

Protein kinase A 억제제인 KT5720이 글루카곤 매개성 항산화 효소의 발현감소에 미치는 영향

오수진^{1,2}, 조재훈¹, 박창식², 김상겸^{1,2}, 김봉희^{1,*}

¹충남대학교 약학대학, ²충남대학교 형질전환 복제돼지 센터

Effects of the Protein Kinase A Inhibitor KT5720 on Glucagon-Mediated Decrease in Expression of Antioxidant Enzymes

Soo Jin Oh^{1,2}, Jaehoon Jo¹, Chang Sik Park²,
Sang Kyum Kim^{1,2} and Bong-Hee Kim^{1,*}

¹College of Pharmacy, ²Research Center for Transgenic Cloned Pigs,
Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

ABSTRACT

We reported previously that glucagon decreased alpha- and pi-class glutathione S-transferases (GSTs) and microsomal epoxide hydrolase (mEH) protein levels in primary cultured rat hepatocytes. The present study examines the effects of protein kinase A (PKA) inhibitor, KT5720, on the glucagon-mediated decrease in expression of GSTs and mEH. To assess cell viability, lactate dehydrogenase release and MTT activity were examined in hepatocytes treated KT5720. Cell viability was significantly decreased in a concentration-dependent manner after incubation with KT5720 at the concentrations of 1 μ M or above for 24 h, which was inhibited by the cytochrome P450 inhibitor SKF-525A. In contrast, another PKA inhibitor H89 (up to 25 μ M) was not toxic to hepatocytes. The glucagon-mediated decrease in expression of alpha- and pi-class GSTs and mEH was completely inhibited by 25 μ M H89 and attenuated by 0.1 μ M KT5720. This study demonstrates that KT5720 may cause cytotoxicity in rat hepatocytes through cytochrome P450-dependent bioactivation. The present study implicates PKA in mediating the inhibitory effect of glucagon on expression of alpha- and pi-class GSTs and mEH.

Key words : KT5720, glucagon, protein kinase A, glutathione S-transferase, microsomal epoxide hydrolase

서 론

대표적인 대사질환인 당뇨병(diabetes mellitus)에서 심혈관계질환, 신장질환, 신경계 질환 등 다양한

조직 손상이 합병증으로 나타난다. 당뇨 상태에서 관찰되는 산화적 스트레스(oxidative stress)는 만성적인 당뇨 합병증의 주요한 원인으로 보고되고 있다(Baynes and Thorpe, 1999; West, 2000). 또한 당뇨와 인슐린 저항성(insulin resistance)은 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis)환자에게서 빈번히 관찰되어 이들 질환의 관련성이 주목을

* To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-42-821-5935, E-mail: bhkimnh@cnu.ac.kr

받고 있다(Neuschwander-Tetri and Caldwell, 2003).

산화적 스트레스는 산화성물질(oxidant and pro-oxidant)과 항산화 물질(antioxidant)의 평형이 교란되어 산화적 반응이 우세하고 결과적으로 조직 손상을 유발할 수 있는 상태로 정의된다(Sies, 1985). 생체의 항산화 체계는 저분자의 항산화 물질과 항산화 효소로 구성되며 각각의 항산화 물질과 효소는 협동적으로 산화적 스트레스에 대항한다(Yu, 1994). 특히, glutathione(GSH)와 GSH를 기질로 사용하는 GSH S-transferase(GST) 및 GSH peroxidase/reductase 등은 활성산소종(reactive oxygen species)과 친전자성 물질(electrophile)을 무독화시킬 뿐만 아니라 산화된 단백질, vitamin C와 E 등을 환원시킴으로써 체내 항산화 활성의 중심축을 구성한다(Meister, 1994). Microsomal epoxide hydrolase(mEH) 역시 epoxide 등 반응성이 강한 물질에 물분자를 trans-addition시킴으로써 항산화 작용을 매개한다. 유전적 다형성(genetic polymorphism) 연구결과는 GST와 mEH의 활성변화가 다양한 암 및 간장 질환의 발생율과 관련이 있는 것으로 보고하였다(To-Figueras *et al.*, 2001; Sonzogni *et al.*, 2002).

당뇨병은 탄수화물을 대표로하는 영양소의 대사 뿐만 아니라 외인성물질의 대사 역시 교란시킨다. Cytochrome P450(CYP) 2B1, 2E1, 3A 그리고 4A의 활성 및 단백질 함량이 당뇨병에서 증가하며 반면 CYP2C와 mEH는 감소한다(Kim *et al.*, 2004a). 당뇨병 상태에서 phase II 반응을 매개하는 효소 중 UDP-glucuronosyltransferase 1A1은 증가하며 sulfotransferase 2A1은 감소한다(Kim *et al.*, 2004b). 당뇨병은 인슐린(insulin)의 분비 또는 반응성의 감소와 함께 글루카곤(glucagon) 등 다양한 호르몬의 변화가 동반된다. 일차배양 랫트 간세포 실험계에서 인슐린의 처리는 alpha-class GST(Kim *et al.*, 2003a, 2006a), mEH(Kim *et al.*, 2003b) 및 GSH 합성의 속도결정 단계를 촉매하는 gamma-glutamylcysteine ligase(Kim *et al.*, 2004b)의 발현을 증가시키며 글루카곤은 상반된 조절기전을 가지는 것으로 보고되었다. 이상의 실험결과는 당뇨병에서 관찰되는 산화적 스트레스가 산화성물질의 증가 뿐만 아니라 항산화 효소의 감소와 관련이 있음을 시사한다.

글루카곤은 adenylate cyclase를 활성화시켜 세포

에서 cyclic AMP의 생성을 증가시키며 증가된 cyclic AMP는 인슐린 신호전달체계를 억제하고 protein kinase A(PKA)를 활성화 시킨다(Kimball *et al.*, 2004). 따라서 대부분의 글루카곤 효과는 cyclic AMP를 경유한 PKA의 활성화에 기인한다. H89와 KT5720은 PKA의 억제를 위해 가장 광범위하게 사용되고 있다. 두 억제제는 모두 세포투과성을 가지며 효소 억제 실험에서 50~60 nM의 inhibition constant 값을 가지는 것으로 보고되었다(Chijiwa *et al.*, 1990; Gadbois *et al.*, 1992). 세포 배양실험에서 PKA를 완전히 억제하기 위해 H89는 주로 25 μM KT5720은 5 μM이 주로 사용된다.

본 연구에서는 일차배양 랫트 간세포를 이용하여 두 PKA 억제제의 세포 독성과 글루카곤에 의한 항산화효소의 발현 감소에 미치는 영향을 실험하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Modified Chee's medium과 L-glutamine은 Invitrogen(Carlsbad, CA)에서 인슐린은 Insulin(Novolin R)은 Novo Nordisk Pharmaceuticals Inc.(Princeton, NJ)에서 구입하였다. Collagenase(type I)은 Worthington Biochemicals(Freehold, NJ)에서 vitrogen(95~98% type I collagen, 2~5% type III collagen)은 Cohesion Technologies Inc.(Palo Alto, CA)에서 구입하였다. Class-specific GST 항체와 mEH 항체는 선행연구에서 이미 보고한 것을 사용하였다(Kim *et al.*, 2003a, b). H89와 KT5720은 Calbiochem(La Jolla, CA)에서 Glucagon과 기타 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

2. 랫트 간세포의 분리 및 배양

간세포(hepatocytes)는 웅성 Sprague-Dawley 랫트(200~300 g)에서 collagenase를 관류하여 분리하였다(Kim *et al.*, 2005). 간세포를 60 mm 배양접시에 3×10^6 cells로 가하고 1 μM의 인슐린이 첨가된 배지에서 4시간 동안 배양하여 간세포를 배양접시에 부착시켰다. 인슐린이 없는 배지로 2회 세척하

여 미부착된 세포와 인슐린을 제거하고 2시간 동안 안정시킨 후 억제제나 글루카곤을 처리하였다. 이후 세포는 인슐린이 없는 배지에서 배양하였으며 매 24시간 마다 배양액을 교체하였다. Glucagon은 멸균증류수에 녹여 냉장실에 보관하였으며 억제제는 DMSO에 녹여 -20°C 에서 보관하였다. 예비실험결과 최대 글루카곤 효과가 관찰된 100 nM을 선택하였으며 PKA 억제제는 글루카곤을 처리하기 1.5시간 전에, SKF-525A는 KT5720을 처리하기 30분 전에 배지에 첨가하였다.

세포의 생존을 확인하기 위해 MTT assay와 LDH (lactate dehydrogenase) assay를 수행하였다. 실험결과는 정상대조군의 값을 100으로 환산하여 %로 표시하였다.

3. Immunoblot analysis

선행 연구에서 보고된 방법에 의거하여 실험을 수행하였다 (Kim *et al.*, 2005). 세포를 3 mL의 4°C phosphate-buffered saline (pH 7.4)으로 세척한 후 50 mM HEPES (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM MnCl_2 , 1 mM sodium orthovanadate, leupeptin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), aprotinin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride로 구성된 lysis buffer를 첨가하였다. 세포를 끊어 1.5 mL의 Eppendorf tubes에 모은 후 25-gauge needle을 끼운 주사기로 5회 통과시켰다. 시료를 30분간 얼음에서 방치하고 16,000 g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에서 단백질 함량을 bicinchoninic acid protein assay (Sigma-Aldrich)로 측정하고 실험에 사용하였다.

Immunoblot analysis를 위해 5 (α -class GST), 15 (mEH) 또는 30 (π -class GST) μg 의 단백질을 loading buffer에 희석시킨 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기연동하고 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Inc., Hercules, CA)로 이동시켰다. 단백질이 결합된 nitrocellulose membrane을 2시간 동안 5% milk powder를 함유하는 phosphate-buffered saline (pH 7.4)에서 반응시키고 각각의 일차 항체를 가한 후 상온에서 16시간 동안 반응시켰다. 일차 항체가 결합된 nitrocellulose membrane을 3시간 동안 horseradish peroxidase 포함되

어 있는 이차 항체와 반응시키고 enhanced chemiluminescence 시약과 Kodak X-OMAT film (Sigma-Aldrich)을 이용하여 단백질을 검출하였다. 검출된 단백질을 정량하기 Molecular Dynamics scanning laser densitometer와 ImageQuant analysis program (Amersham Biosciences, Inc.)을 사용하였다.

4. GSH 정량

세포의 GSH 함량은 전에 보고된 방법을 사용하였다 (Kim *et al.*, 2006b). 세포를 6% perchloric acid에서 끊어 1.5 mL tube에 모으고 원심분리하여 상등액을 시료로 사용하였다. 상등액에 phosphate 완충액 (phosphate 0.125 M, EDTA 6.3 mM, pH 7.5)을 사용하여 GSH 농도가 표준 검량선 농도 범위에 들도록 희석하였다. Eppendorf tubes에 0.3 mM NADPH 용액 0.7 mL, 6 mM DTNB (5, 5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)) 용액 0.1 mL, 검체 또는 GSH 표준액 0.2 mL을 가하여 잘 섞은 후 상온에서 4분간 방치하였다. 반응액에 20 units/mL 농도의 GSH reductase를 가하고 잘 섞은 후 412 nm에서 약 2분간 흡광도의 변화를 측정하여 linear 한 1분간의 기울기 변화를 구하고 검량선으로부터 GSH의 농도를 계산하였다. 실험에 사용한 H89와 KT5720은 *in vitro* 조건에서 1 mM 농도까지 GSH의 측정에 유의적인 변화를 미치지 못하였다.

5. 통계 분석

실험군 사이의 통계적 차이는 Student's *t*-test 또는 analysis of variance 후 Newman-Keuls multiple comparison test ($p < 0.05$)로 검사하였다. 실험결과 재현성은 2~4회의 간세포 분리를 통하여 확인하였다. 모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다.

결 과

1. H89와 KT5720이 세포 생존에 미치는 영향

일차 배양 랫트 간세포 실험계에서 H89와 KT5720이 세포 독성에 미치는 영향을 MTT assay와 LDH assay를 이용하여 실험하였다 (Fig. 1). H89는

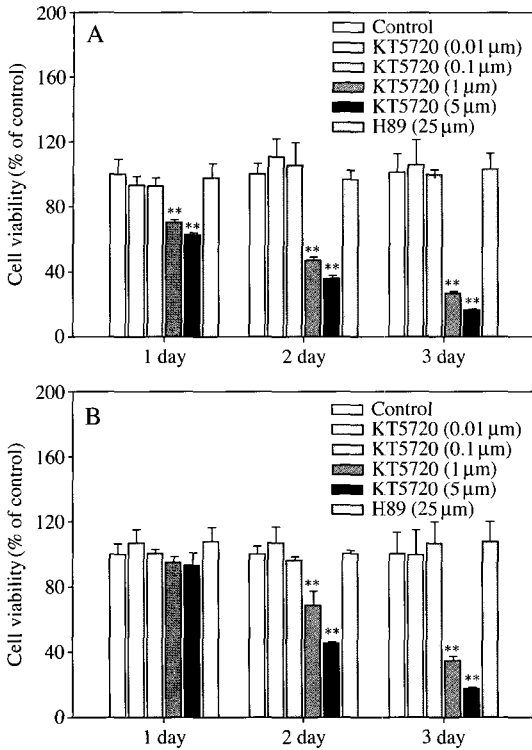


Fig. 1. Effect of KT5720 on viability of primary cultured rat hepatocyte cultured in the absence of glucagon (A) or in the presence of glucagon (B). After the 4-h plating period in the presence of 1 μM insulin, medium was replaced with insulin-free medium. Hepatocytes were then treated with KT5720 or H89 for 1.5 h before addition of 100 nM glucagon, and these treatments were repeated every 24 h for 3 days. Values are shown as a percentage of the level monitored in control hepatocytes. Data are means ± S.D. with three preparations of cell lysates. *,**Significantly different than levels monitored in control hepatocytes.

25 μM 농도에서 글루카곤의 유무와 무관하게 MTT의 활성 (Fig. 1)과 LDH의 유리 (data not shown)에 변화를 유발하지 못 하였다. 이 결과는 H89가 간세포에서 독성이 낮은 물질임을 시사한다. KT5720은 0.1 μM까지 MTT활성 및 배지의 LDH 활성에 변화를 유발하지 못 하였으나 1 μM 농도에서 일 일 이내에 약 30%의 MTT 활성감소를 유발하였으며 배지에서 LDH의 활성을 정상대조군에 비하여 약 50% 증가시켰다 (Fig. 1A). KT5720은 5 μM에서 약

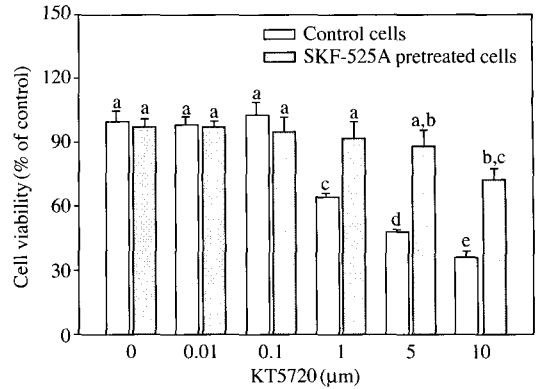


Fig. 2. Effect of the cytochrome P450 inhibitor SKF-525A on the KT5720-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. After the 4-h plating period in the presence of 1 μM insulin, medium was replaced with insulin-free medium. Hepatocytes were then treated with SKF-525A (10 μM) for 0.5 h before addition of KT5720 for 24 h. Values are shown as a percentage of the level monitored in control hepatocytes. Data are means ± S.D. with three preparations of cell lysates. Values with different letters are significantly different from each other, P < 0.05.

40%의 MTT활성 감소와 70%의 배지 LDH활성 증가를 초래하여 농도의존적인 독성을 유발하였다 (Fig. 1A). KT5720의 독성은 시간경과에 따라 증가하여 3일째에는 1 μM과 5 μM에서 MTT활성이 각각 정상대조군의 26%와 16%로 감소하였다 (Fig. 1A). 세포의 기능을 평가하기 위해 24시간 동안 KT5720이 처리된 세포에서 GSH의 농도를 측정하였다. 대조군에서 GSH의 농도는 33.2 ± 2.1 nmol/mg이었으며 KT5720의 농도가 0.01, 0.1, 1과 5 μM로 증가함에 따라 GSH 함량은 34.2 ± 1.9, 33.2 ± 1.7, 30.2 ± 0.8과 27.2 ± 2.3 nmol/mg으로 감소하였다. 따라서 KT5720이 농도의존적으로 세포의 GSH 농도를 감소시킴을 확인하였다. 글루카곤과 함께 KT5720을 배양하고 세포 독성을 실험하였다 (Fig. 1B). 배지에 100 nM의 글루카곤이 첨가되었을 때 24시간 동안 5 μM로 처리된 KT5720은 일차배양 랫트 간세포에서 독성을 유발하지 못 하였다. 그러나 KT5720의 배양시간이 증가함에 따라 MTT 활성의 감소가 관찰되었다. 또한 배지의 LDH 활성 역시 KT5720을 처리하고 2일부터 유의적으

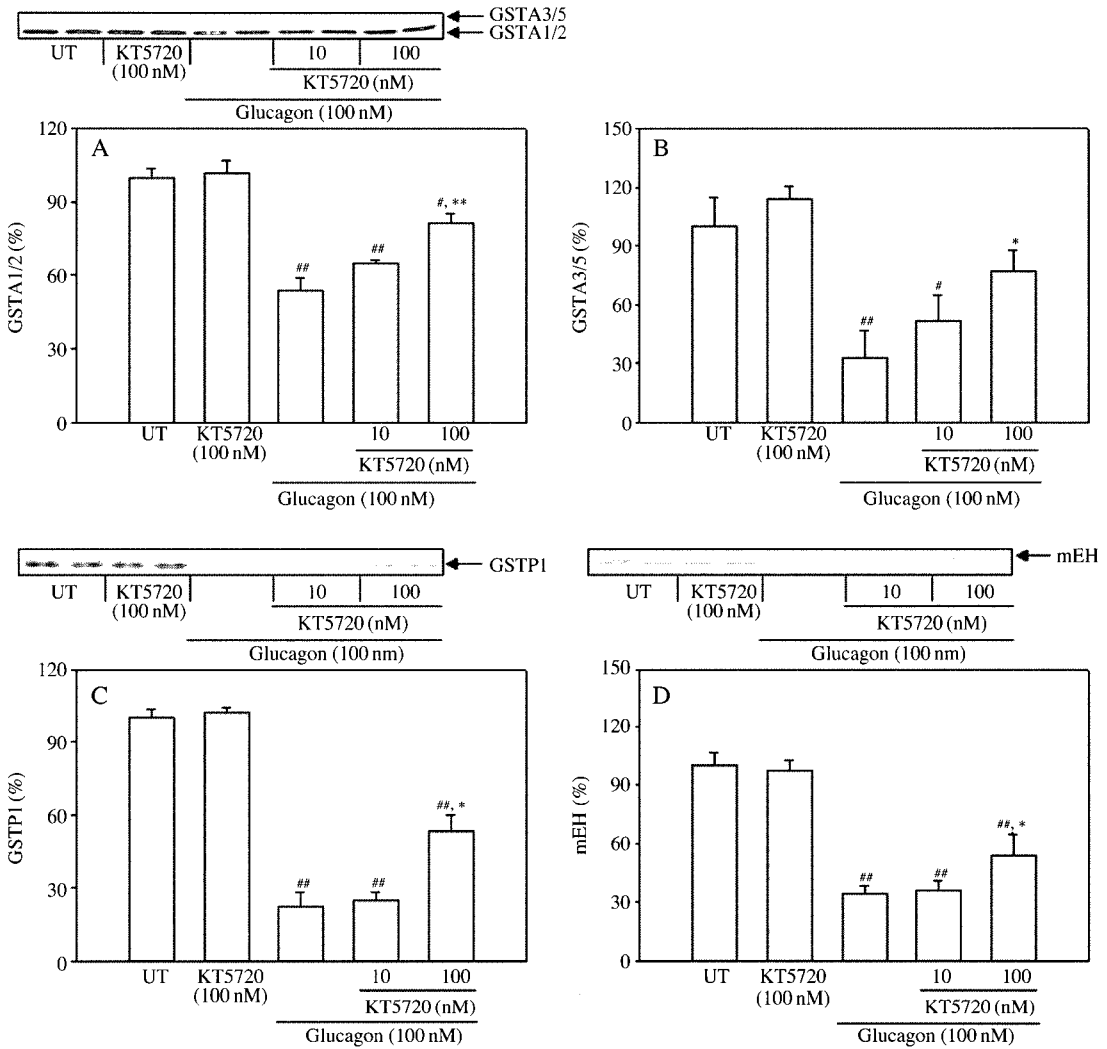


Fig. 3. Immunoblot analysis of the effect of the protein kinase A inhibitor KT5720 on the glucagon-mediated decreases in GSTA1/2 (A), GSTA3/5 (B), GSTP1 (C) and mEH (D) protein levels in primary cultured rat hepatocytes. After the 4-h plating period in the presence of 1 μ M insulin, medium was replaced with insulin-free medium. Hepatocytes were then treated with KT5720 for 1.5 h before addition of 100 nM glucagon, and these treatments were repeated every 24 h for 3 days. Values are shown as a percentage of the level monitored in untreated hepatocytes (UT). Data are means \pm S.D. of immunoblot band densities of four preparations of cell lysates. #, ## Significantly different than levels monitored in UT, $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively. *, ** Significantly different than levels monitored in hepatocytes treated with glucagon only, $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively.

로 증가하였다 (data not shown). 이 결과는 배지에 글루카곤이 첨가되었을 때 부분적으로 KT5720의 독성이 억제됨을 시사한다.

간세포는 다른 세포에 비하여 외인성 물질에 대한 대사활성이 높은 특징을 가지고 있다. 따라서

KT5720의 독성에 대사활성화가 관여하는 가를 확인하기 위해 대표적인 CYP 억제제인 SKF-525A를 전처리하고 KT5720의 독성을 관찰하였다 (Fig. 2). SKF-525A가 전처리된 세포에서 10 μ M KT5720은 약 28%의 MTT 활성 감소와 35%의 배지 LDH 증

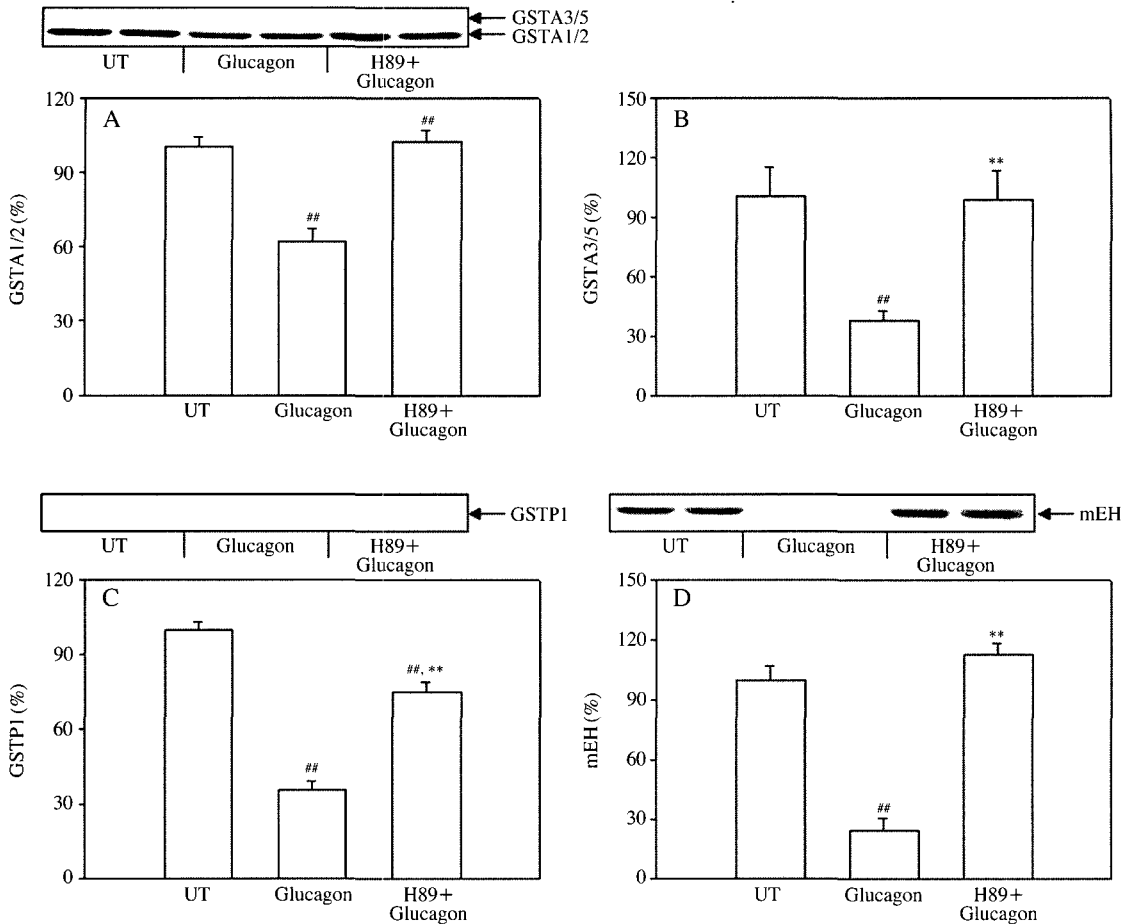


Fig. 4. Immunoblot analysis of the effect of the protein kinase A inhibitor H89 on the glucagon-mediated decreases in GSTA1/2 (A), GSTA3/5 (B), GSTP1 (C) and mEH (D) protein levels in primary cultured rat hepatocytes. After the 4-h plating period in the presence of 1 μ M insulin, medium was replaced with insulin-free medium. Hepatocytes were then treated with 25 μ M H89 for 1.5 h before addition of 100 nM glucagon, and these treatments were repeated every 24 h for 3 days. Values are shown as a percentage of the level monitored in untreated hepatocytes (UT). Data are means \pm S.D. of immunoblot band densities of four preparations of cell lysates. ##, ### Significantly different than levels monitored in UT, $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively. **Significantly different than levels monitored in hepatocytes treated with glucagon only, $P < 0.01$.

가를 유발하였다 (Fig. 2). 반면 5 μ M의 KT5720에 의해 유발된 세포 독성은 SKF-525A에 의해 완벽하게 차단되었다 (Fig. 2). 이 실험결과는 KT5720에 의해 매개되는 세포독성이 대사활성화와 관련이 있을 가능성을 시사한다. 따라서 본 결과는 간세포와 같이 약물대사활성이 높은 세포에 있어서 KT5720의 사용은 주의가 필요함을 제안한다.

2. KT5720와 H89가 글루카곤에 의한 항산화 효소의 발현 감소에 미치는 영향

일차 배양 랫트 간세포 실험계에서 글루카곤의 처리는 alpha-class GST, pi-class GST 및 mEH의 단백질 발현을 억제하는 것으로 보고되었다 (Kim *et al.*, 2003a, b). 본 연구에서 PKA의 억제제인 KT5720과 H89가 글루카곤 의존성 항산화효소의

발현 억제에 미치는 영향을 실험하였다(Figs. 3 and 4). 100 nM로 처리된 글루카곤은 alpha-class GST, pi-class GST 및 mEH의 단백질 발현을 억제하여 이전 연구결과를 확인하였다(Fig. 3). 세포 생존에 영향을 없는 농도인 10과 100 nM로 KT5720를 전처리한 후 글루카곤에 의한 변화에 미치는 영향을 관찰하였다. 10 nM로 처리된 KT5720은 글루카곤에 의한 GSTA1/2의 감소에 유의적인 변화를 유발하지 못 하였으나 100 nM에서 부분적인 글루카곤 억제효과가 관찰되었다(Fig. 3A). 또한 글루카곤에 의한 GSTA3/5, GSTP1 및 mEH의 감소는 100 nM의 KT5720의 전처리에 의해 약화되었다(Fig. 3B, C and D). 이상의 연구결과는 글루카곤에 의한 일부 항산화 효소의 발현 감소가 PKA를 경유하여 발생할 가능성을 시사한다. 그러나 사용한 KT5720의 농도가 PKA의 활성을 완전히 억제하지 못 하여 글루카곤의 영향을 약화시켰을 가능성이 있다. PKA가 글루카곤에 의한 alpha-class GST, pi-class GST 및 mEH의 감소를 매개하였는가를 확인하기 위해 H89를 전처리하였다(Fig. 4). 글루카곤에 의한 alpha-class GST(Fig. 4A, B)와 mEH(Fig. 4D)의 감소는 25 μ M H89에 의해 완전히 억제되었다. 또한 H89는 글루카곤에 의한 pi-class GST의 감소를 현저하게 약화시켰다. 이상의 결과는 글루카곤에 의한 alpha-class GST, pi-class GST 및 mEH의 발현 감소가 PKA에 의해 매개되었음을 시사한다.

고 찰

본 연구결과는 일차 배양 랫트 간세포 실험계에서 글루카곤의 처리가 alpha-class GST, pi-class GST 및 mEH의 발현을 감소시키고 PKA의 억제제인 H89와 KT5720이 글루카곤의 영향을 억제 또는 약화시킴을 보인다. 또한 KT5720은 약물대사활성이 높은 간세포에서 1 μ M부터 독성을 유발하며 CYP 억제제인 SKF-525A의 처리는 KT5720에 의한 독성으로부터 간세포를 보호하였다. 본 연구는 문은 간세포에서 KT5720의 세포독성을 관찰한 첫 보고이다.

산화적 스트레스는 당뇨 환자에게서 증가하며 당뇨 합병증의 중요한 원인으로 보고되고 있다. 당뇨에서 산화적 스트레스 발생기전을 규명하기 위

한 연구는 대부분 산화성 물질의 생성 증가에 초점이 맞추어져 있다. 실제로 본 연구자는 당뇨 상태에서 증가하는 ketone body 중 acetoacetate가 간세포에서 농도의존적으로 GSH의 감소 및 활성 산소종의 증가를 유발함을 보고하였다(Abdelmegeed *et al.*, 2004). 그러나 산화적 스트레스는 산화성 물질의 증가뿐만 아니라 항산화 활성의 감소에 의해서도 발생한다(Sies, 1985). 인슐린의 처리는 글루카곤과 반대로 alpha-class GST와 mEH의 발현 감소 및 GSH의 합성 감소를 유발하였다(Kim *et al.*, 2003a, b and 2004b). 이상의 실험결과는 당뇨 환자에게서 관찰되는 산화적 스트레스의 증가에 항산화 효소의 발현 감소가 관여할 가능성을 시사한다. 첨가적으로 당뇨의 합병증을 예방하기 위해 항산화 효소의 발현을 정상화시킬 수 있는 약물요법의 적용 가능성에 대한 추가적인 연구가 필요함을 제안한다.

H89와 KT5720은 모두 PKA의 억제를 위해 가장 빈번히 사용되는 화학적 억제제로 세포투과성을 가지며 50~60 nM의 inhibition constant 값을 가진다(Chijiwa *et al.*, 1990; Gadbois *et al.*, 1992). 비선택적인 protein kinase 억제제인 staurosporine의 유도체인 KT5720은 PKA에 높은 선택성을 가지며 세포 배양 실험에서 1~5 μ M 농도로 사용된다(Kase *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2006). 논문 검색결과 KT5720의 세포독성과 관련된 논문은 확인할 수 없었으며 PKA의 다른 억제제인 H89가 25 μ M 까지 독성을 유발하지 않는 것을 고려할 때 KT570의 독성은 PKA의 억제효과와는 무관한 것으로 판단된다. 이상의 연구결과는 KT5720의 세포독성의 기전을 규명하기 위한 추가적인 연구결과가 필요함을 시사한다. 첨가적으로 staurosporine은 신경교세포(neuronal glial cell)에서 caspase의 활성화를 통한 apoptosis를 유발하는 것으로 보고되었다(Shih *et al.*, 2003; MacCormac *et al.*, 2004).

결론적으로 본 연구는 당뇨병에서 관찰되는 산화적 스트레스에 PKA를 경유하는 글루카곤에 의한 항산화 효소의 활성 감소가 관여할 가능성을 시사한다. 또한 PKA 억제제인 KT5720은 약물대사활성이 높은 간세포에서 독성을 유발하며 따라서 이 억제제의 사용에 있어서 주의가 필요함을 시사한다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단 (KRF-2004-041-E00393) 및 한국과학재단 형질전환복제 돼지 ERC 프로그램 (grant R11-2002-100-00000-0)의 지원을 받았음.

참고 문헌

- Abdelmegeed MA, Kim SK, Woodcroft KJ and Novak RF. Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in primary cultured rat hepatocytes: role of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310(2): 728-736.
- Baynes JW and Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
- Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T and Hidaka H. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 1990; 265(9): 5267-5272.
- Gadbois DM, Crissman HA, Tobey RA and Bradbury EM. Multiple kinase arrest points in the G1 phase of non-transformed mammalian cells are absent in transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(18): 8626-8630.
- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A and Kaneko M. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987; 142(2): 436-440.
- Kim SK, Abdelmegeed MA and Novak RF. Identification of the insulin signaling cascade in the regulation of alpha-class glutathione S-transferase expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006a; 316(3): 1255-1261.
- Kim SK, Abdelmegeed MA and Novak RF. The mitogen-activated protein kinase kinase (mek) inhibitor PD98059 elevates primary cultured rat hepatocyte glutathione levels independent of inhibiting mek. *Drug Metab Dispos.* 2006b; 34(4): 683-689.
- Kim SK, Woodcroft KJ and Novak RF. Insulin and glucagon regulation of glutathione S-transferase expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003a; 305(1): 353-361.
- Kim SK, Woodcroft KJ and Novak RF. Insulin and growth factor signaling: Effects on drug-metabolizing enzymes, in *Drug metabolism and transport* (Lash LH ed), Humana Press, Totowa (2004a), pp. 45-83.
- Kim SK, Woodcroft KJ, Khodadadeh SS and Novak RF. Insulin signaling regulates gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004b; 311(1): 99-108.
- Kim SK, Woodcroft KJ, Kim SG and Novak RF. Insulin and glucagon signaling in regulation of microsomal epoxide hydrolase expression in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2003b; 31(10): 1260-1268.
- Kim SK, Woodcroft KJ, Oh SJ, Abdelmegeed MA and Novak RF. Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2005; 70(12): 1785-1795.
- Kimball SR, Siegfried BA and Jefferson LS (2004) Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2004; 279: 54103-54109.
- MacCormac LP, Muqit MM, Faulkes DJ, Wood NW and Latchman DS. Reduction in endogenous parkin levels renders glial cells sensitive to both caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Eur J Neurosci.* 2004; 20(8): 2038-2048.
- Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem.* 1994; 269(13): 9397-9400.
- Neuschwander-Tetri BA and Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219.
- Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA and Murphy TH. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci.* 2003; 23(8): 3394-3406.
- Sies H. Oxidative stress: Introductory remarks. In: H. Sies, Editor, *Oxidative Stress*, Academic Press, San Diego, New York, London (1985), pp. 1-8.
- Sonzogni L, Silvestri L, De Silvestri A, Gritti C, Foti L, Zavaglia C, Bottelli R, Mondelli MU, Civardi E and Silini EM. Polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase gene and severity of HCV-related liver disease. *Hepatology* 2002; 36: 195-201.

- To-Figueras J, Gene M, Gomez-Catalan J, Pique E, Borrego N and Corbella J. Lung cancer susceptibility in relation to combined polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase P1. *Cancer Lett* 2001; 173: 155-162.
- Wang Y, Kim PK, Peng X, Loughran P, Vodovotz Y, Zhang B and Billiar TR. Cyclic AMP and Cyclic GMP suppress TNFalpha-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting FADD up-regulation via a protein kinase A-dependent pathway. *Apoptosis*. 2006 Mar; 11(3): 441-51.
- West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000; 17: 171-180.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994; 74(1): 139-162.