

## 단기간의 당섭취 증가가 인슐린 감수성에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 생리학교실

김용운 · 마인열 · 이석강

### 서 론

인슐린 저항성은 당뇨병의 가장 중요한 병리기전으로 인슐린 비의존형 당뇨병 (non-insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) 뿐 아니라 조절되지 않은 인슐린 의존형 당뇨병 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM)에서도 발생하는 것으로 보고되고 있으며(DeFronzo 등, 1982; Blondel 등, 1989) 그 원인으로는 말초조직 자체의 결함인 원발성이거나 그 외 인자들의 영향에 의한 이차적인 결과로 발생하는 것으로 알려져 왔다(Aktories와 Jakobs, 1982; Choi 등, 1991). 인슐린 저항성의 발생기전은 매우 다양하며 유발인자 간에 서로 복합적인 상승작용의 결과로 발생하는 것으로 보고되고 있으나(Rossetti 등, 1990) 현재까지도 확실한 기전은 모르고 있는 실정이다. 그러나 대사이상에 의하여 발생하는 인슐린 저항성을 중심으로 많은 연구(Unger와 Grundy, 1985; Blondel 등, 1990; Kahn 등, 1991)가 이루어져서, 대사에 영향을 미치는 것 중에서 고혈당이 가장 중요한 유발인자이며(Rossetti 등, 1987; Kim 등, 1995) 고인슐린증도 중요한 유발인자로 보고되고(Cusin 등, 1990; Takao 등, 1990) 있다. 고인슐린증은 흔히 비만, 고혈압, 관상동맥경화증, 당뇨병 및 지질 대사장애의 병인에 중요한 공통 분모가 된다고 알

려져 이들을 syndrome X 또는 인슐린 저항성증후군으로 명명하기도 한다(DeFronzo와 Ferrannini, 1991).

한편 고혈당과 고인슐린증은 세포내 당섭취를 증가시키는 대표적인 요인이라는 공통점이 있다(Thorburn 등, 1990). NIDDM환자에서 발생하는 고혈당은 인슐린 저항성에 의하여 감소된 당섭취를 증가시키기 위한 조절기전의 의미를 지니는 것으로 알려져 있으며(Farrace와 Rossetti, 1992; Henry 등, 1990) 반대의 경우로 고혈당이 지속되면 인슐린 저항성과 인슐린 분비의 저하가 발생한다(Takao 등, 1990). 또한 김(1992)은 streptozotocin 당뇨 흰쥐에서 hyperinsulinemic isoglycemic clamp 기법으로 측정하여 안정상태의 혈당인 약 300mg/dl에 고정하기 위한 포도당 주입속도가 정상군에서 안정상태 혈당인 약 90mg/dl에 고정하기 위한 그것과 차이가 없음을 보고하였으며 당섭취 속도가 세포내 당대사를 결정(Thorburn 등, 1990)하게 되는 점으로 미루어 당섭취를 적절하게 유지시키는 조절 기전이 존재할 가능성을 시사하였다.

지속적인 고혈당이나 고인슐린증은 인슐린 수용체를 변화시키고 당수송체의 수나 기능을 감소시키는 것으로 보고(Mayor 등, 1992)되고 있다. 그러나 이러한 변화를 초래하는 기전에 관해서는 아직 명확한 해답이 없으며 세포내로 섭취된 당 대

사산물의 증가나 단백질의 glycosylation을 포함한 정보전달과정의 변화에 기인할 가능성에 관하여 보고(Micheal, 1994)되고 있다.

생리학적인 관점에서 세포내로 당섭취가 증가하면 산화과정 (glycolysis, tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation to produce ATP)과 비산화과정 (glycogen synthesis, formation of lipid and lactate)을 통하여 대사가 진행되는데(Thorburn et al., 1990) 에너지의 이용이 공급에 따르지 못하면 에너지원의 축적으로 세포비만이 초래될 수 있으며 이를 방지하기 위하여 세포수준에서 조절기전을 가질 수 있다고 생각되며 이것이 인슐린 저항성으로 표현될 수 있다는 개념이 가능하리라 생각된다. 즉 고혈당이나 고인슐린증 자체의 효과로서 뿐만이 아니라 세포내로 필요량 이상의 당섭취가 일어난 결과로 발생하는 음성 되먹이기 조절기전에 의하여 인슐린 저항성이 발생할 수 있다는 이론이며 이 과정은 가역적 (reversible process)으로 생각되지만 장기간 지속될 경우 고정될 가능성도 배제할 수 없다.

본 연구에서는 단기간에 필요량 이상으로 당섭취가 증가되었을때 인슐린 감수성이 감소하는지와 인슐린 수용체와 당수송체의 변화를 알아보기 위하여 여러가지 조건으로 단기간에 당섭취를 증가시킨 후 hyperinsulinemic euglycemic clamp 기법으로 인슐린 감수성을 측정하였으며 골격근의 인슐린 수용체 결합능과 제 4형 당수송체의 양을 분석하였다.

## 재료 및 방법

실험동물: Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 사용하였다. 포도당과 인슐린 그리고 방사능 동위원소의 주입을 위하여 pentothal sodium (40 mg/kg,

intraperitoneal)으로 마취하고 외경정맥에 삽관 (Silastic, OD, 0.6 mm; ID, 0.3 mm)하였으며 수술 후 3-4일째에 본 실험을 시행하였다. 실험은 미리 삽관된 관을 통하여 pentothal sodium (10 mg/kg)을 주입하여 마취하고 혈액을 채취하기 위하여 좌측 대퇴동맥에 삽관하고 30분간 휴식 후 시작하였다.

실험설계: 그림 1과 같이 2시간 동안에 여러가지 조건으로 당섭취를 유도하였으며 1시간의 휴식 후에 hyperinsulinemic euglycemic clamp 실험을 시행하여 인슐린 감수성을 측정하였다. 실험군은 hyperinsulinemic euglycemic clamp 전에 시행한 당섭취의 조건에 따라서 5개군으로 구분하였다. 제 I 군은 대조군으로 생리식염수만 주입하여 기초상태의 인슐린 농도와 혈당은 유지하였으며, 제 II 군은 somatostatin (0.8 µg/kg/min)과 포도당을 주입하여 정상인슐린농도와 고혈당을 유지하였으며, 제 III 군은 포도당을 주입하여 고인슐린증과 고혈당을 유지하였고, 제 IV 군은 인슐린과 포도당을 주입하여 초고인슐린증과 정상혈당(~100mg/dl)을 유지하였으며, 그리고 제 V 군은 인슐린과 포도당을 주입하여 초고인슐린증과 고혈당(~200mg/dl)을 유지하였다.

초고인슐린증을 만들기 위한 인슐린 주입은 혈중 인슐린 농도가 약 4,000 µU/ml 되게 priming dose에 이어 유지용량 (maintenance dose, 100 mU/kg/min)을 계속 주입 (infusion pump, IITC, USA) 하였으며 포도당은 원하는 혈당에 맞추기 위하여 10분마다 채혈하여 음성 되먹이기기전을 사용하여 주입 (peristaltic pump, Gilson, France)량을 조절하였다. 인슐린 농도를 측정하기 위하여 0, 60, 120, 180, 240분에 채혈하였으며 당제거율을 계산하기 위하여는 230분과 240분의 혈장을 사용하였다. 혈당은 glucose analyser (Sidekick 1410, YSI)를 사용하여 측정하였으며 측정에 필요한 시간은 45초였다.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp실험. 제

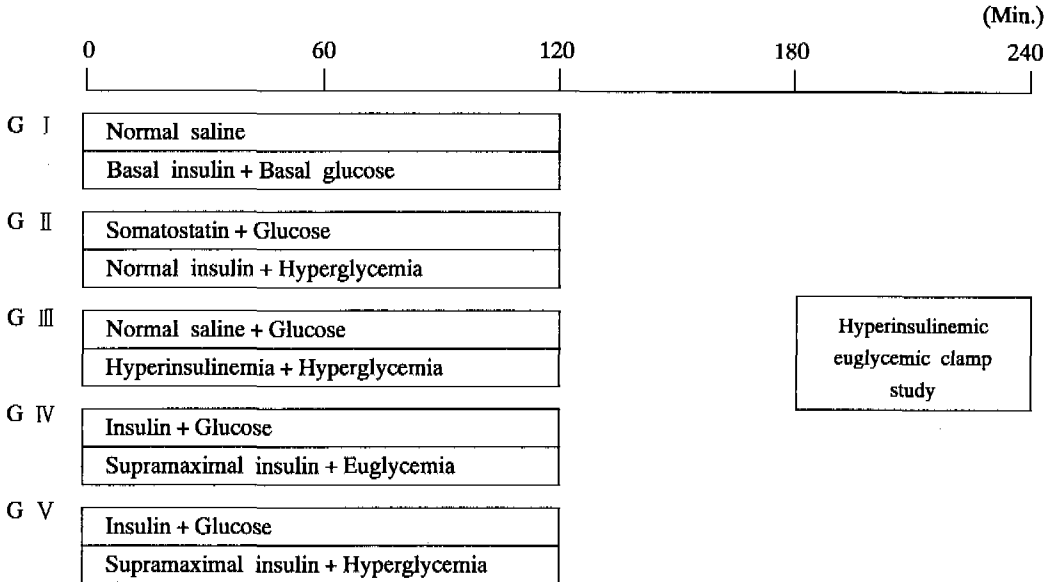


Fig. 1. Experimental design. G I ~ G V denote group I ~ group V, respectively. Upper portions of the left handed boxes indicate infused substance and lower portions of those boxes indicate levels of plasma insulin and blood glucose. Hyperinsulinemic euglycemic clamp study is done for measurement of insulin sensitivity on the same condition in all experimental groups.

IV군의 방법과 동일하게 인슐린과 포도당을 주입하여 초고인슐린과 정상혈당을 유지하고 평형상태의 혈액으로 인슐린 감수성의 지표인 당제거율, 당주입을 및 간의 당생성율을 측정하였다. 당이동을 측정하기 위한 표지자로는 <sup>3</sup>H-glucose를 사용하였으며 priming dose로 4 μCi를 주입하고 0.2 μCi/min의 속도로 지속적으로 주입하였다. 평형상태에서 혈중의 방사능활동도를 측정하여 당제거율(disappearance rate of glucose, Rd)을 계산하고 당제거율에서 포도당 주입률(glucose infusion rate)을 빼 값을 간의 당생성률(hepatic glucose production rate)로 하였다.

당제거율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$Rd = \frac{\text{Isotope infusion rate}}{\text{Specific activity of glucose}}$$

(Specific activity of glucose

= Radioactivity/Plasma glucose concentration)

<sup>3</sup>H-glucose의 방사성 활동도는 hyperinsulinemic euglycemic clamp 실험 중 steady state에서 측정하였는데 혈장 20 μl에 scintillation cocktail (High Safe II, LKB)을 첨가하여 액체섬광계수기 (liquid scintillation counter, Pharmacia, Sweden)로 측정하였다. Hyperinsulinemic euglycemic clamp 실험이 끝난 직후 우측 비복근을 절제하여 액체 질소탱크에 보관하였다가 인슐린 수용체 결합능과 제 4형 당수송체의 분석에 사용하였다.

인슐린 수용체 결합능 분석. Crude membrane의 분리; 액체질소탱크에 보관된 비복근을 4°C에서 조직 분쇄기 (Ultra-Turrax T25, Germany)을 이용하여 균질화 시켰다. 균질액은 고속냉장원심분리기 (J2-MC centrifuge, Beckman)의 내부온도를

4°C로 한 다음 JA-20.1 rotor를 이용하여 1,200 x g 에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 다시 9,000 x g로 10분간 원심분리하였다. 침전물은 버리고 상청액을 초고속원심분리기 (Sorvall ultracentrifuge OTD-75B, Dupont)의 T-875 rotor를 사용하여 4°C에서 190,000 x g로 60분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 침전된 crude membrane을 분리하였다. 분리된 crude membrane은 4°C의 완충액 (50 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris).HCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6)에 녹여 보관하였다.

인슐린-인슐린 수용체 결합 반응; Crude membrane을 완충액 (50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris).HCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) 1 ml에 1-2 mg의 단백질이 함유되도록 녹여 균질화시켰다. 이때 단백질량은 kit (Sigma)를 이용한 micro determination 법으로 정량하였다.

인슐린-인슐린 수용체 결합반응을 관찰하기 위하여 한 시료당 6개의 12 mm x 75 mm polyethylene 시험관을 준비하였다. 준비된 시험관에 시료를 50 µl씩 넣고 2% bovine serum albumin (BSA, Sigma)이 함유된 완충액에 녹은 unlabeled porcine insulin (Velosulin, Nordisk)을 농도가 0, 1, 10, 100, 1,000, 100,000 (nonspecific binding-용, NSB) ng/ml 되도록 넣는다. 그리고 <sup>125</sup>I-insulin (NEN)을 40 nCi 넣고 총부피가 400 µl가 되게 완충액을 첨가하고 4°C에서 18시간 반응시켰다. 반응 종료시 높은 음압이 걸리는 Brandel M-24R filtering manifold를 이용하여 Whatman 여과지로 인슐린-인슐린 수용체 복합체 (insulin-receptor complex)를 분리하였다. 분리된 인슐린-인슐린 수용체 복합체의 <sup>125</sup>I-insulin 방사성 활동도는 γ-선 측정기 (ANSR gamma counter, Abott)로 측정하였다. 인슐린 수용체에 결합한 <sup>125</sup>I-insulin은 측정치에서 NSB를 뺀 값을 사용하여 <sup>125</sup>I의 전체 계수에 대한

백분율로 나타내었다.

제 4형 당수송체(GLUT4) 분석: 제 4형 당수송체 단백질량의 측정을 위하여 비복근 (250mg 정도)을 얼음 접시위에서 가위로 잘게 자른 다음 10 ml의 완충액 (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCL, pH 7.5)에 넣어 조직분쇄기 (Ultraturrax T25)로 균질화 하고 175,000 x g로 60분간 초고속원심분리 (Sorvall ultracentrifuge OTD-75B, Dupont)하였다. 상청액은 버리고 침전물을 450 µl의 완충액 (1 mM EDTA and 10 mM Tris-HCL, pH 7.5)에 넣어 균질화 시킨 다음 50 µl의 0.35 M (10% wt/vol) SDS를 넣어 용해시켜 잘 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 다음 Eppendorf tube에 옮겨 담아 10,000 x g에서 원심분리하여 상청액에서 단백질량을 측정하고 제 4형 당수송체를 정량하였다.

제 4형 당수송체는 enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham)를 이용한 Western blot 법으로 분석하였는데 그 방법을 정리하면 다음과 같다.

실온에서 90 µg정도의 단백질이 포함된 상청액을 100 V로 60분간 SDS-PAGE하여 제 4형 당수송체를 분리하였다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 blocking solution (5% nonfat dried milk in TBS with 0.5% tween 20)에서 1시간 배양하고 TBS-T 용액으로 nitrocellulose membrane을 1분간 1회 씻은 후 anti-GLUT4 (mouse monoclonal antibody)를 첨가한 blocking solution에서 1시간 배양하였다. GLUT4와 결합한 항체는 nitrocellulose membrane을 5분씩 3회 씻은 후 secondary antibody로 peroxidase labeled antimouse antibody를 첨가한 blocking solution에서 1시간 반응시켜 anti-GLUT4와 결합하게 한 다음 ECL kit를 사용하여 15초간 X-ray film에 감광시켜 분석하였다.

자료의 분석: 자료는 평균±표준오차로 표기하

였고 SPSS-PC+를 이용하여 ANOVA-검정을 실시하였으며 Duncan 방식으로 사후검정을 하였다. 또한 당제거율과 당주입량과의 상관계수를 분석하였으며 유의수준은 95% 이상으로 하였다.

### 성 적

각 실험군의 체중, 공복시 혈당 및 인슐린 농도는 표 1과 같이 각 군 간에 유의한 차이는 없었다.

Table 1. General characteristics of the experimental groups

Group	No.	BW (gm)	FBG (mg/dl)	FPI ( $\mu$ U/ml)
I	5	206 $\pm$ 11.7	75 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 1.88
II	4	224 $\pm$ 8.7	65 $\pm$ 1.7	17.2 $\pm$ 1.55
III	5	207 $\pm$ 6.9	70 $\pm$ 3.3	18.7 $\pm$ 1.49
IV	5	212 $\pm$ 3.0	70 $\pm$ 3.2	13.0 $\pm$ 0.77
V	6	209 $\pm$ 7.9	73 $\pm$ 4.1	16.0 $\pm$ 1.08
F ratio		0.78	0.87	2.24
p		> 0.05	> 0.05	> 0.05

Values are mean  $\pm$  SE. BW, body weight; FBG, fasting blood glucose; FPI, fasting plasma insulin.

각 실험군에서 hyperinsulinemic glucose clamp 전에 당섭취를 유도하기 위하여 여러가지 조건에서 인슐린/포도당을 주입하였는데 실험중의 혈당과 인슐린 농도의 변화와 포도당 주입속도는 그림 2와 같다.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp전의 혈당 (mg/dl) 변화는 그림 2와 같이 제 I 군에서 기초상태의 수준 (75  $\pm$  0.7)으로 180분간 유지되었으며 제 II 군은 포도당 주입으로 207  $\pm$  6.3을 유지하다가 포도당 주입을 중단한 30분에 98  $\pm$  4.1으로 낮아졌으며 60분 후에는 84  $\pm$  2.1으로 되었다. 제 III

군은 포도당 주입으로 120분간 204  $\pm$  4.6으로 유지되다가 포도당 주입을 중단한 30분(실험개시 150분)에 74  $\pm$  8.4로 낮아졌으며 60분후(실험개시 180분)에는 78  $\pm$  6.6이 되었다. 제 IV 군은 인슐린과 포도당의 주입으로 100  $\pm$  2.2로 유지되었으며 인슐린 주입을 중단한 후에도 포도당을 계속 주입하여 정상 혈당을 유지하였다. 제 V 군은 인슐린과 포도당의 주입으로 120분간 233  $\pm$  3.1로 유지하다가 인슐린 주입을 중단한 후에도 포도당을 계속 주입하여 정상 혈당을 유지하였다.

혈중 인슐린 농도( $\mu$ U/ml)는 제 I 군에서 기초상태의 수준(14.4  $\pm$  1.88)으로 유지되었으며 제 II 군은 포도당의 주입으로 기초상태에 비하여 유의하게 증가하여 120분간 33.0  $\pm$  3.8을 유지하였으나 제 III 군에 비하여는 낮은 수준이어서 somatostatin이 인슐린 분비를 부분적으로 차단하였던 것을 알 수 있었다. 제 III 군은 포도당 주입으로 인한 고혈당으로 췌장에서 인슐린 분비가 증가하여 135.0  $\pm$  34.8로 유지되었다. 제 IV 군과 V 군은 인슐린의 주입으로 인슐린 농도가 각각 5006  $\pm$  396.1과 4813  $\pm$  687.9로 유지되었으며 인슐린 주입을 중단한 60분 후에도 각각 255  $\pm$  21.4와 496  $\pm$  115.0의 높은 상태로 유지되었다.

혈당을 100과 200 전후에 맞추기 위하여 포도당을 주입하였으며 그 총량(gm/kg)은 제 II 군에서 1.88  $\pm$  0.151, 제 III 군에서 2.69  $\pm$  0.238, 제 IV 군에서 3.54  $\pm$  0.198, 그리고 제 V 군에서 4.32  $\pm$  0.621이었다.

Hyperglycemic euglycemic clamp 실험에서 30-40분이 지나면 인슐린의 효과로 인한 당섭취와 포도당 주입률이 균형을 이루는 평형상태가 나타나며 이때의 인슐린 농도와 혈당 및 포도당 주입률, 당제거율과 간의 당생성률은 표 3과 같다.

Hyperinsulinemic euglycemic clamp study중 평형상태에서의 혈당은 100에서 102사이

졌으며 각 군 간의 유의한 차이도 없었다. 혈당을 일정하게 유지하기 위한 포도당 주입률은 제 V 군이 제 I 군과 IV 군에 비하여 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ).

당제거율은 전체 군 간에 유의한 차이가 있었으며 ( $p < 0.001$ ) Duncan 방식으로 사후검정한 결과로 제 II, III, IV, V 군에서 제 I 군에 비하여 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ).

간의 당생성률은 각 군 간에 유의한 차이가 없었다.

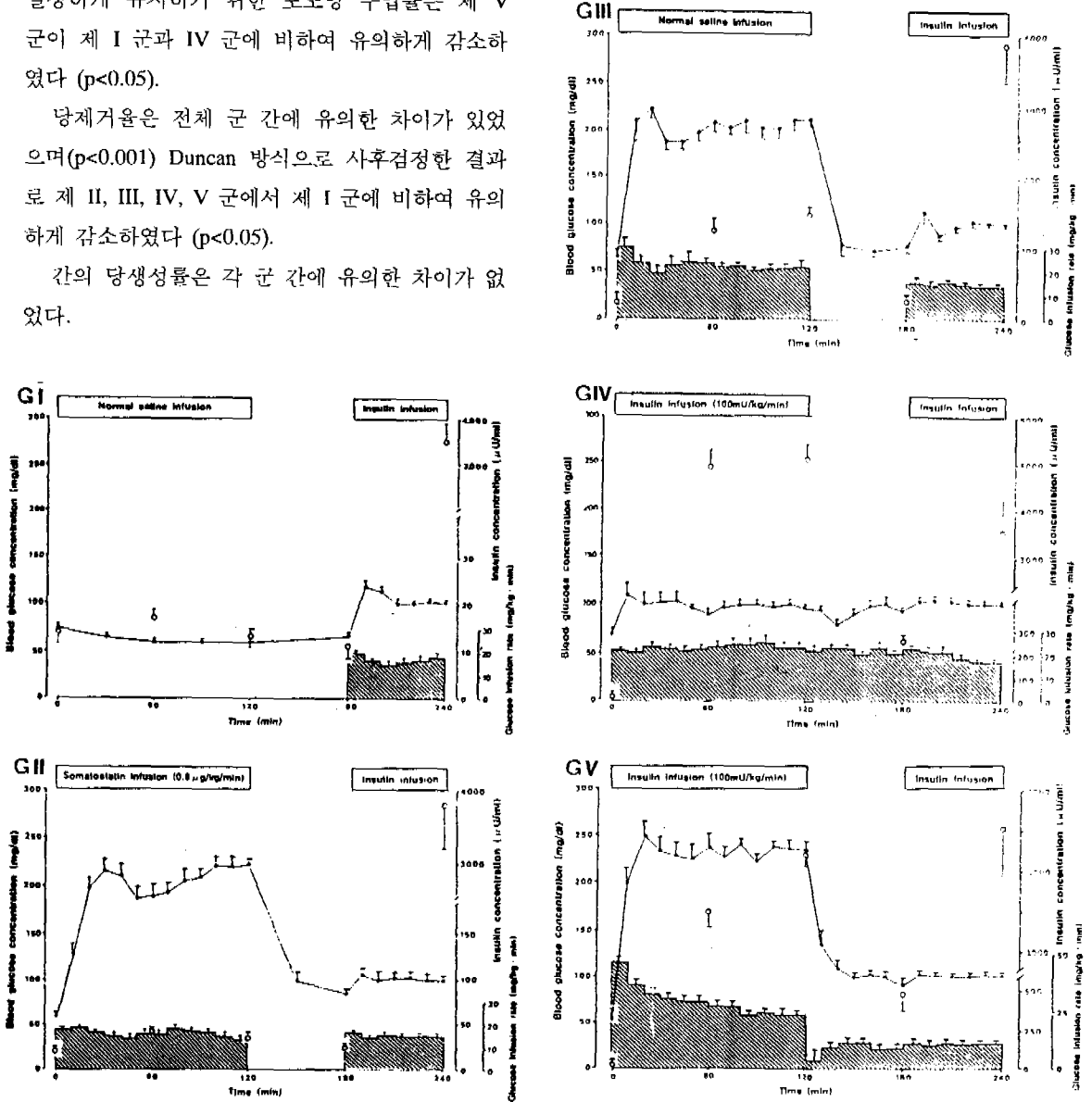


Fig. 2. Blood glucose concentration, plasma insulin concentration, and glucose infusion rate during preloading of glucose and hyperinsulinemic euglycemic clamp studies. The solid line denotes blood glucose concentration, open circle indicates insulin concentration, and dashed area means amounts of infused glucose. Bars mean standard error. GI, group I, basal glucose and insulin concentration; GII, group II, hyperglycemia and normoinsulinemia; GIII, group III, hyperglycemia and hyperinsulinemia; GIV, group IV, euglycemia and supramaximal insulin concentration; GV, group V, hyperglycemia and supramaximal insulin concentration.

당섭취량과 당제거율과의 상관관계는 그림 3과 같다. 전체 실험동물에서 당섭취량과 당제거율은 유의한 역상관 ( $r=-0.701$ ,  $P<0.001$ ) 관계를 나타내었다.

당섭취의 감소기전을 규명하기 위하여 비복근의

인슐린 수용체와 인슐린과의 결합반응을 관찰한 내용은 그림 4와 같이 각 군 간의 유의한 차이가 없었다.

비복근 세포막의 제 4형 당수송체량도 각 군간에 차이가 없었다.

Table 2. Steady state immunoreactive insulin concentration(SSIRI), glucose concentration(SSBG), glucose infusion rate(SSGIR), disappearance rate of glucose(Rd), and hepatic glucose production rate(HGO) during hyperinsulinemic euglycemic clamp study

Group	No	SSIRI μU/ml	SSBG mg/dl	SSGIR mg/kg · min	Rd mg/kg · min	HGO mg/kg · min
I	5	3497 ± 461.2	102 ± 1.4	16.8 ± 1.09	16.9 ± 1.74	0.1 ± 0.55
II	4	3724 ± 618.1	100 ± 2.8	13.4 ± 0.54	13.5 ± 0.53*	0.2 ± 0.76
III	5	3980 ± 601.5	101 ± 1.8	13.5 ± 0.21	11.2 ± 0.52*	-2.3 ± 0.69
IV	5	3780 ± 513.3	102 ± 1.7	16.0 ± 0.49	13.2 ± 0.92*	-3.9 ± 1.13
V	6	6090 ± 1034.0	102 ± 1.7	10.7 ± 1.68*#	10.4 ± 0.41*	-0.3 ± 1.40
F ratio				2.71	7.35	1.08
p				> 0.05	< 0.001	> 0.05

Values are mean ± SE. \*  $p < 0.05$ , vs group I; #  $p < 0.05$ , vs group IV.

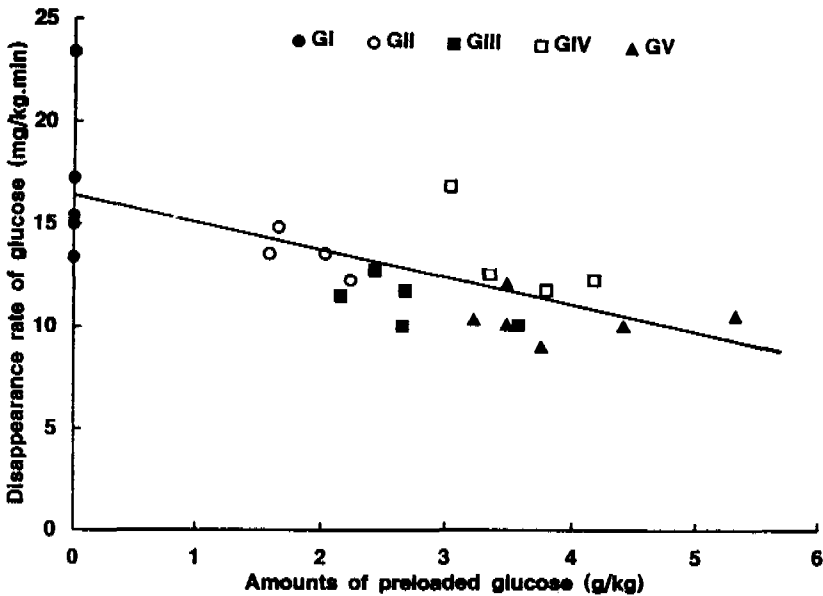


Fig. 3. Relationship between amounts of preloaded glucose and disappearance rate of glucose in whole experimental cases.  $r = -0.701$ ,  $p < 0.001$ . GI, basal glucose and insulin concentration; GII, hyperglycemia and normoinsulinemia; GIII, hyperglycemia and hyperinsulinemia; GIV, euglycemia and supramaximal insulin concentration; GV, hyperglycemia and supramaximal insulin concentration.

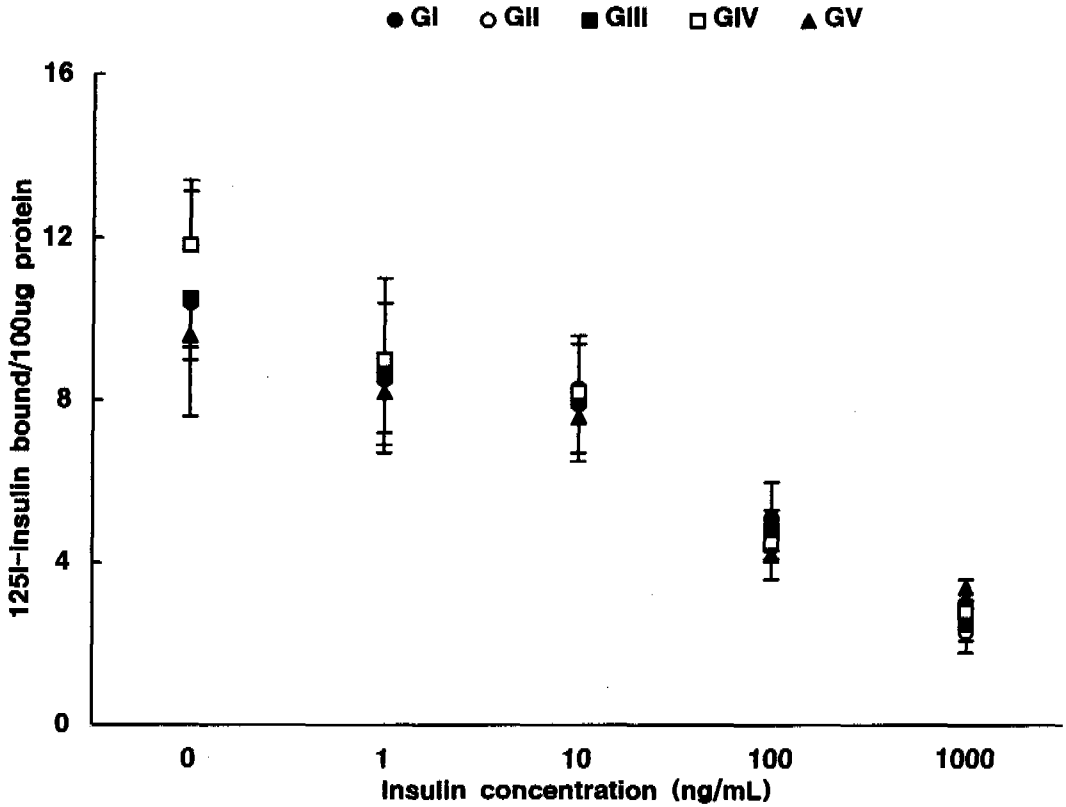


Fig. 4. Insulin binding at varying concentrations of insulin to crude plasma membrane from gastrocnemius muscle in rats. GI : basal glucose and insulin concentration, GII : hyperglycemia and normoinsulinemia, GIII : hyperglycemia and hyperinsulinemia, GIV : euglycemia and supramaximal insulin concentration, GV : hyperglycemia and supramaximal insulin concentration.

고 찰

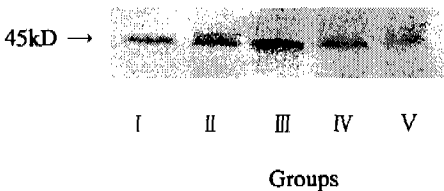


Fig. 5. Western blot analysis of the plasma membrane from gastrocnemius of rats with monoclonal mouse anti-rat glucose transporter 4.

장기간의 고혈당과 고인슐린증으로 말초조직의 인슐린 수용체 결합능이 감소하고 당수송체의 감소로 당섭취가 감소하며 여러가지 세포내 대사변화가 초래되는 것으로 보고(Henry 등, 1990; DeFronzo 등, 1981)되고 있다. 그 이전에 관해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않지만 단백질의 당화과정에 의할 것이라는 가능성이 제기되고 있다(Micheal, 1994). 그러나 생리학적인 관점에서 세포내로의 당섭취가 증가하고 섭취된 영양소를 소화해 내지



못하면 세포내에 축적되어 세포비만으로 이어지게 되며 세포 수준에서는 이를 방지하기 위하여 더 이상의 영양소 유입을 억제할 수 있는 장치를 가져야 세포내 항상성을 유지하는데 유리한 입장에 있게 된다. 이를 위하여 세포수준에서 당섭취를 제한하는 장치를 가동시키며 이것이 인슐린 저항성이라는 형태로 고정될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 이를 검증하기 위하여 실험방법에서 서술한 여러가지 조건으로 단기간 (2시간)에 많은 양의 당섭취를 유도하고 인슐린 예민도를 측정하여 당섭취량과의 상관관계를 구하였는데 통계학적으로 유의한 역상관관계를 얻었다( $r=-0.701$ ,  $p<0.001$ ). 제 V 군 (초고인슐린증과 고혈당)의 경우에 당섭취량이 체중 kg으로 환산하여 4.3 g이나 되었다. 이 양은 세포외액에 있는 전체 포도당의 30배에 해당하며 정맥당부하검사시 주입량의 10배에 달한다. 사람의 경우에 혈관으로 350 g의 포도당을 주입한 것과 비슷한 양이다. 세포내로 섭취된 포도당은 산화과정이나 비산화과정을 통하여 대사되고 마취 상황이기 때문에 에너지의 사용이 제한된 결과 포도당 대사산물들이 축적되게 되어 그 결과 더 이상의 당섭취를 억제하여 이러한 결과를 나타낸 것으로 생각된다.

그러나 제 IV 군의 당제거율이 포도당 주입량은 많은데도 불구하고 제 III 군보다 통계적으로는 유의하지 않지만 오히려 높은 값을 나타내는 것으로 보아 당섭취를 조절하는 것을 당섭취량으로만 국한시킬 수는 없었으며 혈당과 인슐린 농도 자체의 효과도 평가되어야 할 것으로 생각하였다. 인슐린 농도와 혈당이라는 인자의 관점에서 결과를 분석하면 기초상태의 인슐린 농도와 혈당을 유지한 제 I 군에서 당제거율( $\text{mg/kg} \cdot \text{min}$ )이  $16.9 \pm 1.74$  이었는데 비하여 고혈당 상태로 유지한 군들은 인슐린 농도가 증가함에 따라 당제거율이 점점 감소하여 정상 인슐린 농도의 제 II 군이  $13.5 \pm 0.53$ ,

고인슐린 농도의 제 III 군이  $11.2 \pm 0.52$ , 초고인슐린 농도의 제 V 군이  $10.4 \pm 0.41$  이어서 각 단계의 차이만큼 (산술적으로 3.4, 2.3, 0.8  $\text{mg/kg} \cdot \text{min}$ )이 인슐린의 농도변화에 따른 감소치이며 초고인슐린 농도와 정상 혈당의 제 IV 군은 당제거율이  $13.2 \pm 0.92$ 으로 제 V 군과의 산술적인 차이인 2.8  $\text{mg/kg} \cdot \text{min}$ 이 고혈당의 영향으로 볼 수 있겠다.

골격근육은 체중의 약 40%를 차지하는 거대한 조직으로 인슐린에 의하여 촉진되는 당섭취의 80-85%가 이곳에서 이루어지기(DeFronzo 등, 1981) 때문에 당대사를 연구하는데 가장 많이 사용되고 있으며 본 연구에서도 전신에서 나타난 결과의 기전을 규명하기 위한 인슐린 수용체와 당수송체의 분석은 골격근 중에서 뒷다리의 비복근을 사용하였다.

고혈당과 고인슐린증이 지속되면 인슐린 예민도가 감소하는데 그 기전의 하나로 인슐린 수용체의 숫자나 결합능의 감소를 들 수 있다(Mayor 등, 1992). 인슐린 수용체는 고인슐린증이 지속되면 down regulation되어 그 숫자가 감소하며 저인슐린증에서는 up regulation되어 인슐린 수용체의 숫자가 증가하는 양상으로 조절이 된다. 본 연구에서는 인슐린 수용체의 변화를 찾을 수 없었다. 이는 세포에 따라 다소의 차이는 있지만 지방세포의 경우에 세포막의 인슐린 수용체 중에서 90%가 여분(spare)으로 있기 때문에(Gliemann 등, 1975) 수시간의 고인슐린상태가 지속되어 수용체가 인슐린과 결합한 후 세포내로 internalization되더라도(Knutson, 1991) 수용체의 수는 측정에서 나타날 만큼의 변화를 나타내지 않은 결과로 생각된다.

인슐린이 인슐린 수용체와 결합하면 그 효과로 세포내 저장소(소포체막)로부터 당수송체를 세포막으로 이동시키게 되며 그 결과 당섭취가 증가하게 된다. 그 과정은 인슐린이 인슐린 수용체와 결

합하면 인슐린 수용체의  $\beta$ -subunit에 있는 tyrosine residue가 자가인산화(autophosphorylation)되며 (Perlmán 등, 1989) 다음 단계로 세포질내에 있는 insulin receptor substrate-1(IRS-1)의 tyrosyl phosphorylation으로 이어진다(Sun 등, 1991). IRS-1은 sarc homology-2(SH2) domains를 가진 다른 signalling molecules의 결합부위가 되어 regulatory docking protein으로서의 역할을 한다(Eck 등, 1993). 다음 단계로는 SH2 domain을 가진 phosphatidylinositol 3 kinase(PI 3-kinase)가 IRS-1과 결합하고(Cantley 등, 1991) 그 결과로 생성된 인산화물 (phosphatidylinositol, phosphatidylinositol-4-phosphate, phosphatidylinositol-4,5-diphosphate)이 더 아래 단계의 신호전달에 second messengers로 관여할 것으로 보고되고 있다(Stephens 등, 1993). IP 3-kinase의 활성화는 세포내 소체의 이동에 관여하는 것으로 알려져서(Joly 등, 1994; Schu 등, 1993) 당수송체의 이동에 중요한 역할을 할 것으로 보이지만 그 이상 단계의 기전은 아직도 알려져 있지 않고 있다. 인슐린의 자극이 지속되는 상황에서 제 4형 당수송체는 세포막에서 당섭취를 시킨 다음 endocytosis과정을 통하여 세포내 저장소로 이동한다(Zierath, 1995). 인슐린의 효과를 평가하는 지표로서 당섭취를 측정하는 방법을 많이 사용하는데 당섭취는 인슐린이 인슐린 수용체와 결합하고 앞에 기술한 과정을 통하여 당수송체가 세포막으로 이동하여 일어나며 당수송체의 숫자와 당섭취간에는 비례관계가 성립한다(Lund 등, 1994). 그래서 당수송체의 숫자나 기능은 인슐린 저항성과 큰 상관관계를 나타내고 있어서 이 부분의 연구에 중요한 지표로 사용되고 있다(Ebeling 등, 1993; Charron과 Kahn, 1990). 또한 제 4형 당수송체를 활성화 시키는 인자는 인슐린 외에도 근수축(Lund 등, 1995)과 고혈당(Galante 등, 1995)이 있으며 이들은 서로 다른 기전으로 작용한다.

본 연구에서 hyperinsulinemic euglycemic clamp studies후에 적출한 골격근막의 제 4형 당수송체를 분석하였는데 각 군간에 유의한 차이가 없었음은 짧은 시간에 당섭취를 증가시킨 결과로 발생한 당섭취의 감소가 제 4형 당수송체의 숫적 감소보다는 당수송체의 기능적 저하(Joost와 Weber, 1989)나 glucose 6-phosphate의 축적으로 인하여 hexokinase 활성도가 감소한 결과로 초래되는 세포내외의 포도당 농도차이의 감소(Zierath, 1995) 때문인 것으로 생각된다.

이상의 결과는 단기간의 당섭취 증가는 인슐린 수용체 결합능이나 제 4형 당수송체수의 변화없이 더 이상의 당섭취를 억제할 수 있음을 의미한다. 또한 이러한 모델에서 발생한 인슐린 저항성이 가역적인지와 필요이상의 당섭취가 어느정도 오래 유지되어야 병적인 상태로 고정이 되는지에 관해서는 추후 연구가 되어야 할 과제로 생각한다.

## 요 약

인슐린 저항성이란 인슐린의 생물학적 효과가 감소하는 상태를 말하며 당뇨병의 중요한 병리기전이다. 인슐린 저항성은 매우 다양한 특성을 가지고 있으며 유전적인 요인이나 후천적인 요인에 의하여 발생한다. 이제까지 가장 잘 알려진 인슐린 저항성의 유발인자로는 고혈당과 고인슐린증이 있다. 장기간의 고혈당이나 고인슐린증은 가장 중요한 인슐린의 작용조직인 골격근에서 인슐린 수용체의 결합능을 감소시키고 당섭취에 필요한 제 4형 당수송체의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이들 인자는 모두 골격근에서 당섭취를 증가시키는 것으로서 인슐린 저항성은 말초조직이 세포내로의 과도한 영양소 섭취를 방지하기 위하여 작동시키는 조절기전일 가능성을 생

각할 수 있다.

본 연구에서는 단기간의 당섭취 증가가 더 이상의 당섭취를 억제할 수 있는지를 평가하고 그 기전을 규명하고자 흰쥐에서 2 시간 동안 다양한 조건으로 당섭취를 유도하고 1 시간의 휴식기간을 가진 후 인슐린 예민도를 측정하고 골격근을 분리하여 인슐린 수용체와 제 4형 당수송체를 분석하여 당섭취량과 인슐린 감수성과의 상관관계를 규명하고 인슐린 수용체 결합능과 제 4형 당수송체량을 비교하였다.

실험군은 hyperinsulinemic glucose clamp 전에 시행한 당섭취의 조건으로써 5개 군으로 구분하였다. 제 I 군은 대조군으로 생리식염수만 주입하여 기초상태의 인슐린 농도와 혈당을 유지하였으며, 제 II 군은 somatostatin과 포도당을 주입하여 정상 인슐린농도와 고혈당을 유지하였으며, 제 III 군은 포도당을 주입하여 고인슐린증과 고혈당을 유지하였고, 제 IV 군은 인슐린(100 mU/kg/min)과 포도당을 주입하여 초고인슐린증(~4000 µU/ml)과 정상혈당(~100 mg/dl)으로 유지하였으며, 그리고 제 V 군은 인슐린과 포도당을 주입하여 초고인슐린증과 고혈당(~200 mg/dl)을 유지하였다.

체중, 공복시 혈당 및 인슐린 농도는 각 군 간에 유의한 차이가 없었다. Hyperinsulinemic euglycemic clamp 전에 주입한 포도당의 총량(gm/kg)은 제 II 군이 1.88±0.151, 제 III 군이 2.69±0.239, 제 IV 군이 3.54±0.198, 그리고 제 V 군이 4.32±0.621이었다. Hyperinsulinemic euglycemic clamp의 평형상태 당제거율(mg/kg·min)은 제 I 군이 16.9±1.74, 제 II 군이 13.5±0.53, 제 III 군이 11.2±0.52, 제 IV 군이 13.2±0.92, 그리고 제 V 군이 10.4±0.41로 전체 군 간에 유의한 차이가 있었으며(p<0.001) 각 군간의 비교에서 제 II, III, IV, V 군의 값이 제 I 군에 비하여 유의하게 낮았다 (p<0.05). 전체 실험동물에서 포도당 주입량과

당제거율 사이에 역상관관계 (r=-0.701, p<0.001)를 보였다. 인슐린 수용체 결합과 Western blot으로 분석한 제 4형 당수송체량은 각 군 간에 유의한 차이가 없었다.

이상의 결과로 미루어 단기간의 당섭취 증가가 더이상의 당섭취를 억제할 수 있으나 인슐린 수용체 결합과 제 4형 당수송체의 숫적 감소없이 발생하였다.

### 참고문헌

김용운: STZ-당도흰쥐에서 발생하는 인슐린 저항성의 기전. 박사학위 논문, 영남대학교 대학원, 1992, pp 1-50.

Aktorics K, Jakobs KH: In vivo and in vitro desensitization of nicotinic acid-induced adipocyte adenylate cyclase inhibition. Arch Pharmacol 318: 241-245, 1982.

Blondel O, Bailbe D, Portha B: Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NIDDM adult rats given streptozotocin as neonates. Diabetes 38: 610-617, 1989.

Blondel O, Bailbe D, Portha B: Insulin resistance in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by neonatal (5 days) streptozotocin: Evidence for reversal following phlorizin treatment. Metabolism 39(8): 787-793, 1990.

Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S: Oncogenes and signal transduction. Cell 64: 281-302, 1991.

Charron MJ, Kahn BB: Divergent molecular mechanisms for insulin-resistant glucose transport in muscle and adipose cells in vivo. J

- Biol Chem 265(14): 7994-8000, 1990.
- Choi SB, Frontoni S, Rossetti L: Mechanism by which calcitonin gene-related peptide antagonizes insulin action in vivo. *Am J Physiol* 260: E321-E325, 1991.
- Cusin I, Terretaz J, Roher-Jeanrenaud F, Zarjevski N, Assimacopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B: Hyperinsulinemia increases the amount of GLUT4 mRNA in white adipose tissue and decreases that of muscles: A clue for increased fat depot and insulin resistance. *Endocrinology* 127(6): 3246-3248, 1990.
- DeFronzo RA, Ferrannini E: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes* 14: 173-194, 1991.
- DeFronzo RA, Hendler R, Simonson D: Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 31: 795-801, 1982.
- DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E: The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30: 1000-1007, 1981.
- Ebeling P, Bourey R, Koranyi L, Tuominen JA, Groop LC, Henriksson J, Mueckler M, et al.: Mechanism of enhanced insulin sensitivity in athletes. *J Clin Invest* 92: 1623-1631, 1993.
- Eck MJ, Shoelson SE, Harrison SC: Recognition of high affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56<sup>lck</sup>. *Nature* 362: 87-91, 1993.
- Farrace S, Rossetti L: Hyperglycemia markedly enhances skeletal muscle glycogen synthase activity in diabetic, but not in normal conscious rats. *Diabetes* 41: 1453-1463, 1992.
- Galante P, Mosthaf L, Kellerer M, Berti L, Tippmer S, Bossenmaier B, Fujiwara T, et al.: Acute hyperglycemia provides an insulin independent inducer for GLUT4 translocation in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes and rat skeletal muscle. *Diabetes* 44: 646-651, 1995.
- Gliemann J, Gammeltoft S, Vinten J: Time course of insulin receptor binding and insulin induced lipogenesis in isolated rat fat cells. *J Biol Chem* 250: 3368-3374, 1975.
- Henry RR, Gumbiner B, Flynn T, Thorburn AW: Metabolic effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on fate of intracellular glucose in NIDDM. *Diabetes* 39: 149-156, 1990.
- Joly M, Kazlauskas A, Fay FS, Corvera S: Distribution of PDGH receptor trafficking by mutation of its PI-3 kinase binding sites. *Science* 263: 684-687, 1994.
- Joost AG, Weber TM: The regulation of glucose transport in insulin sensitive cells. *Diabetologia* 32: 831-838, 1989.
- Kahn BB, Shulman GI, DeFronzo RA, Cushman SW, Rossetti L: Normalization of blood glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose transport in adipose cells without restoring glucose transporter gene expression. *J Clin Invest* 87: 561-570, 1991.
- Kim YW, Kim JY, Lee SK: Effect of phlorizin and acipimox on insulin resistance in STZ-diabetic rats. *J Kor Med Sci* 10(1): 24-30, 1995.
- Knutson VP: Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 5: 2130-2138, 1991.

- Lund S, Flyvbjerg A, Holman GD, Larsen FS, Pedersen O, Schmitz O: Comparative effects of IGF-1 and insulin on the glucose transporter system in rat muscle. *Am J Physiol* 267(Endocrinol Metab 30): E461-E466, 1994.
- Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O: Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci* 92: 5817-5821, 1995.
- Mayor P, Maianu L, Garvey WT: Glucose and insulin chronically regulate insulin action via different mechanisms in BC3H1 myocytes. *Diabetes* 41: 274-285, 1992.
- Micheal B: Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43: 836-840, 1994.
- Perlman R, Bottaro D, White MF, Kahn CR: Conformational changes in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of the insulin receptor identified by antipeptide antibodies. *J Biol Chem* 264: 8946-8950, 1989.
- Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA: Glucose toxicity. *Diabetes Care* 13: 610-631, 1990.
- Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristo D, DeFronzo RA: Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* 79: 1510-1515, 1987.
- Schu PV, Takegawa K, Fry MJ, Stack JH, Waterfield MD, Emr SD: Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260: 88-91, 1993.
- Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT: Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate: A new intracellular signalling system? *Biochemica et Biophysica Acta* 1179: 27-75, 1993.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, et al.: The structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77, 1991.
- Takao F, Laury MC, Ktorza A, Picon L, Penicaud L: Hyperinsulinemia increases insulin action in vivo in white adipose tissue but not in muscles. *Biochem J* 272: 255-257, 1990.
- Thorburn AW, Gumbiner B, Brechtel G, Henry RR: Effect of hyperinsulinemia and hyperglycemia on intracellular glucose and fat metabolism in healthy subjects. *Diabetes* 39: 22-30, 1990.
- Unger RH, Grundy S: Hyperglycemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 28: 119-121, 1985.
- Zierath JR: In vitro studies of human skeletal muscle: Hormonal and metabolic regulation of glucose transport. *Acta Physiol Scand* 155(suppl): 626, 1995.

— Abstract —

## Effect of Acutely Increased Glucose Uptake on Insulin Sensitivity in Rats

Yong Woon Kim, In Youl Ma, Suck Kang Lee

*Department of Physiology, College of Medicine  
Yeungnam University, Taegu, Korea*

Insulin resistance is a prominent feature of diabetic state and has heterogeneous nature. However, the pathogenetic sequence of events leading to the emergence of the defect in insulin action remains controversial. It is well-known that prolonged hyperglycemia and hyperinsulinemia are one of the causes of development of insulin resistance, but both hyperglycemia and hyperinsulinemia stimulate glucose uptake in peripheral tissue. Therefore, it is hypothesized that insulin resistance may be generated by a kind of protective mechanism preventing cellular hypertrophy.

In this study, to evaluate whether the acutely increased glucose uptake inhibits further glucose transport stimulated by insulin, insulin sensitivity was measured after preloaded glucose infusion for 2 hours at various conditions in rats. And also, to evaluate the mechanism of decreased insulin sensitivity, insulin receptor binding affinity and glucose transporter 4 (GLUT4) protein of plasma membrane of gastrocnemius muscle were assayed after hyperinsulinemic euglycemic clamp studies. Experimental animals were divided into five groups according to conditions of preloaded glucose infusion: group I, basal insulin ( $14 \pm 1.9$   $\mu\text{U/ml}$ ) and basal glucose ( $75 \pm 0.7$  mg/dl), by normal saline infusion; group II, normal insulin ( $33 \pm 3.8$   $\mu\text{U/ml}$ ) and hyperglycemia ( $207 \pm 6.3$  mg/dl), by somatostatin and glucose infusion; group III, hyperinsulinemia ( $134 \pm 34.8$   $\mu\text{U/ml}$ ) and hyperglycemia ( $204 \pm 4.6$  mg/dl), by glucose infusion; group IV, supramaximal insulin ( $5006 \pm 396.1$   $\mu\text{U/ml}$ ) and euglycemia ( $100 \pm 2.2$  mg/dl), by insulin and glucose infusion; group V, supramaximal insulin ( $4813 \pm 687.9$   $\mu\text{U/ml}$ ) and hyperglycemia ( $233 \pm 3.1$  mg/dl), by insulin and glucose infusion. Insulin sensitivity was assessed with hyperinsulinemic euglycemic clamp technique.

The amounts of preloaded glucose infusion (gm/kg) were  $1.88 \pm 0.151$  in group II,  $2.69 \pm 0.239$  in group III,  $3.54 \pm 0.198$  in group IV, and  $4.32 \pm 0.621$  in group V. Disappearance rates of glucose (Rd, mg/kg/min) at steady state of hyperinsulinemic euglycemic clamp studies were  $16.9 \pm 3.88$  in group I,  $13.5 \pm 1.05$  in group II,  $11.2 \pm 1.17$  in group III,  $13.2 \pm 2.05$  in group IV, and  $10.4 \pm 1.01$  in group V. A negative correlation was observed between amount of preloaded glucose and Rd ( $r = -0.701$ ,  $p < 0.001$ ) when all studies were combined. Insulin receptor binding affinity and content of GLUT4 were not significantly different in all experimental groups.

These results suggest that increased glucose uptake may inhibit further glucose transport and lead to decreased insulin sensitivity.

Key Words : Glucose uptake, Insulin resistance, Hyperinsulinemia, Hyperglycemia