

## The Signaling Pathways Involved in High Glucose-Induced Secretion of Insulin-Like Growth Factors (IGFs) and IGF Binding Proteins in Podocytes

Sul-ki Lim, Ho-jae Han and Soo-hyun Park<sup>†</sup>

Bio-therapy Human Resources Center, Department of Veterinary Physiology,  
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

It has been reported that the dysfunctions of podocytes are associated with the development of diabetic nephropathy. In addition, insulin-like growth factors (IGFs) are associated with the development of diabetic nephropathy. However, it is not yet known about the effect of high glucose on IGF-I, -II secretion, and IGF binding proteins (IGFBPs) expression in the podocytes. Thus, this study was conducted to examine the effect of high glucose on IGF system and its involvement of protein kinase C (PKC) and mitogen activated protein kinases (MAPKs) in podocytes. In this study, high glucose (25 mM) increased IGF-I and IGF-II secretion ( $P<0.05$ ), which was blocked by SB 203580 (a p38 MAPK inhibitor) but not by PD 98059 (a p44/42 MAPK inhibitor). In addition, high glucose-induced stimulation of IGFs was blocked by bisindolylmaleimide I and staurosporine (protein kinase C inhibitors). High glucose also increased IGFBP-1 expression, which was blocked by bisindolylmaleimide I and SB 203580. In conclusion, high glucose alters IGFs secretion and IGFBP expression via PKC and p38 MAPK pathways in podocytes.

**Key Words:** Diabetic nephropathy, Insulin-like growth factor system, High glucose, PKC, Mitogen activate protein kinases, Podocytes

### 서 론

당뇨병은 당뇨병성 신경증, 망막증, 및 신증으로 구분되며 이들 중 당뇨병성 신증은 당뇨병 환자의 주요한 사망 원인으로 보고되고 있으며 (Suzuki et al., 2000; Orchard, 2002), 원인으로서는 고혈당증으로 알려져 있다 (Wardle, 1996; Sheetz & King, 2002). 이러한 당뇨병성 신증은 최근에 신장의 사구체에 위치한 podocyte의 기능이 이상 되어 유발되는 것으로 보고되고 있다 (Wendt et al., 2003).

Insulin-like growth factors (IGFs)는 주로 간에서 분비 합성되며, IGF-I과 IGF-II로 분류되며 생체 내 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 매개되

어 (Hirschberg et al., 1998), 6가지의 subtypes로 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. 지금까지 podocyte에서 IGF에 대한 연구는 IGF-I 처리 시 podocyte의 apoptosis를 억제한다는 연구 결과와 같은 그룹에서 IGFBP-2가 podocyte의 세포 증식에 관여한다는 결과가 발표되었지만 이외에는 전혀 이루어지고 있지 않다 (Bridgewater et al., 2005; Bridgewater & Matsell, 2003).

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). 신장에서 podocyte와 같이 인접해 있는 mesangial 세포에서 고혈당증에 의한 de novo 합성에 의한 PKC의 활성이 당뇨병성 사구체 경화증에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Whiteside & Dlugosz, 2002). 한편 streptozotocin (STZ)에 의한 당뇨병성 신증 모델에서 p44/42 mitogen activated protein kinase (MAPK)의 활성이 사구체에서 증가하였으며 신장의 mesangial 세포에서 고포도당 노출 시 p38 MAPK의 활성이 증가되었다고 보고되

\* 논문 접수: 2006년 6월 26일

수정재접수: 2006년 8월 28일

<sup>†</sup> 교신저자: 박수현, (우) 500-757, 광주광역시 북구 용봉동 300, 전남대학교 수의과대학 생리학교실  
Tel: 062-530-2832, Fax: 062-530-2809  
e-mail: parksh@chonnam.ac.kr

었다 (Wilmer et al., 2001). 이러한 보고들은 당뇨병 시 PKC 및 MAPK의 활성이 중요한 역할을 한다는 것을 말해 주고 있다. 그러나 podocyte에서 고포도당 상태에서 IGF 분비에 대한 효과는 물론 이와 관련된 신호전달계에 대한 이에 대한 직접적인 연구는 아직까지 이루어 지지 않고 있다. 따라서 본 연구자는 podocyte 세포에서 고포도당이 IGF-I 및 IGF-II 분비와 이들의 IGF-BPs의 조절에 어떠한 효과가 있는지를 조사하고, PKC 그리고 MAPK 활성과 어떠한 관련이 있는지를 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

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 및 PD 98059는 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Bisindolylmaleimide I 및 SB 203580은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)에서 구입하였다. IGFBP-1, 2 항체는 Santacruz Biotechnologies 회사 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

### 2. Podocyte 배양

랫드의 사구체 내장 상피세포는 Kasinath 박사로부터 친절하게 공급을 받아 분리하여 Kasinath 등 (1986) 및 Pugliese 등 (1987)에 기술하였듯이 특성화를 시켰다. 이들 세포들은 10에서 20 passage의 것을 사용하였으며 5% FBS를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY)에 배양하였다. 이들 세포들이 70% confluence 되었을 때 세포성장을 정지시키기 위해 무혈청 배지에서 이들을 배양하여 세포의 성장을 동기화 시켜서 실험에 이용하였다.

### 3. 시료의 전 처리

시료중 IGF들은 대부분 IGF-BPs와 결합된 형태로 존재하므로 IGFBP로부터 IGFs를 분리하기 위하여 acid-ethanol extraction (Daughaday et al., 1989)와 formic acid extraction (Bowsher et al., 1991) 방법에 의하여 분리하였다. IGF-I의 분리는 혈청 200  $\mu$ l에 acid-ethanol (2 M HCl : ethanol = 1 : 7) 800  $\mu$ l를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치하여 유리형과 결합형을 분리시켰다. 그 후 3,000 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리하여 유리 IGF-I을 함유하는 상층액 500  $\mu$ l에 0.855 M trizma base를 200  $\mu$ l 넣어 분석에 사용하였다. IGF-II의 분리는 혈청 50  $\mu$ l에 0.5% Tween 20을 함유하는 8 M formic acid 100  $\mu$ l를 넣어 진탕하고 350  $\mu$ l의 acetone 첨가하였다.

그 후 3,000 rpm에서 15분간 4°C에서 원심분리하여 상층액 200  $\mu$ l에 1.75 M trisma base 85.7  $\mu$ l를 넣어 분석에 사용하였다. 이후 formic acid-acetone 추출법으로 IGF-BPs로 부터 IGF-II를 분리하여 농도를 측정하였다.

### 4. IGFs (IGF-I과 II) 추적자 제조

Chloramin-T 방법 (Lee et al., 1990)을 약간 변형시킨 것으로서 이를 요약하면, 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 10  $\mu$ l에 rhIGFs 1  $\mu$ g을 첨가한 후 [<sup>125</sup>I] (하나로, 원자력 연구소, 대전, 한국) 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)로 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) 받아서 gamma counter (Packard, ILL, USA)로 cpm을 측정하고 방사능이  $3 \times 10^6$  cpm이 되도록 각각 분주하여 -70°C에 냉동보관 하였다.

### 5. IGFs 방사면역 측정법

혈청 내의 IGFs 농도는 [<sup>125</sup>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 1,000배 희석시킨 polyclonal anti-IGFs 50  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 각각의 시험관에 [<sup>125</sup>I]-IGFs (20,000 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 30분간 원심분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter로 측정하였다.

### 6. Western Ligand Blot

IGFBPs 분석은 Hossenlopp 등 (1986)의 방법에 준하여 시행하였다. 이를 요약하면, podocyte 표본 30  $\mu$ g을 12% SDS-PAGE를 사용하여 non-reducing 조건하에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 semi-dry electrophoretic transfer unit를 이용하여 nitrocellulose membrane (0.45  $\mu$ m pore size)에 이전시킨 후 3% NP 40을 함유한 tris buffered saline (TBS)로 30분 세척하였다. 1% BSA를 함유한 TBS로 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 0.1% tween 20을 함유한 TBS로 10분간 세척하였다. 이를 1% BSA와 0.1% tween 20을 함유한 TBS용액에 IGF-I과 II가 혼합된 [<sup>125</sup>I]-IGFs (2

$\times 10^6$  cpm)을 첨가하여 4°C에서 18시간 배양하였다. 그 다음 0.1% tween 20을 함유한 TBS로 3회 세척한 후 TBS로 3회 세척하고 실온에서 건조시켰다. 건조시킨 nitrocellulose membrane을 암실에서 X-ray film과 함께 cassette에 넣어 -70°C에서 7일간 방치하였다.

### 7. Western immunoblotting

배지를 제거한 podocyte를 phosphate buffered saline (PBS)으로 2번씩 세척한 후, 각기 150  $\mu$ l의 lysis buffer (10 $\times$  PBS, 1% NP-40, 20% SDS, 0.5 M EDTA, 10 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml Leupeptin, 1  $\mu$ g/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  $\mu$ g의 sample들을 8% SDS-PAGE 전기영동을 시킨 후, polyvinylidene difluoride membrane

에 transfer하였다. Membrane은 5% skim milk에 1시간 동안 blocking을 시켰고, 각각의 항체 (anti-human type 1 IGF 수용체 단일 클론 항체, IGFBP-1, 및 IGFBP-2 항체)를 1% skim milk에 5,000배 희석하여 4°C에서 18시간 이상 배양하였다. 그 후, membrane을 0.1% tween-20/1 $\times$  TBS에 10분 간격으로 3번 세척하였고, membrane을 1% skim milk에 5,000배 희석된 horseradish-peroxidase labeled 2차 항체에 1시간 동안 반응시킨 후, 3번 세척을 거쳐서 ECL 시약을 1분간 처리한 다음 X-ray 필름에 30초간 노출시켜 현상하였다.

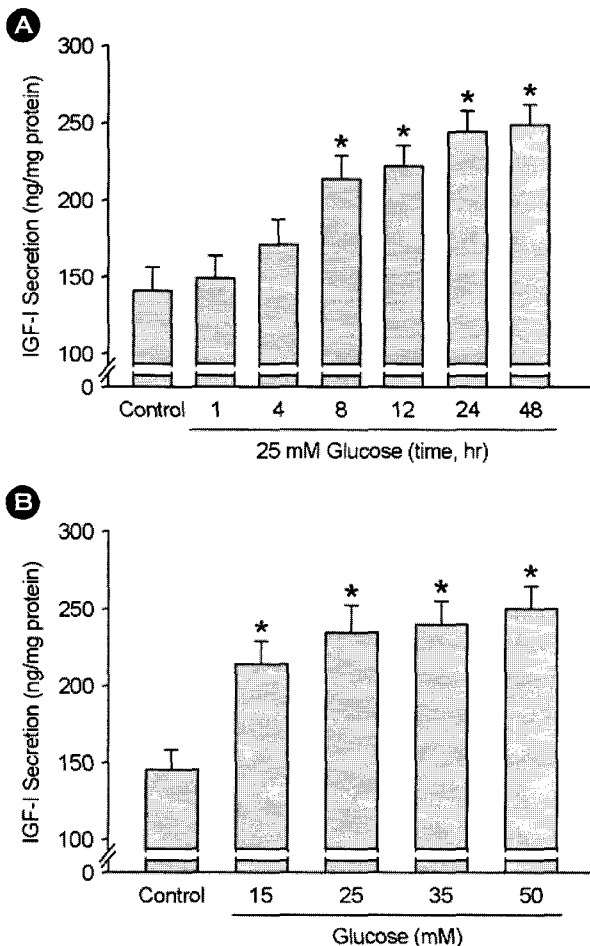
### 8. 통계처리

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  $\pm$  S.E로 하였다.

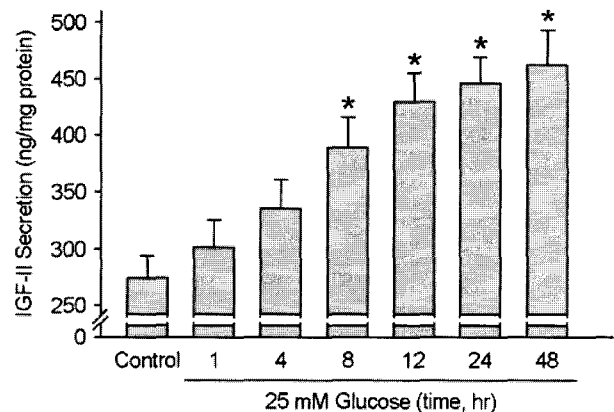
## 결 과

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

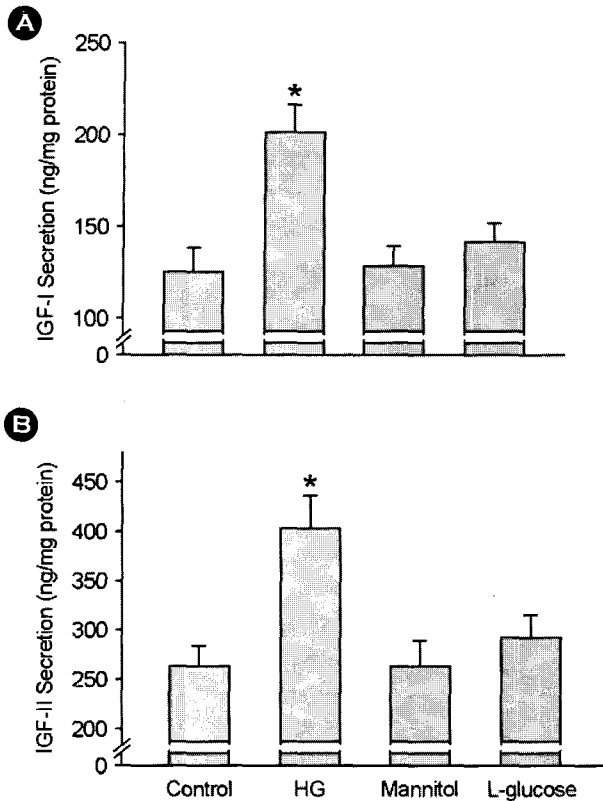
IGF-I 분비에 고포도당의 효과를 알아보기 위하여, podocyte에 다양한 시간 (1~72 hr) 및 농도 (15~50 mM)의 고포도당을 처리한 후 IGF-I 분비효과를 관찰하였다. Figure 1. A에서 보듯이 25 mM 포도당은 8시간 이상 처리 시 IGF-I 분비를 현저히 증가시켰으며 48시간 이상에서 최고를 보였으며 이후 더 이상 증가 작용은 인정되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 배지에서 고혈당의 조건을 유지하기 위하여 포도당을 48시간 처리하였다. 다음 과정으로 고포도당의 IGF-II 분비에는 어떠한 효과가 있는지를 역시 알아보았다. 실험결과 고포도당 처리 시 8시간 이상에서 IGF-II 분비가 증가되는 것으로



**Fig. 1.** Time course (A) and dose response curve (B) of 25 mM glucose on IGF-I secretion. Podocytes were incubated with 25 mM glucose at different time intervals (1 to 48 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.



**Fig. 2.** Time course of 25 mM glucose on IGF-II secretion. Podocytes were incubated with 25 mM glucose at different time intervals (1 to 48 hr). Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $P$ <0.05 vs. control.

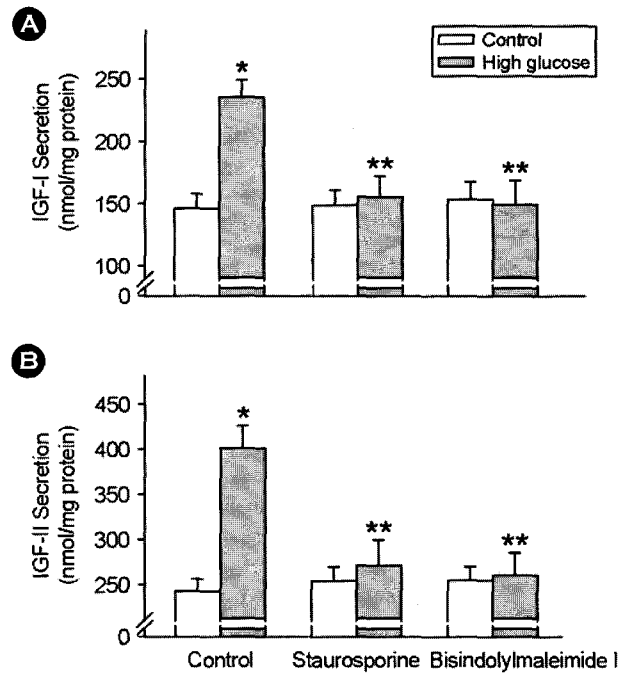


**Fig. 3.** Osmotic effect of glucose, mannitol, and L-glucose on IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Podocytes were incubated with 25 mM glucose, 20 mM mannitol, and 20 mM L-glucose for 48 hr. Values are means  $\pm$  S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. \* $P$ <0.05 vs. control.

나타났다 (Fig. 2). 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II의 증가 작용이 삼투압에 의한 효과인지를 확인하기 위하여 25 mM 및 50 mM의 mannitol 및 L-glucose를 처리하였다. 실험 결과 삼투압지표인 mannitol 및 L-glucose는 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비작용에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3).

## 2. 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용과 PKC 및 MAPK와의 관련성

고포도당에 의한 IGF-I 분비 작용이 PKC와 관련하는지를 알아보기 위하여 PKC 억제제인 staurosporine ( $10^{-8}$  M) 및 bisindolylmaleimide I ( $10^{-6}$  M)을 25 mM 포도당 처리 30분 전에 처리하였다. 실험 결과 PKC 억제제들은 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용을 유의성 있게 차단하였다 (Fig. 4). 한편 MAPKs와의 관련성을 알아보기 위하여 p44/42 MAPK 억제제인 PD 98059 ( $10^{-7}$  M) 및 p38 MAPK 억제제인 SB 203580 ( $10^{-7}$  M)을 전 처리하여 고포도당에 의한 IGF-I 분비 및 IGF-II 분비 작용을 알아보았다. Figure 5에서 보듯이 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 촉진 작용은 SB 203580에 의해서 차단되었으나 PD 98059에 의해서는 차단되



**Fig. 4.** Effect of PKC inhibitor on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Podocytes were incubated with bisindolylmaleimide I ( $10^{-6}$  M) or staurosporine ( $10^{-8}$  M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 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.

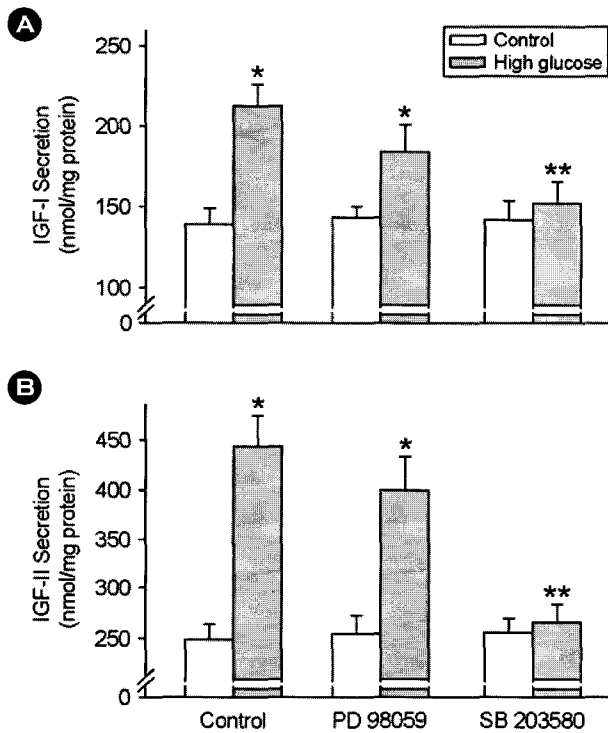
지 않았다 (Fig. 5). 이는 p38 MAPK 활성화가 고포도당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용에 관여하고 있음을 말해 주고 있다.

## 3. 고포도당에 의한 IGF-BPs의 발현 효과

IGFs가 IGF-BPs에 결합하는 지를 알아보기 위하여  $^{125}$ I-IGF-I 및  $^{125}$ I-IGF-II을 이용한 Western ligand blotting을 실시하였다. Podocyte에서는 IGF-BP-1, -2, -4이 발현이 되는 것으로 나타났다. 고포도당에 의한 IGF-BPs의 발현 정도를 알아본 결과 IGF-BP-1/2는 증가하였으나 IGF-BP-4의 경우는 대조군과 발현차이는 인정되지 않았다 (Fig. 6A). IGF-BP-1 및 -2의 분자량이 비슷하기 때문에 Western immunoblotting을 실시하여 알아본 결과 고포도당은 IGF-BP-1의 발현은 증가시키는 것으로 나타났으나 IGF-BP-2의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 6B, C).

## 고찰

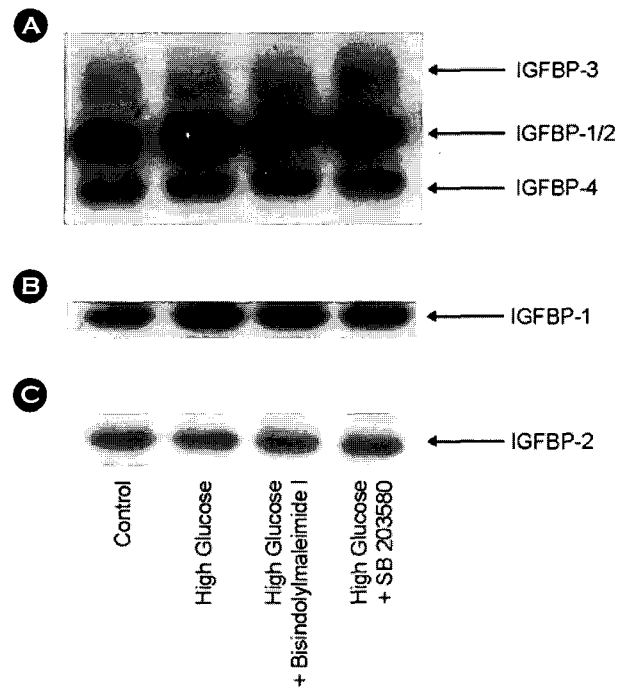
본 실험에서 podocyte에서 정상적으로 IGF-I 및 IGF-II가 분비되는 것을 확인하였다. 본 결과는 최근까지 podocyte에서 IGF에 대한 보고가 전혀 없다는 점에서 최초의 보고로 인정된다. 고포도당 처리 시 podocyte의 IGF-I 분비에 현저한



**Fig. 5.** Effect of SB 203580 and PD 98059 on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Podocytes were incubated with PD 98059 ( $10^{-7}$  M) or SB 203580 ( $10^{-7}$  M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 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.

증가 작용을 보였다. 이러한 결과는 *in vivo*의 결과인 STZ로 유도된 당뇨병 수컷 랫트의 신장에서도 IGF-I이 증가한다는 보고 (Miyatake et al., 1999)와 일치하였다. 이는 신장의 podocyte 역시 당뇨병 시에 일어나는 신장의 IGF-I 증가 작용에 기여하고 있음을 나타낸다. IGF-I의 지속적인 증가 작용은 당뇨병성 NOD 마우스에서 당뇨병성 신증의 특징인 신장의 비대에 기여하는 것으로 보고되고 있다 (Segev et al., 1997). NOD 마우스로부터 분리한 신장의 사구체의 mesangial 세포에서 역시 IGF-I이 증가하였으며 세포성장 촉진 효과를 보였다 (Elliot et al., 1993). 이러한 보고들을 고려할 때, 본 실험에서도 고포도당에 의한 podocyte의 IGF-I 증가 역시 신장 비대에 관여할 수 있다는 가능성을 시사해주고 있다.

IGF-II와 당뇨병에 관한 연구를 살펴보면, IGF-II는 주로 태아에 있어 당뇨병과 관련되는 것으로 보고되고 있다 (Serradas et al., 2002; De La Puente et al., 2000). 최근의 보고에 의하면 IGF-II는 생체에서 혈중 포도당 농도를 정상으로 유지하는 기능이 있다 (Robitaille et al., 2003). Heo 등 (2001)은 STZ로 유도한 당뇨병 랫드에서 신장의 IGF-II가 증가한다고 하였다. 본 실험에서도 IGF-II 역시 고포도당 처리 시 증



**Fig. 6.** Effect of bisindolylmaleimide I and SB 203580 on high glucose-induced alteration of IGF binding proteins (IGFBPs). Podocytes were incubated with bisindolylmaleimide I ( $10^{-6}$  M) or SB 203580 ( $10^{-7}$  M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose for 48 hr.

가하였다. 이는 podocyte 역시 *vivo*에서 나타난 신장의 IGF-II 증가에 기여하고 있음을 의미해주고 있다. 이러한 podocyte의 IGF-I 및 IGF-II 증가 작용은 삼투압 지표인 mannitol 및 L-glucose 처리 시 인정되지 않았다. 이러한 결과는 신장의 mesangial 세포 및 근위세뇨관세포에서 고삼투에 의해 당뇨병성 신증의 발병에 관여한다는 보고와는 상반되었다 (Tack et al., 2002; Park et al., 2001). 본 결과는 고삼투에 의한 효과에 의해서는 매개되지 않고 포도당 특이성에 의해 조절되는 것을 말해 주고 있다.

고포도당은 생체 내 여러 신호전달에 변화를 일으킨다. 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 Lee 등 (2006)이 보고한 당뇨 podocyte에서 PKC 활성화도가 증가한다는 보고와 일치하는 결과라고 볼 수 있겠다.

신장에서는 세 가지의 주요한 MAPKs [p44/42 MAPK, C-jun NH2-terminal kinase (JNK) 및 p38 MAPK]가 발현 되는

것으로 보고되고 있다 (Tian et al., 2000). 최근에 podocyte에서 MAPKs의 활성화에 대한 보고가 이루어지고 있다. Liu 등 (2005)은 podocyte에서 TGF-beta 처리 시 ERK 활성화에 대한 보고를 하였으며, Kang 등 (2006) 역시 podocyte에서 angiotensin II 처리 시 p38 MAPK 활성화가 증가하였다고 보고하였다. 당뇨병성 신증 상황 하에서 podocyte와 MAPK 활성화의 보고의 경우는 고포도당 처리 시 p38 MAPK 활성화가 actin cytoskeleton의 변화를 유도하여 당뇨병성 신증의 발병에 관련된다는 보고 및 고포도당 처리 시 p38 MAPK 활성화가 증가한다는 결과가 있다 (Kang et al., 2003). 본 실험에서도 역시 고포도당에 의한 IGFs 분비 작용에 p38 MAPK의 활성화가 관여하였다. 그러나 다른 MAPK 억제제인 p44/42 MAPK 억제제인 PD 98059 처리 시는 고포도당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용이 차단되지 않는 것으로 보아 p44/42 MAPK 경우는 고포도당에 의한 IGFs 분비 촉진 작용에 관여하지 않는 것으로 사료된다.

IGFBPs는 IGF-I 및 IGF-II에 결합하여 IGFs를 보호하며 이들의 기능을 조절하는 단백질들이다. 본 실험에서 고포도당 처리 시 IGFBP-1의 발현은 증가하였다. 이러한 결과는 당뇨병 시에 신장에서는 IGF-I 및 IGF-II가 증가한다는 보고 (Heo et al, 2001; Werner et al., 1990) 및 본 실험의 고포도당 처리 시 IGF-I 및 IGF-II 분비의 증가와 Lang 등 (2003)에 의한 IGFBP-1 처리 시 IGF-I의 감소를 초래한다는 보고를 근거로 할 때 당뇨병 상황에서 증가한 IGFs를 줄이기 위한 보상기전의 결과로 사료된다. 특히 본 실험에서는 고포도당에 의한 IGFBP-1의 증가 역시 PKC 및 p38 MAPK 활성화 경로를 통하여 작용한다는 것으로 보여주고 있다. 더욱이 본 결과는 IGFs 분비 촉진 작용뿐만 아니라 IGFBP-1의 발현 증가 작용 역시 PKC 및 p38 MAPK의 활성을 통해 작용한다는 것이다. 이러한 결과는 본 연구자가 최초의 보고인 것으로 사료된다. IGF-I 및 IGF-II가 세포성장을 촉진하는 세포 성장 인자에 중추적인 역할을 담당한다는 것을 고려한다면, 고포도당 처리 시 PKC 및 p38 MAPK 활성화가 IGF-I 및 IGF-II 합성을 증가시켜 세포성장 촉진을 야기하여 podocyte의 비대에 관여하여 당뇨병 신증의 발병에 관여할 수 있는 가능성을 추측하게 하지만, 이에 대한 실험 역시 향후 연구에서 다시 연구되어야 할 부분으로 사료된다. 이러한 연구는 향후 당뇨병성 신증의 치료제 개발에 기초적 자료를 제공할 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국 과학재단 2005년도 원자력 연구기반확충 사업 (하나로공동이용활성화분야 2005-04852) 및 BK21 바이오치료 산업인력 양성사업팀의 지원을 받아 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bowsher RR, Lee WH, Apathy JM, O'Brien PJ, Ferguson A, 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.
- Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int.* 2005. 67: 1308-1314.
- Bridgewater DJ, Matsell DG. Insulin-like growth factor binding protein-2 modulates podocyte mitogenesis. *Pediatr Nephrol.* 2003. 18: 1109-1115.
- 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, Escriva 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.
- Heo YR, Kang CW, Cha YS. 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, Adler S. Insulin-like growth factor system and the kidney: physiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis.* 1998. 31: 901-919.
- Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S, Binoux M. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem.* 1986. 154: 138-143.
- 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.
- Kang SW, Natarajan R, Shahed A, Nast CC, LaPage J, Mundel P, Kashtan C, Adler SG. Role of 12-lipoxygenase in the stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase and collagen alpha5(IV) in experimental diabetic nephropathy and in glucose-stimulated podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2003. 14: 3178-3187.
- Kang YS, Park YG, Kim BK, Han SY, Jee YH, Han KH, Lee MH, Song HK, Cha DR, Kang SW, Han DS. Angiotensin I stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor through the p38 mitogen activated protein kinase pathway in cultured mouse podocytes. *J Mol Endocrinol*. 2006. 36: 377-388.
- Kasinath BS, Maaba MR, Schwartz MM, Lewis EJ. Demonstration and characterization of C3 receptors on rat glomerular epithelial cells. *Kidney Int*. 1986. 30: 852-861.
- 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.
- Lang CH, Vary TC, Frost RA. Acute in vivo elevation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 decreases plasma free IGF-I and muscle protein synthesis. *Endocrinology* 2003. 144: 3922-3933.
- Lee EY, Chung CH, Kim JH, Joung HJ, Hong SY. Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2006. 21: 1496-1503.
- Lee CY, Henricks DM. Comparisons of various acidic treatments of bovine serum on insulin-like growth factor-I immunoreactive and binding activity. *Endocrinology* 1990. 127: 139-148.
- Liu S, Liang Y, Huang H, Wang L, Li Y, Li J, Li X, Wang H. ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2005. 16: 207-216.
- 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.
- 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 SH, Shin SS, Han HJ. High glucose levels alter angiotensin II-induced Ca<sup>2+</sup> uptake via PKC and cAMP pathways in renal proximal tubular cells. *Kidney Blood Press Res*. 2001. 24: 84-91.
- Pugliese F, Singh AK, Kasinath BS, Kreisberg JI, Lewis EJ. Glomerular epithelial cell, polyanion neutralization is associated with enhanced prostanoid production. *Kidney Int*. 1987. 32: 57-61.
- Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Rosenberg L, Halle JP. Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* 2003. 144: 3037-3045.
- Segev Y, Landau D, Marbach M, Shehadeh N, Flyvbjerg A, Phillip M. Renal hypertrophy in hyperglycemic non-obese diabetic mice is associated with persistent renal accumulation of insulin-like growth factor I. *J Am Soc Nephrol*. 1997. 8: 436-444.
- Serradas P, Goya L, Lacorne M, Gangnerau MN, Ramos S, Alvarez C, Pascual-Leone AM, 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.
- Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *J Am Med Association* 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.
- Tian W, Zhang Z, Cohen DM. MAPK signaling and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000. 279: F593-F604.
- Wardle EN. How does hyperglycaemia predispose to diabetic nephropathy? *Q J Med* 1996. 89: 943-951.
- Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Moser B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Nawroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol*. 2003. 162:

1123-1137.

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 iso-

zyme activation in the diabetic milieu. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002. 282: F975-F980.

Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C. Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway. *Kidney Int*. 2001. 60: 858-871.