of protein tyrosine kinase impairs electrophysiologic activity and a rapid component of exocytosis in pancreatic β -cells, *J. Mol. Endo.* **35**, 49-59.
 23. Liu, D., W. Zhen, Z. Yang, J. D. Carter, H. Si, and K. A. Reynolds (2006), Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway, *Diabetes* **55**, 1043-1050.
 24. Lee, K. P., S. Ihm, M. K. Lee, B. D. Rhee, H. K. Lee, C. S. Koh, and H. K. Min (1988), A newer method for isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase, *Kor. Diabetes* **12**, 147-152.
 25. Furukawa, N., T. Ohta, T. Noguchi, F. Yonemori, and K. Wakitani (1999), Glucose-dependent insulinotropic effects of JTT-608, a novel antidiabetic compound, *Eur. J. Pharmacol.* **371**, 51-58.
 26. Misra, U. K. and S. V. Pizzo (2005), Coordinate regulation of forskolin-induced cellular proliferation in macrophages by protein kinase A/cAMP-response element-binding protein (CREB) and Epac1-Rap1 signaling, *J. Biol. Chem.* **280**, 38276-38289.
 27. Eason, R. A. (1999), CaM kinase II: A protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis, *Diabetes* **48**, 675-684.
 28. Neshler, R., E. Anteby, M. Yedovizky, N. Warwar, N. Kaiser, and E. Cerasi (2002), β -cell protein kinases and the dynamics of the insulin response to glucose, *Diabetes* **51**(Suppl 1), S68-S73.