

## 실험적 당뇨 흰쥐에서 사구체의 크기에 따른 유전자 발현의 차이

연세대학교 의과대학 Brain Korea 21<sup>1</sup>, 내과학교실<sup>2</sup>

곽승재<sup>1</sup> · 정동섭<sup>1</sup> · 김진주<sup>1</sup> · 이금희<sup>1</sup> · 한승혁<sup>2</sup> · 이태희<sup>2</sup>  
김동기<sup>2</sup> · 이정은<sup>2</sup> · 문성진<sup>2</sup> · 한대석<sup>2</sup> · 강신욱<sup>2</sup>

### Differential Gene Expression According to the Size of Glomeruli in Experimental Diabetic Nephropathy

Seung Jae Kwak<sup>1</sup>, Dong Sub Jung<sup>1</sup>, Jin Ju Kim<sup>1</sup>, Jin Ji Li, M.D.<sup>1</sup>, Seung Hyeok Han, M.D.<sup>2</sup>  
Tae Hee Lee, M.D.<sup>2</sup>, Dong Ki Kim, M.D.<sup>2</sup>, Sung Jin Moon, M.D.<sup>2</sup>  
Dae Suk Han, M.D.<sup>2</sup> and Shin-Wook Kang, M.D.<sup>2</sup>

Department of Internal Medicine<sup>1</sup> Yonsei University College of Medicine, Brain Korea 21  
Department of Internal Medicine<sup>2</sup>

**Purpose:** Although a few gene-profiling studies with whole renal tissue have been described in experimental diabetic nephropathy, there is only one microarray study using diabetic glomeruli. Furthermore, hypertrophic glomeruli have not been explored. The purpose of this study is to elucidate gene expression profiles of hypertrophic glomeruli in early diabetic nephropathy.

**Methods:** Forty-male Sprague-Dawley rats were injected with diluent (N=20) or streptozotocin intraperitoneally (DM, N=20) and were sacrificed at 6- and 12-week. Glomeruli were isolated by sieving technique. Glomeruli from 125 and 75 m sieves were classified into large (hypertrophic, DM-LG) and small glomeruli (DM-SG), respectively. After RNA extraction, hybridization was performed on the Rat cDNA 5K chip in triplicate, and slides were analyzed. The significant genes were selected using significant analysis of microarray.

**Results:** At 6-week, hierarchical clustering revealed that gene expression profiles of DM-LG were different from those of DM-SG, whereas DM-SG and C glomeruli showed similar gene expression pattern. In contrast, gene expression profiles at 12-week were similar between DM-LG and DM-SG, whereas C glomeruli showed different gene expression pattern from DM glomeruli. At 6-week, a total of 207 genes showed greater than 1.5-fold differential expression. 149 genes were upregulated, whereas 58 were downregulated in DM-LG. On the other hand, differential gene expression greater than 1.4-fold was observed in 37 genes at 12-week, upregulated in 26 and downregulated in 11.

**Conclusion:** These results suggest that the gene expression profiles of DM-LG are different from DM-SG, and the gene expression patterns change with the progression of diabetic nephropathy.

**Key Words :** Diabetic nephropathy, Kidney glomerulus, Hypertrophy, Microarray analysis, Gene expression

## 서 론

접수 : 2006년 10월 30일, 승인 : 2007년 2월 28일  
이 논문 2005년 정부 (교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2005-041-E00184)  
책임저자 : 강신욱 서울특별시 서대문구 신촌동 134  
연세대학교 의과대학 내과학교실  
Tel : 02)2228-1959, Fax : 02)393-6884  
E-mail : kswkidney@yumc.yonsei.ac.kr

당뇨병성 신병증은 전 세계적으로 말기 신부전증의 원인 질환 중 가장 많은 빈도를 차지하고 있으며, 당뇨병 유병율의 증가와 더불어 계속적으로 증가하고 있는 추세이다. 2004년

United States Renal Data System (USRDS)의 자료에 의하면 새로 진단된 말기 신부전증 환자의 44%가 당뇨병성 신병증에 의한 것으로 되어 있으며<sup>1)</sup>, 국내에서도 말기 신부전증의 원인으로 당뇨병성 신병증이 42.5%로 가장 많은 빈도를 차지하고 있다<sup>2)</sup>. 이러한 이유에서 당뇨병성 신병증의 병태생리를 규명하기 위한 수많은 연구가 계속되어 왔으나, 아직까지 그 분자생물학적 및 세포학적 기전은 명확하게 정립되어 있지 않은 실정이다<sup>3)</sup>.

당뇨병성 신병증은 병리학적으로는 사구체 및 세뇨관 세포들의 비후, 기저막 비후, 세포 외 기질의 축적 등이 특징적인 소견으로 알려져 있다<sup>4-6)</sup>. 이 중 사구체 비후는 사구체를 구성하는 메산지움 세포나 족세포의 비후와 세포 외 기질의 축적 등으로 인한 결과로, 기존의 연구에 의하면 이 과정에 protein kinase C (PKC)경로, mitogen-activated protein kinase (MAPK)경로, 레닌-안지오텐신계 (RAS), TGF- $\beta$  등이 관여하는 것으로 보고되고 있다<sup>7-10)</sup>. 그러나 현재까지 당뇨 사구체에서 일어나는 유전자들의 변화에 대한 연구는 극히 일부분의 흥미있는 유전자에 국한되어 있었다.

1995년 Schena 등<sup>11)</sup>이 유전자의 발현을 양적으로 측정하기 위하여 microarray법을 유전자 연구에 도입한 이후 각종 질환에서 이 방법을 이용한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 당뇨병성 신병증에서도 microarray법을 이용한 연구가 종종 있었으나, 대부분의 연구가 신장 전체를 microarray에 적용시켰기 때문에 당뇨 사구체에서만 변화할 것을 알기 어려웠다<sup>12)</sup>. 이렇게 당뇨 사구체만을 이용한 microarray 연구가 거의 없었던 이유는 충분한 RNA를 얻을 수 없었기 때문이다. 그러나, 최근 들어 전체 유전자의 상대적 비를 변화시키지 않으면서 소량의 RNA를 선형적으로 증폭시키는 기술<sup>13-19)</sup>이 개발되면서 극소량의 검체로도 microarray를 시행할 수 있게 되어 사구체만을 이용한 실험이 가능하게 되었다.

당뇨 사구체를 이용한 대부분의 연구를 보면 200-250  $\mu$ m, 125-150  $\mu$ m, 그리고 75  $\mu$ m 등의 다양한 크기의 체를 이용하여 분리한 사구체를 이용하였다. 그러나 당뇨 사구체의 경우 중간 체공의 체에 남아 있는 사구체가 많게 되는데, 이는 당뇨병성 신병증에서 여러 인자에 의하여 사구체가 비후되었기 때문으로 생각된다. 따라서 당뇨 사구체와 비당뇨 사구체 사이 뿐만 아니라 당뇨로 인하여 비후가 된 사구체와 비후가 아직 일어나지 않은 사구체 사이에도 유전자 발현에 차이가 있을 것으로 추정하게 되었다.

이에 본 연구자는 실험적 당뇨 흰쥐로부터 체를 이용하여 분리한 사구체를 비후로 인하여 크기가 커졌을 것으로 생각

되는 사구체와 크기가 작은 사구체로 나누어 각 군에서의 유전자 발현의 차이를 microarray법을 이용하여 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물

#### 1) 흰 쥐

모든 동물 실험은 승인된 계획서에 따라 시행되었다. 실험 동물로는 무게 250-280 g의 수컷 Sprague-Dawley 40마리를 당뇨군 20마리와 비당뇨 대조군 (control) 20마리로 나누어 사용하였다. 당뇨는 streptozotocin (STZ) 65 mg/kg을 흰쥐 복강 내에 주사하여 유발시켰으며, 대조군에는 동일한 부피의 위약을 투여하였다. STZ 투여 72시간 후 상품화된 enzymatic test strip (LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA)을 이용하는 glucometer로 혈당을 측정하여 당뇨 발생 유무를 확인하였다. 모든 흰쥐는 자동 온도 조절 시설에서 사육되었으며, 실험 기간 동안 물과 표준 실험 식이를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 당뇨 유발 6주와 12주 후에 각 군에서 10마리씩 희생시켰으며, 희생시키기 전에 체중, 혈당, 그리고 24시간 소변알부민 배설량을 측정하였다. 24시간 소변알부민 배설량은 ELISA (Nephrot II, Exocell Inc., Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 2) 신장 적출 및 사구체 분리

흰쥐를 pentothal (50 mg/kg)마취 하에 단두한 후 신장을 적출하여 체를 통과시키는 방법으로 사구체를 분리하였다. 적출된 신장을 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 후 가위로 피질만을 분리하여 Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Sigma, Inc., St. Louis, MO, USA)에 옮긴 다음, 체공이 200, 150, 125, 그리고 75  $\mu$ m인 stainless 체를 차례로 통과시켰다. 이후 125  $\mu$ m와 75  $\mu$ m 체공에 걸린 사구체를 역상 현미경 하에서 분리하여 실험에 이용하였다. 125  $\mu$ m 체공의 사구체를 큰 사구체 (large DM glomeruli, LG), 75  $\mu$ m 체공의 사구체는 작은 사구체 (small DM glomeruli, SG)로 분류하였다.

#### 3) 사구체 용적의 측정

사구체 용적은 체공을 통해 얻어진 사구체를 디지털 카메라를 이용하여 촬영하고, 이 중 50개의 사구체를 컴퓨터 이미지 분석 (Image-Pro Ver. 2.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD)을 통하여 표면적을 추적한 후, 다음과 같은 공

식을 이용하여 측정하였다<sup>24)</sup>.

$$V_G = 4/3 \pi (\text{Area} / \pi)^{3/2}$$

## 2. RNA 추출 및 증폭

### 1) 총 RNA 추출

총 RNA를 추출하기 위하여 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 사용하였다. RNA STAT-60 reagent 100  $\mu$ L로 사구체를 처리하고, 동결과 해동을 3회 반복하여 용해시켰다. 여기에 700  $\mu$ L의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 vortex한 후 상온에 5분간 두었다. 160  $\mu$ L의 chloroform을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 3분간 상온에 보관한 다음, 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400  $\mu$ L의 isopropanol을 첨가하고 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심 분리하였다. RNA 침전물을 70% ice-cold ethanol로 세척한 후 Speed Vac을 이용하여 건조시키고, diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수로 침전물을 적절한 농도로 희석시킨 다음 spectrophotometer상 260 nm와 280 nm에서 측정된 optical density (O.D.)값을 이용하여 RNA 농도 및 순도를 측정하였다.

### 2) RNA 증폭

#### (1) First strand cDNA 합성

총 RNA 중 2  $\mu$ g RNA에 2  $\mu$ g T7 oligo-dT primer (5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATA GGGAGGCGG-3', Genotech, Daejun, Korea)를 첨가하고 65°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 5분간 냉각시켰다. 여기에 4  $\mu$ L 5X first strand buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2  $\mu$ L의 0.1 M DTT, 2  $\mu$ L의 10 mM dNTP mix (Invitrogen), 1  $\mu$ L RNasin (Promega, Madison, WI, USA), 2  $\mu$ L SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)를 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켰다.

#### (2) Second strand cDNA 합성

30  $\mu$ L 5X second strand buffer, 3  $\mu$ L 10 mM dNTP mix, 4  $\mu$ L DNA polymerase I, 1  $\mu$ L DNA ligase, 1  $\mu$ L RNase H를 first strand cDNA 합성물에 첨가한 후 16°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후에 4  $\mu$ L의 T4 DNA polymerase를 첨가하고 16°C에서 5분간 반응시킨 후 10  $\mu$ L의 0.5 M EDTA와 1 M NaOH를 첨가하고 65°C에서 10분간 반응시킨 다음 25  $\mu$ L의 1 M Tris-HCl (pH 7.5)를 첨

가하여 중화시켰다. 이상의 과정을 통하여 만들어진 double strand cDNA는 Phase Lock Gel (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 이용하여 정제하였다.

#### (3) *In vitro* transcription

T7 MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX, USA) 회사에서 제시한 방법에 따라 2  $\mu$ L의 10X reaction buffer, 2  $\mu$ L enzyme mix와 각각 2  $\mu$ L의 75 mM ATP, CTP, GTP, UTP를 8  $\mu$ L의 double strand cDNA와 혼합한 후 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 이상의 과정을 통하여 증폭된 mRNA는 RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 정제하였다.

## 3. cDNA microarray

Microarray 실험은 본 연세대학교 의과대학 암전이 연구센터 (Cancer Metastasis Research Center, Seoul, Korea)에서 확립한 방법을 이용하였다<sup>20)</sup>. cDNA microarray는 5,088개의 유전자가 점적된 rat cDNA 5K chip (CMRC-GT Rat-5K chip, CMRC)에 reference rat RNA (rat normal kidney)와 함께 hybridization시키는 indirect design 방법을 이용하여 시행하였다.

### 1) Probe 형광 표지와 hybridization

증폭된 mRNA 2  $\mu$ g에 6  $\mu$ L random primer (Invitrogen)를 첨가하고 65°C에서 10분간 반응시켰다. RNA와 random primer의 혼합 용액에 8  $\mu$ L의 5X first strand buffer, 4  $\mu$ L 100 mM DTT, 2  $\mu$ L SuperScript II reverse transcriptase, 2  $\mu$ L 20X low-dT/dNTP mix, 1  $\mu$ L RNasin, 그리고 각각 4  $\mu$ L의 cyanine 3-dUTP (Cy3-dUTP; DuPont NEN Life Science, Boston, MA, USA)와 cyanine 5-dUTP (Cy5-dUTP)을 첨가하고 42°C에서 1시간 동안 반응시켜서, Reference tube에는 Cy-3 dUTP, test tube에는 Cy-5 dUTP를 first cDNA를 합성하는 동안에 표지하였다. 반응물에 15  $\mu$ L의 0.1 M NaOH를 첨가하고 65°C에서 30분간 반응시킨 후, 5  $\mu$ L의 HCl을 첨가하여 중화시켰다. 형광물질 표지 과정과 동시에 cDNA microarray에 25 mm syringe-filter로 여과시킨 3.5X sodium chloride/sodium citrate buffer (SSC), 0.1% sodium dodesyl sulfate (SDS), 10 mg/mL bovine serum albumin (BSA; AMRESCO, Cleveland, OH, USA)과 물로 구성된 blocking 용액을 42°C에서 1시간 동안 반응시켜 pre-hybridization 시켰다. Pre-hybridized 슬라이드는 물과 isopro-

panol로 각각 2분간 세척한 후, 500 rpm에서 5분 동안 원심 분리하여 건조시켰다. Cy3와 Cy5로 표지된 probe들을 QIAquick PCR purification kit (Qiagen)를 사용하여 정제, 혼합한 후 20  $\mu$ g human COT-1 DNA (Invitrogen), 20  $\mu$ g yeast tRNA (Invitrogen), 그리고 20  $\mu$ g의 poly (A) RNA (Sigma)를 첨가한 다음, Microcon YM-30 column (Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용하여 30  $\mu$ L로 농축시켰으며, 여기에 20X SSC, formamide와 10% SDS를 첨가하여 최종 부피가 60  $\mu$ L가 되도록 하였다. Hybridization 용액은 100°C에서 2분 동안 denature시켰으며, 13,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 후 슬라이드 위에 첨가하고 42°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2X SSC-0.1% SDS, 1X SSC-0.1% SDS, 0.2X SSC와 0.05X SSC를 이용하여 각각 2분간 슬라이드를 세척하였으며, 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 건조시켰다.

### 2) 이미지 스캐닝과 microarray 결과 보정

Hybridization이 끝난 microarray는 GenePix 4000B scanner (Axon Instruments, Foster City, CA, USA)를 이용하여 microarray의 이미지를 스캐닝한 후, GenePix Pro 4.0 software (Axon)를 이용하여 형광 발현 정도를 측정하여 수치화하였다. 얻어진  $\log_2$ -변환 데이터는 실험적 오류를 최소화하기 위하여 Lowess function을 기반으로 하는 intensity dependent, within-print tip group normalization<sup>21)</sup>을 이용하여 표준화하였다. S-Plus 2000 software (Insightful, Seattle, WA, USA)를 이용하여 M-A plot을 측정하여 표준화 수행 전후의 변화 정도를 관찰하였으며, triplicate로 수행한 microarray의 연관성을 측정하기 위하여 log ratio 값 사이의 Pearson 상관 계수를 산출하였다. 표준화 수행 후, 모든 실험에서 100%로 분포하는 유전자를 선별하였으며, 중복 유전자는 t-apply를 이용하여 평균값을 취하여 분석을 수행하였다.

### 3) Microarray 결과 분석

Microarray를 시행하여 얻은 전체 자료들은 TreeView (Eisen software, Stanford University, CA, USA)<sup>22)</sup>를 이용한 hierarchical clustering을 시행하여 전체 실험군의 경향을 파악하였다. 두 군간의 유의한 유전자는 t-test 알고리즘을 바탕으로 분산의 영향을 최소화하면서 두 군 이상을 비교할 수 있는 알고리즘이 추가된 Significance Analysis of Microarray (SAM)<sup>23)</sup>를 사용하여 선정하였다. 유전자가 잘못 선별될 비율인 false discovery rate (FDR)를 조절하여 유전자를 선별하였으며, 두 군간에 유의한 차이가 있는 유

전자들은 National Institute of Health (NIH)또는 Stanford 대학에서 제공하는 웹사이트인 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<http://apps1.niaid.nih.gov/david>)와 SOURCE ([http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/source Search](http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/source%20Search)) database를 이용하여 검색하였다.

## 4. 통계 분석

모든 결과는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램 SPSS 윈도우용 11.0판 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다. 각 군의 결과들은 Mann-Whitney U 검정이나 Kruskal-Wallis 다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 비교하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적으로 차이가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. p값이 0.05 미만인 경우 의미있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 동물 자료

대조군과 당뇨병 흰쥐 모두에서 실험 6주 및 12주 후 체중이 증가되었으나, 대조군에서의 체중 증가가 통계적으로 유의하게 많았다 (6주: 396.6±4.5 g vs. 266.7±9.4 g, 12주: 557.8±25.8 g vs. 292.1±9.6 g, p<0.01). 이에 반하여, 체중 당 신장 무게의 비는 대조군에 비하여 당뇨병에서 의미있게 높았다 (6주: 0.36±0.01% vs. 0.65±0.02%, 12주: 0.31±0.01% vs. 0.61±0.02%, p<0.01). 평균 혈당은 6주 후 대조군 158.2±5.9 mg/dL, 당뇨병군 465.1±14.1 mg/dL, 12주 후 대조군 160.4±5.7 mg/dL, 당뇨병군 495.0±2.9 mg/dL로 대조군에 비하여 당뇨병에서 의미있게 높았다 (p<0.01). 또한 24시간 소변 알부민 배설량도 대조군에 비하여 당뇨병에서 유의하게 높았다 (6주: 0.32±0.02 mg/day vs. 1.28±0.11 mg/day, 12주: 0.40±0.06 mg/day vs. 1.99±0.13 mg/day, p<0.05) (Table 1).

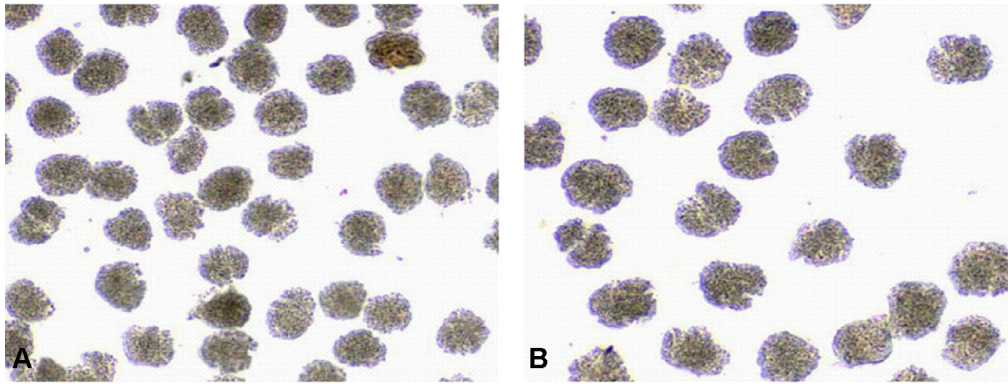
### 2. 분리된 사구체의 용적 차이

체공을 이용하여 분리된 사구체 사진은 Fig. 1A에 제시하였다. 당뇨병에서 얻어진 사구체의 용적을 위에서 기술한 방

**Table 1. Animal Data after 6 Weeks and 12 Weeks**

	6 weeks		12 weeks	
	Control (n=10)	DM (n=10)	Control (n=10)	DM (n=10)
Body weight (g)	396.6±4.5	266.7±9.4*	557.8±25.8	292.1±9.6*
Kidney/body weight (×10 <sup>-2</sup> )	0.36±0.01	0.65±0.02*	0.31±0.01	0.61±0.02*
Glucose (mg/dL)	158.2±5.9	465.1±14.1*	160.4±5.7	495.0±2.9*
Urinary albumin excretion (mg/day)	0.32±0.02	1.28±0.11 <sup>†</sup>	0.40±0.06	1.99±0.13 <sup>†</sup>

Data are expressed as mean±SEM. \*p<0.01 vs. Control; <sup>†</sup>p<0.05 vs. Control



**Fig. 1A.** Isolated glomeruli on the 75 µm sieve (A) and on the 125 µm sieve (B) from a diabetic rat.

법으로<sup>24)</sup> 측정된 결과 125 µm 체공에서 분리된 사구체의 용적이 75 µm 체공에서 분리된 사구체의 용적에 비해 유의있게 증가되어 있었다. (Fig. 1B)

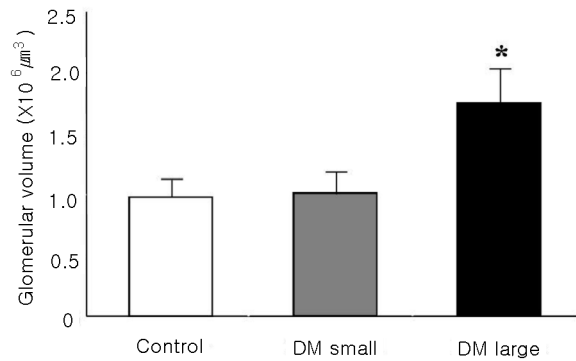
### 3. RNA 증폭

총 4 µg의 RNA로부터 선형적 증폭 방법을 통하여 37 µg의 mRNA를 얻었으며, 증폭된 mRNA의 quality와 integrity는 1.2% agarose gel 전기영동과 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 확인하였다. 실험 6주 (Fig. 2A)와 12주 (Fig. 2B)후의 사구체 mRNA로부터 증폭된 mRNA는 0.2에서 4.0 kb 사이에 분포되어 있었으며, 증폭 전의 mRNA 분포 양상과 유사하였다.

### 4. Microarray 결과

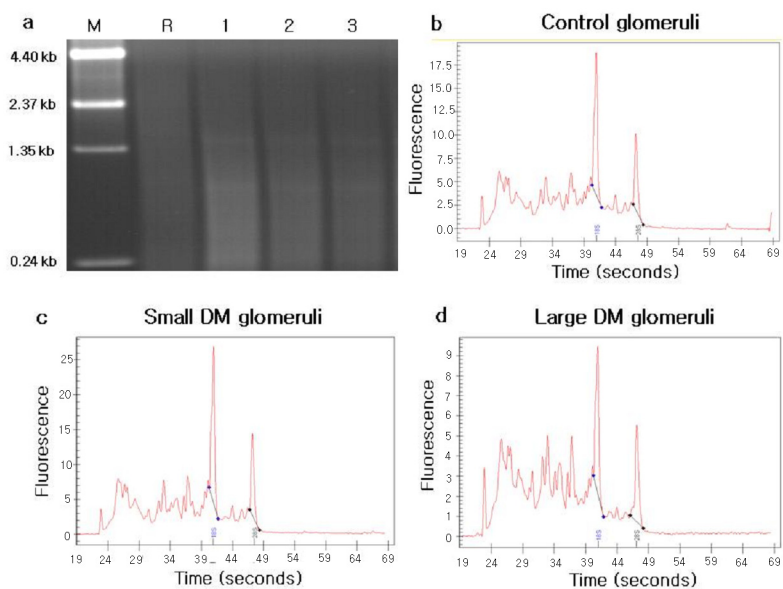
#### 1) Microarray 결과

모든 microarray는 동일한 조건 하에서 triplicate로 수행하였으며, 실험 6주 후 image와 실험 12주 후 image는 각각 Fig. 3A와 3B에 나타내었다. 수치화된 결과는 실험간의

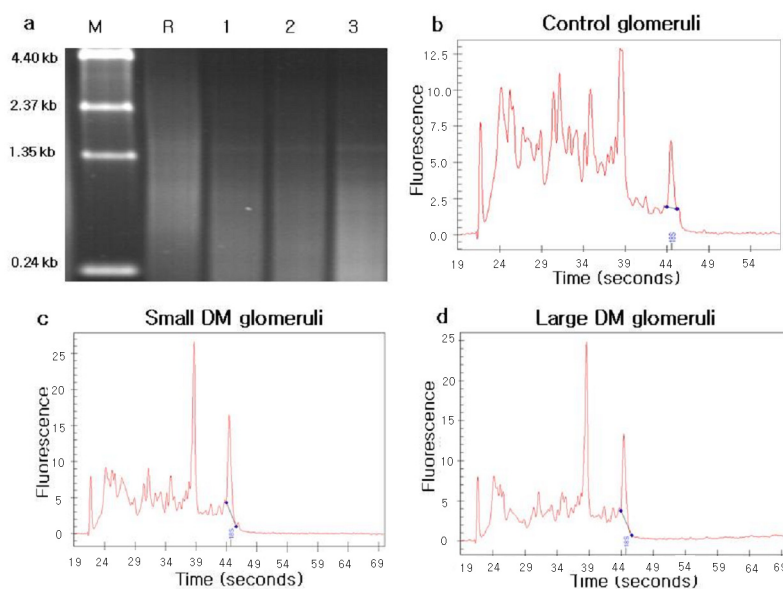


**Fig. 1B.** Difference in glomerular volume according to glomerular size. The mean volumes of glomeruli which were isolated on the 125 µm sieve (DM large, 1.51 ± 0.06 × 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>) were significantly higher than those isolated on the 75 µm sieve (DM small, 0.94 ± 0.03 × 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>) and control (0.87 ± 0.03 × 10<sup>6</sup> m<sup>3</sup>) \*p<0.01 vs. DM small and control.

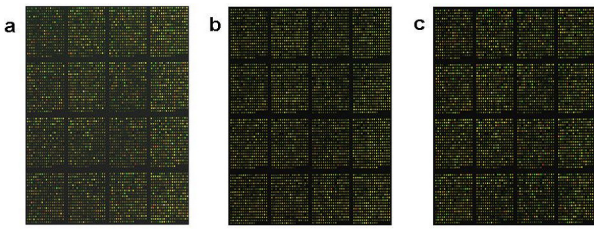
변이를 최소화하기 위하여 표준화하였으며, M-A plot을 이용하여 관찰하였다. M-A plot상 검정색은 표준화 수행 전 각 spot이 갖는 log ratio와 intensity를 나타내며, 주황색은 표준화 수행 후에 보정된 값을 의미한다. Fig. 4에서 알 수 있듯이 모든 실험군에서 두 색간 변이가 크지 않았다. NMP 100%를 기준으로 실험 6주와 12주 사구체로부터 각각 4,538



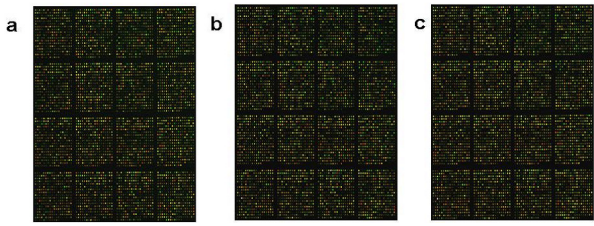
**Fig. 2A.** Representative results showing the quality and size of amplified RNA of 6-week glomeruli. **(a)** 1.2% agarose gel image representing the distribution of amplified mRNA in the range of 0.2 to 4.0 kb, which was similar to that of the original mRNA profiles (M: size marker, R: reference rat RNA, 1: control glomeruli, 2: Small DM glomeruli, 3: Large DM glomeruli). **(b-d)** Electro-pherograms of control glomeruli, small DM glomeruli and large DM glomeruli showing dual peak.



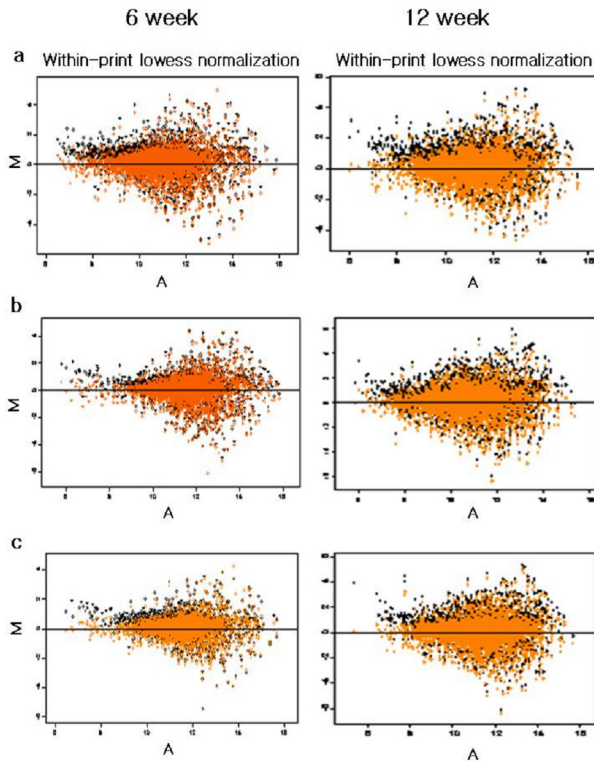
**Fig. 2B.** Representative results showing the quality and size of amplified RNA of 12-week glomeruli. **(a)** 1.2% agarose gel image representing the distribution of amplified mRNA in the range of 0.2 to 4.0 kb, which was similar to that of the original mRNA profiles (M: size marker, R: reference rat RNA, 1: control glomeruli, 2: Small DM glomeruli, 3: Large DM glomeruli). **(b-d)** Electropherograms of control glomeruli, small DM glomeruli and large DM glomeruli showing dual peak.



**Fig. 3A.** Representative scanned images of cDNA microarray with 6-week glomeruli. (a) Control glomeruli, (b) Small DM glomeruli, (c) Large DM glomeruli.



**Fig. 3B.** Representative scanned images of cDNA microarray with 12-week glomeruli. (a) Control glomeruli, (b) Small DM glomeruli, (c) Large DM glomeruli.

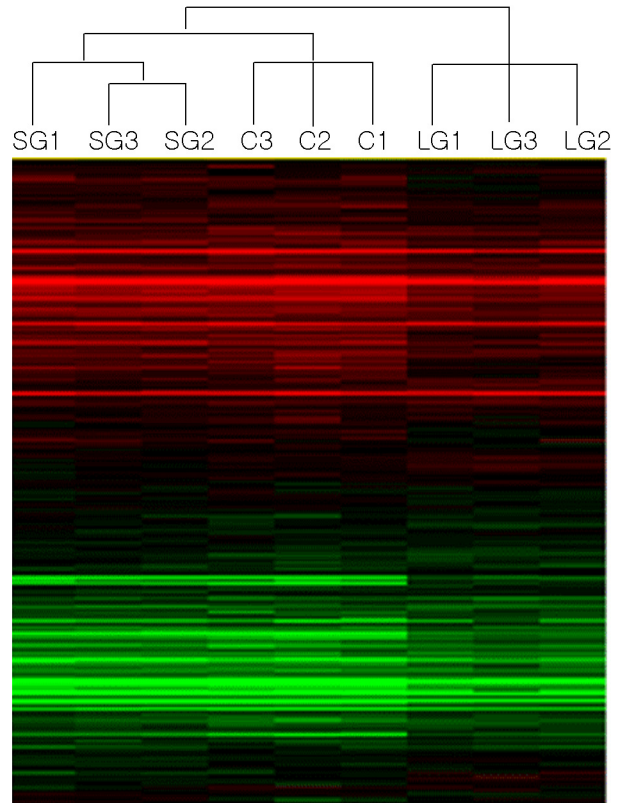


**Fig. 4.** M-A plot after normalization. Black dots represent the spots before standardization and orange spots after standardization. Data were consistent with little variation. (a) Control glomeruli, (b) Small DM glomeruli, (c) Large DM glomeruli

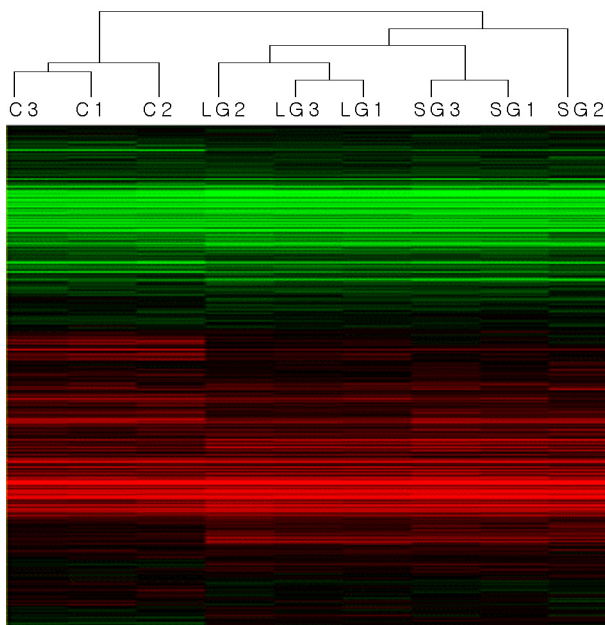
개와 4,532개의 유전자를 취하여 분석을 시행하였다. Pearson 상관 계수의 평균값이 실험 6주 후의 경우, 대조군 0.98, 작은 당뇨 사구체군 0.99, 큰 당뇨 사구체군 0.97이었으며, 실험 12주의 경우에는 대조군 0.97, 작은 당뇨 사구체군 0.97, 그리고 큰 당뇨 사구체군 0.98로 microarray 실험간의 재현성이 매우 높았다.

**2) Unsupervised hierarchical clustering을 이용한 전체 유전자의 발현 양상**

Microarray 실험을 수행한 전체 유전자의 발현 양상을 hierarchical clustering을 이용하여 분석하였다. 선택된 전체 유전자의 hierarchical clustering을 통하여 세 군이 그룹화되는 것이 관찰되었다. 실험 6주 후에는 작은 당뇨 사구체와 대조군 사구체의 유전자 발현 양상이 유사하였던 반면에 (Fig. 5A), 12주 후에는 큰 당뇨 사구체와 작은 당뇨 사구체의 발현 양상이 비교적 유사하였다 (Fig. 5B).



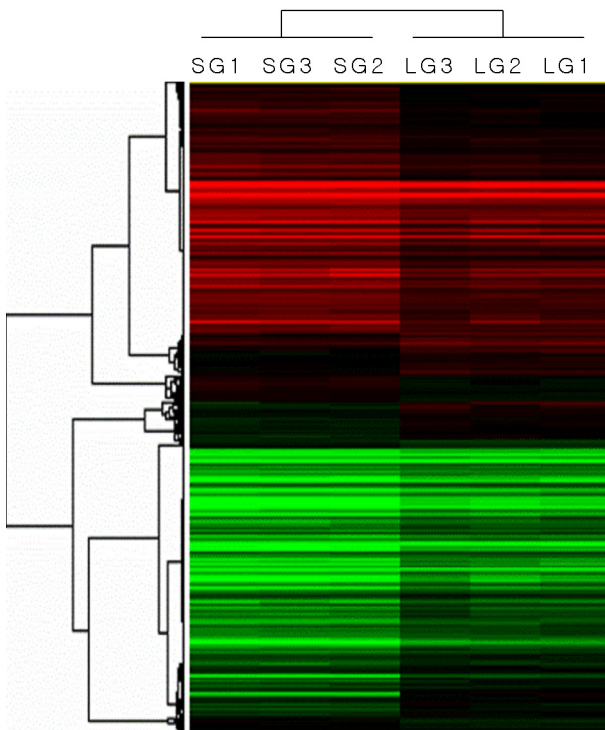
**Fig. 5A.** Unsupervised hierarchical clustering of whole sample with filtered 4,538 genes in 6-week glomeruli. Small DM glomeruli represented hierarchical clustering similar to control glomeruli. C1-3: Control glomeruli, SG1-3: Small DM glomeruli, LG1-3: Large DM glomeruli.



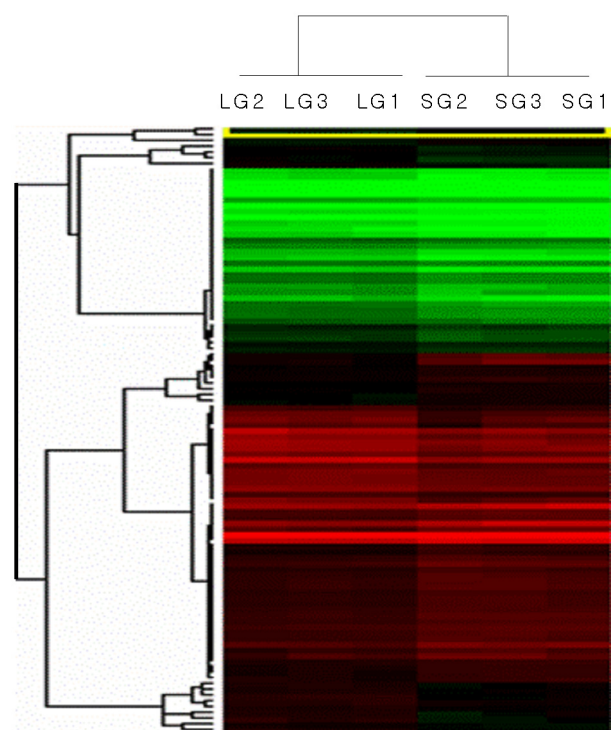
**Fig. 5B.** Unsupervised hierarchical clustering of whole sample with filtered 4,532 genes in 12-week glomeruli. In contrast to 6-week glomeruli, small DM glomeruli and large DM glomeruli showed similar hierarchical clustering. C1-3: Control glomeruli, SG1-3: Small DM glomeruli, LG1-3: Large DM glomeruli.

### 3) 당뇨 흰쥐에서 사구체 크기에 따른 유전자 발현의 차이

당뇨 사구체를 크기에 따라 큰 사구체군과 작은 사구체군으로 나누어 분석을 시행하였으며, 두 군간에 발현 차이를 보이는 유전자를 알아보기 위하여 two-class SAM을 통하여 6주 당뇨 흰쥐에서 분리한 사구체는 FDR을 기준으로 1,080개 (FDR 0.93%), 961개 (FDR 0.12%), 그리고 689개 (FDR 0.06%)의 유전자를 선별하였다. 선정한 유전자군으로 유전자 발현 양상을 hierarchical clustering을 이용하여 분석하였다 (Fig. 6A). 689개의 의미있는 유전자 중 두 군의 유전자가 갖는 log ratio로 두 군간에 발현이 1.5배 이상 차이를 보이는 유전자를 선별하였으며, 유전자를 기능에 따라 크게 physiological process, catalytic activity, cell metabolism, DNA binding, cellular process, transporter activity, extracellular matrix, signal transducer activity, structural molecule activity, transcription regulator activity, regulation of biological process 그리고 development군으로 분류하였다 (Fig. 7). 12주 당뇨 흰쥐 사구체에서는 FDR을 기준으로 105개 (FDR 0.70%), 그리고 79개 (FDR 0.93%)의 유전자를 선별하였으며, 유전자 발현 양상을 hierarchical clustering을 이용하여 분석하였다 (Fig. 6B). 동



**Fig. 6A.** Hierarchical clustering of 689 genes specific to 6-week DM glomeruli. Small DM glomeruli, LG1-3: Large DM glomeruli.



**Fig. 6B.** Hierarchical clustering of 105 genes specific to 12-week DM glomeruli. SG1-3: Small DM glomeruli, LG1-3: Large DM glomeruli.

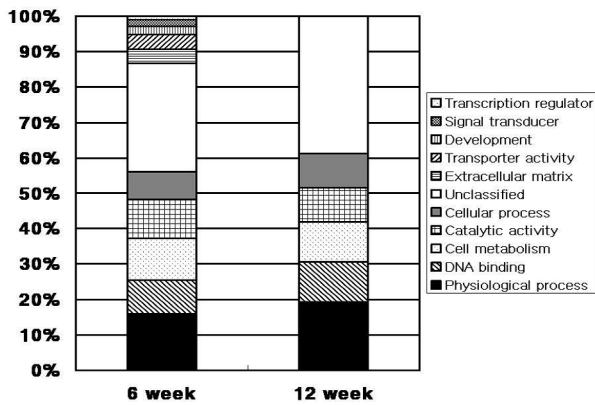


Fig. 7. Functional annotation of DM glomeruli.

일한 방법으로 유전자를 기능에 따라 크게 physiological process, binding, cell, cellular process, 그리고 catalytic activity군으로 분류하였다 (Fig. 7). 선별된 유전자는 log ratio 값을 비교하여 큰 사구체 군에서 발현이 증가하는 순서대로 Table 2와 Table 3에 나타내었다.

고 찰

당뇨병성 신병증은 말기 신부전증의 가장 흔한 원인 질환으로, 임상적으로는 단백뇨, 그리고 병리학적으로는 사구체 및 세뇨관 비후와 세포 외 기질의 축적이 특징적이다. 이러한

Table 2. Specific Genes of Large Glomeruli of the 6-week DM

ID	Name of gene	Ratio
AA819059	Similar to hypothetical protein MGC28394	5.2
AA900319	ESTs	3.8
AA926342	Deoxyribonuclease I	3.5
AA925690	ATPase Na+/K+ transporting beta 1 polypeptide	3.5
AA924591	Cytochrome P450 4A3	3.3
AA818967	ESTs	3.2
AA925291	Nerve growth factor, gamma	3.1
AA819756	Arachidonic acid epoxygenase	3.1
AA924590	FXYD domain-containing ion transport regulator 2	3
AA900546	Heat-responsive protein 12	2.9
AA818440	Beta-alanine-pyruvate aminotransferase	2.9
AI059479	Uromodulin	2.8
AA955087	ESTs	2.7
AA858732	Lysozyme	2.7
AA818896	Cytochrome P450, subfamily 2E, polypeptide 1	2.7
AA964431	Secreted phosphoprotein 1	2.6
AA819821	Lactate dehydrogenase B	2.6
AA818595	ESTs	2.6
AA818439	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein (39 kDa)	2.6
AA926296	ESTs	2.5
AA901316	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha	2.5
AA955106	Aldehyde dehydrogenase family 1, member A1	2.4
AA818332	Kidney-specific protein (KS)	2.4
AA998239	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	2.3
AA958018	CD24 antigen	2.3
AA859729	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	2.3
AA955232	Similar to EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 precursor (Fibulin-3) (FIBL-3) (T16 protein)	2.2
AA900983	ESTs	2.2
AI059491	Ureidopropionase, beta	2.1
AA925897	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 32	2.1
AA925452	Sorbitol dehydrogenase	2.1
AA924991	ESTs	2.1
AA859371	ESTs	2.1
AA819682	ESTs	2.1
AI058495	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha1 subunit	2
AA964628	Glucose-6-phosphatase, catalytic	2

Table 2. Continued

ID	Name of gene	Ratio
AA964628	Glucose-6-phosphatase, catalytic	2
AA900837	Similar to mKIAA0287 protein	2
AA818402	Similar to melusin	2
AA818106	Similar to hypothetical protein	2
AII11917	Solute carrier family 16, member 7	1.9
AI072060	ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1	1.9
AA956998	C1-tetrahydrofolate synthase	1.9
AA925091	Fatty acid binding protein 4	1.9
AA924305	ESTs	1.9
AA900030	Laminin, alpha 5	1.9
AA899079	ESTs	1.9
AA875544	Nuclear pore glycoprotein 62	1.9
AA866442	Cytochrome c, somatic	1.9
AA860061	Retinol binding protein 1	1.9
AA860001	Flavin containing monooxygenase 1	1.9
AA859674	Ankyrin 3 (G)	1.9
AA859339	Scaffolding protein SLIPR	1.9
AA819477	Serum amyloid P-component	1.9
AA819207	Procollagen, type I, alpha 2	1.9
AA818963	ESTs	1.9
AA817866	Glutamine synthetase 1	1.9
AI045017	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2	1.8
AA925220	Acetyl-coenzyme A dehydrogenase, medium chain	1.8
AA925145	ESTs	1.8
AA924368	Interleukin 6 signal transducer	1.8
AA924275	Nyggf2 protein	1.8
AA901229	Amiloride binding protein 1	1.8
AA875194	ESTs	1.8
AA819336	Cathepsin H	1.8
AA819241	ESTs	1.8
AA818827	Glutathione peroxidase 3	1.8
AI070884	Kidney androgen regulated protein	1.7
AI060068	Fatty acid binding protein 3	1.7
AI059076	ESTs	1.7
AA956058	Solute carrier family 16, member 1	1.7
AA926010	Fatty acid coenzyme A ligase, long chain 2	1.7
AA925794	Diazepam binding inhibitor	1.7
AA925675	Collagen, type III, alpha 1	1.7
AA924858	ESTs	1.7
AA923977	ESTs	1.7
AA901287	ESTs	1.7
AA901258	Similar to mKIAA1225 protein	1.7
AA900866	Laminin, gamma 1	1.7
AA900207	Similar to coatomer protein complex subunit alpha	1.7
AA899952	ESTs	1.7
AA858948	Kynurenine 3-hydroxylase	1.7
AA858850	Calnexin	1.7
AA819358	Cytochrome c oxidase, subunit VIIIa	1.7
AA818808	Similar to GTRGEO22	1.7
AA818574	Similar to oxysterol-binding protein - rabbit	1.7
AA818406	Similar to U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm6 (Sm protein F)	1.7

Table 2. Continued

ID	Name of gene	Ratio
AA818196	ESTs	1.7
AA818168	ESTs	1.7
AA817765	ESTs	1.7
AI136137	Propionyl coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	1.6
AI112775	ESTs	1.6
AI070587	Carboxylesterase 2 (intestine, liver)	1.6
AA955299	Similar to serine/threonine-protein kinase pctaire-2	1.6
AA926170	Acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1	1.6
AA926041	Similar to type IV putative aminophospholipid transporting ATPase	1.6
AA925370	F-spondin	1.6
AA925107	ESTs	1.6
AA924969	ESTs	1.6
AA924933	Munc13-4 protein	1.6
AA924710	ESTs	1.6
AA924053	ESTs	1.6
AA924018	ESTs	1.6
AA900410	ESTs	1.6
AA899814	ESTs	1.6
AA899494	Caldesmon 1	1.6
AA899254	ESTs	1.6
AA875661	Similar to Bcl7b protein	1.6
AA875408	Similar to actin-related protein 2	1.6
AA875020	Solute carrier family 2,member 1	1.6
AA866401	ESTs	1.6
AA819769	ESTs	1.6
AA819232	Similar to BTB and kelch domain containing protein 1	1.6
AA818855	Solute carrier family 15, member 2	1.6
AI145620	Tropomodulin 1	1.5
AI137102	Transcription factor 12	1.5
AI112130	Phosphoglycerate mutase 2	1.5
AI072338	Succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit	1.5
AI059316	Enoyl coenzyme A hydratase, short chain 1	1.5
AA998164	Cyclin B1	1.5
AA996401	High mobility group box 2	1.5
AA965187	Lactalbumin, alpha	1.5
AA964981	Cytochrome P450, subfamily IVF, polypeptide 14 (leukotriene B4 omega hydroxylase)	1.5
AA956929	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	1.5
AA956787	Cytochrome P450, IVA1	1.5
AA933159	ESTs	1.5
AA925724	Transcription factor 2	1.5
AA925705	S6 protein kinase (Rsk-1)	1.5
AA925530	ESTs	1.5
AA925330	GDNF-family receptor alpha 3	1.5
AA924697	Acyl-CoA oxidase	1.5
AA924538	ESTs	1.5
AA924535	Similar to 8430411H09Rik protein	1.5
AA901247	ESTs	1.5
AA901144	ESTs	1.5
AA900970	Homeo box A4	1.5
AA900891	ESTs	1.5
AA900275	ESTs	1.5

Table 2. Continued

ID	Name of gene	Ratio
AA899472	Similar to RIKEN cDNA 3230401O13	1.5
AA875267	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	1.5
AA874908	Similar to lobe homolog-like	1.5
AA859846	Actin, beta	1.5
AA859335	Troponin I, slow isoform	1.5
AA858920	ESTs	1.5
AA819774	Similar to hypothetical protein FLJ11305	1.5
AA818680	Ornithine aminotransferase	1.5
AA818572	ESTs	1.5
AA818422	Microsomal glutathione S-transferase 1	1.5
AA818386	ESTs	1.5
AA818043	ESTs	1.5
AI144896	RT1 class Ib gene, locus M3	-1.5
AI136981	ESTs	-1.5
AI071874	Pleiotrophin	-1.5
AI044968	Mast cell protease 9	-1.5
AA962997	Hypothetical protein LOC29390	-1.5
AA957282	ESTs	-1.5
AA957068	Carboxypeptidase E	-1.5
AA955301	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	-1.5
AA925419	ESTs	-1.5
AA925332	Apoptosis antagonizing transcription factor	-1.5
AA924864	Similar to X83328 protein	-1.5
AA924381	ESTs	-1.5
AA924108	Similar to hypothetical protein FLJ20189	-1.5
AA900958	ESTs	-1.5
AA900322	ESTs	-1.5
AA899990	Similar to NADH:ubiquinone oxidoreductase B15 subunit	-1.5
AA875617	Similar to RIKEN cDNA 4931408L03	-1.5
AA875203	ESTs	-1.5
AA875159	Protein tyrosine kinase 2	-1.5
AA858779	TGF- $\beta$ inducible early growth response	-1.5
AA819716	Synaptojanin 1	-1.5
AA819295	Similar to RIKEN cDNA 1190006A08	-1.5
AA819205	ESTs	-1.5
AA818938	ESTs	-1.5
AA818937	ESTs	-1.5
AA818796	Similar to SPI6	-1.5
AA818416	ESTs	-1.5
AA818144	ESTs	-1.5
AI030702	RAB26, member RAS oncogene family	-1.6
AA997856	Dimethylglycine dehydrogenase precursor	-1.6
AA997371	MAD homolog 4 (Drosophila)	-1.6
AA956887	Chemokine receptor (LCR1)	-1.6
AA925353	Lysosomal-associated protein transmembrane 5	-1.6
AA925256	ESTs	-1.6
AA925225	Unknown (protein for MGC:72638)	-1.6
AA924110	Similar to RIKEN cDNA 1110033G07	-1.6
AA899725	ESTs	-1.6
AA899159	Microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	-1.6
AA858941	ESTs	-1.6

**Table 2. Continued**

ID	Name of gene	Ratio
AA819712	ESTs	-1.6
AA818401	CG6210-like	-1.6
AA925654	ESTs	-1.7
AA924878	Plasminogen activator, tissue	-1.7
AA900184	Kinase D-interacting substance of 220 kDa	-1.7
AA875406	ESTs	-1.7
AA819554	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	-1.7
AA817938	Dopa/tyrosine sulfotransferase	-1.7
AI145920	ESTs	-1.8
AA963856	Endothelin receptor type B	-1.8
AA899126	ESTs	-1.8
AA819420	RhoB gene	-1.8
AA819293	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	-1.8
AI385139	ESTs	-1.9
AA996605	ESTs	-1.9
AA900107	ESTs	-1.9
AA926256	ESTs	-2.1
AA956793	Early growth response 1	-2.2
AI146192	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	-2.3

ID : Genbank identification number. ESTs : Expressed sequence taqs. Positive values indicate upregulation in large DM glomeruli, whereas negative values indicate downregulation.

**Table 3. Specific Genes of Large 12-week DM Glomeruli**

ID	Name of gene	Ratio
AA926342	Deoxyribonuclease I	1.6
AA924656	Similar to brain-specific angiogenesis inhibitor 2	1.6
AA900150	NAD <sup>+</sup> -specific isocitrate dehydrogenase b subunit	1.6
AA818827	Glutathione peroxidase 3	1.6
AI059871	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like	1.5
AI030295	ESTs	1.5
AI029771	Adenylate cyclase 5	1.5
AA925037	Similar to hypothetical protein	1.5
AA924591	Cytochrome P450 4A3	1.5
AA818759	LOC361083	1.5
AA818595	ESTs	1.5
AA997722	Similar to ribosomal protein S9; 40S ribosomal protein S9	1.4
AA955087	ESTs	1.4
AA925356	Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	1.4
AA925145	ESTs	1.4
AA924590	FXYD domain-containing ion transport regulator 2	1.4
AA924146	ESTs	1.4
AA901043	ESTs	1.4
AA900546	Heat-responsive protein 12	1.4
AA900319	ESTs	1.4
AA899805	Similar to Dishevelled 2, dsh homolog	1.4
AA858962	Retinol binding protein 4	1.4
AA819821	Lactate dehydrogenase B	1.4
AA818967	ESTs	1.4
AA818896	Cytochrome P450, subfamily 2E, polypeptide 1	1.4
AA818439	Phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein (39 kDa)	1.4
AI14607	ESTs	-1.4

Table 3. Continued

ID	Name of gene	Ratio
AI070852	ESTs	-1.4
AI043961	ESTs	-1.4
AA997188	Germinal histone H4 gene	-1.4
AA925654	ESTs	-1.4
AA925618	Similar to bromodomain-containing protein BP75	-1.4
AA924231	Peroxisomal membrane protein 4	-1.4
AA924080	Inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	-1.4
AI146192	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	-1.6
AA819560	ESTs	-1.9
AA956793	Early growth response 1	-2.4

당뇨병성 신병증의 병태생리를 규명하기 위한 수많은 노력에도 불구하고 아직까지 정확한 분자생물학적 및 세포학적 기전은 확립되어 있지 않은 실정이다.

현재까지의 연구에 의하면, PKC 경로<sup>25-27)</sup>, MAPK 경로<sup>27-28)</sup>, RAS<sup>29-31)</sup>, 그리고 TGF- $\beta$ <sup>32-33)</sup>, 산화성 스트레스<sup>45, 54)</sup> 등이 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행과 밀접하게 연관되어 있으며, 이 중에서도 RAS와 TGF- $\beta$ 는 당뇨병성 신병증의 특징 중 하나인 사구체 비후와 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 안지오텐신 II는 TGF- $\beta$ 의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라 세포주기 조절 단백질의 하나인 p21<sup>Cip1</sup> 및 p27<sup>Kip1</sup>의 발현을 증가시켜 사구체 비후를 유발시키며<sup>34-35)</sup>, 안지오텐신 전환효소 억제제나 안지오텐신 수용체 차단제의 투여로 사구체 비후가 억제되었다는 보고도 있다<sup>36)</sup>. 이에 반하여, Monkawa 등<sup>37)</sup>은 p21<sup>Cip1</sup>과 p27<sup>Kip1</sup> 유전자를 결손시킨 당뇨 쥐에서는 TGF- $\beta$ 1의 발현 증가에도 불구하고 사구체 비후가 유발되지 않았다고 하였다. 이렇듯 사구체 비후는 한 가지 인자에 의한 효과라기 보다는 여러 인자가 상호 복합적으로 작용하여 나타난 결과일 것으로 생각되어지나, 아직까지 비후된 사구체에서의 각종 유전자의 발현 변화에 대한 연구는 전무한 실정이다.

당뇨병 동물 모델에서 사구체의 분리는 주로 다양한 크기의 체공을 가진 체를 이용하거나 microdissection 과정을 통하여 이루어진다. 당뇨병성 신병증의 경우 대부분의 연구자는 사구체 비후로 인하여 중간 크기의 체공을 가진 체에 많은 사구체가 남아 있게 된다는 사실을 알게 되며, 또한 microdissection 과정 중에도 사구체 크기의 변이가 크다는 것을 감지하게 된다. Toyota 등<sup>38)</sup>은 제 2형 당뇨병 모델인 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)쥐를 대상으로 당뇨병성 신병증 초기에 동반되는 사구체 크기의 변화를 미세 컴퓨터 전산화 촬영 (micro-CT)을 이용하여 관찰한 결

과, 당뇨 사구체의 평균 용적 ( $2.31 \pm 0.45 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ )이 대조군 사구체 ( $1.62 \pm 0.23 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ )에 비하여 컷을 뿐만 아니라 당뇨군에서 사구체 용적이 유의하게 광범위하였다고 하였다. 또한, 그들의 결과에 의하면 당뇨 사구체의 50% 이상이 가장 큰 대조군 사구체에 비하여 큰 것으로 나타났으며, 이러한 변화는 당뇨병성 신병증 초기부터 관찰된다고 보고하였다. 따라서 가장 흔한 사구체 분리 방법인 체를 이용할 경우 이미 비후된 사구체가 포함되지 않은 실험 결과가 도출될 가능성이 있으며, 이로 인하여 연구자에 따라 실험 결과가 동일하지 않게 나올 수 있을 것으로 생각된다. 한 예로, 당뇨병성 신병증에서 사구체 여과 장벽을 구성하는 대표적인 단백질인 nephrin의 발현 변화에 대한 연구 결과가 연구자에 따라 서로 상반되게 보고되고 있다. Aaltonen 등<sup>39)</sup>은 STZ로 당뇨가 유발된 흰쥐에서 사구체 내 nephrin mRNA의 발현이 증가되었다고 보고한 반면에, Bonnet 등<sup>40)</sup>은 STZ로 당뇨가 유발된 자발성 고혈압 쥐에서 사구체 내 nephrin mRNA와 단백질의 발현이 오히려 감소되었다고 보고하였다. 이러한 상반된 결과가 실험 모델이나 당뇨 유발 기간에 따른 차이일 수도 있으나, 실험 방법상의 문제일 수도 있을 것으로 생각된다. 이러한 이유에서 본 연구자는 일반적으로 실험에 사용하는 당뇨 사구체 이외에도 이미 비후된 사구체를 따로 분리하여 실험에 이용하였으며, 당뇨와 비당뇨 사구체뿐만 아니라 당뇨 사구체 중에서 비후된 사구체와 비후가 동반되지 않은 사구체를 비교하고자 하였다.

최근 Human Genome Project의 완성으로 대부분 생명체의 유전자 염기 서열이 밝혀지면서 대량의 유전자를 동시에 검사하려는 노력이 계속되어 왔으며, 그 중 하나가 DNA microarray를 이용한 유전자 발현 검사이다. 암을 비롯한 각종 질환에서 DNA microarray를 이용한 연구가 많이 발표되고 있는 상황에서 2000년에 Imai 등<sup>41)</sup>은 단백 과부하 쥐

의 신장에서 유전자의 발현을 microarray 방법을 이용하여 알아봄으로써 신장질환 분야에서 DNA microarray의 적용 가능성을 처음으로 제시하였으며, 이후 당뇨병성 신병증을 포함한 몇몇 신장질환에서 microarray를 이용한 연구 결과가 발표되었다. 당뇨병성 신병증의 경우, Wada 등<sup>11)</sup>이 STZ로 당뇨가 유발된 쥐에서 추출한 신장을 이용한 microarray 실험 결과를 처음으로 보고한 이후, 또 다른 제 1형 당뇨 모델인 NOD 쥐와 제 2형 당뇨 모델인 KK/Ta 쥐와 db/db 쥐의 신장을 이용한 micrarray 실험 결과가 연속적으로 발표되었다<sup>42-43)</sup>. 그러나 동물을 이용한 기존의 연구 대부분은 사구체를 분리하여 시행한 연구가 아니라 신장 전체를 이용한 microarray 실험 결과였기 때문에 신장 전체 용적의 10% 이하에 해당하는 사구체에서만 유전자 발현 변화를 파악한다는 것은 거의 불가능하였다. 다만 사람의 신장을 이용한 연구에서는 사구체에서만 유전자 발현을 관찰할 수 있었는데, Higgins 등<sup>44)</sup>은 정상인의 신장으로부터 분리한 사구체 뿐만 아니라 신피질과 신수질에서의 유전자 발현을 micrarray를 통하여 규명하였으며, 최근에 Baelde 등<sup>45)</sup>은 당뇨병성 신병증이 동반된 환자의 신장으로부터 분리한 사구체를 이용한 microarray 결과를 보고하기도 하였다. 그러나, 후자의 경우에는 단지 2명의 당뇨병 환자를 대상으로 하였을 뿐만 아니라 이미 사구체경화증과 간질 섬유화가 동반 되어있는 진행된 당뇨 신장을 실험에 이용하였다. 이렇듯 당뇨병성 신병증에서 사구체만을 이용한 연구가 거의 없었던 이유는 사람의 경우를 제외하고는 실험 동물의 신장으로부터 분리한 사구체만을 이용해서는 micrarray를 시행할 수 있을 정도의 충분한 양의 RNA를 얻을 수 없었기 때문이다. 다행히 최근 들어 전체 유전자의 상대적 비를 변화시키지 않으면서 소량의 RNA를 선행적으로 증폭시키는 기술이 개발되어 극소량의 검체로도 microarray를 시행할 수 있게 되었으며, 이에 따라 본 연구에서와 같이 사구체만을 이용한 실험도 가능해졌다.

본 연구에서는 당뇨병성 신병증의 초기 변화 중 하나인 사구체 비후의 병태생리를 규명하고자 하였기 때문에, 당뇨 사구체 뿐만 아니라 당뇨 사구체 중에서도 상대적으로 당뇨병에 의한 영향을 많이 받았을 것으로 생각되는 비후된 사구체에서의 유전자 발현을 알아봄으로써 사구체 비후와 관련된 유전자를 탐색하고, 유전자 상호간의 연관성을 확인하고자 하였다. 그 결과 기존의 연구에서 세포 비후와 일부 연관성이 있을 것으로 알려진 PDGF-B<sup>46-48)</sup>와 관련이 있는 platelet-activating factor acetylhydrolase, insulin-like growth factor<sup>49-51)</sup>와 관련이 있다고 생각되는 interleukin-6 signal

transducer, 그리고 세포주기 조절 단백질의 일종인 cyclin B1<sup>52)</sup> 등이 비후된 사구체에서 상대적으로 증가되어 있었다. 반면에 plasminogen activator<sup>53)</sup>와 TGF- $\beta$ 와 관련이 있는 TGF- $\beta$  inducible early growth response 유전자의 발현은 비후된 사구체에서 상대적으로 감소되어 있었다. TGF- $\beta$ 는 당뇨병성 신병증의 발생 및 진행과 가장 밀접한 관련이 있는 인자로 기존의 많은 연구 보고에 의하면 당뇨 사구체에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. 그러나 최근에 Baelde 등<sup>45)</sup>이 당뇨병성 신병증 환자의 사구체를 이용하여 시행한 microarray 결과를 보면, TGF- $\beta$  mRNA 발현이 통계학적 의미는 없었으나 당뇨 사구체에서 오히려 감소되어 있었으며, TGF- $\beta$ 와 관련이 있는 connective tissue growth factor 발현도 당뇨 사구체에서 감소되어 있었다. 그들은 이러한 감소가 조직 복원 능력의 감소를 시사하는 소견이라고만 해석을 하였다. 본 연구 결과상 비후된 사구체에서 TGF- $\beta$ 와 관련이 있는 TGF- $\beta$  inducible early growth response 유전자의 발현 감소 역시 조직 복원 능력의 감소를 의미할 수 있지만, 사구체 비후가 이미 일어난 상태에서의 negative-feedback 등에 의하여 발현이 오히려 감소되었을 가능성도 있을 것으로 생각된다.

본 연구 결과상 흥미로운 것은 비후된 사구체에서의 유전자 발현 양상이 당뇨 유병 기간에 따라 다소 차이가 있다는 것이다. 당뇨 초기에는 비후가 동반되지 않은 당뇨 사구체와 대조군 사구체의 유전자 발현 양상이 유사하였던 반면에, 당뇨의 영향을 많이 받았을 것으로 생각되는 비후된 당뇨 사구체의 유전자 발현 양상은 이들과 현저하게 다른 결과를 보였다. 이와는 대조적으로 당뇨의 유병 기간이 길어짐에 따라 이미 비후가 된 당뇨 사구체와 비후가 동반되지 않은 당뇨 사구체의 유전자 발현 양상이 유사해지는 것으로 보아 당뇨 유병 기간이 길어지게 되면 거의 모든 사구체에서 비후와 관련된 변화가 일어나고 있을 것으로 생각된다. 향후 신피질 중 사구체 비후가 초기에 일어나는 부위에 대한 추가적인 연구도 사구체 비후의 병태생리를 이해하는 데에 도움이 될 것으로 생각된다. Wilson 등<sup>42)</sup>도 제 1형 당뇨 모델인 NOD 쥐를 이용한 microarray 연구에서 당뇨의 유병 기간에 따른 유전자 발현을 관찰하였는데, 그들도 당뇨 발생 당시와 당뇨 유병 1개월 후 사이에 일부 유전자의 발현에 유의한 차이가 있었다고 하여, 본 연구 결과와 종합해 볼 때 당뇨 유병 기간에 따라 유전자의 발현 양상은 변할 것으로 생각된다.

본 연구에서 한 가지 고려되어야 할 사항으로는 체를 이용하여 사구체 추출과정 중 조직 손상에 의한 유전자 발현의

변화 가능성을 완전히 배제할 수는 없었다는 점이다. 그러나, 충분한 량의 RNA를 얻기 위해서는 다량의 사구체가 필요하였기 때문에, 많은 수의 사구체를 얻기 위하여 체를 이용한 사구체 분리방법을 사용하였다. 또한, 본 연구는 database 정보를 기초로 하여 제작한 상품화된 DNA chip을 이용하였기 때문에 nephrin과 같은 일부 새로운 유전자의 부재 등의 제약과 cDNA microarray 결과상 비후된 사구체에서 의미 있는 발현의 차이를 보인 유전자를 real time-PCR 등을 통하여 재확인하지 못하였다는 문제를 내포하고 있다. 향후 본 연구 결과에서 의미 있는 발현의 차이를 보인 유전자에 대한 real time-PCR과 Western blot 등을 포함한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 실험적 당뇨 흰쥐의 신장으로부터 분리한 사구체에서 사구체의 크기에 따른 유전자의 발현 양상에 차이가 있었을 뿐만 아니라 당뇨 유발 기간에 따라서도 유전자의 발현 양상이 변한다는 것을 알게 되었다. 본 연구 결과를 토대로 향후 당뇨병성 신병증에서 사구체 비후를 예방 또는 치료하기 위한 연구에서 목표 유전자의 선정이 가능할 것으로 생각된다. 또한 당뇨병성 신병증 연구 계획 시에는 반드시 당뇨병 유발 기간을 염두에 두어야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

**목적 :** 최근 발달한 microarray를 이용하여 실험적 당뇨병성 신병증 모델에서 신장 전체를 이용한 유전자 발현의 차이를 규명한 연구는 있었으나 당뇨 사구체만을 이용한 연구는 거의 없었으며, 더욱이 비후된 사구체에 대한 연구는 전무한 상태이다. 이에 본 저자는 실험적 당뇨 흰쥐로부터 분리한 사구체를 이용하여 microarray를 시행하여 초기 당뇨병성 신병증에서 사구체와 관련된 유전자를 알아보려고 하였다.

**방법 :** 흰쥐의 복강 내에 streptozotocin (65 mg/kg)을 주사하여 당뇨를 유발시켰으며, 당뇨 유발 6주와 12주 후에 당뇨군과 대조군 각 10마리씩을 희생시켰다. 희생시킨 흰쥐에서 sieving technique을 이용해 사구체를 분리하였으며, 사구체의 크기에 따라 125 m 체공의 체에 걸린 사구체를 큰 사구체, 75 m 체공의 체에 걸린 사구체는 작은 사구체로 분류하였다. 사구체로부터 RNA를 추출한 후 Rat cDNA 5K chip을 이용한 microarray를 수행하였으며, 유의한 유전자는 significant analysis of microarray (SAM)을 이용하여 선별하였다.

**결과 :** Microarray 실험을 통한 전체 유전자의 발현 패턴

을 hierarchical clustering을 수행하여 관찰한 결과, 실험 6주 후에는 작은 당뇨 사구체와 대조군 사구체의 유전자 발현 양상이 유사하였던 반면에, 큰 당뇨 사구체와 작은 당뇨 사구체의 유전자 발현 양상은 서로 상이하였다. 이와 반대로, 12주 후에는 큰 당뇨 사구체와 작은 당뇨 사구체의 유전자 발현 양상이 유사하였던 반면에, 대조군 사구체와 당뇨군 사구체의 유전자 발현 양상이 서로 상이하였다. 6주 당뇨 흰쥐에서 분리한 큰 당뇨 사구체와 작은 당뇨 사구체 사이에 발현 차이를 보인 유전자 중 큰 사구체에서 유전자 발현이 1.5 배 이상 증가된 유전자는 149개이었으며, 발현이 감소된 유전자는 58개이었다. 12주 당뇨 흰쥐의 경우, 105개의 유전자 중 큰 당뇨 사구체에서 유전자 발현이 1.4배 이상 증가된 유전자는 26개, 발현이 감소된 유전자는 11개이었다.

**결론 :** 이상의 결과로, 실험적 당뇨 흰쥐에서 분리한 사구체의 크기에 따라 유전자 발현에 차이가 있으며, 당뇨병 유발 기간에 따라 크기에 따른 유전자 발현의 차이가 변할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chavers B, Foley R, Gilbertson D, Grimm R, Liu J, Louis T, Manning W, Matas A, McBean M, Murray A, St Peter W, Xue J, Fan Q, Guo H, Li S, Li S, Roberts T, Snyder J, Solid C, Wang C, Weinhandl E, Arko C, Chen SC, Dalleska F, Daniels F, Dunning S, Ebben J, Frazier E, Johnson R, Sheets D, Forrest B, Berrini D, Constantini E, Everson S, Frederick P, Eggers P, Agodoa L, United States Renal Data System: Excerpts from the United States Renal Data System 2004 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 45(Suppl 1):A5-A7, 2005
- 2) Korean society of nephrology registry: Renal replacement therapy in Korea Insan memorial dialysis registry 2003-*Korean J Nephrol* 23(Suppl 2):S381-S404, 2004
- 3) Kang SW, Adler SG, Nast CC, Lapage J, Gu JL, Nadler JL, Natarajan R: 12-Lipoxygenase is increased in glucose-stimulated mesangial cells and in experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 59:1354-1362, 2001
- 4) Ziyadeh FN: The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 22:736-744, 1993
- 5) Wolf G, Ziyadeh FN: Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 56:393-405, 1999
- 6) Kimmelstiel P, Wilson C: Intercapillary lesions in glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 12:830-897, 1936
- 7) Koya D, King GL: Protein kinase C activation and the

- development of diabetic complications. *Diabetes* 47: 859–866, 1998
- 8) Ray PE, Suga S, Liu XH, Huang X, Johnson RJ: Chronic potassium depletion induces renal injury, salt sensitivity, and hypertension in young rats. *Kidney Int* 59:1850–1858, 2001
  - 9) Kang SW, Adler SG, Lapage J, Natarajan R: p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. *Kidney Int* 60:543–552, 2001
  - 10) Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K: Expression of transforming growth factor- $\beta$  1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 46:430–442, 1994
  - 11) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467–470, 1995
  - 12) Wada J, Zhang H, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Hida K, Shikata K, Kanwar YS, Makino H: Gene expression profile in streptozotocin-induced diabetic mice kidneys undergoing glomerulosclerosis. *Kidney Int* 59:1363–1373, 2001
  - 13) Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM: High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 18:457–459, 2000
  - 14) Feldman AL, Costouros NG, Wang E, Qian M, Marincola FM, Alexander HR, Libutti SK: Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. *Biotechniques* 33:906–912, 2002
  - 15) Zhao H, Hastie T, Whitfield ML, Børresen-Dale AL, Jeffrey SS: Optimization and evaluation of T7 based RNA linear amplification protocols for cDNA microarray analysis. *BMC Genomics* 3:31, 2002
  - 16) Hu L, Wang J, Baggerly K, Wang H, Fuller GN, Hamilton SR, Coombes KR, Zhang W: Obtaining reliable information from minute amounts of RNA using cDNA microarrays. *BMC Genomics* 3:16, 2002
  - 17) Nygaard V, Loland A, Holden M, Langaas M, Rue H, Liu F, Myklebost O, Fodstad O, Hovig E, Smith-Sorensen B: Effects of mRNA amplification on gene expression ratios in cDNA experiments estimated by analysis of variance. *BMC Genomics* 4:11, 2003
  - 18) Schneider J, Buness A, Huber W, Volz J, Kioschis P, Hafner M, Poustka A, Sultmann H: Systematic analysis of T7 RNA polymerase based in vitro linear RNA amplification for use in microarray experiments. *BMC Genomics* 5:29, 2004
  - 19) Rudnicki M, Eder S, Schratzberger G, Mayer B, Meyer TW, Tonko M, Mayer G: Reliability of t7-based mRNA linear amplification validated by gene expression analysis of human kidney cells using cDNA microarrays. *Nephron Exp Nephrol* 97:e86–e95, 2004
  - 20) Kim TM, Jeong HJ, Seo MY, Kim SC, Cho G, Park CH, Kim TS, Park KH, Chung HC, Rha SY: Determination of genes related to gastrointestinal tract origin cancer cells using a cDNA microarray. *Clin Cancer Res* 11:79–86, 2005
  - 21) Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP: Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30:e15, 2002
  - 22) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14863–14868, 1998
  - 23) Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5116–5121, 2001
  - 24) Li B, Yao J, Kawamura K, Oyanagi-Tanaka Y, Hoshiyama M, Morioka T, Gejyo F, Uchiyama M, Oite T: Real-time observation of glomerular hemodynamic changes in diabetic rats: effects of insulin and ARB. *Kidney Int* 66:1939–1948, 2004
  - 25) DeRubertis FR, Craven PA: Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 43:1–8, 1994
  - 26) Ishii H, Koya D, King GL: Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76:21–31, 1998
  - 27) 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 Suppl* 60:S66–S69, 1997
  - 28) 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* 46:847–853, 1997
  - 29) Kennefick TM, Anderson S: Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 17:441–447, 1997
  - 30) 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
  - 31) Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol* 259:F768–F777, 1990
  - 32) Sharma K, Ziyadeh FN: Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 17:80–92, 1997

- 33) Ziyadeh FN, Sharma K: Role of transforming growth factor- $\beta$  in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney Int* 51:S34-S36, 1995
- 34) Grande JP, Warner GM, Walker HJ, Yusufi AN, Cheng J, Gray CE, Kopp JB, Nath KA: TGF- $\beta$ 1 is an autocrine mediator of renal tubular epithelial cell growth and collagen IV production. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:171-181, 2002
- 35) Wolf G: Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 77:S59-S66, 2000
- 36) Xu ZG, Yoo TH, Ryu DR, Cheon Park H, Ha SK, Han DS, Adler SG, Natarajan R, Kang SW: Angiotensin II receptor blocker inhibits p27<sup>kip1</sup> expression in glucose-stimulated podocytes and in diabetic glomeruli. *Kidney Int* 67:944-952, 2005
- 37) Monkawa T, Hiromura K, Wolf G, Shankland SJ: The hypertrophic effect of transforming growth factor- $\beta$  is reduced in the absence of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27. *J Am Soc Nephrol* 13:1172-1178, 2002
- 38) Toyota E, Ogasawara Y, Fujimoto K, Kajita T, Shigeto F, Asano T, Watanabe N, Kajiya F: Global heterogeneity of glomerular volume distribution in early diabetic nephropathy. *Kidney Int* 66:855-861, 2004
- 39) Aaltonen P, Luimula P, Astrom E, Palmén T, Gronholm T, Palojoki E, Jaakkola I, Ahola H, Tikkanen I, Holthofer H: Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* 81:1185-1190, 2001
- 40) Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, Jalanko H: Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 12:289-296, 2001
- 41) Imai E, Takenaka M, Nagasawa Y, Kaimori J, Hori M: Application of microarray assay to nephrology. *Nephrol Dial Transplant* 15(suppl 6):78-80, 2000
- 42) Wilson KH, Eckenrode SE, Li QZ, Ruan QG, Yang P, Shi JD, Davoodi-Semiromi A, McIndoe RA, Croker BP, She JX: Microarray analysis of gene expression in the kidneys of new- and post-onset diabetic NOD mice. *Diabetes* 52:2151-2159, 2003
- 43) Fan Q, Shike T, Shigihara T, Tanimoto M, Gohda T, Makita Y, Wang LN, Horikoshi S, Tomino Y: Gene expression profile in diabetic KK/Ta mice. *Kidney Int* 64:1978-1985, 2003
- 44) Higgins JP, Wang L, Kambham N, Montgomery K, Mason V, Vogelmann SU, Lemley KV, Brown PO, Brooks JD, van de Rijn M: Gene expression in the normal adult human kidney assessed by complementary DNA microarray. *Mol Biol Cell* 15:649-656, 2004
- 45) Baelde HJ, Eikmans M, Doran PP, Lappin DW, de Heer E, Bruijn JA: Gene expression profiling in glomeruli from human kidneys with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 43:636-650, 2004
- 46) Young BA, Johnson RJ, Alpers CE, Eng E, Gordon K, Floege J, Couser WG, Seidel K: Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int* 47:935-944, 1995
- 47) 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
- 48) Inaba T, Ishibashi S, Gotoda T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, Kawakami M, Yazaki Y, Yamada N: Enhanced expression of platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 45:507-512, 1996
- 49) Flyvbjerg A, Bornfeldt KE, Marshall SM, Arnqvist HJ, Orskov H: Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 33:334-338, 1990
- 50) Werner H, Shen-Orr Z, Stannard B, Burguera B, Roberts CT Jr, Leroith D: Experimental diabetes increases insulinlike growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes* 39:1490-1497, 1990
- 51) Sugimoto H, Shikata K, Makino H, Ota K, Ota Z: Increased gene expression of insulin-like growth factor-I receptor in experimental diabetic rat glomeruli. *Nephron* 72:648-653, 1996
- 52) Wang S, Kim JH, Moon KC, Hong HK, Lee HS: Cell-cycle mechanisms involved in podocyte proliferation in cellular lesion of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 43:19-27, 2004
- 53) Nicholas SB, Aguiniga E, Ren Y, Kim J, Wong J, Govindarajan N, Noda M, Wang W, Kawano Y, Collins A, Hsueh WA: Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency retards diabetic nephropathy. *Kidney Int* 67:1297-1307, 2005
- 54) Clarkson MR, Murphy M, Gupta S, Lambe T, Mackenzie HS, Godson C, Martin F, Brady HR: High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly. *J Biol Chem* 277:9707-9712, 2002