

고포도당으로 자극한 백서 사구체
메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제가
p27^{Kip1} 및 GLUT1의 발현에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의과학사업단
허 중 호

고포도당으로 자극한 백서 사구체
메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제가
p27^{Kip1} 및 GLUT1의 발현에 미치는 영향

지도교수 한 대 석

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

허 중 호

허종호의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

아무것도 모르는 저에게 많은 기회와 격려를 주시고 과학에 대한 가르침을 주시고 미숙한 저의 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 열성으로 이끌어 주신 은사 한대석 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 실험의 시작부터 마무리까지 부족한 저를 항상 끊임없는 인내와 자상함으로 도와주시고 문제점을 지적하여 주시며 같이 고민하여 주신 강신욱 교수님께 특히 감사드립니다. 본 연구 기간 중 항상 관심을 가져 주시고 도움을 주신 김유선 교수님과 송시영 교수님, 그리고 많은 조언을 주신 하현주 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 실험에 대한 개념도 없었던 저에게 많은 격려를 주셨던 노현진 선생님께도 심심한 감사를 드리며, 그 외에 신장내과 이호영 교수님과 최규현 교수님을 비롯한 많은 선생님께도 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 바쁜 중에도 곁에서 항상 친절히 도와주신 박형천 교수님, 강진구 선생님, 김범석 선생님, 류동렬 선생님과 그 외의 많은 선생님들께도 진심으로 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

항상 부족한 아들을 이해하시고 용서해주신 부모님과 끊임없이 도와준 사랑하는 아내와 귀여운 딸에게 이 논문을 드립니다.

저 자 씀

차례

그림 차례	ii
표 차례	ii
국문요약	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 백서 사구체 메산지움 세포의 분리 및 배양	5
2. 약물의 처리 및 투여	6
3. 세포수 및 총 단백질의 측정	7
4. 단백 추출 및 Western blot 분석	7
5. RNA 추출 및 RT-PCR 분석	8
6. Fibronectin에 대한 ELISA 분석	10
7. 통계 분석	11
III. 결과	13
1. 고평도당에 의한 p21 ^{WAF1} , p27 ^{Kip1} 및 p57 ^{Kip2} 단백 발현의 변화	13
2. 고평도당에 의한 GLUT1 단백 발현의 변화	13
3. 고평도당에 의한 phospho-specific ERK1/2의 변화	14
4. MEK 억제제 투여에 의한 phospho-specific ERK1/2의 변화	14
5. MEK 억제제 투여에 의한 메산지움 배양세포수 및 총 단백질의 변화	21
6. MEK 억제제 투여에 의한 p27 ^{Kip1} 단백질과 mRNA 발현의 변화	22
7. MEK 억제제 투여에 의한 GLUT1 단백질과 mRNA 발현의 변화	25
8. MEK 억제제 투여에 의한 fibronectin mRNA와 세포 배양액내 fibronectin의 변화	25
IV. 고찰	30
V. 결론	38
참고문헌	40
영문요약	46

그림 차례

Figure 1. Effect of high glucose on p21 ^{WAF1} protein expression in mesangial cells	17
Figure 2. Effect of high glucose on p27 ^{Kip1} protein expression in mesangial cells	18
Figure 3. Effect of high glucose on p57 ^{Kip2} protein expression in mesangial cells	19
Figure 4. Effect of high glucose on GLUT1 protein expression in mesangial cells	20
Figure 5. Effect of high glucose on phospho-specific ERK1/2 protein expression in mesangial cells	21
Figure 6. Effect of PD98059 on high glucose-induced phospho-specific ERK1/2 protein expression in mesangial cells	22
Figure 7. Effect of PD98059 on cell numbers and total protein content in mesangial cells under high glucose conditions	23
Figure 8. Effect of PD98059 on high glucose-induced p27 ^{Kip1} protein expression in mesangial cells	25
Figure 9. Effect of PD98059 on high glucose-induced p27 ^{Kip1} mRNA expression in mesangial cells	26
Figure 10. Effect of PD98059 on high glucose-induced GLUT1 protein expression in mesangial cells	28
Figure 11. Effect of PD98059 on high glucose-induced GLUT1 mRNA expression in mesangial cells	29
Figure 12. Effect of PD98059 on high glucose-induced fibronectin mRNA expression in mesangial cells	30
Figure 13. Effect of PD98059 on high glucose-induced fibronectin concentration in the supernatant of cultured mesangial cells	31

표 차례

Table 1. Sequences of primers and PCR conditions	14
--	----

국문요약

고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제가 p27^{Kip1} 및 GLUT1의 발현에 미치는 영향

당뇨병성 신증의 특징인 세포 비후 및 세포외 기질의 축적은 포도당이 당전달체인 glucose transporter (GLUT)에 의해 세포 내로 유입된 후 다양한 신호전달 경로를 통해 발생하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 여러 신호전달 경로 중에서도 mitogen-activated protein kinase (MAPK)가 당뇨병성 신증의 병태생리에 관여한다는 연구들이 계속 보고되고 있다. 세포 비후는 세포주기에서 cyclin, cyclin-dependent kinase 및 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)에 의해 결정되어지며, 특히 CKIs의 발현 증가는 세포주기 내에서의 진행을 억제시켜 세포 비후가 발생하는 것으로 보고되고 있다. 당뇨병성 신증의 병태생리에도 CKIs가 관여하는 것으로 알려져 있으나, 아직까지는 MAPK의 하나인 extracellular signal-regulated kinase (ERK)와 CKIs 및 GLUT1과의 상관관계에 대한 연구는 없는 실정이다. 이에 본 연구자는 고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 CKIs (p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), GLUT1 및 ERK 단백질 발현의 변화를 관찰하였으며, ERK 경로 억제제인 PD98059가 고포도당에 의한 CKIs, GLUT1 및 세포 배양액 내의 fibronectin에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고포도당 (30mM)으로 자극한 메산지움 배양세포에서 p21^{WAF1} 단백질은 24시간과 48시간 경과 후 정상 포도당군 (5.6mM)에 비해 각각 2.9배, 3.0배 증가되었으나 ($p < 0.05$), 72시간과 120시간 후에는 정상 포도당군과 차이가 없었다. p27^{Kip1} 단백질은 자극 24시간 후 고포도당군에서 정상 포도당군에 비해 2.1배 증가되었으며 ($p < 0.05$), 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다. p57^{Kip2} 단백질은 전기간을 통하여 변화가 없었다.

2. 고포도당 자극에 따른 GLUT1 단백질 발현은 고포도당 자극 72시간 후 정상 포도당군에 비해 2.0배 증가되었으며 ($p < 0.05$), 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다.

3. 고포도당 자극에 따른 ERK의 활성화는 고포도당 자극 72시간 후 정상 포도당군에 비해 1.6배 증가되었으며 ($p < 0.05$), 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다.

4. MEK 억제제인 PD98059 (25 μ M)는 고포도당으로 120시간 자극

한 메산지움 세포에서 p27^{Kip1}과 GLUT1의 단백 발현 증가를 각각 83%, 82% 억제시켰으며 ($p < 0.05$), mRNA의 발현 증가도 각각 65%, 82% 억제시켰다 ($p < 0.05$).

5. PD98059는 고포도당으로 120시간 자극한 메산지움 배양세포에서 메산지움 세포수당 총 단백질, fibronectin mRNA 발현 및 세포 배양액내 fibronectin 증가를 각각 63%, 92% 및 54% 억제시켰다 ($p < 0.05$).

이상의 결과로 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 고포도당에 의한 p27^{Kip1}과 GLUT1의 증가는 ERK 경로의 활성화와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있으며, ERK 경로를 차단할 경우 세포 비후 및 세포외 기질의 축적을 억제시킬 수 있어 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 당뇨병성 신증, 메산지움 세포, 세포 비후, cyclin-dependent kinase inhibitor, glucose transporter, mitogen-activated protein kinase

고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제가 p27^{Kip1} 및 GLUT1의 발현에 미치는 영향

<지도교수 한대석>

연세대학교 대학원 의과학사업단

허종호

I. 서론

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환으로 I형 당뇨병의 30~40%, II형 당뇨병의 15~30%에서 발생한다. 미국에서 발표된 Diabetic Control and Complications Trial (DCCT) 연구 결과¹는 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 철저한 혈당 조절로 신병증의 발생과 초기 당뇨병성 신증의 진행이 의미있게 억제됨을 보고함으로써 고혈당 자체가 당뇨병성 신증의 발생에 중요한 역할을 함을 증명하였다.

당뇨병성 신증의 특징적인 병리학적 변화로는 신세포의 비후와 세포외 기질의 축적이다². 당뇨병성 신증에서 메산지움 세포 (mesangial cells)는 이 질환의 발생과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 메산지움 배양세포는 고포도당에 의해 세포 비후가 일어나며, collagen IV 및 fibronectin 등의 합성 증가로 인해 세포외 기질의 축적이

발생하는 것으로 알려져 있다³⁻⁶. 그러나, 세포 내로 유입된 포도당이 어떠한 경로를 거쳐 세포의 비후와 세포의 기질의 축적을 일으키는 지에 대해서는 확고한 정설이 없는 실정이다.

당뇨병성 신증의 발병 기전에 관여하는 신호전달 경로 중 최근에 많은 연구가 보고되고 있는 것이 MAPK 경로이다. MAPK는 세포외의 신호를 세포내 반응으로 전달하는데, 현재까지 ERK, p38-MAPK, stress activated protein kinase (SAPK)로 알려진 c-Jun N-terminal kinase (JNK) 등 3가지의 경로가 알려져 있다⁷⁻⁹. 최근에 Haneda 등^{10, 11}은 당뇨병 동물 모델과 고포도당으로 자극한 메산지움 세포에서 ERK의 활성화를 관찰하였으며, Kang 등¹²은 생체내 및 생체의 실험을 통해 당뇨병이나 고혈당에 의한 p38-MAPK의 활성을 보고하는 등 당뇨병성 신증의 발생에서 MAPK의 역할이 중요함을 시사 한 바 있다.

세포 비후는 궁극적으로 세포주기의 조절에 의해 완성되는데 세포 주기는 cyclin과 cyclin-dependent kinase에 의해 진행되며, CKIs가 cyclin과 cyclin-dependent kinase의 결합체에 결합하는 경우에 세포 주기의 정지가 일어나 궁극적으로 세포 비후가 일어나게 된다. CKIs는 INK4족 (p15, p16, p18, p19)과 KIP족 (p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2})으로 분류되어지는데, INK4족에 비해 KIP족이 세포주기의 정지에 크게 관여하는 것으로 되어 있다. Al-Douahji 등²²과 Wolf 등^{16,18}은 당뇨병성 신증에서 메산지움 세포 비후가 주로 CKIs의 증가에 의한 것이라고 보고하고 있는데, KIP족

p57^{Kip2} 는 신장 비후와 크게 관련이 없는 것으로 알려져 있는 반면²¹, p21^{WAF1}과 p27^{Kip1} 중 어느 것이 세포 비후에 주로 관여하는 지에 대해서는 아직 확실한 결론이 없는 상태이다. 이러한 CKIs의 발현에 ERK 경로가 관여한다는 보고를 살펴보면, 신세뇨관 및 NIH 3T3 세포에서 angiotensin II 및 nerve growth factor에 의해 증가된 CKIs가 ERK 경로 억제제에 의해 정상화되었다는 보고가 있다^{19, 26}.

혈당은 세포막에 존재하는 GLUT와 결합을 한 후 세포 내로 이동하며 여러가지 변화를 일으키게 된다. 최근 Heilig 등¹⁵의 연구에 의하면 사구체 메산지움 세포에서는 주로 GLUT1이 발현되며, 고포도당으로 자극하였을때 GLUT1 mRNA의 증가가 유도되었을 뿐만 아니라 GLUT1 cDNA를 transfection시킨 세포는 정상 포도당 농도에서도 고포도당 하에서의 변화와 동일한 세포 변화가 관찰되었다^{13, 14}. 고포도당에 의해 발현이 증가된 GLUT1과 TGF- β 1은 서로의 발현에 영향을 주어 당뇨병성 신증 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데²⁷, TGF- β 1을 억제시킨 경우 GLUT1의 발현이 감소되는 것으로 보고되고 있다. TGF- β 1과 ERK 사이에도 밀접한 연관성이 존재하기 때문에^{37, 38}, TGF- β 1 신호전달체계 중 상부에서 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있는 ERK 경로를 억제시킬 경우에도 GLUT1의 발현이 억제될 수 있을 것으로 생각되어지나, 아직 이에 대한 보고는 없는 실정이다.

이에 본 연구자는 ERK 경로 억제시 CKIs와 GLUT1의 발현이 감

소되어 세포 비후와 세포외 기질의 합성이 억제될 수 있을 것이라는 가정 하에, 고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포를 대상으로 CKIs의 변화를 연구하고, ERK 경로 억제 후 CKIs, GLUT1 및 세포외 기질의 주 성분인 fibronectin의 변화를 관찰함으로써 당뇨병성 신증의 발생 및 치료에 새로운 방향을 제시하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 백서 사구체 메산지움 세포의 분리 및 배양

200~250g의 Sprague-Dawley 백서 (Daehan Bio Link, Seoul, Korea)를 pentothal (50mg/kg)로 마취한 후 단두하여 희생시킨 후 신장을 적출하여 Harper 등²⁸이 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 (100U/ml)과 streptomycin (100 μ g/ml) (GIBCO Laboratories, Bethesda, MA, USA)이 함유된 인산 완충 용액 (phosphate buffered saline: PBS)에 옮긴 후 체공이 200, 150 및 75 μ m인 stainless sieve를 차례로 통과시킨 다음 75 μ m 소공에 걸린 사구체를 PBS에 재부유시켰다. 재부유액을 1500rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남은 조직을 20% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO Laboratories), penicillin (100U/ml), streptomycin (100 μ g/ml), 44mM NaHCO₃ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 14mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES) (Sigma Chemical Co.)가 함유된 RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.)에 넣고 5% CO₂와 95% 공기가 공급되는 37°C 세포 배양기에서 배양하였다. 약 2주간 배양액을 2~3일

마다 교체하여 메산지움 세포로 거의 찻을 때 trypsin/EDTA (0.5%/0.53nM)를 이용하여 계대 배양하고 제 5~8회 계대 배양한 메산지움 세포를 실험에 이용하였다.

2. 약물의 처리 및 투여

가. 본 실험은 배양액내 포도당 최종 농도가 각각 5.6mM, 30mM 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 배양하였다. 그후 각각 5.6mM과 30mM의 포도당을 함유한 배양액으로 배양하여 24시간, 48시간, 72시간 그리고 120시간 후에 세포 배양액을 채집하고 세포로부터 단백질과 RNA를 추출하였다. 실험 중 세포 배양액은 48시간마다 교환하였다. 고 포도당에 의한 삼투압 효과를 배제하기 위해 포도당 농도가 5.6mM인 배양액에 24.4mM mannitol을 첨가한 배양액도 사용하였다.

위의 실험을 기초로 아래의 실험을 진행하였다.

나. 정상 및 고농도 포도당으로 처리할 세포를 MEK 억제제인 PD98059 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) 25 μ M 처리군과 비처리군으로 나누어 실험을 진행하였으며, 일정 시간 경과 후 세포로부터 단백질과 RNA를 추출하였다. 약물 처리 후 세포수 및 총 단백질양, CKIs,

GLUT1, 그리고 fibronectin의 변화를 관찰하여 ERK의 활성 억제가 위 인자들에 미치는 영향을 알아보았다.

3. 세포수 및 총 단백질양의 측정

메산지움 세포수당 총 단백질양을 세포 비후의 지표로 이용하였다. 60mm 배양접시 (Becton Dickinson Labware, Franklin lakes, NJ, USA)에 1×10^5 cell/ml의 세포를 분주하여 subconfluent한 상태까지 배양하였다. 0.2% FBS를 함유한 배지로 48시간동안 배양한 후 세포를 각 조건에 노출시키고, 일정 시간 경과 후 배지를 제거하고 얼음으로 차게한 PBS로 세포를 2회 세척한 후 trypsin/EDTA를 이용하여 세포를 배양용기로 부터 수확하였다. 수확된 세포는 hemocytometer를 이용하여 세포수를 측정하였으며, 총 단백질양은 Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용한 Bradford 방법으로 측정하였다. 결과는 $\mu\text{g} / 10^2$ cells로 표시하였다.

4. 단백질 추출 및 Western blot 분석

각 군의 메산지움 세포를 배양하여 일정 시간 경과 후 배지를 수거하고 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 200 μ l의 lysis buffer (50mM Tris-

HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 2% SDS, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 μ g/ml leupeptin)를 이용하여 세포균질액을 만든 후 12000rpm에서 10분간 원심 분리한 다음 상층액을 취하여 분석에 이용하였다. Bio-Rad assay를 이용하여 단백을 정량한 후 동량의 단백을 SDS와 β -mercaptoethanol이 포함된 sample buffer와 혼합하여 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 끓인 다음 10%~12% polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL, USA)에 이전시켰다. Gel은 Coomassie blue로, membrane은 Ponceaus s로 염색하여 각 well에 loading한 단백이 동량임을 확인하였다. CKIs (p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), GLUT1, phospho-specific ERK1/2, total ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)에 대한 일차 항체를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 방치하여 반응시킨 후 세척하고, 이차 항체를 이용하여 반응시켰다. Signal은 enhanced chemiluminescence 시약 (Amersham Life Science Inc.)을 이용하여 가시화 하였으며 densitometer로 optical density (O.D.)를 측정하였다.

5. RNA 추출 및 RT-PCR 분석

가. 세포로부터 total RNA를 추출하기 위해 RNA STAT-60 (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)을 사용하였다. RNA STAT-60 800 μ l로 세포를

처리한 후 chloroform을 첨가하고 잘 혼합하였다. 원심분리 후 상층액을 취한 다음 isopropanol 400 μ l를 첨가하고 다시 원심분리하였다. 침전물을 70% ethanol로 세척한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리한 물로 침전물을 적절한 농도로 희석시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 RNA 농도를 측정하였다.

나. mRNA의 발현을 측정하기 위한 RT-PCR은 RNA 1 μ g, 8mmol/L MgCl₂, 1mmol/L dNTP, 25U RNase inhibitor, 40U AMV reverse transcriptase, 10 μ mol/L의 random hexamer (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 혼합한 20 μ l 반응 용액을 사용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 역전사는 Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific, Inc. Westbury, NY, USA)내에서 총 20 μ l의 반응 혼합물을 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 그리고 99 $^{\circ}$ C에서 5분간의 incubation 과정을 통해 실시하였다. 역전사가 끝난 검체는 PCR 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

다. PCR은 10ng RNA에 해당하는 cDNA, 1.5U Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim GmbH), 20 μ mol/L dNTP, 각각 20pmol/L sense와 antisense primer, 1.5mmol/L MgCl₂를 함유한 50 μ l 반응 혼합물을 이용하여 시행하였다. PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 3분 가열한 후 94.5 $^{\circ}$ C에서 30초, 각각의 annealing 온도에서 30초, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 35cycle 시행하였으며, 이후 7분간 더 반응시키는 방법으로 하였다. 본 실험에 사용한 PCR primer는 Life Technologies (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제작

하였으며 primer의 염기서열과 PCR 반응조건은 Table 1에 요약하였다.

라. mRNA의 발현은 역전사 효율의 차이를 보정하기 위해 모든 검체의 PCR 산물의 O.D.를 GAPDH의 O.D.로 보정하였다. 이를 위해 PCR 산물과 GAPDH 비의 예민도가 가장 좋은 cDNA의 양과 PCR cycle의 수를 결정한 후 본 실험을 시행하였다.

마. PCR 산물을 측정하기 위해 house keeping 유전자인 GAPDH를 다른 시험관에서 동시에 시행하였으며, PCR이 끝난 후 개개의 증폭된 PCR 산물 중 30 μ l를 취하여 0.05 μ g/ml의 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel에서 전기영동하였다. TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 O.D.를 측정하고 GAPDH O.D.로 보정하였다.

상술한 PCR 과정을 거쳐 고농도 포도당에 의한 CKIs, GLUT1 및 fibronectin mRNA 변화를 관찰하였다.

6. Fibronectin에 대한 ELISA 분석

메산지움 세포 배양액 내의 fibronectin 농도는 Rennard 등²⁹이 사용한 방법을 참고한 competitive ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 50 μ l의 백서 fibronectin 표준물 (Sigma Chemical Co.)과 검사물을 50 μ l의 0.5% bovine serum albumin이 포함된 PBS 용액에 희석한 항-fibronectin

항체 (Calbiochem) 용액과 혼합하여 4℃에서 24시간동안 처리하였다. 100μl의 상기 반응액을 백서 fibronectin이 미리 부착된 96 multi-well plate (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)에 첨가하여 37℃에서 1시간동안 반응 시킨 후 200μl의 세척중화제 (0.1% Tween이 포함된 PBS)로 4회 세척하였다. 그후 100μl의 horseradish peroxidase가 부착된 anti-rabbit IgG 항체를 첨가하고 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 200μl의 세척중화제로 4회 재세척한 다음 0.04mg/dl o-phenylenediamine dihydrochloride와 0.06% H₂O₂가 포함된 pH 5.0인 0.05mol/L citrate buffer를 첨가하여 실온에서 1시간동안 처리하였다. 작용 중단 용액 1N H₂SO₄ 100μl를 각 well에 첨가한 후 색의 변화를 spectrophotometer를 이용하여 490nm에서 판독하였다.

7. 통계 분석

모든 수치는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 7.51판 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 결과들은 Student's t-test 또는 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 분석하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 유의있는 차이가 있는 경우, Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다.

Table 1. Sequences of primers and PCR conditions

	Sequence (5'→ 3')	Annealing Temperature (°C)	No. of Cycles
GAPDH			
Sense	GACAAGATGGTGAAGGTCGG	60	35
Antisense	CATGGACTGTGGTCATGAGC		
p27^{Kip1}			
Sense	GGACTTGGAGAAGCACTGC	60	35
Antisense	CGAGTCAGGCATTTGGTCC		
GLUT1			
Sense	GCCTGAGACCAGTTGAAAGCAC	58	35
Antisense	CTGCTTAGGTAAAGTTACAGGAG		
Fibronectin			
Sense	GCAAGCCTGAACCTGAAGAGAC	62	35
Antisense	CCCTGGTGTCTTGATCATTGCATC		

III. 결과

1. 고폠평도당에 의한 p21^{WAF1}, p27^{Kip1} 및 p57^{Kip2} 단백질 발현의 변화

고포도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 시간에 따른 CKIs 단백질의 변화를 Western blot을 이용하여 분석하였다. p21^{WAF1} 단백질 발현은 24시간 후 고평도당군에서 정상 포도당군에 비하여 의의있게 증가되었으며 (2.95±0.12배, p<0.05), 이러한 차이는 48시간까지 유지되었으나, 72시간과 120시간 후에는 양군 사이에 차이가 없었다 (Figure 1). p27^{Kip1} 단백질 발현은 24시간 후 고평도당군에서 정상 포도당군에 비해 유의하게 증가되었으며 (2.11±0.16배, p<0.05), 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다 (Figure 2). 그러나 p57^{Kip2} 단백질 발현은 정상 포도당군과 고평도당군에서 자극 시간에 따른 차이가 없었다 (Figure 3).

2. 고평도당에 의한 GLUT1 단백질 발현의 변화

메산지움 배양세포를 고평도당으로 자극한 후 GLUT1의 시간에 따른 변화를 Western blot을 이용하여 분석하였다. GLUT1 단백질 발현은 24시간과 48시간 후 고평도당군과 정상 포도당군 사이에 의의있는 차이가 없었으나, 72시간 후에는 정상 포도당군에 비하여 고평도당군에서 의의있게 증가되었으며 (2.01±0.25배, p<0.05), 이러한 차이는 120시간

후에도 유지되었다 (Figure 4).

3. 고평도당에 의한 phospho-specific ERK1/2의 변화

메산지움 배양세포를 고평도당으로 자극한 후 phospho-specific ERK1/2의 시간에 따른 변화를 Western blot을 이용하여 분석하였다. Phospho-specific ERK1/2 단백질 발현은 24시간과 48시간 후에는 정상 포도당군과 고평도당군 사이에 통계학적 차이가 없었으나, 72시간 후에 고평도당군에서 정상 포도당군에 비하여 유의있게 증가되었으며 (1.59 ± 0.14 배, $p < 0.05$), 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다. Total ERK2 단백질 발현은 양군 사이에 자극 시간에 따른 차이가 없었다 (Figure 5).

4. MEK 억제제 투여에 의한 phospho-specific ERK1/2의 변화

고포도당으로 120시간동안 자극한 메산지움 배양세포에서 증가된 phospho-specific ERK1/2 단백질 발현은 MEK 억제제인 PD98059 ($25 \mu\text{M}$)에 의해 정상 포도당군 수준으로 유의있게 감소하였다. 고평도당과 동일 삼투압을 가진 mannitol로 자극한 메산지움 세포에서 phospho-specific ERK1/2 단백질 발현의 증가가 없는 것으로 보아 ERK1/2의 활성 증가가

삼투압에 의한 것은 아니라는 사실을 알 수 있다. Total ERK2 단백질 발현은 각 군 사이에 유의있는 차이가 없었다 (Figure 6).

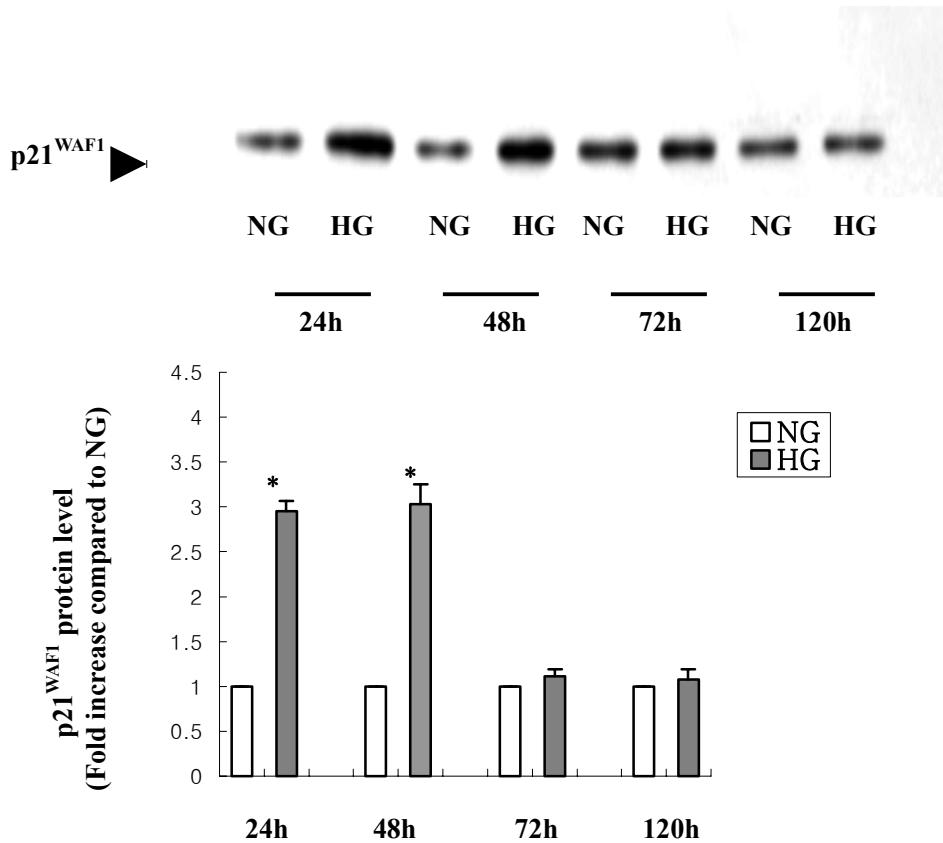


Figure 1. Effect of high glucose on p21^{WAF1} protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were cultured under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media for the indicated time periods. * p<0.05 vs. NG

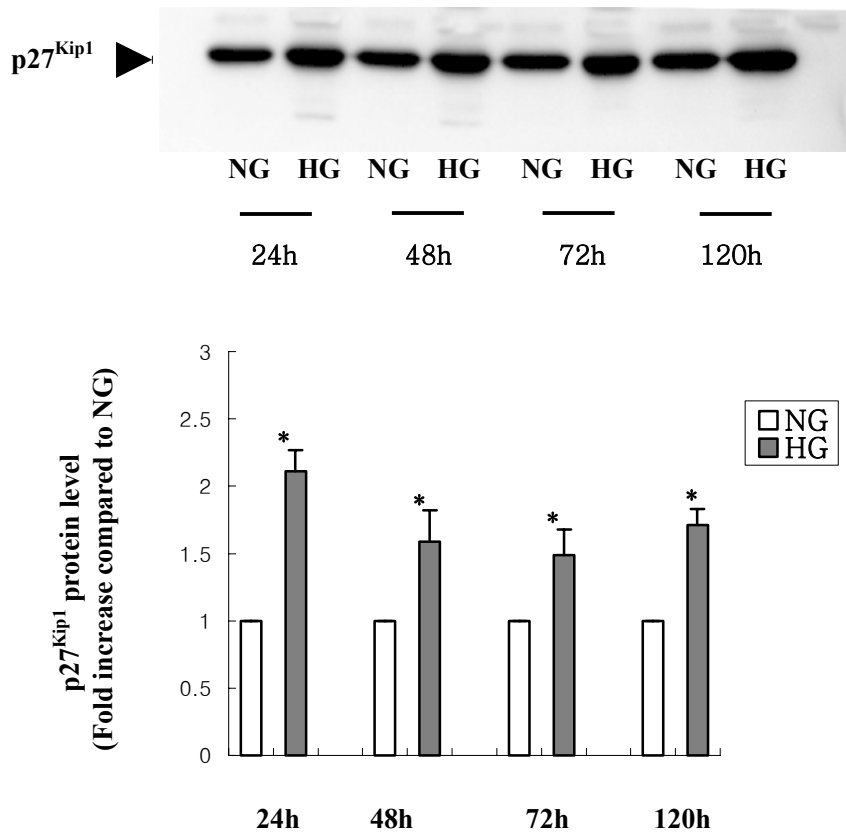


Figure 2. Effect of high glucose on p27^{Kip1} protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were cultured under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media for the indicated time periods. * p<0.05 vs. NG

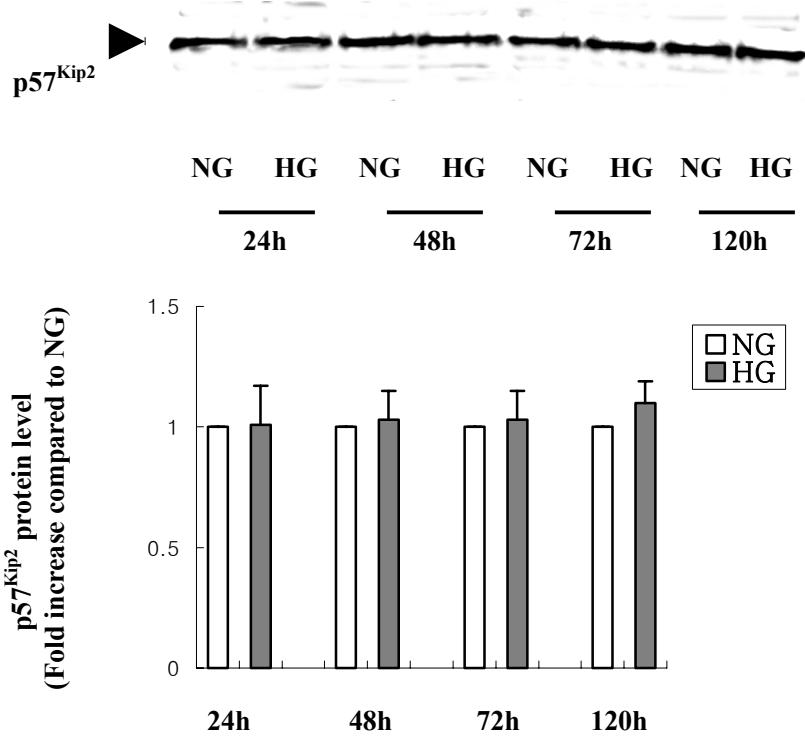


Figure 3. Effect of high glucose on p57^{Kip2} protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were cultured under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media for the indicated time periods.

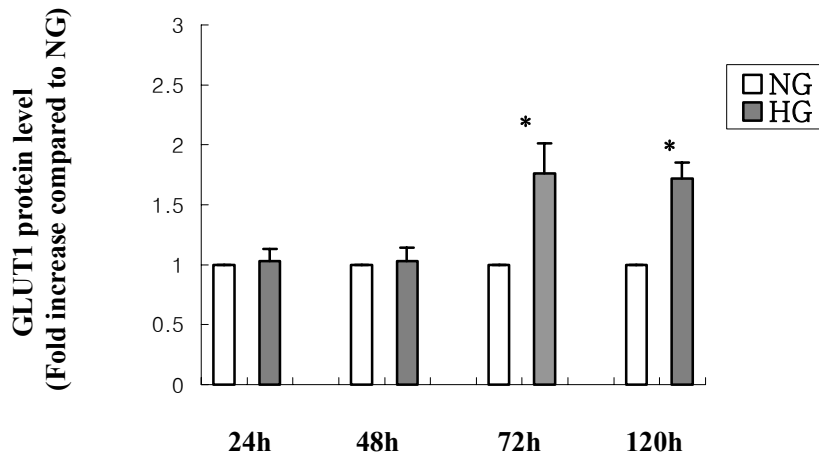
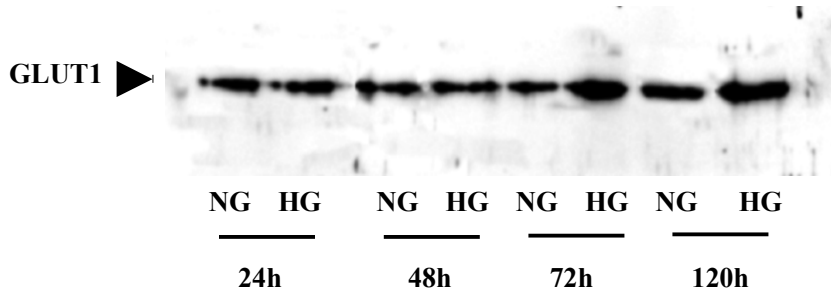


Figure 4. Effect of high glucose on GLUT1 protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were cultured under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media for the indicated time periods. * $p < 0.05$ vs. NG

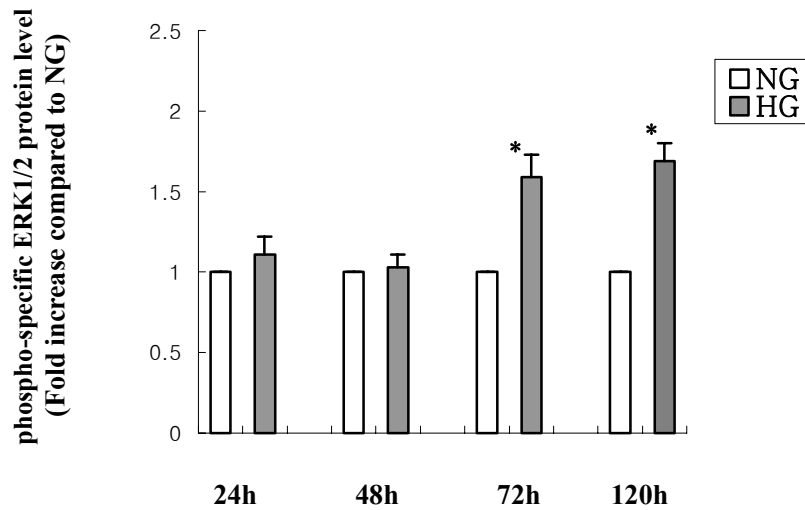
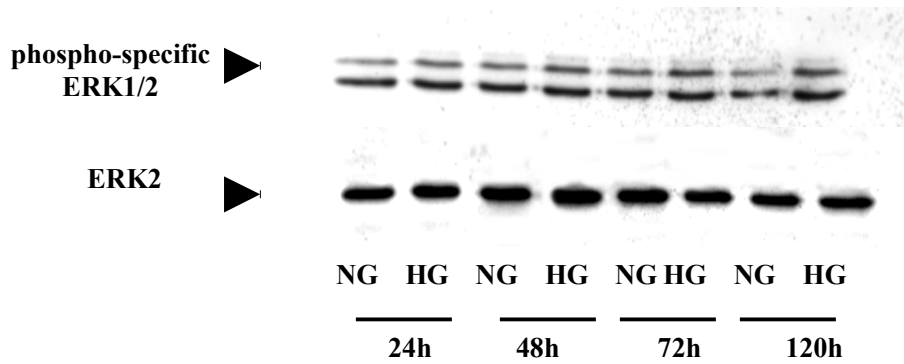


Figure 5. Effect of high glucose on phospho-specific ERK1/2 protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were cultured under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media for the indicated time periods. * $p < 0.05$ vs. NG

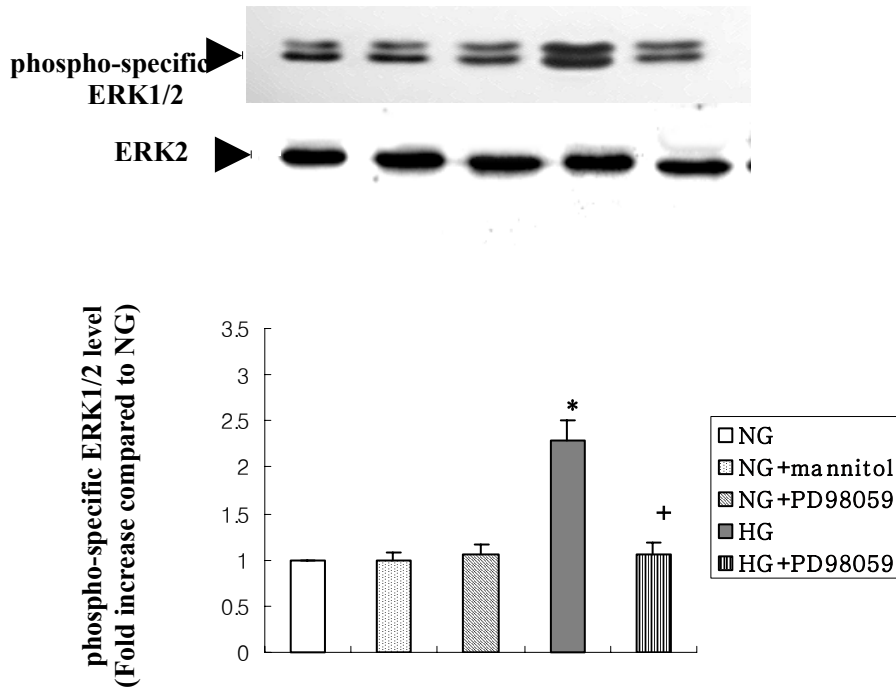


Figure 6. Effect of PD98059 on high glucose-induced phospho-specific ERK1/2 protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were treated with 25 μ M PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. * $p < 0.05$ vs. NG; + $p < 0.05$ vs. HG

5. MEK 억제제 투여에 의한 메산지움 배양세포수 및 총 단백양의 변화

세포의 비후를 나타내는 지표로 알려진 세포수당 총 단백질량은 120 시간 후 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 유의있게 증가하였으며 ($0.97 \pm 0.19 \mu\text{g}/10^2 \text{cells}$ vs. $1.43 \pm 0.23 \mu\text{g}/10^2 \text{cells}$, $p < 0.05$), 이러한 증가는 PD98059에 의해 63% 억제되었다 ($p < 0.05$) (Figure 7).

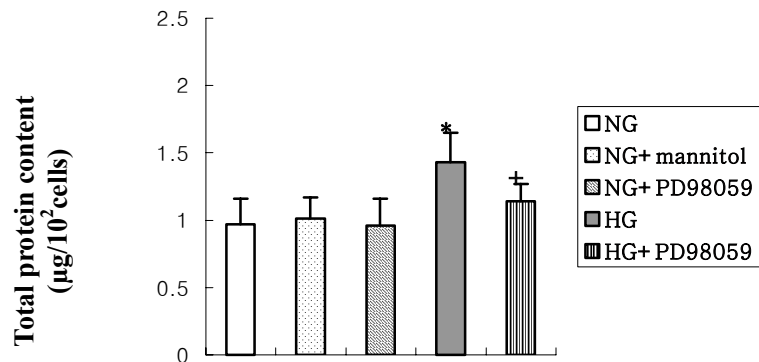


Figure 7. Effect of PD98059 on cell numbers and total protein content in mesangial cells under high glucose conditions. Mesangial cell total protein content per 10^2 cells was used as an index of mesangial cell hypertrophy. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. * $p < 0.05$ vs. NG; + $p < 0.05$ vs. HG

6. MEK 억제제 투여에 의한 p27^{Kip1} 단백질과 mRNA 발현의 변화

고포도당으로 메산지움 세포를 자극하였을 때 변화를 보이는 CKIs는 p21^{WAF1}과 p27^{Kip1}이었으나, p21^{WAF1}의 증가는 phospho-specific ERK1/2 단백질의 증가가 나타나기 전부터 나타났으며, ERK의 활성이 증가한 후에는 오히려 정상 포도당군과 비교하여 볼 때 차이가 없었기 때문에, 본 연구에서는 phospho-specific ERK1/2 단백질의 증가 후에도 계속 증가를 보이는 p27^{Kip1}을 분석하였다.

고포도당으로 120시간동안 자극한 메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제에 의한 p27^{Kip1} 단백질과 mRNA의 변화를 Western blot과 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 고포도당에 의해 증가되었던 p27^{Kip1} 단백질은 MEK 억제제인 PD98059에 의해 83% 억제되었으며 (Fold increase compared to NG; 1.65±0.16배 vs. 1.11±0.11배, p<0.05) (Figure 8), 고포도당에 의해 증가되었던 p27^{Kip1} mRNA도 단백질의 변화와 유사하게 PD98059에 의해 65% 억제되었다 (Fold increase in p27^{Kip1}/GAPDH mRNA compared to NG; 1.83±0.10배 vs. 1.29±0.14배, p<0.05) (Figure 9).

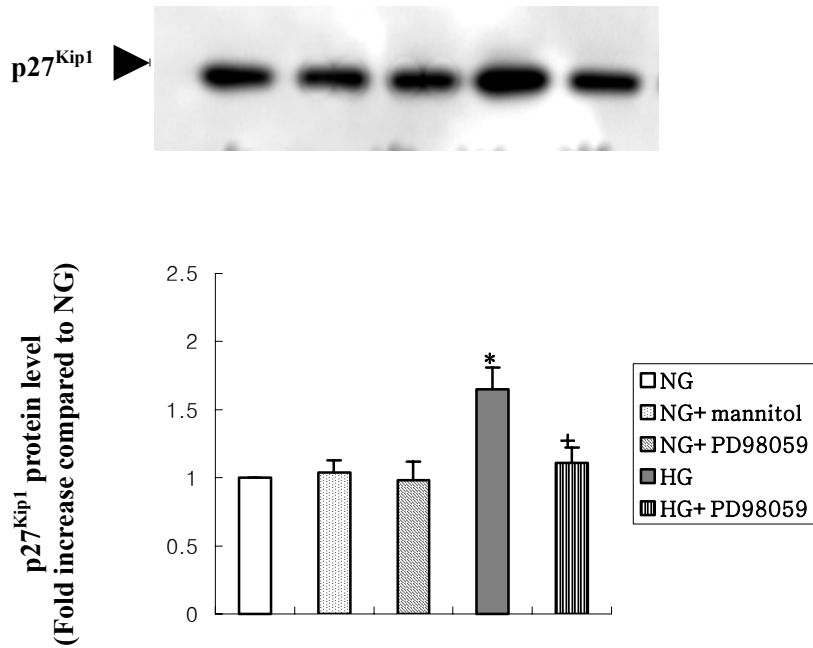


Figure 8. Effect of PD98059 on high glucose-induced p27^{Kip1} protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. * p<0.05 vs. NG; † p<0.05 vs. HG

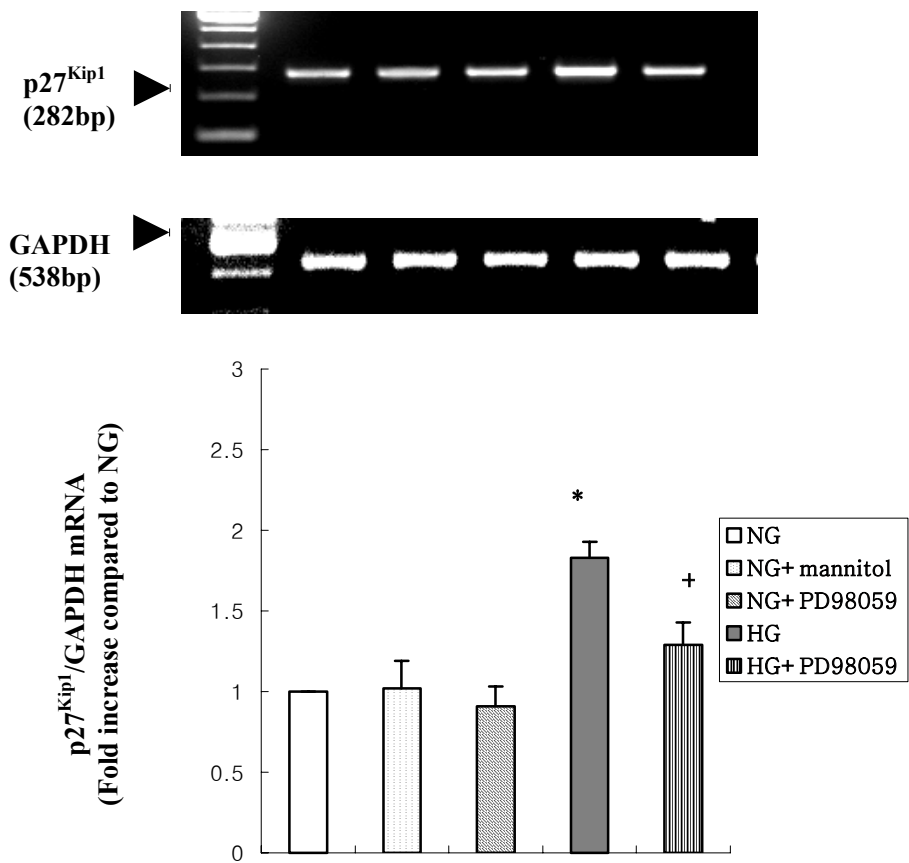


Figure 9. Effect of PD98059 on high glucose-induced p27^{Kip1} mRNA expression in mesangial cells. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. GAPDH mRNA is shown in the lower panel. * p<0.05 vs. NG; + p<0.05 vs. HG

7. MEK 억제제 투여에 의한 GLUT1 단백질과 mRNA 발현의 변화

고포도당으로 120시간동안 자극한 메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제에 의한 GLUT1 단백질과 mRNA의 변화를 Western blot과 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 고포도당에 의해 증가되었던 GLUT1 단백질은 MEK 억제제인 PD98059에 의해 82% 억제되었으며 (Fold increase compared to NG; 1.67 ± 0.16 배 vs. 1.12 ± 0.12 배, $p < 0.05$) (Figure 10), 고포도당에 의해 증가되었던 GLUT1 mRNA도 단백질의 변화와 유사하게 PD98059에 의해 82% 억제되었다 (Fold increase in GLUT1/GAPDH mRNA compared to NG; 1.84 ± 0.30 배 vs. 1.15 ± 0.22 배, $p < 0.05$) (Figure 11).

8. MEK 억제제 투여에 의한 fibronectin mRNA와 세포 배양액내 fibronectin의 변화

고포도당으로 120시간동안 자극한 메산지움 배양세포에서 ERK 경로 억제에 의한 fibronectin mRNA와 세포 배양액내 fibronectin의 변화를 RT-PCR과 competitive ELISA를 이용하여 분석하였다. 고포도당에 의해 증가되었던 fibronectin mRNA는 PD98059에 의해 92% 억제되었다 (Fold increase in fibronectin/GAPDH mRNA compared to NG; 1.59 ± 0.15 배 vs. 1.05 ± 0.13 배, $p < 0.05$) (Figure 12). 세포 배양액내 fibronectin은 정상 포

도당군에 비해 고포도당군에서 유의있게 증가하였으며 (333.8 ± 49.7 ng/ 10^5 cells vs. 503.3 ± 26.4 ng/ 10^5 cells, $p < 0.05$), 이러한 증가는 PD98059에 의해 54% 억제되었다 ($p < 0.05$) (Figure 13).

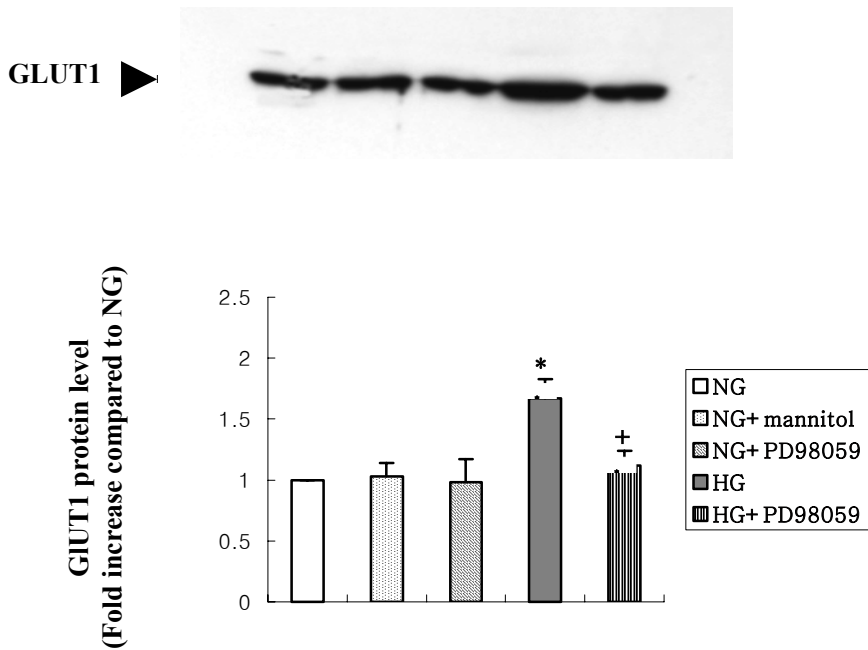


Figure 10. Effect of PD98059 on high glucose-induced GLUT1 protein expression in mesangial cells. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. * $p < 0.05$ vs. NG; + $p < 0.05$ vs. HG

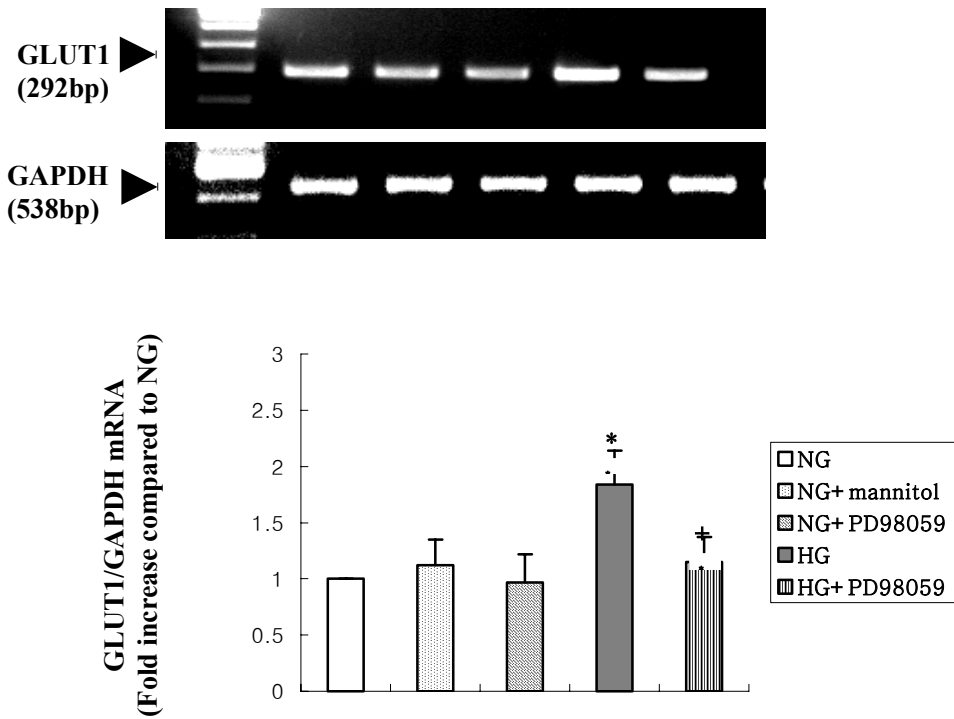


Figure 11. Effect of PD98059 on high glucose-induced GLUT1 mRNA expression in mesangial cells. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. GAPDH mRNA is shown in the lower panel. * $p < 0.05$ vs. NG; † $p < 0.05$ vs. HG

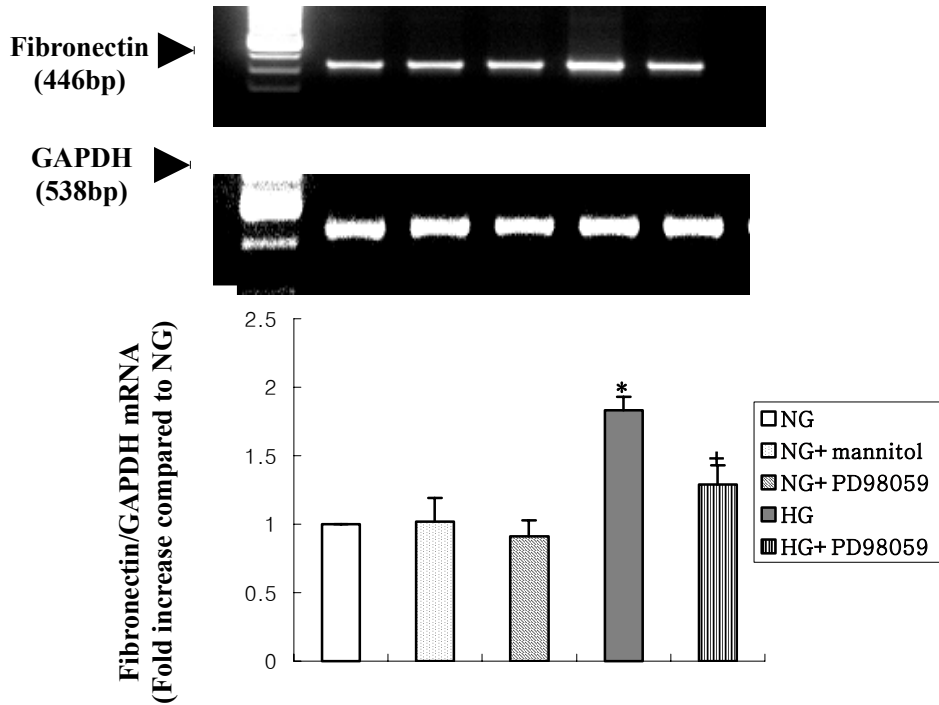


Figure 12. Effect of PD98059 on high glucose-induced fibronectin mRNA expression in mesangial cells. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media. GAPDH mRNA is shown in the lower panel. * $p < 0.05$ vs. NG; † $p < 0.05$ vs. HG

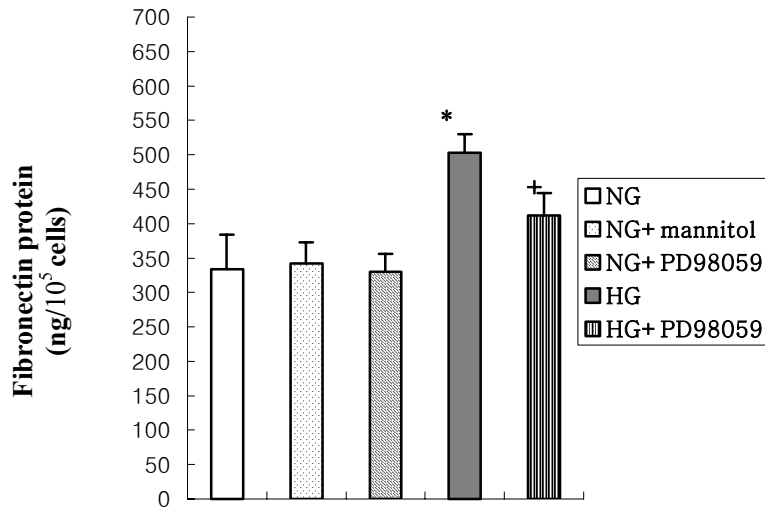


Figure 13. Effect of PD98059 on high glucose-induced fibronectin concentration in the supernatant of cultured mesangial cells. Mesangial cells were treated with PD98059 for 120 hours under normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30mM) media, and cultured media were used for experiments. * $p < 0.05$ vs. NG; + $p < 0.05$ vs. HG

IV. 고찰

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 주된 원인 질환일 뿐만 아니라 당뇨병에 의한 가장 심각한 장기 합병증 중의 하나이다. 특히 평균 수명의 연장으로 인하여 인슐린 비의존성 당뇨병 환자가 증가함에 따라 만성 신부전에서 당뇨병의 중요성이 더욱 강조되고 있다. Fioretto 등³⁰은 제 I형 당뇨병 환자에서 채식이식 후 혈당 조절을 10년 이상 철저히 하면 신조직에서 관찰되는 당뇨병성 신증의 병변이 소실될 수 있다고 하여 고혈당 자체가 신장 합병증 발생에 중요한 발병 기전임을 보고하였다. 또한 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 혈당을 적극적으로 조절함으로써 당뇨병성 신증을 포함한 미세혈관 합병증의 발생과 진행을 지연시킬 수 있다는 결과에 근거하여 고혈당 자체가 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 결정하는 주된 인자로 생각되고 있으나, 고혈당이 정확히 어떠한 기전에 의해 당뇨병성 신증에서 관찰되어지는 사구체 비후와 메산지움의 확장과 같은 특징적인 변화가 유발되는 지에 대해서는 확고한 정설이 없는 실정이다.

고혈당 자체에 의하여 세포외 기질의 증가와 그에 따른 사구체 손상에 관여할 것으로 생각되는 인자들에 대한 많은 연구에 의하면, 고혈당에 의한 세포내 포도당 농도의 증가로 polyol 대사의 항진³¹, protein kinase C (PKC)의 활성화³², glucosamine 경로의 활성화³³ 및 산화성 스트

레스의 증가³⁴ 등 효소적 경로 (enzymatic pathway)의 활성화와, 후기 당화산물 (advanced glycosylation endproduct: AGE)의 축적³⁵과 그에 따른 산화성 스트레스의 증가 등 비효소적 경로 (nonenzymatic pathway)의 활성화에 의하여 사구체의 병변이 발생하는 것으로 주장되고 있다. 이러한 변화들은 어떤 공통적인 기전에 의하여 진행될 수 있을 것으로 생각되는데 그중 PKC-ERK 경로가 하나의 후보일 가능성이 있다. 고포도당으로 메산지움 세포를 자극하였을 때 세포 내로 유입된 포도당은 glycolysis와 polyol pathway를 경유하여 diacylglycerol의 de novo 합성을 증가시킴으로써 PKC의 활성화를 유발할 수 있는 것으로 보고된 바 있다³². 당뇨병성 신증시 ERK의 활성이 증가되어 있으며, PKC 억제제인 calphostin C를 투여하였을 때 ERK의 활성이 억제되었다는 실험결과로부터 PKC를 통해 ERK가 활성화 된다는 것을 알 수 있다¹¹. 또한, ERK의 활성화는 TGF- β 1의 증가와 밀접히 연관되어 있다. 고포도당에 의해 활성화된 ERK는 세포핵 내로 이동한 후 c-fos와 c-jun을 활성화시켜 AP-1을 형성하는데 TGF- β 1의 promoter에 AP-1이 결합할 수 있는 부위가 있어 TGF- β 1의 발현을 촉진시킬 수 있다³⁶⁻⁴⁰. TGF- β 1은 collagen이나 fibronectin과 같은 세포의 기질 단백질의 합성을 촉진시킴으로써 당뇨병성 신증을 포함한 각종 사구체 질환에서 발병 및 진행에 관여하는 것으로 알려져 있다^{6, 24}. 또한, 실험동물 모델과 사람에서 당뇨병성 신증의 초기 소견으로 신비후가 관찰되는데 TGF- β 1은 다수의 신세포에서 세포주

기의 진행을 억제하면서 DNA와 단백질 합성을 촉진시킴으로써 세포 비후를 유발시키는 것으로 되어있다²³. 세포 비후는 궁극적으로 세포주기 조절단백에 의해 결정되어지는데, 주로 KIP족에 속하는 p21^{WAF1}, p27^{Kip1} 및 p57^{Kip2} 단백질의 증가와 밀접한 연관이 있는 것으로 되어 있다. Monkawa 등²⁰은 p21^{WAF1}과 p27^{Kip1}을 결손시킨 당뇨병 mouse에서 TGF- β 1의 증가만으로는 사구체 비후가 유발되지 않았다고 보고함으로써 세포 비후의 유도 과정 중 CKIs의 역할이 중요함을 제시하였다. 고포도당으로 인한 세포 비후와 세포외 기질 축적은 포도당의 세포 내로의 유입이 있어야 가능한데, 이 과정에 당전달체인 GLUT가 관여한다¹⁵. 최근에 고포도당으로 자극한 메산지움 세포에서 GLUT1 mRNA의 발현이 증가되었으며, 이러한 발현 증가가 anti-TGF- β -antibody에 의해 억제되었을 뿐만 아니라 포도당의 세포 내로의 유입도 감소되었다는 보고가 있는데, 이는 TGF- β 1과 GLUT1의 연관성을 입증한 연구 결과이다²⁷.

당뇨병성 신증에서 TGF- β 1과 CKIs, TGF- β 1과 GLUT1사이의 연관성에 대한 연구는 종종 보고 되고 있는 반면에, 아직까지 ERK 경로와 CKIs 및 GLUT1 사이의 연관성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양 세포에서 어떠한 CKIs가 증가되는 지, 그리고 ERK의 활성화가 CKIs와 GLUT1 및 세포외 기질의 생성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

본 연구에서는 Western blot 결과 고포도당에 노출된 메산지움 배양

세포에서 72시간 후부터 GLUT1 단백질 발현이 정상 포도당군에 비해 의미있게 증가함을 관찰하였는데, 이는 Heilig 등¹⁴의 연구와 유사한 결과로 생각된다. 또한 고평도당으로 메산지움 배양세포를 자극한 후 시행한 Western blot 결과상 p21^{WAF1} 단백질 발현은 24시간과 48시간 후 고평도당군에서 정상 포도당군에 비해 유의하게 증가하였는데, 이는 Kuan 등²¹과 Al-Douahji 등²²의 연구결과와 일치하는 소견이다. 그러나 본 실험에서 72시간과 120시간 후에는 고평도당군과 정상 포도당군 사이에 p21^{WAF1} 단백질 발현에 차이가 없었다. 이에 비해 p27^{Kip1} 단백질 발현은 24시간 후부터 고평도당군에서 정상 포도당군에 비해 의미있게 증가하였고, 또 이러한 증가는 120시간 후에도 유지되었는데, 이는 Wolf 등¹⁶의 연구 결과와는 일치하지만 Kuan 등²¹의 연구 결과와는 상반된 결과이다. p57^{Kip2} 단백질 발현은 실험 기간 중 정상 포도당군과 고평도당군 사이에 차이가 없었는데, 이 역시 Kuan 등²¹의 연구 결과와 일치하는 결과이다. 이러한 연구 결과상 차이는 각 연구자들이 사용하는 실험 방법상의 차이와 관련이 있을 것으로 생각되는데, 고평도당 자극 전에 세포 주기를 동일하게 하기 위한 혈청 박탈 기간, 배양액내 우태아 혈청의 농도, 그리고 메산지움 세포의 종류 등에 차이가 있었기 때문으로 생각된다. 본 실험에서는 고평도당으로 백서 사구체 메산지움 세포를 자극하였을 때 p21^{WAF1} 단백질 발현은 실험 초기에만 증가를 보인 반면 p27^{Kip1} 단백질 발현은 지속적인 증가를 보이는 것으로 보아 당뇨병성 신증에서 관찰되

는 메산지움 세포의 비후가 초기에는 p21^{WAF1}과 p27^{Kip1} 모두에 의해, 그리고 어느 정도의 기간이 경과한 후에는 주로 p27^{Kip1}에 의해 영향을 받을 것으로 생각된다.

당뇨병성 신증의 발병 기전에 관여하는 신호전달 경로 중 최근에 많은 연구가 보고되고 있는 것이 MAPK 경로이다. MAPK는 세포외의 신호를 세포내 반응으로 전달하는데, 현재까지 ERK, p38-MAPK, 그리고 JNK 등 3가지의 경로가 알려져 있다⁷⁻⁹. 최근에 Haneda 등^{10, 11}은 당뇨병 동물 모델과 고평도당으로 자극한 메산지움 세포에서 ERK의 활성화를 관찰하였다. 본 실험에서 24시간과 48시간 후에는 정상 포도당군과 고평도당군 사이에 ERK의 활성화에 차이가 없었으나, 72시간과 120시간 후에는 고평도당군에서 정상 포도당군에 비해 ERK의 활성이 의의있게 증가됨을 관찰하였는데 이는 Haneda 등¹⁰의 연구 결과와 일치하는 결과이다. 고평도당에 의한 세포 변화 중 대표적인 것이 세포 비후로 알려져 있기 때문에, 당뇨병성 신증에서 ERK 경로의 활성화도 세포 비후와 연관이 있을 수 있다는 생각에 ERK 경로의 활성화와 CKIs의 증가 사이에도 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 고평도당으로 자극한 메산지움 세포에서 ERK와 GLUT1은 72시간 후부터 증가되었으며 p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} 중 72시간 후에도 증가를 보이는 것은 p27^{Kip1} 뿐이었다. 그러나 ERK의 활성 증가가 관찰되기 전인 24시간과 48시간 후에 증가된 p27^{Kip1}은 ERK 경

로 이외의 다른 신호전달 경로의 영향을 받을 것으로 생각된다. 최근에 Wolf 등¹⁷은 활성화된 ERK가 직접 p27^{Kip1} 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 인산화를 일으켜 p27^{Kip1}의 반감기가 연장된다고 보고하였는데, 본 연구에서 72시간 후에도 관찰되어지는 p27^{Kip1}의 증가는 ERK 경로의 활성화와 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 연구자는 고평도당으로 처리한 메산지움 세포에서 p27^{Kip1} 및 GLUT1의 발현 증가와 ERK 경로의 활성 증가 사이의 연관성을 규명하기 위해 ERK의 상향조절 인자인 MEK 억제제인 PD98059를 투여한 후 p27^{Kip1}과 GLUT1 발현의 변화를 관찰하였다. 약물처리 후 Western blot 결과상 고평도당군에서 증가되었던 p27^{Kip1}과 GLUT1 단백질 발현은 의미있게 감소하였으며, RT-PCR을 이용한 mRNA 발현도 단백질의 변화와 유사한 변화를 보였다. Wolf 등¹⁶은 고평도당으로 메산지움 세포를 자극하였을 때 p27^{Kip1} 단백질의 증가는 관찰되었던 반면에 RT-PCR을 이용해 분석한 p27^{Kip1} mRNA에는 변화가 없었던 점으로 미루어 p27^{Kip1}이 전사 후 조절을 받는다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 상반되는 소견이다. 그러나, Hiromura 등⁴²이 podocyte를 이용한 실험에서 p27^{Kip1} 단백질 발현의 증가 뿐만 아니라 mRNA 발현의 증가를 real time RT-PCR을 통해 규명하였다. 이러한 서로 상반된 결과는 실험에 사용한 세포 종류, 세포실험 조건, PCR 조건, PCR primers 등의 차이에 기인할 것으로 생각된다. 본 실험에서는 Heilig 등¹⁴의 실험을 기초로 GLUT1의 변화에 의해 포도당의 세포 내로의 유입이 영향

을 받을 것이라는 가정 하에 진행하였는데, 향후 2-Deoxy-D-glucose의 세포내 유입량 등을 측정함으로써 실제로 포도당의 세포 내로의 유입에 변화가 일어나는 지에 대해서는 확실히 입증할 필요가 있을 것이다. 최근에 Das 등⁴¹은 phorbol myristate acetate에 의한 HL 60 세포의 분화 실험에서 p21^{WAF1}과 p27^{Kip1}의 발현이 ERK 경로의 영향을 받는다고 보고하였으며, Fong 등⁴³은 3T3-L1 세포를 이용한 실험에서 endothelin-1에 의해 증가된 GLUT1이 ERK 경로의 직접적인 영향을 받는다고 보고하였는데, 이는 실험에 이용한 세포와 자극 인자에는 차이가 있지만 ERK 경로와 CKIs, 그리고 ERK 경로와 GLUT1 사이이 연관성이 있음을 시사한 본 실험의 결과에 이론적 근거를 제시하는 소견으로 생각된다. 본 연구에서는 ERK의 활성을 억제하였을 때 고포도당에 의해 증가되었던 세포 배양액 내의 fibronectin과 세포내 fibronectin mRNA의 감소를 관찰하였을 뿐만 아니라 메산지움 세포수당 총 단백질양의 감소도 관찰하였기에 ERK 경로의 활성화가 세포외 기질의 합성 증가와 세포 비후를 유발하는 중요한 기전일 것으로 생각된다.

요약하면 고포도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 p27^{Kip1}과 GLUT1 발현의 증가는 ERK 경로의 활성화와 연관이 있으며, ERK의 활성 억제는 세포 비후와 세포외 기질의 생성을 억제시킴으로써 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 완화시킬 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구는 고평도당으로 자극한 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 자극 시간에 따른 CKIs (p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), GLUT1, ERK 및 단백질 발현의 변화를 관찰하였으며, ERK 경로 억제제인 PD98059가 고평도당에 의한 CKIs, GLUT1 및 세포 배양액 내의 fibronectin에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고평도당으로 자극한 메산지움 배양세포에서 p21^{WAF1} 단백질은 24시간과 48시간 경과 후 정상 포도당군에 비해 각각 2.9배, 3.0배 증가되었으나, 72시간과 120시간 후에는 변화가 없었다. p27^{Kip1} 단백질은 자극 24시간 후 고평도당군에서 정상 포도당군에 비해 2.1배 증가되었으며, 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다. p57^{Kip2} 단백질은 전기간을 통하여 변화가 없었다.

2. 고평도당 자극에 따른 GLUT1 단백질 발현은 고평도당 자극 72시간 후 정상 포도당군에 비해 2.0배 증가되었으며 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다.

3. 고평도당 자극에 따른 ERK의 활성화는 고평도당 자극 72시간 후 정상 포도당군에 비해 1.6배 증가되었으며 이러한 차이는 120시간 후에도 유지되었다.

4. MEK 억제제인 PD98059 (25 μ M)는 고평도당으로 120시간 자극

한 메산지움 배양세포에서 p27^{Kip1}과 GLUT1 단백질 발현 증가를 각각 83%, 82% 억제시켰으며, mRNA의 발현 증가도 각각 65%, 82% 억제시켰다.

5. PD98059는 고평도당으로 120시간 자극한 메산지움 배양세포에서 메산지움 세포수당 총 단백질, fibronectin mRNA 발현 및 세포 배양액내 fibronectin 증가를 각각 63%, 92% 및 54% 억제시켰다.

이상의 결과로 백서 사구체 메산지움 배양세포에서 고평도당에 의한 p27^{Kip1}과 GLUT1의 증가는 ERK 경로의 활성화와 밀접한 관련이 있었으며, ERK 경로를 억제할 경우 세포 비후 및 세포외 기질의 축적을 억제시킬 수 있어 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in the insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
2. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and enhanced extracellular matrix gene expression in streptozotocin-diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522-30.
3. 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: 1872-8.
4. Ishida T, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R. Stretch-induced overproduction of fibronectin in mesangial cells is mediated by the activation of mitogen-activated protein kinase. *Diabetes* 1999; 48: 595-602.
5. Haneda M, Kikkawa R, Horide N, Togawa M, Koya D, Kajiwara N, et al. Glucose enhances type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Diabetologia* 1991; 34: 491-9.
6. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen 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* 1994; 93: 536-42.

7. Borkemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Int* 1996; 49: 1187-98.
8. Wilkinson MG, Millar JBA. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 2000; 14: 2147-57.
9. Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M. Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 738-45.
10. Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Activation of mitogen-activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Kidney Int* 1997; 51 (Suppl 60): S66-9.
11. Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 1997; 46: 847-53.
12. Kang SW, Adler SG, Lapage J, Nartarajan R. p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. *Kidney Int* 2001; 60: 543-52.
13. Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in mesangial cells cultured in a

normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest* 1995; 96: 1802-14.

14. Heilig CW, Liu Y, England RL, Freytag SO, Concepcion LA. D-glucose stimulates mesangial cell GLUT1 expression and basal and IGF-1-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells. *Diabetes* 1997; 46: 1030-9.
15. Heilig CW, Brosius FC, Henry DN. Glucose transporters of the glomerulus and implications for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1997; 52 (Suppl 60): S92-9.
16. Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Thaïss F, Zahner G, Stahl RAK. High glucose stimulates expression of p27^{Kip1} in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy. *Am J Physiol* 1997; 42: F348-56.
17. Wolf G, Iandicken T, Zahner G, Shankland SJ, Stahl RAK. p44/42 MAP kinase directly phosphorylates the CDK-inhibitor p27^{Kip1} (p27): Role in hypertrophy (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 623A.
18. Wolf G, Schroeder R, Thaïss F, Ziyadeh FN, Helmchen U, Stahl RAK. Glomerular expression of p27^{Kip1} in diabetic db/db mouse: Role of hyperglycemia. *Kidney Int* 1998; 53: 869-79.
19. Wolf G, Stahl RA. Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK1 cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *Kidney Int* 1996; 50: 2112-9.

20. Monkawa T, Hiromura K, Wolf G, Shankland SJ. The hypertrophic effect of transforming growth factor- β is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1172-8.
21. Kuan CJ, Al-Douahji M, Shankland SJ. The cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1, Cip1} is increased in experimental diabetic nephropathy: Potential role in glomerular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 986-93.
22. Al-Douahji M, Brugarolas J, Brown PAJ, Stehman-Breen CO, Alpers CA, Shankland SJ. The cyclin kinase inhibitor p21^{WAF1/Cip1} is required for glomerular hypertrophy in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1999; 56: 1691-9.
23. Border WA, Noble NA. Evidence that TGF- β 1 should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1998;54:1390-1.
24. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-de la Cruz MC, Hong SW, Isono M, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression and glomerular mesangial matrix expression by treatment with monoclonal anti-TGF- β antibody in *db/db* diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8015-20.
25. Han DC, Hoffman BB, Hong SW, Guo J, Ziyadeh FN. Therapy with antisense TGF- β 1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNA in diabetic mice. *Am J Physiol* 2000; 278: F628-34.
26. Pumiglia A, Decker S. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 448-52.
27. Inoki K, Kajiwarra N, Haneda M, Maeda S, Koya D, Kikkawa R. TGF- β stimulate glucose uptake by enhancing GLUT1 expression in mesangial cells. *Kidney Int* 1999; 55: 1704-12.

28. Harper PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC, Karnovsky MJ. Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* 1984; 26: 875-80.
29. Rennard SI, Berg R, Martin GR, Foidart JM, Robey PG. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal Biochem* 1980; 104: 205-14.
30. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland D, Goetz F, Mauer M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 1998; 339: 69-75.
31. Pugliese G, Tilton RG, Williamson JR. Glucose-induced metabolic imbalances in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev* 1991; 7: 35-59.
32. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859-66.
33. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. High glucose-induced transforming growth factor-beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998; 101: 160-9.
34. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
35. Vlassara H, Bucala R: Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease: Role of advanced glycation end product receptors. *Diabetes* 1996; 45 (suppl 3): S65-6.
36. Balmanno K, Cool SJ. Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21^{Cip1} and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* 1999; 18: 3085-97.
37. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein

- kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 16483-6.
38. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 1492-7.
 39. Kreisberg J, Radnik R, Ayo S, Garoni J, Saikumar P. High glucose elevates c-fos and c-jun transcripts and protein in mesangial cell culture. *Kidney Int* 1994; 46: 105-12.
 40. Wilmer W, Cosio F. DNA binding of activator protein-1 is increased in human mesangial cells cultured in high glucose conditions. *Kidney Int* 1998; 53: 1172-81.
 41. Das D, Pintucci G, Stern A. MAPK-dependent expression of p21^{WAF} and p27^{Kip1} in PMA-induced differentiation of HL 60 cells. *FEBS Lett* 2000; 472: 50-2.
 42. Hiromura K, Haseley LA, Zhang P, Monkawa T, Durvasula R, Shankland SJ. Podocyte expression of the CDK-inhibitor p57 during development and disease. *Kidney Int* 2001; 60: 2235-46.
 43. Fong JC, Kao YS, Tsai HY, Ho LT. Endothelin-1 increases glucose transporter glut1 mRNA accumulation in 3T3-L1 adipocytes by a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Cell Signalling* 2001; 13: 491-7.

Abstract

High Glucose Induces p27^{Kip1} and GLUT1 Expression in Cultured Rat Mesangial Cells via ERK Pathway

Zhong Gao Xu

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Dae Suk Han)

Many studies have demonstrated that mesangial cells cultured in high glucose media exhibit the typical features of cellular hypertrophy and excessive extracellular matrix production that are characteristic of diabetic nephropathy in vivo. Previous reports showed high glucose-induced mesangial cell hypertrophy and glomerular hypertrophy in diabetes are associated with increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). It is well known that TGF- β 1 plays a pivotal role in the glomerular mesangium expansion in diabetic nephropathy. Treatment of mesangial cells with high glucose up-regulates GLUT1 mRNA expression and TGF- β 1 stimulates glucose uptake by enhancing GLUT1 expression. Recent study reported that high glucose-induced TGF- β 1 mRNA expression in mesangial cells is largely mediated by ERK activation. However, the relationship between ERK activation and high glucose-induced CKIs, GLUT1 expression and fibronectin synthesis have not been fully elucidated.

To clarify the relationship between ERK activation and sequential changes of CKIs, GLUT1 expression and fibronectin synthesis, rat mesangial cells were exposed to normal glucose (NG: 5.6mM) or high glucose (HG: 30 mM) with or without MEK inhibitor PD98059 (25 μ M).

Among three CKIs (p21^{WAF1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), p57^{Kip2} protein expression was not altered in response to HG. p21^{WAF1} protein expression in mesangial cells cultured under HG conditions significantly increased at 24 hours and 48 hours, but after 72hours, it was not altered in response to HG. p27^{Kip1} protein expression was significantly increased at 24 hours and this increase was maintained up to 120 hours in mesangial cells exposed to HG. Mesangial cells exposed to HG exhibited significant increases in ERK activity and GLUT1 protein expression at 72 hours and remained at higher levels until up to 120 hours. Treatment with PD98059 significantly inhibited HG-induced p27^{Kip1} and GLUT1 protein and mRNA levels. PD98059 also significantly inhibited total protein content/cell number in mesangial cells cultured under HG conditions. HG-induced fibronectin production by mesangial cells was also significantly reduced by PD98059.

In conclusion, activation of ERK pathway by HG may play an important role in the pathogenesis of diabetic nephropathy via inducing p27^{Kip1}, GLUT1 expression and stimulating fibronectin synthesis.

Key Words: diabetic nephropathy, mesangial cell, cell hypertrophy, cyclin-dependent kinase inhibitor, glucose transporter, mitogen-activated protein kinase