

흰쥐 사구체간질 배양세포에서 Troglitazone이 VEGF와 TGF-β 발현에 미치는 영향

건국대학교 의학전문대학원 내과학교실, 고려대학교 의과대학 내과학교실¹

김동림, 김난희¹, 최동섭¹

Effects of Troglitazone on the Expression of VEGF and TGF-β in Cultured Rat Mesangial Cells

Dong-Lim Kim, Nan Hee Kim¹, Dong Seop Choi¹

Department of Internal Medicine, Konkuk University School of Medicine; and
Department of Internal Medicine, College of Medicine, Korea University¹

Abstract

Background: Clinical study reported that troglitazone ameliorated microalbuminuria in diabetic nephropathy. However, the mechanism of action is not fully understood. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is known as vascular permeability factor and it is considered the most likely cause of glomerular hyperfiltration and proteinuria in diabetic nephropathy. Transforming growth factor-beta (TGF-β) is a potent inducer of extracellular matrix production and fibrosis in renal cells and one of the important cytokine in the pathogenesis of diabetic nephropathy. To determine whether troglitazone affects VEGF and TGF-β production in diabetic nephropathy, we examined the effects of troglitazone on the VEGF and TGF-β expression in cultured rat mesangial cells exposed to high glucose concentration.

Methods: Rat mesangial cells were cultured in media with D-glucose 5.5 mM (NG) or D-glucose 30 mM (HG), or D-glucose 30 mM/troglitazone 20 μM (HTz) and for 6, 24, or 72 hours, respectively. VEGF and TGF-β expression were assessed by semiquantitative RT-PCR and western blot analysis.

Results: Troglitazone decreased the VEGF164 and VEGF120 mRNA expressions in cultured rat mesangial cells exposed to high glucose concentration with incubation for 24 and 72 hours, respectively. VEGF protein was also decreased in experimental group treated with troglitazone (HTz) than in those with HG for 24 and 72 hours. However troglitazone had no effect on the expression of TGF-β mRNA in mesangial cells.

Conclusion: This study suggested that troglitazone may modulate the development and progression of diabetic nephropathy by reducing the expression of VEGF in mesangial cells (J Kor Diabetes Assoc 31:220~229, 2007)

Key Words: Diabetic nephropathy, Mesangial cell, TGF-β, VEGF

서 론

당뇨병성신증은 당뇨병의 미세혈관 합병증이다¹⁾. 당뇨병 환자가 급격히 증가하고 있고, 당뇨병성신증으로 인한 만성 신부전 환자가 증가하나 아직 확실한 치료 방법이 없어 조기에 당뇨병성신증의 예방 및 치료가 중요한 실정이다^{1,2)}. Thiazolidinedione (TZD)은 peroxisome proliferator-activated

receptor-γ (PPARγ)의 리간드로 당뇨병 동물 모델이나 비만 증 또는 비만한 당뇨병환자에서 인슐린저항성을 개선시킨다고 알려져 있다³⁻⁵⁾. Troglitazone은 TZD계의 약물로 혈당 조절 외에도 당뇨병성신증 환자에서 단백뇨를 감소시킴이 보고되었다⁶⁾. 그러나 troglitazone이 어떤 기전으로 당뇨병성신증을 호전시키는지에 대한 연구는 부족한 실정이다.

당뇨병성신증은 사구체 과투과와 신사구체 기저막 비후,

사구체간질의 세포의 기질 합성 및 증가로 발생하며^{7,9)}, 병인으로는 고혈당과 이에 연관된 대사이상, 사구체 고혈압, 최종당화산물, 성장인자, 각종 사이토카인 등이 관여한다^{2,10)}.

혈관 내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 강력한 혈관투과 인자로 VEGF의 생성 및 활성이 당뇨병성신증에서 사구체의 과투과와 단백뇨 발생에 관여한다고 보고되었다^{11,12)}.

Transforming growth factor-beta (TGF- β)는 세포외 기질 생성과 섬유화를 일으키는 사이토카인으로 당뇨병성신증과 사구체 경화의 발생에 관여하며 *in vitro* 연구에서 고혈당, 지방, endothelin 등에 의해 발현이 증가되었다¹³⁾.

본 연구는 당뇨병성신증의 중요한 매개체로 알려진 VEGF와 TGF- β 의 발현에 troglitazone이 어떤 영향을 미치는지 알아보고자 고농도의 포도당에서 배양된 쥐의 사구체간질 세포에서 troglitazone 투여 후 VEGF와 TGF- β 의 발현 정도를 측정하였다.

방 법

1. 흰쥐 메산지움세포의 배양

체중이 100~150 g인 정상 Sprague-Dawley 쥐를 ketamine (50 mg/kg)으로 마취한 후 신장외막을 벗기고, 신수질을 제외한 피질을 갈아 체(75, 150, 225 μ m)에 통과시켰다. 얻어진 여과액을 0.1% collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 처리하고 37°C에서 20분간 배양하여 사구체를 분리한 후, D-glucose 5 mM, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 μ g/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 5 μ g/mL insulin, 17% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배양액에 95% O₂와 5% CO₂ 상태에서 무균조작하여 세포를 배양하였다. 이중 위상차 현미경에서 특징적인 연장형(elongated), 또는 성상(stellate)상태의 세포를 사구체간질세포로 인지하고 면역 형광법을 통해 확인하였다. 면역형광 염색에서 actin과 myosin에 양성이고 factor VIII과 cytokeratin (Synbiotics, San Diego, CA)에 음성인 것을 사구체 간질세포로 인지하고 계대 배양하였다. 계대 배양은 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 씻은 다음 trypsin-EDTA로 처리한 후 다시 플라스크에서 배양하였고 본 실험마다 6~7회 계대 배양된 세포를 6 well plate에 각 well 당 1 \times 10⁵ cell을 분주시킨 후 실험하였다.

2. 실험군 선택

배양된 사구체 간질세포를 subconfluent한 상태에서 PBS로 세척한 후 FBS 농도를 1%로 낮추고 다른 조건은 모두 동일한 DMEM 배양액 내에서 48시간 배양하였다. 그 후 실험군을 정상 포도당군(이하 NG군이라 함), 고농도 포도

당군(이하 HG군이라 함), 고농도 포도당과 troglitazone 병합 투여군(이하 HTz군이라 함) 등 세 군으로 나누었다. 또한 각 군을 다시 4개로 분리하여 각각의 조건에서 0, 6, 24, 72시간 동안 배양하였다. NG군은 D-glucose (Sigma) 5.5 mM, HG군은 D-glucose 30 mM, HTz군은 D-glucose 30 mM와 troglitazone 20 μ M을 처리한 후 배양하였다.

HG군과 HTz군은 사구체간질세포에 의한 포도당 소모를 고려하여 24시간 단위로 배양액을 교환하였다. Mannitol (Sigma) 처치군은 정상 농도(5.5 mM) 포도당 배지에 mannitol을 첨가하여 HG군과 삼투압이 같아지도록 유지한 뒤 6시간 배양하여 실험에 이용하였다. 각 실험군은 같은 실험을 4~6회 시행하였다. Mannitol 투여 후 VEGF와 TGF- β mRNA의 발현은 6시간, 24시간, 72시간 모두에서 NG군과 차이가 없어 고농도 포도당 상태의 삼투압효과를 배제하였다. 따라서 Mannitol군은 이 중 6시간군을 선택하였다.

3. RNA 추출 및 반정량적 RT-PCR

실험 조건을 준 후 각각 정해진 시간에 TRIzol LS reagent와 TRIzol reagent (Life Technologies)를 이용하여 RNA를 추출한 다음 분광광도법(spectrophotometry)을 이용하여 260 nM에서 농도를 측정하였다. 1 μ g의 RNA를 oligo-(dT)16 primer와 50 U Molohey murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technology, Gaithersburg, MD)를 사용하여 cDNA로 역전사 시켰다. VEGF mRNA의 구조는 8개의 exon이 존재하며, alternative splicing variants는 exon 6, exon 7에 존재하는데 이 중 VEGF164와 VEGF120이 주로 신장에서 발현되기 때문에 exon 3부터 3' untranslated ends까지 증폭시키기 위한 primer (Koma Biotech Inc, Seoul, Korea)를 제작하였고 이의 염기서열은 sense 5'- GACCCTG GTGGACATCTTCCAGGA -3', antisense 5'- GGTGAGA GGTCTAGTTCCCGA -3'로서 VEGF188, VEGF164, VEGF120의 세가지 splicing variants를 증폭하였다. TGF- β 도 코마바이오테크 회사(Koma Biotech Inc, Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였으며 primer의 염기서열은 sense 5'- ATA CAGGGCTTTCGATCCAGG -3', antisense 5'- GTCCAG GCTCCAAATATAGG -3'였다. PCR 비교 대조물질로는 β -actin을 이용하였으며 primer의 염기서열은 sense 5'- TCT AGGCACCAAGGTGTG -3', antisense 5'- TCATGAGGT AGTCCGTAGG -3'이었다. 각각의 Polymerase chain reaction (PCR) 산물은 PCR이 끝난 후 DNA 전기영동상 band의 크기 확인과 함께 agarose gel 내의 PCR 산물을 분리하였다. PCR 산물 중 일부를 자동 서열 분석기인 ABI 373A automated DNA sequencing system (ABI Genetic Analyzer 310; PRISM, Branchburg Park, NJ)을 사용하여 PCR 산물의 특이성을 확인하였다. VEGF와 TGF- β 및 β -actin의 mRNA 정량분석은 이미 보고된 반정량적 PCR 방

법을 변형하여 시행하였으며, 중합효소연쇄반응 과정 중 역전사된 cDNA의 양과 PCR cycle 수를 다르게 하면서 mRNA의 증폭이 log phase 내에 있는 cDNA의 양과 PCR cycle의 수를 결정하여 실험에 이용하였다. PCR은 총 25 μ L의 반응혼합물(reaction mixture)을 만들어 사용하였으며, 용액의 조성은 200 μ M dNTP, 1.25 unit Taq DNA polymerase, sense primer 및 antisense primer를 각각 40 pM을 함유한 용액 내에 역전사된 cDNA 2 μ L를 첨가한 후 시행하였다. VEGF의 PCR cycle은 변성반응(denaturation) 94°C에서 30초, 결합반응(annealing) 58°C에서 30초, 연장반응(extension) 72°C에서 1분 30초 동안의 과정을 38 cycle 반복하였고, TGF- β 의 PCR은 변성반응 94°C에서 1분, 결합반응 60°C에서 1분, 연장반응 72°C에서 3분 동안의 과정을 38 cycle 반복하였으며 β -actin은 변성반응 94°C에서 1분, 결합반응 60°C에서 1분, 연장반응 72°C에서 3분 동안의 과정을 38 cycle 반복하였다. 각 산물의 초기 변성반응은 3분, 마지막 연장반응은 7분으로 하였다. PCR후의 모든 PCR산물은 ethidium bromide가 섞인 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하였으며, PCR 산물의 정량분석은 Scion image analysis software를 이용하여 densitometry에 의한 VEGF/ β -actin, TGF- β -actin 비로 비교하였다.

4. VEGF 단백질 생성

배양용기로부터 배양액을 제거하고 단층 배양된 세포들

을 PBS로 세척 후 lysis buffer에 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 얻어 sample buffer를 첨가하여 5분간 100°C로 가열하여 단백질을 분리하였다. 이를 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후 0.8 mA/cm²의 속도로 4시간 동안 nitrocellulose membrane에 옮기고 이 nitrocellulose membrane을 5% 탈지분유에 하룻밤 배양한 뒤 rabbit polyclonal VEGF antibody (Santa Cruz biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)와 2시간 반응시켰다. 그 후 membrane을 anti-rabbit secondary antibody에 1시간 배양하고 ECL western blotting kit (Amersham, Buckinghamshire, England)를 이용한 chemiluminescence 방법으로 관찰하였다.

5. 통계분석

모든 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS version 11.5 통계 패키지를 이용하였다. 각 군의 비교는 Friedman 순위에 의한 이원분산분석(two-way ANOVA), Kruskal-Wallis 순위에 의한 일원분산분석(one-way ANOVA), Mann-Whitney U test를 사용하였고 $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

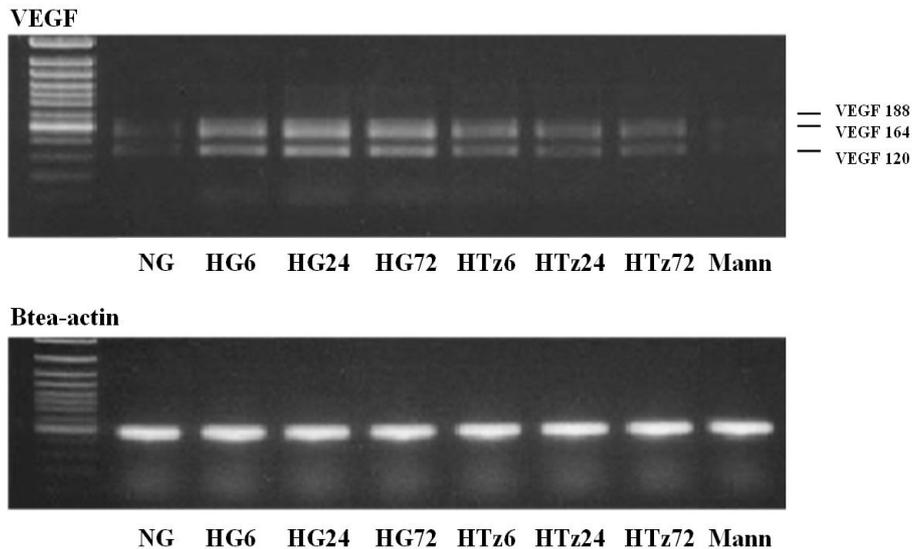


Fig. 1. The effects of troglitazone on the VEGF mRNA expression under high glucose concentration. Three alternative splicing variants encoding peptides VEGF120, VEGF164, and VEGF188 were identified. VEGF120 and VEGF164 were expressed more highly than VEGF188, which was faintly expressed. VEGF mRNA expression was increased in HG 6, 24 and 72 hour groups than NG group. Troglitazone decreased the VEGF mRNA expression in high glucose exposed mesangial cells with incubation for 24 and 72 hours, respectively. NG, normal glucose concentration of media (5.5 mM); HG, high glucose concentration (30 mM); HTz, high glucose concentration treated with troglitazone (glucose 30 mM and troglitazone 20 μ M); Mann, mannitol.

결 과

1. 포도당 농도와 Troglitazone 투여 후 시간 경과에 따른 VEGF mRNA의 발현

VEGF164 mRNA/ β -actin의 발현은 HG 6, 24, 72시간군에서 NG군보다 의미있게 증가하였다(0.74 ± 0.15 , 0.95 ± 0.08 , 0.79 ± 0.04 vs. 0.20 ± 0.02 , $P < 0.01$). 고농도 포도당에 troglitazone 처리 후 VEGF164 mRNA/ β -actin의 비는 HG 24, 72 시간군에 비해 HTz 24, 72 시간군에서 각각 의미 있게 감소하였다(0.51 ± 0.16 vs 0.95 ± 0.08 $P =$

$0.01/ 0.55 \pm 0.06$ vs 0.79 ± 0.04 , $P = 0.04$) (Fig. 1, 2). HTz 6시간 군에서는 VEGF164 mRNA/ β -actin 비가 감소하는 경향은 보였으나 통계적인 차이는 보이지 않았다. Mannitol 투여군의 발현은 NG군과 차이가 없었다.

VEGF120 mRNA/ β -actin의 발현도 유사한 양상을 보였는데 HG 6, 24, 72 시간군에서 NG군보다 의미 있게 증가하였고(0.69 ± 0.07 , 0.74 ± 0.11 , 0.68 ± 0.05 vs 0.18 ± 0.07 $P < 0.01$) (Fig. 3) troglitazone 투여 후 24, 72시간군에서 유의한 감소를 보였다(0.50 ± 0.13 vs 0.74 ± 0.11 , $P = 0.03/ 0.48 \pm 0.06$ vs 0.68 ± 0.05 , $P = 0.02$).

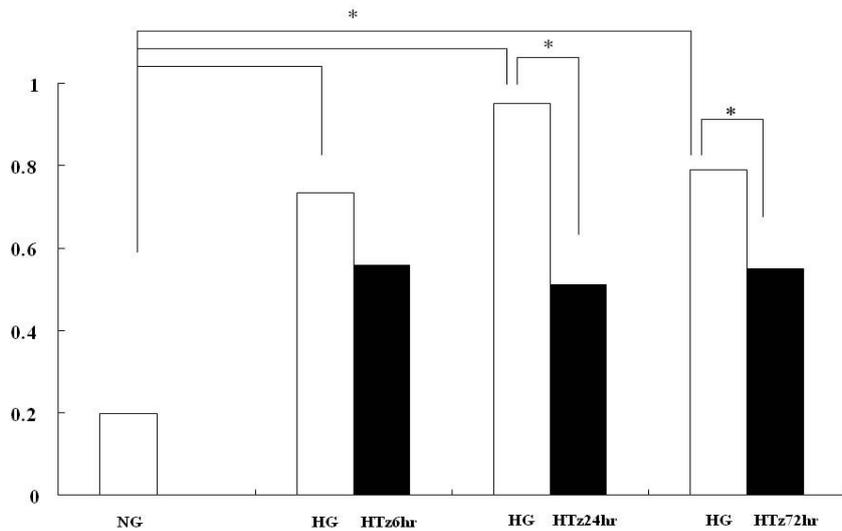


Fig. 2. The ratio of the expression of VEGF164/ β -actin was increased in HG 6, 24 and 72 hour groups than NG group. VEGF mRNA expression was significantly reduced in troglitazone treated groups than HG groups for 24 and 72 hours, respectively. * $P < 0.05$.

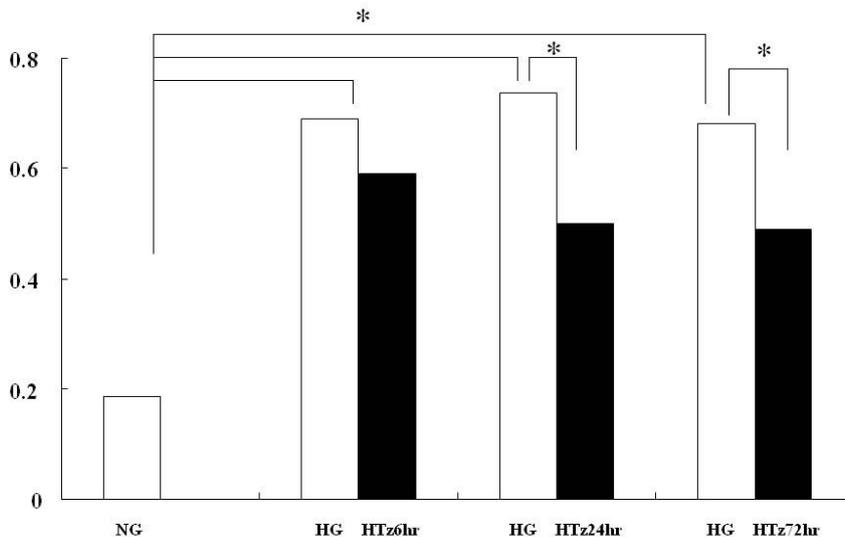


Fig. 3. The ratio of the expression of VEGF120/ β -actin was increased in HG 6, 24, 72 hour groups than NG group, and decreased in HTz 24 and 72 hours than HG 24 and 72 hour groups, respectively. * $P < 0.05$.

2. 포도당 농도와 Troglitazone 투여 후 시간 경과에 따른 TGF-β mRNA의 발현

TGF-β mRNA/β-actin의 발현은 HG 6, 24, 72시간군과 HTz 6, 24, 72시간군에서 NG군보다 의미있게 증가하였다 (HG: 0.71 ± 0.08, 0.79 ± 0.24, 0.73 ± 0.29, HTz: 0.69 ± 0.38, 0.74 ± 0.29, 0.71 ± 0.22, vs 0.49 ± 0.15 *P* < 0.05). 그러나 HG 6, 24, 72시간군과 HTz6, 24, 72시간군 간에는 HTz군에서 TGF-β mRNA 농도가 감소하는 경향은 보였으나 통계적인 의미는 없었다(Fig. 4, 5).

3. 포도당 농도와 Troglitazone 투여 후 시간 경과에 따른 VEGF 단백질의 변화

각 실험군에서 45 kDa의 VEGF 단백질이 관찰되었는데 HG6, 24, 72시간군에서 NG군보다 의미있게 증가하였다 (HG6 124.5 ± 6.6 % of NG, HG24 202.7 ± 9.2 %, HG72 160.2 ± 4.3 %, *P* < 0.05 vs NG, respectively). 고농도 포도당에 노출된 사구체 간질세포에 troglitazone처리 후 6시간군에서는 VEGF 단백질이 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 차이를 보이지 않았다(HTz6 116 ± 2.7% of NG). Troglitazone처리 후 24, 72시간군에서는 약물처리 전보다

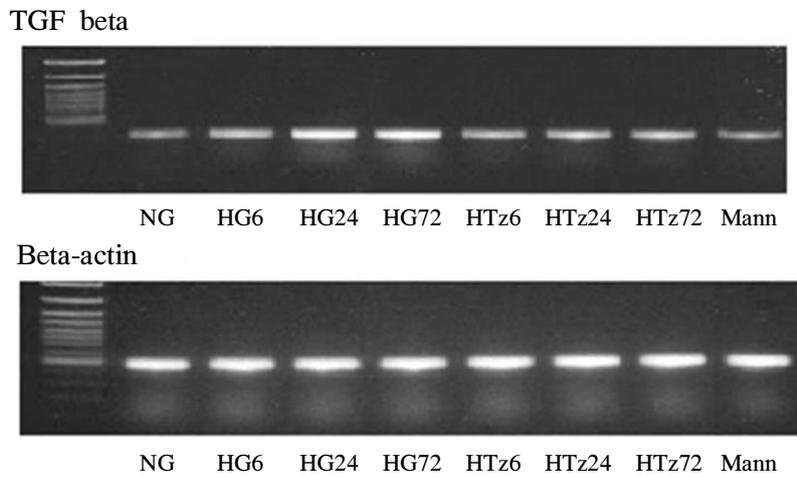


Fig. 4. The effect of troglitazone on the TGF-β mRNA expression according to incubation time and glucose concentration of the media. NG, normal glucose concentration of media (5.5 mM); HG, high glucose concentration of media (30 mM); HTz, high glucose concentration of media treated with troglitazone (glucose 30 mM and troglitazone 20 μM); Mann, mannitol.

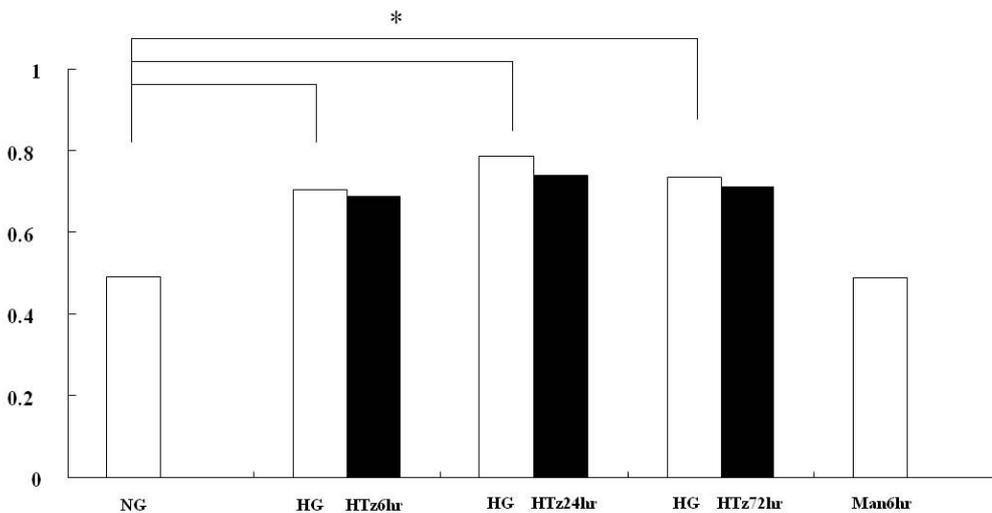


Fig. 5. The ratio of the expression of TGF-β/β-actin was increased in HG 6, 24 and 72 hours than NG group. Troglitazone had no effect on the expression of TGF-β mRNA in mesangial cells. * *P* < 0.05.

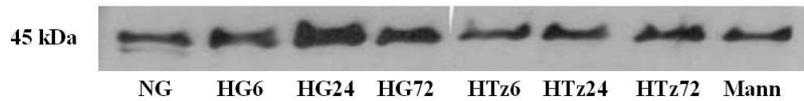


Fig. 6. Western blot analysis of VEGF protein production. NG, normal glucose concentration of media (5.5 mM), HG; high glucose concentration (30 mM); HTz, high glucose concentration treated with troglitazone (glucose 30 mM and troglitazone 20 μM); Mann, mannitol.

VEGF 단백질이 유의하게 감소하였으나(HTz24 143 ± 3.5% of NG, HTz72 140 ± 4.9%, $P < 0.05$), 약물 처리 후 24시간과 72시간간에는 차이가 없었다(Fig. 6).

고찰

본 연구 결과 troglitazone이 고농도의 포도당에 노출된 쥐의 사구체간질 세포에서 VEGF mRNA와 VEGF 단백질의 발현을 감소시킴을 알 수 있었다.

당뇨병성신증은 당뇨병의 미세혈관 합병증으로, 고혈압과 혈당의 조절 및 전환효소 억제제 투여 등이 병의 진행을 억제시킨다고 알려져 있으나 아직까지도 적절한 치료 방법이 없는 실정이다^{2,10,14}. Troglitazone은 제2형 당뇨병의 치료제로 사용되었던 약제로, 혈당 조절 외에도 당뇨병성신증 환자에서 미세단백뇨를 줄였다고 보고되었다⁶. 또한 스트렙토조토신 유발 당뇨병 쥐에서 3개월간 troglitazone을 투여하였을 때 혈당이나 혈압과는 무관하게 미세 단백질뇨가 감소하였고, *in vitro*에서는 사구체간질 세포에 troglitazone을 처리 시 사구체간질 세포의 증식이 억제되었다고 보고하였다^{15,16}. 그러나 troglitazone이 어떤 기전으로 당뇨병성신증을 호전시키는지에 대한 연구는 부족한 실정이다.

혈관 내피세포 성장인자(VEGF)는 강한 혈관 투과성을 지니 VPF (vascular permeability factor)라고도 불리며 34~42 kDa의 disulfid bond로 연결된 dimeric glycoprotein으로서 하나의 exon에서 alternative splicing된 여러 아형이 있다. 사람에게서는 121, 145, 165, 189, 206개 아미노산으로 구성된 5개 아형이 존재하고, VEGF165가 태반을 제외하고 가장 많이 표현되는 형태이다^{11,12,17}. 흰쥐에서는 VEGF120, 164, 188의 3개 아형이 있는데 심장, 폐, 뇌, 신장 등 대부분의 장기에서 VEGF164가 우세하게 발현되며 VEGF188은 분비되지 않는 형태로서 이의 기능은 아직 잘 알려져 있지 않다¹⁷. 본 연구에서는 고농도의 포도당에서 VEGF164가 VEGF120 보다 약 1.3 ± 0.52배 정도로 약간 더 증가하는 경향을 보여 김 등의 연구와는 다른 결과를 보였는데 이는 VEGF mRNA의 생성과정이 포도당 농도 등의 여러 실험 조건에 따라 달라질 가능성을 시사한다¹⁸.

VEGF에 관한 연구는 현재까지 주로 당뇨병성 증식성 망막병증에서 망막 신생혈관 생성과 관련되어 많이 보고되었다^{19,20}. 최근 들어 당뇨병성신증과 VEGF에 관련된 연구들

이 보고되고 있으며, 주로 사구체 상피세포나 원위세뇨관 상피세포에서 발현된다고 알려져 있고 사구체간질 세포에서도 발현되는데 당뇨병성신증 동물 모델에서 VEGF와 VEGF의 수용체가 증가되어 있으며 사구체의 과투과와 미세단백뇨 발생에 관여한다고 알려져 있다^{12,18}.

VEGF는 고혈당, 조직의 허혈상태나 안지오텐신II, TGF-β 등의 여러 사이토카인들에 의해 주로 사구체의 상피세포에서 생성되어 타이로신 키나아제(tyrosine kinase) 수용체인 flt-1/KDR에 작용하여 혈관 투과성의 증가와 내피세포의 기능장애를 유발하여 당뇨병성 합병증을 일으킨다고 알려져 있다^{21,22}. 본 연구에서는 고혈당에 노출 시 사구체간질세포 내 VEGF의 발현이 증가됨을 보였다.

본 연구와는 반대로 Singh 등은 쥐의 사구체간질 세포를 25 mM의 고농도 포도당에 노출시켰을 때 세포배양액에서 VEGF가 감소하였다고 보고하였다²³. 그러나 Singh 등의 연구는 본 연구와는 다르게 사구체간질 세포를 4일 동안 장시간 고농도 포도당에 노출 시켰고, 사구체간질 세포의 배양액에서 효소면역 측정법으로 VEGF를 측정하였다. 연구자들이 사구체간질 세포 자체에서 측정한 자료를 제시하지 않았으나, 사구체간질 세포 자체에서는 세포배양액보다 VEGF 농도가 10~20배 정도 낮고 고농도 포도당에서도 큰 변화가 없어, 대부분의 VEGF는 세포에 축적되지 않고 세포 외로 분비된다고 기술하였다. 이는 VEGF가 여러 조건에 따라 다르게 발현하고, 세포 외에서는 사이토카인 등 여러 다른 인자에 영향을 받을 것임을 시사한다.

본 연구에서 고혈당에 노출 시 사구체간질 세포 내 VEGF mRNA의 발현은 초기 24시간까지 증가하다가 72시간에는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 VEGF가 당뇨병성신증의 진행 과정보다는 초기의 발병기전에 작용하리라 추정되나, 제2형 당뇨병환자에서 단백질뇨가 증가함에 따라 VEGF도 증가함이 보고되어, 생체에서는 지속적인 고혈당 자체뿐 아니라 이로 인한 여러 성장인자 및 사이토카인 간의 불균형으로 지속적으로 VEGF 발현이 증가되어 혈관 합병증을 일으킬 가능성도 있다^{2,21}.

TGF-β는 세포외 기질 생성과 사구체 경화를 일으키는 사이토카인이다²⁴. 고혈당에 의해 신장에서 TGF-β가 증가됨은 여러 연구에서 증명되었는데 생체 외의 연구에서 고혈당에 노출시 48시간 내에 신장의 근위세뇨관 세포와 사구체간질 세포에서 TGF-β mRNA의 발현이 증가되었고 선택적

중화 항체 투여 시 고혈당에 의한 세포의 증식과 콜라겐과 같은 단백질의 생성이 감소하였다^{25,26}. 당뇨병의 동물 모델에서는 스트렙토조토신 유발 당뇨병 쥐에서 당뇨병의 발병 초기에 신사구체에서 TGF- β mRNA와 단백질의 발현이 증가되며 이는 신사구체의 기질 증가와 비례하였고 인슐린으로 고혈당을 치료하면 TGF- β 생성이 감소되었다^{27,28}. 사람에서는 아직까지 연구가 많지 않은데, 한 연구에서 정상인에 비해 당뇨병성신증 환자의 사구체 내에 TGF- β mRNA 발현이 증가됨이 알려졌고²⁹, 또 다른 연구에서는 신혈관 조영술을 받은 환자에서 신동맥과 신정맥간의 TGF- β 농도 차이를 측정된 결과, 정상인에서는 신장에서 혈중 TGF- β 를 제거하는데 비해 당뇨병성신증이 있는 환자에서는 오히려 신장에서 TGF- β 를 과도하게 생성하여 이것이 소변으로 배설됨을 보고하였다³⁰.

본 연구에서 TGF- β mRNA는 고혈당에 노출 후 troglitazone을 투여했을 때 발현이 감소하는 경향은 보였으나 통계적인 의미는 없었다. 한 연구에서 C57 쥐의 사구체간질 세포에 8 μ M의 troglitazone 투여 시 TGF- β 가 유의하게 감소함을 보고하였고³¹, 또 다른 연구에서는 Sprague-Dawley 쥐의 사구체간질 세포에 3 μ M의 troglitazone 투여 시 TGF- β 가 감소함을 보여 본 연구와는 다른 결과를 나타내었다³². 이는 고농도의 troglitazone이 사구체간질 세포의 TGF- β 발현에 다른 영향을 줄 가능성을 생각할 수 있다.

본 연구에서 troglitazone의 농도는 20 μ M로 하였다. 이는 다른 연구들에서 사용한 0.23~23 μ M의 높은 농도에 가깝다. 이전 연구에서 troglitazone 20 μ M의 농도가 사구체간질 세포에 독성을 나타내어 사구체간질 세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유발한다고 보고하였다³¹. 따라서 본 연구의 실험전에 troglitazone 20 M에서 사구체간질 배양 세포수를 측정하였다(n = 3). 약물 처리 후 시간이 지남에 따라 약물 처리하지 않은 대조군과 비교하여 사구체간질 배양 세포수가 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다(Control $5.6 \pm 0.8 \times 10^5$ cells/mL, HTz24 $95.5 \pm 3.9\%$ of control, HTz72 $92.5 \pm 2.9\%$, P = ns). 또한, 다른 연구에서 troglitazone 농도에 비례하여 DNA 생성이 감소한다고 보고되어, 본 연구에서 약물의 충분한 효과를 보기 위해 20 μ M 농도를 처리하였다³³.

사구체간질 세포에서 troglitazone이 어떤 경로로 VEGF를 감소시키는지에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없다. Troglitazone의 구조 일부가 비타민 E와 같은 구조를 가져 항산화 작용에 의한 nitric oxide (NO)의 생성 감소를 생각할 수 있으나, 사구체간질 세포에서 VEGF가 증가할 때 NO의 증가는 미미하다고 보고되어 다른 경로가 있을 것으로 추정하였다³⁴. 또한 인간 제대정맥 내피세포에서는 PPAR γ 가 VEGF의 수용체인 Flt-1과 Flk/KDR의 mRNA 발현을 감소시켰다고 보고하였으나 사구체간질 세포에서는 수용체

수가 감소하지 않았다^{34,35}. 최근의 연구에서 신장의 내피세포 및 사구체간질 세포에서 PPAR γ 가 발현된다고 보고하였으나 PPAR γ 의 활성화에 의해 증가되는 유전자들은 대개 퍼옥시좀 증식반응요소(PPRE)를 가지고 있는데, VEGF 유전자에는 퍼옥시좀 증식반응요소가 없기 때문에 아마도 사구체간질 세포에서 VEGF의 감소가 PPAR γ 활성화의 직접적인 결과라기보다는 다른 사이토카인이나 단백질 등의 경로에 의해 감소될 가능성이 있다^{16,36}.

고혈당에 의한 diacylglycerol-protein kinase C (DAG-PKC) 경로의 활성화와 extracellular signal regulated kinase의 활성화가 사구체간질 세포의 증식 및 사구체의 기능부전을 일으키는 중요한 기전으로 알려져 있고, 실제로 당뇨병 쥐에서 PKC 억제제를 투여하면 사구체 기능이 호전되었다^{37,38}. 최근의 연구에서 고혈당에 노출된 흰쥐 사구체간질 세포에 troglitazone을 처리하면 diacylglycerol-protein kinase C-extracellular signal regulated kinase 경로가 억제되고 DAG kinase가 증가된다고 하였다³². 당뇨병성신증에서 VEGF가 PKC 경로를 통해 합병증 발생에 관여함을 고려할 때, 본 연구에서 troglitazone에 의한 VEGF의 감소는 PKC 억제가 하나의 기전일 것으로 생각된다¹⁸.

또한 몇몇 세포에서 VEGF가 mitogen-activated protein kinase (MAPK)의 활성을 통해 작용을 나타낸다고 보고하였고, 사구체간질 세포에서도 VEGF 생성에 MAP kinase의 활성이 중요한 경로 중의 하나로 이에 대한 추가 연구가 필요하리라 생각된다^{39,40}.

본 연구 결과 troglitazone이 고농도의 포도당에 노출된 쥐의 사구체간질 세포에서 VEGF mRNA와 VEGF 단백질 발현을 감소시켰다. 이러한 결과는 troglitazone이 혈당 조절을 통한 작용 외에도 VEGF의 발현을 감소시켜 당뇨병성신증을 억제하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

요 약

배경: Troglitazone이 제2형 당뇨병환자에서 미세단백뇨를 감소시켰다고 보고하였다. 그러나 당뇨병성신증에 troglitazone이 어떠한 기전으로 미세단백뇨를 감소시키는지 확실하지 않다. 본 연구는 배양된 흰쥐 사구체간질 세포에서 당뇨병성신증의 중요한 매개체로 알려진 VEGF와 TGF- β 발현에 troglitazone이 미치는 영향을 알아보려 하였다.

방법: 사구체간질 세포를 정상 포도당군(NG, D-glucose 5.5 mM), 고농도 포도당군(HG, D-glucose 30 mM), 고농도 포도당과 troglitazone 병합 투여군(HTz, D-glucose 30 mM와 troglitazone 20 μ M)으로 나누어 각각의 조건에서 0, 6, 24, 72시간 동안 배양하였다. 각 조건에서 VEGF와 TGF- β mRNA의 발현을 관찰하였고 VEGF 단백을 관찰하

었다.

결과: 고농도 포도당에 노출된 쥐의 사구체간질 세포에서 대조군과 비교하여 VEGF164와 VEGF120 mRNA의 발현이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 이들 세포에 troglitazone 처리 시 VEGF164와 VEGF120 mRNA가 HG 24, 72시간 군에 비해 HTz 24, 72시간군에서 각각 의미있게 감소하였다($P < 0.05$). VEGF 단백질도 troglitazone 처리 시 HG 24, 72시간군에 비해 HTz 24, 72시간군에서 각각 의미 있게 감소하였다($P < 0.05$). 고농도 포도당에 노출된 쥐의 사구체간질 세포에서 TGF- β mRNA의 발현은 정상대조군보다 의미있게 증가하였다($P < 0.05$). 그러나, troglitazone이 TGF- β mRNA의 발현을 감소시키지는 못하였다.

결론: 본 연구는 troglitazone이 고농도의 포도당에 노출된 쥐의 사구체간질 세포에서 VEGF 발현을 감소시켜 당뇨 병성신증의 억제에 도움이 될 수 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Rossing P: *Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history.* *Curr Diab Rep* 6:479-83, 2006
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.* *N Engl J Med* 329:977-86, 1993
- Fujiwara T, Yoshioka S, Yoshioka T, Ushiyama I, Horikoshi H: *Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. Studies in KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats.* *Diabetes* 37:1549-58, 1988
- Iwamoto Y, Kuzuya T, Matsuda A, Awata T, Kumakura S, Inooka G, Shiraiishi I: *Effect of new oral antidiabetic agent CS-045 on glucose tolerance and insulin secretion in patients with NIDDM.* *Diabetes Care* 14:1083-6, 1991
- Nolan JJ, Ludvik B, Beerdsen P, Joyce M, Olefsky J: *Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone.* *N Engl J Med* 331:1188-93, 1994
- Imano E, Kanda T, Nakatani Y, Nishida T, Arai K, Motomura M, Kajimoto Y, Yamasaki Y, Hori M: *Effect of troglitazone on microalbuminuria in patients with incipient diabetic nephropathy.* *Diabetes care* 21:2135-9, 1998
- Ziyadeh FN: *Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus.* *Kidney Int* 43:114-20, 1993
- Ziyadeh FN, Goldfarb S: *The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus.* *Kidney Int* 39:464-75, 1991
- Ziyadeh FN: *The extracellular matrix in diabetic nephropathy.* *Am Kidney Dis* 22:736-44, 1993
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).* *Lancet* 352:837-53, 1998
- Senger DR, Van Der Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackson RW, Dvorak AM: *Vascular permeability factor in tumor biology.* *Cancer and Metastasis Rev* 12:303-24, 1993
- Iijima K, Yoshikawa N, Connolly DT, Nakamura H: *Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor.* *Kidney Int* 44:959-66, 1993
- Sharma K, Ziyadeh FN: *The emerging role of transforming growth factor- β in kidney diseases.* *Am J Physiol* 35:F829-42, 1994
- Marre M, Leblance H, Suarez L, Guyenne TT, Menard J, Passa P: *Converting enzyme inhibition and kidney function in normotensive diabetic patients with persistent microalbuminuria.* *Br Med J* 294:1448-52, 1987
- Fujii M, Takenura R, Yamaguchi M, Hasegawa G, Shigeta H, Nakano K, Kondo M: *Troglitazone (CS-045) ameliorates albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats.* *Metabolism* 46:981-3, 1997
- Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR, Hsueh WA: *Expression and function of peroxysome proliferator-activated receptor- γ in mesangial cells.* *Hypertension* 37(2):722-7, 2001
- Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor.* *Endocrinol Rev* 13:18-32, 1992
- Kim NH, Jung HH, Cha DR, Choi DS: *Expression of VEGF in response to high glucose in rat mesangial cells.* *J Endocrinol* 165(3):617-24, 2000
- Aiello LP, Avery R, Arring P, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, GL: *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of with diabetic retinopathy and other retinal disorders.* *N Engl J Med* 331:1480-7, 1994

20. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Liddle L, Ferra L, Kin GL, Smith LE: *Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. Proc Natl Acad Sci USA* 1995
21. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D: *Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. Hypertension* 25:913-7, 1995
22. Jakeman LB, Winer J, Benner GL, Altar CA, Ferrara N: *Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. J Clin Invest* 89:244-53, 1992
23. Singh AK, Gudehithlu KP, Pegoraro AA, Singh GK, Basheerudin K, Robey RB, Arruda JA, Dunea G: *Vascular factors altered in glucose-treated mesangial cells and diabetic glomeruli. Changes in vascular factors impair endothelial cell growth and matrix. Lab Invest* 84:597-606, 2004
24. Sharma K, Ziyadeh FN: *Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor- β as a key mediator. Diabetes* 44:1139-46, 1995
25. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN: *Highglucose-induced proliferation in mesangial cells is reversedautocrine TGF- β . Kidney Int* 42:647-66, 1992
26. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G: *Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by activation of transformaing growth factor- β . J Clin Invest* 93:536-42, 1994
27. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H: *mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. Diabetes* 42:450-6, 1993
28. Yamamoto T, Nakamura T, Noble NA, Ruoslahti E, Border WA: *Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. Proc Natl Acad Sci USA* 90:1814-8, 1993
29. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiki H, Dohi K: *Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. Kidney Int* 49:1120-6, 1996
30. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BRC, Kurnik PB, Weisberg LS: *Increased renal production of transforming growth factor- β 1 in patients with type II diabetes. Diabetes* 46:854-9, 1997
31. Zheng F, Fornoni A, Elliot SJ, Guan Y, Breyer MD, Striker LJ, Striker GE: *Upregulation of type I collagen by TGF- β in mesangial cells blocked by PPAR γ activation. Am J Physiol Renal Physiol* 282:639-48, 2002
32. Issiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R: *Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. Diabetes* 49:1022-32, 2000
33. Izumi T, Enomoto S, Hosiyama K, Sasahara K, Shibukawa A, Nakagawa T, Sugiyama, Y: *Prediction of the human pharmacokinetics of troglitazone, a new and extensively metabolized antidiabetic agent, after oral administration, with an animal scale-up approach. J Pharmacol Exp Ther* 277:1630-41, 1996
34. Trachtman H, Futterweit S, Franki N, Singhal PC: *Effect of vascular endothelial growth factor on nitric oxide production by cultured rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Com* 245(2):443-6, 1998
35. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. J Biol Chem* 274:9116-21, 1999
36. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Wilson TM, Kliewer SA: *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ). J Biol Chem* 270:12953-6, 1995
37. Craven PA, Davidson CM, DeRuberts FR: *Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycolipids. Diabetes* 39:667-74, 1990
38. Koya D, King GL: *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes* 47:859-66, 1998
39. Wheelerjones C, Abughazaleh R, Cospedal R, Houliston RA, Martin J, Zachary I: *Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase*

- A2 in endothelial cells via P42/P44 mitogen-activated protein kinase. FEBS Lett 420:28-32, 1997*
40. Amemiya T, Sasamura H, Mifune M, Kitamura Y, Hirahashi J, Hayashi M, Saruta T: *Vascular endothelial growth factor activates MAP kinase and enhances collagen synthesis in human mesangial cells. Kidney Int 56:2055-63, 1999*