

배양한 사구체 상피세포에 대한 당과 후기당화합물에 의한
heparan sulfate proteoglycan의 변화

충북대학교 의과대학 소아과학교실, 약리학교실, University of Texas Health Science Center at San Antonio
하태선, 김현식, Kasinath BS

당뇨병에서 신증이 발병하면 임상적으로 단백질뇨와 신손상진행의 소견이 나타나는데 사구체기저막의 성분상의 변화로서 non-proteoglycan 성분의 증가와 용전하 성분의 감소로 인한 크기와 전하장벽기능의 감소로 단백질뇨가 발생하며 이것은 고혈당이나 이차적인 당화합 단백질, 또는, 비가역적 산물인 후기당화합물(advanced glycosylation endproducts, AGE)과 관련성이 있는데 특히 사구체 여과능의 중요한 인자인 heparan sulfate proteoglycan(HSPG)에 대한 당과 AGE의 역할은 당뇨병에서의 단백질뇨의 발생과 신손상의 진행에 매우 중요할 것으로 사료된다. 이에 본 연구자들은 AGE를 생성하고 당과 AGE에 의한 사구체여과에 중요한 사구체 상피세포의 HSPG의 변화를 HSPG에 대한 난클론항체를 이용한 sandwich-ELISA 방법과 RPD-I을 probe로 이용한 northern 분석으로 관찰하여 다음과 같이 결과를 얻었다.

Fraction V의 bovine serum albumin(BSA)을 glucose-6-phosphate와 반응시켜 만든 당화합물(AGE·BSA)을 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 농도로 배양용기에 coating하고 control로는 당이 없이 BSA만 같은 기간 보관한 것(BSA)을 이용하였다. 성장능의 비교를 위하여 24-well 배양용기에 coating을 안하거나 AGE·BSA 또는 BSA로 coating한 배양용기에 well 당 25,000개의 사구체 상피세포를 배양하고 배양 24시간과 48시간에 직접 세포수를 세어 각 배양시간에서 각조건간에 유의있는 차이를 발견할 수 없었다. HSPG의 변화는 AGE·BSA 또는 BSA 표면위의 사구체 상피세포에 배양액의 당의 농도를 5와 30 mM로 하여 첨가하고 osmotic control로서 당 5mM에 mannitol을 25mM을 섞어서 이를 각각 A5, A30, A25, B5, B30, B25로 group을 지었다. Sandwich-ELISA 방법에 의한 HSPG의 변화는 B5를 standard로 하여 2 days에는 각군간에 차이가 없으나 1 week에는 A30 외에는 모두 증가하였다. 이를 1 week의 B5와 비교하여도 A30과 B30에서 각각 78%와 95%로 유의있게 감소하며 특히 A30가 더 감소하였다. Northern 분석으로도 B5에 대하여 A30에서의 HSPG에 대한 mRNA의 표현이 2 days와 1 week에서 각각 20%와 61%의 유의한 감소를 보였고 A5는 1 week에서만 30%의 감소를 보였다. 그러나 B30의 경우는 10%내의 감소를 보였으며 유의하지는 않았다.

결론적으로, 당과 AGE의 사구체 상피세포의 HSPG에 대한 변화는 노출기간이 길수록 부가적인 효과로 억제하는 양상을 보이나 AGE의 영향이 더 크며 따라서 당뇨병성 신증에서의 단백질뇨의 발생억제에 있어서 단기적인 당조절보다는 장기적으로 AGE의 생성억제가 더 중요할 것으로 사료된다.

Lovastatin inhibits transforming growth factor-beta1 and fibronectin expression in cultured rat mesangial cells. S.I. Kim, D.C. Han and H.B. Lee, Hyonam Kidney Laboratory, Soon Chun Hyang University, Seoul, Korea. We have shown that the inhibition of HMG CoA reductase with lovastatin ameliorates diabetic nephropathy in STZ-induced diabetic rat possibly through the suppression of glomerular transforming growth factor (TGF)- β 1 mRNA expression (Kidney Int. 48, Suppl 51 S61, 1995 and JASN 8, 637A, 1997, A2969). To determine if the suppression of TGF- β 1 expression was caused by reduction of circulating lipid or direct cellular effect by lovastatin, cultured rat mesangial cells (RMC) were examined. When growth of RMC reached to 80% confluency, the cells were synchronized and the cells were treated with control (5.5 mM) or high glucose (30 mM). Lovastatin (10 μ M) or mevalonate (100 μ M) was added alone or together into the culture media. Lovastatin suppressed both control and high glucose-induced TGF- β 1 and fibronectin mRNA expression and protein synthesis by RMC. The down regulation of TGF- β 1 and fibronectin expression by lovastatin was reversed by mevalonate. To evaluate the effect of lovastatin on the localization of p21 Ras, immunostaining was undertaken with polyclonal antibody against Ras protein. Western blot analysis was also carried out with membrane and cytoplasmic fractions of the same cells. While the amount of Ras proteins in RMC cultured with lovastatin increased in the cytoplasmic fraction, those in the membrane fraction decreased. The altered localization of Ras protein induced by lovastatin was reversed by mevalonate and membrane fraction stained strongly. How reduced farnesylation of Ras protein by lovastatin is translated into down regulation of high glucose-induced TGF- β 1 and fibronectin expression remains to be elucidated.