

한국인 제2형 당뇨병 환자의 골격근에서 인슐린 신호전달체계의 결함

아주대학교 의과대학 내분비대사내과학교실

최준혁 · 이관우 · 김호정 · 이동훈 · 이종우 · 김정은 · 임현채 · 김경미 · 최성이 · 정윤석 · 김현만

Impaired Metabolic Signal Transduction Networks in Isolated Skeletal Muscle in Korean type 2 Diabetic Patients

Joon-Hyuck Choi, Kwan-Woo Lee, Hyo-Jeong Kim, Dong-Hun Lee, Jong-Woo Lee
Jung-Eun Kim, Hyun-Chae Yim, Kyung-Mi Kim, Sung-Yi Choi
Yoon-Sok Chung, Hyeon-Man Kim

Department of Endocrinology and Metabolism, Ajou University School of Medicine

ABSTRACT

Background: The glucose uptake rate is the limiting step in glucose utilization and storage. The failure of insulin to stimulate glucose uptake in muscle appears to be a primary defect of insulin resistance. This study was undertaken to examine the effect of physiological hyperinsulinemia on the phosphorylation of the insulin receptor (IR-β), insulin receptor substrate (IRS), Akt kinase and GSK-3 in isolated skeletal muscle, in people with type 2 diabetes (n=9) and control subjects (n=11).

Methods: 75g OGTT and euglycemic hyperinsulinemic clamp test were done. And vastus lateralis muscle was obtained before and 30 min into the euglycemic clamp. Western blots were performed for tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) and phosphorylation of the insulin receptor (IR-β), Akt and GSK-3.

Result: There were no statistical differences in the mean age, BMI and body fat between the control subjects and diabetic patients. The fasting blood sugar and HbA_{1c} in controls and diabetic patients were 98.0±1.3 and 208.1±16.5 ng/dl, and 5.4±0.5 and 9.2±0.6%, and 1.4±0.2 in the control subjects, and 72.2±52.3% (p<0.01) and 10.2±6.3 (p<0.01) in the diabetic patients, respectively. The insulin resistance from the euglycemic hyperinsulinemic clamp tests were 8.2±0.6 mg/kg/min and 3.7±1.1 ng/kg/min in the control subjects and in the diabetic patients, respectively (p<0.01). Compared with the normal controls, insulin-stimulated IR phosphorylation was no different to that in the diabetic patients. However, insulin-stimulated IRS phosphorylation,

접수일자: 2002년 8월 2일

통과일자: 2002년 10월 8일

책임저자: 이관우, 아주대학교병원 내분비대사내과

E-mail: lkW65@madang.ajou.ac.kr

insulin-stimulated Akt phosphorylation and insulin-stimulated GSK-3 phosphorylation were reduced in the diabetic patients compared with the normal controls by 24, 43 and 25%, respectively ($p < 0.05$).

Conclusion: In Korean type 2 diabetic patients, the insulin resistance may be due to the impairment of the upstream insulin signal molecular network. Further studies will focus on determining whether these signaling defects are the cause of the development of insulin resistance, or secondary to the altered metabolic state, associated with type 2 diabetes mellitus (J Kor Soc Endocrinol 17:685~697, 2002).

Key Words: Type 2 diabetes, Skeletal muscle, Insulin resistance, Insulin signal transduction

서 론

포도당의 항상성을 유지하는 근간이 되는 기전은 인슐린이 말초조직에서 포도당의 섭취와 대사를 자극하는 것이다. 제2형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 저항성은 간, 지방, 근육 같은 말초조직에서 인슐린의 작용이 떨어지는 것을 말한다. 제2형 당뇨병의 발생기전에 인슐린 저항성과 인슐린 분비능 저하가 같이 관여함은 잘 알려진 사실이다. 드물게 하나의 유전자 결함이 당뇨병의 원인이 될 수 있고 그 결함이 클 경우 인슐린 작용이나 인슐린 분비를 감소시켜 당뇨병을 유발할 수 있음을 보고하고 있으나 대부분의 제2형 당뇨병 환자들은 병의 초기단계에서 인슐린 저항성을 보이고 있다. 또한 여러 연구들이 인슐린에 대한 감수성의 감소를 결정하는 유전적 요인들을 밝힘으로서 대부분의 제2형 당뇨병이 인슐린 저항성에서 기인함을 증명하고 있다. 제2형 당뇨병은 간, 지방이나 근육 같은 말초조직, 췌장 베타세포 세 기관체계와 연관되어 있고 이들의 상호작용에 결함이 생기면 포도당 대사와 지질대사에 이상반응이 생기게 된다[1]. 그 중 근육은 인슐린 자극상태에서 포도당 섭취의 주요부위이고, 이곳의 기전이 포도당 주입후의 포도당 감소의 75%를 설명한다[2]. 그러므로 근육조직에서 인슐린 작용감소는 인슐린 저항성의 주요한 요소가 된다[3]. 또한 제2형 당뇨병의 포도당 섭취결함은 포도당 대사의 비산화성 경로에 국한되어 있는데[2,4~6], 이러한 비산화성 경로의 대사율의 감소는 포도당 수송, 포도당 인산화 작용, 또

는 글리코겐 합성 중 한 부분 이상의 결함 때문에 온다. 인슐린 저항성을 가진 많은 환자들이 수년간은 당뇨병의 발생을 늦출 만큼의 충분한 인슐린 분비능을 갖추고 있고 이후에 어떤 유전적 요인이 인슐린 분비에 영향을 줄 수 있을 것이라고 받아들여지고 있다. 이를 증명하기 위한 분자생물학적 연구들이 당뇨병의 병인을 밝히는 데 필요하다.

인슐린은 동화작용에 관여하는 가장 강력한 호르몬으로 조직의 발생, 성장 및 체내 포도당 항상성을 유지하는 데 필수적인 물질로 알려져 있고 식사 후 포도당과 아미노산 등의 혈중농도가 증가함에 따라 췌장의 베타세포에서 분비된다. 이 호르몬은 간에서 포도당 신합성감소, 글리코겐 분해를 통해 포도당 생성을 감소시키고 근육과 지방조직으로의 포도당 섭취율을 증가시킴으로서 포도당의 항상성을 유지한다. 인슐린 수용체는 2개의 α -subunits와 2개의 β -subunits가 disulfide로 연결되어 형성된 $\alpha_2\beta_2$ heterotetrameric complex이고, 인슐린은 세포표면에 있는 인슐린 수용체에 부착하여 이를 활성화시킴으로서 여러 가지 인슐린 작용을 시작한다. 인슐린은 세포 외의 α -subunits에 부착하여 혈장막을 통해 신호를 전달해서 세포 내에 있는 β -subunit의 tyrosine kinase domain을 활성화시킨다. 이 β -subunit의 tyrosine kinase가 활성화되면 tyrosine에 있는 많은 중요한 proximal substrates를 인산화시키는데 insulin receptor substrates (IRS1/2/3/4), Shc adaptor protein isoforms, Gab-1 등이 그것이다 [7~13]. 이후에는 인슐린의 신호전달이 PI3-kinase 경

로를 통하여 downstream에 있는 Akt[14~16], PKC[17~18], GSK-3 등으로 전달되고, 다른 한편으로는 MAP-kinase 경로 등을 통하여 전달되어 종국에는 glucose transport, glycogen synthesis, protein synthesis, mitogenesis를 일어나게 한다. 인슐린의 세포 내 신호전달은 여러 과정을 포함한 복잡한 과정으로 이루어지며 정상인의 세포에서는 위의 인슐린 신호전달체계의 모든 과정이 순차적으로 적절하게 진행된다. 인슐린 저항성은 인슐린이 이러한 일련의 과정들을 적절히 조절하지 못할 때 발생한다. 인슐린의 세포 내에서의 저항성을 규명하기 위한 인슐린의 세포 내 신호전달체계에 대한 연구가 국외에서는 활발히 진행되고 있으며 몇몇 연구에서 인슐린 저항성을 가진 골격근육에서 IRS와 관련된 PI 3-kinase의 활성감소와 Akt kinase의 활성감소를 보고하고 있으나 아직까지 명확하게 그 기전이 설명되어지지 않고 있다[19,20]. 국내에서는 아직 이러한 연구가 진행되지 못하고 있으며 국내에서는 처음으로 인슐린 신호전달체계에 대한 연구라는 점에서 큰 의의가 있다고 생각한다. 본 연구에서는 정상성인, 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 경구 당부하검사 및 인슐린 클램프검사를 시행하고 인슐린 클램프 검사시 대상인의 근육을 채취하여 인슐린 신호전달 체계(IR-β, IRS, Akt kinase, GSK-3)를 연구하였다.

대상 및 방법

1. 대상

한국인으로서 경구당부하검사상 정상인 및 당뇨병 환자 각각 11명, 9명을 대상으로 하였으며, 정상인은 건강인으로 과거력상 당대사에 영향을 줄 질환이 없고, 현재 당대사에 영향을 줄 약물 복용 및 다른 소견이 없는 경구당부하검사상 정상 내당능을 보이는 사람으로 하였다. 당뇨병환자는 모두 제2형 당뇨병 환자로 이환기간이 만 5년 이내인 경우로 하고, 인슐린으로 치료하는 대상자는 제외하도록 하였다. 연구 참여자로부터 연구개요에 대하여 설명하고 동의서를 받았다.

2. 방법

(1) 경구 당부하 검사

1) 적어도 12시간 이상 금식 후 다음날 아침 75g 경구 당부하 검사를 시행하여 공복, 60분, 90분 및 두 시간 후의 혈청 포도당 농도를 측정하고 NDDG 기준에 의해 대상자를 정상군, 당뇨병군으로 분류하였다.

2) "HOMA model"을 이용하여 베타세포의 기능과 인슐린저항성 정도를 평가하였다[21].

베타세포의 기능(%)은 $20 \times \text{fasting serum insulin (mIU/L)} / [\text{fasting plasma}$

$\text{glucose (mmol/L)} - 3.5]$ 공식으로 계산하였으며 인슐린 저항성(HOMA)은 $\text{fasting serum insulin (mIU/L)} \times \text{fasting plasma glucose (mmol/L)} / 22.5$ 공식으로 계산하였다.

(2) 임상 및 생화학적 지표 측정

1) 대상자의 연령, 체질량지수 (kg/m^2)를 평가하였으며 체지방량은 DEXA를 이용하여 측정하였다.

2) 신체 둘레(body circumference)는 직립자세에서 줄자로 제대수준의 허리/엉덩이 둘레를 측정하여 허리/엉덩이 둘레의 비(waist hip ratio; WHR)를 계산하였다.

3) 공복시 총콜레스테롤, 중성지방, 고밀도지단백 콜레스테롤 및 HbA1c, 인슐린, C-peptide를 측정하였다.

(3) 정상혈당 고인슐린혈중 클램프 검사 및 근육 조직검사

DeFronzo 등이 고안한 방법으로 외부에서 투여한 인슐린에 대한 조직의 포도당 이용률을 측정하였다[22]. 즉 인슐린을 정주하여 혈장 인슐린 농도를 급격히 올려 약 $100 \mu\text{U/mL}$ 로 유지하고, negative feedback 원리를 이용하여 혈당을 기저 상태인 90mg/dL 로 일정하게 유지하도록 포도당 주입을 조절하였다. 이와 같이 조절된 정상 혈당 상태에서의 포도당 주입률은 곧 신체 모든 조직으로의 포도당 흡수율과 동일시 할 수 있다. 인슐린 주사액은 생리 식염수에 속효성 인간 인슐린을 300mU/mL 의 농도로 섞고 주사액 50cc 당

Table 1. Clinical Characteristics of the Subjects

	정상군	당뇨병군
Age (years)	42.1±2.0	44.8±1.7
Sex (male/female)	8/3	5/4
BMI (Kg/m ²)	24.0±1.0	25.4±1.1
WHR	0.86±0.08	0.88±0.1
Body Fat (%)*	22.8±3.0	27.2±4.1

* Body Fat was measured by DEXA

BMI; body mass index, WHR; waist hip ratio

환자 혈액 2 cc를 섞어서 플라스틱 표면에 인슐린이 붙는 것을 방지하였다. 클램프 검사중 마지막 20분간 대사되는 포도당 양을 mg/kg/min으로 계산하여 인슐린 저항성(포도당 이용률, GUR)로 하였다. 정상혈당 고인슐린혈증 클램프 검사시, 인슐린 투입전과 인슐린 투입 30분후, 두차례에 걸쳐 대퇴부 근육(외측광근, vastus lateralis muscle) 생검을 실시하고, 조직 채취후 즉시 liquid nitrogen으로 얼려 보관하였다.

(4) Western blot

1) IR- β , IRS의 인산화량 측정

50 mg의 근육조직을 500ul의 lysis buffer (20 mM Tris base, PH 8.0, 137 mM NaCl, 1 mM Mg Cl₂, 2 mM CaCl₂, 1% NP-40, 2 mM vanadate, 1 mM DTT, 2.5 mM PMSF)에 넣고 4도에서 homogenization을 시켰다. 14,000 g로 10분간 원심분리하고, supernatent를 얻는다. 얻은 supernatent를 Bradford 방법으로 단백질을 정량한다. Supernatent에 100 mM DTT를 포함한 SDS-stop buffer를 넣고 95도에서 5분간 가열한다. 100 microgram의 sample을 SDS-PAGE (8% resolving gel)에 의해 proteins을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% non-fat dry milk로 block시킨다. membranes을 anti-phosphotyrosine antibody (Upstate Biotechnology Inc., USA)로 1시간동안 incubation시킨다. membrane을 washing하고 secondary antibodies (Antimouse IgG-HRP conjugate)와 30분간 incubation 시킨다. IR- β , IRS의 인산화 정도를 enhanced chemiluminescence로 관찰

하고 densitometry로 정량하였다[23~24].

2) Akt(PKB or Rac) kinase의 인산화량 측정

100 microgram의 sample을 SDS-PAGE (10% resolving gel)에 의해 proteins을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% non-fat dry milk로 block시킨다. membranes을 polyclonal anti-phospho Akt antibody (New England Biolab., USA)로 1시간동안 incubation시킨다. membrane을 washing하고 secondary antibodies (Antirabbit IgG-HRP conjugate)와 30분간 incubation 시킨다. Akt kinase protein의 인산화 정도를 enhanced chemiluminescence로 관찰하고 densitometry로 정량하였다[23~24].

3) GSK-3 α/β 의 인산화량 측정

100 microgram의 sample을 SDS-PAGE (10% resolving gel)에 의해 proteins을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer시킨 후 5% non-fat dry milk로 block시킨다. membranes을 anti-phosphospecific GSK-3 α/β antibody (New England Biolab., USA)로 1시간 동안 incubation시킨다. membrane을 washing하고 secondary antibodies (Antirabbit IgG-HRP conjugate)와 30분간 incubation 시킨다. GSK-3 α/β protein의 인산화 정도를 enhanced chemiluminescence로 관찰하고 densitometry로 정량하였다[23,25].

3. 통계처리 및 분석

모든 통계학적 처리는 SPSS/PC+Window를 이용하였으며, 정상군과 당뇨병군간에 nonparametric test로 Mann-Whitney U test와 공분산 분석(analysis of covariance; ANACOVA)을 이용하였다. 모든 측정 결과는 평균±표준편차로 표시하였다. p값이 0.05이하면 통계적 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

정상인 11명과 당뇨병 환자 9명을 대상으로 하였으며 대상자의 평균 연령은 정상군 42.1±2.0세, 당뇨병

Table 2. Metabolic Characteristics of the Subjects

	정상군	당뇨병군
HbA1c (%)	5.4±0.5	9.2±0.6*
Cholesterol (mg/dL)	189.9±6.6	214.7±17.7
TG (mg/dL)	130.6±20.9	189.2±50.5
HDL (mg/dL)	50.9±3.2	45.1±1.9
LDL (mg/dL)	112.9±6.8	131.7±14.2
FBS (mg/dL)	98.0±1.3	208.1±16.5*
2 PPBS (mg/dL)	107.8±6.8	400.0±19.9*

FBS; fasting serum glucose, 2 PPBS; 2 hours postprandial serum glucose * p<0.05 vs. control subjects

Table 3. Beta-cell Function and Insulin Resistance Measured by HOMA Model and Hyperinsulinemic, Euglycemic Clamp in the Subjects

	정상군	당뇨병군
Beta-cell function (%)	56.4±8.5	72.2±52.3*
HOMA(R)	1.4±0.2	10.2±6.3*
M (mg/kg/min)	8.2±0.6	3.7±1.1*

* p<0.01 vs. control subjects

M; glucose utilization rate

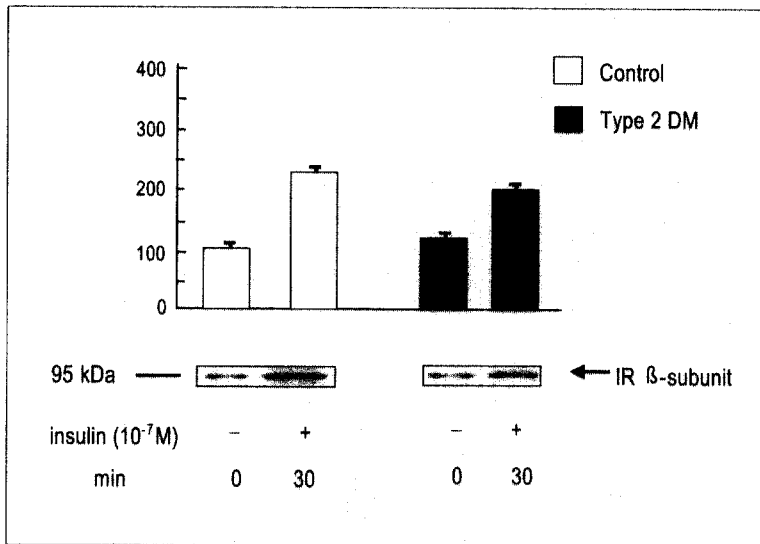


Fig. 1. IR Phosphorylation in Skeletal Muscle of the Subjects.

군 44.8±1.7세, 평균 체질량지수는 정상군 24.0±1.0 kg/m², 당뇨병군 25.4±1.1kg/m²였으며 체지방량은 정상군 22.8±3.0%, 당뇨병군 27.2±4.1%였다. 허리/엉덩이 둘레의 비(waist hip ratio; WHR)는 정상군 0.86±0.08, 당뇨병군 0.88±0.1이었다. 평균 연령, 평균 체질량지수, 체지방량, 허리/엉덩이 둘레의 비(waist hip ratio; WHR)는 두 군간에 차이가 없었다(Table 1).

평균 공복혈당은 정상군 98.0±1.3 mg/dL, 당뇨병군 208.1±16.5 mg/dL (p<0.05), HbA1c는 정상군 5.4±0.5%,

당뇨병군 9.2±0.6% (p<0.05)였다. 공복시 총콜레스테롤은 정상군 189.9±6.6 mg/dL, 당뇨병군 214.7±17.7 mg/dL (p=NS), 중성지방은 정상군 130.6±20.9 mg/dL, 당뇨병군 189.2±50.5 mg/dL (p=NS), 고밀도지단백 콜레스테롤은 정상군 50.9±3.2 mg/dL, 당뇨병군 45.1±1.9 mg/dL (p=NS)로 측정되었다(Table 2).

“HOMA model”을 이용한 베타세포의 기능과 인슐린 저항성은 정상군 56.4±8.5%, 1.4±0.2, 당뇨병군 72.2±52.3% (p<0.01), 10.2±6.3 (p<0.01)였으며 정상혈당클

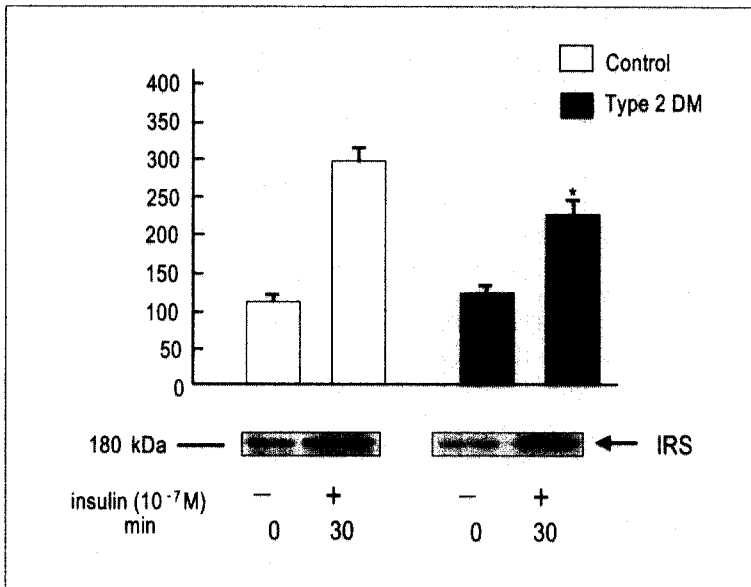


Fig. 2. IRS Phosphorylation in Skeletal Muscle of the Subjects
* p<0.05 vs. Insulin-Stimulated Control Subjects

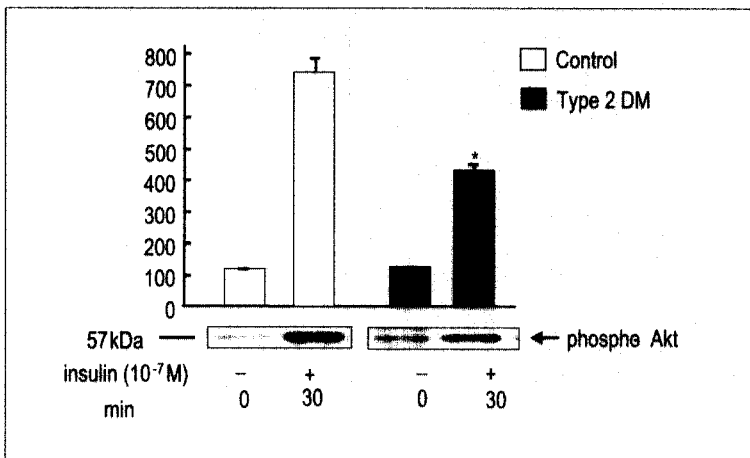


Fig. 3. Akt Phosphorylation in Skeletal Muscle of the Subjects.
* p<0.01 vs. insulin-stimulated control subjects.

램프 검사상 포도당 이용률은 정상군 8.2 ± 0.6 mg/kg/min, 당뇨병군 3.7 ± 1.1 mg/kg/min ($p < 0.01$)로 정상군과 당뇨병군간에 유의한 차이를 나타내었다 (Table 3).

Western blot법으로 IR- β , IRS, Akt kinase, GSK-3

의 인산화량을 인슐린 투입전과 인슐린 투입 30분후 측정하였을 때 IR- β 에서는 정상군이 103.9 ± 2.3 에서 241.3 ± 18.6 , 당뇨병군이 108.9 ± 2.2 에서 198.7 ± 6.3 으로 증가하였다 ($p = NS$) (Fig. 1). 이는 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 통

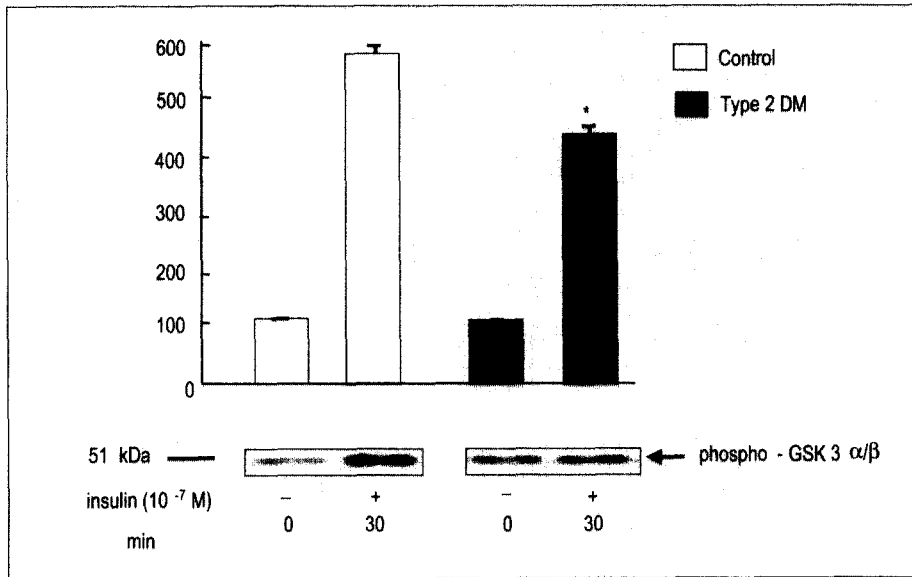


Fig. 4. GSK-3 Phosphorylation in Skeletal Muscle of the Subjects.

* $p < 0.01$ vs. insulin-Stimulated Control Subjects.

제적인 차이가 없었다. IRS에서는 정상군이 111.6 ± 7.3 에서 295.6 ± 17.2 , 당뇨병군이 114.5 ± 6.1 에서 222.0 ± 23.2 로 증가하였으며 ($p < 0.05$) (Fig. 2), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 24% 감소하였다. Akt kinase에서는 정상군이 100.6 ± 1.1 에서 735.2 ± 44.8 , 당뇨병군이 103.4 ± 6.0 에서 416.8 ± 29.5 로 증가하였으며 ($p < 0.01$) (Fig. 3), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 43% 감소하였다. GSK-3에서는 정상군이 107.7 ± 6.7 에서 595.7 ± 28.1 , 당뇨병군이 104.3 ± 4.8 에서 443.3 ± 12.9 로 증가하였으며 ($p < 0.01$) (Fig. 4), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 25% 감소하였다.

고 찰

제2형 당뇨병의 발생기전에 인슐린 저항성과 인슐린 분비능 저하가 같이 관여하는 잘 알려진 사실이다. 몇몇 저자들은 인슐린 작용의 결함이 제2형 당뇨병의 발생 초기에 주요한 병인이 되고 인슐린 분비능의 저하는 말기에 발생한다고 보고하고 있으며[1,26~28]

또한 다른 몇몇 저자는 인슐린 분비능의 저하가 초기의 중요한 병인이라고 보고하고 있다[29~31]. 대부분의 제2형 당뇨병 환자들은 병의 초기단계에서 인슐린 저항성을 보이고 있으며 "HOMA model"을 이용한 인슐린 저항성과 정상혈당 고인슐린혈증 클램프 검사를 이용한 인슐린 저항성과는 중요한 상관관계가 있다고 보고되고 있다[32~33]. 본 연구에서도 "HOMA model"을 이용한 인슐린 저항성은 정상군 1.4 ± 0.2 , 당뇨병군 10.2 ± 6.3 ($p < 0.01$)였으며 정상혈당클램프 검사상 인슐린 저항성(포도당 이용률)은 정상군 8.2 ± 0.6 mg/kg/min, 당뇨병군 3.7 ± 1.1 mg/kg/min ($p < 0.01$)로 정상군과 당뇨병군간에 유의한 차이를 나타냈다.

포도당의 항상성을 유지하는 근간이 되는 기전은 인슐린이 말초조직에서 포도당의 섭취와 대사를 자극하는 것이다. 인슐린은 동화작용에 관여하는 가장 강력한 호르몬으로 조직의 발생, 성장 및 체내 포도당 항상성을 유지하는 데 필수적인 물질로 알려져 있고 식사 후 포도당과 아미노산 등의 혈중농도가 증가함에 따라 췌장의 베타세포에서 분비된다. 이 호르몬은 간에서 포도당 신합성감소, 글리코겐 분해를 통해 포도당 생성을 감소시키고 근육과 지방조직으로의 포도당

섭취율을 증가시킴으로서 포도당의 항상성을 유지한다. 이 중 근육과 지방조직에서의 포도당 섭취는 포도당 수송장치인 GLUT4 isoform의 세포표면으로의 전위에 의해 일어나는데 인슐린은 포도당 운반장치인 GLUT4의 전위를 촉진시킴으로써 포도당 운반을 증가시킨다. 그 중 근육이 인슐린 자극상태에서 포도당을 감소시키는 주요부위이고 제2형 당뇨병의 주된 병인이 이곳에서 일어나는 인슐린 작용에 대한 저항성 때문이라는 것은 잘 알려진 사실이다. 인슐린 저항성은 인슐린이 이러한 일련의 과정을 적절히 조절하지 못할 때 발생하며 최근 연구결과 제2형 당뇨병 환자의 근육에서 GLUT4 유전자는 정상인과 차이가 없는 것이 증명되었고 따라서 포도당 섭취시 인슐린의 작용효능은 GLUT4 운반작용의 변화나 기능장애일 것으로 추정되었다[34]. 그러나 제2형 당뇨병 환자의 근육에 인슐린이 아닌 다른 신호전달체계를 가진 자극을 주었을 때는 GLUT4에 의한 포도당 운반이 정상인 것으로 [35~36] 미루어보아 인슐린에 대한 저항성은 인슐린 신호전달체계의 이상 때문이라고 추론할 수 있다.

인슐린 신호전달체계에서 IR, IRS-1, PI-3 kinase를 포함하는 상위와 중간단계의 결합이 제2형 당뇨병 환자와 비만한 인슐린 저항성 군에서 포도당 수송의 감소를 유발하며 비만한 사람[37]과 쥐[38~42]에서 IR, IRS-1의 단백질량과 인산화량 및 PI-3 kinase 활성도의 감소가 근육에서 인슐린에 의한 포도당 수송의 결합과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 비만한 상태와는 대조적으로 고혈당 저인슐린 상태에서는 근육에서 IR, IRS-1 인산화량과 PI-3 kinase의 활성도가 인슐린에 의한 포도당 수송의 감소에도 불구하고 증가하는 것으로 보고되고 있다[40,42]. 비비만형 제 2형 당뇨병 환자의 근육에서 정상군과 비교하여 IR 인산화량은 감소하거나[43] 변화가 없었으나[24,44] 비비만형 제2형 당뇨병 환자의 근육에서는 IRS-1 인산화량과 PI-3 kinase 활성도가 감소된 것으로 보고되고 있다[45]. 본 연구에서도 Western blot법으로 IR- β , IRS의 인산화량을 인슐린 투입전과 인슐린 투입 30분후 측정하였을 때 IR- β 에서는 정상군이 103.9 ± 2.3 에서 241.3 ± 18.6 , 당뇨병군이 108.9 ± 2.2 에서 198.7 ± 6.3 로 증가하였다 ($p=NS$). 이는 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비

교하여 인산화량의 증가정도가 통계적인 차이가 없는 것으로 관찰되며 IRS에서는 정상군이 111.6 ± 7.3 에서 295.6 ± 17.2 , 당뇨병군이 114.5 ± 6.1 에서 222.0 ± 23.2 로 증가하였으며 ($p < 0.05$), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 24% 감소한 것으로 관찰되었다. 그러므로 제2형 당뇨병 환자의 근육에서 IR-kinase의 활성도가 감소하는 것[43,46~47]과 함께 IRS-1과 PI-3 kinase의 인슐린 신호전달의 결합[24,45,48]이 포도당 수송의 감소와 GLUT4의 전위를 감소시키는 것을 알 수 있다. 하지만 PI-3 kinase 활성도 저하가 GLUT4 전위의 결합을 유발하는 기전은 아직 밝혀지지 않았으며 이러한 신호전달체계의 정도가 인슐린 저항성의 발생원인인지 당뇨병과 관련된 대사작용 변화에 이차적으로 나타나는 것인지 현재까지도 확실치 않다.

Akt (PKB or Rac)는 60-kDa의 serine/threonine kinase이고 receptor tyrosine kinase에 의해 활성화되고 PI3-kinase의 하부신호전달체제라고 생각된다[14~16]. 여러 연구자들이 인슐린 저항성이 있는 환자의 근육에서는 인슐린 자극상태에서 IRS protein과 PI 3-kinase의 결합과 Akt 활성이 다소 감소되어 있다 [49]고 보고하고 있으며 본 연구에서도 같은 결과를 보였다. 정상군이 100.6 ± 1.1 에서 735.2 ± 44.8 , 당뇨병군이 103.4 ± 6.0 에서 416.8 ± 29.5 로 증가하였으며 ($p < 0.01$), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 43% 감소한 것을 볼 수 있었다. 하지만 인슐린 저항성이 있는 환자의 근육에서 Akt의 활성이 정상인 보고도 있다[48]. Kim 등은 인슐린 저항성이 있는 비만증이나 당뇨병 환자들에서 Akt의 phosphorylation이나 activity가 정상이었다고 보고하고 Akt가 정상적이면서 포도당 수송과 글리코겐 합성효소의 활성이 감소되는 점으로 미루어볼 때 Akt가 인슐린 하부신호전달체제의 주된 경로가 아닐 수 있음을 역설하고 있다. 또한 PI-3 kinase의 활성이 감소된 상황에서도 Akt가 정상이었음을 관찰한 후 Akt 활성화에 PI3-kinase activity가 완전히 가동하지 않아도 되며 Akt가 PI3-kinase와 무관한 경로를 통해서도 활성화될 수 있음을 가정하였다. 이러한 결과는 제2형 당뇨병이 있는 환자의 인슐린 저항성이 IRS tyrosine phos-

phorylation부터 Akt 활성이라는 일련의 반응의 결합만은 아니라는 것을 시사한다. 이 과정을 명확히 하기 위해서는 Akt와 PKC λ 활성과 작용부위에 관한 더 많은 연구가 동물 모델과 심한 인슐린 저항성 환자군에서 요구되고 있다.

제2형 당뇨병에서는 글리코겐 합성율이 저하되는데 글리코겐 합성효소의 활성화가 감소되는 것도 하나의 기전이다. 글리코겐 합성효소는 3a, b, c 부위가 있는데 GSK-3가 이 부위를 인산화시켜 효소를 불활성화시키고, protein phosphatase 1(PP1g)이 dephosphorylation을 일으켜 활성화시킨다고 알려져 왔다. Glycogen synthase kinase-3(GSK-3)는 Akt에 의해 인산화되고 불활성화되며[25] glycogen synthesis activity를 방해함으로써 glycogen synthesis에 음성 조절인자로 역할을 하는 것으로 보고되었다[50]. 본 연구에서도 GSK-3의 인산화량이 정상군이 107.7 \pm 6.7에서 595.7 \pm 28.1, 당뇨병군이 104.3 \pm 4.8에서 443.3 \pm 12.9로 증가하였으며 ($p < 0.01$), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 25% 감소한 것으로 나타났다.

현재 외국에서는 당뇨병환자에서 인슐린 신호전달 체계에 대하여 많은 연구결과가 발표되고 있으나, 국내에서는 아직 연구결과가 발표된 적이 없다. 본 연구는 국내 최초로 한국인에서의 인슐린저항성 증후군 및 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 하여 인슐린 신호전달 체계를 검증하고 한국인 당뇨병의 특성을 밝히고자 한 점에서 그 의의가 있다. 제2형 당뇨병 환자에서 정상인과 비교하여 인슐린 자극후 IR- β 는 인산화량의 증가정도가 큰 차이가 없었으나, IRS, Akt kinase, GSK-3에서는 인산화량의 증가정도가 감소되는 것으로 보아 인슐린 저항성은 상위 인슐린 신호전달체계부터 결합이 있는 것으로 생각된다.

요 약

연구배경: 제2형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 저항성은 간, 지방, 근육 같은 말초조직에서 인슐린의 작용이 떨어지는 것을 말한다. 제2형 당뇨병의 발생기전에 인슐린 저항성과 인슐린 분비능 저하가 같이 관여함은

잘 알려진 사실이다. 인슐린의 세포내에서의 저항성을 규명하기 위한 인슐린의 세포내 신호전달체계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 몇몇 연구에서 인슐린 저항성을 가진 골격근육에서 IRS와 관련된 PI 3-kinase의 활성감소와 Akt kinase의 활성감소를 보고하고 있으나 아직까지 명확하게 그 기작이 설명되어지지 않고 있다. 본 연구에서는 정상성인, 제2형 당뇨병 환자를 대상으로 경구당부하검사 및 인슐린 클램프검사를 시행하고 인슐린 클램프 검사시 대상인의 근육을 채취하여 인슐린 신호전달 체계(IR- β , IRS, Akt (PKB, Rac) kinase, GSK-3)를 연구하였다.

방법: 연구대상자는 한국인으로서 경구당부하검사상 정상인 및 당뇨병 환자 각각 11명, 9명을 대상으로 하였으며, 정상인은 건강인으로 과거력상 당대사에 영향을 줄 질환이 없고, 현재 당대사에 영향을 줄 약물 복용 및 다른 소견이 없는 경구당부하검사상 정상 내당능을 보이는 대상자로 하였다. 당뇨병환자는 모두 제2형 당뇨병 환자로 이환기간이 만 5년 이내인 경우로 하고, 인슐린으로 치료하는 대상자는 제외하도록 하였다. 대상자의 연령, 체질량지수, 체지방량, 공복시 총콜레스테롤, 중성지방, 고밀도지단백 콜레스테롤 및 HbA1c, 인슐린, C-peptide를 측정하였고 "HOMA model"을 이용하여 베타세포의 기능과 인슐린저항성 정도를 평가하였다. 정상혈당클램프 검사(euglycemic hyperinsulinemic clamp test)를 시행하고 인슐린 투입전과 인슐린 투입 30분후, 두차례에 걸쳐 대퇴부 근육 생검을 실시한후 western 법으로 IR- β , IRS, Akt kinase, GSK-3의 인산화량을 측정하였다.

결과: 정상인 11명과 당뇨병 환자 9명을 대상으로 하였으며 대상자의 평균 연령, 평균 체질량지수, 체지방량, 허리/엉덩이 둘레의 비(waist hip ratio; WHR)는 두 군간에 차이가 없었다. 평균 공복혈당은 정상군 98.0 \pm 1.3 mg/dL, 당뇨병군 208.1 \pm 16.5 mg/dL ($p < 0.05$), HbA1c는 정상군 5.4 \pm 0.5%, 당뇨병군 9.2 \pm 0.6% ($p < 0.05$)였다. "HOMA model"을 이용한 베타세포의 기능과 인슐린저항성은 정상군 56.4 \pm 8.5%, 1.4 \pm 0.2, 당뇨병군 72.2 \pm 52.3% ($p < 0.01$), 10.2 \pm 6.3 ($p < 0.01$)였으며 정상혈당클램프 검사상 포도당 이용률은 정상군 8.2 \pm 0.6 mg/kg/min, 당뇨병군 3.7 \pm 1.1 mg/kg/min

($p < 0.01$)로 정상군과 당뇨병군간에 유의한 차이를 나타내었다.

Western blot법으로 IR- β , IRS, Akt kinase, GSK-3의 인산화량을 인슐린 투입전과 인슐린 투입 30분후 측정하였을 때 IR- β 에서는 정상군이 103.9 ± 2.3 에서 241.3 ± 18.6 , 당뇨병군이 108.9 ± 2.2 에서 198.7 ± 6.3 으로 증가하였다 ($p = NS$). 이는 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 통계적인 차이가 없었다. IRS에서는 정상군이 111.6 ± 7.3 에서 295.6 ± 17.2 , 당뇨병군이 114.5 ± 6.1 에서 222.0 ± 23.2 로 증가하였으며 ($p < 0.05$), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 24% 감소하였다. Akt kinase에서는 정상군이 100.6 ± 1.1 에서 735.2 ± 44.8 , 당뇨병군이 103.4 ± 6.0 에서 416.8 ± 29.5 로 증가하였으며 ($p < 0.01$), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 43% 감소하였다. GSK-3에서는 정상군이 107.7 ± 6.7 에서 595.7 ± 28.1 , 당뇨병군이 104.3 ± 4.8 에서 443.3 ± 12.9 로 증가하였으며 ($p < 0.01$), 인슐린 투입후 당뇨병군이 정상군과 비교하여 인산화량의 증가정도가 약 25% 감소하였다.

결론: 제2형 당뇨병 환자에서 정상인과 비교하여 인슐린 자극후 IR- β 는 인산화량의 증가정도가 큰 차이가 없었으나, IRS, Akt kinase, GSK-3에서는 인산화량의 증가 정도가 감소되는 것으로 보아 상위 인슐린 신호전달체계부터 결함이 있는 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E: *The pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. Diabetes Care. 15:318-368, 1992*
2. DeFronzo RA, Jocot E, Jequier E, Maeder E, Waren J, Felber JP: *The effect of insulin on disposal of intravenous glucose. Diabetes 30:1000-1007, 1981*
3. Kahn BB: *Type 2 diabetes. When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. Cell. 92:593-596, 1998*
4. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG: *Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. N Engl J Med 322:223-228, 1990*
5. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E, DeFronzo RA: *Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. J Clin Invest 84:205-213, 1989*
6. Bonadonna RC, Del Prato S, Bonora E, Saccomani MP, Gulli G, Natali A, Frascerra S, Pecori N, Ferrannini E, Bier D, Cobelli C, DeFronzo RA: *Roles of glucose transport and glucose phosphorylation in muscle insulin resistance of NIDDM. Diabetes 45:915-925, 1996*
7. Kahn CR: *Insulin action, diabetogenes, and the cause of Type 2 diabetes. Diabetes 43:1066-1084, 1994*
8. White MF, Kahn CR: *The insulin signaling system. J Biol Chem 269:1-4, 1994*
9. Heeson KJ, Harbeck M, Kahn CR, Denton RM: *Insulin action on metabolism. Diabetologia 40:B3-B9, 1997*
10. White MF: *The insulin signalling system and the IRS proteins. Diabetologia 40:S2-S17, 1997*
11. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE: *A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272:21403-21407, 1997*
12. Lavan BE, Lane WS, Lienhard GE: *The 60-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated adipocytes is a new member of the insulin receptor substrate family. J Biol Chem 272:11439-11443, 1997*

13. Vikamäki A, Ueki K, Kahn CR: *Protein-protein interactions in insulin signaling and the molecular mechanism of insulin resistance. J Clin Invest* 103:931-943, 1999
14. Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA: *Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. EMBO J* 14:4288-4295, 1995
15. Burgering BMT, Coffey PJ: *Protein kinase B(c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. Nature* 376:599-602, 1995
16. Didichenko SA, Tilton B, Hemmings BA, Ballmer-Hofer K, Thelen M: *Constitutive activation of protein kinase B and phosphorylation of p47phox by a membrane-targeted phosphoinositide 3-kinase. Curr Biol* 6:1271-1278, 1996
17. Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV: *Protein kinase C-as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. J Biol Chem* 272:30075-30082, 1997
18. Nakanishi H, Brewer KA, Exton JH: *Activation of the ζ isoenzyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate. J Biol Chem* 268:13-16, 1993
19. Saltiel AR, and Kahn CR: *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature* 414:799-806, 2001
20. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H: *Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. Diabetologia* 43:821-835, 2000
21. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: *Homeostasis model assessment:insulin resistance and β -cell function from fasting glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia* 28:412-419, 1985
22. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C: *Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima indians. N Engl J Med* 329:1988-1992, 1993
23. Pratipanawater W, Pratipanawater T, Cusi K, berria R, Adams JM, Jenkison CP, Maezono K, DeFronzo RA, Mandarino LJ: *Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. Diabetes* 50:2572-2578, 2001
24. Krook A, Björnholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR: *Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. Diabetes* 49:284-292, 2000
25. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: *Inhibition of glycogen synthesis kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature* 378:785-789, 1995
26. Reaven GM: *Role of insulin resistance in human disease. diabetes* 37:1595-1607, 1988
27. DeFronzo RA: *Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. Diabetes Review* 5:177-269, 1997
28. Reaven GM, Hollenbeck CB, Chen YDI: *Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non-obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. Diabetologia* 32:52-55, 1989
29. Kosaka K, Kuzuya T, Hagura R, and Yoshinaga H: *Insulin response to oral glucose load is*

- consistently decreased in established non-insulin dependent diabetes mellitus: the usefulness of decreased early insulin response as a predictor of diabetes mellitus. *Diabet Med* 13:S109-S119, 1996
30. Leahy JL: Natural history of β -cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care* 13:992-1010, 1990
31. Gerich JE: The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19:491-503, 1998
32. Emoto M, Nishizawa Y, Maekawa K, Hiura Y, Kanda H, Kawagishi T, Shoji T, Okuno Y, Morii H: Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Diabetes Care* 22:818-822, 1999
33. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M: Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23:57-63, 2000
34. Zierath JR, He L, Guma A, Odegaard Wahlstrom E, Klip A, Wallberg-Henriksson H: Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* 39:1180-1189, 1996
35. Zierath JR, Houseknecht KL, Kahn BB: Glucose transports and diabetes. *Semin Cell Dev Biol* 7:295-307, 1996
36. Carey JO, Azevedo J, Jr Morris PG, Pories WJ, Dohm GL: Okadaic acid, vanadate, and phenylarsine oxide stimulate 2-deoxyglucose transport in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes* 44:682-688, 1995
37. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL: Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest* 95:2195-2204, 1995
38. Heydrick SJ, Gautier N, Olichon-Berthe C, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y: Early alteration of insulin stimulation of PI 3-kinase in muscle and adipocyte from gold thioglucose obese mice. *Am J Physiol* 268:E604-612, 1995
39. Heydrick SJ, Jullien D, Gautier N, Tanti JF, Giorgetti S, Van Obberghen E, Le Marchand-Brustel Y: Defect in skeletal muscle phosphatidylinositol-3-kinase in obese insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 91:1358-1366, 1993
40. Folli F, Saad MJA, Baker JM, Kahn CR: Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. *J Clin Invest* 92:1787-1794, 1993
41. Saad MJA, Folli F, Kahn CR: Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* 92:2065-2072, 1993
42. Saad MJA, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR: Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* 90:1839-1849, 1992
43. Maegawa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M: Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes* 40:815-819, 1991
44. Klein HH, Vestergaard H, Kotzke G, Pederson O: Elevation of serum insulin concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp studies leads to similar activation of insulin

- receptor kinase in skeletal muscle of subjects with and without NIDDM. Diabetes 44:1310-1317, 1995*
45. Björnholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR: *Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in skeletal muscle from NIDDM subjects following in vivo insulin stimulation. Diabetes 46:524-527, 1997*
46. Nolan JJ, Freidenberg G, Henery R, Reichart D, Olefsky JM: *Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes mellitus and obesity. J Clin Endocrinol Metab 78:471-477, 1994*
47. Arner P, Pollare T, Lithell H, Livingston JN: *Defective insulin receptor tyrosine kinase in human skeletal muscle in obesity and Type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 30:437-440, 1987*
48. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB: *Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. J Clin Invest 104:733-741, 1999*
49. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H: *Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from non-insulin-dependent diabetic subjects. Diabetes 47:1281-1286, 1998*
50. Cohen P: *The role of protein phosphorylation in the hormonal control of enzyme activity. Eur J Biochem 151:439-448, 1985*