

관류 흰쥐 간에서 1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol에 의한 글루코오스의 유리작용

황영은 · 문은순 · 김미영

중앙대학교 약학대학

(Received November 6, 1991)

Glucose Release Induced by 1,2-Dioctanoyl-sn-Glycerol in Perfused Rat Liver

Young-Eun Hwang, Eun-Soon Moon and Mie-Young Kim
College of Pharmacy, Chung-Ang University Seoul 151-756, Korea

Abstract—The effect of diacylglycerol on glucose release was studied by using 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (diC_8), a cell permeable diacylglycerol, in perfused rat liver. The glucose release was increased by diC_8 (50 μ M), and the effect was depended on calcium ions. The increment of glucose release by diC_8 (50 μ M) was inhibited by indomethacin (50 μ M); the amount of glucose release was almost the same with that of control group. Arachidonic acid (200 μ M) also increased glucose release and the release was inhibited by indomethacin. There was no synergistic effect on glucose release by the combination of diC_8 (50 μ M) and phenylephrine (10 μ M).

Keywords □ Diacylglycerol, perfused rat liver, glucose release, cyclooxygenase.

간 세포에 있어서 호르몬에 의한 글리코겐 대사를 조절하는 신호전달체계에 관여하는 것으로 c-AMP, inositol triphosphate, diacylglycerol이 잘 알려져 있다.¹⁻⁹⁾ 베타 아드레날린 수용체, 혹은 글루카곤 수용체의 자극에 의한 adenylate cyclase의 활성화로 인하여 c-AMP가 증가되며 그 결과 glycogen phosphorylase가 활성화된다.¹⁻³⁾ 칼슘 활성화호르몬의 작용에 의해 세포막에 존재하는 인지질인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate가 분해되어 inositol 1,4,5-triphosphate와 diacylglycerol이 생성되며 inositol 1,4,5-triphosphate에 의하여 세포내에 저장되어 있던 칼슘이 유리되어 세포내의 증가된 칼슘이온에 의하여 포도당의 유리가 촉진된다.^{1,2,4-9)} 일반적으로 diacylglycerol의 작용은 protein kinase C의 활성화에 의하여 그 작용이 나타난다.¹⁴⁻¹⁷⁾ Diacylglycerol은 hepatocyte의 간 글리코겐의 대사에 있어서 glycogen synthase를 불활성화시켜 글리코겐의 분해를 촉진한다고

알려져 있다.^{1,18)} 그러나 protein kinase C의 활성화 작용이 있는 phorbol ester은 hepatocyte에서 글리코겐 분해를 증가시키지 못하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ 최근에는 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)가 관류 흰쥐 간에서 글리코겐 분해를 촉진하며 이 작용은 cyclooxygenase 저해제인 indomethacin에 의해 차단된다는 보고가 있다.¹⁹⁾ 또한 간의 nonparenchymal 세포(Kupffer and endothelial cells)에서는 arachidonic acid로부터 eicosanoids 특히 prostaglandins(PG)₂, E₂, F₂ α 와 I₂가 생성되며 관류 간에서 이들 eicosanoids를 가했을 때 포도당의 유리가 촉진되었지만 hepatocyte에서는 위와 같은 작용은 나타나지 않았다는 보고도 있다.^{20,21)} 따라서 본 실험은 diacylglycerol에 의한 포도당 유리작용의 기전을 알기 위하여, 세포 투과성 diacylglycerol인 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol(diC_8)이 관류 흰쥐 간에서 포도당 생성에 미치는 영향과 이에 대한 칼슘의 역할, 알파-아드레

달린 효능제인 phenyl ephrine과의 상호작용에 대해 연구하였다. 또한 diacylglycerol에 의한 포도당 유리의 촉진작용이 phorbol ester와 같이 cyclooxygenase의 활성화에 의하여 일어나는 것인지 알아보기 위하여 indomethacin에 의한 포도당 유리 억제작용과 arachidonic acid에 의한 포도당 유리작용과도 비교하였다.

실험방법

실험동물—200~280g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 수컷을 실험실 내에서 10일 동안 동일한 조건하에서 고형사료와 식수를 충분히 공급하면서 사육한 후에 실험에 사용하였다.

실험재료—1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol(diC_8), L-phenylephrine · HCl, arachidonic acid sod. salt, indomethacin, EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid), EGTA(ethyleneglycol tetraacetic acid), bovine serum albumin은 Sigma Chemical Company에서 구입하였고 Glucose-oxidase reagent는 일본 국제 시약의 제품을 사용하였다. 그 외의 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최고 순도의 것을 사용하였다.

시약조제—Phenylephrine과 arachidonic acid는 재증류수에 용해시켜 사용하였다. diC_8 과 indomethacin은 무수에탄올에 용해시켜 사용하였으며 이때의 대조군에도 동량의 에탄올을 첨가하여 실험군 및 대조군에는 각각 0.5%의 에탄올을 함유하게 하였다.

간 관류방법—흰쥐의 간에서 유리되어 나오는 포도당 양을 측정하는 방법으로 본 실험에서는 perfusion methods를 사용하였다. 200~280g 흰쥐 수컷에 60 mg/kg의 sod. pentobarbital을 복강내로 주사하여 마취시킨 후 복부를 절개하여 간 문맥에 cannulation시켜서 상대정맥을 통해서 나오는 관류액을 채취하였다. 관류완충액으로는 0.004 mM-EDTA와 0.1% B.S.A.(bovine serum albumin)을 가한 Krebs-Henseleit buffer(pH 7.6, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $NaHCO_3$ 2.5 mM)를 95% O_2 -5% CO_2 혼합가스(유속 300 ml/min)로 충분히 포화시킨 다음 온도를 37~38°C로 유지시켜 가면서 20~25 ml/min의 유속으로 30분간 비순환 관류시킨 후 1분간의 간격으로 10초간 채취하되 10분간까지 받은 것을 대조군으로 하였다.

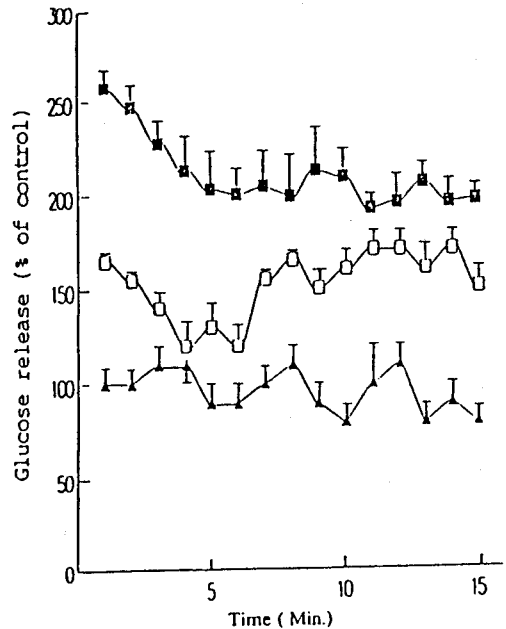


Fig. 1—Effect of diC_8 on the glucose release in perfused rat liver. Values are means \pm S.E.M. of 4~6 experiments and are plotted as percentage of control glucose release.

■—■ diC_8 50 μ M, □—□ diC_8 100 μ M, ▲—▲ diC_8 25 μ M

그 다음에는 약물이 들어있는 완충액을 관류시켜 1분간의 간격으로 10초씩 15분간 채취하였다. DiC_8 에 의한 포도당 유리에 있어서 칼슘의 영향을 알아보기 위한 실험에서는 칼슘을 포함한 완충액과 칼슘 free 완충액, 칼슘 free 완충액에 1 mM의 EGTA(ethylene-glycol tetraacetic acid)를 첨가한 것에 약물을 용해시켰으며 나머지는 모두 완충액의 조성 중에 1.2 mM의 $CaCl_2$ 를 첨가하여 사용하였다. 각 대조군에는 실험군에서 사용한 것과 동일한 완충액을 사용하였다. 상대정맥으로 유리되어 나오는 관류액을 200 μ l씩 취하여 Glucose oxidase-peroxidase 방법에 의하여 포도당의 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

DiC_8 의 포도당의 유리작용과 칼슘의 영향—관류 간에 있어서 기질을 첨가하지 않고 유리된 포도당은 글리코겐의 분해에 의하여 생성된 것이라고 할 수

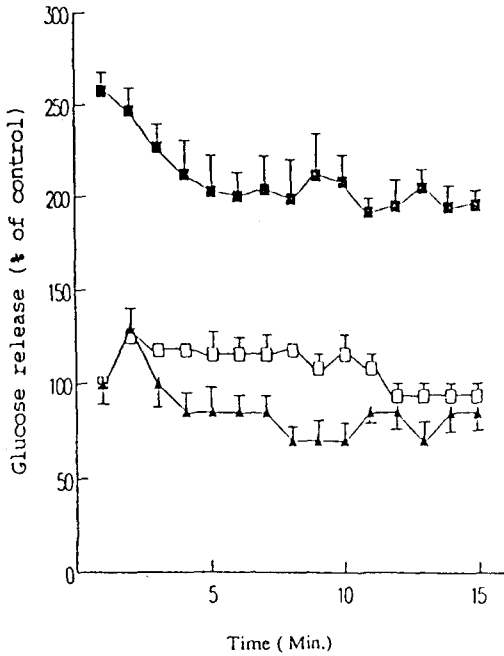


Fig. 2—Effect of calcium on diC₈-induced glucose release.

■—■ diC₈ (50 μM) in 1.2 mM Calcium-containing Krebs-Henseleit buffer, □—□ diC₈ (50 μM) in Ca²⁺-free buffer, ▲—▲ diC₈ (50 μM) in Ca²⁺-free+1 mM EGTA buffer

있다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 diC₈의 농도에 따른 포도당 유리량을 측정된 결과 25 μM에서는 포도당 유리가 증가되지 않았으나 50 μM에서는 현저히 증가하였다. 100 μM에서는 50 μM 농도에 비하여 포도당의 유리가 다소 감소되었다. diC₈의 작용은 diC₈을 가한 후 즉시 나타났으며 그 효과도 15분 이상 지속되었다. 본 실험에서 관류 흰쥐 간에서 diC₈의 포도당 유리작용은 칼슘이 필수적이었으며(Fig. 2) 이는 흰쥐 hepatocyte에서 diacylglycerol이 글리코겐 분해를 촉진하며 여기에 칼슘이 중요한 역할을 한다는 결과¹⁸⁾와 일치하였다. DiC₈(50 μM)에 의한 포도당의 유리는 1.2 mM 칼슘을 포함하는 관류액에서는 대조군의 200%로 증가하였으나 칼슘이 존재하지 않을 경우에는 현저히 감소되었다. 1 mM EGTA를 함유한 칼슘을 첨가하지 않은 관류액에서 EGTA를 함유하지 않은 경우보다 포도당의 유리량이 더 저하되었다. 따라서 diacylglycerol의 간 포도당 유리작용은 세포 외액으로부터의 칼슘의 유입과 세포내 칼슘 둘 다

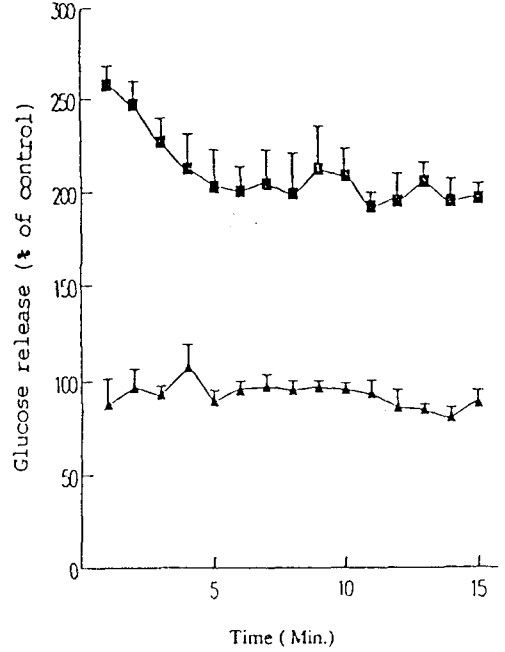


Fig. 3—Effect of indomethacin on diC₈-induced glucose release. Indomethacin was added 15 min before the addition of diC₈.

■—■ diC₈ (50 μM), ▲—▲ diC₈ (50 μM) + indomethacin(50 μM)

필요함을 알 수 있다.

DiC₈의 포도당 유리작용과 cyclooxygenase의 관련성—Protein Kinase C의 활성화 작용이 있는 phorbol ester은 관류 흰쥐 간에서 글리코겐 분해를 촉진하지만^{19,20)} hepatocyte에서는 촉진작용이 나타나지 않았다²²⁾는 보고가 있다. 또한 관류 간에서 phorbol ester의 글리코겐 분해 촉진작용은 cyclooxygenase 저해제인 indomethacin에 의하여 억제되어 cyclooxygenase에 의한 대사산물이 간 글리코겐 분해에 관여한다고 추정되고 있다.^{19,20)} 본 실험에서 diC₈(50 μM)을 가하기 15분 전에 indomethacin(50 μM)을 가했을 때 diC₈의 작용에 의해 유리되어 나오는 포도당의 양은 현저히 저하되어 대조군과 거의 비슷한 결과를 얻었다(Fig. 3). Arachidonic acid(200 μM)에 의한 포도당 유리의 증가도 마찬가지로 indomethacin(50 μM)에 의하여 저해를 받았다(Fig. 4). 보고에 의하면^{20,21)} 관류 간에 arachidonic acid를 가하면 간의 nonparenchymal 세포(Kupffer and endothelial cells)에서 eicosanoids가 생성되어 글리코겐 분해가 촉진된다고 한

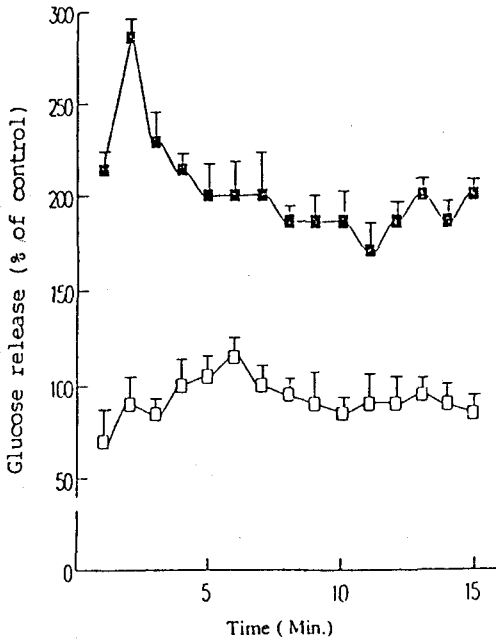


Fig. 4—Effect of indomethacin on arachidonic acid-induced glucose release. Indomethacin was added 15 min before the addition of arachidonic acid.
 ■—■ arachidonic acid (200 μM), □—□ arachidonic acid (200 μM)+indomethacin(50 μM)

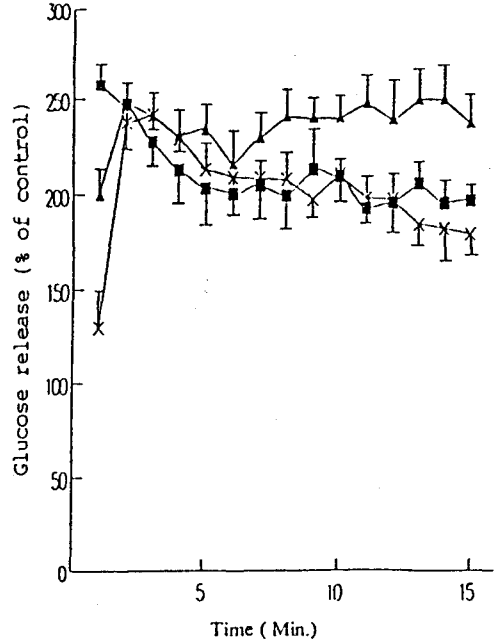


Fig. 5—Effect of phenylephrine on diC₈-induced glucose release.
 ■—■ diC₈(50 μM), ×—× phenylephrine(10 μM), ▲—▲ diC₈(50 μM)+phenylephrine(10 μM)

다. 이러한 작용은 hepatocyte에서는 일어나지 않는다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 나타난 indomethacin에 의한 diC₈의 포도당 유리작용의 저해작용은 phorbol ester의 작용기전과 마찬가지로 hepatocyte가 아닌 관류 간에서만 일어나는 cyclooxygenase의 활성화에 의하여 일어나는 작용으로 볼 수 있겠다.

DiC₈에 의한 포도당 유리작용에 있어서 phenylephrine과의 상호작용—Cyclooxygenase에 의한 생성물인 prostaglandin D₂, E₂, F_{2α} 등은 간 포도당 유리를 촉진하며 그 작용은 세포내 칼슘에 의하여 일어나며 PGF_{2α}는 α-효능제인 페닐에프린과 동일한 세포내 칼슘 pool을 이용한다고 알려져 있다.^{20,21} 본 실험에서 diC₈(50 μM)과 phenylephrine(10 μM)이 동시에 가했을 경우, diC₈ 혹은 phenylephrine만 존재할 경우에 비하여 상승작용은 나타나지 않았다(Fig. 5). 일반적으로 각기 다른 기전에 의하여 글리코젠 분해를 촉진하는 두 가지 agonist를 최대농도로 같이 투여할

경우 각각의 agonist 단독투여의 경우에 비하여 상승작용이 나타난다.^{12,23} 따라서 관류 간에 있어서 diC₈과 phenylephrine의 작용은 동일한 칼슘 pool을 이용하므로 동시 투여시 상승효과가 나타나지 않은 것으로 생각된다.

결 론

Diacylglycerol의 포도당 유리작용에 대한 기전을 알기 위하여 칼슘, cyclooxygenase 저해제인 indomethacin, 알파-효능제인 phenylephrine 등이 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol(diC₈)의 포도당 유리작용에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DiC₈(50 μM)은 포도당 유리를 증가시켰으며 칼슘이 diC₈(50 μM)에 의한 포도당 유리에 필수적이었다.
2. DiC₈(50 μM)에 의한 포도당 유리작용은 indomethacin(50 μM)에 의하여 저해되었다.
3. Arachidonic acid(200 μM)는 포도당 유리를 증

가시켰으며, 이 작용은 indomethacin(50 μ M)에 의하여 저해되었다.

따라서 관류 간에서 diC₈의 포도당 유리 촉진작용은 cyclooxygenase의 작용과 관련이 있으리라 여겨진다.

감사의 말씀

이 논문은 1990년도 교내 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

문헌

- 1) Burgess, G.M.: Receptors and phosphoinositides in liver, *In Receptor biochemistry and methodology*; Ed. by Putney Jr. J.W.; ALAN R. LISS, INC., NEW YORK. 7, 311(1986).
- 2) Morgan, N.G., Shuman, E.A., Exton, J.H. and Blackmore, P.F.: Stimulation of hepatic glycogenolysis by α_1 - and β_2 -adrenergic agonists. *J. Biol. Chem.* **257**, 12907(1982).
- 3) Exton, J.H. and Park, C.R.: Control of gluconeogenesis in liver: Effects of glucagon, catecholamines and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **243**, 4189(1968).
- 4) Tolbert, E.M., Whire, A.C., Aspary, K., Cutts, J. and Fain, J.N.: Stimulation by vasopressin and α -catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 1938(1980).
- 5) Fain, N.J. and Garcia-Sainz, J.A.: Role of phosphatidyl inositol turnover in alpha-1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha-2 effects of catecholamines. *Life Sci.* **26**, 1183(1980).
- 6) Kunos, G.: The hepatic α_1 -adrenoceptor. *Sci.* **202**, 380(1984).
- 7) Reinhart, P.H., Taylor, W.M. and Bygrane, F.S.: The contribution of both extracellular and intracellular calcium to the action of α -adrenergic agonists in perfused rat liver. *Biochem. J.* **220**, 35(1984).
- 8) Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F.: Stimulation of inositol triphosphate formation in hepatocytes by vasopressin, adrenaline and angiotensin II and its relationship to changes in cytosolic free Ca²⁺. *Biochem. J.* **227**, 79(1985).
- 9) Morgan, N.G., Blackmore, P.F. and Exton, J.H.: Modulation of the α_1 -adrenergic control of hepatocyte calcium redistribution by increases in cyclic-AMP. *J. Biol. Chem.* **258**, 5110(1983).
- 10) Rall, T.W.: Role of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic-AMP) in activation of catecholamines; *Pharmacol. Rev.* **24**, 399(1972).
- 11) Greengard, P.: phosphorylated proteins as physiological effects. *Sci.* **199**, 146(1978).
- 12) Hoffman, B.B., Garcia-Sains, J.A., Li, S.H., Lefkowitz, R.J. and Fain, J.N.: Role of alpha-1 adrenoceptors in the turnover of phosphatidylinositol and alpha-2 adrenoceptors in the regulation of c-AMP accumulation in hamster adipocyte. *Life Sci.* **27**, 953(1980).
- 13) Poggioli, J., Mauger, J.P., Claret, M.: Effect of cyclic AMP dependent hormones an Ca²⁺ mobilizing hormones on the Ca²⁺ influx and phosphoinositide metabolism in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **235**, 663(1986).
- 14) Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y.: Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **225**, 2273(1980).
- 15) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *J. Biol. Chem.* **210**, 172(1984).
- 16) Niedel, J.E. and Blackshear, P.J.: Protein kinase C, *In Receptor Biochemistry and Methodology*; Ed. by J.W. Putney, jr., ALAN R. LISS, INC., NEW YORK. 7, 47(1986).
- 17) Nishizuka, Y., Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U. and Kaibuchi, K.: Phospholipid Turnover in Hormone Action. *Recent progress in Hormone Research.* **40**, 301(1983).
- 18) Van de Werve, G., Proietto, J. and Jeanrenaud, B.: Control of glycogen phosphorylase interconversion by phorbol esters, diacylglycerols, Ca²⁺ and hormones in isolated rat hepatocytes. *Biochem.* **231**, 511(1985).
- 19) Garcia-Sainz, J.A. and Hernandez-Sotomayor, S.M.

- T.: Stimulation of hepatic glycogenolysis by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)via cyclooxygenase products. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **132**, 204(1985).
- 20) Altin, J.G. and Bygrave, F.L.: Non-parenchymal cells as mediators of physiological responses in liver. *Mol. Cell. Biochem.* **83**, 3(1988).
- 21) Altin, J.G., Bygrave, F.L.: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and the thromboxane A2 analogue ONO-11113 stimulate Ca^{2+} fluxes and other physiological responses in rat liver. Further evidence that prostanoids may be involved in the action of arachidonic acid and platelet-activating factor. *Biochem. J.* **249**, 677(1988).
- 22) Corvea, S., Garcia-Sainz, J.A.: Phorbol esters inhibit α_1 -adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**, 1128(1984).
- 23) Altin, J.G., Bygrave, F.L.: Synergistic stimulation of Ca^{2+} uptake by glucagon and Ca^{2+} mobilizing hormones in the perfused rat liver. A role for mitochondria in long term Ca^{2+} homeostasis. *Biochem. J.* **238**, 653(1986).