

라이코펜이 사이토카인에 의해 유도된 베타세포 사멸에 미치는 효과 및 기전 연구*

김경^{1**} · 장세은^{1**} · 배공득² · 전희숙^{2,3,4} · 오윤신^{1†}

을지대학교 식품영양학과¹, 가천대학교 의과대학 분자의학 전공², 가천대학교 약학대학³, 가천대학교 김병원⁴

Protective effect of lycopene against cytokine-induced β -cell apoptosis in INS-1 cells*

Kim, Kyong^{1**} · Jang, Se-Eun^{1**} · Bae, Gong Deuk² · Jun, Hee-Sook^{2,3,4} · Oh, Yoon Sin^{1†}

¹Department of Food and Nutrition, Eulji University, Seongnam, Gyeonggi 13135, Korea

²Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Department of Molecular Medicine, Gachon University, Incheon 21999, Korea

³College of Pharmacy, Gachon University, Incheon 21936, Korea

⁴Gachon Gil Medical Center, Incheon 21565, Korea

ABSTRACT

Purpose: Lycopene, a carotenoid with anti-oxidant properties, occurs naturally in tomatoes and pink grapefruit. Although the beneficial effects of lycopene on various disorders have been established, little attention has been paid to the possible anti-diabetic effects of lycopene focusing on β -cells. Therefore, this study investigated the potential of lycopene to protect β -cells against apoptosis induced by a cytokine mixture. **Methods:** For toxicity experiments, the cells were treated with 0.1 ~ 10 nM of lycopene, and the cell viability in INS-1 cells (a rat β -cell line) was measured using a MTT assay. To induce cytokine toxicity, the cells were treated with a cytokine mixture (20 ng/mL of TNF α + 20 ng/mL of IL-1 β) for 24 h, and the effects of lycopene (0.1 nM) on the cytokine toxicity were measured using the MTT assay. The expression levels of the apoptotic proteins were analyzed by Western blotting, and the level of intracellular reactive oxidative stress (ROS) was monitored using a DCFDA fluorescent probe. The intracellular ATP levels were determined using a luminescence kit, and mRNA expression of the genes coding for anti-oxidative stress response and mitochondrial function were analyzed by quantitative reverse-transcriptase PCR. **Results:** Exposure of INS-1 cells to 0.1 nM of lycopene increased the cell viability significantly, and protected the cells from cytokine-induced death. Lycopene upregulated the mRNA and protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and reduced the expression of the Bcl-2 associated X (Bax) protein. Lycopene inhibited apoptotic signaling via a reduction of the ROS, and this effect correlated with the upregulation of anti-oxidative stress response genes, such as GCLC, NQO1, and HO-1. Lycopene increased the mRNA expression of mitochondrial function-related genes and increased the cellular ATP level. **Conclusion:** These results suggest that lycopene reduces the level of oxidative stress and improves the mitochondrial function, contributing to the prevention of cytokine-induced β -cell apoptosis. Therefore, lycopene could potentially serve as a preventive and therapeutic agent for the treatment of type 2 diabetes.

KEY WORDS: lycopene, β -cell, cytokine, apoptosis, type 2 diabetes

서 론

당뇨병은 대표적인 대사질환중의 하나로 전세계적으로 그 발병률이 점차 증가하고 있는 추세에 있다.¹ 당뇨병은 크게 1형과 2형으로 분류할 수 있는데 1형 당뇨병의 경우

자가면역 반응에 의해 췌장의 베타세포가 파괴되면서 충분한 양의 인슐린을 분비하지 못하여 혈당 조절이 이루어지지 못하게 된다. 반면 제 2형 당뇨병은 인슐린 저항성을 보상하기 위해 초기에는 췌장의 베타세포가 증가하지만 결국에는 베타세포가 감소하고 기능이 저하되면서 고혈당

Received: August 29, 2018 / Revised: November 6, 2018 / Accepted: November 20, 2018

* This study was supported by a grant (NRF-2015R1D1A1A01058888; NRF-2018R1C1B6000998) from the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning.

** These authors contributed equally to this article.

† To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-31-740-7287, e-mail: ysoh@eulji.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이 생기게 된다.² 특히 제 2형 당뇨병의 경우, 만성적인 고포도당, 고지방, 그리고 지방조직에서 분비하는 다양한 염증매개체들이 베타세포를 파괴하여 인슐린을 분비하지 못하게 한다.³ 따라서 제 1형과 2형 당뇨병에서 모두 베타세포가 손상되기 때문에 베타세포의 파괴를 막는 것이 당뇨병 치료의 중요한 치료 전략 중의 하나로 알려져 있다.

산화 스트레스의 증가는 당뇨와 당뇨합병증의 발병 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁴ 베타세포는 catalase나 glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소의 발현이 적어, 산화 스트레스에 매우 민감한 것으로 알려져 있으며,⁵ 실제로 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine와 4-hydroxy-2,3-nonenal 를 포함하는 산화 스트레스 표지자의 발현이 당뇨 상태에 있는 췌도에서 증가되어 있는 것이 보고되었다.⁶ 또한 베타세포주나 췌도에 산화스트레스를 유도하였을 경우, 인슐린 유전자의 활성화와 발현이 감소되는 것이 보고되었다.⁷ 따라서 당뇨상태에서 산화적 스트레스에 의한 베타세포의 기능부전이나 사멸을 억제하는 방법이나 물질을 찾는 연구가 필요하다.

라이코펜은 phytochemical의 하나로 베타카로틴, 루테인과 같은 카로티노이드계열의 대표적인 붉은색 지용성 색소 물질이며 토마토나 기타 빨간 식물에 함유되어 있다. 라이코펜은 강력한 항산화 물질로 전립선암, 유방암, 대장암, 췌장암등에서 항암효과를 나타내었고, 심혈관계 질환을 포함한 만성퇴행성 질환과 노화를 예방하는데 효과가 있음이 보고되었다.⁸

Ali 등의 연구결과에 의하면, 라이코펜을 90 mg/kg의 농도로 streptozotocin (STZ)로 유도된 고혈당 랫드에 주입하였을 경우, 인슐린 분비 양의 증가와 더불어 혈당 수준이 감소되는 것을 보고하였다.⁹ 그러나 Wang 등의 연구에서는 고농도의 라이코펜 섭취가 여성의 제2형 당뇨 발병율에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.¹⁰ 이처럼 라이코펜이 당뇨 발병률에 어떠한 역할을 하는지 정확하지 않고, 베타세포를 타겟으로 한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 가지는 라이코펜이 사이토카인에 의한 베타세포 사멸에 효과를 나타내는지 조사하고 그와 관련된 분자 기전에 대해서 조사하고자 하였다.

연구 방법

재료

라이코펜은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 제공하는 시약을 구입하여 tetrahydrofuran (THF, sigma)에 녹여 사용하였다. Fetal bovine serum과 RPMI-1640 배지는 Gibco

(Paisley, UK)에서 구입하였다. Penicillin/streptomycin과 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)는 WELGENE (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Duchefa (Haarlem, Netherlands)제품을 사용하였으며 사이토카인 혼합물로는 Tumor necrotic factor (TNF)- α 와 Interleukin (IL)-1 β (Pepro-Tech, Seoul, Korea)를 사용하였다. 1차 항체로 사용된 bcl-2, bax, β -actin은 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고 HO-1, NQO1, GCLC는 Abcam (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였으며 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit, anti-mouse)는 Santa Cruz Biotechnology (California, USA)에서 구입하였다.

세포 배양

Rat insulinoma 세포주인 INS-1 세포는 37°C, 95% 공기와 5% CO₂ 상태에서 11 mmol/L glucose, 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin 이 포함된 RPMI-1640 (Gibco BRL) 배지에서 배양하였으며, passage 20 ~ 30의 세포를 이용하였다.¹¹

세포 생존율 측정

INS-1 세포를 96-well plate에 5.0 \times 10⁴ cells/well로 분주하고, 24시간 후 시료 및 사이토카인혼합물을 처리 한 후 24시간 또는 48시간 반응시켰다. 배양액을 제거한 후, 0.5 mg/mL의 MTT 용액을 100 μ L/well씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 생성된 formazan crystals을 isopropanol에 녹여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 대조군에 대한 백분율 (% of control)로 나타내었다.

Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포 내 ROS 측정을 위해 fluorogenic dye 2, 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂-DCFDA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용한 염색 방법을 사용하였다. 96-well plates에 1 \times 10⁴ cells/well으로 분주하고 24시간 후 시료를 처리하여 반응시킨 후 DPBS로 씻어 내었다. 10 μ M H₂-DCFDA에 30분간 반응시켜 fluorescent compound (2', 7'-dichlorofluorescein, DCF)를 fluorescence microplate reader (excitation 485, emission 530 nm)로 측정하였다.

RNA추출 및 Real-time PCR의 분석

Total RNA는 RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Kyoto, Japan)로 추출 후 PrimeScript 1st strand cDNA synthesis

kit (Takara Bio Inc.)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응을 위한 primer는 GenBank의 염기서열을 기준으로 100 bp 내외로 합성하고 SYBR Premix Ex Taq II, ROX plus (Takara)를 반응 용액으로 Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 상대적인 mRNA 전사체 양은 $2^{-\Delta CT}$ 방법으로 계산하였고, ΔCT 값은 표적 mRNA와 cyclophilin 값의 차이로 계산하였다. Real-time PCR에 사용한 primer는 다음과 같다.

Bcl-2, (F)5'-GGGATGCCTTTGTGGAAGCTATATG-3', (R)5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'; Bax (F)5'-AGACACCTGAGCTGACCTTGGGA-3', (R)5'-CGGAGACACTCGCTCAGCTT-3'; GCLC (F)5'-ATG AAA GTG GCA CAG GAG CGA G-3', (R)5'-AAA CAG GCC TTC CTT CCC ATT-3'; NQO1 (F)5'-ACATCACAGGGGAGCCGA AGGACT-3', (R)5'-GGCACC CCAAACCAATACAATG-3'

HO-1 (F)5'-GTG AGA AGA GCC CTG ATT GT-3' (R)5'-CCT GTG ATG TCG TTT CTG GA-3'; TFAM(F)5'-A AGTCTTGGGAAGAGCAAATGG-3' (R)5'-TTCACACTG CGACGGATGA-3'; PGC-1 α (F)5'-TGAAGAGCGCCGTG TGATT-3, (R)5'-TTCTGTCCGCGTTGTGTCA-3'; Cyclophilin (F)5'-GGTCTTTGGGAAGGTGAAAGAA-3', (R)5'-GCCATTCCTGGACCCAAAA-3'

Western blot 분석

배양된 세포를 수거한 후 mammalian protein extraction solution (Sigma, USA)으로 용해 후 4°C, 12,000 rpm, 10분간 원심분리 후 상층액을 수거하였다. 추출한 단백질의 농도는 Bradford method로 측정한 후 동량의 단백질 (30 μ g)을 SDS-PAGE gel에서 전기영동하여 전개시킨 후 크기 별로 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 항체와 단백질 간의 비특이적인 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer (5% skim milk in TBST)에서 실온 1시간 동안 교반하였다. 1차 항체 반응은 4°C에서 18시간 반응시켰으며 HRP가 연결되어 있는 이차 항체를 실온에서 2시간 동안 반응하였다. 반응된 단백질은 HRP Chemiluminescent substrate reagent 키트 (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)를 이용하여 X-ray 필름에 감광시켜 특이적 band를 확인하였다. 각 band의 density는 Quantity one program (ver. 4.6, Bio-rad)으로 분석하였다.

세포 내 ATP 농도 측정

INS-1 세포를 24 well에 1×10^5 세포 수/well의 농도로 배양한 후, 라이코펜, 사이토카인 혼합물과 함께 24시간

배양하였다. 반응 후 상등액을 걷은 후 0.5% trichloroacetic acid를 처리하여 ATP 합성 관련 효소 활성을 억제하였다. 10분간 13,000 rpm으로 원심분리하고 상등액을 취한 후 Tris acetate (250 mM)를 혼합하였다. Enliten ATP assay system bioluminescence detection kit (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 세포 내 ATP량을 측정하였으며 단백질 정량을 통해 표준화하였다.

통계처리

상기의 모든 실험 결과는 3회 이상 반복 실험하였으며 모든 실험값은 mean \pm SEM로 나타내었다. 통계적 분석은 SigmaPlot 프로그램 (v10. 0, San Jose, CA, USA)를 이용하였고, 유의성 검정은 ANOVA (one-way analysis of variance) 및 Student's t-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결 과

라이코펜의 베타세포 독성

라이코펜이 베타세포주인 INS-1세포에 독성을 야기하는지 조사하기 위해 세포 배양액에 다양한 농도 (0.1, 1, 10 nM)의 라이코펜을 처리한 후 MTT assay¹²를 실시하여 살아있는 세포수를 측정하였다. 라이코펜을 24시간 처리하였을 때 대조군과 비교하여 0.1 nM 농도에서 세포증식이 유의하게 증가하였고 48시간까지 그 효과가 유지되는 것을 관찰하였다. 1 nM 농도로 24시간 처리하였을 경우에는 세포생존율에는 변화가 없었으나, 48시간 배양 시 대조군과 비교하여 75%의 생존율을 나타내었다. 10 nM 농도로 24시간 처리한 경우 대조군 대비 70% 정도의 생존율을 나타내었으며, 48시간 배양한 경우에는 50% 정도의 생존율을 나타내었다 (Fig. 1A). 따라서 이후 진행되는 모든 시험은 세포 독성이 없는 0.1 nM의 농도로 48시간 이내로 진행하였다.

라이코펜이 사이토카인 혼합물에 의한 베타세포 생존율 감소에 미치는 영향

라이코펜이 사이토카인에 의한 베타세포 생존율 감소에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사이토카인 혼합물 (20 ng/mL TNF α + 20 ng/mL IL-1 β)을 라이코펜 (0.1 nM)과 함께 처리한 후 생존율을 측정하였다. 사이토카인 혼합물을 24시간 처리했을 경우, 대조군과 비교하여 70% 정도의 생존율을 나타내었고 라이코펜과 함께 처리했을 경우 생존율이 유의하게 ($p < 0.05$) 회복되는 것을 관찰하였다. 사이토카인혼합물을 48시간 처리하였을 경우에도 라이코펜

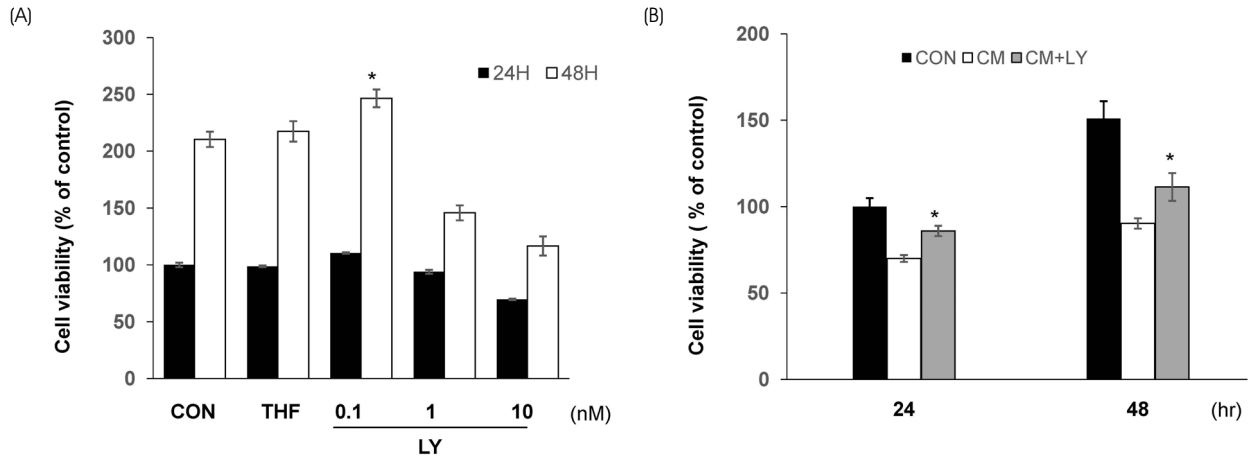


Fig. 1. Effect of lycopene on cytokine mixture-induced cytotoxicity in INS-1 cells. (A) Effect of lycopene on proliferation of INS-1 cells. Cells were incubated in media containing various concentrations of lycopene (LY, 0.1, 1, and 10 nM) dissolved in THF for 24 and 48 h and cell viability was measured by MIT assay. (B) Cytokine mixture (CM, 20 ng/mL TNF α and 20 ng/mL IL-1 β) was treated with or without 0.1 nM of LY and cell viability at 24 and 48 h was determined by MIT assay. Each values are means \pm SEM from three independent experiments and normalized to percentage of control (CON, 24h). * $p < 0.05$ versus THF or cytokine mixture (CM).

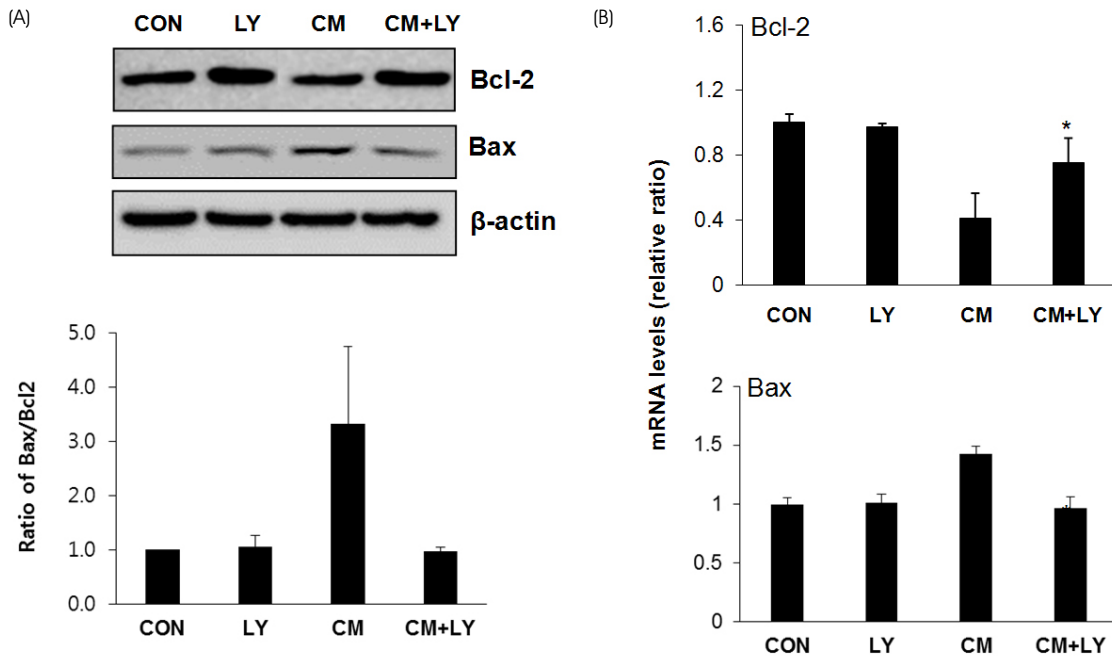


Fig. 2. Effect of lycopene on cytokine mixture-induced apoptosis in INS-1 cells. (A) Cells were treated with 0.1nM lycopene (LY) and Cytokine mixture (CM, 20 ng/mL TNF α and 20 ng/mL IL-1 β) for 24 h. The cells were harvested and expression levels of β -cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) were measured by Western blot analysis. β -actin was used as the internal control. The bands were quantified by Image J software. (B) Cells were treated as described in (A) and cells were harvested after 12 h treatment. The mRNA levels of Bcl-2 and Bax were analyzed by quantitative RT-PCR. The mRNA levels were normalized with those of cyclophilin. The values represent the mean \pm SEM from triplicate experiments. * $p < 0.05$ versus CM.

이 세포 생존율을 유의하게 증가시키는 것을 ($p < 0.05$) 관찰하였다 (Fig. 1B).

라이코펜이 사이토카인 혼합물에 의한 세포사멸 관련 단백질 발현에 미치는 영향

라이코펜이 사이토카인으로 유도된 세포사멸 관련 단백질 발현을 변화시키는지 조사하였다. INS-1 세포에 사이토카인 혼합물과 라이코펜을 단독 또는 함께 처리한 후 세포를 모아 세포사멸을 억제하는 Bcl-2와 세포사멸을 촉진하는 Bax의 단백질 발현^{13,14}의 변화를 western blotting

으로 조사하였다. Fig. 2A의 결과와 같이 INS-1세포에 사이토카인 혼합물을 24시간 처리한 결과, 대조군과 비교하여 Bax 발현이 증가하고 Bcl-2 발현은 감소하였다. 그러나 라이코펜과 동시에 처리하였을 경우, Bax 발현이 감소하고 Bcl-2 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다. Bax와 Bcl-2 단백질 발현 정도를 image J로 측정하여 Bax/Bcl-2 비율로 나타낸 결과, 사이토카인 혼합물에 의해 대조군 대비 3배 정도 증가되고 라이코펜과 동시에 처리하였을 경우 대조군과 비슷한 수준으로 감소됨을 관찰하였다 (Fig. 2A). 또한, Bcl-2, Bax의 유전자 발현에도 영향을 미치는지 조사한 결과, 사이토카인 혼합물에 의해 50%로 감소되었던 Bcl-2 mRNA 발현이 라이코펜과 함께 처리하였을 경우 유의하게 ($p < 0.05$) 증가되었다. 또한 사이토카인 혼합물에 의해 증가되었던 Bax mRNA 발현양은 라이코펜에 의해 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Fig. 2B).

라이코펜이 사이토카인 혼합물에 의한 활성산소 형성에 미치는 영향

사이토카인 혼합물은 세포내 산화스트레스를 유발하여 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)를 발생시켜 베타세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.¹⁵ 라이코펜의 항사멸 효과가 사이토카인 혼합물에 의한 활성산소 형성과 연관되어 있는지 조사하기 위하여 세포 내 발생하는 활성산소 양과 항산화 유전자 발현양을 조사하였다. 활성산소에 의해 산화된 DCF의 양을 측정된 결과, 사이토카인 혼합물을 처리한 그룹에서 대조군에 비해 2배 증가하였고, 라이코펜을 함께 처리하였을 경우 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Fig. 3A). 항산화 유전자인 GCLC, NQO1, HO-1의 mRNA 발현양을 qRT-PCR로 조사한 결과, 세 유전자 발현양 모두 사이토카인 혼합물에 의해 감소되었으나, 라이코펜과 함께 처리 시 발현양이 유의하게 ($p < 0.05$) 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3B).

라이코펜이 사이토카인 혼합물에 의한 미토콘드리아 기능부전과 관련 유전자발현에 미치는 영향

활성산소는 미토콘드리아의 기능을 손상시켜 베타세포의

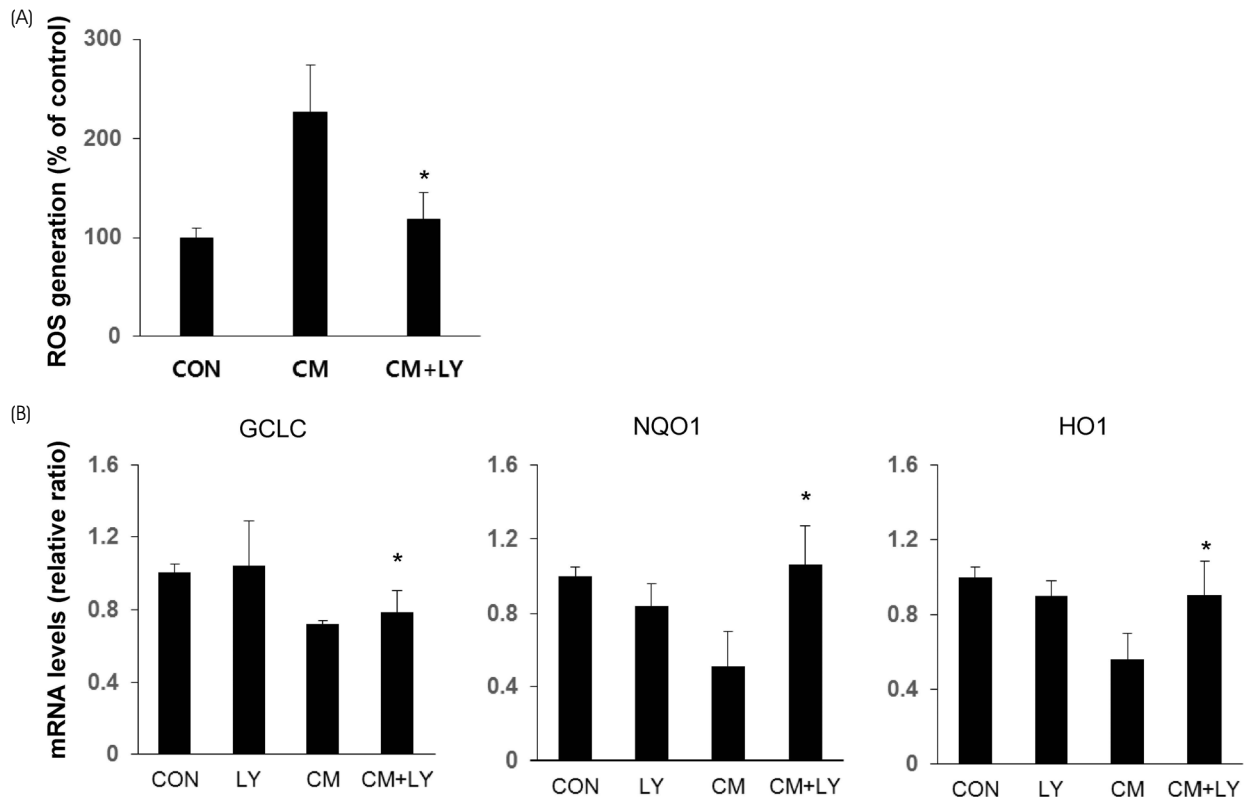


Fig. 3. Effect of lycopene on cytokine mixture-induced ROS generation in INS-1 cells. (A) Cells were treated with 0.1 nM lycopene (LY) and Cytokine mixture (CM, 20 ng/mL TNF α and 20 ng/mL IL-1 β) for 1 h. The cells were stained with 10 μ M H₂-DCFDA, and intracellular ROS generation was determined by DCF. (B) The cells were treated as described in Fig 2B, and mRNA expression levels of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1) and heme oxygenase 1 (HO-1) were analyzed by quantitative RT-PCR. The mRNA levels were normalized with those of cyclophilin. The values represent the mean \pm SEM from triplicate experiments. * $p < 0.05$ versus CM.

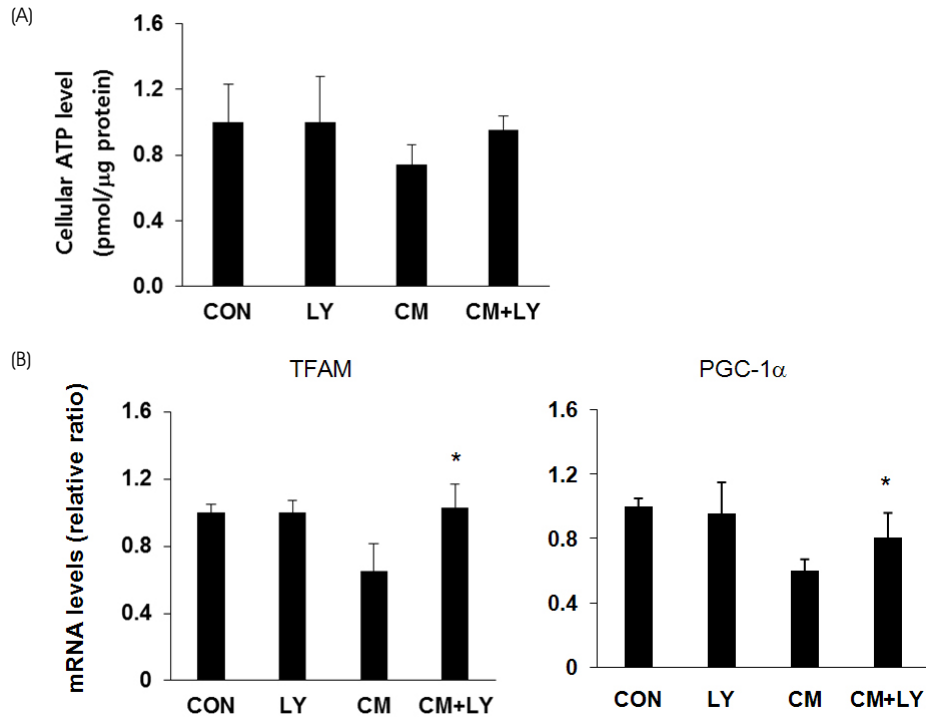


Fig. 4. Effect of lycopene on cytokine mixture-induced mitochondria dysfunction in INS-1 cells. (A) Cells were treated with 0.1nM lycopene (LY) and Cytokine mixture (CM, 20 ng/mL TNF α and 20 ng/mL IL-1 β) for 24 h. Intracellular concentrations of Adenosine triphosphate (ATP) were determined using an ATP-dependent luminescent cell viability assay (B) Cells were treated as described in (A) and cells were harvested after 12 h treatment. The mRNA expression levels of transcription factor A, mitochondrial (TFAM) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC-1 α) were analyzed by quantitative RT-PCR. The mRNA levels were normalized with those of cyclophilin. The values represent the mean \pm SEM from triplicate experiments. * p < 0.05 versus CM.

인슐린 분비를 억제하고, 세포 손상을 야기하는 것으로 보고되었다.^{16,17} 미토콘드리아의 기능이 라이코펜의 항사멸 효과와 관련되어 있는지 조사하기 위해, 사이토카인 혼합물에 라이코펜을 처리한 그룹과 처리하지 않은 그룹의 세포에서 생성되는 ATP양을 측정하였다. Fig. 4A와 같이 사이토카인 혼합물에 의해 세포내 생성되는 ATP 양이 20% 감소하였고, 라이코펜과 동시에 처리 시 대조군과 비슷한 수준으로 ATP 양이 증가하나 통계적 유의 차는 없는 것으로 나타났다 (Fig. 4A). 미토콘드리아의 기능 중 미토콘드리아 생합성과 관련된 유전자 발현을 qRT-PCR로 조사한 결과, mitochondrial transcription factor A (TFAM)과 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) mRNA 발현양 모두 사이토카인 혼합물을 처리한 그룹에서 감소하였고 라이코펜 처리에 의해 유의하게 증가되었다 (Fig. 4B).

고 찰

췌장의 베타세포는 체내 당대사의 항상성을 유지하는데 있어 중추적인 기능을 담당하고 있으며 우리 몸의 에너지

대사를 조절하는 가장 중요한 호르몬인 인슐린을 합성, 저장, 분비하는 역할을 담당하고 있다. 최근 제1형 당뇨병에 서뿐만 아니라 제2형 당뇨병에서도 췌장베타세포의 역할이 강조되고 있는데 특히, 제2형 당뇨병의 경우에는 인간 수명 연장, 운동량 감소, 유전적인 요인, 불균형적인 영양분의 과잉 공급과 같은 환경적 요인이 췌장 베타세포의 손상을 일으키며 그로 인해 인슐린 저항성을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다. 이로 인해 당뇨병의 예방과 치료에 췌장 베타 세포의 성장과 증식의 중요성이 강조되고 있으며 베타 세포의 사멸을 억제하는 천연 기능성 물질을 탐색하는 연구가 강조되고 있다.^{18,19}

본 연구는 라이코펜이 사이토카인 혼합물에 의한 베타 세포 사멸에 미치는 영향과 그에 대한 기전에 대해 조사하였다. 라이코펜에 의한 베타세포의 세포독성을 조사한 결과, 0.1 nM의 저농도에서는 유의하게 세포 증식이 증가하였고 고농도에서는 세포 독성이 나타나는 것을 관찰하였다. 라이코펜을 향후 동물실험이나 인간을 대상으로 하는 연구에 이용할 경우, 독성이 일어나지 않는 범위의 농도나 처리시간을 고려해야 할 것이다.

IL-1 β , TNF- α , Interferon (IFN)- γ 등의 염증 유도 인자들

의 발현 증가는 당뇨상태에서 베타 세포에 손상을 일으키는 중요한 요인중의 하나이다.²⁰ 당뇨발병과정 중 지방세포에서 침윤된 대식세포로부터 TNF- α 의 분비가 증가하며 이는 IL-1 β 를 포함한 다양한 염증유도인자들의 분비를 유도한다.²¹ 기존 연구보고에 따르면 사이토카인 혼합물을 INS-1 세포 또는 분리한 췌도에 처리하였을 경우, 세포 생존율이 감소하고 글루코오스에 의한 인슐린 분비능이 감소하는 것을 관찰하였다.^{11,22} 본 연구에서 0.1 nM 농도의 라이코펜을 사이토카인 혼합물과 함께 처리하였을 경우, 사이토카인 혼합물에 의해 감소되었던 세포 생존율을 증가시키고 증가되었던 세포사멸 관련 단백질의 발현이 감소되었다. 이상의 결과는 적정 농도의 라이코펜은 사이토카인 혼합물에 대한 항사멸효과가 있음을 의미하고, 이는 당뇨가 유도된 생리적 상태에서 베타 세포를 보호할 수 있음을 의미한다.

산화스트레스는 제 2형 당뇨 발병 과정에서 베타세포의 기능 부전과 사멸에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 산화스트레스를 조절하는데 중요한 역할을 하는 것 중의 하나로 다양한 항산화 유전자 (GCLC, NQO1, HO-1) 등을 들 수 있다. 항산화 유전자들의 발현은 leucine zipper transcription factor인 nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)에 의해 조절된다. 산화스트레스가 유발 시, Nrf2가 세포질에서 핵으로 이동하여 항산화 유전자의 promoter 부분 ARE에 결합하여 다양한 항산화 유전자의 발현을 유도하여 산화스트레스를 감소시키는 역할을 한다.²³ 그러나 과도한 산화스트레스가 유발되었을 경우, 이러한 조절시스템의 균형이 깨지면서 세포내 DNA나 단백질을 변성 시켜 인슐린 분비를 억제하고 세포 사멸을 촉진하게 된다.²⁴ 사이토카인 혼합물에 의해 항산화 유전자의 발현이 감소되었으나, 라이코펜과 동시에 처리하였을 경우 유전자 발현양이 대조군에서 발현되는 정도로 회복되었으며 세포내 생성되었던 ROS양도 감소됨을 관찰하였다. Ali 등의 연구에 따르면 STZ 유도 당뇨쥐에게 라이코펜 (90 mg/kg body weight)을 투여한 결과, 혈당이 감소됨과 더불어 혈액내 과산화수소 (H₂O₂) 양이 감소하였다.⁹ Zhu 등의 연구보고에서도 라이코펜 농도 의존적으로 혈액내 산화된 low density lipoprotein (LDL)의 양이 감소되고 항산화 효소의 활성이 증가하여 혈관 내피 기능 이상의 개선 효과와 더불어 당뇨병성 혈관계 합병증 예방 효과를 확인하였다.²⁵ 또한 tert-butyl hydroperoxide에 의해 유도된 신경세포 손상에서도 라이코펜을 전처리하였을 경우 산화스트레스와 세포사멸을 감소시키고, 다양한 시냅스 단백질들의 분비를 촉진시켰다.²⁶ 이러한 결과들로 라이코펜의 항산화 효과는 사이토카인 혼합물을 포함하는 다양한 독성에 의

한 세포사멸을 억제하고 세포 특이적인 기능을 개선할 수 있음을 알 수 있다.

미토콘드리아는 ATP를 생성하여 에너지 항상성을 유지할 뿐만 아니라, 체내 Ca 조절과 세포사멸 신호전달을 담당하며, 염증성 사이토카인, 화학적 산화제, 방사선물질 및 다양한 독성물질에 의한 산화스트레스를 조절하는 기관 중의 하나이다. 정상상태에서는 산화스트레스의 생성 및 제거를 균형 있게 유지하면서 산화스트레스를 낮은 수준으로 유지하지만, 이러한 균형이 깨지게 되면 과산화물 음이온 (O₂⁻), 과산화수소 (H₂O₂)와 같은 과도한 산화스트레스가 생성되면서 미토콘드리아를 포함한 다양한 기관의 기능을 상실하게 된다. 라이코펜을 처리하였을 경우, 사이토카인 혼합물에 의해 감소되었던 ATP 생성을 회복시켰으며, 이러한 기능적인 회복은 미토콘드리아 기능과 대사 관련 유전자들의 발현을 증가시킴으로서 나타나는 현상임을 관찰하였다. TFAM 유전자는 미토콘드리아 생합성을 증가하는 전사인자로 알려져 있고,²⁷ PGC-1 α 는 베타세포 사멸을 조절하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. Zhang 등의 보고에 의하면 베타세포에 고지방산을 장기간 처리하였을 경우 PGC-1 α 발현양이 증가되었으며, NADH-cytochrome b5 oxidoreductase 유전자 손실에 의한 고혈당 마우스에서 베타세포 손상이 일어남과 동시에 PGC-1 α 발현양이 증가됨을 관찰하였다.²⁸ 따라서 TFAM, PGC-1 α 유전자의 발현증가는 라이코펜에 의해 미토콘드리아의 기능이 회복되었음을 의미하고 이에 의해 사이토카인 혼합물에 의한 세포사멸이 억제되었음을 보여준다.

이상의 결과로, 라이코펜이 사이토카인 혼합물에 의한 베타세포 사멸을 억제하는데, 이는 사이토카인에 의한 산화적 스트레스를 억제함과 동시에 미토콘드리아의 기능을 회복시킴으로서 나타나는 현상임을 알 수 있었다. 따라서 라이코펜을 베타세포의 사멸 억제를 위한 기능성 소재로 활용할 수 있을 것이라 보여지며 향후 베타세포를 타겟으로 하는 제 2형 당뇨병 치료의 관련 소재로서 라이코펜을 적용하기 위해서는 다양한 동물모델을 이용한 생체 내 효능 연구가 추가적으로 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 베타세포에서 라이코펜의 항사멸 효과와 그 기전에 대해 조사하기 위해 실시하였다. 라이코펜에 의한 베타세포독성을 조사하기 위해 다양한 농도 (0.1, 1, 10 nM)로 처리하였을 경우, 저농도에서 세포독성이 나타나지 않음을 관찰하였다. 선택한 농도를 사이토카인 혼합물과 함께 처리하였을 경우, 세포 생존율이 증가하는 것을 관찰

하였고, 세포사멸 유도 단백질인 Bax의 발현양은 감소하고, 세포사멸억제 단백질인 Bcl-2 발현양은 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 사이토카인 혼합물에서 증가하였던 세포내 산화스트레스가 라이코펜과 함께 처리하였을 경우 감소되는 것을 관찰하였고 이러한 효과는 항산화 유전자인 GCLC, NQO1, HO-1의 발현양이 증가함으로써 일어난 현상임을 알 수 있었다. 라이코펜은 미토콘드리아의 생성 및 기능과 관련된 유전자의 발현을 증가시키고 사이토카인 혼합물에 의해 감소되었던 세포내 ATP 생성량을 증가시켰다. 이러한 결과는 라이코펜의 항산화효과와 미토콘드리아 기능 개선 효과가 사이토카인에 의한 베타세포 사멸을 억제하는 기전 중의 하나로 작용할 수 있음을 의미한다. 향후 라이코펜이 베타세포를 타겟으로 하는 제 2형 당뇨병 치료의 가능성 소재로 개발될 가능성이 있음을 시사하는 바이다.

ORCID

김경: <https://orcid.org/0000-0002-8354-0488>

장세은: <https://orcid.org/0000-0003-3279-0871>

배공득: <https://orcid.org/0000-0002-1142-2634>

전희숙: <https://orcid.org/0000-0002-1166-4932>

오윤신: <https://orcid.org/0000-0003-3995-4429>

References

- Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 2005; 307(5708): 380-384.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87(1): 4-14.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; 444(7121): 840-846.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48(1): 1-9.
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; 46(11): 1733-1742.
- Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, Kaneto H, Watada H, Kuroda A, Kawamori D, Yasuda T, Matsuhisa M, Yamasaki Y, Hori M. Probuocol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2002; 57(1): 1-10.
- Robertson RP, Harmon JS. Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett* 2007; 581(19): 3743-3748.
- Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys* 1996; 336(1): 1-9.
- Ali MM, Agha FG. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes mellitus, oxidative stress and dyslipidemia in rats by tomato extract lycopene. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69(3): 371-379.
- Wang L, Liu S, Manson JE, Gaziano JM, Buring JE, Sesso HD. The consumption of lycopene and tomato-based food products is not associated with the risk of type 2 diabetes in women. *J Nutr* 2006; 136(3): 620-625.
- Oh YS, Lee YJ, Park EY, Jun HS. Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27(8): 813-819.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 50-57.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(9): 4997-5002.
- Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA, Tse HM. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1281(1): 16-35.
- Cho YM, Park KS, Lee HK. Genetic factors related to mitochondrial function and risk of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77(3 Suppl 1): S172-S177.
- Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005; 307(5708): 384-387.
- Kim EK, Kwon KB, Han MJ, Song MY, Lee JH, Lv N, Choi KB, Ryu DG, Kim KS, Park JW, Park BH. Inhibitory effect of Artemisia capillaris extract on cytokine-induced nitric oxide formation and cytotoxicity of RINm5F cells. *Int J Mol Med* 2007; 19(3): 535-540.
- Mandrup-Poulsen T. Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8): 1433-1440.
- Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörens A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2: S97-S107.
- Hanafusa T, Imagawa A. Insulinitis in human type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1150(1): 297-299.
- Kim EK, Kwon KB, Song MY, Seo SW, Park SJ, Ka SO, Na L, Kim KA, Ryu DG, So HS, Park R, Park JW, Park BH. Genistein protects pancreatic beta cells against cytokine-mediated toxicity. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 278(1-2): 18-28.
- Oh YS, Jun HS. Effects of glucagon-like peptide-1 on oxidative stress and Nrf2 signaling. *Int J Mol Sci* 2017; 19(1): E26.
- Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(6): 411-421.
- Zhu J, Wang CG, Xu YG. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. *Pharm Biol* 2011; 49(11): 1144-1149.
- Huang C, Gan D, Fan C, Wen C, Li A, Li Q, Zhao J, Wang

- Z, Zhu L, Lu D. The secretion from neural stem cells pretreated with lycopene protects against tert-butyl hydroperoxide-induced neuron oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 5490218.
27. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 1998; 18(3): 231-236.
28. Zhang P, Liu C, Zhang C, Zhang Y, Shen P, Zhang J, Zhang CY. Free fatty acids increase PGC-1alpha expression in isolated rat islets. *FEBS Lett* 2005; 579(6): 1446-1452.