

## 백서 사구체 상피세포에서 방사선에 의한 Fibronectin, Pai-1, MMP 발현의 변화

충북대학교 의과대학 방사선종양학교실\*, 소아과학교실<sup>†</sup>, 의학연구소<sup>‡</sup>  
서울대학교 의과대학 방사선종양학교실<sup>§</sup>, 충남대학교 의과대학 방사선종양학교실<sup>||</sup>

박우윤\*<sup>†</sup> · 김원동\*<sup>†</sup> · 정 영\*<sup>†</sup> · 하태선<sup>†</sup><sup>‡</sup> · 김재성<sup>§</sup> · 조문준<sup>||</sup>

**목적:** 방사선에 의한 신장손상은 궁극적으로 신장 섬유화로 인한 신부전으로 나타나며 여기에는 세포외기질의 변화가 동반된다. 방사선 신장손상에서 신사구체 상피세포의 역할을 알아보기 위하여 방사선에 의한 세포외기질과 연관된 여러 유전자 발현의 변화를 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법:** 백서 사구체 상피세포(rat glomerular epithelial cell; GEpC)에 6 MV 선형가속기(Siemens, USA)를 이용하여 0, 2, 5, 10, 20 Gy의 단일 방사선량을 조사한 후 각각 6, 24, 48, 72시간에 시료를 채취하였다. Northern blot, Western blot, zymography를 이용하여 fibronectin (Fn), plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1), matrix metalloproteinases-2, 9 (MMP-2, 9), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2), tissue-type plasminogen activator (t-PA), urokinase-type plasminogen activator (u-PA)의 발현을 측정하였다.

**결과:** GEpC에 대한 10 Gy 단일 방사선 조사후 24시간부터 Fn mRNA가 유의한 증가를 나타냈으며 48시간에 측정된 Fn 단백질은 5, 10 Gy의 방사선량에서 유의하게 증가되었다. 방사선조사에 의해서 Pai-1 유전자의 발현도 mRNA 및 단백질 단계에서 증가되었으며, 특히 10 Gy 조사 후 24, 48시간에 측정된 mRNA의 증가는 통계적으로 유의하였다. GEpC에 방사선조사 후 24시간에 측정된 MMP-2 활성형은 방사선량에 따라 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 그밖의 MMP-9, TIMP-2, t-PA와 u-PA는 아무런 변화를 나타내지 않았다.

**결론:** 방사선에 의하여 GEpC에서 세포외 기질과 관련된 유전자 발현의 변화가 관찰되었으며 이는 방사선 신장손상에 GEpC가 관여함을 나타낸다.

**핵심용어:** 백서 사구체 상피세포, 방사선, Fibronectin, Pai-1, MMP

### 서론

방사선 신장병증에 의한 특징적인 초기 기능 변화는 사구체 여과율(GFR)의 저하이며, 이는 형태학적 변화가 나타나기 전부터 시작되는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 사구체 상피세포 중 내장(visceral)세포는 모세혈관 내피세포를 둘러싸고 있는 기저막의 형성에 관여하며, 족세포로서 모세혈관간의 연결망을 형성하고, 벽측(parietal)세포는 Bowman 낭을 형성한다. 따라서 사구체의 구성 세포 중 상피세포가

사구체 여과율을 결정하는 중요한 역할을 담당하게 되고 방사선 신장병증 초기에 관여할 것으로 추론할 수 있으나 이에 대한 보고는 아직 없다. 사구체 상피세포는 정상적으로 거의 증식을 하지 않지만 손상을 받으면, 즉 발달형 사구체신염, 초점성 구역성 경화증, 악성 고혈압, 실험성 막신병증 등에서 세포외 기질의 증가와 함께 증식하는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 또한 일부 보고에 의하면 사구체 상피세포는 세포외 기질 분해에 중요한 역할을 담당하는 matrix metalloproteinases (MMP) 중 72 KDa의 type IV collagenase (MMP-2, gelatinase A)와 92 KDa의 type IV collagenase (MMP-9, gelatinase B)를 분비하는 것으로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 72 KDa의 잠재형(latent form) zymogen이 68 KDa의 활성형 MMP-2로 전환되는데에는 plasminogen activator (PA)/plasmin system의 도움이 필요하다. Plasmin은 강력한 serine protease로서 MMP의 활성화뿐만 아니라, 세포외 기질의 분해와 섬

이 논문은 2005년 12월 1일 접수하여 2006년 3월 7일 채택되었음.  
이 논문은 2000년도 원자력 연구개발사업(기초연구분야)의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.  
책임저자: 박우윤, 충북대학교 의과대학 방사선종양학교실  
Tel: 043)269-6376, Fax: 043)269-6387  
E-mail: wynpark@chungbuk.ac.kr

유소분해에 중요한 역할을 하며 섬유화 유도 사이토카인인 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )의 latency-associated peptide (LAP)를 분해하여 잠재형의 TGF- $\beta$ 를 활성형 TGF- $\beta$ 로 전환시키는데에도 관여한다.<sup>3)</sup> Zymogen형태의 plasminogen으로부터 plasmin의 생성은 역시 활성인자와 억제인자의 조절을 받는다. 활성인자로는 tissue-type plasminogen activator (t-PA)와 urokinase-type plasminogen activator (u-PA)가 알려져 있으며 억제인자로는 Pai-1이 중요한 것으로 알려져 있는 plasminogen activator inhibitor family가 있다.<sup>3)</sup> 한편 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)라는 자연적으로 존재하는 특정 억제인자는 MMP에 비공유 결합을 함으로써 MMP의 활성을 억제한다.<sup>4)</sup> 사구체 상피세포는 MMP-2, 9 이외에도 상기에 언급한 세포외 기질의 생성 및 분해에 관여하는 여러 매개물질, 즉 fibronectin (Fn), TGF- $\beta$ , plasminogen, plasminogen activator (t-PA, u-PA)를 생성하며 그들의 수용체도 갖고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>5-7)</sup>

이렇듯 사구체 상피세포가 세포외 기질의 생성 및 분해에 중요한 역할을 담당할 개연성이 있으며 방사선 신장 병증에서 사구체 병변이 동반됨을 감안할 때 방사선 신장 손상 기전에 있어서 신 사구체 상피세포의 역할을 검증하는 것은 의미있는 일이라 생각한다.

## 대상 및 방법

### 1. 백서 사구체 상피세포의 배양

Kreisberg<sup>8)</sup>가 성상을 확인하고 공여한 백서 사구체 상피세포(GEpC)를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% 공기 상태에서 배양하여 실험에 이용하였다. 유지배양액으로는 RPMI 1640에 10%의 fetal bovine serum, Hepes, L-glutamine, insulin 그리고 항생제를 혼합한 용액을 사용하였고 실험에는 plateau phase의 세포를 사용하였다.

### 2. 방사선 조사 및 시료의 채취

실온에서 6 MV 선형가속기(Siemens, Mevatron, USA)를 이용하여 후방조사로 세포가 위치한 기저면에 최고 흡수선량이 위치하게 하고, 10 cm 두께의 아크릴판을 세포배양 접시 위에 올려놓아 후방산란을 받도록 하였다. 혈청에 의한 뒷배경을 줄이고 세포를 plateau phase로 유지시키기 위하여 방사선 조사 24시간 전부터는 혈청 제거 배양액을 이용하였다. 0, 2, 5, 10, 20 Gy의 단일 방사선량을 조사한 후 세포배양기에 원위치시킨 다음 각각 6, 24, 48, 72시간에 시료를 채취하였다. 대조군의 세포에는 가짜 방사선조사(sham irradiation)를 실시하였다. 예비실험 결과 배양액의

혈청 유무에 따르는 유전자 발현 차이는 없었다.

### 3. Northern blot analysis

Total RNA의 추출은 Tri-Zol (Life Technologies Inc, USA)을 사용하여 acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform법으로 시행하였다. 15  $\mu$ g의 RNA를 2.5% formaldehyde와 1  $\times$  3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)가 포함된 1.2% agarose gel (Amresco, USA)에서 전기영동을 실시하였다. NyPlon membrane (Hybond-N+, Amersham, USA)에 전기영동된 RNA를 전이시킨 후 Hybrisol I (Oncor, USA) 용액으로 Prehybridization하고  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-labeled DNA probe가 들어간 Hybrisol I 용액으로 12~16시간 동안 50°C에서 hybridization하였다. Membrane을 상온에서 2  $\times$  SSPE, 0.5% SDS 용액으로 15분간 2번 세척하고 0.1  $\times$  SSPE 용액으로 65°C에서 15분간 2번 세척한 후 autoradiography를 실시하였다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)로 reprobe하여 장전된 RNA양을 보정하였다. 결과는 Scion image analyzer (Scion inc, USA)를 이용한 농도계로 분석하고, 실험은 3회 반복 시행하였다. 각각의 probe에 대한 정량화는 probe optical density (OD)를 GAPDH OD로 나누어 계산하였고 방사선 조사에 의한 mRNA 발현 변화는 대조군에 대한 비로 나타내었다.

### 4. cDNA probe

Northern blot에 사용한 fibronectin, Pai-1의 cDNA probe는 미국 아이오와 대학교의 Mike Robbins 교수로부터 공여받아 사용하였다. Fibronectin probe는 270 bp가 pGEM2 vector의 EcoRI과 HindIII site에 삽입된 p-SR270 clone을 사용하였고 Pai-1 probe는 400 bp가 pBluescript SK (-) vector의 SacI과 HindIII site에 삽입된 pSKPAI53 clone을 사용하였다. GAPDH probe는 total RNA로부터 reverse transcription을 실시한 후 sense primer (5'-ccctcaagattgtcagcaatg-3')와 antisense primer (5'-gtcctcagtgtagccaggat-3')로 30번의 PCR를 실시하여 410 bp의 PCR 산물을 얻고 이를 pGEM-T easy vector (Promega, USA)의 EcoRI site에 cloning시켜 실험에 이용하였다.

### 5. Western blot

대조군과 방사선 조사군에서 정해진 시점에 conditioned medium을 취한 후 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 각각의 시료를 Centricon concentrator (MW 10) (Amicon, USA)를 이용하여 농축한 후 단백질 농도를 Bradford의 방법에 따라 측정하였다. 단백질 20  $\mu$ g에 해당하는 conditioned me-

dium을 12.5% polyacrylamide mini-gel에서 100 V로 1시간 30분 동안 전기영동하고 ECL nitrocellulose membrane (Amersham, USA)에 전이시켰다. 1차 항체 goat polyclonal anti fibronectin (Calbiochem, USA 1 : 1,000 dilution), goat polyclonal anti TIMP-2 (Santa Cruz, USA 1 : 1,000 dilution), goat polyclonal anti Pai-1 (Santa Cruz, USA 1 : 1,000 dilution)과 4°C에서 12시간 반응시킨 후 2차 항체 rabbit anti goat IgG horseradish peroxidase conjugate (Calbiochem, USA 1 : 10,000 dilution)와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 세척 후 ECL chemiluminescence substrate (ECL, Amersham, USA)와 상온에서 1분간 반응시킨 후 Kodak X-film에 10초 내지 2분간 노출시켜 현상하였다. 필름에 보이는 비특이적 단백질의 띠로 장전된 단백질의 양을 보정하였다. 단백질 발현 정도는 Scion image analyzer (Scion inc, USA)를 이용한 농도계로 분석하였고 실험은 3회 반복 시행하였다. 방사선 조사에 의한 단백질 발현 변화는 대조군에 대한 비로 나타내었다.

## 6. Zymography

Zymogram은 비환원상태에서, polyacrylamide gel로 분리된 효소의 단백질 분해능력을 측정할 수 있는 유용한 전기영동방법이다.<sup>9)</sup> SDS는 MMP의 잠재형을 활성화시키므로 zymography로 MMP의 잠재형과 활성형을 모두 측정할 수 있다. 즉 gel 제작시 젤라틴을 copolymerization시키고 MMP를 분리시킨 다음 SDS를 제거하고 완충액에서 gel을 배양하여 renatured enzyme이 기질을 분해하게 하는 것이다. MMP 잠재형은 denaturation과 renaturation 과정을 거치며 활성화되기 때문에 잠재형과 활성형의 선명한 띠가 zymogram에 모두 나타나게 된다. 젤라틴 용해능을 측정하기 위해 1 mg/ml의 젤라틴(Sigma, USA) 기질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 prepolymerize시켰다. 10 µg 단백질에 상응하는 conditioned medium과 같은 부피의 시료 완충액(62.5 mM Tris/ HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 2~3 drops of saturated bromophenol blue)을 혼합하여 120 V에서 1~2시간 전기영동하였다. Gel에서 Triton-X로 SDS를 제거한 다음 현상 완충액(50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)에 넣어 37°C에서 12시간 배양하였다. 25% isopropanol/10% acetic acid와 0.25% Coomassie blue에서 30분 동안 gel을 염색한 다음 10% methanol/10% acetic acid가 들어있는 탈염색 용액에서 용액이 깨끗해질 때까지 세척하였다. 젤라틴 용해능은 gel의 과란색 바탕에 투명한 띠로 나타났다. Plasminogen activator의 활성도를 측정하기 위해서는 SDS-polyacrylamide gelatin gel을 만들 때 10 µg/ml의 plasmi-

nogen을 첨가하였다. Conditioned medium을 동량의 시료 완충액과 혼합하여 전기영동한 후 SDS를 제거한 다음 배양 완충액(50 mM glycine-NaOH (pH 8.3)/10 mM EDTA) 용액에 넣어 37°C에서 24시간 배양하였다. 염색 및 탈색과정을 거치면 u-PA와 t-PA의 활성도가 약 40과 60 kDa 위치에 투명한 띠로 나타났다.<sup>9)</sup> 배양 완충액에 포함된 EDTA가 MMP를 억제하므로 PA의 활성도를 간접적으로 측정할 수 있는 것이다. 즉 PA 활성도가 있는 곳에서는 endogenous plasminogen이 plasmin으로 전환되며 이 plasmin이 gel에 포함된 젤라틴 기질을 분해하여 투명한 띠를 생성한다. 각각의 투명한 띠는 Scion image analyzer (Scion inc, USA)를 이용한 농도계로 측정하였고, 실험은 3회 반복 시행하였다. 방사선 조사에 의한 효소의 단백질 분해능의 변화는 대조군에 대한 비로 나타내었다.

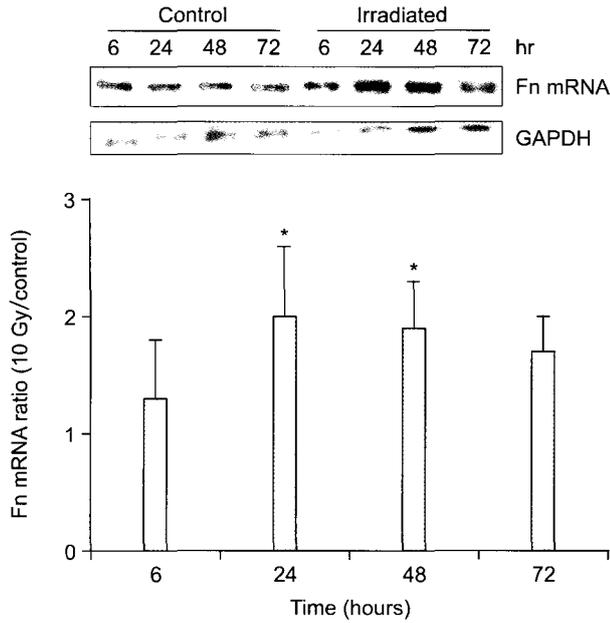
## 7. 통계분석

방사선 조사군과 대조군간의 통계적 분석은 단변량 Student's t-test를 사용하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

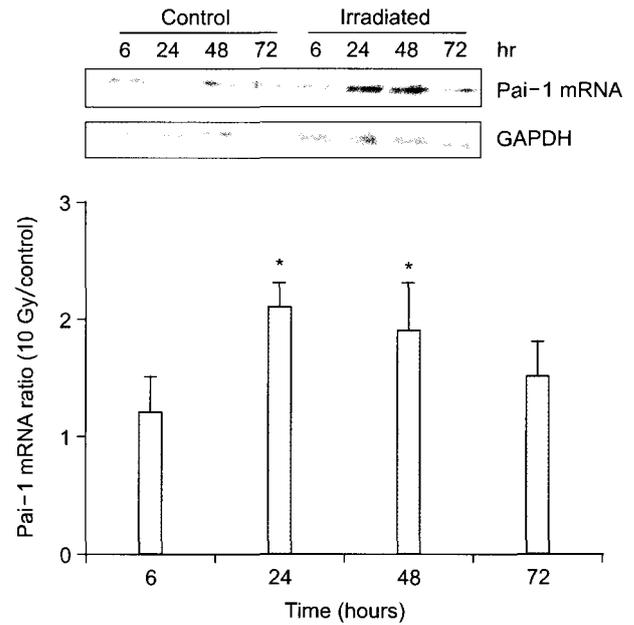
## 결 과

### 1. 방사선 조사가 Fn, Pai-1의 발현에 미치는 영향

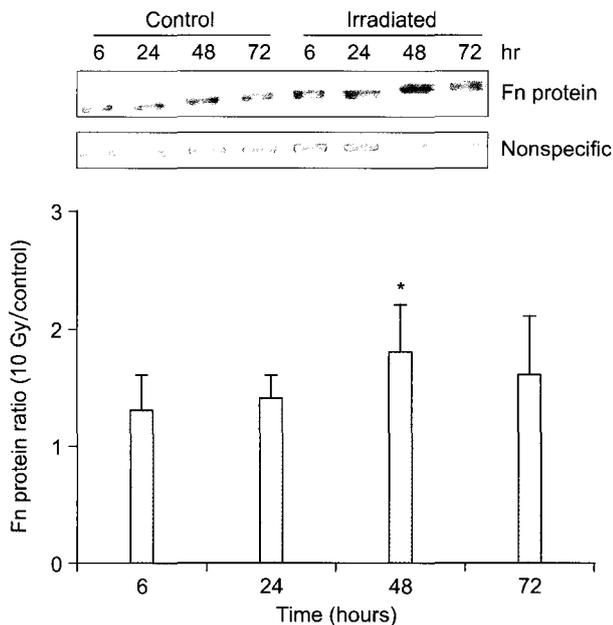
백서 plateau phase GEPC에 대한 2~20 Gy 단일 방사선 조사는 Fn mRNA의 증가를 나타냈다. 10 Gy 조사시 대조군과 비교하여 mRNA의 증가는 24시간(2.0±0.6)에 최고치를 나타냈으며 이러한 증가는 48시간(1.9±0.4)까지 유지되었다(p<0.05)(Fig. 1). 2, 5, 10, 20 Gy의 방사선 조사 후 24시간에 densitometer로 분석한 Fn mRNA의 양은 대조군에 비해서 각각 1.1±0.4, 1.4±0.3, 2.0±0.6, 1.6±0.5배 높았으며 10 Gy에서의 증가는 통계학적으로 의미 있었다(p<0.05). 방사선 조사에 의한 Fn mRNA의 증가가 단백질 발현단계에서도 나타나는지 알아보기 위하여 western blot을 실시하였다. Fn 단백질의 발현이 방사선 조사군과 대조군 모두에서 48시간 후까지 증가하였지만 방사선 조사군에서의 증가가 더욱 현저하였다. 10 Gy의 방사선 조사 후 48시간에 Fn 단백질 양을 densitometer로 분석한 결과 대조군에 비해서 1.8±0.4배 높았으며 이는 통계학적으로 유의하였다(p<0.05)(Fig. 2). 방사선량에 따라 48시간에 측정된 Fn 단백질 양은 5, 10 Gy에서 약 1.8배 증가하였으며 통계학적으로 유의하였다(p<0.05). 즉 방사선 조사가 사구체 간질의 중요 구성 성분인 Fn 발현을 mRNA와 단백질 단계에서 모두 증가시킴을 알 수 있었다.



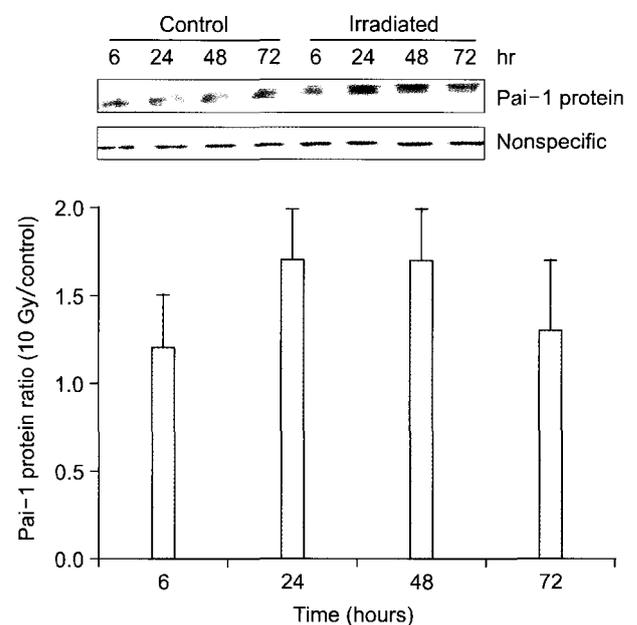
**Fig. 1.** Upper panel shows a representative blot demonstrating that radiation (10 Gy) increases the level of fibronectin mRNA determined in GEpC in a time dependent manner. Lower panel shows the densitometric quantification of GEpC fibronectin mRNA after irradiation (10 Gy) compared with that determined in control cells (Mean±SE; n=3; \*p<0.05).



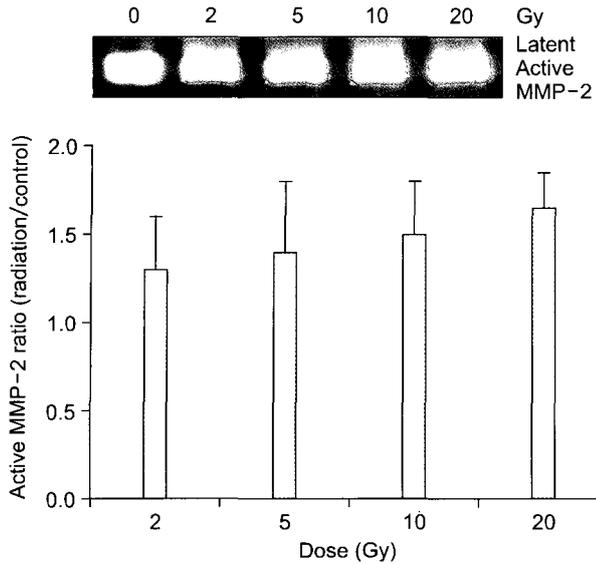
**Fig. 3.** Upper panel shows a representative blot demonstrating that radiation (10 Gy) increases the level of Pai-1 mRNA determined in GEpC in a time dependent manner. Lower panel shows the densitometric quantification of GEpC Pai-1 mRNA after irradiation (10 Gy) compared with that determined in control cells (Mean±SE; n=3; \*p<0.05).



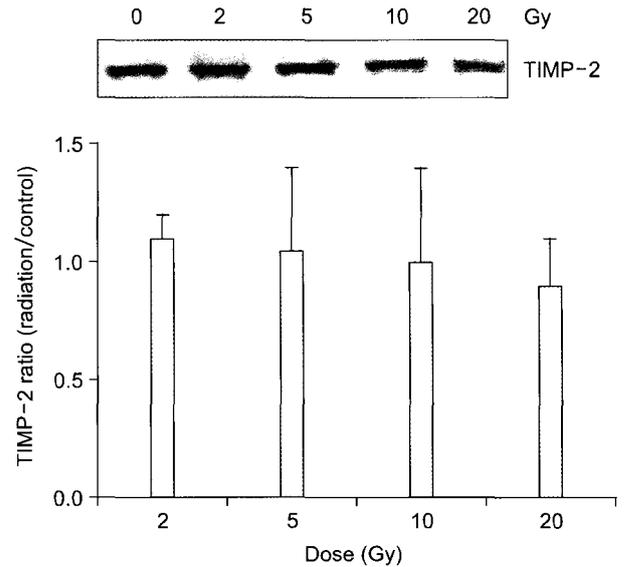
**Fig. 2.** Upper panel shows a representative blot demonstrating that radiation (10 Gy) increases the level of fibronectin immunoreactive protein determined in GEpC conditioned medium in a time dependent manner. Lower panel shows the densitometric quantification of GEpC fibronectin immunoreactive protein after irradiation (10 Gy) compared with that determined in control cells (Mean±SE; n=3; \*p<0.05).



**Fig. 4.** Upper panel shows a representative blot demonstrating that radiation (10 Gy) increases the level of Pai-1 immunoreactive protein determined in GEpC conditioned medium in a time dependent manner. Lower panel shows the densitometric quantification of GEpC Pai-1 immunoreactive protein after irradiation (10 Gy) compared with that determined in control cells (Mean±SE; n=3).



**Fig. 5.** Upper panel shows a representative zymogram of GEPC conditioned medium collected 24 hours after (sham) irradiation which reveals the presence of bands corresponding to latent and active MMP-2. The level of active MMP-2 present in GEPC conditioned medium increases in a radiation dose dependent manner. Lower panel shows the densitometric quantification of active MMP-2 determined in conditioned medium from GEPC irradiated with 2~20 Gy. Data are expressed relative to densitometric values measured in control sham irradiated cells (Mean  $\pm$  SE; n=3).



**Fig. 6.** Upper panel shows a representative blot demonstrating that irradiating GEPC with 2~20 Gy fails to alter the amount of TIMP-2 secreted into the medium 24 hours postirradiation. Lower panel shows the densitometric quantification of TIMP-2 immunoreactive protein determined in conditioned medium from GEPC irradiated with 2~20 Gy. Data are expressed relative to densitometric values measured in control sham irradiated cells (Mean  $\pm$  SE; n=3).

방사선 조사에 의해서 Pai-1 유전자 발현도 증가하였다. 이러한 증가의 시간적 변화를 관찰한 결과 10 Gy의 단일조사 실시한 경우 6시간부터 Pai-1 mRNA가 증가하기 시작하여 방사선 조사 후 24시간에 최고치에 도달했으며 이러한 증가는 48시간까지 유지되었다. Northern blot 결과를 densitometer로 정량한 결과 24, 48시간에 Pai-1 mRNA는 대조군에 비해서 각각  $2.1 \pm 0.2$ ,  $1.9 \pm 0.4$ 배 높았고 통계학적으로 유의하였다( $p < 0.05$ )(Fig. 3). 한편 2~20 Gy 방사선 조사 후 24시간에 측정된 Pai-1 mRNA의 양은 대조군에 비해서 모두 증가하였고 특히 10 Gy에서 2.1배의 유의한 증가를 나타내었으나 방사선량과의 선형적 관계는 없었다. 방사선 조사에 의한 Pai-1 발현 변화는 단백질에서도 나타났다. 10 Gy의 방사선을 조사한 후 24, 48시간에 Pai-1 단백질의 양이 1.7배 증가하였으나 대조군에 비해서 통계학적으로 유의하지는 못했다( $p > 0.05$ )(Fig. 4). 방사선량에 따라 24시간에 측정된 Pai-1 단백질의 양도 모두 증가하였으나 방사선량과는 무관하였고 통계학적으로 유의하지 않았다.

## 2. 방사선 조사가 MMP-2 및 MMP-9의 젤라틴 분해능에 미치는 영향

대조군의 conditioned medium에서 zymography를 시행한

결과 2개의 투명 띠를 볼 수 있었다. 약한 92 KDa, MMP-9의 띠가 관찰되었으며 그 이외에 분자량 72 KDa와 68 KDa의 좀 더 진한 띠가 관찰되었다. 이것은 MMP-2 중 잠재형(72 KDa)과 활성형(68 KDa)에 해당된다. 이러한 MMP의 활성화는 MMP 특이적 억제제인 EDTA로 처리했을 때 젤라틴 단백 분해능이 완전히 소실됨을 관찰함으로써 투명 띠가 MMP에 의해서 생긴 것임을 확인할 수 있었다. 사구체 상피세포에 10 Gy의 방사선을 조사한 후 6시간부터 MMP-2 활성형의 분비가 증가하였으며 48시간까지 그 상태를 유지하였다. 또한 24시간 후에 측정된 MMP-2 활성형은 방사선량에 따라 증가하였으며 10 및 20 Gy에서는 대조군에 비해서  $1.5 \pm 0.3$ ,  $1.6 \pm 0.2$ 배 각각 높았으나 통계학적으로 유의성은 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 5). 한편 사구체 상피세포에서 방사선 조사 후 MMP-9의 배양액으로의 분비는 변화가 없었다. MMP 세포의 활성화는 전사단계의 활성화, 잠재형에서 활성형으로의 전환 외에도 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)와 같은 특이적 억제제에 의해 조절을 받으므로 TIMP-2의 변화를 살펴보았다. 2~20 Gy의 방사선 조사 후 24시간에 측정된 TIMP-2는 대조군과 비교시 차이가 없었다( $p > 0.05$ )(Fig. 6). 마찬가지로 t-PA와 u-PA도 indirect zymography상 아무런 변화를 나타내지 않았다.

## 고안 및 결론

사구체 상피세포는 오래전부터 방사선에 민감한 표적 세포로 알려져 왔으나 방사선 신장병증에서의 정확한 역할에 대해서는 아직 불확실하다. 전통적으로 방사선 신장병증 기전은 사구체 상피세포, 그밖의 사구체 간질, 세뇨관 상피세포 또는 혈관 내피세포 등 표적 세포 집단 내의 클론 형성 세포(clonogen) 수의 감소로 인식되어 왔고 6~12개월의 잠복기는 서서히 분열하는 표적 세포 특성에 의한 것으로 해석되어 왔다.<sup>10)</sup> 그러나 최근의 연구 결과들은 신장 구성 여러 세포들이 신원의 손상과 회복에 관여하는 생물학적 매개물질의 자가분비(autocrine), 측분비(paracrine) 또는 내분비(endocrine)의 대상으로 작용할 개연성을 제시하고 있으며 이는 클론 형성 세포 생존의 관점이 아니라 세포 표현형의 다양한 변화를 파악하는 데 연구의 초점을 모으게 하여 손상의 임상적 발현 전에 치료적 접근 가능성을 열어두게 하였다.<sup>11,12)</sup> 현재 방사선 신장병증의 사구체 경화 기전은 세포의 기질 축적을 야기하는 사구체 구성 세포 표현형의 변화 때문으로 생각되고 있다.<sup>12)</sup> 그 중 특히 사구체 상피세포는 과거로부터 사구체 세포의 기질 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 즉 섬유화 유도 사이토카인인 TGF- $\beta$ 1 및 interleukin-7 등을 스스로 생산하거나 외부의 자극에 의해서 생산해 내며 또한 여러 세포의 기질 성분, 즉 fibronectin, laminin B2, perlecan, collagen IV alpha 1 등의 생산에 직접적으로 관여한다.<sup>5,6)</sup> 또한 사구체 상피세포는 세포의 기질 분해에 관여하는 MMP-2 (72 KDa) type IV collagenase 및 MMP-9 (92 KDa) type IV collagenase 등의 matrix metalloproteinase 등을 분비하고<sup>2)</sup> t-PA, u-PA, plasminogen/plasmin 및 그들의 수용체를 발현한다.<sup>5-7)</sup>

방사선 조사에 의한 사구체 상피세포에서의 fibronectin 증가는 mRNA 뿐만 아니라 단백질 발현 단계에서도 나타났으며 세포의 기질 분해능이 동반하여 상승하지 않는다면 사구체 간질의 양은 증가될 것이다. Fibronectin은 사구체 간질의 중요 구성 성분으로 만성 신질환에서 대부분 증가하는 경향이 있으나 각각의 기질 구성 성분에 미치는 방사선의 영향에 대해서는 알려진 바가 많지 않다.<sup>13)</sup> 현재까지 방사선 조사를 받은 백서 사구체 간질세포<sup>14)</sup>와 폐에서 fibronectin이 증가하였다는 보고가 있으며<sup>15)</sup> 특히 방사선 조사 후 피하 섬유화가 일어난 돼지의 섬유아세포에서 fibronectin의 생성량이 정상 섬유아세포에 비해 2배 이상 증가하였다는 보고가 있다.<sup>16)</sup> 그밖에 Wang 등<sup>17)</sup>은 쥐의 사

구체 간질세포에서 방사선에 의한 fibronectin mRNA의 증가를, collagen type I, III mRNA의 변화 없음을 보고하였으며, Woloschak 등<sup>18)</sup>은 고선량률의 중성자나 감마선을 Syrian hamster embryo에 조사한 1시간 후에 fibronectin mRNA의 증등도의 증가를 보고하였다. 한편 Zhao 등<sup>12)</sup>이 세뇨관 상피세포를 대상으로 한 실험에서는 collagen type I mRNA는 방사선량에 따라 의미있게 증가하였고 collagen type III mRNA는 약간 상승하였으며 fibronectin mRNA는 변화가 없었다. 이러한 결과는 세포 및 조직의 종류에 따라, 방사선이 세포의 기질 구성 성분 유전자의 발현에 다양한 영향을 미침을 알려준다.

사구체 상피세포에서의 방사선 조사는, 통계학적으로 유의하게 Pai-1 mRNA를 증가시켰으며 이는 Pai-1 단백질의 증가로 이어졌다. 일반적으로 Pai-1의 생성은 전사단계에서 조절되는 것으로 생각되고 있으며 생성 후 곧 분비되는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> Zhao 등<sup>14)</sup>은 백서 사구체 간질세포에서는, 본 실험의 결과와 동일하게 Pai-1 mRNA, 단백질의 동시 증가를 보고하였으나, 세뇨관 상피세포에서는 Pai-1 mRNA만의 증가를 보고하였고 이러한 증가가 단백질 발현 단계에서는 관찰되지 않았다고 하였다.<sup>12)</sup> Oikawa 등<sup>19)</sup>의 보고에 의하면 이러한 Pai-1 유전자의 발현 증가는 in vivo 신장 조사에서도 나타난다. 즉 백서 신장에 12 Gy의 방사선 조사 후 12주 후에 피질에서 얻은 RNA의 Northern blot 분석에 의하면 9배의 Pai-1 mRNA 증가가 있었으며 in situ hybridization으로 관찰한 결과 Pai-1 발현이 사구체 경화, 간질분해, 모세혈관 혈전부위에서 나타났다. 더욱이 Angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI, captopril or enalapril)나 angiotensin II type-1 (AT1) 수용체 길항제(AIIRA, L158,809) 등의 주입으로 Pai-1의 발현이 감소하고 따라서 사구체 반흔을 경감시켰다. 이는 방사선 신장병증의 사구체 반흔 및 경화 발생에 Pai-1이 중요한 역할을 함을 암시하나 아직 이러한 가설을 입증하기 위하여는 실험적 자료의 축적이 더 필요하리라 생각한다. 그 외에 PA/plasmin system에 대한 보고로 PA 활성도는 정상 백서 사구체 상피세포<sup>7)</sup>와 간질세포<sup>14)</sup> 모두에서 관찰되는 것으로 알려져 있으며 우 대동맥 내피세포에 방사선 조사 시 세포배양액에서 PA 활성도는 감소하고 세포 내 PA 활성도는 증가한다고 한다.<sup>20)</sup> 또 Sawaya 등<sup>21)</sup>은 12 Gy의 단일 방사선 조사 후 12시간 후에 쥐의 성상세포(astrocyte)에서 세포 내 t-PA의 활성도가 증가하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에 사용한 사구체 상피세포에서는, Zhao 등의 사구체 간질세포<sup>14)</sup>와 세뇨관 상피세포<sup>12)</sup>에서의 보고와 마찬가지로 방사선 조사 후, indirect zymography를 통하여 측정된 세포의 PA 활성

도에 변화가 없었다. 이는 사구체 상피세포에서 PA 활성화 변화없이 Pai-1 발현 증가가 일어남으로써 기질 분해억제, 즉 기질 축적 방향으로 PA/plasmin system의 균형이 기울어지게 됨을 의미한다. 즉 Pai-1 발현증가는 plasmin 감소 및 이로 인한 MMP 활성화 억제를 유도함으로써 섬유소분해 및 사구체 간질 분해를 더욱 감소시키게 된다.

본 실험에 사용한 대조군 사구체 상피세포는 주로 MMP-2를 분비하였으며 소량의 MMP-9도 분비하였다. 방사선 조사군에서는 방사선량에 비례하여 활성형 MMP-2가 증가되었으나 통계학적인 유의성은 갖지 못했으며 MMP-9은 변화가 없었다. 이러한 선택적인 MMP-2의 증가는 백서 사구체 간질세포, 세뇨관 상피세포에서도 보고된 바 있으며,<sup>12,14)</sup> MMP의 종류에 따라 서로 다른 조절기전이 작용하고 있음을 암시한다. 한편 MMP-2의 세포외 분비증가는 방사선 조사 48시간 후 백서 정상세포에서도 관찰되었으나 이때는 활성형보다는 잠재형이 증가하였으며<sup>21)</sup> 방사선 조사된 돼지 섬유아세포에서는 MMP-2 잠재형의 양이 정상 섬유아세포에서와 별 차이가 없었다.<sup>22)</sup> 방사선에 의한 이러한 MMP-2 활성화 증가는 교원질 분해능의 증가를 시사하며 이는 사구체 간질 축적에 대한 일종의 방어기전의 하나일 수도 있다. 최근의 실험에서는 세포외 기질 균형이 단순한 기질성분 증가 및 단백 분해능에 의해서만 결정되는 것은 아니라는 보고가 있다. 즉 특발성 확장 심장근병 환자의 심근에서는 증가된 교원질과 MMP를 동시에 관찰할 수 있으며 이는 기질의 아주 섬세한 변화가 병적상태를 야기할 수 있음을 나타낸다.<sup>23)</sup> 또한 zymography의 결과만으로 젤라틴 분해능의 증가를 확증할 수 없는 바 이는 첨가되는 SDS가 TIMP-active MMP-2 complex를 분해시키기 때문이다.<sup>4)</sup> 따라서 72 KDa과 68 KDa 띠의 정량화는 특이적 억제 과정을 무시한 전반적인 MMP-2 활성화만을 반영하게 된다.

현재 인형 사구체 간질세포,<sup>24)</sup> 세뇨관 상피세포<sup>12)</sup>가 TIMP1, TIMP2의 mRNA와 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있고 일부 사구체 병변, 신 섬유화에서 TIMP-1 증가와 관련된 실험적, 임상적 보고가 있으나 사구체 상피세포에서의 발현여부 및 TIMP-2에 대하여는 아직 그리 알려진 바가 없다. 한편 pro-MMP-2의 활성화가 TIMP-2/MIT-1-MMP complex에 의해서 세포 표면에서 이루어진다는 가설이 있으며 이는 사구체 간질 조절에 있어서 TIMP-2의 중재적 역할이 있음을 시사한다. 그러나 과도한 양의 TIMP-2는 오히려 이러한 활성화를 억제하는 것으로 되어 있으며<sup>25)</sup> 특히 방사선 조사에 의한 TIMP-2 발현 변화에 대해서는 그 자료가 제한적이며 일치하지 않는다. 방사선 섬유화된 돼지 피부의 섬유아세포에서는 TIMP mRNA가 증가하였으나 인형의 섬유

아세포에서는 오히려 그 발현이 감소되었으며<sup>22)</sup> Zhao 등<sup>14)</sup>의 보고에 따르면 방사선 조사 후 백서 사구체 간질세포에서는 TIMP-2 분비가 증가되었으나 세뇨관 상피세포에서는 변화가 없었다.<sup>12)</sup> 본 실험의 사구체 상피세포에서도 방사선에 의한 TIMP-2의 변화는 관찰되지 않았으며 TIMP-2의 생물학적 중요성에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

결론적으로 본 연구는 방사선 조사가 백서 사구체 상피세포에서 세포외 기질의 생성, 축적, 분해, 전환의 역동적 균형에 장애를 초래할 수 있음을 알려준다. 그러나 방사선에 의한 사구체 상피세포에서의 유전자 표현형 변화의 기본적 기전은 좀더 밝혀져야 하며 이러한 결과가 임상적인 방사선 신장병증의 발현과 진행에 적용되기 위해서는 보다 장기간의 연구가 필요하리라 생각된다. 즉 본 연구에서의 Fn, Pai-1 증가는 방사선 조사 후 수 일 내에 일어나지만 생체 내에서의 기능적, 형태학적 변화는 수 주가 지난 후 관찰되며, 이러한 유전자의 변화는 실제 임상에서 행해지는 분할조사의 경우보다 *in vitro* 실험에 흔히 쓰이는 고선량의 단일 방사선 조사 시에 더욱 현격히 나타나기 때문이다. 그러나 이러한 단점에도 불구하고 본 연구에서 얻어진 결과와 타 연구자들에 의해 사구체 간질세포 및 모세혈관에서 얻어진 연구 결과를 종합하면 방사선 신장병증의 기전을 보다 명확하게 이해할 수 있게 될 것이다.

### 참 고 문 헌

1. Avioli LV, Lazor MZ, Cotlove E, Brace KC, Andrews JR. Early effects of radiation on renal function in man. *Amer J Med* 1963;34:329-337
2. McMillan JI, Riordan JW, Couser WG, Pollock AS, Lovett DH. Characterization of a glomerular epithelial cell metalloproteinase as matrix metalloproteinase-9 with enhanced expression in a model of membranous nephropathy. *J Clin Invest* 1996;97:1094-1101
3. Odekon LE, Blasi F, Rifkin DB. Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF-beta to TGF-beta. *J Cell Physiol* 1994;158:398-407
4. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4: 197-250
5. Mentzel S, Van Son JP, De Jong AS, et al. Mouse glomerular epithelial cells in culture with features of podocytes in vivo express aminopeptidase A and angiotensinogen but not other components of the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephro* 1997;8:706-719
6. van Det NF, Verhagen NA, Tamsma JT, et al. Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor-beta by high glucose, not by angiotensin II. *Diabetes* 1997;46:834-840

7. **Adler S.** Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *Am J Pathol* 1992;141:571-578
8. **Kreisberg JI, Karnovsky MJ.** Glomerular cells in culture. *Kidney Int* 1983;23:439-447
9. **Seftor EA.** Electrophoretic analysis of proteins associated with tumor cell invasion. *Electrophoresis* 1999;15:454-462
10. **Stewart FA.** Radiation nephropathy after abdominal irradiation or total body irradiation. *Radiat Res* 1995;143:235-237
11. **Weichselbaum RR, Hallahan D, Fuks Z, Kufe D.** Radiation induction of immediate early genes: effectors of the radiation-stress response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:229-234
12. **Zhao W, O'Malley Y, Wei S, Robbins ME.** Irradiation of rat tubule epithelial cells alters the expression of gene products associated with the synthesis and degradation of extracellular matrix. *Int J Radiat Biol* 2000;76:391-402
13. **Robbins ME, O'Malley Y, Zhao W, Davis CS, Bonsib SM.** The role of the tubulointerstitium in radiation-induced renal fibrosis. *Radiat Res* 2001;155:481-489
14. **Zhao W, O'Malley Y, Robbins MEC.** Irradiation of rat mesangial cells alters the expression of gene products associated with the development of renal fibrosis. *Radiat Res* 1999;152:160-169
15. **Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R, Rubin P.** Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;28:621-631
16. **Wegrowski J, Remy J, Martin M, Lafuma C.** Fibronectin and glycosaminoglycan synthesis by fibrotic pig fibroblasts in primary culture. *Connect Tissue Res* 1989;23:237-249
17. **Wang J, Robbins MEC.** Radiation-induced alteration of rat mesangial cell transforming growth factor-beta and expression of the genes associated with the extracellular matrix. *Radiat Res* 1996;146:561-568
18. **Woloschak GE, Felcher P, Chang-Liu CM.** Expression of cytoskeletal and matrix genes following exposure to ionizing radiation: dose-rate effects and protein synthesis requirements. *Cancer Lett* 1995;92:135-141
19. **Oikawa T, Freeman M, Lo W, Vaughan DE, Fogo A.** Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. *Kidney Int* 1997;51:164-172
20. **Ts'ao C, Ward WF.** Acute radiation effects on the content and release of plasminogen activator activity in cultured aortic endothelial cells. *Radiat Res* 1985;101:394-401
21. **Sawaya R, Tofilon PJ, Mohanam S, et al.** Induction of tissue-type plasminogen activator and 72-kDa type-IV collagenase by ionizing radiation in rat astrocytes. *Int J Cancer* 1994;56:214-218
22. **Lafuma C, El Nabout RA, Crechet F, Hovnanian A, Martin M.** Expression of 72-kDa gelatinase (MMP-2), collagenase (MMP-1), and tissue metalloproteinase inhibitor (TIMP) in primary pig skin fibroblast cultures derived from radiation-induced skin fibrosis. *J Invest Dermatol* 1994;102:945-950
23. **Gunja-Smith Z, Morales AR, Romanelli R, Woessner JF Jr.** Remodeling of human myocardial collagen in idiopathic dilated cardiomyopathy: role of metalloproteinases and pyridinoline cross-links. *Am J Pathol* 1996;148:1639-1648
24. **Carome MA, Striker LJ, Peten EP, et al.** Human glomeruli express TIMP-1 mRNA and TIMP-2 protein and mRNA. *Am J Physiol* 1993;264:F923-F929
25. **Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, et al.** The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase receptor regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A: a kinetic study. *J Biol Chem* 1998;273:871-880

---

*Abstract*

---

## **Radiation Induced Changes in the Expression of Fibronectin, Pai-1, MMP in Rat Glomerular Epithelial Cell**

Woo Yoon Park, M.D.\*<sup>†</sup>, Won Dong Kim, M.D.\*<sup>†</sup>, Ying Zheng\*<sup>†</sup>, Tae Sun Ha, M.D.<sup>†</sup>,  
Jae Sung Kim, M.D.<sup>§</sup> and Moon June Cho, M.D.<sup>||</sup>

Departments of \*Radiation Oncology and <sup>†</sup>Pediatrics, College of Medicine and <sup>†</sup>Medical Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, <sup>§</sup>Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, <sup>||</sup>Department of Radiation Oncology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

**Purpose:** Renal irradiation can lead to the development of radiation nephropathy, and this is characterized by the accumulation of extracellular matrix and final fibrosis. To determine the possible role of the glomerular epithelial cell, the radiation-induced changes in the expression of its genes associated with the extracellular matrix were analyzed.

**Materials and Methods:** Rat glomerular epithelial cells (GEpC) were irradiated with a single dose of 0, 2, 5, 10 and 20 Gy with using 6 MV LINAC (Siemens, USA), and the samples were collected 6, 24, 48 and 72 hours post-irradiation, respectively. Northern blotting, western blotting and zymography were used to measure the expression level of fibronectin (Fn), plasminogen activator inhibitor-1 (Pai-1), matrix metalloproteinases-2, 9 (MMP-2, 9), tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), tissue-type plasminogen activator (t-PA) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA).

**Results:** Irradiation with a single dose of 10 Gy resulted in a significant increase in Fn mRNA since 24 hours post-irradiation, and a single dose of 5 and 10 Gy significantly increased the Fn immunoreactive protein measured 48 hours post-irradiation. An increase in Pai-1 mRNA and protein was also observed and especially, a single dose of 10 Gy significantly increased the mRNA measured 24 and 48 hours post-irradiation. The active MMP-2 measured 24 hours post-irradiation slightly increased in a dose dependent manner, but this increase did not reach statistical significance. The levels of MMP-9, TIMP-2, t-PA and u-PA appeared unaltered after irradiation.

**Conclusion:** Irradiation of the glomerular epithelial cells altered the expression of genes associated with the extracellular matrix, implying that the glomerular epithelial cell may be involved in the development of radiation nephropathy.

---

**Key Words:** Rat glomerular epithelial cell, Radiation, Fibronectin, Pai-1, MMP