

고포도당에 기인한 근위세뇨관세포내 ANG II 수용체 발현변화가 포도당 운반체에 미치는 효과 및 cAMP, PKC, PLA₂, [Ca²⁺]_i과의 관련성에 관한 연구

전남대학교 수의과대학 생리학교실

한호재 · 박수현 · 오영준 · 박지영 · 이윤정 · 임민진 · 박수형 · 김은정

배 경 : 당뇨병성 신증 발생시 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 Renin-angiotensin II(ANG II) system의 작용은 이들의 수용체를 통하여 이루어지는 것으로 알려져 있다. 특히 당뇨병시 ANG II 수용체 발현이 감하조절 되는데 이에 대한 자세한 기전은 아직까지 알려져 있지 않고 있다. 그리고 당뇨병 시 혈당 농도 조절에 근위세뇨관세포의 포도당 운반체 활성이 중추적인 역할을 하고 있음에도 불구하고 그 조절기전에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 최근 당뇨병 환자의 치료를 위한 약물개발의 표적으로서 신장 포도당 운반체에 대한 관심이 고조되고 있는 상황을 고려해 볼 때, 고포도당에 기인한 신장 내 ANG II 수용체 및 Na/glucose 공동운반체 활성 변화가 어떤 신호전달경로를 통하여 조절되는가를 밝히는 것은 필수적으로 요구되고 있다.

방 법 : 본 연구에서는 초대배양한 토끼 신장근위세뇨관세포를 이용하여 고포도당이 어떠한 신호전달계를 통하여 ANG II binding 감하조절작용을 일으키는지를 ¹²⁵I-ANG II binding 실험, Western blotting, RT-PCR 및 ELISA 등을 통해 알아보았고, 아울러 당뇨병시 신장 근위세뇨관세포 내 그 농도가 증가되는 ANG II가 어떠한 신호전달경로를 거쳐 Na/glucose 공동운반체를 조절하는가를 α -methylglucopyranoside(α -MG) uptake 실험을 통해 알아보았다.

결 과 :

1) 고포도당이 ANG II 수용체에 미치는 영향과 그와 관련된 신호전달경로: 고포도당(25 mM)은 12시간 이상에서 ANG II binding을 억제하였으나 삼투압 지표인 mannitol 및 L-glucose의 경우는 영향을 미치지 않았으며 이러한 고포도당의 ANG II binding 억제작용은 세포 외 포도당 농도를 제거하였을 때 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 고포도당에 의한 ANG II binding 억제작용이 삼투압 변화와 관계없는 포도당 특이적인 효과라는 것을 말해주고 있다. 이와 같은 고포도당에 의한 ANG II binding 억제작용은 주로 ANG II receptor type 1(AT₁R)에 기인한 것으로 나타났다. 이 결과는 RT-PCR에서 AT₁R mRNA 수준의 감소 및 Western blotting에서 AT₁R 단백질의 발현 감소에 의해서도 확인되었다. 한편, ANG II binding의 억제 작용은 수용체의 Kd 값보다는 Vmax 값의 감소를 통하여 이루어지는 것으로 나타났다. 고포도당에 의한 ANG II binding 억제 효과는 phospholipase A₂(PLA₂) 억제제들(mepacrine, AACOCF₃) 및 cyclooxygenase 억제제들(indomethacin, ibuprofen)에 의해서는 차단되었으나 lipoxigenase 및 cytochrome P-450 epoxygenase 억제제에 의해서는 차단되지 않았다. 세포에 직접적으로 고포도당을 처리하여 arachidonic acid(AA) 방출 및 prostaglandin E₂ 생성을 측정한 결과 이들 모두를 증가시켰다. Western blotting에서도 고포도당을 처리한 군에서 세포질에서의 세포막으로의 cPLA₂의 이동을 관찰할 수 있었다. 이러한 고포도당의 AA 방출작용 및 ANG II binding 억제작용은 protein kinase C 억제제들(staurosporine, H-7 및 bisindolylmaleimide I) 및 mitogen activated protein kinases(MAPK)들 중 p44/42 MAPK억제제인 PD 98059에 의해서는 차단되었으나 p38 MAPK 억제제인 SB 203580에 의해서는 차단되지 않았다. 또한 고포도당은 30분에서 최대로 p44/42 MAPK를 활성화 시켰으며, 이러한 작용은 PKC 억제제들에 의해서 차단되었다. 한편 고포도당은 산화성 스트레스의 표지인 lipid peroxide

형성 증가 및 transforming growth factor(TGF)- β 1 분비작용도 증가시켰으며, 이러한 고포도당에 의한 TGF- β 1 분비작용은 항산화제들(N-acetyl cystein, taurine, vitamin C)에 의해서 차단되었다. 고포도당에 의한 ANG II binding 억제작용 역시 항산화제들 및 항-TGF- β 항체 처리시 차단되었다. 따라서, 고포도당은 신장 근위세뇨관세포에서 PKC-p44/42 MAPK-cPLA₂-oxidative stress-TGF- β 1의 신호전달 경로를 통하여 ANG II binding을 downregulation하는 것으로 생각되어진다.

2) ANG II가 Na/glucose 공동운반체 미치는 영향과 그와 관련된 신호전달경로. ANG II(10^{-7} M, 8 시간)는 α -MG uptake를 억제하였으며 이러한 작용은 AT₁R antagonist인 losartan에 의해서 선택적으로 차단되었으나, AT₂R antagonist인 PD 123319에 의해서는 차단되지 않았다. ANG II의 α -MG uptake 억제작용은 PLA₂ 억제제들에 의해 차단되었으며 실제적으로 ANG II 처리시 AA release는 증가되었다. ANG II에 의한 AA release 증가 작용 역시 losartan 및 tyrosine kinase 억제제들(herbimycin A, genistein)에 의해서 차단되었다. ANG II에 의한 α -MG uptake 억제작용은 cAMP/PKA 억제제들(SQ 22536, Rp-cAMP, PKI), PKC 억제제들 및 p44/42 MAPK 억제제에 의해서도 차단되었다. ANG II의 AA release 증가 작용은 PKC 억제제 및 p44/42 MAPK 억제제에 의해서 차단되었다. ANG II는 5분 이상에서 p44/42 MAPK 활성을 촉진시켰으며 이러한 작용은 PKC 억제제에 의해서 차단되었다. 따라서 ANG II는 PKC-p44/42 MAPK-cPLA₂ 신호전달경로를 통하여 Na/glucose 공동운반체를 억제하는 것으로 나타났다.

결론 : 고포도당 및 ANG II는 PKC-p44/42 MAPK-cPLA₂-oxidative stress-TGF- β 1의 신호전달 경로를 통하여 ANG II 수용체 및 Na/glucose 공동운반체를 억제하는 것으로 생각된다.