□ 원 저 □

Uncoupling Protein 3의 골격근 세포내 과발현이 OLETF 백서 및 배양된 골격근 세포에서 포도당대사에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 내과학교실, 아산생명과학 연구소[1], 계명대학교 의과대학 내과학교실[2], 울산대학교 의과대학 생화학교실[3]

한정희·박혜선[1]·고정민·김하영·강호경[2]·이인규[2]·박중열·홍성관·이재담[3]·이기업

The Effects of Uncoupling Protein 3 Overexpression on Glucose Metabolism in OLETF Rats *in Vivo* and Cultured Skeletal Muscle Cells *in Vitro*

Jeong Hee Han, Hye Seon Park[1], Jung-Min Koh, Ha Young Kim, Ho Kyung Kang[2], In-Kyu Lee[2], Joong Yeol Park, Sung Kwan Hong, Jae Dam Lee[3], Ki-Up Lee

Department of Internal Medicine, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Institute for Life Sciences and Technology[1], Department of Internal Medicine, Keimyung University[2], Department of Biochemistry, College of Medicine, University of Ulsan[3]

- Abstract -

Background: UCP3 is a mitochondrial membrane protein expressed selectively in the skeletal muscle and brown adipose tissue. Since the skeletal muscle is the main organ determining insulin sensitivity in the body, it was hypothesized that UCP3 overexpression in skeletal muscle cells would improve glucose metabolism.

Methods: An adenovirus-UCP3 was produced by a recombinant DNA method. OLETF rats were divided into 2 groups. Four rats were injected with the adenovirus-UCP3 (UCP3 group) and others were injected with the adenovirus (control group) in the skeletal muscle. The UCP3 group was provided with the same quantity of food as that consumed by the control group on the previous day. Insulin sensitivity was evaluated by the euglycemic hyperinsulinemic clamp method. In a separate experiment, glucose transport and glycogen synthesis we evaluated in C2C12 cells transfected with ether an adenovirus or the adenovirus-UCP3.

Results: The insulin sensitivity improved significantly and the body weight decreased in the UCP3 group. The glucose transport and glycogen synthesis were higher in the UCP3-C2C12 skeletal muscle cells at the basal state. After insulin treatment, glucose transport and glycogen synthesis were also higher in the UCP3-C2C12 cells but the increments were reduced after treatment with wortmannin, a PI3K inhibitor.

접수일자: 2001년 9월 4일, 통과일자: 2002년 2월 20일, 책임저자: 이기업, 서울중앙병원 내분비내과

Conclusion: Insulin sensitivity was higher in the UCP3-overexpressed OLETF rats in the *in vivo* study. UCP3 transfection also increased glucose transport and glycogen synthesis in the cultured skeletal muscle cells by a PI3K dependent mechanism **(J Kor Diabetes Asso 25:460 ~ 468, 2001).**

Key Words: UCP3, Glucose transport, Glycogen synthesis, PI3K

서 론

Uncoupling protein (UCP, UCP1)은 미토콘드리아의 내막에 존재하는 단백질로 호흡에 의해 생성된 미토콘드리아 내막과 외막 사이의 전위차를 ATP 합성에 이용하지 않고 열로 발산시키는 기능을 가진다. 최근 동물의 갈색지방조직에만 존재하는 UCP와 구조적 유사성을 가진 아형인 UCP2와 UCP3가 사람에서도 발현됨이 알려져 큰 관심을 끌고 있는데 UCP2는 모든 조직에 걸쳐 분포하는 반면 UCP3는 그 발현이 골격근 세포와 갈색지방조직에만 국한된다. UCP2와 UCP3는 UCP1과 염기서열이 각각 56%, 57% 일치한다고 보고되어 그 기능이 UCP1과 유사하리라 생각이 되지만 아직까지 그 기능은 확실히 밝혀지지 않은 상태이다. 특히 UCP3는 체내 에너지 대사와 인슐린 감수성을 결정하는데 있어 가장 중요한 역할을 하는 기관인 골격근에 선택적으로 발현되어 존재하여 에너지 대사의 조절에 있어 중요한 기능을 담당하리라 생각되어진다. UCP3의 에너지 대사에 관련된 연구들은 다양한 결과를 보고하고 있는데 생쥐에서 UCP3를 knock out 시키더라도 비만해지지 않고 지방산의 대사에 영향을 주지 않았다는 보고가 있었던 반면에[1] 최근 UCP3를 골격근에 과발현시킨 형질전환 생쥐에서 먹이 섭취가 증가함에도 불구하고 체중이 감소함이 보고되기도 하였다[2]. 한편, 고지방 식이의 투여, 기아상태, 급격한 운동 시 골격근 조직에서의 UCP3 발현이 증가되는 것으로 보아서[3~5] UCP3가 지방산대사의 조절에 있어 중요한 역할을 할 것이라는 주장도 대두되고 있다.

저자들은 골격근이 인슐린작용에 의한 전신적 포도당 이용률을 결정하는 가장 중요한 기관이라는 점과 UCP3가 골격근에 주로 발현된다는 점에 착안하여 골격근에서의 UCP3 과발현이 포도당대사를 호전시키고 인슐린 감수성을 증가시킬 것이라는 가설을 세웠다. 이를 증명하기 위해 비만형 당뇨병의 모델인 OLETF 백서에서 UCP3를 과발현 시켰을 때 체중의 변화와 인슐린 감수성의 변화를 보고자 하였고 한편 배양된 골격근 세포에 UCP3를 과발현 시켰을 때 포도당 수송 및 당원합성에 미치는 영향을 알아 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. Adenovirus-UCP3 의 제작

Human UCP3 cDNA를 미국 Harvard 의대에서 기증받아 UCP3를 encoding하는 adenovirus를 제작하였다. pACCMVpLpA에서 XhoI/ClaI조각을 절단한 후 UCP3 cDNA를 결합하여 재조합 plasmid를 만들었다. UCP3 DNA를 함유하는 plasmid를 E1 region이 절단된 adenoviral DNA를 포함하는 HEK-293 세포에 transfection시킨 후 세포를 녹여 재조합 UCP3를 encoding하는 adenovirus (adenovirus-UCP3)를 만들었다.

2. Euglycemic hyperinsulinemic clamp

25주령의 8마리의 OLETF 백서를 대상으로 하여 4마리는 대퇴사두근 (quadriceps muscle), 비복근 (gastrocnemius muscle), 가자미근 (soleus muscle) 등의 골격근에 adenovirus 2 mL (1×10^{12} pfu/mL)를 주사하여 대조군으로 하였고 4마리는 골격근에 adenovirus-UCP3 2 mL (1×10^{12} pfu/mL)를 주사하였다 (UCP3 과발현군). UCP3를 투여한 백서에서 먹이섭취가 증가하는 경향이 있어 그 전날 대조군이 먹은 양의 먹이만큼 투여하였고 (Fig. 1) 골격근에 adenovirus를 주사한

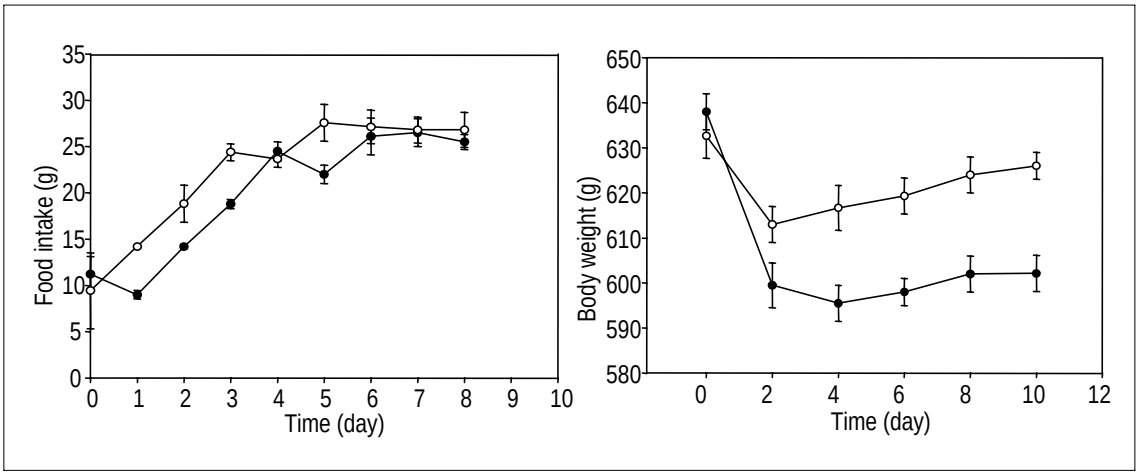

Fig. 1. Upper panel shows the amount of food intake. UCP3 group (closed circle) were provided by the same amount of food as that comsumed by control group on the previous day (closed circle). Lower panel shows the body weight changes between two groups. The body weight was siginificantly decreased in UCP3 group compared to control group. *: $p<0.05$ vs control

10일 후에 euglycemic hyperinsulinemic clamp를 시행하였다. OLETF 백서의 꼬리에 정맥관을 삽입한 후 인슐린 (Humulin Regular, Eli-Lilly, Indianapolis, IN, USA)을 86 pmol/kgmin로 주입하였고 혈청내 포도당 농도를 10분 간격으로 측정을 하여 기저상태의 혈청 포도당 농도를 목표로 25% 포도당 용액의 주입속도를 변화시켰다.

3. C2C12 골격근 세포의 배양

C2C12 골격근 세포 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)를 10% FCS와 2 mmol/L 글루타민이 포함된 DMEM 배지에서 배양을 했다. 배양된 세포를 48시간 간격으로 신선 배지로 교환하였다. 5 mmol/L의 포도당과 0.5% 혈청을 함유한 Earles salts를 포함된 MEM (minimum essential medium)에서 18시간 배양하여 myotube로 분화시켰다.

4. Adenovirus-UCP3의 transfection

C2C12 골격근 세포를 혈청이 포함되지 않은 배지에서 adenovirus-UCP3 3×10^6 pfu/cm^{2}와 같이 1시간 동안 배양한 후 2% 혈청이 포함된 MEM 배지로 바꿔 24시간동안 배양하였고 4일간 유지한 후 UCP3 과발현 C2C12 골격근 세포를 만들어 (UCP3-C2C12 세포) 실험에 사용하였다.

5. 혈장의 포도당과 인슐린 농도의 측정

OLETF 백서의 혈장 포도당 농도는 포도당 산화법 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA)으로 측정하였고 혈장 인슐린 농도는 Linco사 (Linco Research Inc., St. Charles, MO)의 kit를 이용하여 방사면역측정법 (radioimmunoassay)으로 측정을 하였다.

6. 포도당 수송의 측정

C2C12 골격근 세포와 UCP3-C2C12 골격근 세포를 기저상태에서 또는 인슐린, wortmannin 등과 같이 1시간 배양하였고 실온에서 0.5 μmol/L 2-deoxy-[H^3]D-glucose (2DG; 0.5 μCi/mL)에 10분간 노출시켰다. 세포를 0.05N NaOH에 녹여서 방사성 활동도로 포도당 수송을 측정하였다.

7. 당원합성의 측정

C2C12 골격근 세포와 UCP3-C2C12 골격근 세포

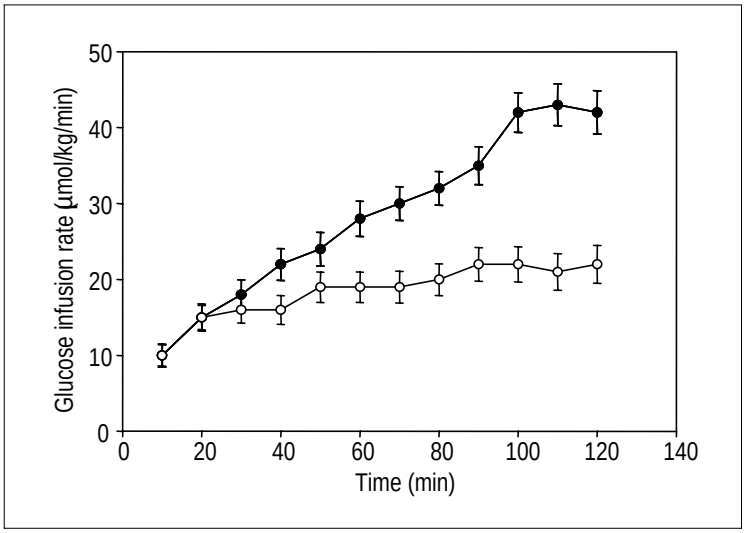

Fig. 2. When euglycemic hyperinsulinemic clamp was done to control (open circle) and UCP3 group (closed circle), the insulin sensitivity was siginificantly higher in UCP3 group. *: $p<0.05$ vs control

를 기저상태에서 또는 인슐린, wortmannin 등과 같이 1시간 배양 5 mmol/L glucose와 0.5 μCi of D-[U-^{14}C] glucose가 포함된 MEM 배지에서 90분간 반응시켰다. 100 μL의 30% KOH가 첨가된 용액에서 세포를 세척 후 녹인 후 95% 알코올로 침전시켜 방사성 활동도를 확인하였다.

8. 통계적 분석

통계 분석은 SPSS 프로그램 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) computer program을 사용하였고 결과는 평균 표준오차로 나타내었다. 두 군의 평균의 비교는 Mann-Whitney test를 시행하였고 세 군의 평균의 비교는 Kruskal-Wallis test를 통해 비교 분석하였다. 통계적 유의성은 $p<0.05$로 정의하였다.

결 과

1. OLETF 백서에서 UCP3 과발현에 의한 인슐린 감수성의 변화

대조군과 같이 먹이섭취 제한을 한 UCP3군에서 대조군에 비해 체중이 통계적으로 유의하게 감소되었다 (Fig. 1). Euglycemic hyperinsulinemic glucose clamp를 시행하였을 때 UCP3 과발현 OLETF 백서에서 대조군에 비해 인슐린 감수성이 유의하게 증가하였다 (Fig. 2). UCP3 과발현 OLETF 백서에서 혈중 포도당 농도는 8.43±0.88 mmol/L였고 대조군의 혈중 포도당 농도는 12.54±1.86 mmol/L로 대조군의 포도당 농도가 통계적으로 유의하게 높았다 ($p<0.05$). UCP3 과발현 OLETF 백서의 혈중 인슐린 농도는 85.12±17.62 pmol/L로 대조군의 인슐린 농도 (116.61±8.62 pmol/L) 보다 낮았으나 통계적으로 유의하지 않았다.

2. C2C12 골격근 세포에서 UCP3 과발현에 의한 포도당 수송과 당원합성의 변화

C2C12세포에서 기저상태 포도당 수송은 1.28±0.17 μmol/L/min였고 100 nM 인슐린으로 2시간 처리한 후 2.67±0.20 μmol/L/min로 증가하였다. UCP3-C2C12세포에서는 기저상태 포도당 수송이 3.89±0.13 μmol/L/min로 증가되었고 인슐린 처리후에도 5.74±0.44 μmol/L/min로 증가하였다. 인슐린을 처리한 UCP3-C2C12 세포에 phosphoinositide 3-kinase (PI3K) 억제제인 wortmannin을 첨가하였을 때 포도당 수송활성이

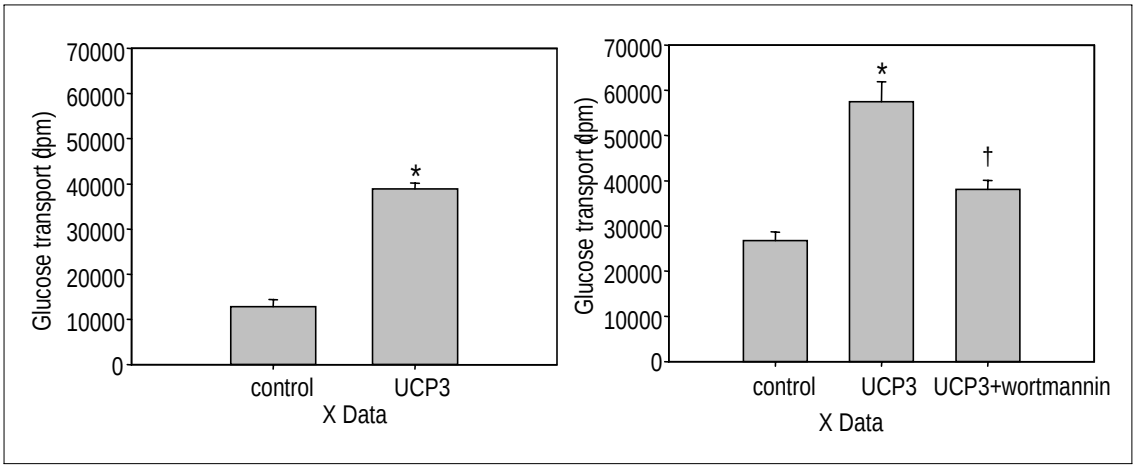

Fig. 3. The glucose transport was increased in UCP3-overexpressed C2C12 skeletal muscle cells at basal state (upper panel). After insulin treatment (lower panel), the glucose transport was also increased in UCP3-overexpressed C2C12 skeletal muscle cells. The increment was diminished after treatment of wortmannin.
*: $p<0.05$ compared to control. †: $p<0.05$ compared to UCP3

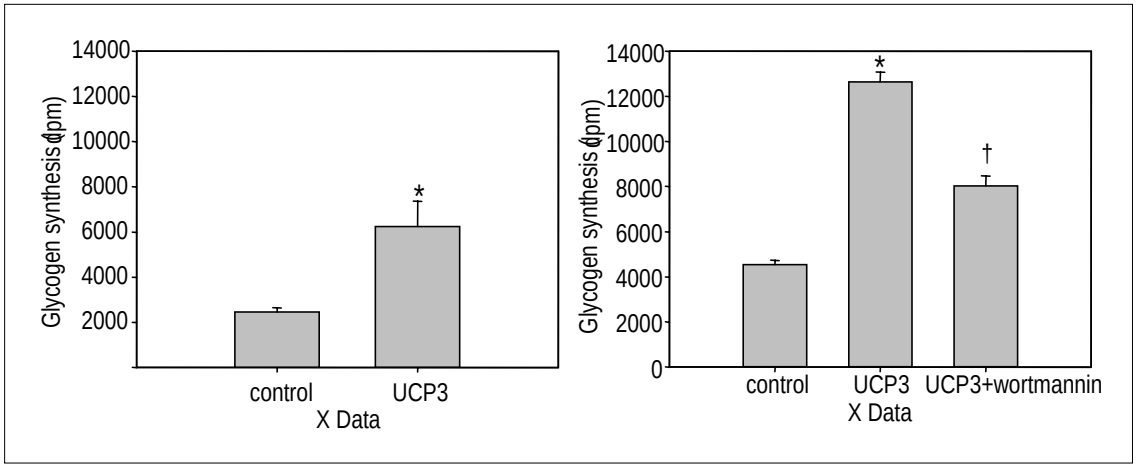

Fig. 4. The glycogen synthesis was increased in UCP3-overexpressed C2C12 skeletal muscle cells at basal state (upper panel). After insulin treatment (lower panel), the glycogen synthesis was also increased in UCP3-overexpressed C2C12 skeletal muscle cells. The increment was diminished after treatment of wortmannin.
*: $p<0.05$ compared to control. †: $p<0.05$ compared to UCP3

3.81±0.20 μmol/L/min로 감소하였다 (Fig. 3).

기저상태 당원합성은 C2C12 세포에서 0.25±0.01 μmol/L/min였고 인슐린 처리 후 0.45±0.01 μmol/L/min로 증가하였다. UCP3-C2C12 세포에서는 기저상태 당원합성이 0.62±0.01 μmol/L/min로 증가되었고 인슐린 처리후에도 1.26±454 μmol/L/min로 증가하였다. UCP3-C2C12 세포에 wortmannin을 첨가하였을 때 UCP3-C2C12 세포에서 당원합성률이 0.80±0.04 μmol/L/min로 감소하였다 (Fig. 4).

고 찰

본 연구의 결과 UCP3의 골격근 세포내 과발현이 OLETF 백서에서 인슐린저항성을 호전시키고 배양된 골격근 세포에서 포도당 수송 및 당원합성을 증가시킴을 알 수 있었다. UCP3에 의한 포도당 수송 및 당원합성의 증가는 wortmannin에 의해 억제되어 PI3K에 의존적임을 보여주었는데 이와 같은 결과는 Huppertz 등의 포도당 수송에 대한 최근의 연구와 일치하는 것이다[7]. 본 연구에서는 이에 덧붙여 UCP3가 배양된 골격근 세포에서 당원합성을 증가시키고 OLETF 백서에서 인슐린 감수성을 증가시킴을 관찰하였는데 이와 같은 연구결과는 아직까지 보고된 바 없다.

본 연구에서 UCP3에 의한 포도당 수송 및 당원합성의 증가가 wortmannin에 의해 억제되었는데 이는 UCP3가 PI3K 인슐린 신호전달체계를 활성화시킴을 보여주는 소견이다. PI3K는 85kDa의 조절인자와 110 kDa의 분해인자 (catalytic subunit)로 구성된 단백질로 인슐린 자극 시 tyrosine 인산화가 된 IRS (Insulin receptor substrate) 단백질과 결합하여 인슐린 신호전달체계를 활성화시킨다[8]. PI3K가 IRS와 결합되어 활성화되면 PKB/Akt를 활성화시켜 GLUT4의 translocation을 통해 포도당 수송을 증가시키는 한편, GSK3를 억제하여 당원합성을 촉진한다[9]. UCP3가 어떤 기전으로 PI3K를 활성화시킬지는 앞으로 연구되어야 할 과제이나 UCP3에 의한 당대사의 호전에 대해서는 다음의 몇 가지 가능성을 생각할 수 있다.

첫번째로 UCP3에 의한 미토콘드리아 전위차의 해소가 이차적으로 지방산 대사를 촉진하여[10] 세포내 long chain acyl CoA (LCAC)와 ceramide와 같은 지방대사산물의 감소를 유발하여 포도당 수송 및 당원합성을 증가시켰을 가능성을 생각할 수 있다. 체내 및 세포내 지방산의 증가는 인슐린저항성의 중요한 원인중의 하나로 생각되고 있고 이중 특히 LCAC의 역할에 대해 많은 연구가 있었다[11]. 세포내 지방산 유입의 증가에 의해 축적된 세포내 LCAC는 포도당 대사에 중요한 역할을 하는 glycogen synthase나 hexokinase의 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다[12,13]. 한편, LCAC는 세포내 중성지방이나 diacylglycerol (DAG)의 생성을 증가시켜 PKC θ를 활성화 시키며[13] PKC θ는 인슐린 수용체와 PKB/Akt와 같은 인슐린 신호전달체계를 억제할 수 있다[14,15]. Ceramide는 sphingomyelin이 sphingomyelinase에 분해되어 생성되는 lipid second messenger로 지방산으로부터 직접 생산되기도 하는데[16] 최근의 연구에서 PKB/Akt와 같은 인슐린 신호전달체계를 억제함으로써 지방산에 의한 인슐린저항성을 유발하는 주물질로 지목된 바 있다[17]. UCP3에 의해 지방산의 산화가 증가되면 세포내 LCAC 및 ceramide가 감소하게 될 것이고, 이에 따라 인슐린 신호전달체계가 활성화할 가능성이 있는데 이에 대해서는 앞으로 더 연구가 필요할 것으로 생각된다.

두번째로 UCP3의 증가가 세포내 반응성 산소기 (ROS)를 감소시킴으로써 당대사를 활성화 시켰을 가능성을 생각할 수 있겠다. 체내에서 생성되는 대부분의 ROS는 미토콘드리아에서 전자전달체계를 거친 전자가 O_2와 반응하여 H_2O가 되는 과정에서 만들어지는데 정상적으로 약 1 ~ 5%의 산소만이 H_2O가 되지 못하고 O_2^-이 된다. 전자전달체계가 어떤 이유에서든지 원활히 활동을 하지 못하는 경우에는 semiquinone 같은 물질이 축적되면서 O_2^- 생산이 증가하며 동시에 intermembrane space에 농축된 H^+ ion ($\triangle\mu H^+$)도 증가하게 된다. UCP3가 proton leak를 통해 이러한 $\triangle\mu H^+$를 줄이게 되면 결국 전자전달계에서의 전자의 흐름을 원활히 하여 ROS의 생성이 감소하게 될 것으로 생각된다[18]. 국내에서도 김 등은 UCP3를 골격근 세포에 transfection 시켰을 때 ROS의 생성이 감소됨을 보고하였고[19], 본 교실에서도 배양된 혈관내피세포에 UCP2를 transfection 시켰을 때 ROS의 생산이 감소함을 관찰한 바 있다[20]. 또한 세포내 산화스트레스는 인슐린 자극에 의한 IRS-1과 PI3K의 세포내 분획을 변화시켜 인슐린저항성을 유발한다는 보고가 있고[21], 이외에도 산화스트레스가 인슐린 신호전달체계를 억제하는 serine/threonine kinase를 증가시킨다는 보고도 있다[22].

한편 UCP3의 증가가 세포내 ATP를 고갈시킴으로써 5 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 활성화시키고 이에 의해 포도당 수송이 증가할 가능성을 생각할 수 있겠다. AMPK는 세포내 연료의 증감에 민감하게

반응하는 단백질로 AMP/ATP의 비율에 영향을 받는데 주로 스트레스나 근육 수축, 저산소증 등과 같은 ATP를 많이 소모하는 상황에서 PI3K와는 독립적인 경로로 포도당 수송을 증가시킨다[23]. 그러나 실제 배양된 골격근 세포에 AMPK 자극제인 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR)를 처리했을 때 당원분해가 증가된다는 보고가 있고[24] 본 교실에서도 배양된 골격근 세포에 AICAR를 처리하였을 때 당원합성이 감소됨을 관찰하여 (미발표자료) UCP3에 의한 당원합성의 증가는 이와는 다른 기전에 의할 것으로 생각된다.

OLETF 백서를 대상으로 한 생체내 실험에서 UCP3를 OLETF 백서의 골격근에 과발현 시켰을 경우 인슐린저항성이 호전되었는데 이는 세포배양실험에서 증명된 인슐린 감수성의 증가가 생체내에서도 적용이 됨을 직접적으로 증명한 것이다. UCP3가 과발현된 OLETF 백서에서 대조군에 비해 먹이섭취가 증가하였는데 먹이 섭취를 대조군과 같은 양으로 제한을 하였을 때 유의한 체중이 감소함을 관찰하였고 인슐린 감수성이 호전되었다. 결과에 제시되지는 않았으나 먹이양을 대조군과 같이 제한하지 않았을 경우에는 UCP3 과발현군에서 오히려 체중의 증가가 있어 최근에 보고된 UCP3 과발현 형질전환 생쥐에서의 먹이섭취가 증가하였지만 체중은 감소하였다는 결과와는[2] 다소 차이를 보이고 있다. 이는 아마도 UCP3 과발현 형질전환 생쥐에서 골격근에 발현되는 UCP3의 양에 비해 본 연구에서 외부에서 투여한 UCP3의 양이 상대적으로 적었기 때문일 것으로 추정된다.

본 연구의 제한점으로는 adenovirus-UCP3를 OLETF 백서의 골격근에 주사한 후 UCP3의 과발현의 정도를 확인하지 않았다는 점과 C2C12 골격근와 adenovirus-UCP3를 같이 배양하였을 때 transfection의 적절성을 확인하지 않았다는 점이다. 그러므로 향후 OLETF 백서의 골격근에서 adenovirus-UCP3를 주사 후 UCP3 mRNA 발현 정도와 C2C12 세포에서 β-galactosidase (β-gal)를 함유하는 adenovirus와 배양 후 -gal 염색을 하거나 공초점 현미경 (confocal microscope)을 이용하여 transfection의 적절성을 확인하는 실험이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과로 골격근 세포에 UCP3 과발현을 시켰을 때 포도당 수송 및 당원합성이 증가됨으로써 인슐린 감수성이 호전됨을 관찰하였다. 한편, PI3K 억제제를 처리했을 때 UCP3에 의한 포도당 수송 및 당원생성의 증가가 상쇄되는 것으로 보아 UCP3에 의한 효과는 인슐린 신호전달체계 중 PI3K에 일부 의존함을 알 수 있었다. 결론적으로 본 연구의 결과는 UCP3가 향후 인슐린 감수성을 촉진시키는 새로운 치료제로 사용될 가능성을 시사하고 있다. 그러나 아직 UCP3가 어떤 기전에 의해 인슐린 신호전달체계를 활성화하는지는 밝혀져 있지 않은 상태로 앞으로 이에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

연구배경: Uncoupling protein (UCP)는 미토콘드리아의 내막에 위치하는 단백질로 세포내의 과다한 에너지를 열로 발산시키는 기능을 가진다. 최근 동물의 갈색지방조직에만 존재하는 UCP와 유사성을 가진 아형들 (UCP2,3)이 사람에게도 존재함이 알려져 큰 관심을 끌고 있는데 이중 UCP3는 그 발현이 골격근세포와 갈색지방조직에만 국한된다. 본 연구에서는 UCP3가 체내 인슐린 감수성을 결정하는데 가장 중요한 조직인 골격근에 국한되어 발현되는 점에 착안하여 UCP3를 골격근세포에 과발현시켰을 때 포도당 대사에 어떠한 영향이 나타나는 지를 조사하였다.

방법: 25주령의 8마리의 OLETF 백서를 대상으로 하여 4마리는 골격근에 adenovirus 2 mL (1×10^{12} pfu/mL)를 주사하여 대조군으로 하였고 4마리는 골격근에 재조합법으로 제작된 adenovirus-UCP3 2 mL (1×10^{12} pfu/mL)를 주사하였다 (UCP3 과발현군). UCP3를 투여한 백서에서 먹이섭취가 증가하는 경향이 있어 그 전날 대조군이 먹은 양의 먹이만큼 투여하였다. 골격근에 adenovirus를 주사한 10일 후에 euglycemic hyperinsulinemic clamp를 시행하였다. Adenovirus-UCP3를 C2C12 골격근 세포에 transfection시켜 UCP3-C2C12를 만들고 C2C12 골격근 세포와 UCP3-C2C12 골격근 세포에서 포도당 수송 및 당원합성을 측정하였다.

결과: UCP3 과발현 OLETF에서 체중이 감소하는 경향을 보였고 인슐린 감수성이 증가하였다. C2C12세포에서 기저상태 포도당 수송은 1.28±0.17 μmol/L/min였고 100 nM 인슐린으로 2시간 처리한 후 2.67±0.20 μmol/L/min로 증가하였다. UCP3-C2C12 세포에서는 기저상태 포도당 수송이 3.89±0.13 μmol/L/min로 증가되었고 인슐린 처리 후 5.74±0.44 μmol/L/min로 증가하였다. 인슐린을 처리한 UCP3-C2C12 세포에 PI3K 억제제인 wortmannin을 첨가하였을 때 포도당 수송활성이 3.81±0.20 μmol/L/min로 감소하였다. 기저상태 당원합성은 C2C12 세포에서 0.25±0.01 μmol/L/min였고 인슐린 처리 후 0.45±0.01 mol/L/min로 증가하였다. UCP3-C2C12 세포에서는 기저상태 당원합성이 0.62±0.01 μmol/L/min였고 인슐린 처리 후 1.26±454 μmol/L/min로 증가하였다. UCP3-C2C12 세포에 wortmannin을 첨가하였을 때 당원합성율이 0.80±0.04 μmol/L/min로 감소하였다.

결론: UCP3 과발현이 OLETF 백서에서 인슐린 감수성을 증가시켰고 골격근세포에서 포도당 수송 및 당원합성을 증가시켰다. Wortmannin을 첨가하였을 때 포도당 수송 및 당원합성이 감소함으로 보아 이 과정이 인슐린 신호전달체계인 PI3K에 일부 의존함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Antonio J, Vidal-Puig Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB: *Energy Metabolism in Uncoupling Protein 3 Gene Knockout Mice. J Biol Chem 275:16258-16266, 2000*
2. Clapham JC, Arch JRS, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GBT, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Heruty N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Haroer AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD, Abuin A: *Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. Nature 406:415-418, 2000*
3. Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW, Seeley RJ, Cummings DE, Havel PJ, Kuijper JL, BeltrandelRio H: *Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting. Diabetes 47:298-302, 1998*
4. Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M, Langin D: *Increased Uncoupling Protein-2 and -3 mRNA Expression during Fasting in Obese and Lean Humans. J Clin Invest 100:2665-2670, 1997*
5. Boss O, Samec S, Desplanches D, Mayet MH, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP: *Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. FASEB J 12:335-339, 1998*
6. Park JY, Kim CH, Hong SK, Suh KI, Lee KU: *Effects of FFA on insulin-stimulated glucose fluxes muscle glycogen synthase activity inrats. Am J physiology. 275 (2 pt 1):E338-344, 1998*
7. Huppertz C, Fischer BM, Kim YB, Kotani K, Vidal-Puig A, Slieker LJ, Sloop KW, Lowell BB, Kahn BB: *Uncoupling Protein 3 (UCP3) Stimulates Glucose Uptake in Muscle Cells through a phosphoinositide 3 Kinase-dependent Mechanism. J Biol Chem 276:12520-12529, 2001*
8. Alessi DR, Downes CP: *The role of PI 3-kinase in insulin action. Biochim Biophys Acta 8:151-164, 1998*
9. Kido Y, Nakae J, Accili D: *The Insulin Receptor and Its Cellular Targets. J Clin Endocrinol Metab 86:972-979, 2001*
10. Boss O, Hagen T, Lowell BB: *Uncoupling proteins 2 and 3: potential regulators of mitochondrial energy metabolism. Diabetes 49:143-156, 2000*
11. Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm

DJ, Kraegen EW: *Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. Diabetes 46:1768-1774, 1997*

12. Wirirsuwannakul D, Kim KH: *Mechanism of palmityl coenzyme A inhibition of liver glycogen synthase. J Biol Chem 252:7812-7817, 1977*
13. Thompson AL, Cooney GJ: *Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance. Diabetes 49:1761-1765, 2000*
14. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI: *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. Diabetes 48:1270-1274, 1999*
15. Barthel A, Nakatani K, Dandekar AA, Roth RA: *Protein Kinase C Modulates the Insulin-Stimulated Increase in Akt1 and Akt3 Activity in 3T3-L1 Adipocytes. Biochem Biophys Res Commun 243:509-513, 1998*
16. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, Biden TJ: *Ceramide Generation Is Sufficient to Account for the Inhibition of the Insulin-stimulated PKB Pathway in C2C12 Skeletal Muscle Cells Pretreated with Palmitate. J Biol Chem 274:24202-24210, 1999*
17. Hajduch E, Balendran A, Batty IH, Litherland GJ, Blair AS, Downes CP, Hundal HS: *Ceramide impairs the insulin-dependent membrane recruitment of Protein Kinase B leading to a loss in downstream signalling in L6 skeletal muscle cells. Diabetologia 44:173-183, 2001*
18. Skulachev VP: *Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. Biochim Biophysics Acta 1363:100-124, 1998*
19. 김민선, 조영민, 박경수, 한창엽, 전현정, 박규상, 홍혜경, 김성연, 조보연, 김영미, 이홍규: 골격근세포에서 고지방 처리에 의하여 유도한 유리산소기 *(ROS)* 생성에 대한 *Uncoupling protein-3*와 *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Gamma*의 차단 효과. 당뇨병 *25(Suppl. 3):160, 2001*
20. 김하영, 박중열, 박기영, 박혜선, 홍성관, 김영범, 이재담, 강호경, 이인규, 이기업: 배양한 혈관내피세포에서 *UCP-2* 유전자 과발현이 *endothelin-1* 발현에 미치는 영향. 당뇨병 *25(Suppl. 3):182, 2001*
21. Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A: *Oxidative Stress Disrupts Insulin-induced Cellular Redistribution of Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in 3T3-L1 Adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and LUT4 translocation. J Biol Chem 274:10595-10602, 1999*
22. Abe MK, Karpova AY, Li J, Lup WL, Herhenson MB: *Hydrogen peroxide activates extracellular signal-regulated kinase via protein kinase C, Raf-1, and MEK1. Am J Respir Cell Mol Biol 18:562-569, 1998*
23. Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ: *Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. Diabetes 49:527-531, 2000*
24. Russell RR, III, Bergeron R, Shulman GI, Young LH: *Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. Am J Physiol Heart Circ Physiol 277:H643-H649, 1999*