

3T3-L1 지방세포주에서 포도당 수송에 미치는 CdCl₂의 영향

강동희*, 길이룡^{1,*}, 박광식², 이병훈, 문창규*

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

Effects of Cadmium on Glucose Transport in 3T3-L1 adipocytes

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

Cadmium is well known as a toxic metal and has insulin mimicking effects in rat adipose tissue. This study was undertaken to investigate the effect of CdCl₂ on glucose transport and its mechanism in 3T3-L1 adipocytes. CdCl₂ exhibits respectively 2.2 and 2.8 fold increases in the 2-deoxyglucose uptake when exposed to 10 and 25 μM of CdCl₂ for 12 hr. To investigate the stimulating mechanism of glucose transport induced by CdCl₂, Wortmannin and PD98059 were used respectively as PI3K inhibitor and MAPK inhibitor, which did not affect 2-DOG uptake. This results suggest that induced 2-deoxy-(1-³H)-D-glucose (2-DOG) uptake by CdCl₂ may not be concerned with the insulin signalling pathway. Whereas nifedipine, a calcium channel blocker inhibited the 2-DOG uptake stimulated by CdCl₂. In addition, we also measured the increased production of Reactive oxygen substances (ROS) and glutathione (GSH) level in 3T3-L1 adipocytes to investigate correlation between the glucose uptake and increased production of ROS with H2DCFDA. CdCl₂ increased production of ROS. Induced 2-DOG uptake and increased production of ROS by CdCl₂ were decreased by N-acetylcystein (NAC). And L-buthionine sulfoximine (BSO) a potent inhibitor of γ-GCS, decreased of 2-DOG uptake. Also NAC and BSO changed the cellular GSH level, but GSH/GSSG ratio remained unchanged at 10, 25 μM of CdCl₂.

Key words : cadmium, 3T3-L1 adipocytes, reactive oxygen species, glutathione, redox state

서 론

* 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

카드뮴은 2가 금속이온의 하나로 필수 금속은 아니지만 모든 조직에 존재하는데, 구리를 제외한

다른 필수 금속보다 더 강하게 황과 결합한다. 카드뮴이 생체내 포도당 대사에 미치는 영향으로는, CdCl₂를 마우스에 복강주사 하였을 경우 췌장의 β cell의 분비기능을 감소시켜 hyperglycemia를 유발하며 (Ghafghazi and Mennear, 1973), CdCl₂를 21일 또는 45일간 랫드에 복강투여시 간장의 pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1, 6-diphosphatase와 glucose-6-phosphatase의 활성을 증가시키며 (Singhal *et al.*, 1976), 닭의 배아세포에서도 2-deoxy-D-glucose uptake를 증가시킨다 (Rubin, 1975). 또한 CdCl₂를 7일간 하루에 두 번 랫드에 피하 주사시에도 (1.0 mg/kg), 간장의 cAMP와 혈중 glucose를 증가시키며, 현저하게 인슐린 농도를 감소시키며, 아급성으로 카드뮴에 노출된 경우 췌장의 분비기능 저하로 인한 glucose intolerance를 일으킨다는 보고가 있다 (Merali and Singhal, 1975). CdCl₂에 노출된 랫드의 지방세포에서 lipogenesis가 증가하였으며 (Yamamoto *et al.*, 1984), teleost fish를 카드뮴에 0.26 mg/L로 60일 동안 만성적으로 노출시킬 경우 고혈당증과 고락테이트산증이 나타났다 (Sastry and Subhadra, 1982).

한편, 포도당 수송은 동화 호르몬인 인슐린 뿐만 아니라 H₂O₂와 같은 ROS (reactive oxygen species)에 의해서도 PKB 및 MAPKinase와 stress signaling pathway를 포함한 각종 tyrosine phosphorylation 활성화를 통해 포도당 수송을 촉진한다 (Clark *et al.*, 1998). ROS와 관련하여 Glutathione은 중요한 항산화 물질로서 oxidants나 중금속, 농약 등으로 인한 free radical과 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 synthase (γ -GCS)와 GSH reductase의 감소에 기인한 것으로 oxidative stress의 marker로 이용되기도 한다. 생성된 내부 GSSG는 glutathione reductase (GRD)에 의해 다시 GSH로 환원되거나 세포 밖으로 방출된다. 이때 GSH로의 환원은 NADPH에 의존적이며 NADPH는 pentose phosphate pathway를 통해 공급되며 세포내로 유입된 glucose의 glucose 6-phosph-

hate로의 변환을 통해 활성화된다. 납, 수은, 니켈과 더불어 카드뮴에 노출시 nitric oxide (NO \cdot), superoxide anion (O₂ \cdot), hydrogen peroxide (H₂O₂)와 hydroxyl radicals (HO \cdot) 등의 ROS가 생성되어 glutathione과 protein-bound sulfhydryl group을 감소시켜 lipid peroxidation, DNA single strand breaks와 칼슘 항상성을 파괴시킨다 (Ezdihar and Sidnye, 1996; Erzsebet *et al.*, 2001)

따라서 본 연구는, 카드뮴이 체내 포도당 대사의 primary target tissue인 지방세포에서 포도당 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3T3-L1 adipocytes에서 2-DOG uptake의 변화 및 그 기전에 대해서 알아보려고 하였다. 지방세포는 높은 지방 함유로 인해 medium 위에 떠있어서 영양공급과 물질투여시 동일하게 이루어지지 않을 수 있으며, 충분한 공급 또한 이루어지지 않을 수 있다. Morphological 변화 역시 관찰하기 어려우며 지방세포의 대부분이 incubation 72시간 내에 cell lysis가 이루어지는 등의 단점이 있다. 본 실험에 사용한 3T3-L1 adipocytes에는 지방세포에서의 당 수송 측정 실험에서 가장 많이 사용되는 세포주로 3T3-F442a와 더불어 분화를 유도할 수 있어서 지방세포 관련 연구를 위한 cell culture에 많이 쓰인다. 그러나 분화된 3T3-L1은 전형적으로 single large lipid droplet을 가지는 성숙한 지방세포와는 달리 cytoplasm에 multiple lipid droplets이 있다. 3T3-L1 adipocytes는 GLUT1, GLUT4와 같은 여러 포도당 수송체가 발현되어 있으며 isobutylmethyl xanthine, dexamethasone과 인슐린의 혼합액을 처리하면 분화되어 인슐린 receptor를 발현시켜 인슐린에 대한 반응성이 증가된다. 또한 분화가 되면 GLUT1 뿐만 아니라 GLUT4 발현이 증가되어 인슐린에 대한 반응성이 더욱 높아져 인슐린 반응성 실험에 많이 사용되고 있다 (Hynes and Bye, 1974; Green and Meuth, 1974).

실험 방법

3T3-L1 지방세포주의 배양

한국 세포주 은행에서 분양 받은 3T3-L1 지방세포를 해동 직후, 37°C에서 미리 가온한 DMEM-10 배지 10 mL에 신속하게 넣은 후 1,800 rpm에서

5분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 freezing medium내의 DMSO를 제거하였다. Tapping을 한 후 다시 배지를 10 mL 가해주어 세포를 재현탁 시켰다. 100 mm culture dish에 세포 현탁액 10 mL을 가한 후 humidified 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 세포배양에 이용되는 모든 시약과 기구는 멸균조작을 거친 것을 사용하였다.

포도당 수송능 측정

세포를 12 well culture dish에 seeding하여 완전히 분화시킨 후 2시간 동안 DMEM-0 배지로 교환하여 serum을 depletion 시킨다. 제시된 농도의 시료를 세포 배양액에 가하고 일정 시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배지를 제거한 후, 미리 37°C로 가온한 KRH (Krebs-Ringer Hepes buffer: 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 5 mM Na₂HPO₄, 20 mM HEPES, pH 7.4, filtration)로 2회 세척하여 배지 안에 존재하는 glucose를 제거하였다. 각 well에 KRH 1 mL를 가하고 [³H]-2-deoxyglucose (3.2 μCi/nmol) 25 μL를 가하여 0.125 mM가 되도록 하고, 5분 후 [³H]-2-deoxyglucose를 포함한 KRH를 신속히 제거하고 빙냉한 PBS를 가함으로써 반응을 정지시켰다. 빙냉한 PBS로 2회 더 세척한 후, oven에서 30분 동안 건조 후 세포 표면의 물기를 완전히 제거하였다.

Cell lysis buffer (1% SDS, 0.2N NaOH) 1 mL를 가하여 Rocker (Vision, speed control 최대)에 놓고 흔들어주면서 over-night 처리하여 세포를 녹인 후, 일부는 단백질 정량에 사용하고 나머지 800 μL는 Ultima Gold cocktail (Packard Bioscience Company) 3 mL를 넣고 voltex하여 균일하게 섞어준 후, liquid scintillation counter (LKB 1211 Rackbeta, Pharmacia LKB, Finland)로 radioactivity를 측정하였다.

세포 독성의 측정

MTT assay는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)로 세포독성을 측정하였다. 간단히 설명하면 24 well flat bottomed plate에 4 × 10⁴ cells/mL로 맞춘 3T3-L1 지방세포 현탁액 400 μL를 가한 후 완전히 분화시키고 실험전 DMEM-0 배지로 2시간 처리하여 serum depletion 후 각 농도의 시료를 가하여 총 400 μL로

하여 5% CO₂ incubator에서 일정시간 동안 배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT 용액 100 μL를 가하여 4시간 더 배양하여 salt를 석출시킨 후, 세포 손실이 적도록 조심하며 상등액을 aspiration하여 제거한 후 Extration buffer (DMSO : EtOH = 1 : 1)를 각 well에 600 μL씩 가하고 rotomix (Thermolyne, type 50800, speed 6)로 15분간 mix하여 생성된 formazan 결정을 완전히 녹이고, ELISA reader (Multiskan MCC/340P, Titertek)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 확인하였다.

지방 합성 측정

세포를 6 well culture dish에 seeding하여 완전히 분화시킨 후 실험전 DMEM-0 배지에서 2시간 배양하여 serum을 제거한다. 제시된 농도의 시료를 일정시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. KRH buffer로 2번 washing한 후 [U-¹⁴C] glucose (1 mL, 5 mM glucose in KRH; 1.25 μCi/mL)를 함유하는 배지로 교환한 후 1시간 방치하였다. 빙냉한 PBS로 2회 더 세척한 후, oven에서 30분 동안 건조 후 세포 표면의 물기를 완전히 제거하였다. Cell lysis buffer (1% SDS, 0.2N NaOH) 1 mL를 가하여 Rocker (Vision, speed control 최대)에서 4시간 처리하여 세포를 녹인 후, Dole's lipid extraction sloution 3 mL를 넣은 후 2시간 동안 shaking 후 Heptane과 DW를 각각 3 mL 넣는다. Pasteur pipette으로 수층을 제거한 후 DW로 2번 더 washing한다. 남은 기름층을 LSC vial에 옮겨 담은 후 하루 동안 후드 안에 방치하여 유기용매를 날려 버리고 Ultima Gold cocktail (Packard Bioscience Company) 3 mL를 넣고, voltex하여 균일하게 섞어준 후 liquid scintillation counter (LKB 1211 Rackbeta, Pharmacia LKB, Finland)로 radioactivity를 측정하였다.

활성산소 라디칼 (ROS) 및 세포내 글루타치온 정량

Dichlorofluorescein diacetates는 내부 esterases에 의해 잘려진 후 reactive oxygen의 존재하에서 형광을 발하는 물질로 전환이 된다. 이를 confocal microscopy를 이용하여 image를 촬영하였다. 세포를 8 well culture dish에 seeding하여 완전히 분화시킨 후 DMEM-0로 2시간 배양하여 serum을 제거한

다. 제시된 농도의 시료를 세포 배양액에 가하고 일정 시간 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후, 미리 가온한 Krebs's Ringer solution으로 두 번 washing 한다. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (1 mg/mL DMSO : 용시조제)를 Krebs's Ringer solution에 1 µg/mL 농도로 만들어 well 당 200 µL씩 가하여 15 분간 더 배양하였다. 530 nm 부근에서 wide하게 측정하였다. 이때 화합물이 불안정하므로 오래 방치하지 않도록 주의하여야 한다. 6 well plate에 3T3-L1 지방세포 4 × 10⁴ cells/mL 현탁액 2 mL를 가하여 후 완전히 분화시킨 후 DMEM-0 배지에서 2시간 배양하여 serum을 제거하고 각 농도의 카드뮴 및 시료를 가하여 12시간 동안 배양 후 PBS로 두 번 세척하고 0.2% Triton X-100 (in PBS) 1 mL를 가하여 5분 방치하여 세포를 용해시켰다. 이를 EP tube로 옮겨서 13,000 rpm에서 5분간 4°C 하에서 원심분리한 후 상등액을 취하였다. GSH 측정은 상등액 10 µL를 취해 미리 멸균시킨 증류수 90 µL와 함께 96well flat bottomed plate에 넣고(triplet) 다음의 반응액을 0 µL 넣은 후 2분 동안 15초 간격으로 405 nM에서 흡광도를 측정하였다. GSH 표준품을 0-30 µM 농도범위로 만들어 standard curve를 잡아주었다. GSSG 측정은 상등액 130 µL를 취하여 EP tube로 옮긴 후 2-vinyl pyridine 5 µL를 넣어 1시간 동안 incubation하여 GSH를 침전시킨 후 침전액을 피하여 상등액을 10 µL 취하여 위와 같이 실험하였다.

실험 결과

카드뮴의 세포독성

3T3-L1 지방세포에 CdCl₂를 12시간 처리한 후 MTT assay로 세포 독성을 측정된 결과, 5, 10, 25 µM에서는 cell viability에 영향을 주지 않았으나 50 µM 이상의 농도에서부터 현격한 세포독성을 나타내었다(Fig. 1).

3T3-L1 지방세포에서의 포도당 수송에 미치는 카드뮴의 영향

MTT assay에서 유의적인 세포독성을 나타내지 않았던 범위의 CdCl₂를 농도별로 처리하여 2-DOG uptake를 측정된 결과 농도 의존적인 포도당 수송 증가가 관찰되었으며 25 µM에서 최대 효과를

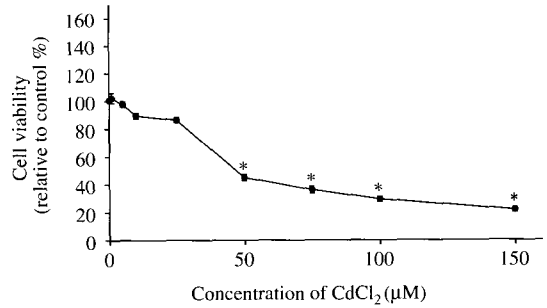


Fig. 1. Cell viability of 3T3-L1 adipocytes exposed to CdCl₂. 3T3-L1 adipocytes were incubated for 12 hours at 37°C at various concentrations of CdCl₂. MTT solution was added to culture medium followed by the incubation for 4 hours. After incubation, supernatants in each well were removed and salt products were dissolved in the extraction buffer and allowed to be incubated for 15 minutes. Absorbance was read by ELISA reader at 540 nm.

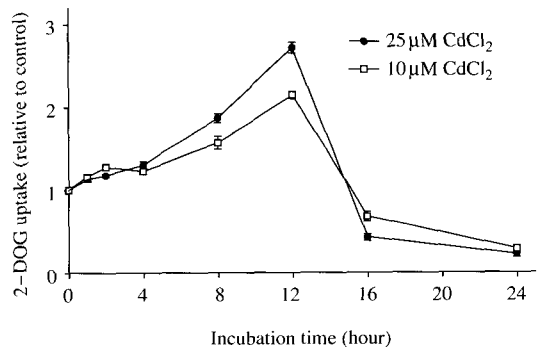


Fig. 2. Time course of 2-DOG uptake induced by CdCl₂ in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with 10 µM or 25 µM of CdCl₂. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods.

보였다(Fig. 3). CdCl₂는 10 µM과 25 µM의 농도에서 incubation time이 늘어남에 따라 포도당 수송도 증가시켰으며 12시간에서 최대 효과를 나타내었다(Fig. 2). L-type voltage-sensitive 칼슘 채널 차단제인 Nifedipine 5 µM을 카드뮴과 함께 처리하였을 경우 CdCl₂에 의한 포도당 수송 촉진작용이 기저 상태 수준으로 억제되었다(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 µM

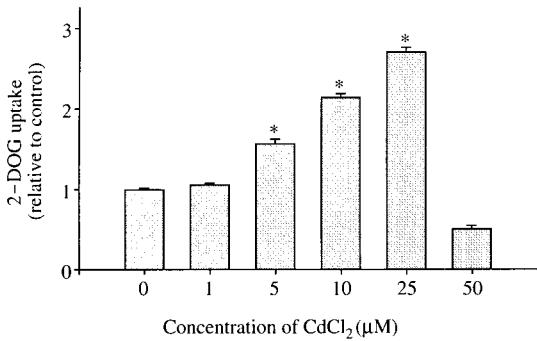


Fig. 3. Effects of CdCl₂ on 2-DOG uptake in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with CdCl₂ for 12 hours at indicated concentrations. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods.

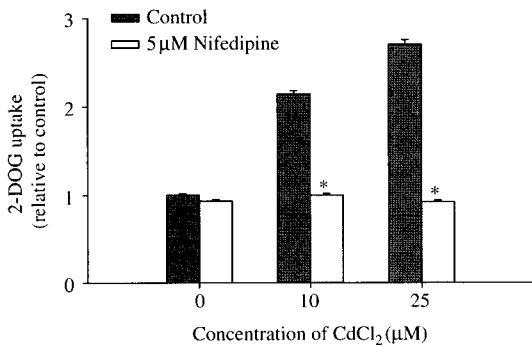


Fig. 4. Effects of Nifedipine on CdCl₂ stimulated 2-DOG uptake in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with 10 or 25 μM of CdCl₂ for 12 hours with or without Nifedipine 5 μM. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods.

과 25 μM 모두에서 카드뮴과 인슐린 동시처리로 인한 additive effect는 관찰되지 않았다 (Fig. 5). 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 수송 증가가 억제됨이 밝혀졌다(Gould *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1994; Tsakiridis *et al.*, 1995). 따라서 CdCl₂에 의한 포도당 수송의 증가가 인슐린 pathway와 유사하게 경유하는지 알아보기 위하여 wortmannin을 100 nM로 30분 처리하였다. 그 결과 wortmannin은 CdCl₂에 의한 포도당 수송 증가

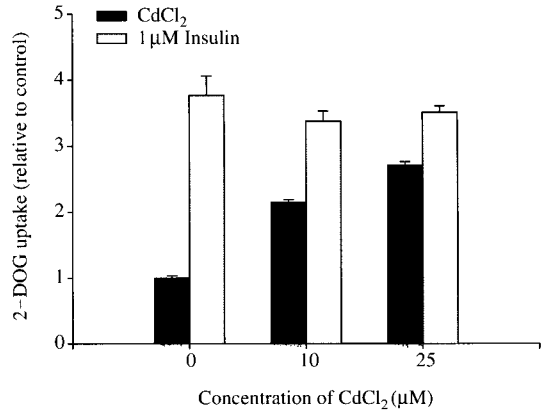


Fig. 5. Insulin sensitizing effects of CdCl₂ in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with 10 μM or 25 μM of CdCl₂ for 12 hours. After insulin 1 μM was added for 30 min, 2-DOG uptake was described in experimental methods.

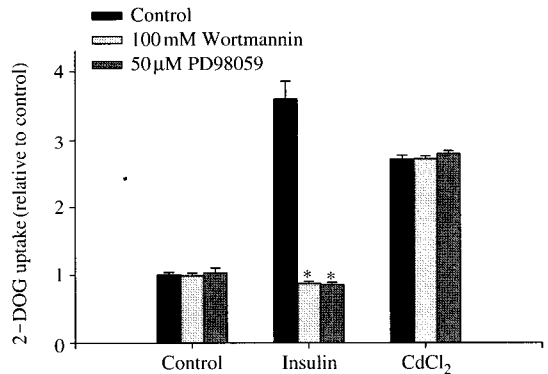


Fig. 6. Effect of Wortmannin and PD98059 on CdCl₂-induced 2-DOG uptake in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with CdCl₂ 25 μM for 12 hours. Wortmannin 100 nM or PD98059 50 μM was added with or without insulin 1 μM for 30 min. 2-DOG uptake was measured as described in experimental methods.

에는 유의적인 영향을 미치지 못하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 6).

카드뮴의 포도당 수송능과 Mitogen activated protein kinase (MAPK)와의 상관성

MAP kinase kinase (MEK)를 강력하게 억제하여 MAPK의 인산화를 저해하여 이의 활성화를 억제

함으로 MAPK가 관여하는 경로를 차단하는 것으로 알려진 PD98059를 50 μM 처리시 인슐린에 의

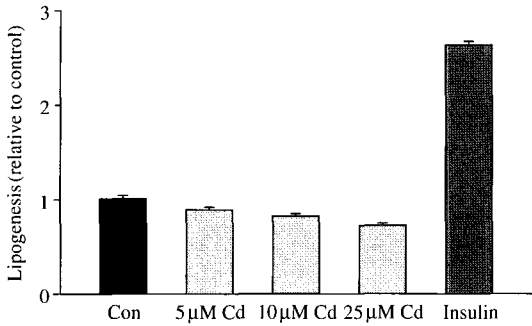


Fig. 7. Effect of CdCl_2 on lipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were treated with CdCl_2 at the indicated concentrations for 12 hours. After with or without insulin 1 μM for 30 min, lipogenesis was measured as described in experimental methods.

한 포도당 수송은 유의적으로 억제되었으나, CdCl_2 에 의한 포도당 수송 증가는 억제되지 않았다(Fig. 6). 지방세포에 존재하는 포도당 대사의 하나인 지방합성에 미치는 CdCl_2 의 영향을 인슐린과 비교하여 보았다. 인슐린에 의한 지방 합성은 기저 상태보다 약 2.8배 이상 증가하였으나 CdCl_2 의 경우 5, 10, 25 μM 의 농도에서 지방합성의 억제가 관찰되었다(Fig. 7).

카드뮴의 포도당 수송능과 활성산소 라디칼의 영향

CdCl_2 에 의한 포도당 수송의 증가가 세포내 oxidative stress에 의한 것인지를 알아보기 위하여 CdCl_2 을 12시간 처리한 후 세포내 활성산소 라디칼을 Dichlorofluorescein dye를 이용하여 confocal microscopy로 사진 촬영하였다. 10, 25 μM 에서 활성산소 라디칼 생성 증가가 관찰되었으며, 항산화

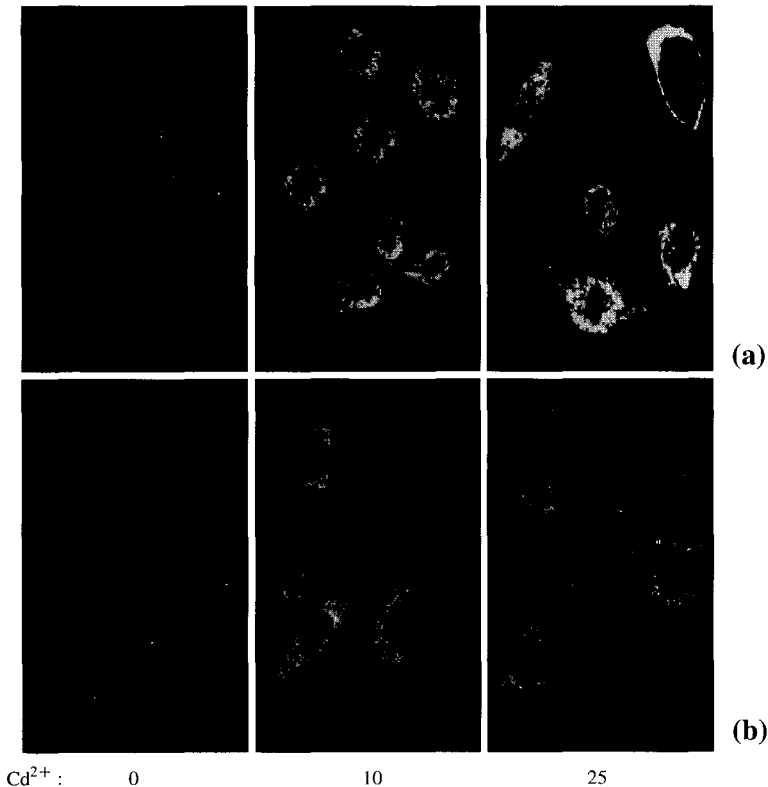


Fig. 8. Effect of CdCl_2 on production of ROS in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with CdCl_2 with (b) or without NAC (1 mM) (a). Increased production of ROS was measured as described in experimental methods.

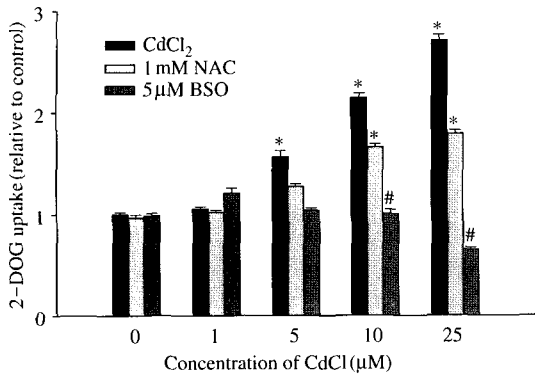


Fig. 9. Effects of N-acetylcysteine or L-buthionine sulfoximine on CdCl₂-induced 2-DOG uptake in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with CdCl₂ for 12 hours with or without NAC 1 mM or BSO 5 μM. 2-DOG uptake was measured as described experimental methods.

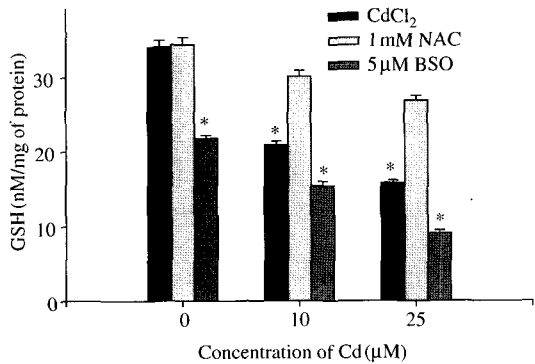


Fig. 10. Effects of CdCl₂ on total glutathione levels in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with CdCl₂ for 12 hours with or without NAC (1 mM) or BSO (5 μM). GSH was measured as described experimental methods.

제의 일종인 N-acetylcysteine (NAC) 1 mM을 CdCl₂와 동시 처리한 경우, CdCl₂에 의한 활성산소 라디칼 생성 증가가 억제되었다 (Fig. 8). CdCl₂에 의한 포도당 수송의 증가가 CdCl₂에 의한 활성산소 라디칼 생성증가에 기인한 것인지를 알아보기 위하여 GSH 전구물질인 N-acetylcysteine (NAC) 1 mM과 세포내 GSH 고갈물질인 L-buthionine sulfoximine (BSO) 5 μM을 CdCl₂과 동시 처리하여 포도당 수송을 비교하였다. NAC를 동시 처리한 경우

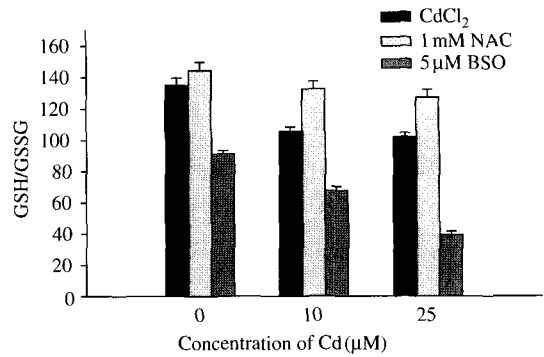


Fig. 11. Effects of CdCl₂ on redox potentials in 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated with 10 or 25 μM of CdCl₂ for 12 hours with or without NAC 1 mM or BSO 5 μM. GSH and GSSG were measured as described experimental methods.

CdCl₂에 의한 포도당 수송 증가가 감소되었으며, BSO를 동시 처리한 경우는 오히려 기저 수준 이하로 떨어짐이 관찰 되었다 (Fig. 9). 3T3-L1 지방 세포에서 CdCl₂에 의한 세포 독성으로부터 보호하는 중요한 물질인 GSH 함량을 CdCl₂의 농도별로 측정하였다. CdCl₂의 농도가 증가함에 따라 GSH 함량이 감소하여 25 μM에서는 약 50% 정도의 감소가 관찰되었다. NAC와 동시 처리하였을 때, CdCl₂를 처리하지 않고 NAC만 12시간 배양한 경우 정상 세포와 비슷한 수준의 GSH가 측정되었으며 10, 25 μM의 CdCl₂와 동시 처리시 NAC만 처리하였을 때보다 약간 감소됨이 관찰되었다. BSO를 동시 처리한 경우 CdCl₂ 농도별로 현저한 GSH량의 감소가 관찰되었다 (Fig. 10). CdCl₂에 12시간 노출시킨 세포에서의 GSH/GSSG ratio는 기저수준보다 약 20% 가량 감소하였지만, CdCl₂ 농도가 10, 25 μM 증가하여도 일정하게 유지되고 있음을 볼 수 있었다. NAC와 CdCl₂을 동시 처리한 경우에는 아무것도 처리하지 않은 세포와 비슷하게 GSH/GSSG ratio가 유지되고 있음이 관찰되었다 (Fig. 11).

고 찰

지방조직은 근육과 더불어 포도당 대사가 이루어지는 주요 조직의 하나로 혈당조절에 매우 중요한 역할을 한다 (Bell *et al.*, 1990). 3T3-L1 지방세

또는 Swiss albino mouse의 embryo로 fibroblast-like 형태의 모양을 가지며, 급속하게 나뉘어져 confluent 상태가 되어 inhibited state로 진행하면서 pre-adipose에서 adipose-like로 바뀌게 된다. 배양액중의 serum 농도가 높아지면 fat accumulation이 급속하게 다량 이루어지며 분화한다. 배양액에 IBMX, 즉 isobutylmethylxanthine, dexamethasone, insulin의 혼합액을 넣어주면 분화가 촉진된다. lipid droplet이 85~90% 이상 보여지면 분화가 완료된 것으로 본다. 분화가 완료되면 대사에 영향을 미치는 여러 호르몬에 대한 감도와 수용체의 발현이 증가하며 특히 인슐린 자극에 반응할 수 있는 인슐린 수용체 발현이 증가하여 인슐린작용 기전을 연구하는 in vitro model로서 많이 이용되고 있다 (Hynes and Bye, 1974; Green and Meuth, 1974).

CdCl₂가 세포독성을 일으키지 않는 μM 수준의 농도에서 지방세포의 포도당 수송을 증가시키는 것으로 관찰되어 그 기전을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 포도당 수송이 증가되기 위해서는 포도당 수송체의 발현증가, 내재활성의 증가, 세포막으로의 전이 등이 증가하여야 한다. 인슐린에 의한 포도당 수송체의 전이에는 PI3K가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 또한 Mitogen activated protein kinase (MAPK)도 관여하는 것으로 보고 되었다 (Backer *et al.*, 1992; Cheatham *et al.*, 1994; Gould *et al.*, 1994). 따라서 CdCl₂의 작용에 인슐린의 반응 기전이 관여하는지를 알아보기 위해 PI3K의 inhibitor인 wortmannin과 MAPK의 inhibitor인 PD98059를 사용하여 실험하였다. 인슐린에 의한 포도당 수송은 wortmannin과 PD98059에 의해 유의적으로 저해되었지만 CdCl₂에 의한 포도당 수송에는 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 6). 이상의 결과로서 카드뮴은 인슐린과는 다른 기전으로 포도당 수송을 증가시키는 것으로 추정되었다.

지방세포내로 유입된 당이 lipogenesis를 거쳐 세포내에 저장되는데 있어 카드뮴의 영향을 살펴보았다. 인슐린에 의해서 lipogenesis가 약 2.8배 가량 증가하는 반면에 CdCl₂는 10, 25 μM 농도범위 내에서 오히려 기저수준 이하로 감소됨이 관찰되었다 (Fig. 7). 따라서 인슐린은 포도당 수송과 lipogenesis를 모두 증가시키나, CdCl₂는 포도당 수송을 증가시켜 저장보다는 다른 경로를 통하여 포도당을 소모하여 lipogenesis를 억제하는 것으로 사료된다.

CdCl₂가 ROS에 미치는 영향을 Dichlorodihydrofluorescein dye를 써서 confocal microscopy로 실험한 결과 10, 25 μM 에서 CdCl₂에 의한 ROS 생성이 증가되었으며 이는 항산화제인 NAC 1 mM과 동시 처리하였을 경우 억제되었다. CdCl₂에 의한 포도당 수송 증가는 NAC처리에 의해 GSH 합성이 증가한 경우 그 증가량이 감소하였으며, BSO 처리에 의해 GSH 합성이 감소한 경우 오히려 basal 이하로 떨어졌다 (Fig. 9). 이를 통해 카드뮴에 의한 DOG uptake증가는 ROS 및 세포내 GSH 합성과 관련 있을 것으로 추정된다 (Kovalovsky *et al.*, 1997a, b; Lena *et al.*, 2001).

CdCl₂ 처리후 세포내 GSH 함량은 10, 25 μM 에서 현저한 감소를 나타낸다. NAC와 동시 처리의 경우 그 감소폭이 적었으며 BSO 처리에 의해서는 기저수준 이하로 현저히 떨어졌다 (Fig. 10). 세포내 redox status를 반영하는 GSH/GSSG ratio는 CdCl₂에 노출되면 oxidative stress로 인해 감소하지만 CdCl₂ 농도가 10, 25 μM 로 증가하여도 일정하게 유지하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 11). 외부 ROS를 효과적으로 제거하기 위하여 GSH가 소모되고 일정한 redox status를 유지하기 위하여 GSSG로부터 GSH로 전환이 필요한데 이때 NADPH를 필요로 한다. NADPH는 포도당 대사중 Pentose phosphate pathway를 통해서만 공급이 되며 이 경로는 특히 지방산 합성이 많은 지방조직과 스테로이드 합성이 많은 간에 활성화 되어있다 (Bannai *et al.*, 1991). 따라서 세포 생존을 위해 절대적으로 필요한 redox status를 유지하기 위해서는 원활한 포도당 공급이 필요하다. CdCl₂를 농도별로 처리하였을 경우 세포내 증가된 ROS를 효과적으로 제거하기 위해 GSH 사용이 증가되고, 일정한 산화 환원계를 유지하기 위해 GSSG로부터 GSH로의 빠른 전환이 필요하다. 카드뮴에 의한 포도당 수송의 증가는 이것에 기인하는 것으로 사료된다.

결론적으로 카드뮴의 포도당 수송능 증가는 인슐린의 반응 경로와는 다른 경로를 통해 이루어지는 것으로 사료된다. 카드뮴에 의한 포도당 수송 증가 기전을 규명하기 위해 실시한 실험에서 CdCl₂ (10 μM , 25 μM)는 세포내 ROS 생성을 증가시켰으며 또한 세포내 GSH 함량도 변화시키는 것으로 확인되었다. 그러나 GSH/GSSG ratio는 oxidative stress 발생으로 인해 기저수준 보다 감소하였지만,

10 μ M, 25 μ M에서 일정하게 유지되는 것으로 관찰되었다. 따라서 CdCl₂에 기인한 포도당 수송의 증가는 CdCl₂에 의해 생성된 oxidative stress로부터 세포를 방어하기 위한 antioxidant defense mechanism의 활성화에 필요한 포도당 공급을 위한 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Backer JM, Myers MG, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix HP, Margolis B, Skoink EY, Schlessinger J and White MF. The phosphatidylinositol 3-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 1992; 11: 3469-3479.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Erzsebet T, Zuzana K and Aranka H. Gyorgy Comparative in vitro toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 479-483.
- Ezdihar AH and Sidney JS. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A.1 cell cultures. *Toxicol* 1996; 112: 219-226.
- Ghaghazi T and Mennear JH. Effects of acute and subacute cadmium administration on carbohydrate metabolism in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 26: 231-240.
- Green H and Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* 1974; 3(2): 127-33.
- 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.
- Hynes RO and Bye JM. Density and cell cycle dependence of cell surface proteins in hamster fibroblasts. *Cell* 1974; 3(2): 113-20.
- Kozlovsky N, Rudich A, Potashnik R and Bashan N. Reactive oxygen species activate glucose transport in L6 myotubes. *Free Radic Biol Med* 1997; 23(6): 859-69.
- Kozlovsky N, Rudich A, Potashnik R, Ebina Y, Murakami T and Bashan N. Transcriptional activation of the Glut1 gene in response to oxidative stress in L6 myotubes. *J Biol Chem* 1997; 272(52): 33367-72.
- Lena F, Ulf F and Ralf M. Oxidative Stress, Human Genetic Variation, and Disease. *Arch Biochem Biophys* 2001; 389(1): 84-93.
- Merali Z and Singhal RL. Protective effect of selenium on certain hepatotoxic and pancreatotoxic manifestations of subacute cadmium administration. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 195(1): 58-66.
- Merali Z and Singhal RL. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium administration to neonatal rats. *Br J Pharmacol* 1980; 69: 151-157.
- Rubin H. Nonspecific nature of the stimulus to DNA synthesis in cultures of chick embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1975; 72(5): 1676-80.
- Sastry KV and Subhadra K. Effect of cadmium on some aspects of carbohydrate metabolism in a freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*. *Toxicol Lett* 1982; 14(1-2): 45-55.
- Singhal RL, Merali Z and Hrdina PD. Aspects of the biochemical toxicology of cadmium. *Fed Proc* 1976; 35: 75-80.
- 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.
- Whitman M, Kaplan D, Robert T and Cantley I. Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts: implications for cellular regulation. *Biochem J* 1987; 247: 165-174.
- 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.
- Yamamoto A, Wada O, Ono T, Ono H, Manabe S and Ishikawa S. Cadmium-induced stimulation of lipogenesis from glucose in rat adipocytes. *Biochem J* 1984; 219(3): 979-84.