

인슐린 매개성 Microsomal Epoxide Hydrolase의 발현증가에서 Akt의 역할

김상겸 · 김봉희 · 오정민 · 윤강욱 · 김충현 · 강진욱*[#]

충남대학교 약학대학, 충남대학교 형질전환 복제돼지 센터, *조선대학교 약학대학

(Received June 13, 2007; Revised August 21, 2007)

Role of Akt in Insulin-Mediated Increase in Expression of Microsomal Epoxide Hydrolase

Sang Kyum Kim, Bong-Hee Kim, Jung Min Oh, Kang Uk Yun, Chung Hyeon Kim and Keon Wook Kang*[#]

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

*College of Pharmacy Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract — The present study examines the effect of dominant-negative Akt on the insulin-mediated microsomal epoxide hydrolase (mEH) induction in rat hepatocytes. We also assessed the role of insulin in the expression of soluble epoxide hydrolase (sEH). Insulin increased mEH levels and the enzyme activities, whereas sEH protein expression was unaffected by insulin. The specific PI3K inhibitors or p70 S6 kinase inhibitor ameliorated the insulin-mediated increase in mEH protein levels. Infection with adenovirus expressing dominant-negative and kinase-dead mutant of Akt1 effectively inhibited the insulin-mediated increase in mEH expression and mEH activity. These results suggest that mEH and sEH are differentially regulated by insulin and PI3K/Akt/p70S6K are active in the insulin-mediated regulation of mEH expression.

Keywords □ microsomal epoxide hydrolase, soluble epoxide hydrolase, insulin, cellular signaling pathway, akt

대사질환인 당뇨병(diabetes mellitus)에서 산화적 손상은 당뇨병증을 유발하는 중요한 병인으로 보고되고 있다.^{1,2)} 산화적 스트레스는 산화성물질(oxidant and pro-oxidant)과 항산화 물질(antioxidant)의 평형이 교란되어 산화적 반응이 우세하고 결과적으로 조직손상을 유발할 수 있는 상태로 정의된다.³⁾ 따라서 당뇨병에서 산화적 손상의 기전은 크게 산화성 물질의 증가와 항산화 체계 활성의 감소로 규정할 수 있다. 선행 연구결과는 주로 산화성물질의 증가에 중점을 두어 연구되었으나 최근 항산화 효소의 발현이 당뇨상태에서 감소하는 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 항산화 효소의 발현 감소는 산화성물질의 공격에 세포를 더욱 민감하게 만들며 결과적으로 산화적 손상으로 인한 당뇨합병증의 발생에 기여한다.

Microsomal epoxide hydrolase(mEH)는 광범위한 epoxide 기질에 물분자를 trans-addition시키는 반응을 촉매한다. 일부 다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons)는 mEH에 의해 대사활성화되어 발암성을 획득하나 대부분의 친전자성

epoxide는 mEH에 의해 무독화된다.⁵⁾ mEH의 genotype은 간암, 직장암, 폐암 등의 발생과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.⁶⁻⁸⁾ 또한 최근 mEH의 활성이 낮은 phenotype을 가진 사람에게서 간경화의 발병률이 높은 것으로 보고되어 주목을 받고 있다.¹⁰⁾

화학적으로 유도된 당뇨병 쥐에서 mEH의 활성이 감소하며 이 결과는 부분적으로 인슐린과 관련이 있는 것으로 보고되었다.¹¹⁾ 본 연구자의 선행 연구에서 일차배양 랫트 간세포에 인슐린을 처리할 경우 농도의존적인 mEH 단백질의 발현 증가가 관찰되었으며 글루카곤은 반대로 mEH의 단백질 발현을 감소시켰다.¹²⁾ 화학적인 kinase 억제제를 사용한 신호전달체계 연구에서 인슐린에 의한 mEH의 발현 증가는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)와 p70 S6 kinase에 의해 매개되며 protein kinase C, extracellular signal-regulated kinase 그리고 c-Jun N-terminal kinase와는 관련이 없는 것으로 관찰되었다.¹²⁾ 또한 글루카곤에 의한 mEH의 발현감소는 cyclic AMP를 경유한 protein kinase A의 활성화와 관련이 있는 것으로 보고하였다.^{12,13)} 그러나 인슐린 신호전달의 핵심에 위치하고 있는 Akt가 인슐린에 의한 mEH의 발현증가를 매개하는 가를 규명하기 위한 연구는 진행되지 못하였다.

본 연구의 목표는 일차배양 랫트 간세포 실험계에서 인슐린에

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 062-230-6368 (팩스) 062-222-5414
(E-mail) kwkang@chosun.ac.kr

의한 mEH의 발현증가가 Akt와 관련을 가지는 것을 규명하기 위해 수행되었다. Akt의 신호를 억제하기 위해 kinase 활성이 결핍된 kinase-dead Akt1과 green fluorescence protein(GFP)이 삽입된 adenovirus를 일차 배양 랫트 간세포에 감염시켰다. 첨가적으로 soluble epoxide hydrolase(sEH)의 발현에 미치는 인슐린의 영향을 관찰하였다. sEH는 외인성물질과 epoxyeicosatrienoic acids와 같은 내인성물질의 대사를 담당하며 mEH와는 달리 cytosol에 존재한다.¹⁴⁾

재료 및 방법

시약

Modified Chee's medium과 L-glutamine은 Invitrogen(Carlsbad, CA)에서 인슐린은 Novo Nordisk Pharmaceuticals Inc.(Princeton, NJ)에서 구입하였다. Collagenase(type I)은 Worthington Biochemicals(Freehold, NJ)에서 vitrogen(95~98% type I collagen, 2~% type III collagen)은 Cohesion Technologies Inc.(Palo Alto, CA)에서 구입하였다. mEH 항체는 선행연구에서 이미 보고한 것을 사용하였으며,¹²⁾ sEH는 Davis에 있는 University of California의 Hammock박사로부터 받았다. Akt와 phospho-Akt(serine-473)는 Cell Signaling Technology Inc.(Beverly, MA)로부터 구입하였다. Wortmannin, LY294002, rapamycin 등 kinase 억제제는 Calbiochem(La Jolla, CA)에서 cis-stilbene oxide와 기타 시약은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다.

랫트 간세포의 분리 및 배양

간세포(hepatocytes)는 웅성 Sprague-Dawley 랫트(200~300 g)에서 collagenase를 관류하여 분리하였다.¹⁵⁾ 간세포를 60 mm 배양접시에 3×10^6 cells로 가하고 1 μ M의 인슐린이 첨가된 배지에서 4시간 동안 배양하여 간세포를 배양접시에 부착시켰다. 인슐린이 없는 배지로 2회 세척하여 미부착된 세포와 인슐린을 제거하고 2시간 동안 안정시킨 후 억제제나 인슐린을 처리하였다. 이후 매 24시간 마다 배양액을 교체하였다. Kinase 억제제는 인슐린을 처리하기 1시간 전에 배지에 가하였으며 모든 억제제는 DMSO에 녹여 -20°C에서 보관하였다.

세포의 생존을 확인하기 위해 MTT assay와 LDH(lactate dehydrogenase) assay를 수행하였다.

Kinase-dead Akt adenoviral construct의 준비

Kinase-dead Akt1은 ATP 결합부위인 179번 lysine을 methionine으로 치환하여 ATP가 결합할 수 없도록 제작하였다. GFP와 kinase-dead Akt1을 가지는 adenovirus의 제작은 이전 논문에서 보고하였다.¹⁶⁾ Kinase-dead Akt1을 함유하는 adenovirus

를 2시간 동안의 세포부착과정 후 150 MOI 농도로 가하여 24 시간 동안 일차 배양 랫트 간세포를 감염시켰다. 이후 배양액을 교체하여 adenovirus를 제거하고 2시간 동안 안정화시키고 10 nM의 인슐린을 처리하였다.

Immunoblot analysis

Immunoblot analysis는 선행 연구에서 보고된 방법에 의거하여 실험을 수행하였다.¹⁷⁾ 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 MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM MnCl₂, 1 mM sodium orthovanadate, leupeptin(10 μ g/ml), aprotinin(10 μ g/ml)과 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride로 구성된 lysis buffer를 첨가하였다. 세포를 긁어 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 15 μ g의 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 포함되어 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.

Enzyme assay

mEH와 sEH의 활성은 각각 cis-stilbene oxide와 trans-diphenylpropene oxide를 기질로 이용하여 측정하였다. 효소의 활성은 mU/mg protein으로 표시하였으며 1 mU은 1 nmol/min이다.

통계 분석

실험군 사이의 통계적 차이는 analysis of variance 후 Newman-Keuls multiple comparison test(p<0.05)로 검사하였다. 실험 결과의 재현성은 2~4회의 간세포 분리를 통하여 확인하였다. 모든 실험결과는 평균±표준편차 표시하였다.

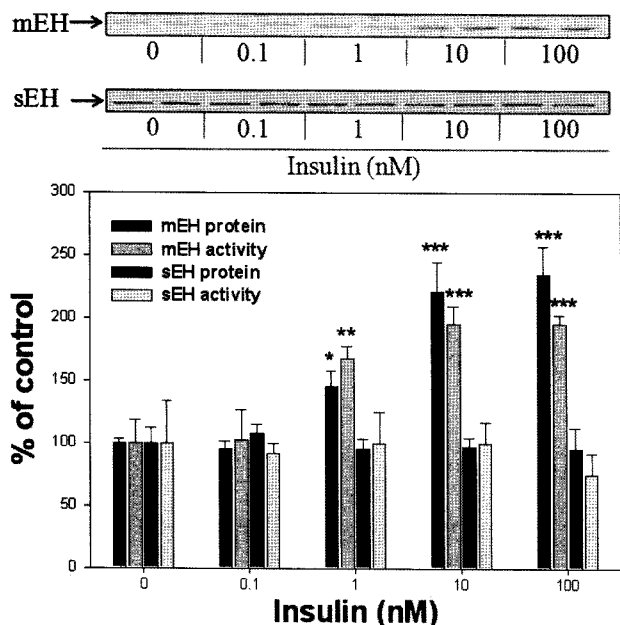


Fig. 1 – Concentration-dependent effects of insulin on mEH protein, mEH activity, sEH protein and sEH activity in primary cultured rat hepatocytes. Hepatocytes were cultured in the presence of various concentrations of insulin for 24 h. Data are means \pm S.D. of three to five preparations of cell lysates from a single hepatocyte preparation. *, **, ***, significantly different from levels monitored in hepatocytes cultured in the absence of insulin, $p < 0.05$, $p < 0.01$, or $p < 0.001$, respectively.

결과 및 고찰

인슐린에 의한 mEH와 sEH의 발현 변화

일차 배양 랫트 간세포 실험계에서 인슐린이 mEH 및 sEH의

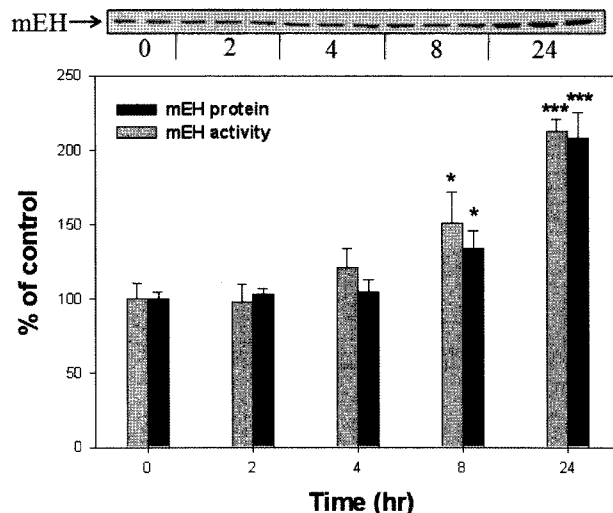


Fig. 2 – Effects of short-term insulin exposure on mEH protein and activity in primary cultured rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with 10 nM insulin for 2, 4, 12, or 24 h; 24 h after initiation of each insulin treatment, cells were harvested. Data are means \pm S.D. of three to five preparations of cell lysates from a single hepatocyte preparation. *, **, ***, significantly different from levels monitored in hepatocytes cultured in the absence of insulin, $p < 0.05$, or $p < 0.001$, respectively.

단백질 발현 및 활성에 미치는 영향을 실험하였다(Fig. 1). 인슐린의 처리는 농도의존적으로 mEH의 단백질 함량 및 cis-stilbene oxide를 기질로 측정된 활성을 증가시켰다. 유의적인 변화는 약 1 nM 인슐린에서 관찰되었다. 반면 cytosol에 주로 존재하는 sEH의 발현은 인슐린 처리에 의해 유의적인 변화를 보이지 않았으며 trans-diphenylpropene oxide을 기질로 이용한 단백질 활성

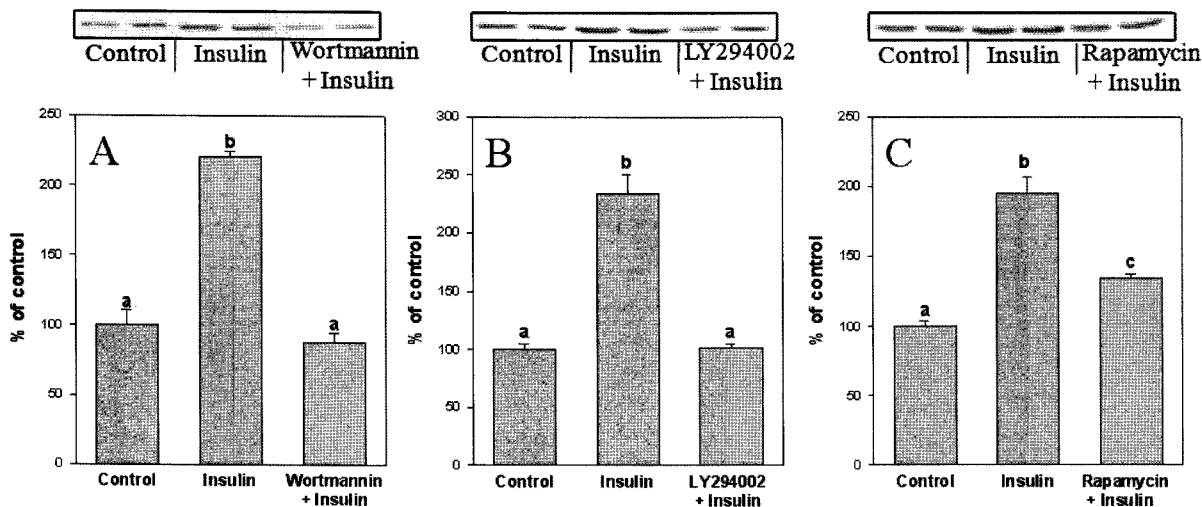


Fig. 3 – Effect of wortmannin, LY294002 or rapamycin on the insulin-mediated increase in mEH protein levels in primary cultured rat hepatocytes. Hepatocytes were treated with wortmannin (500 nM), LY294002 (10 μ M), or rapamycin (1 μ M) for 1 hr before addition of 10 nM insulin for 24 hr. Data are means \pm S.D. of three to six preparations of cell lysates from a single hepatocyte preparation. Values with different letters are significantly different from each other, $p < 0.05$.

측정에서도 동일한 양상을 보였다. 첨가적으로 인슐린의 생리적 길항 호르몬인 글루카곤의 처리는 mEH의 단백질 발현을 감소시켰으나 sEH에는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(자료미제시). 이 결과는 인슐린과 글루카곤의 측면에서 mEH 및 sEH의 단백질 발현이 다른 조절기전을 가지고 있음을 보인다.

인슐린에 의한 mEH 발현증가의 신속성을 확인하기 위해 2, 4, 8 및 24시간 동안 인슐린을 처리한 후 mEH의 단백질 발현 및 활성을 측정하였다(Fig. 2). 이전 선행 연구에서 인슐린의 처리는 GSH 합성의 속도결정 단계를 촉매하는 gamma-glutamyl-cysteine ligase의 catalytic subunit인 heavy subunit과 alpha-class GST의 발현을 인슐린 처리 후 각각 2시간과 4시간부터 증가시켰으나,^{16,18)} mEH의 단백질 발현 및 효소활성은 인슐린 처리 후 8시간부터 증가하여 인슐린 반응성 항산화 효소 중에서 비교적 느리게 증가하는 것으로 관찰되었다.

인슐린에 의한 mEH의 발현증가를 매개하는 신호전달체계

인슐린에 의한 신호전달체계는 PI3K를 상위 단계로 하여 Akt, PKC, mammalian target of rapamycin(mTOR) 그리고 p70S6 kinase를 경유하는 PI3K pathway와 mitogen activated protein kinase(MAPK) pathway로 크게 나눌 수 있다.⁴⁾ PI3K pathway는 glucose 대사 및 수송과 같은 혈당의 조절을, MAPK는 세포 증식을 매개한다.⁴⁾ 선행 연구의 결과를¹²⁾ 토대로 본 연구에서는 PI3K를 중심으로 mEH의 발현을 조절하는 신호전달체계를 실험하였다.

본 연구에서 사용된 kinase 억제제는 MTT assay와 LDH assay에서 세포독성이 없는 농도로 사용하였다.^{12,16-18)} PI3K의 억제제인 wortmannin과 LY294002는 각각 500 nM과 10 μM에서 인슐린에 의한 mEH의 단백질 발현증가를 완벽하게 억제하였다(Fig. 3A and 3B). 이 결과는 인슐린에 의한 mEH의 발현 증가가 PI3K에 의해 매개됨을 시사한다. 또한 mTOR의 억제제인 rapamycin은 p70S6 kinase의 인산화를 억제하여 결과적으로 p70S6 kinase의 활성을 차단한다. Rapamycin은 1 μM 농도에서 부분적으로 인슐린에 의한 mEH의 발현 증가를 억제하였다(Fig. 3C). 이상의 결과는 이전에 보고한 것과 같이 인슐린에 의한 mEH의 발현 증가가 PI3K 및 그 하위 단계인 p70S6 kinase에 의해 매개됨을 시사한다.

인슐린에 의한 mEH의 발현증가에서 인슐린에 의한 PI3K pathway의 중심축인 Akt의 역할을 실험하였다(Fig. 4). 먼저 10 nM의 인슐린에 의한 Akt의 활성화를 serine 473 잔기의 인산화로 평가하였다(Fig. 4A). 인슐린의 처리는 5분, 30분 1시간, 3시간 그리고 24시간에 모두 Akt의 인산화를 현격하게 증가시켰다. 이 결과는 인슐린에 의한 Akt의 인산화가 매우 신속하고 지속적으로 발생함을 시사한다. Akt의 활성을 억제하기 위해 kinase dead Akt1과 GFP를 함유한 adenovirus(AdV-kdAkt)와 GFP만

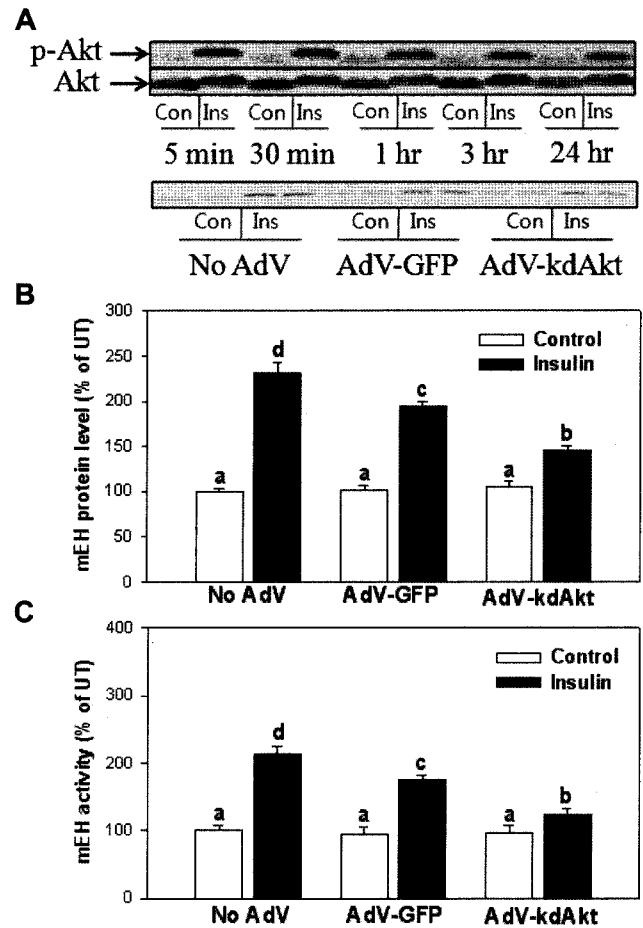


Fig. 4 - Insulin-mediated phosphorylation of Akt (A) and effect of kinase-dead Akt expression on insulin-mediated mEH protein (B) and activity (C) levels in primary cultured rat hepatocytes. A, hepatocytes were cultured in the presence (Ins) or absence (Con) of insulin for the indicated times. B and C, hepatocytes were infected with 150 MOI AdV-Akt or 150 MOI AdV-GFP. Following 24-h infection with AdV-Akt or AdV-GFP, hepatocytes were treated with 10 nM insulin for 1 day. Data are means \pm S.D. of three and four preparations of cell lysates from a single hepatocyte preparation. Values with different letters are significantly different from each other, $p < 0.05$.

을 함유한 adenovirus(AdV-GFP)를 일차 배양 랫트 간세포에 감염시켰다. GFP의 발현정도를 형광현미경으로 관찰한 결과 adenovirus의 감염효율은 150 MOI에서 90% 이상으로 확인되었다. 세포독성을 MTT assay 및 LDH로 평가한 결과 본 실험에서 사용한 농도의 adenovirus 감염은 세포독성이 없는 것으로 확인되었다(자료미제시). 선행 연구에서 150 MOI의 adenovirus 감염은 일차 배양 랫트 간세포에서 kinase-dead Akt1의 발현을 정상 Akt에 비해 약 6~10배 높게 증가시켰으며 glycogen synthase kinase-3β의 인산화를 지표로 측정된 Akt의 활성을 정상 수준의 10%로 감소시켰다.¹⁸⁾ AdV-kdAkt의 감염은 인슐린에 의한 mEH

의 발현 증가를 유의적으로 억제하였다(Fig. 4B). 또한 mEH의 활성 역시 AdV-kdAkt에 의해 현저히 억제되었다(Fig. 4C). 이상의 결과는 Akt가 인슐린에 의한 mEH의 발현 증가에서 중추적인 역할을 담당함을 시사한다.

결 론

인슐린은 mEH의 발현 및 활성을 농도 의존적으로 증가시켰으며 반면 sEH의 발현과 활성에는 변화를 유발하지 못 하였다. 인슐린에 의한 mEH의 발현 증가를 매개하는 신호전달체계를 화학적 그리고 생물학적 kinase 억제제를 처리하여 규명한 결과 PI3K/Akt/p70S6 kinase가 중심적인 역할을 담당하는 것으로 관찰되었다. 본 연구 결과는 당뇨병에서 관찰되는 산화적 스트레스의 원인이 산화성 물질의 증가뿐만 아니라 항산화 효소의 발현 및 활성 감소와도 관련이 있으며 PI3K를 중심으로 한 Akt 및 p70 S6 kinase의 활성화가 당뇨병에서 산화적 스트레스를 억제하는 유효한 방법이 될 수 있음을 시사한다.

참고문헌

- 1) Baynes, J. W. and Thorpe, S. R. : Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* **48**, 1 (1999).
- 2) West, I. C. : Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med.* **17**, 171 (2000).
- 3) Sies, H. : Oxidative stress: Introductory remarks. In: H. Sies, Editor, *Oxidative Stress*, Academic Press, San Diego, New York, London pp. 1-8 (1985).
- 4) Kim, S. K. and Novak, R. F. : The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* **113**, 88 (2007).
- 5) Shou, M., Gonzalez, F. J. and Gelboin, H. V. : Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2 and epoxide hydrolase. *Biochemistry* **35**, 15807 (1996).
- 6) Harrison, D. J., Hubbard, A. L., MacMillan, J., Wyllie, A. H. and Smith, C. A. : Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and susceptibility to colon cancer. *Br. J. Cancer* **79**, 168 (1999).
- 7) McGlynn, K. A., Rosvold, E. A., Lustbader, E. D., Hu, Y., Clapper, M. L., Zhou, T., Wild, C. P., Xia, X. L., Baffoe-Bonnie, A., Ofori-Adjei, D., et al. : Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2384 (1995).
- 8) 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.* **173**, 155 (2001).
- 10) Sonzogni, L., Silvestri, L., De Silvestri, A., Gritti, C., Foti, L., Zavaglia, C., Bottelli, R., Mondelli, M. U., Civardi, E. and Silini, E. M. : Polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase gene and severity of HCV-related liver disease. *Hepatology* **36**, 195 (2002).
- 11) Thomas, H., Schladt, L., Knehr, M. and Oesch, F. : Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases, glutathione S-transferases and peroxisomal betaoxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 4291 (1989).
- 12) Kim, S. K., Woodcroft, K. J., Kim, S. G. and Novak, R. F. : Insulin and glucagon signaling in regulation of microsomal epoxide hydrolase expression in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1260 (2003).
- 13) Oh, S. J., Jo, J.-H., Park, C. S., Kim, S. K. and Kim, B.-H. : Effects of the protein kinase A inhibitor KT5720 on glucagon-mediated decrease in expression of antioxidant enzymes. *Journal of Environmental Toxicology* **21**, 245 (2006).
- 14) Fretland, A. J. and Omiecinski, C. J. : Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem. Biol. Interact.* **129**, 41 (2000).
- 15) Kim, S. K., Woodcroft, K. J., Oh, S. J., Abdelmegeed, M. A. and Novak, R. F. : Role of mechanical and redox stress in activation of mitogen-activated protein kinases in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1785 (2005).
- 16) Kim, S. K., Abdelmegeed, M. A. and Novak, R. F. : 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.* **316**, 1255 (2006).
- 17) Kim, S. K., Woodcroft, K. J. and Novak, R. F. : Insulin and glucagon regulation of glutathione S-transferase expression in primary cultured rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 353 (2003).
- 18) Kim, S. K., Woodcroft, K. J., Khodadadeh, S. S. and Novak, R. F. : Insulin signaling regulates gamma-glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression in primary cultured rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 99 (2004).