

고포도당이 백서 사구체 메산지움 세포의 Nitric Oxide 합성에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실, 약리학교실*, 신장질환연구소

노현진 · 하현주* · 유미라* · 신석균 · 송현웅
황재하 · 강신욱 · 최규현 · 한대석 · 이호영

〈요 약〉

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 주된 원인 질환으로 국내에서도 새로 진단 받은 말기 신부전증 환자의 약 34%가 당뇨병성 신증에서 기인하는 것으로 보고되어 있다. 고포도당혈증은 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 결정하는 주된 인자로 생각되고 있으나, 정확히 어떠한 원위 경로를 경유하여 사구체 모세혈관 기저막의 비후 및 메산지움 영역의 확장 등 특징적인 변화를 유발하는지는 알려져 있지 않다. 고포도당혈증에 의하여 사구체 손상을 매개할 것으로 보고되어 있는 여러 인자들 중 하나인 nitric oxide(NO)는 세포질 내에서 nitric oxide synthase(NOS)에 의하여 합성된다. 신장 내에서 생성되는 constitutive NO는 사구체 모세혈관의 압력을 감소시키고 신장 혈류 순환의 자동 조절(auto regulation) 기능에 관여하며 세뇨관에서의 sodium 재흡수를 억제하는 기능을 하는 것으로 보고되어 있어 신 손상에 대한 보호 작용을 하는 것으로 생각되고 있으나, 병적인 조건하에서 inducible NOS(iNOS) 경로에 의하여 국소적으로 다량의 NO가 생성되는 경우에는 오히려 신장의 손상을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 당뇨병성 신증의 발생에 있어서는 초기에 관찰되는 사구체의 과여과에 constitutive NOS(cNOS)에 의한 NO의 합성 증가가 관여하는 것으로 제시되어 있으며 당뇨병의 진행에 따라 NO의 안정성 및 활성이 감소되는 것으로 보고되어 있으나, iNOS 경로에 의한 NO의 역할에 대해서는 확실히 알려져 있지 않다. 이에 본 연구자는 백서에서 추출한 사구체 메산지움 세포를 배양하여 고포도당에 노출시킨 후 iNOS에 의한 NO의 합성 변화를 관찰하였으며, protein kinase C(PKC) 경로의 활성화와 polyol 대사의 향진이 이에 미치는 효과를 검색하여 다음의 결과를 얻었다.

1) 고포도당에 노출된 메산지움 세포에서 배지 내 nitrite 및 nitrate의 총 농도는 lipopolysaccharide(LPS)와 interferon- γ (IFN- γ)로 세포를 자극한 후 24시간째에 대조군에 비하여 유의하게 증가되었으며, NO에 의하여 이차적으로 활성화되는 세포 내 cyclic guanosine monophosphate의 농도도 자극 후 24시간 및 48시간째에 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다.

2) LPS와 IFN- γ 로 자극된 메산지움 세포의 iNOS mRNA 표현은 시간이 경과할수록 증가하였으며, 자극 후 4시간 및 24시간째에 메산지움 세포의 iNOS mRNA 표현이 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다. 그러나 동일 농도의 L형 포도당에 의해서는 iNOS mRNA의 표현이 증가하지 않았다.

3) LPS와 IFN- γ 로 자극된 메산지움 세포의 iNOS 단백 표현은 시간이 경과할수록 증가하였으며, 자극 후 48시간째에는 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 증가되었다.

4) PKC 억제제 calphostin C에 의하여 고포도당에 의한 iNOS mRNA의 표현 증가가 억제

* 본 연구는 1998년도 대한신장학회 COBE 연구비의 일부 보조로 이루어졌음.

책임저자: 이호영 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 내과학교실

Tel: (02)361-5423, Fax: (02)393-6884

제되었다.

5) Aldose reductase 억제제에 의하여 고포도당에 의한 iNOS mRNA의 표현 증가가 억제되었다.

이상의 결과로 백서 사구체 메산지움 세포에서 고포도당에 의하여 iNOS 경로에 의한 NO의 합성이 의의 있게 증가됨을 확인하였으며, PKC 경로의 활성화와 polyol 대사의 향진이 이에 관여하는 것으로 사료된다.

서 론

당뇨병성 신증은 말기 신부전증의 주된 원인 질환일 뿐 아니라 당뇨병에 의한 가장 심각한 장기 합병증 중 하나이다. 국내에서도 당뇨병성 신증에 의한 말기 신부전증 환자의 비율이 급속하게 증가하는 추세이며, 1997년 대한신장학회에서 주관한 인산 기념 등록사업에 의하면 새로 진단 받은 말기 신부전증 환자의 약 34%가 당뇨병성 신증에서 기인하여 가장 많은 비율로 보고되었다¹⁾. 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서 혈당을 적극적으로 조절함으로써 당뇨병성 신증을 포함한 미세혈관 합병증의 발생과 진행을 지연시킬 수 있다는 DCCT(Diabetes Control and Complications Trial) 결과 및 많은 동물 실험에 근거하여 고포도당혈증 자체가 당뇨병성 신증의 발생과 진행을 결정하는 주된 인자로 생각되고 있으나²⁾, 정확히 어떠한 원위 경로를 경유하여 사구체 모세혈관 기저막의 비후 및 세포 외 기질(extracellular matrix)의 증가로 인한 메산지움 영역의 확장 등 특징적인 변화를 유발하는 지는 알려져 있지 않다. 고포도당혈증 자체에 의하여 세포 외 기질의 증가와 그에 따른 사구체 손상을 매개할 것으로 생각되는 인자들에 대한 많은 연구에 의하면, 고포도당혈증에 의한 세포 내 포도당 농도의 증가로 효소적 경로(enzymatic pathway) 및 비효소적 경로(non-enzymatic pathway)를 경유한 대사의 활성화, 즉 polyol 대사의 향진³⁻⁵⁾, protein kinase C(PKC)의 활성화^{6, 7)}, glucosamine 경로의 활성화⁸⁾ 및 산화성 스트레스의 증가⁹⁾ 등 효소적 경로의 활성화와 후기 당화산물(advanced glycosylation endproducts; AGE)의 축적¹⁰⁾과 그에 따른 산화성 스트레스의 증가 등 비효소적 경로의 활성화에 의하여 transforming growth factor- β (TGF- β), platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), in-

sulin-like growth factor(IGF) 등의 성장 인자 및 각종 cytokine, nitric oxide(NO)를 포함한 혈관 조절 인자들의 변화가 유발됨으로써 궁극적으로 사구체의 경화가 발생하는 것으로 제시되고 있다.

NO는 제2전령 물질의 하나로 세포질 내에서 L-arginine의 guanidino nitrogen으로부터 L-citrulline을 합성하는 과정에서 생성된다. NO의 주요 기능은 혈관 평활근의 이완 작용이나¹¹⁾, 혈소판의 응집 및 부착을 억제하고¹²⁾, 국소 신경 전달물질로서의 기능¹³⁾도 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 신장 내에서 NO는 사구체 혈관 평활근의 긴장도를 이완시키고¹⁴⁾, 세뇨관에서의 sodium 재흡수를 억제하며^{15, 16)}, 메산지움 세포의 수축 및 증식을 억제하는 기능을 가지고 있다^{17, 18)}. NO의 합성을 매개하는 NO synthase(NOS)는 constitutive NOS(cNOS)와 inducible NOS(iNOS)로 분류되며, cNOS는 주로 혈관 내피 세포에 존재하는 endothelial NOS(eNOS)와 신경 세포에 존재하는 neuronal NOS(nNOS)로 구분된다¹⁹⁾. Inducible NOS는 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) 등의 cytokine이나 그람 음성균의 내독소(lipopolysaccharide; LPS)에 의하여 표현이 유도되며, 주로 대식 세포, 중성 백혈구, 간 세포, 섬유아 세포, 혈관 평활근 세포 등에 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 신장의 세뇨관 상피 세포와 메산지움 세포에도 이와 같은 iNOS가 존재하여 사구체 내의 혈액동학적 변화 및 사구체 병변의 유발에 관여할 것으로 생각되고 있다^{20, 21)}.

당뇨병성 신증의 발생과 진행에 있어서 NO 합성의 변화 양상과 매개 기전은 보고마다 차이가 있으며 최근까지도 논란이 계속되고 있다. 주로 많이 보고된 내용은 cNOS에 의한 NO 합성 및 안정성의 변화로, Tolins 등과 Bank 등은 당뇨병을 유발한 백서에서 cNOS에 의한 NO의 합성이 증가되었다고 보고한 반면^{22, 23)}, Wang 등과 Craven 등은 그와 반대되는 결과

를 보고하였고²⁴⁻²⁶⁾, 특히 Craven 등은 NO의 합성 감소에 있어서 안정성의 저하를 중요한 소견으로 제시한 바 있다²⁷⁾. 메산지움 세포를 대상으로 한 실험은 보고가 많지 않으며 그 결과도 역시 상반되어 정설이 없는 실정이다. Sharma 등은 고폏도당에 노출시킨 생쥐의 사구체 메산지움 세포에서 iNOS mRNA의 표현이 증가되었으며 PKC의 활성화가 이에 관여하였다고 보고한 바 있으나²⁸⁾, 최근에 Trachtman 등은 백서 메산지움 세포를 고폏도당에 노출시킨 결과 NO의 합성은 감소하였으며 PKC의 활성화가 관여하는 증거를 찾지 못하였던 것으로 보고하였다²⁹⁾. 종합하여 볼 때 고폏도당에 의한 NO 합성의 변화 양상 및 그 기전을 규명하기 위해서는 보다 많은 실험 결과가 축적되어야 할 것으로 사료된다.

이에 저자 등은 백서에서 추출한 사구체 메산지움 세포를 배양하여 고폏도당에 노출시킨 후, NO의 안정된 대사물질로 알려진 nitrite와 NO에 의하여 이차적으로 활성화되는 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)를 측정하고 iNOS mRNA 및 단백 표현의 변화를 조사함과 동시에 PKC의 활성화와 polyol 대사의 향진이 이에 관여하는 지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 백서 사구체 메산지움 세포의 분리, 배양 및 약물 투여

200-250gm의 Sprague-Dawley 백서를 pentothal (50mg/kg; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 마취한 후 단두하여 희생시킨 다음, 신장을 적출하여 Harper 등이 고안한 방법³⁰⁾으로 사구체를 분리, 메산지움 세포를 배양하였다. 다음의 모든 과정은 4℃, laminar flow hood 하에서 무균 상태로 실시하였다. 적출된 신장을 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 후 가위로 피질만을 분리하여 penicillin(100U/ml; Sigma Chemical Co.)과 streptomycin(100μg/ml; Sigma Chemical Co.)이 함유된 인산 완충 용액(phosphate buffered saline; PBS)에 옮긴 후 체공이 200, 150 및 75μm인 stainless sieve(Sigma Chemical Co.)를 차례로 통과시킨 다음, 75μm 소공에 걸린 사구체를 PBS에 재부유시켰다. 이 부유액을 1,500rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남은 조직에 20% fetal bovine serum(FBS; GIBCO BRL, Gr-

and island, NY, USA), penicillin(100U/ml), streptomycin(100μg/ml), 44mM NaHCO₃, 14mM N-2-hydroxy-ethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; GIBCO BRL)을 넣고 5% CO₂와 95% 공기가 공급되는 37℃ 세포배양기(Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 약 2주간 배양액을 2-3일마다 교체하여 메산지움 세포로 거의 찻을 때 trypsin/EDTA(0.25%/0.1%; GIBCO BRL)를 이용하여 계대 배양하였고, 제5-11회의 계대 배양한 메산지움 세포를 실험에 이용하였다.

역상 현미경(Olympus IMT-2, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)으로 메산지움 세포의 형태를 확인하고, 항 vimentin 항체(DAKO Japan Co., Kyoto, Japan)와 항 cytokeratin 항체(DAKO Japan Co.)를 이용한 면역조직화학 염색을 시행하였다.

Lactate dehydrogenase(LDH)와 nitrite 측정을 위한 세포는 6 well 배양 용기에서 배양하였으며 그 외의 모든 분석을 위한 세포는 100mm 배양 용기에서 배양하였다. 세포들로 배양 용기가 거의 가득 찼을 때 5.6mM(대조군)이나 30mM(고포도당군)의 D형 포도당을 함유한 혈청 배제 DMEM으로 교환하였다. 교환 후 24시간이 경과하였을 때 LPS(10μg/ml; Sigma Chemical Co.)와 IFN-γ(50IU/ml; Genzyme Corporation, Cambridge, MA, USA)로 세포를 자극하였고, 각 실험 목적에 알맞은 시간 동안 배양하였다. 대조군 및 고폏도당의 농도를 설정하기 위한 예비 실험으로 포도당의 농도를 5.6, 10, 20, 30 및 50mM로 달리하여 자극 후 24시간에 측정한 nitrite 농도는 5.6mM에서의 농도 62.17±3.24nmol/mg protein을 1로 하였을 때 10, 20, 30, 50mM의 포도당 배지에서 각각 1.13±0.09, 1.22±0.22, 1.53±0.18, 1.53±0.06배로 증가하였다. 따라서 본 실험에서는 대조군을 5.6mM, 고폏도당군을 30mM로 설정하여 실험하였다.

고포도당에 의한 NO 합성의 변화에 미치는 PKC 활성화나 polyol 대사 향진의 역할을 검색하기 위하여 PKC 억제제인 calphostin C(Sigma Chemical Co.)와 aldose reductase 억제제인 6-bromo-1, 3-dioxo-1H-benz[d, e]isoquinoline-2(3H)-acetic acid(Tocris Cookson, Langford, Bristol, UK)를 고폏도당으로 자극하기 전 1시간부터 계속 투여하였다. Calphostin C는 메산지움 세포를 이용한 기존의 실험에서 PKC의 활성을

억제하는 농도로 보고된 100nM로 부여하였고, aldose reductase 억제제는 10, 100, 500 μ M의 농도에 따른 반응을 검색하였다.

2. 세포 사망 분석

시간의 경과에 따른 메사지움 세포의 사망률을 알아보기 위하여 LDH를 측정하였다. LPS와 IFN- γ 로 세포를 자극하고 4, 24, 48, 72, 96시간 경과 후 β -NADH(Sigma Chemical Co.) 30mg을 0.2N NADH buffer 50ml에 녹여 96 well 배양 용기에 100 μ l씩 분주한 후, 각 실험 조건의 well로부터 50 μ l의 배지를 취하여 혼합하였다. 배양 용기에 남아있는 각 sample에 Triton X-100을 1%가 되도록 넣은 후 5분간 배양하여 세포를 파괴시키고, 이 중 50 μ l를 취하여 96 well 배양 용기에 분주하였다. 각각의 well에 pyruvic acid(Sigma Chemical Co.) 50 μ l를 넣은 후 SOFT-maxPRO microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용, 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 사망률은 세포 외 배지로 유리된 LDH 양과 Triton X-100을 처리하여 세포들을 모두 파괴시켰을 때의 배지 내 총 LDH 양과의 비율로 표시하였다.

3. Nitrite의 측정

Nitrite 측정에 이용한 배지는 phenol red에 의한 영향을 배제하기 위하여 phenol red free DMEM(Sigma Chemical Co.)을 이용하였다. LPS와 IFN- γ 로 세포를 자극하고 4, 24 및 48시간 후에 배지의 상층액을 취하여 다음과 같이 Griess 방법³¹⁾을 이용, nitrite를 측정하였다.

5% phosphoric acid에 용해된 1% sulfanilic acid와 0.1% N-naphthylethylene diamine dihydrochloride를 동량으로 혼합한 Griess 시약 500 μ l를 동량의 배지 상층액과 혼합하여 60 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리한 후 spectrophotometer(Ultrascpec 3,000; Pharmacia Biotech, England, UK)를 이용하여 546nm에서 흡광도를 측정하였으며, NaNO₂를 이용한 표준 곡선에서 농도를 계산하였다. 계산된 nitrite의 농도는 배지 내 단백질의 농도로 보정하였다.

배지 내의 nitrate와 nitrite의 총 농도는 배지 상층액을 취한 후 nitrate reductase(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 부여하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간

배양하였다가 같은 방법으로 측정하였다.

4. cGMP의 측정

LPS와 IFN- γ 로 자극한 후 24시간 또는 48시간이 경과하였을 때 배지를 제거하고 300 μ l의 Tris-EDTA 용액(40-50%, pH 7.5)을 이용하여 세포를 균질화 한 후 10초간 sonication을 시행하였다. 100 $^{\circ}$ C에서 3분간 단백질을 응고시키고 12,000rpm에서 10분간 원심 분리 한 후 상층액을 취하여 cGMP를 측정하였다. Cyclic GMP의 측정은 상품화된 kit(Amersham Life Science, Little Chalfont, England, UK)를 이용하여 방사면역법으로 측정하였다.

5. Inducible NOS mRNA에 대한 Northern blot 분석

LPS와 IFN- γ 로 자극하고 0, 4, 24 및 48시간에 RNA를 분리하였다. RNA는 Chomczynski와 Sacchi 방법에 의하여 다음과 같이 총 RNA를 분리하였다³²⁾. 즉, 세포를 4M guanidinium thiocyanate로 균질화 한 후, acid phenol을 이용하여 단백질과 DNA를 추출해 내고 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켰다. Ethanol을 이용하여 세척한 후 RNA pellet을 건조시켰고 diethylpyrocarbonate(DEPC)를 처리한 탈이온수에 용해하여 260nm에서 흡광도를 측정, RNA 양을 정량하였다.

분리된 RNA는 2.2M formaldehyde를 포함한 1.2% 한천젤을 이용하여 전기영동한 후 모세관 전기법을 이용하여 nylon 흡착지에 이전하였고 gene-linker(Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 자외선으로 cross link 하였다. Prehybridization은 상품화된 prehybridization buffer(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 42 $^{\circ}$ C에서 5시간 동안 시행하였고, 원하는 소식자(cDNA)인 iNOS와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)에 random primer extension법(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 이용하여 [³²P]dCTP(3,000Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL, USA)로 표지하여 42 $^{\circ}$ C에서 20시간 동안 흡착지에 보합 결합시켰다. 실험에 사용한 iNOS cDNA는 Dr. CJ Lowenstein(Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD, USA)으로부터 기증받았다. 흡착지를 다음과 같은 순서로 30분씩-① 실온에서 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS)가 포함

된 2×SSC(1×SSC의 조성은 pH 7.0의 0.15M NaCl과 0.015M sodium citrate이다), ② 실온에서 0.1% SDS가 포함된 0.2×SSC, ③ 55℃에서 0.1% SDS가 포함된 0.2×SSC-세척하였다. 증강지가 장착된 카세트에서 Kodak X-Omat K XK-1 X-ray 필름을 이용하여 -70℃에서 1-3일 동안 자가 방사 기록을 하였다. 자가 방사 기록은 CSC camera(Canon, Japan)를 이용하여 TINA 2.10e program으로 densitometer를 측정하고 GAPDH mRNA 양으로 보정하였다.

6. Inducible NOS 단백질에 대한 Western blot 분석

LPS와 IFN- γ 로 자극하여 4, 24 및 48시간이 경과하였을 때 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척하였다. 200 μ l의 lysis buffer(50mM Tris/HCl, pH 7.5, 100mM NaCl, 2mM ethylenediaminetetra-acetic acid, 2mM ethyleneglycol-bis(β -aminoethyl ether)-N, N'-tetra-acetic acid, 1mM dithiothreitol, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ M leupeptin, 1% Triton X-100)를 이용하여 세포 균질액을 만들고 13,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후, 상층액을 취하여 분석에 이용하였다.

Bio-Rad assay를 이용하여 Bradford 방법으로 단백질을 정량한 후 50 μ g의 단백질을 SDS와 β -mercaptoethanol이 포함된 sample buffer와 혼합하여 95℃에서 5분간 끓였다. 8% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 각각의 단백질을 분리하고 완충액을 이용하여 nitrocellulose 흡착지에 이전하였다. Inducible NOS에 대한 일차 항체(mouse monoclonal anti-rat antibody; Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)를 처리하여 실온에서 2시간 30분 동안 반응시킨 후 세척하고 이차 항체(horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG; Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 실온에서 2시간 30분 동안 반응시켰다. Signal은 enhanced chemiluminescence 시약(Amersham Life Science, Little Chalfont, England, UK)을 이용하여 가시화 하였고, densitometer로 정량하였다.

7. 통계적 분석

모든 측정값은 평균±표준오차로 표시하였으며, 대조군과 고포도당군 간의 차이는 Mann-Whitney U-

test를 이용하여 비교하였다. 세 군 이상의 통계학적 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 이용하여 Fisher's test로 검정하였고, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 사구체 매산지움 세포의 배양

배양 매산지움 세포는 형태학적으로 특징적인 비교적 넓고 길며 끝이 날카롭게 각진 방추형 또는 성상 형태를 지녔고, 항 vimentin 항체에 양성 반응을 나타내었으며 항 cytokeratin 항체로는 염색되지 않았다.

2. LDH 측정에 의한 세포 사망률 평가

LPS와 IFN- γ 로 자극한 매산지움 세포는 대조군에서 4, 24, 48, 72 및 96시간 경과 후 세포 사망률이 각각 3.9 ± 1.3 , 6.3 ± 0.8 , 5.9 ± 0.8 , 25.2 ± 0.2 및 $25.3\pm 0.7\%$, 고포도당군에서 4, 24, 48, 72 및 96시간 경과 후 각각 7.3 ± 0.1 , 4.9 ± 0.7 , 5.3 ± 0.2 , 13.5 ± 0.4 및 $16.8\pm 0.3\%$ 로 특히 대조군에서 72시간 이후의 세포 사망률이 현저히 증가되었다. 따라서 본 연구에서는 세포 사망이 현저하게 일어나지 않는 48시간까지 관찰하였다.

3. 고포도당이 매산지움 세포의 nitrite 및 cGMP 합성에 미치는 영향

배지 내 nitrite 농도는 대조군 및 고포도당군 모두에서 시간이 경과할수록 증가하여 대조군의 4시간째 농도 59.21 ± 0.20 nmol/mg protein을 1로 하였을 때 대조군에서는 24시간 및 48시간에 각각 1.15 ± 0.20 , 2.31 ± 0.36 배, 고포도당군에서는 4, 24 및 48시간에 각각 1.07 ± 0.10 , 1.51 ± 0.25 및 2.62 ± 0.67 배로 증가하였다. 대조군과 고포도당군 모두 48시간째의 nitrite 농도는 각 군의 4시간째 농도에 비하여 통계적으로 유의 있게 증가하였다($p<0.05$). 그러나, 각 시간대에서 고포도당군과 대조군 사이의 nitrite 농도는 고포도당군에서 증가된 경향은 보였으나 통계적인 의의는 없었다(Fig. 1).

배지 내의 nitrate를 nitrite로 환원하여 측정한 총 nitrite의 농도는 자극 후 24시간 및 48시간에 고포도당군에서 각각 278.51 ± 38.98 , 428.53 ± 43.30 nmol/mg protein, 대조군에서 각각 178.90 ± 28.41 , $344.85\pm$

60.12nmol/mg protein으로 자극 후 24시간째 고포도당군에서 대조군에 비하여 유의 있게($p<0.05$) 증가되었다(Fig. 2). Nitrate와 nitrite의 총 농도에 대한 nitrite의 농도 비율은 자극 후 24시간 및 48시간에 대조군에서 각각 37.9%와 39.7%, 고포도당군에서 각각 32.2%와 36.2%로 시간의 경과 및 포도당의 농도에 따른 유의 있는 차이는 없었다.

NO의 활성을 나타내는 또 다른 지표로서 세포 내 cGMP의 활성을 측정된 결과, 대조군에서는 24시간 및 48시간에 각각 7.67 ± 0.46 , 4.59 ± 0.94 pmol/mg protein, 고포도당군에서는 각각 12.39 ± 1.01 , 5.31 ± 0.92

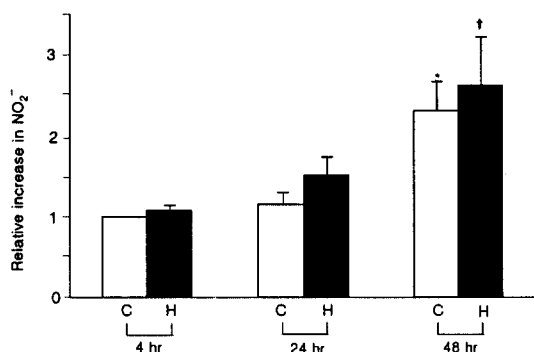


Fig. 1. Effect of high glucose on rat mesangial cell nitrite levels. Results are expressed as relative to that of control glucose at 4 hours. Values are expressed as mean \pm SE of four experiments. C; control glucose (5.6 mM), H; high glucose (30 mM). * $p<0.05$ versus control glucose at 4 hours; † $p<0.05$ versus high glucose at 4 hours

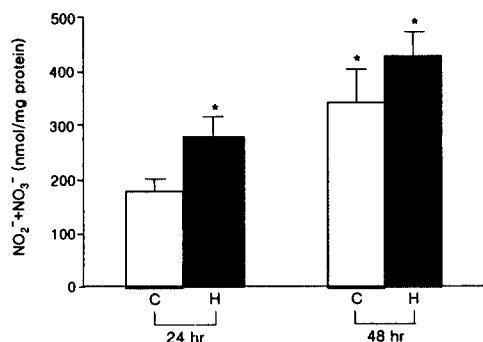


Fig. 2. Effect of high glucose on rat mesangial cell NO₂⁻ + NO₃⁻ levels. Values are expressed as mean \pm SE of three experiments. C; control glucose (5.6 mM), H; high glucose (30 mM). * $p<0.05$ versus control glucose at 24 hours

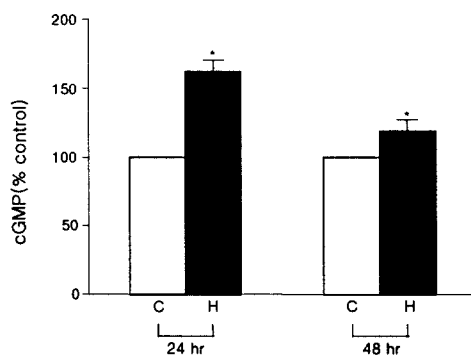


Fig. 3. Effect of high glucose on rat mesangial intracellular cGMP levels. Results are expressed as a percentage of paired control glucose. Values are expressed as mean \pm SE of four experiments. C; control glucose (5.6 mM), H; high glucose (30 mM). * $p<0.05$ versus paired control glucose

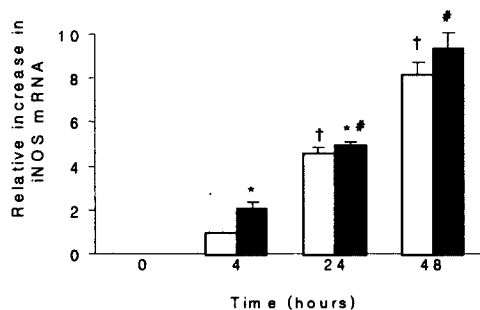


Fig. 4. Effect of high glucose on the expression of mesangial iNOS mRNA by Northern blot analysis. Mesangial cells were treated with LPS (10 μ g/ml) plus IFN- γ (50 IU/ml) for the indicated time periods under control glucose (C; 5.6 mM) or high glucose (H; 30 mM). GAPDH mRNA is shown in the lower panel. Values are the intensity of densitometric readings of iNOS mRNA corrected for GAPDH and expressed as relative to that of control glucose at 4 hours. Values are expressed as mean \pm SE of three to six experiments. * $p<0.05$ versus paired control glucose; † $p<0.05$ versus control glucose at 4 hours; ‡ $p<0.05$ versus high glucose at 4 hours

D-glucose 5.6 30 5.6 mM
L-glucose 0 0 24.4 mM

Fig. 5. Comparison of mesangial cell expression of iNOS mRNA under D-glucose and L-glucose by Northern blot analysis. Mesangial cells were treated with LPS(10 µg/ml) plus IFN-γ(50IU/ml) for 6 hours under control glucose(C), high glucose(H) or L-glucose(L). GAPDH mRNA is shown in the lower panel.

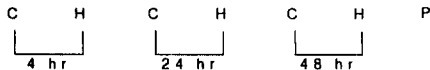


Fig. 6. Effect of high glucose on the expression of mesangial iNOS protein by Western blot analysis. Mesangial cells were treated with LPS(10 µg/ml) plus IFN-γ(50IU/ml) for the indicated time periods under control glucose(C; 5.6mM) or high glucose(H; 30mM). P; positive control for iNOS protein at 130kD.

pmol/mg protein으로 고포도당군에서 대조군에 비하여 통계적으로 유의 있게($p<0.05$) 증가되었다(Fig. 3).

4. 고포도당에 의한 iNOS mRNA 표현의 변화

Northern blot 분석을 시행한 결과, LPS와 IFN-γ로 자극하지 않은(0시간) 메산지움 세포는 대조군과 고포도당군 모두에서 iNOS mRNA 표현이 없었으나, LPS 및 IFN-γ에 의하여 대조군 및 고포도당군 모두에서 iNOS mRNA의 표현이 증가되었다(Fig. 4). In-

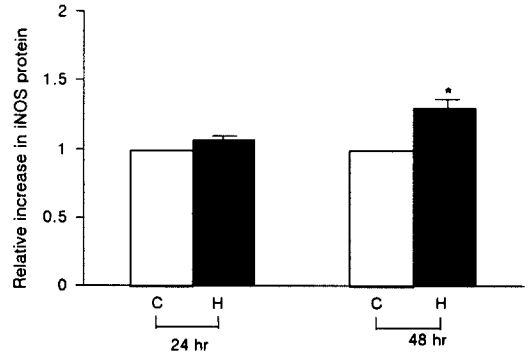


Fig. 7. Relative intensity of densitometric readings of iNOS protein content. Results are expressed as a relative to that of control glucose at the given time point. Values are expressed as mean±SE of three experiments. * $p<0.05$ versus paired control glucose

Glucose	C	H	C	H	C	H
CC	+	+	-	-	-	-
ARI(µM)	-	-	10	10	100	100

Fig. 8. Effect of calphostin C and aldose reductase inhibitor on the expression of iNOS mRNA by Northern blot analysis. Mesangial cells were treated with LPS(10 µg/ml) plus IFN-γ(50IU/ml) for 6 hours under control glucose(C; 5.6mM) or high glucose(H; 30 mM) in combination with calphostin C(CC; 100nM) or aldose reductase inhibitor(ARI; 10, 100 µM). GAPDH mRNA is shown in the lower panel. One representative experiment of four separate experiments is shown.

ducible NOS mRNA의 표현은 대조군과 고포도당군 모두에서 시간의 경과에 따라 유의 있게 증가되었다($p<0.05$). LPS와 IFN-γ로 자극한 후 4시간째에 고포도당군에서 대조군에 비하여 유의 있게 iNOS mRNA의 표현이 증가되었으며(2.13 ± 0.32 배, $p<0.05$), 이러한 차이는 24시간째에도 유지되었다. 동일 농도의 L형 포도당에 의해서는 iNOS mRNA의 표현이 증가하지 않는 것으로 보아 고포도당에 의한 메산지움 세포의 iNOS mRNA 표현 증가가 삼투압에 의한 효과

가 아남을 알 수 있었다(Fig. 5).

5. 고포도당에 의한 iNOS 단백질 표현의 변화

LPS와 IFN- γ 로 자극 후 4시간째에는 고포도당군과 대조군 모두에서 iNOS 단백질의 표현을 관찰할 수 없었으며, 시간이 경과할수록 매사지움 세포의 iNOS 단백질의 표현이 점진적으로 증가하였다(Fig. 6). 대조군에 비하여 고포도당군에서 24시간 및 48시간의 iNOS 단백질 표현이 증가되었으며, 48시간째에는 통계적으로 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Fig. 7).

6. PKC 억제제 및 aldose reductase 억제제 투여에 의한 iNOS mRNA 표현의 변화

고포도당에 의한 NO의 합성 증가에 있어서 PKC의 활성화 및 polyol 대사 항진의 역할을 검색하기 위하여 PKC 억제제와 aldose reductase 억제제를 투여한 후 고포도당에 의한 iNOS mRNA의 표현 증가에 미치는 영향을 평가하였다.

고포도당에 의하여 대조군의 약 2배로 증가되었던(Fig. 4) iNOS mRNA의 표현은 calphostin C 투여에 의하여 1.03 ± 0.05 배로 증가 현상이 억제되었다(Fig. 8). Aldose reductase 억제제는 농도별 예비 실험 결과, $500 \mu\text{M}$ 에서 육안적으로 매사지움 세포의 생존율이 50% 미만으로 감소하여 본 실험에서는 $10 \mu\text{M}$ 과 $100 \mu\text{M}$ 의 농도를 이용하였다. Aldose reductase 억제제 투여에 의하여 고포도당에 의한 iNOS mRNA의 표현 증가 현상이 $10 \mu\text{M}$ 과 $100 \mu\text{M}$ 에서 각각 대조군의 1.17 ± 0.14 , 0.77 ± 0.12 배로 억제되었다(Fig. 8).

고 찰

당뇨병성 신증은 국내외적으로 말기 신부전증을 유발하는 가장 중요한 원인 신장 질환으로서 고포도당혈증에 의하여 발생 및 진행이 촉진되어지는 것으로 알려져 있으나 이에 관여하는 많은 인자들의 정확한 발병 기전에 대해서는 많은 가설이 존재하고 있는 실정이다.

NO는 제2전령 물질의 하나로 혈관 평활근을 이완시키는 endothelium-derived relaxing factor로서 처음 보고되었으나³³⁾, 그 외에 국소 신경 전달 물질로서의 역할을 담당하며¹³⁾, 혈소판의 응집과 부착을 억제하고¹²⁾, 대식 세포의 항염증 작용이나 항암 작용 등에도

관여³⁴⁾하는 것으로 알려져 있다. 신장 내에서의 constitutive NO는 사구체 모세혈관의 압력을 감소시키고 신장 혈류 순환의 자동 조절 기능에 관여하며³⁵⁾ 세뇨관에서의 sodium 재흡수를 억제하는 기능^{15, 16)}을 하는 것으로 보고되어 있어 신 손상에 대한 보호 작용을 하는 것으로 생각된다. 그러나, 병적인 조건하에서 다양한 cytokine에 의하여 사구체 매사지움 세포 및 활성화된 대식 세포, 혈관 평활근 세포 등에 존재하는 iNOS 경로가 활성화됨으로써 국소적으로 다량의 NO가 생성되는 경우에는 오히려 신장의 손상을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다³⁶⁻³⁹⁾. Inducible NOS에 의하여 다량으로 생성된 NO가 세포 및 조직의 손상을 유발하는 기전으로 제시된 것은 첫째, superoxide와의 반응에 의하여 peroxynitrite를 생산하고 지질의 과산화를 유발함으로써 조직의 손상을 유발할 수 있으며^{40, 41)}, 둘째, 미토콘드리아의 세포 호흡이나 DNA 합성에 관여하는 주요 효소의 철 함유 부위(iron-containing moiety)에 결합함으로써 세포에 대한 독성을 유발하고^{42, 43)}, 셋째, proinflammatory cytokine인 TNF나 IL-1을 유도하여 염증 반응을 촉진시킬 수 있다는 것^{44, 45)} 등이다.

당뇨병을 유발한 백서에서 소변으로 배설되는 nitrite 및 nitrate의 양이 증가함과 동시에 사구체 여과율이 증가하고^{22, 23)}, 혈관 내피 세포를 고포도당에서 배양하였을 때 칼슘 의존적인 cNOS의 활성 증가와 함께 cGMP의 농도가 증가하는 등⁴⁶⁾의 실험 결과를 근거로 당뇨병성 신증의 초기에 관찰되는 사구체의 과여과에 있어서 NO의 합성 증가가 관여할 것임이 제시되었다. 그러나 진행된 당뇨병 환자에서 내피 세포에 의한 혈관의 확장 기능이 저하되어 있을 뿐 아니라⁴⁷⁻⁵⁰⁾, 당뇨병을 유발한 백서 사구체에서 세포 내 칼슘 증가에 대한 cGMP의 활성이나 외부에서 투여한 NO의 공여 물질에 대한 cGMP의 활성이 저하되어 있는 점²⁴⁻²⁶⁾, 항산화제의 투여에 의하여 이러한 혈관 확장 기능의 저하가 부분적으로, 혹은 완전하게 회복되는 점⁵¹⁻⁵⁴⁾ 등으로 미루어 진행된 당뇨병의 경우에는 NO의 안정성이 저하됨으로써 그 활성이 감소되어 있는 것으로 받아들여지고 있다²⁷⁾. 이와 같은 연구들은 당뇨병성 신증의 병인론에 있어서 사구체 모세혈관을 포함한 혈관 내피 세포들에 존재하는 cNOS의 경로와 그에 따른 NO의 변화를 연구한 것으로서 iNOS의 역할에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 않다.

사구체 질환에서의 iNOS의 역할에 대한 연구는 염증성 사구체 신염의 실험 모델로부터 시작되었으나, 당뇨병성 신증 환자 및 동물 모델에서도 TNF- α , IFN- γ 등을 포함한 cytokine의 활성화가 나타나고⁵⁵⁾ 당뇨병을 유발한 백서에서 초기에 대식 세포의 사구체 내 침윤이 관찰된다는 보고⁵⁶⁾들에 근거하여 당뇨병성 신증의 발병 및 진행에 있어서 iNOS의 역할에 대한 관심이 높아지고 있다. 본 연구에서는 메산지움 세포에 존재하는 iNOS 경로에 초점을 맞추어 당뇨병성 신증의 병인론적 역할을 규명하고자 하였다.

백서의 사구체 메산지움 세포를 고포도당에 노출시키고 iNOS에 의한 NO의 합성을 유도하기 위하여 LPS와 IFN- γ 로 세포를 자극한 결과, iNOS mRNA 및 단백질의 표현과 그에 따른 NO의 합성이 고포도당에 의하여 의의 있게 증가되었다. LPS와 IFN- γ 로 자극되지 않은 메산지움 세포에서는 iNOS mRNA가 전혀 표현되지 않았고 현재까지는 사구체 메산지움 세포에 cNOS 경로가 존재하는 것으로 보고된 바 없으며, cNOS에 대한 일차 항체를 이용하여 Western blot 분석을 시행한 결과 동일한 조건으로 자극한 메산지움 세포에서 자극 후 48시간까지 고포도당군 및 대조군 모두 cNOS 단백질이 전혀 표현되지 않았으므로 본 연구에서 측정된 NO는 iNOS에 의한 NO의 합성임을 확인할 수 있었다.

고포도당에 노출된 메산지움 세포에서 iNOS 경로를 경유한 NO의 합성이 증가되는 본 연구 결과는 Sharma 등이 생쥐의 메산지움 세포를 배양하여 실험한 결과와 일치되는 것이나²⁸⁾, 백서의 사구체 메산지움 세포를 이용한 Trachtman 등의 실험 결과와는 상이한 결과였다²⁹⁾. 이러한 상반된 결과의 원인은 분명하지 않으나 아마도 양 실험의 protocol에 따른 차이가 원인으로 추측된다. 즉, 본 연구에서는 고포도당에 전처리 한 후 24시간이 경과하였을 때 LPS와 IFN- γ 로 세포를 자극하였고, 혈청 배제 배지를 이용함으로써 혈청 내에 존재하는 활성 TGF- β 등의 각종 성장 인자 및 iNOS에 대한 상호 작용을 알지 못하는 다양한 인자에 의한 영향을 배제하고자 하였으나, Trachtman 등의 실험에서는 고포도당에 노출시킨과 동시에 세포를 자극하였고 10% 혈청이 포함된 배지를 지속적으로 사용하였다. 실제로 혈청 내에 존재하는 활성 TGF- β 는 iNOS mRNA의 안정성을 저하시키고 단백질로의 해독(translation)을 억제하며 iNOS 단백질의 분해를 촉진

하는 것으로 보고되어 있어⁵⁷⁾ 이와 같은 영향을 배제할 수 없을 것으로 생각되며, 이후에 보고된 동일 저자들의 실험 결과에서도 혈청 배제 배지를 이용한 유사 실험에서는 고포도당에 의한 NO의 합성 감소를 재확인하지 못한 것으로 보고⁵⁸⁾되어 있어 이러한 가능성을 의심할 수 있을 것으로 사료된다.

고포도당에 의한 diacylglycerol(DAG)의 합성 증가와 그에 따른 PKC 경로의 활성화가 NOS에 의한 NO의 합성에 관여하는 인자로서 제시된 바 있으며⁵⁹⁻⁶²⁾, 사구체 메산지움 세포에서도 이와 유사한 결과가 보고되어 있어 본 실험에서도 이를 검색하였다. 실험 결과, PKC 억제제인 calphostin C의 투여에 의하여 고포도당에 의한 iNOS mRNA의 표현 증가가 의의 있게 억제되었으며 이러한 결과는 Sharma 등이 또 다른 PKC 억제제인 staurosporine과 H-7을 이용하여 관찰한 결과와 일치하였다²⁸⁾. 이에 대한 기전으로 Inducible NOS의 promotor에 phorbol ester에 반응하는 AP-1 site가 존재함으로써 PKC의 활성화에 의하여 iNOS의 전사가 증가됨이 보고된 바 있다⁶⁰⁾.

고포도당에 의한 polyol 대사의 항진은 당뇨병성 신증을 비롯하여 당뇨병성 망막증 및 신경병증 등의 합병증 발생에 중요한 병태 생리로 인정되는 기전으로서^{63, 5)} aldose reductase에 의하여 포도당이 sorbitol로 대사되는 과정과 sorbitol dehydrogenase에 의하여 sorbitol이 fructose로 대사되는 두 가지 과정으로 구성된다. 세포 내의 포도당 농도가 정상인 상태에서는 hexokinase에 의하여 glucose-6-phosphate로 대사되는 경로가 포도당 대사의 대부분을 차지하며 polyol 경로에 의한 대사 과정은 매우 미미하나, 세포 내의 포도당 농도가 증가된 상태에서는 hexokinase의 포화로 인하여 전체 포도당 대사의 약 1/3까지도 polyol 경로를 경유하여 대사되는 것으로 알려져 있다⁶⁴⁾. Polyol 대사 과정의 속도 제한 효소로 알려진 aldose reductase는 환원형의 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)를 조효소로 필요로 하므로 이에 대한 경쟁으로 인하여 NOS의 작용을 억제할 것으로 제시된 바 있으나⁶⁵⁾, 본 연구에서는 고포도당에 의하여 iNOS 경로를 경유한 NO의 합성이 오히려 증가되었고 aldose reductase 억제제의 투여에 의하여 iNOS mRNA의 표현이 억제되었으므로 NOS와 aldose reductase 사이의 조효소 경쟁에 의한 기전으로는 polyol 대사의 관여 기전을 설명할 수 없을 것으로 사

료된다.

또한 polyol 대사의 항진은 세포질 내의 NAD^+ 에 대한 NADH의 비율(NADH/NAD^+)을 증가시키며, 이러한 변화는 DAG의 de novo 합성을 증가시킴으로써 PKC의 활성화를 유발할 수 있는 것으로 보고된 바 있다^{66, 67}. Ishii 등은 사람의 메산지움 세포를 배양하여 고포도당에 노출시키고 PKC의 활성화와 TGF- β 의 합성 증가에 있어서 aldose reductase의 역할을 검색한 결과, aldose reductase 억제제의 투여로 막분질의 PKC 활성화와 TGF- β 의 합성이 유의 있게 감소되었음을 보고하였고⁶⁸, Keogh 등도 당뇨병을 유발한 백서의 사구체에서 고포도당에 의한 DAG의 합성 증가 및 PKC의 활성화가 aldose reductase 억제제의 투여에 의하여 유의 있게 억제되었음을 보고하였다⁶⁹. 본 연구에서는 고포도당에 의한 iNOS mRNA의 표현 증가가 aldose reductase 억제제의 투여에 의하여 유의 있게 억제되는 결과를 얻어 고포도당에 노출된 메산지움 세포에서 iNOS 경로에 의한 NO의 합성 증가에 polyol 대사의 항진이 관여하는 것으로 생각되었으며, 이 과정에서 DAG-PKC 경로의 활성화가 중간 기전으로서 작용하는 지를 확인하기 위하여 aldose reductase 억제제를 투여한 후 DAG 농도를 측정하였다. 그 결과, aldose reductase 억제제의 투여로 인하여 iNOS mRNA의 변화가 관찰되었던 자극 후 4시간째에는 DAG의 농도가 감소되지 않았으며, PKC- α , β II 및 ζ 에 대한 Western blot 분석에서도 PKC 단백질 표현의 정도에는 유의 있는 변화가 없었다. 이러한 결과로 보아 고포도당에 의한 NO의 합성 증가에 polyol 대사의 항진이 관여하는 것으로 생각되나, 보다 정확한 규명을 위해서는 PKC의 활성도를 직접적으로 측정해야 할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과로 백서 사구체 메산지움 세포에서 고포도당에 의하여 iNOS 경로에 의한 NO의 합성이 유의 있게 증가됨을 확인하였으며, PKC 경로의 활성화와 polyol 대사의 항진이 이에 관여하는 것으로 사료된다.

= Abstract =

Effect of High Glucose on Nitric Oxide Production in Cultured Rat Mesangial Cells

Hyunjin Noh, M.D., Hunjoo Ha, Ph.D.*

Mi Ra Yu, B.S.*, Suk Kyun Shin, M.D.

Hyun Yong Song, M.D., Jae Ha Hwang, M.D.

Shin Wook Kang, M.D., Kyu Hun Choi, M.D. Dae

Suk Han, M.D. and Ho Yung Lee, M.D.

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

Diabetic nephropathy is one of the leading causes of end-stage renal disease and characterized pathologically by the glomerular mesangial expansion and increased extracellular matrix(ECM) formation. Glomerular hyperfiltration and increased vascular permeability observed in the early stage of diabetic nephropathy have been proposed to play a significant pathophysiologic role in the eventual development of glomerulosclerosis of diabetic nephropathy. Some studies have suggested that this glomerular hyperfiltration is mediated by increased nitric oxide(NO) production via the constitutive nitric oxide synthase(cNOS) pathway present in endothelial cells under the high glucose environment. However, the exact role of the inducible NOS(iNOS) pathway present in mesangial cells in the pathogenesis of diabetic nephropathy is not clearly established.

The present study was carried out to examine whether NO production via the iNOS pathway is modulated in cultured rat mesangial cells exposed to the high glucose environment and underlying mechanism of this modulation. For this purpose, the production of the stable metabolite of NO(nitrite), intracellular cyclic guanosine monophosphate(cGMP), iNOS mRNA expression and iNOS protein synthesis were examined under different glucose concentrations.

Rat mesangial cells cultured in high glucose concentration(30mM D-glucose) increased significantly nitrite/nitrate production and intracellular cGMP levels upon stimulation with lipopolysaccharide(LPS) plus interferon- γ (IFN- γ) compared with control glucose concentration(5.6mM D-glucose). Mesangial iNOS mRNA expression and protein synthesis also increased significantly in response to high glucose. This enhanced iNOS mRNA expression induced by high glucose concentration was significantly suppressed by protein kinase C(PKC) inhibitor, calphostin C, and the aldose

reductase inhibitor, 6-bromo-1, 3-dioxo-1H-benz[d,e]isoquinoline-2(3H)-acetic acid. These results indicate that high glucose in combination with stimulation by LPS plus IFN- γ enhances NO production from mesangial cells by the iNOS pathway, and that the activation of PKC and the polyol pathway may play a role in this enhancement.

Key Words : Diabetic nephropathy, High glucose, Nitric oxide, Inducible nitric oxide synthase, Mesangial cells

참 고 문 헌

- 1) 대한신장학회 등록위원회 : 한국의 신대체요법 현황
인산 기념 등록사업 1997. *대한신장학회지* 18:1-15, 1999
- 2) Diabetes Control and Complications Trial Research Group : The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-986, 1993
- 3) Winegrad AE : Does a common mechanism induce the diverse complications of diabetes? *Diabetes* 36:396-406, 1987
- 4) Tilton RG, Chang K, Pugliese G, Eades DM, Province MA, Sherman WR, Kilo C, Williamson JR : Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes* 38:1258-1270, 1989
- 5) Pugliese G, Tilton RG, Williamson JR : Glucose-induced metabolic imbalances in the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes Metab Rev* 7:35-59, 1991
- 6) Lee T-S, Saltsman KA, Ohashi H, King GL : Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration : Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5141-5145, 1989
- 7) Craven PA, Davidson CM, DeRubertis FR : Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* 39:667-674, 1990
- 8) Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED : High glucose-induced transforming growth factor- β production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 101:160-169, 1998
- 9) Baynes JW, Thorpe SR : Role of oxidative stress in diabetic complications : A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48:1-9, 1999
- 10) Vlassara H, Bucala R : Recent progress in advanced glycation and diabetic vascular disease : Role of advanced glycation end product receptors. *Diabetes* 45:Suppl 3:S65-S66, 1996
- 11) Kitazono T, Faraci FM, Heistad DD : L-arginine restores dilator response of the basilar artery to acetylcholine during chronic hypertension. *Hypertension* 27:893-896, 1996
- 12) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S : An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5193-5197, 1990
- 13) Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, van Maercke YM, Herman AG : Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345:346-347, 1990
- 14) Ito S, Ren YL : Evidence for the role of nitric oxide in macula densa control of glomerular hemodynamics. *J Clin Invest* 92:1093-1098, 1993
- 15) Radermacher J, Klanke B, Schurek HJ, Stotte HF, Frohlich JC : Importance of NO/EDRF for glomerular and tubular function : Studies in the perfused rat kidney. *Kidney Int* 41:1549-1559, 1992
- 16) Shultz PJ, Tolins JP : Adaptation to increased dietary salt intake in the rat : Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest* 91:642-650, 1993
- 17) Shultz PJ, Schorer AE, Raij L : Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 258:F162-167, 1990
- 18) Raij L, Shultz PJ : Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide : Effects on and production by mesangial cells and the glomerulus. *J Am Soc Nephrol* 3:1435-1441, 1993
- 19) Nathan C : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064, 1992
- 20) Markewitz BA, Michael JR, Kohan DE : Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *J Clin Invest* 91:2138-2143, 1993
- 21) Shultz PJ, Archer SL, Rosenberg ME : Inducible nitric oxide synthase mRNA and activity in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 46:683-689, 1994
- 22) Bank N, Aynedjian HS : Role of EDRF(nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 43:1306-1312, 1993
- 23) Tolins JP, Shultz PJ, Raij L, Brown DM, Mauer SM : Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats : Role of NO. *Am J Physiol* 265:F886-895, 1993

- 24) Wang YX, Brooks DP, Edwards RM : Attenuated glomerular cGMP production and renal vasodilation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol* 264:R952-956, 1993
- 25) Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR : Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats : Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J Clin Invest* 93:311-320, 1994
- 26) Craven PA, Studer RK, DeRubertis FR : Impaired nitric oxide release by glomeruli from diabetic rats. *Metabolism* 44:695-698, 1995
- 27) Craven PA, DeRubertis FR, Melhem M : Nitric oxide in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 52:46-53, 1997
- 28) Sharma K, Danoff TM, DePiero A, Ziyadeh FN : Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels : Possible mediation via protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 207:80-88, 1995
- 29) Trachtman H, Futterweit S, Crimmins DL : High glucose inhibits nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 8:1276-1282, 1997
- 30) Harper PA, Robinson JM, Hoover RL, Wright TC, Karnovsky MJ : Improved methods for culturing rat glomerular cells. *Kidney Int* 26:875-880, 1984
- 31) Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ : Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412, 1988
- 32) Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
- 33) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142, 1991
- 34) Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM : Nitric oxide : A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 157:87-94, 1988
- 35) Romero JC, Strick DM : Nitric oxide and renal function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2:114-121, 1993
- 36) Cattell V, Lianos E, Largen P, Cook T : Glomerular NO synthase activity in mesangial cell immune injury. *Exp Nephrol* 1:36-40, 1993
- 37) Cook HT, Ebrahim H, Jansen AS, Foster GR, Largen P, Cattell V : Expression of the gene for inducible nitric oxide synthase in experimental glomerulonephritis in the rat. *Clin Exp Immunol* 97:315-320, 1994
- 38) Narita I, Border WA, Ketteler M, Noble NA : Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 72:17-24, 1995
- 39) Hruby Z, Beck KF : Cytotoxic effect of autocrine and macrophage-derived nitric oxide on cultured rat mesangial cells. *Clin Exp Immunol* 107:76-82, 1997
- 40) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624, 1990
- 41) Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL : Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6770-6774, 1996
- 42) Stadler J, Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Ochoa JB, Simmons RL : Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 260:C910-916, 1991
- 43) Nussler AK, Billiar TR : Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54:171-178, 1993
- 44) Magrinat G, Mason SN, Shami PJ, Weinberg JB : Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation and gene expression. *Blood* 80:1880-1884, 1992
- 45) Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A : Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide generating compounds. *J Immunol* 150:1509-1516, 1993
- 46) Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, Kostner GM : High D-glucose-induced changes in endothelial Ca²⁺/EDRF signaling are due to generation of superoxide anions. *Diabetes* 45:1386-1395, 1996
- 47) Calver AC, Collier JG, Vallance PJT : Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin dependent diabetes. *J Clin Invest* 90:2548-2554, 1992
- 48) McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, Andrews

- JW, Hayes JR: Impaired endothelium dependent and independent vasodilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 35:771-776, 1992
- 49) Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA: Impaired endothelium dependent vasodilation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Circulation* 88:2510-2516, 1993
- 50) Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA: Impaired nitric oxide mediated vasodilation in non insulin dependent diabetes. *J Am Coll Cardiol* 27:567-574, 1996
- 51) Hattori Y, Kawasaki H, Kazuhiro A, Abe K, Kanno M: Superoxide dismutase recovers altered endothelium dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 261:H1086-1094, 1991
- 52) Langenstroer P, Pieper GM: Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 263:H257-265, 1992
- 53) Tesfamariam B, Cohen RA: Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 263:H321-326, 1992
- 54) Bohlen HG, Lash JM: Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF mediated vasodilation of normal rat arterioles. *Am J Physiol* 265:H219-225, 1993
- 55) Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H: mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 42:450-456, 1993
- 56) Young B, Johnson R, Alpers C, Eng E, Floege J, Couser W: Mesangial cell proliferation precedes development of glomerulosclerosis in experimental diabetic nephropathy(Abstract). *J Am Soc Nephrol* 3:770, 1992
- 57) Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C: Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 178:605-613, 1993
- 58) Trachtman H, Koss I, Bogart M, Abramowitz J, Futterweit S, Franki N, Singhal PC: High glucose enhances growth factor-stimulated nitric oxide production by cultured rat mesangial cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 100:213-225, 1998
- 59) Marsden PA, Ballermann BJ: Tumor necrosis factor alpha activates soluble cyclase in bovine glomerular mesangial cells via an L-arginine dependent mechanism. *J Exp Med* 172:1843-1852, 1990
- 60) Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228, 1992
- 61) Hortelano S, Genaro AM, Bosca L: Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Lett* 320:135-139, 1993
- 62) Bosca L, Lazo PA: Induction of nitric oxide release by MRC OX-44(anti-CD53) through a protein kinase C-dependent pathway in rat macrophages. *J Exp Med* 179:1119-1126, 1994
- 63) Kinoshita JH, Nishimura CL: The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metab Rev* 4:323-337, 1988
- 64) Gonzalez RG, Barnett P, Aguayo J, Cheng HM, Chylack LTJ: Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* 33:196-199, 1984
- 65) Okuda Y, Kawashima K, Suzuki S, Asakura Y, Asano M, Tsurumaru K, Dai H, Tachi Y, Bannai C, Saitoh M, Yamashita K: Restoration of nitric oxide production by aldose reductase inhibitor in human endothelial cells cultured in high-glucose medium. *Life Sci* 60:PL53-56, 1997
- 66) Sochor M, Baquer NZ, McLean P: Regulation of pathways of glucose metabolism in kidney: The effect of experimental diabetes on the activity of the pentose phosphate pathway and the glucuronate-xylulose pathway. *Arch Biochem Biophys* 198:632-646, 1979
- 67) Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG: Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-813, 1993
- 68) Ishii H, Tada H, Isogai S: An aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced increase in transforming growth factor- β and protein kinase C activity in cultured human mesangial cells. *Diabetologia* 41:362-364, 1998
- 69) Keogh RJ, Dunlop ME, Larkins RG: Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism* 46:41-47, 1997