

L6 근육세포에서 포도당 수송능에 미치는 CdCl₂의 영향

강동희*, 길이룡^{1,*}, 박광식², 이병훈, 문창규*

서울대학교 약학대학, ¹Julia McFarlane Diabetes Research,
²동덕여자대학교 약학대학

Effects of Cadmium on Glucose Transport in L6 Myocytes

Donghee Kang*, Lee-Yong Khil^{1,*}, Kwangsik Park²,
Byung-Hoon Lee and Chang-Kiu Moon*

College of Pharmacy, Seoul National University, 56-1 Sillim-dong,
Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

¹Lab of Viral and Immunopathogenesis of Diabetes, Julia McFarlane Diabetes Research
Center and Dep. of MID, Faculty of Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, T2N 4N1, Canada

²College of Pharmacy, Dongduk Women's University, 23-1 Wolgok-dong,
Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea

Abstract

This study was aimed to know the effect of cadmium chloride (CdCl₂) on glucose transport in L6 myotube and its action mechanism. CdCl₂ increased the 2-deoxy-(1-³H)-D-glucose (2-DOG) uptake 1.9 and 2.4 fold at 10 and 25 μM respectively. To investigate the stimulating-mechanism of glucose transport induced by CdCl₂, the wortmannin and PD98059 were used as PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) inhibitor and MAPK inhibitor respectively, which did not affect 2-DOG uptake. This fact suggests that CdCl₂ induced 2-DOG uptake may not be concerned to the insulin signalling pathway. Whereas nifedipine, a calcium channel blocker, and trifluoperazine, a calmodulin inhibitor, were found to inhibit the 2-DOG uptake stimulated by CdCl₂. In addition, we also measured the ROS (reactive oxygen species) production and GSH level in L6 myotube to investigate the correlation between the glucose uptake and ROS. CdCl₂ (25 μM) increased ROS generation approximately 1.5 fold and changed the cellular GSH level, but GSSG/GSH ratio remained unchanged. CdCl₂-stimulated 2-DOG uptake and ROS generation were inhibited by N-acetylcystein. And BSO pretreatment, a potent inhibitor of γ-GCS, resulted in the dramatic decrease of 2-DOG uptake and also the increase of the sensitivity to cadmium cytotoxicity. The obtained results suggest that CdCl₂-stimulated glucose uptake might be based on the activation of HMP shunt as an antioxidant defense mechanism of the cells.

Key words : Cadmium, Glucose transport, Myocytes, ROS, GHS

* Both authors are equally contributed to this work.

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-880-7843, E-mail: moonck@snu.ac.kr

서 론

카드뮴(Cadmium)은 지각에서 흔히 발견되는 원소로서 카드뮴에 만성적으로 노출될 경우 주로 신장 및 골격계에 심각한 장애를 초래하는 것으로 알려져 있다. 카드뮴에 의한 인체 역학조사결과 다양한 독성이 보고 되고 있는데 이중에서도 카드뮴에 의한 노출가능성이 높은 작업장의 노동자에게서는 주로 폐 손상이 보고 되고 있다. 이외에도 동물과 인간에서 카드뮴 노출에 의해 손상을 입는 조직으로는 간, 정소, 면역계, 신경계, 혈관 등이 보고되고 있다.

한편, 포도당 수송은 세포내 포도당 대사과정의 속도 결정 단계로서 혈당 조절에서 중요한 역할을 차지한다. 포도당 수송을 담당하는 포도당 수송체(GLUT)는 분자량 약 43-50 KD의 당단백으로 현재 모두 6개의 isotype이 밝혀져 있으며 다양한 생리적인 자극에 반응하여 세포내 포도당의 항상성을 유지하는데 절대적인 역할을 한다, 그러나 이들 isotype은 조직 분포, 속도론적 특성, 기질 특이성 등에 있어서 서로 차이점이 있는 것으로 알려져 있다(Bell *et al.*, 1990). 인슐린의 경우, 세포내 저장소에 저장되어 있던 GLUT4의 세포막으로의 전이를 통해 급성적인 포도당 수송에 관여한다고 알려져 있다(Cushman and Wardzala, 1980). 인슐린은 두 개의 α -subunit(135 kDa)와 두 개의 β -subunit(95kDa)으로 구성되어 있는 인슐린 수용체에 결합함으로써 작용을 나타내는 데 활성화된 인슐린 수용체인 β -subunit은 IRS-1(pp185), IRS-2(pp190), 4PS(pp170), pp60, Shc(pp52) 등을 인산화시키는 것으로 알려졌다. 그중 처음 밝혀진 IRS-1이 인슐린 작용에 있어서 가장 중요한 기질로 인식되고 있으며 이에 대한 다양한 연구가 이루어졌다(Caro *et al.*, 1986; Augert and Exton 1988; Cherqui *et al.*, 1990). IRS-1의 하위단계에는 크게 PI3K를 경유하는 metabolic pathway와 p42/44MAPK를 경유하는 mitogenic pathway로 나누어진다. 포도당 수송과 관련이 있는 경로인 metabolic pathway에서는 지방세포와 근육세포에서 인슐린에 의한 포도당 수송이 PI3K 및 wortmannin과 LY29042에 의하여 비상경적이며 비가역적으로 억제됨이 확인됨으로써(Okada *et al.*, 1994; Cheatham *et al.*, 1994), PI3K가

인슐린에 의한 GLUT4의 전이에 관여한다는 사실이 입증되었다. PI3K의 하위단계에는 PKB, atypical PKC 등이 관련되어 GLUT4를 세포막으로 전이시키는 것으로 알려져 있으나 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않다. 포도당 수송은 동화효몬인 인슐린뿐만 아니라 H₂O₂와 같은 reactive oxygen species 역시 PKB 및 MAP kinase와 stress signaling pathways를 포함한 각종 protein kinase의 활성화를 통해 촉진되는 것으로 알려져 있다(Clark *et al.*, 1998). 포도당 수송을 담당하는 포도당 수송체는 integral glycoproteins류로 현재까지 6개의 isotope이 밝혀져 있다. 그중 GLUT1은 대부분의 조직에서 가장 널리 분포 및 발현되어있으며 주로 cell division, differentiation, transformation 및 다양한 stress에 반응하여 조절된다(Muckler, 1990). L6 skeletal muscle cell line에서 ROS generation system을 통해 포도당 수송에 미치는 oxidative stress의 영향을 알아 보기 위하여 glucose/glucose oxidase(H₂O₂ generation system) 또는 xanthine/xanthine oxidase(O₂·, H₂O₂ generation system)를 처리한 결과 GLUT1 protein과 mRNA의 발현 및 포도당 수송을 촉진하는 효과가 있다는 보고가 있다. 이는 3T3-L1 adipocytes에서도 유사한 결과가 관찰되었다(Nistan *et al.*, 1997a, b). Superoxide anion(O₂·), hydrogen peroxide(H₂O₂), and hydroxyl radicals(HO·)과 같은 reactive oxygen species(ROS)는 주로 세포내 산화 환원 과정을 통해 생성되는데 특히 근육에서는 과격한 운동이나 ischemia reperfusion injury 등을 통해 다른 조직에 비해 심각한 정도로 ROS에 노출된다(Ferreira *et al.*, 1989). 따라서 세포는 ROS에 의한 세포내 DNA, 지질막, 단백질과 같은 세포 구성요소들의 파괴를 막기 위한 다양한 antioxidant defense system들을 가지고 있다. α -tocopherol, ascorbic acid, glutathione처럼 세포내 redox cycle에서 sacrificial molecules로 작용하기도 하며(Harris, 1992), superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase와 같은 antioxidant enzyme은 직접 oxygen radicals에 작용하여 덜 공격적인 산물로 변화시키기도 한다(Allen, 1991). 개의 골격근에서는 γ -glutamyl cycle의 모든 key enzymes이 활성화되어 있으며(Sen *et al.*, 1992) 특히, 운동중에는 total glutathione(TGSH) pool과 골격근의 GSH-dependent antioxidant capacity가 증가한다고 한다. 골격

근을 기원으로 하는 L6 myoblasts 역시 high resting TGSH pool이 존재한다. Glutathione은 중요한 항산화물질로서 oxidants나 중금속, 농약 등으로 인한 free radicals과 toxic electrophiles의 무독화과정, thiole-disulphide status를 유지하는데 사용되며 다양한 세포 보호기능에 관여한다. GSH는 수용성으로 mitochondria matrix와 cytosol에 존재하며 자신의 sulfhydryl group과 oxidants와 반응하여 GSSG를 생성하며 GSSG의 증가는 GSH-consuming enzymes인 GSH peroxidase와 GSH transferase의 증가 및 GSH를 만드는 γ -glutamylcysteine synthase와 GSH reductase의 감소에 기인한 것으로 oxidative stress의 marker로 이용되기도 한다. 생성된 내부 GSSG는 다시 glutathione reductase (GRD)에 의해 환원되거나 세포밖으로 방출되는데 또한 GSH로의 환원은 NADPH에 의존적이며 NADPH는 hexose monophosphate shunt의 부산물로 포도당 공급을 필요로 한다 (Bannai *et al.*, 1991; Ulla *et al.*, 2000).

본 연구에서는, 카드뮴이 체내 포도당 대사의 primary target tissue인 skeletal muscle에서의 포도당 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 L6 myotubes에서 2-DOG uptake의 변화 및 그 기전에 대해서 실험하였다. 본 실험에 사용한 L6 myocytes는 골격근에서의 당 수송능 측정 실험에서 가장 많이 사용되는 세포주로 neonatal rat의 thigh 근육세포로부터 분리해 만든 myoblast이다. L6 cell은 GLUT1, GLUT3, GLUT4와 같은 다양한 포도당 수송체가 발현되어져 있으며 confluent 상태가 되면 multi-nucleated skeletal muscle myotubes로 분화하게 되고 이 상태가 되면 GLUT1 뿐만 아니라 GLUT4 발현이 증가되어 인슐린 반응성이 증가하게 되므로, 인슐린 반응성 실험에도 많이 이용되고 있다.

실험 방법

L6 근육세포주의 배양

서울대학교 분자 생물학과에서 분양 받은 L6 세포를 해동 직후, 37°C로 미리 가온한 DMEM-10 배지 10 mL에 신속하게 가하여 2,000 rpm에서 8분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 freezing medium내의 DMSO를 제거하였다. 다시 배지를 10 mL 가해주고 pipette을 이용하여 세포를 재현탁하였다.

100 mm tissue culture flask에 세포 현탁액 10 mL을 가한 후 humidified 37°C, 10% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포배양에 이용되는 모든 시약과 기구는 멸균조작을 거친 것을 사용하였다.

포도당 수송능 측정

세포를 24 well culture dish에 seeding하여 완전히 분화시킨 후 제시된 농도의 시료를 세포 배양액에 가하고 일정 시간 37°C, 10% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 미리 37°C로 가온한 HBS (HEPES buffered saline, 140 mM NaCl, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO₄, 20 mM HEPES, pH 7.4)로 2회 세척하여 배지 안에 존재하는 glucose를 제거하였다. 각 well에 HBS 375 μ L를 가하고 [³H]-2-deoxyglucose (3.2 μ Ci/nmol) 25 μ L를 가하여 0.125 mM가 되도록 하고, 5분 후 [³H]-2-deoxyglucose를 포함한 HBS를 신속히 제거하고 빙냉한 PBS를 가함으로써 반응을 정지시켰다. 빙냉한 PBS로 2회 더 세척한 후, 상온에서 잠시 방치하여 세포 표면의 물기를 완전히 제거하였다. Cell lysis buffer (1% SDS, 0.2 N NaOH)를 가하여 rotomix (Thermolyne, type 50800, speed 6)로 30~60분 동안 mix하여 세포를 녹인 후, 일부는 단백질 정량에 사용하고 나머지는 Bray's solution에 넣고 liquid scintillation counter (LKB 1211 Rackbeta, Pharmacia LKB, Finland)로 radioactivity를 측정하였다. [³H]-2-deoxyglucose를 가하기 직전에 2-DOG uptake의 억제제인 100 μ M phloretin (ethanol에 용해시켜 최종농도가 1 v/v%가 되도록 조제)을 가하여, 세포에 들어가지 않고 세포 표면에 묻어있는 [³H]-2-deoxyglucose의 양을 보정해 주었다.

세포 독성의 측정

MTT assay는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)가 살아있는 세포의 active mitochondria에 존재하는 succinate dihydrogenase에 의해 개환 되어 자주색 formazan 결정으로 석출되는 것을 이용한 실험으로서, 빠르고 정확하여 세포독성이나 생존율, 세포증식이나 대사 상태를 측정하는 데 많이 사용되어 왔다. 96 well flat bottomed plate에 1.8×10^4 cells/mL로 조절한 L6 근육 세포현탁액 60 μ L를 가한 후 완전히 분화

시킨 다음 각 농도의 시료를 가하여 총 200 μ L로 한 후, 10% CO₂ incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT 용액 25 μ L를 가하여 2시간 더 배양하여 salt를 석출시킨 후, 상등액을 pasteur pipette으로 aspiration한 후 DMSO와 EtOH의 혼합액(1:1)을 각 well에 100 μ L 가하고 rotomix (Thermolyne, type 50800, speed 6)로 15분간 mix하여 생성된 formazan결정을 완전히 녹이고, ELISA reader (Multiskan MCC/340P, Titertek)로 630 nm를 reference로하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 세포 독성을 확인하였다. MTT 용액은 수용성 MTT salt 500 mg을 phosphate-buffered saline (PBS) 100 mL에 녹여 0.22 μ m filter로 여과하여 차광, 냉장 보관하였으며 한 달 이상 된 것은 사용하지 않았다.

글리코겐 합성 측정

세포를 24 well culture dish에 seeding하여 완전히 분화시킨 후 제시된 농도의 시료를 0.5% serum 및 5 mM 포도당을 함유한 배양액에 가하고 5시간 동안 37°C, 10% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 완전히 제거한 후 [U-¹⁴C] glucose (1 mL, 5 mM glucose in DMEM; 1.25 μ Ci/mL)를 함유하는 배지로 교환한 후 1시간 방치하였다. 빙냉한 PBS로 두 번 세척한 후 20% w/v KOH 100 μ L를 가하여 세포를 부순다. 1시간 후 1M HCl 100 μ L를 가하여 중화시킨 것과 나머지 plate 바닥을 200 μ L DW로 세척한 것을 모아서 5분간 끓였다. Glycogen (30 mg/mL) 250 μ L과 에탄올 700 μ L를 가해 1시간 방치하여 glycogen을 침전시킨 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리시킨다. 침전물을 300 μ L DW로 현탁시킨 후 radioactivity를 측정하였다.

활성산소 라디칼 (ROS) 측정

Dichlorofluorescein diacetates는 내부 esterases에 의해 잘려진 후 reactive oxygen의 존재하에서 형광을 발하는 물질로 전환이 된다. 이때 형광물질의 흡광도를 측정하여 Reactive oxygen의 양을 측정하는 원리이다. 세포를 24 well culture dish에 seeding하여 완전히 분화시킨 후 제시된 농도의 시료를 세포 배양액에 가하고 일정 시간 37°C, 10% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 미리 가온한 Kreb's Ringer solution으로 두 번 washing 한다.

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (1 mg/mL DMSO : 용시조제)를 Kreb's Ringer solution에 1 μ g/mL 농도로 만들어 well 당 500 μ L씩 가하여 10% CO₂, 37°C에서 15분간 배양하였다. 다시 Kreb's Ringer solution으로 두 번 세척한 후 배지를 제거하고 DMSO로 5분간 세포를 부수어 Ex = 485 nm, Em = 530 nm로 흡광도를 측정하였다. 이때 화합물이 불안정하므로 오래 방치하지 않도록 주의하여야 한다.

세포내 글루타티온의 정량

6 well plate에 1.8×10^4 cells/mL로 조절된 L6 근육 세포현탁액 2 mL를 가한 후 완전히 분화시킨 다음 각 농도의 카드뮴 및 시료를 가하여 10% CO₂ incubator에서 12시간 동안 배양하였다. HBSS로 두 번 세척하고 perchloric acid (0.3 M) 500 μ L를 가한 후 15분간 얼음에 방치하였다. 3 M K₂CO₃ 75 μ L 가한 후 다시 20분간 얼음에 방치하였다. EP tube에 옮겨서 13,000 rpm에서 5분간 4°C 하에서 원심분리한 후 상등액 60 μ L을 취해 60 μ L 2.4 mM DTNB, 60 μ L 40 μ g/mL GR (100 μ L/5.75 mL)을 가하고 지체없이 414 nm에서 흡광도를 측정한다. GSSG 측정을 위해 2-vinyl pyridine을 plate에 소량 가한 후 60 μ L 0.8 mM NADPH를 가하여 414 nm에서 흡광

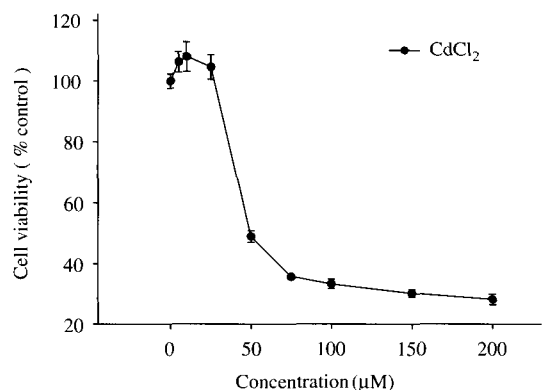


Fig. 1. Effects of CdCl₂ on viability of L6 myotubes. L6 myotubes were incubated for 12 hours at 37°C at various concentrations of samples. MTT solution was added to culture medium followed by the incubation for 4 hours. After incubation, supernatants in each well were removed and salt products were dissolved in the extraction buffer and allowed to be incubated for ten minutes. Absorbance was read by ELISA reader at 540 nm.

도 측정하였다.

결 과

카드뮴의 세포독성

L6 myotubes에 CdCl₂를 12시간 처리한 후 MTT assay로 세포 독성을 측정한 결과, 5, 10, 25 μM에서는 cell viability에 영향을 주지 않으나 50 μM 이상의 농도에서 현격한 세포독성을 나타내었다(Fig. 1).

L1 myotubes에서의 포도당 수송에 미치는 카드뮴의 영향

MTT assay에서 유의적인 세포독성을 나타내지 않았던 범위의 CdCl₂를 농도별로 처리하여 2-DOG uptake를 측정한 결과 농도 의존적인 포도당 수송 증가가 관찰되었으며 25 μM에서 최대 효과를 보였다. CdCl₂는 10 μM과 25 μM의 농도에서 incubation time이 늘어남에 따라 포도당 수송도 증가시켰으며 12시간에서 최대 효과를 나타내었다(Figs. 2, 3). L-type voltage-sensitive 칼슘 채널 차단제인 Nifedipine 100 μM 처리하였을 경우 CdCl₂에 의한 포도당 수송 촉진작용을 기저상태 수준으로 억제하였다(Fig. 4). 이를 통해 CdCl₂에 의한 포도당 수송 증가는 칼슘 채널을 통한 카드뮴의 세포내 유입에 의한 것임을 알 수 있다. CdCl₂과 인슐린을 동시에 처리하였을 경우 10 μM과 25 μM 모두에서

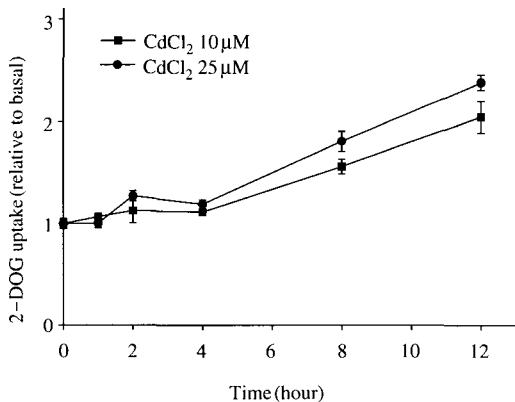


Fig. 2. Time course of 2-DOG uptake stimulated by CdCl₂ in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated with 10 μM or 25 μM CdCl₂. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods.

기저상태와 인슐린 자극시 포도당 수송의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

인슐린 신호전달 경로와 카드뮴에 의한 포도당 수송과의 상관성

PI3K는 세포내에서 PI-3-P, PI-3,4-P₂, PI-3,4,5-P₃를 생성하는 효소로(Whitman *et al.*, 1987, 1988) PI3K 억제물질인 wortmannin에 의하여 인슐린에 의한 포도당 수송이 억제됨이 밝혀졌다(Clarke

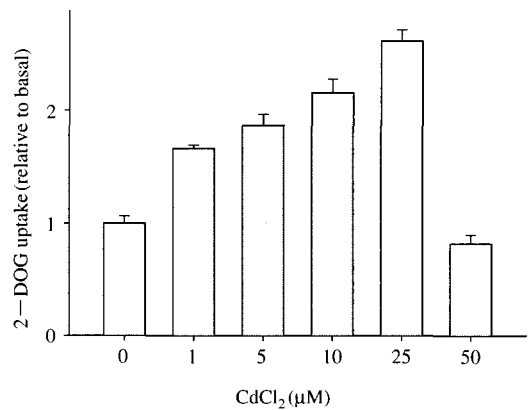


Fig. 3. Effects of CdCl₂ on 2-DOG uptake in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated with CdCl₂ for 12 hours at indicated concentrations. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods.

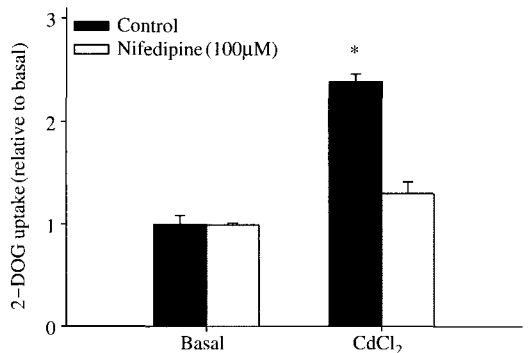


Fig. 4. Effects of Nifedipine on CdCl₂ stimulated 2-DOG uptake in L6 myotubes. Myotubes were incubated with CdCl₂ (25 μM) for 12 hours in the absence or presence of Nifedipine (100 μM). 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods. * Significantly different from control group by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

et al., 1994; Gould *et al.*, 1994; Tsakiridis *et al.*, 1995). 따라서 CdCl₂에 의한 포도당 수송의 증가가 인슐린 pathway와 유사하게 경유하는지 알아보기 위하여 wortmannin을 100 nM로 45분 처리하였다. 그 결과 wortmannin은 CdCl₂에 의한 포도당 수송능 증가에는 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되었다(Fig. 6). MAP kinase kinase (MEK)를 강력하게 억제하여 MAPK의 인산화를 저해하여 이의 활성화를 억제함으로써 MAPK가 관여하는 경로를 차단하는 것으로 알려진 PD98059를 50 μM 처리시 인슐린에 의한 포도당 수송은 유의적으로 억제되었으나, CdCl₂에 의한 포도당 수송은 억제하지 못하였다(Fig. 6). 근육세포에 존재하는 포도당 대사의 하나인 글리코겐 합성에 미치는 CdCl₂의 영향을 인슐린과 비교하여 보았다. 인슐린에 의한 글리코겐 합성은 기저 상태보다 약 1.4배 이상 증가하였으나 CdCl₂의 경우 5, 10, 25 μM의 농도에서 글리코겐 합성의 억제가 관찰되었다(Fig. 7).

세포내 활성산소 라디칼 생성에 미치는 카드뮴의 영향

CdCl₂에 의한 포도당 수송의 증가가 세포내 oxidative stress에 의한 것인지를 알아보기 위하여 CdCl₂을 12시간 처리한 후 세포내 활성산소 라디칼을 Dichlorofluorescein dye를 이용하여 측정하였

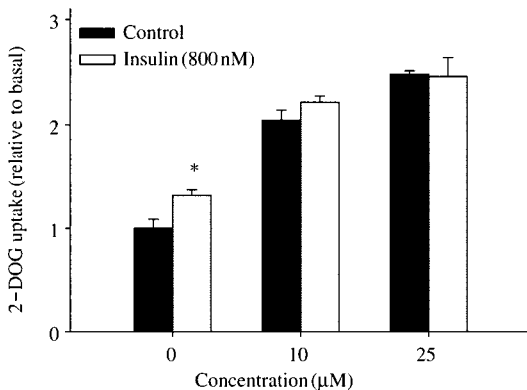


Fig. 5. Insulin sensitizing effect of CdCl₂ in L6 myotubes. Myotubes were treated with 10 μM or 25 μM of CdCl₂ for 12 hours in the presence or absence of 800 nM insulin. 2-DOG uptake was described in experimental methods. *Significantly different from control group by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

다. 5, 10, 25 μM에서 활성산소 라디칼 생성이 유의적으로 증가하였으나 농도 의존성은 관찰되지 않았다. 항산화제의 일종인 N-acetylcysteine (NAC) 1 mM을 CdCl₂와 동시 처리한 경우, CdCl₂에 의한 활성산소 라디칼 생성은 나타나지 않았다(Fig. 8).

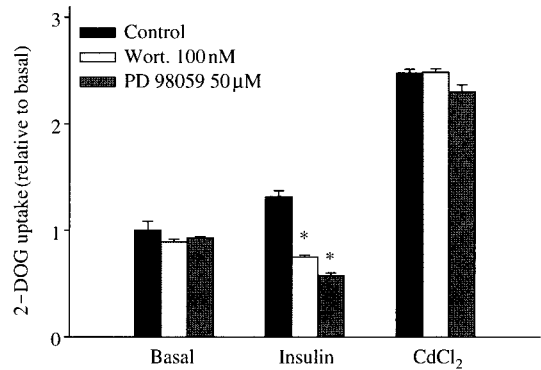


Fig. 6. Effect of wortmannin or PD98059 on CdCl₂-induced 2-DOG uptake in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated with CdCl₂ (25 μM) or insulin (800 nM) in the absence or presence of 100 nM wortmannin or 50 μM PD98059 for 12 hours. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods. *Significantly different from control group by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

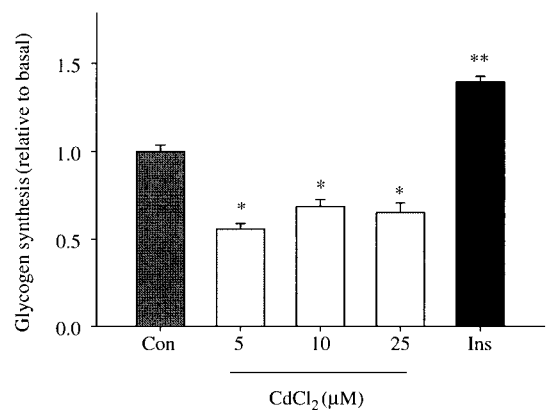


Fig. 7. Effect of CdCl₂ on Glycogen synthesis in L6 myotubes. Myotubes were treated with CdCl₂ at the incubated concentrations for 12 hours or with 500 nM insulin for 20 minutes. Glycogen synthesis was measured as described in experimental methods. *, **Significantly different from control group by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

CdCl₂에 의한 포도당 수송의 증가가 CdCl₂에 의한 활성산소 라디칼 생성에 기인한 것인지를 알아보기 위하여 GSH 전구물질인 N-acetylcysteine (NAC) 1 mM과 세포내 GSH 고갈물질인 L-buthionine sulfoximine (BSO) 25 μM을 CdCl₂과 동시 처리하여 포도당 수송능을 비교하였다. NAC를 동시 처리한 경우 CdCl₂에 의한 포도당 수송능 증가가 기저 수준으로 억제되었으며, BSO를 동시 처리한 경우는 오히려 기저 수준 이하로 떨어짐이 관찰되었다(Fig. 9). CdCl₂에 의한 세포 독성과 세포내 GSH 함량과의 관계를 알아보기 위하여 GSH 고갈 물질인 BSO를 CdCl₂와 동시 처리하여 MTT assay를 하였다. CdCl₂을 단독으로 처리하였을 경우 25 μM 이하에서는 세포 독성이 관찰되지 않았으나 BSO를 동시 처리한 경우 10 μM에서부터 세포 독성이 나타나기 시작하였다. 세포내 GSH 고갈은 CdCl₂에 의한 세포 독성의 증가와 관련이 있음을 알 수 있다(Fig. 10).

세포내 총 글루타티온 양에 미치는 카드뮴의 영향

L6 myotubes에서 CdCl₂에 의한 세포 독성으로부터 보호하는 중요한 물질인 GSH 함량을 CdCl₂의

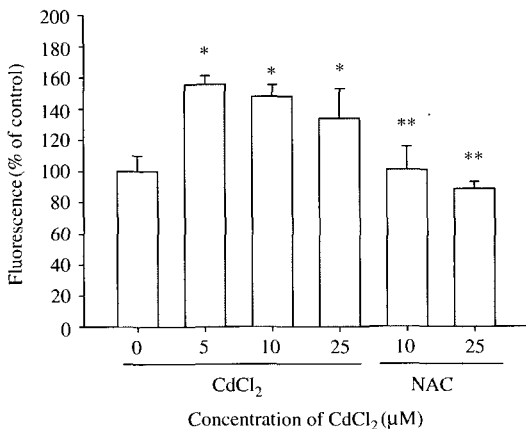


Fig. 8. Effects of CdCl₂ on generation of Reactive oxygen species in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated with CdCl₂ with or without pretreatment of NAC (1 mM). ROS generation was measured as described in experimental methods. *Significantly different from control group by Student's *t*-test (*P* < 0.05) **Significantly different from group without NAC-pretreatment by Student's *t*-test (*P* < 0.05).

농도별로 측정하였다. 5 μM에서는 GSH의 생성의 증가가 관찰되었으나 (data not shown) CdCl₂의 농도가 증가함에 따라 GSH 함량이 감소하여 25 μM에서는 60% 정도의 감소가 관찰되었다. NAC와 동시

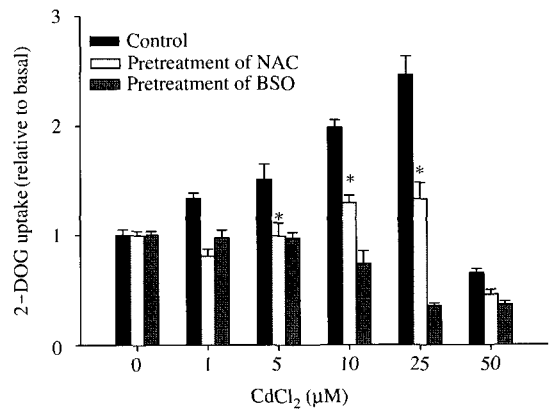


Fig. 9. Effects of N-acetylcysteine or L-buthionine sulfoximine on CdCl₂-induced 2-DOG uptake in L6 myotubes. Myotubes were incubated with CdCl₂ for 12 hours with or without pretreatment of NAC (1 mM) or BSO (25 μM). 2-DOG uptake was measured as described experimental methods. *Significantly different from control group by Student's *t*-test (*P* < 0.05).

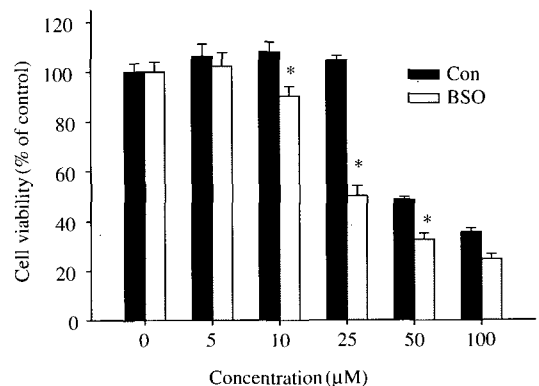


Fig. 10. Effects of L-buthionine sulfoximine on CdCl₂-induced cytotoxicity. L6 myotubes were pretreated with 25 μM BSO for 12 hours and then incubated with 25 μM CdCl₂ for 12 hours. Cytotoxicity of CdCl₂ to L6 myotubes were assessed by the MTT assays as described in experimental methods. *Significantly different from control group by Student's *t*-test (*P* < 0.05).

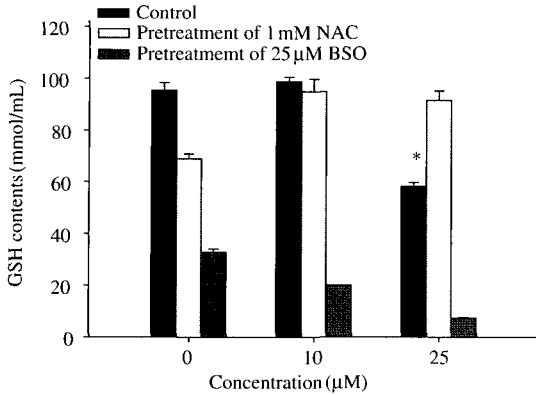


Fig. 11. Effects of CdCl₂ on total glutathione levels in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated with or without NAC or BSO for 12 hours followed by the treatment of CdCl₂ for 12 hours. *Significantly different from control group by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

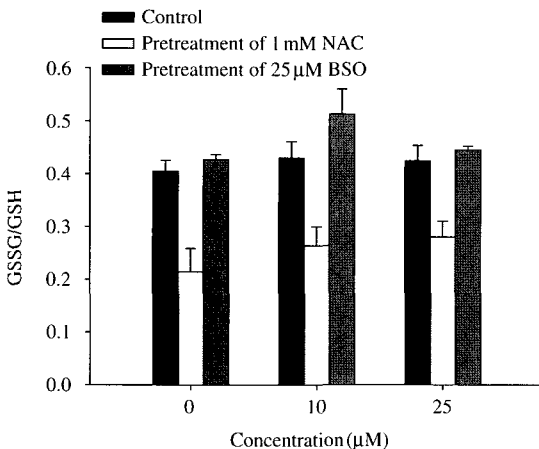


Fig. 12. Effects of CdCl₂ on redox potentials in L6 myotubes. L6 myotubes were incubated with or without NAC or BSO for 12 hours followed by the treatment of CdCl₂ for 12 hours.

처리하였을 때 CdCl₂를 처리하지 않고 NAC만 12 시간 배양한 경우 정상 세포와 비슷한 수준의 GSH가 측정되었으며 10, 25 μM의 CdCl₂와 동시에 처리시 NAC만 처리하였을 때보다 약간 증가함이 관찰되었다. BSO를 동시에 처리한 경우 CdCl₂ 농도별로 현저한 GSH량의 감소가 관찰되었다 (Fig. 11). CdCl₂에 12시간 노출시킨 세포에서의 GSSG/GSH ratio

는 NAC와 CdCl₂을 동시 처리한 세포의 그것에 비해 약 1.5배 높았으며 카드뮴 농도에 상관없이 일정하게 유지되고 있음이 관찰되었다.

고 찰

혈중 포도당 수준의 유지는 생명체에게는 매우 중요한 일이며, 이를 위하여 생명체는 인슐린과 글루카곤이라는 호르몬을 사용한다. 혈당 수준이 높게 올라갔을 때 이를 감소시키기 위해서 작용하는 호르몬이 인슐린이며, 인슐린은 인슐린 반응성 장기의 포도당 수송을 야기하고 수송된 포도당의 대사를 증가시켜 혈당을 일정한 수준으로 유지한다. 각 조직으로의 포도당 수송은 포도당 수송체 (GLUT)라 불리는 당단백을 통해 촉진확산에 의하여 일어나며, 근육조직에는 특히 GLUT1과 GLUT4 isoform이 많이 발현되어 있다. 포도당 수송은 현재, 포도당 수송체의 발현 증가, 내재화성 증가, 세포막으로 전이에 의해 증가하는 것으로 알려져 있지만 아직 그 자세한 기전은 확실히 밝혀지지 않았다. 근육은 전체 포도당의 대부분을 흡수하는 조직으로서(전체 포도당의 약 80% 이상을 대사) 혈당 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 그런데 근육조직은 개개의 세포로 분리되지 않고 조직으로 존재하므로 약물이나 기질의 흡수를 방해하는 diffusional barrier가 존재하며, 분리하였을 때 오랜 시간 활성을 가지지 못하기 때문에 근육조직을 대상으로 실험하는 경우 많은 문제점이 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 이유로 본 실험에서는 L6 근육세포를 사용하여 실험하였다.

L6 근육세포는 랫드의 skeletal muscle cell line이다. L6 myoblast는 monolayer형태로 성장하다가 confluent한 상태가 되면 저절로 fusion되어 mononucleated myoblast에서 multinucleated myotube로 되며 striated muscle fiber를 형성하는 특징을 가지고 있다. Serum에는 differentiation inhibitor가 들어 있으므로 serum의 양을 줄여주면 L6 myotube로 분화가 촉진된다. 분화가 완료된 L6 myocytes에서는 myosin heavy chain이나 creatine kinase와 같은 특징적인 skeletal muscle protein이 증가하게 된다. 또한 대사에 영향을 미치는 여러 호르몬에 대한 감도와 수용체의 발현이 증가한다. 특히 분화가 진

행됨에 따라 수용체의 인슐린 결합능이 증가하며, 인슐린 반응성이 증가한다. L6 myocytes는 형태학적으로나 특성상 근육과 유사하며, 이와 같은 특징 때문에 L6 세포는 인슐린의 작용 기전을 연구하는 *in vitro model*로서 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 유해 환경물질인 CdCl₂가 근육조직에서 포도당 대사에 미치는 영향 및 그 작용기전에 대해 규명하고자 하였다. 먼저 실험에 사용될, cell viability에 영향을 주지 않는 CdCl₂의 농도범위를 정하기 위하여 MTT assay를 하였다. 농도별로 CdCl₂를 처리한 결과 50 µM부터 현저한 세포독성이 나타나기 시작하였으며, 따라서 이후 실험은 세포 생존에 영향을 주지 않는 25 µM 이하의 CdCl₂를 사용하였다(Fig. 1). CdCl₂ 10 µM과 25 µM을 배양 시간을 달리하여 포도당 수송능을 측정된 결과 배양 시간이 길어질수록 포도당 수송 촉진 효과도 증가하였으며 12시간째 최대 효과가 관찰되었다(Fig. 2). CdCl₂를 12시간 동안 L6 근육세포에 처리하고 포도당 수송능을 측정된 결과 카드뎴 농도에 의존적으로 포도당 수송이 촉진되었으며 25 µM에서 최고 효과를 나타내었다(Fig. 3). 이상의 결과로부터 얻어진 포도당 수송능의 증가가 CdCl₂의 세포내 유입에 의한 작용인지를 확인하기 위하여 카드뎴이 세포내로 유입되는 통로인 칼슘채널의 선택적인 저해제인 Nifedipine을 처리한 결과, 카드뎴에 의한 포도당 수송의 증가가 관찰되지 않았다(Fig. 4). 따라서 CdCl₂는 세포독성을 일으키지 않는 µM 수준의 농도에서 근육세포의 포도당 수송능을 증가시키는 것으로 관찰되어 그 기전을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 포도당 수송이 증가되기 위해서는 포도당 수송체의 발현증가, 내재활성의 증가, 세포막으로의 전이등이 증가하여야 한다.

CdCl₂에 의한 포도당 수송의 증가가 포도당 수송체의 세포막으로의 전이를 조절하는 인슐린에 의한 신호 전달 체계와 관련이 있는지를 알아보았다. 인슐린에 의한 포도당 수송체의 전이에는 PI3K가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 또한 최근의 연구에서 Mitogen activated protein kinase (MAPK)도 관여하는 것으로 보고되었다. 따라서 CdCl₂의 작용에 인슐린의 반응 기전이 관여하는지를 알아보기 위해 PI3K의 inhibitor인 wortmannin과 MAPK의 inhibitor인 PD98059를 사용하여 실험하였다. 인슐린에 의한 포도당 수송은 wortmannin과 PD 98059

에 의해 유의적으로 저해되었지만 CdCl₂에 의한 포도당 수송에는 영향을 미치지 못하였다(Fig. 6). 이상의 결과로서 카드뎴은 인슐린과는 다른 기전으로 포도당 수송을 증가시키는 것으로 추정되었다. 다음은 근육내 당대사를 담당하는 또다른 작용인 글리코겐 합성을 측정하여 보았다. 인슐린에 의해서 유의적인 증가를 나타내는 반면에 CdCl₂는 5~25 µM 농도범위 내에서 오히려 기저수준 이하로 감소됨이 관찰되었다(Fig. 7). 인슐린은 포도당 수송과 글리코겐 합성을 모두 증가시키나 CdCl₂는 포도당 수송을 증가시켜 저장보다는 다른 경로로 포도당의 소모가 증가하여 글리코겐 합성을 억제하는 것으로 사료된다. 다음은 포도당 수송체의 발현 및 포도당 수송체의 전이를 증가시키는 인자인 Reactive oxygen species (ROS)와의 관련성을 실험하였다. CdCl₂는 Chinese hamster V57 cell, 신장, 폐에서 hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (HO·)과 같은 각종 ROS를 생성한다고 알려져 있으며 L6 myotubes에서 CdCl₂를 12시간 처리한 후 Dichlorofluorescein의 형광을 통해 ROS 생성을 측정하여 보았다. 5~25 µM에서 CdCl₂에 의한 ROS 생성이 증가되었으며 이는 항산화제인 NAC 1 mM과 동시 처리하였을 경우 나타나지 않았다. 그러나 앞서 실험한 2-DOG uptake에서 CdCl₂이 농도 의존적인 효과를 나타낸 반면 ROS 생성에 있어서는 농도 의존적인 증가는 나타나지 않았다(Fig. 8). CdCl₂에 의한 ROS의 증가가 포도당 수송의 증가와 직접적인 영향을 주는지 규명하기 위하여 세포내 ROS생성을 억제하는 NAC 및 세포내 GSH 고갈 물질인 BSO를 비교하여 2-DOG uptake를 실시하였다. CdCl₂에 의한 포도당 수송 증가는 NAC에 의해 억제되었으며 BSO에 의해서는 포도당의 수송이 정상수준 이하로 떨어졌다(Fig. 9). 이상의 결과에서 CdCl₂에 의한 포도당 수송 촉진은 CdCl₂의 세포내 ROS 생성에 기인한 것으로 추정되며, ROS만의 specific 효과가 아닌 다른 요인이 더 있을 것으로 생각되어 세포내 redox cycle에 작용하는 GSH와의 관련성을 알아보았다.

세포내 GSH 고갈 물질인 BSO (25 µM)을 CdCl₂과 12시간 동시 처리후 MTT assay를 통하여 세포독성을 측정하였다. CdCl₂ 단독 배양시 25 µM 이하에서는 세포생존에 전혀 영향을 주지 않았던 것과는 달리 BSO 동시 처리한 세포의 경우 10 µM부터

세포 독성이 나타나 세포내 GSH 감소가 CdCl₂의 sensitivity를 증가하며 GSH가 세포 생존을 위한 필수적인 역할을 수행할 것으로 생각된다 (Fig. 10). CdCl₂ 처리후 세포내 GSH 함량은 5 μM에서는 증가하고 점차 감소하여 25 μM에서는 현저한 감소를 나타낸다. NAC와 동시 처리의 경우 5 μM, 10 μM에서 증가하고 25 μM에서는 기저수준 정도로 감소하였다 (Fig. 11). 세포내 redox status를 반영하는 GSSG/GSH는 CdCl₂에 노출되어도 일정하게 유지하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 12). CdCl₂은 세포내에서 ROS를 생성시키는 물질로서 50 μM 이상의 농도에서는 세포 독성을 야기한다. CdCl₂독성에 대하여 세포의 생존을 위한 adaptation을 위해 세포내 방어시스템으로 GSH를 사용한다. GSH는 redox cycle을 돌고 있는 물질로서 GSSG와 GSH를 순환하면서 세포내 redox를 일정한 수준으로 유지한다. 외부 ROS를 효과적으로 제거하기 위하여 GSH가 소모되고 일정한 redox status를 유지하기 위하여 GSSG로부터 GSH로 전환이 필요한데 이때 NADPH를 필요로 한다. NADPH는 포도당 대사중 HMP shunt를 통해서만 공급이 되므로 세포 생존을 위해 절대적으로 필요한 redox status를 유지하기 위해서는 원활한 포도당 공급이 필요하다.

카드뎴을 농도별로 처리하였을 경우 초기 농도에서는 GSH 생성을 증가시키나 점점 농도를 증가시킬 경우 세포내 ROS를 효과적으로 제거하기 위해 GSH 사용이 증가되고 일정한 산화 환원계를 유지하기 위해 GSSG로부터 GSH로의 빠른 전환이 필요하다. 카드뎴에 의한 포도당 수송의 증가는 이것에 기인한 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- Augert G and Exton J. Insulin and oxytocin effects on phosphoinositide metabolism in adipocytes. *J Biol Chem* 263: 3600-3609.
- Bannai S, Sato H, Ishii T and Taketani S. Enhancement of glutathione levels in mouse peritoneal macrophages by sodium arsenite, cadmium chloride and glucose/glucose oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1092: 175-9.
- Allen RG. Oxygen reactive species and antioxidant responses during development: The metabolic paradox of cellular differentiation. *Pro Exp Biol Med* 1991; 196: 117-129.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H and Seino S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990; 13: 198-208.
- Caro JF, Hoop O, Pories WJ, Meelheim D, Flickinger EG, Thomas F, Jarquin M. and Silverman JF. Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes - Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase-activity. *J Clin Invest* 1986; 78: 249-258.
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J and Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 4902-4911.
- Cherqui G, Reynet C, Caron M, Melin B, Wicsek D, Clauser E, Capeau J and Picard J. Insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 control insulin stimulation of myristoyldiacylglycerol generation and subsequent activation of glucose transport. *J Biol Chem* 1990; 265: 21254-21261.
- Clarke JF, Young PW, Yonezawa K, Kasuga M and Holman GD. Inhibition of the translocation of GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 cells by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Biochem J* 1994; 300: 631-635.
- Cushman SW and Wardzala LJ. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in isolated rat adipose cell: Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 1980; 255: 4758-4762.
- Ferria RM, Burgos S, Lleusy J, Milei B and Boveris A. Reduction of reperfusion injury with manitol. *Ann horac Surg* 1989; 48: 77-84.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE and Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1989; 264: 2180-2184.
- Gould GW, Jess TJ, Andrews GC, Herbst JJ, Plevin RJ and Gibbs EM. Evidence for a role of phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of glucose transport in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1994; 269: 26622-26625.
- Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2574-2578.
- Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 1994; 219: 713-725.
- Nistan K, Assaf R, Ruth P and Nava B. Reactive oxygen species activate glucose transport in L6 myotubes. *Free*

- Radic Biol Medic 1997a; 23: 859-869.
- Nitan K, Assaf R, Ruth P, Yousuke E and Nava B. Transcriptional activation of the Glut1 gene in response to oxidative stress in L6 myotubes. J Biol Chem 1997b; 272: 33367-33372.
- Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O and Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. J Biochem 1994; 269: 3568-3573.
- Sen CK, Rahkila P and Hanninen O. Glutathione metabolism in skeletal muscle derived cells of the L6 line. Acta Physiol Scand 1993; 148: 21-6.
- Tsakiridis T, Mcdowell H and Walker T. Multiple Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. Endocrinology 1995; 136: 4315-4322.
- Ulla H.D, John W, Niall FM, Nicholas AK, Jane M and Derek JJ. Cadmium-inducible Expression of the Yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network. J Biol Chem 2000; 275: 32611-32616.
- Whitman M, Dowens CP, Keeler M, Keller T and Cantley I. Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. Nature 1988; 332: 644-646.