

당뇨병성 백서에서 Vanadate투여후 혈당의 변화와 근육세포내 포도당운반체 활성화 및 유전자의 조절

연세대학교 의과대학 내과학교실

이현철 · 남문석 · 이은직 · 임승길 · 김경래 · 허갑범

아주대학교 의과대학 내분비대사내과학교실

정 윤 석

인하대학교 의과대학 내과학교실

이 관 우

순천향대학교 의과대학 내과학교실

조 용 목

서 론

당뇨병은 크게 인슐린의존성 당뇨병과 인슐린비의존성 당뇨병으로 나누어 지는데, 각각 그 발병기전이 다르고 임상적으로도 매우 이질적인 양상을 보이게 된다. 전 국민의 2~3%가 당뇨병환자인 점과 그리고 당뇨병이 근본적인 치료가 현재로서는 불가능하며, 일생 동안 주의깊은 조절을 요하는 점을 고려할 때 당뇨병의 치료와 그 기전에 관한 연구는 아무리 강조해도 지나치지 않겠다. 현재까지의 당뇨병 치료는 그 발병기전에 따라 인슐린의존성 당뇨병의 경우는 인슐린주사를 지속적으로 받아야 하며, 인슐린비의존성의 경우는 식사, 운동요법, 경구용혈당강화제를 우선적으로 사용하고, 이에 반응이 없는 경우 인슐린치료가 불가피한데 이는 환자 자신에게는 물론 그 가족에게도 매우 큰 부담이 되고 있다. 당뇨병환자의 혈당을 효과적으로 조절하는 것은 매우 중요한데, 첫째, 적당한 혈당조절이 만성적인 합병증을 예방하고 둘째, 체내에 적절한 영양공급을 가능하게 하기 때문이다. 따라서 현재 사용되고 있는 약제 외에 혈당조절에 효과가 있는 새로운 약제를 개발하고, 그 작용기전을 연구하는 것이 필요하다.

최근, 이러한 연구의 일환으로 phosphate analogue인 vanadate가 인슐린과 유사한 작용을 가지고 있다고 알려짐으로 해서 그 작용기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 아직까지 이에 대한 연구는 실험동물에 국한되어 있는데 이는 그 독성에 관한 연구가 불충분하기 때문이다. 실험동물에서 vanadate는 정상상태에서는 저혈당을 유발하지 않으나¹⁾, streptozotocin으로 당뇨병을 유발한 쥐에서는 매우 효과적인 혈당강하효과를 보임이 보고되었다¹⁻⁴⁾.

현재까지 알려진 vanadate의 작용기전은, 지방세포에서 포도당의 산화와 포도당의 수송을 촉진시키고, 간에서 포도당으로부터 글리코젠의 생성 및 합성을 증가시키며, 당 신생합성을 억제하고, 인슐린수용체의 인산화과정에 관여한다는 연구결과들이 보고되었으며, 최근에는 포도당운반체의 발현, 내적인 활성화 및 운반에 관여할 것으로 생각되고 있다⁵⁻¹⁰⁾. 또한 일부에서는 장에서의 포도당흡수를 감소시킨다든지, 식욕의 감소와 연유될 것으로 보고하고 있다^{17,18)}.

이에 저자 등은 당뇨병유발 실험동물에서 vanadate의 혈당강하작용의 기전을 연구하기 위하여, vanadate투여후 세포내로의 포도당의 이동 및 대사에 관여하는 포도당운반체의 활성도를 측정하고, 동시에 포도당운반체의 유전자조절을 관찰하여 이제까지와는 다른 각도에서 vanadate의 작용기전을 연구하고자 한다. 이는 앞으로 vanadate가 당뇨병치료의 한 약제로써

접 수 : 1994년 5월 9일
통 과 : 1994년 5월 31일

사용될 가능성이 있고, 실용화가 불가능한 경우에도 vanadate의 작용기전을 연구함으로써 당뇨병에서 당 대사장애의 기전을 밝히는데 기여할 것으로 생각된다.

대상 및 방법

1. 실험동물

연령이 비슷하고 평균체중이 약 250 g 정도되는 male Sprague-Dawley rat을 구입하여 정상대조군, 당뇨병백서군, vanadate치료군 등 세군으로 나누어 사용하였다.

2. 당뇨병의 유발 및 Vanadate 투여

정상 백서에 streptozotocin 60 mg/kg를 꼬리 정맥에 주사하여 고혈당을 유발시킨후, 일주일동안 관찰한 후 실험을 시행하였다. 꼬리끝에서 혈액을 채취하여 당산화효소법으로 혈당을 측정하여 당뇨발병 여부를 확인하였고, 실험군을 당뇨백서군(6마리)으로 하였다. 고혈당이 7~10일이 지속된 백서에 vanadate를 주는데 sodium metavanadate(6마리)와 과산화수소를 처리한 pervanadate(6마리)를 식수 1 ml당 0.8 mg씩 섞어서 식수대용으로 8주간 투여하여 각각의 혈당 강하효과를 측정하였다.

3. 혈청 생화학검사

백서의 혈액을 채취하여 원심분리후 혈청만을 분리하여 자동분석기로 blood urea nitrogen, creatinine, SGOT 및 SGPT를 측정하였다.

4. 조직검사

Vanadate치료 8주후 백서를 희생시켜 간장, 신장 및 췌장을 적출하여 파라핀에 고정시킨후 절단하여 hematoxylin-eosin염색후 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 근육세포내 포도당운반체 활성도

1) 시약

본 연구에 쓰인 시약으로 bovine serum albumin (BSA), Tween 20등 모든 시약은 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입해서 사용했으며, 또한 western blotting에 쓰인 ECL (Enhanced chemiluminescence)

시약은 모두 Amersham corp. (Arlington Heights, USA)에서 구입하였다. 또, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 쓰인 시약은 Bio-Rad사(Richmond, CA)에서 구입하였다. Primary antibody(제1 항체)로 포도당운반체 GLUT4에 대한 단일클론항체인 primary antibody IF8은 Liverstock Biologicals에서, secondary antibody(제2 항체)인 HRP (Horse radish peroxidase)와 anti-mouse IgG는 Sigma사(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2) 근육조직의 막 단백질의 분리

실험시작 8주후 정상대조군(6마리), 당뇨병백서군(6마리), vanadate치료군(2군, 각각 6마리) 세군 각각의 근육을 4°C에서 잘게 자르고, 근육조직 20 mg을 0.2 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)의 완충용액 9 ml에 녹여 호모게나이저로 갈아 균질화시킨 후, 이것을 175,000 xg에서 4°C 60분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)완충용액 450 ul를 가하여 침전물이 완전히 녹을 때까지 vortex교반기에서 강하게 섞은 다음, 여기에 0.3 M (10% wt./vol.) sodium dodecyl sulfate 50 ul를 첨가하여 vortex교반기에서 잘 섞은 후 실온에서 10분간 방치하였다. 이 용액을 1.5 ml eppendorf관에 옮겨서 10,000 xg로 10분간 원심분리하여 녹지 않은 침전물을 제거하였다.

이렇게 해서 얻은 막단백질은 단백질 정량과 포도당운반체(GLUT4) 정량에 사용하였다.

3) 단백질 정량

단백질 농도는 Lowry 방법을 이용하였고, 여기서 표준시료로 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였다.

4) Immunoblotting에 의한 포도당운반체 GLUT4의 정량

세군의 막단백질(100 ug/lane)을 2.5% sodium dodecyl sulfate, 75 mM dithiothreitol, 1.7 M (12.5% vol./vol.) glycerol, 361 mM 0.025% we./vol.) bromophenol blue, 12.5 mM Tris-HCl (pH 7.0)시료완충액에 녹인 후 끓는 물에서 3분간 끓인 다음 1.4 M (10% wt./vol.)의 분리젤(separating gel)과 0.56 (4% wt./vol.)의 축적젤(stack gel)로 Laemmli방법¹⁹⁾에 따라 시행하였다.

전기영동한 겔의 immunoblotting은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 즉, 겔 단백질은 transfer buffer에서 nitrocellulose막(Hybond-ECL, Amersham corp.)에 옮긴 후 단백질이 붙은 nitrocellulose막의 비특이결합을 방지하기 위하여 TBS-tween (Tris-buffered-saline, Tween 20)에 2% (wt./vol.) bovine serum albumin (BSA)을 녹인 완충용액에 실온으로 1 시간동안 담가두었다. 이때 적정 tween의 농도는 실험에 따라 다양하지만 0.1% (vol./vol.) Tween 20이 ECL western blotting work에 가장 적당하다. 그후 TBS로 nitrocellulose막을 15분간 1번, 5분간 2번 정도 씻은 다음 제 1 항체인 포도당운반체 GLUT4에 대한 단일클론항체 IF8 (1/6000 dilution)을 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 이 단일클론항체 IF8은 다른 운반체단백질과는 면역학적으로 구별되는, GLUT4 세포질단백질에 있는 C-말단부위를 인식한다. 다음에는 TBS-tween으로 15분간 1번, 5분간 2번 정도 nitrocellulose막을 세척한 다음 HRP (Horse radish peroxidase)가 결합된 제 2 항체(1/3000 희석)를 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그리고 나서 TBS-tween으로 15분간 1번, 5분간 4분 깨끗이 nitrocellulose막을 씻은 다음 ECL detection reagent A와 B를 1:1로 섞은 용액에 1분간 담가 두었다. 이것을 Hyperfilm ECL (autoradiography film)에 5~10초간 노출시켰다. 즉, 포도당운반체(GLUT4)는 자가방사법과 densitometer scanning을 이용하여 정량하였다.

6. 말초근육세포내 포도당운반체 유전자 조절

1) 시약

RNA를 추출하는데 사용된 guanidine isothiocyanate는 BRL사의 초순도급을 사용하였고, cesium chloride는 ICN사(ICN Biomedicals, Inc.)의 optical grade를 사용하였다. [α -³²P]dCTP와 nylon membrane, multiprime DNA labeling system은 Amersham사 제품을 이용하였고, sephadex G-50 spun column은 IBI사에서, 방사선 필름은 Kodak사의 제품을 사용하였다. Probe을 정제하기 위한 제한효소, Sal I은 Pharmacia사의 것을, GeneClean Kit는 Bio 101사의 제품을 사용하였다. Formaldehyde, absolute alcohol, n-butanol, chloroform은 Merck사의 제품

을, formamide, phenol, MOPS는 BRL사의 초순도급을 사용하였다. 그 밖에 northern blot분석을 수행하는데 필요한 모든 시약과 기타 기초시약들은 BRL, Sigma, Merck 등의 회사에서 분자생물학용의 특급품 내지 일급품을 사용하였다.

2) RNA 추출

Vanadate투여 8주후 쥐의 뒷다리 허벅지 근육조직을 떼어내어 무게를 잰후, phosphate-buffered saline (PBS)에서 세척한 다음, 잘게 잘라 homogenization buffer에 넣어 즉시 사용하거나, 재빨리 액체질소에 넣어 사용전까지 -70°C에 보관했다. 잘게 다진 근육조직을 guanidinium thiocyanate homogenization buffer (4 M guanidinium thiocyanate, 0.1 M Tris HCl (pH 7.5), 1% β -mercaptoethanol) 10 volumes에 넣은 후 Polytron균동기를 사용하여 최대속력으로 1~2분간 균질화하였다. 균질화후 최종농도가 0.5%가 되게 20% sodium lauryl sarcosinate를 첨가하고 잘 현탁시켜 5,000 xg에서 10분간 원심분리하였다. Ultracentrifuge tube에 CsCl/EDTA (5.7 M CsCl, 0.01 M EDTA, pH 7.5)용액을 20 ml 넣고 파쇄한 표본을 위에 천천히 올려 놓는다. Swinging-bucket rotor (SW 28, Beckman Instruments)를 사용하여 20°C에서 25,000 rpm으로 24시간 동안 초원심분리하였다. 형성된 gradient가 흔들리지 않도록 조심스럽게 상층액을 뽑아 제거한 후 75% ethanol로 잔류한 CsCl를 씻어내고 RNA pellet을 상온에서 말렸다. RNA pellet을 0.1% SDS가 포함된 TE buffer (pH 7.6) 적당한 양으로 녹였다. 이 RNA 용액을 1.5 ml microfuge tube에 옮긴 후 여기에 동량의 phenol/chloroform을 첨가하고 잘 섞고 원심분리한 후 수층액층만 추출하고, 동량의 chloroform과 n-butanol (4:1)로 동일한 방법으로 수회 더 추출하였다. 정제한 RNA용액에 1/10 volume의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2배 volumes의 ice-cold ethanol을 차례로 첨가한 후 잘 섞어서 -20°C에서 30분이상 방치했다. 그리고, 4°C에서 10분간 12,000 xg로 원심분리하여 RNA를 침전시키고 다시 75% ethanol로 세척하여 원심분리한 후 침전된 RNA를 공기 중에서 말렸다. RNA를 다시 소량의 DEPC 처리된 증류수에 녹인 후 농도를 측정하고 곧바로 northern transfer를 실시하거나, 사용전까지 3배 volume의 ethanol을 첨

가하여 -70°C 에서 보관했다. RNA의 농도는 spectrophotometer로 측정했으며 260 nm에서 O.D.가 1일때 40 ug/ml로 계산하였다.

3) Northern Transfer

적당량의 agarose를 녹여 60°C 까지 식힌 후 $5\times$ formaldehyde gel-running buffer (0.1 M MOPS, pH 7.0, 40 mM sodium acetate, 5 mM EDTA, pH 8.0)를 1 M이 되게, formaldehyde를 2.2 M되게 각각 첨가하고 잘 섞어준 후, gel을 굳히고 적어도 30분간 상온에서 방치했다. 30 ug 이상의 RNA 4.5 ul, $5\times$ formaldehyde gel-running buffer 2.0 ul, formaldehyde 3.5 ul, formamide 10.0 ul를 섞어 sample을 만들었다. 이 sample을 65°C 에서 15분간 방치하여 RNA를 denaturation시킨 후, 재빨리 얼음 속에서 식혔다. Sample을 loading하기 전에 gel을 5 V/cm로 prerun하고, DEPC 처리한 후 멸균한 formaldehyde gel-loading buffer (50% glycerol, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.2% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF)를 sample에 2 ul 가한 후, sample을 gel에 loading했다. Gel을 $1\times$ formaldehyde gel-running buffer에서 3-4 V/cm로 전개했다. 약 2시간 정도 전기영동하여 bromophenol blue가 약 8 cm 정도 이동했을 때 전기영동을 끝내고, DEPC처리한 증류수에 담가 formaldehyde를 gel에서 우려낸 후 marker lane만 잘라내어 ethidium bromide로 염색하고 photograph한다. 나머지 gel을 Whatman 3 MM paper로 덮힌 유리판 위에 올려 놓는다. 이 때, 이 유리판 밑에는 $20\times$ SSC를 채운 접시를 놓고 3 MM paper가 젖을 수 있도록 paper의 양끝을 buffer속에 잠기게 했다. Nitrocellulose filter를 적당한 크기로 잘라 deionized water에 완전히 적신 후 $20\times$ SSC에 적어도 5분간 담가 두었다. 위의 gel을 3 MM paper위에 기포가 생기지 않도록 놓고 gel 주위로 parafilm을 둘렀다. 그 위에 적셔진 nitrocellulose paper를 기포가 생기지 않도록 놓고 $2\times$ SSC로 적신 3 MM paper 2장을 덮었다. 그 위에 종이타월을 잘라 5~8 cm 높이로 쌓고 유리판을 덮은 후 500 g 정도의 무게로 눌러 주었다. 가끔 젖은 종이타월을 갈아주면서 6~16시간 정도 blotting하여 준후 filter를 $6\times$ SSC에 5분 정도 담갔다가 상온에서 3 MM 종이 위에 놓고 30분 정도 말려 주었다. 이 filter를 3 MM paper 사이에 끼워 80°C 에서 30분에서

2시간 정도 baking하여 blotting된 RNA를 filter에 cross-linking시켰다.

4) Probe Preparation

pGEM4Z의 Sal I site에 cloning되어 있는 GLUT4의 cDNA를 E.coli에서 다량 증폭하여 plasmid를 정제한 후, Sal I으로 반응시켜 완전히 절단한 후, agarose gel에서 확인하고 chloroform으로 수회 정제한다. 이것을 다시 prepared gel에 loading하여 전개시킨 후 GLUT4 cDNA band만을 잘라내고 elution하여 정제를 실시하였다. 최종적인 추출물을 알코올 침전시키고, DEPC처리된 멸균증류수에 녹여 농도를 측정한 후 사용하였다.

5) Prehybridization & Hybridization

RNA가 transfer된 membrane을 prehybridization (50% formamide, $5\times$ SSC, $5\times$ Denhardt's Solution, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 0.1% SDS, 100 ug/ml denatured salmon sperm DNA) solution에서 42°C , 2시간이상 반응시킨다. 정제한 GLUT4 cDNA probe은 random hexamer법을 이용하여 radiolabeling시켰다. 총 hybridization반응액내에 5 ng/ml 정도 되는 양의 probe를 denature시키고 [α - ^{32}P]dCTP로 37°C 에서 3~4시간 radiolabel한 후, sephadex G-50 spun column을 통과시켜 radiolabel되지 않은 [α - ^{32}P]dCTP를 제거한다. Hybridization용액 (50% formamide, $5\times$ SSC, $1\times$ denhardt's solution, 20 mM sodium phosphate, pH 6.8, 100 ug/ml denatured salmon sperm DNA, 0.1 g/ml dextran sulfate)에 이 radiolabel된 probe를 첨가하여 42°C 에서, 16~24시간정도 hybridization시킨다.

6) Washing & Autoradiography

세척액 1 ($2\times$ SSC, 0.1% SDS)로 상온에서 20분간 흔들어 주며 세척하고, 세척액 2 ($2\times$ SSC, 0.1% SDS)로 55°C , 20분간 3회 세척했다. Membrane을 $2\times$ SSC 용액에 살짝 rinse하고 공기중에서 건조시킨 후 X-ray film에 노출시켰다. -70°C 에서 24~48시간 동안 autoradiography한 후 film을 현상했다. 이 autoradiogram을 densitometer (Hoefer instrument-s)를 이용하여 scanning densitometry하여 상대량을 측정하였다.

Table 1. Changes of Body Weight in Three Groups of Rats

	Tx. Groups		
	STZ-DM	Metavanadate	Pervanadate
	(n=6) (g)	(n=6) (g)	(n=6) (g)
Before STZ	237±10	238±15	234±13
Before Tx.	210±14	219±15	218±19
Week 1	198±17	200±20	200±6
Week 2	189±19	193±27	200±18
Week 3	182±17	209±34	215±14*
Week 4	179±16	222±31*	219±12*
Week 6	175±13	229±31*	236±30*
Week 8	172±6	236±30*	244±11*

Values are mane±SD.

STZ: Streptozotocin. Tx.: treatment.

STZ-DM: streptozotocin induced diabetic control group.

*p<0.05 compared with STZ-DM.

결 과

1. Vanadate투여후 체중 및 혈당변화

Vanadate투여를 시작한 후 2주까지는 두 치료군 및 당뇨병백서군 모두에서 체중감소를 보였으나, vanadate투여 2, 3주째부터 치료군 모두에서 체중증가를 보이기 시작하여 4주째에는 당뇨병백서군에 비해서 유의있게 체중이 증가되었다(p<0.05, Table 1, Fig. 1).

당뇨병백서군과 metavanadate치료군 및 pervanadate치료군에서 치료전 혈당은 각각 445 mg/dl, 417 mg/dl, 418 mg/dl이었고, 치료 2주 후에는 각각 453 mg/dl, 159 mg/dl, 109 mg/dl로 치료군에서 혈당이 유의있게 강하되었다(p<0.05, Table 2, Fig. 2).

2. Vanadate 투여후 조직변화

Vanadate투여 8주째 당뇨병백서군과 치료군에서 간장, 신장 및 췌장을 광학현미경으로 관찰했을 때, 간장 및 신장의 조직에서는 특이한 소견을 발견할 수 없었으나 췌장의 소도세포는 파괴되어 있었다(Fig. 3~5).

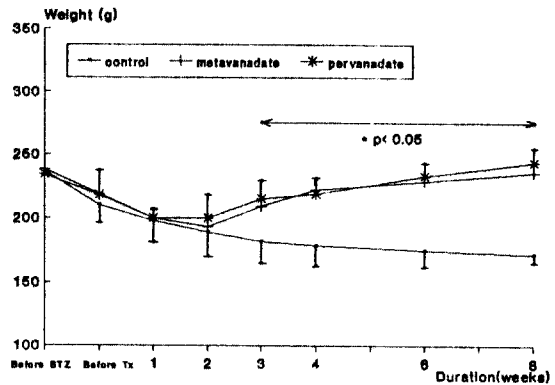


Fig. 1. Changes of body weight in three groups.

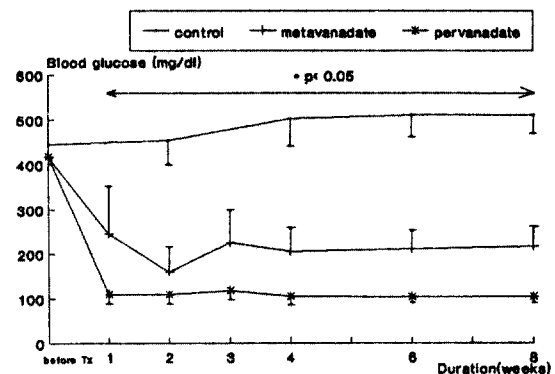


Fig. 2. Changes of fed-state blood glucose in three groups.

Table 2. Changes of Fed-state Blood Glucose in Three Groups of Rats

	Tx. Groups		
	STZ-DM	Metavanadate	Pervanadate
	(n=6) (mg/dl)	(n=6) (mg/dl)	(n=6) (mg/dl)
Before Tx.	445 ± 50	417 ± 65	418 ± 75
Week 1	—	245 ± 106	110 ± 20*
Week 2	453 ± 53	159 ± 55*	109 ± 20*
Week 3	—	225 ± 73	118 ± 19*
Week 4	502 ± 62	205 ± 52*	105 ± 18**
Week 6	511 ± 49	211 ± 41*	104 ± 12**
Week 8	511 ± 42	217 ± 44*	105 ± 13**

Values are mean ± SD. Tx.: Treatment.

STZ-DM: streptozotocin induced diabetic control group.

*p < 0.05 compared with STZ-DM. **p < 0.05 compared with metavanadate treated group.



Fig. 3. Light microscopic morphology of rat liver. The hepatocytes were normal in configuration.

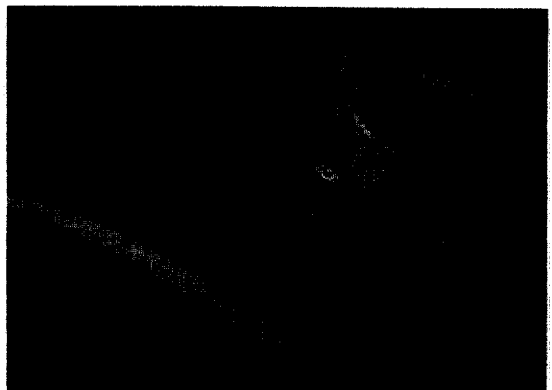


Fig. 5. Light microscopic morphology of rat pancreas. The pancreatic islets were normal in configuration.

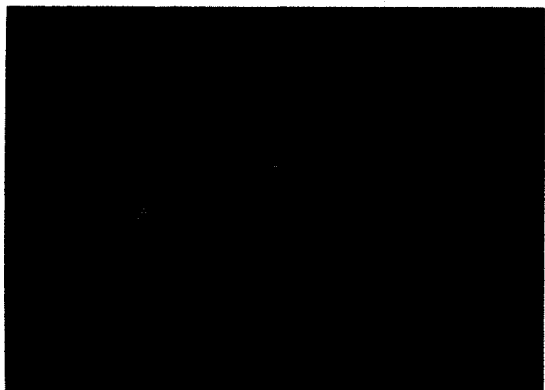


Fig. 4. Light microscopic morphology of rat kidney. The glomeruli and tubules were normal in configuration.

3. Vanadate투여후 부작용

실험기간동안 대상백서들은 설사가 심하지는 않았으며 시행한 생화학검사상 혈청 BUN 및 creatinine치는 당뇨병백서군에 비해 vanadate투여 후 큰 차이가 없었고 혈청 SGOT 및 SGPT치는 vanadate치료군에서 약간 상승하였다(Table 3).

4. 당뇨병백서군에서 Vanadate투여전후 포도당 운반체의 활성도

분리한 원형질막단백질로 45 kD 포도당운반체 띠를 관찰하였으며 (Fig. 6~8) 정당대조군에 비해 당뇨병백

Table 3. Serum Biochemical Tests after 8 Weeks in Three Groups of Rats

		STZ-DM (n=6)	Metavanadate (n=6)	Pervanadate (n=6)
BUN	(mg/dl)	18±0.3	24±8.3	29±5.3
Creatinine	(mg/dl)	0.6±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
SGOT	(IU/L)	117±9	113±31	148±68
SGPT	(IU/L)	54±22	17±8	80±25

Values are mean±SD.

BUN: blood urea nitrogen.

SGOT: serum glutamic oxaloacetic transaminase.

SGPT: serum glutamic pyruvic transaminase.

STZ-DM: streptozotocin induced diabetic control group.

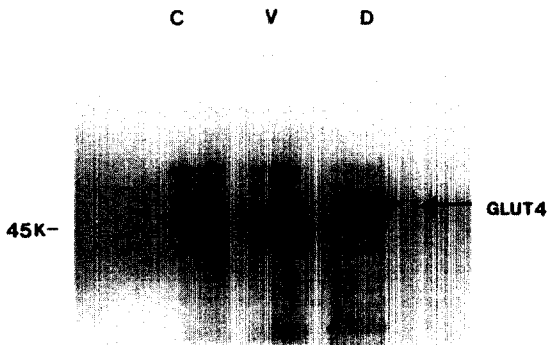


Fig. 6. Quantitation of glucose transporter (GLUT4) protein in rat skeletal muscle from control, diabetic, and vanadate-treated rat using antibodies specific for the GLUT4 glucose transporters. Representative western blot of muscle of control (C), diabetic (D), and vanadate-treated rat (V). For rat skeletal muscle, 100 ug protein was applied to each lane.

서균에서 포도당운반체의 활성도는 50~55%로 현저히 감소하였으나, vanadate투여후 포도당운반체의 활성도는 70~75%로 약간 회복되는 경향을 보였다(Fig. 9, 10).

5. Vanadate투여후 포도당운반체 mRNA양의 변화

총 RNA는 CsCl density gradient를 이용하여 추출하였다(Table 4). Fig. 11에서 보는 바와 같이 28S와 18S의 band로써 mRNA가 파괴되지 않고 잘 보존되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 말초근육조직으로부터 추출한 총 RNA는 northern blot을 시행하였고, 이

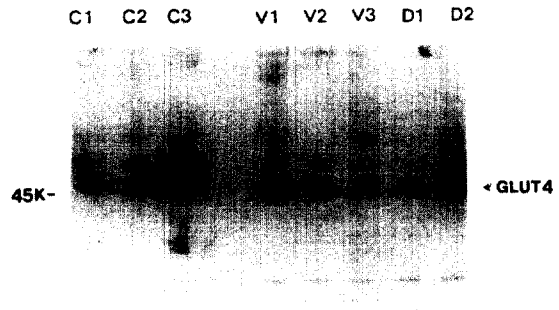


Fig. 7. Immunoblot showing relative abundance of GLUT4 protein in rat skeletal muscle of control (C), diabetic (D), and vanadate-treated rats (V). Muscle membrane preparation, gel electrophoresis, immunoblotting (ECL) and densitometric scanning were performed as described in materials and methods. Equal amounts of membrane protein (100 ug) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and reacted with antibodies specific for the COOH-terminal portion of the GLUT4 glucose transporter.

때 사용한 표식자로서는 Chicago대학의 Bell교수로부터 기증받은 포도당운반체(GLUT4) cDNA를 이용하였다. 관찰된 GLUT4 mRNA의 분자 크기는 약 3.2 kb 정도이며, streptozotocin으로 유발한 당뇨병백서균에서 포도당운반체 mRNA가 정상대조군에 비해서 약 50% 정도로 현저히 감소되어 있었고, vanadate투여 후 약 70% 정도로 호전되는 경향을 보였다(Fig. 12, 14).

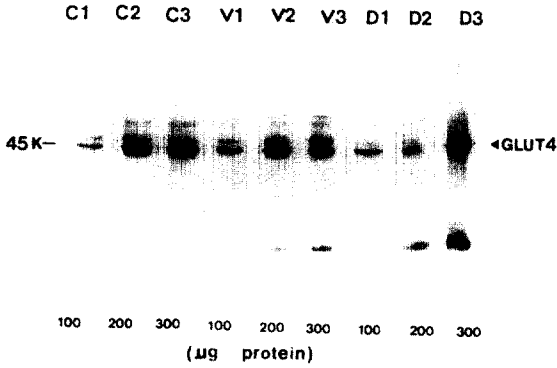


Fig. 8. Immunological identification of GLUT4 glucose transporter in rat skeletal muscles. The total membrane fractions were prepared by ultracentrifugation and indicated quantities of membrane protein were subjected to western blot analysis as described for materials and methods.

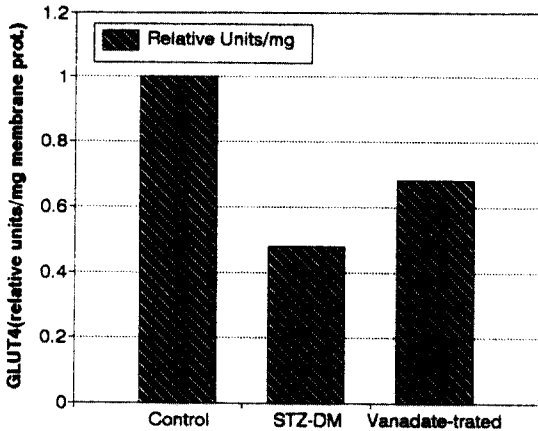


Fig. 9. Effects of diabetic rats and vanadate-treated rats on GLUT4 content in rat skeletal muscles. Total membrane fractions were prepared from rat skeletal muscle and subjected to immunoblot analysis with GLUT4-specific antibodies as described for materials and methods. relative numbers of GLUT4 transporters per milligram membrane protein were quantitated on ECL by scanning densitometry, and expressed in each individual as a fraction of the mean value in control subjects. Datas are mean \pm SD in each subgroups.

고 안

Streptozotocin으로 유발된 당뇨병백서에서 당뇨병

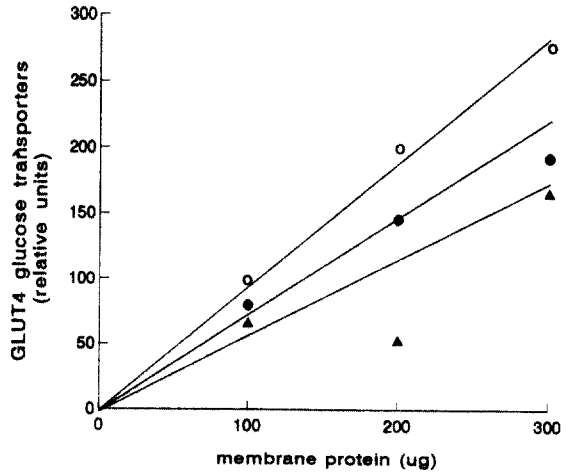


Fig. 10. Quantitation of GLUT4 protein in skeletal muscle of rats. Crude total membranes were prepared from total skeletal muscle of three different rats. Open circle: control (C); closed circle: vanadate-treated rat (V); triangle: diabetic rat (D).

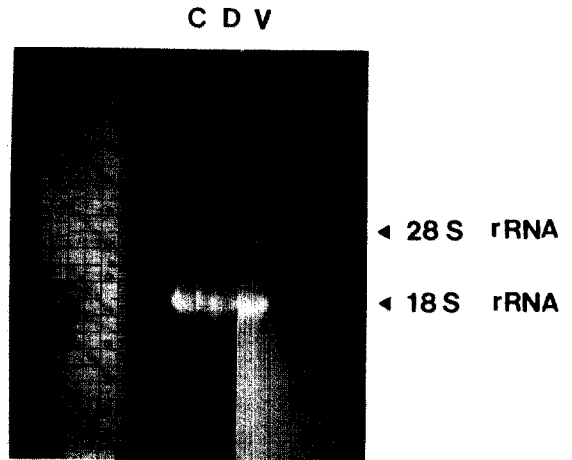


Fig. 11. Total RNA isolation from rat skeletal muscle using the guanidium thiocyanate/CsCl density gradient ultracentrifugation. Equal amount of total RNA preparation from each subgroup was subjected to 1% formaldehyde gel electrophoresis.

이 유발되어 체중이 감소하다 vanadate투여후 혈당이 정상에 가깝게 됨에 따라 체중이 증가하기 시작하였는데 이는 Madson 등¹⁷⁾의 보고와 유사한 결과를 보였다. Vanadate투여 8주후 시행한 생화학적 검사에서 신장기능은 별 변화가 없었으나 pervanadate치료군에

Table 4. Relative RNA Content of Skeletal Muscle from Control, STZ-DM, and Vanadate-treated Rats

	Control (n=6)	STZ-DM (n=6)	vanadate-treated (n=12)
Total RNA/g tissue (U/g)	1.00±0.32	0.35±0.05	0.67±0.05
GLUT4 mRNA/total RNA (U/100 ug)	1.00±0.03	0.56±0.05	0.84±0.06
Overall GLUT mRNA expression (U/g tissue)	1.00±0.01	0.21±0.002	0.56±0.003

Values are means±SE.

Muscle tissue was weighed, homogenized, and subjected to CsCl density gradient ultracentrifugation to obtain a total RNA fraction. Total tissue content of RNA was measured by spectrophotometry. The value in each group was expressed as a fraction of the mean value for that RNA in control.

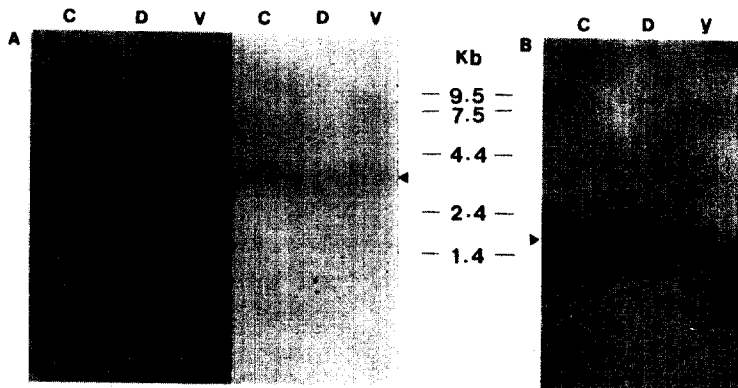


Fig. 12. A. Effects of vanadate of GLUT4 mRNA level of skeletal muscle in STZ-induced diabetic rats. Diabetic rats were induced and then treated with vanadate as described in methods. Northern blot analysis of skeletal muscle total RNA (100 ug/lane) from individual rats was performed as under methods. Total RNA, size-fractionated (100 ug/lane) on 1% formaldehyde gels was transferred to nylon membranes, and hybridized under high-stringency conditions with ³²P-labeled cDNAs encoding GLUT4. The arrow indicated GLUT4 mRNA species. **B.** Northern blot of total RNA from STZ-induced diabetic rat skeletal muscle actin probe. Total RNA was prepared as described above. The blot was hybridized to a chicken β-actin cDNA probe, which had been ³²P-labeled by megaprime DNA labeling. The blot was quantified by scanning densitometry.

서 간효소치가 약간 상승하는 부작용을 보였는데, 동시에 시행된 간 및 콩팥 조직검사에는 아무런 이상 소견이 보이지 않아 간에 대한 부작용이 조직학적 변화를 초래할 정도는 아닌 것으로 생각되었다. 반면에 Mongold 등²⁰⁾은 vanadate투여후 생화학적 검사 및 조직소견에서 특별한 이상을 발견할 수 없었다는 보고를 한바 있는데, 이는 Mongold 등이 39일간 vanada-

te를 투여하고 관찰한데 비하여, 본 연구에서는 8주동안 vanadate를 투여한 후 관찰이라는 점에서, vanadate의 장기간 투여와 연관될 것으로 생각되기도 하나, 향후 장기간 본 약제를 투여함으로써 이러한 변화가 일시적인 현상인지 확인할 필요성이 있을 것으로 생각된다.

Vanadate투여후 시행된 췌장조직검사에서 췌장소

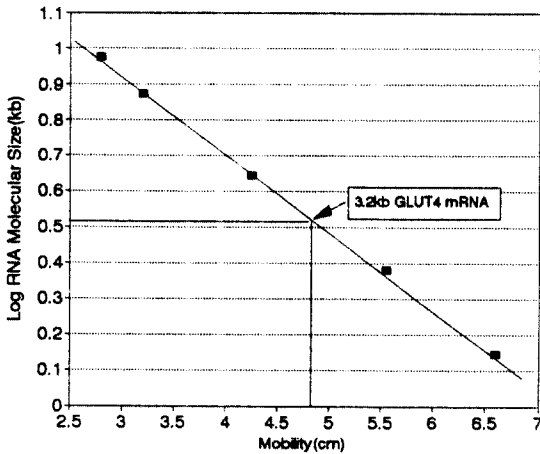


Fig. 13. Determination of molecular size of GLUT4 mRNA detected in the autoradiograms. GLUT4 cDNA hybridized with a single 3.24 kb mRNA species in each subgroups. Standard RNA marker bands (BRL) are 9.5 kb, 7.5 kb, 4.4 kb, 2.4 kb, and 1.4 kb.

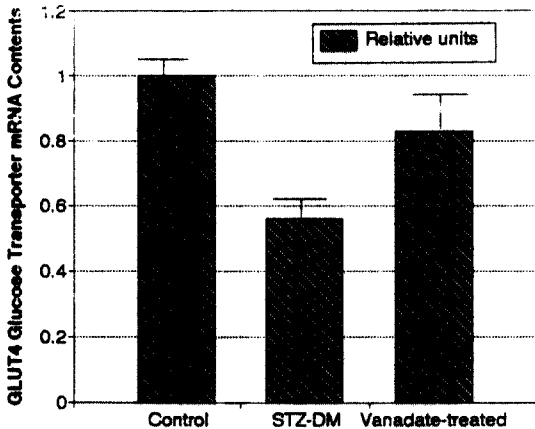


Fig. 14. Comparison of the relative content of glucose transporter mRNA in skeletal muscle from control, STZ-induced DM, vanadate-treated DM rats. Relative amounts of the GLUT4 mRNA were quantitated by subjecting total RNA fractions to northern blot analysis followed by scanning densitometry of autoradiograms. The values in each subgroups were expressed as a fraction of the mean value for the mRNA in control subjects. Values are mean \pm SE of relative units per 100 μ g total mRNA in each subgroups.

과 같은 소견을 보인 것이다. 따라서 vanadate투여후 혈당의 변화는 췌장소도세포의 재생에 의한 것이 아니라, vanadate 그 자체에 의한 혈당저하작용에 의한 것으로 추정할 수 있겠다. Pederson 등¹²⁾은 Streptozotocin으로 유발된 당뇨병백서에서 당뇨병이 발병된 지 3일만에 vanadate를 일찍 투여함으로써 췌장소도세포의 파괴를 억제할 수 있다고 보고한 바 있는데, 같이 측정된 인슐린농도는 감소되어 있는 소견을 보여, 췌장조직파괴의 예방이 혈당을 정상화시켰다고 볼 수는 없겠다.

포도당운반체 (facilitative glucose transporter; GLUT)는 각각 분포하고 있는 조직에 따라 5가지로 구분되며^{21,22)}, 그중 GLUT4는 근육이나 지방세포에 존재하고 인슐린에 의하여 발현이나 전이가 증가하기 때문에, 식후에 상승된 혈당으로 분비된 인슐린에 의하여 당의 세포내이동을 증가시켜 식후혈당의 상승을 억제하여 포도당의 항상성에 중요한 역할을 한다^{23,24)}. 최근 인슐린저항성에 대한 이들의 역할이 광범위하게 연구되고 있으며 이들의 mRNA의 표현, 전이, 원형질막과의 접합 또는 활성화 등의 장애가 인슐린저항의 중요한 요소로 주목되고 있다.

포도당운반체의 발현, 전이 및 내재적 활성도 (intrinsic activity)는 여러가지 물질에 의하여 조절된다. 인슐린에 의한 당운반체의 증가는 소위 2단계모델로 설명하고 있다. 즉 인슐린은 세포내 저밀도막 (intracellular low density microsomal membrane; LDM)에서 원형질막 (plasma membrane; PM)으로 포도당운반체의 전이를 증가시키며, 또한 포도당운반체의 내재적 활성도를 증가시킨다²⁵⁾. 본 연구에서 GLUT4 mRNA는, 당뇨병 유발시에 정상대조군의 약 50% 정도로 감소되었으나, vanadate투여후 정상대조군의 약 80% 정도로 회복되어, Strout 등¹⁵⁾과 유사한 결과를 보였다. 또한 GLUT4 단백질은 당뇨병에서 원형질막에서의 양이 정상대조군에 비하여 약 50~55% 감소하였고, vanadate투여후 정상군의 약 70~75% 정도로 회복되었다. 이는 Strout 등¹⁵⁾이 streptozotocin으로 유발된 당뇨병백서의 근육세포에서 인슐린반응성운반체가 70% 감소되었다가 vanadate투여후 대조군의 87%까지 회복된 보고와 유사한 결과라 할 수 있겠다. 반면에 Brichard 등¹⁶⁾은 vanadate를 10주간 주구난 후, 인슐린저항성백서의 근육에서는 당흡수는 증가하

도세포가 파괴된 소견을 보였는데 이는 Mongold 등²⁰⁾

나, GLUT4 mRNA의 양은 변함이 없었다고 하였다. 이와같은 차이는 실험동물이 달랐던 사실과 연관될 가능성이 있다고 생각된다. 또한 Paquet 등¹⁴⁾은, vanadate를 처치한 백서의 지방세포에서는 2-deoxy-glucose의 흡수가 증가하였고, GLUT4는 원형질막에서 증가하고, 세포내 저미도막에서는 감소하였다고 보고한 바 있다. 이를 본 실험의 결과와 연관지어 생각해 볼 때, 원형질막에서의 GLUT4 증가가, 포도당운반체의 전이 증가로 인한 것인지, 아니면 포도당운반체의 내재적 활성도가 증가된 효과인지 명확히 알수는 없으나, GLUT4 mRNA가 증가하고 원형질막에서 포도당운반체가 증가된 소견으로 보아 포도당운반체의 전이가 증가된 것으로 생각되어진다.

결론적으로 vanadate의 혈당강하 효과는 포도당운반체 mRNA와 포도당운반체단백질의 증가에 의해 이루어진 것으로 사료된다.

요 약

목적 : 당뇨병은 전세계적으로 급속도로 증가하고 있는 만성적인 질환으로서 아직 만족할만한 치료약제가 없는 실정이다. 본 연구는 포도당대사의 가장 기초적인 단계인 세포내로의 포도당이동 및 세포내대사에서 중요한 역할을 하는 포도당운반체의 활성도 및 포도당운반체 mRNA조절에 vanadate가 미치는 영향을 연구함으로써 그 작용기전을 규명하는데 있다.

방법 : 나이와 체중이 비슷한 male Sprague-Dawley백서를 이용하여 정상대조군 및 streptozotocin으로 유발한 당뇨병백서군과 vanadates치료군 (metavanadate, pervanadate)으로 나누어 체중, 혈당, 포도당운반체활성도 및 포도당운반체 mRNA양의 변화를 조사하였다.

결과 : Vanadate투여 2주후까지는 당뇨병백서군 및 vanadates치료군 모두에서 체중감소를 보였으나, vanadate투여 2, 3주째부터 치료군 모두에서 체중증가를 보이기 시작하여 4주째에는 당뇨병백서군에 비하여 체중이 유의있게 증가되었다. 당뇨병백서군과 metavanadates 치료군, pervanadate치료군에서 치료 전 혈당은 각각 445 mg/dl, 417 mg/dl, 418 mg/dl이었고, 치료 2주후에는 각각 453 mg/dl, 159 mg/dl, 109 mg/dl로 vanadate치료군에서 혈당이 유의있게

강화되었다. vanadate투여 8주후 당뇨병백서군과 vanadates치료군에서 간장 및 신장조직을 광학현미경으로 관찰한 바, 특이한 이상소견을 발견할 수 없었으나, 췌장의 경우 소도세포가 파괴된 양상을 보였다. Vanadates투여 8주후 시행한 생화학적 검사에서 신장기능은 당뇨병백서군에 비해 차이가 없었으나 간효소치는 vanadates치료군에서 약간 상승하였다. 정상대조군에 비하여 당뇨병백서군에서 포도당운반체의 활성도는 현저히 감소되었고, vanadates투여후 포도당운반체의 활성도는 약간 회복하는 경향을 보였다. 정상대조군에 비해서 streptozotocin유발 당뇨병백서군에서 포도당운반체 mRNA는 현저히 감소되어 있었고, vanadates투여후 약간 호전되는 경향을 보였다.

결론 : streptozotocin으로 유발한 당뇨병백서군에서 vanadates투여후 혈당이 강하하는 이유는 이미 알려진 기전외에도 포도당운반체단백질과 mRNA양을 증가시킴이 중요한 기전의 하나로 기여하며, vanadates에 의한 포도당운반체의 조절은 전사후와 mRNA단계 모두에서 영향을 주는 것으로 생각된다.

== Abstract ==

The Change of Blood Glucose and the Activity and Gene Regulation of Glucose Transporters in the Peripheral Muscle on Vanadate Treatment in Diabetic Rats

Hyun Chul Lee, M.D., Moon Suk Nam, M.D.

Eun Jig Lee, M.D., Seung Kil Lim, M.D.

Kyung Rae Kim, M.D. and Kap Bum Huh, M.D.

*Department of Internal Medicine, Yonsei University
College of Medicine, Seoul, Korea*

Yoon Sok Chung, M.D.

*Department of Endocrinology and Metabolism,
Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea*

Kwan Woo Lee, M.D.

*Department of Internal Medicine, Inha University
Seongnam, Korea*

Yong Wook Cho, M.D.

*Department of Internal Medicine,
Soonchun Hyang University, Chunan, Korea*

Objectives: Vanadate is known to mimic several effect of insulin including the stimulation of glucose uptake and oxidation, glycogen synthesis as well as the anti-lipolytic effect. But mechanisms for these effects of vanadate are still not completely understood. The aim of this study was to elucidate the effects of vanadate on intrinsic activity of the glucose transporter and the regulation of the glucose transporter mRNA.

Methods: Using age and weight-matched male Sprague-Dawley rats (average weight 250 g), the experimental groups were divided into nondiabetic rats (n=6), streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (n=6), metavanadate and pervanadate treated diabetic rats (n=12). We measured weight, blood glucose, glucose transporter activity, and glucose transporter 4 (GLUT4) mRNA change.

Results:

1) STZ-induced diabetic rats became catabolic and they lost their weight, but after 3 to 4 weeks of treatment with metavanadate or pervanadate, body weights were increased. Blood glucose levels in

metavanadate or pervanadate treated rats were significantly lower than STZ-induced diabetic rats after 1 week treatment.

2) There was no significant toxicity in vanadates treated rats, compared with STZ-induced diabetic rats and there was no abnormal change in kidney and liver of rats under light microscope 8 weeks after vanadates treatment.

3) The glucose transporter activity of diabetic rats was significantly decreased, compared with that of normal control rats, and increased after vanadates treatment.

4) The glucose transporter mRNA of diabetic rats was markedly decreased, compared with that of normal control rats, and increased after vanadates treatment.

Conclusion: In STZ-induced diabetic rats, vanadates treatment may improve insulin sensitivity through increased expression of GLUT4 gene.

Key Words: Streptozotocin-induced Diabetic Rat, Vanadate, GLUT4

REFERENCES

- 1) Heyliger CE, Tahiliani AG, Mcneil JH: *Effects of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. Science* 227: 1474, 1985
- 2) Chaliss RAJ, Leighton B, Budohosk L, Newsholme LA: *Effect of chronic administration of vanadate to the rat the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis in skeletal muscle to insulin. Biochem Pharmacol* 36:357, 1987
- 3) Meyerovitch J, Farfel Z, Sack J, Schechter Y: *Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. J Biol Chem* 262: 6658, 1987
- 4) Brichard SM, Okitolonda W, Henquin C: *Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats. Endocrinology* 123:2048, 1988
- 5) Schechter Y, Karlsh SJD: *Insulin-like stimulation of glucose oxidation in rat adipocytes by vanadyl ions. Nature (London)* 284:556, 1980
- 6) Dubyak GR, Kleinzeller AD: *The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. J Biol Chem* 255:5306, 1980
- 7) Tolman EL, Barris E, Burns M, Pansini A, Partridge R: *Effects of vanadium on glucose metabolism*

- in vitro*. *Life Sci* 25:1159, 1979
- 8) Pugazhenth S, Khandelwal RJ: *Insulin like effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and STZ-induced diabetic rats*. *Diabetes* 39:821, 1990
 - 9) Ramasarma T, Crane F: *Does vanadium play a role in cellular regulation ?* *Curr Top Cell Regul* 20:247, 1981
 - 10) Tracey AS, Gresser MJ: *Interaction of vanadate with phenol and tyrosine phosphorylation*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 83:609, 1986
 - 11) Shechter Y: *Insulin-mimetic effects of vanadate: Possible implication for future treatment of diabetes*. *Diabetes* 39:1, 1990
 - 12) Pederson RA, Ramandaham S, Buchan AMJ, Mcneil JH: *Long-term effects of vanadyl treatment on STZ-induced diabetes in rats*. *Diabetes* 38:1390, 1989
 - 13) Cros G, Mongold JJ, Serano JJ, Ramanadham S, Mcneil JH: *Effects of vandyl derivatives on animal models of diabetes*. *Mol Cell Biochem* 109:163, 1992
 - 14) Paquet MR, Romanek RJ, Sargeant RJ: *Vanadate induces the recruitment of GLUT-4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes*. *Mol Cell Biochem* 109:149, 1992
 - 15) Strout HV, Vicario PP, Biswas C, Saperstein R, Brady EJ, Pilch PF, Berger J: *Vanadate treatment of streptozotocin diabetic rats restores expression of the insulin-responsive glucose transporter in skeletal muscle*. *Endocrinology* 126:2728, 1990
 - 16) Brichard SM, Jeannet AF, Jeanrenaud B: *Vanadate treatment markedly increases glucose utilization in muscle of insulin-resistant fa/fa rats without modifying glucose transporter expression*. *Endocrinology* 131:311, 1992
 - 17) Madsen KL, Porter VM, Fedorak RN: *Oral vanadate reduces Na⁺-dependent glucose transport in rat small intestine*. *Diabetes* 42:1126, 1993
 - 18) Malabu UH, Dryden S, Mccarthy HD, Kilpatrick A, Williams G: *Effect of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rat: The antihyperglycemic action of vanadate is attributable entirely to its suppression of feeding*. *Diabetes* 42:9, 1994
 - 19) Lammie UK: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227:680, 1970
 - 20) Mongold JH, Cros GH, Vian L, Tep A, Ramanadham S, Siou G, Diaz J, McNeill JH, Serrano JJ: *Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: Effects on vanadium levels and pancreatic B-cells morphology*. *Pharmacology and Toxicology* 67:192, 1990
 - 21) Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, fukumoto H, Seino S: *Molecular biology of mammalian glucose transporters*. *Diabetes Care* 13:198, 1990
 - 22) Simpson LA, Cushman SW: *Hormonal regulation of mammalian glucose transport*. *Annu Rev Biochem* 55:1059, 1986
 - 23) Mueckler M: *Family of glucose-transporter genes: Implication for glucose homeostasis and diabetes*. *Diabetes* 39:6, 1990
 - 24) Kananicki MA, Pilch PF: *Regulation of glucose transporter function*. *Diabetes Care* 13:219, 1990
 - 25) Karnieli E, Zaronwski MJ, Hisson PJ, Simpson LA, Salans LB, Cushman SW: *Divergent mechanism for the insulin resistant and hyperresponsive glucose transporter in adipose cell from fasted and refed rats*. *J Biol Chem* 256:4772, 1981