

죽세포에서
고포도당과 싸이클로스포린이
세포사멸에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 과 학 과
정 동 섭

죽세포에서
고포도당과 싸이클로스포린이
세포사멸에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 과 학 과
정 동 섭

죽세포에서
고포도당과 싸이클로스포린이
세포사멸에 미치는 영향

지도교수 강 신 욱

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

정 동 섭

정동섭의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

제가 공부를 하겠다는 마음을 먹고 이곳에서 석사 학위를 하기 위해 들어온지 3년이 지났습니다. 3년이란 시간동안 알지도 못했던 돈으로도 살 수 없는 많은 것들을 배우고, 많은 추억들을 간직할 수 있었습니다. 이러한 기회를 주시고, 항상 너그러이 보듬어주신 강신욱 교수님께 제일 먼저 감사드립니다. 그리고 본 연구에서 각별한 관심을 가져주신 김유선 교수님, 정현주 교수님께도 감사드립니다. 제게 실험을 가르쳐주신 허종호 선생님과 이수현 선생님께 깊은 감사드리며, 곽승재 선생님, 김진주 선생님, 이금희 선생님께도 감사드립니다. 그리고 편하게 대해 주신 유태현 선생님, 류동열 선생님, 최훈영 선생님, 김형중 선생님, 김주성 선생님, 한승혁 선생님, 이상철 선생님, 이정은 선생님께도 감사의 말씀 전하며, 항상 내 곁에서 힘이 되어준 원우 형, 사현이 형, 찬희 형에게도 감사의 말 전합니다. 저희 세브란스 야구 동우회, 농구 동아리에도 감사의 말씀 전합니다.

그리고 힘드신데도 저한테 내색 한번 안 하신 사랑하는 부모님과 매형, 누나, 너무 사랑스런 종현이, 삼촌, 외숙모, 우리 착한 동생들 영섭이, 은혜, 그리고 아버님, 어머님, 할머니께도 감사드립니다. 마지막으로 저의 평생 반려자가 될 사랑하는 유리에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 족세포의 배양	7
2. 세포 실험	7
3. 역전사	8
4. PCR을 이용한 mRNA 발현의 측정	9
5. Western blot을 이용한 단백 발현의 측정	11
6. 배양 족세포의 사멸 측정	12
가. Hoechst 33258 염색	12
나. FACS 분석	13
7. 통계 분석	14
III. 결과	15
1. Bax와 Bcl-2 mRNA 및 단백질 발현	15
2. TGF- β mRNA와 단백질 발현	17
3. 세포사멸 분석	18
가. Hoechst 33258 염색	18
나. FACS 분석	20
IV. 고찰	23
V. 결론	28
참고문헌	30
영문요약	40

그림 차례

Figure 1. Bax/Bcl-2 mRNA expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by RT-PCR	15
Figure 2. Bax/Bcl-2 protein expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by Western blot	16
Figure 3. TGF- β mRNA expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by RT-PCR	17
Figure 4. TGF- β protein expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by Western blot	18
Figure 5. Fluorescent photographic assessment of apoptosis in podocytes	19
Figure 6. Apoptotic podocytes in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA assessed by Hoechst 33258 staining	20
Figure 7. FACS analysis of apoptosis in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups	21

표 차례

Table 1. Primers of mouse Bax, Bcl-2, TGF- β and GAPDH	11
Table 2. FACS analysis of apoptosis in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups	22

국문 요약

족세포에서 고평도당과 싸이클로스포린이 세포사멸에 미치는 영향

싸이클로스포린 (CsA)은 신이식 후 사용하는 강력한 면역억제제로 이식신 생존율을 유의하게 호전시켰다. 그러나 CsA을 장기간 사용할 경우 구심성 신소동맥 병변, 세뇨관 위축, 세뇨관-간질성 섬유화, 그리고 사구체경화증 등이 동반되는 만성 CsA 신독성이 발생하게 되는데, 이러한 만성 CsA 신독성의 병인으로는 구심성 세동맥의 수축으로 인한 허혈과 세포사멸 등이 있다. 또한, 세포사멸은 당뇨병성 신병증의 특징 중 하나인 족세포 수의 감소와도 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 당뇨병성 신병증은 전 세계적으로 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환으로, 당뇨병성 신병증에 의한 말기 신부전증 환자의 증가와 함께 신이식을 받는 당뇨병 환자도 더욱 증가할 것으로 예상된다. 그러나 당뇨병을 동반한 말기 신부전증 환자에서의 이식 후 신생존율은 감염이나 급성 거부반응으로 인하여 비당뇨병 말기 신부전증 환자에 비하여 낮은 것으로 보고되고 있다.

이에 본 연구자는 당뇨병 신이식 환자에서의 낮은 신생존율과 족세포 사멸 사이의 연관성을 규명하기 위하여 고평도당과 CsA으로 자극한 족세포에서의 세포사멸을 알아보려고 하였다. 족세포를 33°C에서 감마인터페론이 포함된 배양액으로 계대 배양하였으며, 이후 37°C에서 감마인터페론이 없는 배양액으로 배양하면서 분화를 시켰다. 족세포의 분화를 확인한 후 우태아혈청이 없는 배양액으로 24시간 동안 배양한 다음, 5.6 mM 포도당 (NG), NG + 24.4 mM 만니톨 (NG + M), NG + 10⁻⁶ M CsA (NG + CsA), 30 mM 포도당

(HG), 그리고 HG + 10^{-6} M CsA (HG + CsA) 배양액으로 72시간 동안 배양하였다. mRNA 발현은 RT-PCR로, 단백질 발현은 Western blot로, 그리고 세포사멸은 Hoechst 33258 염색과 FACS를 이용하여 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 족세포에서 Bax/Bcl-2 mRNA 발현비는 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 NG군에 비하여 각각 3배, 2.8배 증가되었으며 ($p < 0.05$), Bax/Bcl-2의 단백질 발현비도 NG군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 2.2배, 1.7배 증가되었다 ($p < 0.01$). 그러나 고포도당이나 만니톨은 족세포의 Bax와 Bcl-2 mRNA 및 단백질 발현에 영향을 미치지 않았다.
2. TGF- β mRNA 및 단백질 발현은 NG군과 HG군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 유의있게 증가되었다 ($p < 0.05$). 그러나 고포도당이나 만니톨은 족세포의 TGF- β 발현에 영향을 미치지 않았다.
3. Hoechst 33258 염색에 의한 apoptotic cell의 수는 CsA 처리군에서 유의있게 증가되었으며, FACS 분석상으로도 CsA 처리군에서 apoptotic cell의 비율이 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.01$).

이상의 결과로 족세포에서 싸이클로스포린이 세포사멸을 증가시켰으며, 싸이클로스포린에 의한 세포사멸이 고포도당 조건 하에서 더 심화되지는 않을 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 족세포, 세포사멸, 고포도당, 싸이클로스포린

족세포에서 고포도당과 싸이클로스포린이
세포사멸에 미치는 영향

<지도교수 강 신 욱>

연세대학교 대학원 의과학과

정 동 섭

I. 서 론

최근에 당뇨병성 신병증은 투석이나 신이식이 필요한 말기 신부전증의 원인 질환 중 가장 많은 빈도를 차지하는 질환으로 대두되었다. 국내외적으로 새로 투석을 시작하는 환자의 약 40-45%가 당뇨병성 신병증에 의한 말기 신부전증 환자인 것으로 보고되고 있을 정도로 투석 환자에서 당뇨병성 신병증의 빈도는 계속 증가하고 있으며^{1,2}, 같은 맥락에서 당뇨병 환자를 대상으로 한 신이식도 점차 증가하고 있다.

신이식 후 사용하는 면역 억제제는 세월이 지남에 따라 크게 변화되었는데, 그 중에서도 1980년대에 들어서 사용하기 시작한 싸이클로스포린 (CsA)이 이식신의 생존율 증가에 크게 공헌하였다. CsA은 11개의 아미노산으로 구성된 약제로 T 림프구에서 calcineurin의 활성화를 억제함으로써³ interleukin-2를 비롯한 여러 싸이토카인의 작용을 차단하여 면역 억제 작용을 나타나게 된다. 그러나 장기간 CsA을 사용하는 경우 신장 내 간질의 섬유화, 세뇨관 위축, 그리고 구심성 세동맥의 hyalinosis가 특징인 만성 CsA 신병증이 유발된다⁴⁻⁶. 이러한 만성 CsA 신병증이 발생하는 병태생리학 기전에 대해서는 아직 명확하지는 않으나 레닌-안지오텐신계의 활성화, endothelin, 그리고 활성 산소종의 변화에 의한 신장 내 구심성 혈관의 수축에 의한 허혈이 관여하는 것으로 알려져 있으며⁷⁻⁹, 최근에는 생체 내 및 생체 외 실험을 통하여 세포사멸 (apoptosis)이 CsA에 의한 신독성과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다¹⁰. CsA에 의한 세포사멸은 주로 세뇨관 세포를 대상으로 한 연구에서 증명되었으나, 최근에는 사구체 메산지움 세포뿐만 아니라 족세포를 이용한 실험에서도 CsA이 세포사멸을 유도하였다는 보고가 있다^{11,12}.

세포사멸은 모든 다세포 기관의 정상 발달과 항상성에 필수적인 자연적 세포사로, 과소, 또는 과대한 세포사멸은 악성 종양, 류마티스 관절염, Alzheimer 병을 포함한 각종 질환과 밀접하게 연관되어 있다. 신장 질환 중에는 허혈-재관류 손상, 폐쇄성 신장 질환, 다낭성 신질환, 그리고 당뇨병성 신병증 등의 병태 생리에 세포사멸이 관여한다는 것으로 이야기 되어지고 있다¹³⁻¹⁹. 당뇨병성 신병증의 경우, 생체 내 및 생체 외 실험을 통하여 당뇨 조건 하에서 사구체 메산지움 세포와 세뇨관 세포에서 세포사멸이 일어났다는 보고가 있으며²⁰, 당뇨 조건 하에서 생성이 증가되는 TGF- β 로 자극

한 족세포에서도 세포사멸이 유도되었다는 연구 결과가 있다²¹⁻²³. 그러나 족세포에서 고포도당 자체가 세포사멸을 일으키는 지에 대한 연구는 현재까지 전무한 실정이다.

이에 본 연구자는 고포도당으로 자극한 족세포에서 세포사멸의 발생 여부를 관찰함과 동시에 계속 증가할 것으로 예상되는 당뇨병 환자에서의 신이식을 대비하여 당뇨 조건이 CsA에 의한 족세포 사멸에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 족세포 (conditionally immortalized mouse podocyte)의 배양

실험에 이용한 족세포는 Dr. Mundel (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)로부터 기증받은 세포로, 33°C에서 γ -interferon이 포함된 배양액으로 배양하면 일반적인 상피세포와 유사하게 증식을 하지만 (permissive condition), 37°C에서 γ -interferon이 없는 배양액으로 배양하면 생체 내 족세포와 유사하게 증식이 정지되면서 죽돌기를 갖는 세포로 분화된다 (non-permissive condition). 2주 동안 non-permissive condition

하에서 배양한 족세포에서 synaptopodin mRNA의 발현을 역전사-중합효소 연쇄 반응 (reverse transcription-polymerase chain reaction, 이하 RT-PCR)으로 분석하여 분화를 확인하였다.

2. 세포 실험

모든 실험은 족세포를 37°C에서 14일간 배양하여 충분히 분화가 된 상태에서 시행하였다. 10% 우태아혈청 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 함유하고 있는 RPMI-1640 배양액 (GIBCO BRL)을 우태아혈청이 없는 배양액으로 교환하여 24시간 동안 배양한 후 포도당 농도가 5.6 mM (NG, 정상포도당균) 또는 30 mM (HG, 고포도당균)인 배양액으로 72시간 동안 처리하였다.

싸이클로스포린 (Cyclosporine A, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)은 배양액 내 최종 농도가 10^{-6} M이 되도록 일부 정상 포도당균 (NG + CsA)과 고포도당균 (HG + CsA)에 첨가하였다. 또한, 고포도당에 의한 삼투압 효과를 배제하기 위하여 정상 포도당균에 24.4 mM 만니톨을 첨가한 실험도 동시에 시행하였다. 자극 72시간 후에 족세포로부터 RNA 및 단백을 추출하였으며, 세포사멸을 알아보기 위하여 Hoechst 33258 염색과 FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)를 시행하였다.

3. 역전사 (reverse transcription)

세포로부터 총 RNA를 추출하기 위하여 RNA STAT-60 (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)을 사용하였다. RNA STAT-60 reagent 100 μ l로 세포를 처리한 후 700 μ l의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 vortex한 후 실온에 5분간 두었다. 이후 160 μ l의 chloroform (Sigma Chemical Co.)을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 실온에 3분간 보관한 다음, 4°C에서 12,000 rpm으로 15

분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400 μ l의 isopropanol (Sigma Chemical Co.)을 첨가하고 4°C에 20분간 보관한 다음 4°C, 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. RNA 침전물은 70% ice-cold ethanol로 세척, Speed Vac (Savant, Farming-Dale, NY, USA)을 이용하여 건조시킨 후 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수로 희석시켰다. 분리된 RNA 양과 순도는 spectrophotometer (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA)상 260 nm과 280 nm에서 측정된 optical density (O.D.) 값을 이용하여 확인하였다.

c-DNA는 Roche Diagnostics c-DNA synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 제작하였다. 세포로부터 분리한 총 RNA 중 2 μ g의 RNA에 10 μ M 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 Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, USA)로 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고 99°C에서 5분간 반응시켜 first-strand c-DNA를 합성한 후, -70°C에 보관하였다.

4. PCR을 이용한 mRNA 발현의 측정

mRNA의 발현은 역전사 효율의 차이를 보정하기 위하여 모든 검체의 PCR 산물의 O.D.를 GAPDH의 O.D.로 보정하였는데, 이를 위하여 실험에서 얻은 PCR 산물과 GAPDH 비의 예민도가 가장 높은 c-DNA의 양과 PCR cycle의 수를 결정한 후 본 실험을 시행하였다. House keeping 유전자인 GAPDH는 다른 시험관에서 동시에 시행하였다. PCR이 끝난 후 개개의 증폭된 PCR 산물 중 30 μ l를

취하여 0.05 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동을 하였다. PCR 산물과 GAPDH의 O.D.는 TINA image software (Ver2.01, Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 측정하였다. Bax, Bcl-2 및 TGF- β 에 대한 primer는 설계 후 Life Technologies (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제작하였다 (Table 1). PCR은 20 ng (GAPDH) 또는 40 ng (Bax, Bcl-2, TGF- β)에 해당하는 c-DNA, 1.5 U Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Inc., Foster, CA, USA), 20 μM dNTP, 각각 25 pmol sense와 antisense primer, 1.5 mM MgCl_2 를 포함한 50 μl 반응 혼합물을 이용, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 9분간 가열한 후 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초, annealing 온도인 62 $^{\circ}\text{C}$ (GAPDH, TGF- β) 또는 56 $^{\circ}\text{C}$ (Bax, Bcl-2)에서 45초, 그리고 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 36 cycles (GAPDH, TGF- β) 또는 45 cycles (Bax, Bcl-2)을 시행하였으며, 이후 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 더 반응시켰다. 상술한 PCR 과정을 거쳐 고평도당과 CsA에 의한 Bax, Bcl-2 및 TGF- β mRNA의 발현 변화를 관찰하였다.

Table 1. Primers of mouse Bax, Bcl-2, TGF- β and GAPDH

		Sequence (5' \rightarrow 3')
Bax	Sense	TCC CCC CGA GAG GTC TTC T
	Antisense	CCC AGT TGA AGT TGC CAT CA
Bcl-2	Sense	TGG GAT GCC TTT GTG GAA CT
	Antisense	GAG ACA GCC AGG AGA AAT CAA AC

TGF-β	Sense	CGA GGT GAC CTG GGC ACC ATC C
	Antisense	GCT CCA CCT TGG GCT TGC GAC C
GAPDH	Sense	GAC AAG ATG GTG AAG GTC GG
	Antisense	CAT GGA CTG TGG TCA TGA GC

5. Western blot을 이용한 단백질 발현의 측정

각 군의 죽세포를 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% [vol/vol] glycerol)를 이용하여 용해시킨 후, 세포 용해액을 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액 내 단백질은 Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 농도를 결정한 후 50 μ g씩 등분하여 -70°C에 보관하였다.

50 μ g의 단백질은 Laemli sample buffer로 처치, 100°C에서 5분간 가열한 후, 15% acrylamide denaturing SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel 내 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 (1x PBS, 0.1% Tween-20, 그리고 5% nonfat milk)로 처치한 후 4°C에서 하룻밤 동안 Bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology), 그리고 TGF- β (Santa Cruz Biotechnology)에 대한 일차 항체를 처리하여 반응시켰다. Membrane을 1x 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)와 0.1% Tween-20으로 15분간 1회, 5분간 2회 처치한 후, 1:1000으로 희석된 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz

Biotechnology)가 첨가된 buffer A에 1시간 동안 반응시킨 다음 ECL chemiluminescent 시약 (Amersham Life Science, Inc.)을 이용하여 가시화하였다. Signal은 TINA image software를 이용하여 O.D.로 정량화하였다.

6. 배양 족세포의 사멸 측정

가. Hoechst 33258 염색

배양 슬라이드 용기에 배양한 족세포를 PBS로 2회 세척한 후 2% paraformaldehyde와 20% sucrose가 첨가된 PBS로 실온에서 30분간 고정시킨 다음 PBS로 2회 세척하였다. 이후 0.1% Triton X-100 용액이 첨가된 PBS로 실온에서 2분간 처리한 다음 배양된 족세포를 DNA와 결합하는 형광 색소 Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co.)가 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가된 PBS와 암실에서 20분간 반응시킨 후 자외선 filter를 이용하여 형광현미경 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)으로 핵의 형태를 관찰하였다. 최소한 300개 이상의 세포를 관찰하였으며, 핵 내 chromatin이 농축 (condensation)된 사멸체 (apoptotic body)가 존재하는 세포를 세포사멸이 일어난 세포로 간주하였다.

나. FACS 분석

배양한 족세포를 차가운 PBS로 2회 세척한 후 trypsin을 이용하여 배양 용기로부터 탈락시킨 후 우태아혈청을 첨가하여 trypsin을 불활성화시킨 다음 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 세포 pellet을 수집하였다. 수집된 세포는 1×10^6 개/ml이 되도록 annexin 완충액 (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4)을 첨가하였다. 이후 세포 현탁액 100 μl 에 FITC-annexin V (AV; BD Biosciences, Franklin Lakes, NY, USA) 5 μl (annexin 완충액을

이용하여 1:250으로 희석)와 1 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI; BD Biosciences) 5 μl 를 첨가하여 vortex를 시행한 후 암실에서 15분간 반응시켰다. 세포는 flow cytometer (BD Biosciences)와 WinMDI (Ver. 2.8, TRSI, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며, AV와 PI 모두에 표지되지 않은 세포는 생존, PI에만 표지된 세포는 괴사, AV에만 표지된 세포는 초기 세포사멸, 그리고 AV와 PI 모두에 표지된 세포는 후기 세포사멸로 간주하였다.

7. 통계 분석

모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램 SPSS 윈도우용 11.0판 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다. 각 처치군에서의 결과는 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 비교하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적 차이가 있었던 경우에는 Mann-Whitney U-test로 확인하였다. p 값이 0.05 미만인 경우에 의미있는 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. Bax와 Bcl-2 mRNA 및 단백질 발현

세포사멸과 관련된 Bax/Bcl-2의 mRNA 발현비는 NG군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 각각 3배, 2.8배 증가되었다

($p < 0.05$) (Fig. 1).

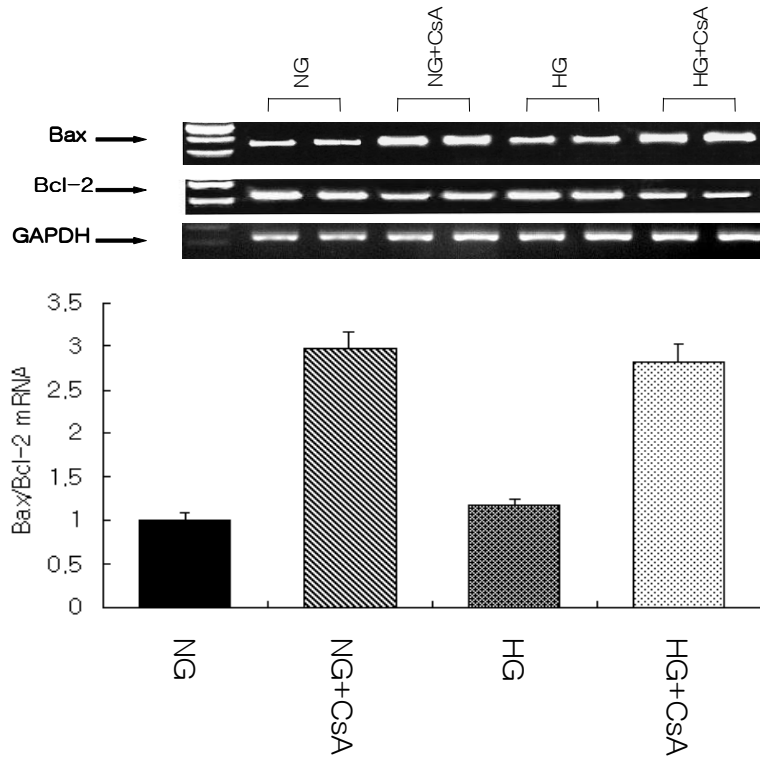


Figure 1. Bax/Bcl-2 mRNA expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by RT-PCR ($p < 0.05$).

Western blot을 이용하여 분석한 Bax/Bcl-2의 단백질 발현비도 NG 군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 각각 2.2배, 1.7배 증가되었다 ($p < 0.01$) (Fig. 2). 그러나 고포도당이나 만니톨은 족세포의 Bax와 Bcl-2의 mRNA 및 단백질 발현에 큰 영향을 주지 않았다.

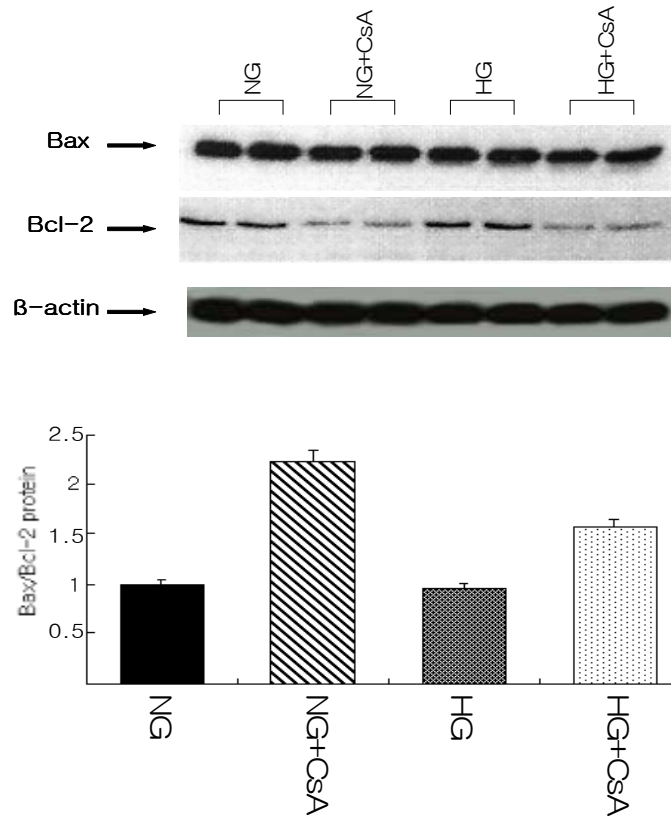


Figure 2. Bax/Bcl-2 protein expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by Western blot ($p < 0.01$).

2. TGF- β mRNA와 단백질의 발현

NG군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 TGF- β mRNA의 발현은 각각 1.7배, 1.5배 증가되었으며 ($p < 0.05$) (Fig. 3), TGF- β 단백질의 발현도 각각 1.4배, 1.8배 증가되었다 ($p < 0.05$) (Fig. 4). 그러나 고포도당이나 만니톨은 족세포의 TGF- β mRNA와 단백질의 발현에 영향을 주지 않았다.

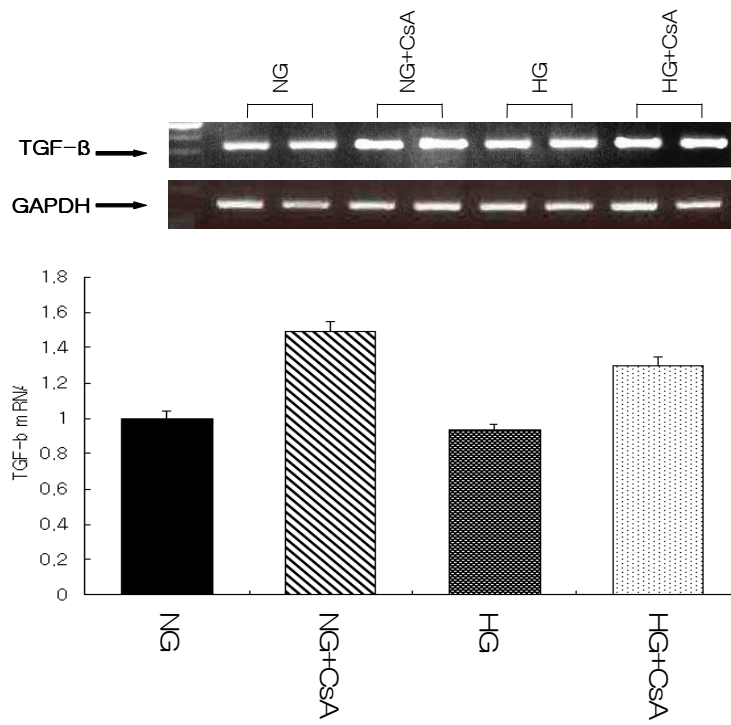
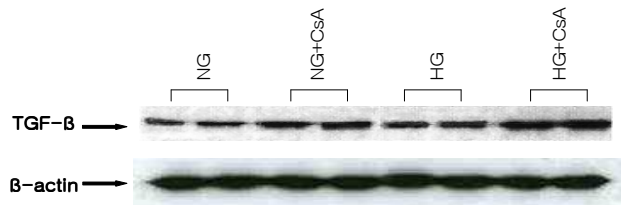


Figure 3. TGF- β mRNA expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by RT-PCR ($p < 0.05$).



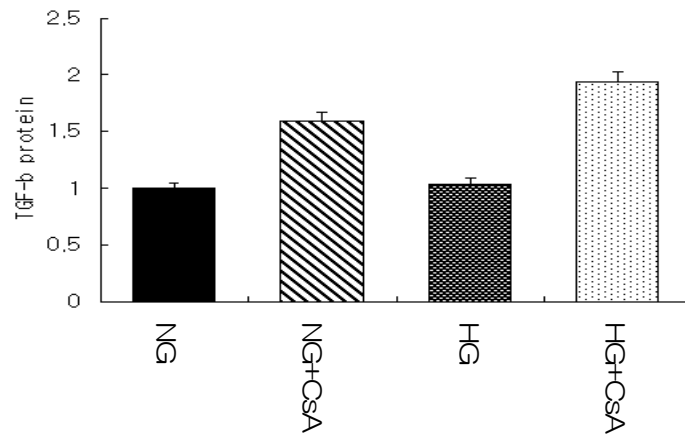


Figure 4. TGF- β protein expression in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups assessed by Western blot ($p < 0.05$).

3. 세포사멸 분석

가. Hoechst 33258 염색

Hoechst 33258 염색상 세포사멸이 일어난 세포는 CsA 처치군에서 의의있게 많았다 ($p < 0.05$) (Fig. 5, Fig. 6). 반면에, 고평도당이 나 만니톨은 족세포에서 Hoechst 33258 염색으로 분석한 세포사멸에 큰 영향을 주지 않았다.

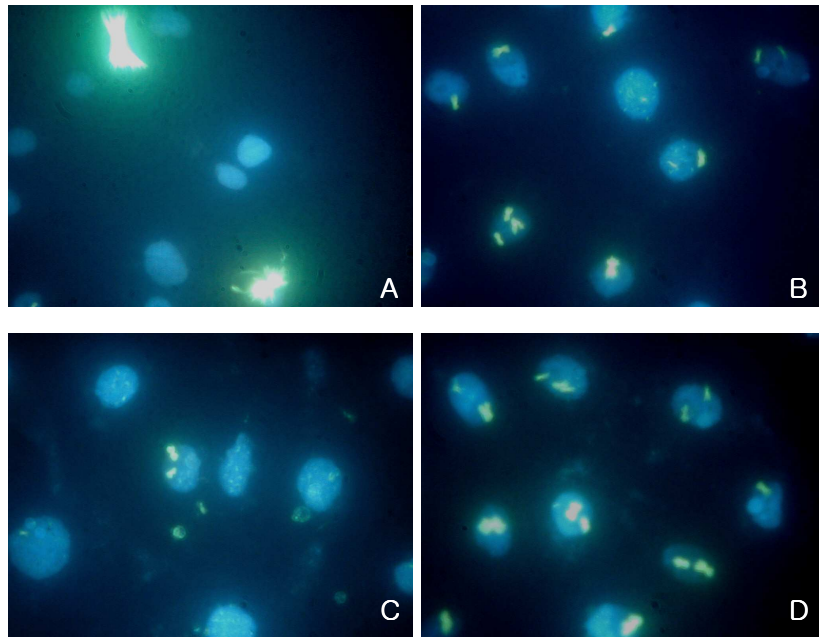


Figure 5. Fluorescent photographic assessment of apoptosis in podocytes. Cells were stained with DNA-binding fluorochrome Hoechst 33258 (x400, A: NG, B: NG + CsA, C: HG, D: HG + CsA).

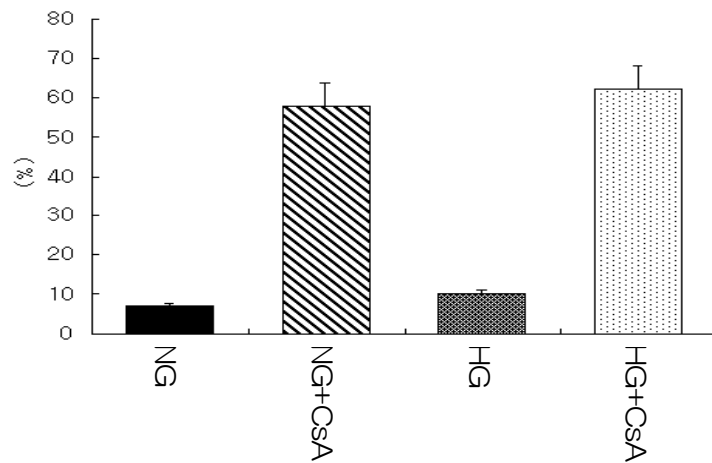


Figure 6. Apoptotic podocytes in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA assessed by Hoechst 33258 staining ($p < 0.05$).

나. FACS 분석

FACS를 이용한 세포사멸 분석에서도 CsA 처치군에서 세포사멸이 일어난 죽세포가 의의있게 많았다 (Fig. 7) (Table 2). NG + CsA군과 HG + CsA군에서 세포사멸이 일어난 세포는 각각 $60.51 \pm 6.72\%$ 와 $49.34 \pm 8.25\%$ 로, NG군의 $21.87 \pm 3.2\%$ 비하여 의의있게 많았다 ($p < 0.01$). 고평도당이나 mannitol은 배양 죽세포에서 FACS를 이용하여 분석한 세포사멸에 큰 영향을 주지 않았다.

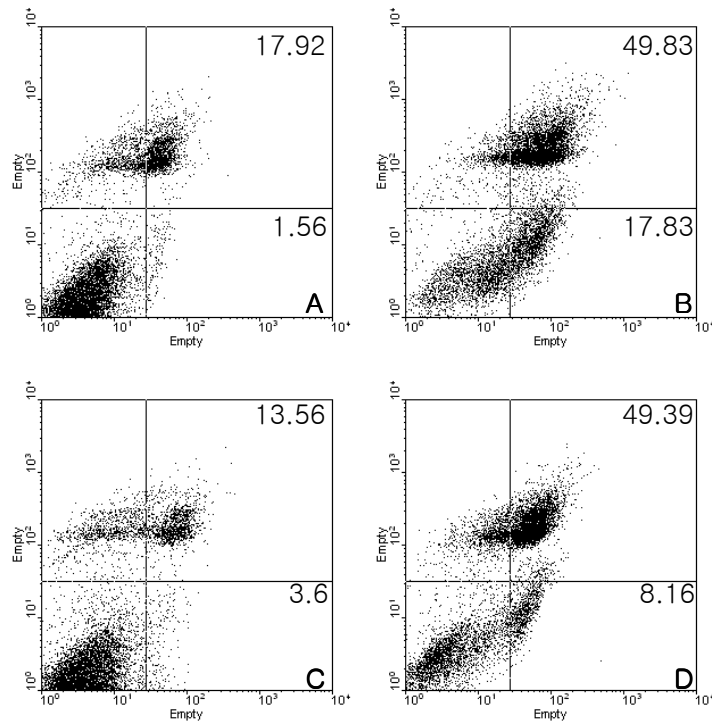


Figure 7. FACS analysis of apoptosis in NG (A), NG + CsA (B),

HG (C) and HG + CsA (D) groups.

Table 2. FACS analysis of apoptosis in NG, NG + CsA, HG and HG + CsA groups.

	Viabile (LL)	Necrosis (UL)	Early apoptosis (LR)	Late apoptosis (UR)	Apoptosis (Early + Late)
NG	72.2 ± 2.84	6.18 ± 5.47	2.24 ± 0.78	19.63 ± 2.42	21.87 ± 3.2
NG+CsA	22.83 ± 5.62	8.01 ± 2.6	15.83 ± 4.22	44.68 ± 2.3	60.51 ± 6.72
HG	70.91 ± 2.01	10.93 ± 4.88	3.6 ± 1.49	13.56 ± 4.3	17.16 ± 5.79
HG+CsA	28.88 ± 4.24	11.57 ± 7.25	6.16 ± 2.5	43.18 ± 5.75	49.34 ± 8.25

IV. 고찰

1980년대 초에 CsA과 muromonab-CD3 (OKT3 단일 클론 항체)가 임상에 널리 사용되기 시작한 이후, 신이식 후 이식신 1년 생존율이 약 60%에서 약 90%로 급성장하였다²⁴. CsA은 11개의 아미노산으로 구성된 강력한 면역억제제로³ 신이식 환자뿐만 아니라 각종 자가면역성 질환과 신증후군 환자에서도 흔히 사용되고 있는데²⁵, 이 약제를 장기간 사용하는 환자에서 신독성은 가장 심각한 문제로 되어 있다^{4,5,26}. 이러한 만성 CsA 신독성의 병태생리는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 장기간의 허혈과 세포사멸이 관여하는 것으로 알려져 있다²⁷.

Dempsey 등이 세뇨관 배양세포에서 CsA에 의한 세포사멸을 처음 보고한 이후로 CsA에 의한 세포사멸은 주로 세뇨관 세포를 중심으로 이루어져 왔다²⁸. Healy 등은 LLC-PK₁ 세포에서 저용량의 CsA에 의해서는 세포사멸이 유도되었던 반면에 고용량의 CsA에 의해서는 오히려 세포피사가 유도된 것으로 미루어 CsA에 의한 세포 독성의 기전이 용량에 따라 달라진다고 하였다²⁹. 이와는 반대로 Bakker 등은 사람의 신장으로부터 분리 배양한 근위세뇨관 세포와 LLC-PK₁ 세포에서 CsA에 의한 세포사는 세포사멸이 아닌 세포피사에 의한 것이라고 하였다³⁰. 이렇게 상이한 결과는 실험에 사용한 CsA의 용매가 하나의 원인일 수 있는데, 전자의 경우에는 용매로 ethanol만을 사용하였던 반면에 후자의 경우에는 ethanol과 Cremophore EL을 동시에 사용하였던 것으로 미루어보아 Cremophore EL에 의하여 세포피사가 유도되었을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 세포사멸을 관찰하고자 하였기 때문에 CsA 용매로는 ethanol만을 사용하였다.

CsA에 의한 세포사멸에는 여러 인자가 관여하는 것으로 알려져 있는데, 그 중에서도 가장 많이 거론되어 있는 인자는 nitric oxide와 TGF- β 이다^{31,32}. 사람의 근위세뇨관 배양세포에서 CsA에 의한 세포사멸이 nitric oxide 억제제인 L-nitromethylarginine과 cycloheximide에 의하여 억제되었다는 연구 결과³³가 있는가 하면 CsA 신독성이 동반된 쥐에서 TGF- β 중화 항체가 세뇨관 세포의 세포사멸을 억제시켰다는 연구 보고도 있다³⁴. 이러한 nitric oxide와 TGF- β 는 서로 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다³⁵.

병리학적으로 CsA에 의한 신독성은 신장 내 간질의 섬유화, 세뇨관 위축, 그리고 구심성 세동맥의 hyalinosis가 특징적인 소견으로 되어 있으며, 종종 사구체경화증도 동반되는데, 최근에는 사구체경화증의 병태생리학적 면에서 족세포의 역할이 크게 강조되고 있다³⁶. 족세포는 발생기에는 증식을 하지만 성인이 되면 정상 상태에서는 증식을 하지 않는 최종 분화된 상태의 세포이다. 그러나 각종 자극에 의하여 족세포가 손상을 받을 경우 족세포 탈락과 세포 증식이 일어나게 되며, 이 과정에 세포사멸이 관여하는 것으로 알려져 있다. 최근에 Fornoni 등은 CsA에 의한 신독성의 병태생리에 족세포의 세포사멸도 관련이 있을 것이라고 하였다. 그들은 족세포에서 CsA이 용량-의존적으로 ELISA와 flow cytometry로 분석한 세포사멸을 유도하였으며, hepatocyte growth factor가 CsA에 의하여 유도된 세포사멸을 억제시켰다고 보고하였다¹². 본 연구에서는 비록 CsA의 용량에 따른 세포사멸의 정도에 관한 실험을 시행하지는 않았지만, 기존의 연구에서 세포사멸이 유도되었던 용량을 사용하여 족세포에서 세포사멸의 발생을 Hoechst 33258 염색과 FACS로 증명하였다.

족세포의 세포사멸에 대한 연구는 아직 많지 않은 실정으로 기존의 연구 결과에 의하면 족세포에서도 TGF- β 가 세포사멸과 밀접하

계 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. Schiffer 등은 배양 족세포에서 TGF- β_1 과 Smad7이 세포사멸을 유도하였다고 하였으며, TGF- β_1 에 의한 세포사멸에 p38 MAPK가 관여한다고 하였다³⁷. Wada 등도 족세포에서 TGF- β_1 에 의한 세포사멸을 관찰하였는데, 그들은 이 과정에 cyclin-dependent kinase 억제제인 p21이 관여한다고 보고하였다³⁸. TGF- β 는 세포사멸 이외에도 각종 질환의 병태생리에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 특히 당뇨병성 신병증에서 병리학 적 특징인 세포 비후와 세포 외 기질의 합성에 관여하는 가장 중요한 인자로 되어 있다^{39,40}. 이러한 TGF- β 는 메산지움 세포를 비롯하여 세뇨관 세포와 평활근 세포에서 고포도당에 의하여 발현이 증가되며⁴¹⁻⁴⁴, 당뇨병성 신병증의 병태생리에 세포사멸이 관련이 있다는 여러 증거들이 있는 상황을 고려해 볼 때¹³, 족세포에서도 고포도당에 의하여 TGF- β 의 발현이 증가하고, 이러한 TGF- β 증가에 의하여 세포사멸이 유도될 수 있을 것으로 생각되나 아직까지 족세포에서 고포도당에 의한 세포사멸에 대한 보고는 전무한 실정이다.

본 연구 결과상 배양 족세포에서 고포도당에 의한 세포사멸의 유도를 관찰할 수 없었는데, 이는 아마도 고포도당이 다른 신장 세포와는 달리 족세포에서 TGF- β 의 발현을 증가시키지 않았기 때문으로 생각된다.

최근에 당뇨병성 신병증은 투석이나 이식이 필요한 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환으로 대두되었으며, 그 빈도는 계속적으로 증가하고 있다. 이러한 이유로 당뇨병 환자에서의 신이식도 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 일반적으로 당뇨병 환자에서의 이식신 생존율은 비당뇨병 환자에 비하여 낮은 편인데, 이러한 차이는 감염과 급성 거부 반응의 빈도 차에 기인하는 것으로 알려져 있다. 보고자에 따라서는 급성 거부 반응도 세포사멸과 관련이 있는 것으로 이야기하고 있기 때문에 본 연구에서는 고포도당과 CsA

의 세포사멸에 대한 복합적인 효과를 규명하고자 하였다. 그 결과 죽세포에서 고평도당이 CsA에 의하여 유도된 세포사멸을 더 증가시키지는 않았는데, 이러한 결과가 본 실험에서 사용한 용량의 CsA에 의하여 유도된 세포사멸이 너무 광범위하여 고평도당에 의한 효과가 masking되었을 가능성을 완전히 배제할 수는 없을 것으로 생각된다.

결론적으로 신이식을 시행받은 당뇨병 환자에서 면역억제제로 사용하는 CsA에 의한 죽세포의 세포사멸이 비당뇨병 환자와 비교하여 더 증가하지는 않을 것으로 생각되나, 향후 고평도당과 함께 다양한 용량의 CsA으로 자극한 죽세포에서의 세포사멸에 대한 추가적인 연구를 통하여 반드시 재확인하여야 할 것으로 생각된다. 또한 CsA에 의한 세포사멸이 주로 발생하는 세뇨관 세포를 이용한 추가 실험도 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 당뇨병 신이식 환자에서의 낮은 신생존율과 죽세포 사멸 사이의 연관성을 규명하기 위하여 고평도당과 CsA으로 자극한

족세포에서의 세포사멸을 알아보려고 하였다. 5.6 mM 포도당 (NG), NG + 24.4 mM 만니톨 (NG + M), NG + 10^{-6} M CsA (NG + CsA), 30 mM 포도당 (HG), 그리고 HG + 10^{-6} M CsA (HG + CsA) 배양액으로 72 시간 동안 배양하여 mRNA 발현은 RT-PCR로, 단백 발현은 Western blot로, 그리고 세포사멸은 Hoechst 33258 염색과 FACS를 이용하여 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 족세포에서 Bax/Bcl-2 mRNA 발현비는 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 NG군과 HG군에 비하여 각각 3배, 2.8배 증가되었고 ($p < 0.05$) 각 군 사이에 Bax/Bcl-2의 단백 발현비 또한 NG군과 HG군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 2.2배, 1.7배 증가되었다 ($p < 0.01$). 고포도당이나 만니톨은 족세포의 Bax, Bcl-2 mRNA 및 단백 발현에 영향을 미치지 않았다.
2. TGF- β mRNA 및 단백 발현은 NG군과 HG군에 비하여 NG + CsA군과 HG + CsA군에서 유의있게 증가되었다 ($p < 0.05$). 고포도당이나 만니톨은 족세포의 TGF- β 발현에 영향을 미치지 않았다.
3. Hoechst 33258 염색에 의한 apoptotic cell의 수는 CsA 처리군에서 유의있게 증가되었으며, FACS 분석 상으로도 CsA 처리군에서 apoptotic cell의 비율이 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.01$).

이상의 결과로 족세포에서 CsA이 세포사멸을 증가시켰으며, CsA에 의한 세포사멸이 고포도당 조건 하에서 더 심화되지는 않을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chen SC, Everson S, Constantini E, et al. Excepts from the United States Renal Data System 2004 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Am J Kidney Dis 2005;45 Suppl 1:v-vii.
2. 대한신장학회 등록위원회. 우리나라 신대체 요법의 현황 - 인산기념 말기 신부전 환자 등록사업 2003- 대한신장학회지 2004;28 Suppl 2:S382-S404.
3. Gooch JL, Barnes JL, Garcia S, Abboud HE. Calcineurin is activated in diabetes and is required for glomerular hypertrophy and ECM accumulation. Am J Physiol Renal Physiol. 2003;284:F144-154. Epub 2002 Sep 11.

4. Andoh TF, Bennett WM. Chronic Cyclosporine nephrotoxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:265-270.
5. Bennett WM. Insights into chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996;34:515-519.
6. Shihab FS. Cyclosporine nephrotoxicity: Pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol* 1996;16:536-547.
7. Price DA, Porter LS, Gordon M, Fisher ND, De' Oliveira JM, Laffel LM, et al. The paradox of low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2382-2391.
8. Seikaly MG, Arant BS, Seney FD. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 1990;86:1352-1357.
9. Kelly DJ, Cox AJ, Tolcos M, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL, Gilbert RE. Attenuation of tubular apoptosis by blockade of the renin-angiotensin system in diabetic Ren-2 rats. *Kidney Int* 2002;61:31-39
10. Ortiz A, Lorz C, Catalan M, Ortiz A, Coca S, Egido J.

Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells: role of caspases. *Kidney Int Suppl* 1998;68:S25-S29.

11. Amore A, Emancipator SN, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N, et al. Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int* 2000;57:1549-1559.
12. Fornoni A, Li H, Foschi A, Striker GE, Striker LJ. Hepatocyte growth factor, but not insulin-like growth factor I, protects podocytes against cyclosporin A-induced apoptosis. *Am J Pathol* 2001;158:275-280.
13. Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 1995;333:18-25.
14. Daemen MA, van V, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:541-549.
15. Morrissey JJ, Klahr S. Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *Am J Physiol* 1999;276:F39-F45.
16. Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in the repair process of

- experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1995;47:114-121.
17. Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J. Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. *J Clin Invest* 1994;94:2105-2116.
18. Schelling JR, Cleveland RP. Involvement of Fas-dependent apoptosis in renal tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;56:1313-1316.
19. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota A. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996;49:103-111.
20. Kang BPS, Frencher S, Reddy V, et al. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol* 2003;284:F455-F466.
21. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int* 1992;42:647-656.

22. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN. Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 1992;41:107-114.
23. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor β 1 production is mediated by the hexoseamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;101:160-169.
24. Vereerstraeten P. Renal transplantation at the Free University of Brussels. *Rev Med Brux* 1993;14:78-82.
25. Vine W, Bowers LD. Cyclosporine: structure, pharmacokinetics, and therapeutic drug monitoring. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1987;25:275-311.
26. Li C, Lim SW, Sun BK, Yang CW. Chronic cyclosporine nephrotoxicity: new insights and preventive strategies. *Yonsei Med J* 2004;45:1004-1016.
27. Lee SY, Jo SK, Cho WY, Kim HK, Won NH. The effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation* 2004;78:1756-1764.

28. Dempsey M, Healy E, Ryan MP. Intracellular signaling and cyclosporin A-induced apoptosis in a renal cell line. *Biochem Soc Trans* 1998;26:S344.
29. Healy E, Dempsey M, Lally C, Ryan MP. Apoptosis and necrosis: mechanisms of cell death induced by cyclosporine A in a renal proximal tubular cell line. *Kidney Int* 1998;54:1955-1966.
30. Bakker RC, van Kooten C, van de Lagemaat-Paape ME, Daha MR, Paul LC. Renal tubular epithelial cell death and cyclosporin A. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1181-1188.
31. Mohamed MA, Robertson H, Booth TA, Balupuri S, Gerstenkorn C, Kirby JA, et al. Active TGF-1 expression in kidney transplantation: A comparative study of cyclosporine-A (CyA) and tacrolimus (FK506). *Transpl Int Suppl* 1 2000;13:S295-S298.
32. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E, Garcia-Torres R, Bolio A, Lopez-Zetina P, et al. Role of NO in cyclosporine nephrotoxicity: Effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *Am J Physiol* 1998;274:F791-798.

33. Amore A, Emancipator SN, Cirina P, Conti G, Ricotti E, Bagheri N, et al. Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int* 2000;57:1549-1559.
34. Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, et al. Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:377-388.
35. Patel P, Varghese E, Ding G, Fan S, Kapasi A, Reddy K, et al. Transforming growth factor beta induces mesangial cell apoptosis through NO- and p53-dependent and -independent pathways. *J Investig Med* 2000;48:403-410.
36. Morales JM, Andres A, Rengel M, Rodicio JL. Influence of cyclosporin, tacrolimus and rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant Suppl* 1 2001;16 :121-124.
37. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 2001;108:807-816.

38. Wada T, Pippin JW, Terada Y, Shankland SJ. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is required for TGF-beta1-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int* 2005;68:1618-1629.
39. Kushiro M, Shikata K, Sugimoto H, Ikeda K, Horiuchi S, Makino H. Accumulation of Nsigma-(carboxy-methyl)lysine and changes in glomerular extracellular matrix components in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat: a model of spontaneous NIDDM. *Nephron* 1998;79:458-468.
40. Oh JH, Ha H, Yu MR, Lee HB. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor-beta 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int* 1998;54:1872-1878.
41. Hoffman BB, Sharma K, Ziyadeh FN. Potential role of TGF-beta in diabetic nephropathy. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:190-196.
42. Mogyorosi A, Ziyadeh FN. What is the role of decorin in diabetic kidney disease? *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1078-1081.
43. 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
2001;23:471-481.

44. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. Semin Nephrol 2003;23:532-543.

ABSTRACT

The effect of high glucose and cyclosporine A
on apoptosis in cultured podocytes

Dong-Sub Jung

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Shin-Wook Kang)

Cyclosporine A (CsA) is a potent immunosuppressant for transplantation and various autoimmune diseases, and has markedly improved the success of organ transplantation. However, the major limiting problem in the long-term use of CsA is chronic nephrotoxicity, a histologic lesion characterized by afferent arteriopathy, tubular atrophy, tubulointerstitial fibrosis, and finally glomerulosclerosis. The pathogenesis of chronic CsA nephrotoxicity is not fully understood, but several previous studies have suggested that it is attributed to sustained ischemia and apoptosis of tubular cells, mesangial cells, and podocytes. On the other hand, apoptosis of podocytes is also considered one of the pathophysiologic events in diabetic nephropathy, resulting in decrease in podocytes number. Diabetic nephropathy is the leading cause of end-stage renal disease (ESRD) in many countries, so more diabetic ESRD patients are supposed to receive a kidney transplant. However, the renal survival rates in diabetic ESRD patients are known to be worse than non-diabetic ESRD patients due to more infection and acute rejection, in which apoptosis is known to be implicated.

In this study, we evaluated the combined effect of high glucose and CsA on apoptosis in cultured podocytes to

determine whether high glucose and CsA exert synergistic deleterious effects on podocytes, leading to poor renal survival in diabetic transplant patients in clinical field. Conditionally immortalized mouse podocytes were cultured under permissive conditions at 33°C with γ -interferon and were subcultured, and then allowed to differentiate at 37°C without γ -interferon. After confirming differentiation of podocytes and serum restriction for 24 hours, podocytes were exposed to medium containing 5.6 mM glucose (NG), NG + 24.4 mM mannitol (NG + M), NG + 10^{-6} M CsA (NG + CsA), 30 mM glucose (HG), or HG + 10^{-6} M CsA (HG + CsA) for 72 hours. mRNA expression was determined by RT-PCR, protein expression by Western blot, and apoptosis by Hoechst 33258 staining and FACS analysis. The results were as follows;

1. Bax/Bcl-2 mRNA expression ratio was significantly increased in NG + CsA and HG + CsA cells by 3.0- and 2.8-fold, respectively, compared to podocytes exposed to NG medium ($p < 0.05$). Bax/Bcl-2 protein ratio was also significantly increased in NG + CsA and HG + CsA cells by 2.2- and 1.7-fold, respectively, compared to NG podocytes ($p < 0.01$). However high glucose and mannitol had no effect on Bax and Bcl-2 mRNA and protein expression.
2. TGF- β mRNA and protein expression were significantly higher in NG + CsA and HG + CsA podocytes than NG cells ($p < 0.05$). However high glucose and mannitol had no

effect on TGF- β expression.

3. The numbers of apoptotic cell determined by Hoechst 33258 staining were significantly increased by CsA treatment, and FACS analysis also revealed significantly higher proportion of apoptotic cells in CsA-treated groups.

In conclusion, these results suggest that CsA increases apoptosis in podocytes and diabetes status may not affect CsA-induced apoptosis of podocytes.

Key Words: podocyte, apoptosis, high glucose, cyclosporine A