

고포도당으로 자극한
복막 중피세포에서 collagenase와
TIMP의 변화

연세대학교 대학원
의 과 학 과
김 진 주

고포도당으로 자극한
복막 중피세포에서 Collagenase와
TIMP의 변화

지도교수 강 신 옥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

김 진 주

김진주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

의 과 학 과

2005 년 12 월 일

감사의 글

여러모로 부족했던 제가 석사 학위과정을 무사히 마칠 수 있도록 도움을 주셨던 많은 분들께 이 지면을 빌어 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

우선, 실수를 하더라도 오히려 용기를 주시고, 실험의 모든 과정 뿐만 아니라 이 논문이 완성되기까지 세심한 지도를 아끼지 않으셨던 강신욱 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한, 바쁘신 와중에도 석사 학위논문을 지도해 주신 이재면 교수님과 윤수영 교수님께 감사 드립니다.

함께 실험하면서 굶은 일들을 대신 해주었던 승재 오빠와 동섭씨 모두 고마웠고, 열심히 실험 배우는 금희 언니 앞으로 즐거운 실험실 생활하시길 바랍니다. 생각만으로도 든든한 류동열 선생님, 유태현 선생님, 많은 배려를 해주시는 김주성 선생님, 최훈영 선생님, 항상 편하게 대해 주시는 이정은 선생님, 한승혁 선생님, 이상철 선생님 감사합니다.

박학다식에 위트까지 겸비한 정 많은 쟁 언니, 실험하면서 간과하기 쉬운 문제를 꼼꼼히 지적해 주었던 인숙 언니, 늘 안부를 물어주는 지현 언니, 항상 웃게 만드는 경선이와 진희 언니, 애교만점 정원 언니, 시원시원한 민정이와 숙인이를 비롯한 많은 실험실분들께 감사 드립니다.

후배라는 이유만으로 멀리서 그리고 가까이에서 힘이 되어 주고, 또 선배로서의 따끔한 충고를 아끼지 않았던 해주 언니와 은정 언니, 대학 때부터 지금까지 모든 고민을 함께 나누었던 다미 언니와 은혜, 이름 보다는 별명이 먼저 떠오르는 2% 오빠들, 한결 같은 친구 영미, 혜영이에게 고마운 마음을 전합니다.

고맙다는 인사가 오히려 어색한 나의 soul mate 성빈, 오랜 시간

을 함께 한 연금, 미라, 수빈, 선영, 민경이 힘들었던 순간에 많은 위로가 되어 주어서 정말 고마웠고 동시에 미안한 마음을 전하고 싶습니다.

함께 지내는 동안 다 큰 조카 아침 밥 챙겨주시라, 혹여 불편 할까봐 여러모로 많이 신경 써주셨던 외삼촌, 외숙모께 감사드립니다. 그리고 많은 웃음을 주었던 귀여운 준모, 건모 건강하고 앞으로 더 멋지게 자라렴~!!

마지막으로, 독립적이고 존재만으로도 든든한 사랑하는 동생 낙민이와 귀여운 막내 동생 진아 모두 마음속에 있는 꿈들을 이루었으면 좋겠고, 그 어떤 단어로도 형언할 수 없는 사랑과 헌신으로 지금의 저를 있게 해 주신 사랑하는 부모님께 이 작은 결실을 바칩니다.

지금 제 인생의 작은 씨앗 하나를 뿌렸다고 생각합니다. 앞으로 10년, 20년 후에도 열매를 맺기 위한 열정만은 식지 않았으면 좋겠습니다.

2005년 12월

진주 씬.

차 례

국문요약.....	1
I. 서론.....	5
II. 재료 및 방법.....	8
1. 복막 중피세포(human peritoneal mesothelial cell) 배양..	9
2. 세포 실험.....	10
3. RNA 추출 및 real time-PCR 분석.....	10
4. 단백질 추출 및 Western blot 분석.....	13
5. ELISA 분석	15
6. 통계 분석.....	15
III. 결과.....	17
1. 고포도당에 의한 제 1형, 제 3형 Collagen 단백질의 발현 변화.....	17
2. 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 MMPs mRNA 및 단백질 발현변화.....	18
3. 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 TIMPs mRNA 및 단백질 발현 변화.....	19
4. 복막 중피세포 배양액 내 MMPs 단백질과 활성도의 변화.....	21
5. 복막 중피세포 배양액 내 TIMPs 단백질의 변화.....	22
IV. 고찰.....	24
V. 결론.....	30
참고문헌.....	32
영문요약.....	40

그림 차례

Figure 1. Representative Western blot of type I and type III collagen in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (Cell lysates).....	17
Figure 2. MMP-1, MMP-8 and MMP-13 mRNA expression assessed by real time-PCR in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (cell lysates)	18
Figure 3. Representative Western blot of MMP-1, MMP-8, and MMP-13 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (Cell lysates).....	19
Figure 4. TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression assessed by real time - PCR in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (Cell lysates)	20
Figure 5. Representative Western blot of TIMP-1 and TIMP-2 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (Cell lysates).....	20
Figure 6. Representative Western blot of MMP-1, MMP-8 and MMP-13 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (Media).....	21
Figure 7. ELISA of MMP-1, MMP-8 and MMP-13 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG(Media)	22
Figure 8. Representative Western blot of TIMP-1 and TIMP-2 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (Media)..	23

표 차례

Table 1. Sequences of primers and sizes of final PCR products.	
.....	13

국문요약

고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 collagenase와 TIMP의 변화

지속성 외래 복막투석은 말기 신부전증 환자의 치료 방법으로 널리 이용되고 있으나, 장기간 시행하면 복막 섬유화로 인한 복막의 투과성 증가 및 한외여과부전으로 인하여 복막투석을 더 이상 시행하지 못하는 상태까지 이르게 되는 것이 큰 제한점이라고 할 수 있다. 복막 섬유화는 병리학적으로 중피세포의 탈락과 세포 외 기질의 축적이 특징적인 소견이다. 세포 외 기질의 축적은 기질의 합성과 분해의 불균형에 의하여 나타나는 현상으로, 당뇨병성 신병증을 대상으로 이에 대한 많은 연구가 있어 왔다. 또한, 복막 중피세포에서도 고포도당 조건 하에서 세포 외 기질의 합성 증가를 확인한 연구들은 종종 있지만, 복막 섬유화의 기전을 합성이 아닌 분해의 측면에서 규명한 연구는 극히 미미한 실정이다.

이에 본 연구자는 복막 중피세포에서 고포도당이 세포 외 기질의 분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 복막 섬유화에서 주로 축적되는 세포 외 기질인 제 1형 및 제 3형 collagen을 분해하는 것으로 알려져 있는 collagenases (MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13)와

tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs; TIMP-1과 TIMP-2)의 발현과 활성도를 측정하였다. 사람의 복막으로부터 분리한 복막 중피세포를 이용하여 정상 포도당 (5.6 mM 포도당), 정상 포도당+만니톨 (34.4 mM 만니톨), 그리고 고포도당 (40 mM 포도당) 배양액으로 72시간 동안 배양한 후 세포와 배양액을 수집하였다. Collagenases와 TIMPs의 mRNA 발현은 real time-PCR, 단백질 발현은 Western blot, 그리고 collagenases의 활성도는 ELISA로 측정하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 제 1형 collagen의 단백질 발현은 정상 포도당군에 비하여 고포도당군에서 1.4배 증가되었던 반면 ($P<0.05$), 고포도당에 의한 제 3형 collagen의 단백질 발현에는 의미있는 변화가 없었다.
2. MMP-1과 MMP-8의 mRNA 발현은 고포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 각각 2.10배, 2.03배 감소하였다($P<0.05$). 그러나 양군 사이에 MMP-13의 mRNA 발현에는 유의한 차이가 없었다.
3. 세포 배양액 내 collagenases (MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13)의 단백질 발현은 세포 배양액에서는 고포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 의미있게 감소되었다 (고포도당군 vs. 정상 포도당군: MMP-1, 32.6%; MMP-8, 21.3%; MMP-13, 23.8%)($P<0.05$). 그러나 양군 사이에 세포 용해액 내

collagenase의 단백 발현에는 유의한 차이가 없었다.

4. 복막 중피세포 배양액 내 MMP-1및 MMP-8의 그리고 MMP-13의 활성도는 고평도당균에서 각각 12.6 ± 0.3 pg/ml, 14.9 ± 0.93 pg/ml로 정상 포도당균의 36.0 ± 4.7 pg/ml, 31.3 ± 7.03 pg/ml에 비하여 의미있게 감소되어 있었다($P < 0.05$). 그러나 양군 사이에 MMP-13의 활성도는 각각 37.5 ± 0.43 pg/ml, 35.6 ± 0.52 pg/ml로 유의한 차이가 없었다.
5. TIMP-1과 TIMP-2의 mRNA 발현은 정상 포도당균에 비하여 고평도당균에서 각각 1.8배, 1.5배 증가되었다 ($P < 0.05$).
6. 세포 배양액 내 TIMP-1과 TIMP-2의 단백 발현은 고평도당균에서 정상 포도당균에 비하여 각각 1.7배, 1.6배 증가되었다 ($P < 0.05$). 그러나 양군 사이에 세포 용해액 내 TIMP-1과 TIMP-2의 단백 발현에는 의미있는 차이는 없었다.

이상의 실험 결과로 미루어, 복막 중피세포에서 고평도당에 의한 collagenases의 발현 감소와 TIMPs의 발현 증가로 인한 세포 외 기질의 분해 감소도 복막 섬유화의 병태생리에 일부 관여할 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 복막 섬유화, 고포도당, 복막 중피세포, collagenase,

TIMP

고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 collagenase와

TIMP의 변화

<지도교수 강 신 욱>

연세대학교 대학원 의과학과

김 진 주

I. 서론

지속성 외래 복막투석 (continuous ambulatory peritoneal dialysis, 이하 복막투석)은 1978년 Popovich 등¹에 의하여 처음 소개된 이후 신이식, 혈액투석과 함께 말기 신부전증의 치료로 널리 이용되고 있으나, 장기간 시행하면 복막 섬유화로 인한 복막의 투과성 증가 및 한외여과부전으로 인하여 복막투석을 더 이상 시행하지 못하는 상태까지 이르게 되는 것이 큰 제한점이라고 할 수 있다²⁻⁴. 이러한 복막 섬유화가 일어나는 원인으로는 반복적인 복막염⁵, 생체 부적합 투석액에의 반복적인 노출 등이 있으며^{6, 7}, 특히 고농도의 포도당 함유 투석액을 장기간 사용하는 경우 복막의 기능부전이 발

생활 가능성이 높은 것으로 알려져 있다⁸⁻¹¹.

정상적인 복막은 중피세포와 중피 하 결체조직층 (submesothelial connective tissue layer)으로 이루어져 있는데, 중피 하 결체조직층에는 collagen이 주를 이루면서 섬유아세포와 유리세포 (대식세포, 과립구 등)가 존재하며, 혈관과 임파관도 분포하고 있다¹². 정상 복막과 비교하여, 고농도의 포도당 용액으로 투석을 시행받은 백서의 복막은 혈관의 변형과 collagen 섬유증의 증가로 인하여 중피 하 조직의 확장이 동반되며^{13, 14}, 지속성 외래 복막투석을 시행받고 있는 사람의 복막에서도 이와 유사한 변화가 관찰되었다¹⁵.

세포 외 기질의 항상성은 합성과 분해의 균형에 의하여 이루어지게 되는데, 세포 외 기질의 합성 증가에 관여하는 대표적인 인자로는 TGF- β , 그리고 분해에 관여하는 대표적인 인자로는 matrix metalloproteinases (MMPs)와 MMPs의 내부 억제제 (endogenous inhibitor)인 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)가 있다^{16, 17}. 현재까지 세포 외 기질의 합성 및 분해에 관한 연구는 주로 당뇨병성 신병증 모델을 중심으로 이루어져 왔다. 세포 외 기질의 축적이 특징인 당뇨병성 신병증에서도 TGF- β 에 의한 기질의 합성 증가뿐만 아니라, MMPs와 TIMPs의 변화에 의한 기질의 분해 감소가 신병증의 발생 및 진행에 관여하는 것으로 보고되고 있다^{18, 19}. 당뇨병성 신병증의 경우에는 축적되는 세포 외 기질이 주로 제 4형

collagen이기 때문에, 제 4형 collagen의 분해에 관여하는 것으로 알려져 있는 MMP-2와 MMP-9, 그리고 TIMP-1과 TIMP-2의 변화를 관찰한 연구가 대부분이다¹⁹⁻²³. 복막 섬유화 역시 병리학적으로 세포 외 기질의 축적이 특징적인 소견으로, 병태생리학적으로 기질의 합성 증가가 관련이 있다는 보고는 종종 있어 왔다. 최근에는 기질의 분해 감소도 복막 섬유화에 관여할 것이라는 가정 하에 연구가 진행되어 MMP-2, MMP-9, 그리고 TIMP-1이 세포 외 기질의 축적에 관여한다는 보고가 있었다²⁴. 그러나 복막 중피세포의 경우, 여러 종류의 세포 외 기질 중에서도 제 1형과 제 3형 collagen을 주로 합성하는 것으로 알려져 있으며, 세균성 복막염과 유사한 병리학적 소견을 보이는 silica에 의한 화학성 복막염 (chemical peritonitis)에서도 제 1형과 제 3형 collagen이 주로 축적되었다는 보고가 있다²⁵. 제 1형과 제 3형 collagen의 분해에는 현재까지 주로 연구되어 온 MMP-2와 MMP-9과는 다른 collagenases (MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13)와 TIMPs (TIMP-1과 TIMP-2)가 관여하는 것으로 알려져 있음에도 불구하고²⁶, 복막 섬유화의 병태생리를 밝히기 위한 연구 중에서 이들의 변화를 관찰한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구자는 복막 중피세포를 고폠토도당 배양액으로 배양한 후 제 1형과 제 3형 collagen의 변화를 관찰하였으며, 제 1형과 제 3형 collagen의 분해와 관련이 있는 collagenases (MMP-1, MMP-8,

그리고 MMP-13)와 TIMPs (TIMP-1과 TIMP-2)의 변화를 연구함으로써 세포 외 기질의 합성 측면이 아닌 분해 측면에서 복막 섬유화의 병태생리를 재조명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 복막 중피세포 (human peritoneal mesothelial cell) 배양

복막 중피세포는 Stylianou 등²⁷의 방법을 이용하여 분리하였다. 간단히 기술하면, 외과적 개복 수술을 시행받은 환자로부터 서면 동의를 받은 후 수술실에서 채취한 장막 (약 5 X 5 cm 크기)으로부터 복막 중피세포를 분리하였다. 무균 인산-완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)를 이용하여 장막을 3회 세척한 후 37°C에서 0.05% trypsin-0.02% ethylenediaminetetraacetic acid 용액으로 20분간 처리하였다. 이후 장막 잔존물을 제거한 다음 4°C에서 1,200 rpm으로 10분간 원심분리한 후 침전물을 10% 우태아혈청, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 그리고 26 mM NaHCO₃ 함유 M-199 배양액으로 처리한 다음 100 mm 배양용기에 분주하여, 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다. 배양액은 분주 24시간 후에, 그리고 이후에는 3일마다 교환하였다. 복막 중피세포는 역상 위상차 현미경 하에서의 형태와 vimentin과 cytokeratin의 존재 및 desmin과 제 VIII 인자의 부재를 면역형광 현미경으로 확인함으로써 증명하였다. 모든 실험은 제 1 또는 제 2 계대배양 중피세포를 이용하여 시행하였다.

2. 세포 실험

복막 중피세포가 100 mm 배양 용기에 subconfluent 한 상태에서 고포도당 자극 실험을 시행하였다. 24시간 동안 0.5% 우태아혈청이 함유된 M-199 배양액을 처리한 후 정상 포도당 (5.6 mM, 정상포도당군) 과 고포도당 (40 mM, 고포도당군) 배양액으로 교체하였으며, 3일 후에 세포들을 sacrifice하여 실험에 이용하였다. 삼투압에 의한 효과를 배제하기 위하여 고포도당군과 동일한 삼투압이 되도록 34.4 mM mannitol을 첨가한 배양액을 이용한 실험도 병행하였다.

3. RNA 추출 및 real time-PCR을 이용한 mRNA 발현의 측정

정상 포도당 또는 고포도당으로 자극한 복막 중피세포로부터 총 RNA를 추출하기 위하여 100 mm 배양 용기에 800 μ l의 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 첨가한 후 실온에 5분간 보관하였다. 이후 160 μ l의 chloroform을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 실온에 3분간 보관한 다음, 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400 μ l의 isopropanol을 첨가하고 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리를 시행하였다. RNA 침전물은 70% ice-cold ethanol로 세척, SpeedVac (Savant, Farming-Dale, NY, USA)을 이용

하여 건조시킨 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 증류수로 희석하였다. 분리된 RNA 양과 순도는 spectrophotometry상 260 nm와 280 nm에서 측정된 optical density (O.D). 값을 이용하여 확인하였다.

cDNA는 cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 제작하였다. 세포로부터 분리한 총 RNA 중 2 μg 의 RNA에 10 μM random hexanucleotide primer, 1 mM dNTP, 8 mM MgCl_2 , 30 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.2 mM dithiothreitol, 25 U RNase inhibitor, 그리고 40 U AMV reverse transcriptase가 포함된 20 μl 혼합물을 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고 99°C에서 5분간 반응시켜 역전사 (reverse transcription) 과정을 종료하였다.

Collagenases와 TIMPs의 mRNA 발현은 real time-PCR을 이용하여 분석하였다. Primer는 Life Technologies (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제작하였으며, 각각의 PCR 산물은 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide가 함유된 2% agarose gel에서 전기영동하여 증폭된 유전자의 크기를 확인하였다.

Real time-PCR은 25 ng RNA에 해당하는 cDNA 5 μl , 10 μl 의 SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 그리고 각각 5 pmol의 sense와 antisense primer가 포함된 20 μl 반응 혼합물과 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied

Biosystems)을 이용하여 시행하였다. PCR 조건은 95℃에서 9분간 반응시킨 후, 94.5℃에서 45초, 60℃에서 45초, 그리고 72℃에서 1분간 반응시키는 과정을 35회 시행하였다. PCR을 시행한 후 온도를 60℃에서 95℃로 서서히 높여 melting curve를 구하였다. 모든 실험은 각 sample당 triplicate로 시행하였다. Comparative CT 방법을 이용하여 각각의 mRNA 양을 추정하였으며, GAPDH의 결과로 보정하였다. 정상 포도당균에서의 GAPDH와 collagenases mRNA 또는 GAPDH와 TIMPs mRNA 발현의 비를 1로 정의한 후, 만니톨균과 고폍도당균에서의 mRNA 발현을 상대적으로 비교하였다.

Table 1. Sequences of primers and sizes of PCR products

	Sequences (5' →3')	PCR size (bp)
MMP-1		
Sense	GGG AGA TCA TCG GGA CAA CTC	72
Antisense	GGG CCT GGT TCA AAA GCA T	
MMP-8		
Sense	GCC ATC CCT TCC AAC TGG TA	88
Antisense	AGC CCA GTA TTG GTT GCC TTT	
MMP-13		
Sense	TGT TGC TGC GCA TGA GTT C	61
Antisense	TGC TCC AGG GTC CTT GGA	
TIMP-1		
Sense	CTG TGG CTC CCT GGA ACA	67
Antisense	CCA ACA GTG TAG GTC TTG GTG AAG	
TIMP-2		
Sense	AAG AGT TGT TGA AAG TTG ACA AGC A	63
Antisense	CGG ACC GAC CGA TTG C	

4. Western blot을 이용한 단백질 발현의 측정

배양 용기의 세포들을 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [2% sodium dodecyl sulfate, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% (vol/vol) glycerol]를 이용하여 용해시킨 후, lysate를 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 다음 상층액을 취하였다. 추출된 단백질은 Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories)를 이용하여 농도를 결정한 후 각각 50 μ g씩 aliquot하여 보관하였다. 50 μ g의 단백질은 Laemmli sample buffer와 혼합한 후 100°C에서 5분간 가열한 다음,

SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel내 단백질은 semidry blotting 기계를 이용하여 Hybond-ECL membrane (Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL, USA)에 전이시켰으며, 실온에서 1시간 동안 blocking buffer A (1 X PBS, 0.1% Tween-20, and 8% nonfat milk)로 처치한 후, 하룻밤 동안 4°C에서 1:200~1:1,000으로 희석한 제 1형 collagen, 제 3형 collagen, MMP-1, MMP-8, MMP-13, TIMP-1 또는 TIMP-2에 대한 monoclonal 또는 polyclonal 항체 (Calbiochem, Darmstadt, Germany)와 반응시켰다. Membrane을 1 X PBS와 0.1% Tween-20로 15분간 1회, 5분간 2회 세척한 후, 1:1000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SantaCruz, CA, USA) 또는 horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)가 포함된 buffer A와 1시간 동안 반응시켰다. 최종적으로 membrane은 ECL chemiluminescent 용액 (Amersham Life Science, Inc.)을 이용하여 감광시켰으며, densitometer로 O.D.를 측정하였다.

MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13 단백질 발현은 세포 용해액 외에도 배양액을 이용한 실험도 병행하였다.

4. ELISA 분석

배양액 내 MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13의 활성도는 ELISA kit (R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 간단히 기술하면, 각 kit에서 제공한 standard collagenase (MMP-1, MMP-8, 또는 MMP-13)와 동결건조 과정을 통하여 농축한 배양액을 각각 150 μ l씩 96-well multiplate에 넣고 상온에서 3시간 동안 반응시킨 후, 300 μ l의 세척 완충액으로 4회 세척한 다음 standard에는 200 μ l의 p-aminophenylmercuric acetate (APMA)를, 그리고 실험 배양액에는 diluent를 첨가한 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 300 μ l의 세척 완충액으로 4회 세척한 다음 quenched fluorogenic substrate 200 μ l를 첨가하고, 37°C에서 빛이 차단된 조건 하에 18시간 동안 반응시킨 후 luminescence spectrometry상 320 nm (excitation wavelength)와 405 nm (emission wavelength)에서 측정된 O.D 값을 이용하여 판독 하였다.

5. 통계 분석

모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 11.0 판 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다. 각 군간의 비교에는 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 이용하였으며, Kruskal-Wallis 검정상

통계학적 의의가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. P 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 의미있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 고포도당에 의한 제 1형과 제 3형 collagen 단백질 발현 변화

제 1형 collagen의 단백질 발현은 정상 포도당군에 비하여 고포도당군에서 유의하게 증가된 반면에, 고포도당에 의한 제 3형 collagen의 단백질 발현에는 의미있는 변화가 없었다 (Fig. 1).

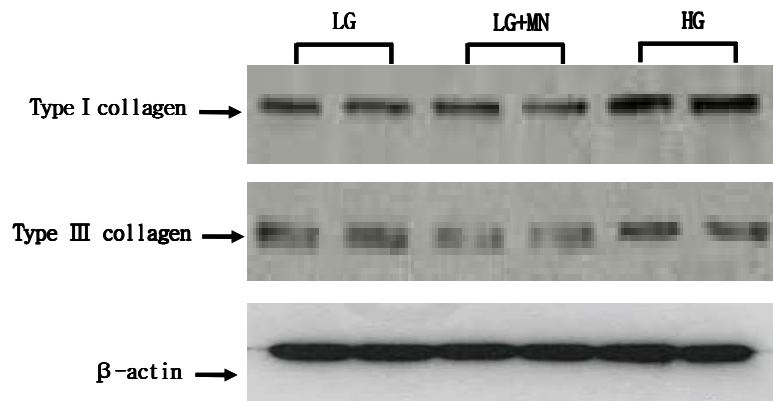


Figure 1. Representative Western blot of type I collagen and type III collagen in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (cell lysates).

2. 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 collagenases mRNA 및 단백질의 발현 변화

정상 포도당군, 만니톨군, 그리고 고포도당군사이에서 GAPDH mRNA로 보정한 MMP-1과 MMP-8 mRNA의 발현은 정상 포도당군에 비하여 고포도당군에서 각각 55%와 51% 감소되었다 ($P < 0.05$). 이에 반해 만니톨군과 정상 포도당군 사이에 MMP-1과 MMP-8의 mRNA 발현에는 유의한 차이가 없었다. 또한 MMP-13 mRNA의 발현은 세 군간에 의미있는 차이가 없었다 (Fig. 2).

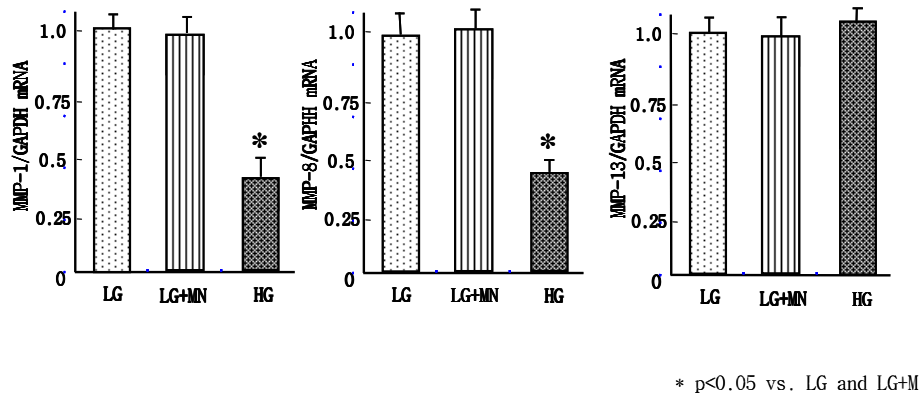


Figure 2. MMP-1, MMP-8 and MMP-13 mRNA expression assessed by real time-PCR in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (cell lysates).

정상 포도당군, 만니톨군, 그리고 고포도당군사이에 세포 용해액 내 collagenases (MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13) 단백질의 발현에는

의미있는 차이가 없었다 (Fig. 3).

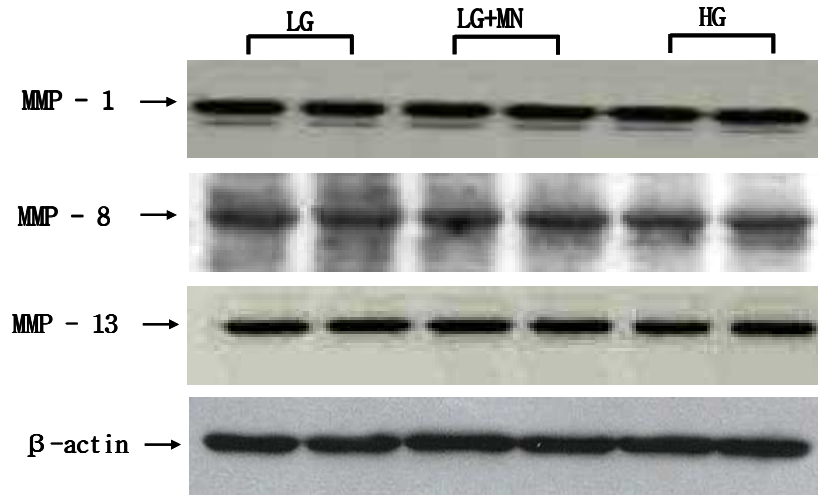
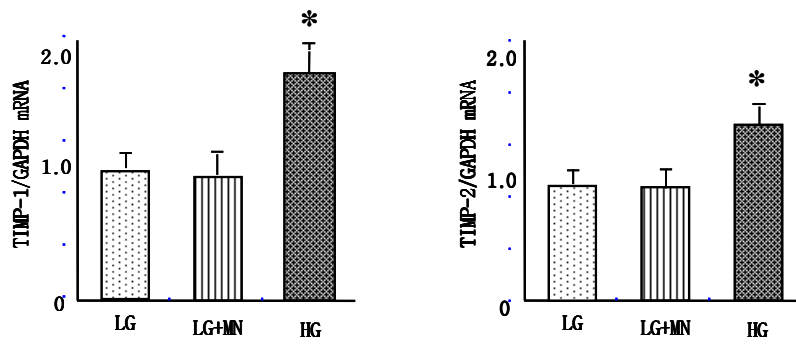


Figure 3. Representative Western blot of MMP-1, MMP-8, and MMP-13 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (cell lysates).

3. 고평도당으로 자극한 복막 중피세포에서 TIMPs mRNA 및 단백질 발현 변화

GAPDH mRNA로 보정한 TIMP-1과 TIMP-2 mRNA의 발현은 정상 포도당군에 비하여 고평도당군에서 각각 1.78와 1.50배 증가되었다 ($P < 0.05$). 이에 반해 만니톨군과 정상 포도당군 사이에 TIMP-1과 TIMP-2의 mRNA 발현에는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 4).

mRNA의 발현과는 달리 고평도당이나 만니톨이 복막 중피세포에서 TIMP-1이나 TIMP-2의 단백질 발현에는 영향을 주지는 않았다 (Fig. 5).



* $p < 0.05$ vs. LG and LG+M

Figure 4. TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression assessed by real time-PCR in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (cell lysates).

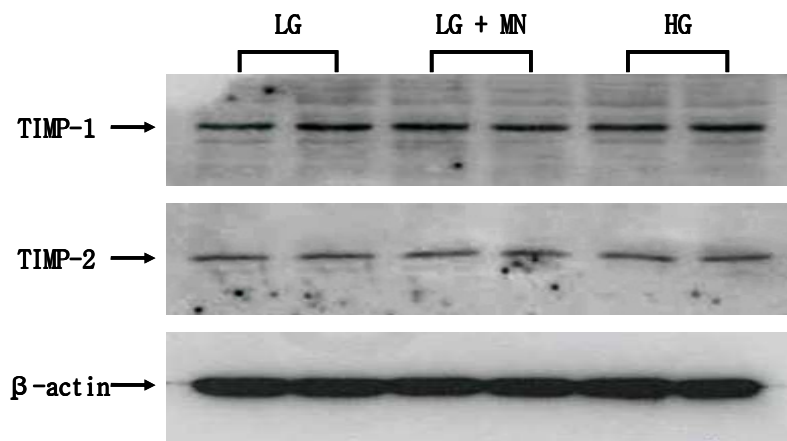


Figure 5. Representative Western blot of TIMP-1 and TIMP-2 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (cell lysates).

4. 복막 중피세포 배양액 내 collagenases 단백질과 활성도의 변화

복막 중피세포 배양액 내 MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13의 단백질 발현은 고폠포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 의미있게 감소되었다 ($P < 0.01$) (Fig. 6).

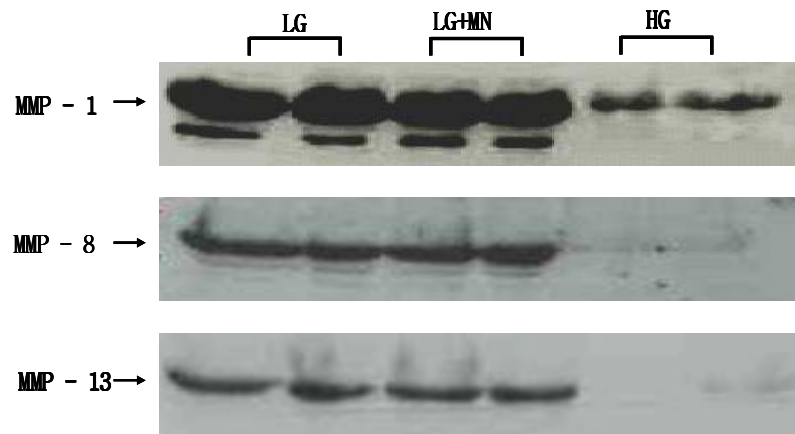


Figure 6. Representative Western blot of MMP-1, MMP-8, and MMP-13 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (media).

또한, 복막 중피세포 배양액 내 MMP-1과 MMP-8의 활성도는 고포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 유의하게 감소되었다. 활성 MMP-1의 농도는 정상 포도당군 36.0 ± 4.7 pg/ml, 고포도당군 12.6 ± 0.3 pg/ml ($P < 0.01$)이었으며, MMP-8은 각각 31.3 ± 7.03 pg/ml, 14.9 ± 0.93 pg/ml ($P < 0.04$)로 고포도당군에서 MMP-1과 MMP-8의 활성도는 의미있게 감소되었다. 그러나 MMP-13의 활성도는 각각 37.5 ± 0.43

pg/ml, 35.6 ± 0.52 pg/ml로 양군 사이에 의미있는 차이는 없었다 (Fig. 7).

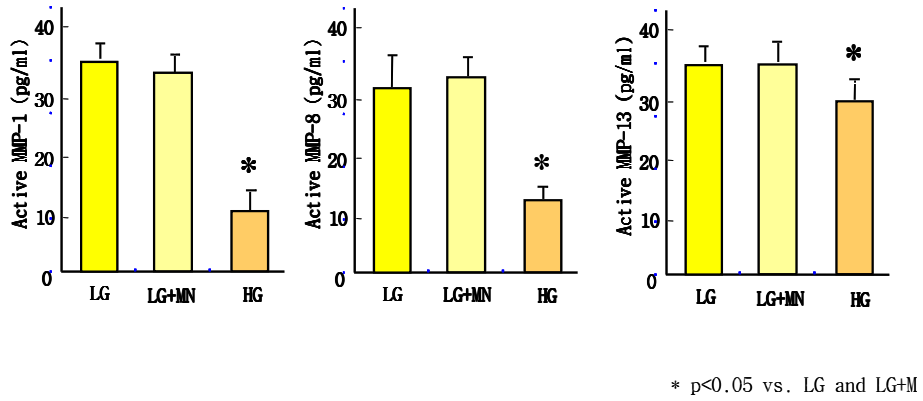


Figure 7. ELISA of MMP-1, MMP-8, and MMP-13 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (media).

5. 복막 중피세포 배양액 내 TIMPs 단백질의 변화

세포 용해액 결과와는 달리 배양액 내 TIMP-1과 TIMP-2의 단백질 발현은 고평도당균에서 정상 포도당균에 비하여 각각 1.7배와 1.6배 증가되었다 ($P < 0.05$)(Fig. 8).

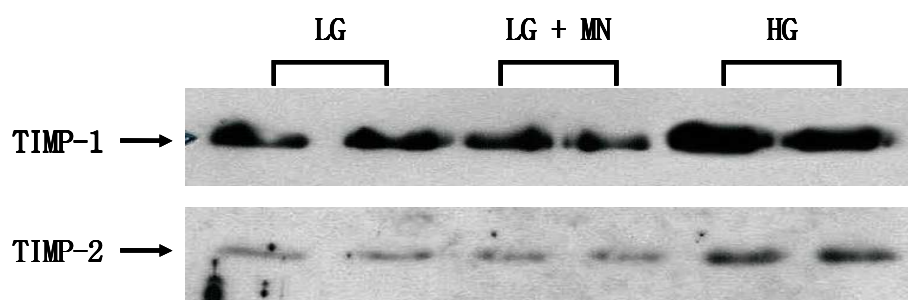


Figure 8. Representative Western blot of TIMP-1 and TIMP-2 in cultured HPMC exposed to LG, LG+MN, and HG (media).

IV. 고찰

복막 섬유화는 장기간 복막투석을 시행받고 있는 말기 신부전증 환자에서 발생하는 심각한 합병증 중 하나로, 복막의 기능부전을 야기시켜 더 이상 복막투석을 시행하지 못하는 상태까지 이르게 한다. 복막 섬유화는 병리학적으로는 복막 중피세포의 탈락으로 인한 중피세포 수의 감소와 더불어 세포 외 기질의 축적이 특징적인 소견인데, 이러한 섬유화가 발생하는 병태생리학적 기전은 아직까지 명확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 정상 상태의 복막에서는 세포 외 기질의 합성과 분해의 균형에 의하여 기질의 축적이 일어나지 않지만, 일부 병적인 상태에서는 합성과 분해의 불균형에 의하여 세포 외 기질이 축적되는 것으로 보고되고 있다.

세포 외 기질의 축적에 대한 병태생리학적 기전을 규명하기 위한 수 많은 연구들 가운데 가장 대표적인 것은 당뇨병성 신병증 모델을 대상으로 한 연구이다. 당뇨병성 신병증도 사구체 내 세포 외 기질의 축적이 특징적인 병리학적 소견으로, 과거에는 주로 고혈당이나 TGF- β 에 의한 세포 외 기질의 합성 증가가 병인으로 이야기되어져 왔으나 최근에는 단백 분해 효소의 생성 감소도 관련이 있다는 연구 결과들이 종종 보고되고 있다^{18, 28}. Streptozotocin으로 당뇨가 유발된 백서를 대상으로 당뇨 유발 6개월 후 적출한 신장에서

MMP-2와 MMP-9의 활성도는 감소된 반면에 TIMP mRNA의 발현은 증가되었다는 보고가 있으며²⁸, 제 2형 당뇨 환자로부터 채취한 신생검 조직의 사구체를 이용하여 RT-PCR을 시행한 결과 MMP-2 mRNA의 발현이 대조군 사구체에 비하여 유의하게 감소되어 있었다는 보고도 있다²⁹. 생체 외 실험상으로도 고포도당으로 자극한 메산지움 세포와 사구체 상피 세포에서 MMP-2의 발현은 감소되는 반면에 TIMP-2의 발현은 오히려 증가되어 세포 외 기질의 축적이 일어난다고 알려져 있다²⁹.

고포도당 투석액을 사용하는 복막투석 환자에서 발생하는 복막 섬유화도 당뇨병성 신병증과 유사하게 세포 외 기질의 축적이 특징적인 소견이기 때문에 병태생리를 당뇨병성 신병증과 유사하게 기질의 합성 증가 측면과 기질의 분해 감소 측면에서 연구하게 된다. 복막 중피세포에서 고포도당은 protein kinase C나 p38 mitogen-activated protein kinase 경로의 활성화를 통하여 세포 외 기질의 합성 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다^{30, 31}. 복막 중피세포 역시 MMP-2, MMP-3, 그리고 MMP-9를 분비하며 동시에 TIMP-1, TIMP-2, 그리고 TIMP-3도 합성하는 것으로 알려져 있기 때문에 세포 외 기질의 분해 감소가 복막 섬유화와 관련이 있을 것으로 생각되나 이에 대한 연구는 아직까지 미미한 실정이다²⁴. Hirahara 등은 chlorhexidine gluconate을 백서의 복강내로 주입하여 손상이

유발된 복막을 이용하여 in situ film zymography를 시행한 결과, 대조군에 비하여 chlorhexidine을 투여받은 백서의 복막 조직 내 MMP-2 활성도가 의미있게 증가되어 있었다고 보고하였다. 그러나 그들은 zymography를 이용한 MMP-2 활성도가 복막 중피 배양 세포에서는 관찰되지 않았다고 하였다³². 이 외에도 복막 중피세포에서 고삼투압 자극에 의하여 MMP-9 단백 발현과 활성도가 감소되었다는 보고가 있으며, 복막염이 동반된 복막투석 환자에서 투석액 내 MMP-9과 TIMP-1의 활성도가 증가되어 있는 것으로 미루어 보아 MMP-9과 TIMP-1이 복막염에 의한 복막의 세포 외 기질의 재구성과 관련이 있다는 연구 결과도 있다³³.

MMPs는 아연-의존형 endopeptidases로 세포 외 기질의 분해 및 재구성에 관여하며, 기질 특이성에 따라 여섯 군으로 분류된다 : (1) Collagenase (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18); (2) Gelatinases (MMP-2, MMP-9); (3) Stromelysins (MMP-3, MMP-10, MMP-11); (4) Matrilysins (MMP-7, MMP-26); (5) Membrane type MMPs (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4, MT-5-MMPs); (6) 기타 MMPs (MMP-12, MMP-19, MMP-22)³⁴. 당뇨병성 신병증의 경우에는 사구체내 축적되는 세포 외 기질이 주로 제 4형 collagen이기 때문에 제 4형 collagen 분해에 관여하는 MMP-2와 MMP-9를 대상으로 연구를 해 왔다는 것이 적절하다고

생각되지만³⁵, 복막 중피세포가 주로 생성하고, 복막 섬유화 조직에서 주로 관찰되는 세포 외 기질이 제 1형과 제 3형 collagen이라는 사실을 감안하면^{36, 37}, 복막 섬유화의 병태생리를 규명하는데 있어 MMP-2와 MMP-9의 변화를 연구 주제로 하였다는 것은 타당하지 않았다고 생각된다. 이러한 이유에서 본 연구자는 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 제 1형과 제 3형 collagen의 분해에 관여하는 것으로 알려져 있는 collagenase의 변화에 대한 연구를 시행한 결과, 고포도당에 의하여 복막 중피 배양세포에서 collagenase계 MMPs 중 MMP-1과 MMP-8의 mRNA, 단백 발현과 배양액 내 collagenase계 MMPs의 활성도가 감소되었으며, 이러한 감소가 세포 외 기질의 축적과 관련이 있을 것으로 생각된다.

Collagenase계 MMPs는 주로 종양의 전이, 구강 질환, 관절염 등의 병태생리에 관여하는 것으로 알려져 있으며^{16, 38}, 최근에는 본 연구와 유사한 복막 섬유화에서 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)과 collagenase의 역할에 대한 연구 결과가 발표되었다. Higuchi 등³⁹은 복막 중피세포와 섬유아세포를 대상으로 고포도당이 PAI-1, MMP-13, 그리고 TIMP-1의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 섬유아세포에서는 MMP-13 mRNA의 발현이 증가되었으나 복막 중피세포에서는 유의한 변화가 없었다고 하였다. 또한 그들은 복막 중피세포에서 고포도당에 의하여 제 1형과 제 3형

collagen mRNA의 발현이 오히려 감소되었다고 보고하였다³⁹. 이는 고포도당에 의하여 제 1형과 제 3형 collagen 단백질의 발현이 증가된 본 연구 결과나 고포도당에 의한 제 1형 collagen mRNA의 발현 증가를 관찰한 Morgera등의 연구와는 상반된 결과로⁴⁰, 이는 실험에 사용한 배양액 내 포도당 농도, 자극 시간, 그리고 중피세포의 종류 (사람 vs. 백서) 등의 차이에 기인할 것으로 생각된다.

MMPs 유전자는 여러 성장 인자나 염증성 사이토카인에 의하여 발현이 증가되는 것으로 보고되고 있다. 당뇨병성 신병증 모델에서는 고포도당이 protein kinase C 경로나 TGF- β 를 통하여 MMP 유전자 발현을 조절한다고 알려져 있으며^{30, 41, 42}, 안지오텐신-전환 효소 억제제나 안지오텐신 수용체 차단제에 의하여 고혈당이나 고포도당에 의한 MMPs의 변화가 억제되었다는 실험 결과들로 미루어 보아 안지오텐신도 MMPs의 발현에 관여할 것으로 여겨지고 있다^{21, 43}. 당뇨병성 신병증 모델과 유사하게 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서도 protein kinase C 경로의 활성화, TGF- β 의 발현 증가, 그리고 안지오텐신 II의 합성 증가가 관찰되기 때문에 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서도 MMPs의 발현 변화가 이들 인자에 의하여 조절될 것으로 생각되나 이를 증명하기 위해서는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

세포 내에서 합성된 MMPs는 잠재 (latent) 상태로 분비된 후 단

백 분해효소(proteinase)나 plasmin과 같은 물질에 의하여 활성화되며, TIMPs에 의하여 작용이 억제된다. Plasmin은 불활성 상태의 plasminogen으로부터 전환되는데, 이 과정에 PAI-1과 PAI-2가 관여하는 것으로 되어있다⁴⁴. 당뇨 조건 하에서 시행한 기존의 실험 결과들을 보면 PAI-1의 발현 증가에 의한 plasmin의 생성 감소로 인하여 MMPs의 활성화가 억제될 뿐만 아니라 TIMPs의 발현 증가에 의하여 MMPs의 작용이 억제되는 것으로 보고되고 있다⁴⁵⁻⁴⁹. Higuchi 등³⁹은 고포도당으로 자극한 복막 중피세포에서 PAI-1과 TIMP-1 mRNA의 발현에 변화가 없었다고 하여 본 연구 결과와는 차이가 있었는데, 이러한 차이는 전술한 바와 같이 실험 대상과 실험 조건의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

결론적으로 복막투석을 시행받고 있는 환자에서 발생하는 합병증 중 하나인 복막 섬유화의 병태생리에 일부 collagenase의 발현 감소와 TIMPs의 발현 증가로 인한 collagen의 분해 감소가 일부 관여할 것으로 생각된다. 향후 본 연구의 결과를 복막 섬유화 예방을 위한 약제의 적용과 새로운 투석액의 개발을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

고포도당 조건 하에서 72시간 동안 배양한 복막 중피세포에서 제 1형 collagen과 제 3형 collagen, collagenases (MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13), 그리고 TIMPs (TIMP-1 and TIMP-2)의 발현과 활성도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 제 1형 collagen의 단백질 발현은 정상 포도당군에 비하여 고포도당군에서 1.4배 증가되었던 반면 ($P < 0.05$), 고포도당에 의한 제 3형 collagen의 단백질 발현에는 의미있는 변화가 없었다.
2. MMP-1과 MMP-8의 mRNA 발현은 고포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 각각 55%, 51% 감소하였다 ($P < 0.05$). 그러나 양군 사이에 MMP-13 mRNA의 발현에는 유의한 차이가 없었다.
3. 세포 배양액 내 collagenases (MMP-1, MMP-8, 그리고 MMP-13)의 단백질 발현은 고포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 의미있게 감소되었다 (고포도당군 vs. 정상 포도당군: MMP-1, 32.6%; MMP-8, 21.3%; MMP-13, 23.8%) ($P < 0.05$). 그러나 양군 사이에 세포 용해액 내 collagenase의 단백질 발현에는 유의한 차이가 없었다.
4. 복막 중피세포 배양액 내 MMP-1, MMP-8의 활성도는 고포도당

군에서 각각 12.6 ± 0.3 pg/ml, 14.9 ± 0.93 pg/ml로 정상 포도당균의 36.0 ± 4.7 pg/ml, 31.3 ± 7.03 pg/ml 에 비하여 의미있게 감소되어 있었다 ($p < 0.05$). 그러나 양군 사이에 MMP-13의 활성도는 37.5 ± 0.43 pg/ml, 35.6 ± 0.52 pg/ml로 의미있는 차이는 없었다.

5. TIMP-1과 TIMP-2의 mRNA 발현은 정상 포도당균에 비하여 고포도당균에서 각각 1.8배, 1.5배 증가되었다 ($P < 0.05$).
6. 세포 배양액 내 TIMP-1과 TIMP-2의 단백 발현은 고포도당균에서 정상 포도당균에 비하여 각각 1.7배, 1.6배 증가되었다 ($P < 0.05$). 그러나 양군 사이에 세포 용해액 내 TIMP-1과 TIMP-2의 단백 발현에는 의미있는 차이는 없었다.

이상의 실험 결과로 미루어, 복막 중피세포에서 고포도당에 의한 collagenases의 발현 감소와 TIMPs의 발현 증가로 인한 세포 외기질의 분해 감소도 복막 섬유화의 병태생리에 일부 관여할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, Ghods AJ, Twardowski ZJ, Pyle WK. Continuous ambulatory peritoneal dialysis.1978. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:901-910.
2. Dobbie JW. Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1992;12:14-27.
3. Nakamoto M. Pathogenesis of peritoneal fibrosis peritoneal small vessel changes. *Perit Dial Int*1996;16:S39-S41.
4. Plum J, Hermann S, Fusholler A, Schoenicke G, Donner A, Rohrborn A, Grabensee B. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int* 2001;78:S42-S47.
5. Honda K, Nitta K, Horita S, Yumura W, Nihei H. Morphological changes in the peritoneal vasculature of patients on CAPD with ultrafiltration failure. *Nephron* 1996;72:171-176.
6. Topley N. Membrane longevity in peritoneal dialysis: impact of infection and bio-incompatible solutions. *Adv Ren Replace Ther* 1998;5:179-184.
7. Wang T, Qureshi AR, Heimbürger O, Waniewski J, Bergström J, Lindholm B. Daily exposure to dialysis fluid results in

- changes in peritoneal transport. *Perit Dial Int*. 1997;17:379-386.
8. Witowski J, Bender TO, Gahl GM, Frei U, Jorres A. Glucose degradation products and peritoneal membrane function. *Perit Dial Int* 2001;21:201-205.
 9. Park MS, Lee HA, Chu WS, Yang DH, Hwang SD. Peritoneal accumulation of AGE and peritoneal membrane permeability. *Perit Dial Int* 2000;20:452-460.
 10. Witowski J, Bender TO, Wisniewska-Elnur J, Ksiazek K, Passlick-Deetjen J, Breborowicz A, Jorres A. Mesothelial toxicity of peritoneal dialysis fluids is related primarily to glucose degradation products, not to glucose per se. *Perit Dial Int* 2003;23:381-390.
 11. Davies SJ, Phillips L, Naish PF, Russell GI. Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1046-1051.
 12. Dobbie JW, Anderson JD. Ultrastructure, distribution, and density of lamellar bodies in human peritoneum. *Perit Dial Int* 1996;16:482-487.
 13. Coles GA, Topley N. Long-term peritoneal membrane changes. *Adv Ren Replace Ther* 2000;7:289-301.
 14. Musi B, Braide M, Carlsson O, Wieslander A, Albrektsson A, Ketteler M Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids:

- long-term exposure of nonuremic rats. *Perit Dial Int* 2004;24:37-47.
15. Fang W, Qian JQ, Yu ZY, Chen SS. Morphological changes of the peritoneum in peritoneal dialysis patients. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:862-866.
 16. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
 17. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
 18. McLennan SV, Martell SK, Yue DK. Effects of mesangium glycation on matrix metalloproteinase activities: possible role in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002;51:2612-2618.
 19. Caenazzo C, Garbisa S, Onisto M, Zampieri M, Baggio B, Gambaro G. Effect of glucose and heparin on mesangial alpha 1(IV)COLL and MMP-2/TIMP-2 mRNA expression. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:443-448.
 20. McLennan SV, Martell SY, Yue DK. High glucose concentration inhibits the expression of membrane type metalloproteinase by mesangial cells: possible role in mesangium accumulation. *Diabetologia* 2000;43(5):642-648.
 21. McLennan SV, Kelly DJ, Cox AJ, Cao Z, Lyons JG, Yue DK, Gilbert RE. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression

- and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia* Feb 2002;45:268-275.
22. Singh R, Song RH, Alavi N, Pegoraro AA, Singh AK, Leehey DJ. High glucose decreases matrix metalloproteinase-2 activity in rat mesangial cells via transforming growth factor-beta1. *Exp Nephrol* 2001;9:249-257.
23. Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, Koji T, Yagame M, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H, Jinde K. In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997;52:111-119.
24. Martin J YS, Robson RL, Steadman R, Davies M. Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2000;20:524-533.
25. Renvall S, Lehto M, Penttinen R. Development of peritoneal fibrosis occurs under the mesothelial cell layer. *J Surg Res* 1987;43:407-412.
26. Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. *Biochimie* 2005;87:273-286.
27. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990;37:1563-1570.
28. McLennan SV, Fisher E, Martell SY, et al. Effects of

glucose on matrix metalloproteinase and plasmin activities in mesangial cells: possible role in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2000;77:S81-87.

29. Del Prete D, Anglani F, Forino M, Ceol M, Fioretto P, Nosadini R, Baggio B, Gambaro G. Down-regulation of glomerular matrix metalloproteinase-2 gene in human NIDDM. *Diabetologia* 1997;40:1449-1454.
30. Ha H, Yu MR, Lee HB. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2001;59:463-470.
31. Xu ZG, Kim KS, Park HC, Choi KH, Lee HY, Han DS, Kang SW. High glucose activates the p38 MAPK pathway in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2003;63:958-968.
32. Hirahara I, Ogawa Y, Kusano E, Asano Y. Activation of matrix metalloproteinase-2 causes peritoneal injury during peritoneal dialysis in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:1732-1741.
33. Fukudome K, Fujimoto S, Sato Y, Hisanaga S, Eto T. Peritonitis increases MMP-9 activity in peritoneal effluent from CAPD patients. *Nephron* 2001;87:35-41.
34. Kadoglou NP, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology* 2005;56:173-189.

35. Caenazzo C, Garbisa S, Onisto M, Zampieri M, Baggio B, Gambaro G. Effect of glucose and heparin on mesangial alpha 1(IV)COLL and MMP-2/TIMP-2 mRNA expression. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:443-448.
36. Joffe P, Jensen LT. Type I and III procollagens in CAPD: markers of peritoneal fibrosis. *Adv Perit Dial* 1991;7:158-160.
37. Ha H, Cha MK, Choi HN, Lee HB. Effects of peritoneal dialysis solutions on the secretion of growth factors and extracellular matrix proteins by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2002;22:171-177.
38. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol* 2001;17:463-516.
39. Higuchi C, Tanihata Y, Nishimura H, Naito T, Sanaka T. Effects of glucose and plasminogen activator inhibitor-1 on collagen metabolism in the peritoneum. *Ther Apher Dial* 2005;9:173-181.
40. Morgera S, Schlenstedt J, Hambach P, Giessing M, Deger S, Hocher B, Neumayer HH. Combined ETA/ETB receptor blockade of human peritoneal mesothelial cells inhibits collagen I RNA synthesis. *Kidney Int* 2003;64:2033-2040.
41. Toyoda M, Suzuki D, Honma M, Uehara G, Sakai T, Umezono T, Sakai H. High expression of PKC-MAPK pathway mRNAs correlates with glomerular lesions in human diabetic

- nephropathy. *Kidney Int* 2004;66:1107-1114.
42. Hayashida T, Schnaper HW. High ambient glucose enhances sensitivity to TGF-beta1 via extracellular signal-regulated kinase and protein kinase Cdelta activities in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* Aug 2004;15:2032-2041.
 43. Rekha Singh NA, Ashok K. Singh, and David J. Leehey. Role of Angiotensin 2 in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 1999;48:2066-2073.
 44. Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL. The cell biology of the plasminogen system. *Faseb J* 1995;9:939-945.
 45. Tomooka S BW, Marshall BC. Glomerular matrix accumulation is linked to inhibition of the plasmin protease system. *Kidney Int* 1992;42:1462-1469.
 46. Baricos WH, Cortez SL, el-Dahr SS, Schnaper HW. ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int* 1995;47:1039-1047.
 47. Mignatti P. Extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activators. *Kidney Int* 1995;49:S12-14.
 48. Schnaper HW. Balance between matrix synthesis and degradation: a determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 1995;9:104-111.

49. Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol.* 1996;148:1345-1350.

ABSTRACT

The effects of high glucose on collagenase and tissue
inhibitors of metalloproteinases in cultured
human peritoneal mesothelial cells

Jin-Ju Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Shin-Wook Kang)

Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) has been used as a long-term renal replacement therapy for patients with end-stage renal disease. However, after long-term treatment with CAPD, peritoneal fibrosis (PF) has been observed in some patients, resulting in membrane failure. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that denudation of mesothelial cells

from the peritoneum and excessive deposition of extracellular matrix (ECM) are the structural determinants of PF. ECM accumulation results from imbalanced matrix protein metabolism between synthesis and degradation, which has been widely investigated in diabetic nephropathy. Previous studies have demonstrated that ECM synthesis is increased in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) under high glucose conditions, but the effects of high glucose on degradative pathways, which is mediated by matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), have not fully explored.

The purpose of this study was to elucidate the effects of high glucose on these proteolytic processes in cultured HPMCs. Since the main ECMs accumulated in PF are type I and type III collagen, I investigated collagenases (MMP-1, MMP-8, and MMP-13) activity, expression and TIMPs (TIMP-1 and TIMP-2) expression, which are known to be involved in the degradation of type I and type III collagen. In addition, I determined type I and type III collagen levels in high glucose-stimulated HPMCs. HPMCs were isolated from a piece of human omentum and were

incubated with M199 media containing 5.6 mM glucose (LG), 5.6 mM glucose + 34.4 mM mannitol (LG+M), or 40 mM glucose (HG). After 72 hours, cells were harvested for messenger RNA and protein, and media were collected. mRNA expressions was determined by real time-PCR, protein expressions by Western blot, and collagenase activities by ELISA. The results were as follows:

1. Type I collagen protein expression was significantly higher in HPMC exposed to HG compared to LG cells (average 1.4-fold, $p < 0.05$), whereas there was no difference in type III collagen protein expression.
2. MMP-1 and MMP-8 mRNA expression in HG-stimulated HPMCs were decreased by 55% and 51%, respectively, compared to LG cells ($P < 0.05$). However, there was no difference in MMP-13 mRNA expression between LG and HG cells.
3. Collagenase protein expressions were significantly lower in HG media compared to LG media (MMP-1, 32.6%; MMP-8, 21.3%; MMP-13, 23.8% of LG) ($p < 0.05$), but there were no differences in collagenases protein expression in cell lysates.

4. MMP-1 and MMP-8 activities in HG media (12.6 ± 0.3 pg/ml, 14.9 ± 0.93 pg/ml, respectively) were significantly lower than those in LG media (36.0 ± 4.7 pg/ml, 31.3 ± 7.0 pg/ml, respectively) ($p < 0.05$). but there was no difference in MMP-13 activity between LG and HG media.
5. TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in HG stimulated HPMCs were 1.8-fold and 1.5-fold higher, respectively, compared to LG cells ($P < 0.05$).
6. TIMP-1 and TIMP-2 protein expression in HG media were 1.7-fold and 1.6-fold higher, respectively, compared to LG media ($p < 0.05$), but there were no differences in TIMP protein expression in cell lysates.

In conclusion, these results suggest that the impairment of matrix degradation may contribute to ECM accumulation in peritoneal fibrosis.

Key Words: peritoneal fibrosis, collagen, matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase.