

당뇨병 신증을 동반한 환자에서 단핵구 내 NF- κ B 및 AP-1의 활성화

연세대학교 의과대학 내과학교실, 이화여자대학교 약학대학¹

남지선, 조민호, 박종숙, 이근택¹, 김혜진, 강은석, 이유미, 안철우, 차봉수, 이은직, 임승길, 김경래, 하헌주¹, 이현철

Activation of NF- κ B and AP-1 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Isolated from Patients with Diabetic Nephropathy

Jisun Nam, Min Ho Cho, Jong Suk Park, Geun Taek Lee¹, Hai Jin Kim, Eun Seok Kang, Yu Mie Lee, Chul Woo Ahn, Bong Soo Cha, Eun Jig Lee, Sung Kil Lim, Kyung Rae Kim, Hun Joo Ha¹, Hyun Chul Lee

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine; and Ewha Womans University, Pharmacy¹

Abstract

Background: We evaluated the role of oxidative stress in diabetic nephropathy by measuring intracellular reactive oxygen species (ROS) and redox-sensitive transcription factors in isolated peripheral mononuclear cells (PBMC).

Methods: From 66 diabetic patients with or without diabetic nephropathy (Group III and II, respectively) and 49 normal control subjects (Group I), spontaneous and stimulated ROS levels, activities of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), and specificity protein1 (Sp1) in PBMC, urinary and PBMC TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1), and 24-hour urinary albumin excretion (UAE) were measured.

Results: Spontaneous ROS was significantly higher in group III and II than group I (60.7 ± 3.3 vs. 60.0 ± 3.0 vs. $41.1 \pm 2.4\%$, respectively), and stimulated ROS were significantly higher in Group III compared to Group II (Increment of H₂O₂-induced ROS production: 21.8 ± 2.2 vs. $11.1 \pm 2.0\%$, respectively; increment of PMA-induced ROS production 23.5 ± 4.5 vs. $21.6 \pm 2.2\%$, respectively). The activities of NF- κ B and AP-1, but not of Sp1, were significantly higher in Group III than in Group II (2.53 vs. 2.0 vs. 1.43-fold, respectively). Both PBMC- and urinary TGF- β 1 levels were higher in Group III than Group II (3.23 ± 0.39 vs. 1.99 ± 0.68 ng/mg in PBMCs, 16.88 ± 6.84 vs. 5.61 ± 1.57 ng/mL in urine, both respectively), and they were significantly correlated with activities of NF- κ B and AP-1 and 24-hour UAE.

Conclusions: Increased intracellular ROS generation in PBMCs of diabetic patients is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy through activation of NF- κ B and AP-1, but not Sp1, and increased expression of TGF- β 1. (J Kor Diabetes Assoc 31:261~273, 2007)

Key Words: AP-1, Diabetic nephropathy, NF- κ B, Oxidative stress, Sp1, TGF- β 1

서 론

과거에는 감염이나 급성 대사성 합병증이 당뇨병환자에 서의 주된 문제였지만, 점차 만성 합병증의 중요성이 대두 되고 있다. 당뇨병 신증을 포함한 이들 합병증의 기전에 대

해 여러 가설들이 있으나, 아직 규명되지 않았고 효과적인 치료 역시 확립되지 않은 상태로, 당뇨병 만성 합병증의 기 전을 이해하기 위한 많은 연구가 필요한 상태이다.^{1,2)} 여러 기전들 중 고혈당에 의해 형성된 산화 스트레스가 반응성 산소족(Reactive oxygen species)을 증가시켜 산화스트레스

접수일자: 2007년 3월 19일, 통과일자: 2007년 5월 22일, 책임저자: 안철우, 연세대학교 의과대학 내과학교실

* 본 논문은 대한당뇨병학회 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

에 민감한 세포 내 신호전달체계가 활성화되면, 세포손상을 일으키는 유전자 산물들이 생성되어 여러 미세혈관 및 대혈관 합병증을 일으킨다고 알려져 있다³⁻⁹. 고혈당은 신장 혈관사이세포에 및 신세뇨관 상피세포에서 반응성 산소종의 형성을 자극시키고, 이들은 protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, 전사인자 등에 의한 세포 내 신호전달체계를 활성화시켜, TGF- β 와 세포 외 기질 유전자 및 단백질의 발현을 증가시킨다¹⁰. 최근 당뇨병 신증의 발병에 있어서 백혈구의 역할이 중요하다는 보고들이 많이 있는데¹¹⁻¹⁵, Galkina 등¹²은 말초혈액 내 백혈구들이 아직 밝혀지지 않은 기전에 의해 신장으로 이동하게 되면, 사구체혈관벽의 세포표면 단백질(L-, P-, E-selectin, integrin) 및 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)과 같은 부착분자(adhesion molecule)와 반응하여 신장조직 내로 이동하게 되고, 여러 반응성 산소종, 염증성 사이토카인, metalloproteinase, 성장인자 등을 생성시켜 신증을 일으킨다고 하였다. 여기에는 림프구와 단구(monocyte) 등의 단핵세포뿐 아니라 호중구와 같은 다핵형 세포도 관여하는데^{11,12}, 이 중 단구가 신장혈관의 염증반응에서 가장 핵심적인 역할을 하고 이들의 축적이 당뇨병 신증에서 특징적으로 나타나며¹³, 단백질과 신장 혈관사이세포의 증식을 직접적으로 일으킬 수 있다고 보고되었다¹⁴. 림프구 역시 당뇨병 신증 환자의 신장조직으로 이동하는 것이 관찰되었고, 여기서 염증반응에 관여하는 것이 관찰되었으나, 아직 많은 연구가 필요하고, 호중구는 주로 급성 염증반응에 관여한다고 알려져 있으나, 당뇨병환자에서 비정상적으로 활성화된 중성구가 관찰되었다¹⁴.

당뇨병환자에서 증가된 산화 스트레스에 의해 활성화된 산화환원 체계의 전사인자들이 신증 발생에 중요한 매개물질들인데, nuclear factor-kappa B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), 그리고 specificity protein1 (Sp1)에 대한 연구가 많이 되어있다¹⁶⁻²¹. NF- κ B는 p50과 p65로 이루어진 이종이합체(heterodimer)로서, 세포질에서는 억제 단백질인 I- κ B와 결합하여 불활성화된다^{21,22}. Phosphorylated I- κ B kinase complex가 사이토카인에 의해 자극되면 I- κ B가 붕괴되면서 NF- κ B가 핵 내로 전위되어, 각종 면역 및 염증 반응, 성장, 그리고 유착에 관여하는 여러 유전자의 전사를 자극하게 된다²¹⁻²⁵. 사이토카인뿐 아니라, 고혈당, 유리지방산, 산화 스트레스와 산화 저비중지단백(LDL)도 NF- κ B의 활성화에 관여한다^{25,26}. PBMC에서 NF- κ B의 활성화도가 당뇨병 신증환자에서 혈당조절상태 및 요중 알부민 배설량과 상관관계에 있다는 보고도 있다^{27,28}. 또한, 최근 Enzyme Mobility Shift Assay (EMSA)를 사용한 연구에 의해 증가된 산화 스트레스가 NF- κ B의 활성화를 통해 당뇨병 신증에 관여한다고 보고된 바 있다²⁷.

AP-1은 Jun과 Fos의 복합체로 이루어진 전사인자로서, 산화스트레스에 의해 활성화되고, NF- κ B, STAT (signal

transducers and activators of transcription), smads 등 여러 당뇨병 신증과 관련된 전사인자들과 상호작용을 한다^{29,30}. 이전 연구자들에 의해 NF- κ B와 AP-1의 cross-coupling이 보고된 바 있다³¹. Anti-sense *c-jun*과 *c-fos*는 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)에 의한 NF- κ B의존적 프로모터의 반응을 감소시키는데, 이는 AP-1 결합 부위가 없는 프로모터에서의 Fos와 NF- κ B의 상승효과를 암시한다. 이러한 전사 요소들의 cross-coupling은 핵 내에서만 이루어지며 이로 인해 NF- κ B의 DNA 결합 반응이 증가된다. *C-fos*와 *c-jun* 모두 bZip 부위를 통해 NF- κ B5의 Rel homology 영역에서 물리적으로 작용할 수 있는데, 이는 이러한 물리적 상호작용이 기능적 상승작용의 분자적 기반으로 작용함을 암시한다³². 산화환원에 의해 조절되는 전사 요소들의 결합 부위는 AIDS, 암, 동맥경화, 당뇨병 합병증 등 여러 질병의 기전에 직접적으로 관여하는 광범위한 유전자들의 프로모터 부위에 위치한다³³.

Sp1도 역시 당뇨병 신증의 기전에 관여한다고 최근 알려졌다는데, 반응성 산소종에 의해 자극된 hexamine 경로에 의해 당화됨으로서 Sp1이 활성화된다³⁴. 당화된 Sp1은 PAI-1 유전자의 발현을 증가시키고, 이는 세포외 기질의 분해를 억제하여 세포외 기질의 축적을 야기시킴으로서 당뇨병 신증의 기전에 관여한다고 생각되어 지고 있다³⁵. Collagen (I, III, IV형), glycoproteins (fibronectin, laminin), 여러 proteoglycan 등 세포 외 기질을 형성하는 여러 물질들 중 collagen 유전자 프로모터의 전사는 주로 Sp1과 이에 부합되는 NF- κ B의 요소 간의 상호작용에 의해 조절된다³⁶.

고혈당에 의해 세포 내, 특히 PBMC 내 반응성 산소종이 자극되고 이로 인해 이들 전사인자들인 NF- κ B, AP-1, Sp1이 활성화됨으로서, TGF- β 와 세포 외 기질 유전자 및 단백질의 발현이 증가되어 신장 구조를 변화시킨다고 생각된다¹⁰. 신장 혈관사이세포의 확장은 당뇨병 신증의 특징적인 구조적 변화로서^{29,37} 고혈당 배지에서 배양한 혈관사이세포에서 세포외 기질에 대한 mRNA와 세포 외 기질의 합성의 증가가 관찰되었다고 보고된 바 있고^{29,37}, TGF- β 이 세포 외 기질의 축적에 가장 중요한 매개물질이라고 생각되어지고 있다^{7,30,38}. 본 연구에서는 당뇨병 신증 환자에서 PBMC 내 산화 스트레스, NF- κ B, AP-1, 그리고 Sp1의 활성화가 어떻게 변하고, 이들과 TGF- β 및 신증의 진단 기준으로 사용되는 요중 알부민 배설량이 어떠한 관계에 있는지에 대해 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 치료 받고 있는 제2형 당뇨병환자 중 66명(남자 28명, 여자 38명, 평균 나

이 51.6 ± 13.4세, 평균 당뇨 유병기간 133.6 ± 90.4개월과 이들과 연령, 성별을 맞춘 정상 대조군 49명 등 총 115명을 대상으로 하였다. 모든 대상자들에서 문진을 통해 나이, 당뇨병 유병기간, 고혈압 유무, 신체질량지수, 식사 습관, 흡연 여부 등에 대한 정보를 얻었고, 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, 24시간 소변 알부민 배설량을 측정하였으며 당뇨병 합병증에 대한 선별검사를 시행 하였다(Table 1).

혈액 채취는 10시간 이상의 공복 후 시행하였으며, 혈당은 autoanalyzer (Beckman, Fullerton, CA)를 이용한 glucose oxidase technique을 통해, 당화혈색소는 high performance liquid chromatography (HPLC) (Variant II, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다 정상 범위를 4.0~6.0%로 정의하였다. 총 콜레스테롤과 중성지방 수치는 autochemical analyzer (Hitachi 747, Nakashi, Japan)를 이용하여 enzymatic method (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)를 이용하여 측정하였고, HDL 콜레스테롤은 selective inhibition test (Daichii, Tokyo, Japan)를 통해, LDL 콜레스테롤은 Friedwald formula를 이용하여 계산하였다. 소변 내 알부민 배설량은 24시간 동안 모은 소변을 가지고 nephelometric method (BNA, Behring-Werke, Marburg, Germany)를 시행하여 분석 하였다.

24시간 소변 알부민 배설량을 기준으로 당뇨병 신증을 진단하였으며 24시간 알부민 뇨가 300 mg/day 이상인 경우 현성 알부민 뇨로 정의하였다. 당뇨병 망막증은 동공 확대 후 시행한 안저 검사를 통해 안과 전문의가 진단하였고, 신경병증은 진동감각역치를 측정하여 진단하였다. 당뇨병 대혈관 합병증은 임상적 소견과 도플러 초음파를 이용하여 진단하였다. 안지오텐신 전환효소 억제제, 안지오텐신 수용체 길항제, PPAR- γ activator, vitamin C, E, α -lipoic acid, 부신피질호르몬제 등 AP-1 및 NF- κ B의 활성화에 영향을 미

치는 약제를 복용하는 경우는 대상에서 제외하였다³⁹⁾. 그리고, 당뇨병환자들은 24시간 소변 알부민 배설양에 따라 현성 당뇨병 신증을 동반한 당뇨병환자와 신증이 없는 환자군으로 나누었다.

그리고 연령, 성별에 맞춘 정상 대조군 49명(남자 21명, 여자 28명, 평균 나이 49.4 ± 13.2세; Table 1)을 모집하여 다음 세 군으로 나누었다.

- (1) I군: 연령, 성별에 맞춘 정상 대조군
- (2) II군: 신증을 동반하지 않은 당뇨병환자군: 30 mg 이하의 24시간 소변 알부민 배설
- (3) III군: 현성 신증을 동반한 당뇨병환자군: 300 mg 이상의 24시간 소변 알부민 배설

2. 환자의 혈액으로부터 말초혈액 단핵구세포 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) 분리

채혈을 하자마자 Hofmann 등의 방법²⁸⁾으로 PBMC를 분리하였다. 채혈한 전혈에 항응고제인 3.8% sodium citrate (9:1; vol/vol)를 처리하여 Ficoll Paque Plus™ gradient (Pharmacia, Freiburg, Germany) 처리 과정을 거친 후 상온에서 500 × G로 30분간 원심 분리하여⁴⁰⁾ PBMC를 포함하고 있는 층을 흡입하고 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척 후 현미경으로 PBMC를 확인하고, 두 명의 검사자가 PBMC의 수를 측정하였다. 세포수를 1 × 10⁶ PBMC/mL로 보정하였고, PBMC를 혈청으로 코팅된 조직 배지의 흡착 여부에 따라 림프구와 단핵구로 분류하였다⁴¹⁾.

3. 산화 스트레스 및 PBMC 내 반응성 산소종의 활성화 측정

형광염료인 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of subjects

	Group I	Group II	Group III
N (Male: Female)	49 (21:28)	31 (15:16)	35 (13:22)
Age (year)	49.4 ± 13.2	54.5 ± 14.3	57.0 ± 12.9
BMI (kg/m ²)	25.1 ± 3.0	24.9 ± 6.4	25.3 ± 3.8
Systolic blood pressure (mmHg)	117.7 ± 18.5	127.6 ± 15.2	133.2 ± 17.5*
Diastolic blood pressure (mmHg)	83.5 ± 45.2	82.4 ± 7.6	83.3 ± 9.8
FPG (mg/dL)	107.1 ± 7.2	170.1 ± 10.6*	174.0 ± 17.7*
HbA1c (%)	6.1 ± 2.1	9.6 ± 3.2*	10.2 ± 2.8*
T.chol (mg/dL)	193.1 ± 37.3	187.9 ± 66.2	193.8 ± 67.6
TG (mg/dL)	128.3 ± 9.8	175.0 ± 31.6	150.1 ± 17.2
HDL-c (mg/dL)	49.8 ± 14.3	43.0 ± 18.4	46.4 ± 13.9
Duaration of diabetes (month)	0	121.4 ± 90.1*	145.8 ± 90.7*
24 hour UAE (mg/day)	5.9 ± 2.1	28.6 ± 7.9*	1593.4 ± 378.3**

* P < 0.05, compared to group I. † P < 0.05, compared to group II. Group I, Normal healthy control; Group II, Diabetic patients without nephropathy; Group III, Diabetic patients with nephropathy; BMI, Body mass index; FPG, Fasting plasma glucose; T. chol, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-c, HDL-cholesterol; UAE, urine albumin excretion.

dye (DCF-DA, 5 mmol/L; Molecular Probes, Eugene, Oregon)를 사용하여 PBMC 내 반응성 산소종의 활성도를 형광분광광도계(F-2000 Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다(excitation, 488 nm; emission, 515-540 nm). 이 때 기저치의 활성도는 물론 림프구를 세포 내 산화 스트레스의 protein kinase C (PKC) 활성화제인 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma Chemical Co., Deisenhofen, Germany) 100 nmol/L와 30분간 배양함으로써 산화 스트레스를 가한 후의 활성도와 15분간 100 μ mol/L H₂O₂와 배양하여 산화 스트레스를 자극시킨 후의 활성도를 각각 측정하였다.

4. NF- κ B 및 AP-1의 활성도 측정

Hofmann 등²⁸⁾의 방법으로 핵단백질을 분리하였다. 간단히 설명하면, 1 \times 10⁶개의 PBMC를 섭씨 4도의 400 mL의 완충액 A (10 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.9, at 4 $^{\circ}$ C, 1.5

mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, and 0.2 mmol/L PMSF)에서 용해한 후, 얼음에서 배양하고, 30 초 간 150,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액은 제거하고 세포질 분획을 얻은 후 완충액 B (20 mmol/L HEPES-KOH pH 7.9 at 4 $^{\circ}$ C, 25% glycerol, 1.5 mmol/L MgCl₂, 420 mmol/L NaCl, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PMSF)와 함께 섭씨 4도에서 20분 동안 보관한 후 위와 동일한 방법으로 2분간 원심분리 하였다. 남은 상층액은 핵단백질을 포함하게 되면 섭씨 80도에서 보관하였고, 단백질의 Bradford의 방법(Pierce, Ill.)⁴²⁾을 이용하여 정량화 하였다.

5. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

10 μ g의 핵단백을 사용하여 EMSA를 시행 하였으며, NF- κ B, AP-1 및 Sp1를 방사선 표지된 oligonucleotide들과 결합시키기 위해 실온에서 20분간 10 mmol/L HEPES, pH

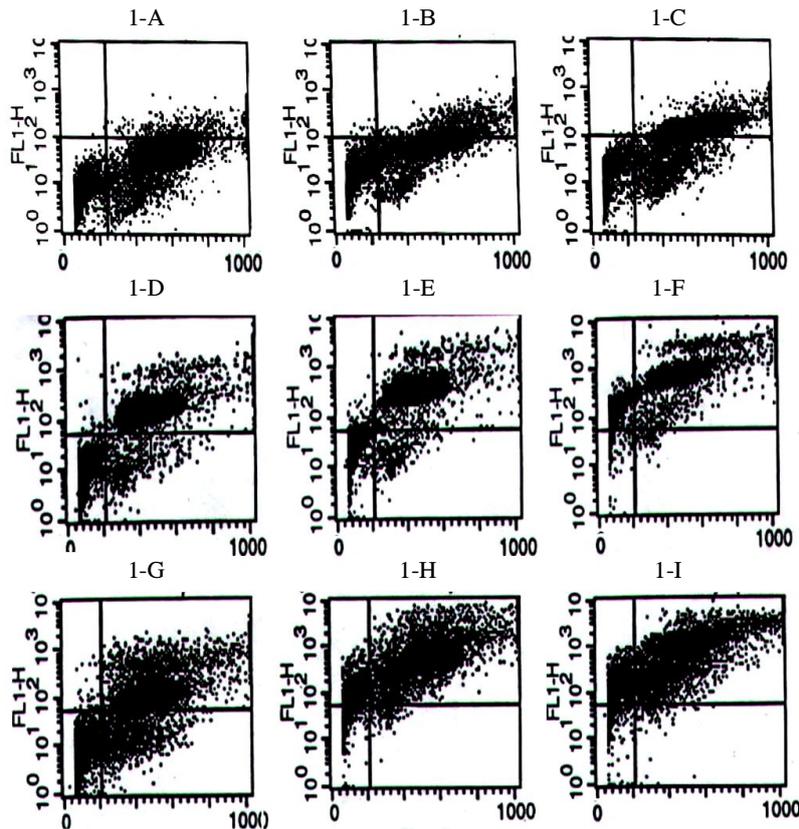


Fig. 1. Intracellular ROS in PBMC isolated from healthy control subject, diabetic patients without nephropathy, and patients with diabetic nephropathy. Fig. 1-A, spontaneous ROS level; 1-B, H₂O₂ stimulated ROS level; 1-C, PMA stimulated ROS level in Group I (normal healthy control group); 1-D, spontaneous ROS level; 1-E, H₂O₂ stimulated ROS level; 1-F, PMA stimulated ROS level in Group II (diabetic patients without nephropathy); 1-G, spontaneous ROS level; 1-H, H₂O₂ stimulated ROS level; 1-I, PMA stimulated ROS level in Group III (patients with diabetic nephropathy). Spontaneous, H₂O₂ and PMA-induced ROS production in ex vivo isolated peripheral blood mononuclear cells was measured spectrophotometrically using the fluorescent dye technique.

7.5, 0.5 mmol/L EDTA, 100 mmol/L KCl, 2 mmol/L DTT, 2% glycerol, 4% Ficoll, 0.25% NP-40, 1 mg/mL bovine serum albumin (BSA) 및 poly dI/dC로 이루어진 결합 배지에서 처리하였다^{28,42,43}. 단백질-DNA 복합체를 5% native polyacrylamide gel 및 0.5% Tris-vorac-EDTA (TBE)로 용해하였고, 겔을 진공 상체에서 건조시킨 후 섭씨 영하 80도에서 48에서 64시간 동안 Amersham Hyperfilms (Amersham, Braunschweig, Germany)에 노출 시켰다. 그리고 각각의 겔에서 밀도계측기(densitometry, Biorad)를 이용하여 남아 있는 NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 방사능대를 정량화하였다. NF- κ B의 oligonucleotides (5'-AGT TGA GGG GAG TTT CCC AGG C-3'), AP-1 (C-jun)의 oligonucleotides

(5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'), 그리고 Sp1의 oligonucleotides (5'-ATT CGA TCG GGG GGG GGG GAG C-3')는 Promega (Madison, WI)를 사용하였다.

6. TGF- β 단백질의 측정: ELISA

PBMC lysate와 소변에서 TGF- β 를 측정하기 위해 혈액과 소변을 30분간 실온에서 HCl (최종 농도 0.2 mol/L)로 처리하여 활성화 형태로 전환시킨 후 당량물(equimole) NaOH로 중성화시켰으며 TGF- β 의 정량화를 위해 TGF- β EmaxTM ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI)을 이용하여 quantitative sandwich enzyme immunoassay를 시행하였고, TGF- β EmaxTM ImmunoAssay System은 32

Table 2. Spontaneous and H₂O₂ -or PMA- stimulated ROS in PBMCs

	Group I	Group II	Group III
Spontaneous ROS production (%)	41.1 ± 2.4	60.0 ± 3.0*	60.7 ± 3.3*
Increment of H ₂ O ₂	9.1 ± 4.0	11.1 ± 2.0*	21.8 ± 2.2*
- induced ROS production (%)			
Increment of PMA	12.1 ± 3.0	21.6 ± 2.2*	23.5 ± 4.5*
- induced ROS production (%)			

* $P < 0.05$, compared to group I. † $P < 0.05$, compared to group II. Group I, Normal healthy control; Group II, Diabetic patients without nephropathy; Group III, Diabetic patients with nephropathy; ROS, reactive oxygen species; UAE, urine albumin excretion. These table show that there was significant increment in H₂O₂- and PMA- induced ROS levels in patients with nephropathy, versus those without nephropathy (21.8 ± 2.2 vs. 11.1 ± 2.0%, 23.5 ± 4.5 vs. 21.6 ± 2.2%, respectively, all $P < 0.05$).

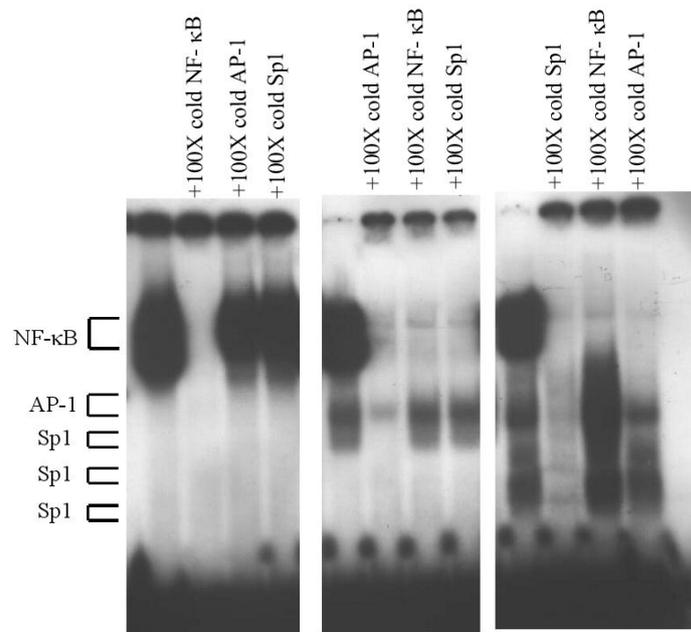


Fig. 2. The specificity of oligonucleotides for NF- κ B, AP-1 and Sp1. In order to evaluate the reliability of this study, we analyzed the specificity of oligonucleotide for NF- κ B, AP-1 and Sp1 by competition EMSA with labeled and unlabeled ("cold") oligonucleotides, respectively. The band formed from interaction between nuclear extract and labeled NF- κ B disappeared when "cold NF- κ B" was added, and the same effect was seen with AP-1 and Sp1, thus showing the specificity of oligonucleotides for NF- κ B, AP-1 and Sp1.

pg/mL TGF-β1까지 측정 가능하였다.

7. 통계적 분석

각 측정치는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 임상적, 생화학적 차이는 ANOVA 및 독립적 표본의 t-검정을 이용하였다. 변수들 간의 상관관계는 Pearson's correlation analysis를 사용하였다. 통계분석은 SAS와 SPSS for windows 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하였고, P값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의하다고 평가하였다.

결 과

1. 대상자들의 임상적, 생화학적 특징

본 연구에 참여한 세 군(I군: 정상 대조군, II군: 신증이 없는 당뇨병환자 III군: 현성 신증을 동반한 당뇨병환자) 간의 연령, 성별, 체질량 지수, 총 콜레스테롤, 중성 지방 및 HDL-콜레스테롤에서 차이가 없었다. 당뇨병환자군 사이에서도 공복 혈당, HbA1c와 당뇨병 유병 기간에 차이가 없었으나 현성 신증을 동반한 당뇨병환자군에서 수축기 혈압이 높았다(Table 1).

2. 임의의 및 H₂O₂와 PMA- 으로 자극시킨 PBMC 내 반응성 산소종 활성도의 차이

당뇨병 신증의 기전에 있어서 산화 스트레스의 역할을 알아보기 위하여 형광분석법을 이용하여 반응성 산소종의 활성도를 측정하였다(Fig. 1) (Table 2).

I군(M:F = 21:28, 평균 나이 = 49.4 ± 13.2), II군(M:F = 15:16, 평균 나이 = 54.5 ± 14.7) 및 III군(M:F = 13:22, 평균 나이 = 57.0 ± 11.9)의 반응성 산소종의 활성도를 비교한 결과, 임의의 반응성 산소종 활성도는 I군에서 II군과 III군에 비해 낮았고(41.1 ± 2.4 vs. 60.7 ± 3.3%, 41.1 ± 2.4 vs. 60.0 ± 3.0%, 순서대로, 모두 P < 0.05), H₂O₂와 PMA로 자극시킨 후의 활성도는 III군에서 I군과 II군에 비해 의미있게 높았다. 당뇨병환자들 사이에서 신증 유무에 따라 임상적, 생화학적 특징에 차이가 없고 임의의 반응성 산소종 활성도에도 차이가 없었으나, H₂O₂와 PMA로 자극 후 활성도는 신증을 동반한 군에서 의미있게 높았다(21.8 ± 2.2 vs. 11.1 ± 2.0%, 23.5 ± 4.5 vs. 21.6 ± 2.2%, 순서대로, P < 0.05).

Table 3. Inter-group comparisons of NF-κB, AP-1 and Sp1 in PBMC

	Group I	Group II	Group III
NF-κB	0.9999 ± 0.0843	1.0105 ± 0.1536	1.9043 ± 0.3020**
AP-1	1.0003 ± 0.1773	1.4392 ± 0.3087*	2.7906 ± 0.4824**
Sp1	1.0000 ± 0.1665	1.3881 ± 0.1892*	1.4521 ± 0.2052*

* P < 0.05, compared to group I. † P < 0.05, compared to group II. Group I, Normal healthy control; Group II, Diabetic patients without nephropathy; Group III, Diabetic patients with nephropathy; UAE, urine albumin excretion.

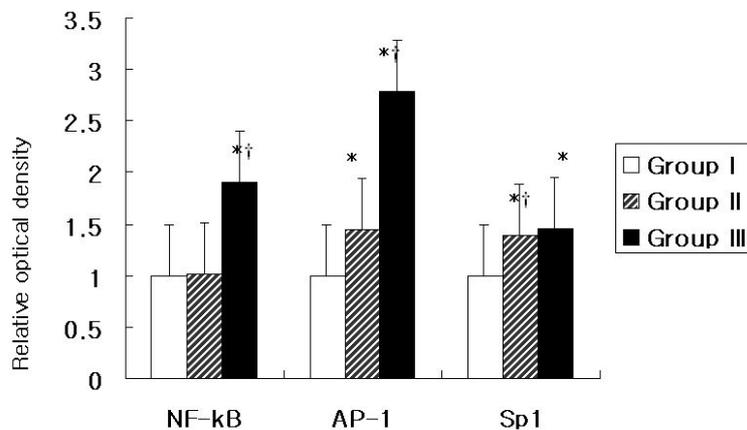


Fig. 3. The activities of NF-κB, AP1, and Sp1 in PBMC in different groups. Activities of transcription factors were quantified using EMSA and densitometry (Biorad). * P < 0.05, compared to group I, † P < 0.05, compared to group II. Group I, Normal healthy control; Group II, Diabetic patients without nephropathy; Group III, Diabetic patients with nephropathy; UAE, urine albumin excretion.

3. EMSA를 이용하여 측정된 NF- κ B, AP-1 및 Sp1 Oligonucleotides의 특이성(Competition 및 Supershift Assay)

본 연구의 신뢰성을 평가하기 위해 labeled 및 unlabeled oligonucleotides를 가지고 competition EMSA을 시행하여 NF- κ B, AP-1 및 Sp1 oligonucleotide의 특이성을 분석하였다. 각각의 전사인자에 대한 unlabeled oligonucleotide를 넣자 해당 전사인자의 band가 더 이상 관찰되지 않는 점을 미루어, 사용된 oligonucleotide가 각각 전사인자에 specific함을 알 수 있었다(Fig. 2).

NF- κ B의 supershift EMSA를 통해 산화 스트레스와 연관 있는 NF- κ B의 구성 요소를 조사한 결과 결과를 제시하지 않았으나, p65와 p60 이종이합체가 당뇨병 신증과 연관 있다는 것을 알 수 있었다.

4. 각 군 간의 PBMC 내 NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 활성화도

NF- κ B, AP-1 및 Sp1 등의 전사 인자들의 활성화도를

EMSA를 통해 측정된 결과, II군에서 I군 보다 높은 AP-1 활성화도(1.4392 \pm 0.3087 vs. 1.0003 \pm 0.1665, $P < 0.05$)와 높은 Sp1 활성화도(1.3881 \pm 0.1892 vs. 1.0000 \pm 0.1665, $P < 0.05$)가 관찰되었으나, 이 두 군 간에 NF- κ B의 활성화에는 차이가 없었다. 그러나 III군에서는 AP-1 (2.7906 \pm 0.4824 vs. 1.0003 \pm 0.1773, $P < 0.05$)과 Sp1의 활성화도(1.4521 \pm 0.2052 vs. 1.0000 \pm 0.1665, $P < 0.05$)뿐만 아니라, I군에 비해 NF- κ B 활성화도(1.9043 \pm 0.3020 vs. 0.9999 \pm 0.0843, $P < 0.05$)도 높게 측정되었다. 또한, III군에서 II군 보다 높은 NF- κ B와 AP-1의 활성화도가 관찰된 반면 Sp1 활성화도는 비슷하였다(Table 3) (Fig. 3).

5. 각 군 간의 PBMC 및 소변 내 TGF- β 1 단백질의 차이

PBMC 및 소변 내 TGF- β 1은 II군에 비해 III군에서 높게 측정되었다. PBMC 내 TGF- β 1 (ng/mg)을 정량화 하였을 때, III군에서 3.23 \pm 0.39, II군에서 1.99 \pm 0.68이었으며, 소변 내 TGF- β 1 (ng/mL)은 III군에서 16.88 \pm 6.84, II군에서 5.61 \pm 1.57이었다. I군과 II군 사이에서는 PBMC 및 소

Table 4. Inter-group comparisons of TGF- β 1 expression in PBMCs and urine

	Group I	Group II	Group III
PBMC-TGF- β 1 (ng/ μ g of cell protein)	1.6580 \pm 0.4808	1.9921 \pm 0.6785	3.2265 \pm 0.3901**
uTGF- β 1 (ng/mL)	6.5320 \pm 1.7489	5.6069 \pm 1.5696	16.8758 \pm 6.8399**

* $P < 0.05$, compared to group I. † $P < 0.05$, compared to group II. Group I, Normal healthy control; Group II, Diabetic patients without nephropathy; Group III, Diabetic patients with nephropathy; PBMC-TGF- β 1, TGF- β 1 in PBMC; uTGF- β 1, urinary TGF- β 1. The expression of TGF- β 1 in PBMCs and urine was higher in patients with diabetic nephropathy than in diabetic patients without nephropathy (3.2265 \pm 0.3901 vs. 1.9921 \pm 0.6785; 16.8758 \pm 6.8399 vs. 5.6069 \pm 1.5696, all $P < 0.05$), however, no difference was found in urinary or PBMC-TGF- β 1 between normal healthy control and diabetic patients without nephropathy.

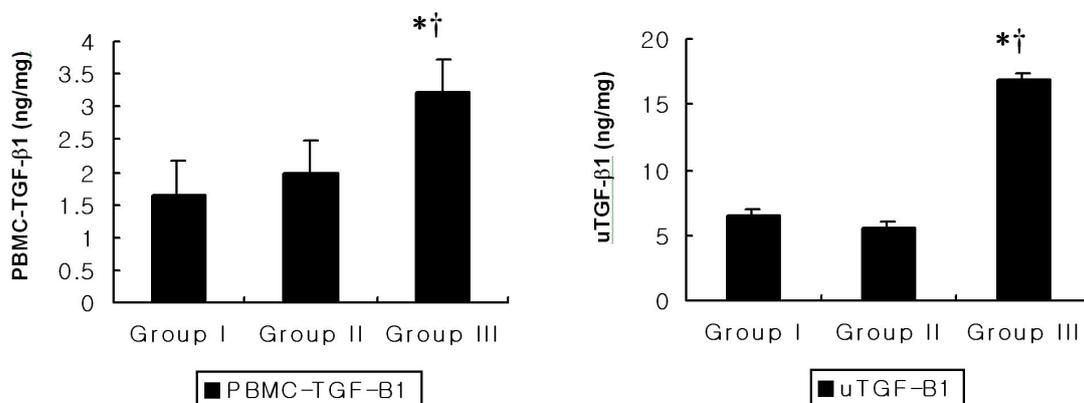


Fig. 4. The expressions of urinary and PBMC-TGF- β 1 in each group. TGF- β 1 was measured in PBMC lysate and in urine by quantitative sandwich enzyme immunoassay. * $P < 0.05$, compared to group I, † $P < 0.05$, compared to group II. Group I, Normal healthy control; Group II, Diabetic patients without nephropathy; Group III, Diabetic patients with nephropathy; PBMC-TGF- β 1, TGF- β 1 in PBMC; uTGF- β 1, urinary TGF- β 1. The expression of TGF- β 1 in PBMC and urine was significantly higher in patients with diabetic nephropathy than in diabetic patients without nephropathy.

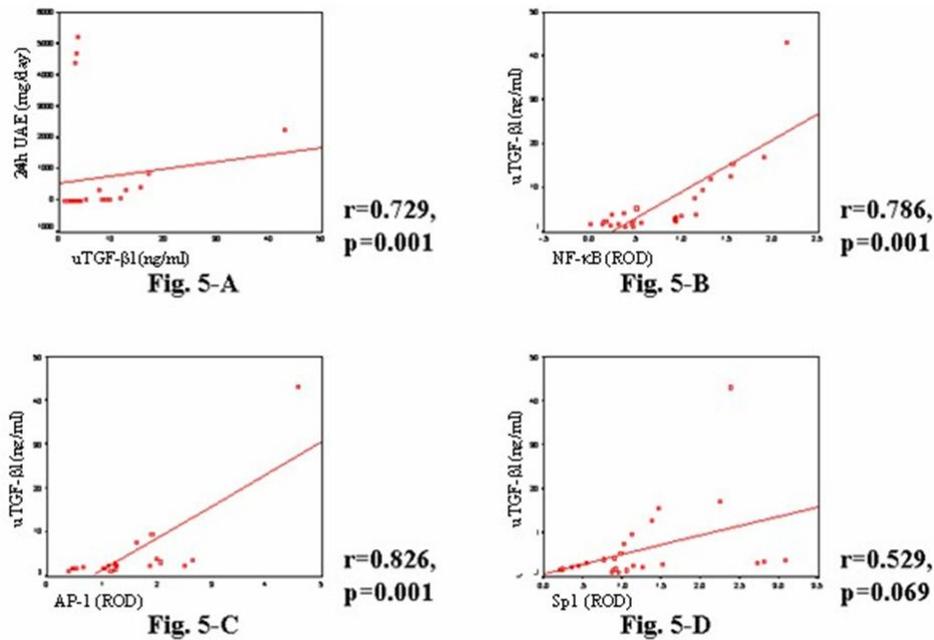


Fig. 5. Correlations between 24 h UAE and urinary TGF- β 1 (A), activity of NF- κ B and urinary TGF-1 β (B), activity of AP-1 and urinary TGF- β 1 (C), and activity of Sp1 and urinary TGF- β 1 (D). PBMC-TGF- β 1: TGF- β 1 in PBMC; uTGF- β 1: urinary TGF- β 1; ROD: Relative optical density. Urinary TGF- β 1 protein was significantly correlated with 24-hour albumin excretion ($r = 0.729$, $P = 0.001$). Moreover, the expression of TGF- β 1 was not found to be significantly correlated with the Sp1 activity, but was significantly correlated with NF- κ B and AP-1 activities ($r = 0.786$, $r = 0.826$, respectively, all $P < 0.001$).

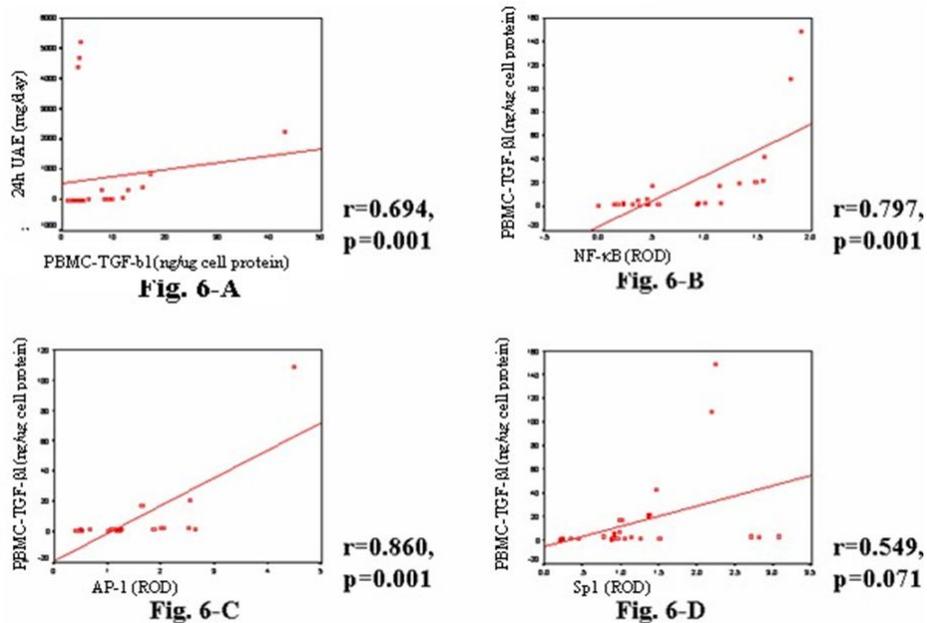


Fig. 6. Correlations between 24 h UAE and PBMC-TGF- β 1 (A), activity of NF- κ B and PBMC-TGF- β 1 (B), activity of AP-1 and PBMC-TGF- β 1 (C), and activity of Sp1 and PBMC-TGF- β 1 (D). PBMC-TGF- β 1: TGF- β 1 in PBMC; uTGF- β 1: urinary TGF- β 1; ROD: Relative optical density. TGF- β 1 protein in PBMC was found to be significantly correlated with 24-hour albumin excretion, NF- κ B, and AP-1 activities ($r = 0.694$, $r = 0.797$, $r = 0.860$, respectively, all $P = 0.001$), but was not correlated with Sp1 activity ($r = 0.549$, $P = 0.071$).

Table 5. Correlations between NF- κ B, AP-1, Sp1, 24 hour urinary albumin excretion and TGF-1 in PBMCs and urine

	uTGF-1	PBMC-TGF-1
24 hour UAE (mg/day)	r = 0.729*	r = 0.694*
NF- κ B	r = 0.786*	r = 0.797*
AP-1	r = 0.826*	r = 0.860*
Sp1	r = 0.529	r = 0.549
uTGF- β 1	r = 1.000*	r = 0.781*
PBMC-TGF- β 1	r = 0.781*	r = 1.000*

* $P < 0.05$. PBMC-TGF- β 1, TGF- β 1 in PBMC; uTGF- β 1, urinary TGF- β 1; UAE, urine albumin excretion.

변 내 TGF- β 1 양에 차이가 관찰되지 않았다(Table 4) (Fig. 4). 당뇨병 신증에서 TGF- β 1의 역할을 확인하기 위해 PBMC 및 소변 내 TGF- β 1의 발현도와 24시간 소변 알부민 배설량과의 관계를 알아 본 결과, PBMC 및 소변 내 TGF- β 1 양은 PBMC의 NF- κ B and AP-1 활성화도 및 24시간 소변 알부민 배설량과 의미있게 연관되었다. 그러나 PBMC 및 소변 내 TGF- β 1은 Sp1의 활성화도와는 연관성이 없었다(Fig. 5, 6). 또, PBMC 내 TGF- β 1은 소변 내 TGF- β 1과 유의한 관련성이 있었다(Table 5).

고 찰

당뇨병 신증은 고혈당, 인슐린저항성, 고혈압, 고지혈증, 응고 장애 등 다양한 대사 질환들 사이의 복잡한 상호작용을 통해 발병한다고 여겨지고 있으며, 최근 산화 스트레스에 의해 매개되는 여러 세포 내 신호전달 경로와 염증 반응들을 통해 기존의 위험 인자들이 신증을 일으킨다고 증명되었다. 당뇨병 신증을 예방하고 치료하고자 신증의 발병 기전에서 산화 스트레스의 역할에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 특히 당뇨병 신증의 발병에 있어서 백혈구의 역할이 중요하다는 보고들이 많이 있는데, 말초혈액 백혈구 중, 림프구와 단구 등의 단핵세포뿐 아니라 호중구 같은 다핵형 세포도 관여한다^{11,12}. Hofmann 등²⁷은, 혈당조절 상태가 동일한 신증을 동반한 당뇨병환자군과 동반하지 않은 환자군들의 PBMC에서 NF- κ B의 활성화도를 측정 한 결과, 신증이 있는 군에서 의미있게 증가되어 있었으며, 항산화제를 투여하자 NF- κ B의 활성화도가 감소하는 것을 관찰하였고, PBMC 내 NF- κ B의 활성화도가 소변 알부민 배설량, 즉 당뇨병 신증의 정도와 비례함을 보고하였다.

그러므로 본 연구의 목적은 PMBC에서 산화 스트레스, NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 활성화를 측정하고, TGF- β 1와 24시간 소변 알부민 배설량 간의 관계를 조사하며, NF- κ B, AP-1, Sp1 와 TGF- β 1 간의 관계에 대해 분석하여 궁극적으로 당뇨병 신증의 기전에서 산화 스트레스, NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 역할에 대해 알아보고자 하였다.

형광분석법으로 이용하여 측정 한 임의의 반응성 산소종 활성화 정도를 산화 스트레스의 지표라고 하였을 때, 이는

신증의 유무와 상관없이 당뇨병환자에서 정상인보다 높게 측정되었고(60.7 \pm 3.3 vs. 60.0 \pm 3.0 vs 41.4 \pm 2.4, III, II, I군 순서, $P < 0.05$), 신증을 동반한 당뇨병환자와 동반하지 않은 당뇨병환자 간에는 차이가 없었다. 그러나 H₂O₂와 PMA로 자극한 후의 반응성 산소종 스트레스 활성화도는 신증을 동반한 당뇨병환자에서 신증을 동반하지 않은 환자들과 정상인들에 비해 의미 있게 높이 측정되었다(H₂O₂로 자극 후 21.8 \pm 2.2 vs. 11.1 \pm 2.0, 9.1 \pm 4.0; PMA로 자극 후 23.5 \pm 4.5 vs. 21.6 \pm 2.2, 12.1 \pm 3.0, 모두 III, II, I군 순서, 모두 $P < 0.05$). 이는 비정상적인 산화환원 체계가 당뇨병 신증의 발생에 영향을 줄 수 있음을 의미한다. H₂O₂로 자극한 산화종 스트레스 수치가 높게 측정되는 것은 산화 스트레스에 대한 청소제 체계(scavenger system)의 이상이 당뇨병 신증의 하나의 병인으로서 작용할 가능성을 시사하고, PMA로 처리하였을 때 자극치의 유의한 차이는 PKC에 의해 활성화되는 신호전달체계가 당뇨병 신증의 병인으로 작용할 가능성을 시사한다고 생각된다⁴⁴). 또한, 이러한 결과들은 당뇨병 신증에서 관찰되는 림프구의 기능 이상이 증가된 활성화 산소종의 생성으로 인해 초래할 수 있음을 의미한다⁴⁵).

NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 활성화도를 측정하기 위해 EMSA를 사용하였으며, competition EMSA를 통하여 이 연구의 신뢰도를 확인하였다. 결과, 신증을 동반하지 않은 당뇨병환자에서 정상인 보다 AP-1 (1.4392 \pm 0.3087 vs. 1.0003 \pm 0.1773, $P < 0.05$)과 Sp1 (1.3881 \pm 0.1892 vs. 1.0000 \pm 0.1665, $P < 0.05$)의 활성화도가 높게 측정된 반면, NF- κ B의 활성화도에는 차이가 없었다. 그러나 신증을 동반한 당뇨병환자에서는 정상인에 비해 NF- κ B (1.9043 \pm 0.3020 vs. 0.9999 \pm 0.0843, $P < 0.05$), AP-1 (2.7906 \pm 0.4824 vs. 1.0003 \pm 0.1773, $P < 0.05$), 그리고 Sp1 (1.4521 \pm 0.2052 vs. 1.0000 \pm 0.1665, $P < 0.05$)의 활성화도가 높게 나타났다. 그리고 Sp1은 신증을 동반한 당뇨병환자와 동반하지 않은 환자에서 차이를 보이지 않았다.

그러므로 신증을 동반하지 않은 당뇨병환자에서의 증가된 활성화 산화종은 NF- κ B의 활성화도에는 영향을 주지 않고 AP-1과 Sp1의 활성화도에만 영향을 준다는 것을 알 수 있었고, 당뇨병 신증을 동반한 환자에서 동반하지 않은 환자들

에 비해 NF- κ B와 AP-1이 의미있게 증가함을 알 수 있었다, 당뇨병 신증의 발병에 있어서 여러 전사인자들의 역할에 대한 이전 연구들은 대개 고혈당 배지에 배양한 혈관사이세포 혹은 간세포를 가지고 이루어 졌는데, 정상군에 비해 고혈당에 노출된 세포에서 더 많은 NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 활성화가 측정되었다^{8-10,34,35,38,46-48}. PBMC에서 진행된 이전 연구 결과, 당뇨병 신증을 가진 환자에서 동일한 혈당조절 상태의 신증이 없는 당뇨병환자보다 NF- κ B의 활성도가 높게 나와 단순히 고혈당이 PBMC의 NF- κ B 활성도에 영향을 미치는 것이 아니라 신증의 여부에 따라 영향을 받는다는 것을 보여주었다²⁷. 또한, Weigert 등⁴⁹은 Sp1 결합 부위에 돌연변이를 일으켰을 때 정상 및 고혈당 배지에서 배양한 혈관사이세포에서의 TGF- β promoter 활성도는 감소하였지만, 고혈당으로 자극시킨 TGF- β promoter의 활성도에는 아무런 영향을 주지 못 하였다고 하였다. 따라서 본 연구 결과는 이전 연구 결과에 추가로, NF- κ B뿐 아니라 AP-1의 활성도도 당뇨병 신증 환자에서 의미있게 변화되며, Sp1은 고혈당과는 연관성이 있지만 자극된 활성화 산소종의 신호전달체계에 문제가 생기는 신증에서는 의미있는 역할을 하지 못 한다고 할 수 있겠다.

PBMC 및 소변 내 TGF- β 양은 정상인과 신증을 동반하지 않은 당뇨병환자들 사이에서는 차이가 없었지만, 신증을 동반한 당뇨병환자에서 신증이 없는 환자보다 높게 측정되었다(3.2265 ± 0.3901 vs 1.9921 ± 0.6785 ; 16.8758 ± 6.8399 vs 5.6069 ± 1.5696 , 모두 $P < 0.05$). 또, PBMC 내 TGF- β 은 소변 내 TGF- β 와 상관 관계를 이루었다.

Hill 등은⁵⁰ TGF- β 이 산화 스트레스와 연관이 있으며 당뇨병 신증의 발생에 중요한 인자라고 보고하였다. 또, TGF- β 이 NF- κ B 및 AP-1 활성화를 조절하며, 반대로 NF- κ B 및 AP-1이 TGF- β 에 의한 세포 외 기질 및 각종 chemokine 생성을 조절하는 역할을 한다는 보고들이 있다^{51,52}. 본 연구에서 PBMC 및 소변 내 TGF- β 이 24시간 UAE와 NF- κ B 및 AP-1과 연관성이 있음이 밝혀는데, Han 등⁵³에 의해 소변 내 UAE가 항 TGF- β 항체에 의해 감소한다고 보고한 바 있다. TGF- β 이 Sp1 활성화는 의미있는 상관관계를 이루지 않았는데, 앞서 당뇨병 신증 환자에서 NF- κ B 및 AP-1의 활성도가 의미있게 변하고 Sp1 활성도는 그렇지 않았던 것과 마찬가지로, Sp1은 당뇨병 신증의 중추 역할을 하는 TGF- β 에 의미 있는 영향을 미치지 못하기 때문이라고 생각된다.

따라서, 본 연구 결과, 세포 내 반응성 산소종의 생성과 PBMC 내 산화환원체계의 전사물질들 중 NF- κ B, AP-1의 활성화가 PBMC 및 소변 내 TGF- β 을 증가시키고, 이로 인해 당뇨병 신증이 발생한다고 할 수 있겠다.

요 약

연구배경: 본 연구는 당뇨병환자에서 세포 내 반응성 산소종 스트레스를 정량화 하고, PBMC 내 NF- κ B, AP-1 및 Sp1 등 산화환원반응에 관여하는 여러 전사인자의 활성도를 측정하여 산화 스트레스가 신손상에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 또 산화 스트레스와 연관 있다고 알려진 TGF- β 을 PBMC와 소변에서 측정하여 24시간 UAE와 앞의 전사인자들과 분석하여 당뇨병 신증에서 TGF- β 의 역할에 대해서도 알아보고자 하였다.

방법: 66명의 제2형 당뇨병환자와 연령, 성별에 맞춘 정상 대조군 49명을 24시간 소변 내 알부민 배설량에 따라 세 군으로 나누었다. Dichlorodifluorescein (DCF)와 형광분광광도계를 사용하여 세포 내 반응성 산소종의 활성도를 측정하였고, PBMC 내 NF- κ B, AP-1 및 Sp1의 활성도는 EMSA를 이용하여 측정하였으며, PBMC와 소변 내 TGF- β 는 quantitative sandwich enzyme immunoassay로 정량화하였다.

결과: 임의의 반응성 세포종은 당뇨병환자군(II군, III군)에서 정상군(I군)에 비해 높게 측정되었다(60.7 ± 3.3 vs. 60.0 ± 3.0 vs. 41.1 ± 2.4 , %, 순서대로, $P < 0.05$). H₂O₂와 PMA로 자극시킨 반응성 세포종은 III군에서 I군뿐 아니라 II군보다도 의미있게 높게 측정되었다(H₂O₂에 의해 자극된 후 증가율: 21.8 ± 2.2 vs. 9.1 ± 4.0 vs. 11.1 ± 2.0 , III, II, I군 순서; PMA에 의해 자극된 후 증가율이 23.5 ± 4.5 vs. 12.1 ± 3.0 vs. 21.6 ± 2.2 %, III, II, I군 순서). PBMC 내 Sp1을 제외하고 NF- κ B, AP-1은 III군에서 II에 비해 의미있게 증가하였다(2.53 vs. 2.0 vs. 1.43 배, NF- κ B, AP-1, Sp1 순서). 그리고 PBMC 및 소변 내 TGF- β 역시 III군에서 II에 비해 높게 측정되었고(PBMC에서 3.23 ± 0.39 vs. 1.99 ± 0.68 ng/mg; 소변에서 16.88 ± 6.84 vs. 5.61 ± 1.57 ng/mL, 순서대로), 이들은 NF- κ B 및 AP-1의 활성도와 24시간 UAE와 상관관계에 있었다.

결론: 세포 내 반응성 산소종의 생성과 PBMC 내 NF- κ B, AP-1의 활성도는 PBMC 및 소변 내 TGF- β 과 24시간 UAE와 밀접한 관련성이 있다. 그러므로 PBMC내에 증가된 산화 스트레스가 당뇨병환자의 신손상에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. The Diabetes Control and Complication 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 Eng J Med* 329:977-86, 1993
2. United Kingdom Prospective Diabetes Study 33: *Intensive blood glucose control with sulphonylurea and insulin compared with conventional treatment and the risk of complication in the patients with type 2 diabetes. Lancet* 352:837-53, 1998
 3. Baynes JW: *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes* 40:405-12, 1991
 4. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ: *Relationship between plasmameasures of oxidative stress and metabolic control in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetologia* 40:647-54, 1997
 5. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD: *Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. Mol Cell Biochem* 84:223-31, 1988
 6. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G: *Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? Metabolism* 44:363-8, 1995
 7. Rema M, Mohan V, Bhaskar A, Shanmugasundaram KR: *Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy? Indian J Ophthalmol* 43:17-21, 1995
 8. Ha H, Kim KH: *Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. Kidney Int* 51:S18-21, 1995
 9. Baynes JW: *Role of oxidative stress in development of complication of diabetes. Diabetes.* 40:405-12, 1991
 10. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H: *Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol* 14:S241-5, 2003
 11. Chung FM, Shin SJ, Tsai JC, Lee YJ, Chang DM: *Peripheral total and differential leukocyte count in diabetic nephropathy. Diabetes care* 28:1710-7, 2005
 12. Galkina E, Ley K: *Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol* 17:368-77, 2006
 13. Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, Belair MF, Michel O, Perdereau B, Bariety J, Bruneval P: *Early glomerular macrophage recruitment in streptozocin-induced diabetic rats. Diabetes* 49:466-75, 2000
 14. Takahashi T, Hato F, Yamane T, Inaba M, Okuno Y, Nishizawa Y, Kitagawa S: *Increased spontaneous adherence of neutrophils from type 2 diabetic patients with overt proteinuria: Possible role of the progression of diabetic nephropathy. Diabetes Care* 23:417-8, 2000
 15. Dhindsa S, Tripathy D, Mohanty P, Ghanim H, Syed T, Aljada A, Dandona P: *Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor-kappaB in mononuclear cells. Metab Clin Exp* 53:330-4, 2004
 16. Du X, Stockklauser-Farber K, Ames NB: *Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: Role of nitric oxide synthase? Free Rad Biol Med* 27:752-63, 1999
 17. Baeuerle PA, Baltimore D: *NF- κ B. ten years after. Cell* 87:13-20, 1996
 18. Pinkus R, Weiner R, Daniel V: *Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-B, and glutathione S-transferase gene expression. J Biol Chem* 271:13422-9, 1996
 19. Kim SJ, Angel P, Lavatis R, Hattori K, Kim YK, Sporn MB, Karin M, Roberts AB: *Autoinduction of transforming growth factor- β 1 is mediated by the AP-1 complex. Mol Cell Biol* 10:1492-7, 1990
 20. Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T: *NF- κ B and Sp1 regulates transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. J Immunol* 153:2052-63, 1994
 21. Baeuerle PA: *The inducible transcription factor NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. Biochim Biophys Acta* 1072: 63-80, 1991
 22. Baeuerle PA, Baltimore D: *I- κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. Science* 242:540-6, 1988
 23. Lenardo MJ, Baltimore D: *NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. Cell* 58:227-9, 1989
 24. Liao F, Andalibi A, DeBeer FC, Fogelman AM, Lusis AJ: *Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. J Clin Invest* 91:2572-9, 1993
 25. Baeuerle PA, Henkel T: *Function and activation of NF- κ B in immune system. Ann Rev Immunol* 12:141-79, 1994
 26. Robbesyn F, Salvayre R, Negre-Salvayre A: *Dual role of oxidized LDL on the NF-kappa B signaling*

- pathway. *Free Radic Res* 38:541-51, 2004
27. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Abdel Khalek AK, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP: *Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B*. *Diabetologia* 42(2):222-32, 1999
 28. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz MS, Joswig M, Lee V, Morcos M, Tritschler H, Ziegler R, Wahl P, Bierhaus A, Nawroth PP: *Insufficient glycaemic control increases NF- κ B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes*. *Diabetes Care* 21:1-7, 1998
 29. 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 transforming growth factor- β* *J Clin Invest* 93:536-42, 1994
 30. Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH: *A role of the latent TGF- β 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF- β 1*. *EMBO J* 10:1091-101, 1991
 31. Franza BR, Rauscher FJ, Josephs SF, Curran T: *The fos complex and fos-related antigens recognize elements that contain AP-1 binding sites*. *Science* 239:1150-3, 1988
 32. Stein B, Baldwin AS, Ballard DW, Greene WC, Angel P, Herrlich P: *Cross-coupling of the NF- κ B p65 and Fos/Jun transcription factor produces potentiated biological function*. *EMBO J* 12:3879-91, 1993
 33. Sen CK, Packer L: *Antioxidant and redox regulation of gene transcription*. *FASEB J* 10:709-20, 1996
 34. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M: *Hyperglycemia-Induced Mitochondrial Superoxide Overproduction Activates the Hexosamine Pathway and Induces PAI-1 and TGF- β Expression by Increasing Sp1 Glycosylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12222-6, 2000
 35. Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG: *Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells*. *Diabetes* 49:863-71, 2000
 36. Miller GA, Schettler V, Miller CA, Strutz F: *Prevention of progression of renal fibrosis: How far are we?* *Kidney International* 49(Suppl54):S75-82, 1996
 37. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN: *High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β* *Kidney Int* 42: 647-56, 1992
 38. Rocco M, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN: *Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule*. *Kidney Int* 41:107-14, 1992
 39. Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL: *PPAR alpha activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats*. *J Mol Cell Cardiol* 36:295-304, 2004
 40. Rothbarth HP, Hendriks-Sturkenboom I, Ploem J: *Identification of monocytes in suspension of mononuclear cells*. *Blood* 48:139-47, 1976
 41. Holschermann H, Durfeld F, Maus U, Bierhaus A, Heidinger K, Lohmeyer J, Nawroth PP, Tillmanns H, Haberbosch W: *Cyclosporine a inhibits tissue factor expression in monocytes/macrophages*. *Blood* 88:3837-45, 1996
 42. Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem* 72:248-54, 1976
 43. Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller M, Mackman N, Ziegler R, Nawroth PP: *The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF- κ B*. *Thromb Haemost* 77:772-82, 1997
 44. Niwa Y, Ozaki Y, Kanoh T, Akamatsu H, Kurisaka M: *Role of cytokines, tyrosine kinase and protein kinase C on production of superoxide and induction of scavenging enzymes in human leukocytes*. *Clin Immunopathol* 79:303-13, 1996
 45. Koya D, King GL: *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications*. *Diabetes* 47:859-66, 1998
 46. Ha H, Lee HB: *Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose*. *Kidney Int* 77: S19-25, 2000
 47. Ha H, Lee HB: *Reactive oxygen species amplify glucose signaling in renal cells cultured under high*

- glucose and in diabetic kidney. Nephrology 10:S7-10, 2005*
48. Iwasaki Y, Kambayashi M, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Hashimoto K: *High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro. J Diabetes Complicat 21:56-62, 2007*
49. Weigert C, Sauer U, Brodbeck K, Pfeiffer A, Haring HU, Schleicher ED: *AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF- β 1 promoter in mesangial cells. J Am Soc Nephrol 11:2007-16, 2000*
50. Hill C, Flyvbjerg A, Grnbk H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, Sheppard MC, Logan A: *The Renal Expression of Transforming Growth Factor- Isoforms and Their Receptors in Acute and Chronic Experimental Diabetes in Rats. Endocrinology 141(3):196-208, 2000*
51. Weier Q, Chen X, Holian J, Mreich E, Twigg S, Gilbert RE, Pollock CA: *Transforming growth factor- β 1 differentially mediates fibronectin and inflammatory cytokine expression in kidney tubular cells. Am J Physiol 291:F1070-7, 2006*
52. Chuang LY, Guh JY: *Extracellular signals and intracellular pathways in diabetic nephropathy. Nephrology 6:154-72, 2001*
53. Han DC, Ziyadeh FN: *Favorable treatment outcome with neutralizing anti-transforming growth factor- β antibodies in experimental diabetic kidney disease. Perit Dial Int 19:S234-7, 1999*