

The Regulation of Insulin-Like Growth (IGF) Factors and IGF Binding Proteins by High Glucose in Mesangial Cells

Soo-hyun Park[†]

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

It has been reported that glomerulosclerosis mediated by the dysfunction of mesangial cells and insulin-like growth factors (IGFs) are associated with the development of diabetic nephropathy. However, it is not yet known the effect of high glucose on IGF-I, -II secretion, IGF-I receptor, and IGFBPs expression in the mesangial cells. Thus, this study was conducted to examine the effect of high glucose on IGF system and its involvement of protein kinase C (PKC) and oxidative stress in mesangial cells. In this study, high glucose (25 mM) increased IGF-I and IGF-II secretion and mRNA expression ($P < 0.05$), which was blocked by PKC inhibitor (staurosporine, 10^{-8} M) and antioxidant (N-acetyl cysteine, 10^{-5} M). High glucose decreased IGFBP-1 and -2 expression but increased IGFBP-5 expression. These alteration of IGFBPs by high glucose was also prevented by staurosporine and NAC, suggesting the role of PKC and oxidative stress. Indeed, high glucose increased PKC activity. Furthermore, high glucose-induced increase of lipid peroxide (LPO) formation was blocked by PKC inhibitors. In conclusion, high glucose alters IGF system via PKC-oxidative pathways in mesangial cells.

Key Words: Diabetic nephropathy, Insulin-like growth factor system, High glucose, PKC, Oxidative stress, Mesangial cell

서 론

당뇨병은 당뇨병성 신경증 망막증 및 신증으로 구분되며 이들 중 당뇨병성 신증은 당뇨병 환자의 주요한 사망원인으로 보고되고 있으며 (Suzuki et al., 2000; Orchard, 2002), 원인으로는 고혈당증으로 알려져 있다 (Wardle, 1996; Sheetz et al., 2002). 이러한 당뇨병성 신증은 신장의 사구체에 위치한 mesangial 세포가 고포도당에 노출시 경화되어 제 기능을 하지 못하여서 유발되는 것으로 보고되고 있다 (Lenz et al., 2000, Park et al., 2000, Sheetz et al., 2002).

Insulin-like growth factors (IGFs)는 주로 간에서 분비 합성되며, IGF-I과 IGF-II로 분류되며 생체내 분열원질성 작용과 대사성 작용 (포도당 대사, 지방대사, 단백질 합성)을 나타낸다 (Hirschberg et al., 1998). 최근에는 간장 이외의 다른 장기에서의 IGFs의 조절 작용이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 이들의 작용은 각각의 수용체에 의해서 매개

되어 (Hirschberg et al., 1998), 6가지의 subtypes으로 이루어진 IGF binding proteins (IGFBPs)에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다 (Collett-Solberg et al., 2000). 특히 신장에서는 이러한 IGFs/IGFBPs system이 신장의 기능 및 발달에 관여하는 것으로 알려져 있어서 (Feld et al., 1996), 체계적인 신호전달 이론이 필요한 시기에 이르렀다. 신장의 mesangial 세포에서는 IGF-I 및 IGF-II 모두가 발현되는 것으로 알려져 있으며 이러한 IGF-I 및 IGF-II의 작용의 수용체들의 존재 역시 보고되고 있다 (Berfield et al., 1997; Tack et al., 2002). 이들 세포에서 IGFBPs는 IGFBP1부터 IGFBP5까지 종에 따라 다양하며, 특히 IGFBP 1, 2, 3 및 5가 주요한 물질인 것으로 알려져 있다 (Grellier et al., 1996; Hirschberg et al., 1998; Horney et al., 1998).

당뇨병성 신증의 발병에 활성산소가 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (Agardh et al., 2002; Obrosova et al., 2003). 당뇨병 시 mesangial 세포에서도 산화성 스트레스 증가가 관찰되었다 (Catherwood et al., 2002). 또한 1형 및 2형 당뇨병 환자의 섬유아세포 및 혈소판에서 protein kinase C (PKC)의 활성이 증가되는 것으로 보고되고 있다 (Kimura et al., 2001; Iori et al., 2003). 이러한 보고들은 당뇨병 시 PKC 및 산화성 스트레스가 중요한 역할을 한다는 것을 말해 주고 있다. 그러나 이에 대한 직접적인 연구는 아직까지 이루어 지지 않고 있다.

*논문 접수: 2004년 8월 10일

수정재접수: 2004년 9월 17일

[†]교신저자: 박수현, (우) 500-757 광주광역시 북구 용봉동 300 전남대학교 수의과대학 생리학교실
Tel: 062-530-2832, Fax: 062-062-530-2899
e-mail: parksh@chonnam.ac.kr

따라서, 본 연구자는 mesangial 세포에서 고포도당이 IGF-I 및 IGF-II 분비와 이들의 유전자에 대한 변화 및 수용체 나아가 IGFBP의 조절에 어떠한 효과가 있는지를 조사하고, 산화성 스트레스 그리고 PKC 활성화는 어떠한 관련이 있는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Dulbecco's Modified Eagle's Medium /Ham's nutrient mixture F-12 (D-MEM/F-12)와 Class IV collagenase은 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. Staurosporine, H-7, taurine, GSH, 및 N-acetyl cystein (NAC)은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Bisindolylmaleimide I는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. IGFBP-1, 2, 3 및 5 항체는 Santa cruz Biotechnologies 회사 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, Anti-human type 1 IGF 수용체 단일항체는 Gropep 회사 (Thebarton, SA 5031, Australia)로부터 주문하였다.

2. Mesangial 세포의 초대 배양

실험에 사용할 랫트를 24시간 절식시킨 다음 pentobarbital (1 ml/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 신 피질을 신장으로부터 분리하였다. 분리한 피질 조직을 가능한 세절한 다음 HBSS와 함께 30, 60 mesh에 여과시킨 후 다시 통과된 시료를 20 mesh에 여과하여 HBSS 용액에 세척하였다. 사구체가 함유되어 있는 HBSS 용액을 다시 한 번 120 x g, 30초간 원심분리하여 상층액만을 취하고 다시 1,000 x g, 1분간 원심분리시켜 침전된 시료를 채취하였다. 채취된 시료를 RPMI 1640 (Sigma)에 세척한 다음 1000 x g, 1분간 원심분리하였다. 정제된 사구체를 피막을 제거하기 위하여 collagenase (750 IU/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/cm가 되도록 분주한 다음 D-valine으로 치환된 Minimum Essential Media Eagle (Sigma)에서 5% CO₂, 95% O₂인 CO₂ 배양기에서 흔들리지 않도록 고정하여 72시간 동안 배양시킨다. 이때 D-valine 배지, HEPES, streptomycin, penicillin (100 U/ml) 0.25%, fungizon, insulin (0.013 µg/ml) 그리고 20% fetal bovine serum을 함유하도록 하고, 이후 CO₂ 배양기에 배양시켰다. 계대배양시에는 5 mM의 포도당을 함유

한 DMEM/F-12를 사용하였다.

3. 시료의 전 처리

시료 중 IGF들은 대부분 IGFBP와 결합된 형태로 존재하므로 IGFBP로부터 IGFs를 분리하기 위하여 acid-ethanol extraction (Daughaday et al., 1989)과 formic acid extraction (Bowscher et al., 1991) 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 3,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 유리 IGF-I를 함유하는 상층액 500 µl에 0.855 M trizma base를 200 µl 넣어 분석에 사용하였다. 간장, 신장 및 태반 조직은 각 조직 0.25 g에 1% trifluoroacetic 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 3,500 x g에서 15분간 4°C에서 원심분리하여 상층액 200 µl에 1.75 M trizma base 85.7 µl를 넣어 분석에 사용하였다. 이후 formic acid-acetone 추출법으로 IGFBP로부터 IGF-II를 분리하여 농도를 측정하였다.

4. IGFs 방사면역 측정법

혈청내의 IGFs 농도는 [¹²⁵I]-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 1,000배 희석시킨 polyclonal anti-IGFs 50 µl를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 시험관에 [¹²⁵I]-IGFs (20,000 cpm/100 µl)을 첨가하여 4°C에서 18시간 반응시켰다. 그 후 horse serum 50 µl와 12% polyethylene glycol #8000 (PEG) 1 ml를 첨가하여 3,000 rpm에서 30분간 원심분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter로 측정하였다.

5. Quantitative competitive reverse transcription and polymerase chain reaction (QC RT-PCR)에 의한 IGF-I/II mRNA 발현

전체 RNA는 TRI 시약 (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)을 이용하여 추출하였다. 역전사는 42°C에서 60분간 4 µg RNA 및 200 U murine leukemia virus transcriptase (GIBCO BRL Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)이 함유된 20 µl를 실시하였다. PCR 증폭은 5 µl RT 산물, 각각의

primer (10 pmol), 1.25 U Taq polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 및 1 mM dNTP을 이용하였다. 95°C에서 3분간 초기 배양 후에, 95°C (1분), 55°C (1분) and 72°C (1분)로 구성된 30 증폭 cycles를 실시하였으며 at 72°C에서 10분간 최종 extension을 실시하였다. 산물들은 ethidium bromide를 함유한 2% agarose gel을 1×TBE buffer에 전기영동 하였다. 특이 primer sets은 이미 알려진 cDNA 서열로부터 제작되었다. IGF-I sense, 5'-CAC AGG GTA TGG CTC-3' IGF-I antisense, 5'-CTT CTG GGT CTT GGG-3' IGF-II sense, 5'-CGA TGC TGG TGC TTC TCA-3' IGF-II antisense, 5'-GGG GTC TTG GGT GGG TAG-3', IGF-I 및 IGF-II 유전자 발현의 정량을 하기 위해서 결손된 internal standard를 이용하여 quantitative competitive PCR 검사를 하였다. 175 bp IGF-I PCR 산물로부터 56 bp 결손된 Internal standard of IGF-I은 Alu I로 소화를 시킨 후 T-easy PCR cloning vector (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 결합시켰다. IGF-II의 경우는 인간 476 IGF-II PCR 산물의 113 bp를 삭제한 IGF-II cDNA을 Alu I로 부분 소화시킨 후 T-easy PCR cloning vector를 이용하였다. 이들 standards는 같은 primer들로 증폭을 시켰고 copy수는 internal standard와 밴드의 발현 비교로 결정하였다.

6. Lipid peroxide 형성

Confluent한 mesangial 세포에서 LPO 형성은 malonaldehyde의 양으로 측정하였으며, 간략히 요약하면 다음과 같다. 세포들을 수확한 후 초음파로 세포를 분쇄한 후, 반응용액 [8% SDS 100 µl, 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA) 200 µl, 20% acetic acid 200 µl]을 넣은 후 95°C에서 60분간 반응시켰다. 이후, 얼음으로 차게 한 물에 식힌 후, 비특이적인 적색 색소를 제거하기 위하여 n-butanol-pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수합하였다. 이 시료를 spectrofluometry (emission 파장 553 nm, excitation 파장 515 nm)로 측정하여 nmol/mg protein으로 표시하였다.

7. Western immunoblotting

배지를 제거한 mesangial 세포를 Phosphate buffered saline으로 2번씩 세척한 후, 각기 150 µl의 lysis buffer (10×PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 0.01 M PMSF, 10 mg/ml Leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A)를 처리하여 균질화를 시켰다. 균질화된 세포를 tube에 옮긴 후, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 저장하였다. Bradford 단백질 정량법을 이용하여 각각 60 µg의 sample들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 blocking을 시켰고, 각각의 항체 (anti-human type 1 IGF 수용

체 단일 클론 항체, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 및 IGFBP-5 항체)를 1% skim milk에 5,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% Tween-20/1×TBS에 10분 간격으로 3번 세척 하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 incubating한 후, 3번 washing을 거쳐서 ECL 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

8. Protein kinase C 측정

세포를 완충액 A [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose, 0.2 mM CaCl₂, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 mM benzamide]으로 균질화한 후 EDTA를 첨가하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상층액을 취해 100,000 g 로 1시간 동안 원심분리하여 상층액 (cytosolic fraction)을 수거하여 냉장 보관하였다. 이 때 침전된 부분을 완충액 B [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.25 M sucrose, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100]으로 부유시킨 후 냉소에서 20분간 보관한 후 100,000 g로 다시 원심분리하여 상층액 (membrane fraction)을 수거하였다. 이렇게 수거된 부분은 먼저 단백질을 측정한 후 각 5 µg씩을 채취하여 실시하였다. PKC의 양은 Amersham에서 구입한 PKC assay system (RPN 77)을 이용하여 실시하였다.

9. 통계처리

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

결 과

1. 고포도당의 IGF-I 및 IGF-II 분비 및 유전자에 대한 효과

IGF-I 분비에 대한 고포도당의 효과를 알아보기 위하여, mesangial 세포에 다양한 시간 (0~72 hr) 및 농도 (5~50 mM)의 포도당을 처리한 후 IGF-I 분비효과를 관찰하였다. Fig. 1A에서와 같이 25 mM 포도당을 8시간 이상 처리 시 IGF-I 분비가 유의성 있게 증가되었으며 48시간 이상에서 최고를 보였다. 이후 더 이상 증가 작용은 인정되지 않았다. 15 mM 이상의 포도당 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가 작용을 보였으며 25 mM 이상에서 이러한 작용은 더욱더 현저하게 나타났다 (Fig. 1B). 따라서 본 실험에서는 고혈당의 조건을 유지하기 위하여 25 mM 포도당을 72시간 처리하였다. 고포도당의 IGF-I 분비 작용에 PKC와의 관련성에 대해 알

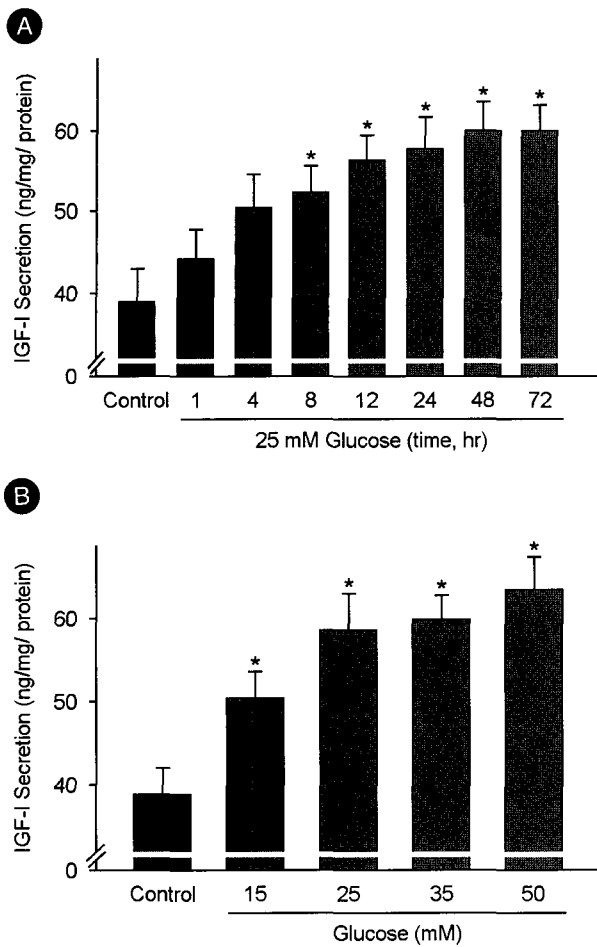


Fig. 1. Time course (A) and dose response curve (B) of high glucose on IGF-I secretion. Mesangial cells were incubated with 25 mM glucose at different time intervals (0 to 72 hr) or different dosage of glucose (5 to 50 mM). Values are means \pm S.E. of 12 separate experiments performed on 4 different cultures. * P <0.05 vs. control.

아보기 위하여 PKC 억제제인 staurosporine (10^{-8} M)을 고포도당 처리 30분 전에 전 처리한 결과 고포도당에 의한 IGF-I 분비를 차단 시켰다 (Fig. 2A). 이러한 변화는 IGF-II의 경우에도 같은 양상을 볼 수 있었다 (Fig. 2B). 나아가, 산화성 스트레스와의 관련성을 알아보기 위하여 항산화제인 NAC (10^{-5} M)을 전 처리한 결과 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가작용이 차단되는 것으로 나타났다.

한편, 고포도당에 의한 유전자 발현의 변화를 알아보기 위하여 QC-RT-PCR을 이용하여 측정하여 본 결과 고포도당 군에서 IGF-I 및 IGF-II mRNA 발현의 증가를 볼 수 있었다 (Fig. 3). 고포도당에 의한 IGF-I 및 -II mRNA 발현 증가는 역시 PKC 억제제 및 항산화제에 의해서 차단되는 것으로 보아 PKC 및 산화성 스트레스가 역시 강력히 관여하고 있음을 시사해 주고 있다.

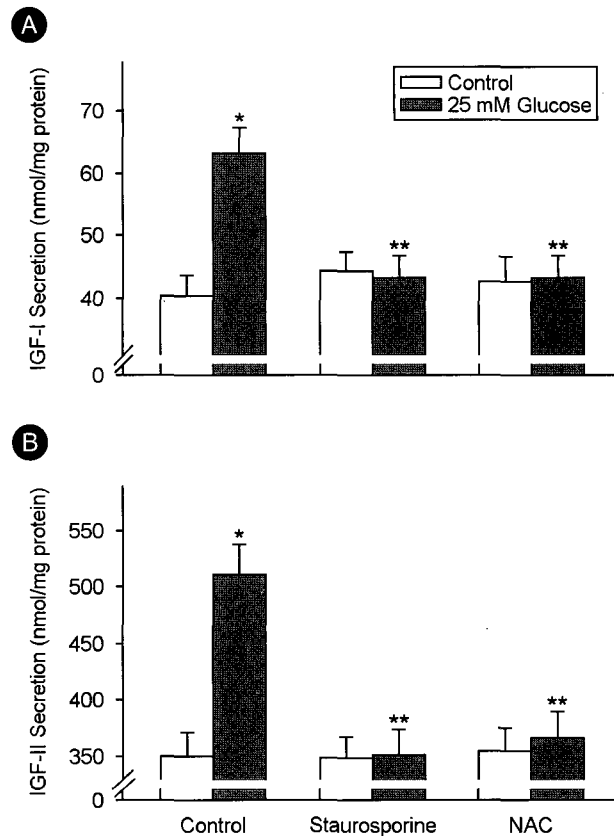


Fig. 2. Effect of PKC inhibitor and antioxidant on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were incubated with staurosporine (10^{-8} M) or NAC (10^{-5} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 72 hr. Values are means \pm S.E. of 12 separate experiments performed on 4 different cultures. * P <0.05 vs. control, ** P <0.05 vs. 25 mM glucose.

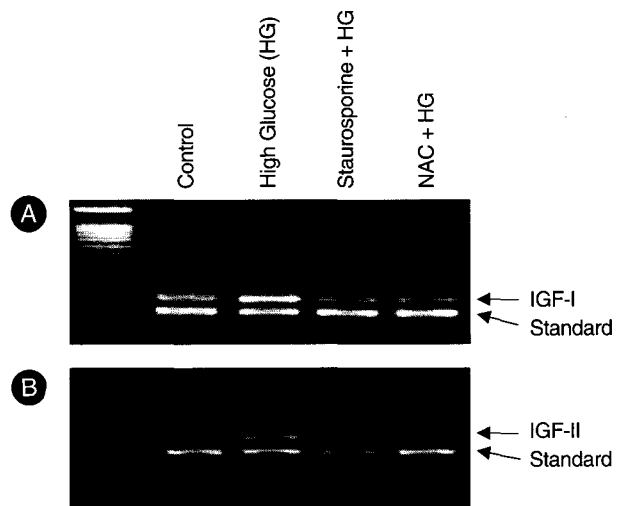


Fig. 3. Effect of high glucose on IGF-I mRNA (A) and IGF-II mRNA (B). Mesangial cells were incubated with staurosporine (10^{-8} M) or NAC (10^{-5} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 72 hr.

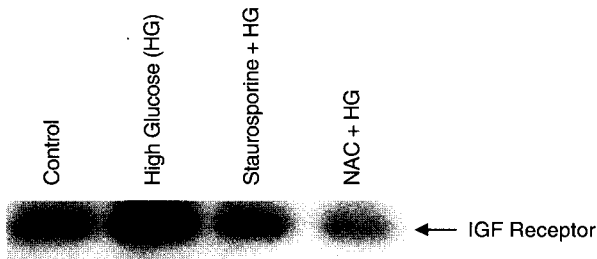


Fig. 4. Effect of high glucose on IGF-I receptor expression. Mesangial cells were incubated with staurosporine (10^{-8} M) or NAC (10^{-5} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 72 hr.

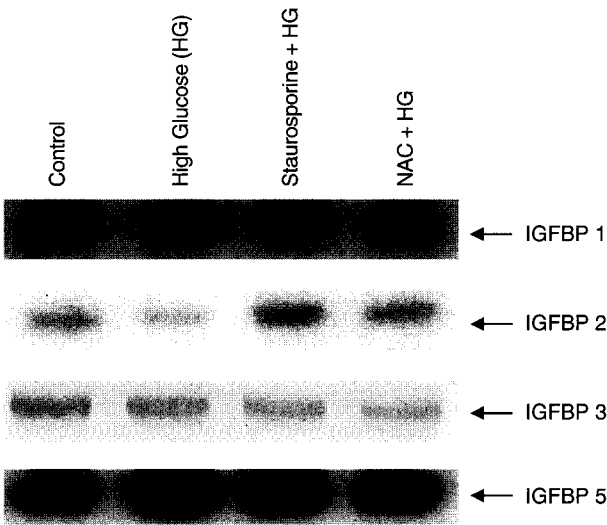


Fig. 5. Effect of high glucose on IGF binding proteins. Mesangial cells were incubated with staurosporine (10^{-8} M) or NAC (10^{-5} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 72 hr.

2. 고포도당의 IGF-I 수용체 및 IGFBP의 발현 변화

고포도당에 의한 IGF-I 수용체의 발현에 어떠한 변화가 있는지를 알아보기 위해 Western immunoblotting을 실시한 결과 고포도당 군에서 현저한 IGF-I 수용체의 발현이 증가하였으며 이러한 작용은 PKC 억제제인 staurosporine 및 항산화제인 NAC 처리 시 역시 차단되는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 한편 고포도당에 의한 IGFBPs의 발현 정도를 알아본 결과 mesangial 세포에서는 IGFBP-1, -2, -3 및 -5를 발현이 되는 것으로 나타났다. 고포도당은 IGFBP-1 및 IGFBP-2의 발현을 억제하는 것으로 나타났으나 IGFBP-5의 경우는 오히려 증가시키는 것으로 나타났다. 이에 반하여 IGFBP-3의 경우는 대조군과 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다 (Fig. 5). 이러한 고포도당에 의한 IGFBPs의 발현 작용 역시 PKC 억제제 및 항산화제에 의해서 차단되는 것으로 나타났다. 고포도당을 직접적으로 처리하여 PKC 활성도를 측정된 결과

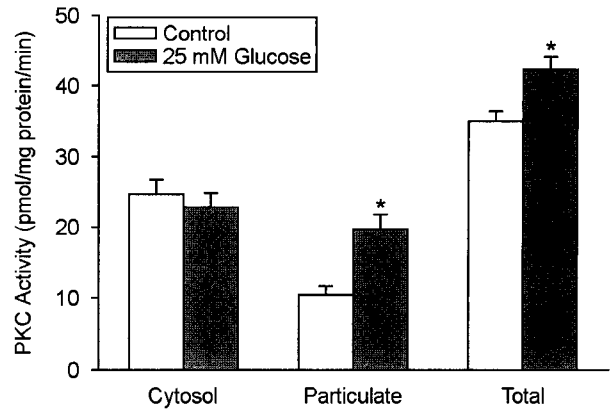


Fig. 6. Effect of high glucose on PKC activity. Mesangial cells were separated to cytosolic and membrane fraction after the incubation of high glucose for 72 hr. Values are means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control.

고포도당 처리군에서 세포질에서 세포막으로의 PKC 활성도 이동을 관찰할 수 있었다 (Fig. 6). 한편 산화성 스트레스와 PKC와의 상관관계를 살펴보기 위하여 고포도당을 처리하여 Lipid peroxide (LPO) 형성을 측정하였다. 실험 결과 고포도당에 의한 LPO 형성 증가는 항산화제들에 의해 선택적으로 억제 되었으며 (Fig. 7A), PKC 억제제들 역시 고포도당에 의한 LPO 형성을 차단하는 것으로 나타났다 (Fig. 7B). 이는 PKC 활성이 고포도당에 의한 산화성 스트레스 증가에 관여하고 있음을 말해주고 있다.

고 찰

본 실험에서 고포도당 처리 시 mesangial 세포의 IGF-I 분비에 현저한 증가 작용을 보였다. 이러한 결과는 streptozotocin으로 유도된 당뇨병 수컷 랫트의 신장에서도 IGF-I이 증가한다는 보고와 일치하였다 (Miyatake et al., 1999). Elliot 등 (Elliot et al., 1993)에 의한 Non-Obese Diabetic (NOD) 마우스에서 분리한 mesangial 세포에서 IGF-I가 증가한다는 결과와도 동일하였다. 더욱이 본 실험에서는 고포도당이 IGF-I 및 IGF-II mRNA 유전자 발현을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 당뇨병 랫트에서 신장의 IGF-I mRNA 발현이 감소하였다는 보고들 (Flyvbjerg et al., 1990; Landau et al., 1995)과는 상충된 결과다. 하지만 몇몇 연구자들 역시 본 실험과 같이 당뇨병 랫트에서 신장의 IGF-I mRNA의 발현이 증가하였다고 보고하였다 (Werner et al., 1990; Bach et al., 1991). 이에 대한 정확한 이유는 지금으로써는 알 수 없지만 아마 개체 특이성인 것으로 사료된다. 본 실험에서의 이전의 보고 (Heo et al., 2003)의 경우 전사 및 단백질 합성 억제 시에 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비가 차단되었다는

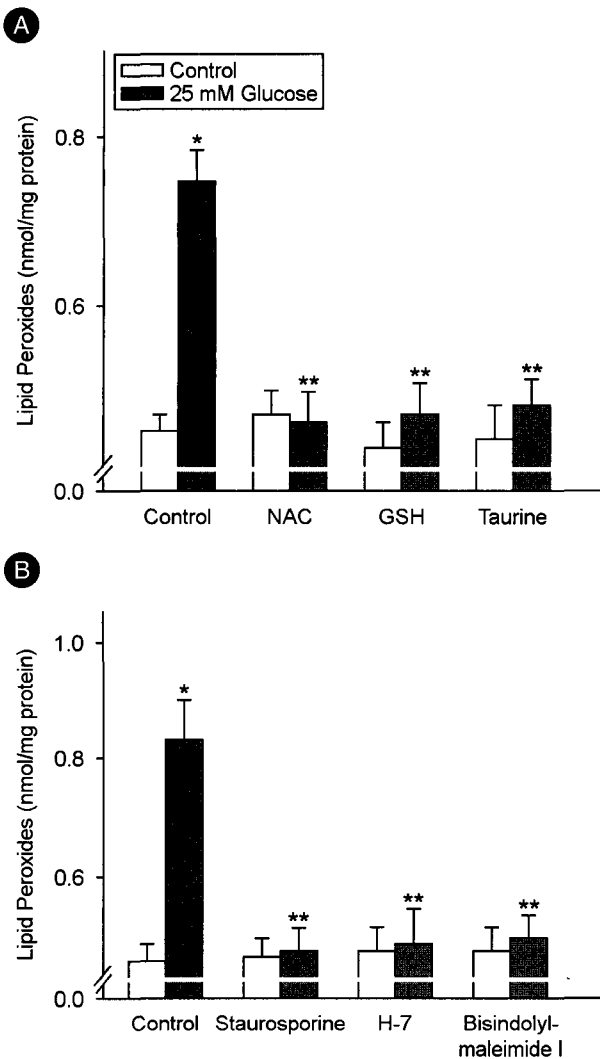


Fig. 7. Effect of PKC inhibitors on high glucose-induced increase of LPO formation. Mesangial cells were incubated with NAC (10^{-5} M), GSH (10^{-5} M), taurine (2 mM), staurosporine (10^{-8} M), H-7 (10^{-5} M), or bisindolylmaleimide I (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 72 hr. Values are means \pm S.E. of 12 separate experiments performed on 4 different cultures. * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. 25 mM glucose.

결과를 직접적으로 뒷받침해 주는 자료로 사료된다. 본 실험 결과는 신장의 중요한 구성성분으로 여과 기능을 담당하는 사구체의 주요한 세포인 mesangial 세포에서의 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 유전자 발현의 증가를 통해 이들의 단백질 분비 증가가 당뇨병성 신증의 발병에 기여할 수 있음을 시사해 준다.

고포도당은 생체내 여러 신호전달에 변화를 일으킨다. 그 중 산화성 스트레스의 증가는 당뇨병에서 신증을 포함한 여러 미세 혈관계의 합병증을 유발하는데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Ha et al., 2000). 고포도당에 의한 산화성 스트레스는 polyol 경로를 통해 내인성 항산화 물질의 감

소와 autoxidation, glycooxidation 등의 활성으로 reactive oxygen species가 증가되어 유발된다 (Cameron et al., 2000). 본 실험 결과에서도 mesangial 세포에 고포도당 처리 시 LPO의 생성이 증가되어 IGFs의 분비 증가에 영향을 주고 있는 것으로 관찰되었다.

Koya 등 (1998)은 고혈당증은 단구세포에서 diacylglycerol (DAG)/PKC 경로를 활성화시키고, 이들의 활성화는 STZ에 의해 유도된 당뇨 랫트의 망막, 대동맥, 심장 및 사구체와 고포도당 조건에 배양되는 혈관세포나 조직에서 현저히 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서도 비록 세포의 차이는 있지만 고포도당 처리 시 PKC 활성화도가 세포질에서보다 세포막에서 증가하는 것이 관찰되었고, total PKC 활성화 또한 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이는 또한 Whiteside 등 (2002)이 보고한 당뇨 랫트의 사구체와 초대 배양된 mesangial 세포에서의 PKC 활성화도가 증가한다는 보고와 일치하는 결과라고 볼 수 있겠다.

IGF-I 수용체는 IGF-I 및 IGF-II의 반응을 매개하는 수용체이다. 본 실험에서 고포도당 처리 시 IGF-I 수용체의 발현이 증가하였다. 이는 IGF-I의 수용체의 발현이 당뇨병성 신증의 발병에 중요한 역할을 한다는 것을 말해주는데 IGF-I 수용체 길항제가 당뇨병 랫트의 신장 비대를 억제하였다는 보고 (Haylor et al., 2000)로 미루어 볼 때 고포도당에 의한 IGF-I 수용체의 발현 증가가 당뇨병성 신증의 발병에 관여하고 있을 것으로 사료된다. 이러한 고포도당에 의한 IGF-I 수용체 발현 증가 역시 PKC 및 산화성 스트레스가 관여하고 있음을 관찰할 수 있었다.

IGFBPs는 IGFs를 조절하는 인자들이다. 본 실험에서 당뇨병 시 IGFBP-1의 증가는 당뇨병 상황시 신생 랫트에서 신장의 IGFBP-1의 증가를 보고한 결과와 일치하여 mesangial 세포에서의 IGFBP-1 증가가 부분적으로 관여하고 있음을 보여주었다 (De La Puente et al., 2000). 그러나 그들은 IGFBP-1 이외에도 IGFBP-2도 함께 증가하였다고 하여 본 실험 결과와는 다른 결과를 보고하였다. 이는 아마 신생아 또는 성숙의 차이 뿐만 아니라 *in vivo* 및 *in vitro*의 차이에 기인할 것으로 사료된다. Horney 등 (1998)은 mesangial 세포에서 고포도당 처리 시 IGFBP-2 수준은 감소한다고 하여서 본 실험 결과와 일치함을 보였다. 특히 본 실험에서 고포도당 처리 시 IGFBP-5의 현저한 증가는 본 연구자가 최초의 보고인 것으로 사료된다. 특히 이러한 IGFBP-5의 현저한 증가는 PKC에 의해서 조절되는 것으로 나타났다. 이 결과는 mesangial 세포에서 PKC 활성화가 IGFBP-5의 세포이동 촉진 효과를 나타내었다는 보고에 근거할 때 당뇨병성 신증에서도 mesangial 세포에서 PKC 활성화에 의한 IGFBP-5의 이동의 가능성을 시사해준다 (Berfield et al., 1997).

여러 연구자들은 고포도당과 산화성 스트레스의 관계에

PKC 경로가 관여하는 것으로 보고하고 있다 (Koya et al., 1998; Park et al., 2000; Cameron et al., 2002). 본 실험 결과에서도 mesangial 세포에 PKC 억제제를 처리하였을 때는 LPO의 생성이 억제되는 것을 관찰하였다. 즉 고포도당 처리 시 산화성 스트레스는 PKC 경로를 통해 증가되고 있음을 추정할 수 있다. 이는 즉, mesangial 세포에서 고포도당에 의한 IGFs의 분비 조절에 PKC 활성화에 의한 산화성 스트레스의 증가가 연관되고 있음을 시사하고 있다. 특히 본 실험에서는 고포도당에 의한 PKC의 활성화가 산화성 스트레스의 증가를 유도하여 IGF-I 수용체의 발현 및 IGFbPs의 발현에도 관여하고 있다는 것을 말해주고 있다. 본 연구자가 아는 한, 이러한 결과는 최초의 보고라고 할 수 있다. 결론적으로 고포도당은 PKC-산화성 스트레스의 연속 신호전달계를 통하여 IGF system에 영향을 미쳐 사구체 경화증을 유도하여 당뇨병 신증의 발병에 관여할 것으로 추측된다. 이러한 연구는 향후 당뇨병성 신증의 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국 학술진흥재단 2002년도 신진교수연구과제 (KRF-2002-003-E00159)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사 드립니다

REFERENCES

- Agardh CD, Stenram U, Torffvit O, Agardh E. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. *J Diabetes Complications*. 2002. 16: 395-400.
- Bach LA, Stevenson JL, Allen TJ, Jerums G, Herington AC. Kidney insulin-like growth factor-I mRNA levels are increased in postpubertal diabetic rats. *J Endocrinol*. 1991. 129: 5-10.
- Berfield AK, Spicer D, Abrass CK. 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 RR, Lee WH, Apathy JM, O'Brien PJ, Ferguson AL, Henry DP. 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.
- Cameron NE, Cotter MA. Effects of protein kinase C β inhibition on neurovascular dysfunction in diabetic rats: interaction with oxidative stress and essential fatty acid dysmetabolism. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002. 18: 315-323.
- Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int*. 2002. 61: 599-608.
- Collett-Solberg PF, Cohen P. Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine*. 2000. 12: 121-136.
- Daughaday WH, 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 MA, Alvarez C, Escriba F, Pascual-Leone AM. 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 SJ, Striker LJ, Hattori M, Yang CW, He CJ, Peten EP, Striker GE. Mesangial cells from diabetic NOD mice constitutively secrete increased amounts of insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*. 1993. 133: 1783-1788.
- Feld SM, Hirschberg R. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding proteins in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1996. 10: 355-358.
- Flyvbjerg A, Frystyk J, Marshall SM. Additive increase in kidney insulin-like growth factor I and initial renal enlargement in uninephrectomized-diabetic rats. *Horm Metab Res*. 1990. 22: 516-520.
- Grellier P, Sabbah M, Fouqueray B, Woodruff K, Yee D, Abboud HE, Abboud SL. Characterization of insulin-like growth factor binding proteins and regulation of IGFbP3 in human mesangial cells. *Kidney Int*. 1996. 49: 1071-1078.
- Ha HJ, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int*. 2000. 58: S19-S25.
- Haylor J, Hickling H, El Eter E, Moir A, Oldroyd S, Hardisty C, El Nahas A. JB3, an IGF-I receptor antagonist, inhibits early renal growth in diabetic and uninephrectomized rats. *J Am Soc Nephrol*. 2000. 11: 2027-2035.
- Heo JS, Kang CW, Han HJ, Park SH. The regulatory mechanism of Insulin like growth factor secretion by high glucose in mesangial cell: Involvement of cAMP. *Kor J Vet Sci*. 2003. 43: 563-571.
- Hirschberg R, Adler S. Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis*. 1998. 31: 901-919.
- Horney MJ, Shirley DW, Kurtz DT, Rosenzweig SA. Elevated glucose increases mesangial cell sensitivity to insulin-like

- growth factor I. *Am J Physiol.* 1998. 274: F1045-F1053.
- Iori E, Marescotti MC, Vedovato M, Ceolotto G, Avogaro A, Tiengo A, Del Prato S, Trevisan R. In situ protein Kinase C activity is increased in cultured fibroblasts from Type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia* 2003. 46: 524-530.
- Kimura M, Ishizawa M, Miura A, Itaya S, Kanoh Y, Yasuda K, Uno Y, Morita H, Ishizuka T. Platelet protein kinase C isoform content in type 2 diabetes complicated with retinopathy and nephropathy. *Platelets.* 2001. 12: 138-143.
- Koya D, King G. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 1998. 47: 859-866.
- Landau D, Chin E, Bondy C, Domene H, Roberts CT Jr, Gronbaek H, Flyvbjerg A, LeRoith D. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in the rat kidney: effects of long-term diabetes. *Endocrinology.* 1995. 136: 1835-1842.
- Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000. 11: 574-581.
- Miyatake N, Shikata K, Wada J, Sugimoto H, Takahashi S, Makino H. Differential distribution of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in experimental diabetic rat kidney. *Nephron.* 1999. 81: 317-323.
- Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* 2003. 34: 186-195.
- Orchard TJ, Chang YF, Ferrell RE, Petro N, Ellis DE. 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.
- Park CW, Kim JH, Lee JH, Kim YS, Ahn HJ, Shin YS, Kim SY, Choi EJ, Chang YS, Bang BK, Lee JW. 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.
- Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA.* 2002. 288: 2579-2588.
- Suzuki M, Kanazawa A, Shiba M, Kojima H, Harano Y. Insulin resistance in diabetic microangiopathies. *J Diabetes Complications.* 2000. 14: 40-45.
- Tack I, Elliot SJ, Potier M, Rivera A, Striker GE, Striker LJ. Autocrine activation of the IGF-I signaling pathway in mesangial cells isolated from diabetic NOD mice. *Diabetes.* 2002. 51: 182-188.
- Wardle EN. How does hyperglycaemia predispose to diabetic nephropathy? *QJM.* 1996. 89: 943-951.
- Werner H, Shen-Orr Z, Stannard B, Burguera B, Roberts CT Jr, LeRoith D. Experimental diabetes increases insulin like growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes* 1990. 39: 1490-1497.
- Whiteside CI, Dlugosz JA. Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in the diabetic milieu. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002. 282: F975-F980.