

당뇨 백서 사구체 및 고포도당으로 자극한 immortalized mouse podocyte에서 ZO-1 mRNA와 단백질 발현의 변화

연세대학교 의과대학 내과학교실, 신장질환연구소
김범석, 허중호, 강신욱, 최규현, 이호영, 한대식

임상적 당뇨병성 신병증은 단백질이 특징적인 소견으로 단백질의 발생 기전은 사구체 기저막에서의 charge selectivity와 size selectivity의 장애에 의해 발생되는 것으로 알려져 있다. 이중 size selectivity는 주로 podocyte의 족돌기(foot process) 사이의 slit에 의해 유지되는데, slit내에 존재하는 slit diaphragm은 nephrin과 p-cadherin 등이 구성하는 것으로 알려져 있다. Zona occludens 1(ZO-1)은 podocyte의 족돌기 세포 질내에 존재하는 단백질로 slit diaphragm이 부착되는 부위에 존재하기 때문에 glomerular filtration barrier의 유지에 중요할 것으로 생각되어지고 있다. 최근에 단백뇨를 동반한 MWF rat model에서 사구체내 ZO-1 발현이 감소되었을 뿐만 아니라 세포내 분포가 변화되었다는 보고는 있지만, 당뇨병성 신병증에서 ZO-1의 변화를 고찰한 연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구자 등은 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 백서에서 사구체를 분리하여 당뇨 유행기간에 따른 ZO-1 mRNA와 단백질의 변화를 RT-PCR과 Western blot을 이용하여 관찰하였으며, 이와 동시에 고포도당으로 자극한 conditionally immortalized mouse podocyte에서도 ZO-1 발현의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 당뇨가 유발된 백서에서의 24시간 뇨단백 배설량은 1개월 후 $78.8 \pm 7.2\text{mg}$, 2개월 후 $73.8 \pm 7.2\text{mg}$, 그리고 3개월 후 $90.6 \pm 11.3\text{mg}$ 으로 대조군(1개월 후 $23.0 \pm 1.5\text{mg}$, 2개월 후 $23.9 \pm 1.2\text{mg}$, 3개월 후 $19.8 \pm 3.2\text{mg}$)에 비해 유의하게 증가되었다($p < 0.05$).
2. 당뇨 백서 사구체내 ZO-1 mRNA 발현은 대조군에 비해 모든 기간에서 유의하게 증가되었으며, 특히 3개월 후에는 122%가 증가되었다($p < 0.05$). ZO-1 단백질 발현도 mRNA의 발현 변화와 유사한 소견을 보였다.
3. 7일간 고포도당(30mM) 배양액에서 배양한 podocyte내의 ZO-1 mRNA와 단백질 발현은 대조군에 비해 73%와 59% 증가되었다($p < 0.05$).

이상의 결과로 당뇨병성 신병증의 초기부터 ZO-1 mRNA와 단백질 발현이 증가되며, 이러한 ZO-1의 변화가 당뇨병성 신병증의 병태생리와 밀접히 연관되어 있을 것으로 생각된다. 향후 ZO-1의 발현과 단백질의 상관관계 및 다른 filtration barrier 관련 유전자와의 연관성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

고포도당 환경에 의한 백서 폐산지움 세포내 Calcium 활성도의 변화

송준호¹, 정상용², 이승우¹, 이루다¹, 김문재¹, 서창국² 인하의대 내과학교실¹, 생리학교실²

Calcium (Ca^{2+})은 세포내 신호전달 체계의 전달자 중 하나로 세포의 신호의 변화에 따라 다양한 세포 반응을 유발한다. 폐산지움 세포 내의 Ca^{2+} 신호 전달의 변화는 과여과와 단백질 현상 등 세포 수축에 따른 혈액학적 변화와 세포 활성물질을 통한 세포외 기질 축적 등 병리적 기전을 매개하며, 이와 관련되어 여러 가지 pathogenic agonist에 대한 Ca^{2+} 신호전달의 반응에 대한 연구들이 선행된 바 있으나, 당뇨병성 신증과 유사한 고포도당 환경에서의 변화에 대해서는 정확하게 알려진 바 없다. 연구자들은 백서 폐산지움 세포에서 포도당 농도 변화에 따른 세포내 Ca^{2+} 활성도의 변화를 측정하고 관련된 Ca^{2+} 통로를 분석하였다.

1. 고포도당(30, 50mM)에 의해 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는 점진적으로 증가하였으며, 포도당 농도가 높을수록 초기에 나타나고(30mM, 3000-3500sec; 50mM, 1000-1500sec) 최고치가 증가되는(30mM, $0.82 \pm 0.23 \sim 2.17 \pm 0.46$; 50mM, $0.82 \pm 0.06 \sim 2.00 \pm 0.7$) 양상을 보였다. 이와 같은 반응은 정상포도당이나 동일 농도의 mannitol에서는 나타나지 않았다.
2. 고포도당에 의한 Ca^{2+} 신호전달에서 주로 세포 수축과 연관되는 IP_3 -mediated Ca^{2+} release와 voltage-operated Ca^{2+} channel(VOCC)에 의한 Ca^{2+} 활성도의 변화는 관찰되지 않았다.
3. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 증가는 세포 밖의 Ca^{2+} 을 제거한 경우(chelator; EGTA, 0.1mM) 발생하지 않아 고포도당 환경에서의 Ca^{2+} 신호전달은 세포외의 Ca^{2+} 의 유입에 의한 것을 알 수 있었다.
4. 정상 Ca^{2+} 용액에서 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 증가는 store-operated Ca^{2+} influx (SOI)의 억제제로 알려진 SKF96365($50 \mu\text{M}$)에 의해 억제되어 SOI에 의한 Ca^{2+} 의 유입이 연관됨을 알 수 있었다.
5. Ca^{2+} 의 세포외 배출을 결정하는 Na^+ - Ca^{2+} exchanger(NCX)의 활성도를 측정하기 위해 세포내 Ca^{2+} 활성도의 증가 후 NCX의 forward mode를 측정한 결과 NCX의 활성도가 억제됨을 알 수 있으며, NCX의 단백질 발현을 확인한 결과 고포도당 배양 세포에서는 발현이 감소되어 있었다.

고포도당 환경은 백서 폐산지움 세포내 Ca^{2+} 활성도를 증가시켰다. 관련 Ca^{2+} 통로 중 SOI에 의한 Ca^{2+} 유입 증가와 NCX에 의한 Ca^{2+} 유출 억제가 관찰된 반면 수축 기전과 관계가 있는 IP_3 -mediated Ca^{2+} release와 VOCC에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 세포내 Ca^{2+} 이 세포내 신호전달의 주요 전달자 중 하나임을 고려할 때 이상의 변화는 당뇨병성 신증에서의 세포내 병리적 반응과 관련 있을 것으로 추정된다.