

흰쥐의 배양된 간세포에서 ethanol에 의해 유도된 p42/44 MAPkinase가 IGF system에 미치는 효과

이선미 · 김종훈 · 강창원*

진북대학교 수의과대학, 생체안전성 연구소
(게재승인: 2006년 12월 3일)

Effects of ethanol-induced p42/44 MAPkinase activity on IGF system in primary cultured rat hepatocytes

Sun-Mi Lee, Jong-Hoon Kim, Chang-Won Kang*

College of Veterinary Medicine, Bio-safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: December 3, 2006)

Abstract : Ethanol abuse is associated with liver injury, neurotoxicity, modulation of immune responses, and increased risk for cancer, whereas moderate ethanol consumption exerts protective effects against liver injury. However, the underlying signal transduction mechanisms of insulin-like growth factors (IGFs) which play an important regulatory role in various metabolism mechanisms are not well understood. We investigated the effects of ethanol-induced p42/44 activity on IGF-I secretion, IGF-I receptor and IGFBP-1 secretion using radioimmunoassay and western blotting in primary cultured rat hepatocytes. The p42/44 activity, IGF-I secretion and IGF-I receptor activity significantly accelerated compared to control at 10 and 30 min after 200 mM ethanol treatment, but then it became suppressed at 180 min. In contrast, IGFBP-1 secretion was inhibited compared to control at 30 min after 200 mM ethanol treatment, but increased at 180 min. The IGF-I secretion, IGF-I receptor and p42/44 activity at 30 min after 200 mM ethanol treatment accelerated with increasing ethanol concentration but IGFBP-1 secretion inhibited ($p < 0.05$). The increased IGF-I secretion, inhibited IGFBP-1 secretion and IGF-IR activity by ethanol-induced temporal p42/44 activity at 30 min after ethanol treatment was blocked by treatment with PD98059. Alcohol dehydrogenase (ADH) inhibitor, 4-methylpyrazole blocked the changes of IGF-I secretion, IGFBP-1 secretion, and IGF-IR activity by ethanol-induced p42/44 activity at 30 and 180 min. Taken together, these results suggest that ethanol is involved in the modulation of IGF-I and IGFBP-1 secretion and IGF-IR activity by p42/44 activity in primary cultured rat hepatocytes. In addition, changing of p42/44 activity by ethanol was caused with ADH.

Key words : hepatocyte, IGF-I, IGF-I receptor, IGFBP-1, p42/44

서 론

Ethanol은 간장에서 단백질, glucose, triglycerides 및 phospholipid 등의 변화에 따라 ethanol성 간염, 섬유증 및 지방간을 유발한다고 알려져 있다 [10, 20, 21, 26]. 또한 ethanol은 간세포에서 세포 증식과 사멸을 유발하며, 여기에 관여하는 인자로는 reactive oxygen species

(ROS), protein kinase C, adenylate cyclase 및 mitogen-activated protein kinase(MAPkinase)가 있다. 특히 MAPkinase 중 p42/44 (extracellular signal regulated kinase 1과 2)는 ethanol에 대한 간세포 활성화에 깊이 관여하고 있다고 보고되었다 [1, 2, 8, 14, 27].

흰쥐의 배양된 간세포에서 angiotensin-II와 혈청에 의하여 활성화된 p42/44는 ethanol에 의하여 억제되며, 간

*Corresponding author: Chang-Won Kang
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: +82-63-270-3715, Fax: +82-63-270-3780, E-mail: cwkwang@chonbuk.ac.kr]

세포에서 ethanol은 p42/44 MAPkinase와 p38 등을 장시간 자극한다고 보고되었다 [4]. 이와 같이 일차 배양된 간세포에서 ethanol에 의한 p42/44 활성화와 이에 따른 세포사멸과의 연관성은 이미 잘 알려진 사실이다.

Insulin-like growth factor-I(IGF-I)은 기능적으로 생체의 내분비, 방계분비 및 자기분비를 통하여 세포 증식, 분화 및 대사에 관여하는 호르몬이며, 순환혈액내 존재하는 대부분 IGF-I은 주로 간세포에서 생산되는 것으로 보고 되어있다 [7, 9]. IGF-I은 DNA 합성에 필요한 G1기에서 S기로 진입하는데 필요한 인자이며, IGF-I receptor에 반응함으로써 세포의 유사분열효과와 apoptosis를 억제하는 역할을 한다 [3, 30, 31]. 또한 순환혈액내에 존재하는 IGF-I은 6 types의 IGF-binding proteins(IGFBPs)과 친화력을 가지고 있다 [5, 11]. 이 중 IGFBP-1은 주로 간세포에서 생산되며, 그 기능이 아직까지 명확하지 않지만 IGF-I 반감기 조절, 세포 증식 억제, 면역 억제, 세포 리모델링 억제 및 세포 사멸뿐만 아니라 세포 cytokine 등의 분비 조절에 관여하고 있으며, 특히 당뇨 및 생체 염증작용 등에 의한 생체 이화학적 반응에 관여함이 보고되었다 [11, 15]. 그러나 ethanol에 대한 호르몬 분비 기전이 아주 복잡하여 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았으며, 특히 IGFs system과의 연관성은 더우기 명확하게 알려져 있지 않은 상태이다. 따라서 이 연구는 배양된 흰쥐의 간세포에서 ethanol에 의해 유도된 p42/44 MAPkinase가 IGF-I와 IGFBP-1 분비 및 IGF-IR에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 150 g 내외의 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 랫트를 사용하였다.

간세포에 ethanol 처리

간세포 분리는 Seglen 등 [29]의 방법에 따라 sodium pentobarbital(45 mg/kg BW)을 복강에 주입하여 마취시킨 후 collagenase(Sigma, USA)를 관류하였다. 요약하면, Ca²⁺-free 완충액(8.3 g NaCl, 0.5 g KCl, 2.4 g HEPES, pH 7.4)을 이용하여 간장에 충만 되어 있는 혈액을 제거하였다. Collagenase 완충액을 이용하여 간세포를 분리한 후 Williams E buffer(Sigma, USA)로 세척하였다. Trypan blue 용액을 이용하여 세포의 생존율(97% 이상)을 확인 한 후 3 × 10⁶ 세포를 collagen이 coating된 petri-dish(60 mm diameter)에 fetal bovine serum(5%, v/v; Hyclone, USA)이 함유된 Williams E 액체배지에 넣은 다음 37°C에 2시간 세포를 안정화하여 간세포를 부착시

켰으며, 이후 serum이 첨가되지 않은 부착된 간세포에 200 mM ethanol을 0.5, 10, 30, 60 및 180분 동안 처리하였다.

IGF-I 분석

IGF-I을 분석은 Park 등 [24]의 방법에 따랐다. 요약하면, ethanol을 처리한 간세포 배양상층액 200 μl에 acid-ethanol(2 M HCl: ethanol = 1:7) 800 μl를 첨가한 후 3,000 rpm으로 30분간 냉장 원심분리하여 IGF-I을 분리하였다. 여기에 100 μl에 polyclonal anti-IGFs(Gro-Pep, Australia) 50 μl를 넣은 후 조제된 [¹²⁵I]-IGF-I (20,000 cpm/100 μl)을 100 μl 첨가하고 60분후에 혼합하여 각각의 시험관에 4°C 18시간 반응시켰다. 그 후 말 혈청(Sigma, USA) 50 μl와 12% polyethylene glycol #8000(PEG) 1 ml(Sigma, USA)을 첨가하여 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter(Packard, USA)로 측정하였다.

Western immunoblotting 분석

BCA 단백질 정량법을 이용하여 각각 40 μg의 sample 들을 10% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride(PVDF)에 이동하였다. PVDF은 5% 탈지유에 1시간 동안 차단시키고, 일차항체를 1:250~1:1,000 비율로 희석하여 4°C에서 18시간 이상 반응시켰다. 그 후, PVDF을 0.1% Tween-20/1X TBS에 10분 간격으로 3회 세척하고, 1% 탈지유에 3,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled secondary antibody에 1시간동안 반응시킨 후, 3회 세척하고 ECL solution(Santa Cruz, USA) 처리한 다음 X-ray 필름에 노출시켜 현상하였다.

통계처리

이 실험에서 측정된 결과는 mean ± SD로 나타내었고 군간의 차이는 Student's *t*-test를 이용하였으며, *p*-value < 0.05 경우를 유의한 차이로 인정하였다.

결 과

Ethanol 처리시간이 p42/44, IGF-I분비, IGF-IR 및 IGFBP-1 분비에 미치는 효과

배양된 간세포에 200 mM ethanol을 0.5, 10, 30, 60 및 180분 동안 처리한 후 ethanol이 p42/44, IGF-I분비, IGF-IR 및 IGFBP-1 분비에 미치는 효과는 Fig. 1A에서와 같다. 즉 인산화된 p42/44 활성화는 10과 30분에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가(*p* < 0.05) 되었으나, 180분에서는 유의성 있게 감소(*p* < 0.01)되었다.

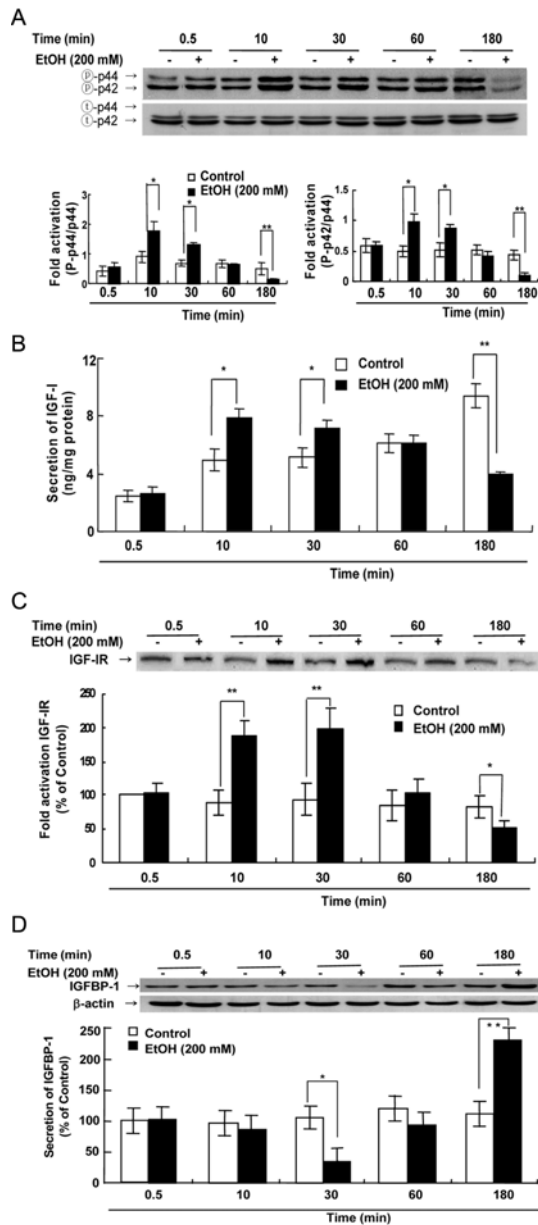


Fig. 1. Time course of 200 mM ethanol-induced p42/44 activity (A), IGF-I secretion (B), IGF-IR activity (C) and IGFBP-1 secretion (D) in primary cultured rat hepatocytes. IGF-I secretion was determined by radioimmunoassay (RIA). IGFBP-1, IGF-IR and p42/44 activity as assessed using a densitometer and Western blotting in primary cultured rat hepatocytes ($n = 7$). Equal amounts (40 μ g) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted. Data are mean \pm SD values. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared to control.

IGF-I 분비는 10분 및 30분 처리군에서 대조군에 비

하여 증가($p < 0.05$) 하였으나, 180분에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.01$) 되었다(Fig. 1B).

IGF-IR 활성 역시 ethanol 10분과 30분 처리군이 대조군에 비하여 유의성 있게 증가($p < 0.01$)되었으나, 180분에서는 대조군에 비하여 감소($p < 0.05$) 되었다(Fig. 1C).

IGFBP-1 분비는 ethanol 30분 처리군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소($p < 0.05$)되었으나, ethanol 180분 처리군에서는 IGFBP-1 분비가 대조군에 비하여 유의성 있게 증가($p < 0.05$)되었다(Fig. 1D).

Ethanol 처리농도가 p42/44, IGF-I, IGF-IR 및 IGFBP-1 분비에 미치는 효과

Ethanol 10분 처리에 의한 IGF-I 분비와 p42/44활성은 유의성 있게 증가하였지만 IGFBP-1분비에 있어서는 ethanol 10분 처리가 대조군에 비하여 차이는 인정되지 않았다. 따라서 저자들은 ethanol 30분 처리에 의한 0, 50, 100 및 200 mM ethanol 농도에서 확인하였다. 그 결과 인산화 된 p42/44 활성은 100과 200 mM ethanol 처리군이 대조군에 비하여 증가됨을 확인하였다(Fig. 2B). 이때 IGF-I 분비는 ethanol 농도 의존적으로 증가되었으며, 특히 200 mM에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가($p < 0.05$)하였다(Fig. 2A). 그러나 예비실험에서 500 mM ethanol 30분 처리시 간세포가 거의 사멸하였다(data not shown).

IGF-IR 활성은 ethanol 30분 처리에서 농도 의존적으로 증가되었으며, 특히 200 mM ethanol 처리군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2B). 이에 반하여 IGFBP-1 분비는 ethanol 농도 의존적으로 감소되었으며, 특히 100과 200 mM ethanol 처리군이 대조군에 비하여 감소되었다(Fig. 2B).

Ethanol에 의한 IGF-I, IGF-IR 및 IGFBP-1분비의 일시적인 변동과 p42/44 활성과의 관련성

배양된 간세포에서 ethanol에 의한 일시적인 p42/44 활성과 이에 따른 IGF-I, IGF-IR 활성 및 IGFBP-1 분비의 상호 관련성 여부를 구명하기 위하여 p42/44 억제제인 PD98059(10 μ M)를 사용하였다. 그 결과 200 mM ethanol 30분 처리군은 대조군에 비하여 p42/44활성 증가, IGF-I 분비 증가, IGF-IR 활성 증가 및 IGFBP-1 분비를 감소시킨 반면, p42/44 억제제인 PD98059 단독 처리군은 대조군에 비하여 p42/44활성 감소, IGF-I분비 감소, IGF-IR활성 감소 및 IGFBP-1 분비 증가를 유발함으로써 ethanol 180분 처리에 따른 p42/44, IGF-I 분비, IGF-IR활성 및 IGFBP-1 분비 양상과 같은 결과를 관찰하였다. 또한 ethanol 30분 처리 후 PD98059 처리는 ethanol에 의한 일시적인 인산화 p42/44 증가, IGF-I 분비증가,

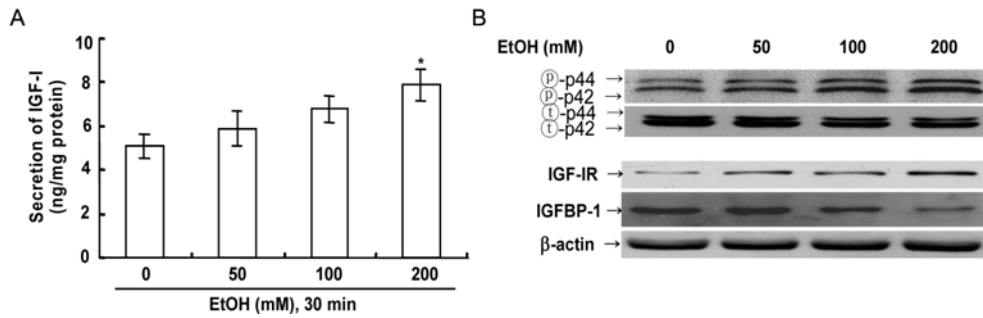


Fig. 2. Effects of different concentrations of ethanol on secretion of IGF-I secretion (A), p42/44 activity, IGF-IR activity and IGFBP-1 secretion (B) in primary cultured rat hepatocytes. IGF-I secretion was determined by RIA. IGFBP-1, IGF-IR and p42/44 activity as assessed using a densitometer and Western blotting in primary cultured rat hepatocytes ($n = 7$). Equal amounts ($40 \mu\text{g}$) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted. Data are mean \pm SD values. *, $p < 0.05$ compared to control.

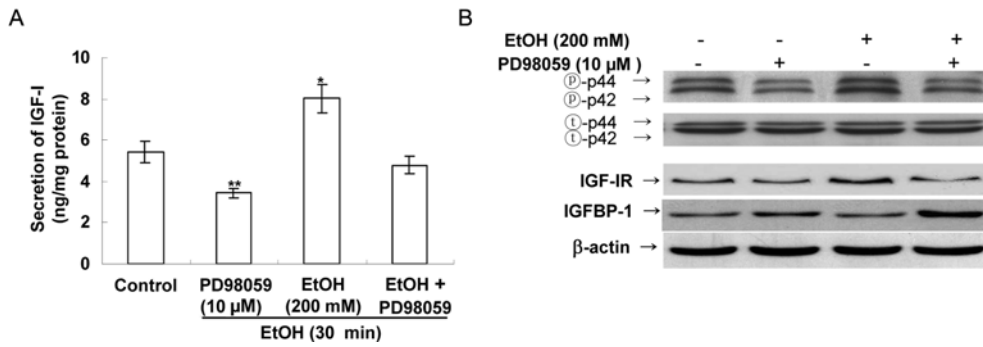


Fig. 3. Effects of PD98059 on changing of IGF-I secretion (A), p42/44 activity, IGF-IR activity, and IGFBP-1 secretion (B) at 30 min. after ethanol treatment in primary cultured rat hepatocytes. IGF-I secretion was determined by RIA. IGFBP-1, IGF-IR and p42/44 activity as assessed using a densitometer and Western blotting in primary cultured rat hepatocytes ($n = 7$). Equal amounts ($40 \mu\text{g}$) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted. Data are mean \pm SD values. *, $p < 0.05$ compared to control.

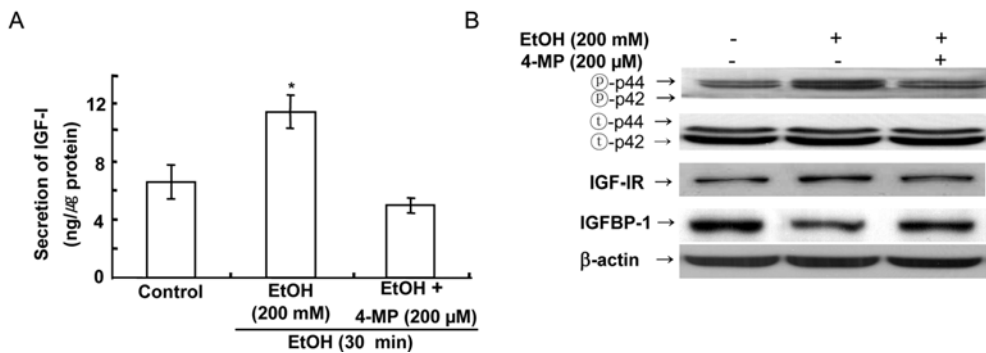


Fig. 4. Effects of 4-MP on the change of IGF-I secretion (A), p42/44 activity, IGF-IR activity, IGFBP-1 secretion (B) at 30 min. after ethanol treatment in primary cultured rat hepatocytes. IGF-I secretion was determined by RIA. IGFBP-1, IGF-IR and p42/44 activity as assessed using a densitometer and Western blotting in primary cultured rat hepatocytes ($n = 7$). Equal amounts ($40 \mu\text{g}$) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted. Data are mean \pm SD values. *, $p < 0.05$ compared to control.

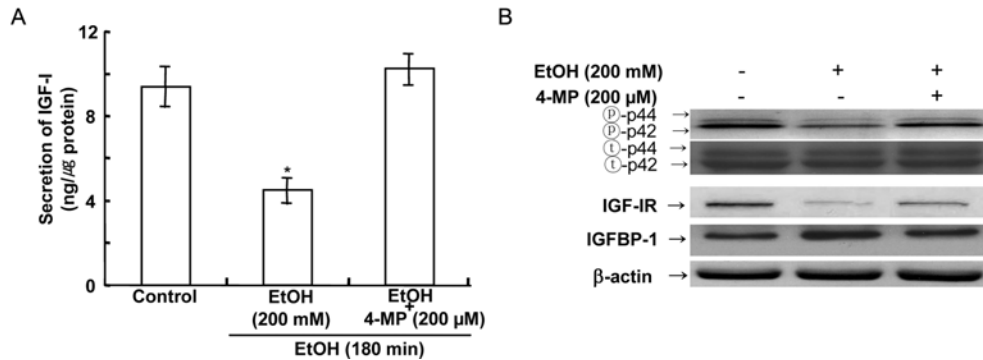


Fig. 5. Effects of 4-MP on the IGF-I secretion (A), p42/44 activity, IGF-IR activity and IGFBP-1 secretion (B) at 180 min. after ethanol treatment in primary cultured rat hepatocytes. IGF-I secretion was determined by RIA. IGFBP-1, IGF-IR and p42/44 activity as assessed using a densitometer and Western blotting in primary cultured rat hepatocytes ($n = 7$). Equal amounts (40 μ g) of total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted. Data are mean \pm SD values. *, $p < 0.05$ compared to control.

IGF-IR 활성증가 및 IGFBP-1 분비감소를 억제하였다 (Fig. 3A, B).

Ethanol 의한 IGF-I, IGFBP-1, IGF-IR 및 p42/44 활성과 ADH와의 관련성

배양된 간세포에서 ethanol에 의한 IGF-I 분비, IGFBP-1 분비, IGF-IR 활성 및 p42/44 활성의 변동이 ethanol 분해효소인 alcohol dehydrogenase(ADH)와의 관련성 여부를 확인하기 위하여 ethanol 분해 효소 억제제인 200 μ M 4-methylprazol(4-MP)을 적용하였다. 그 결과 일차 배양된 간세포에 200 mM ethanol을 30분 처리에 의한 일시적인 IGF-I 분비 증가, IGFBP-1 분비 감소, IGF-IR 활성 증가 및 p42/44 활성 증가는 4-MP에 의하여 그 작용이 차단됨이 확인되었다(Fig. 4A, B). 또한 200 mM ethanol 180분 처리에 의한 IGF-I 분비 감소, IGFBP-1 분비 증가, IGF-IR 활성 감소 및 p42/44 활성 감소 역시 4-MP에 의하여 차단되었다(Fig. 5A, B).

고 찰

이 연구에서는 배양된 간세포에서 ethanol이 세포신호 전달체인 p42/44 활성, IGF-I 분비, IGF-IR 활성, IGFBP-1 분비와의 관련성 및 ethanol 대사와의 연관성을 검토하였다.

간세포에서 ethanol은 MAPkinase를 조절하며 MAP kinase 중 p42/44는 세포 분화, 증식 및 apoptosis와 밀접한 관련성이 있다고 알려져 있다 [1]. 특히, 간세포에서 ethanol은 p42/44 활성을 길게 유지시키며, 또 다른 연구에서는 간세포에 ethanol 처리는 일시적으로 p42/44 활성을 증가시키지만 만성 ethanol 투여는 그 활성이 감소

한다고 보고하였다 [17, 21]. 또한 간세포에 ethanol 10-30분 처리에 의한 p42/44 활성의 일시적 증가는 간세포의 스트레스 저항력 증가를 유발하며, ethanol 처리에 의한 장시간 p42/44 활성 유지는 간세포 증식주기 억제에 관여하고 있음을 보고하였다 [4, 28, 33]. 이 연구에서는 배양된 간세포에 ethanol 처리는 일시적으로 p42/44 활성이 증가되었고 180분에서는 감소되었다. 이는 장시간 ethanol 처리에 의하여 간세포 분화와 증식 억제 및 apoptosis에 의한 것으로 사료된다. 또한 장시간 ethanol 노출 시간에 따른 다른 연구와 이 연구의 p42/44 활성 차이는 초기 배양된 환경의 간세포 상태, 분리된 간세포를 배양접시에 부착시키는 시간 및 배지의 유지 조건이 다르므로써 그 결과가 다를 수 있음을 암시하였다. 또한 ethanol 30분 처리에 의한 일시적인 p42/44 활성은 농도 의존적으로 증가하였다. 이와 같이 ethanol에 의한 일시적인 p42/44 활성 증가 양상은 상기 연구 결과와 일치하였으며, 이러한 활성 증가는 일시적인 세포 스트레스 저항력이 관여할 수 있음을 암시하였다.

간세포에 IGF-I 첨가는 p42/44 활성을 증가시키며, 간세포에서 ethanol은 IGF-I 분비를 억제한다고 보고하였다 [12, 13]. 또한 전보 [15, 24]에서 환경에 ethanol 투여는 혈액과 간조직의 IGF-I 분비를 억제시켰으며, 일차 배양된 간세포에서 ethanol은 산화성스트레스 증가에 의하여 IGF-I 분비가 억제된다고 보고하였다. 간세포의 스트레스 저항력 증가는 IGF-I 분비를 증가시키며, ethanol은 일시적인 세포스트레스 저항성에 영향을 있음을 보고하였다 [22, 32]. IGF-IR은 세포 증식에 관여하는 IGF-I 과 결합하여 자동 인산화를 유도하고 ras-raf-MAPkinase cascade를 통하여 세포의 유사분열, 형질변화 및 apoptosis를 억제시킴으로써 IGF-I 분비를 자극한다고 보고하였

다 [19]. 이 연구에서 간세포에 ethanol 처리는 일시적으로 IGF-I 분비증가와 IGF-IR 활성이 증가되고 ethanol 180분 처리에서는 IGF-I 분비 억제와 IGF-IR 활성억제가 관찰되었다. 이는 배양된 간세포에서 ethanol에 의한 일시적인 IGF-I 분비와 IGF-IR 활성 증가는 세포의 스트레스저항력 증가와 관련이 있으며, 장시간 ethanol 노출에 대한 IGF-I 분비 억제와 IGF-IR 활성 억제는 이 전보 [16, 24]에서와 같이 ethanol에 의한 산화성스트레스 증가에 의한 세포 분화와 증식 억제가 IGF-I 분비를 억제시킬 수 있음을 암시하였다. 또한 일시적인 ethanol 처리에 의한 IGF-I 분비와 IGF-IR 활성 변동은 p42/44 억제제에 의하여 차단되었으며, 장시간 ethanol 처리에 의한 IGF-I 분비와 IGF-IR 활성 변동 양상이 p42/44 억제제 단독 처리군과 일치함에 따라 단 · 장시간 ethanol에 의한 IGF-I 분비와 IGF-IR 활성 변동은 p42/44 활성이 관련 될 수 있는 가능성을 암시하였다.

배양된 간세포에 생산되는 IGFBP-1은 Hs578T breast cancer cell과 간세포에서 apoptosis를 증가시킨다고 보고 [11, 14, 25]하였고 이 연구자의 이전 연구 역시 ethanol에 의한 간세포 산화성 스트레스는 IGFBP-1 분비를 증가시킬 수 있음을 보고하였다 [16]. 이 연구에서는 배양된 간세포에 ethanol 30분 처리는 IGFBP-1 분비를 감소시켰으며, ethanol 180분 처리는 그 분비를 증가시켰다. p42/44 억제제 단독 투여는 ethanol 180분 처리에 의한 IGFBP-1 분비 양상과 비슷하였으며, ethanol 30분 처리에 의한 IGFBP-1 분비 변동 역시 p42/44 억제제에 의하여 그 분비가 증가되었다. 이는 간세포에서 일시적 혹은 장시간 ethanol에 의하여 유도된 산화성 스트레스가 IGFBP-1 분비에 영향을 미쳤으며, 이 분비 변동 역시 p42/44 활성이 관련될 수 있는 가능성을 암시하였다.

이어 이 연구자는 일시적 혹은 장기간 ethanol에 유도된 p42/44 활성, IGF-I 분비, IGF-IR 활성 및 IGFBP-1 분비 변동이 ethanol 대사와 어떠한 연관성이 있는지를 구명하기 위하여 단시간 혹은 장시간 ethanol을 처리한 일차 배양된 간세포에 ADH 억제제를 처리한 결과 그 분비와 활성이 차단됨을 확인하였다. Ethanol에 의한 간독성과 apoptosis는 ethanol 대사산물인 ADH 활성에 의한 acetaldehyde가 그 원인이라고 보고되었다 [6, 23, 32]. 또한 간세포에서 ethanol 대사산물인 acetaldehyde가 일시적인 p42/44 활성을 증가시키며, 장시간 ethanol 처리에 따른 간세포내 acetaldehyde 축적 증가가 apoptosis를 유발한다고 보고되었다 [17, 18]. 이는 ethanol 대사산물인 ADH가 p42/44 활성, IGF-I, IGFBP-1 및 IGF-IR 활성에 영향을 미칠 수 있음을 암시하였다. 그러나 ethanol 대사산물인 acetaldehyde가 IGF-I, IGFBP-1 및 IGF-IR 활성과 직접적인 관련성은 앞으로 깊이있게 연구를 진행

시켜야 할 부분으로 사료된다.

따라서 간세포에서 ethanol은 IGF-I, IGF-IR 활성 및 IGFBP-1 분비에 영향을 미치며, 그 호르몬과 활성 변동은 p42/44 활성과 관련성이 있음을 관찰할 수 있었다. 더욱이 ethanol에 의한 p42/44 활성은 간세포에서 ethanol 산화과정에서 생기는 ADH 생성과 상관관계가 있는 것으로 판단되었다.

결론

Ethanol은 간에서 단백질, glucose, triglycerid-es 및 phospholipid 등의 변동에 의하여 ethanol성 간염, 섬유증 및 지방간을 유발한다고 알려져 있다. 그러나 ethanol의 호르몬 분비 기전은 아주 복잡하기 때문에 아직까지 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서 이 연구는 간세포에 ethanol이 세포 신호전달체인 p42/44 활성에 미치는 효과를 확인하고 그 활성이 IGF-I, IGFBP-1 분비 및 IGF-IR 활성에 어떠한 관련성이 있는지를 연구하였다. 이 연구는 일차 배양된 간세포에 ethanol을 처리하고 이를 방사면역측정법과 western blotting 이용하여 아래와 같은 결론을 얻었다.

흰쥐의 배양된 간세포에서 p42/44 활성, IGF-I 분비 및 IGF-IR 활성은 200 mM ethanol 처리 후 10-30분에서 대조군에 비하여 증가하고 180분에 감소하였다 ($p < 0.05$). 이에 반하여 IGFBP-1 분비는 30분에 일시적으로 대조군에 비하여 감소되었으며 180분에 증가하였다 ($p < 0.05$).

흰쥐의 배양된 간세포에서 p42/44 활성, IGF-I 분비 및 IGF-IR 활성은 ethanol 농도 의존적으로 증가하였으며, 특히 200 mM ethanol에서 대조군에 비하여 증가하고, IGFBP-1 분비는 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.05$). 200 mM ethanol 30분 처리에 의한 일시적인 IGF-I와 IGFBP-1 분비 및 IGF-IR 활성 변동은 PD98059에 의하여 차단되었다. 또한 200 mM ethanol 30 혹은 180분 처리에 의한 p42/44 활성 변동은 ADH 억제제인 4-MP에 의하여 차단되었으며, 이때의 ethanol에 의한 IGF-I, IGFBP-1 분비 및 IGF-IR 활성 역시 차단되었다.

이상의 결과를 종합하면 흰쥐의 배양된 간세포에서 ethanol에 의한 p42/44 활성은 IGF-I, IGFBP-1 분비 및 IGF-IR 활성에 영향을 미쳤으며, 이러한 변동은 ethanol 대사산물인 ADH가 관여하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 전북대학교 지원 연구비에 의하여 연구되었으며 또한 2단계 BK사업의 지원비를 받았음.

참고문헌

1. **Aroor AR, Shukla SD.** MAP Kinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life Science* 2004, **74**, 2339-2364.
2. **Bailey SM, Cunningham CC.** Contribution of mitochondria to oxidation stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radi Biol Med* 2002, **32**, 11-16.
3. **Baserga R, Rubin R.** Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993, **3**, 47-61.
4. **Chen J, Ishac EJ, Dent P, Kunos G, Gao B.** Effects of ethanol on mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase cascades in normal and regeneratinn liver. *Biochem J* 1998, **334(Pt3)**, 669-676.
5. **Conover CA.** Regulation and physiological role of insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr J* 1996, **43**, 38-48.
6. **Crabb DW, Bosron WF, Li TK.** Ethanol metabolism. *Pharmacol Ther* 1987, **34**, 59-73.
7. **D'Ercole AJ, Stiles AD, Louis EU.** Tissue concentrations of somatomedin C: Further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci* 1984, **81**, 935-939.
8. **Domenicotti C, Paola D, Vitali A, Nitti M, Cottalasso D, Melloni E, Poli G, Marinari UM, Pronzato MA.** Mechanisms of inactivation of hepatocyte protein kinase C isoforms following acute ethanol treatment. *Free Radical Biol Medi* 1998, **25**, 529-535.
9. **Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J.** Actions of insulin-like growth factors. *Ann Rev Physiol* 1985, **47**, 443-67.
10. **Hidiroglou N, Madere R.** Effect of chronic ethanol dosing on hepatic triglyceride and phospholipid profile and fatty acid in the guinea pig. *Alcohol* 1999, **19**, 229-233.
11. **Jones JI, Clemmons DR.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological Actions. *Endocrine Review* 1995, **16**, 3-34.
12. **Juul A.** Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm IGF Res* 2003, **13**, 113-170.
13. **Kundu AK, Nagaoka M, Chowdhury EH, Hirose S, Sasagawa T, Akaike T.** IGF-I induces growth, survival and morphological chage of primary hepatocytes on a galactose-bared polymer through both MAPK and β -catem in pathways. *Cell Struct Funct* 2003, **28**, 255-263.
14. **Kurose I, Higuchi H, Miura S, Saito H, Watanabe N, Hokari R, Hirokawa M, Takaishi M, Zeki S, Nakamura T, Ebinuma H, Kato S, Ishii H.** Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology* 1997, **25**, 368-378.
15. **Lee PD, Giudice LC, Conover C, Powell DR.** Insulin-like growth factor-binding protein-I: recent findings and new directions. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, **216**, 319-357.
16. **Lee SM, Kang CW.** Effects of ethanol on secretion of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-I (IGBP-1) in primary rat hepatocytes: Involvement of lipid peroxidase (LPO) activity. *Korean J Lab Anim Sci* 2004, **20**, 391-397.
17. **Lee YJ, Aroor AR, Shukla SD.** Temporal activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and c-Jun N-terminal kinase by acetaldehyde in rat hepatocytes and its loss after chronic ethanol exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **301**, 908-914.
18. **Lee YJ, Shukla SD.** Pro- and anti-apoptotic roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in ethanol and acetaldehyde exposed rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2005, **508**, 31-45.
19. **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT.** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995, **16**, 143-163.
20. **Lieber CS.** Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacol Ther* 1990, **46**, 1-41.
21. **Lieber CS.** Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 2005, **9**, 1-35.
22. **Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M.** Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005, **4**, 119-125.
23. **Nomura F, Pikkarainen PH, Jauhonen P, Arai M, Gordon ER, Baraona E, Lieber CS.** Effect of ethanol administration on the metabolism of ethanol in baboons. *J Pharmacol Exp Ther* 1983, **227**, 78-83.
24. **Park SH, Heo JS, Kang CW.** Dose-dependent effect of alcohol on insulin-like growth factor systems in male rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004, **31**, 22-28.
25. **Perks CM, Newcomb PV, Norman MR, Holly JM.**

- Effect of insulin-like growth factor binding protein-1 on integrin signalling and the induction of apoptosis in human breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* 1999, **22**, 141-150.
26. **Pezzarossa A, Dazzi D, Negro R, Cervigni C, Vescovi PP.** Effects of alcohol consumption and accompanying diet on metabolic response to arginine in chronic alcoholics. *J Stud Alcohol* 1999, **60**, 581-585.
27. **Potter JJ, MacDougald OA, Mezey E,** Regulation of rat alcohol dehydrogenase by cyclic AMP in primary hepatocyte culture. *Arch Biochem Biophys* 1995, **321**, 329-335.
28. **Reddy MM, Shukla SD.** Potentiation of mitogen-activated protein kinase by ethanol in embryonic liver cells. *Biochem Pharmacol* 1996, **51**, 661-668.
29. **Seglen PO.** Preparation of isolated liver cells. *Methods Cell Biol* 1975, **13**, 29-83.
30. **Sell C, Baserga R, Rubin R.** Insulin-like growth factor-I and the IGF-receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995, **55**, 303-306.
31. **Sell C, Dumenil G, Deveaud C, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga R.** Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryofibroblasts. *Mol Cell Biol* 1994, **14**, 3604-3612.
32. **Tombes RM, Auer KL, Mikkelsen R, Valerie K, Wymann MP, Marshall CJ, McMahon M, Dent P.** The mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade can either stimulate or inhibit DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes depending upon whether its activation is acute/phasic or chronic. *Biochem J* 1998, **330**, 1451-1460.
33. **Weng Y, Shukla SD.** Ethanol alters angiotensin II stimulated mitogen activated protein kinase in hepatocytes: agonist selectivity and ethanol metabolic independence. *Eur J Pharmacol* 2000, **398**, 323-331.