

고농도의 포도당과 TGF- β 가 배양된 사구체 상피세포의 손상에 미치는 영향

울산동강병원 내과¹, 경북대학교 의과대학 내과학교실², 소아과학교실³

정귀화² · 정성창¹ · 정의달² · 도윤정² · 김희경² · 박순홍²
박인혜² · 김정국² · 하승우² · 김보완² · 이인규² · 고철우³

The Effect of High Glucose and TGF- β on the Cellular Injury in Cultured Glomerular Epithelial Cells

Gui Hwa Jeong², Sung Chang Chung¹, Eui Dal Jung², Yun Jeong Doh², Hee Kyoung Kim²,
Soon Hong Park², In Hae Park², Jung Guk Kim², Sung Woo Ha², Bo Wan Kim², In Kyu Lee², Cheol Woo Ko³

*Donggang medical center, Woolsan, Korea¹,
Department of Internal Medicine², Pediatric³,
Kyungpook National University, School of Medicine, Daegu, Korea
Donggang medical center, Woolsan, Korea*

- Abstract -

Background: The glomerulus is a complex physiological structure, as well as selective filtration barrier in the control of renal blood flow and blood pressure. Glomerular epithelial cells may play an important role in development of diabetic nephropathy. Apoptosis of the glomerular epithelial cells are characterized by disappearance of a selective filtration barrier. TGF- β is a key factor in the development of diabetic nephropathy because of its effects on the accumulation of extracellular matrix and mesangial cell proliferation. We examined whether the high glucose and TGF- β induce the apoptosis in cultured rat glomerular epithelial cells.

Methods: Glomerular epithelial cells were cultured from rat glomeruli and conditioned with different concentration of TGF- β or high-glucose. We measured apoptosis of cultured rat glomerular epithelial cell conditioning with different concentration of TGF- β or high-glucose by using DNA electrophoresis.

Results: High glucose (25 mM) induced apoptosis of cultured rat glomerular epithelial cells compared to controls. TGF- β also induced cell death of cultured rat glomerular epithelial cells in dose dependent manner.

Conclusion: These results suggest that high glucose and TGF- β -induced cell death of glomerular epithelial cell may play an important role in diabetic nephropathy and proteinuria. Pathway of apoptosis or cell death by high glucose and TGF- β must be investigated in the glomerular epithelial cells. (*J Kor Diabetes Assoc* 30:254~263, 2006)

Key Words: Apoptosis, Diabetic nephropathy, Glomerular epithelial cell, High-glucose, TGF- β

서 론

당뇨병성 신증은 말기 신부전의 가장 흔한 원인이며, 당뇨병환자의 약 35-40% 가량에서 발생한다⁶⁾. 또한 당뇨병으로 인한 입원 및 사망의 주된 원인이므로 당뇨병성 신증에 대한 정확한 병리 기전을 규명하는 것이 중요하다. 이제까지 당뇨병성 신증에 대한 대부분의 연구는 사구체의 구조적 이상으로 인한 광범위한 사구체 경화증이 어떤 기전에 의해 발생하는지에 초점을 맞추어 진행되어 왔으며, 사구체 상피세포의 역할에 대한 연구는 많지 않다. 현재까지는 미세알부민뇨의 발생으로 당뇨병성 신증을 예측할 수 있다고 알려져 있지만, 최근 연구에 의하면 당뇨병성 신증 초기에 미세알부민뇨가 있는 당뇨병환자에서 사구체당 상피세포 숫자가 감소되어 있다는 사실이 밝혀졌다⁷⁾.

당뇨병성 신증에서 나타나는 사구체 경화증의 발생에 사구체 상피세포의 손상과 결핍이 중요한 역할을 하고⁸⁻¹⁰⁾, 사구체 상피세포의 구조적 손상과 밀도의 변화는 여과 기능의 장애를 초래하며 선택적 투과성이 없어져 당뇨병성 신증의 진행과 미세알부민뇨를 증가시키는데 영향을 미친다^{5,7,9,11,12)}. 사구체 여과의 구조적, 기능적 유지에 중요한 역할을 하는 사구체 상피세포는 actin이 풍부한 족돌기로 사구체 기저막 외측에 부착되어 있으며, 여과 틈새를 유지시켜 사구체 모세혈관으로부터의 단백질의 유출을 방지하고 있다^{2,5,14)}. 족돌기의 소실은 여러 신장질환의 초기에 나타나는데, 이로 인해 여과 틈새가 파괴되고 단백질이 유발된다^{8,15)}. 이후 사구체 상피세포의 공포화, 가성 낭종 형성, 탈락 등이 일어나고 결국에는 사구체 상피세포의 사멸이 일어난다. 사구체 상피세포의 사멸로 인해 하나의 사구체 상피세포가 담당해야 할 면적이 넓어지고, 이것을 유지시키기 위해 사구체 상피세포는 성장하고, 족돌기를 넓히게 된다⁷⁾. 이러한 사구체 상피세포의 변화는 사구체 경화증, 간질의 손상, 신기능 저하 등으로 진행하는데 매우 중요하다.

이전의 많은 연구에서 당뇨병성 신증은 지속적인 고혈당에 의해 성장 인자, 안지오텐신 II, 신장의 미세혈류 변화, 세포외 기질의 증가, 기저막의 비후 등 사구체의 구조적 변화에 의해 발생한다고 알려져 있고, 이러한 변화를 일으키는 사이토카인 중 가장 잘 알려진 것이 전환성장인자(transforming growth factor- β , TGF- β)이다^{2,3,5,16)}. TGF- β 는 신질환의 동물모델과 사람의 만성 신질환에서 손상받은 신장에 축적되는 사이토카인으로 메산지움 세포의 비대, 세포외 기질의 생산 증가 등으로 기저막의 비후와 메산지움에 세포외 기질의 지속적인 축적을 일으켜 세포간질의 섬유화와 사구체 경화증을 유발하여 당뇨병성 신증에 관여한다고 알려져 있다¹⁷⁻¹⁹⁾. 본 연구에서는 당뇨병성 신증과 단백질의 발생에 중요한 사구체 상피세포의 손상에 고농도의 포도당과 TGF- β 가 미치는 영향에 대해 알아보려고 한다.

대상 및 방법

1. 재료

4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)와 propidium iodide (PI)는 sigma (St. Louis, MO)에서 구입하였고, TUNEL 염색을 위한 In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein은 Roche Applied Science (Indianapolis, IN)에서 구입하였다. Caspase-3 Colorimetric Assay Kit는 BD biosciences clontech. (Terrabella, CA)에서 구입하였고, 항 p21 Cip 항체와 항 p27 Kip 항체, 항 mouse 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.

2. 사구체 상피세포 배양

일차 배양한 쥐의 사구체 상피세포는 Dr. Kreisberg (San Antonio, TX)로부터 공급받아 실험에 사용하였다. RPMI 1640 (Gaithersburg, MD) 배지에 불활성화시킨 10% fetal bovine serum (FBS), HEPES 1M sigma (St. Louis, MO), Insulin 100 U/mL (Indianapolis, Indiana), penicillin/streptomycin/amphotericin, glutamine (0.2 mM)을 함유한 것으로 5% CO₂가 공급되는 37°C 항온습기에서 배양하였다²⁰⁾. 배지는 3일에 한번 교환하였고, 세포 융합이 100%가 되면 1:3 또는 1:4로 계대 배양하였다. 배양 계대수 7~12에서 실험을 하였다. 사구체 상피세포는 다음과 같은 기준에 의해 확인하였다. 1) 세포 단층의 자갈모양 2) 미세융모의 존재 3) 치밀이음부로 예상되는 연접복합체의 존재 4) 미오신(myosin)의 부재 5) 플라스틱 접시에 돔(domes)의 형성 등이다.

3. 고농도 포도당 또는 TGF- β 처리 조건

배지에 각각 고농도의 포도당 (25 mM), 정상 농도의 포도당 (5.5 mM), 만니톨 (19.5 mM)을 넣은 정상 농도 포도당 (5.5 mM)이 함유된 배양액에서 하루에 1회씩 배지를 갈아주면서 12, 24, 48, 72시간 동안 배양하였고, TGF- β 는 1 ng/mL를 일반 배지에 넣어 48시간동안 배양하였다.

4. 세포사멸 측정

1) DAPI 염색

8 Chamber Slide에 배양된 세포를 24시간 동안 0.5% serum starvation한 후 정상 농도의 포도당 (5.5 mM)과 고농도의 포도당 (25 mM), 그리고 정상 농도와 고농도의 포도당에 TGF- β 1 ng/mL를 처리 한 조건에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 D-PBS로 2번 씻고 2% PFA (paraformaldehyde) 완충액에 30분간 고정하였다. 고정 후 D-PBS로 5분씩 3회 씻은 후 0.5 ug/mL DAPI 20분간 처리하였다. 염색된 세포를 형광현미경으로 관찰하였다.

2) PI 염색

6-well plate에 배양된 세포를 24시간 동안 0.5% serum starvation한 후 정상 농도 포도당 (5.5 mM)과 고농도 포도당 (25 mM), 각각의 조건에서 세포배양 시 영향을 미치지 않았던 농도인 TGF- β 1 ng/mL을 처리하여 24, 48, 72시간으로 나누어 시간별로 배양하였다. 배지를 1.5 mL 튜브에 모으고, 원심분리하여 세포만 모았다. well 바닥에 있는 세포는 D-PBS로 2회 씻은 후 트립신 (Trypsin)으로 세포를 떼어내어 배지에서 얻은 세포와 합쳐서 원심분리하여 세포만을 모았다. 모든 세포를 PBS 1 mL로 씻은 후 PBS 100 μ L에 세포를 현탁시키고, 차가운 100% 에탄올 200 μ L를 첨가하여 30분간 4°C에 놓아둔 뒤, 원심분리하여 에탄올을 제거한 후 PBS로 2회 씻었다. 튜브에 세포만을 남기고 50 μ g/mL Ribonuclease A 250 μ L를 넣고 37°C에서 30분간 배양하였다. 100 μ g/mL Propidium Iodide (PI) 250 μ L를 넣고 37°C에서 20분간 배양하였다. 이 세포를 FACS (Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 사멸된 세포의 퍼센트 (%)를 측정하였다.

3) TUNEL 염색

8 Chamber 슬라이드에 배양된 세포를 24시간 동안 0.5% serum starvation한 후 정상 농도의 포도당 (5.5 mM), 고농도의 포도당 (25 mM), 만니톨 (19.5 mM)과 함께 정상 농도의 포도당 (5.5 mM)을 각각 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포를 D-PBS로 3번 씻은 후, 세포 고정을 위해 2% Paraformaldehyde (PFA)를 이용하였고 15~25°C에서 2% PFA로 60분간 고정하였다. D-PBS로 3번 씻은 후 키트 (kit)에 제공된 투과성 용액 100 μ L를 첨가하여 얼음에서 2분간 처리한다. D-PBS로 3회 5분씩 씻어준 후 In Situ Cell Death Detection Kit (indianapolis, IN)로 제공된 라벨 용액 450 μ L와 효소 용액 50 μ L를 슬라이드에 처리하여 37°C에서 1시간 암상태에서 배양하였다. 그 후 D-PBS로 10분씩 3번 씻은 후 커버글라스를 덮어 형광 현미경으로 관찰하였다.

4) Caspase-3 활성화 측정

배양된 세포에 정상 농도 포도당 (5.5 mM), 정상 농도 포도당 (5.5 mM)과 만니톨 (19.5 mM), 고농도 포도당 (25 mM), 정상 농도 (5.5 mM) 및 고농도 포도당 (25 mM) 배지 각각에 1 ng/mL TGF- β 를 처리한 후 0, 24, 48, 72시간마다 ELISA를 통해 caspase-3 활성도를 측정하였다. Caspase-3 활성도 측정 시 조건에 맞게 모두 처리한 후 세포를 모아서 용해시킨 후 용해한 세포를 얼음에 10분 동안 두었다가 12,000 rpm으로 10분간 4°C에서 원심분리하여 상등액을 이용하여 정량하였다. 정량값을 동일하게 맞춘 시료에 2X reaction buffer와 1 mM DTT를 첨가하여 얼음에서 30분 동안 반응시키고, 1 mM caspase-3 substrate (DEVD

-pNA)를 5 μ L 첨가하여 37°C 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 웨스턴 블롯

배양된 세포에 정상포도당 (5.5 mM), 고농도포도당 (25 mM)를 처리하여 12, 24, 48, 72시간 배양하였다. 세포를 모은 후 IPH 용해 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 100 mM PMSF, Leupeptin 1 mg/mL, Aprotinin 1 mg/mL, 1M DTT)으로 용해시킨 후, 12,000 rpm으로 4°C에서 20분 원심분리하였다. 상층액을 취하여 단백질을 Bradford법으로 정량한 후 25 μ g 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 크기별로 분리하였다. 크기별로 분리된 단백질을 transfer 완충액 (20% methanol, 25 mM Tris-HCl, and 192 mM glycine)으로 채운 전이 탱크에서 200 voltage로 1시간 동안 transfer하여 분리된 단백질을 nitrocellulose 막 (NC 막)으로 옮겼다. 항체와 단백질 간의 비특이적 반응을 차단하기 위해 NC 막을 5% skim milk가 포함된 Tris-buffered saline (TBS : 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 137 mM NaCl)에서 2시간 동안 반응시킨 후 5% skim milk가 포함된 TBS에 각각의 항 p21 (1:500) Cip 항체 및 항 p27 (1:500) Kip 항체를 첨가하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. Horseradish peroxidase conjugated 이차 항체 [항 mouse (1:700)]와 반응시키고, horseradish peroxidase-conjugated 이차 항체 [항mouse(1:700) 항체] 400 μ g/mL를 첨가하여 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. TBST (TBS + 0.1% Tween 20)로 세척 하고 ECL plus (Amersham Biosciences, Little Chalfnot, UK)를 사용하여 단백질 발현을 확인하였다. 그 후 같은 막을 stripping buffer (100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCL, pH 6.7)에서 60°C로 30분간 반응시켰다. 이후 막을 TBS로 5분씩 5회 세척한 후 항 actin 항체와 다시 반응시켜 일정한 양의 단백질을 사용하였는지 확인하였다.

결 과

1. 고농도의 포도당과 TGF- β 가 세포사멸에 미치는 영향

배양된 사구체 상피세포를 DAPI 염색으로 사구체상피세포의 핵을 염색한 결과, 정상 농도의 포도당 (5.5 mM)에서는 관찰되지 않던 DNA 분절이 고농도의 포도당 (25 mM)에서는 3, 5, 7일 모두에서 관찰되었다. 삼투압에 의한 영향을 배제하기 위하여 정상 농도의 포도당 (5.5 mM)에 19.5 mM의 만니톨을 추가한 경우에는 DNA 분절이 관찰되지 않았다 (Fig. 1A, 1B).

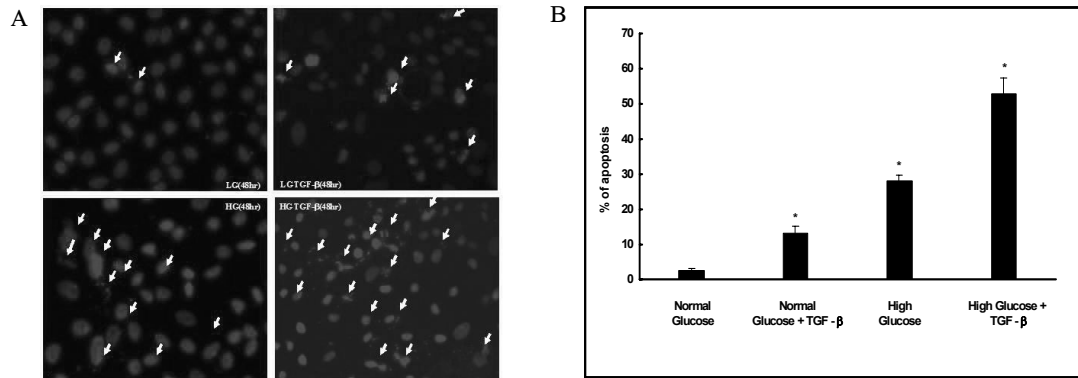
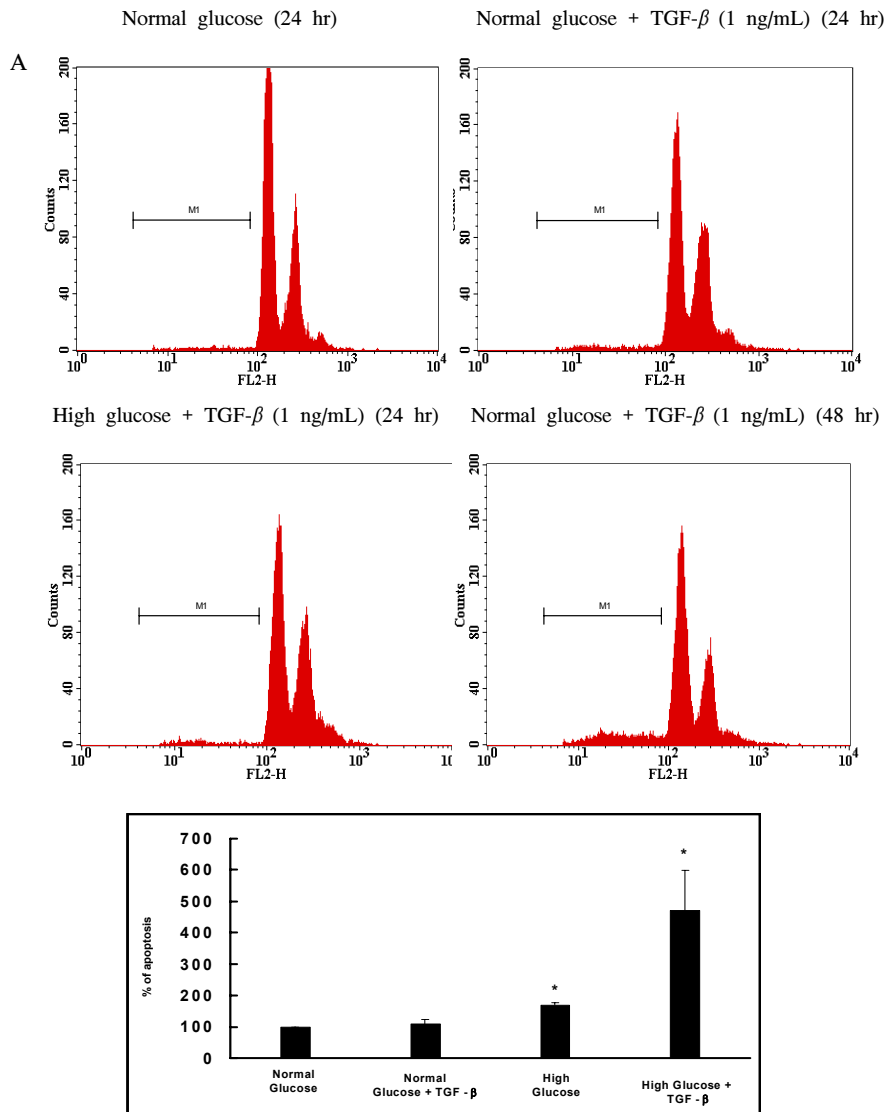


Fig. 1. Cultured renal epithelial cells were exposed to normal glucose (5.5 mM), high glucose (25 mM), normal glucose (5.5 mM) plus TGF- β (1 ug/mL), high glucose (25 mM) plus TGF- β (1 ug/mL). (A) DAPI stain in renal epithelial cells treated with high glucose and TGF- β . Apoptotic DNA fragmentation of cells treated with high glucose and TGF- β were increased in DAPI stain. (B) The mean \pm S.D. of the three different experiments expressed as number of apoptotic cells per normal cells are shown in the graph.

* $P < 0.05$ versus controls.



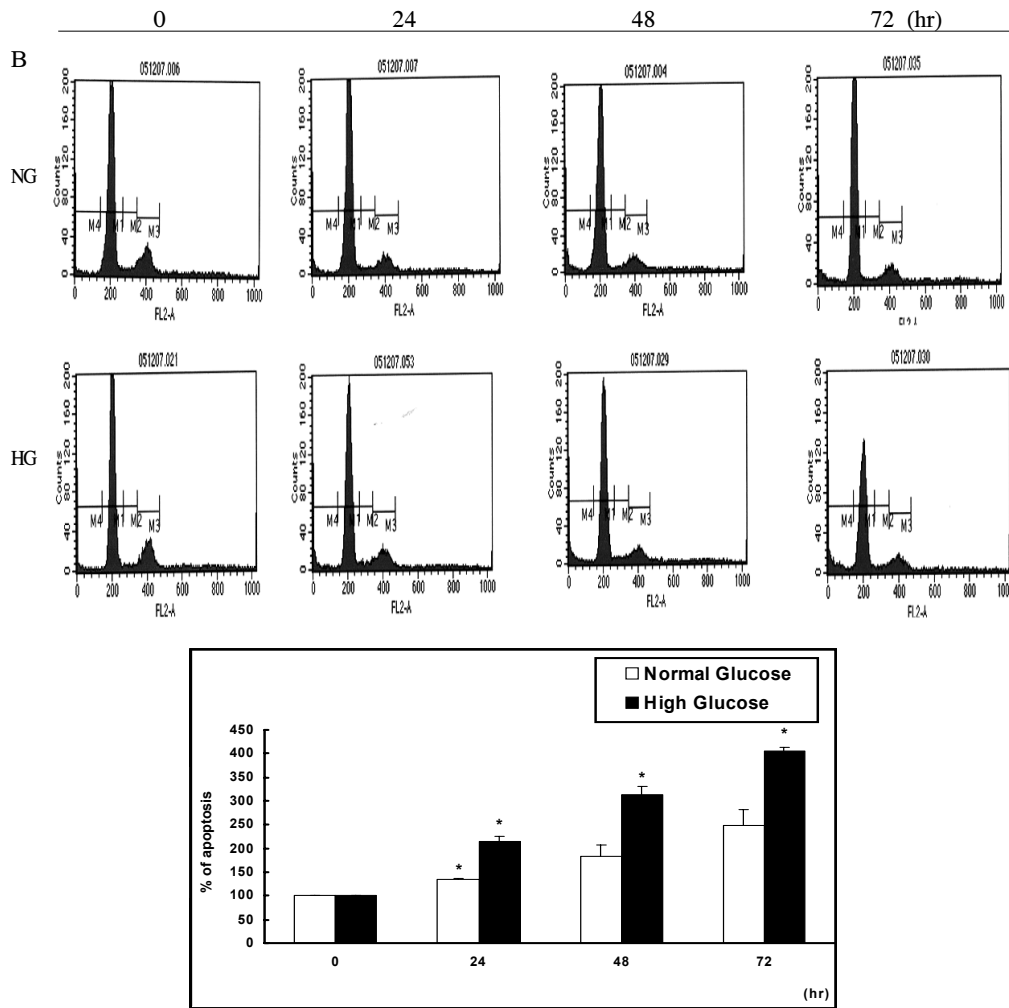


Fig. 2. High glucose and TGF- β induce apoptosis in renal epithelial cells.

A. Cells were exposed to normal glucose (5.5 mM), normal glucose (5.5 mM) plus TGF- β (1 ng/mL), high glucose (25 mM), high glucose (25 mM) plus TGF- β (1 ng/mL) for 24 hr after which nuclei were stained by PI stain and analysed by flow cytometry. The mean \pm S.D. of the three different experiments expressed as number of apoptotic cells per total cells are shown in the graph.

* $P < 0.05$ versus controls compared.

B. Cells were exposed to normal glucose (5.5 mM), high glucose (25 mM) plus TGF- β (1 ng/mL) for 24, 48, 72 hr were stained by PI stain and analysed by flow cytometry. The mean \pm S.D. of the three different experiments expressed as number of apoptotic cells per total cells are shown in the graph.

* $P < 0.05$ versus controls.

배양된 사구체 상피세포를 PI로 염색한 후 FACS (Franklin Lakes, NJ)로 정량 분석한 결과, 정상 농도의 포도당을 전처리한 군에 비해 고농도의 포도당을 전처리한 군에서 시간에 의존적으로 사멸된 세포의 수가 증가하였으며 (Fig. 2B) 정상 농도의 포도당만 전처리한 군에 비해 정상 농도의 포도당과 TGF- β (1 ng/mL)를 같이 전처리한 군에서 전처리 48시간 후, 사멸된 세포의 수가 증가하였다 (Fig. 2A). 배양된 사구체상피세포를 TUNEL 염색한 결과, 정상 농도의 포도당을 전처리한 군에 비해 고농도의 포도당으로 24시간 동안 전처리한 군에서 사멸된 세포의 수가 증가하였다 (Fig. 3A, 3B).

2. 고농도의 포도당과 TGF- β 가 caspase-3 활성화에 미치는 영향

우선 정상 농도 (5.5 mM)와 고농도의 포도당 (25 mM)에서 caspase-3의 활성도를 시간에 따라 기저상태, 24, 48, 72시간 후 각각 측정을 한 결과, 48시간과 72시간에서 차이가 있었다 (Fig. 4A, 4B). TGF- β 에 의한 영향을 본 결과 caspase-3 활성도가 증가하였고, 고농도 포도당 배지에서 배양한 세포에 1 mM caspase-3 inhibitor, DEVD-fmk (Terrabella, CA)를 처리하였을 때 caspase-3가 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4A).

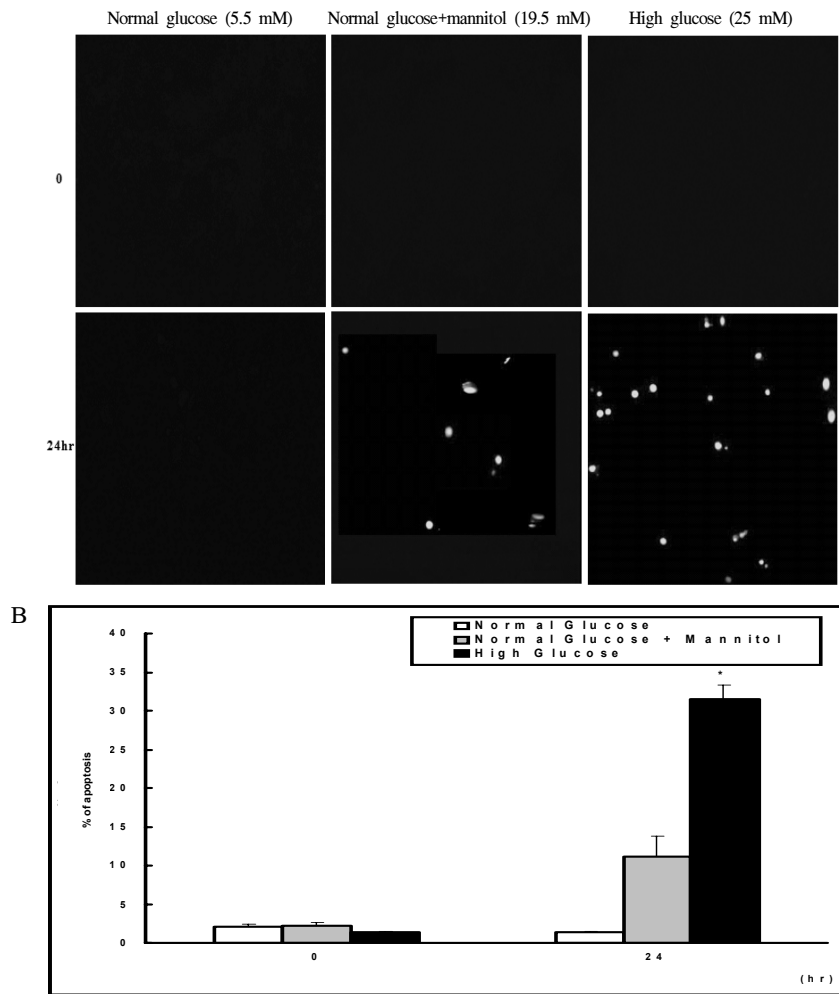


Fig. 3. High glucose induced apoptosis in renal epithelial cells.

After cells were exposed to starvation state for 24 h, they were exposed to normal glucose (5.5 mM), normal glucose (5.5 mM) plus mannitol (19.5 mM), high glucose (25 mM) for 24 hr. A. Renal epithelial cells were stained by TUNEL stain. B. Three types of bars (white, gray, black) indicate percentage of apoptotic cells per total number. The mean \pm S.D. of the three different experiments expressed as number of apoptotic cells per total cells are shown in the graph.

* $P < 0.05$ versus controls compared.

3. 고농도의 포도당이 p21, p27 단백질 발현에 미치는 영향

세포분열 과정 중 G1 기에서 S 기로의 이행을 억제함으로써 세포사멸을 일으키는데 중요한 역할을 담당하는 p21 Cip와 p27 Kip가 사구체 상피세포의 사멸과정에서도 역할을 할 것으로 예상하였으나, 정상 농도 포도당 (5.5 mM), 고농도 포도당 (25 mM)으로 처리한 사구체 상피세포 모두에서 p21 Cip와 p27 Kip의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 5A, 5B).

고 찰

고혈당 환경에서 사구체 메산지움 세포수의 감소 원인은

세포사멸, 탈락, 세포 증식 억제 등에 의한 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 고농도의 포도당과 TGF- β 와의 관련성에 대해서는 이미 많이 알려져 있다^{1,2,27)}. 고농도의 포도당은 신장 내 TGF- β 를 활성화시키고^{16,21)}, 당뇨병 동물모델의 신장에서 TGF- β mRNA와 단백질의 발현을 증가시킨다^{3,22-24)}. 항 TGF- β 항체를 사용하여 TGF- β 의 활성도를 억제시키면 신장의 비대이나 세포외기질의 증식을 억제하여 당뇨병성 경화증의 진행을 예방할 수 있다고 한다²⁴⁻²⁶⁾. 앞서 시행된 많은 연구의 결과들은 TGF- β 가 당뇨병성 신증의 병인에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 그러나 이제까지의 연구들은 주로 고농도의 포도당과 TGF- β 등에 의해 신장의 비대, 메산지움 세포의 증식, 세포외 기질의 증식이 어떻게 일어나는지에 대한 연구였으며, 사구체 상피세포의 역할에 대한 연구는 흔치 않았다²⁷⁾. 사구체 상피세포는 사구체 기저

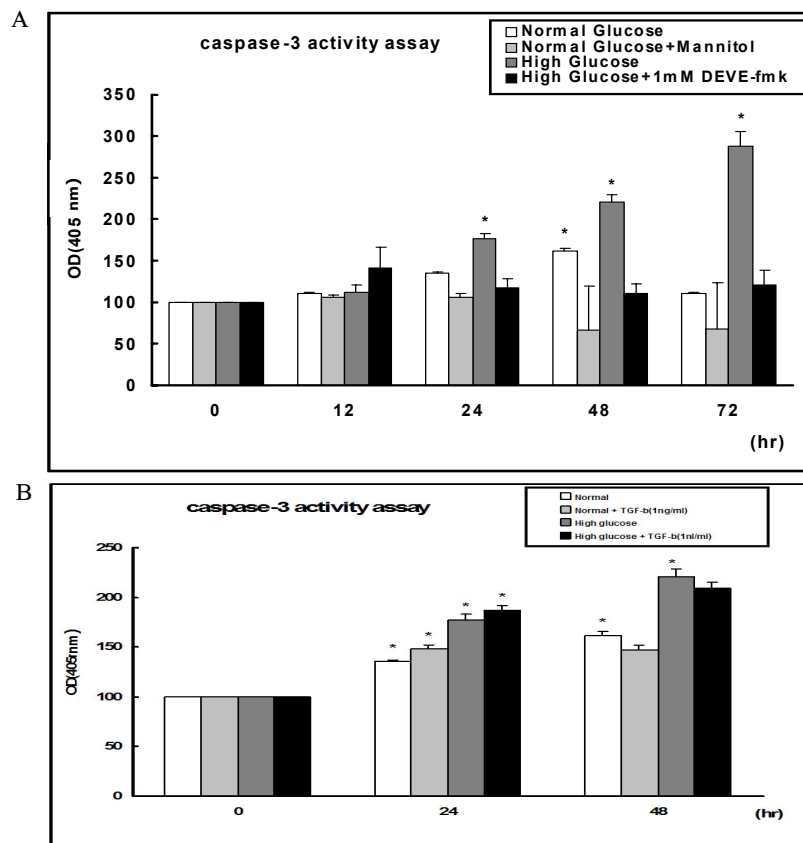


Fig. 4. A. Effects of glucose concentration (5.5 mM, 25 mM) on caspase-3 activity. Time course of caspase 3-activity of renal epithelial cells induced by high glucose (25 mM). The level of caspase-3 activity in high glucose (25 mM) was significantly increased compared with the control cells at 24, 48, 72 hr. B. Effects of TGF- β treatment (1 ng/mL) on caspase-3 activity. Caspase-3 activity was increased in the cells treated with normal glucose (5 mM) plus TGF- β (1 ng/mL), high glucose (25 mM), high glucose plus TGF- β (1 ng/mL) at 24 hr. At 48 hr, caspase-3 activity was increased in group treated with high glucose.

* $P < 0.05$ compared with normal glucose (5.5 mM).

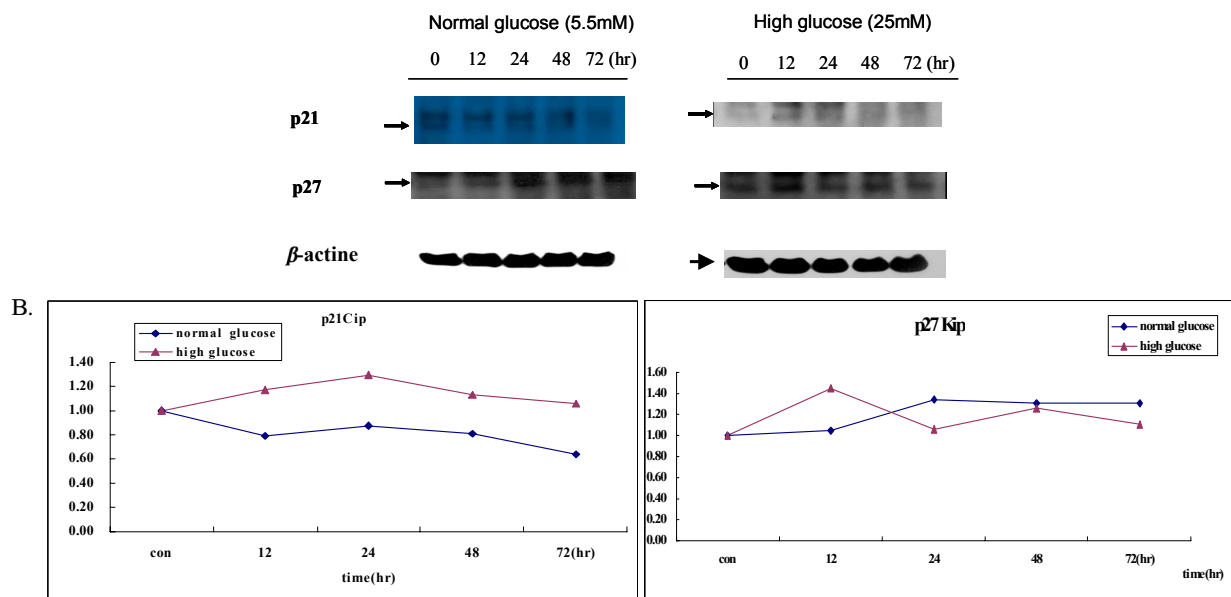


Fig. 5. Western blot assay about p21 Cip, p27 Kip of renal epithelial cells 12, 24, 48, 72 hours after cell lysis with IPH lysis buffer. A. Western blot shows p21 Cip level and p27 Kip level after treatment of high glucose. B. p21 Cip and p27 Kip concentration were measured at 12, 24, 48, 72 hr after normal (5.5 mM), high (25 mM) glucose treatment.

막의 생산에 관여하는 구조적 지지물로서 사구체의 여과에 중요한 역할을 담당한다. 사구체 상피세포에 손상이 생기면 여과 기능의 장애가 일어나고 선택적 투과성이 없어져 단백뇨가 발생하게 된다. 앞에서 언급한 결과들은 사구체 상피세포의 손상이 당뇨병성 신증의 발생 및 진행에 관여한다는 것을 시사하고, 사구체 상피세포의 손상 기전을 밝히는 것이 당뇨병성 신증의 발생기전을 알아내는데 도움이 되리라 생각된다. 최근에 Schiffer 등^{28,29)}은 동물 실험연구에서 진행되는 사구체 경화증의 초기에 TGF- β 에 의해 유도되는 Smad7의 표현 증가와 관련된 사구체 상피세포의 세포사멸이 먼저 일어나고 내피세포와 메산지움세포의 세포사멸은 상당히 진행된 상태에서 증가한다는 것을 보고하였는데, 사구체 상피세포 사멸에 TGF- β 가 p38 MAP kinase와 caspase-3의 활성화를 통해 작용하고, Smad7의 증가는 세포 생존 인자인 NF- κ B의 신호 전달을 방해함으로써 TGF- β 의 세포 사멸 기능을 증폭시킨다고 보고하였다. 또 김 등³⁰⁾의 보고에서도 사구체 경화증 환자에서 사구체 상피세포의 손상이 TGF- β 를 자극하고 다시 Smad 신호전달을 통하여 사구체 상피세포를 자극하여 세포외 기질의 과다 생산 등으로 사구체 경화증이 발생한다고 하였다. 최근에는 Singhal 등^{31,32)}의 연구에서 안지오텐신 II가 배양된 쥐의 사구체 상피세포의 사멸을 유도한다고 하였고, 상피세포 사멸은 안지오텐신 II 수용체를 차단함으로써 예방된다고 발표하였다. Sanwal 등³³⁾은 purumycin이 활성 산소를 통하여 사구체 상피세포 사멸을 유도한다고 보고하였고 이 등⁵⁾은 고농도의 포도당에 의한 산화스트레스와 인테그린이나 세포 간 결합부위의 변화가 족세포의 손상을 초래한다고 보고하였다. 앞서 언급한 연구결과²⁸⁻³⁰⁾에 의하면 사구체 상피세포의 손상이 당뇨병성 신증에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고, 본 연구에서는 고농도의 포도당에 의해 사구체 상피세포의 사멸이 유도되는 것과 TGF- β 에 의해 사구체 상피세포의 사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

또한, Gunter Wolf 등³⁴⁾은 고농도의 포도당은 MAP kinase를 통한 전사후 과정에서 p27 Kip를 증가시키게 된다는 것과 고농도의 포도당에 의해 증가된 결체조직 성장인자가 CDK inhibitor (p15, p21 Cip, p27 Kip)의 발현을 증가시키며, 이러한 CDK inhibitor의 증가로 인해 세포 분열 과정이 정지하게 된다는 것에 대해 보고한 바 있다.

본 실험에서는 사구체 상피세포를 고농도의 포도당과 TGF- β 를 처리하였을 때 세포 사멸이 발생함을 확인할 수 있었다. 그러나, 세포사멸 과정에 영향을 미친다고 알려진 p21 Cip와 p27 Kip의 증가를 확인할 수는 없었다. 그러므로, 사구체 상피세포의 사멸과정에는 여러 연구들에서 알려진 고농도 포도당과 TGF- β 에 의해 p21 Cip, p27 Kip를 통한 내피세포 및 메산지움세포의 사멸과정과는 다른 기전이 작용하고 있을 것이라 추정해 볼 수 있으며 이를 규명하기

위한 새로운 연구가 필요하다.

이상의 내용을 요약하면, 고농도의 포도당과 이로 인하여 상승된 TGF- β 가 사구체 상피세포의 사멸을 증가시키며, 그 결과로 소실되는 사구체의 선택적 투과성은 단백뇨나 사구체 경화증 발생에 있어 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 그러나 고농도 포도당과 TGF- β 발현의 증가가 사구체 상피세포 사멸 과정에 있어 어떠한 기전을 통하여 영향을 미치는지에 대한 자세한 기전을 규명할 수 없었다는 점이 이 논문의 제한점으로 사료되고, 사구체 상피세포에서 일어나는 세포사멸 과정을 확인하기 위한 추가적인 연구가 필요하다는 결론을 얻을 수 있었다.

요 약

연구배경: 당뇨병성 신증에 고혈당과 TGF- β 가 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있지만 사구체 상피세포에 대한 효과와 기전에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 사구체 상피세포는 사구체 기저막의 생산에 관여하고 구조적으로 여과적 장벽의 중요한 역할을 하며, 사구체 상피세포의 손상이 발생하면 여과장치에 이상이 초래되어 단백뇨가 발생하게 된다. 본 연구에서는 사구체 상피세포 손상의 한가지 기전인 세포 사멸에 미치는 고농도의 포도당과 TGF- β 의 작용 및 그 기전에 대해 알아보고자 하였다.

방법: 일차 배양한 쥐의 사구체 상피세포를 고농도의 포도당과 TGF- β 에 노출시킨 후 사구체 상피세포의 사멸과정을 알기 위해 DNA 분절 유무를 확인하였다.

결과: 고농도의 포도당에 노출된 사구체 상피세포에서 DNA 분절이 관찰되었고 TGF- β 의 농도가 증가함에 따라 DNA 분절이 관찰되었다.

결론: 본 연구의 결과로 보아 고농도의 포도당과 TGF- β 에 의한 사구체 상피세포의 사멸이 당뇨병에서 사구체 상피세포의 손상기전의 하나로 생각되며 고농도의 포도당과 TGF- β 에 의한 사구체 상피세포의 사멸이 당뇨병성 신증에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 고농도의 포도당과 TGF- β 가 어떤 경로를 통하여 사구체 상피세포의 사멸을 일으키는지는 아직 잘 밝혀져 있지 않으므로 앞으로 이에 대한 많은 연구가 이뤄져야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 강영선, 지이화, 한상엽, 신진호, 조상경, 차대룡, 권영주, 조원용, 표희정, 김형규, 강신욱, 한대석: 당뇨병성 신증의 발병기전으로 족세포(Podocyte)에서 형질전환인자(Trans-forming Growth Factor) β 의 역할. 대한신장학회지 22(6):645-54, 2003
2. 신규태, 김홍수: 메산지움 세포에서 Transforming

- Growth Factor-β1 antisense*를 이용한 섬유화 물질의 억제. 대한신장학회지 22(4):349-57, 2003
3. 김형엽, 장재휘, 한상미, 안기성, 박성배, 김현철, 박관규: 자연발생 당뇨병의 신장에서 섬유화 초래인자인 *Transforming Growth Factor-β1*의 발현. 대한신장학회지 22(2):165-73, 2003
 4. 이은영, 송재숙, 정춘희, 홍세용: 당뇨병성 신증에서 사구체 족세포 (podocyte)의 손상기전. 당뇨병 27:343-51, 2003
 5. Lee SH, Bae JS, Park SH, Lee BH, Park RW, Choi JY, Park JY, Ha SW, Kim YL, Kwon TH, Kim IS: *Expression of TGF-β induced matrix protein Big-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. Kidney International Vol. 64:1012-21, 2003*
 6. Raptis AE, Viberti G: *Pathogenesis of diabetic nephropathy. Exp Clin Endocrinol Diabetes 109 Suppl 2:424-37, 2001*
 7. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW: *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. J Clin Invest 99:342-48, 1997*
 8. Fries JW, Sandstrom DJ, Meyer TW, Rennke HG: *Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. Lab Invest 60:205-18, 1989*
 9. Kriz W, Gretz N, Lemley KV: *Progression of glomerular diseases is the podocyte the culprit? Kidney Int 54:687-97, 1998*
 10. Kriz W, Elger M, Nagata M, Kretzler M, Uiker S, Koeppen-Hageman I, Tenschert S, Lemley KV: *The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. Kidney Int Suppl 45:64-72, 1994*
 11. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG: *Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and micro-albuminuria. Diabetologia 42:1341-44, 1999*
 12. Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P: *Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. Diabetes 52:1031-35, 2003*
 13. Rennke, HG: *How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage? Kidney Int Suppl 45:58-63, 1994*
 14. Kerjaschki D: *Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. Kidney Int 45:300-13, 1994*
 15. Nagata M, Kriz W: *Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. Kidney Int 42:148-60, 1992*
 16. Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS: *High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. Kidney International Vol. 67:82-93, 2005*
 17. Border WA, Noble NA: *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. N Engl J Med 331:1286-92, 1994*
 18. Peters H, Noble NA, Border WA: *Transforming growth factor-beta in human glomerular injury. Curr Opin Nephrol Hypertens 6:389-93, 1997*
 19. Fumo P, Kuncio GS, Ziyadeh FN: *PKC and high glucose stimulate collagen alpha 1 (IV) transcriptional activity in a reporter mesangial cell line. Am J Physiol 267:632-38, 1994*
 20. Kreisberg JJ, Hoover RL, Karnovsky MJ: *Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. Kidney Int 14:21-30, 1978*
 21. Sharma K, Ziyadeh FN: *Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. Semin Nephrol 17:80-92, 1997*
 22. Sharma K, Ziyadeh FN: *Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. Am J Physiol 267:1094-101, 1994*
 23. 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*
 24. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN: *Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. Diabetes 45:522-30, 1996*
 25. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K: *Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta*

- antibody in db/db diabetic mice. Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8015-20, 2000
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 autocrine activation of transforming growth factor-beta. J Clin Invest* 93:536-42, 1994
 27. Det NF van, Verhagen NA, Tamsma JT, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, FJ van der Woude: *Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin II. Diabetes Vol 46 Issue 5:834-40, 1997*
 28. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, Bottinger EP: *Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. J Clin Invest* 108:807-16, 2001
 29. Schiffer M, Schiffer LE, Gupta A, Shaw AS, Roberts IS, Mundel P, Bottinger EP: *Inhibitory smads and tgf-Beta signaling in glomerular cells. J Am Soc Nephrol* 13:2657-66, 2002
 30. Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, Lee HS: *Activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. Kidney Int* 64:1715-21, 2003
 31. Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishnan N, Franki N, Ding G, Singhal PC: *Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. Am J Physiol Renal Physiol* 284:955-65, 2003
 32. Ding G, Reddy K, Kapasi AA, Franki N, Gibbons N, Kasinath BS, Singhal PC: *Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol* 283:173-80, 2002
 33. Sanwal V, Pandya M, Bhaskaran M, Franki N, Reddy K, Ding G, Kapasi A, Valderrama E, Singhal PC: *Puromycin aminonucleoside induces glomerular epithelial cell apoptosis. Exp Mol Pathol* 70:54-64, 2001
 34. Wolf G, Shankland SJ: *p27 Kip1: The "rosebud" of Diabetic nephropathy? J Am Soc Nephrol* 14:819-22, 2003