

장시간 고포도당으로 자극한 배양 족세포에서 안지오텐신 II 수용체 차단제에 의한 세포비후 차단과 세포주기 조절 단백질의 차등 발현

연세대학교 의과대학 내과학교실, 이화여자대학교 의과대학 내과학교실*

박형천 · 허종호 · 류동열* · 유태현 · 정동섭
김진주 · 곽승재 · 이금희 · 한대석 · 강신욱

〈요 약〉

목 적 : 세포 비후 (hypertrophy)는 다양한 성장인자들의 자극과 함께 세포주기를 조절하는 일련의 세포주기 조절 단백질의 작용에 의하여 결정된다. 당뇨병성 신병증의 주요 병리학적 소견인 사구체와 세뇨관 비후에도 세포주기 조절 단백질이 관여하는 것으로 보고되고 있으며, 신병증 초기 단계부터 족세포 비후는 관찰되는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 장시간 고포도당으로 자극한 불멸화 마우스 족세포 (immortalized mouse podocyte)의 비후와 세포주기 조절 단백질인 p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, 그리고 p57^{Kip2}의 발현 변화를 관찰하고, 안지오텐신 II 수용체 차단제 (angiotensin II receptor blocker, ARB) 투여가 이들의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

방 법 : 불멸화 마우스 족세포를 정상 포도당 (5.6 mM), 고포도당 (30 mM), 정상 포도당+만니톨 (24.4 mM), 정상 포도당+안지오텐신 II (10^{-7} M), 고포도당+ARB (L-158,809, Merk, 10^{-6} M), 정상 포도당+안지오텐신 II+ARB 군으로 나누어 7일간 배양하였다. 세포 비후 여부를 관찰하기 위하여 세포수와 세포내 총 단백을 측정하였다. 세포주기 조절 단백질의 mRNA와 단백질 발현 변화는 각각 RT-PCR과 Western blot을 이용하여 관찰하였다.

결 과 : 고포도당과 안지오텐신 II로 자극한 분화된 마우스 족세포는 정상 포도당군에 비하여 유의한 세포 비후가 관찰되었고 ($149.6 \pm 6.5\%$ 및 $155.2 \pm 8.1\%$, $p < 0.05$), ARB 투여는 이러한 족세포 비후를 의미있게 감소시켰다. p27^{Kip1} mRNA 및 단백질 발현은 고포도당군에서 정상 포도당군에 비하여 각각 1.5배, 2.0배 증가되었으며 ($p < 0.05$), 이러한 p27^{Kip1} mRNA 및 단백질 발현 증가는 ARB 투여로 각각 75%, 70% 억제되었다 ($p < 0.05$). 외부에서 투여한 안지오텐신 II (10^{-7} M)도 고포도당 자극과 유사하게 p27^{Kip1} mRNA와 단백질 발현을 증가시켰다. 한편, 고포도당이나 안지오텐신 II는 다른 세포주기 조절 단백질인 p21^{Cip1}과 p57^{Kip2}의 단백질 발현에는 영향을 미치지 않았다.

결 론 : 장시간 고포도당으로 자극한 불멸화 마우스 족세포에서 세포 비후가 관찰되었으며, ARB 투여가 이러한 고포도당에 의한 세포비후를 유의하게 억제시킨 점으로 미루어 보아 고포도당에 의한 세포 비후가 안지오텐신 II와 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 2002년도 대한신장학회 MSD 연구비의 지원으로 진행되었음.

접수: 2006년 5월 24일, 승인: 2006년 6월 12일

책임저자: 강신욱 서울시 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 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환으로 병리학적으로 사구체와 세뇨관 비후 및

세포의 기질의 축적이 특징적인 소견으로^{1, 2)}, 고혈당 자체, 안지오텐신 II, 그리고 transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 등이 당뇨병성 신병증의 병태 생리에 관여하는 것으로 알려져 있다³⁾.

세포 증식과 비후는 세포주기 (cell cycle)를 조절하는 일련의 세포주기 조절 단백질에 의해 결정된다. 세포주기 각각의 단계마다 특정 cyclin과 이와 짝을 이루어 활성화되는 cyclin-dependent kinase (CDK)가 복합체를 이루어 세포주기를 진행시키며, CDK 억제제 (CDK inhibitor, CKI)는 이러한 cyclin/CDK 복합체를 억제하여 세포증식 과정을 중단시킨다. 현재 알려진 대표적인 CKI에는 표적 cyclin/CDK 복합체의 종류와 염기서열의 유사성에 따라 크게 INK4 그룹 (p15, p16, p18, p19)과 CIP/KIP 그룹 (p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p57^{Kip2})이 있다⁴⁻⁶⁾. 당뇨병성 신병증의 발생에 관여하는 인자로 알려진 고혈당, 안지오텐신 II, 그리고 TGF- β 1 등은 세포내 CKI의 발현을 증가시킴으로써 결국 세포 비후를 유발하며⁷⁾, 이러한 G1기에서의 세포주기 정지에는 p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p57^{Kip2}과 같은 CIP/KIP 그룹이 관여한다고 알려져 있다^{4, 7)}.

제 1형 당뇨 동물 모델인 biobreeding (BB) 백서와 제 2형 당뇨 동물 모델인 db/db 마우스에서 사구체 비후와 함께 CKI의 하나인 p27^{Kip1}의 발현 증가가 관찰되었으며^{8, 9)}, 고포도당으로 자극한 배양 배산지움 세포에서도 protein kinase C 경로와 활성산소종 경로를 통하여 p27^{Kip1}의 발현이 증가되었다⁷⁾. 또한 최근에는 제 2형 당뇨 동물 모델의 하나인 ZDF-fa/fa 백서를 이용한 동물 실험과 고농도 포도당으로 자극한 마우스 족세포 배양 실험에서 족세포 비후와 함께 p27^{Kip1} 단백질의 발현 증가가 보고되었다¹⁰⁾.

족세포는 사구체 여과장벽을 구성하고 있는 주요 세포로^{11, 12)}, 최근에는 이러한 족세포 손상이 당뇨병성 신병증의 발생과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다¹³⁾. 당뇨병성 신병증 초기 단계부터 족세포의 탈락과 더불어 족세포의 비후가 관찰되어지며^{13, 14)}, 안지오텐신 전환효소 억제제나 안지오텐신 II 수용체 차단제 (angiotensin II receptor blocker, ARB)가 사구체 비후뿐만 아니라 족세포의 변화도 억제시켰다는 보고가 있다^{9, 14-16)}. 최근 Xu 등은 ARB가 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 백서와 고포도당으로 3일간 자극한 족세포에서 p27^{Kip1}의 발현 억제를 통하여 사구체 및 세포 비후를 억제시켰다고 하였다¹⁷⁾. 그러

나 그들은 p27^{Kip1} 이외의 세포주기 조절 단백질의 발현 변화는 관찰하지 않았다.

이에 저자 등은 배양 족세포를 기존의 연구에 비하여 장기간 고포도당으로 자극한 후 족세포의 비후 여부와 p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, 그리고 p57^{Kip2}의 발현 변화를 관찰하였으며, 안지오텐신 II 수용체 차단제가 이러한 변화에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 족세포 (conditionally immortalized mouse podocyte)배양

본 실험은 미국의 Peter Mundel 교수 (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)로부터 기증받은 불멸화 마우스 족세포를 사용하였다. 이 세포는 33°C에서 gamma interferon이 포함된 배양액으로 배양 (permissive condition)하면 일반적인 상피세포와 유사하게 증식을 하지만, 37°C에서 gamma interferon이 없는 배양액으로 배양 (nonpermissive condition)하면 생체내 족세포와 유사하게 증식이 정지되면서 죽돌기를 갖는 세포로 분화 (differentiation)되는 특성을 가지고 있다. 본 연구에서는 37°C에서 2주 동안 배양하여 분화를 유발시킨 족세포를 이용하여 실험하였다.

2. 세포 실험

세포 실험은 분화된 족세포가 용기에 거의 찬 상태에서 실시하였다. RPMI 배양액을 이용하여 세포를 배양한 후 D-glucose를 이용하여 정상 포도당 (5.6 mM), 고포도당 (30 mM), 정상 포도당+안지오텐신 II (10^{-7} M), 고포도당+ARB (L-158,809, Merk, 10^{-6} M), 정상 포도당+안지오텐신 II+ARB군으로 나누어 실시하였다. 포도당에 의한 삼투압 효과를 배제하기 위해 포도당 농도가 5.6 mM인 배양액에 24.4 mM 만니톨을 첨가한 배양액도 사용하였다. 각각의 배양 조건에서 7일간 배양한 후 세포로부터 RNA와 단백을 추출하였다. 총 3회의 반복 실험을 실시하였다.

3. 세포 비후 측정

세포 비후 정도는 세포수에 대한 세포내 총 단백질의 비로 측정하였다. 100 mm 배양 용기에 상기 배양 조건으로 7일간 배양한 후 배양액을 제거하고 0.05%

trypsin과 0.21 mmol/L EDTA로 처리하여 세포들을 떼어내 원침시켰다. 이후 PBS로 세척하여 죽세포들을 재부유시킨 후 일부는 hemocytometer를 이용하여 죽 세포 숫자를 측정하는데 사용하였으며, 나머지 세포들은 0.5 mol/L NaOH로 처리한 후 개량된 Lowry 법을 이용하여 총 단백을 정량하는데 사용하였다.

4. 총 RNA 추출 및 종합효소 연쇄반응 (Polymerase chain reaction, PCR)

총 RNA를 추출하기 위하여 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA) 100 μ L로 배양한 죽세포를 처리하여 세포 균질액을 만들었다. 여기에 700 μ L의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 vortex 한 후 실온에 5분간 두었다. 이후 400 μ L의 chloroform을 첨가하고 30초간 손으로 충분히 흔들어 섞은 후 3분간 실온에 보관한 다음 4°C 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400 μ L의 isopropanol을 첨가하고 다시 4°C 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. RNA 침전물을 차가운 70% ethanol로 세척한 후 Speed Vac으로 건조시키고, DEPC로 처리한 증류수를 사용하여 희석시켰다. 분리된 RNA 순도는 spectrophotometer상 260 nm와 280 nm에서 측정된 optical density 값을 이용하여 확인하였다.

cDNA는 Boehringer Mannheim cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 제작하였다. 죽세포로부터 분리한 총 RNA 중 2 μ g의 RNA에 10 μ M random hexanucleotide primer 1 mM dNTP, 8 mM MgCl₂, 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 혼합물을 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고 99°C에서 5분간의 incubation 과정을 거친 후, -70°C에 보관하였다.

GAPDH와 p27^{Kip1} mRNA의 발현은 PCR을 이용하여 분석하였다. PCR을 위한 primer는 Life Technologies사 (Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였으며, 마우스 GAPDH sense primer 염기 서열은 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3', antisense primer 염기 서열은 5'-CCAGTCAGCTTCCCGTTCAGC-3', 마우스 p27^{Kip1} sense primer 염기 서열은 5'-

CGTGAGAGTGTCTAACGGG-3', antisense primer 염기 서열은 5'-CGAGTCAGGCATTTGGTCC-3'이었다.

종합효소 연쇄반응은 10 ng (GAPDH) 또는 20 ng (p27^{Kip1}) RNA에 해당하는 cDNA, TaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems, Inc. Foster, CA, USA), 20 μ M dNTP, 각각 25 pmol sense 및 antisense primer, 1.5 mM/L MgCl₂를 함유한 50 μ L 반응 혼합물을 사용, 95°C에서 9분 가열한 후 94.5°C에서 45초, 그리고 72°C에서 1분간 32 cycles (GAPDH) 또는 45 cycles (p27^{Kip1})를 시행한 후 마지막에는 72°C에서 7분간 더 반응시키는 방법으로 하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 PCR 산물은 0.05 μ g/mL ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하였다. TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 O.D.값을 측정하였으며, 각 실험 조건 하에서의 p27^{Kip1} mRNA의 발현 정도는 GAPDH mRNA의 발현 정도로 보정하였다.

5. 단백질 추출 및 Western blot 분석

각 군의 배양 죽세포를 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (2% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% [vol/vol] glycerol)를 이용하여 용해시킨 후, 세포 용해액을 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액내 단백질은 Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 농도를 결정한 후 등분하여 -70°C에 보관한 후 실험에 이용하였다. 동량의 단백을 Laemmli sample buffer로 처리, 100°C로 5분간 가열한 후, 8% 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 이전하였다. Membrane을 실온에서 1시간 동안 blocking buffer A (1x PBS, 0.1% Tween-20, 그리고 8% nonfat milk)로 처리한 후 p27^{Kip1}, p21^{Cip1}, p57^{Kip2}, 또는 β -actin 대한 1차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Membrane을 1xPBS와 0.1% Tween-20로 15분간 1회, 5분간 2회 처리한 후, 1:10,000으로 희

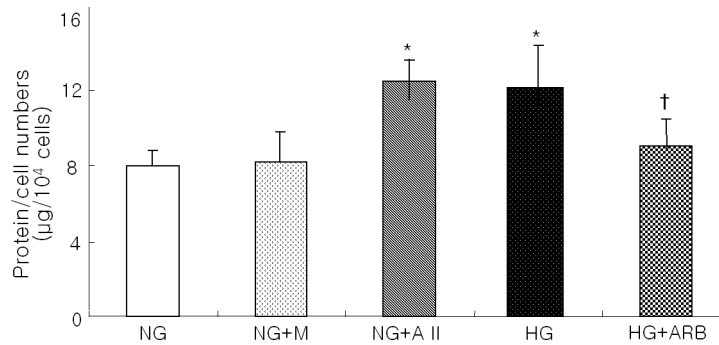


Fig. 1. Cellular hypertrophy expressed as protein/cell numbers in podocytes exposed to normal glucose (5.6 mM, NG), NG+mannitol (M, 24.4 mM), NG+angiotensin II (AII, 10⁻⁶ M), high glucose (30 mM, HG), and HG+angiotensin II receptor blocker (ARB) (L-158, 809, 10⁻⁶ M). The ratios of protein/cell number were increased by 1.5-fold in podocytes exposed to HG or AII and the increment in the ratio of protein/cell number induced by HG was significantly inhibited with ARB treatment by 70% (N=5 in each group). **p*<0.05 vs. NG, †*p*<0.05 vs. HG

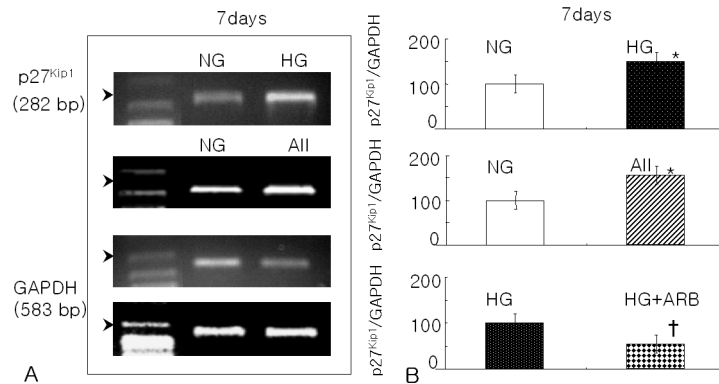


Fig. 2. (A) A representative RT-PCR electrophoresis for p27^{Kip1} and GAPDH mRNA of podocytes (N=6 in each group). (B) Values are the intensities of densitometric readings of p27^{Kip1} mRNA corrected for GAPDH mRNA. The p27^{Kip1}/GAPDH mRNA ratios of podocytes exposed to high glucose (30 mM, HG) or angiotensin II (AII, 10⁻⁶ M) were significantly higher than that of normal glucose (5.6 mM, NG). Angiotensin II receptor blocker (ARB, L-158, 809, 10⁻⁶ M) significantly ameliorated the HG-induced p27^{Kip1} mRNA expression by 75%. **p*<0.05 vs. NG, †*p*<0.05 vs. HG

석된 horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG가 함유된 buffer A에 1시간 동안 반응시킨 다음 3ience, Inc.)을 이용하여 가시화하였다. Signal은 TINA image software를 이용하여 O.D.값을 측정하였다.

6. 통계 분석

모든 결과는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 11.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 결과들은 Mann-Whitney U 검정이나 Kruskal-Wallis

다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 분석하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 의미 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 고포도당 자극에 따른 배양 족세포의 비후 및 ARB의 효과

세포 비후의 간접적인 측정 지표로 세포수에 대한 세포내 총 단백 비를 사용하였다. 고포도당군과 안지오텐신 II (10^{-7} M) 처리군에서 정상 포도당군에 비하여 동일한 족세포 수에 대한 세포내 단백질 비가 유의하게 증가되었으며 (각각 $149.6 \pm 6.5\%$, $155.2 \pm 8.1\%$, $p < 0.05$), 이와 같은 고포도당 자극에 의한 세포 비후 효과는 ARB 투여로 약 70% 억제되었다 (Fig. 1).

2. 고포도당으로 자극한 배양 족세포에서 cyclin-dependent kinase inhibitor 단백질의 차등 발현

고포도당으로 7일간 자극한 족세포에서 $p27^{Kip1}$ mRNA의 발현은 정상 포도당군의 약 1.5배 수준으로 증가된 반면 ($p < 0.05$), 양군 사이에 GAPDH mRNA의 발현에는 차이가 없었다 (Fig. 2). Western blot을

이용하여 측정된 $p27^{Kip1}$ 의 단백질 발현도 mRNA 발현과 유사하게 정상 포도당군에 비하여 고포도당군에서 유의하게 증가되었으며, TINA software를 이용하여 측정된 O.D.는 정상 포도당군에 비하여 고포도당군에서 약 2배 증가되어 있었다 ($p < 0.05$, Fig. 3). 안지오텐신 II (10^{-7} M) 처리군에서도 고포도당군과 유사하게 $p27^{Kip1}$ mRNA 및 단백질 발현이 의미있게 증가되었으며 (Fig. 2, 3), 삼투압 효과를 배제하기 위하여 만니톨을 첨가한 배양액은 $p27^{Kip1}$ 의 단백질 발현에 영향을 주지 않았다. 한편, $p21^{Cip1}$ 과 $p57^{Kip2}$ 의 단백질 발현은 정상 포도당군, 고포도당군, 그리고 안지오텐신 II (10^{-7} M) 처리군 사이에 유의한 차이가 관찰되지 않아 (Fig. 4, 5) $p27^{Kip1}$ 단백질과는 다른 양상을 나타냈다.

3. ARB가 고포도당으로 자극한 배양 족세포에서 $p27^{Kip1}$ mRNA 및 단백질 발현에 미치는 영향

고포도당으로 자극한 족세포에서 ARB (L-158,809, 10^{-6} M) 투여는 고포도당에 의한 $p27^{Kip1}$ mRNA 및 단백질 발현 증가를 각각 75%, 70% 억제시켰다 ($p < 0.05$). 또한 이와 같은 ARB 투여는 안지오텐신 II

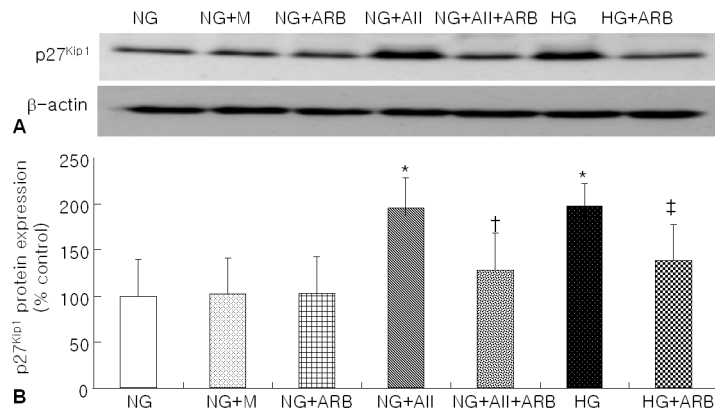


Fig. 3. (A) A representative Western blot of $p27^{Kip1}$ in podocytes ($N=4$ in each group). (B) Values are the intensities of densitometric readings of $p27^{Kip1}$ protein. Compared to normal glucose (5.6 mM, NG), the $p27^{Kip1}$ protein expression was significantly increased in podocytes exposed to high glucose (30 mM, HG) or angiotensin II (AII, 10^{-7} M). Angiotensin II receptor blocker (ARB, L-158, 809, 10^{-6} M) treatment significantly inhibited the increase in $p27^{Kip1}$ protein expression induced by HG. The mannitol (M, 24.4 mM) had no effect on the $p27^{Kip1}$ protein expression in podocytes.

* $p < 0.05$ vs. NG, † $P < 0.05$ vs. NG+AII, ‡ $p < 0.05$ vs. HG

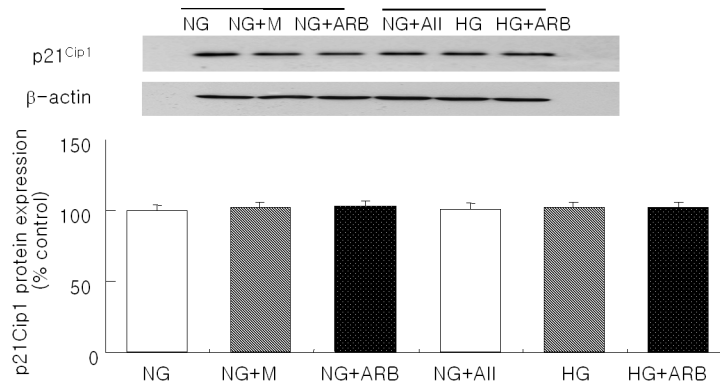


Fig. 4. A representative Western blot of p21^{Cip1} in podocytes exposed to normal glucose (5.6 mM, NG), high glucose (30 mM, HG), or angiotensin II (AII, 10⁻⁷M). There were no significant changes in p21^{Cip1} protein expression among the groups (N=4 in each group).

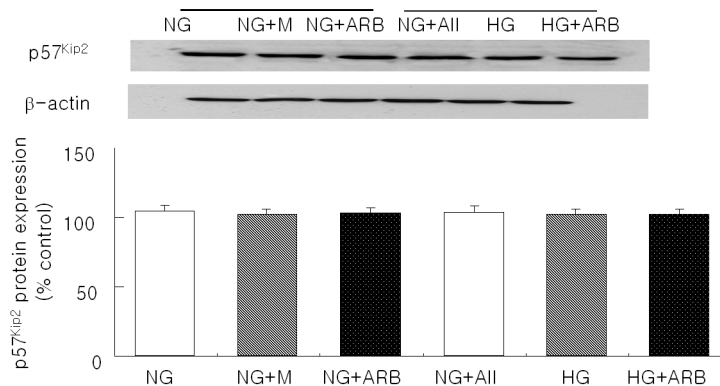


Fig. 5. A representative Western blot of p57^{Kip2} in podocytes exposed to normal glucose (5.6 mM, NG), high glucose (30 mM, HG), or angiotensin II (AII, 10⁻⁷M). There were no significant changes in p57^{Kip2} protein expression among the groups (N=4 in each group).

(10⁻⁷M) 처리군에서의 p27^{Kip1} 단백질 발현 증가도 효과적으로 억제시켰다 (p<0.05, Fig. 2, 3).

고 찰

본 연구 결과상 7일간의 고포도당 자극은 배양 마우스 족세포의 비후와 함께 p27^{Kip1} mRNA 및 단백질 발현을 증가시켰으며, 이러한 고포도당 자극에 의한 세포 비후와 p27^{Kip1}의 발현 증가는 안지오텐신 II 수용체 차단제 L-158,809에 의하여 효과적으로 억제되었다. 이는 기존의 고포도당 자극에 의한 족세포 비후

와 이에 대한 안지오텐신 II 수용체 차단제의 효과와 일치하였다.

진행된 당뇨병성 신병증은 병리학적으로 미만성 또는 결절성 사구체경화증과 세포의 기질의 축적이 특징적인 소견이지만 초기에는 주로 사구체 및 기저막의 비후가 나타난다¹⁻³⁾. 세포의 비후는 생화학적으로 DNA 복제없이 단백질과 RNA 양이 증가되면서 세포의 크기 증가가 동반되는 현상이다^{4, 5, 18)}. 이와 같은 세포 성장 과정은 세포주기의 각 단계마다 관련된 특정 성장인자들과 일련의 세포주기 조절 단백질에 의하여 엄격하게 조절되고 있다⁵⁾. 당뇨병성 신병증과 관련된

최근의 연구들을 보면, 고포도당 자극과 안지오텐신 II 등이 세포주기 조절 단백 중 cyclin-dependent kinase 억제제 (CDK inhibitor, CKI)의 발현을 증가시켜 관련 사구체 세포들을 G1기에 정지시킴으로써 세포 비후가 유발되는 것으로 보고되고 있다^{4, 7)}. 특히 세포주기 조절 단백 중 당뇨병성 신병증에서 나타나는 사구체 비후는 주로 p27^{Kip1}이나 p21^{Cip1} 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다³⁾. 배양 메산지움 세포를 고포도당으로 자극하면 초기 (24시간 이내)에는 증식이 일어나다가 이후에는 G1기에서 세포주기가 정지되고 점진적인 세포 비후가 나타난다. 즉 고포도당 자극으로 발현이 증가된 p27^{Kip1} 단백질은 세포주기 중 G1기의 후반부에 관여하는 CDK2 단백질과 결합하여 세포주기의 진행을 유발하는 cyclin-CDK2 복합체 기능을 억제하고 세포주기의 진행을 G1/S기에서 중지시킨다⁵⁻⁷⁾. 또한 p27^{Kip1} (-/-)인 메산지움 세포는 고포도당 자극에도 G1기 중지가 일어나지 않으며, 이러한 p27 (-/-)인 세포에 inducible vector system을 이용하여 p27^{Kip1} 단백을 재구성 (reconstitute)시키면 고포도당에 의한 메산지움 세포 비후가 대조군과 동일하게 유발된다. 뿐만 아니라 p27^{Kip1} 또는 p21^{Cip1}에 대한 antisense oligonucleotide 투여는 이와 같은 고포도당에 의한 세포 비후 작용을 억제시킨다¹⁹⁾.

Streptozotocin 유발 당뇨 백서²⁰⁾와 db/db 마우스 당뇨 모델⁹⁾에서도 사구체내 p27^{Kip1} 또는 p21^{Cip1} 단백질 발현 증가가 관찰되었고, p21^{Cip1} (-/-) 마우스나 p27^{Kip1} (-/-) 마우스는 당뇨가 유발되어도 사구체 비후가 억제되거나 거의 나타나지 않았다²¹⁾. 이와 같은 세포 배양 실험과 당뇨병성 신병증 동물 모델로부터 얻은 실험 결과들은 당뇨병성 신병증에서 동반되는 사구체 비후와 세포주기 조절 단백 사이의 중요한 상관관계를 보여준다.

죽세포는 사구체의 구조를 지지할 뿐만 아니라 사구체 여과장벽의 주요 구성 세포로, 사구체 여과 선택성을 유지하는데에 중요한 역할을 담당한다²²⁾. 이와 같은 죽세포는 세포주기 조절 단백질인 p27^{Kip1}과 p57^{Kip2} 단백질들의 발현이 본질적으로 증가되어 있어 세포 성장이 정지된 분화된 상피세포이다²³⁾. 최근에는 이러한 죽세포의 손상이 당뇨병성 신병증을 포함한 각종 사구체 질환의 병인으로 이야기 되어지고 있다^{24, 25)}. 제 2형 당뇨를 동반한 Pima Indian의 신생검 연구 결과를 보면, 당뇨병성 신병증의 초기 단계부터 이

미 사구체당 죽세포의 수가 감소되어 있으면서 죽돌기 (foot process)의 융합과 죽세포 비후 소견이 관찰되어진다¹³⁾. 그리고 제 2형 당뇨 동물 모델의 하나인 Zucker 비만 백서 (Zucker diabetic fatty rat, ZDF-fa/fa)에서도 사구체 용적의 증가와 함께 죽세포에 국한된 p27^{Kip1}와 p21^{Cip1} 단백질의 발현이 증가되었다는 보고가 있다. 뿐만 아니라 고포도당으로 자극한 죽세포 배양 연구에서도 죽세포 비후와 함께 p27^{Kip1} 단백질의 발현 증가가 관찰되었다¹⁰⁾. 이외에도 Kuan 등은 죽세포는 아니지만 메산지움 배양 세포에서 고포도당이 p21^{Cip1}의 단백질 발현은 증가시킨 반면 p57^{Kip2}의 발현에는 변화가 없었다고 하였다²⁰⁾. 본 연구에서도 기존의 연구 결과들^{8-10, 17, 19)}과 유사하게 장기간 고포도당으로 자극한 죽세포에서 세포 비후와 Western blot 상 p27^{Kip1}의 단백질 발현이 증가되었으나, p21^{Cip1}이나 p57^{Kip2} 단백질의 발현에는 변화가 없었다. 이와 같은 차등 발현 양상은 실험에 사용한 세포의 종류, 고포도당으로 자극한 기간, 그리고 배양액내 우테아 혈청의 농도 등에 차이가 있었기 때문으로 생각된다. 한편, 만니톨로 자극한 경우에는 죽세포의 비후나 p27^{Kip1} 단백질 발현 증가가 나타나지 않아 이와 같은 죽세포 변화는 고포도당 자극으로 유발되었을 것으로 생각된다.

안지오텐신 II는 레닌-안지오텐신계의 주요 산물로서 사구체내 고혈압을 유발하거나 TGF- β 와 같은 성장인자를 증가시켜 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행을 촉진한다³⁾. 이와 같은 안지오텐신 II는 고포도당 자극과 유사하게 세포주기 조절 단백질인 p27^{Kip1} 단백질의 발현 증가를 통하여 사구체 메산지움 세포¹⁹⁾, 신세뇨관세포²⁶⁾, 그리고 혈관 평활근세포²⁷⁾의 비후를 유발한다. 최근에는 안지오텐신 II가 죽세포에서도 p27^{Kip1}의 발현을 증가시킨다는 보고가 있었으며^{16, 17)}, 이러한 p27^{Kip1}의 발현 증가로 인하여 죽세포 비후도 일어날 것으로 생각된다. 안지오텐신 II는 죽세포의 제 1형 안지오텐신 II 수용체를 통하여 죽세포의 세포골격을 이루는 actin 섬유의 전위 (rearrangement)²⁸⁾, 죽세포 사멸 (apoptosis)²⁹⁾ 그리고 nephrin³⁰⁾이나 zonula occludens-1³¹⁾의 발현을 조절한다. 한편 안지오텐신 전환효소 억제제나 ARB는 당뇨병성 신병증에서 표준 치료제로 권장되어지는 약제로, 단백뇨를 감소시킬 뿐만 아니라 사구체 비후 및 죽세포 탈락도 예방하는 것으로 알려져 있다³¹⁻³⁴⁾.

이러한 안지오텐신 II 억제제의 효과는 사구체내

압력 감소와 같은 혈액역동학적 개선 뿐만 아니라 안지오텐신 II에 의하여 유도되는 대표적인 비후인자인 TGF- β 나 안지오텐신 II에 의한 CKI 발현 증가 억제제를 통하여 나타날 것으로 추측되고 있다³⁵⁾. Wolf 등은 제 1형 당뇨 동물 모델인 BBdp 백서의 사구체에서 Western blot과 면역조직화학적 방법을 통하여 세포주기 조절 단백질 p16^{INK4}, p21^{Cip1}, 그리고 p27^{Kip1} 단백질의 발현 증가를 관찰하였다. 그리고 3주간의 안지오텐신 전환효소 억제제 투여는 혈압이나 혈당과는 무관하게 사구체내 p16^{INK4}와 p27^{Kip1} 단백질의 발현 증가를 억제하였다⁸⁾. 본 연구에서도 ARB 투여는 장기간의 고포도당 자극에 의한 족세포 비후와 p27^{Kip1} 단백질의 발현 증가를 억제시켰으며, 이와 같은 결과는 기존의 연구 결과와 일치하였다. 이러한 ARB의 효과는 고포도당에 의하여 분비가 증가된 안지오텐신 II의 작용을 억제시켰기 때문으로 생각된다. 한편, 기존의 연구에 비하여 고용량의 ARB 사용에도 불구하고 세포 비후의 억제 효과가 더 증가하지 않았다. 이와 같은 결과는 장기간의 고포도당 자극에 의한 산화성 스트레스의 증가 등에 의하여 ARB의 효과가 경감되었을 가능성이 있다. 고농도의 안지오텐신 II 자극은 배양 족세포에서 세포사멸을 유발한다고 알려져 있다²⁹⁾. 본 연구에서도 장기간의 고포도당 자극과 고농도의 안지오텐신 II 투여가 족세포에서 세포사멸을 유발시켰을 가능성은 충분히 있으나, 족세포 비후와 CKI의 단백질 발현 변화가 주 연구 목적이었던 관계로 세포사멸 현상에 대해서는 관찰하지 않았다.

이상의 결과로 장기간의 고포도당 자극은 기존의 연구에서와 같이 족세포 비후와 함께 p27^{Kip1} mRNA와 단백질의 발현을 증가시켰으며 이러한 변화는 ARB 처치에 의하여 효과적으로 억제되었다. 따라서 당뇨병성 신병증의 표준 치료제인 안지오텐신 II 수용체 차단제는 혈압 조절이나 단백질 감소 효과 외에 추가적인 신기능 보호 효과가 있을 것으로 사료된다.

= Abstract =

Angiotensin II Receptor Blocker Induced Inhibition of Cellular Hypertrophy and Differential Expression of Cyclin-dependent Kinase Inhibitors in Cultured Podocytes Stimulated by Long-term High Glucose

Hyeong Cheon Park, M.D., Zhong-Gao Xu, M.D.
Dong-Ryeol Ryu*, M.D., Tae-Hyun Yoo, M.D.
Dong-Sub Jung, M.D., Jin Ju Kim, M.D.
Seung Jae Kwak, M.D., Jin Ji Li, M.D.
and Shin-Wook Kang, M.D.

Department of Internal Medicine, College of Medicine, Yonsei University; Department of Internal Medicine, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea*

Background : Hypertrophy of podocytes is observed in type 2 diabetic patients. Cellular hypertrophy requires combined effects of various mitogen-induced entry into the cell cycle and subsequent cell cycle arrest at the G1/S interphase. This cell cycle arrest is mediated by various cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). We investigated the effect of angiotensin II receptor blocker (ARB) treatment on podocyte hypertrophy and CKIs expression in cultured podocytes stimulated by long-term high glucose.

Methods : Immortalized mouse podocytes were cultured in media containing 5.6 mM normal glucose (NG), 30 mM high glucose (HG), or NG+angiotensin II (AII, 10⁻⁷M) for 7 days with or without ARB (L-158,809, 10⁻⁶M). Cellular hypertrophy was assessed by measurement of cellular protein/cell counts, and CKIs mRNA and protein expression were assessed by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

Results : Cellular hypertrophy was induced in podocytes exposed to HG or AII compared to NG cells and this HG-induced cellular hypertrophy was inhibited with ARB treatment by 70% (p<0.05). In addition, there were 1.5-fold and 2.0 fold increases in p27^{Kip1} mRNA and protein expression, respectively, in HG-stimulated podocytes compared to NG-treated cells (p<0.05). p27^{Kip1} mRNA and protein expression were also increased in cultured podocytes stimulated by AII by 156% and 199%, respectively

($p < 0.05$). ARB treatment ameliorated HG-induced increase in p27^{Kip1} mRNA by 75% and protein expression by 70% ($p < 0.05$). In contrast, there were no significant changes in p21^{Cip1} and p57^{Kip2} protein expression in cultured podocytes exposed to HG or AII.

Conclusion : High glucose induced significant cellular hypertrophy and increased p27Kip1 mRNA and protein expression in cultured mouse podocytes, and these changes were effectively inhibited by ARB treatment. (**Korean J Nephrol 2006;25(5):695-704**)

Key Words : Podocyte, p27^{Kip1}, High glucose, Angiotensin II receptor blocker

참 고 문 헌

- Osterby R, Gundersen HJ: Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities. *Diabetologia* **11**:225-229, 1975
- Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J, Couser WG, Seidel K: Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* **47**:935-944, 1995
- Wolf G: Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **58**(Suppl 77):S59-S66, 2000
- Shankland SJ, Wolf G: Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**:F515-F529, 2000
- Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **15**:1149-1163, 1995
- Wolf G, Ziyadeh FN: Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* **56**:393-405, 1999
- Marshall CB, Shankland SJ: Cell cycle and glomerular disease: a minireview. *Nephron Exp Nephrol* **102**:e39-e48, 2006
- Wolf G, Wenzel U, Ziyadeh FN, Stahl RA: Angiotensin converting-enzyme inhibitor treatment reduces glomerular p16INK4 and p27Kip1 expression in diabetic BBdp rats. *Diabetologia* **42**:1425-1432, 1999
- Wolf G, Schroeder R, Thaïss F, Ziyadeh FN, Helmchen U, Stahl RA: Glomerular expression of p27Kip1 in diabetic db/db mouse: role of hyperglycemia. *Kidney Int* **53**:869-879, 1998
- Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K, Nagata M: Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Lab Invest* **82**:25-35, 2002
- Tryggvason K, Wartiovaara J: Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**:543-549, 2001
- Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* **83**:253-307, 2003
- Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW: Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* **99**:342-348, 1997
- Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H: Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **15**:1379-1383, 2000
- Amann K, Nichols C, Trnig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E: Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **11**:1003-1011, 1996
- Mifsud SA, Allen TJ, Bertram JF, Hulthen UL, Kelly DJ, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE: Podocyte foot process broadening in experimental diabetic nephropathy: amelioration with renin-angiotensin blockade. *Diabetologia* **44**:878-882, 2001
- Xu ZG, Yoo TH, Ryu DR, Park HC, Ha SK, Han DS, Adler SG, Natarajan R, Kang SW: Angiotensin II receptor blocker inhibits p27Kip1 expression in glucose-stimulated podocytes and in diabetic glomeruli. *Kidney Int* **67**:944-952, 2005
- Fine LG, Norman J: Cellular events in renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol* **51**:19-32, 1989
- Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Thaïss F, Zahner G, Stahl RA: High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol* **273**:348-356, 1997
- Kuan CJ, al-Douhaji M, Shankland SJ: The cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* **9**:986-993, 1998
- Wolf G, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, Shankland SJ: High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27Kip1, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol* **158**:1091-1100, 2001

- 22) Mundel P, Kriz W : Structure and function of podocytes : an update. *Anat Embryol* **192**:385-397, 1995
- 23) Nagata M, Nakayama K, Terada Y, Hoshi S, Watanabe T : Cell cycle regulation and differentiation in the human podocyte lineage. *Am J Pathol* **153**:1511-1520, 1998
- 24) Kriz W, Gretz N, Lemley KV : Progression of glomerular diseases : is the podocyte the culprit? *Kidney Int* **54**:687-697, 1998
- 25) Pavenstadt H : Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol* **278**:F173-F179, 2000
- 26) Wolf G, Wenzel U, Hannken T, Stahl RA : Angiotensin II induces p27Kip1 expression in renal tubules in vivo : role of reactive oxygen species. *J Mol Med* **79**:382-389, 2001
- 27) Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK : Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* **62**:749-756, 1988
- 28) Benigni A, Gagliardini E, Remuzzi G : Changes in glomerular perm-selectivity induced by angiotensin II imply podocyte dysfunction and slit diaphragm protein rearrangement. *Semin Nephrol* **24**:131-140, 2004
- 29) Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, Pichler R, Griffin S, Couser WG, Shankland SJ : Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* **65**:30-39, 2004
- 30) Benigni A, Tomasoni S, Gagliardini E, Zoja C, Grunkemeyer JA, Kalluri R, Remuzzi G : Blocking angiotensin II synthesis/activity preserves glomerular nephrin in rats with severe nephrosis. *J Am Soc Nephrol* **12**:941-948, 2001
- 31) Macconi D, Abbate M, Morigi M, Angioletti S, Mister M, Buelli S, Bonomelli M, Mundel P, Endlich K, Remuzzi A, Remuzzi G : Permselective dysfunction of podocyte-podocyte contact upon angiotensin II unravels the molecular target for renoprotective intervention. *Am J Pathol* **168**:1073-1085, 2006
- 32) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* **329**:977-986, 1993
- 33) Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S : Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Eng J Med* **345**:861-869, 2001
- 34) Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P : The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Eng J Med* **345**:870-878, 2001
- 35) Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN : From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease : podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* **54**:1626-1634, 2005