

Hamster Insulinoma 세포에서
ATP의 인슐린 분비에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
이 건 일

Hamster Insulinoma 세포에서
ATP의 인슐린 분비에 미치는 영향

지도 공 인 덕 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 건 일

이건일의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

부족한 저를 기초의학의 길로 인도해주시고 어려운 고비마다 극복할 수 있도록 지혜와 용기를 주신 하나님께 감사드립니다. 본 논문이 나오기까지 연구여건을 제공해 주시고 모든 면에서 세심한 지도를 아끼지 않으신 공인덕 교수님께 진심으로 감사를 드리며 논문의 내용에 많은 지도와 조언을 주신 이중우 교수님과 정춘희 교수님, 본 연구가 완성되기까지 바쁘신 가운데 연구와 실험 전반에 대한 조언과 많은 도움을 주신 정성우 교수님과 박규상 교수님, 그리고 생리학교실 여러 선생님들께 감사를 드립니다. 인슐린 측정에 필요한 장비와 시약을 쓸 수 있도록 도와주신 임상병리과의 방사면역부 선생님들께도 감사의 말씀을 전합니다. 항상 격려해주시고 조언해주시는 김명순 교수님과 오늘날의 저를 위해 항상 노심초사하시며 희생과 사랑을 베풀어주신 부모님께 감사의 마음을 전하며 사랑하는 가족과 함께 작은 결실의 기쁨을 나누고 싶습니다.

2003년 6월

저자 씀

차 례

그 립 차 례	ii
국문요약	iii
제1장 서론	1
제2장 재료 및 방법	4
2.1. 세포 배양	4
2.2. 방사면역법을 이용한 인슐린 측정	4
2.3. 여러 뉴클레오티드의 인슐린분비에 대한 영향 측정	5
2.4. 세포내 유리 칼슘농도 측정	5
2.5. 세포막을 통한 이온전류 측정	6
2.6. 약물	7
2.7. 자료 분석	8
제3장 결과	10
3.1. 포도당 및 KCl의 인슐린 분비	10
3.2. 여러 뉴클레오티드의 인슐린 분비에 대한 영향	10
3.3. 퓨린 수용체 차단제의 영향	15
3.4. 저·고농도 포도당에서 ATP의 인슐린 분비에 대한 영향	15
3.5. Pertussis toxin 전처리 효과	18
3.6. ATP에 의한 세포내 유리 칼슘의 변화	19
3.7. ATP에 의해 유발된 내향 전류	22
제4장 고찰	25
제5장 결론	31
참고 문헌	32
영문 요약	38

그림 차례

그림 1. HIT-T15 세포들의 광학현미경적 소견	9
그림 2. 포도당의 농도와 배양 시간에 따른 인슐린 분비량	12
그림 3. KCl의 인슐린 분비에 미치는 영향	13
그림 4. 여러 뉴클레오티드들의 인슐린 분비에 미치는 영향	14
그림 5. 퓨린 수용체 차단제 전처치로 인한 ATP의 인슐린 분비 억제 효과의 변화	16
그림 6. 포도당의 고저에 따른 ATP의 인슐린분비 억제 효과의 차이	17
그림 7. Pertussis toxin 전처치의 인슐린 분비와 ATP의 인슐린 분비 억제 효과에 대한 영향	18
그림 8. ATP의 세포내 유리 칼슘 증가	20
그림 9. ATP에 의해 유발된 내향전류의 특성	23

국 문 요 약

Hamster Insulinoma 세포에서 ATP의 인슐린 분비에 미치는 영향

세포외액의 뉴클레오티드는 세포외의 신호전달물질로서 생체내의 다양한 생리 작용에 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 왔다. 퓨린수용체 효현제들은 인슐린 분비에 영향을 미치지만, 영향의 성향과 그 때 관여하는 퓨린 수용체의 아형이 종간에 따라 달라 논쟁의 여지가 있다. 퓨린 수용체의 인슐린 분비에 대한 효과와 그 아형을 규명하기 위하여 본 연구에서는 햄스터의 췌장 β세포주인 HIT-T15를 대상으로 인슐린 농도, 세포내 유리 칼슘 및 내향성 전류를 측정하여 뉴클레오티드에 의한 반응을 관찰하였다.

인슐린 분비는 포도당에 의하여 농도 의존적으로 증가하였고 EC_{50} 는 10.2 mM이었으며 1시간 배양 중 20분까지 63.3 %, 40분까지 88.2 %가 분비되었다. 또한, 탈분극을 유발하는 KCl에 의해서 인슐린 분비는 농도에 비례하여 증가하였다. 그러나 ATP는 농도 의존적으로 인슐린 분비를 억제시켰으며 상대적 효력 및 효과 (IC_{50} : μM)는 $BzATP (6.9) > ATP (20.4) \geq \alpha\beta-MeATP (23.3) \geq 2-MeSATP (24.9)$ 순으로 나타났다. 그외 ADP, AMP, ATPP, adenosine, UTP 및 UDP 등은 효과가 거의 없었다. 이와 같은 퓨린 효현제의 인슐린 분비 억제 효과는 기존에 보고된 $P2X_7$ 효력비교와 유사하였다. ATP의 이런 효과는 $P2X_7$ 차단제인 oxidized ATP의 전처치에 의하여 거의 억제되었으며 오히려 인슐린 분비는 $ATP > \alpha\beta-MeATP > 2-MeSATP$ 순으로 증가하였다. 아데닌 뉴클레오티드들은 포도당이 3 mM 일 때는 31.8 %의 인슐린 분비를 억제하였고 15 mM일 때는 43.7 %를 억제하였다. Go/i 억제제인 pertussis toxin의 전처치는 ATP의 억제효과에 영향이 없었다. ATP와 BzATP는 일시적인 세포내 유리 칼슘을 증가시켰는데 각각의 EC_{50} 는 409.5, 155.1 μM 이다. ATP와 BzATP는 비활성화되지 않는 내향

전류를 발생시키는데 역전전위가 거의 0 mV 이었다.

위의 실험결과로 미루어보아, ATP는 HIT-T15 세포에 내재적으로 발현되어 있는 P2X₇ 수용체 활성화를 통해 세포내 유리 칼슘을 증가시키고, 내향전류를 유발하며, 그리고 인슐린 분비를 억제하는 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : Adenosine 5'-triphosphate (ATP), HIT-T15 세포, 인슐린, P2X₇

Hamster Insulinoma 세포에서 ATP의 인슐린 분비에 미치는 영향

<지도 공인 덕 교수>

연세대학교 대학원 의학과

이 건 일

제1장 서론

세포내에서 ATP (adenosine 5'-triphosphate)의 주작용은 근 수축, 막을 통한 물질이동 및 고분자물질 합성 등과 같은 능동적 과정의 에너지원으로 이용되는 것이다. 또한 이들의 일부는 적은 양이기는 하나 세포외액에서 퓨린 수용체를 활성화하는 중요한 신호전달 물질로 작용하여 다양한 생물학적 효과를 나타낸다. 퓨린 수용체의 활성화는 신경전달물질과 효소분비 및 면역학적 반응 등과 같이 비교적 짧은 기간동안의 생리작용 뿐만 아니라 세포성장, 분화 및 증식과 같은 장시간의 생리작용에서도 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Abbraccio 및 Burnstock, 1998; Ralevic 및 Burnstock, 1998; Burnstock, 1990). 퓨린 수용체는 그 수용체를 활성화시키는 효현제들의 종류에 따라 크게 adenosine에 의하여 활성화되는 P1수용체와 ATP를 비롯한 뉴클레오티드에 의하여 활성화되는 P2 수용체로 나뉘어 진다. 이 중 P2 수용체는 더 다양한 특성을 나타내는데 ionotropic 수용체인 P2X와 metabotropic 수용체인 P2Y로 나눌 수 있으며, 각각은 효현제들의 선택성과 분자생물학적 특성을 바탕으로 P2X₁₋₇, P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12} 등으로 세분화되어 있다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998; von Kugelgen 및 Wetter, 2000; Burnstock 및 Williams, 2000). 이온통로와 연관되어 있는 P2X 수용체는 양이온에 대한 선택적 투과도를 증가시켜 막전압을 탈분극시키고 세포 내 칼슘농도를 증가시킨다. 이

수용체는 주로 신경과 평활근 같은 흥분성 조직에 분포하며 흥분성 신경전달에 관여한다. 한편 P2Y 수용체는 G-단백질을 매개로 phospholipase C를 활성화시켜 IP₃를 형성한다. 형성된 IP₃는 세포 내의 칼슘농도를 증가시켜 호르몬 분비, 물질 대사, 근 수축과 같은 기능을 나타낸다. 이와 같이 P2 수용체는 주로 세포의 흥분에 관여하며, 내분비세포인 경우에는 세포의 흥분과 함께 호르몬 분비를 일으킨다 (Burnstock, 1997; Ralevic 및 Burnstock, 1998; von Kugelgen 및 Wetter, 2000).

세포외액의 ATP는 P2 수용체를 활성화하여 췌장 β세포의 인슐린 분비를 효과적으로 조절할 수 있다 (Hillaire-Buys 등, 1994). ATP는 아세틸콜린과 카테콜아민 함유 vesicle의 중요한 요소이며 (Bertrand 등, 1986; Burnstock, 1994) 췌장 섬의 교감 및 부교감 신경말단의 풍부한 분포를 보면 ATP의 인슐린 분비 조절의 생리적 기능이 가능하리라 유추할 수 있다 (Gilon 및 Henquin, 2001; Ahren, 2000). 게다가 인슐린이 함유된 granule에 ATP의 농도가 높을 것을 보아 ATP는 인슐린 분비의 되먹임 역할을 할 것으로 보인다 (Detimary 등, 1996). 췌장 β세포에서 세포외 ATP는 이온 통로의 활성화와 세포내 칼슘변화 등의 많은 신호 전달 과정과 상호작용을 한다 (Li 등, 1991; Arkhammar 등, 1990; Geschwind 등, 1989; Petit 등, 1989; Squires 등, 1994). 세포외 ATP가 P2 수용체를 통하여 쥐 췌장 섬과 인슐린종 세포주에서 인슐린을 분비한다는 것은 오래 전부터 알려져 왔으며 (Loubatieres-Mariani 등, 1979; Hillaire-Buys 등, 1994) 이 수용체는 약리적으로 P2Y 수용체의 특성이 있는 것으로 규명되었다 (Bertrand 등, 1987; Hillaire-Buys 등, 1994). 이외에도 P2X의 활성화에 의한 인슐린 분비 증가와 P1 수용체의 활성화에 의한 인슐린 분비 억제도 보고된 바 있다 (Petit 등, 1998; Verspohl 등, 2002). 이와 더불어 P2Y 및 P2X의 cDNA clone이 insulinoma cDNA library에서 발견되었다 (Tokuyama 등, 1995; Wang 등, 1996). 반면에 세포외 ATP는 마우스 췌장 β세포에서 인슐린 분비를 억제한다 (Petit 등, 1989; Poulsen 등 1999). 이런 억제는 ⁸⁶Rb efflux와 전기적 활성의 감소와 관련되어 있고 (Petit 등, 1989), 세포내 유리 칼슘의 증가와 K_{ATP}의 활성 감소에도 불구하고 exocytosis를 직접 억제하여 이루어진다고 하였다 (Poulsen 등, 1999).

인슐린 분비에 대한 ATP의 영향은 종간의 차이를 보이고 있으며 수용체의 종

류에 따라서도 다른 영향을 나타내고 있다. Hamster insulinoma 세포 (HIT T-15)는 췌장 β 세포로부터 유래된 내분비 종양 세포로 가장 중요한 분비자극인 포도당을 비롯한 각종 인슐린 분비자극에 대하여 정상 췌장 β 세포의 반응을 비교적 잘 유지하고 있다고 알려져 있으나 (Santerre 등, 1981) 퓨린 수용체에 대한 연구는 미비하다. 따라서 본 실험에서는 HIT-T15 세포주에서 ATP를 비롯한 여러 뉴클레오티드에 의한 인슐린 분비 반응을 관찰하고 이러한 작용을 매개하는 퓨린 수용체의 종류 및 특성을 규명하고자 하였다.

제2장 재료 및 방법

2.1. 세포 배양

한국세포주은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 배양하고 있는 HIT-T15 세포를 10% heat-inactivated fetal bovine serum, antimycotic-antibiotics가 포함된 RPMI 1640 성장배지 (Gibco BRL, NY, USA)로 5% CO₂, 95% air, 37°C 상태의 항온 항습기에서 배양하였다. 성장배지는 2~3일에 한번씩 갈아주고, 7~10일 사이에 한번씩 계대배양을 하였다.

2.2. 방사면역법을 이용한 인슐린 측정

인슐린 분비는 37°C KRBB (Krebs-Ringer bicarbonate buffer, NaCl 118.5, KCl 4.74, CaCl₂ 2.54, KH₂PO₄ 1.19, MgSO₄ 1.19, NaHCO₃ 25, HEPES 10 mM, 0.1% bovine serum albumin, pH 7.4)에서 1×10⁵/ml의 세포를 정적배양하여 측정하였다. 2시간동안 전배양 후 배양액을 제거하고 다시 1시간동안 주어진 농도의 포도당과 약물을 넣어 배양하였다. 배양이 끝나면 부유액은 흡입하여 인슐린을 측정할 때까지 -20 °C에 보관하였다. 인슐린의 측정은 쥐의 인슐린을 대조군으로 하여 이중항체방사면역법 (LINCO Research Inc, Missouri, U.S.A.)을 이용하여 측정하였다. 흡입한 부유액에서 원심분리로 상층액을 분리한 후 ¹²⁵I-Insulin (100 μl)을 첨가하고 Guinea Pig anti-Rat Insulin Serum (100 μl)을 넣었다. 잘 섞은 후 20시간 이상 4 °C에서 배양시켰다. Goat anti-Guinea Pig IgG Serum (1 ml)을 첨가하고 부드럽게 섞어 20분간 4 °C에서 배양한 후 2000 ~ 3000×g로 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 감마카운터 (RIA-MA 280, Byk-Sangtec Diagnostics, Germany)로 radioactivity를 1분간 측정하였다. 모든 sample은 두 개로 나누어 측정하고 그 평균값을 사용하였다.

2.3. 여러 뉴클레오티드의 인슐린분비에 대한 영향 측정

포도당 및 KCl을 처치한 후 인슐린의 분비반응을 측정하여 대조군으로 삼았다. 시간에 따른 분비량을 알아보기 위해 10분 간격으로 1시간 동안 인슐린 분비량을 측정하였다. ATP, BzATP, $\alpha\beta$ -MeATP, 2-MeSATP 등의 여러 뉴클레오티드 (3 ~ 100 μ M)를 가하여 이들에 의한 인슐린 분비량 변화를 기록하였다. 이때 분비된 양은 대조군에 비교하였으며 최대 효과의 50%를 발휘시키는데 필요로 하는 효현제의 농도 (IC₅₀ 또는 EC₅₀)를 구하여 이를 서로 비교하였다. 퓨린수용체 억제제인 suramin, PPADS, oxidized ATP를 2시간 전처치하고 주요한 뉴클레오티드의 효과를 비교하였으며 Go/i 억제제인 pertussis toxin도 14 ~ 18 시간 전처치 한 후 뉴클레오티드의 효과를 비교하였다. 또한, 포도당의 농도를 3 mM, 15 mM로 나누어 뉴클레오티드의 효과의 차이를 살펴보았다. 특별한 언급이 없는 한 실험은 포도당이 10 mM인 상태에서 시행하였다.

2.4. 세포내 유리 칼슘농도 측정

HIT-T15 세포가 자라고 있는 배양용기에 0.25% trypsin을 약 5분간 처리한 후 세포들을 원심분리 (400 × g, 5 min)하여 회수하였다. 이어 NaCl 125, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucose 6, HEPES 25, CaCl₂ 2 mM (pH 7.4)로 조성된 Krebs-Ringer Hansleit (KRH) 용액으로 2회 세척한 후, 0.2% bovine serum albumin을 포함한 KRH 용액에 세포를 5 X 10⁶ cells/ml 되게 부유시켰다. 세포부유액에 Fura-2/AM을 최종 3 μ M되도록 가하여 항온수조 (37°C)에서 분당 60회 정도로 흔들며 주면서 30분간 부하 (loading) 시켰다. 이때 Fura-2/AM의 효과적인 부하를 위해 비이온성 계면활성제 (non-ionic detergent)인 pluronic acid를 0.025%(w/v)농도로 첨가하였다. 부하가 끝난 후 세포외액의 잔여 Fura-2/AM을 제거하기 위해 bovine serum albumin-free KRH 용액으로 3회 세척한 뒤, 2 X 10⁶ cells/ml의 농도로 세포부유액을 만들었다. Fura-2/AM을 세포 내로 부하시키

거나, 세척할 때에는 형광염료의 누출 (fluorescence dye leakage)을 최소화하기 위해 250 μ M의 sulfinpyrazone이 포함된 KRH 용액을 사용하였다.

세포 내 유리 칼슘 농도의 변화는 형광분광 광도계 (fluorescence spectrophotometer, Model F-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)의 세포내 양이온 측정장치 (intracellular cation measurement system)를 이용하여 기록하였다. Fura-2가 부하된 균질의 세포부유액 일정량 (400 μ l)을 stirring bar가 들어 있는 quartz cuvette에 옮긴 후 교반하면서, 340 및 380 nm의 파장으로 교대로 (측정간격: 0.5 초) 여기 (excitation)시킬 때 방출 (emission)되는 형광신호를 510 nm의 파장에서 지속적으로 측정하였다. 세포 부유액은 37°C의 온도 하에서 약 5분 정도 기다려 평형에 이르게 한 다음, 약물을 cuvette 내에 가하여 약 300 초간 세포내 유리 칼슘의 변화를 관찰 및 기록하였다. 실험 끝에는 0.1% triton X-100 및 10 mM EGTA를 가하여 Fmax (fluorescence maximum)와 Fmin (fluorescence minimum)을 각각 구하며, 이때 세포 내 유리 칼슘 농도는 형광비 (fluorescence ratio, F_{340}/F_{380})를 이용하여 Grynkiewicz 등 (1985)의 방법으로 계산하였다.

2.5. 세포막을 통한 이온전류 측정

이온전류는 patch clamp amplifier (EPC7, Instrutech Corp., NY, USA)를 사용하여 whole-cell patch clamp 방법으로 기록하였다. 측정 전극은 borosilicate glass capillary (외경; 1.65 mm, 내경; 1.2 mm, Corning 7052, Garner Glass Co., Claremont, CA, USA)를 P-97 Flaming-Brown micropipette puller (Sutter Instrument Co., Novato, CA, U.S.A.)로 뽑아 제작하였다. 전극은 Sylgard 184 (Dow Corning, Midland, MI, USA)로 코팅하며, 전극내부에 용액을 채웠을 때 저항이 1.5~2.5 M Ω 이 되도록 microforge (MF-83, Narishige)를 이용하여 열처리로 다듬었다. 세포가 들어 있는 culture dish를 도립현미경 (inverted microscope; IMT-2, Olympus, Tokyo, Japan) 위에 올려놓고, 세포외액을 중력에 의해 1~2 ml/min 속도로 관류시켰다. 약물이 포함된 용액은 polyethylene관과 연결된 gas

chromatography용 모세관을 통해 세포에 가해지도록 하며, 이때 모세관의 끝이 세포의 100 μm 이내에 위치하도록 하였다.

비선택적 양이온 통로 측정을 위한 전극내 용액 (internal solution)의 조성 (mM)은 135 CsCl, 1 MgCl₂, 10 ethyleneglycol-bis-(β aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 HEPES, 5 MgATP, 0.5 Na₂GTP, 2.5 Tris-phosphocreatine (pH 7.2 with Tris, 300 mosm/kg H₂O)으로 한다. 세포외 관류액 (external solution)의 조성 (mM)은 140 CsCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES, 5 glucose, (pH 7.4 with Tris, 300 mosm/kg H₂O)로 하여 실험하였다. 막전압 고정법 (voltage clamp) 기록을 위해서 세포막의 capacitance와 series resistance는 80% 이상 보정하며, AD converter (Digidata 1200, Axon Instruments)상에 디지털화 된 sampling rate는 5-10 kHz, low-pass filter는 2-5 kHz (-3dB)로 하였다. 실험결과는 pClamp6 software (Axon Inc., Foster city, CA, USA)를 통해 컴퓨터에 저장하여 분석하였다.

2.6. 약물

Adenosine, adenosine 5'-monophosphate (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP), adenosine 5'-triphosphate (ATP), adenosine 5'-tetraphosphate (ATPP), α , β -methylene adenosine 5'-triphosphate (α , β -MeATP), 2-methylthio-adenosine triphosphate (2-MeSATP), uridine 5'-diphosphate (UDP), uridine 5'-triphosphate (UTP), Benzoyl-Benzoyl ATP (BzATP), oxidized ATP (\circ ATP), sulfinpyrazone, pertussis toxin (PTX), suramin, PPADS, EGTA, triton X-100, bovine serum albumin, 및 0.25% trypsin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum 및 antimycotic-antibiotic는 GIBCO (Grand Island, NY, USA)로부터 fura-2/AM, pluronics은 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 각각 구입하였다. Adenosine은 DMSO에 녹였고, 그 외의 모든 시약은 삼차 증류수에 녹여 사용하였다.

2.7. 자료 분석

모든 결과는 평균 \pm 표준오차(S.E.M.)로 나타내며, 통계적인 의의는 t-검정과 분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하여, p값이 0.05이하일 때를 유의한 차이가 있다고 간주하였다.

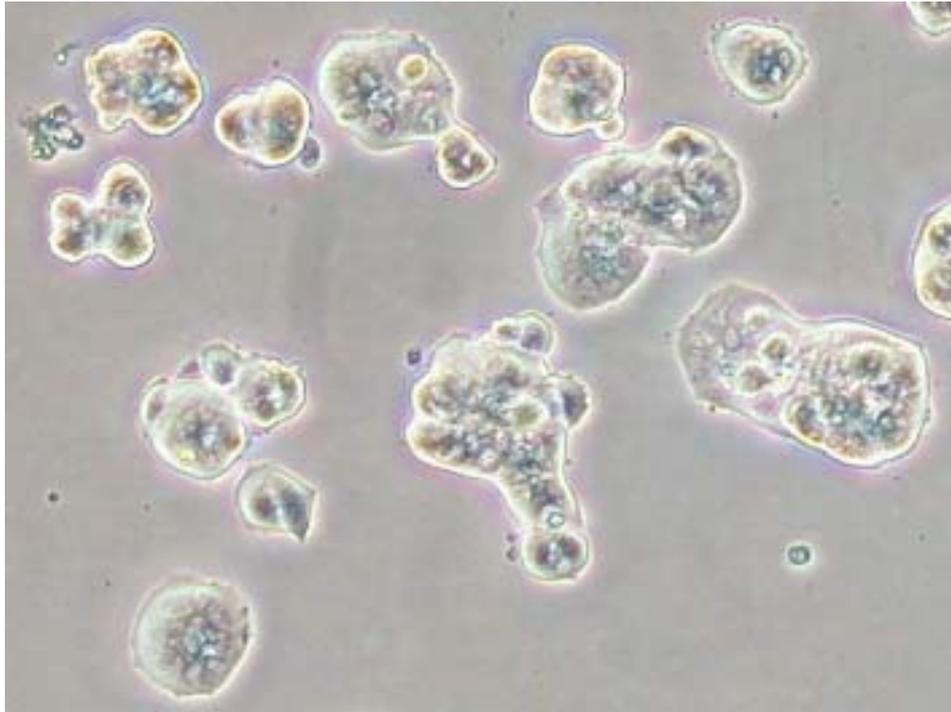


그림 1. HIT-T15 세포들의 광학현미경적 소견 (×200)

제3장 결과

3.1. 포도당 및 KCl의 인슐린 분비

인슐린 분비는 포도당 농도를 달리한 정적배양상태에서 이중항체 방사면역법으로 측정하였다 (그림 2A). 인슐린의 분비량은 포도당의 농도에 의존하여 증가하였다. 포도당이 없을 때는 0.6 ± 0.2 ng/ml의 인슐린이 분비되었고 20 mM 포도당에서는 4.7 ± 0.5 ng/ml이 분비되었으며 ($n = 6$) 최대효과의 반을 나타내는 포도당 농도는 (EC_{50}) 10.2 ± 1.3 mM 이었다. 분비 시간과 분비된 인슐린 양의 관계는 초기 대량 분비와 점차 분비되는 양이 감소하는 hyperbolar 유형이었다 (그림 2B). 포도당이 6 mM일 때 1 시간동안 분비된 인슐린 양을 10분 간격으로 측정하였다. 1시간동안 분비된 양에 대한 퍼센트로 나타내보면 6.6 ± 3.0 % (0 분), 60.6 ± 8.5 % (20 분), 83.7 ± 6.8 % (40 분)이다 ($n = 6$). KCl은 탈분극을 유발하여 세포내 유리 칼슘을 증가시킨다고 알려져 있다. ATP의 효과와 비교하기 위해 KCl에 의해 분비된 인슐린을 측정하였다. KCl을 15 mM에서 90 mM까지 농도를 증가하여 가한 후, 인슐린 분비 변화를 그림 3에 나타내었다. 인슐린 분비는 KCl의 농도에 따라 비례하여 증가하였으며 90 mM KCl은 대조군에 비해 93.7 %의 인슐린 분비를 증가시켰다.

3.2. 여러 뉴클레오티드의 인슐린 분비에 대한 영향

포도당에 의해 분비된 인슐린에 대한 뉴클레오티드의 영향을 알아보기 위해 포도당 10 mM일 때 ATP, ADP, AMP, ATPP, BzATP, 2-MeSATP, $\alpha\beta$ -MeATP, adenosine, UTP 및 UDP (100 μ M)를 가한 후 분비된 인슐린 양을 비교하였다 (그림 4A, $n = 8$). 이 중 ATP, BzATP, 2-MeSATP, $\alpha\beta$ -MeATP에서 인슐린 분비가 각각 28.7 ± 7.9 %, 51.2 ± 6.7 %, 21.6 ± 8.0 %, 24.5 ± 7.0 %

억제되어 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 인슐린 분비억제에 대한 효능은 BzATP > ATP > $\alpha\beta$ -MeATP > 2-MeSATP 순 이었다. 따라서 이들의 인슐린 분비 억제 효과를 비교하기 위해 3 μ M ~ 100 μ M의 농도로 세포에 가하여 IC_{50} 를 구하였다 (그림 4B). 인슐린 억제의 효력 (IC_{50})은 BzATP ($6.9 \pm 3.7 \mu$ M) > ATP (20.4 ± 3.2) \geq $\alpha\beta$ -MeATP (23.3 ± 3.3) \geq 2-MeSATP (24.9 ± 4.0) 순 이었다. 이런 결과는 쥐와 마우스의 P2X₇ 수용체의 특성 (Surprenant 등, 1996; Chessell 등, 1998)과 유사하여 HIT-T15 세포에서 ATP에 의해 활성화된 주요한 퓨린 수용체가 P2X₇ 수용체임을 나타낸다.

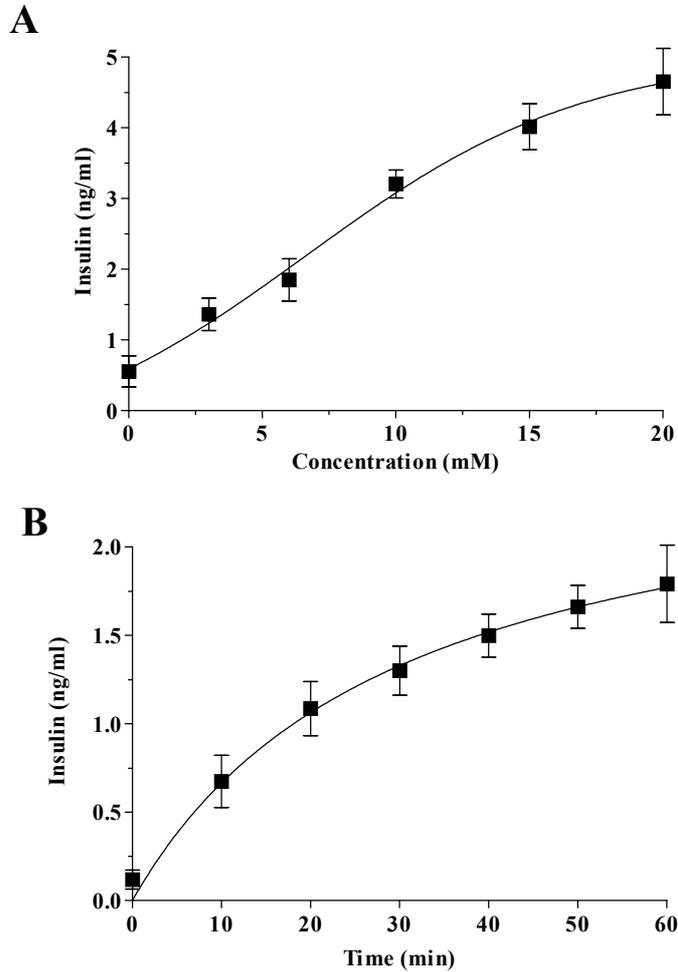


그림 2. 포도당의 농도와 배양 시간에 따른 인슐린 분비량. 1×10^5 /ml의 HIT-T15 세포에 포도당 (0 ~ 20 mM)을 가하고 1시간의 정적배양 후 분비된 인슐린 양을 나타내었다 (A, 실험례 수는 6임). 포도당의 농도가 증가함에 따른 인슐린 분비 반응의 증가는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.0001$). 포도당을 6 mM로 고정하고 10분 간격으로 1시간까지 인슐린 분비량을 측정하여 나타내었다 (B, 실험례 수는 6임). 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며 반응 곡선은 GraphPad Prism을 이용하여 non-linear regression 분석으로 그려졌다.

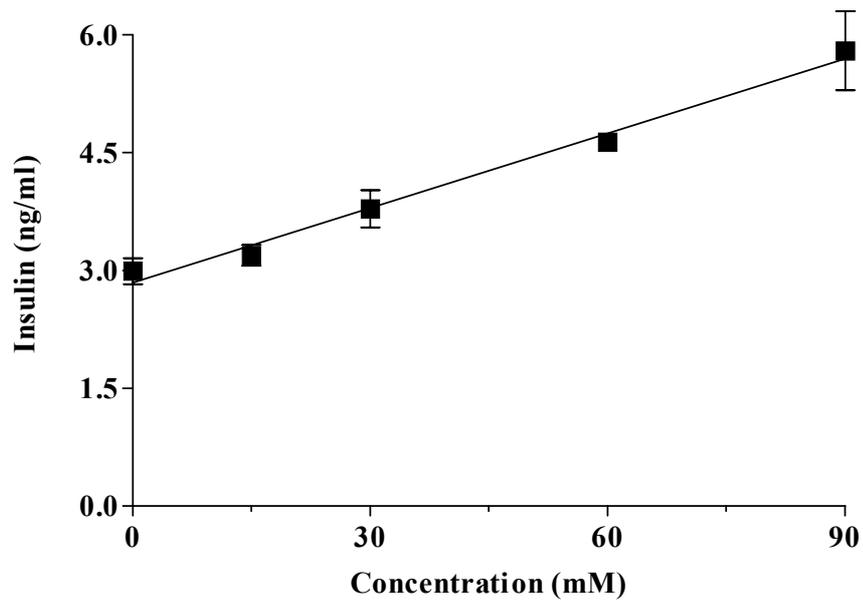


그림 3. KCl의 인슐린 분비에 미치는 영향. 포도당이 10 mM일 때 세포에 KCl (0 ~ 90 mM)을 가한 후 인슐린 분비량의 변화를 평균과 표준오차로 나타내었다 (실험례 수는 6임, $r^2 = 0.74$).

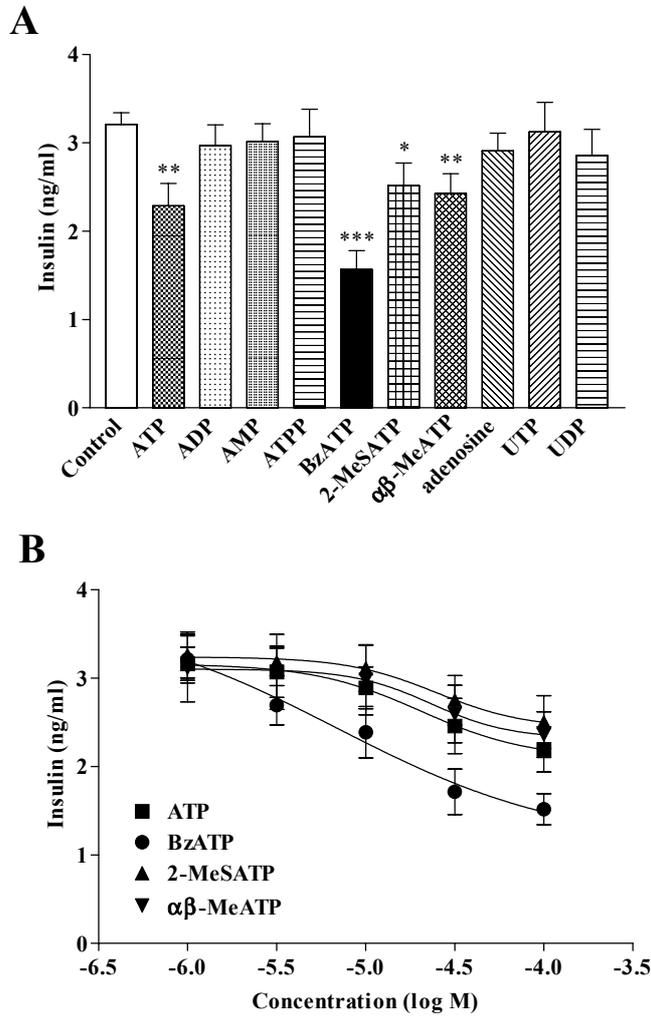


그림 4. 여러 뉴클레오티드들의 인슐린 분비에 미치는 영향. (A) ATP, ADP, AMP, ATPP, BzATP, 2-MeSATP, $\alpha\beta$ -MeATP, adenosine, UTP 및 UDP (100 μ M)의 인슐린 분비에 미치는 효과를 비교하였다. (B) 3 ~ 100 μ M의 ATP(■), BzATP(●), 2-MeSATP(▲) 및 $\alpha\beta$ -MeATP (▼)를 투여한 후 분비된 인슐린 양을 농도에 따라 나타내었다. 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며 실험례 수는 각각 8 (A), 6 (B)임. *은 $p < 0.05$, **은 $p < 0.01$, ***은 $p < 0.0001$ 임.

3.3. 퓨린 수용체 차단제의 영향

퓨린 수용체의 아형을 확인하기 위해 퓨린 수용체 차단제의 전처치에 따른 영향을 확인하였다. P₂ 수용체의 비선택적 차단제인 PPADS 와 suramin (200 µM) 은 ATP의 인슐린 분비 억제에 거의 영향이 없었다 (결과 생략). 반면, P2X₇ 수용체의 선택적 차단제인 oxidized ATP (200 µM) (Murgia 등, 1993)의 2시간 전처치에 의해서 BzATP의 인슐린 억제효과는 14.6 ± 8.4 %로 현저하게 감소되었고 ATP, 2-MeSATP, αβ-MeATP (100 µM)는 반대로 각각 47.4 ± 10.4 %, 19.4 ± 4.1 %, 33.2 ± 6.7 %씩 인슐린 분비를 증가시키는 효과를 보였다 (그림 5, n = 6).

3.4. 저 · 고농도 포도당에서 ATP의 인슐린 분비에 대한 영향

ATP의 인슐린 분비 억제작용과 포도당의 농도의 관계를 살펴보기 위하여 포도당의 농도를 3 mM, 15 mM로 달리하여 뉴클레오티드의 효과를 살펴보았다. 그림 6은 포도당이 3 mM, 15 mM 일 때의 인슐린 분비에 대한 네 뉴클레오티드의 효과를 나타내었다. 인슐린 분비는 포도당이 15 mM일 때 3mM일 때보다 208.3 % 증가하였다 ($p < 0.001$). 3 mM 포도당에서 ATP와 BzATP가 통계적으로 유의하게 인슐린을 억제하였으나 15 mM 포도당에서는 4 개의 뉴클레오티드 모두가 통계적으로 유의하였다. 네 효현제는 평균적으로 포도당이 3 mM 일 때 31.8 ± 1.8 %를, 15 mM 일 때는 43.7 ± 3.1 %를 억제하였다. 비록 ATP가 포도당의 농도의 고저에 상관없이 인슐린 분비를 억제하나 포도당 농도가 높아 인슐린 분비가 증가되어있는 경우엔 인슐린 분비 억제 효과가 더 크게 나타났다. 이것은 ATP가 주로 포도당에 의해 분비된 인슐린을 억제한다는 것을 나타낸다.

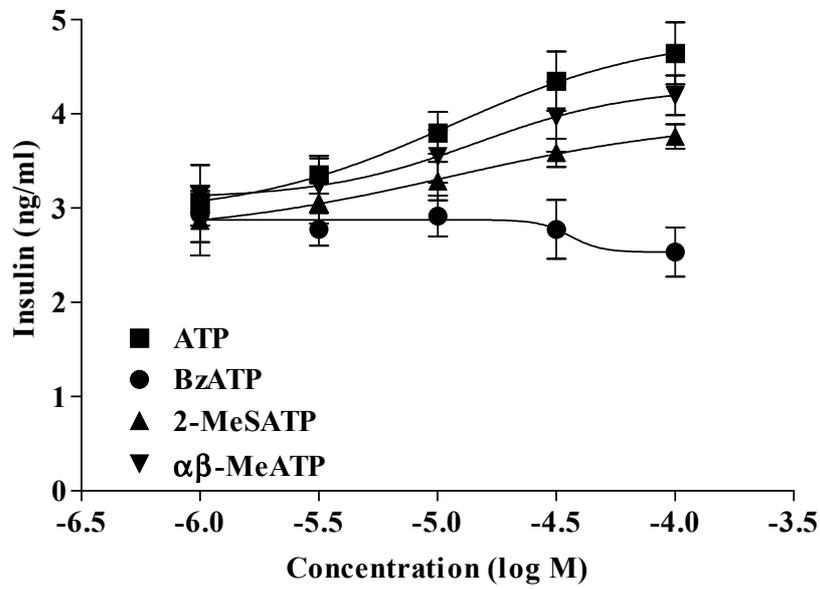


그림 5. 퓨린 수용체 차단제 전처리로 인한 ATP의 인슐린 분비 억제 효과의 변화. P2X₇ 선택적 차단제인 oATP (200 μM)를 2시간 전처리한 후 3 ~ 100 μM의 ATP (■), BzATP (●), 2-MeSATP (▲), αβ-MeATP (▼)에 의한 인슐린 분비량을 비교하였다. 결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며 실험례 수는 6임.

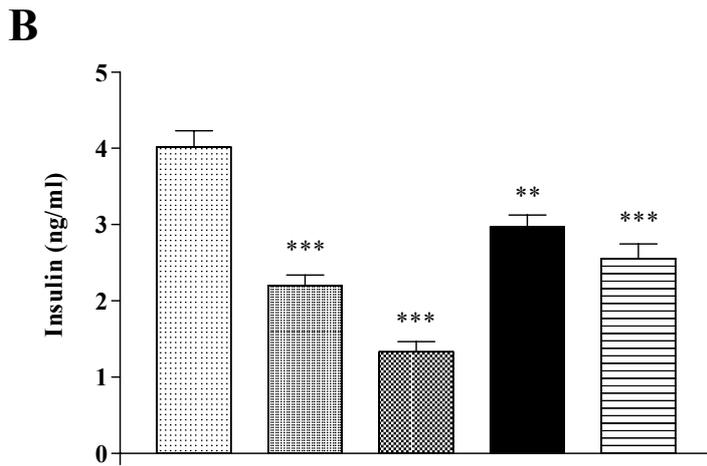
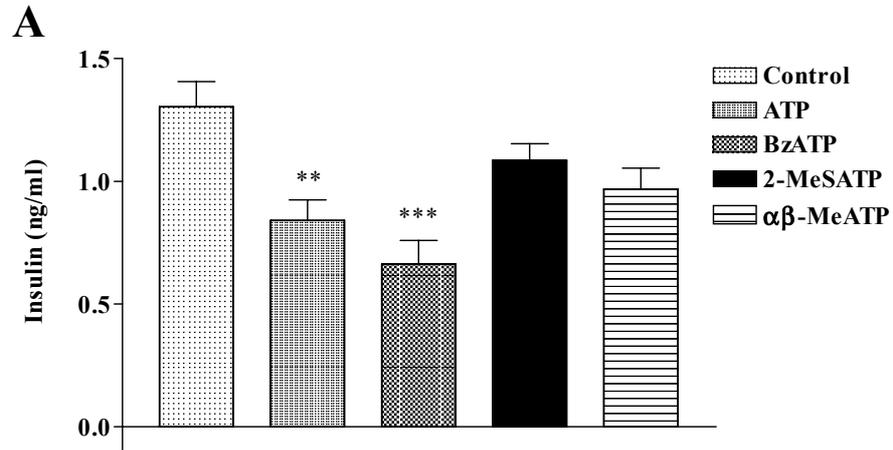


그림 6. 포도당의 고저에 따른 ATP의 인슐린 분비 억제 효과의 차이. 포도당을 저농도 (3 mM, A)와 고농도 (15 mM, B)로 차이를 두고 각각 ATP, BzATP, 2-MeSATP, $\alpha\beta$ -MeATP (100 μ M)을 투여한 후 인슐린을 측정하였다. 결과는 평균과 표준오차로 나타내었다. 실험례 수는 6 이었고, **은 $p < 0.01$, ***은 $p < 0.001$ 임.

3.5. Pertussis toxin 전처리 효과

다양한 기전으로 인슐린 분비를 억제하는 Go/i (Sharp, 1996)의 관련 여부를 알기 위해 G 단백질의 α subunits 중 Go/i를 선택적으로 억제하는 pertussis toxin을 전처리하여 그 효과를 알아보았다. Pertussis toxin (500 nM)을 14 ~18시간 전처리 한 후 여러 퓨린수용체 효현제들을 처리하여 분비된 인슐린 양을 측정하였다. ATP, BzATP, 2-MeSATP, $\alpha\beta$ -MeATP (100 μ M) 모두에서 억제 반응은 차단되지 않았으며, 대조군에 비해서 인슐린 분비가 약간 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (그림 7, n = 6). 따라서 ATP의 P2X₇ 수용체의 활성화에 의한 인슐린 억제 반응은 Go/i를 경유하지 않음을 알 수 있다.

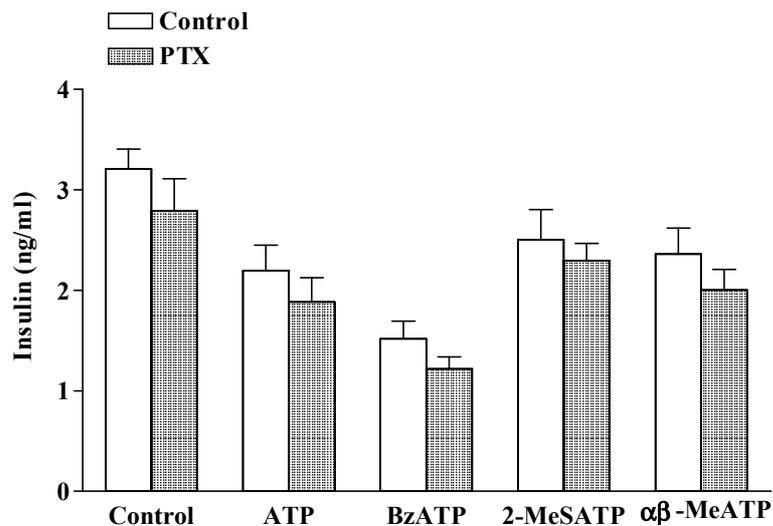
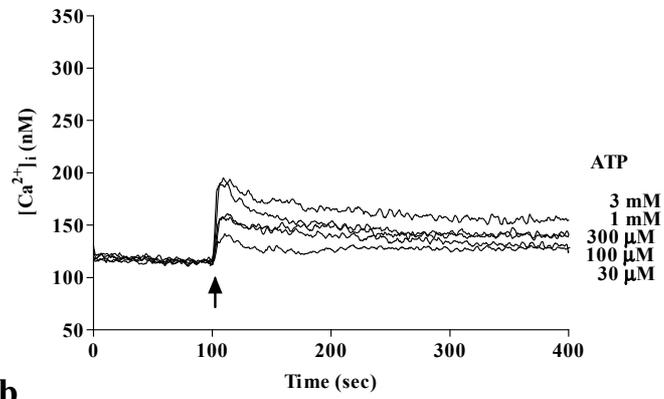


그림 7. Pertussis toxin (PTX) 전처리의 인슐린 분비와 ATP의 인슐린 분비 억제 효과에 대한 영향. Go/i 억제제인 pertussis toxin을 14 ~18시간 전처리 한 후 여러 퓨린 수용체 효현제 (100 μ M)를 처리하여 그 영향을 대조군과 비교하였다. 결과는 평균과 표준오차로 나타내었고 실험례 수는 6임.

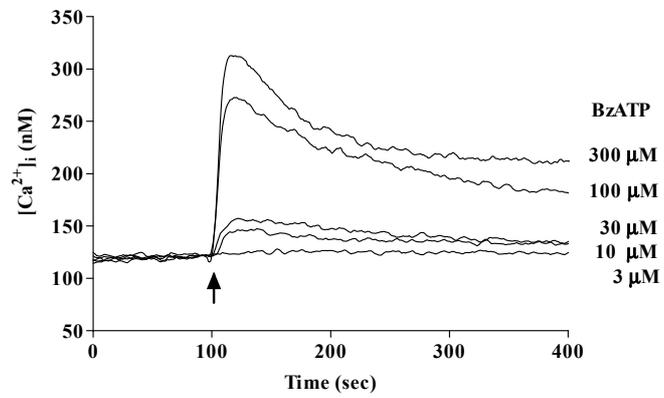
3.6. ATP에 의한 세포내 유리 칼슘의 변화

ATP에 의해 활성화된 P2X₇ 수용체는 세포내 유리 칼슘을 증가시키고 비선택적 양이온 통로를 통해 막전압을 탈분극시킨다 (Ferrari 등, 1996; Brater 등, 1999; Ralevic 및 Burnstock, 1998). 또한, 췌장 β 세포에서 세포외액의 ATP는 칼슘의 효과적인 조절인자로 알려져 있어 (Geschwind 등, 1989) HIT-T15 세포에서 ATP를 비롯한 여러 뉴클레오티드의 세포내 칼슘에 대한 효과를 살펴보았다. 칼슘민감성 형광 염색물질인 Fura-2를 이용하여 2 × 10⁶/ml의 세포에서 세포내 유리 칼슘이온 농도([Ca²⁺]_i)를 측정하였다. 여러 뉴클레오티드중 ATP와 BzATP만 현저히 [Ca²⁺]_i가 증가하였고 (그림 8Aa, b) ADP, AMP, ATPP, UTP, UDP, oATP 및 adenosine에 의한 [Ca²⁺]_i 변화는 미비했으며 2-MeSATP와 αβ-MeATP (100 μM)는 적었다 (결과 생략). 측정된 안정시 [Ca²⁺]_i는 120.1 ± 28.3 nM이었으며, ATP를 가하면 일시적으로 [Ca²⁺]_i가 증가하였다가 점차 회복되었다. 보통 약 20초 이내에 최고치에 도달한 후 천천히 감소되었다. 그러나 시간이 지나더라도 높은 농도의 효현제인 경우에는 안정시 [Ca²⁺]_i 농도로 회복되지는 않았으며, 비교적 일정하게 유지되었다 (그림 8Aa, b). ATP와 BzATP에 의한 [Ca²⁺]_i의 증가는 농도가 높을수록 커졌으며 EC₅₀는 각각 409.5 ± 1.2 μM과 155.1 ± 1.5 μM (n = 6)으로 BzATP가 더 큰 효과를 나타내었다. 또한 ATP의 최대 반응은 BzATP의 28.7 ± 1.2 %에 지나지 않았다 (그림 8Ac). BzATP가 P2X₇ 퓨린 수용체에 특이적이고 ATP와 BzATP가 유사한 시간-칼슘증가 관계를 나타내므로 HIT-T15 세포에 내재적으로 표현된 퓨린 수용체는 인슐린 분비 실험과 같게 P2X₇일 것으로 추정한다. P2X 수용체의 아형을 분명히 하기 위하여 특이적 길항제를 사용하였다. ATP와 BzATP에 의한 [Ca²⁺]_i의 증가는 비가역적 P2X₇ 길항제인 oATP (300 μM)의 2시간 전처리로 각각 51 %와 84 % 씩 감소하였다 (n = 5) (그림 8B). BzATP에 의한 증가는 ATP에 의한 증가보다 더욱 많이 감소하였으므로 ATP에 의한 칼슘의 증가는 P2X₇이외에 다른 퓨린 수용체에 의해서도 일어났음을 유추할 수 있다.

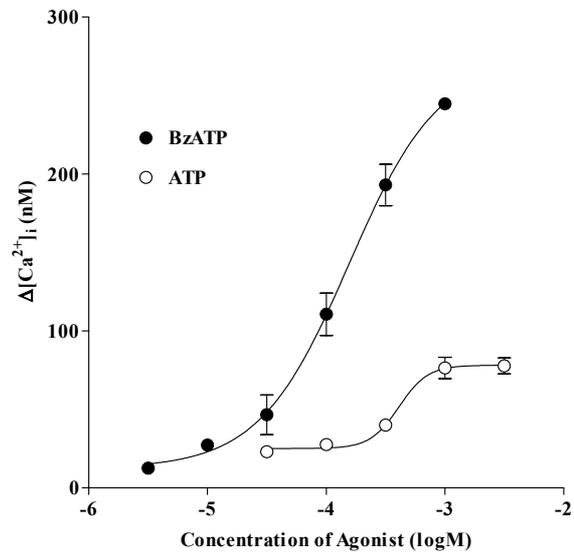
Aa



Ab



Ac



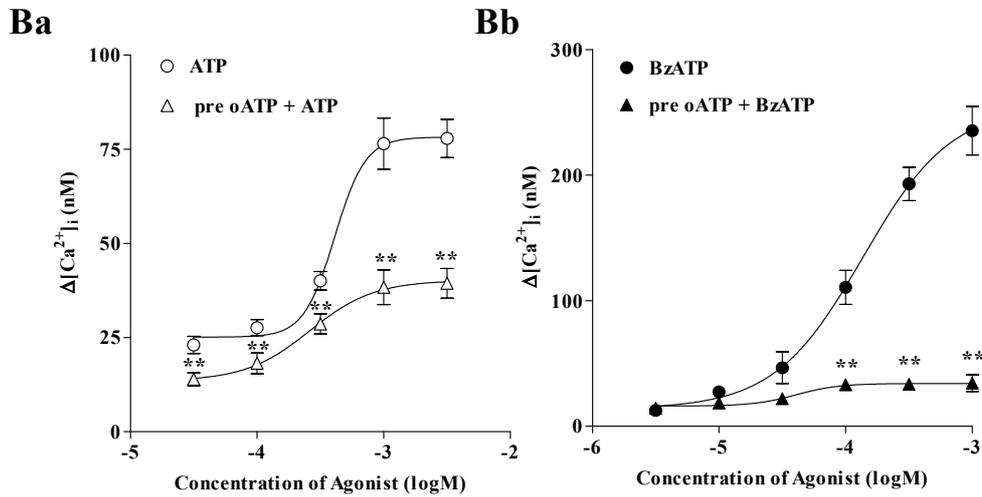
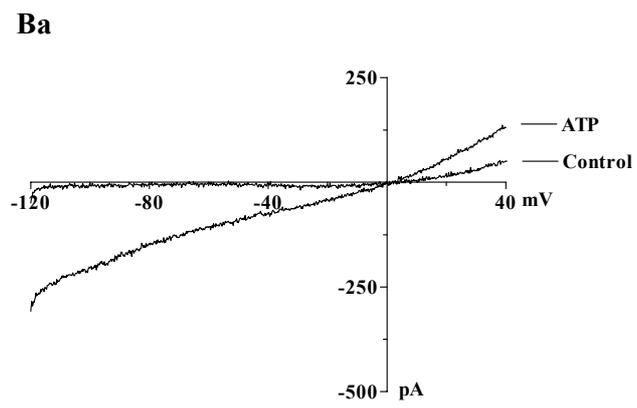
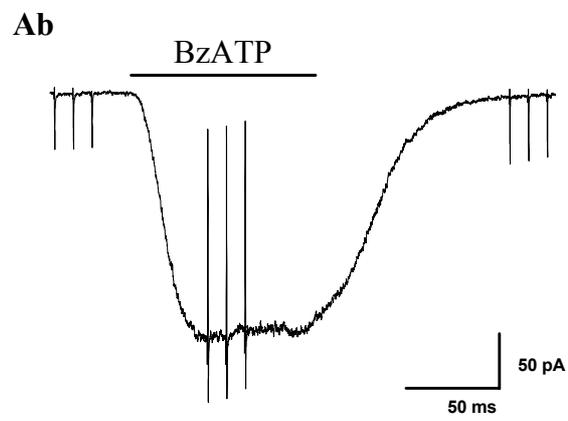
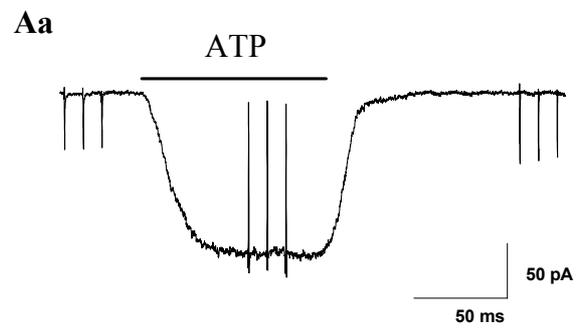


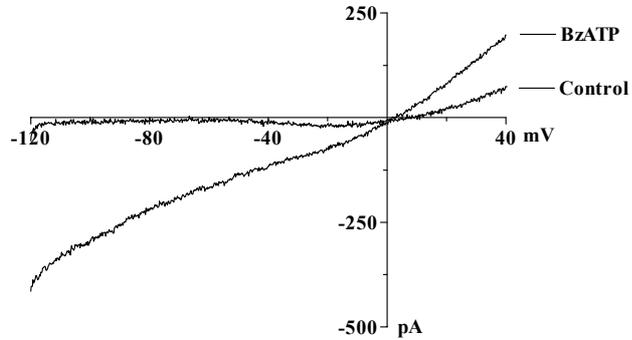
그림 8. ATP의 세포내 유리 칼슘 증가. ATP와 BzATP를 투여한 후 (화살표) $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화를 나타내었다 (Aa, b). Fura-2/AM이 부하된 세포 ($2 \times 10^6/ml$, $37^\circ C$)를 cuvette에서 5분간 평형상태를 유지하고 ATP 및 BzATP를 한 농도씩 투여하며 $[Ca^{2+}]_i$ 를 형광분광 광도계로 측정했다. $[Ca^{2+}]_i$ 의 농도 반응 곡선은 Ac에 나타내었다. ATP 및 BzATP에 의한 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가는 농도에 따라 증가했으며, EC_{50} 는 각각 409.5 와 155.1 μM 이었다. HIT-T15 세포를 oATP (300 μM)에 2시간동안 $37^\circ C$ 에서 전배양시킨 후 ATP 및 BzATP의 $[Ca^{2+}]_i$ 증가를 보았다 (B). oATP는 ATP 및 BzATP의 $[Ca^{2+}]_i$ 증가의 최대치를 각각 51.4 %, 84.2% 억제하였다. 실험레 수는 각각 6 (A), 5 (B)이었고, **은 $p < 0.05$ 임.

3.7. ATP에 의해 유발된 내향 전류

P2X 수용체의 두드러진 특성은 양이온 통로를 통해 내향전류를 일으켜 막전압을 탈분극 시키는 것이다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998). ATP와 BzATP가 유발한 내향전류를 측정하여 양이온 통로의 특성을 관찰하였다. HIT-T15 세포의 막전압을 -80 mV로 고정된 상태에서 ATP와 BzATP는 내향전류를 일으켰다 (그림 9A). BzATP가 더 효과적이었으며 ATP ($300 \mu\text{M}$)의 최대 전류는 -50.4 ± 27.0 pA/pF ($n = 5$) 이었고 BzATP ($100 \mu\text{M}$)는 -135.3 ± 49.4 pA/pF ($n = 5$) 이었다. BzATP에 의한 내향전류가 ATP에 의한 것보다 생성이 빠르고 소멸은 느렸다. 전압 램프 (ramp)에 의해서 생성된 전류-전압 관계를 살펴보면 대조군에서는 -120 과 $+40$ mV사이에서 거의 전류가 흐르지 않았으나 ATP 및 BzATP의 처치후에는 음전압에서는 내향전류가, 양전압에서는 외향전류가 흘렀다 (그림 9Ba, b). 대조군과의 차에 의해 생성된 전류-전압 관계를 보면 직선의 모양을 나타냈고 역전 전압은 거의 0 mV 이었으며 의미있는 rectification은 없었다 (그림 9Bc, $n = 10$). 이러한 결과는 P2X₇ 수용체의 양이온 통로가 비선택적 양이온 통로임을 나타내는 것이다.



Bb



Bc

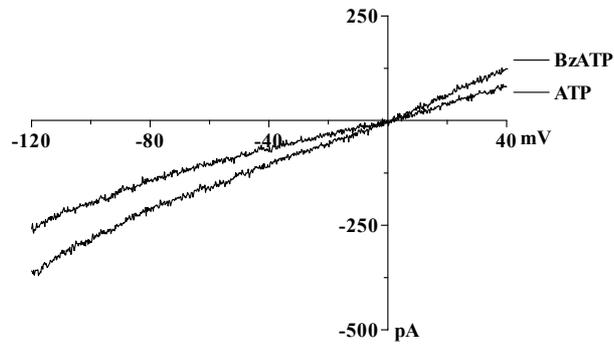


그림 9. ATP에 의해 유발된 내향전류의 특성. ATP (300 μ M) 및 BzATP (100 μ M)의 투여 (밑줄)에 의해서 발생한 대표적인 내향전류를 Aa 및 Ab에 그렸다. B는 전압램프(-120~40 mV, 400 msec)에 의해서 유발된 전류-전압 관계를 나타낸다. Ba와 Bb는 대조군 전류와 ATP와 BzATP에 의해 유발된 전류를 나타낸 것이고 Bc는 각각의 대조군 전류와 효현제에 의해 유발된 전류의 차를 나타낸 것이다. 대조군은 전류가 거의 흐르지 않았으나 효현제에 의해서 역전전위가 0 mV에 가까운 전류가 생성되었다. 각 세포의 전류는 3개의 전압램프에 의해서 생성된 것의 평균을 사용하였다.

제4장 고찰

Non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) 신경 자극시 ATP는 nitric oxide (NO) 및 neuropeptide 같은 신경전달물질과 함께 유리되어 피부, 수뇨관 및 장관 등의 다양한 기관에서 혈류, 분비 및 평활근수축 등과 같은 기능을 조절한다고 보고된 바 있다 (Burnstock, 1972). 또한 혈소관 등에 존재하는 vesicle에는 ATP가 600 mM 이상의 고농도로 존재하고 있으므로, 이들이 자극에 의해 세포외로 유리될 경우 인접부위는 생리적 작용을 나타내기엔 충분한 농도에 이를 것이라 하였다 (Boeynaems 및 Pearson, 1990; Gordon, 1986). 그러나 ATP의 작용은 조직마다 다양하며 수용체 분류도 복잡하여 쉽게 이해되어지지 못하고 있다. 특히 햄스터의 췌장 β 세포에서 유도된 HIT-T15 세포에서는 퓨린 수용체 및 ATP의 인슐린 분비에 미치는 효과에 대한 연구가 지금까지 보고된 바 없었다.

세포외액 ATP의 췌장 β 세포에 대한 영향은 여러 종의 β 세포와 인슐린 분비 종양 세포주에서 주로 연구되어 인슐린 분비 조절, 이온 통로의 활성화와 세포내 칼슘변화 및 그들의 상호관계 등이 보고되었다. 이 중 인슐린 분비에 대한 영향과 이에 관련된 퓨린 수용체 아형에 대한 상반된 결과가 있어 논란의 여지가 있다. 세포외액 ATP는 쥐에서 P2Y 수용체의 활성화에 의해 인슐린을 분비한다고 보고되었으나 (Bertrand 등, 1987) P2X 수용체를 통해서도 인슐린을 증가시킨다고 Petit 등 (1998)은 보고했다. 이와 더불어 P2X가 아닌 P2Y 수용체를 통해서만 인슐린이 증가하고 ATP가 가수분해되어 생성된 adenosine이 P1 수용체를 활성화하여 인슐린 분비를 억제한다는 연구도 최근에 발표되었다 (Verspohl 등, 2002). 쥐에서의 이런 연구와는 대조적으로 마우스에서는 세포외액 ATP가 P2Y를 활성화하여 exocytosis를 억제시켜 인슐린 분비를 감소시킨다고 보고되었다 (Petit 등, 1989; Poulsen 등 1999). 한편, 이런 연구와 더불어 췌장 β 세포에 발현되어 있는 퓨린 수용체에 대한 연구도 진행되어 쥐의 췌장 섬 및 insulinoma cDNA library에서 P2Y₁와 P2X₄ 수용체를 나타내는 cDNA clone을 분리하여 규명하였다 (Tokuyama 등, 1995; Wang 등, 1996). 그러나 구체적인 기능 및 특성은 연구되지

못해 퓨린 수용체를 통한 인슐린 분비 조절을 뒷받침하기에는 부족하다.

인슐린 분비에 대한 ATP의 영향이 종간의 차이를 보이고 활성화되는 수용체의 종류에 따라서도 다른 영향을 나타내었다. 따라서 본 연구는 HIT-T15 세포에서 자극-분비 결합에서 중요한 조절 요소로서의 세포의 ATP의 영향을 살펴보았다. 기존의 마우스에서의 연구와 유사하게 ATP는 인슐린 분비에 대한 억제효과를 갖고 있었다. 여러가지 아데닌 뉴클레오티드 중 P2X₇에 선택적인 효현제로 알려져 있는 BzATP의 인슐린 분비 억제 작용이 가장 컸다. 효과 및 효력 (IC₅₀)값을 비교해 본 결과 BzATP > ATP ≥ αβ-MeATP ≥ 2-MeSATP 순으로 나타났으며, 이는 기존에 쥐, 마우스의 P2X₇ 수용체에 대한 P2 효현제의 효력비교 결과와 부합함을 알 수 있다 (Surprenant 등, 1996; Chessell 등, 1998). 또한, ATP의 인슐린 억제 반응을 매개하는 수용체를 확인하기 위하여, 여러 수용체 차단제들의 전처치를 통해 주요하게 활성화되는 수용체를 규명하고자 하였다. Suramin과 PPADS는 P2 수용체 비선택적 차단제로 본 실험에서는 둘 다 ATP에 의한 인슐린 분비 억제 효과를 차단하지 못했으나 P2X₇의 선택적 억제제로 알려진 oATP는 ATP의 이런 효과를 차단하였다. 이와 같이 인슐린 분비에 대한 P2 효현제와 차단제의 효과를 고려해 볼 때 ATP에 의한 인슐린 분비 억제 작용은 P2X₇ 수용체를 통해 이루어진 것이다. 또한, oATP에 의해 P2X₇ 수용체가 차단된 상태에서는 ATP, αβ-MeATP 및 2-MeSATP에 의해서 인슐린 분비가 대조군에 비하여 20 ~ 50 % 증가되었다. 이러한 결과는 HIT-T15 세포에 P2X₇ 수용체 이외에 다른 퓨린 수용체가 존재하고 이들의 활성화는 인슐린 분비를 증가시킬 수 있다는 것이다. 비록 다른 퓨린 수용체가 인슐린 분비를 증가시켜도 ATP의 전체효과가 인슐린 억제로 나온 것을 보아서 이들의 인슐린 분비 증가 능력은 활성화된 P2X₇의 억제 능력에 비해 상대적으로 적다고 추측할 수 있다.

활성화된 P2X₇ 수용체는 다른 P2X 수용체처럼 양이온 통로를 통한 내향전류를 유발시키고 세포내 유리 칼슘을 증가시킨다 (Ralevic 및 Burnstock, 1998, 그림 8, 9). 여러 연구에서 ATP가 세포내 저장소의 칼슘 유리 및 칼슘 통로 또는 양이온 통로를 통한 세포외 칼슘의 유입으로 세포내 유리 칼슘을 증가시킨다고 보고하였다 (Arkhammar 등, 1990; Geschwind 등, 1989; Blachier 및 Malaisse, 1988;

Poulsen 등, 1999). ATP와 BzATP에 의한 세포내 유리 칼슘의 변화도 위와 같은 경로로 일어나리라 추측한다. BzATP의 효과가 ATP에 비해 더 컸으며 oATP에 의해 칼슘증가는 크게 억제되었는데 이는 인슐린 측정실험의 결과와 일치한다. 전기 생리적 실험을 통하여 ATP에 의해 유발된 내향전류가 역전 전위가 0 mV인 것으로 보아 ionotropic P2X 수용체의 특성인 비선택적 양이온 통로임을 알 수 있었으며 (Ralevic 및 Burnstock, 1998) 비활성화가 없는 특성을 보였다.

포도당은 세포내 ATP/ADP의 비를 증가시켜 K_{ATP} 통로를 억제하여 탈분극을 유발하고 이것은 칼슘 통로를 활성화하여 세포내로 칼슘을 유입시켜 칼슘 의존성 exocytosis가 일어나며 이외에 여러 대사물들에 의한 K_{ATP} 통로 비의존적 방법으로도 일어난다고 알려져 있다 (Lang, 1999). 인슐린의 분비는 포도당 (~20 mM)에 의해 농도 의존적으로 증가하였고 Santerre 등 (1981)은 HIT-T15 세포와 hamster islet의 인슐린 분비가 포도당이 10 ~ 20 mM일 때 최대로 분비된다는 유사한 결과를 보고하였다. 또한, 마우스의 췌장 β 세포로부터 형질 전환된 β TC-6 세포의 포도당에 대한 인슐린 분비 반응은 3 mM일 때 최고치에 도달하여 (Poitout 등, 1995) HIT-T15 세포의 결과에 비해 더 낮은 농도의 포도당에서 인슐린 분비가 최대치에 올랐다. 한편, ATP의 효과는 포도당의 농도가 낮을 때 보다 높을 때 더 크게 나타났다 (그림 6). 이런 결과는 ATP가 포도당에 의해 유발된 인슐린 분비를 주요하게 억제한다는 것을 의미한다. 이와 더불어 Petit 등(1998)도 ATP가 포도당 유도 인슐린 분비에 영향을 끼친다고 하였다. 포도당과 유사하게 탈분극을 유발하는 KCl을 투여한 후 농도 의존적으로 인슐린 분비가 증가하였다 (그림 3). ATP는 포도당과 KCl에 유사하게 탈분극을 일으켜 세포내 유리 칼슘을 증가시키지만 인슐린은 이들과 반대로 억제한다. 이들은 세포내 유리 칼슘의 증가는 같으나 세포외 칼슘의 유입 경로에는 차이가 있다. ATP에 의한 칼슘 유입은 비선택적 양이온 통로와 칼슘통로를 통해 이루어지나 (Brater 등, 1999; Ralevic 및 Burnstock, 1998) KCl과 포도당에 의한 것은 칼슘통로 단독으로 이루어진다 (Lang 1999). 이것은 ATP가 유발한 일시적인 탈분극과 세포내 유리 칼슘 증가는 포도당과 KCl에 의한 것과 다른 기전으로 이루어진다는 것을 나타내며 이것이 인슐린 분비에 미치는 영향의 차이를 나타낼 수도 있다. 또한, 이런 변화 후 또는 동

시에 알려지지 않은 다른 반응을 유발하여 인슐린 분비를 억제할 것이라고 추측할 수도 있다.

ATP의 영향에 관련된 주요한 신호전달을 밝히기 위해 Go/i의 관련여부를 조사하였다. HIT-T15 세포에는 여러 Go/i subtype이 있는데 이들은 PTX에 의해 억제되며 epinephrine과 somatostatin의 인슐린 분비 억제에 관여한다고 보고되었다 (Seaquist 등, 1992). 인슐린 분비 억제는 Go/i를 경유하여 K_{ATP} 의 활성화, L형 칼슘 통로 억제, adenylyl cyclase 억제, exocytosis 억제 등 여러 인슐린 분비 억제 기전에 의하여 이루어진다고 보고되었다 (Sharp, 1996). 본 실험에서는 PTX에 의해서 인슐린 분비 억제 효과가 차단되지 않았다 (그림 7). 따라서 ATP에 의한 인슐린 분비 억제 과정은 Go/i가 관련되어 있지 않은 다른 인슐린 분비 억제 기전을 경유했을 것으로 추측한다.

ATP에 의한 세포내 유리 칼슘의 증가와 막전압이 탈분극되는 현상은 일시적으로 인슐린 분비를 증가시키는 효과를 갖고 있다. 그러면 무엇이 ATP의 인슐린 분비 억제를 가능하게 하는 것일까? 본 연구에서는 Go/i와 관련 없다는 것을 밝혔지만 그 외에도 다음과 같은 것을 추측할 수 있다 (Sharp, 1996). 첫째, K_{ATP} 통로의 활성화로 인슐린 분비는 억제될 수 있다. K_{ATP} 통로는 칼슘 유입과 칼슘 의존적 exocytosis와 밀접한 관계가 있는 막전압과 전기적 활성의 정도를 정하며 포도당의 농도 증가에 따른 인슐린 분비에 중요한 기능을 갖는다 (Ashcroft 및 Rorsman, 1989; Li 등, 1991; Arkhammar 등, 1990; Poulsen 등, 1999). 둘째, 칼슘 통로 차단으로 칼슘의 유입이 줄어들면 인슐린 분비는 억제될 수 있다. ATP가 크로마핀 세포에서 칼슘통로 되먹임 억제제로 작용하며 SA 절 세포에서 L-형 칼슘 통로를 억제하는 작용을 한다는 보고가 있다 (Currie 및 Fox, 1996; Qi 및 Kwan, 1996). 인슐린 분비는 칼슘통로의 활성화에 중요한 영향을 받으므로 ATP의 인슐린 분비 억제도 유사한 기전으로 일어날 수 있다. 셋째, adenylyl cyclase의 억제는 인슐린 분비를 억제시킬 수 있다. P2 수용체의 활성화가 adenylyl cyclase를 억제한다는 보고 (Ralevic 과 Burnstock, 1998)가 있는데 이는 cAMP 농도를 감소시키고 protein kinase A 유발 exocytosis를 억제할 수도 있다. 넷째, exocytosis를 직접 억제하여 인슐린 분비를 억제할 수 있다. ATP의 exocytosis 억제는 마우스의

췌장 β 세포에서 보고된바 있다 (Poulsen 등, 1999). Poulsen 등은 ATP의 인슐린 분비 억제 효과가 세포내 유리 칼슘의 증가에 비해 시간적으로 후반부에 일어나며, G-단백질을 경유하여 phosphatase의 활성화로 인해 칼슘 의존적 exocytosis의 억제로 일어난다고 하였다. 이 중에 K_{ATP} 와 Ca^{2+} channel 및 adenylyl cyclase의 활성 변화는 $P2X_7$ 수용체의 활성화를 통한 인슐린 억제에 있어서 가능성이 적다. $P2X_7$ 수용체는 ionotropic 수용체이어서 내향전류로 인한 탈분극 및 세포내 유리 칼슘의 증가를 일으키지만 metabotropic 수용체가 아니어서 G 단백질과 관련이 없기 때문이다. 따라서 네 번째의 exocytosis의 직접억제 즉, 세포내 유리 칼슘의 변화 이후에 일어나는 exocytosis와 관련된 일련의 과정에 관여하리라 예측할 수 있다. 또한 인슐린 분비를 억제하는 여러 신경전달물질들의 특성과 두드러지는 ATP의 인슐린 분비억제의 특성은 ionotropic 수용체를 활성화하여 그 효과를 나타낸다는 것이다. 지금까지 알려져 있는 인슐린 분비억제제인 norepinephrine, somatostatin, galanin, PGE_2 , neuropeptide Y 등은 모두 G 단백질과 관련된 metabotropic 수용체를 활성화한다. 그리고 이들 대부분은 Go/i 와 연관되어 있다 (Sharp, 1996). 그러나 ATP의 인슐린 분비억제는 유일하게 ionotropic 수용체를 활성화하여 일어나며 Go/i와 연관이 없다.

ATP의 췌장 β 세포에 대한 의미를 살펴보면 세포외액 ATP는 인슐린 분비를 억제함으로써 인슐린 분비 되먹임 기능을 할 수 있다는 것이다. 인슐린과 함께 분비된 ATP의 농도는 강한 자극 동안 계속되는 인슐린 분비를 억제하는 되먹임 효과를 하기에 충분한 것이다. 이것은 변화하는 분비자극에 대해 췌장 β 세포가 빠르게 적응 할 수 있도록 잠재적 역량을 부여할 수 있다. 본 실험은 세포외액 ATP가 $P2X_7$ 수용체를 활성화하여 인슐린 분비를 억제한다는 것을 규명하였지만, ATP에 의한 인슐린 분비 억제가 어떠한 기전을 통하여 유발되는 지 특히, protein kinase A, protein kinase C, 세포외 Ca^{2+} , phosphatase 등의 관련여부를 밝히는 실험이 이후에 이루어져야 하겠다. 비록 효현제 및 차단제에 의해서 퓨린 수용체의 아형이 규명되었으나 hamster의 $P2X_7$ 유전자는 아직 밝혀지지 않았다.

따라서 앞으로 cloning 및 RT-PCR과 같은 분자생물학적인 방법을 통하여 HIT-T15 세포에서 인슐린 분비에 작용하는 퓨린 수용체를 규명하는 것도 역시 필요하다고 사료된다.

제5장 결론

HIT-T15 세포에서 퓨린수용체 활성화에 의한 인슐린 분비 억제 효과를 관찰하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. 포도당과 KCl에 의해서 인슐린은 농도 의존적으로 분비되었다.
2. 인슐린 분비는 여러 뉴클레오티드중 ATP, BzATP, $\alpha\beta$ -MeATP, 2-MeSATP에 의해 의미있게 감소하였다.
3. 인슐린 분비의 억제효과는 BzATP > ATP \geq $\alpha\beta$ -MeATP \geq 2-MeSATP 순으로 나타났으며, 농도 의존적이었다.
4. ATP의 억제효과는 oATP에 의해서는 차단되었다.
5. ATP의 억제효과는 포도당의 농도가 높을 때 더 컸다.
6. ATP의 억제효과는 Go/i 억제제인 PTX에 의하여 영향을 받지 않았다.
7. ATP는 세포내 유리 칼슘을 일시적으로 증가시키고 비선택적 양이온 통로를 활성화하여 내향전류를 유발하였다.

이상의 실험결과로 미루어 보아 ATP는 HIT-T15 세포에서 P2X₇ 수용체 활성화를 통해 세포내 칼슘 증가와 함께 인슐린 분비를 억제하는 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Abbracchio MP, Burnstock G: Purinergic signaling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 78: 113-145, 1998
- Ahren B: Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia.* 43(4): 393-410, 2000
- Arkhammar P, Hallberg A, Kindmark H, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO: Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. A mechanism involving direct interaction with both release and refilling of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool. *Biochem J.* 265(1): 203-211, 1990
- Ashcroft FM, Rorsman P: Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog Biophys Mol Biol.* 54(2): 87-143, 1989
- Bertrand G, Chapal J, Loubatieres-Mariani MM: Potentiating synergism between adenosine diphosphate or triphosphate and acetylcholine on insulin secretion. *Am J Physiol.* 251(4 Pt 1): E416-421, 1986
- Bertrand G, Chapal J, Loubatieres-Mariani MM, Roye M: Evidence for two different P2-purinoceptors on beta cell and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol.* 91(4): 783-787, 1987
- Blachier F, Malaisse WJ: Effect of exogenous ATP upon inositol phosphate production, cationic fluxes and insulin release in pancreatic islet cells.

Biochim Biophys Acta. 970(2): 222-229, 1988

Boeynaems JM, Pearson JD: P2-purinceptors on vascular endothelial cells: physiological significance and transduction mechanisms. *Trends Pharmacol Sci. 11: 34-37, 1990*

Brater M, Li SN, Gorodezkaya IJ, Andreas K, Ravens U: Voltage-sensitive Ca^{2+} channels, intracellular Ca^{2+} stores and Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} channels contribute to the ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in differentiated neuroblastoma X glioma NG 108-15 cells. *Neurosci. Lett. 264:97-100, 1999*

Burnstock G: Purinergic nerves. *Pharmacol Rev. 24(3): 509-581, 1972*

Burnstock G: Overview. Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci. 603: 1-17, 1990*

Burnstock G: Cotransmitters of catecholamines. *J Auton Pharmacol. 14(1): 5-6, 1994*

Burnstock G: The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology. 36(9): 1127-1139, 1997*

Burnstock G, Williams M: P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther. 295(3): 862-869, 2000*

Chessell IP, Simon J, Hibell AD, Michel AD, Barnard EA, Humphrey PP: Cloning and functional characterisation of the mouse P2X₇ receptor. *FEBS Lett. 439(1-2): 26-30, 1998*

Currie KP, Fox AP: ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca^{2+} channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*. 16(5): 1027-1036, 1996

Detimary P, Jonas JC, Henquin JC: Stable and diffusible pools of nucleotides in pancreatic islet cells. *Endocrinology*. 137(11): 4671-4676, 1996

Ferrari, D, Villalba M, Chiozzi P, Falzoni S, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F: Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP. *J. Immunol*. 156:1531-1539, 1996

Geschwind JF, Hiriart M, Glennon MC, Najafi H, Corkey BE, Matschinsky FM, Prentki M: Selective activation of Ca^{2+} influx by extracellular ATP in a pancreatic beta-cell line (HIT). *Biochim Biophys Acta*. 1012(1): 107-115, 1989

Gilon P, Henquin JC: Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev*. 22(5): 565-604, 2001

Gordon JL: Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*. 233(2): 309-319, 1986

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 260(6): 3440-3450, 1985

Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, Petit P, Loubatieres-Mariani MM:

- Purinergic receptors on insulin-secreting cells. *Fundam Clin Pharmacol.* 8(2): 117-127, 1994
- Lang J: Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem.* 259(1-2): 3-17, 1999
- Li GD, Milani D, Dunne MJ, Pralong WF, Theler JM, Petersen OH, Wollheim CB: Extracellular ATP causes Ca^{2+} -dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. Phospholipase C mediates Ca^{2+} mobilization but not Ca^{2+} influx and membrane depolarization. *J Biol Chem.* 266(6): 3449-3457, 1991
- Loubatieres-Mariani MM, Chapal J, Lignon F, Valette G: Structural specificity of nucleotides for insulin secretory action from the isolated perfused rat pancreas. *Eur J Pharmacol.* 59(3-4): 277-286, 1979
- Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippla M, Di Virgilio F: Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem.* 268(11): 8199-8203, 1993
- Petit P, Bertrand G, Schmeer W, Henquin JC: Effects of extracellular adenine nucleotides on the electrical, ionic and secretory events in mouse pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol.* 98(3): 875-882, 1989
- Petit P, Hillaire-Buys D, Manteghetti M, Debrus S, Chapal J, Loubatieres-Mariani MM: Evidence for two different types of P2 receptors stimulating insulin secretion from pancreatic B cell. *Br J Pharmacol.* 125(6): 1368-1374, 1998

- Poitout V, Stout LE, Armstrong MB, Walseth TF, Sorenson RL, Robertson RP: Morphological and functional characterization of beta TC-6 cells—an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice. *Diabetes* 44(3): 306-313, 1995
- Poulsen CR, Bokvist K, Olsen HL, Hoy M, Capito K, Gilon P, Gromada J: Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 48(11): 2171-2181, 1999
- Qi AD, Kwan YW: Modulation by extracellular ATP of L-type calcium channels in guinea-pig single sinoatrial nodal cell. *Br J Pharmacol*. 119(7): 1454-1462, 1996
- Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol rev*. 50(3): 413-492, 1998
- Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP: Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78(7): 4339-4343, 1981
- Seaquist ER, Neal AR, Shoger KD, Walseth TF, Robertson RP: G-proteins and hormonal inhibition of insulin secretion from HIT-T15 cells and isolated rat islets. *Diabetes*. 41(11): 1390-1399, 1992
- Sharp GW: Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol*. 271(6 Pt 1): C1781-1799, 1996

Squires PE, James RF, London NJ, Dunne MJ: ATP-induced intracellular Ca²⁺ signals in isolated human insulin-secreting cells. *Pflugers Arch*. 427(1-2): 181-183, 1994

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G: The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science*. 272(5262): 735-738, 1996

Tokuyama Y, Hara M, Jones EM, Fan Z, Bell GI: Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 211(1): 211-218, 1995

Verspohl EJ, Johannwille B, Waheed A, Neye H: Effect of purinergic agonists and antagonists on insulin secretion from INS-1 cells (insulinoma cell line) and rat pancreatic islets. *Can J Physiol Pharmacol*. 80(6): 562-568, 2002

von Kugelgen I, Wetter A: Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 362(4-5): 310-323, 2000

Wang CZ, Namba N, Gono T, Inagaki N, Seino S: Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 220(1): 196-202, 1996

ABSTRACT

Effect of ATP on Insulin Secretion in Hamster Insulinoma Cells

Lee, Keon Il
Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

It has been known that extracellular nucleotides play significant roles in the various physiological regulations as signaling molecules. Although purinergic agonists have influence on insulin secretion, there is controversy about different effect and type of purinergic receptors involved in insulin release among several species. This study was investigated the effect of purinergic nucleotides on HIT-T15 cells, hamster insulinoma tumor, by means of measuring insulin concentration, intracellular free Ca^{2+} and ionic currents.

Glucose increased insulin secretion in a concentration-dependent manner with EC_{50} 10.2 mM during 1 hour incubation, that were secreted 63.3 % at 20 min and 88.2 % at 40 min. Also KCl, depolarizing membrane potential, induced insulin release concentration-dependently. ATP, however, reduced insulin secretion in a dose-dependent manner and relative efficacy and potency order (IC_{50} ; μM) was BzATP (6.9) > ATP (20.4) \geq $\alpha\beta$ MeATP (23.3) \geq 2-MeSATP (24.9). Other nucleotides such as ADP, AMP, ATPP, adenosine, UTP, and UDP were not effective on insulin secretion at all. This purinergic

agonist profile in reducing insulin secretion was similar to that of P2X₇ receptor reported previously. This effect of ATP was nearly abolished by preincubation with oxidized ATP (200 μM), antagonist of P2X₇, and unexpectedly insulin secretion was concomitantly increased with the following order ATP > αβMeATP > 2-MeSATP. These purinergic nucleotides inhibited the insulin secretion of 31.8 % at glucose 3 mM and 43.7 % at 15 mM. Preincubation with PTX, a blocking agent of G_o/i, had no effect on inhibitory action of ATP. ATP and BzATP induced transient increase in intracellular free Ca²⁺ with EC₅₀ of 409.5 and 155.1 μM. Both evoked non-inactivating inward currents were reversed at nearly 0 mV.

Based on these results, purinergic stimulation induces the inhibitory action in insulin secretion, the increase in intracellular free Ca²⁺ level, and the increment of inward currents via the activation of P2X₇-like purinergic receptors endogenously expressed in HIT-T15 cells.

Key words : Adenosine 5'-triphosphate (ATP), HIT-T15, Insulin, P2X₇