

## Mesangial 세포에서 고포도당에 의한 insulin-like growth factor의 분비조절기전에 관한 연구: cAMP와의 관련성

허정선 · 강창원 · 한호재<sup>1</sup> · 박수현\*

전북대학교 수의과대학 생리학교실, 생체안전성 연구소

<sup>1</sup>전남대학교 수의과대학 생리학교실

(제재승인: 2003년 11월 20일)

## The regulatory mechanism of insulin like growth factor secretion by high glucose in mesangial cell: involvement of cAMP

Jung-sun Heo, Chang-won Kang, Ho-jae Han<sup>1</sup>, and Soo-hyun Park\*

Bio-safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonju National University, Chonju 561-756, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Hormone Research Center, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

(Accepted: November 20, 2003)

**Abstract :** Dysfunction of mesangial cells has been contributed to the onset of diabetic nephropathy. Insulin like growth factors (IGFs) are also implicated in the pathogenesis of diabetic nephropathy. However, it is not yet known about the effect of high glucose on IGF-I and IGF-II secretion in the mesangial cells. Furthermore, the relationship between cAMP and high glucose on the secretion of IGFs was not elucidated. Thus, we examined the mechanisms by which high glucose regulates secretion of IGFs in mesangial cells. Glucose increased IGF-I secretion in a time- ( $>8$  hr) and dose- ( $>15$  mM) dependent manner ( $p<0.05$ ). Stimulatory effect of high glucose on IGF-I secretion is predominantly observed in 25 mM glucose (high glucose), while 25 mM glucose did not affect cell viability and lactate dehydrogenase release. High glucose also increased IGF-II secretion. The increase of IGF-I and IGF-II secretion is not mediated by osmotic effect, since mannitol and L-glucose did not affect IGF-I and IGF-II secretion. 8-Br-cAMP mimicked high glucose-induced secretion of IGF-I and IGF-II. High glucose-induced stimulation of IGF-I and IGF-II secretion was blocked not by pertussis toxin but by SQ 22536 (adenylate cyclase inhibitor), Rp-cAMP (cAMP antagonist), and myristoylated protein kinase A (PKA) inhibitor amide 14-22 (protein kinase A inhibitor). These results suggest that cAMP/PKA pathways independent of Gi protein may mediate high glucose-induced increase of IGF-I and IGF-II secretion in mesangial cells. Indeed, glucose ( $>15$  mM glucose) increased cAMP formation. In conclusion, high glucose stimulates IGF-I and IGF-II secretion via cAMP/ PKA pathway in mesangial cells.

**Key words :** Diabetic nephropathy, Insulin-like growth factor, high glucose, cAMP, mesangial cell

### 서 론

당뇨병성 신증은 인슐린 의존성 당뇨병의 주요한 합병증으로 종종 신장 장애의 주요한 원인으로 알려지고 있다 [21, 29]. 많은 연구자들은 이러한 당뇨병성 신증의

발병에 혈중 포도당 농도의 증가를 의미하는 고혈당증이 주요한 원인을 차지하는 것으로 보고하고 있다 [27, 32]. 이러한 당뇨병성 신증은 고혈당증에 의해 사구체 세포의 기질의 축적에 의한 사구체 경화가 야기되어 유발되는 것으로 알려져 있으며 [23, 27], 신장의 사구체

이 연구는 한국학술진흥재단 2002년도 신진교수연구과제 (KRF-2002-003-E00159)의 지원에 의하여 이루어졌다.

\*Corresponding author: Soo-hyun Park

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonju National University, Chonju 561-756, Korea  
[Tel: 82-63-270-3884, Fax: 82-53-270-3870, E-mail: parksh@chonbuk.ac.kr]

에 위치한 mesangial 세포들이 그 중요한 역할을 담당하고 있다 [19].

한편, Insulin like growth factors (IGF)는 주로 간에서 분비 합성되며, IGF-I과 IGF-II로 분류되며 생체내 분열원질성 작용과 대사성 작용(포도당 대사, 지방대사, 단백질 합성)을 나타낸다 [11]. 신장의 mesangial 세포에서는 IGF-I 및 IGF-II 모두가 발현되는 것으로 알려져 있다 [2, 31]. 최근 이러한 IGFs가 당뇨병과 밀접한 연관이 있는 것으로 여러 연구자들에 의해서 보고되고 있다 [4, 5]. 당뇨병시에는 혈청내 IGF-I 수준이 감소한 반면 오히려 IGF-II는 증가한다 [1]. 특히 신장에서 IGF-I은 당뇨병성 신증 초기에 관련되는 것으로 나타나고 있다 [4, 5]. 그러나 이들이 어떠한 세포에서 어떻게 조절되는지에 대해서는 아직까지 알려져 있지 않고 있다.

cAMP는 당뇨병성 신증의 발병에 하나의 인자로 될 수 있다 [23, 25]. 이러한 cAMP는 mesangial 세포에서 다양한 반응을 나타내어 병태생리학적 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다 [13]. 그러나 이 cAMP와 당뇨병성 신증과의 관련성에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않고 있다. 따라서 본 연구자는 mesangial 세포에서 고포도당이 IGF-I 및 IGF-II 수준에 어떠한 효과가 있는지를 조사하고, 나아가 이들이 cAMP와 어떠한 관련이 있는지를 알아보기 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)/Ham's nutrient mixture F-12 (D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase은 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. D-glucose, 8-Br-cAMP, pertussis toxin (PTX), L-glucose, mannitol, actinomycin D, cycloheximide 및 Rp-cAMP은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 주문하였다. SQ 22536는 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA), Myristoylated protein kinase A inhibitor amide 14-22 (PKI)는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다.

### Mesangial 세포의 초대배양

실험에 사용할 rat를 24시간 절식시킨 다음 pentobarbital (1 m/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 후 신속하게 isolated 3 claps method를 이용하여 신장을 분리하고, 신동맥을 통하여 streptomycin과 penicillin (100 U/ml)이 포함된 30 ml의 Hanks' balanced salts (HBSS) 용액을 서서히 관류시켜 혈액을 완전히 제거한 후 HBSS에 옮겨서 사구체가 존재하는 신피질을 신장으로부터 분리하였

다. 분리한 피질 조직을 가능한 세절한 다음 HBSS와 함께 30 mesh, 60 mesh에 여과시킨 후 다시 통과된 시료를 20 mesh에 여과하여 HBSS 용액에 세척하였다. 사구체가 함유되어 있는 HBSS 용액을 다시 한번 120×g, 1초간 원심 분리하여 상층액만을 취하고 다시 1000×g, 1분간 원심 분리시켜 침전된 시료를 채취하였다. 채취된 시료를 RPMI 1640 (Sigma)에 세척한 다음 1000×g, 1분간 원심분리 하였다. 정제된 사구체를 피막을 제거하기 위하여 collagenase (750IU/ml, Sigma)에 15분간 37°C에서 서서히 교반한 다음 무혈청 RPMI 1640 배지에 3번 계속 세척하였다. 이와 같은 과정을 통하여 얻어진 사구체 세포들을 세포배양 접시에 500 사구체/cm<sup>2</sup>가 되도록 분주한 다음 D-valine으로 치환된 Minimum Essential Media Eagle (Sigma)에서 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>인 CO<sub>2</sub> 배양기에서 흔들리지 않도록 고정하여 72시간 동안 배양시킨다. 이때 D-valine 배지, HEPES, streptomycin, penicillin (100U/ml) 0.25%, fungizone, insulin (0.013 µg/ml) 그리고 20% fetal bovine serum을 함유하도록 하고, 이후 CO<sub>2</sub> 배양기에 배양시켰다. 계대 배양시에는 5 mM의 포도당을 함유한 DMEM/F-12를 사용하였다.

### 시료의 전 처리

시료중 IGF들은 대부분 Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs)와 결합된 형태로 존재하므로 IGFBP로부터 IGFs를 분리하기 위하여 acid-ethanol extraction [6]와 formic acid extraction [3] 방법에 의하여 분리하였다. IGF-I의 분리는 혈청 200 µl에 acid-ethanol (2 M HCl : ethanol=1 : 7) 800 µl를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치하여 유리형과 결합형을 분리시켰다. 그 후 3000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 유리 IGF-I를 함유하는 상층 액 500 µl에 0.855 M trizma base를 200 µl 넣어 분석에 사용하였다. 간장, 신장 및 태반 조직은 각 조직 0.25 g에 1% trifluoracetic acid (TFA) 2 ml를 넣어 균질마쇄기 (Polytron Co, U.S.A)로 마쇄 후 원심분리하여 상층액을 취한 다음 acid-ethanol 추출법으로 IGFBP로부터 IGF-I를 분리하여 농도를 측정하였다.

IGF-II의 분리는 혈청 50 µl에 0.5 % Tween 20을 함유하는 8.0 M formic acid 100 µl를 넣어 진탕하고 350 µl의 acetone 첨가하였다. 그 후 3500×g에서 15분간 4 °C에서 원심분리하여 상층액 200 µl에 1.75 M trizma base 85.7 µl를 넣어 분석에 사용하였다. 간장, 신장 및 태반 조직은 각 조직 0.25 g을 1% TFA 2 ml에 넣어 균질마쇄기(Polytron Co, U.S.A)로 마쇄하고 원심분리하여 상층액을 취한 다음 formic acid-acetone 추출법으로 IGFBPs로부터 IGF-II를 분리하여 농도를 측정하였다.

### IGFs(IGF-I과 II) 추적자 제조

Chloramin-T 방법 [18]을 약간 변형시킨 것으로서 이를 요약하면, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 10  $\mu$ l에 rhIGFs 1  $\mu$ g을 첨가한 후 [ $^{125}$ I] (Amersham Life Science, ILL, USA) 1 mCi를 첨가하고 0.04 mg/ml의 chloramin-T를 넣어서 신속히 교반한 후 cellulose CF-II column (Bio-Rad, CA, USA)에 혼합물을 가한 다음 barbital buffer로 column을 세척하였다. 그 후 12% bovine serum albumin(BSA)으로 용출시키고, IGF-II는 sephadex G-25 (Pharmacia LKB., Biotechnology AB, Sweden) column을 통하여 0.2 M sodium phosphate buffer(0.2% BSA 포함)에 용출시켜 분획 수집기(20 drops)에 받아서 gamma counter (Packard, ILL, USA)로 cpm을 측정하고 방사능이  $3 \times 10^6$  cpm이 되도록 각각 분주하여 -70°C에 냉동보관 하였다.

### IGFs 방사면역 측정법

혈청내의 IGFs 농도는 [ $^{125}$ I]-IGFs에 polyclonal anti-IGFs를 사용한 방사면역 측정법(radioimmunoassay, RIA)을 이용하였다. 이를 요약하면, IGFs RIA 완충액으로 0.5% BSA, 0.12 M NaCl, 0.1% sodium azide를 함유한 0.04 M 인산 완충액(pH 7.4)을 사용하였다. IGFs 표준액과 시료에 1000배 회석시킨 polyclonal anti-IGFs 50  $\mu$ l을 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 시험관에 [ $^{125}$ I]-IGFs (20000 cpm/100  $\mu$ l)을 첨가하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 그 후 horse serum 50  $\mu$ l와 12% polyethylene glycol #8000 (PEG) 1 ml를 첨가하여 3,000 rpm에서 30분 간 원심 분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter로 측정하였다.

### cAMP 함량 측정

Confluent된 mesangial 세포에 각기 다른 농도의 포도당 (0~50 mM glucose)을 72시간 동안 처리하였다. 이후, POLYTRON PT 1200를 이용하여 4 mM EDTA가 들어 있는 무혈청 배지에서 균질화를 시켰으며, 100°C에서 5분간 끓이고 300 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 4°C에 저장하였다. 이들 표본들은 [ $^3$ H] cAMP assay system을 이용하여 cAMP 함량을 측정하였다. 결과는 pmol cAMP/mg protein으로 표현하였다.

### 통계처리

실험 결과의 통계적 처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance (ANOVA)로 하였으며, P-value<0.05을 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means±S.E.로 하였다.

## 결과

### 고포도당의 IGF-I 및 IGF-II 분비에 대한 시간 및 농도 curve

IGF-I 분비에 고포당의 효과를 알아보기 위하여, 혈관사이세포에 다양한 시간 (1~72 hr) 및 농도 (15~50 mM)의 고포도당을 처리한 후 IGF-I 분비효과를 관찰하였다. Fig. 1A에서 보듯이 25 mM 포도당은 8시간 이상 처리시 IGF-I 분비를 현저히 증가 시켰으며 48 시간 이상에서 최고를 보였으며 이후 더 이상 증가 작용은 인정되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 배지에서 고혈당의 조건을 유지하기 위하여 포도당을 72시간 처리하였다. 다음 과정으로 고포당의 IGF-II 분비에는 어떠한 효과가 있는지를 역시 알아보았다. 실험결과 고포도당 처리시 IGF-II 분비가 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 IGF-II 분비작용은 IGF-I 분비작용과 시간 및 농도가 같은 양상을 보였다. 이러한 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비작용이 새로운 유전자 및 단백질의 합성과

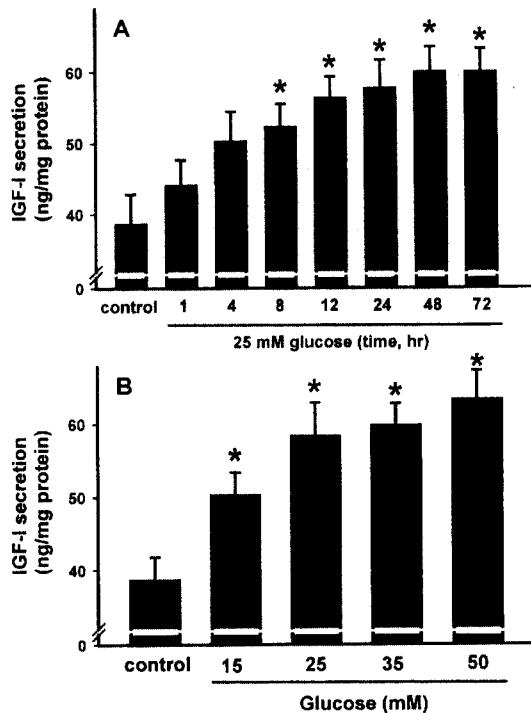
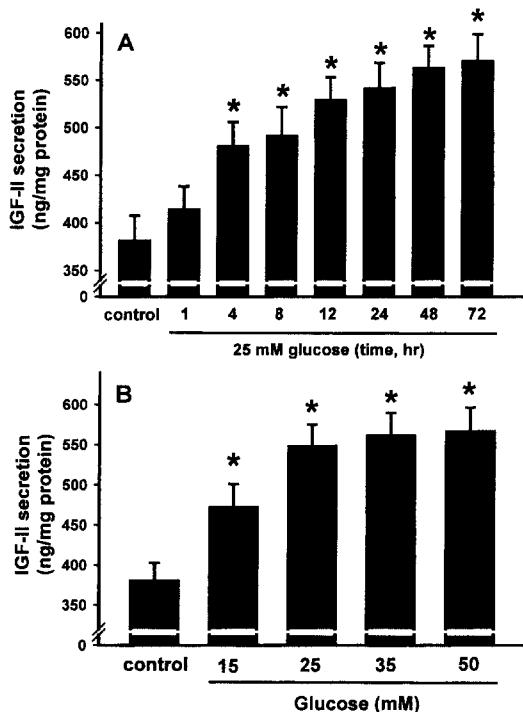


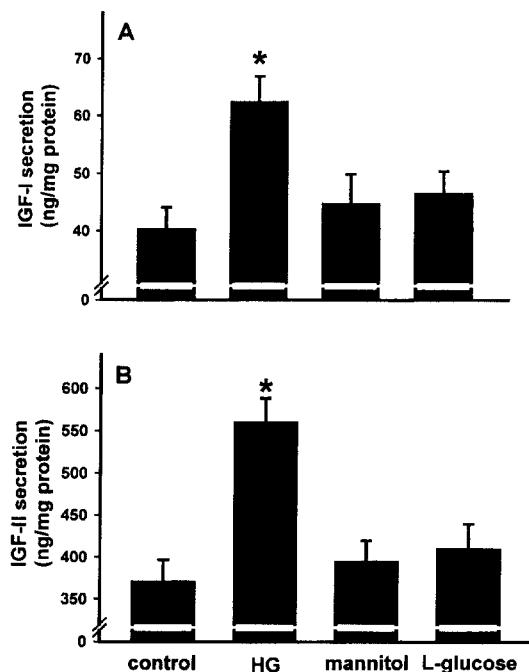
Fig. 1. Time course (A) and dose response curve (B) of 25 mM glucose on IGF-I secretion. Mesangial cells were incubated with 25 mM glucose at different time intervals (1 to 72 hr) or different dosage of glucose (5 to 50 mM). Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \*p<0.05 vs. control.



**Fig. 2.** Time course (A) and dose response curve (B) of 25 mM glucose on IGF-II secretion. Mesangial cells were incubated with 25 mM glucose at different time intervals (1 to 72 hr) or different dosage of glucose (5 to 50 mM). Values are means $\pm$ S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \*p<0.05 vs. control.

관련이 되는지를 알아보기 위하여 전사억제제인 actinomycin D ( $10^{-7}$  M) 및 cycloheximide ( $10^{-6}$  M)을 1시간 전처리 한 후 고포도당을 처리하였다. 실험결과 actinomycin D 및 cycloheximide는 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비를 차단하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가작용에는 새로운 유전자 및 단백질의 합성이 관여되고 있음을 시사해 주고 있다(Fig. 3).

고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II의 증가 작용이 삼투압에 의한 효과인지를 확인하기 위하여 25 mM 및 50 mM의 mannitol 및 L-glucose를 처리하였다. 실험결과 삼투압지표인 mannitol 및 L-glucose는 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비작용에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4). 이러한 IGF-I 및 IGF-II 분비가 세포의 손상과 관련하는지를 알아보기 위하여 포도당, mannitol 및 L-glucose을 처리한 후 세포손상의 지표인 trypan blue exclusion 검사 및 lactate dehydrogenase 활성을 측정하였다. 실험결과 포도당, mannitol 및 L-glucose를 처리한 경우 모두 대조군과 유

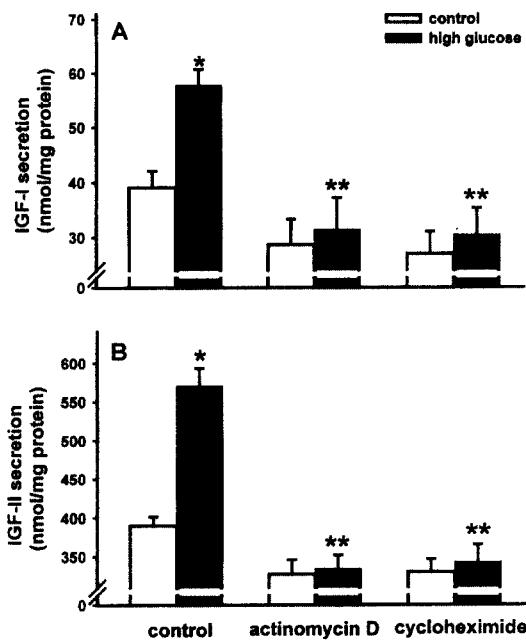


**Fig. 3.** Osmotic effect of glucose, mannitol, and L-glucose on IGF-I (A) and IGF-II secretion. Mesangial cells were incubated with 25 mM glucose, 20 mM mannitol, and 20 mM L-glucose for 72 hr. Values are means $\pm$ S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \*p<0.05 vs. control.

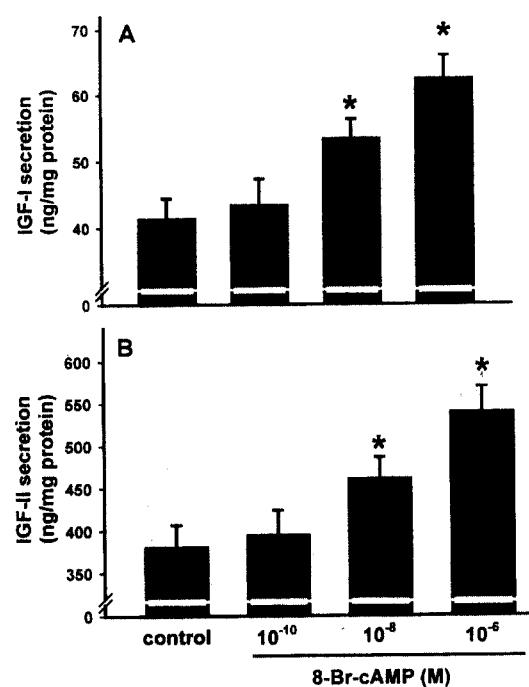
의성 있는 차이는 인정되지 않았다(Table 1). 이 결과는 고포도당에 의한 작용은 세포손상을 시키지 않는다는 것을 의미하며 이러한 작용이 IGF-I 및 IGF-II 증가작용과도 관련이 없다는 것을 나타내고 있다.

#### 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용에 대한 cAMP의 관련성

고포도당에 의한 IGF-I 분비 작용이 어떠한 신호와 관련되는지를 알아보기 위하여 cAMP 유사체인 8-Br-cAMP를 농도별 ( $0\text{--}10^{-6}$  M)로 mesangial 세포에 72시간 처리하였다. 실험결과  $10^{-8}$  M 이상의 8-Br-cAMP를 처리하였을 때 IGF-I 및 IGF-II 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5). 이 결과는 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가작용에 cAMP가 관련될 수 있다는 것을 시사해 주고 있다. cAMP/protein kinase A 신호전달억제제들을 이용하여 이들의 관련성을 알아보았다. Mesangial 세포에 선택적 cAMP 억제제인 Rp-cAMP ( $10^{-5}$  M), adenylate cyclase 억제제 (SQ 22536,  $10^{-6}$  M) 및 protein kinase A 억제제인 protein kinase A



**Fig. 4. Effects of actinomycin D and cycloheximide on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion.** Mesangial cells were preincubated with actinomycin D ( $10^{-7}$  M) or cycloheximide ( $10^{-6}$  M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $p$ <0.05 vs. control, \*\* $p$ <0.05 vs. 25 mM glucose.



**Fig. 5. Effects of 8-Br-cAMP on IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion.** 8-Br-cAMP ( $0\text{--}10^{-6}$  M) was treated to the mesangial cells for 72 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $p$ <0.05 vs. control.

IGF-I 및 IGF-II 분비작용은 이들 억제제들에 의해 유의성 있게 차단되었다(Fig. 6). 나아가, G protein의 관련성을 알아보기 위하여 Gi protein 억제제인 pertussis toxin ( $10 \text{ ng/ml}$ )을 전처리한 후 포도당을 처리하였다. 실험결과 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II의 분비 증가작용 모두 차단되지 않는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이는 G protein이 관여되고 있지 않고 있음을 시사해 주고 있다. 실제로 고포도당 처리시 cAMP 양을 측정한 결과 15 mM 이상의 포도당 처리 시 대조군에 비해 현저한 증가 작용을 볼 수 있었다(Fig. 8).

## 고 찰

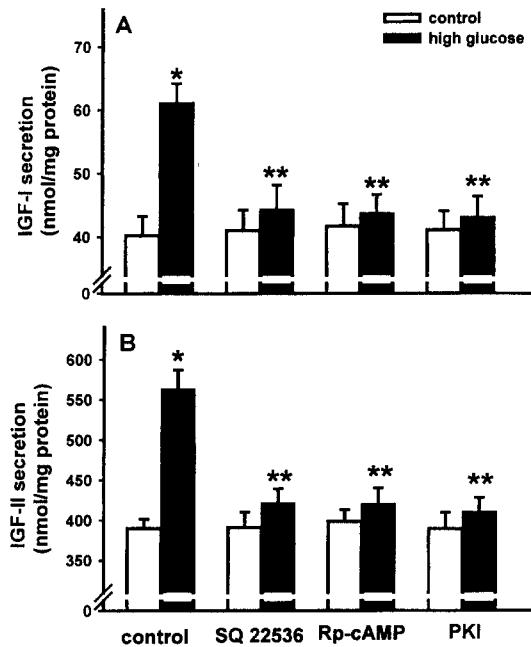
본 실험에서 고포도당 처리시 mesangial 세포의 IGF-I 분비에 현저한 증가 작용을 보였다. 이러한 결과는 streptozotocin으로 유도된 당뇨병 수컷 랫의 신장에서도 IGF-I의 증가한다는 보고와 일치하였다 [20]. Landau 등 [17]은 최근 암컷 랫에 STZ 투여시 신장의 IGF-I는 대조군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다고 하였다. 본 실험에서는 수컷 rat에서 mesangial 세포를 분리

**Table 1. Effects of high glucose on cell viability.**

	LDH (W.U./100 $\mu$ g protein)	Cell viability (% of control)
Control	$16.3 \pm 0.6$	100
10 mM glucose	$17.2 \pm 0.9$	$99.6 \pm 3.5$
10 mM mannitol	$16.8 \pm 0.7$	$101.25 \pm 5.2$
25 mM glucose	$15.6 \pm 0.6$	$102.3 \pm 4.8$
25 mM mannitol	$16.2 \pm 0.7$	$103.7 \pm 5.0$
50 mM glucose	$16.6 \pm 0.7$	$101.3 \pm 3.8$
50 mM mannitol	$15.9 \pm 0.9$	$99.3 \pm 3.2$

Mesangial cells were treated with 10, 25, 50 mM glucose, 10, 25, or 50 mM mannitol for 72 hr and then lactate dehydrogenase activity (LDH) assay and trypan blue exclusion experiment were conducted. Values are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments with triplicate dishes.

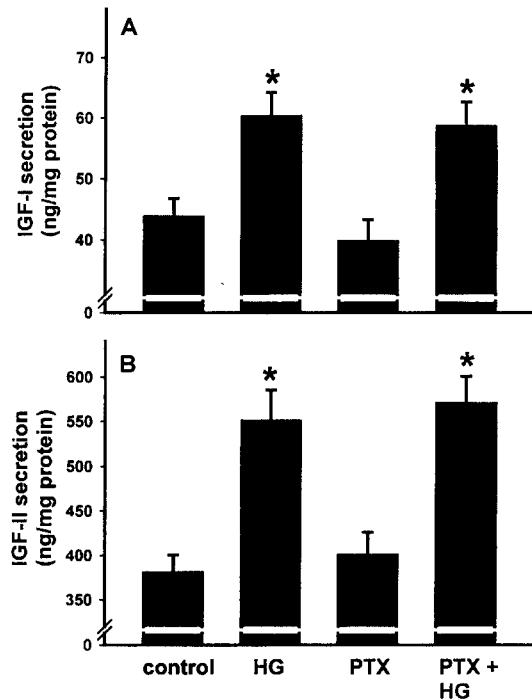
inhibitor amide 14-22 (PKI,  $10^{-6}$  M)를 고포도당 처리하기 30분 전에 처리하였다. 실험결과 고포도당에 의한



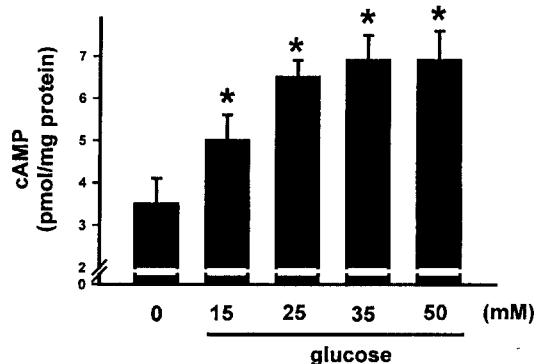
**Fig. 6.** Involvement of adenylate cyclase/cAMP on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were incubated with SQ 22536 ( $10^{-6}$  M), PKI ( $10^{-6}$  M), or Rp-cAMP ( $10^{-5}$  M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose and then were treated with 25 mM glucose for 72 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $p<0.05$  vs. control, \*\* $p<0.05$  vs. 25 mM glucose.

하여 실험에 이용하였기 때문에 당뇨병성 신증의 발병에 있어 성의 차이가 관여할 수도 있다는 가설을 시사해 주고 있다. 한편 이러한 결과는 특히 Elliot 등<sup>8</sup>에 의한 Non-Obese Diabetic (NOD) mouse에서 분리한 mesangial 세포에서 IGF-I이 증가하는 한다는 결과와도 동일하였다. 그러나 그들은 시간 및 농도적인 면에서 접근을 하지 않았다. 본 실험에서는 이러한 고포도당에 의한 효과가 8시간 이상 처리시 IGF-I의 분비가 증가하는 것으로 보아 이 역시 vivo에서 보인 STZ 처리시 하루도 기 전부터 고혈당증이 나타난다는 것과 관련될 수 있다 하겠다 [33]. 본 실험 결과는 신장의 중요한 구성성분으로 여과의 기능을 담당하는 사구체의 주요한 세포인 mesangial 세포에서의 고포도당에 의한 IGF-I 분비 증가가 당뇨병성 신증의 발병에 기여하고 있다는 것을 시사해 준다.

신장의 mesangial 세포 및 근위세뇨관세포에서 고삼투에 의해 당뇨병성 신증의 발병에 관여한다는 보고가 이루어지고 있다 [22, 30]. 그러나 삼투압 지표인 mannitol 및 L-glucose 처리 시 IGF-I 및 IGF-II의 분비증가작용



**Fig. 7.** Effects of pertussis toxin on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were preincubated with pertussis toxin (PTX, 10 ng/ml) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 72 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $p<0.05$  vs. control.



**Fig. 8.** Dose dependency of glucose on cAMP formation. Mesangial cells were preincubated to IBMX ( $10^{-5}$  M) for 30 min to prevent the degradation of cAMP into 5'-AMP before exposure to glucose (0-50 mM) for 72 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $p<0.05$  vs. control.

은 인정되지 않았으므로, IGF-I 및 IGF-II 분비 증가작용은 D-glucose에 특이적인 것으로 나타났다.

IGF-II는 발생 초기에 중요한 역할을 하는 세포성장인자로 알려져 있다. II 형 당뇨병 Goto-Kakizaki (GK) rat 태아 모델에서는 혈청내 IGF-II 혈성의 결손이 당뇨병의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 언급되고 있다 [26]. 이들 실험동물에서 2달 및 6달 당뇨병 GK rat 모델에서의 pancreatic islets를 추출한 결과 대조군에서 보다 IGF-II가 현저히 증가하였다고 하였으나 이에 대한 이유는 밝혀지 못했다 [12]. 당뇨병성 신증에 있어 IGF-II에 대한 관계는 신생 rat에 있어서 STZ를 투여하였을 때 신장의 IGF-II 농도가 증가하였다는 보고가 있다 [7]. 그러나 성체에서 당뇨병시 신장의 IGF-II 농도의 변화에 대한 연구는 극히 미미한 실정이다. 본 실험실에서 수컷 성숙 랙트에 STZ 처리시 신장의 IGF-II가 증가한다고 이미 보고한 바 있다 [10]. 그러나 신장의 어느 세포에서 이러한 IGF-II의 증가가 이루어지고 있는지는 보고되지 않고 있다. 본 실험에서 mesangial 세포에 고포도당 처리시 IGF-II 가 증가하였으므로 생체실험과 견주어 볼 때 부분적으로 mesangial 세포가 IGF-II 분비 증가 작용을 야기하여 당뇨병성 신증의 발병에 관여한다고 할 수 있다. 우리가 아는 한, mesangial 세포에서 고포도당의 IGF-II에 증가 작용은 본 실험결과에서 최초의 보고이다. 그렇지만 불행 이도 이러한 IGF-II의 작용은 아직까지 정확히 밝혀지고 있지 않고 있다. 향후 연구에서 밝혀져야 할 부분으로 생각되고 있다.

본 실험에서 고포도당 처리시 혈관사이세포에서 cAMP 형성을 대조군에 비해 유의성있게 증가하였다. 이 결과는 혈관사이세포에서 고포도당에 의한 collagen alpha의 전사 활성에 cAMP 및 protein kinase A의 활성화가 관여한다는 보고와 비슷한 cAMP의 관련성을 볼 수 있었다 [35]. 그러나 그들은 직접 mesangial 세포에서 고포도당 처리 시 cAMP 함량을 측정치 않았다. 우리가 아는 한 mesangial 세포에서 고포도당 처리 시 cAMP 함량 증가는 첫 보고인 것으로 알고 있다. 본 저자는 신장 근위세뇨관세포에서 고포도당에 의한  $\text{Ca}^{2+}$  uptake의 증가작용에 cAMP가 관여하여 당뇨병성 신증의 발병에 관련한다고 이미 보고하였다 [23]. 따라서 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때 신장의 mesangial 세포에서도 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비의 증가작용에 cAMP/PKA 경로가 작용하여 당뇨병성 신증의 발병에 관여할 수 있다는 가능성을 이야기 해주고 있다. Lambert 등 [16]은 배양된 마우스 배아 악관절 실질 세포에서 adenylyl cyclase/PKA 경로의 활성화는 IGF-I 수준을 증가시켰지만, IGF-II의 수준에는 영향이 없는 것으로 나타났다고 하였다. 본 실험에서 특징적인 것은 이러한 IGF-I 분비 이외에 IGF-II의 분비에도 cAMP의 신호전달계와 관련이 있다는 것을 말해주고 있다. 이는 아마 세포 특이적

(마우스 악관절 실질 세포 대 mesangial 세포)인 것으로 사료된다. 최근, IGF-I 분비는 아니지만 고포도당을 처리하였을 때 세포의 반응이 actinomycin D 또는 cycloheximide에 의해 차단되는 것을 몇몇 보고에서 보여주고 있다 [9, 14]. 본 실험에서 전사 억제제인 actinomycin D 및 번역 억제제인 cycloheximide 처리시 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비가 차단되는 것 역시 mesangial 세포의 유전자 및 단백질의 합성이 중요한 역할을 하고 있다는 것을 말해주고 있다. 어떠한 새로운 단백질의 합성이 이러한 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비를 증가 시켰는지는 현재로서는 알 수 없지만, 아마도 cAMP 경로가 활성화되어 단백질의 합성에 영향을 미치지 않았는가 추측이 된다. 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 증가작용에 이러한 cAMP이외에도 당뇨병성 신증의 발병에 관련되는 것으로 보고되고 있는  $\text{Ca}^{2+}$  같은 다른 인자들과의 관련성에 대한 실험 및 이를 상호간의 관계에 대해서도 향후 연구에 필요할 것으로 사료된다.

최근, mesangial 세포에서 세포성장의 자극은 당뇨병성 신증의 발병과 밀접한 관련이 있다고 여러 연구자들에 의해서 이루어지고 있다 [15, 34]. IGF-I 및 IGF-II가 세포성장을 촉진하는 세포성장 인자에 중추적인 역할을 담당한다는 것을 고려한다면, 고포도당 처리 시 IGF-I 및 IGF-II 합성을 증가 시켜 세포성장 촉진을 야기하여 사구체 경화증 같은 사구체 변화가 야기되어 이러한 변화가 당뇨병 신증의 발병에 관여할 수 있는 가능성을 추측하게 한다. 이에 대한 실험은 향후 연구에서 다시 연구되어져야 할 부분으로 사료된다. 본 실험에서는 이러한 adenylate cyclase/cAMP 경로가 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 합성 증가작용에 관여하는 매개체로 역할을 하는 것으로 나타났다. 이러한 연구는 향후 당뇨병성 신증의 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

## 결 론

고혈당증시 mesangial 세포의 기능이상이 야기되어 사구체 경화증을 유발하여 당뇨병 신증의 발병에 중요한 역할을 담당한다. 한편 insulin-like growth factor는 당뇨병성 신증의 발병 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 mesangial 세포에 고포도당 처리시 IGF 분비조절에 어떠한 영향이 있는지를 알아보았고 이차 전달물질의 하나인 c-AMP와의 관련성을 알아보았다.

실험결과 고포도당은 ( $> 15 \text{ mM}$ ) IGF-I 및 IGF-II 분비를 유의성 있게 증가시켰으며 이러한 작용은 포도당

특이적인 것으로 나타났다. cAMP 활성제인 8-Br-cAMP 처리결과 고포도당과 유사한 반응을 나타냈으며, 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가 작용은 adenylate cyclase 억제제, protein kinase A 억제제 및 cAMP 길항제들에 의해서 선택적으로 차단되었다. 그러나 Gi protein 억제제인 pertussis toxin에 의해서는 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가작용은 차단되지 않았다. 직접적으로 cAMP 함량을 측정한 결과 15 mM 이상의 포도당 처리 시 대조군에 비해 증가하는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 볼 때 mesangial 세포에서 고포도당은 cAMP 신호전달계를 통하여 IGF-I 및 IGF-II 분비작용을 증가시키는 것으로 나타났다.

### 참고문헌

- Bach, M. A., Chin, E. and Bondy, C. A.** The effects of subcutaneous insulin-like growth factor-I infusion in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 1994, **79**, 1040-1045.
- Berfield, A. K., Spicer, D. and Abrass, C. K.** Insulin-like growth factor I (IGF-I) induces unique effects in the cytoskeleton of cultured rat glomerular mesangial cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1997, **45**, 583-593.
- Bowsher, R. R., Lee, W. H., Apathy, J. M., O'Brien, P. J., Ferguson, A. L. and Henry, D. P.** Measurement of insulin-like growth factor-II in physiological fluids and tissues. I. An improved extraction procedure and radioimmunoassay for human and rat fluids. *Endocrinology*. 1991, **128**, 805-814.
- Chiarelli, F., Santilli, F. and Mohn, A.** Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm. Res.* 2000, **53**, 53-67.
- Cummings, E. A., Sochett, E. B., Dekker, M. G., Lawson, M. L. and Daneman, D.** Contribution of growth hormone and IGF-I to early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 1998, **47**, 1341-1346.
- Daughaday, W. H. and Rotwein, P.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structure serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.* 1989, **10**, 68-91.
- De La Puente, A., Goya, L., Ramos, S., Martin, M. A., Alvarez, C., Escrivá, F. and Pascual-Leone, A. M.** Effects of experimental diabetes on renal IGF/IGFBP system during neonatal period in the rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000, **279**, F1067-F1076.
- Elliot, S. J., Striker, L. J., Hattori, M., Yang, C. W., He, C. J., Peten, E. P. and Striker, G. E.** Mesangial cells from diabetic NOD mice constitutively secrete increased amounts of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*. 1993, **133**, 1783-1788.
- Han, H. J., Choi, H. J. and Park, S. H.** High glucose-induced inhibition of alpha-methyl-D-glucopyranoside uptake is mediated by protein kinase C-dependent activation of arachidonic acid release in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells. *J. Cell Physiol.* 2000, **183**, 355-363.
- Heo, Y. R., Kang, C. W. and Cha, Y. S.** L-Carnitine changes the levels of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in streptozotocin-induced diabetic rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2001, **47**, 329-334.
- Hirschberg, R. and Adler, S.** Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am. J. Kidney Dis.* 1998, **31**, 901-919.
- Hoog, A., Sandberg-Nordqvist, A. C., Abdel-Halim, S. M., Carlsson-Skwirut, C., Guenifi, A., Tally, M., Ostenson, C. G., Falkmer, S., Sara, V. R., Efendic, S., Schalling, M. and Grimalius, L.** Increased amounts of a high molecular weight insulin-like growth factor II (IGF-II) peptide and IGF-II messenger ribonucleic acid in pancreatic islets of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology*. 1996, **137**, 2415-2423.
- Jackson, E. K. and Dubey, R. K.** Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001, **281**, F597-F612.
- Kawanaka, K., Han, D. H., Gao, J., Nolte, L. A. and Holloszy, J. O.** Development of glucose-induced insulin resistance in muscle requires protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 20101-20107.
- Kurogi, Y.** Mesangial cell proliferation inhibitors for the treatment of proliferative glomerular disease. *Med. Res. Rev.* 2003, **23**, 15-31.
- Lambert, H. W., Weiss, E. R. and Lauder, J. M.** Activation of 5-HT receptors that stimulate the adenylyl cyclase pathway positively regulates IGF-I in cultured craniofacial mesenchymal cells. *Dev. Neurosci.* 2001, **23**, 70-77.
- Landau, D., Israel, E., Rivkis, I., Kachko, L., Schrijvers, B. F., Flyvbjerg, A., Phillip, M. and Segev, Y.** The effect of growth hormone on the development of diabetic kidney disease in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002, **17**, 107-113.

- Transplant. 2003, **18**(4), 694-702.
18. Lee, C. Y. and Henricks, D. M. Comparisons of various acidic treatments of bovine serum on insulin-like growth factor-I immunoreactive and binding activity. J. Endocrinol. 1990, **127**, 139-148.
  19. Lenz, O., Elliot, S. J. and Stetler-Stevenson, W. G. Matrix metalloproteases in renal development and disease. J. Am. Soc. Nephrol. 2000, **11**, 574-581.
  20. Miyatake, N., Shikata, K., Wada, J., Sugimoto, H., Takahashi, S. and Makino, H. Differential distribution of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetic rat kidney. Nephron. 1999, **81**, 317-323.
  21. Orchard, T. J., Chang, Y. F., Ferrell, R. E., Petro, N. and Ellis, D. E. Nephropathy in type 1 diabetes: a manifestation of insulin resistance and multiple genetic susceptibilities? Further evidence from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication Study. Kidney Int. 2002, **62**, 963-970.
  22. Park, C. W., Kim, J. H., Lee, J. H., Kim, Y. S., Ahn, H. J., Shin, Y. S., Kim, S. Y., Choi, E. J., Chang, Y. S., Bang, B. K. and Lee, J. W. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent. Diabetologia. 2000, **43**, 1544-1553.
  23. Park, S. H., Shin, S. S. and Han, H. J. High glucose levels alter angiotensin II-induced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake via PKC and cAMP pathways in renal proximal tubular cells. Kidney Blood Press Res. 2001, **24**, 84-91.
  24. Rossert, J., Terraz-Durasnel, C. and Brideau, G. Growth factors, cytokines, and renal fibrosis during the course of diabetic nephropathy. Diabetes Metab. 2000, **26**, S16-S24.
  25. Schleicher, E. D. and Weigert, C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. Kidney Int Suppl. 2000, **77**, S13-S18.
  26. Serradas, P., Goya, L., Lacorne, M., Gangnerau, M. N., Ramos, S., Alvarez, C., Pascual-Leone, A. M. and Portha, B. Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. Diabetes. 2002, **51**, 392-397.
  27. Sheetz, M. J. and King, G. L. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. JAMA. 2002, **288**, 2579-2588.
  28. Steff, M. W., Osterby, W. R., Chavers, B. and Mauer, S. M. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. Diabetes. 1998, **38**, 1077-1081.
  29. Suzuki, M., Kanazawa, A., Shiba, M., Kojima, H., and Harano, Y. Insulin resistance in diabetic microangiopathies. J. Diabetes Complications. 2000, **14**, 40-45.
  30. Symonian, M., Smogorzewski, M., Marcinkowski, W., Krol, E. and Massry, S. G. Mechanisms through which high glucose concentration raises  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in renal proximal tubular cells. Kidney Int. 1998, **54**, 1206-1213.
  31. Tack, I., Elliot, S. J., Potier, M., Rivera, A., Striker, G. E. and Striker, L. J. Autoocrine activation of the IGF-I signaling pathway in mesangial cells isolated from diabetic NOD mice. Diabetes. 2002, **51**, 182-188.
  32. Wardle, E. N. How does hyperglycaemia predispose to diabetic nephropathy? QJM. 1996, **89**, 943-951.
  33. Wi, J. K., Kim, J. K. and Youn, J. H. Mechanisms of postabsorptive hyperglycemia in streptozotocin diabetic rats. Am. J. Physiol. 1996, **270**(5 Pt 1), E752-E758.
  34. Wolf, G. Molecular mechanisms of diabetic mesangial cell hypertrophy: a proliferation of novel factors. J. Am. Soc. Nephrol. 2002, **13**, 2611-2613.
  35. Ziyadeh, F. N., Fumo, P., Rodenberger, C. H., Kuncio, G. S., and Neilson, E. G. Role of protein kinase C and cyclic AMP/protein kinase A in high glucose-stimulated transcriptional activation of collagen alpha 1 (IV) in glomerular mesangial cells. J Diabetes Complications. 1995, **9**, 255-261.