

# 사람의 제2형 당뇨병성 신증의 신조직내 TGF-β-inducible Gene-h3의 발현과 유용성 - 면역조직화학적 분석 -

연세대학교 의과대학 병리학교실, 리젠바이오텍\*

홍순원 · 임범진 · 정현주 · 이동신\* · 윤희정\*

## 〈요 약〉

**목적:** 신장 베타 변형성장인자 (TGF-β)계의 활성화가 당뇨병성 신증의 주요 인자로 알려져 있다. TGF-β는 비활성형으로 생성되어 생물학적 활성도를 갖는 형태로 변형되는데, 최근에 TGF-β inducible gene-h3 (βig-h3)가 TGF-β에 의해 유도되는 유전자로써 알려지면서 TGF-β의 활성도를 시사하는 유전자로 인정받고 있다.

**방법:** 급번 실험에서는 제2형 당뇨병성 신증의 전형적인 조직소견과 임상소견을 보이는 사람을 대상으로 신 조직 내 βig-h3 발현을 보았고, TGF-β1과 그 제2형 수용체 및 Smad3에 대해서도 면역조직화학적 염색을 시행하여 비교 분석하였다.

**결과:** 이번 분석에서 βig-h3가 신조직내에 분포하는 양상을 보면, 당뇨병성 신증의 11예 중 5예는 사구체에, 7예는 세뇨관에 염색이 증가되어 있는 소견이 있었고, 정상 대조군의 경우 사구체나 세뇨관 모두 전혀 발현되지 않았다. TGF-β1의 염색 결과, 정상 조직에서는 전혀 염색되지 않는 양상을 보인 반면, 당뇨병성 신증에서는 사구체에서는 11예 중 3예와 세뇨관에서는 11예 중 1예에서 과염색된 것을 관찰할 수 있었으나, 통계학적인 의의는 없었다. TβRII의 염색 결과, 세뇨관 발현은 정상과 별 차이가 없었으나, 사구체는 당뇨병성 신증인 경우 11예 중 6예에서 과염색된 반면, 정상에서는 3예 중 1예에서 과염색되어 당뇨병성 신증에서 증가되어 있었다. Smad3의 염색 결과, 당뇨병성 신증과 정상 모두 사구체 및 세뇨관에 발현되었고, 단위 사구체 당 염색된 세포의 수로 비교하여 당뇨병성 신증에서 49.1±0.3으로 정상 (40.9±0.8)에 비해 약간 증가하였다.

**결론:** 이상의 결과를 종합하여 사람의 제2형 당뇨병성 신증에서 βig-h3 발현이 TGF-β계의 활성화를 잘 반영하는 것으로 생각되어 병의 진행을 파악하는데 도움이 될 것으로 생각한다. 앞으로 조직학적으로나 생화학적으로 βig-h3 발현을 조사함으로써 질환의 진단 및 진행을 파악하는데 유용한 인자로써의 개발이 필요할 것으로 생각한다.

## 서 론

당뇨병에 의한 신증은 만성 신부전의 중요한 원인

본 논문은 2001년 연세대학교 의과대학 해의연수교수 연구비 (2001-03)로 수행하였음.

접수: 2004년 5월 7일, 승인: 2004년 6월 11일

책임저자: 홍순원 서울시 강남구 도곡동 146-92

연세의대 영동세브란스병원 진단병리과

Tel: 02)3497-3543, Fax: 02)3463-2103

E-mail: soonwonh@yumc.yonsei.ac.kr

으로 알려져 있고, 한국을 비롯한 동양에서는 제 2형 당뇨병의 빈도가 제1형 당뇨병에 비해 높은 것으로 알려져 있다. 당뇨병성 만성 신부전 환자의 절반이 제 2형 당뇨병에 의한 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 당뇨병성 신증의 초기부터 말기까지 신장 손상의 주요 인자가 되는 cytokine은 TGF-β로써 고혈당과 깊은 연관이 있다는 것이 잘 알려져 있는 바이다<sup>2-9)</sup>. 다각도로 당뇨병성 신증의 발현을 지연시키고자 연구되고 있고, 혈당자체를 정상화 시키는 것이 가장 기초적으로 생

각할 수 있는 방법이다. 당뇨병 자체가 만성 질환이기 때문에 혈당조절의 어려움이 자주 발생하고 신부전으로 발전하는 여러 중간단계의 차단에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다. 따라서 만성신부전으로 발전하는 경로로 알려져 있는 TGF- $\beta$  계에 대한 연구가 주목을 받는 것은 당연한 일이라 생각한다. TGF- $\beta$ 는 주로 smad에 의해 하부 신호 전달이 이루어지는 것으로 알려져 있으나, smad와 관계 없는 하부 신호 전달 경로도 연구되고 있다. 저자는 smad계가 연관이 있음을 동물 실험을 통해 밝혔으나, 사람이 있어서는 어떤 역할을 하는지 잘 알려져 있지 않았다<sup>10, 11</sup>.

TGF- $\beta$ 1의 발현으로 TGF- $\beta$ 1 자체의 발현을 보는 방법도 있지만, TGF- $\beta$ 1 활성화 산물을 발견함으로써 TGF- $\beta$ 1가 작용함을 간접적으로 알 수 있다. 세포외기질 중 콜라겐과 fibronectin 등의 증가가 보고되어 있으나, TGF- $\beta$ 1 특이적인 발현은 아니다. 따라서 최근에 TGF- $\beta$ 1 특이적으로 발현하는  $\beta$ ig-h3의 발견은 TGF- $\beta$ 1 연구에 중요한 결과물로서 인정받고 있다<sup>12-19</sup>. 또한 이는 TGF- $\beta$ 1에 비해 검출 양이 많아 비교적 쉽게 그 발현을 알 수 있어 소변 검사 등으로 질환의 활성 정도를 예측하는 인자로 상용하고자 연구가 활발하다<sup>20-23</sup>. 따라서 당뇨병성 신증 조직 내에서의 발현을 보는 것은 중요한 의미가 있는 일이다.

급변 실험에서는 제2형 당뇨병성 신증의 전형적인 조직조건과 임상조건을 보이는 사람의 신 조직을 대상으로 하여,  $\beta$ ig-h3 발현을 보았고, TGF- $\beta$ 1과 그 제2형 수용체 및 Smad3에 대해서 면역조직화학 염색을 시행하여 비교 분석하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1995년 1월부터 2001년 2월까지 연세의료원에 내원한 환자들 중 당뇨병성 신증으로 조직학적으로 진단되고, 여분의 조직 절편이 가능한 11예를 대상으로 하였으며, 신세포암종으로 수술한 조직 중 정상 조직 3예를 대조군으로 하였다.

임상적인 소견은 의무기록지를 참고하였으며, 검사실 소견과 함께 조직학적 소견을 재검토하고,  $\beta$ ig-h3, TGF- $\beta$ 1과 그 제2형 수용체 및 Smad3에 대해서 면역조직화학 염색을 시행하여 관찰 분석하였다.

### 2. $\beta$ ig-h3 TGF- $\beta$ 1, T $\beta$ RII, Smad3에 대한 면역조직화학 염색

$\beta$ ig-h3, TGF- $\beta$ 1, TRII, Smad3에 대한 면역조직화학 염색은 Labeled Streptavidin biotin 염색법 (Zymed Laboratory, Cap-Plus Detection kit, South San Francisco, CA)으로 시행하였다. 탈 파라핀 후 증류수에서 10분 정도 함수과정을 거치고, 항원 부활 처리를 위해 10 mM 구연산 완충액 (citrate buffer pH 6.0)에 넣고 10분간 전자레인지에서 끓인 후 꺼내어 실온에서 식혔다. 슬라이드는 내인성 과산화효소 활성도를 저지하기 위해 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>으로 15분간 처리하고, Tris Buffered Saline (TBS)에 10분간 세척 후 단백저지용액에 15분 처리한다. 슬라이드는 일차항체를 처리한 후 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 각 일차항체는 다음과 같다:

$\beta$ ig-h3 (Polyclonal, 1:50, 리젠바이오텍, 서울, 한국), TGF- $\beta$ 1 (Polyclonal, 1:100, Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), TRII (Polyclonal, 1:100, Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), Smad3 (Polyclonal, 1:100, Zymed Laboratory, South San Francisco, CA), 세 차례 TBS로 세척한 후 biotin 처리된 이차항체로 실온에서 15분간 반응시켰다. 세 차례 TBS로 세척한 후 streptavidin-HRP로 15분간 반응시키고 TBS로 세척, Nova RED substrate kit (VECTOR Laboratory, Burlingame, CA)로 발색한 후 증류수에서 발색저지, Harris Hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, 탈색과 현색 과정을 거친 후 탈수, 투명, 봉입과정을 거쳐 검경하였다.

#### 1) 면역조직화학 염색의 분석

생검에 포함된 모든 사구체와 세뇨관을 분석대상으로 하였으며, 정상 대조군의 사구체는 임의로 20개의 사구체를 선택하였고, 세뇨관은 10개의 40배 시야를 임의 선택하여 분석하였다<sup>10</sup>.  $\beta$ ig-h3와 T $\beta$ RII는 중등도의 강도로 관찰시야 50% 이상 염색되었을 때 양성으로 판정하였다. TGF- $\beta$ 1 역시 같은 방법으로 판정하였으나, 사구체는 10% 이상의 염색을 양성으로 보았다. 염색의 강도를 image analyzer (Image-Pro Plus 3.0)을 이용하여 측정하였다. Smad3는 핵 염색이 된 경우가 50% 이상일 경우 양성으로 판정하였다.

#### 2) 통계학적 분석

임상 양상 및 염색 결과 중 연속적인 값은 unpair-

ed Student's t-test로 범주형 자료는 chi-square test로 비교 분석하였고, 통계적 유의성은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

## 결 과

### 1. 임상조건

당뇨병성 신증 환자는 평균 나이 50.8세로 정상 대조군 59.0세에 비해 젊은 편이었으나, 통계학적 의의는 없었다. 남녀비는 8 대 3으로 남자가 많이 포함되었다. 당뇨병성 신증 환자 11명 중 모두가 단백뇨를 주소로 하였고, 10명은 고혈압, 7명은 신증후군이 있

었다. 당뇨는 진단 받은 지 평균 12년으로 2주부터 25년까지 다양하였다 (Table 1).

### 2. 조직학적 소견

모든 당뇨병성 신증에서 미만성 사구체경화 소견과 중등도의 세뇨관 위축 및 간질내 단핵구 침윤이 관찰되었고, 6에는 결절성 사구체 경화 소견을 보였다 (Table 2). 대조군은 대부분 정상 사구체 구조를 보이고, 세뇨관과 간질에 특이 소견이 없었으나, 종양 주변 일부 조직에서 간질 내 섬유화 소견을 보였다 (Fig. 1A & 1B).

Table 1. Clinical Manifestations of Diabetic Nephropathy Patients

	Diabetic nephropathy (11)	Normal control (3)	p value
Age (year old)	50.8	59.0	0.09
Sex (M:F)	8:3	1:2	0.2
Proteinuria	11	0	
24hr proteinuria (mg/24hr)	35.2±1.53	ND	
Cr (mg/dL)	2.5±0.25	1.2±0.1	0.47
Albumin (g/dL)	2.7±0.05	3.7±0.05	0.02
Hypertension	10	0	
Systolic (mmHg)	153.0±1.35	125.0±0.45	0.03
Diastolic (mmHg)	90.4±0.56	80.0±0.0	0.05
Diabetic duration	12 years (2weeks to 25 years)		0.01

Mean ±SD, p<0.05

Table 2. Histologic and Immunohistochemical Results

	Diabetic nephropathy (11)	Normal control (3)	p value
Nodular			
Glomerulosclerosis	6	0	0.095
TGF- $\beta$ 1			
Glomerulus	3	0	0.308
Tubule	1	0	0.568
TRII			
Glomerulus	6	1	0.424
	19.3±0.7 (%)	5.9±0.6 (%)	0.005
Tubule	11	3	NA
Smad3			
Glomerulus	11	3	NA
	49.1±0.3 (%)	40.9±0.8 (%)	0.01
Tubule	11	3	NA
$\beta$ ig-h3			
Glomerulus	5	0	0.145
Tubule	7	0	0.051

Mean ±SD, p<0.05, NA: not available

**Fig. 1.** *The histologic and immunohistochemical results. The histology of (A) the normal kidney and (B) the diabetic kidney showing nodular glomerulosclerosis. The immunohistochemical stain for  $\beta$ ig-h3 reveals greater glomerular and tubular expression in the diabetic kidney (D) than the normal kidney (C). The immunohistochemical stain for TGF- $\beta$ 1 demonstrates a few stainable cells in diabetic glomerulus (F), but not in normal (E). The immunohistochemical stain for TGF- $\beta$  receptor II shows little more increased expression in the diabetic kidney (H) than normal (G). The immunohistochemical stain for smad3 shows little more increased glomerular intranuclear translocation in the diabetic kidney (J) than the normal kidney (I  $\times$ 400).*

### 3. 면역조직화학적 염색소견

#### 1) $\beta$ ig-h3의 염색 결과

당뇨병성 신증의 11예 중 5예는 사구체에, 7예는 세뇨관에 염색이 증가되어 있는 소견이 있었고 (Table 2), 섬유화가 되어 있는 간질보다는 세뇨관에서 강하게 표현되는 양상이 특징적이었다 (Fig. 1C & 1D). 정상 대조군의 경우 사구체나 세뇨관의 손상이 없는 곳을 비교하면 전혀 발현되지 않지만, 일부의 비특이적인 섬유화가 진행된 곳을 보면 간질에 염색되는 경우가 있었으나, 세뇨관에는 염색되지 않는 것을 알 수 있었다.

#### 2) TGF- $\beta$ 1의 염색 결과

정상 조직에서는 전혀 염색되지 않는 양상을 보인 반면, 당뇨병성 신증에서는 사구체에서는 11예 중 3예와 세뇨관에서는 11예 중 1예에서 과염색된 것을 관찰할 수 있었으나, 통계학적인 의의는 없었다 (Table 2, Fig. 1E & 1F).

#### 3) T $\beta$ RII의 염색 결과

T $\beta$ RII의 염색은 당뇨병성 신증의 세뇨관은 물론 정상 세뇨관에서도 모두 발현되어 세뇨관 발현은 비교하기 어려웠다. 그러나 사구체는 당뇨병성 신증인 경우 11예 중 6예에서 과염색된 반면, 정상에서는 3예 중 1예에서 과염색되어 당뇨병성 신증에서 증가되어 있다고 볼 수 있었으나, 통계학적 의의는 없었다. 단위 사구체 당 염색된 부위를 비교하여 당뇨병성 신증에서  $19.3 \pm 0.7\%$ 으로 정상 ( $5.9 \pm 0.6\%$ )에 비해 증가되어 있었다 (Table 2, Fig. 1G & 1H).

#### 4) Smad3의 염색 결과

Smad3의 염색은 Smad3의 핵내 전위를 보는 것으로 당뇨병성 신증과 정상 모두 사구체 및 세뇨관에 발현되었고, 단위 사구체 당 염색된 세포의 수로 비교하여 당뇨병성 신증에서  $49.1 \pm 0.3\%$ 으로 정상 ( $40.9 \pm 0.8\%$ )에 비해 약간 증가하였다 (Table 2, Fig. 1I & 1J).

## 고 찰

본 실험에서  $\beta$ ig-h3 단백질이 사람의 제2형 당뇨병성 신증의 조직내에서 발현됨을 알 수 있었고, 특히 세뇨관에 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 동물 실험으로 정상 및 당뇨쥐의 신장내 발현을 연구한 논문에서

는 in situ hybridization에 의해  $\beta$ ig-h3 유전자가 정상 및 당뇨 쥐의 근위세뇨관 (S3 분절)과 토리결 장치에서 발현됨을 증명하였고, 양적으로는 약 2배정도 증가하였다고 보고하였다<sup>20</sup>). 최근에 보고에 의하면, 당뇨쥐에 있어서  $\beta$ ig-h3 단백질이 근위세뇨관의 S3 분절에 다량 발현되고, 일부의 상행 세뇨관고리와 사구체 체세포에서 발현될 뿐 아니라, 사람의 근위세뇨관 상피세포의 배양실험에서도 발현되는 것이 알려졌다<sup>21</sup>). 사람의 신조직내에서  $\beta$ ig-h3의 발현은 cyclosporine 신증 환자의 조직에서 처음으로 보고되었으며, 이 논문에서  $\beta$ ig-h3 단백질은 cyclosporine 신증 환자의 원위 곡세뇨관과 사구체의 체세포에서 발현되지만, 정상 대조군인 경우 발현되지 않는다고 보고하였다<sup>22</sup>). 정상 대조군에서  $\beta$ ig-h3 단백질이 동물 실험과는 달리 발현되지 않았는데 이는 금번 실험과 일치하는 소견이었다. 이상의 결과들을 종합해서 보면, 사람이든 동물이든  $\beta$ ig-h3 단백질은 세뇨관에서 발현하는 것을 알 수 있다. 그러나 동물 실험과는 달리 정상에서는 발현되지 않는 것으로 보아 사람에게 있어서 더욱 신 손상을 예측하는 특이성을 갖는 유전자로 볼 수 있을 것으로 생각한다. 또한 금번 실험에서는 일부 사구체의 맥관막 세포에도 발현됨을 알 수 있었다. 그러나 당뇨병성 신증 환자의 신 조직내  $\beta$ ig-h3 단백질 발현을 밝힌 것은 본 연구가 처음으로써 후속 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각한다.

본 실험에서 TGF- $\beta$ 1의 발현이 당뇨병성 신증의 사구체에서 증가한 것으로 보였으나 통계학적 의의는 없었다. 실제 제 2형 당뇨병성 신증의 동물 실험에서도 면역 염색으로는 TGF- $\beta$ 1 단백질의 발현 증가를 통계학적으로 증명하지 못했다<sup>10</sup>). 따라서 좀 더 객관적인 TGF- $\beta$ 계의 활성도를 표현하는 인자를 찾아내는 것이 환자의 예후의 짐작에 도움이 될 것이다.  $\beta$ ig-h3 단백질은 1992년 Skonier 등이 처음 발견하여 알려졌는데, 이는 TGF- $\beta$ 계의 활성도를 대변할 수 있는 물질로 소개되었다. 세포 배양 실험에서 TGF- $\beta$ 1을 투여한 경우 농도의 증가에 따라  $\beta$ ig-h3 유전자의 발현이 증가됨도 보고되었다<sup>20</sup>).

TGF- $\beta$ 는 당뇨병성 신증의 초기부터 말기까지 지속적으로 관여하는 유전자로 알려져 있으나, 초기 당뇨병성 신증에 의한 단백질이 있을 때는 아직 소변내 TGF- $\beta$ 의 발현을 검출해 낼 수 없어 조기 진단에 어려움이 있다. 또한 당뇨병이 진행되어도 단백질이

나타나지 않거나, 치료에 의해 TGF- $\beta$ 1은 감소 하였어도 단백뇨가 검출되는 등 단백뇨와 TGF- $\beta$ 와의 관계는 아직 논의의 대상이 되고 있다<sup>24)</sup>. Lee 등은 사람에게 있어서 소변내  $\beta$ ig-h3 단백을 발견함으로써 TGF- $\beta$ 나 albuminuria에 비해 초기 병변을 대변할 수 있다고 하였으나<sup>21)</sup>, 본 실험에서는 말기 병변에서 오히려 TGF- $\beta$  단백 발현을 찾기 어려움에도 불구하고  $\beta$ ig-h3 단백의 발현은 지속적으로 나타남으로 당뇨병성 신증의 진행을 예측하는 인자가 될 것으로 생각한다. 따라서 TGF- $\beta$ 1 보다  $\beta$ ig-h3 단백의 발현을 신 조직내에서 확인함으로써 신질환의 예후를 측정하는 기반이 될 것으로 생각한다.

본 실험에서는 다른 보고들과는 달리 사구체간질 세포에 표현이 증가되는 것을 볼 수 있는데, 이는 본 실험에 포함된 조직이 사구체 간질 세포의 증식과 기질의 증가가 두드러진 당뇨병성 신증 말기의 소견을 보이기 때문인 것으로 생각한다. 따라서 당뇨병 신증 초기에는 신세뇨관부터 시작한  $\beta$ ig-h3 단백 발현이 신증이 진행하면서 세뇨관외에도 사구체의 사구체간질세포까지 발현하는 것을 알 수 있었다. 이는 병변의 말기에 조직내에서 TGF- $\beta$ 의 발현이 감소하는 것과는 다른 소견으로  $\beta$ ig-h3 단백의 발현은 병변이 지속 및 악화됨에 따라 섬유화와 같이 축적되어 나타나는 것으로 TGF- $\beta$  계의 관여 및 활성화 모두를 반영하는 인자로 생각되며, 활성화 후에도 소실되지 않는 흔적으로 작용하던지 섬유화를 진행하는 인자로 작용할지는 연구해 보아야 할 것으로 생각한다.

부수적인 발견으로 생각되는 것으로는 정상 신장의 일부 비특이적인 섬유화가 있는 부위에는 세뇨관내 발현은 관찰되지 않고 간질내에서만 발현되는 소견을 보이나, 당뇨병 신증에서 세뇨관 발현을 보이는 것은 질환의 기전이 세뇨관세포에서 시작되는 병변임을 시사하는 특이적인 소견으로 생각한다. 따라서 조직 검사에서 세뇨관내  $\beta$ ig-h3 단백을 발견하는 것이 세뇨관 특이적 병변 즉 당뇨병성 신증을 진단하는데 도움이 될 것으로 생각한다.

본 실험에서 같이 시행한 면역 염색으로 TGF- $\beta$  수용체 및 smad와  $\beta$ ig-h3 단백질의 발현을 비교해 보면 TGF- $\beta$  수용체는 정상 세뇨관에서도 발현되기 때문에  $\beta$ ig-h3 단백질의 세뇨관 발현과는 비교할 수 없었으나, TGF- $\beta$  수용체는 정상 사구체에서는 3예 중 1예에서만 발현되고, 당뇨병성 신증의 사구체에서

는 11예 중 6예에서 발현됨을 알 수 있었다. 이는 TGF- $\beta$ 1 단백질이 제 2형 당뇨병성 신증에서 잘 발현되지 않음에도 불구하고 TGF- $\beta$  계가 관여하고 있음을 시사하는 소견으로 인정할 수 있다. 이는 다른 논문에서 제 2형 당뇨병인 경우 TGF- $\beta$ 1 자체 보다는 수용체가 더욱 신 질환의 형성에 관여한다는 것과 잘 일치하는 소견으로 생각되고<sup>10)</sup>,  $\beta$ ig-h3 단백질의 발현 부위는 TGF- $\beta$  수용체와 다르지만 역시 당뇨병성 신증의 세뇨관에서 증가함으로 TGF- $\beta$  계가 관여함을 시사하는 소견으로 생각하고 이들 발현의 연관성에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다. 마찬가지로 smad와  $\beta$ ig-h3 단백질 발현간의 관계를 보면, smad3의 핵내 전이는 정상 신장에서 어느 정도 나타나기 때문에 단위 사구체 당 염색된 세포의 수로 비교하여 당뇨병성 신증에서  $49.1 \pm 0.3$ 으로 정상 ( $40.9 \pm 0.8$ )에 비해 약간 증가하였다. 당뇨병성 신증에 있어 smad의 연관성은 아직 연구 중에 있으나 대부분은 smad계에 의한 신호 전달이 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러나 일부의 신호전달은 smad계와 무관한 경로로 이루어지는 것으로 알려져 있다<sup>11)</sup>. 이번 실험에서는 smad가 당뇨병성 신증의 신호 전달을 담당한다는 결론을 내기 어려울 것으로 생각하며, 따라서  $\beta$ ig-h3 단백 발현과의 연관성을 찾기 어려울 것으로 생각한다. 따라서 TGF- $\beta$  계의 마지막 단계 유전자로써 활성도를 증명하는  $\beta$ ig-h3 단백질의 발현은 이런 중간 경로 및 TGF- $\beta$  계 역할을 규명하는데 중요한 인자로 인정받을 만하다.

요약하면  $\beta$ ig-h3 단백질이 사람의 제2형 당뇨병성 신증의 조직내에서 발현됨을 알 수 있었고, 특히 세뇨관에 발현이 증가됨을 알 수 있었다. 또한 동물과는 달리 정상 조직내에서는 발현되지 않는 것을 알 수 있었다.

말기 병변에서 오히려 TGF- $\beta$  단백 발현을 찾기 어려움에도 불구하고  $\beta$ ig-h3 단백질의 발현은 지속적으로 나타남으로 당뇨병성 신증의 진행을 예측하는 인자가 될 것으로 생각한다. 당뇨병성 신증에 있어서는 신세뇨관 외에 사구체의 간질 세포에도 발현됨을 알 수 있었고 이는 당뇨병성 신증 말기의 소견 때문인 것으로 생각한다. 비특이적 섬유화 병변에서는 세뇨관 염색이 되지 않는 것으로 보아 당뇨병성 신증 특이성이 있는 것으로 보인다. TGF- $\beta$  수용체는 당뇨병성 신증 발전에 기여하는 것을 알 수 있는 반면,

smad는 그 기여도를 인정할 수 없는 소견이었다.

## 결론

이상의 결과를 종합하여 사람의 제2형 당뇨병성 신증에서  $\beta$ ig-h3 발현이 TGF- $\beta$  계의 활성화를 잘 반영하는 것으로 생각되어 병의 진행을 파악하는데 도움이 될 것으로 생각한다. 앞으로 조직학적으로나 생화학적으로  $\beta$ ig-h3 발현을 조사함으로써 질환의 진단 및 진행을 파악하는데 유용한 인자로써의 개발이 필요할 것으로 생각한다.

= Abstract =

### Renal Expression and Usefulness of TGF- $\beta$ -inducible Gene-h3 in Human Type II Diabetic Nephropathy - Immunohistochemical Analysis -

Soon Won Hong, M.D., Beom Jin Lim, M.D.  
Hyeon Joo Jeong, M.D., Dongsin Lee-Yoon, M.D.\*  
and Hee Jeong Yun, M.S.\*

Department of Pathology, Yonsei University  
College of Medicine, Seoul,  
REGEN Biotech\*, Inc, Seoul, Korea

**Background :** Activation of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) system has been implicated in the pathological change of diabetic nephropathy such as renal hypertrophy and accumulation of extracellular matrix. In tissues, TGF- $\beta$  is secreted as a biologically inactive complex requiring in vivo activation. Thus, increased TGF- $\beta$ 1 mRNA or protein may not necessarily reflect parallel changes in TGF- $\beta$ 1 biologic activity. TGF- $\beta$ 1 inducible gene-h3 ( $\beta$ ig-h3) is a novel gene uniquely up-regulated by active TGF- $\beta$ 1.

**Methods :** For evaluating the  $\beta$ ig-h3 protein expression in human diabetic nephropathy, we examined the expression of  $\beta$ ig-h3 protein, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$  type II receptor (TRII) and Smad protein intranuclear translocation by immunohistochemistry in human diabetic nephropathy tissues (n=11) and normal renal tissue (n=3).

**Results :** The  $\beta$ ig-h3 protein was expressed in diabetic tubular epithelium (diabetes vs. normal 7/11 vs. 0/3) and diabetic glomerulus (diabetes vs. normal 5/11 vs. 0/3). The tubular expression was stronger than the interstitial expression. The TGF- $\beta$ 1 was expressed in diabetic tubular epithelium (diabetes vs.

normal 1/11 vs. 0/3) and diabetic glomerulus (diabetes vs. normal 3/11 vs. 0/3). The TGF- $\beta$  type II was expressed more in diabetic glomerulus (diabetes vs normal 6/11 vs. 1/3). But in the tubule, the expression didn't show any significant difference. The number of intranuclear translocation of Smad protein in glomerulus (diabetes vs normal  $49.1 \pm 0.3$  vs.  $40.1 \pm 0.8$ ) was increased in diabetes, but the tubular manifestation was not significant.

**Conclusion :** We propose that TGF- $\beta$  system mediates human diabetic nephropathy through  $\beta$ ig-h3 protein expression. The  $\beta$ ig-h3 protein expression could be a useful marker expecting of disease activity and progress. (*Korean J Nephrol* 2004;23 (4):559-566)

**Key Words :** Diabetic nephropathy, Human, TGF- $\beta$ ,  $\beta$ ig-h3 protein, Immunohistochemistry

## 참고 문헌

- 1) 대한당뇨병학회 : 당뇨병성 신증 : 당뇨병학. 서울. 고려의학. 1998
- 2) Chen S, Hong SW, Iglesias-de la Cruz MC, Isono M, Casaretto A, Ziyadeh FN : The key role of the transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Ren Fail* 23:471-481, 2001
- 3) Ziyadeh FN, Sharma K, Erickson M, Wolf G : Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 93:536-542, 1994
- 4) Chen S, Cohen MP, Lautenslager GT, Shearman CW, Ziyadeh FN : Glycated albumin stimulates TGF- $\beta$ 1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 59:673-681, 2001
- 5) Ko KS, Ihm CG, Kim HJ, Lee TW, Kim MJ : The effects of high glucose concentration, angiotensin II and its blockers on the production of IL-6 and fibronectin in cultured human mesangial cells. *Korean J Med* 61:399-408, 2001
- 6) Ha HJ, Kim YJ, Han DC, Lee HB : Effects of graded control of blood glucose with insulin on the progression of experimental diabetic nephropathy. *Korean J Nephrol* 18:894-903, 1999
- 7) Sohn KY, Kim IS, Kim BW, Kim JG, Ha SW, Nam JH, Koo SM, Park RW, Kweon S : Effect of transforming growth factor-B1 and platelet

- derived growth factor on synthesis and gene expression of collagen and non-collagen protein in aortic smooth muscle cells cultured in different concentrations of insulin and glucose. *J Korean Diabet Assoc* **23**:518-529, 1999
- 8) Kim NH, Oh JH, Kim YH, Park IB, Kim SJ, Baik SH, Choi DS : Serum levels of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in type 2 diabetic patients. *J Korean Diabet Assoc* **22**:522-530, 1998
  - 9) Choi KH, Kang SW, Lee HY, Han DS : The effects of high glucose concentration on angiotensin II- or transforming growth factor- $\beta$ -induced DNA synthesis, hypertrophy and collagen synthesis in cultured rat mesangial cells. *Yonsei Med J* **37**:302-311, 1996
  - 10) Hong SW, Isono M, Chen S, Iglesias-de la Cruz MC, Han DC, Ziyadeh FN : Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor- $\beta$ 1, its type II receptor, and activation of the smad signaling pathway in the db/db mouse. *Am J Pathol* **158**:1653-1663, 2001
  - 11) Derynck R, Zhang YE : Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* **425**:577-584, 2003
  - 12) Skonier J, Neubauer M, Madisen L, Bennett K, Plowman GD, Purchio AF : cDNA cloning and sequence analysis of beta ig-h3, a novel gene induced in a human adenocarcinoma cell line after treatment with transforming growth factor- $\beta$ . *DNA Cell Biol* **11**:511-522, 1992
  - 13) Skonier J, Bennett K, Rothwell V, Kosowski S, Plowman G, Wallace P, Edelhoff S, Distech C, Neubauer M, Marquardt H, Rodgers J, Purchio AF : beta ig-h3 : a transforming growth factor- $\beta$ -responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment in vitro and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol* **13**:571-584, 1994
  - 14) Dieudonne SC, Kerr JM, Xu T, Sommer B, De-Rubeis AR, Kuznetsov SA, Kim IS, Gehron Robey P, Young MF : Differential display of human marrow stromal cells reveals unique mRNA expression patterns in response to dexamethasone. *J Cell Biochem* **76**:231-243, 1999
  - 15) Kim JE, Kim EH, Han EH, Park RW, Park IH, Jun SH, Kim JC, Young MF, Kim IS : A TGF- $\beta$ -inducible cell adhesion molecule, betaig-h3, is downregulated in melorheostosis and involved in osteogenesis. *J Cell Biochem* **77**:169-178, 2000
  - 16) Rawe IM, Zhan Q, Burrows R, Bennett K, Cinton C : Beta-ig. Molecular cloning and in situ hybridization in corneal tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**:893-900, 1997
  - 17) LeBaron RG, Bezverkov KI, Zimber MP, Pavele R, Skonier J, Purchio AF : Beta IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor- $\beta$ , is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* **104**: 844-849, 1995
  - 18) Ha SW, Yeo HJ, Bae JS, Chung SC, Kim JG, Kim IS, Lee IK, Kim BW : Effect and mechanism of high glucose level on the expression of an adhesion protein, beta ig-h3, and cellular function in endothelial cells. *J Korean Diabet Assoc* **27**: 323-331, 2003
  - 19) Ha SW, Jung GH, Yeo HJ, Bae JS, Lee SH, Kim JG, Park RW, Kim IS, Kim BW : Effect of transforming growth factor-induced gene product, beta ig-h3 on proliferation, migration, and adhesion of aortic smooth muscle cells cultured in high glucose. *J Korean Diabet Assoc* **26**:286-295, 2002
  - 20) Gilbert RE, Wilkinson-Berka JL, Johnson DW, Cox A, Soulis T, Wu LL, Kelly DJ, Jerums G, Pollock CA, Cooper ME : Renal expression of transforming growth factor- $\beta$  inducible gene-h3 (beta ig-h3) in normal and diabetic rats. *Kidney Int* **54**:1052-1062, 1998
  - 21) Lee SH, Bae JS, Park SH, Lee BH, Park RW, Choi JY, Park JY, Ha SW, Kim YL, Kwon TH, Kim IS : Expression of TGF- $\beta$ - $\beta$ ig-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. *Kidney Int* **64**:1012-1021, 2003 induced matrix protein
  - 22) Langham RG, Egan MK, Dowling JP, Gilbert RE, Thomson NM : Transforming growth factor- $\beta$ 1 and tumor growth factor- $\beta$ -inducible gene-H3 in nonrenal transplant cyclosporine nephropathy. *Transplantation* **72**:1826-1829, 2001
  - 23) Paul LC : Beta (ig) H-3 : why should we know about this molecule? *Transplantation* **72**:1725-1726, 2001
  - 24) Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K : Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- $\beta$  antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8015-8020, 2000