

식이 지방이 췌장 90%를 제거한 당뇨 흰쥐의 인슐린 분비능과 췌장 베타세포의 양에 미치는 영향

박선민[†] · 박춘희 · 홍상미
호서대학교 자연과학대학 식품영양학과

The Effect of Dietary Fat on Insulin Secretion and Pancreatic β -Cell Mass in 90% Pancreatectomized Diabetic Rats

Sunmin Park[†], Chun Hee Park and Sang Mee Hong

Dept. of Food & Nutrition, College of Natural Science, Hoseo University, Chungnam 336-795, Korea

Abstract

The prevalence of diabetes has increased to 8% of population. Unlike type 2 diabetes in the western countries, Korean diabetic patients are nonobese and have low serum insulin levels. As the increased prevalence of diabetes and the peculiar characteristics may be related to dietary fat contents, we determined their effects on insulin resistance, insulin secretion and pancreatic β -cell mass in 90% pancreatectomized (Px) diabetic rats in the present study. The rats were provided with low fat diet (LF, 10 energy% fat), moderate fat diet (MF, 25 energy% fat) and high fat diet (HF, 40 energy% fat) for 6 months. HF increased body weight and epididymal fat pads parallel with increased food intake compared to LF and MF. Fasting serum glucose and insulin levels and homeostasis model assessment of insulin resistance were higher in HF, compared to LF and MF, indicating that HF increased insulin resistance. Rats fed LF and MF diets reduced insulin resistance, but only rats fed MF improved pancreatic β -cell mass and insulin secretion capacity, measured by hyperglycemic clamp and *in situ* pancreatic perfusion. LF had low insulin secretion capacity and pancreatic β -cell mass, indicating the increased possibility of diabetic prevalence and progression. MF increased β -cell mass by stimulating β -cell proliferation and neogenesis and reducing β -cell apoptosis. In conclusion, MF is effective for the prevention of prevalence and progression of diabetes.

Key words: dietary fat, β -cell function, β -cell mass, proliferation, apoptosis

서 론

우리나라의 당뇨병 유병률은 과거 20년 동안 급격히 증가하여 최근의 연구보고에 따르면 전체 인구의 약 8~10%이며, 향후 20년 동안 더욱 급증하여 20%까지 증가할 것으로 보고되고 있다(1,2). 이런 경향은 우리나라뿐 아니라 동남아시아 국가에서 공통적으로 나타나는 현상인데 이것은 해당 국가들이 과거에 영양 섭취가 부족하고 활동량은 많은 상태에서 영양 과다와 활동량이 적은 상태로 진입하여 이것이 지속될 때 대사성 질환이 그 중에서도 특히 비비만형 제2형 당뇨병의 발생이 급증하는 것과 관련이 있다(3,4). 그러나 아직까지 어떤 기전에 의해서 제2형 당뇨병의 유병률이 증가하는 지는 알려지지 않았다.

과거에는 제2형 당뇨병이 인슐린 저항성의 증가로 인해 나타난다는 것이 지배적인 이론이었으나, 약 10년 전부터 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성과 인슐린 분비능의 합에 의

해서 결정되는 것으로 밝혀졌다. 또한, 과거에는 인슐린 분비능이 췌장 베타세포의 양과 상관관계가 없다고 알려졌으나, 최근에 여러 연구에서 췌장의 베타세포의 성장과 사멸을 통한 베타세포의 양 조절이 인슐린 분비능에 영향을 미친다고 보고하고 있다(5-7). 즉, 인슐린 저항성이 인슐린 분비능의 한계를 넘어서면 고혈당을 나타내며 당뇨병으로 진전된다. 이러한 인슐린 분비능의 한계는 베타세포의 양과 관련이 있다는 것이 유전자 조작 생쥐에서 확인되었다(8,9). 인슐린 신호전달에 중요한 역할을 하는 insulin receptor substrate-2(IRS2)를 몸 전체에서 제거한 생쥐(IRS2-KO 생쥐)에서 생후 5주부터 인슐린 저항성이 증가하기 시작하였고, 이에 따라 인슐린 분비가 증가해야 당뇨병이 유발되지 않는데, IRS2-KO 생쥐는 인슐린 분비가 충분히 증가하지 못하여 생후 6주부터 당뇨병이 심해지고 생후 8~10주에 죽었다. 이것은 인슐린 저항성이 증가할 때 인슐린 분비가 증가하지 못하여 발생하는 고혈당으로 인한 것이었다. 이때 인슐린

[†]Corresponding author. E-mail: smpark@hoseo.edu
Phone: 82-41-540-5633, Fax: 82-41-548-0670

분비의 감소는 췌장의 베타세포의 양이 급격하게 감소한 것과 밀접한 관련이 있었다. 그 후 IRS2가 췌장의 베타세포에서 인슐린/insulin like growth factor-1(IGF-1)의 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌고, 인슐린/IGF-1 신호전달의 향상이 베타세포의 양을 유지하는데 필수적이라는 것이 보고되었다(10).

고지방식은 비만을 동반하는 인슐린 저항성을 유도한다고 많은 연구에서 보고되었다(11-13). 대부분의 동물 모델에서는 고지방식은 인슐린 분비를 증가시켜 당뇨병을 유발하지는 않았고, 특히 췌장의 베타세포의 양도 어느 정도까지 증가한다는 것이 보고되었다. 그러나 심한 비만을 동반하는 Zucker 흰쥐는 고지방식이 베타세포의 양이 어느 이상 증가하지 못하고 당뇨병으로 진전되었다(12,13). 또한 본 연구자의 과거 연구에서도 90% 췌장제거 당뇨흰쥐에게 고지방식을 공급하였을 때 인슐린 분비가 인슐린 저항성 증가를 따라잡지 못해 당뇨병 증세를 악화시켰다(14). 한편 동일한 열량을 섭취할 때 저지방식은 식이내 지방 양이 상대적으로 낮고 탄수화물의 섭취량이 많아 식후 혈당을 급격하게 상승시킬 수 있지만, 인슐린 작용이 민감해서 인슐린 분비는 낮지만 포도당 항상성을 유지하지는 것으로 알려졌다. 그러나 저지방식을 한 후 고지방식을 섭취하면 인슐린 저항성이 급격하게 증가하는데 인슐린 분비는 인슐린 저항성의 증가를 따라 잡지 못해 오히려 당뇨병이 악화될 수도 있다는 보고도 있었다(15). 그러므로 비비만형 당뇨흰쥐에서 식이내 적절한 탄수화물과 지방 양이 당뇨병의 진전을 방지하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러나 아직까지 식이내 지방의 양이 인슐린 저항성과 함께 인슐린 분비능 및 췌장 베타세포의 양을 고려하여 식이내 적절한 지방 함량을 연구한 것은 적었다. 본 연구에서는 90% 췌장 제거 흰쥐에서 베타세포의 기능과 양을 측정하여 제2형 당뇨병 진전을 억제할 수 있는 식이내 지방 함량을 조사하였다.

재료 및 방법

실험 동물

생후 10주된 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 대한 실험동물회에서 구입하여 2주 동안 본 연구자의 동물 사육실에서 고품사료(삼양유지 사료, 익스트루전: E.P.)로 공급하며 적응시켰다. 실험 동물은 실험 기간 동안 군에 따라 정해진 식이와 물을 자유 급식하도록 하였다. 실험 사육장 온도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $65 \pm 5\%$ 를 유지하고 광주기와 암주기를 12시간이 되도록 빛을 조절하였다.

90% 췌장을 절제한 흰쥐 당뇨 모델

생후 12주가 되어 체중이 260 ± 30 g된 흰쥐를 Hosokawa 등(16)이 이용한 방법을 사용해서 췌장의 90%를 제거하였다. 실험동물에게 phentobarbital(10 mg/kg 체중)을 근육주사하여 마취시킨 후 복부를 절개하여 조심스럽게 췌장의 담

관(common bile duct)에서 십이지장의 처음 부분까지 약 2 mm 부분의 췌장만 남기고 나머지 췌장의 부분은 모두 절제한 후 소독한 실로 봉합하여 경한 당뇨 증세를 가진 실험동물을 만들었다. 수술 후 1주일 동안 자유 급식한 후 식후 혈당이 180 mg/dL 이상인 흰쥐만을 당뇨실험 동물로 사용하였다.

실험군 설정 및 식이 공급형태

체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)으로 한 군에 11마리씩 3군으로 나누었다. 췌장 제거 흰쥐의 정상 대조군으로 사용하기 위해서 sham 수술을 하였고 이들은 당뇨 증세를 나타내지 않았다. 90% 췌장 제거 흰쥐는 우리나라 제2형 당뇨병과 유사한 특성을 나타내는 제2형 당뇨 모델로 공복 혈당은 정상이지만, 식후 혈당은 고혈당을 나타낸다. 이들은 정상 체중을 가지지만, 인슐린 분비능이 정상 흰쥐의 약 50%를 나타내어 이로 인한 인슐린 저항성이 유발된다는 것이 여러 연구 결과에서 밝혀졌다(17,18).

당뇨 흰쥐에서 지방섭취량에 따른 인슐린 분비능을 알아보기 위해 각 군에 정해진 식이를 6개월 동안 공급하였다. 정상 흰쥐인 sham 흰쥐에게는 중지방식을 공급하여 정상 대조군으로 사용하였다. 각 군의 식이는 정해진 탄수화물, 지방과 단백질 비율에 따라 AIN-93 formulation에 근거하여 제조하였다(19). 탄수화물, 단백질과 지방은 전분과 설탕(8:20), 카제인 그리고 돈지 쇼트닝과 옥수수기름(8:2)을 각각 주요 급원으로 사용하였다. 저지방식이(LF, 10 En% fat diet), 중지방식이(MF, 25 En% fat diet)와 고지방 식이(HF, 40 En% fat diet)는 Table 1에서 주어진 식이성분비에 따라 공급하였다.

체중, 혈당 및 인슐린 저항성 측정

사육기간 동안 1주일마다 한번씩 체중과 꼬리 끝으로부터 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다. 인슐린 저항성은 공복 혈당(mmol/L)과 혈청 인슐린 농도($\mu\text{U/mL}$)를 곱하고 22.5로 나눈 것으로 계산하는 인슐린 저항성의 항상성 모델(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA_{IR})로 계산하였다(20).

인슐린 분비능 측정

고혈당 클램프(hyperglycemic clamp): 체내 인슐린 분비능을 측정하기 위하여 고혈당 클램프 방법을 실행하였다. 이 실험을 하기 위해서 실험동물을 공급한지 23주째 되었을 때 phentobarbital(10 mg/kg 체중)을 근육주사하여 마취시킨 후 카테터(catheter)를 왼쪽 목동맥(carotid artery)과 오른쪽 목정맥(jugular vein)에 삽입하였다. 수술 후 흰쥐에게 식이와 물을 정상적으로 공급하였고, 1주일 후에는 체중이 수술 전과 같은 수준의 체중을 유지하기 시작하며 수술로부터 완전히 회복하였다. 수술 7일째 되는 날에 약 15~18 시간 금식시킨 후 고혈당 클램프로 인슐린 분비능을 실행하였다(21). 고혈당 클램프는 25% 포도당 용액을 목정맥으로

Table 1. The composition of experimental diets

	Low fat diet (LF)	Moderate fat diet (MF)	High fat diet (HF)
Carbohydrate (En%)	70	56	40
Corn starch (g/kg diet)	585	510	392
Sucrose (g/kg diet)	80	80	80
Protein (En%)	20	19	20
Casein (g/kg diet)	206	206	231
Fat (En%)	10	25	40
Soybean oil (g/kg diet)	8	24	41
Shortening (g/kg diet)	36	95	171
Cellulose (g/kg diet)	30	30	30
AIN-76 mineral mixture (g/kg diet)	35	35	35
AIN-76 vitamin mixture (g/kg diet)	10	10	10
Choline bitartrate (g/kg diet)	2	2	2
D,L-methionine (g/kg diet)	3	3	3
Cholesterol (g/kg diet)	5	5	5

1.2 mL/kg 체중/분으로 5분 동안 한꺼번에 많은 양을 주입한 후 25% 포도당 용액을 20 μ L/kg 체중/분의 속도로 지속적으로 주입하면서 목동맥으로 혈액을 채취하여 혈당을 5분 간격으로 측정하고 약 90분이 지나 혈당이 처음 혈당보다 100 mg/dL만큼 높아졌을 때를 유지하도록 한다. 혈당이 5분 정도 처음 혈당보다 100 mg/dL 높은 수준을 유지할 때 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 -70°C 에서 보관하였다가 혈청 인슐린 농도를 측정하여 췌장에서 인슐린 분비능을 측정하였다.

In situ 췌장 관류(pancreas perfusion) 연구: 6개월 동안 정해진 식이를 섭취한 흰쥐에게 췌장으로 들어가는 대동맥(inferior vena cava)에 polyethylene(PE) 관을 삽입하고 간문맥(Hepatic portal vein)에 Silastic 관을 삽입하였다. Krebs-Henseleit 용액을 multistaltic pump로 2 mL/min 속도로 PE 관으로 대동맥으로 넣어주었다(22). 지라, 신장, 심장으로 가는 혈관을 모두 막아 Krebs-Henseleit 용액이 췌장으로만 가도록 하였다. 간문맥에서 나오는 액을 1분 단위로 fraction collector로 받았다. Krebs-Henseleit 용액은 4.4 mM KCl, 2.1 mM CaCl_2 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 29 mM NaHCO_3 , 116 mM NaCl, 3% dextran T-70, 0.5% bovine serum albumin(Sigma)으로 만들어주고 95% O_2 와 5% CO_2 로 산소를 포화시켰다.

췌장 관류를 수행하기 위해 Krebs-Henseleit 용액으로 네 종류의 다른 용액을 만들었다. 첫 번째 용액은 120 mg/dL 포도당, 두 번째 용액은 350 mg/dL 포도당, 세 번째 용액은 120 mg/dL 포도당+20 mM 알지닌(arginine), 네 번째 용액은 350 mg/dL 포도당+20 mM 알지닌으로 네 종류의 용액을 만들었다. 첫 번째 용액은 수술 시작 후 20분간 흘려주어 췌장을 안정화시킨 후 10분간의 용액을 받았다. 두 번째 용액으로 바꿔준 후 20분간의 용액을 받았다. 세 번째 용액을 흘려주기 전에 첫 번째 용액을 15분간, 세 번째 용액을 20분간 흘려주고 마지막으로 네 번째 용액을 20분간 흘려주어 췌장에서 나오는 액을 받았다. 췌장 관류 실험이 끝난 후 실험쥐에서 췌장만을 떼어 -70°C 에 보관하였다가 췌장 조직

의 인슐린 양을 측정하였다.

췌장 베타세포의 양

BrdU로 베타세포의 증식 측정: 고혈당 클램프를 한 후 흰쥐에게 다시 식이를 2일 동안 공급한 후 췌장 베타세포의 증식(proliferation)과 신생(neogenesis)을 조사하기 위해서 죽이기 6시간 전에 100 mg BrdU/kg 체중을 복강으로 투여한 후 단두로 죽이고 췌장을 분리하여 4% paraformaldehyde로 고정시킨 후 파라핀으로 포매하였다(23). 이것으로부터 4 μ m의 파라핀 절편을 만들고 탈수한 후, BrdU 항체로 염색하여 새롭게 증식되는 베타세포의 양을 측정하였다(23,24).

Tunnel assay: 4 μ m로 만든 파라핀 절편을 탈수한 후, Tunnel kit(Roche)로 염색한 후 hematoxline으로 염색하여 세포자사멸(apoptosis)이 일어난 핵인 갈색의 핵(apoptotic body)의 수를 세어 세포자 사멸 정도를 측정하였다.

면역조직화학: 인슐린과 글루카곤의 항체로 이중 면역염색법으로 베타세포의 양을 측정한다. 베타세포의 각각의 크기는 인슐린 항체에 의해서 염색된 면적을 그에 들어있는 핵의 수로 나누어 결정하였다. 이때 사용한 islet은 핵의 수가 125~150개 되는 것으로 사용하였다. 작은 베타세포 클러스터(β -cell cluster)는 5개 이하의 핵을 가지고 있고 면적이 25 μm^2 이하로 인슐린 항체에 의해서 염색된 것으로 결정하였다. 베타세포를 인식하기 위해서 인슐린으로 이중 면역염색법을 수행하였다.

통계처리

실험 결과는 평균 \pm 표준편차(SD)로 측정하였다. 식이 지방의 효과를 one-way analysis variance(ANOVA)를 SAS 통계 프로그램으로 측정하였다. Tukey test로 multiple comparison으로 군별 차이를 결정하였다. MF 식이를 공급한 정상 흰쥐와 MF 식이를 섭취한 당뇨 흰쥐와의 차이는 two-sample t-test로 통계적 유의성을 검증하였다. 통계적 유의성은 $p<0.05$ 로 검증하였다.

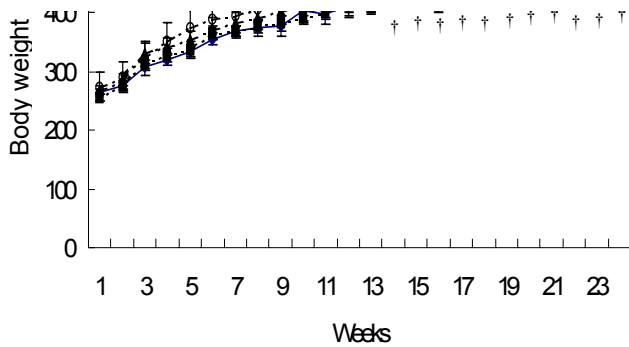


Fig. 1. The changes of body weight during the experimental periods.

Values are mean ± SD.

*Significantly different among the groups of Px rats at p<0.05. After week 14, the body weight of the rats fed a high fat diet (HF) were significantly different from those fed a low fat diet (LF) and a moderate fat diet (MF) at p<0.05 by Tukey test.

† Sham rats were significantly different from Px rats fed MF at p<0.05.

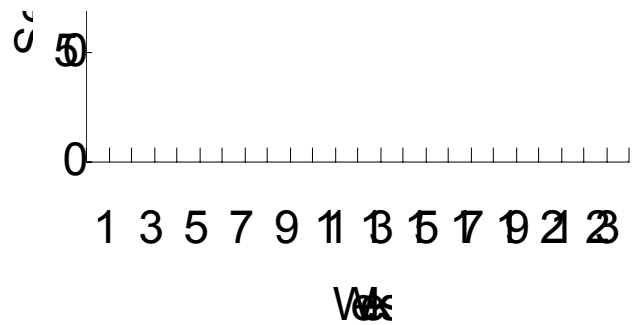


Fig. 2. The changes of random fed serum glucose levels during the experimental periods.

Values are mean ± SD.

*Significantly different among the groups of Px rats at p<0.05. After week 4, random fed serum glucose levels of the rats fed a high fat diet (HF) were significantly different from those fed a low fat diet (LF) and a moderate fat diet (MF) at p<0.05 by Tukey test. In every week, random fed serum glucose levels were significantly lower in Sham rats than Px rats fed MF at p<0.001.

Table 2. Body weight, caloric intake and epididymal fat pads at the end of the experimental periods

	Low fat diet (LF, N=10)	Moderate fat diet (MF, N=11)	High fat diet (HF, N=11)	Sham rats (N=10)
Body weight (g)	433.4 ± 15.6 ^{1) b2)}	437.9 ± 14.8 ^b	501.3 ± 24.1 ^a	487.7 ± 34 [†]
Caloric intake (kcal/day)	90.2 ± 10.3 ^b	95.4 ± 11.4 ^b	131.4 ± 15.4 ^a	75.8 ± 10.7 [†]
Food intake (g/day)	20.0 ± 2.3 ^{ab}	18.0 ± 2.2 ^b	21.9 ± 2.6 ^a	14.4 ± 2.0 [†]
Epididymal fat pads (g)	3.4 ± 0.6 ^b	3.9 ± 0.7 ^b	5.5 ± 0.7 ^a	2.9 ± 0.7 [†]

¹⁾Values are mean ± SD.

²⁾Values with different superscripts in the same row were significantly different at p<0.05 by Tukey test.

[†]Significantly different from Px rats fed MF at p<0.05 by two-sample t-test.

결과 및 고찰

체중과 혈당 변화

HF는 실험 14주부터 LF와 MF에 비하여 흰쥐의 체중을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 1). 이러한 증가는 열량 섭취의 증가와 관련이 있었다. 또한 식이 섭취를 6개월 동안 시킨 후 복부지방(epididymal fat pads)의 양도 HF군이 LF와 MF 군에 비해서 현저하게 높았고 이 증가는 체중 증가율보다 더 높았다(Table 2). MF 식이를 공급한 정상 흰쥐는 열량 섭취량이 당뇨 흰쥐에 비해 적었지만, 체중은 높아 24주 후에 488 ± 34 g을 나타내었다(Table 2). 당뇨 흰쥐에 비해 정상 흰쥐의 체중이 6개월 동안 49 g만큼 더 증가하였다. 이것은 당뇨 흰쥐에서 뇨로 포도당 손실과 혈청 인슐린 농도의 감소와 관련이 있을 것으로 사료된다. 그러나 복부지방의 증가는 정상 흰쥐보다 당뇨 흰쥐인 췌장 제거 흰쥐에서 현저하게 높았다(Table 2).

식이를 제한하지 않고 매주 측정된 혈당도 HF가 다른 LF와 MF에 비해 4주째부터 높아 고지방식이 혈당을 높이는 효과를 나타내었다(Fig. 2). 식이를 3개월과 6개월 공급한 후 측정된 공복혈당도 HF군에서 LF와 MF군에 비해 높았고 또한 공복 혈청 인슐린 농도도 통계적으로 유의하게 높았다

(Table 3). 즉, HF를 섭취한 당뇨백서에서 공복 혈청 인슐린 농도가 높음에도 불구하고 혈당이 더 높은 것은, 인슐린 작용이 감소하여 인슐린 분비가 더 필요한데도 불구하고 인슐린 분비가 증가하지 않아 혈당이 높아진 것으로 사료된다. 그러므로 HF를 섭취한 당뇨백서는 인슐린 저항성과 함께 인슐린 분비도 부족하다는 것을 예측할 수 있었다.

공복 혈당과 혈청 인슐린 농도를 HOMA_{IR} 계산식에 대입하여 인슐린 저항성을 측정하였을 때 HF군에서 LF와 MF군에 인슐린 저항성이 통계적으로 유의하게 높았다(Table 3). 정상 흰쥐의 혈당이 당뇨 흰쥐에 비해 낮고 인슐린 저항성도 낮았다. 즉, HF는 체중을 증가시키고, 이것이 인슐린 저항성을 증가시켜 이로 인해 혈당이 높아진 것으로 사료된다. 이것은 과거 연구에 의해서 밝혀진 것처럼 고지방식이가 말초 조직(특히 근육)에서의 포도당 이용을 감소시키고, 간에서 당신생과정(gluconeogenesis)을 항진시키므로써 포도당 생산을 증가시키며 고인슐린혈증에도 불구하고 당신생과정이 증가된다는 것과 연관이 있는 것으로 사료된다(25,26).

인슐린 분비능

인슐린 분비능을 고혈당 클램프와 *in situ* 췌장 관류 방법으로 측정할 때 췌장의 베타세포를 포도당으로 지속적인 자극을 하면 biphasic하게 인슐린 분비가 나타나는데, 일시적

Table 3. Fasting serum glucose and insulin levels and HOMA_{IR} at the end of the experimental periods

	Low fat diet (LF, N=10)	Moderate fat diet (MF, N=11)	High fat diet (HF, N=11)	Sham rats (N=10)
Serum glucose at 12 weeks (mg/dL)	103.6±13.6 ²⁾³⁾	100.2±12.6 ^b	122.6±14.3 ^a	83.4±10.3 [†]
Serum glucose at 24 weeks (mg/dL)	101.3±14.1 ^b	102.7±15.4 ^b	131.3±17.1 ^a	85.6±10.7 [†]
Serum insulin at 12 weeks (ng/mL)	0.68±0.27 ^b	0.78±0.34 ^b	1.32±0.35 ^a	0.48±0.32 [†]
Serum insulin at 24 weeks (ng/mL)	0.87±0.33 ^b	0.94±0.43 ^b	1.89±0.45 ^a	0.54±0.28 [†]
HOMA _{IR} ¹⁾ at 12 weeks	5.1±1.3 ^b	5.8±1.5 ^b	8.9±2.2 ^a	3.0±0.8 [†]
HOMA _{IR} at 24 weeks	6.4±1.3 ^b	7.1±1.9 ^b	18.2±3.8 ^a	3.4±0.7 ^{††}

¹⁾HOMA_{IR} represents homeostasis model assessment of insulin resistance, which is calculated by fasting serum insulin (μU/mL) × fasting serum glucose (mmol/L)/22.5.

²⁾Values are mean ± SD.

³⁾Values with different superscripts in the same row were significantly different at p<0.05 by Tukey test.

[†]Significantly different from Px rats fed MF at p<0.05 by two sample t-test. ^{††}p<0.01.

1기(first phase) 분비를 거쳐 지속적인 2기(second phase) 분비가 관찰된다. 이때 동시에 여러 효소들을 활성화시켜 포도당에 의한 인슐린의 분비를 증가시킨다는 것이 알려졌다(27,28). 인슐린 저항성이 발생하면 1기 분비가 감소하고 초기에는 2기 분비가 증가하다가 췌장의 베타세포 양의 감소와 함께 인슐린 분비가 감소하여 궁극적으로 당뇨병이 발생한다고 보고하였다(27,28).

본 연구에서도 Weir와 Bonner-Weir(27)가 발표한 것처럼 인슐린의 1기와 2기 분비가 관찰되었고, 정상 흰쥐에 비해 당뇨 흰쥐에서는 모든 식이에서 인슐린의 1기 분비가 감소하였고, 반면에 MF군에서는 2기 분비가 정상 흰쥐와 유사한 형태를 나타내었다(Fig. 3). 반면에 당뇨 흰쥐에서 HF군은 2분보다 5분에서의 인슐린 분비가 높아 인슐린 1기 분비가 지연된 것을 볼 수 있었고 그 절대값도 정상 흰쥐에 비해 현저하게 낮았다. 또한 2기 분비도 특이한 형태를 나타내어 60분까지는 정상 흰쥐보다도 더 높은 분비를 나타내었지만

그 후 지속적으로 낮아지는 것으로 보아 인슐린 분비능이 감소하는 것을 알 수 있었다. 한편, LF군에서는 인슐린 1기 분비뿐 아니라 2기 분비 모두 낮았다. 이러한 분비 형태는 혈당을 공복 혈당보다 100 mg/dL를 높이는 데 필요한 포도당 주입속도와도 관련이 있었다. 혈당을 공복 혈당보다 100 mg/dL 높은 상태로 유지하는데 필요한 포도당 주입속도는 MF군에서 가장 높았으나 이 값은 정상 흰쥐 값의 약 65%에 해당하였다(Table 3). 고혈당 클램프에서 포도당 주입속도는 베타세포의 기능과 인슐린 민감성을 결정하는데 중요한 역할을 한다. 고혈당 클램프시 인슐린 민감성은 혈당을 공복에 비해 100 mg/dL 높게 유지된 상태에서 포도당 주입속도와 이때 혈청 인슐린 농도의 비로 계산할 수 있다. 이때 인슐린 민감성은 MF, LF와 HF 순서로 높았다(Table 4). 즉, 저지방식을 섭취할 경우 급격히 혈당이 높아질 때 인슐린 분비가 이를 감당하지 못하여 혈당이 높은 상태가 유지되면 인슐린 민감성이 감소할 수 있는 것을 알 수 있었다.

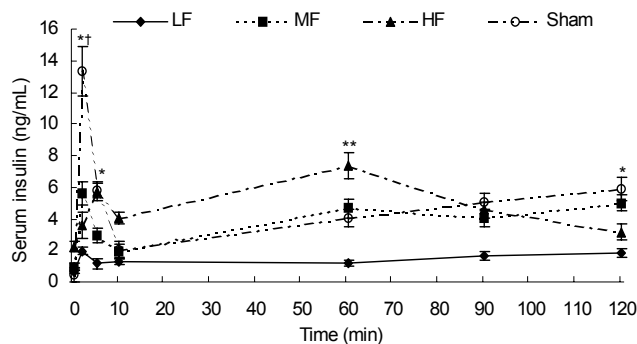


Fig. 3. Serum insulin levels during hyperglycemic clamp at the end of experimental periods.

Values are mean ± SD.

*Significantly different among the groups of Px rats at p<0.05.

**p<0.01.

At 2 and 120 min, serum insulin levels of the rats fed a moderate fat diet (MF) were significantly different from those fed a low fat diet (LF) and a high fat diet (HF) at p<0.05 by Tukey test. At 5 min, serum insulin levels of the rats fed with LF were significantly different from those fed MF and HF at p<0.05. At 60 min, serum insulin levels were the order of HF, MF and LF at p<0.05.

[†]Significantly different from Px rats fed MF at p<0.05.

In situ 췌장 관류

췌장 관류 실험을 통한 포도당과 알지닌 자극으로 인해 각 군에서 췌장의 인슐린 분비능을 측정하였다. 120 mg/dL 농도로 정상혈당 수준의 포도당 농도로 췌장을 자극시켰을 때는 1 ng/mL 이하로 인슐린 분비가 낮았다(Fig. 4). 이후 포도당 농도를 350 mg/dL로 갑자기 올려주었을 때 췌장 제거를 하지 않은 정상 흰쥐에는 포도당자극에 의해 인슐린 1기 분비가 일어났고 90% 췌장 제거한 당뇨군에서도 인슐린 1기 분비가 일어나기는 했지만 지연되었고 그 양도 적었다. 당뇨 흰쥐 중 정상 흰쥐와 가장 유사한 인슐린 분비 형태를 보인 것은 MF를 공급한 경우이었다. 350 mg/dL 포도당 용액을 주입하였을 때 1기 인슐린 분비는 정상 흰쥐의 1분정도 지연되었고 인슐린 분비는 약 35% 감소하였다. HF는 1기 분비를 3분 이상 지연시켰고 분비량은 45% 감소시켰다. 인슐린 2기 분비는 MF군은 정상식이군과 큰 차이를 나타내지 않았지만, HF군에서는 25분부터 30분까지 2기 분비를 급격히 증가시켰다.

알지닌 자체로는 인슐린 분비를 증가시키지 못하지만 높

Table 4. Insulin secretion capacity during hyperglycemic clamp

	Low fat diet (LF, N=10)	Moderate fat diet (MF, N=11)	High fat diet (HF, N=11)	Sham rats (N=10)
Serum insulin at first phase ¹⁾ (ng/mL)	1.6±0.3 ^{4)(c5)}	5.3±0.6 ^a	4.2±0.6 ^b	9.6±1.0 [†]
Serum insulin at second phase ²⁾ (ng/mL)	1.6±0.3 ^b	4.6±0.6 ^a	4.9±0.6 ^a	5.0±0.6
Area under the curve of insulin (AU)	3.8±0.6 ^c	10.3±1.9 ^b	15.6±2.5 ^a	11.2±1.7
Glucose infusion rate (mg/kg bw/min)	3.1±0.4 ^c	10.7±1.8 ^a	7.2±1.1 ^b	16.4±2.5 [†]
Insulin sensitivity ³⁾ (μmol glucose · min ⁻¹ · 100 g ⁻¹ per μM insulin)	24.8±3.8 ^b	29.8±4.1 ^a	18.8±3.4 ^c	42.5±5.8 ^{††}

^{1,2)}First phase insulin secretion was defined as the average of serum insulin levels at 2 and 5 mins, and as second phase at 60, 90 and 120 mins.

³⁾Insulin sensitivity at hyperglycemic state was calculated as the ratio of glucose infusion rate to steady-state plasma insulin levels.

⁴⁾Values are mean±SD.

⁵⁾Values with different superscripts in the same row were significantly different at p<0.05 by Tukey test.

[†]Significantly different from Px rats fed MF at p<0.05 by two sample t-test. ^{††}p<0.01.

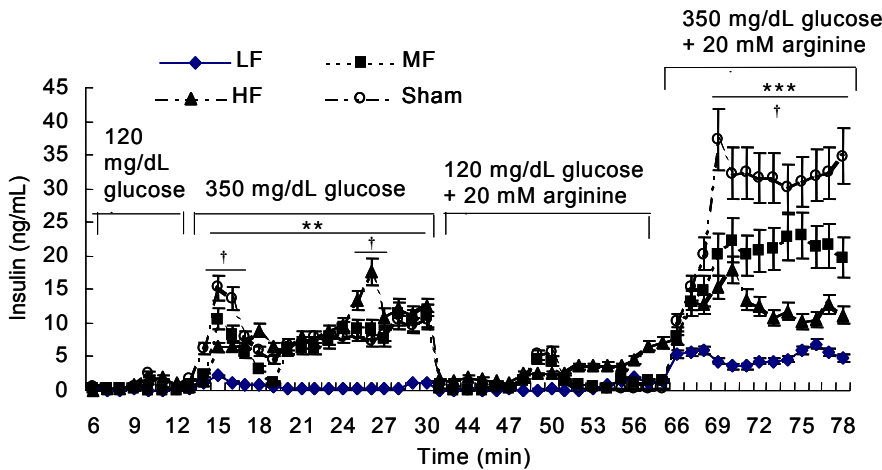


Fig. 4. Insulin secretion during pancreatic perfusion at the end of experimental periods.

Values are mean±SD.

Significantly different among the groups of Px rats at p<0.01. *p<0.001.

[†]Significantly different from Px rats provided with MF at p<0.05.

LF, a low fat diet; MF, a moderate fat diet; HF, a high fat diet.

은 포도당 농도에서는 알지닌이 인슐린 분비를 협동적으로 증가시킨다는 것이 알려져 있다(26). 그 기전을 살펴보면, 포도당에 의한 인슐린 분비는 포도당의 대사 결과로 생성되는 ATP에 의해 Ca⁺⁺에 의존적인 K⁺ channel이 열리면서 나타난다. 그러므로 포도당에 의한 인슐린 분비는 생리적인 범위에서 포도당 농도의 증가와 비례관계가 성립한다. 그러나 알지닌은 췌장 베타세포에 작용할 때 포도당에 의존적이지 않지만, 작용기전은 포도당과는 다른 기전으로 인슐린 분비를 자극한다. 본 연구에서도 알지닌은 포도당 농도가 120 mg/dL일 때 인슐린 분비를 증가시키지 않았지만 포도당 농도를 350 mg/dL로 상승하였을 때 인슐린 분비를 극대화시켰다. 350 mg/dL 포도당+알지닌 용액을 관류시켰을 때, 정상 흰쥐에서 인슐린분비가 높았고, 당뇨 흰쥐에서는 MF군, HF군 그리고 LF군 순으로 낮아졌다(Fig. 4). 그러므로 췌장 관류실험에서도 고혈당 클램프에서와 같은 결과로 당뇨 흰쥐에서 인슐린 분비능이 MF식이를 공급하였을 때 가장 효과적으로 증가하였다.

췌장 베타세포의 양

인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포의 양은 MF군이 베

타세포를 나타내는 인슐린 염색이 가장 많이 되었고, 그 다음으로 HF군이 많았고, 가장 낮은 것이 LF군이였다(Table 5). 본 연구에서 증식은 BrdU가 세포분열을 하는 핵에 결합하므로 흰쥐를 희생시키기 6시간 전에 주입하여 베타세포의 증식을 측정하였다. 베타세포의 증식은 MF, HF 그리고 LF 순이어서 베타세포의 양과 같은 경향을 나타내었다. 또한 베타세포의 양을 결정하는데 중요한 역할을 하는 세포 사멸은 LF와 MF보다 HF가 높았다(Table 5). 베타세포의 양을 결정하는 또 하나의 요인인 재생은 세포 형태학적인 면에서 조사하였다. LF군은 담관(duct) 근처에서 새롭게 생성되는 islet이 거의 없었고, 반면에 MF와 HF는 담관 근처에서 생성되는 작은 islet의 수가 많아 재생이 많이 이루어진다는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). 고지방식이를 공급하였을 때 백서에서 담관 근처의 작은 베타세포 크러스터의 양이 증가하는 결과는 Sharma 등의 연구 결과와 일치하였다(29,30). 새롭게 생긴 islet의 수를 정량화하기 위해서 핵의 수가 5개 이하인 작은 베타세포 크러스터의 수를 측정하였는데 MF와 HF가 LF에 비해서 통계적으로 유의하게 높았다. 결과적으로 HF군이 MF보다 베타세포의 양이 적은 것은 재생에 있어

Table 5. The modulation of islet morphometry

	Low fat diet (LF, N=10)	Moderate fat diet (MF, N=11)	High fat diet (HF, N=11)	Sham rats (N=10)
β-cell area (% of total pancreas)	6.8±0.8 ^{3)c4)}	9.2±1.3 ^a	8.0±1.2 ^b	7.1±0.9 [†]
Individual β-cell size ¹⁾ (μm ²)	192.1±27.8 ^b	235.6±34.2 ^a	229.4±30.5 ^a	189.5±26.7 [†]
Absolute β-cell mass (mg)	23.6±3.9 ^c	34.7±4.0 ^a	28.7±3.5 ^b	41.9±4.3 [†]
BrdU ⁺ cells (% BrdU ⁺ cells of islets)	0.6±0.2 ^c	1.3±0.3 ^a	0.9±0.2 ^b	0.9±0.2 [†]
Apoptosis (% apoptotic bodies of islets)	0.5±0.1 ^b	0.6±0.2 ^b	0.9±0.2 ^a	0.6±0.2
Small β-cell clusters ²⁾ (% of total islets)	5.6±0.8 ^b	17.5±3.4 ^a	19.7±4.1 ^a	1.2±0.5 ^{†††}

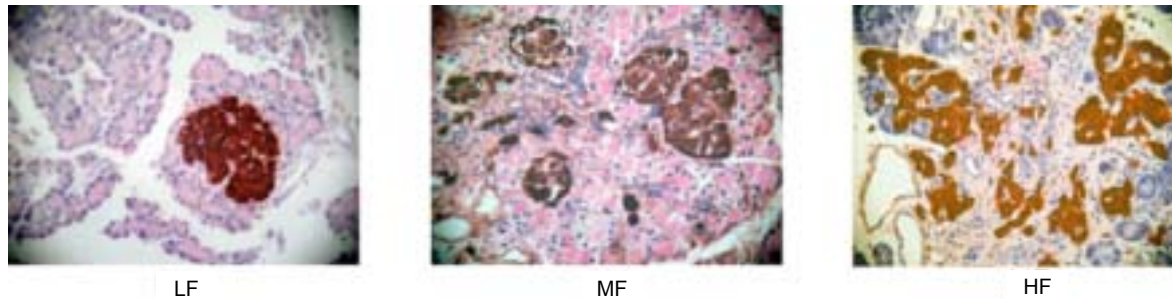
¹⁾The insulin-positive area divided by the number of nuclei counted in the corresponding insulin-positive structures, which were chosen at random and corresponded to 125~150 nuclei per sample.

²⁾The number of measurements in an arbitrarily set area of <25 μm² (islets containing less than 5 nuclei were excluded), and expressed as the percentage of the total number of measurements in the section.

³⁾Values are mean±SD.

⁴⁾Values with different superscripts in the same row were significantly different at p<0.05 by Tukey test.

[†]Significantly different from Px rats fed MF at p<0.05 by two sample t-test. ^{†††}p< 0.001.

**Fig. 5. Insulin staining in pancreas section.**

Dark color represents anti-insulin staining, β-cells. LF, a low fat diet; MF, a moderate fat diet; HF, a high fat diet.

서는 차이가 없지만 재생된 베타세포의 증식이 낮고 세포 사멸이 높은 것이 중요한 요인으로 작용한 것으로 사료된다. LF는 세포의 증식과 사멸이 모두 낮아 결과적으로 베타세포의 양이 낮은 것으로 여겨진다.

베타세포의 사멸은 식이군에서 포도당, 알지닌과 같은 분비촉진제(secretagogue)에 의한 인슐린 분비능의 변화와 베타세포의 양이 상관관계가 있다는 것을 나타내었다. 또한 IRS1 KO 생쥐는 인슐린 저항성이 증가하지만 인슐린 분비가 충분하여 당뇨병을 유발하지 않고 이것은 췌장의 베타세포의 양의 증가에 의한 보완에 의한 것이라는 것이 보고되었다(31). 반면에 IRS2 KO 생쥐에서 나이가 들면서 인슐린 저항성과 함께 인슐린 분비가 상승하지 못해 고혈당을 나타내고, 이것은 췌장 베타세포의 양의 감소로 기인한다는 다른 연구의 결과와 일치한다. 결국 인슐린 저항성이 증가할 때 베타세포 양의 증가는 필수적인데 LF는 인슐린 저항성은 낮추지만 베타세포의 양이 낮고 또한 인슐린 분비능도 낮아 인슐린 저항성이 증가하는 상황에서 당뇨병을 유발시킬 가능성이 높은 것으로 사료된다.

요 약

우리나라 당뇨병 중 제2형 당뇨병이 99%를 차지하고 있으며 비만형 당뇨병이 많은 서구와는 달리 비비만형 환자들

이다. 이러한 증가가 식이 섭취형태와 관계가 있을 것으로 사료되어 여러 연구결과 식물성 단백질의 과다 섭취가 베타세포의 성장에 악영향을 미쳐 인슐린 저항성이 증가할 때 당뇨병 유발과 진전을 촉진시킬 수 있다는 것을 발표하였다. 또 하나의 요인은 식이내 지방 양이다. 본 연구에서는 우리나라의 제2형 당뇨병과 유사한 특성을 가진 동물 모델인 90% 체장 제거 흰쥐에서 지방 섭취량이 인슐린 저항성, 인슐린 분비능과 췌장 베타세포의 양에 미치는 영향을 조사하였다. 90% 체장 제거 흰쥐는 6개월 동안 저지방(총열량의 10%), 중지방(총열량의 25%) 또는 고지방(총열량의 40%) 식이를 섭취하는 동안 칼로리 섭취에 따라서 고지방식이 가장 체중과 복부지방을 증가시켰다. 고지방식은 공복 혈당과 인슐린을 증가시켜 HOMA_{IR}도 상승시켰다. 반면에 중지방식은 인슐린 저항성을 증가시키지 않았다. 한편, 저지방식은 인슐린 저항성을 저하시키는 것에는 좋은 효과가 있지만 혈당이 상승할 때 분비되는 인슐린 양으로 측정하는 인슐린 분비능과 베타세포의 양이 감소되어 궁극적으로 당뇨병의 유발이나 진전을 예방하는데 나쁜 영향을 미친 것으로 보여진다. 중지방식은 인슐린 저항성을 증가시키지 않으면서도 고혈당 클램프와 췌장 관류로 측정된 베타세포의 기능을 향상시키고, 베타세포의 양도 증가시켰다. 결론적으로 제2형 당뇨병의 유발과 진전을 방지하기 위해서는 저지방식이나 고지방식보다는 중지방식을 섭취하는 것이

가장 효과적이라고 할 수 있겠다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(과제번호: R01-2006-000-10389-0) 지원에 의하여 수행된 내용의 일부로서 지원에 감사드립니다.

문헌

- Huh KB. 1992. Insulin resistance and chronic degenerative diseases. *Kr J Diabetes* 16: 93-98.
- Kim EJ, Kim YK. 1970. Epidemiology of diabetes in Korean diabetics. *Kr J Internal Med* 13: 25-29.
- Korean Medical Insurance Association. 1993. *1992 Annuals for medical insurance statistics*. Ministry of Health and Welfare, Seoul.
- Min HK. 1996. Non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in Korea. *Diabet Med* 13: S13-S15.
- Sung YA, Hong YS. 2000. Mechanism of the insulin secretory defect by chronically elevated glucose levels in pancreatic islets: depletion of insulin content due to hyperstimulation by glucose. *Kr J Diabetes* 24: 1-9.
- Leahy JL. 1990. Natural history of beta cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care* 13: 992-1010.
- Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. 1990. Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13: 610-630.
- Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. 1999. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23: 32-40.
- White MF. 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302: 1710-1711.
- Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, Schubert M, Fisher TL, Dow MA, Leshan R, Zakaria M, Mossa-Basha M, White MF. 2003. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic β -cells prevents diabetes. *J Clin Invest* 112: 1521-1532.
- Ye JM, Dzamko N, Hoy AJ, Iglesias MA, Kemp B, Kraegen E. 2006. Rosiglitazone treatment enhances acute AMP-activated protein kinase-mediated muscle and adipose tissue glucose uptake in high-fat-fed rats. *Diabetes* 55: 2797-2804.
- Tokuyama Y, Sturis J, DePaoli AM, Takeda J, Stoffel M, Tang J, Sun X, Polonsky KS, Bell GI. 1995. Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 44: 1447-1457.
- Corsetti JP, Sparks JD, Peterson RG, Smith RL, Sparks CE. 2000. Effect of dietary fat on the development of non-insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis* 148: 231-241.
- Choi SB, Park S. 1999. The effect of w-6 polyunsaturated fat and vitamin-E on insulin resistance in 90% pancreatectomized rats. *Kr J Internal Med* 56: 490-499.
- Park S, Park CH, Jang JS. 2006. Antecedent intake of traditional Asian-style diets exacerbates pancreatic β -cell function, growth and survival after Western-style diet feeding in weaning male rats. *J Nutr Biochem* 17: 307-318.
- Hosokawa YA, Hosokawa H, Chen C, Leahy JL. 1996. Mechanism of impaired glucose-potentiated insulin-secretion in diabetic 90 percent pancreatectomy rats-study using glucagon like peptide-1(7-37). *J Clin Invest* 97: 180-186.
- Park JS, Kim CS, Nam JY, Kim DM, Jo MH, Park J, Ahn CW, Cha BS, Lim SK, Kim KR, Lee HC, Huh KB. 2005. Characteristics of type 2 diabetes in terms of insulin resistance in Korea. *Yonsei Med J* 46: 484-490.
- Chae BN, Lee SK, Hong EG, Chung YS, Lee KW, Kim HM. 1998. The role of insulin secretion and insulin resistance in the development of Korean type 2 diabetes mellitus. *Kr J Diabetes* 22: 491-503.
- Report of the American Institute of Nutrition. 1977. Ad hoc committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107: 1340-1348.
- Thule PM, Campbell AG, Kleinhenz DJ, Olson DE, Boutwell JJ, Sutliff RL, Hart CM. 2006. Hepatic insulin gene therapy prevents deterioration of vascular function and improves adipocytokine profile in STZ-diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E114-E122.
- Rossetti L, Shulman GI, Zawalich W, DeFronzo RA. 1987. Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. *J Clin Invest* 80: 1037-1044.
- Thams P, Capito K. 1999. L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide. *Euro J Endocrinol* 140: 87-93.
- Choi SB, Jang JS, Park S. 2005. Estrogen and exercise may enhance beta-cell function and mass via insulin receptor substrate 2 induction in ovariectomized diabetic rats. *Endocrinology* 146: 4786-4794.
- Rooman I, Lardon J, Bouwen L. 2002. Gastrin stimulates β -cell neogenesis and increases islet mass from trans-differentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes* 51: 686-690.
- Lee JH, Son HS, Kim JY, Park SY, Lee SK. 1994. Effect of high fat diet on the glycogen synthase activity of the different skeletal muscles in rats. *Kr J Diabetes* 18: 21-25.
- Unger RH. 1995. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. *Diabetes* 44: 863-870.
- Weir GC, Bonner-Weir S. 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53: S16-S21.
- Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, Weir GC. 2003. Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. *J Biol Chem* 278: 2997-3005.
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. 1999. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48: 507-513.
- Ko SH, Suh SH, Kim BJ, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Son HS, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Bonner-Weir S, Weir GC, Yoon KH, Park CG. 2004. Expression of the intermediate filament vimentin in proliferating duct cells as a marker of pancreatic precursor cells. *Pancreas* 28: 121-128.
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S. 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 128-129.