

배양된 Mouse podocyte에서 배양액내 고포도당 및 Angiotensin II의 투여가 Transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)의 분비에 미치는 효과

지이화, 차대룡, 한상영, 강영선, 이소영, 신진호, 권영주, 조원용, 표희정, 김형규, 강신욱*, 한대석*
고려대학교 의과대학 내과학교실, 연세대학교 의과대학 내과학교실*

최근들어 분자생물학의 발달로 사구체기저막(GBM)의 세부구조가 밝혀지며 사구체질환의 진행에서 podocyte의 중요성이 강조되고 있다. Podocyte는 GBM의 외측부를 구성하는 slit diaphragm을 형성하는 주된세포로서 이들로부터 합성되는 각종 단백질의 변화 및 podocyte 손상은 사구체 permselectivity의 변화 및 사구체경화과정에서 중요한 역할을 하리라 추정되고 있다. 현재 밝혀진 podocyte의 중요성은 이들로부터 분비되는, nephrin, podocalyxin, GLEPP1 및 각종 단백질의 변화가 GBM cytoskeleton의 변화를 초래하고, 일단 손상을 받은 podocyte는 증식기능이 없기 때문에 defective GBM 부위로 부터의 사구체경화의 진행이 유발된다는 가설등이 제시되고 있다. 그러나 podocyte에서 조직의 섬유화를 유발시키는 대표적 물질인 TGF $\beta 1$ 의 분비가 이루어지는지는 아직 보고된 바 없다. 이에 저자들은 immortalized mouse podocyte를 배양하여 이들에서 TGF β 의 합성유무를 알아보고자 본연구를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Podocyte의 배양은 33°C의 permissive condition에서 interferon을 투여하여 세포의 증식을 시킨후 37°C의 non-permissive condition에서 interferon을 첨가하지 않은 상태로 14일간 배양하여 podocyte의 differentiation을 유발시켰다. Differentiated podocyte는 differentiated podocyte marker인 podocalyxin 발현유무를 RT-PCR을 통해 확인한 후 배양액내 포도당농도를 각각 5.5, 15, 30mM로 투여하였고, angiotensin II투여군에서는 angiotensin II를 각각 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} M로 투여하였으며 일부에서는 angiotensin II를 10^{-6} M과 함께 angiotensin receptor antagonist인 losartan을 각각 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M로 투여하였다. 고포도당 배양액에서 6시간 후부터 TGF $\beta 1$ mRNA의 발현은 정상 포도당배양액군에 비해 포도당농도에 비례하여 증가가 관찰되었고(NG: 0.69 ± 0.09 , 15mM: 0.83 ± 0.07 , 30mM: 0.90 ± 0.01), 이러한 경향은 72시간까지 지속적으로 관찰되었고 15mM에서 72시간후에는 유의하게 TGF $\beta 1$ 발현이 증가되었다($1.02 \pm 0.04, p < 0.05$). Angiotensin II 투여후 TGF $\beta 1$ mRNA 발현은 6시간후부터 24시간까지 투여농도에 비례하여 유의한 증가소견을 보이다가 72시간후에는 control군에 비해 높은 소견을 보이거나 통계적 유의성은 없었다(0.96 ± 0.06 vs 1.00 ± 0.03 vs 1.23 ± 0.03 ; A-II처리군, 0.69 ± 0.09 ; control군, $p < 0.05$). Angiotensin II와 함께 losartan을 투여한 군에서 6, 24시간후 TGF $\beta 1$ mRNA 발현은 losartan 농도에 비례하여 angiotensin II에 의해 유발된 TGF $\beta 1$ 유전자발현의 유의한 억제에 관찰되었다(1.23 ± 0.03 ; AII 처리군, 0.93 ± 0.06 vs 0.92 ± 0.06 vs 0.76 ± 0.19 ; losartan 투여군, $p < 0.05$). TGF $\beta 1$ 단백질의 발현은 western blot 결과 배양액내 포도당 농도 및 angiotensin II 투여후 72시간에 dose dependent하게 단백질발현이 증가되었고 이들에 의한 VEGF 단백질발현의 증가는 losartan을 동시에 투여함으로써 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 podocyte에서 TGF $\beta 1$ 의 합성이 일어난을 확인할수 있었고 고혈당 및 RAS 활성화는 podocyte로부터의 TGF $\beta 1$ 합성을 증가시켜 사구체경화를 촉진시킬 가능성이 있으리라 사료된다.

고포도당으로 자극한 백서 사구체 대사지움 배양세포에서 ERK pathway 억제가 GLUT1 및 p27^{Kip1}의 발현에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 신장질환연구소
허종호, 강신욱, 최규현, 이호영, 한대석

당뇨병성 신병증은 세포 비후 및 세포의 기질의 축적이 특징으로, 포도당이 당전달체인 GLUT1에 의해 세포내로 유입된 후 ERK pathway를 포함한 다양한 signal transduction pathway를 통해 발생하는 것으로 알려져 있다. 세포 비후는 세포주기에서 cyclin, cyclin-dependent kinase 및 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)에 의해 결정되어지며, 특히 CKIs의 발현 증가는 세포주기 내에서의 진행을 억제시키 세포 비후가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 당뇨병성 신병증의 병태생리에도 CKIs가 관여하는 것으로 알려져 있으나 아직까지 CKIs의 발현과 ERK pathway 및 GLUT1과의 상관관계에 관한 연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구자들은 고포도당으로 자극한 백서 사구체 대사지움 배양세포에서 ERK1/2, GLUT1 및 CKIs의 하나인 p27^{Kip1}의 변화를 관찰하였으며, ERK pathway 억제제인 PD98059가 고포도당에 의한 GLUT1 및 p27^{Kip1}의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 RT-PCR과 Western blot을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고포도당으로 자극한 대사지움 배양세포에서 p27^{Kip1} mRNA 발현은 자극 2시간 후부터 증가되기 시작하여 5일 후에도 증가된 상태가 유지되었다. 자극 5일 후 고포도당군(HG)에서의 p27^{Kip1} mRNA 발현은 대조군(LG)과 mannitol 자극군에 비해 각각 83%와 75% 증가되었다($p < 0.05$). GLUT1 mRNA의 발현도 자극 5일 후 HG군에서 LG군에 비해 63% 증가되었다($p < 0.05$).
2. 고포도당 자극에 따른 total ERK1/2 단백질의 발현에는 큰 변화가 없었던 반면, phospho-ERK1/2는 고포도당 자극 2시간 후부터 증가되기 시작하여 5일 후에도 증가된 상태가 유지되었다. p27^{Kip1}과 GLUT1 단백질 발현도 5일 후 HG군에서 LG군에 비해 각각 72%와 92% 증가되었다 ($p < 0.05$).
3. ERK pathway 억제제인 PD98059는 고포도당에 의한 p27^{Kip1}과 GLUT1 mRNA의 발현 증가를 각각 75%와 80% 억제시켰으며, 단백질의 발현 증가도 각각 87%와 84% 억제시켰다($p < 0.05$).

이상의 결과로 대사지움 배양세포에서 고포도당에 의한 p27^{Kip1}과 GLUT1의 증가는 ERK pathway의 활성화와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있으며, ERK pathway를 차단할 경우 포도당의 세포내로의 유입과 세포 비후를 억제시킬 수 있어 당뇨병성 신병증의 발생을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.