

正常人 培養纖維芽細胞의 인슐린 受容體에 관한 研究

慶熙大學校 醫科大學 內科學敎室

趙 京 杉·金 鎮 雨·金 榮 高
金 光 源·金 鮮 于·崔 永 吉

=Abstract=

A Study on the Insulin Receptor of the Cultured Human Fibroblasts

Kyung Sam Cho, M.D., Jin Woo Kim, M.D., Young Seol Kim, M.D.

Kwang Won Kim, M.D., Sun Woo Kim, M.D. and Young Kil Choi, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Kyung Hee University

To evaluate the usefulness of cultured human fibroblast for insulin receptor assay, the authors cultured fibroblast from biopsied normal adult female eyelid skin and assayed the insulin receptor with radioreceptor assay method. From the data obtained, percent of labeled insulin bound, numbers of insulin binding sites, affinity constants(Ka) and affinity of the empty sites(Ke) were calculated.

The results were as follow;

- 1) The percent radioactivity bound of cultured fibroblast reached plateau at 4 hours 15°C incubation.
- 2) The scatchard plot of insulin binding to cultured human fibroblast was curvilinear and the affinity to receptor was decreased with increased receptor occupancy.
- 3) The numbers of high affinity, low affinity and total insulin receptor of cultured fibroblasts were 852, 24,800 and 25,652 sites per cell.
- 4) High and low affinity constants of cultured fibroblasts were $3.4 \times 10^{10} M^{-1}$, and $1.08 \times 10^8 M^{-1}$, and the affinity of empty site was $5.0 \times 10^8 M^{-1}$.

I. 緒 論

細胞에 대한 인슐린의 作用은 인슐린受容體와 結合됨으로 시작되며, 인슐린 受容體의 異狀이 糖代謝障礙의 한 機轉으로 밝혀짐에 따라 인슐린受容體에 대한 많은 研究가 報告되고 있다¹⁾. 患者의 인슐린受容體 研究에는 單核球²⁾, 顆粒球³⁾, 赤血球⁴⁾, 脂肪細胞⁵⁾ 및 胎盤細胞⁶⁾ 등이 주로 使用되었으며, 이 細胞들은 檢査 당시 患者體內的 인슐린受容體 樣相을 밝히는데 有用하다. 그러나 인슐린受容體의 遺傳的 障礙를 관찰하는 데는 培養細胞를 使用하는 것이 유리하다. 또한 인위적으로 變化시킨 狀態下에서의 인슐린受容體의 變化를 觀察하는 데도 培養細胞가 有用하다¹⁾.

纖維芽細胞는 사람의 皮膚組織에서 容易하게 培養될 수 있고 繼代培養으로 많은 수의 細胞를 얻을 수 있으며, 培養時 遺傳的 變化가 없으며, 液化窒素에 冷凍시켜 半永久的으로 保管시킬 수 있어 인슐린受容體 研究에 적절한 長點을 갖고 있다^{7,8)}.

著者들은 정상성인 여자의 生檢皮膚組織에서 纖維芽細胞를 培養하고 放射受容體測定法으로 인슐린受容體를 測定하여 報告하는 바이다.

II. 實 驗 方 法

1) 纖維芽細胞의 培養

培養은 Sly⁹⁾의 方法에 따라 다음과 같이 實施하였다.

가) 最初培養

정상 성인 여자의 眼瞼에서 1 cm² 크기의 皮膚組織을 無菌의으로 採取한 후 Laminar Flow Cabinet (LABCONCO) 內에서 약 1 mm³의 크기로 切片하여 25 cm²의 培養플라스크(Greiner Labortechnik)에 固定시키고 5 ml의 培養液을 넣었다.

나) 繼代培養

最初培養 3週後 纖維芽細胞가 培養된 것을 確認하고 Trypsin(1:250, Flow)으로 처리하여 纖維芽細胞를 抽出하고 75 cm²의 培養플라스크에서 繼代培養하였다. 纖維芽細胞가 單層으로 充滿되면 2:1로 分離繼代培養하였다.

培養은 37°C, 5% CO₂, 95% air의 Water Jacket CO₂ Incubator(SHEL-LAB)에서 實施하였으며 培養液으로는 Eagle's modified MEM(Flow)에 20% Fetal bovine serum(Flow)과 Fungizone 2.5 µg/ml, Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin 100 u/ml(Flow)을 混合하여 使用하였다. 培養細胞는 Inverted Microscope (OLYMPUS)로 觀察하였다.

2) 인슐린受容體 檢査

인슐린受容體 檢査는 Rechler의 方法에 따라 다음과 같이 實施하였다.

가) 纖維芽細胞의 分離

培養플라스크에서 培養液을 除去하고 HEPES Buffer Saline Solution(without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺)으로 洗滌하고 0.5% Trypsin으로 纖維芽細胞를 分離하였다. 分離한 細胞를 培養液으로 洗滌하여 Trypsin의 活性을 除去한 後 0.2% Bovine Albumin(SIGMA)을 混合한 Phosphate Buffer Saline에 浮遊시켜 ml當 3.0 × 10⁶個가 되도록 調節하였다. 纖維芽細胞의 生存性은 Trypan blue 色素法¹⁰⁾을 利用하였고 95%이상 生存했을 때만 實驗에 使用하였다. 纖維芽細胞數는 Hemocytometer로 測定하였다.

나) 受容體 檢査

細胞浮遊液 250 µl(0.75 × 10⁶ cells)에 ¹²⁵I-인슐린(Porcine, Cambidge Nuclear, 90 µCi/µg) 240 pg과 2.0 × 10⁻²에서 2.0 × 10³ng/ml 농도의 非標識인슐린(Porcine, Mouocomponent, Novo)을 混合하고 最終容量을 0.5 ml가 되도록 PBS로 調節하였다. 15°C에서 1시간 간격으로 1시간에서 4시간까지 放置하여 얻은 結果(Fig. 1)로 受容體測定을 위해서는 放置時間을 3시간으로 고정하였다. 3시간 放置후 200 µg의 混合液을 取하여 細胞만을 分離한 후 Gamma 計測器로 測

定하였다.

다) 計 算

(1) 인슐린-纖維芽細胞 結合率

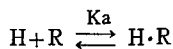
Percent radioactivity bound

$$= \frac{\text{Fibroblast pellet radioactivity}}{\text{Total radioactivity}} \times 100$$

特異結合率(specific binding)을 計算하기 위하여 非特異結合率(nonspecific binding)을 非標識인슐린 2 × 10³ ng/ml濃도의 인슐린結合率로 定하고, 總結合率에서 非特異結合率을 減하여 特異結合率을 算定하였다^{4,11)}.

(2) Scatchard 分析

다음과 같은 數式과 假定下에서 Scatchard 그래프를 分析하였다^{4,11,12)}



$$K_a = \frac{[H \cdot R]}{[H] \cdot [R]} = \frac{[B]}{[F] \cdot [H - B]}$$

$$\frac{[B]}{[F]} = K_a \frac{[N] - [B]}{[N]}$$

B : 特異結合된 호르몬(specifically bound hormone)

F : 遊離된 호르몬(free hormone)

N : 受容體의 總數(total numbers of receptor)

R : 受容體(Receptor)

H : 호르몬(Hormone)

K_a : 平衡常數 혹은 親和常數(affinity constant)

H·R : 호르몬-受容體 複合體(hormone-receptor complex)

以上과 같이 假定하여 Scatchard plot가 曲線型으로 형성되어, 親和力이 서로 다른 두 種類의 受容體가 存在하는 것으로 分析하였다.

(3) 細胞當 受容體 數(receptor sites/cell)

$$\text{Sites/cell} = \frac{\text{Moles of insuline bound per liter}}{\text{Cell concentration per liter}} \times \text{Avogadro's number}$$

Moles of insulin bound per liter: 인슐린이 細胞에 最大로 結合될 때, 즉 Scatchard 그래프가 橫軸에 만날 때이다.

Cell concentration per liter: 混合液에 이미 調節해 놓은 細胞 濃度, 1.5 × 10⁶/ml

Avogadro's number: 6.02 × 10²³

(4) Average affinity profile^{13,14)}

K = {[B]/[F]} / [N - B]: 縱軸

[B]/[N] × 100(percent of receptor occupancy): 橫軸

受容體의 受容率이 增加함에 따라 受容體의 인슐린에 대한 親和力의 變化를 나타낸 것이다.

(5) Affinity constant of empty site(Ke)

Average affinity profile 그래프의 最初의 값, 즉 非標識인슐린이 $2 \times 10^{-2} \text{ng/ml}$ 일 때의 값으로, 인슐린이 受容體와 結合을 始作할 때의 親和力을 나타낸다.

III. 成 績

1) 纖維芽細胞의 培養

皮膚組織에서 纖維芽細胞가 最初培養되기까지는 3週가 所要되었으며, 分離繼代培養時는 培養後 4~5日이면 培養플라스크에 거의 充滿되었고 7日이면 完全히 單層으로 充滿되었다. 充滿된 培養플라스크에서 trypsinization 으로 採取한 纖維芽細胞의 數는 플라스크當 $0.5 \sim 1.5 \times 10^6$ 個였다.

2) 時間에 따른 인슐린結合率

非標識인슐린의 濃度를 $2 \times 10^{-2} \text{ng/ml}$ 로 固定시키고 15°C 에서 放置時間을 增加시킨 경우 각 시간마다의 인슐린 結合率은 3.28%, 4.64%, 5.34%, 5.73%였다 (Table 1, Fig. 1). 3時間의 結合率은 4時間과 큰 차이가 없어 4時間이던 平衡狀態에 到達하는 것으로 보이며 이것은 Mott 등¹⁵⁾의 結果와 類似하였다.

3) 인슐린 濃度 變化에 따른 인슐린 結合率

非標識인슐린 濃度 增加에 따른 標識인슐린 結合率은 漸增적으로 減少하는 樣相을 보여 纖維芽細胞에는 인슐린에 대한 受容體가 存在한다는 것을 의미한다 (Fig. 2).

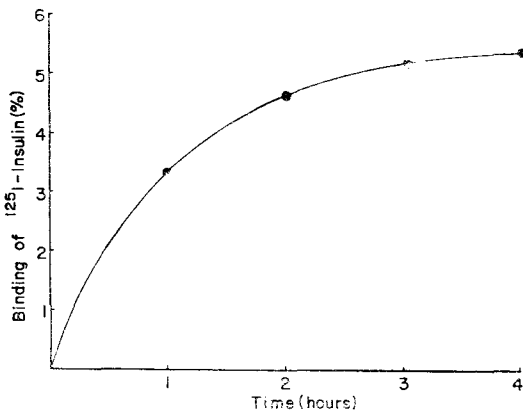


Fig. 1. Effect of duration of incubation on insulin binding at concentration of unlabelled insulin 10^{-2}ng .

Table 1. Effect of Duration of Incubation on Insulin Binding(10^{-2}ng)

Time(hours)	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
Binding(%)	3.28	4.64	5.34	5.73

Table 2. Insulin Binding Parameters in Cultured Human Fibroblasts

Maximal binding percent of ¹²⁵ I-insulin	5.56
Receptor number	
High affinity(sites/cell)	852
Low affinity	24,800
Total number	25,652
Affinity(Ka)	
High affinity	$3.4 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$
Low affinity	$1.08 \times 10^8 \text{M}^{-1}$
Affinity of empty site(Ke)	$5.0 \times 10^8 \text{M}^{-1}$

4) Scatchard 分析

培養纖維芽細胞 인슐린結合率의 Scatchard 分析은 曲線形態를 보였으며 이것은 肝細胞, 脂肪細胞, 赤血球 및 單核球에서 얻은 結果와 類似하였다. 두개의 親和力이 다른 受容體가 存在한다는 假定下에 高親和性受容體 및 低親和性受容體로 分析하였다(Fig. 3).

가) 細胞當 受容體 數

高親和性受容體 數는 852(sites/cell), 低親和性受容體 數는 24,800(sites/cell)으로 전체 受容體 數는 25,652(sites/cell)였다(Table 2).

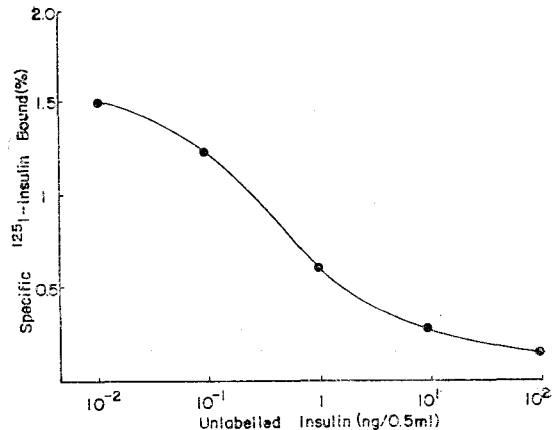


Fig. 2. Displacement of ¹²⁵I-Insulin binding by unlabelled insulin in cultured human fibroblasts.

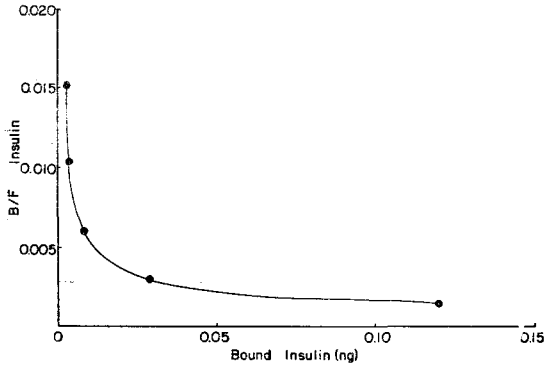


Fig. 3. Scatchard analysis of insulin binding of cultured human fibroblasts.

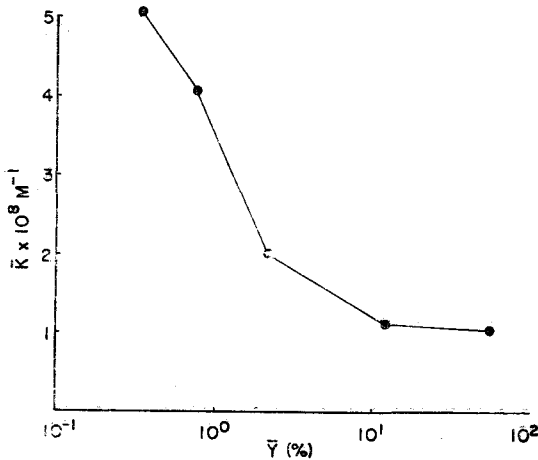


Fig. 4. Affinity profile of ¹²⁵I-Insulin binding to cultured human fibroblasts.

$$K = \frac{B/F}{R_0 - B}$$

Fraction of R_0 occupied is given by $Y(B/R_0 \times 100)$

나) 인슐린에 대한 受容體 親和常數(Affinity constant, K_a)

培養纖維芽細胞의 高親和性親和常數는 $3.4 \times 10^{10} M^{-1}$, 低親和性親和常數는 $1.08 \times 10^8 M^{-1}$ 이었다(Table 2).

다) Average affinity profile(K)(Fig. 4)

受容體 受容率(percent of receptor occupancy)이 增加함에 따른 K 값의 變化를 觀察하면 受容體의 인슐린受容率이 增加함에 따라 親和力이 減少하는 negative cooperativity 를 보였다(Fig. 4). 인슐린과 受容體가 最初로 反應을 始作하는 K_e (affinity of empty site) 값은 $5.0 \times 10^8 M^{-1}$ 이었다(Table 2).

IV. 考 按

纖維芽細胞는 動物이나 사람의 皮膚組織으로부터 容

易하게 培養될 수 있으며 繼代培養으로 多量을 얻을 수 있다. Rechler와 Podskalny¹⁵⁾는 繼代培養한 纖維芽細胞에서 인슐린受容體를 證明하였으며 Mott¹⁶⁾는 受容體의 數가 인슐린의 濃度에 따라 調節된다고 하였다. 또한 纖維芽細胞에서 인슐린에 의한 代謝作用으로 糖酸化¹⁷⁾, 葡萄糖¹⁸⁾과 아미노산¹⁹⁾의 吸收, 蛋白質¹⁷⁾, RNA¹⁷⁾ 및 DNA²⁰⁾의 合成, glycogen²¹⁾과 lipid²²⁾의 合成 등의 이루어진다고 報告되었다. 이와 같이 纖維芽細胞는 細胞內의 여러가지 代謝作用 특히 인슐린과 관련된 代謝作用 研究와 인슐린受容體 研究에 많이 利用되었다. 繼代培養纖維芽細胞의 인슐린受容體는 Gambhir⁴⁾의 赤血球, 淋巴球³⁾, 單核球²⁾, 脂肪細胞⁵⁾ 및 placenta cell line⁶⁾에서 밝혀진 인슐린受容體의 反應과 類似한 性狀을 보였다. 본 研究에서도 정상 성인 여자의 眼瞼에서 採取한 皮膚組織에서 3週만에 最初培養에 成功하고 繼代培養에 들어 갈 수 있었으며, 비교적 단순한 培養液 造成으로 1週마다 繼代培養할 수 있었다. Mott¹⁶⁾는 15°C에서의 標識인슐린의 培養纖維芽細胞 特異結合率이 시간이 增加함에 따라 增加하며 4시간이면 平衡 狀態에 이른다고 하였고 이때의 標識인슐린의 結合率은 3.0%로 본 研究의 結果가 類似하였다.

Scatchard 分析에서 曲線形態를 갖는 現象에 대한 解析은 대체로 두가지가 있다. 첫째는 高親和性受容體와 低親和性受容體의 두가지 受容體가 있음으로 생긴다는 것¹²⁾이고 둘째는 인슐린受容體는 한가지 形態이나, 受容體가 인슐린과 複合體를 形成하면 近接한 受容體의 形態를 變化시켜 인슐린과의 親和力을 減少시킨다는 것으로 DeMeyts¹³⁾는 호르몬과 受容體의 이러한 關係를 negative cooperativity 즉 受容體의 受容率이 증대될수록 親和力이 減少하는 現象으로 설명하고 있다.

본 研究에서는 親和力이 다른 두가지 形態의 受容體가 있다고 가정하고 각각의 受容體 數와 親和常數를 分析하여 보았고, 한편으로는 한가지 受容體가 negative cooperativity 를 갖는다는 前提下에 受容體 受容率의 가장 낮은 때의 親和力 K_e (affinity of empty site)를 계산하여 보았다. 繼代培養 纖維芽細胞의 인슐린受容體 數는 赤血球의 受容體 數보다는 현저히 많았지만 이것은 細胞의 種類가 다른 것이 原因일 수 있고²³⁾, 또 다른 原因으로는 體內와는 다른 環境에서 장기간 露出되어 있으므로 인슐린受容體數가 變化되었을 가능성을 들 수 있다²³⁾.

인슐린受容體가 證明된 사람의 細胞로는 赤血球, 單核球, 淋巴球, 脂肪細胞 및 placenta cell 이 있지만 이

중 赤血球, 單核球 및 脂肪細胞는 人體에서 採取한 즉 시 使用하여야 한다. 따라서 採取했을 때의 人體의 生理的 狀況을 반영하는 實驗에 적절하다. 반면 繼代培養된 纖維芽細胞는 50代以上 繼代될 때까지 供與者의 遺傳因子와 다름없이 繼代되어^{7,15)} 遺傳的 代謝異常의 研究에 有用하며, 培養液의 造成을 쉽게 變化시킬 수 있어 人工的 變化에 따른 인슐린受容體의 變化를 研究하는 경우 有用하게 使用될 수 있다.

V. 結 論

著者들은 正常成人 여성의 眼瞼皮膚組織에서 纖維芽細胞를 繼代培養하고 放射受容體測定法으로 인슐린受容體를 測定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 15°C에서 放置時間을 增加시킨 경우 시간의 增加에 따라 인슐린結合率이 增加하였으며 4時間에 平衡狀態에 도달하였다.

2) 培養纖維芽細胞는 標識인슐린 및 非標識인슐린과 競合的으로 結合하며, Scatchard 그래프는 曲線形態를 보이고, 受容體 受容率이 增加함에 따라 親和力이 減少하는 negative cooperativity를 보였다.

3) 培養纖維芽細胞의 인슐린受容體總數는 26,652 sites/cell 이었고 高親和性受容體는 852, 低親和性受容體는 24,800 sites/cell 이었다.

4) 親和常數(affinity constant, K_a)는 高親和性受容體에서 $3.4 \times 10^{10} M^{-1}$, 低親和性受容體에서 $1.08 \times 10^8 M^{-1}$ 이었다.

5) 培養纖維芽細胞의 affinity of empty site(K_e)는 $5.0 \times 10^8 M^{-1}$ 이었다.

REFERENCES

- 1) Roth, J. and Grunfeld, C.: *Endocrine systems: mechanisms of disease, target cells, and receptors. Textbook of endocrinology 6th Eds. 1981.*
- 2) Schwartz, R.H., Blanco, A.R., Handwerger, B.S., and Kahn, C.R.: *Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations of human peripheral blood mononuclear leukocytes: Implications for studies of insulin resistant states in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72:474, 1975.*
- 3) Gavin, III, J.R., Roth, J., Jen, P., and Freychet, P.: *Insulin receptors in human circulating*

- cells and fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69:747, 1972.*
- 4) Gambhir, K.K., Archer, J.A., and Bradley, C. J.: *Characteristics of human erythrocyte insulin receptors. Diabetes, 27:701, 1978.*
- 5) Olefsky, J.M., Jen, P., and Reaven, G.M.: *Insulin binding to isolated human adipocytes. Diabetes, 23:565, 1974.*
- 6) Podskalny, J.M., Chou, J.Y., and Rechler, M. M.: *Insulin receptors in a new human placenta cell line: demonstration of negative cooperativity. Arch. Biochem. Biophys., 170:504, 1975.*
- 7) Jakoby, W.B., and Pastan, I.H. Eds.: *Methods in enzymology. vol. 28, Cell culture, 1979.*
- 8) Howard, B.V., DeLaLlera, M., and Howard, W.J.: *A new method for the establishment of diploid fibroblast cell cultures from human foreskins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 153:280, 1976.*
- 9) Sly, W.S., and Grubb, J.: *Isolation of fibroblasts from patients. Methods in enzymology. vol. 28, Cell culture, p. 444, 1979,*
- 10) Moore, G.E., Ito, E., Ulrich, K., and Sandberg, A.A.: *Culture of human leukemia cells. Cancer, 19:713, 1966.*
- 11) Williams, L.T., and Lefkowitz, R.J.: *Slowly reversible binding of catecholamine to a nucleotide-sensitive state of the β -adrenergic receptor. J. Biol. Chem., 252:7207, 1977.*
- 12) Wheeler, F.B., Santora, II, A.C., and Elsas, II, L.J.: *Evidence supporting a two-receptor model for insulin binding by cultured embryonic heart cells. Endocrinology, 107:195, 1980.*
- 13) DeMeyts, P., Roth, J., Neville, Jr., D.M., Gavin, III, J.R. and Lesniak, M.A.: *Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 55:154, 1973.*
- 14) DeMeyts, P., and Roth, J.: *Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 66:1118, 1975.*
- 15) Rechler, M.M., and Podskalny, J.M.: *Insulin receptors in cultured human fibroblasts. Diabetes, 25:250, 1976.*

- 16) Mott, D.M., Howard, B.V., and Bennett, P.H.: *Stoichiometric binding and regulation of insulin receptors on human diploid fibroblasts using physiologic insulin levels. J. Biol. Chem.*, 254: 8762, 1979.
- 17) Goldstein, S., and Littlefield, J.W.: *Effect of insulin on the conversion of glucose-C¹⁴ to C¹⁴ O₂ by normal and diabetic fibroblasts in culture. Diabetes*, 18:545, 1969.
- 18) Fujimoto, W.Y., and William, R.H.: *Insulin action on the cultured human fibroblast, glucose uptake, protein synthesis, RNA synthesis. Diabetes*, 23:443, 1974.
- 19) Martin, M.S., and Pohl, S.L.: *Insulin resistance of α -aminoisobutyric acid transport in cultured human skin fibroblasts. J. Biol. Chem.*, 254:9976, 1979.
- 20) Rechler, M.M., Podskalny, J.M., Goldfine, I. D., and Wells, C.A.: *DNA synthesis in human fibroblasts: stimulation by insulin and by non-suppressible insulin-like activity. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39:512, 1974.
- 21) Hidaka, H., Howard, B.V., Kosmakos, F.C., Fields, R.M., Craig, J.W., Bennett, P.H., and Lerner, J.: *Insulin stimulation of glycogen synthesis in human diploid fibroblasts. Diabetes*, 29:806, 1980.
- 22) Bhatena, S.J., Avigan, J., and Schreiner, M. E.: *Effect of insulin on sterol and fatty acid synthesis and hydroxymethylglutaryl CoA reductase activity in mammalian cells grown in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71:2174, 1974.
- 23) DePirro, R., Bertoli, A., Fusco, A., Testa, I., Greco, A.V., and Lauro, R.: *Effect of dexamethasone and cortisone on insulin receptors in normal human male. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52:953, 1981.