



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

당뇨병환자에서 혼합식이 섭취 후
글루카곤 반응을 결정하는
인자에 대한 연구

제주대학교 대학원

의학과

김 동 규

2021년 2월

당뇨병환자에서 혼합식이 섭취 후 글루카곤
반응을 결정하는 인자에 대한 연구

지도교수 고관표

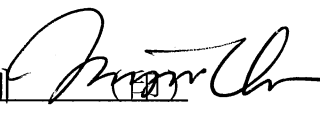
김동규


이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

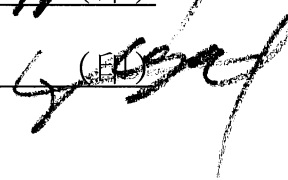
2020년 10월

김동규의 의학석사 학위논문을 인준함.

2020년 10월

심사 위원장 _____ 조문제 

위 원 _____ 김진석 

위 원 _____ 고관표 

제주대학교 대학원

2020년 10월

Factors determining glucagon response to mixed meal
ingestion in diabetic patients

Dong-Kyu Kim


(Supervised by professor Gwanpyo Koh)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master in medicine (Department of Internal Medicine)


October, 2020

This thesis has been examined and approved.

Doctoral committee:

Professor Moonjae Cho  Chairman

Professor Jinsoek Kim 

Professor Gwanpyo Koh 

Department of Internal Medicine

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

제 목

당뇨병환자에서 혼합식이 섭취 후 글루카곤 반응을 결정하는 인자에 대한 연구

Factors determining glucagon response to mixed meal ingestion in diabetic patients

ABSTRACT

Aim: Glucagon secretion is suppressed by glucagon-like peptide 1 (GLP-1) but stimulated by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), both of which are incretins. Unlike healthy individuals, diabetes patients show an inappropriate postprandial response in terms of failure to achieve suppression of glucagon secretion. However, the underlying mechanism is still not clearly understood. Therefore, we aimed to investigate the changes in glucagon levels in diabetes people after the ingestion of a standard mixed meal and the correlations of variation in glucagon levels with GLP-1, GIP, and various clinico-biochemical characteristics.

Methods: Glucose, C-peptide, glucagon, intact GLP-1 (iGLP-1), and intact GIP (iGIP) were measured in blood samples collected from 317 diabetes patients at two time points: before and 30 minutes after the ingestion of a standard mixed meal (480 kcal, 60% carbohydrate, 20% protein, and 20% fat) in the fasting state. The difference between the 30-min postprandial value and the basal value was expressed as Δ (30-min minus basal).

Results: At 30 minutes after meal ingestion, the glucagon level showed no difference relative to the basal value, whereas glucose, C-peptide, iGLP-1, and iGIP levels showed a significant increase. In univariate analysis, Δ glucagon showed not only a strong correlation with hemoglobin A1c (HbA1c; $r=0.389$) but also a significant correlation with fasting glucose ($r=0.198$), Δ glucose ($r=-0.269$), and estimated glomerular filtration rate ($r=-0.140$). However, Δ glucagon showed no significant correlations with Δ iGLP-1 and Δ iGIP. In the hierarchical multiple regression analysis for excluding the confounding effects of various factors, HbA1c ($\beta=0.327$, $p<0.001$) was the only variable that continued to show the most significant correlation with Δ glucagon.

Conclusions: Diabetes people showed no suppression of glucagon secretion after the ingestion of a mixed meal. The margin of increase in the glucagon level showed a significant positive correlation with HbA1c but no correlation with changes in iGLP-1 and GIP levels. In other words, diabetes people with poorer glycemic control may show greater increase in postprandial glucagon level, and this does not appear to be mediated by incretin.

Keywords: Diabetes mellitus, Glucagon, Glucagon-like peptide 1, Glucose-dependent insulinotropic polypeptide

초 록

글루카곤 (glucagon) 분비는 glucagon-like peptide 1 (GLP-1)에 의해 억제되고 glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)에 의해 자극되는 것으로 알려져 있다. 당뇨병환자는 경구섭취 시 정상인과 달리 글루카곤이 억제되지 않는 부적절한 반응을 보이며, 이에 대한 의미나 기전은 아직 잘 모르고 있다. 이에 우리는 당뇨병환자에서 표준혼합식이 섭취 후 글루카곤의 변화와 GLP-1, GIP 그리고 여러 임상 및 생화학적 특징들의 관계를 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

317명의 당뇨병환자를 대상으로 공복상태에서 표준혼합식이 (480 kcal, 60% 탄수화물, 20% 단백질, 20% 지방) 섭취 전과 30분 후 채혈하여 포도당, C-peptide, 글루카곤, GLP-1 완전체 (intact GLP-1, iGLP-1)와 GIP 완전체 (intact GIP, iGIP)를 측정하였다. 30분 후 수치와 기저치의 차이는 Δ (30분 후 수치에서 기저치를 뺀 값)로 표시하였다.

혼합식 섭취 30분 후 글루카곤은 기저치와 비교하여 차이가 없었으나, 혈당, C-peptide, iGLP-1, iGIP은 유의하게 증가하였다. 단변량분석 (univariate analysis)에서 Δ glucagon은 당화혈색소 ($r=0.389$)와 가장 높은 유의한 상관을 보였으며, 공복혈당 ($r=0.198$), Δ glucose ($r=-0.269$), eGFR ($r=-0.140$)과도 유의한 상관을 보였다. 그러나 Δ iGLP-1, Δ iGIP과는 유의한 상관이 없었다. 또한 여성과 인슐린 투여군에서 Δ glucagon이 유의하게 컸고, 설폰요소제와 메트포민 투여군에서는 유의하게 작았다. 여러 인자들의 교란효과 (confounding effect)를 배제하기 위한 계통다중회귀분석 (hierarchical multiple regression analysis)에서 당화혈색소 ($\beta=0.327$, $p<0.001$)는 여전히 Δ glucagon과 가장 관련이 많은 변수로 나타났다.

결론적으로 당뇨병환자에서 혼합식 섭취 후 글루카곤은 억제되지 않았으며, 글루카곤

증가폭은 당화혈색소와 유의한 양의 상관을 보였고 iGLP-1 & GIP 변화와는 관련이 없었다. 즉 당뇨병환자의 혈당조절이 불량할 수록 경구섭취 후 글루카곤치가 증가될 수 있으며, 이는 인크레틴에 의해 매개되는 것이 아닌 것으로 보인다.

Keywords: Diabetes mellitus, Glucagon, Glucagon-like peptide 1, Glucose-dependent insulinotropic polypeptide

서 론

글루카곤 (glucagon)은 췌장 랑게르한스섬 (islet of Langerhans)의 α -세포에서 분비되며, β -세포의 인슐린 (insulin)과 더불어 포도당 항상성을 유지하는 중요한 역할을 한다. 고혈당에서는 인슐린 분비가 증가하고 글루카곤 분비는 억제되며, 저혈당에서는 인슐린 분비가 중단되고 글루카곤은 증가되어 간에서의 당생산을 증가시킨다. 이런 두 호르몬의 정반대 작용을 통해 혈당치는 정상을 유지하게 된다 [1]. 글루카곤은 1921년 처음으로 동물의 췌장추출물에서 발견되었고 혈당을 올리는 효과가 있다고 알려졌지만, 당뇨병 치료효과가 있는 인슐린과 달리 별다른 주목을 받지 못했었다 [2]. 그러나 1973년 Unger와 Orci가 당뇨병의 병인에서 글루카곤 과잉은 인슐린 부족만큼이나 중요하다는 bihormonal-abnormality hypothesis를 주장하였으며 [3, 4], 이후로 글루카곤 연구가 활성화되었다.

건강한 성인은 음식섭취 후 인슐린 분비가 증가하고 글루카곤 분비는 억제되나, 당뇨병환자는 음식섭취 후 글루카곤이 억제되지 않는다 [5, 6]. Knop 등 [7]은 정상인은 경구당부하검사 (oral glucose tolerance test, OGTT)와 isoglycaemic intravenous glucose infusion (IIGI)에서 공히 글루카곤이 억제되었으나, 제2형당뇨병 환자의 경우 OGTT에서는 glucagon이 억제되지 않았고 IIGI에서만 억제되었다고 발표하였다. Mitrakou 등 [8] 과 Oh 등 [9]의 연구에서도 제2형당뇨병 환자는 정상인과 달리 OGTT에서 글루카곤의 부적절한 반응 (inappropriate suppression)이 관찰되었다 (Fig. 1). 혼합식부하검사 (mixed meal tolerance test, MMTT)는 인슐린이나 글루카곤의 동적반응을 평가하는데 있어 OGTT보다 생리적인 검사로 알려져 있다. 당뇨병환자에서 혼합식 섭취 시 혈중 글루카곤은 정상인보다

유의하게 증가되며, 섭취 30분 후 정점에 도달한다 [10, 11]. 이렇듯 경구섭취에서만 나타나는 글루카곤이 억제되지 않는 현상은 제2형당뇨병 뿐만 아니라 제1형당뇨병 [12], 만성췌장염 [13] 또는 췌장절제술 [14]에 의한 이차성당뇨병, 그리고 maturity-onset diabetes of the young (MODY) [15]등 거의 모든 종류의 당뇨병에서 나타난다 [16] 당뇨병환자의 경구섭취 후 글루카곤의 부적절한 반응을 설명하는 기전으로 인슐린 또는 포도당에 대한 α -세포의 저항성 [16], 인슐린분비능 감소 [17], 그리고 랑게르한스섬에서 α - β -세포 비율의 증가 [10, 18], 그리고 장에서 분비되는 글루카곤 (gut-origin glucagon) [19] 등이 있으나 아직 잘 모르는 상태이다.

인크레틴 (incretin)은 음식 섭취했을 때 장내분비 (enteroendocrine) 세포에서 분비되는 호르몬으로 췌장 β -세포를 자극하여 인슐린 분비를 증가시킴으로써 식후혈당의 증가를 방지한다. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)과 glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)는 대표적인 인크레틴으로 각각 회장 (ileum)의 L-세포와 십이지장과 공장 (jejunum)의 K-세포에서 분비된다 [20]. GLP-1과 GIP은 인슐린과 글루카곤 분비에 미치는 영향이 서로 다르다. GLP-1은 인슐린 분비를 자극하지만 글루카곤 분비를 억제하며 [21], GIP는 인슐린과 글루카곤 분비를 모두 자극한다 [22, 23]. 따라서 인크레틴 등의 장기원호르몬 (gut-derived hormone)들이 경구 음식섭취시 나타나는 글루카곤의 모순적 반응 (paradoxical glucagon response)을 매개할 수 있다 [7, 24].

아직까지 당뇨병환자에서 경구섭취시 나타나는 글루카곤의 부적절한 반응의 기전은 밝혀져 있지 않으며, 저자가 알기로 많은 수의 환자를 대상으로 표준혼합식 (standard mixed meal) 섭취 후 글루카곤 변화를 분석한 연구는 거의 없다. 이에 연구자들은

300여명의 당뇨병환자를 대상으로 표준혼합식 섭취 후 글루카곤의 변화와 인크레틴을 포함한 임상 및 생화학적 인자들과의 관계를 분석하여 글루카곤의 부적절한 반응을 결정하는 인자를 찾아보고자 하였다.

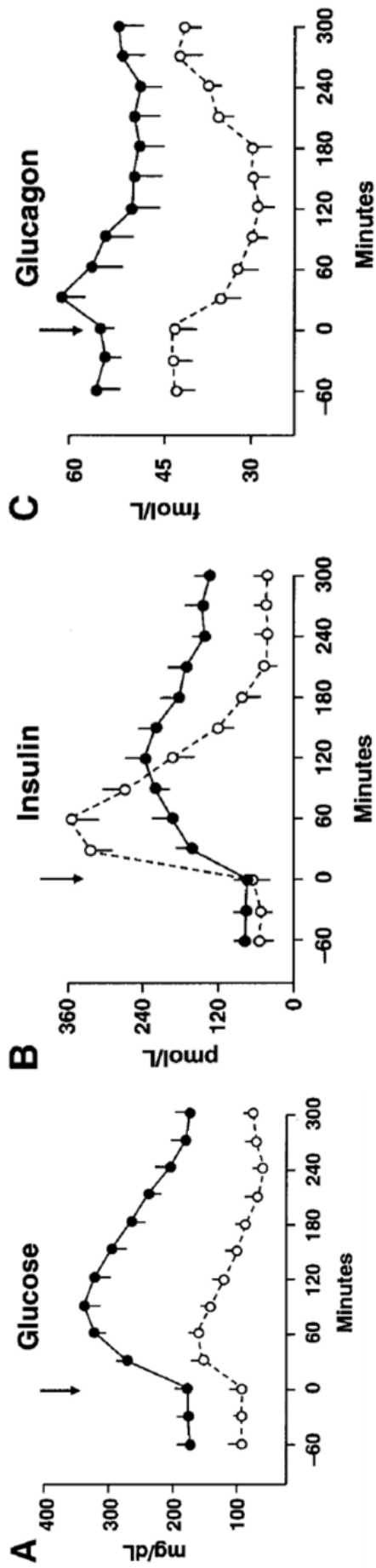


Fig. 1. Profiles of glucose (A), insulin (B), and glucagon (C) after an oral glucose load (\downarrow) in 10 healthy (\circ , dashed line) and 10 type 2 diabetic (\bullet , solid line) subjects. Adapted from Mitrakou et al [8].

대상 및 방법

연구대상

2010부터 2015년까지 제주대학교병원 내분비대사내과에 입원하였던 당뇨병환자를 연구대상으로 하였다. 4기와 5기의 만성콩팥병 (eGFR (estimation of the glomerular filtration rate) <30 mL/min), 복수를 동반한 간경화증, 또는 감염 및 염증질환 환자들은 연구대상에서 제외하였다. 혈중 글루카곤과 인크레틴치에 영향을 주는 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 억제제 또는 GLP-1 수용체 작용제를 복용하는 경우도 제외하였다. 본 연구는 헬싱키선언 (Declaration of Helsinki)을 준수했으며, 제주대학교병원 의학연구윤리심의위원회 (Institutional Review Board (IRB) of Jeju National University Hospital) (IRB File No. JEJUNUH 2020-07-018)의 사전승인을 득했고, 모든 피험자로부터 연구 전 서면동의서를 받았다.

연구방법

밤새 8시간 이상 금식 후 채혈하여 헤파린 처리된 용기와 aprotinin (250 KIU/mL blood; Sigma-Aldrich, St Louis, MO)과 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 억제제 (10 µL/mL blood; Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 함유한 냉각된 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 용기에 보관하였다. 헤파린 처리된 용기의 혈액으로부터 포도당, 당화혈색소, C-peptide, creatinine과 alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였고, 냉각 EDTA 용기의 혈액으로부터 공복 intact GLP-1 (iGLP-1), intact GIP (iGIP)와 글루카곤을 측정하였다. 그리고 나서 피험자에게 밥, 국, 세가지 반찬과 김치로 구성된 표준혼합식을 공급하였다. 모든 피험자에게 공급된 혼합식의 열량 (480 kcal)과 다량영양소 (macronutrient)의 구성비

(탄수화물: 단백질: 지방 = 2.8:1:1)는 항상 일정하였다. 피험자들은 20분 내 혼합식의 섭취를 완료하였고, 식사 개시 후 30분에 채혈하여 헤파린 처리된 용기와 aprotinin과 DPP-4 억제제를 함유한 냉각 EDTA 용기에 각각 보관하였다. 헤파린 처리 용기와 냉각 EDTA 용기에 담긴 혈액으로부터 식후 30분 포도당과 C-peptide 그리고 식후 30분 iGLP-1, iGIP와 글루카곤을 각각 측정하였다. 혈액이 담긴 EDTA 용기는 iGLP-1, iGIP와 글루카곤 측정 전까지 -20°C 에 보관하였다. 포도당, C-peptide, iGLP-1, iGIP와 글루카곤의 식후 30분과 공복 수치의 차이 (Δ , 30분 후 수치에서 기저치를 뺀 값)는 각각 $\Delta\text{glucose}$, $\Delta\text{C-peptide}$, $\Delta\text{iGLP-1}$, ΔiGIP 와 $\Delta\text{glucagon}$ 으로 표시하였다.

나이, 당뇨병 유병기간, 다른 병력 그리고 당뇨병약제의 투약력은 피험자에게 직접 묻거나 제주대학교병원의 전자의무기록 (electronic medical records)를 이용하여 파악하였다. 키와 몸무게는 전자기계로 측정하였고, 혈압은 10분 이상 안정 후 두 번 측정하여 평균치를 기록하였다. 허리둘레는 다리를 어깨 너비로 벌린 후 중간호흡 상태에서 마지막 늑골과 장골능선 (iliac crest)의 중간 지점에서 지면에 평하게 측정하여 cm 단위로 소수점 한 자리까지 기록하였다.

생화학지표의 측정

혈장 포도당은 glucose oxidase method를 이용한 TBA-200FR chemical analyzer (Toshiba, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 당화혈색소는 ion-exchange high-performance liquid chromatography 방법을 이용한 HLC-723G8 (Tosoh, South San Francisco, CA, USA)로 측정하였으며, 대한진단검사의학회의 질보증 (Korean Association of Quality Assurance for the Clinical Laboratory) 기준에 따라 정기적으로 당화혈색소 표준화작업을 시행하였다. C-peptide는 Modular Analytics E170 electrochemiluminescence immunoassays (Hitachi, Tokyo, Japan)로

측정하였고, creatinine과 ALT는 TBA-200FR chemical analyzer로 측정하였다. eGFR은 the Modification of Diet in Renal Disease equation 방법으로 계산하였다 [25]. iGLP-1 (GLP-1 [7-36] amide, GLP-1 [7-37]) 과 iGIP (GIP [1-42])는 sandwich enzyme immunoassay 원리를 이용한 측정키트 (Code No. 27784와 27201, respectively; Immuno-Biological Laboratories Co. Ltd., Gunma, Japan)를 구입하여 정량하였다. 글루카곤은 sandwich ELISA 방법을 이용한 Glucagon Chemiluminescent 키트 (Cat. No. EZGLU-30K, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)를 구입하여 정량하였다.

통계분석

모든 수치는 평균 \pm 표준편차 또는 백분율로 표기하였다. 식후 30분과 공복 포도당, C-peptide, iGLP-1, iGIP와 글루카곤 수치들의 차이는 Wilcoxon signed-rank test로 검정하였다. 임상 및 생화학 변수 중 연속변수와 Δ glucagon 간 상관성 검정은 Pearson's 상관분석을 이용하였고, 범주에 변수에 따른 Δ glucagon의 차이는 Mann-Whitney *U* test로 분석하였다. 여러 임상 및 생화학 변수들의 Δ glucagon에 대한 단계적 기여도 (stepwise contribution)를 평가하기 위해 계통다중회귀분석 (hierarchical multiple regression analysis)를 시행하였다. Δ glucagon을 종속변수로 하였으며, 독립변수는 각 모델에 따라 달리 하였다. 모델 1은 나이, 성별, 공복혈당과 공복 C-peptide 그리고 Pearson's 상관분석에서 유의한 연관을 보인 인자들을 독립변수로 하였다. 모델 2는 Δ glucose, Δ C-peptide, Δ iGLP-1, Δ iGIP를 추가하였다. 최종적인 모델 3는 투약여부에 따라 Δ glucagon이 유의한 차이를 보인 당뇨병약제들을 포함하였다. Pearson's 상관분석과 계통다중회귀분석 시행에 앞서 비정규분포를 보이는 변수들은 모두 로그치환 (logarithmically transformed)하였다. SPSS 14.0 소프트웨어 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계 분석하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의하다고 판정하였다.

결 과

연구 대상의 임상 및 생화학적 특징과 표준혼합식 섭취 전후 인크레틴과 글루카곤의 변화

대상 환자들의 임상 및 생화학적 특징들은 Table 1에 정리돼 있다. 선정과 제외기준에 근거한 총 317명의 환자가 포함되었다. 그 들의 대부분은 중노년층 (middle- and old-aged)였으며, 남자가 조금 더 많았다. 당뇨병 유병기간은 비교적 긴 편이었고, 혈당조절은 불량한 편이었다. 대상의 약 2/3는 메트포민, 1/2은 설폰요소제 그리고 1/3은 인슐린을 투여 중이었다 (Table 1).

대상 환자들의 표준혼합식 섭취 전후 포도당, C-peptide, iGLP-1, iGIP 그리고 글루카곤 수치들은 Table 2에 정리돼 있다. 포도당, C-peptide, iGLP-1, iGIP 수치들은 혼합식 섭취 30분 후 기저치에 비해 유의하게 증가하였다. 글루카곤치는 혼합식 섭취에 의해 억제되지 않았으며, 30분치는 기저치와 비교하여 차이가 없었다 (Table 2, Fig. 2).

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the study subjects.

Variables	Value
<i>n</i>	317
Age, years	59.6 ± 11.5
Gender, male, <i>n</i> (%)	205 (64.6)
Body mass index, kg/cm ²	25.8 ± 3.7
Waist circumference, cm	90.9 ± 9.0
Systolic BP, mmHg	138.1 ± 17.8
Diastolic BP, mmHg	81.9 ± 10.6
DM duration, years	9.9 ± 8.3
HbA1c, %	8.9 ± 2.2
Glucose, mg/dL	168.1 ± 66.5
C-peptide, ng/mL	2.1 ± 1.5
ALT, U/L	32.2 ± 26.4
Creatinine, mg/dL	1.1 ± 0.7
eGFR, mL/min	67.3 ± 17.3
Antidiabetic regimen	
Sulfonylurea, <i>n</i> (%)	169 (53.3)
Metformin, <i>n</i> (%)	221 (69.7)
Thiazolidinedione, <i>n</i> (%)	18 (5.6)
α-Glucosidase inhibitor, <i>n</i> (%)	18 (5.6)
Insulin, <i>n</i> (%)	100 (31.5)

Data are expressed as mean ± standard deviation or frequencies (%).

BP, blood pressure; DM, diabetes mellitus; iGLP-1, intact glucagon-like peptide 1; iGIP, intact glucose-dependent insulinotropic polypeptide; ALT, alanine aminotransferase; eGFR, estimation of the glomerular filtration rate.

Table 2. Blood levels of glucose, C-peptide, glucagon and intact incretin before and 30 min after ingestion of a standard mixed meal ($n = 317$).

Variables	Fasting levels	30-min Postmeal levels	<i>p</i>
Glucose, mg/dL	168.1 ± 66.5	257.8 ± 71.2	<0.001
C-peptide, ng/mL	2.1 ± 1.5	3.2 ± 2.0	<0.001
Glucagon, pg/mL	84.6 ± 37.3	84.7 ± 48.2	0.909
iGLP-1, pmol/L	5.7 ± 3.7	11.5 ± 9.3	<0.001
iGIP, pmol/L	3.9 ± 3.8	21.8 ± 6.8	<0.001

Data are expressed as mean ± standard deviation.

p values are calculated using Wilcoxon signed-rank test.

iGLP-1, intact glucagon-like peptide 1; iGIP, intact glucose-dependent insulinotropic polypeptide.

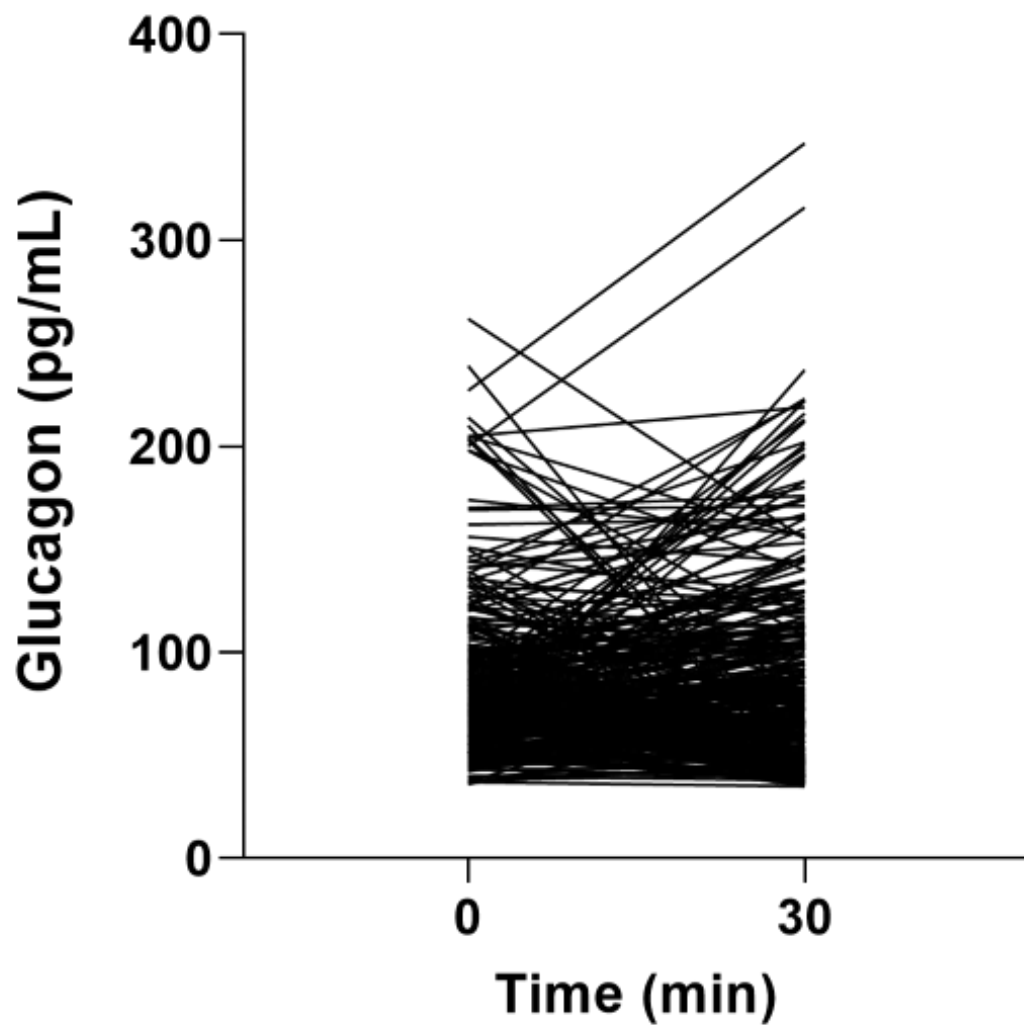


Fig. 2. Changes in glucagon levels after ingestion of a standard mixed meal. *p* values are calculated using the Wilcoxon signed-rank test.

ΔGlucagon과 임상 및 생화학변수들의 단변량분석 (univariate analysis) 결과

경구섭취 후 글루카곤이 억제되지 않는 정도와 임상 및 생화학변수들의 관계를 알아보기 위한 단변량분석으로서 Pearson's 상관분석과 Mann-Whitney *U* test를 시행하였다.

연속형변수를 위한 검정인 Pearson's 상관분석에서 Δglucagon은 당화혈색소 (Fig. 3), 공복혈당 (Fig. 4)과 유의한 양의 상관을 보였고, ΔGlucose (Fig. 5), eGFR (Fig. 6)과 유의한 음의 상관을 보였다 (Table 3). 특히 당화혈색소는 Δglucagon과 가장 높은 상관 ($r=0.389$)을 보였는데 (Fig. 3), 이는 혈당조절이 불량할 수록 음식섭취 후 글루카곤이 억제되지 않고 오히려 증가함을 의미한다. 성별과 복용약제에 따른 혼합식 섭취 후 글루카곤변화의 비교는 Mann-Whitney *U* test를 이용하였다. 남성보다는 여성에서 글루카곤 증가폭이 유의하게 컸다. 설펜요소제와 메트포민을 투여하는 경우 비투여군보다 글루카곤 증가폭이 유의하게 작았으며, 인슐린 투여군은 비투여군보다 유의하게 컸다 (Table 4).

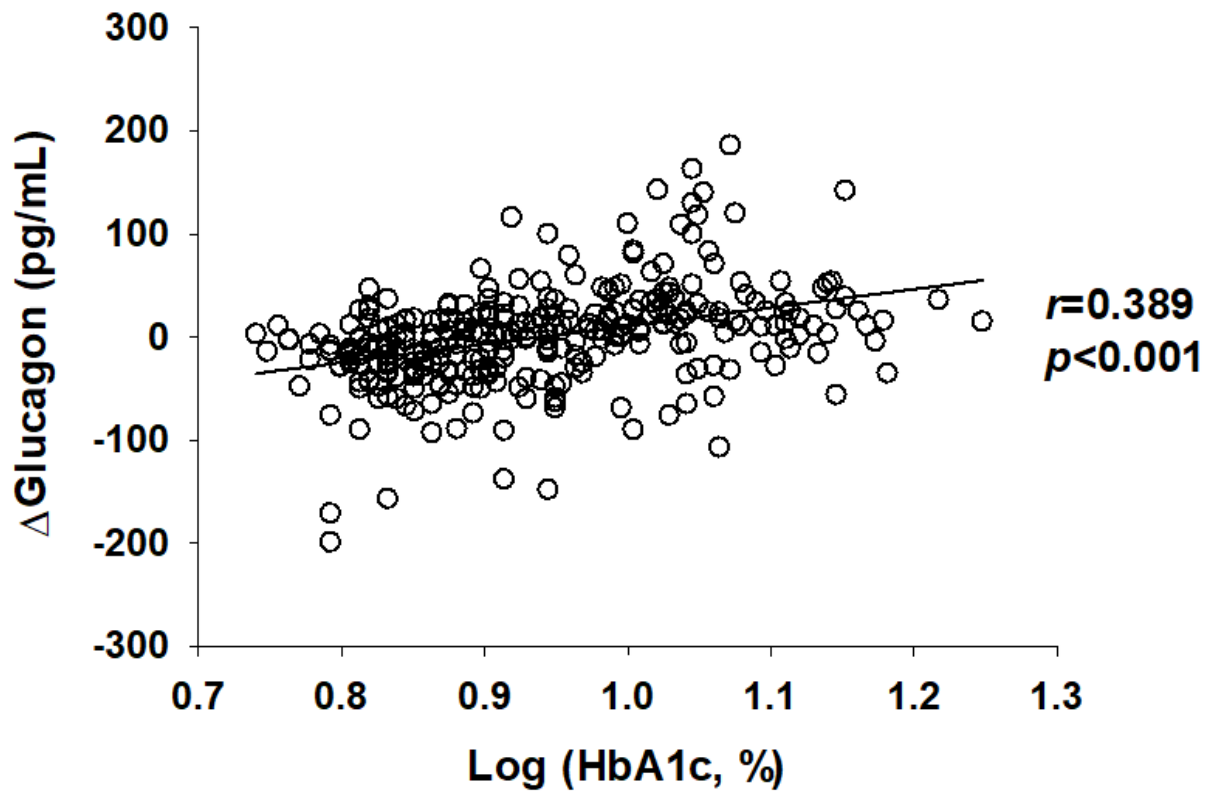


Fig. 3. Correlation between Δ glucagon and HbA1c levels. HbA1c levels were logarithmically transformed. Correlation coefficients and p values are calculated using the Pearson's correlation analysis. r , correlation coefficient.

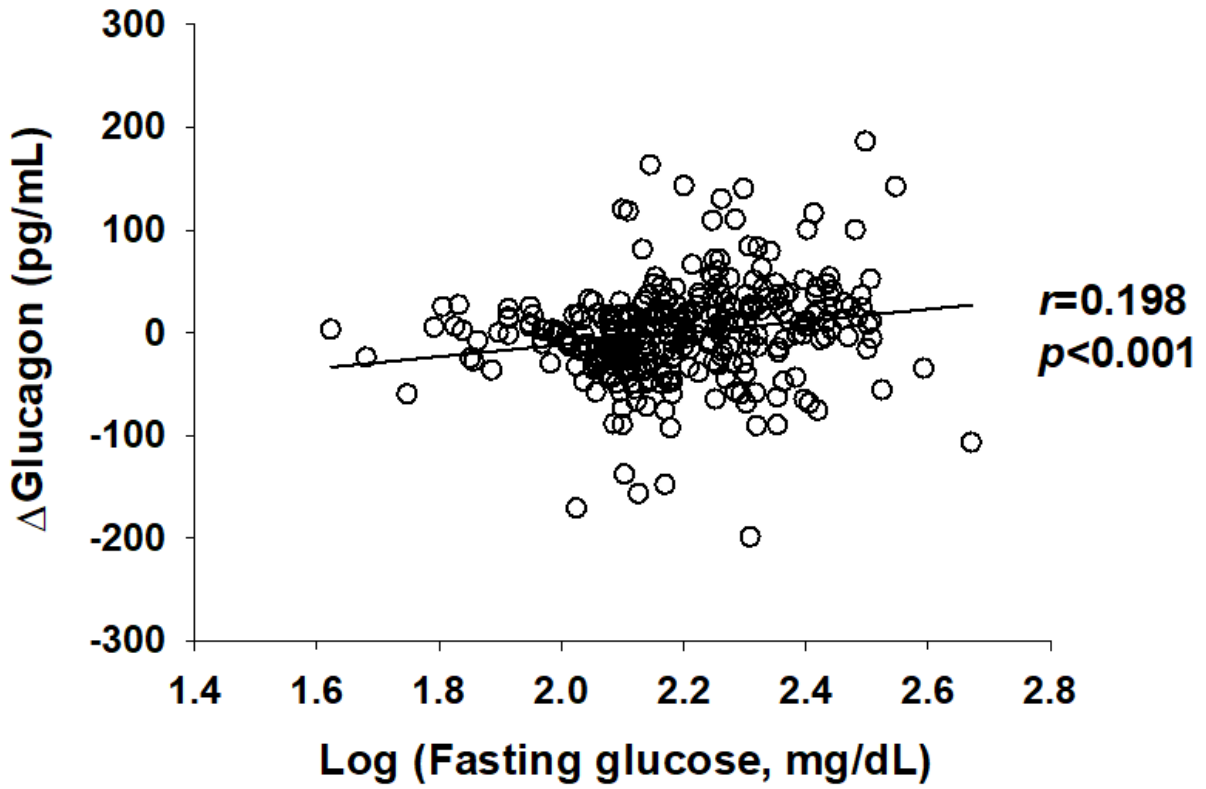


Fig. 4. Correlation between Δ glucagon and fasting glucose levels. Fasting glucose levels were logarithmically transformed. Correlation coefficients and p values are calculated using the Pearson's correlation analysis. r , correlation coefficient.

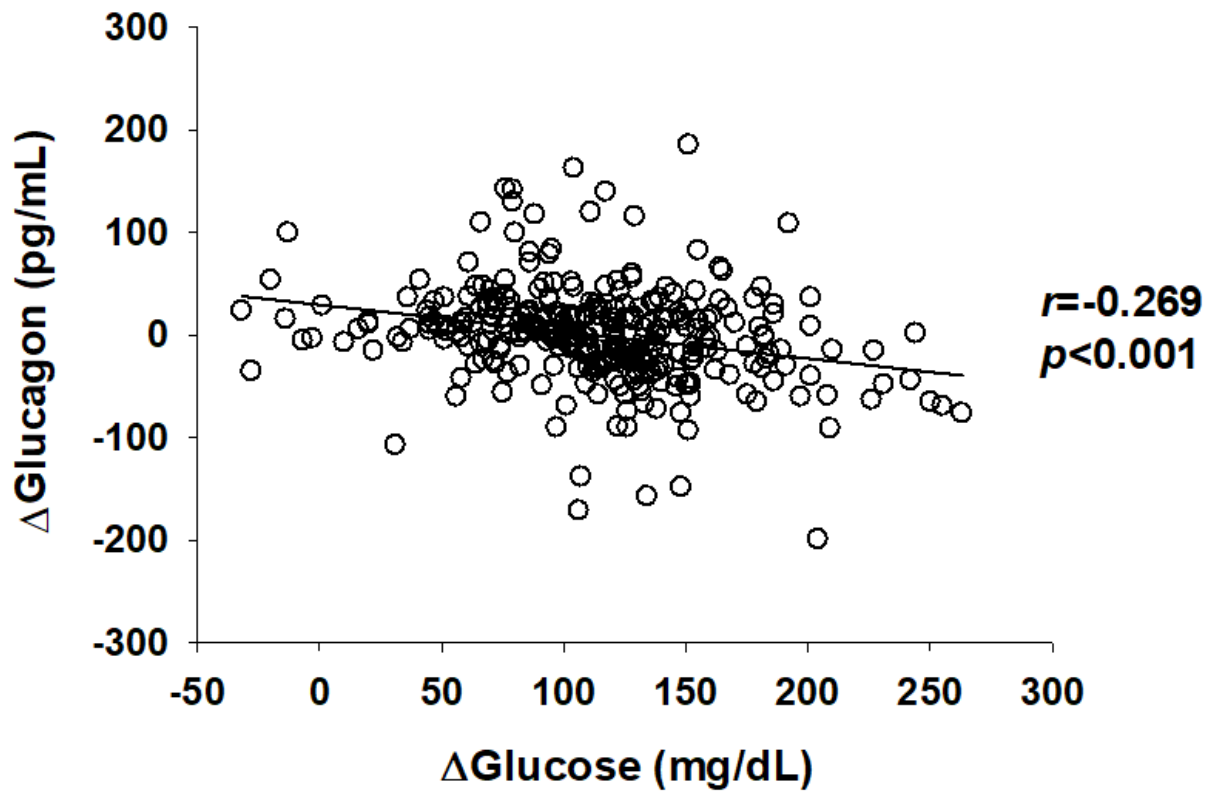


Fig. 5. Correlation between Δ glucagon and Δ glucose levels. Correlation coefficients and p values are calculated using the Pearson's correlation analysis. r , correlation coefficient.

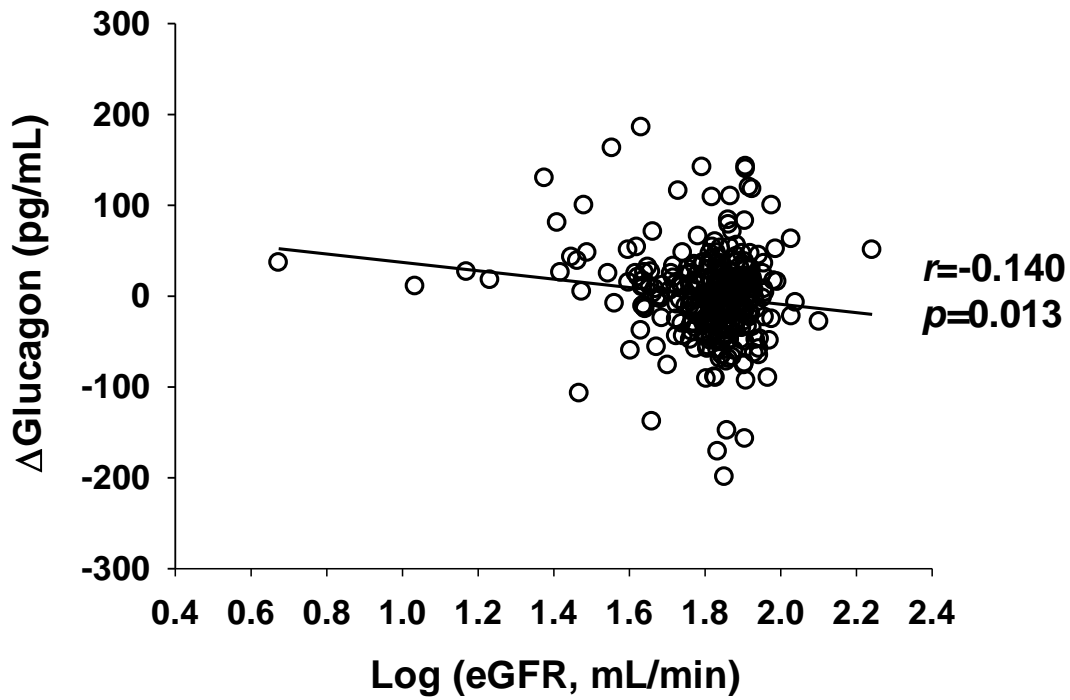


Fig. 6. Correlation between Δ glucagon and eGFR levels. eGFR levels were logarithmically transformed. Correlation coefficients and p values are calculated using the Pearson's correlation analysis. eGFR, estimation of the glomerular filtration rate; r , correlation coefficient.

Table 3. Correlational analysis of the relationships between Δ glucagon levels and clinical and laboratory variables ($n = 317$).

Variables	Δ Glucagon, pg/mL	
	<i>r</i>	<i>p</i>
Age	0.005	0.925
Body mass index, kg/cm ²	0.031	0.583
Waist circumference, cm	0.099	0.084
Systolic BP, mmHg	-0.042	0.456
Diastolic BP, mmHg	-0.039	0.485
Log (DM duration, years)	0.010	0.861
Log (HbA1c, %)	0.389	<0.001
Log (Fasting glucose, mg/dL)	0.198	<0.001
Log (Fasting C-peptide, ng/mL)	-0.052	0.360
Δ Glucose, mg/dL	-0.269	<0.001
Δ C-peptide, ng/mL	-0.036	0.531
Log (Δ iGLP-1, pmol/L)	0.09	0.118
Log (Δ iGIP, pmol/L)	-0.009	0.869
Log (ALT, U/L)	0.025	0.667
Log (Creatinine, mg/dL)	0.053	0.351
Log (eGFR, mL/min)	-0.140	0.013

DM duration, HbA1c, fasting glucose and C-peptide, Δ iGLP-1, Δ iGIP, ALT, Creatinine and eGFR were logarithmically transformed.

r and *p* values are calculated using the Pearson correlation analysis.

r, correlation coefficient; BP, blood pressure; DM, diabetes mellitus; iGLP-1, intact glucagon-like peptide 1; iGIP, intact glucose-dependent insulinotropic polypeptide; ALT, alanine aminotransferase; eGFR, estimation of the glomerular filtration rate.

Table 4. Differences in Δ glucagon levels according to gender and the use of antidiabetic agents.

Variable	Gender		Use of sulfonylurea		Use of metformin		Use of thiazolidinedione		Use of α -glucosidase inhibitor		Use of insulin	
	Male (n = 205)	Female (n = 112)	Yes (n = 169)	No (n = 148)	Yes (n = 221)	No (n = 96)	Yes (n = 18)	No (n = 299)	Yes (n = 18)	No (n = 299)	Yes (n = 100)	No (n = 217)
Δ Glucagon, pg/mL	-6.4 \pm 45.7	11.5 \pm 49.5	-5.9 \pm 41.8	6.6 \pm 53.2	-4.3 \pm 41.1	9.7 \pm 59.6	-14.9 \pm 45.9	0.8 \pm 47.8	0.8 \pm 52.2	-0.1 \pm 47.6	11.1 \pm 49.5	-5.2 \pm 49.2
		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
		<0.001		0.017		0.014		0.055		0.695		<0.001

Data are expressed as mean \pm standard deviation.

p values are calculated using Mann–Whitney *U* test.

*ΔGlucagon*치를 예측하기 위한 계통다중회귀분석 결과

다른 변수들의 영향을 배제하고 음식 섭취 후 글루카곤 증가폭을 독립적으로 예측하는 인자를 찾기위해 계통다중회귀분석을 시행하였다. 나이, 성별 그리고 단변량분석에서 유의성을 보인 변수들 (당화혈색소, eGFR, 공복혈당)을 포함한 모델 1에서 성별 (여성)과 당화혈색소가 $\Delta\text{glucagon}$ 과 유의한 양의 상관을 보였다. 모델 2는 모델 1에 혼합식 섭취 후 포도당, C-peptide, iGLP-1과 iGIP의 증가폭들을 변수로 추가하여 $\Delta\text{glucagon}$ 과의 관계를 분석하였다. 모델 2의 설명력 (adjusted R^2)은 모델 1보다 6.8% 증가하였다. 모델 2에서도 당화혈색소는 $\Delta\text{glucagon}$ 과 지속적으로 유의한 관련을 보였으며, 성별은 유의한 관계를 보이지 않았다. 포도당 증가폭은 $\Delta\text{glucagon}$ 과 유의한 음의 상관을 보였으나, iGLP-1과 iGIP는 유의한 관련이 없었다. 당뇨병약제들을 추가 변수로 포함한 모델 3에서는 설명력 (adjusted R^2)이 모델 2보다 0.7% 증가하였으며, 당화혈색소, $\Delta\text{glucose}$, 성별이 $\Delta\text{glucagon}$ 과 유의한 관련을 보였다. 세 가지 모델 모두에서 당화혈색소의 교정회귀상수 (corrected regression coefficient, β)가 가장 높았으므로, 혈당조절이 음식 섭취 후 글루카곤 증가를 가장 잘 예측한다고 할 수 있다 (Table 5).

Table 5. Hierarchical multiple regression analyses predicting Δ glucagon levels.

Variables	Model 1		Model 2		Model 3	
	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>	β	<i>p</i>
Age, years	-0.028	0.622	-0.056	0.319	-0.049	0.391
Gender, female	0.125	0.019	0.105	0.050	0.109	0.041
Log (HbA1c, %)	0.359	0.000	0.337	0.000	0.327	0.000
Log (eGFR, mL/min)	-0.099	0.082	-0.037	0.527	-0.014	0.821
Log (Fasting glucose, mg/dL)	0.007	0.905	0.040	0.563	0.027	0.703
Log (Fasting C-peptide, ng/mL)	0.002	0.971	-0.030	0.628	-0.005	0.943
Δ Glucose, mg/dL			-0.237	0.000	-0.222	0.000
Δ C-peptide, ng/mL			0.092	0.131	0.087	0.156
Log (Δ iGLP-1, pmol/L)			0.032	0.573	0.027	0.632
Log (Δ iGIP, pmol/L)			0.067	0.228	0.062	0.262
Use of sulfonylurea					-0.044	0.463
Use of metformin					-0.058	0.312
Use of insulin					0.023	0.716
Adjusted R ²	0.175		0.243		0.250	
F	10.874	<0.001	9.037	<0.001	7.127	<0.001

HbA1c, eGFR, fasting glucose and C-peptide, Δ iGLP-1 and Δ iGIP were logarithmically transformed. β , corrected regression coefficient; eGFR, estimation of the glomerular filtration rate; iGLP-1, intact glucagon-like peptide 1; iGIP, intact glucose-dependent insulinotropic polypeptide.

고찰

317명의 당뇨병환자를 대상으로 분석한 본 연구에서 표준혼합식 섭취 후 글루카곤의 증가폭은 당화혈색소와 유의한 양의 상관 그리고 섭취 후 혈당증가폭과 유의 상관을 보였으며, iGLP-1과 iGIP 증가폭과는 관계가 없었다. 즉 혈당조절이 불량할 수록 음식 섭취 후 글루카곤이 증가한다고 말할 수 있으며, 글루카곤 분비를 조절하는 것으로 잘 알려진 인크레틴은 음식 섭취 시 나타나는 글루카곤 변화와 연관이 없었다. 다시 말해 당뇨병환자에서 음식 섭취 30분 후 혈당은 증가하나 글루카곤은 예상과 달리 억제되지 않으며 혈당조절이 불량한 경우는 오히려 글루카곤이 증가될 수 있다라는 점이다. 그리고 이러한 글루카곤의 변화는 GLP-1 또는 GIP에 의해 매개되는 것이 아닌 것으로 보인다.

본 연구에서 혈당조절이 불량할 수록 음식섭취 후 글루카곤 증가폭이 커지는 이유는 잘 알 수 없지만 인슐린분비능이 감소할수록 식후 글루카곤 억제가 나타나지 않기 때문일 수 있다. 제2형당뇨병은 유병기간이 오래될 수록 인슐린분비능이 점차 떨어져 혈당이 점진적으로 상승한다 [26]. 또한 인슐린 부족은 혈중 글루카곤이 상승하는 가장 중요한 기전으로 제시되어 왔다 [17, 27, 28]. 따라서 당화혈색소 상승은 인슐린분비능 저하를 의미하므로, 본 연구에서 당화혈색소와 음식섭취 후 글루카곤 증가가 양의 상관을 보였다고 설명할 수 있다. 그러나 본 연구에서 인슐린분비능과 반비례관계를 보인다고 알려진 당뇨병 유병기간이 [29] 글루카곤 증가폭과 관련이 없는 점은 위 설명을 뒷받침하지 않는다. 또한 불량한 혈당조절 자체가 식후 부적절한 글루카곤 반응의 원인일 수 있다. 이를 뒷받침하는 연구결과를 Aydin 등 [30] 과 Raskin 등 [31]이 발표한

바 있다. 이들은 당뇨병환자에서 인슐린을 투여했을 때 혈당이 개선되고 혈중 글루카곤이 감소되는 결과를 확인하였다. 그러나 혈중 글루카곤 감소가 혈당개선 자체 때문인지 혈중 인슐린 증가 때문인지 확실치 않았다. 반대로 부적절한 글루카곤 반응이 불량한 혈당조절의 원인일 수 있다. 여러 연구에서 식후 부적절한 글루카곤 반응은 식후고혈당 또는 불량한 혈당조절의 원인으로 보고되었다 [6, 32]. 결론적으로 본 연구에서 관찰된 당화혈색소와 식후 글루카곤 증가의 양의 상관은 인슐린분비능이 저하될 수록 음식섭취 후 글루카곤이 억제되지 않아 나타났을 가능성, 불량한 혈당조절 자체가 부적절한 글루카곤 반응을 초래했을 가능성, 그리고 식후 부적절한 글루카곤 반응이 불량한 혈당조절의 근본 기전일 가능성 등이 있으나 단면연구 설계 (cross-sectional design)인 본 연구의 자료로는 기전을 밝힐 수 없었다.

본 연구의 다변량분석에서 Δ glucose와 Δ glucagon은 음의 상관을 보였는데 이 것은 잘 알려진 포도당과 글루카곤의 반대작용으로 설명할 수 있다. 즉 음식섭취에 의해 증가된 혈당이 글루카곤 분비를 억제하여 초래된 것으로 생각한다. 본 연구에서 Δ C-peptide와 Δ glucagon은 유의한 관계를 보이지 않았다. C-peptide는 글루카곤 분비를 억제하는 것으로 잘 알려진 [1] 인슐린의 간접적 지표이므로 상기 결과가 의아할 수 있으나, 이는 본 연구의 혼합식 섭취 후 채혈을 30분에만 시행했기 때문에 초래된 것으로 보인다. 당뇨병환자는 정상인보다 베타세포기능이 떨어져 있어 경구섭취 후 C-peptide 정점 (peak)이 90-120분 이후에 나타난다 [33, 34]. 따라서 본 연구에서 식후채혈을 30분이 아닌 90-120분 이후에 시행했었다면 Δ C-peptide와 Δ glucagon이 유의한 음의 상관을 보였을 것으로 추정한다.

GLP-1을 정주 (intravenous infusion)하면 글루카곤 분비를 억제하고 [21] GIP 정주는 글루카곤을 자극하기 때문에 [22, 23], 본 연구에서 글루카곤의 변화가 iGLP-1 변화와 음의 상관관계를 보이거나 iGIP 변화와 양의 상관관계를 보일 것으로 예상했지만 그러한 결과는 관찰되지 않았다. 이렇듯 경구섭취 후 글루카곤 변화가 인크레틴과 관련이 없는 결과는 다른 연구들에서도 확인할 수 있다. Knop 등 [7]의 연구에서 정상인과 당뇨병환자를 대상으로 OGTT를 시행했을 때 글루카곤 억제반응은 두 군에서 다르게 나타났으나, GLP-1과 GIP의 반응은 두 군 간 차이가 없었다. Yabe 등 [11]은 정상인, 내당능장애와 당뇨병환자를 대상으로 OGTT와 MMTT를 시행했을 때, 글루카곤은 당뇨병환자에서 가장 많이 증가했으나 GLP-1과 GIP 수치는 세 군 간 차이가 없어 글루카곤과 인크레틴 반응은 관련이 없다고 하였다. 즉 본 연구와 다른 연구들의 결과를 고려하면, 당뇨병환자에서 음식섭취 후 나타나는 글루카곤의 변화는 내인성(endogenous) GLP-1 또는 GIP에 의해 초래되는 것이 아닌 것으로 보인다.

본 연구의 단변량분석에서 여자는 남자보다 혼합식 섭취 후 글루카곤 증가폭이 컸으며 (Table 4), 다변량분석에서도 여전히 여성은 글루카곤 증가를 예측하는 유의한 인자로 나타났다 (Table 5). Horie 등 [35]의 연구에서도 OGTT에서 여자는 남자보다 글루카곤이 덜 억제되는 (less suppression) 현상이 나타났다. 생쥐를 대상으로 한 연구에서 저혈당 등 다양한 종류의 자극을 가했을 때 암컷은 수컷보다 혈중 글루카곤이 더 많이 증가하였다 [36]. 인간 및 동물에서 여성의 글루카곤 반응이 더 큰 이유는 정확히 모르지만 췌장의 α -세포 용적이 남자보다 여자에서 더 크기 때문으로 설명하고 있다 [37].

얼마 전 본 연구와 유사한 결과를 보인 논문이 발표된 바 있다. Lee 등 [38]은 본 연구와

동일하게 한국인 당뇨병환자를 대상으로 단면분석 (cross-sectional analysis)을 통해 당화혈색소와 공복 및 식후 glucagon-to-insulin 비가 양의 상관을 보인다고 보고하였다. 그러나 Lee 등 [38]의 연구는 우리 연구와 많은 점에서 다르다. 우선 표준식이 아닌 환자 임의로 식사 (ad libitum diet)를 섭취한 후 채혈했기 때문에 피험자들 간 식이조건이 달랐고, 글루카곤 단일지표가 아닌 glucagon-to-insulin 비로 분석했기 때문에 변수들과 글루카곤의 독립적 관계를 평가했다고 말할 수 없다. 또한 혈중 인크레틴을 측정하지 않았다. 따라서 경구섭취 후 글루카곤 변화와 여러 인자들의 관계를 분석하기에는 Lee 등 [38]의 연구보다 우리 연구가 더 적합하다고 말할 수 있다.

본 연구는 적지 않은 단점을 가지고 있다. 첫째, 혈중 글루카곤과 인크레틴을 연속적으로 측정하지 않았다. 일반적으로 음식섭취에 대한 혈중 지표들의 반응은 일정시간에 걸쳐 여러번 측정한 수치의 곡선하면적 (area under the curve) 또는 식후 정점에 도달한 단일수치로 평가하게 된다. 이론적으로 곡선하면적이 최고치보다 더 정확하다. 그러나 우리는 반복채혈로 인한 피험자들의 불편을 줄이기 위해 기저치와 최고치, 두 번만 측정하였다. 당뇨병환자에서 혼합식 섭취 시 혈중 글루카곤과 인크레틴은 대략 30분 후 정점에 도달하는 것으로 알려져 있으며 [7, 11, 39], 우리 연구에서도 경구섭취 후 3시간 동안 글루카곤, iGLP-1, iGIP를 연속적으로 측정했을때 30분에 정점에 도달하고 이후 점차 감소하는 것으로 나타났다 (data not shown). 따라서 우리는 식후 자극치 채혈시간을 30분으로 결정하여 연구를 시행하였다. 둘째, glucagon-like peptide-2 (GLP-2)를 측정하지 않았다. GLP-2는 장점막의 증식과 장에서의 영양분 섭취를 촉진하며, 위장관운동과 위산분비를 억제한다 [40]. GLP-2는 장점막 상피의 L-세포에서 GLP-1과 함께 분비되며 (co-secreted), GLP-1과 반대로 글루카곤 분비를 자극한다 [41]. 일부 연구자들은 GLP-2, GLP-1, GIP 등의 위장관호르몬들의 글루카곤 분비자극 (glucagonotropic)과 분비억제

(glucagonostatic) 효과의 불균형이 경구섭취 후 나타나는 부적절한 글루카곤 반응의 원인으로 생각하고 있다 [42]. 따라서 추후 GLP-2가 경구섭취 후 글루카곤 반응에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하리라 생각한다. 셋째, 우리는 인크레틴의 완전체 (intact form)를 측정하였으며, 총체형 (total form)은 측정하지 않았다. 완전체는 인크레틴의 생물학적 활성형이며, 총체형은 완전체 이외 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)에 의해 파괴된 비활성 대사체 (inactive metabolites)를 포함한다 [43]. 음식섭취 후 전체적인 인크레틴 분비반응은 총체형으로 평가하는 것이 유리하다고 알려져 있다 [44]. 그러나 완전체도 어느 정도 인크레틴 분비를 반영하며 [45], 장점막에서 분비되어 글루카곤을 분비하는 췌장의 α -세포에 도달하기까지 대부분의 인크레틴은 파괴된다. 따라서 음식섭취 후 글루카곤 변화와 관련된 인크레틴 형태는 총체형이 아닌 완전체라고 할 수 있다. 넷째, 본 연구의 피험자들의 대부분은 항당뇨병약제를 투여받고 있었다. 우리는 혈중 글루카곤치에 영향을 준다고 잘 알려진 DPP-4 억제제 또는 GLP-1 수용체 작용제 투여자를 선정기준에서 제외하였다. 그러나 메트포민, 인슐린, 설펜요소제 등도 드물지만 글루카곤치에 영향을 준다고 보고된 바 있다 [46]. 우리는 피험자에게 투여 중인 당뇨병약제들의 영향을 배제하기 위한 다변량분석을 시행했으며, 여기서 메트포민, 인슐린, 설펜요소제는 Δ glucagon에 영향을 주는 인자가 아닌 것으로 판명되었다 (Table 5).

결론적으로 당뇨병환자에서 혼합식 섭취 후 글루카곤은 억제되지 않았으며, 혈당조절이 불량할 수록 섭취 후 글루카곤치가 증가되었다. 또한 이러한 글루카곤의 부적절한 반응은 GLP-1과 GIP의 변화와 관련이 없었다. 혈당조절이 불량할 수록 섭취 후 글루카곤치가 증가되는 이유는 본 연구결과로는 알 수 없으며, 향후 GLP-2를 포함한 여러 위장관호르몬들과 글루카곤의 상호작용을 알아보는 체계적인 실험연구 및 임상연구가 필요하리라 생각한다.

감사의 글

많이 늦은 나이에 대학원에 진학하여 공부를 하면서 집안일을 소홀히 하는데도 잘하고 있다고 격려하며 응원해준 아내와 파워 포인트 등 여러 문서작성에 도움을 준 딸과 부족한 점이 많은 저를 지도하여 주신 제주대학교병원 내분비대사내과 고관표 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- [1] Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:E671-8.
- [2] Scott RV, Bloom SR. Problem or solution: The strange story of glucagon. *Peptides.* 2018;100:36-41.
- [3] Moon JS, Won KC. Pancreatic alpha-Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block. *Diabetes Metab J.* 2015;39:1-9.
- [4] Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet.* 1975;1:14-6.
- [5] Ahren B, Larsson H. Impaired glucose tolerance (IGT) is associated with reduced insulin-induced suppression of glucagon concentrations. *Diabetologia.* 2001;44:1998-2003.
- [6] Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA. Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4053-9.
- [7] Knop FK, Vilsboll T, Madsbad S, Holst JJ, Krarup T. Inappropriate suppression of glucagon during OGTT but not during isoglycaemic i.v. glucose infusion contributes to the reduced incretin effect in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2007;50:797-805.
- [8] Mitrakou A, Kelley D, Veneman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J. Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes.* 1990 Nov;39(11):1381-90.
- [9] Oh TJ, Kim MY, Shin JY, Lee JC, Kim S, Park KS, et al. The incretin effect in Korean subjects with normal glucose tolerance or type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80:221-7.
- [10] Henquin JC, Rahier J. Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2011;54:1720-5.
- [11] Yabe D, Kuroe A, Watanabe K, Iwasaki M, Hamasaki A, Hamamoto Y, et al. Early phase glucagon

and insulin secretory abnormalities, but not incretin secretion, are similarly responsible for hyperglycemia after ingestion of nutrients. *J Diabetes Complications*. 2015;29:413-21.

[12] Hare KJ, Vilsboll T, Holst JJ, Knop FK. Inappropriate glucagon response after oral compared with isoglycemic intravenous glucose administration in patients with type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298:E832-7.

[13] Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007;56:1951-9.

[14] Lund A, Bagger JI, Wewer Albrechtsen NJ, Christensen M, Grondahl M, Hartmann B, et al. Evidence of Extraprostatic Glucagon Secretion in Man. *Diabetes*. 2016;65:585-97.

[15] Ostoft SH, Bagger JI, Hansen T, Pedersen O, Holst JJ, Knop FK, et al. Incretin effect and glucagon responses to oral and intravenous glucose in patients with maturity-onset diabetes of the young--type 2 and type 3. *Diabetes*. 2014;63:2838-44.

[16] Girard J. Glucagon, a key factor in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochimie*. 2017;143:33-6.

[17] Lefebvre PJ, Paquot N, Scheen AJ. Inhibiting or antagonizing glucagon: making progress in diabetes care. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2015;17:720-5.

[18] Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, et al. Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2300-8.

[19] Knop FK. EJE PRIZE 2018: A gut feeling about glucagon. *Eur J Endocrinol*. 2018;178:R267-R80.

[20] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132:2131-57.

[21] Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993;91:301-7.

[22] Meier JJ, Gallwitz B, Siepmann N, Holst JJ, Deacon CF, Schmidt WE, et al. Gastric inhibitory

polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. *Diabetologia*. 2003;46:798-801.

[23] Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2002;45:1111-9.

[24] Lund A, Bagger JI, Christensen M, Knop FK, Vilsboll T. Glucagon and type 2 diabetes: the return of the alpha cell. *Curr Diab Rep*. 2014;14:555.

[25] Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2006;145:247-54.

[26] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837-53.

[27] Unger RH, Orci L. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology (first two parts). *N Engl J Med*. 1981;304:1518-24.

[28] Unger RH, Orci L. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology (second of two parts). *N Engl J Med*. 1981;304:1575-80.

[29] U.K. Prospective Diabetes Study Group. U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. *Diabetes*. 1995;44:1249-58.

[30] Aydin I, Raskin P, Unger RH. The effect of short-term intravenous insulin administration on the glucagon response to a carbohydrate meal in adult onset and juvenile type diabetes. *Diabetologia*. 1977;13:629-36.

[31] Raskin P, Unger RH. Effect of insulin therapy on the profiles of plasma immunoreactive glucagon in juvenile-type and adult-type diabetics. *Diabetes*. 1978;27:411-9.

[32] Koopman ADM, Beulens JW, van der Heijden A, Elders P, Dekker JM, Alsema M, et al. A prospective study on glucagon responses to oral glucose and mixed meal and 7-year change in fasting glucose. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;91:82-6.

- [33] Forbes S, Lam A, Koh A, Imes S, Dinyari P, Malcolm AJ, et al. Comparison of metabolic responses to the mixed meal tolerance test vs the oral glucose tolerance test after successful clinical islet transplantation. *Clin Transplant*. 2018;32:e13301.
- [34] Greenbaum CJ, Mandrup-Poulsen T, McGee PF, Battelino T, Haastert B, Ludvigsson J, et al. Mixed-meal tolerance test versus glucagon stimulation test for the assessment of beta-cell function in therapeutic trials in type 1 diabetes. *Diabetes care*. 2008;31:1966-71.
- [35] Horie I, Abiru N, Eto M, Sako A, Akeshima J, Nakao T, et al. Sex differences in insulin and glucagon responses for glucose homeostasis in young healthy Japanese adults. *J Diabetes Investig*. 2018;9:1283-7.
- [36] Karlsson S, Scheurink AJ, Ahren B. Gender difference in the glucagon response to glucopenic stress in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282:R281-8.
- [37] Bonnevie-Nielsen V. Different effects of high glucose and high fat diet on pancreatic insulin and glucagon in female and male mice. *Diabete Metab*. 1982;8:271-7.
- [38] Lee M, Kim M, Park JS, Lee S, You J, Ahn CW, et al. Higher glucagon-to-insulin ratio is associated with elevated glycated hemoglobin levels in type 2 diabetes patients. *Korean J Intern Med*. 2017.
- [39] Henkel E, Menschikowski M, Koehler C, Leonhardt W, Hanefeld M. Impact of glucagon response on postprandial hyperglycemia in men with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2005;54:1168-73.
- [40] Wallis K, Walters JR, Forbes A. Review article: glucagon-like peptide 2--current applications and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25:365-72.
- [41] Meier JJ, Nauck MA, Pott A, Heinze K, Goetze O, Bulut K, et al. Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology*. 2006;130:44-54.
- [42] Lund A, Vilsboll T, Bagger JJ, Holst JJ, Knop FK. The separate and combined impact of the intestinal hormones, GIP, GLP-1, and GLP-2, on glucagon secretion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300:E1038-46.

- [43] Deacon CF, Nauck MA, Meier J, Hucking K, Holst JJ. Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:3575-81.
- [44] Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes.* 1995;44:1126-31.
- [45] Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2001;50:609-13.
- [46] Haedersdal S, Lund A, Knop FK, Vilsboll T. The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Mayo Clin Proc.* 2018;93:217-39.