C20

배양된 Mouse Podocyte에서 Tumor Necrosis Factor (TNF)에 의해 유발된 Apoptosis에서 p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)와 Integrin Linked Kinase (ILK)의 역할

고려의대 안산병원 내과학교실, 의학연구소[1], 인제의대 내과학교실[2], 연세의대 내과학교실[3]

강영선, 지이화[1], 홍동기[1], 소경아[1], 한금현, 한상엽[2], 차대룡, 강신욱[3], 한대석[3]

p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK)는 여러가지 자극에 의해 세포밖의 신호를 세포내로 전달하여 apoptosis와 염증등을 일으키는 전달체계로 알려져 있다. 체내 염증반응을 매개하는 주된 cytokine인 TNF는 세포막에 존재하는 receptor와 결합하여 apoptosis를 유발하는데 이러한 신호전달 체계가 비정상적으로 조절되는 경우, podocyte의 소실과 메산지움의 증식으로 이어지고 사구체경화를 유발하는 것으로 생각되어진다. 본 연구에서는 TNF 자극시 podocyte에서 p38 MAPK pathway의 역할을 알아보고자 p38 MAPkinase와 MKK3/6, CREB, ATF2의 변화와 TNF자극시 integrin-linked kinase(ILK)와 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K)와 glycogen synthase kinase-3(GSK-3)의 변화를 관찰하여 다음의 결과를 얻었다. 1. TNF(20ng/ml) 투여후 30분, 1, 6, 24시간별로 p38 MAPK는 통계적으로 유의하지는 않았지만 대조군에 비해 mRNA 발현이 시간에 따라 증가하는 경향을 보였다 (0.46±8.86 vs 0.51±2.37 vs 0.85±3.70 vs 0.96±1.52 vs 0.98±0.12, $p>0.05$). p38과 pp38의 단백발현은 TNF 투여농도(1, 10, 20ng/ml)에 따라 증가하였고 30분, 1, 6시간까지 증가하였다가 24시간 후에는 감소하였다. MKK3/6의 경우 TNF 투여군에서 대조군과 비교하여 30분, 1시간까지 유의하게 발현이 증가하였고 이후에는 통계적으로 유의하지는 않았지만 증가하는 경향을 보였다(0.47±2.23 vs 0.56 ±4.9 vs 0.71±6.61 vs 0.72±3.49 vs 0.73±1.90, $p<0.05$). MKK3/6의 단백 발현은 투여된 TNF 농도에 따라 증가하였고 30분 1, 6시간까지 증가하다가 24시간부터 감소하였다. Phosphorylated MKK3/6도 같은 결과를 나타내었다. CREB의 경우는 TNF 투여군에서 유전자발현이 증가하였고 시간에 따라 유의하지는 않았지만 증가하는 추세를 나타내었고(0.60±1.01 vs 0.76±7.33 vs 1.04±0.22 vs 1.84 ±0.14 vs 2.20±0.16, $p<0.05$), CREB의 단백발현은 TNF 농도에 따라 증가하였지만 시간에 따른 변화는 없었다. 활성 형태인 phosphorylated CREB은 TNF 농도에 따라 단백발현이 증가하고 24시간까지 증가하다가 72시간에는 감소하였다.

Phosphorylated ATF2의 단백발현은 TNF의 농도에 따라 증가하였고 6시간까지 시간에 따라 증가하다가 24시간에서 72시간까지 점차 감소하였다. 2. TNF 투여군에서 anti-apoptotic pathway인 ILK의 발현은 대조군과 비교하여 30분에서 유의한 증가가 없다가 1, 6, 24시간에 따라 유의하게 증가하였다 (1.98±0.31 vs 3.17±1.73 vs 5.12±8.59 vs 6.57±0.92 vs 8.52±0.86, $p<0.05$). ILK의 단백발현은 TNF 농도에 따라 증가하였고 30분 1, 6, 24시간까지 증가했다가 72시간후에는 감소하였다. PI3K는 TNF 투여 30분에 의미있게 증가하였다가 이후 변화가 없다가 24시간에 증가하였다(2.99±1.81 vs 5.02±1.64 vs 7.11±0.53 vs 5.62±0.41 vs 9.26±1.98, $p>0.05$). GSK3β는 대조군보다는 시간에 따라 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다(4.77±0.75 vs 2.25±0.78 vs 2.02±2.02 vs 1.80±1.40 vs 1.63±3.81, $p>0.05$). 3. 위의 단백들의 활성도가 가장 높은 6시간과 24시간 시점에서 TNF농도에 따라 유의하게 apoptotic cell수가 증가하는 것을 알 수 있었다(6시간; 0.93±0.36 vs 1.23±0.51 vs 2.67 ±0.60 vs 4.03±0.49, $p<0.05$, 24시간; 0.93±0.36 vs 1.53±0.73 vs 3.43±0.76 vs 6.40±1.53, $p<0.05$). 이상의 결과에서 TNF 자극에 의한 podocyte의 apoptosis에서 p38 MAPK pathway가 관여할 것으로 생각된다.