

고 농도의 당 존재하에서 신 세뇨관 상피 세포의 세포외 기질 생성 조절 기전에 관한 연구

연세대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실*, 신장질환연구소

황재하 · 유태현 · 송현용 · 김주성 · 송영수
정득림 · 김경섭* · 강신욱 · 이호영 · 한대석 · 최규현

〈요 약〉

본 연구에서는 당뇨병성 신증에서 세뇨관 간질성 병변의 주된 병리 소견인 간질 섬유화 기전의 일부를 규명하기 위하여, 고농도의 당 존재하에서 배양된 신 세뇨관 상피(LLC-PK₁) 세포에서 당이동체 GLUT1의 발현과 대표적인 세포외 기질의 하나인 fibronectin의 생성 및 TIMP I의 생성을 평가하고, PKC, TGF- β 매개 가능성성을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) LLC-PK₁ 세포를 25mM의 당에 24, 48시간동안 노출시킨 결과 대조군(당농도 5.6mM, 25mM mannitol)에 비하여 당이동체 GLUT1 단백의 발현이 감소하였다.
- 2) 25mM의 당에 의한 GLUT1 단백 발현의 억제 효과는 PKC 억제제인 GF102903X(10 μ M)의 첨가에 의하여 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.
- 3) Fibronectin의 생성은 15, 25mM의 당 농도에 48시간동안 노출시킨 결과 농도 의존적으로 증가하였다.
- 4) GF102903X(10 μ M)의 첨가는 대조군에서 Fibronectin 생성의 증가를 보였으나, 고농도의 당에 의한 fibronectin 생성의 증가는 GF102903X에 의하여 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.
- 5) 항 TGF- β 항체(30 μ g/mL)의 첨가는 고농도의 당에 의한 fibronectin 생성의 증가를 일부 억제하였다.
- 6) LLC-PK₁ 세포의 배양 상층액내 TIMP-1 농도는 15, 25mM의 당에 24, 48시간동안 노출시킨 결과 농도와 시간 의존적으로 증가하였으며, GF102903X(10 μ M)와 항 TGF- β 항체(30 μ g/mL)의 첨가는 각각 유의한 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 신 세뇨관 상피 세포는 고농도의 당에 지속적으로 노출될 경우 당이동체 발현의 감소와 함께 fibronectin 생성과 TIMP-1의 분비가 증가할 것으로 판단되며 fibronectin의 증가는 TGF- β 에 의하여 일부 매개될 것으로 사료된다. 따라서 세포외 기질인 fibronectin 생성의 증가와 세포외 기질 분해 효소 억제효소인 TIMP-1의 증가는 당뇨병성 신증의 세뇨관 간질성 섬유화 기전의 하나가 될 수 있을 것으로 추정된다.

서 론

당뇨병성 신증은 만성 사구체 신염과 함께 말기 신

부전증으로 투석 치료를 받아야하는 주된 원인 질환의 하나이다^{1, 2)}. 최근 사회의 발달과 식습관의 서구화로 당뇨병의 이환율이 증가하는 추세이며 적절한 혈당 조절에도 불구하고 이환 기간이 길어짐에 따라 당뇨병성 신증의 빈도도 지속적인 증가 추세를 보이고 있다³⁾.

당뇨병성 신증의 주된 병리 소견은 메산지움 기질(matrix)의 증가로서 점차 사구체 기저막의 비후와 간질(interstitium)의 섬유화가 초래되어 사구체 여과율

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 1998년도 일반교수 연구비에 의하여 이루어졌음.

책임저자 : 최규현 서울시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel : 02)361-5437, Fax : 02)393-6884
E-mail : khchoi6@yumc.yonsei.ac.kr

이 저하되게 된다^{1,4)}. 특히 세뇨관 간질 부위의 기질의 증가는 당뇨병성 신증에서 관찰되는 세뇨관 위축의 원인이 되며 사구체 병변과 함께 신 기능 저하의 주된 기전으로 사료된다. Ueno 등⁵⁾은 인슐린 비의존성 당뇨 환자에서 세뇨관 간질성 병변으로 간질 기질의 확장이 사구체 병변과 비례하여 관찰된다고 보고하였다. Brito 등⁶⁾은 인슐린 의존성 당뇨 환자에서 근위 세뇨관 기저막의 두께를 측정한 결과 비당뇨 환자군에 비하여 현저히 증가함을 보고하였으며 특히 미세 단백뇨(microalbuminuria) 환자에서 관찰하여 당뇨병성 신증의 초기 병변의 하나로 주장하였다. 또 Bader 등⁷⁾은 간질 섬유화의 진행으로 혈관의 폐쇄를 유발하여 허혈성 사구체 병변을 유발함으로서 사구체 여과율을 저하시킬 뿐 아니라 사구체 경화를 촉진할 것으로 주장하였다. 따라서 당뇨병성 신증에서 사구체 병변과 함께 세뇨관 간질성 병변 또한 당뇨병성 신증의 진행에 중요하다고 인정되고 있으나 세뇨관 간질성 병변의 기전에 대한 연구는 많지 않다.

당뇨병성 신증에서 간질 섬유화의 주된 병태 생리는 세뇨관 강내의 뇨당과 기저측막(basolateral membrane)의 혈당에 지속적으로 노출되는 신 세뇨관 세포의 변화이다^{8,9)}. 따라서 세뇨관 세포내로의 당 흡수, 즉 이동능의 변화가 예상되며 섬유화 병변이 교원질의 증가의 결과이므로 교원질 증가의 기전으로 세뇨관 세포로부터의 교원질 합성의 증가 및 교원질 분해 억제 효소인 tissue inhibitors of metalloproteinases(TIMP) 등을 예상할 수 있다. 또한 이러한 예상되는 변화들과 당 흡수의 증가와 상관성여부, 매개 물질들에 대해선 아직 규명된 바 없어 이에 대한 연구는 당뇨병성 신증에서 간질성 병변의 진행 과정을 규명하는데 매우 중요하다고 사료된다.

본 연구에서는 당뇨병성 신증에서 세뇨관 간질성 병변의 주된 병리 소견인 간질 섬유화 기전의 일부를 규명하기 위하여, 고농도의 당 존재下에서 배양된 신 세뇨관 상피 세포에서 당 이동체 GLUT1의 발현과 대표적인 세포외 기질의 하나인 fibronectin의 생성 및 TIMP I의 생성을 평가하고, transforming growth factor β (TGF- β), protein kinase C(PKC) 매개 여부를 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

대상 및 방법

1. 시약

Eagle's minimum essential medium(MEM), glucose, trypsin/EDTA, GF109203X 등은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

2. 방법

1) 신 세뇨관 상피세포의 배양

신 세뇨관 상피세포는 ATCC(American Tissue Culture Collection, Rockville, MD USA)로부터 LLC- PK1 세포주(ATCC CRL-1392, passage number 194)를 분주 받아, Morrissey 등¹⁰⁾의 방법을 참고하여 5-10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin, 100 μ g/mL streptomycin이 함유된 pH 7.4의 MEM 배양액으로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 분주 후 confluence를 이루고 나서 trypsin/EDTA를 사용하여 계대 배양하여 계대배양 3-30회의 세포를 사용하였다.

고농도의 당에 노출은 배양액내 포도당 농도가 당뇨병에서의 혈중 농도와 유사한 15mM(270mg/dl), 25 mM(450mg/dl)이 되도록 D-glucose를 용해시켜 실험하였으며, 포도당 농도가 5.6mM인 배양액 자체를 대조군으로 하고, 삼투압성 대조군은 당 농도와 동일하게 mannitol을 첨가하여 24-72시간동안 배양하였다. 또한 항 TGF- β 항체(Genzyme Co, Cambridge, MA, USA)와 PKC 억제제인 GF109203X를 각각 배양액에 첨가하여 TGF- β , PKC의 매개 가능성을 실험하였다. 모든 실험은 특별한 언급이 없는 한 serum free 상태에서 진행하였다.

2) 당 이동체 GLUT1 발현

Dominguez 등¹¹⁾의 방법을 참고하여 western blot을 실시하였다. 세포를 5×10^5 cells/ml의 빈도로 60 mm dish에 분주하고 confluence를 이루고 나서 당에 노출시킨 다음 세포를 이탈시켜 원심 분리하여 세포진을 얻은 후 PBS 용액으로 3회 세척하였다. 0.1% β -Mercaptoethanol, 2mM EDTA, 1% Triton X-100가 함유된 PBS buffer에서 30초 동안 sonication한 후 13,000g에서 20분간 원침한 상층액을 Bradford 방법¹²⁾으로 단백 농도를 측정한 뒤 각 sample로부터 100 μ g 을 취하여 8% SDS-PAGE에서 size 별로 분리하였다. 분리된 단백을 Immobilon filter에 350mA로 2시

간 동안 transfer한 다음 5% nonfat milk가 함유된 Tris-buffered saline-Tween(TBST) blocking buffer와 배양하고 나서, 실온에서 carboxy terminal end of the rat GLUT1 protein에 대한 rabbit polyclonal Ab를 5% nonfat milk를 함유한 TBST 완충 용액으로 1,000배 회석한 용액에서 상기 membrane을 30분간 반응시켰다. Membrane을 5분씩 3회 TBST 완충용액으로 세척하고 나서 5% nonfat milk를 함유한 TBST 완충용액에 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugated Ab(Amersham, Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England)를 5,000배 회석한 용액에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 동일한 방법으로 다시 세척하고 ECL plus western blot detection system(Amersham, Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England)을 사용하여 반응시킨 후 ECL film에 노출시켜 현상하였다.

3) Fibronectin 합성

Oh 등¹³⁾의 방법을 참고하여 시행하였다. 세포를 5×10^5 cells/ml의 빈도로 60mm dish에 분주하고 confluence를 이루고 나서 당에 노출시킨 다음 상층액을 수거하여 12,000G에서 1분간 원침하여 cell debris를 제거하고 상층액을 Bradford 방법으로 단백 농도를 측정한 뒤 5% SDS polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백을 monoclonal anti-fibronectin Ab(Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)와 anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated Ab(Santa cruz Biotech, Santa cruz, CA, USA)를 이용하여 GLUT1과 동일한 방법으로 western blotting을 실시하였다.

4) TIMP-1 농도의 측정

배양 상층액을 수거하여 Philips 등¹⁴⁾의 방법을 참고하여 ELISA 방법으로 측정하였다. 배양 상층액을 10-100 μ L씩 triplicate 하고, 정제된 TIMP-1의 standards를 회석하여 동일하게 첨가한 후 ELISA kit 방법(Amersham, Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, England)에 따라 측정하였다.

5) 통계 분석

실험 결과는 평균 \pm 표준 편차로 표시하였으며, ANOVA one-way analysis에서 Scheffe's F-test를 이용한 통계 분석에서 $p < 0.05$ 에 유의성을 두었다.

결 과

1. 고농도의 당이 신 세뇨관 세포의 당 이동체 GLUT1 발현에 미치는 영향

GLUT1은 사람의 적혈구를 positive control로 하여 Western blot을 시행한 결과 분자량 60-66kD에서 넓은 분포를 보였으며, LLC-PK₁ 세포의 GLUT1은 분자량 약 60kD에서 단일 band로 관찰되었다(Fig. 1). LLC-PK₁ 세포를 당농도 15, 25mM 하에서 24, 48시간 동안 배양한 후 GLUT1 단백의 발현 양상을 관찰한 결과 당 농도 25mM에서 24, 48시간동안 노출시킴에 따라 대조군과 삼투압 대조군에 비하여 50% 이상의 현저한 억제를 관찰할 수 있었다(Table 1, Fig. 1).

고농도의 당에 의한 GLUT1 단백 발현의 감소기전으로 PKC에 의한 매개 가능성은 평가하기 위하여 PKC 억제제인 GF102903X(10μ M)를 첨가하여, 당 농도 25mM에서 48시간 동안 배양하여 GLUT1 발현을

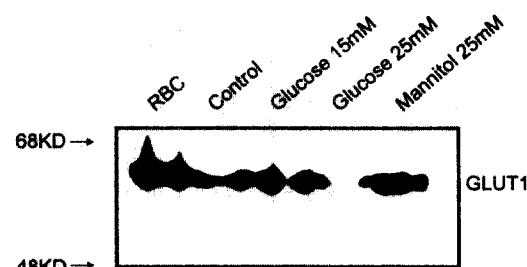


Fig. 1. Effect of high glucose on GLUT1 protein level, assessed by western blot analysis, in LLC-PK₁ cells. The exposure of LLC-PK₁ cells to 25mM glucose for longer than 24 hours decreased GLUT1 protein level.

Table 1. Effects of High Glucose on GLUT1 Protein Expressions of LLC-PK₁ Cells

Control	Glucose(mM)		Mannitol (mM)
	15	25	
Time of exposure			
24 hours	1	0.5 \pm 0.1*	0.4 \pm 0.1*
48 hours	1	0.6 \pm 0.2*	0.5 \pm 0.1*

Values are the intensity of densitometric readings of GLUT1 protein relative to that of control glucose at the given time point. M \pm S.D., N=4, * $p < 0.05$ vs. control.

평가하였으나 대조군에 비하여 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.

2. 고농도의 당이 신 세뇨관 세포의 fibronectin 생성에 미치는 영향

LLC-PK₁ 세포의 Fibronectin 생성은 15, 25mM의

Table 2. Effects of High Glucose on Fibronectin Production of LLC-PK₁ Cells

Control	Glucose(mM)			Mannitol (mM)
	15	25	25	
Time of exposure				
48 hours	1	2.7±1.3*	3.3±1.1*	1.2±0.1

Values are the intensity of densitometric readings of fibronectin relative to that of control glucose at the given time point. M±S.D., N=3, *p<0.05 vs. control.

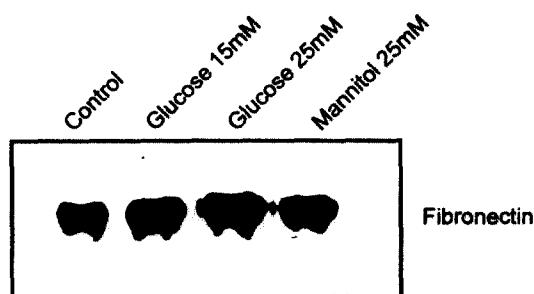


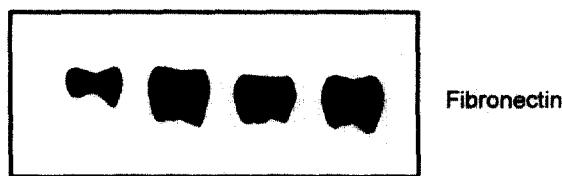
Fig. 2. Effect of high glucose on fibronectin production in LLC-PK₁ cells. The exposure of LLC-PK₁ cells to 25 mM glucose for 48 hours significantly increased fibronectin production, dose-dependently.

당 농도에 24, 48시간동안 노출시킨 결과, 24시간동안의 노출에서는 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었고, 15, 25mM에서 48시간동안 배양시에 각각 대조군에 비하여 의의있는 증가를 보였다(Table 2, Fig. 2).

고농도의 당에 의한 Fibronectin 생성 증가의 기전으로 PKC에 의한 매개 가능성은 평가하기 위하여 GF102903X(10 μM)를 첨가하여 실험한 결과 대조군에서 의의있는 fibronectin 생성의 증가를 보였으나, GF102903X과 같이 당 농도 25mM에서 48시간동안 배양한 실험에선 25mM의 당에서 배양한 경우에 비하여 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 반면에 고농도의 당에 의한 Fibronectin 생성 증가의 기전으로 TGF-β에 의한 매개 가능성을 평가하기 위한 실험에서는 30 μg/mL의 항 TGF-β 항체(30 μg/mL)의 첨가와 함께 25mM의 당에 48시간동안 노출시킨 실험에서 항 TGF-β 항체의 첨가 없이 25mM의 당에 48시간동안 노출시킨 대조군에 비하여 약 40%의 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

3. 신 세뇨관 세포 배양시 고농도의 당이 TIMP-1 농도에 미치는 영향

LLC-PK₁ 세포의 배양 상층액내 TIMP-1 농도는 대조군에서는 거의 측정되지 않았으나 24시간동안 15, 25mM의 당에 노출시킨 결과 각각 1.6±0.1, 2.8±0.3 ng/mL로 증가하였으며, 당 농도 5.6mM에 48시간동안 배양한 경우의 1.9±1.1ng/mL에 비하여 15, 25mM의 당에 48시간동안 노출시킨 결과 4.8±0.5, 9.1±0.7ng/mL로 농도 및 시간의 의존적인 증가를 보였다(Fig. 5). 고농도의 당에 의한 TIMP-1 농도의 증가기전으로



Glucose(mM)	5.6	5.6	25	25
GF102903X(μM)	0	10	0	10

Fig. 3. Effect of PKC inhibitor GF102903X on the production of Fibronectin in LLC-PK₁ cells cultured under high glucose concentrations. The addition of GF102903X at the concentration of 10 μM induced the significant increase of fibronectin level in LLC-PK₁ cells under glucose-free condition, whereas there was no significant effect on the high glucose-induced increase of fibronectin production.

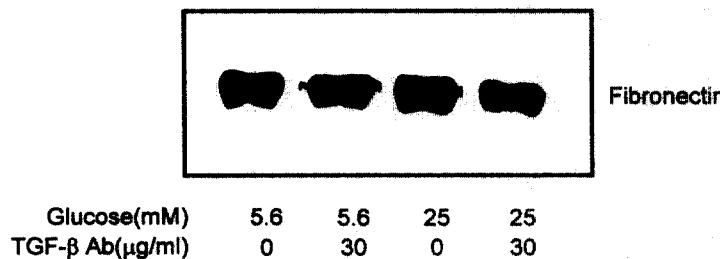


Fig. 4. Effect of anti-TGF- β antibody on the production of Fibronectin in LLC-PK₁ cells cultured under high glucose concentrations. The addition of anti-TGF- β antibody at 30 μ g/mL partly inhibited the high glucose-induced increase of fibronectin production.

출되므로 당 이동능의 변화가 예상된다. 신장에는 다양한 당 이동체가 존재하는데 근위 세뇨관 세포의 세뇨관 강쪽에는 SGLT가 주로 존재하고 기저막에는 GLUT2 가 존재한다^{15, 16)}. Heilig 등¹⁷⁾은 배양된 백서의 메산지움 세포는 정상 당 농도에서도 당 이동체의 발현이 증가함을 보고하였으며, Dominguez 등¹¹⁾은 세포내 칼슘의 증가시 GLUT1 발현이 증가됨을 보고하여 GLUT1 단백의 발현은 당 농도를 비롯한 세포의 환경에 따라 변화하는 중요한 기전의 하나로 사료된다. 본 연구에서는 당뇨에서와 유사하게 세포외 당 농도를 증가시켜 세뇨관 세포를 당 농도 15mM(250mg/dL) 이상에서 24시간동안 이상 배양한 결과 GLUT1의 발현은 감소를 보였다. Yang 등¹⁸⁾은 LLC-PK₁ 세포에서 27.5mM의 당 농도에서 48시간 배양시 GLUT1 mRNA 발현의 감소를 보고하였으나 GLUT1 단백 발현에 대한 결과는 없었으며, Moran 등¹⁹⁾은 phlorizin 결합 밀도로 평가한 당 이동능이 배양액내 당 농도와 역상관 관계를 보인다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사하였다. 이상의 결과로 보아 고농도의 당에 노출되는 세뇨관세포에서 당 이동체의 발현은 억제되는 것으로 보이며 지속적인 당 유입에 의한 세포 손상을 방지하기 위한 기전의 하나로 추정된다.

Fig. 5. Effect of high glucose on tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1 levels in LLC-PK₁ cells. The exposure of LLC-PK₁ cells to high glucose for 24 and 48 hours increased TIMP-1 levels in culture supernatant of LLC-PK₁ cells, dose-dependently. The TIMP-1 levels of 48-hour exposure to 15 and 25 mM glucose were also significantly higher than those of 24-hour exposure, respectively. M \pm S.D., N=3, * p <0.05 vs. control.

PKC와 TGF- β 매개 가능성성을 실험하기 위하여 GF-102903X(10 μ M)과 항 TGF- β 항체(30 μ g/mL)를 각각 첨가한 결과 의의있는 차이를 관찰할 수 없었다.

고 찰

세포의 당 농도의 증가는 세포의 당 이동능의 변화를 유발할 것으로 생각되며, 당뇨 환자에서 신 세뇨관 상피 세포 역시 세포외 고농도의 당에 지속적으로 노

GLUT1의 발현은 소장 세포에서는 vasointestinal peptide, prostaglandin 등에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있는 반면 신 세뇨관 상피 세포에서의 조절 물질은 아직 알려져 있지 않다^{11, 15)}. Amsler 등²⁰⁾은 세뇨관 세포에 PKC 활성화 물질인 phorbol ester를 투여한 경우 당 이동능의 발현을 억제함을 보고하여, 세포내 당 유입에 따른 diacylglycerol 합성의 증가로 활성화된 PKC에 의한 GLUT1 발현의 억제 가능성이 추

정된다. 본 연구에서 PKC 억제제를 이용한 실험에서 저하된 GLUT1 단백 발현의 회복을 관찰할 수 없어 PKC에 의한 매개 가능성은 낮을 것으로 사료된다. Yang 등¹⁸⁾은 captopril의 투여로 고농도의 당에 의한 GLUT1 mRNA 발현의 억제가 회복됨을 보고한 바 있으며, 세뇨관 세포의 세포내 칼슘 상승시 GLUT1 발현이 증가하므로 메산지움 세포에서 고농도의 당에 의한 세포내 칼슘의 저하를 관찰한 Mene 등²¹⁾의 보고를 고려할 때 고농도의 당에 의한 GLUT1 단백 발현의 저하는 PKC에 의한 매개보다는 angiotensin II 또는 세포내 칼슘 농도의 변화에 의하여 유발될 것으로 추정되나 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

당뇨병성 신증의 주된 세뇨관 간질성 병변은 간질 기질의 증가와 이에 따른 섬유화로서^{8, 14)}, 세포외 기질의 증가는 합성의 증가나 분해의 감소 또는 두 과정이 모두 관여하여 초래된다²¹⁾. 세뇨관 간질을 구성하는 세포들은 세뇨관 세포와 간질의 섬유아 세포인데 세뇨관 세포가 현저히 많으며 당뇨병성 신증에서 주로 세뇨관 세포의 기저막의 비후가 특징인 점⁶⁾을 고려할 때 세뇨관 세포의 기질 합성 즉 교원질 합성이 증가할 것으로 예상되어 왔다. 본 연구에서 세뇨관 세포를 15mM 이상의 당 농도에서 48시간동안 이상 배양한 결과 fibronectin 생성의 증가를 관찰하였다. Morrisey 등¹⁰⁾과 Phillipis 등¹⁴⁾은 각각 LLC-PK₁ 세포와 인 세뇨관 상피 세포를 고농도의 당 존재하에서 배양한 결과 fibronectin과 collagen IV의 생성 증가를 보고하여 본 연구의 결과와 일치하였다. 당 농도는 모두 25mM에서 실험하였으나 본 연구에서는 15mM의 농도에서도 증가함을 관찰하였고, 노출 시간은 ELISA 방법을 통하여 Morrisey 등¹⁰⁾은 24시간에서도 증가를 보고하여 본 실험의 결과와 종합해 볼 때 세뇨관 세포가 세포외 고농도의 당에 노출될 경우 농도와 시간에 의존적으로 fibronectin 생성이 증가할 것으로 판단된다. 또한 fibronectin이 세포외 기질의 주된 성분이므로 고농도의 당에 의한 세뇨관 세포의 fibronectin 생성의 증가는 당뇨병성 신증의 세뇨관 간질 병변의 기전의 하나가 될 수 있을 것으로 사료된다.

고농도의 당에 의한 Fibronectin 생성의 증가 기전으로 우선 PKC 활성화에 의하여 유발될 것으로 추정된다. 당 농도를 0mM인 대조군에서 PKC 억제제를 첨가한 결과 fibronectin의 생성이 증가하여 PKC는 세뇨관 세포에서 fibronectin 생성을 억제할 것으로 사

료된다. 그러나 고농도의 당과 함께 PKC 억제제를 첨가한 실험에서는 PKC 억제제를 단독 첨가한 경우에 비하여 추가적인 증가는 관찰할 수 없었다. 이러한 결과로 보아 고농도의 당에 의한 fibronectin 증가는 PKC 경로와 무관하게 유발될 것으로 사료되며, 고농도의 당 존재하에서 24시간 이상 지속시 초기에 활성화된 PKC 활동도가 phorbol ester 전처리시 PKC 활동도가 소실되는 것과 유사하게²²⁾ 억제되어 PKC에 의한 영향을 받지 않는 것으로 추정된다. Morrisey 등¹⁰⁾은 aldose reductase 억제제인 sorbinil 투여로 fibronectin 생성이 억제됨을 관찰한 바 있으며, Burger 등²³⁾은 인 세뇨관 상피 세포에서 fibronectin 생성이 TGF- β 와 platelet-derived growth factor(PDGF)에 의하여 촉진됨을 보고하였다. 본 실험에서도 고농도의 당과 함께 TGF- β 항체를 투여한 결과 약 40%의 fibronectin 생성이 감소함을 관찰하여 고농도의 당에 의한 fibronectin 생성이 TGF- β 에 의하여 일부 매개될 수 있음을 반영하는 결과 생각된다. Oh 등¹³⁾은 메산지움 세포의 fibronectin 생성이 TGF- β 에 의하여 매개됨을 보고하여 사구체와 세뇨관 세포의 fibronectin 생성은 공통적으로 TGF- β 에 의하여 매개될 것으로 사료되나 polyol 경로를 비롯한 축적인 매개 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

세포외 기질의 증가는 기질 분해 감소의 결과로 보는 견해에서 기질의 분해는 세포 자체로부터 분비되는 다양한 분해 효소에 의하여 일어나는데 대표적으로 collagenase, gelatinase A, gelatinase B, stromelysin-1 등을 들 수 있으며 총칭하여 matrix metalloproteinases(MMPs)라고 한다^{24, 25)}. MMPs는 질환에 따라 분비 정도가 다르고^{24, 26)} 섬유화를 매개하는 물질들인 TGF- β 에 의하여 분비가 항진될 수 있으며²⁷⁾, MMPs의 분비가 감소되거나 MMPs의 활동도를 억제하는 TIMP의 분비가 증가되면 기질의 축적이 초래되고 섬유화가 초래될 것으로 예상된다. 따라서 당뇨병성 신증에서도 고농도의 당에 노출된 세뇨관 세포 자체로부터 MMPs의 분비가 감소되거나 TIMP 분비의 증가가 기대된다. 본 연구에서 15, 25mM의 당 농도에 24, 48시간동안 노출된 세뇨관 세포로부터 농도, 시간 의존적으로 TIMP-1의 분비가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. Phillips 등¹⁴⁾은 25mM의 당 농도에서 TIMP-1과 함께 TIMP-2의 증가를 보고하여 본 연구의 결과와 일치하였으며, type IV 교원질과 fibronec-

tin 축적의 기전으로 설명하였다. Suzuki 등²⁵⁾은 당뇨병성 신증의 신생검 조직에서 TIMP-1 mRNA 발현이 간질성 병변의 정도와 상관성이 있음을 보고하여 본 실험의 결과와 종합하여 볼 때 당뇨병성 신증의 간질 섬유화는 세뇨관 세포의 TIMP-1 분비의 증가에 의하여 일부 매개될 것으로 추정된다.

TIMP-1 분비의 증가 기전으로 역시 PKC 활성화와 사구체 경화의 주된 매개 물질인 TGF- β ¹³⁾에 의한 매개 가능성을 예상할 수 있다. 당뇨병성 신증은 비염증성 병변으로 침윤 세포들에 의한 매개 물질의 유리에 의한 변화보다는 세뇨관 세포내 신호 전달계의 변화에 따른 결과일 가능성이 높으므로 PKC 매개 가능성은 평가하기 위하여 PKC 억제제를 고농도의 당과 같이 노출 시켰으나 TIMP-1 분비 증가에 변화를 보이지 않아 PKC 이외의 기전에 의하여 분비가 증가할 것으로 사료되었다. Burger 등²³⁾은 TGF- β 에 의한 직접적인 fibronectin 생성의 증가를 보고한 반면에 Baricos 등²⁷⁾은 항 TGF- β 항체를 이용한 실험에서 plasminogen activator inhibitor-1을 증가시키고, MMP-2 활성화를 차단함으로서 메산지음 세포의 세포외 기질의 증가를 유발함을 보고하여 TIMP-1 증가도 TGF- β 에 의한 매개 가능성도 예상되었다. 그러나 고농도의 당과 항 TGF- β 항체를 같이 투여한 실험에서도 TIMP-1의 분비에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 본 연구의 결과로 보아 고농도의 당에 노출된 세뇨관 세포로부터 TIMP-1의 증가는 PKC, TGF- β 이외의 기전에 의하여 매개 될 것으로 사료되나 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

이상의 결과로 보아 고농도의 당에 노출되는 세뇨관 세포는 당 이동체 GLUT1의 발현이 저하되는 반면에 fibronectin과 TIMP 생성의 증가로 세포외 기질이 축적되어 당뇨병성 신증에서의 세뇨관 간질성 병변을 유발할 것으로 생각된다. 고농도의 당에 의한 세뇨관 세포의 fibronectin 생성의 증가는 TGF- β 에 의하여 일부 매개 될 것으로 추정되나 정확한 규명을 위하여 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 실험에 많은 도움을 주신 연세의대 약리학교실의 유미라 선생님께 감사의 말씀을 드립니다.

= Abstract =

The Study on the Mechanism Regulating the Production of Extracellular Matrix in Renal Tubular Epithelial Cells Cultured in High Glucose Concentration

Jae Ha Hwang, M.D., Tae Hyun Yoo, M.D.
Hyun Yong Song, M.D., Joo Seong Kim, M.D.
Young Su Song, M.D., Deug Lim Chong, M.D.
Kyung Sup Kim, M.D., Shin Wook Kang, M.D.
Ho Yung Lee, M.D., Dae Suk Han, M.D.
and Kyu Hun Choi, M.D.

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

Thickening of tubular basement membrane and progressive tubulointerstitial fibrosis has been reported as important components of diabetic nephropathy. In order to investigate the mechanisms of tubulointerstitial changes in diabetic nephropathy, we evaluated the effects of a high concentration of glucose(25mM; 450mg/dL) on glucose transporter GLUT1 level, fibronectin production and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-1 concentration in renal tubular(LLC-PK₁) cells. As the effect of high glucose-induced alteration in LLC-PK₁ cells, the expression of facilitative glucose transporter, GLUT1 was decreased after longer than 24-hours exposure to 25mM glucose, compared to control(5.6mM). The administration of protein kinase C (PKC) inhibitor GF109203X(10 μ M) did not show significant effect on high glucose-induced decrease of GLUT1 level. On western blot analysis of fibronectin production, The exposure of LLC-PK₁ cells to 25mM glucose for 48 hours significantly increased fibronectin production, dose-dependently. The addition of GF109203X at the concentration of 10 μ M induced the significant increase of fibronectin level in LLC-PK₁ cells under glucose-free condition, whereas there was no significant effect on the high glucose-induced increase of fibronectin production. The addition of anti-TGF- β antibody at 30 μ g/mL partly inhibited the high glucose-induced increase of fibronectin production. Concerning the changes of tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)-1 levels in the presence of high glucose, the exposure to high glucose for 24 and 48 hours increased TIMP-1 levels in culture supernatant of LLC-PK₁ cells, dose-dependently. The TIMP-1 levels of 48-hour exposure to 15 and 25mM glucose were also significantly higher than those of 24-hour

exposure. The treatment with 10 μ M GF102903X or 30 μ g/mL anti-TGF- β antibody had no significant effects on TIMP-1 levels measured under the high glucose culture condition.

In conclusion, the expression of facilitative glucose transporter, GLUT1 is inhibited and the production of fibronectin is increased in renal tubular cells cultured in the presence of high concentration of glucose, which is partly mediated by TGF- β . The TIMP-1 level is also increased under high glucose culture condition. The enhanced productions of fibronectin and TIMP-1 of renal tubular cells under high glucose concentration may contribute to tubulointerstitial fibrosis that occurs in diabetic nephropathy.

Key Words : High glucose, Renal tubular cells, Extracellular matrix

참 고 문 헌

- 1) Andersen AR, Christiansen JK, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T: Diabetic nephropathy in type I(insulin-dependent) diabetes : An epidemiologic study. *Diabetologia* 25:496, 1983
- 2) Faber J, Balant LP, Dayer PG, Fox HM, Vernet AT : The kidney in maturity onset diabetes mellitus : A clinical study of 510 patients. *Kidney Int* 21:730, 1982
- 3) Don Riesenbergs : The natural history and epidemiology of diabetic nephropathy. Implications for prevention and control. *JAMA* 263:1954, 1990
- 4) Mauer SN, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DER, Brown DM, Goetz FC : Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 74:1145-1155, 1984
- 5) Ueno M, Kawashima S, Nishi S, Shimada H, Karasawa R, uzuki Y, Maruyama Y, Arakawa M : Tubulointerstitial lesions in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 52(Suppl 63):S191-S194, 1997
- 6) Brito PL, Fioretto P, Drummond K, Kim Y, Steffes MW, Basgen JM, Sisson-Ross S, Mauer M : Proximal tubular basement membrane width in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 53:754-761, 1998
- 7) Bader R, Bader H, Grund KE, MacKensen-Hean S, Christ H, Bohle A : Structure and function of the kidney in diabetic glomerulosclerosis : Correlations between morphological and functional parameters. *Path Res Pract* 167:204-216, 1980
- 8) Ziyadeh FN : Significance of tubulointerstitial changes in diabetic renal disease. *Kidney Int* 49(Suppl 54):S10-S13, 1996
- 9) Wolf G, Neilson EG, Goldfarb S, Ziyadeh FN : The influence of glucose concentration on angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 176:902-909, 1991
- 10) Morrisey K, Steadman R, Williams JD, Phillips AO : Renal proximal tubular cell fibronectin accumulation in response to glucose is polyol pathway dependent. *Kidney Int* 55:160-167, 1999
- 11) Dominguez JH, Song B, Liu-Chen S, Qulali M, Howard R, Lee CH : Studies of renal injury II. Activation of the glucose transporter 1(GLUT1) gene and glycolysis in LLC-PK₁ cells under Ca²⁺ stress. *J Clin Invest* 98:395-404, 1996
- 12) Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-64, 1976
- 13) Oh JH, Ha H, Yu MR, Lee HB : Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor- β 1 and fibronectin synthesis. *Kidney Int* 54:1872-1878, 1998
- 14) Philips AO, Steadman R, Morrisey K, Martin J, Eynstone I, 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
- 15) Debnam ES, Unwin RJ : Hyperglycemia and intestinal and renal glucose transport : Implications for diabetic renal injury. *Kidney Int* 50:1101-1109, 1996
- 16) Kamran M, Peterson RG, Dominguez JH : Overexpression of GLUT2 gene in renal proximal tubules of diabetic Zucker rats. *J Am Soc Nephrol* 8:943-948, 1997
- 17) Heilig CW, Conception LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P : Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest* 96:1802-1814, 1995
- 18) Yang ML, Guh JY, Yang YL, Chang CC, Chuang LY : Captopril reverses high glucose-induced effects on LLC-PK₁ cells partly by enhancing facilitative glucose transporter messenger RNA expressions. *Biochem Mol Biol Int* 41:511-519, 1997
- 19) Moran A, Turner RJ, Handler JS : Regulation of sodium-coupled glucose transport in a cultured epithelium. *J Biol Chem* 258:15087-15090, 1983
- 20) Amsler K, Ghatani S, Hemmings BA : cAMP-dependent protein kinase regulates renal epithelial

- cell properties. *Am J Physiol* **260**:C1290-C1299, 1991
- 21) Mene P, Pugliese G, Pricci F, Mario UD, Cinotti GA, Pugliese F: High glucose inhibits cytosolic calcium signaling in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* **43**:585-591, 1993
- 22) Choi KH, Kang SW, Lee HY, Han DS: The effects of high glucose concentration on angiotensin II- or transforming growth factor- β -induced DNA synthesis, hypertrophy, and collagen synthesis in cultured rat mesangial cells. *Yonsei Med J* **37**:302, 1996
- 23) Burger A, Wagner C, Viedt C, Reis B, Hug F, Hansch GM: Fibronectin synthesis by human tubular epithelial cells in culture: Effects of PDGF and TGF- β on synthesis and splicing. *Kidney Int* **54**:407-415, 1998
- 24) Norman JT, Lewis MP: Matrix metalloproteinases (MMPs) in renal fibrosis. *Kidney Int* **49**(Suppl 54):S61-S63, 1996
- 25) Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, Koji T, Yagame M, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H: In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int* **52**:111-119, 1997
- 26) Engelmyer E, van Goor H, Edwards DR, Diamond J: Differential mRNA expression of renal cortical tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 in experimental hydronephrosis. *J Am Soc Nephrol* **5**:1675-1683, 1995
- 27) Baricos WH, Cortez SL, Deboisblanc M, Xin S: Transforming growth factor- β is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **10**:790-795, 1999