

당뇨 백서에서 p38 Mitogen-Activated Protein Kinase 억제제 (FR167653)가 세극막 관련 단백질 발현에 미치는 영향

이화여자대학교 의학전문대학원 내과학교실¹
연세대학교 의과대학 내과학교실², BK21 의과학 사업단³

류동열¹ · 유태현² · 정동섭³ · 곽승재³ · 박제현³ · 이순하³ · 이금희³ · 류정화¹
유민아¹ · 김승정¹ · 강덕희¹ · 최규복¹ · 윤건일¹ · 한대석² · 강신욱²

The Effect of FR167653, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Inhibitor, on the Expression of Slit Diaphragm-Associated Proteins in Experimental Diabetic Nephropathy

Dong-Ryeol Ryu, M.D.¹, Tae-Hyun Yoo, M.D.², Dong-Sub Jung, H.S.³, Seung-Jae Kwak, M.S.³
Je-Hyun Park, Ph.D.³, Sun-Ha Lee, M.C.³, Jinji Lee, M.D.³, Jung-Hwa Ryu, M.D.¹, Mina Yu, M.D.¹
Seung-Jung Kim, M.D.¹, Duk-Hee Kang, M.D.¹, Kyu Bok Choi, M.D.¹, Kyun Il Yoon, M.D.¹
Dae-Suk Han, M.D.² and Shin-Wook Kang, M.D.²

Department of Internal Medicine¹, School of Medicine, Ewha Womans University;

Department of Internal Medicine², BK21 Project for Medical Science³

College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Purpose: This study was undertaken to investigate the effect of a p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) inhibitor, FR167653, on urinary albumin excretion and on the expression of slit diaphragm-associated proteins in diabetic rats.

Methods: Thirty-two Sprague-Dawley rats were injected with diluent [control (C), N=16] or streptozotocin intraperitoneally (DM, N=16). Eight rats from each group were treated with 5 mg/kg/day FR167653 (C+FR, DM+FR) for 6 weeks. At the time of sacrifice, 24-hour urinary albumin excretion was determined by ELISA. Glomerular nephrin, P-cadherin, and ZO-1 mRNA and protein expression were determined by real-time PCR and Western blot, respectively, with sieved glomeruli.

Results: Urinary albumin excretion was significantly higher in DM compared to C rats, and this increase in albuminuria was significantly inhibited by the administration of FR167653 in DM rats. Glomerular phospho-p38 MAPK protein expression was significantly increased in DM rats compared to C rats, and FR167653 treatment significantly attenuated the increase in phospho-p38 MAPK expression in DM glomeruli. Nephrin mRNA and protein expression were higher in 6-week DM compared to C glomeruli, and these increases were significantly abrogated with FR167653 treatment in DM rats. In contrast, FR167653 had no effects on the decrease in P-cadherin expression and the increase in ZO-1 expression observed in DM glomeruli.

Conclusion: These findings suggest that FR167653, a p38 MAPK inhibitor, reduce the amount of albuminuria in early diabetic nephropathy, and this anti-proteinuric effect seems to be related with the change of glomerular nephrin expression.

Key Words: Diabetic nephropathy, p38 mitogen-activated protein kinases, FR167653

접수: 2007년 10월 25일, 승인: 2008년 3월 20일

이 논문은 2006년도 대한신장학회 BAXTER 신진연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

책임저자: 강신욱 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 내과학교실

Tel : 02)2228-1959, Fax : 02)393-6884, E-mail : kswkidney@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

당뇨병성 신병증은 국내 말기 신부전의 가장 흔한 원인 질환으로, 임상적으로는 단백뇨가 특징적인 소견이다^{1, 2)}. 당뇨병성 신병증을 비롯한 각종 사구체 질환에서 단백뇨는 혈관 내피세포층 (endothelial layer), 사구체 기저막 (glomerular basement membrane), 그리고 세극막 (slit diaphragm)이 존재하는 족세포층 (podocyte layer)으로 이루어진 사구체 여과 장벽의 변화에 의하여 유발되며, 세극막 관련 단백질로 nephrin, P-cadherin, zonula occludens-1 (ZO-1), CD2-associated protein (CD2AP) 등이 존재하는 것으로 알려져 있다³⁻⁷⁾.

당뇨병성 신병증에서 단백뇨의 발생 기전을 분자생물학적으로 규명하기 위하여 당뇨 조건 하에서의 세극막 관련 단백질의 발현 변화에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며, 이 중 nephrin 발현이 단백뇨 발생 및 악화와 가장 밀접한 상관관계를 나타내는 것으로 보고되고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 또한, 당뇨병성 신병증에서 P-cadherin 및 ZO-1의 발현 변화도 부분적으로 단백뇨 발생과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다^{11, 12)}. 그러나, 현재까지 당뇨병성 신병증에서 세극막 관련 단백질의 발현 변화에 관여하는 세포내 신호전달 경로가 정확하게 밝혀져 있지는 않은 실정이다.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK)는 당뇨 자극에 의하여 발생된 비정상적인 신호가 핵 내로 전달되는 중요한 신호전달 경로 중의 하나로, 현재까지는 extracellular signal regulated kinase-1/2 (ERK1/2), stress-activated c-Jun N-amino terminal kinase (JNK/SAPK), p38 MAPK, 그리고 big MAPK (ERK 5) 등이 MAPK 족에 속하는 것으로 밝혀져 있다¹³⁾. 이 중 p38 MAPK는 전구 염증성 사이토카인, 자외선, 삼투압 변화, 또는 산화성 스트레스 등에 의하여 활성화되어 여러 가지 세포 기능을 변화시키는 것으로 알려져 있는데, 고삼투압과 산화성 스트레스는 당뇨병과 동반되는 특징적인 소견이기 때문에 p38 MAPK가 당뇨병성 합병증의 병태생리에 관여할 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되어 왔다¹⁴⁾.

p38 MAPK 억제제는 현재까지 여러 종류가 개발되어 염증성 질환, 관절염, 자가면역 질환, 패혈성 쇼크 및 심혈관계 질환의 질병 모델에서 그 효과가 입증된 바 있다¹⁵⁾. FR167653 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan)은 전구 염증성 사이토카인의 발현을 억제하고¹⁶⁾, 고혈압성

백서에서는 NAD(P)H oxidase의 억제와 NO 생체이용률 (bioavailability) 향상에 기여하며, 단백뇨, 사구체경화 및 간질내 대식세포의 이동 (migration)을 효과적으로 억제하는 등 다양한 약리 작용이 보고되었는데¹⁷⁾, 단백뇨를 동반한 사구체신염 동물 모델에서 FR167653에 의한 p38 MAPK의 활성화 억제를 통하여 단백뇨 발생이 감소된 소견으로 미루어 보아 족세포 손상 및 단백뇨의 발생과 MAPK의 활성화 사이에 연관성이 있을 것으로 생각된다¹⁸⁾.

그러나, 당뇨병성 신병증의 동물 모델에서 p38 MAPK 억제제의 효과를 관찰한 실험은 미미한 실정으로, 본 연구에서는 실험적 당뇨 백서에서 FR167653에 의한 p38 MAPK 억제 효과와 더불어 당뇨병성 신병증의 주된 임상 증상인 단백뇨 호전 여부를 관찰하고, p38 MAPK와 세극막 관련 단백질의 발현 변화 사이의 연관성을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

무게 230-270 g의 웅성 백서 (Sprague-Dawley rats) 32마리를 사용하였으며, 이중 16마리는 위약을 복강 주사하여 대조군 (C)으로, 그리고 나머지 16마리는 streptozotocin (STZ) 65 mg/kg을 복강 주사하여 당뇨군 (DM)으로 사용하였다. FR167653은 소량의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였으며, C군 및 당뇨군에서 각각 8마리는 무작위로 FR167653 투여군 (5 mg/kg/day 양측 대퇴근육에 교대로 근육)과 위약 투여군에 배정되었다. FR167653 투여 백서와 위약 투여 백서 모두에서 투여 기간 동안 특이적인 국소 또는 전신 반응은 관찰되지 않았다. 백서들은 자동 온도 조절 시설에서 사육되었으며, 물과 표준 실험식을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 당뇨 유발 6주 후 체중과 혈당을 측정하였으며, 24시간 소변을 수집하였다. 24시간 뇨알부민 배설량은 ELISA (Nephrot II, Exocell, Inc., Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 모든 동물 실험은 승인된 기안서에 따라 시행되었다.

2. 사구체 분리

백서를 pentothal (50 mg/kg)로 마취한 후 단두하여 희생시킨 다음 신장을 적출하였다. 적출된 신장의 무게를 측정 한 후 면도날로 장축을 따라 반으로 절개하고 가위로 피질만

을 분리하여 인산 완충 용액 (phosphate buffered saline, PBS)에 옮긴 후 체공이 200, 150 및 75 μm 인 stainless sieve를 차례로 통과시킨 다음 75 μm 소공에 걸린 사구체를 실험에 이용하였다.

3. 총 RNA 추출 및 역전사

총 RNA는 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 이용하여 추출하였다. 분리한 사구체에 100 μL 의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 동결과 해동을 3회 반복하여 용해시킨 후, 700 μL 의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 vortex한 후 실온에 5분간 두었다. 이후 160 μL 의 chloroform을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 3분간 실온에 보관한 다음, 4°C에서 12,000 X g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400 μL 의 isopropanol을 첨가하고 4°C에서 12,000 X g로 30분간 원심분리하였다. RNA 침전물은 70% ice-cold ethanol로 세척, Speed Vac을 이용하여 건조시킨 후 DEPC-증류수로 희석시켰다. 분리된 RNA 순도는 spectrophotometry상 260 nm과 280 nm에서 측정된 optical density (O.D.) 값을 이용하여 확인하였다.

cDNA는 Boehringer Mannheim cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)을 이용하여 제작하였다. 사구체로부터 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 transcriptase를 첨가하였다. 이 혼합물은 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고

99°C에서 5분간의 incubation 과정을 거친 후, -70°C에 보관하였다.

4. Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR)

실험에 사용한 primer 및 PCR 조건은 Table 1에 기술한 바와 같다. RT-PCR은 ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며, 10 μL SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems), 25 ng cDNA, 그리고 5 pmol sense와 antisense primer를 포함한 20 μL 반응 혼합물로 시행하였다. PCR 반응 후에는 온도를 60°C에서 95°C로 증가시켜 얻어진 해리 곡선 (dissociation curve)을 확인하였다. 각각의 PCR 수행 시에는 cDNA가 포함되지 않은 음성 대조군도 함께 시행하였다.

$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 을 이용한 상대 정량법으로 각각의 PCR 산물을 비교하였으며, 결과는 nephrin, P-cadherin, 그리고 ZO-1 mRNA 발현을 GAPDH mRNA 발현으로 보정하여 표시하였다. 대조군에서의 유전자 발현을 1로 정하여 각 군에서의 발현을 대조군에 대한 상대적 비로 나타내었다. 예비 실험에서 각 PCR primer의 PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동하여 단일 밴드임을 확인하였다.

5. 단백질 추출 및 Western blot 분석

각 군의 사구체를 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% [vol/vol] glycerol)를 이용하여 용해시

Table 1. Sequences of Primers and PCR Conditions

	Sequence (5'→3')	Annealing Temperature (°C)
Nephrin		62
Sense	CCTGCACCACCAACTGCTTAGC	
Antisense	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	
P-cadherin		53
Sense	AGTGGGCCACGAGGTACAGA	
Antisense	ACGCCATGCCGGTGAGT	
ZO-1		60
Sense	CGAGGCATCGTTCTAATAAGAA	
Antisense	GACCTCGAAACCTCCAGAAGTCT	
GAPDH		60
Sense	TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG	
Antisense	AGCCAGGATGCCCTTTAGT	

킨 후, 세포 용해액을 4°C에서 10,000 X g로 10분간 원심 분리하였다. 상층액내 단백질은 Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 농도를 결정한 후 50 µg씩 등분하여 -70°C에 보관하였다. 50 µg의 단백질은 Laemmli sample buffer로 처리, 100°C로 5분간 가열한 후, 8% 또는 12% acrylamide denaturing SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel내 단백질은 semidry blotting 기계를 이용하여 Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL, USA)에 이전시켰다. Membrane을 실온에서 1시간 동안 blocking buffer A (1 X PBS, 0.1% Tween-20, 그리고 8% nonfat milk)로 처리한 후, 1:500으로 희석된 polyclonal anti-phospho-p38-MAPK antibody (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA), anti-p38 MAPK antibody (New England Biolabs, Inc.), anti-nephrin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-P-cadherin antibody (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA), anti-ZO-1 antibody (Zymed Laboratories, Inc.), 또는 anti-β-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Membrane을 1 X PBS와 0.1% Tween-20로 15분간 1회, 5분간 2회 처리한 후, 1:1,000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG가 포함된 buffer A에 1시간 동안 반응시킨 다음 ECL chemiluminescent 시약 (Amersham Life Science, Inc.)을 이용하여 가시화하였다. 신호 강도는 TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 O.D.로 정량화하였다.

6. 면역형광 염색

신장 조직을 신선한 상태에서 곧바로 OCT compound (Tissue-Tek®; Sakura Finetek U.S.A. Inc., Torrance, CA, USA)를 이용하여 동결시킨 다음 5 µm 절편의 슬라이드를 제작하였다. 면역조직화학 염색을 위해 제작된 슬라이드를 건조시킨 후 acetone으로 고정하였으며, sodium azide가 포함된 0.1% H₂O₂ PBS로 실온에서 20분간 반응시켜 항체의 침투성을 높였다. Nephrin 염색을 위해 anti-nephrin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 1:100으로 희석하여 실온에서 3시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 후, Cy3 (red)-conjugated IgG (Jackson ImmunoResearch

Laboratories, West Grove, PA, USA)로 60분간 반응시켰다. 그리고, anti-P-cadherin antibody (Zymed Laboratories, Inc.)와 anti-ZO-1 antibody (Zymed Laboratories, Inc.)를 1:100으로 희석하여 실온에서 3시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 후, Cy2 (green)-conjugated IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 사용하여 60분간 반응시켰다.

7. 통계분석

모든 수치는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 12.0판 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 결과들은 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 분석하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적 차이가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 동물 자료

실험 기간 동안 네 군 모두에서 체중이 증가하였으나, C군 (402±6 g)과 C+FR군 (398±7 g)에서 DM군 (270±4 g)과 DM+FR군 (302±8 g)에 비하여 유의하게 증가하였다 (p<0.05). 이와는 대조적으로, 백서를 희생시킬 때 측정된 체중 당 신장의 무게는 C군 (0.76±0.05%)과 C+FR군 (0.78±0.06%)에 비하여 DM군 (1.09±0.08%)과 DM+FR군 (1.03±0.08%)에서 의미있게 높았다 (p<0.05).

당뇨 유발 6주 후 혈당은 C군, C+FR군, DM군, 그리고 DM+FR군에서 각각 95.8±0.9 mg/dL, 99.1±0.5 mg/dL, 466.2±13.9 mg/dL, 그리고 464.1±18.8 mg/dL로 C군과 C+FR군에 비하여 DM군과 DM+FR군에서 유의있게 높았다 (p<0.01). 24시간 뇨알부민 배설량은 C군 (0.29±0.04 mg/day)과 C+FR군 (0.32±0.04 mg/day)에 비하여 DM군 (1.09±0.17 mg/day, p<0.05)에서 유의한 증가를 보였으며, 이러한 증가는 FR167653 투여로 의미있게 억제되었다 (0.38±0.05 mg/day, p<0.05) (Table 2).

2. 사구체내 phospho-p38 MAPK와 총 p38 MAPK의 단백질 발현

Western blot을 이용하여 분석한 사구체내 phospho-p38 MAPK의 단백질 발현은 C군에서 대조군에 비하여 2.3배 증가되었으며, 이러한 증가는 FR167653 투여로 72% 억제되었다 ($p<0.05$). 반면에, 총 p38 MAPK의 단백질 발현은 네 군 사이에 유의한 차이가 없었다 (Fig. 1).

3. 사구체내 nephrin mRNA와 단백질의 발현

사구체내 nephrin/GAPDH의 mRNA 발현 비는 DM군에서 C군에 비하여 1.9배 증가되었으며, 이러한 증가는 FR167653 처치로 74% 억제되었다 ($p<0.05$) (Fig. 2A).

사구체내 nephrin 단백질의 발현 역시 C군에 비하여 DM군에서 1.6배 증가되었으며, DM+FR군에서는 이러한 nephrin 단백질의 발현 증가가 89% 억제되었다 ($p<0.05$) (Fig. 2B).

4. 사구체내 P-cadherin 및 ZO-1 mRNA와 단백질의 발현

사구체내 P-cadherin/GAPDH의 mRNA 발현 비는 당

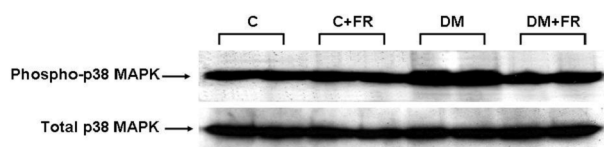


Fig. 1. Glomerular phosphorylated p38 MAPK protein expression in DM was increased 2.3 times compared with control (C) rats ($p<0.05$), and this increase was significantly inhibited with FR167653 treatment ($p<0.05$). On the other hand, FR167653 had no effect on glomerular phosphorylated p38 MAPK protein expression in C rats, and there was no difference in total p38 MAPK protein expression among the four groups.

뇨 유발 6주 후 C군에 비하여 DM군에서 의미있게 감소되었으나 ($p<0.05$), DM+FR군과 DM군 사이에는 P-cadherin/GAPDH mRNA의 발현 비에 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 3A). Western blot으로 분석한 사구체내 P-cadherin의 단백질 발현 역시 DM군에서 C군에 비하여 의미있게 감소되었다 ($p<0.05$). 그러나, FR167653 처치는 C군과 DM군 모두에서 사구체내 P-cadherin의 단백질 발현에 의미있는 영향을 미치지 못하였다 (Fig. 3B).

사구체내 ZO-1/GAPDH의 mRNA 발현 비는 C군에 비하여 DM군에서 유의하게 증가되었으나 ($p<0.05$), DM+FR군과 DM군 사이에는 ZO-1/GAPDH mRNA의 발현 비에

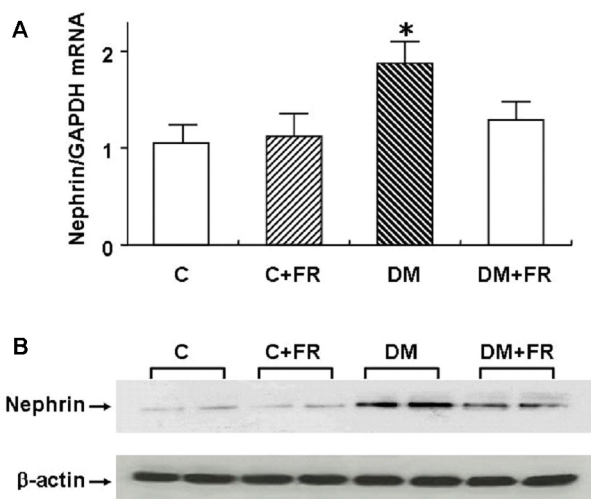


Fig. 2. Glomerular nephrin/GAPDH mRNA ratio was significantly higher in DM compared with control (C) rats at 6 weeks after DM induction, and FR167653 treatment significantly inhibited the increase in glomerular nephrin/GAPDH mRNA ratio in DM rats. FR167653 had no effect on glomerular nephrin mRNA expression in C rats (**Panel A**). Densitometric quantitation revealed that there was 1.6 times increase in glomerular nephrin protein expression in DM relative to C rats ($p<0.05$), and this increase was significantly inhibited with FR167653 treatment ($p<0.05$). On the other hand, there was no difference in β -actin protein expression among the four groups (**Panel B**). * $p<0.05$ vs. C and DM+FR.

Table 2. Animal Data of the Four Groups

	Control (N=8)	C+FR (N=8)	DM (N=8)	DM+FR (N=8)
Body weight after 6 weeks (g)	402 $\pm$ 6	398 $\pm$ 7	270 $\pm$ 4*	302 $\pm$ 8*
Kidney Wt./body Wt. (%)	0.76 $\pm$ 0.05	0.78 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.08*	1.03 $\pm$ 0.08*
Blood glucose (mg/dL)	95.8 $\pm$ 0.9	99.1 $\pm$ 0.5	466.2 $\pm$ 13.9†	464.1 $\pm$ 18.8†
Urinary albumin excretion (mg/day)	0.29 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.04	1.09 $\pm$ 0.17*	0.38 $\pm$ 0.05†

* $p<0.05$ vs. Control; † $p<0.05$ vs. DM; ‡ $p<0.01$ vs. Control

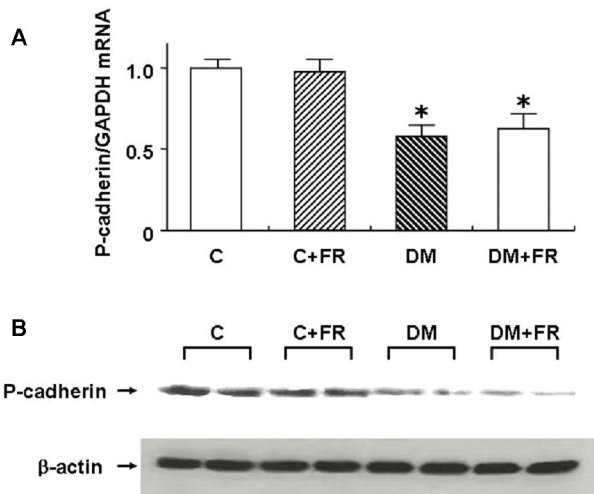


Fig. 3. Glomerular P-cadherin/GAPDH mRNA ratio was significantly lower in DM rats than control (C) rats. However, P-cadherin/GAPDH mRNA ratio was not changed with FR167653 treatment in DM rats (**Panel A**). Similarly, P-cadherin protein expression was significantly lower in DM rats than C rats assessed by densitometry ($p < 0.05$). FR167653 treatment did not affect P-cadherin protein expression in C and DM rats. There was no difference in β -actin protein expression among the four groups (**Panel B**). * $p < 0.05$ vs. C.

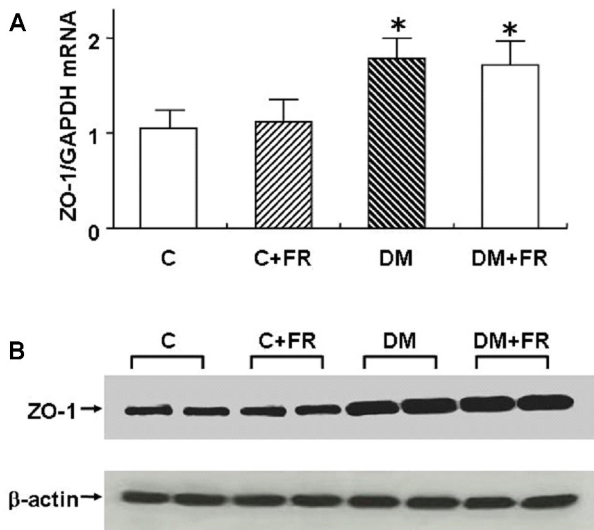


Fig. 4. Glomerular zonula occludens-1 (ZO-1)/GAPDH mRNA ratio was significantly higher in DM compared with control (C) rats at 6 weeks after DM induction. However, FR167653 treatment had no effect on glomerular ZO-1/GAPDH mRNA ratio in C and DM rats (**Panel A**). Densitometric quantitation revealed that there was a significant increase in glomerular ZO-1 protein expression in DM relative to C rats ($p < 0.05$). FR167653 had no effect on glomerular ZO-1 protein expression in C and DM rats. There was no difference in β -actin protein expression among the four groups (**Panel B**). * $p < 0.05$ vs. C.

의의있는 차이가 없었다 (Fig. 4A). 사구체내 ZO-1 단백 발현 또한 C군에 비하여 DM군에서 유의하게 증가되었으나 ($p < 0.05$), FR167653 처치는 C군과 DM군 모두에서 사구체내 ZO-1의 단백 발현에 의미있는 영향을 미치지 못하였다. 한편, β -actin의 단백 발현은 모든 군 사이에 유의있는 차이가 없었다 (Fig. 4B).

5. 면역 형광염색 결과

면역형광염색으로 분석해 본 결과, 사구체 내에서 nephrin 발현은 족세포와 세극막에 국한되어 있었으며, Western blot의 결과와 유사하게 DM군에서 증가되었고, DM+FR군에서는 이러한 nephrin 단백질의 발현 증가가 억제되었다 (Fig. 5A). 한편, C군에 비하여 DM군에서 감소되었던 P-cadherin 발현과 증가되었던 ZO-1 발현은 FR167653 처리에 의하여 의미있는 변화를 보이지 않았다 (Fig. 5B, 5C).

고 찰

본 연구에서는 STZ로 당뇨가 유발된 백서에서 6주 동안 FR167653을 투여하였을 때 뇨알부민 배설량이 감소하고, 이러한 FR167653의 단백질 감소 효과가 당뇨병성 신병증에서 관찰되는 p38 MAPK 활성화의 억제 및 nephrin 발현 변화의 호전과 관련되어 있음을 관찰하였다.

당뇨병성 신병증의 진행에 p38 MAPK 활성화가 미치는 영향에 대해서는 여러 연구 결과가 발표되었다. 초기 당뇨 백서 사구체와 고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK와 그 상부 인자인 MAPK kinase 3/6 (MKK 3/6) 및 하부 인자인 c-AMP responsive element binding protein (CREB)이 활성화되어 c-AMP responsive element (CRE)와 결합함으로써 fibronectin 유전자의 발현이 증가된다는 보고가 있으며^{19, 20)}, 당뇨병성 신병증 환자의 신장 조직을 이용한 면역조직화학 검사상 메산지움 세포, 혈관 내피세포, 세뇨관 상피세포, 그리고 족세포에서 phospho-p38 MAPK의 발현이 증가되었다는 연구 결과도 있다²¹⁾.

FR167653은 본래 lipopolysaccharide로 자극한 단핵세포와 phytohemagglutinin으로 자극한 림프구에서 interleukin-1과 tumor necrosis factor- α 의 생성을 억제하는 약제로 개발되었으며¹⁶⁾, 신장을 비롯한 여러 장기에서 허혈/재관류 손상을 예방하는 효과가 있는 것으로 알려졌다²²⁻²⁴⁾. 또한, 항염증 효과를 통하여 반월상 사구체신염, 자가면역 손상,

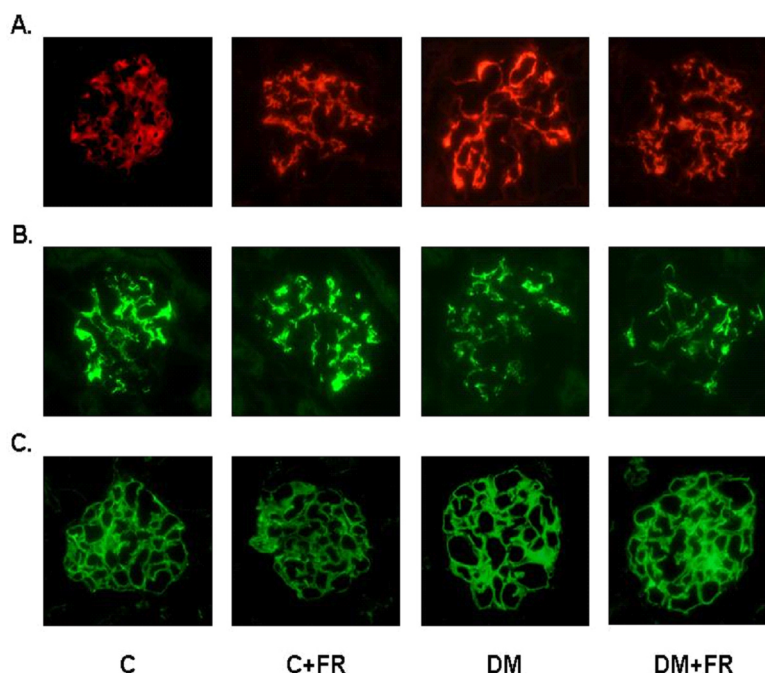


Fig. 5. Immunofluorescent staining for glomerular nephrin expression revealed that nephrin staining confined within podocytes and slit diaphragm was significantly stronger in DM compared to control (C) and C+FR rats, and FR167653 treatment inhibited the increases in nephrin expression in DM rats at 6 weeks after DM induction (**Panel A**). Glomerular P-cadherin expression (**Panel B**) was significantly lower and glomerular ZO-1 expression (**Panel C**) was significantly higher in DM rats than C rats. However, FR167653 treatment did not affect P-cadherin and ZO-1 expression in C and DM rats ($\times 400$).

그리고 만성 이식신병증에서도 신보호 작용을 나타내었다는 보고들도 있다²⁵⁻²⁷. 최근에는 puromycin aminonucleoside nephropathy 모델에서 FR167653을 전치치한 경우 단백뇨의 발생이 의미있게 감소되었으며, 만성 adriamycin nephropathy 모델에서는 FR167653이 사구체경화증과 신장 기능부전을 예방하였다는 연구 결과가 있었다¹⁸. 여러 종류의 신질환에서 관찰된 이러한 신보호 및 단백뇨 감소 효과는 FR167653의 p38 MAPK 활성화 억제 작용에 기인하는 것으로 알려져 있다. 현재까지의 많은 연구에도 불구하고 p38 MAPK의 활성화 및 단백뇨가 특징인 당뇨병성 신병증에서 FR167653의 효과에 대한 연구는 전무한 상태이었는데, 본 연구 결과로 미루어 보아 당뇨병성 신병증에서도 p38 MAPK경로와 단백뇨의 발생 사이에 밀접한 연관이 있을 것으로 생각된다.

여러 사구체 질환에서 발생하는 단백뇨는 세극막 관련 단백질의 발현 변화와 밀접한 상관관계가 있는 것으로 알려져 있으며, 이 중에서도 nephrin 발현과의 연관성에 관한 연구가 많이 이루어져 왔는데, 그 결과는 다소 상이한 실정이다.

Puromycin aminonucleoside나 mercuric chloride를 투여하여 단백뇨가 유발된 백서에서 nephrin의 발현이 감소되어 있다는 보고와 더불어 성인 일차성 신증후군 환자의 신조직에서 nephrin의 발현 감소뿐만 아니라 족세포내의 분포에도 변화가 있음이 관찰된 바 있다^{28, 29}. 그러나, 소아 일차성 신증후군 환자의 신조직을 이용한 또 다른 연구에서는 대조군에 비하여 nephrin의 발현에 차이가 없었다³⁰. 또한, 당뇨병성 신병증을 대상으로 한 연구에서도 Bonnet 등³¹은 STZ로 당뇨가 유발된 자발성 고혈압 백서에서 nephrin mRNA와 단백질 발현 모두가 유의 있게 감소되었다고 보고한 반면, Aaltonen 등³²은 STZ 유발 당뇨 백서와 생쥐에서 현성 알부민뇨가 발생되기 전인 초기 당뇨병성 신병증 시기에 nephrin mRNA가 오히려 증가되었다고 하였다. 본 연구에서는 STZ로 당뇨병이 유발된 백서에서 6주 후 사구체내 nephrin의 발현이 증가되었는데, 이처럼 당뇨병성 신병증에서 사구체내 nephrin의 발현이 연구자에 따라 차이를 보이는 것은 실험에 사용된 동물의 종류, 당뇨병의 유발 기간, 그리고 고혈압의 동반 여부 등이 원인으로 이야기 되어져왔다. 그런데,

초기 당뇨병 백서로부터 추출한 사구체를 이용한 최근의 연구에 의하면, 좀 더 비후된 사구체에서는 nephrin의 발현이 감소되어 있었던 반면에, 비후가 덜 진행된 사구체에서는 오히려 nephrin의 발현이 증가되어 있었기 때문에³³⁾, 연구에 사용된 사구체 분리 기법의 차이도 nephrin 발현에 대한 다양한 결과를 설명할 수 있을 것으로 생각된다.

한편, 본 연구에서는 당뇨병성 신병증에서 관찰된 nephrin의 발현 증가가 FR167653 투여에 의하여 억제되었다. 따라서, FR167653 투여는 당뇨병성 신병증에서 증가된 족세포내 p38 MAPK 신호전달 경로를 억제하여 nephrin 발현을 정상화하며, 이에 따라 세극막의 구조가 안정화되고 단백뇨 발생이 억제되었을 것으로 생각된다. 그러나, 향후 전자 현미경을 이용하여 세극막의 구조 변화에 대한 추가적인 연구도 필요할 것으로 사료된다.

단백뇨와 P-cadherin의 발현 변화 사이의 연관성에 대한 현재까지의 연구 결과 역시 논란의 여지가 있다. 핀란드형 선천성 신증후군에서 P-cadherin이 정상적으로 표현되었으며³⁴⁾, P-cadherin 결여 생쥐에서 심한 단백뇨가 동반되지 않았다는 보고가 있었던 반면에³⁵⁾, Liu 등³⁶⁾은 백서에 항 P-cadherin 항체를 투여한 결과 24시간 뇨알부민 배설이 49% 증가하였으며, 이러한 변화는 nephrin이나 NEPH1과는 무관하여 P-cadherin 역시 사구체 여과 장벽 역할을 한다고 하였다. 또한, 당뇨 백서의 사구체와 고포도당으로 자극한 배양 족세포에서 관찰된 P-cadherin의 발현 감소와 단백뇨의 발생 사이에 연관성이 제시된 바 있으며¹¹⁾, P-cadherin 발현 변화에는 calcineurin의 활성화가 관여하여 당뇨병성 신병증에서 저용량의 cyclosporine 투여에 의하여 P-cadherin의 발현 호전과 함께 단백뇨가 감소되었다는 보고도 있다³⁷⁾. 본 연구에서는 당뇨병성 신병증 백서에서 P-cadherin 발현이 대조군에 비하여 의미있게 감소되어 있었으나, FR167653 투여에 의하여 P-cadherin의 발현 감소가 변하지 않은 것으로 미루어 보아 p38 MAPK 경로가 P-cadherin의 발현에는 관여하지 않을 것으로 생각된다.

당뇨병성 신병증에서 ZO-1의 발현과 단백뇨 사이의 연관성에 대한 연구도 다양한 결과를 보이고 있다. 멕시코-아메리칸 당뇨병 환자를 대상으로 한 코호트 연구에서 ZO-1 단백을 발현시키는 유전자 TJP1 (tight junction protein 1)의 돌연변이가 단백뇨 발생의 주요 결정 인자는 아니지만, 단백뇨의 경중도 결정에는 부분적으로 관여하는 것으로 나타났다³⁸⁾. 또한, 당뇨병성 신병증 백서 사구체내 ZO-1의 발현이 증가되었으며 안지오텐신 수용체 차단제 투여로 이러한 변화

가 억제되었음이 보고된 바 있으나¹²⁾, STZ로 유발된 당뇨 백서와 db/db 생쥐에서 ZO-1의 발현이 감소되고, 족세포막에 분포하던 ZO-1이 세포질 내로 이동하였다는 연구 결과가 발표되기도 하였다³⁹⁾. 이러한 상반된 결과 역시 nephrin 발현에 대한 연구 결과와 마찬가지로 실험 방법의 차이에 기인하였을 가능성도 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 6주된 당뇨병성 신병증 백서에서 사구체내 ZO-1의 발현이 증가되었으나, FR167653 투여군과 비투여군 사이에 의미있는 차이가 관찰되지 않았다. 따라서, ZO-1 역시 p38 MAPK 경로와는 무관한 경로에 의하여 발현이 조절되는 것으로 생각된다.

결론적으로, FR167653은 당뇨 백서에서 p38 MAPK 활성화를 효과적으로 억제하였고, 뇨알부민 배설을 유의하게 감소시켰으며, 이러한 효과는 당뇨 조건하에서 관찰되는 nephrin의 발현 변화의 호전과 관련이 있을 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : 본 연구에서는 실험적 당뇨 백서에서 p38 MAPK 억제제가 단백뇨 발생 및 세극막 관련 단백질 발현 변화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

방 법 : Sprague-Dawley 백서 32마리를 대상으로, 16마리는 streptozotocin (65 mg/kg)으로 당뇨를 유발시켰으며 (DM군), 16마리는 위약을 투여하였다 (C군). 각 군에서 8마리는 p38 MAPK 억제제인 FR167653을 5 mg/kg의 용량으로 6주간 매일 근주하였다 (C+FR, DM+FR). 당뇨 유발 6주 후 24시간 소변을 수집한 다음 희생시켜 신장을 적출한 후 사구체를 분리하였다. 24시간 뇨알부민 배설량은 ELISA로 측정하였으며, 사구체 내 nephrin, P-cadherin, 그리고 ZO-1의 mRNA와 단백질 발현은 각각 real-time PCR과 Western blot으로 분석하였다.

결 과 : 당뇨 유발 6주 후 24시간 뇨알부민 배설량은 C군 (0.29 ± 0.04 mg/day)과 C+FR군 (0.32 ± 0.04 mg/day)에 비하여 DM군 (1.09 ± 0.17 mg/day, $p < 0.05$)에서 유의하게 증가되었으며, 이러한 증가는 FR167653 투여로 의미있게 억제되었다 (0.38 ± 0.05 mg/day, $p < 0.05$). 세극막 관련 단백질 중 nephrin mRNA 및 단백질 발현은 DM군에서 C군에 비하여 각각 1.9배, 1.6배 증가되었으며, 이러한 증가는 FR167653 투여로 각각 74%, 89% 억제되었다 ($p < 0.05$). 반면에, FR167653은 DM군에서 발현이 감소된 P-cadherin과 발현이 증가된 ZO-1에 유의있는 영향을 미치지 않았다.

결론: 이상의 결과로, FR167653은 당뇨 백서에서 p38 MAPK 활성화를 효과적으로 억제하였고, 노알부민 배설을 유의하게 감소시켰으며, 이러한 효과는 nephrin의 발현 변화의 호전과 관련이 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Korean Society of Nephrology, Registry Committee: Renal replacement therapy in Korea Insan memorial dialysis registry 2005. *Korean J Nephrol* 25(Suppl 2): S425-S457, 2006
- 2) Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E: The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32(Suppl 2): 64-78, 1983
- 3) Daniels BS, Deen WM, Mayer G, Meyer T, Hostetter TH: Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest* 92:929-936, 1993
- 4) Ota Z, Shikata K, Ota K: Nephrotic tunnels in glomerular basement membrane as revealed by a new electron microscopic method. *J Am Soc Nephrol* 4: 1965-1973, 1994
- 5) Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P: The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11:1-8, 2000
- 6) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7962-7967, 1999
- 7) Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286:312-315, 1999
- 8) Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, Camussi G: Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 52:1023-1030, 2003
- 9) Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, Bruijn JA: Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 14:2063-2071, 2003
- 10) Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, Abbate M, Ruggenenti P, Kalluri R, Remuzzi G: Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 65:2193-2200, 2004
- 11) Ryu DR, Xu ZG, Yoo TH, Chang JH, Jung DS, Lee SH, Kim JJ, Choi KH, Lee HY, Han DS, Kang SW: P-cadherin is decreased in glucose-stimulated podocytes and in experimental diabetic nephropathy. *Korean J Nephrol* 22:494-503, 2003
- 12) Kim BS, Xu ZG, Park HC, Kang SW, Choi KH, Ha SK, Lee HY, Han DS: Changes of ZO-1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured mouse podocyte under high glucose conditions and the effect of angiotensin II type 1 receptor blocker. *Korean J Nephrol* 22: 632-644, 2003
- 13) Davis RJ: The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268:14553-14556, 1993
- 14) Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ: Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* 270:7420-7426, 1995
- 15) Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL: Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology* 47: 185-201, 2000
- 16) Yamamoto N, Sakai F, Yamazaki H, Nakahara K, Okuhara M: Effect of FR167653, a cytokine suppressive agent, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Eur J Pharmacol* 314:137-142, 1996
- 17) Tojo A, Onozato ML, Kobayashi N, Goto A, Matsuoka H, Fujita T: Antioxidative effect of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor in the kidney of hypertensive rat. *J Hypertens* 23:165-174, 2005
- 18) Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Nagae T, Yokoi H, Kawachi H, Shimizu F, Sugawara A, Nakao K: Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 16:2690-2701, 2005
- 19) Kang SW, Adler SG, Lapage J, Natarajan R: p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. *Kidney Int* 60:543-552, 2001
- 20) Yoo TH, Xu ZG, Ryu DR, Kim HW, Lee SH, Kim JJ, Jung DS, Choi KH, Lee HY, Han DS, Kang SW: The effect of high glucose on p38 MAPK pathway and fibronectin synthesis in cultured rat mesangial cells. *Korean J Nephrol* 22: 483-493, 2003
- 21) Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kida H, Yokoyama H: Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human

- diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 45:54-65, 2005
- 22) Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Sakai N, Yoshimoto K, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H: Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Nephrol Dial Transplant* 17:399-407, 2002
- 23) Kamoshita N, Takeyoshi I, Ohwada S, Iino Y, Morishita Y: The effects of FR167653 on pulmonary ischemia-reperfusion injury in dogs. *J Heart Lung Transplant* 16:1062-1072, 1997
- 24) Hashimoto K, Nishizaki T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Okano S, Ikegami T, Yanaga K, Sugimachi K: Beneficial effect of FR167653 on cold ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplantation* 70:1318-1322, 2000
- 25) Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H: A new anti-inflammatory compound, FR167653, ameliorates crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats. *J Am Soc Nephrol* 11:1534-1541, 2000
- 26) Iwata Y, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Matsushima K, Yokoyama H, Kobayashi K: p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice. *J Am Soc Nephrol* 14:57-67, 2003
- 27) Wada T, Azuma H, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Iwata Y, Matsushima K, Takahara S, Yokoyama H, Kaneko S: Reduction in chronic allograft nephropathy by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Nephrol* 26:319-325, 2006
- 28) Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, Kerjaschki D, Holthöfer H: Nephrin in experimental glomerular disease. *Kidney Int* 58:1461-1468, 2000
- 29) Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G: Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 158:1723-1731, 2001
- 30) Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikkinheimo M, Tryggvason K, Jalanko H: Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 12:289-296, 2001
- 31) Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z: Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 44: 874-877, 2001
- 32) Aaltonen P, Luimula P, Aström E, Palmen T, Grönholm T, Palojoki E, Jaakkola I, Ahola H, Tikkanen I, Holthöfer H: Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* 81:1185-1190, 2001
- 33) Kim JJ, Li JJ, Jung DS, Kwak SJ, Ryu DR, Yoo TH, Han SH, Choi HY, Kim HJ, Han DS, Kang SW: Differential expression of nephrin according to glomerular size in early diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:2303-2310, 2007
- 34) Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestilä M, Holmberg C, Salonen R, Heikkinheimo M, Wartiovaara J, Tryggvason K, Jalanko H: Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* 157:1905-1916, 2000
- 35) Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M, Hynes RO: Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 139:1025-1032, 1997
- 36) Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS: Nephl and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 112:209-221, 2003
- 37) Kang SW, Yoo TH, Kim HJ, Choi HY, Kim JS, Jung DS, Kim JJ, Kwak SJ, Han SH, Kim DK, Lee TH, Lee JE, Han DS, Ryu DR: The effect of cyclosporine on P-cadherin expression in experimental diabetic nephropathy and glucose-stimulated podocytes. *Korean J Nephrol* 26:23-33, 2007
- 38) Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, Wang W, Gorin Y, Barnes JL, Abboud HE: ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. *Diabetes* 55:894-900, 2006
- 39) Lehman DM, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Fowler S, Almasy L, Duggirala R, Stern MP, Abboud HE: Evaluation of tight junction protein 1 encoding zona occludens 1 as a candidate gene for albuminuria in a Mexican American population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114:432-437, 2006