



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

포도당 수송체 4의 세포막 이동 검출법과
이를 이용한 바나듐 착화합물의 효능 평가

Investigation of Glucose Transporter 4 Translocation
to the Cellular Membrane for the Evaluation of
the Anti-inflammatory and Insulin-mimetic Properties
of a Vanadium Complex

2016년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
기 지 은

포도당 수송체 4의 세포막 이동 검출법과
이를 이용한 바나듐 착화합물의 효능 평가

Investigation of Glucose Transporter 4 Translocation
to the Cellular Membrane for the Evaluation of
the Anti-inflammatory and Insulin-mimetic Properties
of a Vanadium Complex

지도교수 송 준 명

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2015년 11월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

기 지 은

기지은의 약학석사학위논문을 인준함

2015년 12월

위 원 장 박 정 일 (인)

부 위 원 장 권 성 원 (인)

위 원 송 준 명 (인)

국 문 초 록

인슐린 신호전달체계에 따라 세포내 포도당 흡수를 하기 위해 포도당 수송체 4(Glucose Transporter 4, GLUT4)를 세포내에서 세포막으로 이동시킨다. 염증관련 매개체들은 제 2형 당뇨(T2DM)에서 관찰되는 인슐린 저항(Insulin resistance, IR)상태를 야기시킨다. 비만으로 유도되는 IR 상태의 치료방법으로, 인슐린 mimetic 그리고 항염증 효능이 있는 합성물이 효과가 있을 것으로 판단된다.

Vanadium oxo 복합체는 인슐린 mimetic 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 트립타민, 피리독살 하이드로클로라이드는 항염증 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 이 세 가지 물질의 결합으로 인해 새로운 vanadyl-Schiff base 복합체(VOTP)가 합성되었다. 새로운 합성물인 VOTP가 인슐린 mimetic, 항염증 효능을 가지고 있는지 확인하기 위하여 GLUT4-myc-GFP 융합 단백질을 과다발현 시킨 CHO-K1 세포주를 사용하였다. GLUT4-myc-GFP 융합 단백질이 과다발현 된 CHO-K1 세포에 VOTP를 처리함으로써 세포막으로 이동되는 GLUT4의 정상적인 양을 전반사 형광(Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF)현미경을 이용하여 관찰하였다.

TIRF 이미지 결과는 VOTP가 항당뇨 물질로써 효과적으로 작용하는 것을 보여준다. VOTP는 c-Jun N-terminal kinase 1(JNK-1)의 비활성화와 인슐린 리셉터 기질(Insulin receptor substrate 1, IRS1)의 타이로신 인산화를 활성화하여, IR 상태일 때 인슐린 신호체계를 회복시킨다. VOTP에 의한 높은 수준의 Forkhead box O1(FOXO1) 인산화는 글루코오스신생합성을 줄어뜨리게 하고, 글리코겐합성을 늘리게 된다. 본 연구를 통해 새로 합성된 물질인 VOTP는

인슐린 mimetic, 항염증 두 가지 효능을 가지고 있으며 나노 물 범위에서도 효능을 가지고 있음을 확인하였다.

주요어

인슐린 저항성, 포도당 수송체 4, 항당뇨, 염증, 전반사 형광현미경

학번: 2013-23453

목 차

국문초록	i
목 차	iii
List of Figures	iv
List of Abbreviations	v
I. 서 론	1
II. 실험	3
1. 플라스미드와 합성 물질	3
2. 세포 배양 및 트랜스펙션	3
3. 포도당 흡수 측정	4
4. TIRF 이미징	4
5. Qdot-항체 결합 및 이미징	5
III. 결 과	7
1. VOTP의 인슐린 mimetic 효능 평가	7
2. VOTP의 항염증 효능 평가	11
3. 하이콘텐츠 이미징	15
IV. 고 찰	17
V. 결 론	22
VI. 참고문헌	23
Abstract	25

List of Figures

그림 1. 인슐린 신호전달체계와 염증 신호전달체계 도식	6
그림 2. 지방세포로 분화된 3T3-L1의 포도당 흡수량	9
그림 3. VOTP 처리 후 세포막으로 이동된 GLUT4 관찰	10
그림 4. 인슐린 저항상태에서의 GLUT4 세포막 이동 관찰	13
그림 5. 세포막으로 이동된 GLUT4 관찰	14
그림 6. 하이콘텐트 이미징 결과	16

List of Abbreviations

GLUT4: Glucose Transporter 4
T2DM: Type 2 Diabetes Mellitus
IR: Insulin Resistance
TNF: Tumor Necrosis Factor
TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence
IRS1: Insulin receptor substrate 1
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
JNK1: c-Jun N-terminal kinase 1
FOXO1: Forkhead box O1
PI3K: phosphatidyl-inositol-3-kinase
AOTF: Acusto optic tunable filter
PBS: Phosphate Buffer Saline

I. 서론

인슐린 신호에 반응하지 않는 것을 인슐린 저항성이라고 하며, 이는 제 2형 당뇨병의 특성이다. 만성 염증반응은 인슐린 민감성을 줄이는데 큰 영향을 끼친다. 제 2형 당뇨병을 겪고 있는 몇몇 환자들은 TNF- α 가 높은 수준으로 발현된다. 최근 연구들에 의하면 TNF- α 는 인슐린 저항성 발병의 주요 원인이 되는 염증 전 사이토카인으로 분류한다¹. 인슐린에 의한 포도당의 흡수는 TNF- α 의 발현 증가에 의해 크게 감소한다². TNF- α 는 IRS1의 타이로신 인산화를 저해함으로써 인슐린에 대한 민감성을 줄이게 된다³. 일반적인 치료방법으로써 염증을 억제하고 인슐린 민감성을 높이는 복합적인 약이 사용된다. 따라서, 항염증 역할과 인슐린과 mimetic 효능을 가진 합성물은 항당뇨 치료에 막대한 성공효과를 가져올 수 있을 것이다. 두 가지 역할을 가진 하나의 합성물은 약의 복용량을 줄이고 처방을 용이하게 하는데 큰 기여를 할 것이다.

포도당 수송체 4(GLUT4)는 인슐린 저항성을 유도하는 TNF- α 의 발현에 의해 조절된다⁴. GLUT4는 세포 내 포도당 농도를 일정하게 유지하기 위해 인슐린 신호를 받으면 세포내로 포도당을 운반한다. 대부분의 수송체들은 세포막에 존재하나 GLUT4는 세포 내 소포에 존재하고 있다가 포도당의 흡수를 촉진하는 인슐린 신호가 있어야 세포막으로 이동하게 된다⁵. 따라서 TNF- α 는 GLUT4 세포막 이동을 저해하고, 이는 인슐린 저항성의 주요 원인으로 생각된다^{6,7}.

세포 독성을 줄이고 용해도를 개선시킨 vanadium oxo(VO) 복합체는 인슐린 mimetic 특성을 가지고 있기 때문에 제 2형 당뇨병의

치료로 쓰일 수 있을 것으로 기대되는 물질이다. 이 물질의 작용기전은 IRS1의 타이로신 인산화와 인슐린에 의한 GLUT4 세포막 이동을 촉진한다는 것이다⁸.

GLUT4의 세포막 이동 관찰은 GLUT4를 직접적으로 검출할 수 없기 때문에 어려움이 있다. Western blot, ELISA, 면역 전자 현미경과 같은 간접적 방법은 정확하지 않고 시간이 많이 소비되며 정량적인 결과를 얻기 어렵다⁹. 그렇기 때문에 유전적으로 코딩된 형광단을 GLUT4에 붙여 세포 내 존재 위치와 세포 이동을 관찰하는 것이 더 용이하다¹⁰. 전반사 형광(TIRF) 현미경은 에바네센트 각도에 의해 세포 안쪽의 시각화를 제한함으로써 선택적으로 형광단을 볼 수 있는 유용한 방법이다. TIRF 현미경은 오직 세포막 근처 부분만을 시각화하고 그 외의 부분 형광은 최소화하기 때문에 신호 대 잡음비가 높은 이미지를 얻을 수 있다. 이 방법은 단백질의 이동 정도를 정량화할 수 있는 효율적인 방법이다.

지금까지 인슐린 저항성 상태에서 쓰일 수 있는 항염증 효능 그리고 인슐린 mimetic 효능 두 가지를 가진 복합체에 대한 연구가 많지 않다. 이번 논문에서 우리는 두 가지 효능을 가진 vanadyl 복합체(VOTP)를 연구하였다. CHO-K1 세포주에 TNF- α 처리를 함으로써 발생하는 염증, 그리고 인슐린 저항상태 동안 세포막으로 이동하는 GLUT4를 TIRF 현미경을 통해 관찰하며 정량화 하였다. 합성된 VOTP는 염증반응으로 인해 일어난 인슐린 저항상태에서 항염증, 인슐린 mimetic 효과를 나타냄으로써 GLUT4의 세포막 이동을 촉진하여 포도당 항상성을 유지하는데 기여함을 밝혀내었다.

II. 실험

1. 플라스미드와 합성 물질

pB-GLUT4myc7-GFP는 Addgene (MA, USA)에서 얻은 것을 사용하였다. 인슐린, TNF- α , Vanadium (IV) oxide sulfate hydrate와 다른 용액들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, 피리독살 하이드로클로라이드와 트립타민은 Alfa-Aesar (MA, USA)에서 구입하였다.

2. 세포배양 및 트랜스펙션

3T3-L1과 CHO-K1 세포주는 한국 세포주 은행에서 공급받은 것을 사용하였다. 배지 조성은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 11995-073, Gibco), 5 mg/mL penicillin, 5 mg/mL streptomycin, 10 mg/mL neomycin (PSN; 15640-055, Gibco)과 10% fetal bovine serum (FBS; 16000-044, Gibco)을 혼합하여 사용하였으며 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

Lipofectamine 3000 (Invitrogen CA, USA)을 이용하여 1-5 μ g의 pB-GLUT4myc7-GFP 플라스미드를 CHO-K1 세포에 48시간동안 트랜스펙션 하였다. 그 후 항생제가 포함된 DMEM 으로 배지를 바꿔주었다. 인슐린과 VOTP는 15분동안 처리를 하였고, TNF- α 는 5시간동안 처리하였다. 세포막으로 이동된 GLUT4-GFP는

TIRF를 이용하여 검출하였다.

3. 포도당 흡수 측정

3T3-L1 세포를 12 well 플레이트에 1×10^6 /well의 개수로 하루 동안 키웠다. 그 후 지방세포로 분화시켰다¹¹. 지방세포를 FBS와 항생제가 없는 DMEM에서 4시간동안 키운 후, 100 nM의 인슐린 또는 각각 다른 농도의 VOTP (10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM)를 처리하고 15분 동안 37°C에 보관하였다. 각 well을 Krebs Ringer Phosphate buffer (KRP buffer)로 wash한 후, 100 μ M의 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG)을 처리하고 10분간 37°C에 보관하였다. 처리물질을 제거한 후 세포를 ice-cold PBS로 세 번 wash 하였다. 세포에 의한 포도당 흡수량은 세포 내 2-NBDG의 형광 세기를 확인 함으로써 분석하였다. 이미지는 488 nm의 excitation 파장과 525 nm의 emission 파장을 이용하여 형광현미경(IX73, Olympus, Tokyo, Japan)으로 얻었고 MetaMorph software, Version 7.1.3.0 을 사용하였다.

4. TIRF 이미징

CHO-K1 세포를 6 well 위의 커버슬립에서 하루동안 키운 후, lipofectamine 3000을 이용하여 1-5 μ g의 pB-GLUT4myc7

-GFP 플라스미드를 48시간동안 트랜스펙션 하였다. 세포에 VOTP 혹은 아스피린을 30분 동안 처리하고 10 ng/ml의 TNF- α 를 5시간 동안 처리하였다. 마지막으로 인슐린을 30분 동안 처리하고 커버슬립을 떼어내 슬라이드 글라스에 얹은 후 TIRF 현미경(Ig-TIRFM, TIRF Labs, NC, USA)을 이용하여 GFP 형광을 확인하였다. 모든 이미지는 20X 배율로 얻었으며, MetaMorph Software, Version 7.1.3.0을 이용하여 이미지를 분석하였다.

5. Qdot-항체 결합 및 이미징

인산화 형태의 GSK3 β , JNK1, IRS1ser, FOXO1과 IRS1tyr의 항체를 dot525, Qdot565, Qdot625, Qdot655 그리고 Qdot705와 각각 결합시켰다¹². 세포를 4%의 포르말데하이드로 고정시키고 PBS로 wash한 후 0.2%의 사포닌처리를 하였다. 다시 wash를 하고 Qdot-항체 결합체들을 1%BSA에 희석하여 1시간 동안 상온에서 인큐베이션 하였다. 그 후 PBS로 wash를 하고 Acusto optic tunable filter (AOTF, TEAF10-0.45-0.7-S, Brimrose Corporation, MD, USA)와 형광현미경을 이용하여 각각의 Qdot emission 파장을 검출하였다. 모든 이미지는 20X 배율로 얻었으며 이미지는 MetaMorph software, Version 7.1.3.0을 이용하여 분석하였다.

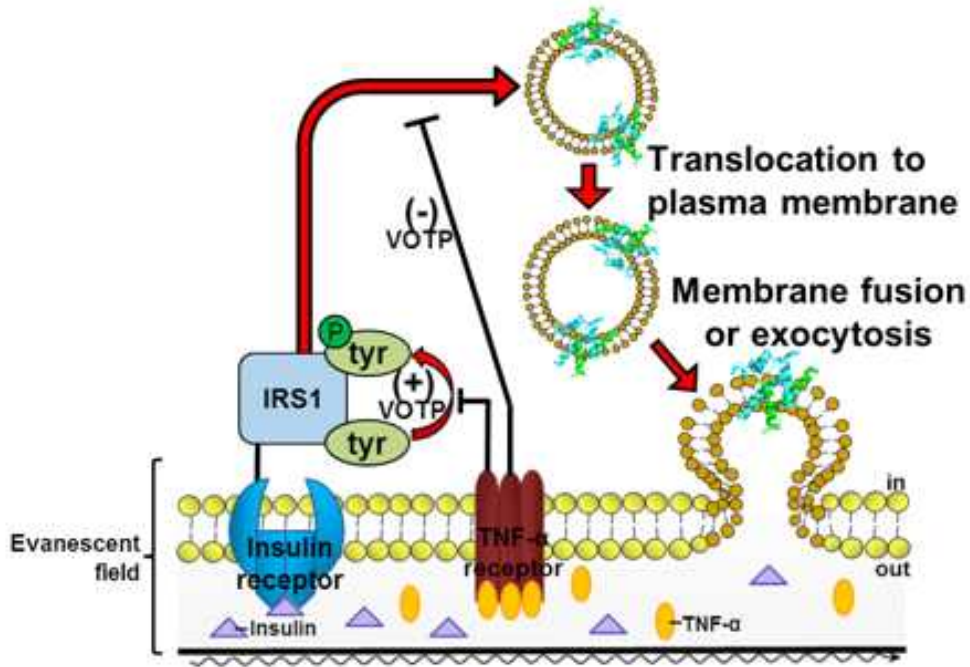


그림 1. 인슐린 신호전달체계와 염증 신호전달체계 도식.

인슐린이 인슐린 리셉터에 바인딩하면 세포내에 존재하고 있던 GLUT4의 세포막 이동을 촉진시키는 IRS1 타이로신의 인산화를 촉진시킨다. TNF-α는 IRS1 타이로신의 인산화와 그 아래 신호전달 체계를 억제함으로써 GLUT4의 세포막 이동, 포도당 흡수를 저해한다. VOTP는 TNF-α에 의해 유도되는 인슐린저항성을 억제하는 항염증 역할을 한다.

III. 결 과

1. VOTP의 인슐린 mimetic 효능 평가

VOTP의 인슐린 mimetic 효능을 평가하기 위해 세포내로 흡수되는 포도당량을 측정하였다. 그림 2의 (i)는 대조군, (ii)는 인슐린 100 nM, (iii)~(vi)는 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM의 VOTP를 세포에 처리하고 형광을 측정한 결과이다. 모든 실험은 오차를 줄이기 위해 각각 세 번씩 진행하여 평균값을 내었다. 그림 2의 (vii)는 세포내 포도당량을 나타내는 GFP의 형광 세기 평균값과 표준편차를 나타내고 있다. 인슐린을 처리한 세포의 형광 세기는 2240으로 가장 높았으며, VOTP의 농도가 증가함에 따라 형광 세기가 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 VOTP 200 nM에서 형광 세기가 증가하지 않는 것으로 보아 100 nM에서 saturation 되었다고 판단하였고 이 후 실험은 100 nM로 설정하여 진행하였다.

그림 3은 인슐린과 VOTP를 처리하여 TIRF 현미경으로 GLUT4의 세포막 이동을 확인한 결과이다. 그림 3A (ii)의 결과는 인슐린 100 nM을 처리한 세포가 GLUT4의 세포막 이동을 보여주며, 그림 3B는 각각 다른 농도의 VOTP를 처리하여 GLUT4가 세포막으로 이동한 것을 보여준다. 세포내 포도당 흡수량의 결과와 마찬가지로 VOTP의 농도가 증가함에 따라 GLUT4의 세포막 이동이 증가하는 것을 확인하였으며, VOTP 100 nM을 처리한 세포에서 가장 많은 양의 GLUT4가 세포막으로 이동된 것을 확인할 수 있었다. 각 이미지에 대한 형광 세기의 평균과 표준편차를 그림 3A (iii)와 그림 3B

(vi)에 정량화하여 나타내었다.

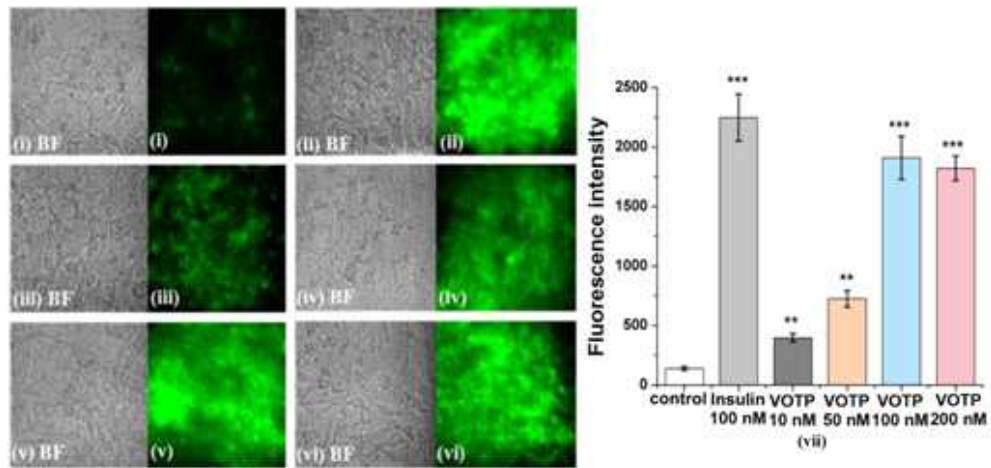


그림 2. 지방세포로 분화된 3T3-L1의 포도당 흡수량

인슐린과 각 농도에 따른 VOTP 처리 후 대조군과의 포도당 흡수량을 비교하였다. (i) 대조군 (ii) 인슐린 (100 nM) (iii) VOTP (10 nM) (iv) VOTP (50 nM) (v) VOTP (100 nM) (vi) VOTP (200 nM) (vii) 각 결과에서 포도당 흡수에 따른 형광 세기의 평균. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

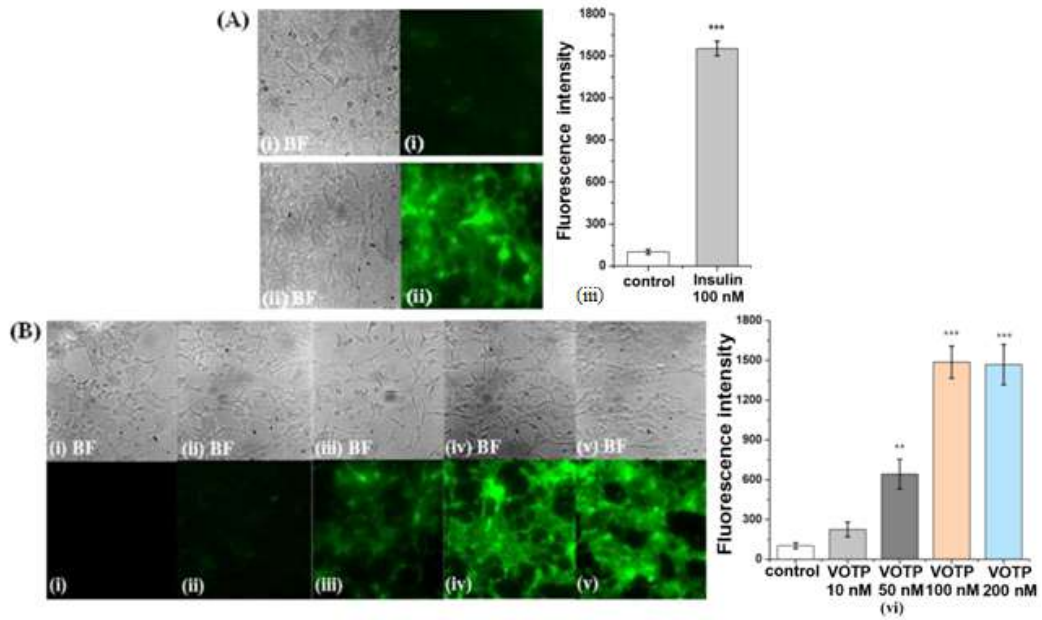


그림 3. VOTP 처리 후 세포막으로 이동된 GLUT4 관찰

(A) 트랜스펙션시킨 CHO-K1 세포에 인슐린을 처리하고 TIRF 현미경을 이용하여 대조군과 비교하였다. (i) 대조군 (ii) 인슐린 (iii) GLUT4의 세포막 이동에 따른 형광 세기 평균 (B) 트랜스펙션시킨 CHO-K1 세포에 VOTP를 농도별로 처리하고 TIRF 현미경을 이용하여 대조군과 비교하였다. (i) 대조군 (ii) VOTP 10nM (iii) VOTP 50 nM (iv) VOTP 100 nM (v) VOTP 200 nM (vi) GLUT4의 세포막 이동에 따른 형광 세기 평균. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

2. VOTP의 항염증 효능 평가

TNF- α 처리를 하여 인슐린 저항상태 모델을 만들었다. 그림 4A (i)에서 보듯이 TNF- α 는 세포내에서의 GLUT4 이동을 완전히 억제하는 것을 확인하였다. TNF- α 에 의해 유도된 인슐린 저항성 상태에서 VOTP를 처리하였을 때, GLUT4의 세포막 이동이 유도되는 것을 확인하였으며 VOTP의 농도가 증가함에 따라 그 양이 증가하는 것을 확인하였다(그림 4A (ii)-(v)). 다른 실험으로 VOTP를 먼저 처리하고 TNF- α 에 의한 인슐린 저항상태를 유도하였다. 마찬가지로 대조군은 인슐린 신호전달체계가 TNF- α 에 의해 저해된 것을 확인하였다(그림 4B (i)). VOTP를 처리하고 인슐린 저항상태로 유도한 CHO-K1 세포에서 VOTP의 처리 농도가 증가함에 따라 GLUT4의 세포막 이동이 증가하는 것을 확인하였으며 100 nM에서 최대값을 얻는 것을 확인하였다(그림 4B (ii)-(v)).

TIRF 현미경 이미지 결과는 인슐린 저항상태 유도 후 인슐린을 처리하지 않았을 때에도 미리 처리한 VOTP에 의해 GLUT4의 세포막 이동이 유도된다는 것을 보여주었다(그림 5 (iii)). VOTP의 항염증 효능을 비교하기 위해, 인슐린 저항상태에서 항염증 효능이 있다고 잘 알려진 아스피린을 처리하였다. VOTP는 100 nM로 최적화하여 실험을 진행하였다. VOTP가 인슐린 신호전달체계를 회복시키며 GLUT4의 세포막 이동을 증가시키는데, 높은 농도로 처리한 아스피린 (100 μ M)보다 높은 효율을 보이는 것을 확인하였다(그림 5 (iv),(v)). 또한 그림 5 (vi)에서 PI3K의 저해제인 wortmannin을 처리하여 VOTP가 IRS1 타이로신의 인산화를 촉진하고, 인슐린 신호전

달체계를 활성화 시킬 수 있는지 확인하였다. Wortmannin과 VOTP
를 처리한 인슐린 저항상태 세포에서 GLUT4의 세포막 이동이 줄어
들었으나 완전히 저해하지는 못한 것을 확인하였다.

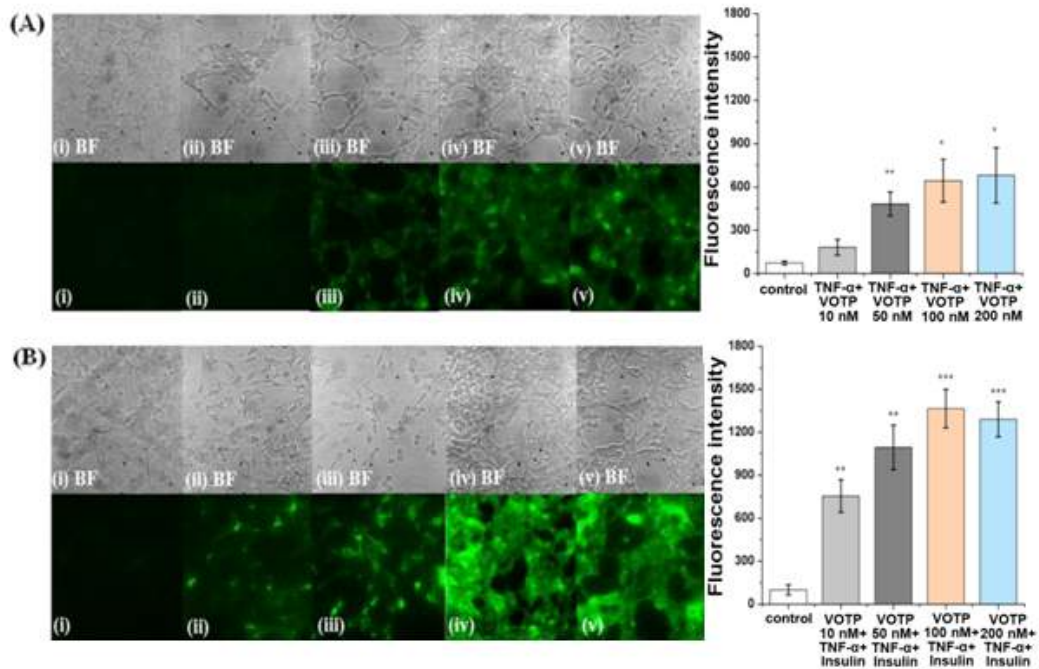


그림 4. 인슐린 저항상태에서의 GLUT4 세포막 이동 관찰

(A) TNF- α 처리 후 농도에 따른 VOTP를 처리하여 TIRF 현미경을 통해 대조군과 비교하였다. (i) 대조군 (ii) TNF- α + VOTP 10 nM (iii) TNF- α + VOTP 50 nM (iv) TNF- α + VOTP 100 nM (v) TNF- α + VOTP 200 nM. 오른쪽 그래프는 GLUT4의 세포막 이동에 따른 형광 세기 평균 (B) 농도에 따른 VOTP를 처리 후 TNF- α , 인슐린을 처리하여 TIRF 현미경을 통해 대조군과 비교하였다. (i) 대조군 (ii) VOTP 10 nM + TNF- α + 인슐린 (iii) VOTP 50 nM + TNF- α + 인슐린 (iv) VOTP 100 nM + TNF- α + 인슐린 (v) VOTP 200 nM + TNF- α + 인슐린. 오른쪽 그래프는 GLUT4의 세포막 이동에 따른 형광 세기 평균. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

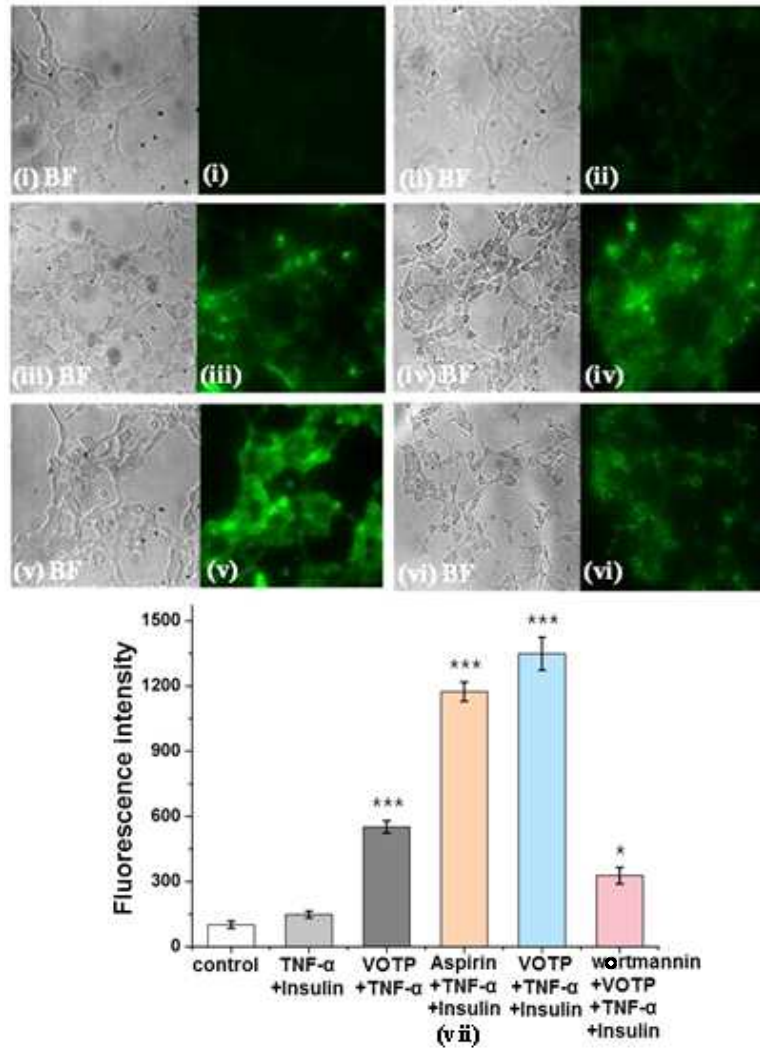


그림 5. 세포막으로 이동된 GLUT4 관찰

각 조건에 따라 세포막으로 이동된 GLUT4를 비교하였다. (i) 대조군 (ii) TNF- α + 인슐린 (iii) VOTP + TNF- α (iv) 아스피린 + TNF- α + 인슐린 (v) VOTP + TNF- α + 인슐린 (vi) wortmannin + TNF- α + 인슐린 (vii) GLUT4의 세포막 이동에 따른 형광 세기 평균. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

3. 하이콘텐트 이미징

그림 6은 VOTP의 항염증 효능을 확인하기 위해 하이콘텐트 모니터링을 통한 인슐린과 염증 신호전달체계에 관여하는 매개체들의 활성을 확인한 결과이다. Qdot-항체 conjugate를 세포에 처리하여 p-GSK3 β , p-JNK1, p-IRS1ser, p-FOXO1, p-IRS1tyr의 활성을 확인하였다. 그림 6A (i)는 세포에 인슐린을 처리한 후 실험을 진행한 결과이다. 인슐린 신호전달체계에 관여하는 p-GSK3 β , p-FOXO1, p-IRS1tyr이 활성화되는 것을 확인하였다. 그림 6A (ii)는 TNF- α 를 처리하고 인슐린을 처리한 결과이다. p-GSK3 β , p-FOXO1, p-IRS1tyr의 활성이 억제됨으로써 인슐린 신호전달체계는 저해되고, 염증 신호전달체계에 관여하는 p-JNK1, p-IRS1ser이 활성화되는 것을 확인하였다. 그림 6A (iii)는 아스피린, TNF- α , 인슐린을 처리한 결과이고 그림 6A (iv)는 VOTP, TNF- α , 인슐린을 처리한 결과이다. 항염증효능이 있는 아스피린을 처리하여 p-GSK3 β , p-FOXO1, p-IRS1tyr이 다시 활성화되는 것으로 보아, TNF- α 에 의한 인슐린 저항상태를 저해하였다. 또한 VOTP를 처리하였을 때에도 마찬가지로 염증 신호전달체계가 저해되고 인슐린 신호전달체계에 관여하는 매개체들이 활성화되는 것으로 보아 항염증 효능을 가지고 있다는 것으로 판단하였다. 그림 6B는 6A의 이미지를 수치로 정량화하여 나타낸 그래프이다.

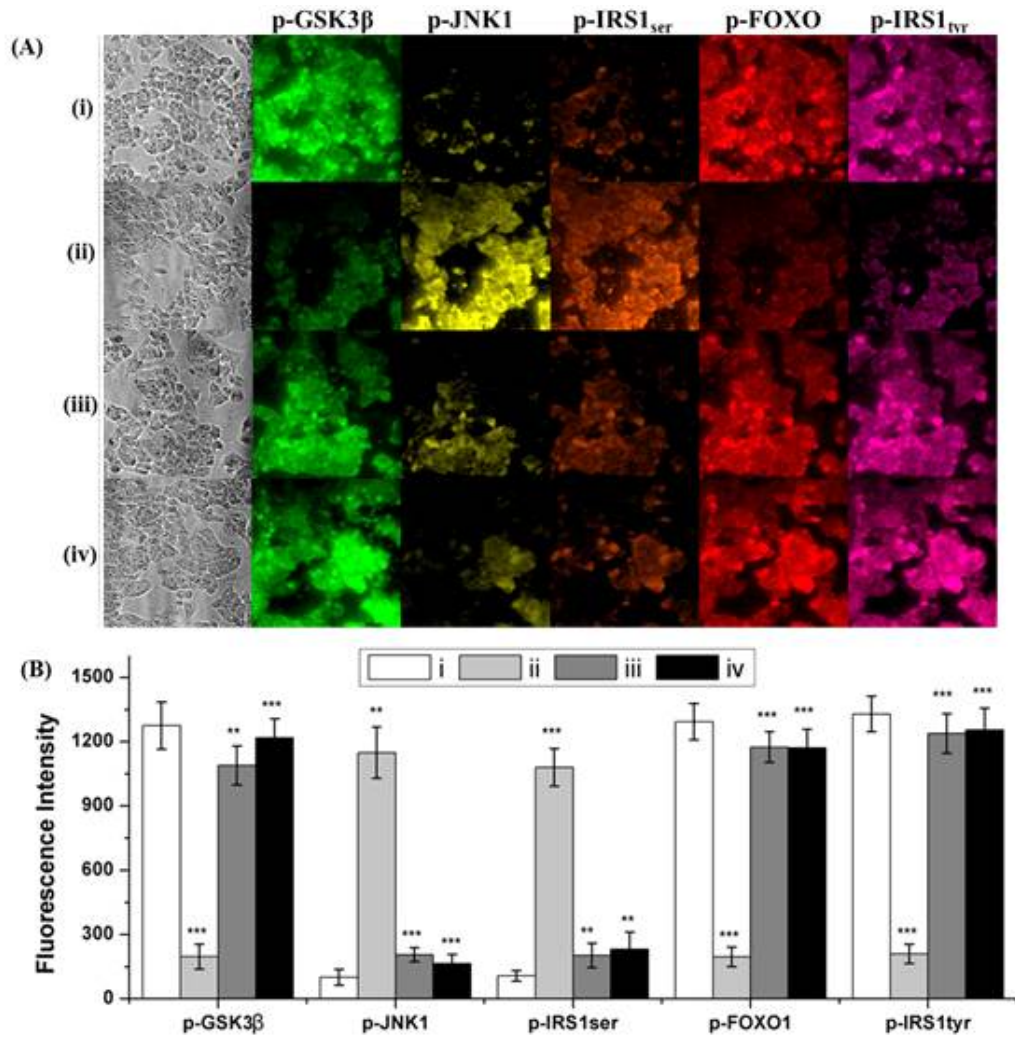


그림 6. 하이콘텐츠 이미징 결과

(A) p-GSK3 β , p-JNK1, p-IRS1ser, p-FOXO1, p-IRS1tyr의 활성을 하이콘텐츠 모니터링을 통해 관찰하였다. (i) 인슐린 (ii) TNF- α + 인슐린 (iii) 아스피린 + TNF- α + 인슐린 (iv) VOTP + TNF- α + 인슐린 (B) 위의 형광 이미지 결과를 그래프로 나타낸 결과이다. **p<0.01; ***p<0.001.

IV. 고찰

제 2형 당뇨병은 만성 질병중의 하나로 발병 비율이 증가하고 있는 추세이다. 현재 쓰이고 있는 치료 약물은 여러 부작용을 가지고 있다. 또한, 인슐린은 가격이 비싸고 주기적으로 주입해 주어야하기 때문에 환자들에게 고통을 안겨줄 수 있다. 그러므로 제 2형 당뇨병을 치료하기 위한 효과적인 새로운 약물을 찾는 것이 중요하다. 최근 연구들은 비만, 염증 그리고 제 2형 당뇨병과의 상관관계를 규명하고 있다. TNF- α 와 같은 염증 매개체들은 제 2형 당뇨병을 일으키는데 큰 원인으로 알려져 있다. 사용되고 있는 약물들은 인슐린 mimetic 효능이 있다고 알려져 있으나, 높은 복용량에 의한 부작용들이 나타나고 있다. 따라서, 낮은 복용량으로도 치료할 수 있는 항염증 효능, 인슐린 mimetic 효능을 가지고 있는 물질이 제 2형 당뇨병을 치료할 수 있는 적절한 대체 물질로써 연구되고 있다. 이전 연구들은 vanadium oxo complex들이 인슐린 mimetic 효능을 가지고 있다고 밝혀내었다. Vanadium metal salt와 그 complex들은 항균, 항암, 항백혈병의 치료와 같은 촉매 그리고 생물학적 치료방법으로써 연구되었다^{13,14}. Vanadium은 다른 산화 상태를 갖는 Schiff base ligand들과 복합체를 형성함으로써 안정되고, 인슐린 mimetic 효능을 갖는 물질로 만들어질 수 있다¹⁵. Schiff base ligand는 알데하이드와 아미노화합물 사이의 축합에 의해 쉽게 생성된다.

피리독살 하이드로클로라이드와 트립타민은 항당뇨 그리고 항염증 효과를 증대시킬 수 있을 것이라 예상하였다. pyridoxal 5'-phosphate (PLP)와 비타민 B6의 활성 형태인 pridoxamine (PM)은 발전적 당화의 산물 (AGEs) 형성을 방해하는 것으로 잘 알

려져 있어 당뇨병의 치료 물질로써 연구되고 있다¹⁶. 최근 연구들은 PLP가 당뇨병성 신장 질환의 진행을 억제한다고 설명하고 있으며, 이는 노화관련 당뇨 합병증의 치료물질로써 고려되고 있다¹⁷. 비슷하게, 트립타민이 기본이 되는 복합체는 항염증 효능을 가진다고 알려져 있다. 그러므로 Schiff base ligand를 갖는 피리독살 하이드로클로라이드와 트립타민 복합체, 그리고 vanadium이 만나 항염증, 인슐린 mimetic 활성을 가진 합성 물질로 작용할 수 있을 것이라 생각하였고 본 연구는 그 효능을 평가하였다.

본 연구에서는 인슐린 mimetic 효능을 갖는 새로운 합성물에 대한 평가를 하기 위한 마커로써 GLUT4의 세포막 이동을 확인하였다. 인슐린 mimetic 효능을 확인하기 위한 이전 방법들인 confocal 현미경, Qdot을 이용한 방법들은 세포 내 신호에 의해 발생하는 큰 노이즈 때문에 GLUT4의 이동을 정확히 정량화하는데 어려움이 있었다. TIRF 현미경은 GLUT4의 세포막 이동을 확인하는데 새로운 접근법이다. 세포 안에 있는 형광을 여기 시키지 않고, 에바네센트 필드에 의해 세포막에 존재하는, 혹은 그 부근에 있는 형광만을 여기 시키기 때문에 주변 노이즈가 줄어들어 특이적으로 형광을 검출해낼 수 있다. 제 2형 당뇨병에 있어 인슐린 신호전달로 인해 일어나는 GLUT4의 세포막 이동은 중요하기 때문에, 세포막에 존재하는 GLUT4의 시각적인 정량적 분석은 항염증, 인슐린 mimetic 효능을 가지는 합성물을 스크린 하는데 효과적인 방법이다.

VOTP의 농도를 최적화하기 위해 3T3-L1 지방세포에 각각 다른 농도의 VOTP를 처리하여 세포내로 흡수되는 포도당의 양을 측정하였다. 100 nM 농도의 VOTP를 처리하였을 때 가장 많은 양의 포도

당이 흡수되는 것을 확인하였고, 그 농도로 다른 실험들을 진행하였다. GLUT4의 세포막 이동을 확인하기 위해 pB-GLUT4myc7-GFP 를 CHO-K1 세포에 트랜스펙션하여 과다발현 시켰다. 트랜스펙션 한 세포에서의 GLUT4 리포터 단백질의 발현 정도는 76%로, 세포내 GFP의 형광을 검출함으로써 확인하였다. 각각 다른 농도의 VOTP를 트랜스펙션한 세포에 처리한 후, TIRF 현미경을 이용하여 GLUT4 세포막 이동을 확인하였다. VOTP는 나노몰의 처리농도 범위에서도 인슐린과 같은 효능을 갖는다는 것을 확인하였고, TNF- α 를 처리한 인슐린 저항성 모델에서 100 nM의 VOTP이 GLUT4의 세포막 이동을 촉진시키는지의 여부를 확인하였다.

염증으로 인한 인슐린 저항성 모델에서 VOTP의 역할을 평가하기 위해 TNF- α 를 CHO-K1 세포에 처리하여 인슐린 저항성 모델을 만들었다. VOTP의 항염증 효능을 확인하기 위해, TIRF 현미경으로 세포막에 존재하는 GLUT4-GFP의 형광 세기를 측정하였다. 인슐린과 VOTP를 처리한 세포에서 비슷한 양의 GLUT4가 세포막으로 이동하는 것을 확인하였고, TNF- α 를 처리하여 세포가 인슐린 저항상태에 있음에도 불구하고 VOTP를 처리하였을 때, GLUT4의 세포막 이동이 일어나는 것을 확인하였다. 항염증 효능이 있다고 잘 알려진 아스피린을 처리한 세포와 VOTP를 처리한 인슐린 저항상태 세포에서 인슐린을 처리하였을 때 GLUT4의 세포막 이동이 일어난 것을 확인함으로써 VOTP가 항염증 효능을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다.

인슐린 mimetic 효능을 가지는 약물들은 phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)와는 독립적인 작용기전을 가지고 있다. 그렇기

때문에 PI3K의 저해제인 wortmannin을 처리하여 VOTP가 인슐린 신호전달체계를 활성화 시킬 수 있는지 확인하였다. Wortmannin과 VOTP를 처리한 인슐린 저항상태 세포에서 GLUT4의 세포막 이동이 줄어든 것을 확인하였으나, 완전히 저해하지는 못하였다. 이로써 VOTP가 다른 매커니즘을 통해 작용할 수도 있다는 것을 알아냈다. VOTP의 분명한 작용기전은 인슐린 저항 상태에서 VOTP가 인슐린 리셉터 타이로신 키나아제 (IRTK)를 다시 활성화시켜 IRS1 타이로신의 인산화를 촉진시키는데 관여하며, 또한 PI3K와는 독립적인 작용기전에 관여한다는 것이다. 이러한 작용기전은 wortmannin을 처리한 실험 결과에서 VOTP가 GLUT4의 세포막 이동을 여전히 유도하고 있다는 것을 확인함으로써 알 수 있었다.

VOTP의 항염증 효능을 더 확인하기 위해 하이콘텐트 모니터링을 통한 인슐린과 염증 신호전달체계에 관여하는 매개체들의 활성을 확인하였다. Qdot-항체 conjugate를 세포에 처리하여 형광을 확인함으로써 결과를 얻었다. 하이콘텐트 모니터링은 세포를 분해하지 않고 여러 생물분자들을 한 샘플에서 동시에 검출할 수 있기 때문에 용이하다. Qdot의 높은 형광 세기는 세포 형광 이미지의 해상도와 정확도를 높여줄 수 있다.

일반적으로 TNF- α 에 의해 JNK-1의 인산화를 통해 활성화되어 인슐린 저항성을 유도한다. TNF- α 는 GSK와 FOXO1의 인산화를 저해하고, IRS1 타이로신의 인산화 또한 저해한다¹⁸. VOTP를 미리 처리하고 TNF- α 를 처리하여 인슐린 저항상태를 만들게 되면, VOTP는 JNK-1의 인산화를 저해하여 활성을 억제하고 그와 동시에 IRS1 타이로신, GSK의 인산화를 촉진시키게 된다. 게다가 VOTP는

FOXO1의 인산화를 촉진하여 포도당신생과정을 억제한다. VOTP를 처리하였을 때, IRS1 세린의 인산화는 줄어들고 IRS1 타이로신의 인산화가 촉진되는 결과를 통해 인슐린 저항상태에서는 비활성화되었던 IRTK의 활성이 증가된다는 결론을 얻을 수 있었다.

VOTP는 세포내 포도당 항상성을 유지하는데 두 가지 기능을 하는 것으로 판단하였다.

(i) VOTP는 염증이 생긴 상태에서 IRS1 타이로신 키나아제를 활성화 시키면서 항염증 효능을 나타낸다.

(ii) PI3K와는 독립적인 작용기전으로 인슐린 mimetic 효능을 나타낸다.

염증은 제 2형 당뇨병을 일으키는데 주요한 원인이 된다. 인슐린 신호전달체계에 의해 활성화되어야 하는 IRS1 타이로신 인산화가 제 2형 당뇨병에서 IRTK의 활성 억제에 따라 비활성된다. 따라서 제 2형 당뇨병을 치료하는 효과적인 방법은 염증 신호전달체계를 억제하고 인슐린 신호전달체계를 회복시키는 것이다.

본 연구를 통해 새로이 합성된 vanadyl complex인 VOTP는 이 두 가지 효능을 가지고 있으므로 제 2형 당뇨병의 치료제로써의 가능성을 가지고 있다는 것을 확인하였다. VOTP는 낮은 농도인 나노몰 처리 범위에서도 효과적이기 때문에 세포 독성에 큰 영향을 주지 않는다. 염증에 의해 유도되는 인슐린 저항성 세포모델과 TIRF 현미경을 이용한 GLUT4의 세포막 이동 스크리닝 기법은 합성물질을 분석하는데 있어 높은 정확도를 가진 편리하고 효과적인 방법임을 알 수 있었다.

V. 결 론

본 연구는 항염증, 인슐린 mimetic 효능을 가지고 있는 새로이 합성된 vanadyl complex가 항당뇨 물질로써의 가능성이 있음을 보여주었다. VOTP는 낮은 농도에서도 높은 활성을 보임으로 기존에 쓰이던 제 2형 당뇨병 치료제의 대체물질로써 쓰일 가능성이 있다는 것을 *in vitro* 실험을 통해 확인하였다. 앞으로 동물 실험을 통해 부작용을 알아내고, 치료제로 개발되기 위한 지속적인 연구를 진행하여 VOTP가 제 2형 당뇨병 치료제의 새로운 물질이 될 수 있음을 평가해야 한다.

VI. 참고문헌

1. Z. Zhang, M. Zhao, Q. Li, H. Zhao, J. Wang, Y. Li, *FEBS Letters*, 2009, **583**, 470–474
2. P. A. Kern, S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, G. Ranganathan, *American Journal of Physiology*, 2001, **280**, E745–751
3. H. Kanety, R. Feinstein, M. Z. Papa, R. Hemi, A. Karasik, *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**, 23780–23784
4. J. M. Stephens, J. Lee, P. F. Pilch, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, **272**, 971–976
5. E. Carvalho, P. A. Jansson, I. Nagaev, A. M. Wentzel, U. Smith, *The FASEB Journal*, 2001, **15**, 1101–1103
6. V. Rotter, I. Nagaev, U. Smith, *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**, 45777–45784
7. A. Nohara, S. Okada, K. Ohshima, J. E. Pessin, M. J. Mori, *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, **286**, 33457–33465
8. M. Z. Mehdi, S. K. Pandey, J. F. Theberge, A. K. Srivastava, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2006, **44**, 73–81
9. S. H. Li, J. H. McNeill. *Molecular and Biochemistry*. 2001, **217**, 121–129
10. P. Lanzerstorfer, V. Stadlbauer, L. A. Chtcheglova, R. Haselgrubler, D. Borgmann, J. Wruss et al., *British Journal of Pharmacology*, 2014, **171**, 5237–51.
11. K. Zebisch, V. Voigt, M. Wabitsch, M. Brandsch, *Analytical*

Biochemistry, 2012, **425**, 88–90

12. Y. K. Tak, P. K. Naoghare, B. J. Kim, M. J. Kim, E. S. Lee, J. M. Song, *Nano Today*, 2012, **7**, 231–244

13. A. P. Mishra, M. Soni, *Metal-Based Drugs*, 2008, **2008**, 875410

14. P. Noblia, M. Vieites, B. S. Parajon–Costa, E. J. Baran, H. Cerecetto, P. Draper et al., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2005, **99**, 443–451

15. H. Han, L. Lu, Q. Wang, M. Zhu, C. Yuan, S. Xing et al., *Dalton Transactions*, 2012, **41**, 11116–11124

16. T. Ishida, K. Hatta, S. Yamashita, M. Doi, M. Inoue, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1986, **34**, 3553–3562

17. S. Nakamura, H. Li, A. Adijiang, M. Pischetsrieder, T. Niwa, *Dialysis & Transplantation*, 2007, **22**, 2165–2174

18. M. J. Kim, S. Rangasamy, Y. Shim, J. M. Song, *Journal of Nanobiotechnology*, 2015, **13**, 4

Abstract

Investigation of Glucose Transporter 4 Translocation to the Cellular Membrane for the Evaluation of the Anti-inflammatory and Insulin-mimetic Properties of a Vanadium Complex

Jieun Ki

Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis
The Graduate School
Seoul National University

Insulin signaling causes the translocation of glucose transporter 4 (GLUT4) to the plasma membrane in order to facilitate cellular glucose uptake. Inflammatory mediators induce an insulin-resistance (IR) state, as observed in type 2 diabetes mellitus (T2DM). Compounds with insulin-mimetic and anti-inflammatory potentials may be effective in the treatment of obesity-induced IR during T2DM. Vanadium oxo complexes have been reported to exhibit insulin-mimetic activities, whereas tryptamine moiety possesses anti-inflammatory potential. Hence, a novel bifunctional vanadyl-Schiff base complex (VOTP) was synthesized by condensation of pyridoxal hydrochloride and tryptamine for

ligand preparation and its subsequent complexation with VOSO₄. Insulin-sensitive CHO-K1 cells, expressing a GLUT4-myc-GFP fusion protein, were treated with VOTP, and GLUT4 translocation was quantified by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. TIRF images showed that the complex could efficiently act as an insulin-mimetic substance. VOTP restored insulin signaling during IR through the inactivation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) and subsequent phosphorylation and activation of the tyrosine moiety of insulin receptor substrate 1 (IRS1). In addition, the high levels of phosphorylated Forkhead box O1 (FOXO1) indicated low levels of gluconeogenesis to further support the existence of the phenomenon of glycogenesis in response to insulin. The synthesized complex has insulin-mimetic and anti-inflammatory potentials, and it is active at nanomolar treatment ranges, thus avoiding issues of possible toxicity. Collectively, these findings encourage the future use of this compound as a potential anti-diabetic agent.

Keyword

Insulin resistance, glucose transporter 4, anti-diabetic, inflammation, total internal reflection fluorescence microscopy

Student Number: 2013-23453