

흰쥐 인슐린종세포에서 고농도 포도당의 Alloxan 독성 증강 효과

이병래 · 차종희 · 박재운 · 고춘남* · 박평심**†

조선대학교 의과대학 생화학교실
동강대학 *환경위생과, **식품영양과

High Glucose Potentiates the Alloxan-induced Cytotoxicity in Cultured Rat Insulinoma Cells

Byoung-Rai Lee, Jong-Hee Cha, Jae-Yoon Park, Choon-Nam Koh* and Pyoung-Sim Park**†

Dept. of Biochemistry, College of Medicine, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea
*Dept. of Environment and Hygiene, and **Dept. of Food and Nutrition, Dong Kang College,
Kwangju 500-714, Korea

Abstract

Reactive oxygen species are produced under diabetic conditions and possibly cause various forms of tissue damage in patients with diabetes mellitus. The aim of this study was to examine the effects of high glucose on the alloxan-induced beta cell injury. The insulinoma (RINm5F) cells were cultured either with high glucose (22.2 mM) or normogluucose (5.6 mM) in RPMI 1640 media for 3 days. The SOD activities were determined by spectrophotometric assay and nitroblue tetrazolium (NBT) stain. The effects of high glucose on the cytotoxicity of alloxan were also investigated in RINm5F cells and the cells viability were determined by 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) methods. Results showed that the CuZn-SOD activity was decreased but Mn-SOD activity was increased significantly in RINm5F cells cultured with high glucose (22.2 mM) media. The cytotoxicity of alloxan was increased by high glucose compared with normogluucose in RINm5F cells. Diethyl-dithiocarbamate (DDC), as inhibitor of CuZn-SOD, also potentiate the alloxan-induced cytotoxicity in RINm5F cells. These results suggest that, in RINm5F cells, short term culture with high glucose media decreases CuZn-SOD activity and the decreased activity of CuZn-SOD may be one of the causative factors of beta-cell injury induced by high glucose.

Key words: superoxide dismutase (SOD), RINm5F cells, high glucose

서 론

생체는 유리기에 의한 손상으로부터 자신을 보호할 수 있는 여러 가지 항산화방어계 즉 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 peroxidase 등과 같은 항산화효소계와 glutathione, ascorbic acid, sulfhydryl groups, uric acid, vitamin A, vitamin E 및 bilirubin 등과 같은 비효소계 항산화 물질 등을 지니고 있다(1,2).

SOD는 superoxide anion(O_2^-)을 과산화수소로 전환시키는 효소로서 진핵세포에는 세포질의 CuZn-SOD와 사립체의 Mn-SOD 등 동종효소가 알려져 있다(1,2). 과산화수소는 세포의 정상적인 대사산물이나 조직에 대한 산화적 손상을 일으킬 수 있는 산소의 반응성 형태이므로 catalase와 peroxidase에 의해서 소거된다(3,4).

항산화계의 변화를 초래하는 여러가지 질병이 알려져

있는데, 당뇨병의 간, 신장 및 적혈구에서 CuZn-SOD 활성도는 감소되고, Mn-SOD 활성도는 증가되며, 췌장 catalase와 CuZn-SOD 활성도가 증가된다고 한다(5,6). 또한 인슐린 비의존형 당뇨병환자에서 적혈구의 SOD 활성도는 감소하였고, glutathione peroxidase(GPX) 활성도 변화가 없었으나, 인슐린 의존형 당뇨병환자에서 적혈구의 SOD 및 GPX 활성도가 감소된다고 하여, 당뇨병에서 항산화계의 변화가 초래되고, 효소활성도의 변화는 효소의 종류와 질병의 형태에 따라서 다르게 나타나 는 것으로 알려져 있다(7-9). 당뇨병은 췌장의 베타세포와 인슐린의 기능이상에 의해서 발생되는데, 고혈당에 빠지면 베타세포는 서서히 점진적으로 손상을 입게 되어 포도당에 의한 인슐린의 분비량이 저하되고, 더욱 진행되면 베타세포가 파괴되어 세포수가 감소하게 된다(10-12).

†To whom all correspondence should be addressed

포도당은 생리적 조건에서 산화되어 과산화수소나 산소 유리기 등을 생성할 수 있기 때문에 고혈당에 의한 포도당 독성은 유리기 생성과 연관이 있으며 베타세포는 만성적인 고혈당에 의해서 인슐린 분비가 감소되고, 배양 인슐린종 세포를 고농도 포도당에 장기간 배양하면 인슐린의 합성과 분비가 감소된다고 보고되어 있다 (13-16).

혈관내피세포를 고농도 포도당에서 배양하면 CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase 및 GPx 합성이 유도되는데, 이는 포도당에 의해서 반응성 산소의 생성이 증가되어 나타난 결과로 보고되어 있다(17). 반응성 산소의 생성제와 소거제의 평형유지는 생체의 항상성 유지에 대단히 중요하다. 베타세포는 다른 세포에 비하여 항산화 효소활성도가 낮아서 반응성 산소에 의한 손상에 더욱 민감한 것으로 알려져 있다(18). 따라서 고농도 포도당에 의한 베타세포의 독성은 항산화효소 활성도 변화와 밀접한 연관이 있을 것으로 생각되는데, Tiedge 등(18)은 흰쥐의 췌장에서 분리한 소도 세포를 고농도 포도당에 48시간 배양하면 SOD, catalase 및 GPx 등 효소의 활성도가 변화되지 않았다고 하였으나, Oliveira 등(19)은 흰쥐췌장세포를 60분간 고농도 포도당에 배양하면 SOD 활성도가 증가된다고 하여, 포도당 농도가 SOD 활성도에 미치는 영향은 노출 시간과 밀접한 연관이 있는 것으로 추측된다.

본 실험에서는 고농도 포도당이 베타세포의 항산화제에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 고농도 포도당을 함유한 배양액에 배양한 흰쥐 인슐린 종 세포에서 배양기간에 따른 SOD 동종효소의 활성도 변화를 조사하고, 베타세포 독성물질인 alloxan에 의한 세포독성에 미치는 고농도 포도당과 CuZn-SOD 억제제인 diethyl dithiocarbamate (DDC)의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포의 배양

RIN(RIN 5mF) 세포는 캐나다 켈거리대학 당뇨병연구소에서 기증받아 사용하였다. 세포의 배양은 10% fetal bovine serum, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 U/mL) 및 nystatin(25 µg/mL)등을 함유한 RPMI 1640 배지에서 CO₂ 배양기로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였고, 3일마다 배양액을 교환해 주었다. 실험은 두 군으로 나누어 고농도 포도당 투여군과 정상농도 포도당 투여군으로 나누어 고농도 포도당 군에는 배양액에 포도당 22.2 mM이 되게 하고, 정상농도 포도당 투여군에는 배양액에 포도당 5.6 mM과 mannitol 16.6 mM을 첨가하여 배양하였다.

Superoxide dismutase 활성도 측정

SOD 활성도는 Crapo 등(20)의 방법에 의해서 측정했

다. 즉 xanthine 이 xanthine oxidase에 의해서 uric acid로 전환될 때 부산물로 생성되는 superoxide가, cytochrome C를 환원시키는데, SOD가 superoxide를 소거하여 cytochrome C 환원량이 감소되므로 감소한 cytochrome C 환원량으로서 SOD 활성도를 측정하였다. 인슐린종 세포(5 × 10⁶)에 100 µL의 0.01% PMSF를 함유한 100 mM phosphate buffer(pH 7.8)을 가하여 동결과 용해를 3회 반복한 후 초음파 세포막 분쇄기(ultrasonic dismembrator)로 세포막을 파쇄하여 14,000×g로 5분간 원심 분리한 후 상등액을 효소활성도 측정을 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소 활성의 측정은 시험관에 0.1 mM EDTA와 0.2 mM KCN를 함유한 100 mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.3 mL에 0.5 mM xanthine 0.3 mL와 0.1 mM cytochrome C 0.3 mL를 넣고 혼합하여 25°C에서 3분동안 방치한 후 xanthine oxidase 용액을 가하여 550 nm에서 1분간 변화되는 흡광도를 측정하여 흡광도의 증가 속도가 매 분당 0.020이 되게 xanthine oxidase량을 조절하였다. 효소의 활성도는 상기 조건에서 조효소액 0.01 mL를 가하여 증가되는 흡광도를 측정하였으며, cytochrome C 환원 속도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

단백질의 청량은 Lowry 등의 방법(21)에 의해서 측정하였으며, 소의 혈청 알부민(Sigma, USA)을 표준 단백질로 사용하였다.

이상의 실험결과는 Student's t-test에 의해서 검정하였다.

SOD 활성 염색

SOD는 Flohe와 Otting(22)의 방법을 이용하여 염색하였다. 반응 원리는 riboflavin은 TEMED 존재 하에서 빛에 의해서 superoxide를 생성하고 superoxide가 수용성인 무색의 NBT를 불용성인 blue formazan으로 전환시키는데, SOD가 존재하는 부분에서는 superoxide가 소거되어 blue formazan 생성이 억제되므로 염색되지 않게 된다. 7.5% 비변성 폴리아크릴아마이드 겔(non-denaturing polyacrylamide gel)에 조효소액 20 µL(단백질 0.1 mg)를 gel loading buffer에 혼합하여 loading 한 후 50 mM Tris-glycin buffer(pH 8.0), 100 V, 4°C 조건에서 1시간 동안 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 된 겔은 암실에서 용액 A(NBT 25 mg과 riboflavin 10 mg을 증류수 100 mL에 녹여서 만든 용액) 10 mL에 30분간 방치한 후 용액 B(TEMED 1 g을 증류수 100 mL에 녹여서 만든 용액) 10 mL로 옮겨서 빛에 노출시켜서 발색시킨다.

RIN 세포에서 alloxan 독성 측정

Alloxan에 의한 세포독성은 생존한 세포의 사립체 탈수 소효소에 의해서 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)가 blue formazan으로 전환된

양을 분광흡광 광도계를 이용하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하여 환산하는 세포독성 측정방법인 MTT법(23)으로 세포 생존율을 측정하였다 즉 MIN 세포(1×105)를 96 well plate에 포도당 농도가 5.6 mM과 22.5 mM이 들어있는 배양액에 3일간 배양한 후 alloxan을 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM이 들어있는 배양액으로 교환하여 2일간 더 배양하였다. MTT를 최종농도가 1 mM이 되게 세포 배양액을 첨가하여 4시간동안 배양한 후 배양액을 제거하고 HBSS로 3회 세척한 후 DMSO 200 µL를 첨가하여 ELISA plate reader(Bio-rad, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DDC가 alloxan 독성에 미치는 영향은 DDC를 세포배양액에 4mM이 되게 첨가하고 1시간 후 alloxan을 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM이 들어있는 배양액으로 교환하여 2일간 더 배양한 후 MTT법으로 세포 생존율을 측정하였다.

결 과

고농도 포도당에서 배양한 RINm5F 세포의 SOD 활성도

RINm5F 세포를 세포배양액(RPMI 1640)에 포도당 농도를 최종농도가 5.6 mM(보통농도)과 22.4 mM(고농도)이 되게 첨가하고 3 일간 배양하여 세포를 수집하고 초음파 세포막 분쇄기(ultrasonic dismembrator)로 세포막을 파괴하여 조효소액을 만들어 SOD 활성을 측정한 결과 5.6 mM 농도에서 배양한 세포의 total SOD 활성도는 13.5 ±1.4 U/mg protein, CuZn-SOD는 10.1±1.1 U/mg protein, Mn-SOD는 3.6±0.3 U/mg protein를 나타냈고, 22.2 mM 농도에서 배양한 세포의 total SOD 활성도는 12.6±2.1 U/mg protein, CuZn-SOD 활성도는 7.5±1.2 U/mg protein, Mn-SOD 활성도는 5.6±0.3 U/mg protein를 나타내서 고농도 포도당에 배양한 RINm5F 세포는 보통농도에서 배양한 세포에 비하여 total SOD 활성도는 차이를 나타내지 않았으나, CuZn-SOD 활성도는 25%가 감소되었고, Mn-SOD는 56%가 증가되었다(Table 1)

Table 1. The activities of SOD isozymes in RINm5F cells cultured in high glucose (22.2 mM) contained media

	SOD activities (U/mg protein)	
	Normoglucose (5.6 mM)	High glucose (22.2 mM)
Total SOD	13.5±1.4	12.6±2.1
CuZn-SOD	10.1±1.1	7.5±1.2*
Mn-SOD	3.6±0.3	5.6±0.3**

The cells were harvested and SOD activities were determined by spectrophotometric method Details were described in the section of materials and methods *p<0.05, **p<0.01 vs normoglucose group.

고농도 포도당에 배양한 RINm5F 세포 SOD의 활성도

RINm5F 세포를 포도당 농도가 5.6 mM과 22.4 mM이 되게 첨가하고 배양하여 수집한 세포에서 얻은 조효소액을 10% none-denaturing PAGE을 시행하고 riboflavin과 NBT로 SOD 활성도를 염색하여 densitometer로 relative density를 측정하여 비교한 결과 22.2 mM 농도에서 3일간 배양한 세포의 CuZn-SOD 활성은 5.6 mM 농도에서 배양한 세포에 비하여 15% 정도가 감소되었으며, Mn-SOD 활성도는 22.2 mM 농도에서 배양한 세포에서 오히려 89% 정도가 증가되어 고농도 포도당에서 배양한 RINm5F세포에서 SOD 활성도의 변화는 등중효소의 종류에 따라서 서로 다른 양상을 나타내고 있다(Fig. 1).

포도당이 alloxan에 의한 RIN 세포 독성에 미치는 영향

RIN 세포를 세포배양액에 포도당 농도를 최종농도가 5.6 mM(대조군)과 22.4 mM이 되게 첨가하여 3일간 배양하고, alloxan을 최종농도가 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mM이 되게 첨가하여 2일간 배양한 후 생존한 세포를 MTT법으로 측정하여 대조군과 비교하여 나타낸 결과 대조군에서는 alloxan 농도 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mM의 세포생존율은 각각 100, 101,101, 100, 72, 17 및 15%이었으며, 22.5 mM군에서는 각각 105, 103, 101, 91. 35. 14 및 13 %를 나타내서 고농도 포도당에서 배양한 세포에서 alloxan농도 5 mM(p<0.05)과 10 mM (p<0.01)에서 세포독성이 더 증가되었음을 나타내고 있다(Fig. 2).

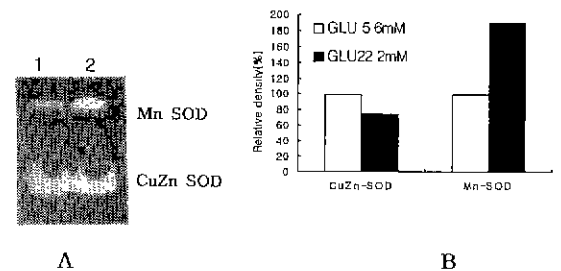


Fig. 1. A : NBT staining of SOD isozymes in RINm5F cells. RIN cells were cultured with high glucose (22.2 mM) and normoglucose (5.6 mM) contained RPMI media. Cell membrane was disrupted with ultrasonic dismembrator and collect supernatant after centrifugation at 12000 rpm for 5 min. 20 µL (protein 0.2 mg) of supernatant was electrophoresised in 7.5% native-PAGE at 100 V for 1.5 hrs in Tris-glycine buffer (pH 8.5). The SOD bands were stained with NBT, riboflavin and TEMED. lane 1 : normoglucose, lane 2 : high glucose. B : Relative density of SOD band. Relative density of SOD band was determined by densitometric analysis

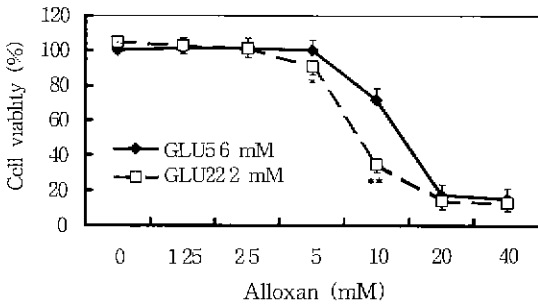


Fig. 2. Alloxan-induced cytotoxicity in RINm5F cells was potentiated by high glucose. RINm5F cells were cultured in high glucose (22.2 mM) contained media for 3 days and alloxan (final concentration 20 mM) was added to the culture media. The viable cells were determined by MTT method. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs 5.6 mM glucose group)

RINm5F 세포에서 alloxan 독성에 미치는 DDC의 영향

RINm5F 세포를 배양액에 DDC를 4 mM이 되게 첨가하고 alloxan을 최종농도가 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mM이 되게 첨가하여 2일간 배양한 후 생존한 세포를 MTT법으로 측정하여 대조군과 비교한 결과 대조군에서는 alloxan 농도 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 및 40 mM군의 세포생존율은 각각 100, 101, 101, 100, 72, 17 및 15%이었으며, DDC 첨가군에서는 각각 100, 97, 85, 23, 17, 13 및 14%를 나타내서 DDC를 첨가하여 배양한 세포에서 alloxan 농도 2.5 mM($p < 0.05$), 5 mM($p < 0.01$), 10 mM($p < 0.01$)에서 DDC에 의해서 alloxan 독성에 더 증가됨을 알 수 있다(Fig. 3).

고찰

반응성 산소는 세포의 생리적 반응과정에서 미토콘드리아에서 주로 생성되고, 항산화계에 의해서 소거된다

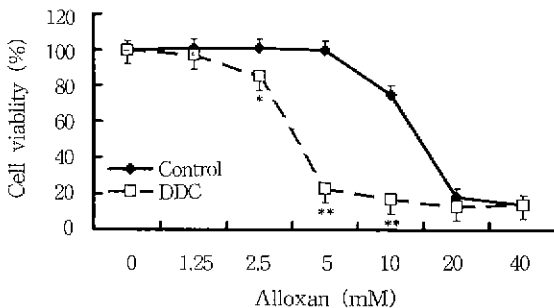


Fig. 3 The effects of diethyl dithiocarbamate (DDC) on alloxan-induced cytotoxicity in RINm5F cells. RINm5F cells were cultured in RPMI media for 3 days, and alloxan DDC were added to the culture media. The viable cells were determined by MTT method (*: $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control group)

(1,2). 반응성 산소의 생성과 소거반응사이에 불균형이 야기되어 세포내 반응성 산소의 양이 증가되면 핵산, 지질 및 단백질 등이 세포내 물질의 변성이 유발되어 결과적으로 세포손상이 초래된다(24) 반응성 산소의 소거에 관여하는 항산화효소인 SOD, catalase 및 GPx는 생체내에 광범위하게 분포되어 있으나, 효소의 활성도는 장기나 세포의 종류에 따라서 서로 다르다고 한다(24,25). 췌장소도에서 CuZn-SOD 활성도는 간의 약 30% Mn-SOD 활성도는 간의 약 25%를 나타내고, catalase와 GPx도 간에 비하여 각각 21% 및 2%로 췌장소도에서는 항산화 효소활성도가 매우 낮은 것으로 알려져 있어서(18), 췌장소도는 간 등의 장기에 비하여 산화적 세포 손상이 더 쉽게 일어날 수 있을 것으로 생각된다. 포도당은 생리적 조건에서 자가 산화되어 산소유리기를 생성한다고 알려져 있어서 고농도 포도당의 독성은 유리기 생성과 연관이 있으며 만성적인 고혈당에 의해서 인슐린 분비가 감소되는 등의 베타세포 기능이 저하된다고 한다(10-13). 따라서 본 실험에서는 고농도 포도당이 베타세포의 항산화계에 미치는 영향을 흰쥐인슐린종 세포주를 고농도 포도당에 배양하여 SOD 동종 효소의 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다. SOD 동종효소 활성도는 고농도 포도당에 3일간 배양한 RINm5F 세포에서 total SOD 활성도는 대조군과 차이를 나타내지 않았으나, CuZn-SOD 활성도는 25%가 감소되었고, Mn-SOD 활성도는 56%가 증가되어서 동종효소의 종류에 따라서 서로 다른 효소활성도 변화 양상을 나타냈는데, 혈관내피 세포를 고농도 포도당에서 배양하면 CuZn-SOD와 Mn-SOD 합성이 유도되고, 흰쥐의 췌장에서 분리한 소도세포를 고농도 포도당(30 mM)에 48시간 배양하였을 때는 SOD 활성도 변화되지 않았다고 한 결과와는 다른 양상을 나타내고 있다(19)

반응성 산소를 소거하는 SOD는 세포질의 CuZn-SOD과 미토콘드리아내의 Mn-SOD가 있는데, 당뇨병환자에서 CuZn-SOD는 간, 신장 및 적혈구에서 활성도가 감소되어 있으며, Mn-SOD의 활성도는 오히려 증가되어 있는 것으로 알려져 있고, 당뇨병 환자의 적혈구 SOD 활성도가 증가하는 반면 IDDM 환자에서 적혈구 CuZn SOD는 감소되어 있는 것으로 보고되어 있어서(5-9), 질병의 형태나 장기에 따라 SOD 동종효소 활성도는 서로 다른 변화를 나타내고 있음을 보여 주고 있다. 또한 CuZn-SOD 활성도를 비변성 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동하여 효소 활성도를 염색한 결과도 고농도의 포도당에서 3일간 배양한 세포의 CuZn-SOD 활성도는 대조군에 비하여 저하되었으나, Mn-SOD 활성도는 증가되어 분광흡광광도계로 측정한 효소 활성도의 변화와 같은 유형을 나타냈다.

반응성 산소는 단백질의 당화(glycation)를 촉진하는데, 당화된 단백질은 생리적 기능이 변성되는 것으로 알려져 있으므로(11), 본 실험결과 3일간 고농도에서 배양한

세포에서 CuZn-SOD 활성이 감소된 것은 유리기 소거능력이 비교적 적은 RINm5F 세포의 세포질에서 CuZn-SOD 합성이 유도되기 전에 증가된 유리기에 의해서 단백질의 변성이 일어나 효소 활성이 저하된 것으로 추측되거나 이의 기전에 대하여는 계속적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 항산화효소 활성도의 저하는 세포의 산화적 손상에 대한 감수성을 증가시킬 수 있으므로 본 실험에서 췌장 베타세포에 산화적 세포손상을 초래하는 것으로 알려진 alloxan(26)에 의한 RINm5F 세포 손상에 미치는 고농도포도당의 영향을 알아보기 위해서 alloxan을 최종농도 1.25~10 mM이 되게 첨가하여 2일간 배양한 후 생존한 세포를 MTT법으로 측정된 결과 고농도 포도당에 3일간 배양한 세포에서 alloxan 농도 5와 10 mM에서 세포독성이 더 증가되어 고농도 포도당이 alloxan에 의한 세포독성을 증가시키는 것으로 나타났다. MTT법은 세포독성 측정방법으로 Carmichael 등(23)은 Chinese hamster lung fibroblast(V77), human lung cell line (NCI-H249, NCI-H460)을 이용한 실험에서 화학물질에 대한 세포의 감수성과 fromazan 생성량이 밀접한 연관성이 있는 예민한 방법이라 하였다. 고농도 포도당에서 3일간 배양한 RINm5F 세포는 alloxan에 대한 감수성이 더 증가되고, CuZn-SOD 활성도가 감소되므로 alloxan 독성 증가와 CuZn-SOD 활성도 감소의 연관성을 추적하였다. CuZn-SOD 활성 억제제로 알려져있는 DDC를 배양액에 첨가하여 CuZn-SOD 활성을 억제시키고 alloxan의 세포독성을 측정된 결과 DDC 첨가로 RINm5F 세포에 대한 alloxan의 감수성 증가되므로 CuZn-SOD 활성도 감소는 alloxan에 의한 세포독성 증가의 한 요인이 된다고 할 수 있다 이상의 실험 결과로서 흰쥐인슐린 중세포를 고농도 포도당에 배양하면 CuZn-SOD 활성도가 감소되어 세포의 산화적 손상이 더 잘 일어날 수 있으므로, 고농도 포도당에 노출되면 세포가 산화적 손상에 더 민감하게 반응할 것으로 추정된다.

요 약

고농도 포도당은 산화적 세포손상을 유발할 수 있는데 본 실험에서는 RINm5F 세포에서 고농도 포도당의 노출 시간에 따른 SOD 동종효소 활성도를 측정된 결과 고농도 포도당에 3일간 배양한 세포에서 total SOD 활성도는 대조군과 차이를 나타내지 않았으나, CuZn-SOD 활성도가 25%가 감소되었고, Mn-SOD 활성도는 56%가 증가되었고, 21일간 배양한 RINm5F 세포에서는 total SOD 활성도는 34%, CuZn-SOD는 26%, Mn-SOD는 49%의 효소 활성도가 각각 증가되었다 비변성 폴리아크릴아마이드겔 전기영동을 시행하여 효소활성도를 염색한 결과도 고농도의 당에서 3일간 배양한 세포의 CuZn-SOD 활성은 대

조군에 비하여 저하되었으나, Mn-SOD의 활성은 증가되었고, 21일간 배양한 세포의 CuZn-SOD와 Mn-SOD 활성은 모두 증가되었다 RT-PCR을 시행한 결과 고농도 포도당에서 3일간 배양한 세포의 CuZn-SOD mRNA량은 대조군과 차이가 없었고, Mn-SOD mRNA량은 증가되었으며, 21일간 배양한 세포에서는 CuZn-SOD와 Mn-SOD mRNA 모두 대조군보다 증가되었다. 고농도 포도당에서 3일간 배양한 RINm5F 세포는 alloxan에 대한 감수성이 더 증가되고, CuZn-SOD 억제제인 DDC도 alloxan의 독성을 증가시키는 것으로 나타났다. 따라서 고농도 포도당에 RINm5F 세포를 단기간 배양하면 CuZn-SOD 활성이 감소되는데, 이는 세포의 산화적 손상에 대한 감수성이 더 증가되는 요인이 될 것이며, 장기간 배양하면 항산화효소의 생성량이 증가되어 효소 활성도가 증가되는 것으로 추정된다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 조선대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Fridovich, I. ' Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1-15 (1986)
2. Miquel, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*, Miquel, J., Quintanilha, A.T. and Weber, H (eds), CRC Press, Florida. Vol. 1, 3-16 (1989)
3. Deisseroth, A and Dounce, A.L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis. and physiological role *Physiol. Rev.*, **50**, 319-375 (1970)
4. Meister, A and Anderson, M.E. ' Glutathione *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760 (1983)
5. Loven, D. Schedl, H., Wilson, H., Dabes, T T, Stegink, L.D., Diekus, M. and Oberley, L : Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, **35**, 503-507 (1986)
6. Loven, D P., Schedl, H.P, Oberley, L W., Wilson, H.D., Bruch, L and Niehaus, C.N : Superoxide dismutase activity in the intestinal mucosa of the streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinol.*, **111**, 737-42 (1982)
7. Hagglof, B. Marklund, S.L and Holmgren, G. : CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children *Acta Endocrinol.*, **102**, 235-239 (1983)
8. Uzel, N, Sivas, A., Uysal, M and Oz, H. : Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus, *Horm. Metabol. Res.*, **19**, 89-90 (1987)
9. Nath, N., Chari, S.N and Rathi, A.B. : Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes *Dia-*

- betes*, **33**, 586-589 (1984)
- 10 Sakurai, T. and Tsuchiyam, S : Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett.*, **236**, 406-410 (1988)
 - 11 Mullarkey, C.J., Edelstein, D and Brownlee, M : Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **173**, 932-939 (1990)
 - 12 Porte, D Jr. and Kahn, S.E. : Mechanisms for hyperglycemia in type II diabetes mellitus: therapeutic implications for sulfonylurea treatmentan update *Am. J. Med.*, **90**, 8S-14S (1991)
 - 13 DeFronzo, R.A., Bonadonna, R.C and Ferrannini, E : Pathogenesis of NIDDM A balanced overview. *Diabetes Care*, **15**, 318-68 (1992)
 - 14 Yki-Jarvinen, H. : Toxicity of hyperglycaemia in type 2 diabetes. *Diabetes Metabol. Rev.*, **14**, S45-S50 (1998)
 - 15 Moran, A, Zhang, H.J., Olson, L.K., Harmon, J.S., Poitout, V. and Robertson, R.P. : Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15. *J. Clin. Invest.*, **99**, 534-539 (1997)
 - 16 Robertson, R.P., Olson, L.K. and Zhang, H J : Differentiating glucose toxicity from glucose desensitization: a new message from the insulin gene. *Diabetes*, **43**, 1085-1089 (1994)
 - 17 Ceriello, A., dello Russo, P., Amstad, P and Cerutti, P. : High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes*, **45**, 471-477 (1996)
 - 18 Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. and Lenzen, S. : Relation between antioxidant enzymic gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells *Diabetes*, **46**, 1733-1742 (1997)
 - 19 Olveira, H.R., Curi, R. and Carpinelli, A.R. : Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am. J. Physiol.* **276**, C507-C510 (1999)
 - 20 Crapo, C.H., McCord, J.M. and Fridovich, I. : Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods Enzymol.*, **53**, 382-393 (1978)
 - 21 Lowry, C.H., Rsenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-277 (1951)
 - 22 Flohe, L. and Otting, F. : Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.*, **105**, 93-104 (1984)
 - 23 Carmichael, J.W., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D and Michell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-942 (1987)
 - 24 Proctor, P.H. : Free radicals and human disease. In *CRC hand book of free radical and antioxidants in biomedicine*, Miquel, J., Quintanilha, A.T. and Weber, H (eds), CRC Press, Florida, Vol 1, p.209-222 (1989)
 - 25 Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. : Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview *Methods Enzymology*, **186**, 1-85 (1990)
 - 26 Janjic, D., Maechler, P., Sekine, N., Bartley, C, Annen, A.S. and Wolheim, C.B. : Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 639-648 (1999)

(2000년 7월 21일 접수)