대한신장학회지 제 22 권 제 5 호 2003년; 483~493

고포도당이 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK 활성화 및 Fibronectin 생성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 신장질환연구소

유태현 · 허종호 · 류동열 · 김현욱 · 이수현 · 김진주
정동섭 · 최규헌 · 이호영 · 한대석 · 강신욱

〈요 약〉

목 적 : 고포도당으로 자극한 백서 메산지움 배양세포에서 p38 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성화와 p38 MAPK의 상부와 하부인자로 알려져 있는 MAPK kinase 3/6 (MKK3/6)와 c-AMP responsive element binding protein (CREB)의 활성화, 그리고 fibronectin 합성을 자극 시간에 따라 관찰하고, p38 MAPK 경로와 fibronectin 합성 사이의 연관성을 규명함으로서 당뇨병성 신증의 병태생리를 규명하고자 하였다.

방 법 : 백서 메산지움 배양세포를 정상 포도당 (5.6 mM), 고포도당 (30 mM), 또는 정상 포도당+만니톨 (24.4 mM)로 자극한 후 첫째 p38 MAPK; 둘째 p38 MAPK의 상부 인자인 MKK3/6; 셋째 p38 MAPK의 하부인자인 CREB; 넷째 MAPK phosphatase-1 (MKP-1)의 변화를 자극 시간 (3분-48시간)에 따라 Western blot을 이용하여 관찰하였으며, 다섯째 fibronectin의 변화는 RT-PCR과 ELISA를 이용하여 확인하였다.

결 과 : 고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK 경로가 활성화되었다. Total p38 MAPK 단백은 변화가 없었으나, 활성화된 phospho-p38 MAPK 단백은 고포도당군에서 자극 10분 후부터 정상 포도당군에 비해 의의있게 증가되었으며 (평균 1.9배), phospho-CREB 단백 역시 고포도당군에서 자극 10분 후부터 의미있게 증가되었다 (평균 2.5배). 이에 비해 p38 MAPK의 상부인자인 phospho-MKK3/6는 고포도당군에서 자극 3분 후부터 의의있게 증가되었다 (평균 2.4배). 또한, MKP-1 단백 발현은 고포도당군에서 p38 MAPK의 활성이 증가하기 시작한 시기와 동일한 시기 (자극 10분 후)부터 증가하기 시작하였다 (평균 1.9배). Fibronectin mRNA와 세포 배양액내 fibronectin은 고포도당군에서 자극 48시간 후에 각각 1.7배와 1.5배 증가되었으며, 이러한 증가는 p38 MAPK 억제제인 SB203580 (1 μM)에 의해 각각 73%와 69% 억제되었다.

결 론 : 고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK 경로의 활성화를 확인하였으며, p38 MAPK 억제제가 고포도당에 의한 fibronectin의 합성 증가를 억제시키는 것으로 보아 당뇨병성 신증에서 관찰되어지는 fibronectin의 축적에 p38 MAPK 경로가 관여할 것으로 생각된다.

본 연구는 연세대학교 의과대학 2000년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음 (과제번호 : 2000-09).
접수 : 2003년 6월 20일, 승인 : 2003년 7월 10일
책임저자 : 강신욱 서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel : 02)361-5428, Fax : 02)393-6884
E-mail : kswkidney@yumc.yonsei.ac.kr

서 론

최근에 당뇨병성 신증은 투석이나 신이식이 필요한 말기 신부전증의 원인 질환 중 가장 많은 빈도를 차지하는 질환으로 대두되었다. 이러한 이유로 당뇨병성

신증의 병태생리를 밝혀내려는 노력이 계속되어 왔음에도 불구하고 아직까지도 확실한 분자생물학적 및 세포학적 기전은 정립되어 있지 않은 상태이다. 기존의 연구들에 의하면, 고포도당에 의해 유도된 성장 인자들에 의한 세포 비후[1, 2], 세포외 기질의 생성 증가[3, 4], 세포외 기질 단백 분해 효소의 생성 감소[5, 6] 등이 관여하는 것으로 알려져 있으나, 이러한 과정에 관여하는 신호전달경로는 확실하게 밝혀져 있지 않은 실정이다.

많은 연구자들에 의해 당뇨 사구체[7, 8]와 고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포[9, 10]에서 protein kinase C (PKC)의 활성화가 증명되었다. PKC는 receptor-ligand 상호작용에 의한 생리학적 신호를 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 등과 같은 경로를 통해 핵으로 전달하여 궁극적으로 세포 증식, 분화, 그리고 사멸 등에 관여하는 유전자의 전사를 조절하게 된다[11-13]. MAPK족 중 p38 MAPK는 proinflammatory cytokines[14, 15], 자외선[15, 16], 고삼투압[15, 17, 18] 및 산화성 물질[19] 등에 의해 활성화되며, 세포 비후, prostanoid 생성을 비롯한 여러 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다[20, 21].

고삼투압과 산화성 스트레스는 당뇨병의 특징적인 소견이기 때문에 p38 MAPK가 당뇨병성 합병증의 병태생리에 관여할 것으로 생각되어 여러 연구가 진행되어 왔다. 당뇨 쥐에서 추출한 대동맥과 초기 당뇨 사구체에서 p38 MAPK가 활성화되었다는 보고가 있으며[22, 23], 고포도당으로 자극한 평활근 배양세포 및 고포도당과 mechanical strain으로 자극한 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK의 활성화를 증명한 연구도 있다[24, 25]. 그러나, 기존의 연구는 p38 MAPK 경로 중 p38 MAPK의 활성화만을 고찰한 연구가 대부분으로, p38 MAPK의 상부 인자인 MAPK kinase 3/6 (MKK3/6)와 하부 인자인 c-AMP responsive element binding protein (CREB)나 activating transcription factor-1 (ATF-1)의 변화를 동시에 관찰한 연구는 극히 미미한 실정이다. 최근에 Xu 등[26]은 사람의 복막 중피세포를 이용한 실험에서 고포도당으로 자극한 후 시간에 따른 p38 MAPK, MKK3/6 및 CREB의 변화를 보고하였으며, Wilmer 등[27]도 7일간 고포도당으로 자극한 사람 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK와 p38 MAPK의 하부 인자 activator protein-1 (AP-1)의 활성화는 증명하였으나, 자극 시간에 따른 변화 및 상부 인자인 MKK3/6, 그리고 활성화된 p38 MAPK의 비활성화에 관여하는 MAPK phosphatase-1 (MKP-1)의 변화는 관찰하지 않았다.

이에 저자 등은 백서 메산지움 배양세포를 이용하여 고포도당으로 자극한 후 시간에 따른 p38 MAPK의 활성화를 관찰함과 동시에 p38 MAPK의 상부 인자인 MKK3/6, 하부 인자의 하나인 CREB, 그리고 MKP-1의 변화를 연구하였다. 또한, p38 MAPK 경로와 당뇨병성 신증에서 축적되는 대표적 세포외 기질인 fibronectin의 생성 사이의 연관성도 밝힘으로써 당뇨병성 신증의 병태생리를 좀 더 확실하게 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 백서 사구체 메산지움 세포의 분리 및 배양

200-250 g의 Sprague-Dawley 백서 (Daehan Bio Link, Seoul, Korea)를 pentothal (50 mg/kg)로 마취한 후 단두하여 희생시킨 다음 신장을 적출하여 Harper 등[28]이 고안한 방법으로 사구체를 분리하여 메산지움 세포를 배양하였다. 다음의 모든 과정은 laminar flow hood 하에서 무균 상태로 실시하였다. 적출된 신장을 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 후 가위로 피질만을 분리하여 penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 μg/mL) (GIBCO Laboratories, Bethesda, MA, USA)이 함유된 인산 완충 용액 (phosphate buffered saline, PBS)에 옮긴 후 체공이 200, 150 및 75 μm인 stainless sieve를 차례로 통과시킨 다음 75 μm 소공에 걸린 사구체를 PBS에 재부유시켰다. 재부유액을 1,200×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 남은 조직을 20% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Laboratories), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μg/mL), 44 mM $NaHCO_3$ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 14 mM N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N′-2-ethane sulfonic acid (HEPES) (Sigma Chemical Co.)가 포함된 RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.)에 넣고 5% CO_2와 95% 공기가 공급되는 37℃ 세포 배양기에서 배양하였다. 약 2주간 배양액을 2-3일마다 교체하여 메산지움 세포로 거의 찼을 때 trypsin/EDTA (0.5%/0.53 nM)를 이용하여 계대 배양하고, 제 5-8회 계대 배양한 메산지움 세포를 실험에 이용하였다.

2. 고포도당 및 p38 MAPK 억제제 처치

실험은 배양액내 최종 포도당 농도가 각각 5.6 mM (정상 포도당군)과 30 mM (고포도당군)이 되게 RPMI 1640 배양액에 D-glucose (Sigma Chemical Co.)를 첨가하였다. 세포가 subconfluent한 상태에 도달하게 되면 0.2% FBS를 함유한 배양액으로 교환하고 48시간 동안 배양한 후 각각 5.6 mM과 30 mM의 포도당을 함유한 배양액으로 배양하여 3분, 10분, 2시간, 그리고 48시간 후에 세포 배양액을 채집하고 세포로부터 단백과 RNA를 추출하였다. 고포도당에 의한 삼투압 효과를 배제하기 위해 포도당 농도가 5.6 mM인 배양액에 24.4 mM 만니톨을 첨가한 배양액도 사용하였다. 또한, 고포도당에 의한 fibronectin 생성과 p38 MAPK 경로 사이의 연관성을 규명하기 위해 p38 MAPK 억제제인 SB203580 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 1 μM로 1시간 동안 전처치한 실험도 시행하였다.

3. 단백 추출 및 Western blot 분석

각 군의 메산지움 배양세포들을 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, 10mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% [vol/vol] glycerol)를 이용하여 용해시킨 후, 세포 용해액을 4℃에서 10,000×g로 10분간 원심분리하여 상층액을 -70℃에 보관하였다. 모든 경과 시점의 배양세포가 sacrifice된 후, 추출된 단백은 Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 농도를 결정한 후 50 μg씩 등분하여 보관하였다. 50 μg의 단백은 Laemmli sample buffer로 처치, 100℃로 5분간 가열한 후, 12% acrylamide denaturing SDS-polyacrylamide gel를 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel내 단백은 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×PBS, 0.1% Tween-20, 그리고 8% nonfat milk)로 처치한 후, p38 MAPK, phospho-specific p38 MAPK, MKK3, phospho-specific MKK3/6, CREB, phospho-specific CREB (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA), 그리고 MKP-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 1차 항체로 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Membrane을 1×PBS와 0.1% Tween-20로 15분간 1회, 5분간 2회 처치한 후, 1 : 1,000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG가 함유된 buffer A에 1시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescent 시약 (Amersham Life Science, Inc.)을 이용하여 가시화하였다. Signal은 TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 optical density (O.D.)로 정량화하였다.

4. RNA 추출 및 RT-PCR 분석

정상 포도당 또는 고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포로부터 총 RNA를 분리하기 위해 100 mm 배양 용기에 800 μL의 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 첨가한 후 실온에 5분간 보관하였다. 이후 160 μL의 chloroform을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 3분간 실온에 보관한 다음, 4℃에서 12,000×g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400 μL의 isopropanol을 첨가하고 4℃에서 12,000×g로 30분간 원심분리하였다. RNA 침전물은 70% ice-cold ethanol로 세척, Speed Vac을 이용하여 건조 시킨 후 DEPC-증류수로 희석시켰다. 분리된 RNA 순도는 spectrophotometry상 260 nm과 280 nm에서 측정된 O.D. 값을 이용하여 확인하였다.

cDNA는 Boehringer Mannheim cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 제작하였다. 세포로부터 분리한 총 RNA 중 2 μg의 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 dithiothreithol, 25 U RNAse inhibitor, 그리고 40 U AMV reverse transcriptase를 첨가하였다. 이 혼합물은 30℃에서 10분, 42℃에서 1시간, 그리고 99℃에서 5분간의 incubation 과정을 거친 후, -70℃에 보관하였다.

Fibronectin과 GAPDH mRNA의 발현은 PCR을 이용하여 분석하였다. PCR을 위한 primer는 Life Technologies (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제작하였으며, GAPDH sense primer 염기 서열은 GACAAGATGGTGAAGGTCGG, antisense primer 염

기 서열은 CATGGACTGTGGTCATGAGC; fibronectin sense primer 염기 서열은 GCAAGCCTGAACCTGAAGAGACC, 그리고 antisense primer 염기 서열은 CCTGGTGTCCTGATCATTGCATC이었다. PCR은 20 ng RNA에 해당하는 cDNA, 1.5 U Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim GmbH), 20 μM dNTP, 각각 25 pmol sense와 antisense primer, 1.5 mM $MgCl_2$를 함유한 50 μL 반응혼합물을 이용, 95℃에서 3분 가열한 후 94.5℃에서 30초, 62℃에서 30초, 그리고 72℃에서 1분간 38 cycles를 시행한 후, 마지막에는 72℃에서 7분간 더 반응시키는 방법으로 하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 PCR 산물은 0.05 μg/mL ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하였다. TINA image software (Raytest)를 이용하여 O.D.를 측정하였으며, GAPDH의 O.D.로 보정하였다.

5. Fibronectin에 대한 ELISA 분석

메산지움 세포 배양액내의 fibronectin은 Rennard 등[29]이 사용한 방법을 참고한 competitive ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 50 μL의 백서 fibronectin 표준물 (Sigma Chemical Co.)과 검사물을 50 μL의 0.5% bovine serum albumin이 포함된 PBS 용액에 희석한 항-fibronectin 항체 (Calbiochem) 용액과 혼합하여 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 100 μL의 상기 반응액을 백서 fibronectin이 미리 코팅된 96 multi-well plate (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)에 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 200 μL의 세척 중화제 (0.1% Tween이 포함된 PBS)로 4회 세척하였다. 이후 100 μL의 horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 200 μL의 세척 중화제로 4회 재세척한 다음 0.04 mg/dL o-phenylenediamine dihydrochloride와 0.06% H_2O_2가 포함된 pH 5.0인 0.05 mol/L citrate buffer를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 작용 중단 용액 1N H_2SO_4 100 μL를 각 well에 첨가한 후 색의 변화를 spectrophotometer를 이용하여 490 nm에서 판독하였다. 배양액내 fibronectin은 hemocytometer를 이용하여 측정한 세포수로 표준화하였다.

6. 통계 분석

모든 수치는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 11.0판 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 결과들은 Mann-Whitney U 검정이나 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 분석하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적 차이가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. p값이 0.05 미만인 경우 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 고포도당 자극 시간에 따른 p38 MAPK의 활성화

고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 자극 시간에 따른 p38 MAPK의 활성화를 알아보기 위해 phospho-specific p38 MAPK와 총 p38 MAPK에 대한 항체를 사용하여 Western blot를 시행하였다. Phospho-specific p38 MAPK 단백 발현은 고포도당 자극 3분 후에는 큰 변화가 없다가, 자극 10분 후부터는 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 의미있게

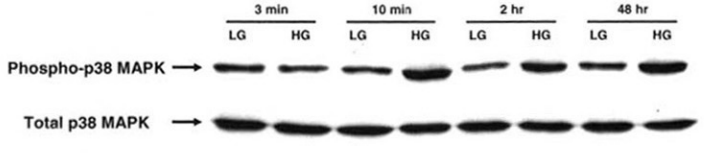

Fig. 1. Western blot of total and phospho-specific p38 MAPK protein in mesangial cells exposed to low glucose (LG) and high glucose (HG) for 3 minutes to 48 hours (representative of four blots). Phospho-specific p38 MAPK protein expression (upper panel) was significantly higher in mesangial cells exposed to HG than in those exposed to LG at 10 minutes and was sustained to 48 hours ($p<0.05$). Total p38 MAPK protein expression (lower panel) was not different between the two groups.

증가되었으며, 이러한 증가는 자극 48시간 후까지도 지속되었다 (Fig. 1). TINA image software를 이용하여 측정한 O.D.는 정상 포도당군에 비해 자극 10분 후부터 고포도당군에서 평균 1.9배 증가되었다. 이에 비해 총 p38 MAPK 단백 발현은 실험 기간 동안 양군 사이에 차이가 없었다. 고포도당과 동일 삼투압을 가진 만니톨에 의해서는 phospho-specific p38 MAPK 단백 발현의 증가가 없었다.

2. 고포도당 자극 시간에 따른 MKK3/6의 활성화

고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 자극 시간에 따른 p38 MAPK의 상부 인자인 MKK3/6의 활성화를 알아보기 위해 phospho-specific MKK3/6와 총 MKK3에 대한 항체를 사용하여 Western blot를 시행하였다. Phospho-specific MKK3/6 단백 발현은 고포도당 자극 3분 후부터 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 의미있게 증가되었으며, 이러한 증가는 자극 48시간 후까지도 지속되었다 (Fig. 2). TINA image software를 이용하여 측정한 O.D.는 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 평균 2.4배 증가되었다. 이에 비해 총 MKK3 단백 발현은 실험 기간 동안 양군 사이에 차이가 없었다. 이상의 결과로 보아 p38 MAPK의 활성화에 앞서 p38 MAPK의 상부 인자인 MKK3/6의 활성화가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 고포도당과 동일 삼투압을 가진 만니톨은 phospho-specific MKK3/6 단백 발현에 영향이 없었다.

3. 고포도당 자극 시간에 따른 CREB의 활성화

고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 자극 시간에 따른 p38 MAPK의 하부 인자 중 하나인 CREB의 활성화를 알아보기 위해 phospho-specific CREB과 총 CREB에 대한 항체를 사용하여 Western blot를 시행하였다. Phospho-specific CREB 단백 발현은 phospho-specific p38 MAPK 단백 발현과 유사하게 고포도당 자극 10분 후부터 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 의미있게 증가되었으며, 이러한 증가는 자극 48시간 후까지도 지속되었다 (Fig. 3).

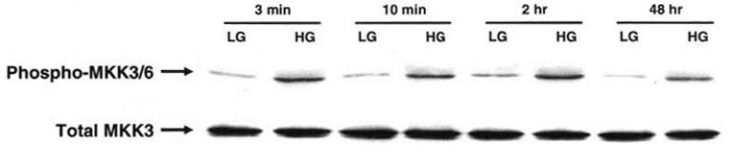

Fig. 2. Western blot of total MAPK kinase 3 (MKK3) and phospho-specific MKK3/6 protein in mesangial cells exposed to low glucose (LG) and high glucose (HG) for 3 minutes to 48 hours (representative of four blots). Phospho-specific MKK3/6 protein expression was significantly higher in mesangial cells exposed to HG than in those exposed to LG throughout the study period ($p<0.05$). There was no difference in total MKK3 protein expression between the two groups.

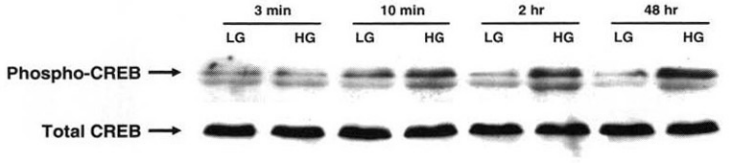

Fig. 3. Western blot of total and phospho-specific CREB protein in mesangial cells exposed to low glucose (LG) and high glucose (HG) for 3 minutes to 48 hours (representative of four blots). Phospho-specific CREB protein expression was significantly higher in mesangial cells exposed to HG than in those exposed to LG at 10 minutes and was sustained to 48 hours ($p<0.05$). Total CREB protein expression was not different between the two groups.

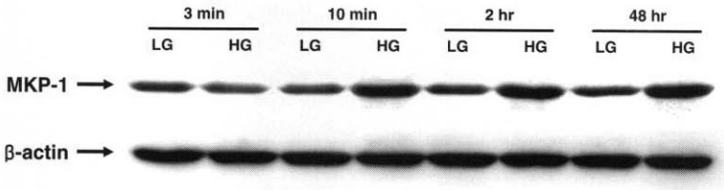

Fig. 4. *Western blot of MKP-1 protein in mesangial cells exposed to low glucose (LG) and high glucose (HG) for 3 minutes to 48 hours (representative of four blots). MKP-1 protein expression (upper panel) was significantly higher in mesangial cells exposed to HG than in those exposed to LG at 10 minutes and was sustained to 48 hours ($p<0.05$). β-actin protein expression was not different between the two groups.*

TINA image software를 이용하여 측정한 O.D.는 정상 포도당군에 비해 자극 10분 후부터 고포도당군에서 평균 2.5배 증가되었다. 이에 비해 총 CREB 단백 발현은 실험 기간 동안 양군 사이에 차이가 없었다. 고포도당과 동일 삼투압을 가진 만니톨에 의해서는 phospho-specific CREB 단백 발현의 증가가 없었다.

4. 고포도당 자극 시간에 따른 MKP-1의 활성화

고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 활성화된 p38 MAPK의 불활성화에 관여하는 MKP-1 단백 발현의 자극 시간에 따른 변화를 알아보기 위해 MKP-1에 대한 항체를 사용하여 Western blot를 시행하였다. MKP-1 단백 발현은 고포도당 자극 3분 후에는 큰 변화가 없다가, 자극 10분 후부터는 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 의미있게 증가되었으며, 이러한 증가는 자극 48시간 후까지 지속되었다 (Fig. 4). TINA image software를 이용하여 측정한 O.D.는 정상 포도당군에 비해 자극 10분 후부터 고포도당군에서 평균 1.9배 증가되었다. 고포도당과 동일 삼투압을 가진 만니톨은 MKP-1 단백 발현에 영향이 없었다.

5. p38 MAPK 억제제에 의한 fibronectin mRNA와 세포 배양액내 fibronectin의 변화

고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 자극 48시간 후 fibronectin mRNA와 세포 배양액내 fibronectin은 정상포도당군에 비해 고포도당군에서 각각 1.7배와 1.5배 증가되었으며, 이러한 증가는 p38 MAPK 억제제인 SB203580 1 μM에 의해 각각 73%와 69% 억제되었다 (Fig. 5, 6).

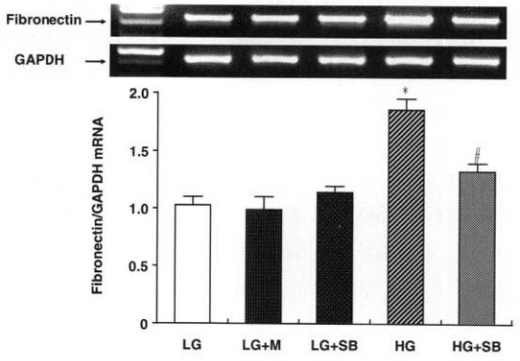

Fig. 5. *The p38 MAPK inhibitor SB203580 (SB, 1 μM) inhibited high glucose (HG) -induced fibronectin mRNA expression in mesangial cells by 73% (N=4). Low glucose (LG)+mannitol (M) had no effect on fibronectin mRNA expression in mesangial cells. *p< 0.05 vs. LG, #p<0.05 vs. HG.*

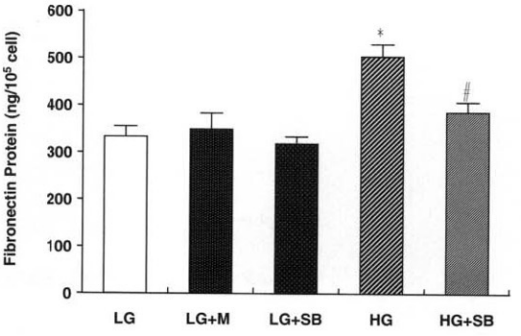

Fig. 6. *The p38 MAPK inhibitor SB203580 (SB, 1 μM) inhibited high glucose (HG)-induced fibronectin synthesis measured by ELISA in mesangial cells by 69% (N=4). Low glucose (LG)+mannitol (M) had no effect on fibronectin synthesis in mesangial cells. *p< 0.05 vs. LG, #p<0.05 vs. HG.*

고 찰

p38 MAPK는 MAPK족의 하나로, JNK와 더불어 "stress-activated kinase"로 알려져 있으며, 자외선[16], 삼투압 변화[17], 산화성 물질[19] 등에 의해 활성화되어 세포 성장, 분화 및 세포사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다[11-13, 20, 21, 30]. 이러한 p38 MAPK는 심근 비후와 당뇨병성 신증의 병태생리에 관여하는 TGF-β에 의한 유전자 발현과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며[31, 32], 최근에는 초기 당뇨병성 신증의 사구체에서 p38 MAPK가 활성화되었다는 보고도 있다[23, 33]. Wilmer 등[27]은 고포도당으로 7일간 자극한 사람 메산지움 배양세포에서 p38 MAPK의 활성화와 p38 MAPK의 하부 인자인 AP-1의 활성화는 증명하였으나, 자극 시간에 따른 p38 MAPK의 변화나 p38 MAPK의 상부 인자인 MKK3/6의 활성화는 관찰하지 않았다. 본 연구에서는 고포도당의 자극에 의해 MKK3/6의 활성화가 먼저 일어나고, 이후에 p38 MAPK와 CREB이 활성화되는 것을 관찰하였으며, 주요한 세포외 기질인 fibronectin의 생성과 p38 MAPK 경로 사이의 연관성을 증명하였다.

p38 MAPK를 비롯한 모든 MAPK족은 MAPK의 상부 인자인 dual specific protein kinase (MAPK kinase)에 의해 활성화되는데[34, 35], 이중 MEK1은 ERK의 활성화, MKK3와 MKK6는 p38 MAPK의 활성화, 그리고 MKK4/SEK1은 p38 MAPK와 JNK의 활성화 모두에 관여하는 것으로 알려져 있다[34-36]. MKK3/6는 고삼투압[37], 고온[38], 그리고 과산화수소[39] 등에 의해 활성화되는 것으로 보고되었으며, 최근의 몇몇 연구를 통해 초기 당뇨 사구체[33] 및 고포도당으로 자극한 복막중피 배양세포[26]에서 MKK3/6의 활성화도 관찰되었다. 고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 MEK1의 활성화를 증명한 연구는 있었지만[40], p38 MAPK의 상부 인자인 MKK3/6의 활성화를 관찰한 연구는 없었던 상태로, 본 연구 결과를 통해 메산지움 배양세포에서도 고포도당에 의해 MKK3/6가 활성화된다는 것이 확인되었다. 이러한 고포도당 자극에 의한 MKK3/6의 활성화가 p38 MAPK의 활성화에 비해 조기에 일어난 것으로 보아, p38 MAPK의 활성화가 MKK3/6의 활성화에 의해 야기되었을 것으로 생각된다.

MAPK의 활성화 정도는 상부 인자인 MAPK kinase의 활성화 여부뿐만 아니라 활성화된 MAPK를 비활성화 시키는 MKP에 의해서도 영향을 받게 된다. 여러 종류의 MKP 중에서 MKP-1은 과거에는 ERK만을 비활성화 시키는 것으로 알려졌으나[41], 최근에 transient transfection 기법을 이용한 실험에서 p38 MAPK와 JNK 모두를 불활성화시키는 것으로 밝혀졌다[19, 42]. 대부분의 연구에 의하면, MKP-1은 성장인자나 스트레스 등에 의해 활성화된 MAPK를 비활성화 시키기 위한 feedback 작용으로 발현이 증가되는 것으로 알려져 왔다[19, 43, 44]. 그러나, 최근의 몇몇 연구자는 활성화된 ERK나 p38 MAPK를 비활성화 시키기 위한 feedback으로 MKP-1의 발현이 증가되는 것이 아니라, 오히려 MKP-1의 발현 감소로 인해 ERK나 p38 MAPK가 활성화된다고 하였다[45, 46]. 이처럼 MKP-1의 발현에 대한 연구 결과가 다양하듯이 당뇨나 고포도당 자극에 의한 MKP-1의 발현을 관찰한 연구 결과들도 일관성이 없다. 고포도당으로 12-24시간 동안 자극한 혈관 평활근 배양세포에서 MKP-1 mRNA와 단백 발현이 각각 30%와 75% 감소되었다는 연구 결과가 있으며[47], 메산지움 배양세포[48]와 복막 중피 배양세포[26]에서 고포도당에 의해 MKP-1 mRNA와 단백의 발현이 의미있게 감소된 것으로 보아 ERK나 p38 MAPK의 활성화와 밀접한 관계가 있을 것이라는 보고도 있다. 이와는 반대로 강 등[23]은 고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 자극 1시간 후부터 MKP-1 단백의 발현이 증가되었다고 하였으며, 강 등[33]도 초기 당뇨병성 신증의 사구체를 이용한 연구에서 MKP-1 mRNA와 단백의 발현 증가를 관찰하였다. 본 연구에서도 강 등[23]과 강 등[33]의 연구 결과와 일치하는 결과를 보였다. 이렇게 다양한 결과를 보이는 이유는 확실하지 않지만, 아마도 실험에 사용한 세포의 종류, 포도당 농도 및 자극 시간의 차이에 기인할 것으로 생각된다. 본 연구 결과로 보아 백서 메산지움 배양세포에서는 고포도당 자극에 의해 활성화된 p38 MAPK를 비활성화 시키기 위한 feedback 과정의 하나로 MKP-1의 발현이 증가되었을 것으로 생각된다.

활성화된 p38 MAPK는 여러 전사 인자들의 serine과 threonine기의 인산화를 통해 유전자 발현을 일으키게 된다. 지금까지 p38 MAPK가 활성화시키는 것으로 알려져 있는 전사 인자로는 CREB과 ATF-1,

ATF-2, Elk-1, CHOP, 그리고 MEF-2C 등이 있다[14, 34, 49-52]. CREB은 c-AMP responsive element (CRE)과 결합함으로써 유전자 발현에 관여하게 되는데, CRE가 fibronectin promoter 부위에도 존재하며[53], CREB의 활성화를 통해 fibronectin mRNA의 발현이 증가되었다는 보고도 있다[54]. 당뇨병성 신증의 특징적인 소견이 fibronectin을 비롯한 세포외 기질의 축적이기 때문에, 본 연구에서도 p38 MAPK-CREB의 활성화와 fibronectin 생성 사이의 연관성을 규명하기 위해 p38 MAPK 억제제인 SB203580로 전처치를 한 결과 고포도당에 의해 증가되었던 fibronectin mRNA와 배양액내 fibronectin 모두 의미있게 억제되었으며, 이러한 결과는 메산지움 배양세포에서 고포도당에 의한 fibronectin 생성에 p38 MAPK 경로가 관여한다는 사실을 시사한다. 그러나, 고포도당에 의한 fibronectin 생성 증가가 p38 MAPK 억제제에 의해 완전히 억제되지 않은 것으로 보아 fibronectin의 생성에 p38 MAPK 이외의 신호전달경로가 관여할 가능성도 있을 것으로 생각된다.

세포외 기질의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 TGF-β는 최소한 2가지 이상의 신호전달경로를 통해 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그 중 하나는 TGF-β-activated kinase 1 (TAK1)-MKK6-p38 MAPK 경로이며[55], 다른 하나는 TGF-β-Smad 경로이다[56]. 최근의 연구에 의하면, dominant negative TAK1이나 dominant negative MKK6가 도입된 C2C12 세포에서 TGF-β에 의한 신호전달이 완전히 차단되지 않았으며, 이는 Smad 경로가 유지되었기 때문이라 하였다[32]. 따라서 본 연구에서도 TGF-β-Smad 경로에 의한 영향으로 인해 p38 MAPK 억제제인 SB203580로 전처치를 하였음에도 불구하고 고포도당에 의한 fibronectin 생성 증가가 어느 정도 유지되었을 것으로 생각된다.

이상의 결과로, 메산지움 배양세포에서 고포도당에 의해 p38 MAPK의 활성화가 일어났으며, 이는 상부 인자인 MKK3/6의 활성화 증가에 의한 것으로 생각된다. 또한 p38 MAPK의 하부 인자인 CREB의 활성화와 동시에 fibronectin의 생성 증가도 증명하였으며, 고포도당에 의한 fibronectin 생성 증가에 p38 MAPK 경로가 일부 관여할 것으로 생각된다. 향후 생체내 실험을 통해 p38 MAPK 경로 억제가 당뇨병성 신증의 발생 및 진행에 미치는 영향을 좀 더 확실히 규명할 필요가 있을 것으로 생각된다.

= ***Abstract*** =

The Effect of High Glucose on p38 MAPK Pathway and Fibronectin Synthesis in Cultured Rat Mesangial Cells

**Tae-Hyun Yoo, M.D., Zhong-Gao Xu, M.D.
Dong-Ryeol Ryu, M.D., Hyun-Wook Kim, M.D.
Su-Hyun Lee, B.S., Jin-Ju Kim, B.S.
Dong-Sub Jung, B.S., Kyu Hun Choi, M.D.
Ho Yung Lee, M.D., Dae-Suk Han, M.D.
and Shin-Wook Kang, M.D.**

*Department of Internal Medicine,
College of Medicine, Institute of Kidney Disease,
Yonsei University, Seoul, Korea*

Background : The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is activated by several stress factors, potentially leading to cellular apoptosis and growth. Little is known about the pattern of p38 MAPK pathway activation in mesangial cells under high glucose conditions. We examined the activity and expression of p38 MAPK members, p38 MAPK, MAPK kinase 3/6 (MKK3/6), c-AMP responsive element binding protein (CREB), and MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in cultured mesangial cells exposed to high glucose.

Methods : Mesangial cells were subcultured from rat glomeruli isolated by sieving technique. After serum restriction for 48 hours mesangial cells were exposed to 5.6 mM glucose (low glucose, LG), 5.6 mM glucose+24.4 mM mannitol (LG+M), or 30 mM glucose (high glucose, HG) for 3 minutes to 48 hours with or without SB203580. Western blot was performed to determine the activity and protein expression of p38 MAPK members. RT-PCR and ELISA were performed for fibronectin mRNA expression and fibronectin synthesis, respectively.

Results : p38 MAPK and CREB activities were significantly increased in mesangial cells exposed to HG compared with LG or LG+M after 10 minutes and was sustained at higher levels to 48 hours ($p<0.05$), but total p38 MAPK and CREB protein expressions did not differ. MKP-1 showed a similar pattern as p38 MAPK and CREB ($p<0.05$). MKK3/6 acitvity was significantly higher in HG cells after 3 minutes and remained at higher levels throught the study period ($p<0.05$). Fibronectin mRNA expression and fibronectin synthesis were significantly increased

in mesangial cells exposed to HG after 48 hours ($p<0.05$). SB203580 (1 μM) pretreatment for 1 hour significantly reduced HG-induced fibronectin mRNA expression and fibronectin synthesis by 73% and 69%, respectively ($p<0.05$).

Conclusion : p38 MAPK activity was increased in mesangial cells exposed to HG in parallel with increased MKK3/6 activity, resulting in CREB activation and increased fibronectin synthesis. This activated p38 MAPK may play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **(Korean J Nephrol 2003;22(5):483-493)**

Key Words : p38 MAPK, MKK3/6, CREB, High glucose, Mesangial cell, Diabetic nephropathy

참 고 문 헌

1) Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP : High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* **259**:F704-714, 1990
2) Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H : mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* **42**:450-456, 1993
3) Ayo SH, Radnik RA, Glass WF II, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, Kreisberg JI : Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. *Am J Physiol* **260**:F185-191, 1991
4) Ihm CG, Lee GS, Nast CC, Artishevsky A, Guillermo R, Levin PS, Glassock RJ, Adler SG : Early increased renal procollagen alpha 1 (IV) mRNA levels in streptozotocin induced diabetes. *Kidney Int* **41**:768-777, 1992
5) Kitamura M, Kitamura A, Mitarai T, Maruyama N, Nagasawa R, Kawamura T, Yoshida H, Takahashi T, Sakai O : Gene expression of metalloproteinase and its inhibitor in mesangial cells exposed to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun* **185**:1048-1054, 1992
6) Phillips AO, Steadman R, Morrisey K, Martin J, Eynstone L, Williams JD : Exposure of human renal proximal tubular cells to glucose leads to accumulation of type IV collagen and fibronectin by decreased degradation. *Kidney Int* **52**:973-984, 1997
7) Craven PA, DeRubertis FR : Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* **83**:1667-1675, 1989
8) Craven PA, Davidson CM, DeRubertis FR : Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* **39**:667-674, 1990
9) Williams B, Schrier RW : Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* **92**:2889-2896, 1993
10) Ziyadeh FN, Fumo P, Rodenberger CH, Kuncio GS, Neilson EG : Role of protein kinase C and cyclic AMP/protein kinase A in high glucose-stimulated transcriptional activation of collagen alpha 1 (IV) in glomerular mesangial cells. *J Diabetes Complications* **9**:255-261, 1995
11) Davis RJ : The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* **268**:14553-14556, 1993
12) Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR : The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**:156-160, 1994
13) Seger R, Krebs EG : The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**:726-735, 1995
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) Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W : The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis in response to tumor necrosis factor. *EMBO J* **15**:1914-1923, 1996
16) Dérijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, Davis RJ : JNK1 : a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025-1037, 1994
17) Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ : A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**:808-811, 1994
18) Shapiro L, Dinarello CA : Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:12230-12234, 1995
19) Liu Y, Gorospe M, Yang C, Holbrook NJ : Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase

during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. *J Biol Chem* **270**:8377-8380, 1995

20) Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME : Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**:1326-1330, 1995

21) Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, Jakubowski JA : p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin- stimulated platelets. *J Biol Chem* **271**: 27723-27729, 1996

22) Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, Ishii H, Jiang ZY, Yamauchi T, Kuboki K, Meier M, Rhodes CJ, King GL : Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase via different pathways. *J Clin Invest* **103**:185-195, 1999

23) Kang MJ, Wu X, Ly H, Thai K, Scholey JW : Effect of glucose on stress-activated protein kinase activity in mesangial cells and diabetic glomeruli. *Kidney Int* **55**:2203-2214, 1999

24) Natarajan R, Scott S, Bai W, Yerneni KK, Nadler J : Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension* **33**:378-384, 1999

25) Ingram AJ, Ly H, Thai K, Kang M, Scholey JW : Activation of mesangial cell signaling cascades in response to mechanical strain. *Kidney Int* **55**:476-485, 1999

26) 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* **63**:958-968, 2003

27) Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C : Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway. *Kidney Int* **60**:858-871, 2001

28) Harper PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC, Karnovsky MJ : Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* **26**:875-880, 1984

29) Rennard SI, Bery R, Martin GR, Foidart JM, Robey PG : Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal Biochem* **104**:205-214, 1980

30) Cobb MH, Robbins DJ, Boulton TG : ERKs, extracellular signal-regulated MAP-2 kinases. *Curr Opin Cell Biol* **3**:1025-1032, 1991

31) Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J Jr, Brown JH, Han J, Chien KR : Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **273**:2161-2168, 1998

32) Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E : Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-β-induced gene expression. *J Biol Chem* **274**:27161-27167, 1999

33) 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

34) Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Derijard B, Davis RJ : MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**:1247-1255, 1996

35) Enslen H, Raingeaud J, Davis RJ : Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J Biol Chem* **273**:1741-1748, 1998

36) Macdonald SG, Crews CM, Wu L, Driller J, Clark R, Erikson RL, McCormick F : Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro. *Mol Cell Biol* **14**:2223-2224, 1994

37) Bode JG, Gatsios P, Ludwig S, Rapp UR, Haussinger D, Heinrich PC, Graeve L : The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity. *Biol Chem* **274**:30222-30227, 1999

38) Maroni P, Bendinelli P, Zuccorononno C, Schiaffonati L, Piccoletti R: Cellular signaling after in vivo heat shock in the liver. *Cell Biol Int* **24**: 145-152, 2000

39) Moriguchi T, Toyoshima F, Gotoh Y, Iwamatsu A, Irie K, Mori E, Kuroyanagi N, Hagiwara M, Matsumoto K, Nishida E : Purification and identification of a major activator for p38 from osmotically shocked cells. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase 6 by osmotic shock, tumor necrosis factor-alpha, and H2O2. *J Biol Chem* **271**:26981-26988, 1996

40) Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R : Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of dia-

betic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* **46**:847-853, 1997

41) Charles CH, Sun H, Lau LF, Tonks NK : The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:5292-5296, 1993

42) Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasch SC, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, Worthen GS : Selective activation and functional significance of p38 alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest* **103**:851-858, 1999

43) Zheng CF, Guan KL : Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J Biol Chem* **268**:16116-16119, 1993

44) Franklin CC, Kraft AS : Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem* **272**:16917-16923, 1997

45) Bokemeyer D, Lindemann M, Kramer HJ : Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **32**:661-667, 1998

46) Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K : The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem* **271**:6497-64501, 1996

47) Begum N, Ragolia L, Rienzie J, McCarthy M, Duddy N : Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by insulin in vascular smooth muscle cells. Evaluation of the role of the nitric oxide signaling pathway and potential defects in hypertension. *J Biol Chem* **273**:25164-25170, 1998

48) Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M : Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* **10**:738-745, 1999

49) Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ : FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J* **15**:4629-4642, 1996

50) Wang XZ, Ron D : Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science* **272**:1347-1349, 1996

51) Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ : Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**:296-299, 1997

52) Whitmarsh AJ, Yang SH, Su MS, Sharrocks AD, Davis RJ : Role of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in the activation of ternary complex factors. *Mol Cell Biol* **17**:2360-2371, 1997

53) Bowlus CL, McQuillan JJ, Dean DC : Characterization of three different elements in the 5′-flanking region of the fibronectin gene which mediate a transcriptional response to cAMP. *J Biol Chem* **266**:1122-1127, 1991

54) Dean DC, McQuillan JJ, Weintraub S : Serum stimulation of fibronectin gene expression appears to result from rapid serum-induced binding of nuclear proteins to a cAMP response element. *J Biol Chem* **265**:3522-3527, 1990

55) Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K : Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-β signal transduction. *Science* **270**:2008-2011, 1995

56) Heldin CH, Miyazono K, Dijke PT : TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**:465-471, 1997