

Non-isotopic in situ hybridization for the detection of TGF- β mRNA in the diabetic rats.

D.C. Han¹, S.Y. Jin², S.W. Cho¹, M.K. Cha¹, M.S. Park¹, S.D. Hwang¹ and H.B. Lee¹, Hyonam Kidney Laboratory¹ and Dept. of Pathology², Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea.

Cytokine mRNA expression in renal tissue in different forms of renal injury has mainly been studied in isolated glomeruli by Northern blot hybridization. This method may result in degradation of mRNA during isolation of glomeruli and has the disadvantage of being unable to localize the site of mRNA expression. Recently non-isotopic in situ hybridization using biotin or digoxigenin has been shown to be a simpler method for the detection of mRNA in different tissues. TGF- β appears to have an important role in renal injury in diabetic nephropathy. To evaluate the usefulness of non-isotopic in situ hybridization method for the detection of mRNA expression in diabetic kidney, we studied TGF- β mRNA expression in streptozotocin-induced diabetic rats using digoxigenin.

TGF- β probe was labelled with digoxigenin during PCR. Hybridization was carried out for 12-16 hours at 37°C and washed with SSC for 3 hours. TGF- β mRNA was noted in the glomeruli in 20 days after induction of diabetes mellitus. TGF- β mRNA expression was markedly suppressed by insulin treatment. There was no expression of TGF- β mRNA in the interstitium or tubular epithelium. In the normal and RNase treated diabetic rat kidney, TGF- β expression was not detected.

Conclusion : In situ hybridization using digoxigenin is a safe and rapid method and has an additional advantage of being able to locate the site of mRNA expression within the kidney.

고포도당에서 배양된 흰쥐 신사구체에서의 지질 과산화변동

연세의대 약리학교실

하현주, 윤석종, 김경환

당뇨 흰쥐 신조직에서 관찰한 지질과산화물이나 산화된 핵산의 증가는 당뇨병 신증의 발생이나 진행에 산화성 스트레스 (oxidative stress) 가 관여함을 시사하였다. 따라서, 본 연구에서는 고포도당이 산화성 스트레스를 증가하므로써 당뇨병 신증의 병인론으로 작용하는 지를 검색하고자, 흰쥐에서 분리 배양한 사구체를 이용하였다. 나아가 고포도당에 의하여 활성화된다고 알려진 protein kinase C (PKC) 가 지질과산화 증가의 한 기전으로 작용하는지도 알아보려 하였다.

표준화된 체질량법을 이용하여 체중 250 g 정도의 수컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐로부터 콩팥 사구체를 분리한 후 정상 (11 mM 포도당) 또는 고포도당 (31 mM 포도당) 을 함유한 RPMI-1640 배양액으로 1 시간 또는 48 시간 배양하였다. 활성 산소나 PKC 활성화의 관여 여부를 알아보기 위하여 각각에 대한 억제제로 20 mM dimethylthiourea (DMTU) 나 100 nM staurosporine 또는 500 μ M H-7 을 배양액 중에 첨가하였다. 사구체내 지질 과산화물은 malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct 를 표준물로서 excitation wave 515 nm 에서 방출되는 형광을 553 nm 에서 측정하였다.

정상 및 고포도당에서 1 시간 배양된 사구체의 지질과산화물 (nmol/mg protein) 은 0.34 ± 0.03 및 0.56 ± 0.06 ($p < 0.05$) 이었고, 48 시간 배양했을 때에는 각각 0.43 ± 0.09 및 0.76 ± 0.08 ($p < 0.05$) 으로서 각각 고포도당에서의 의의있게 증가하였다. DMTU 는 1 시간 및 48 시간 배양에서 고포도당에 의한 지질과산화물 생성 증가를 의의있게 억제 하였으나, H-7 이나 staurosporine 은 1 시간 배양에서만 억제하였다.

본 연구의 결과 분리된 사구체의 지질과산화가 고포도당 자체에 의해서 증가하고, 48 시간 배양과는 달리 1 시간 배양군에서는 PKC 활성화가 관여함을 알 수 있었다.