

Mesangial 세포에서 고포도당에 의한 IGFs 분비와 PKC 및 산화성 스트레스와의 관련성에 관한 연구

박수현 · 허정선 · 강창원¹ · 한호재*

전남대학교 수의과대학 생리학교실

¹전북대학교 수의과대학 생리학교실, 생체안전성 연구소

(게재승인: 2004년 11월 8일)

The relationship between high glucose-induced secretion of IGFs and PKC or oxidative stress in mesangial cells

Soo-hyun Park, Jung-sun Heo, Chang-won Kang¹ and Ho-jae Han*

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

¹Bio-safety Research Institute, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: November 8, 2004)

Abstract : The proliferation of mesangial cells has been associated with the development of diabetic nephropathy. The cell proliferation has been regulated by diverse growth factors. Among them, insulin like growth factors(IGFs) are also involved 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 and the relationship between high glucose-induced secretion of IGFs and PKC or oxidative stress in the mesangial cells. Thus, we examined the mechanisms by which high glucose regulates secretion of IGFs in mesangial cells. High glucose(25 mM) increased IGF-I and IGF-II secretion. High glucose-induced increase of IGF-I and IGF-II secretion were blocked by taurine(2×10^{-3} M), N-acetyl cystein(NAC, 10^{-5} M), or GSH(10^{-5} M) (antioxidants), suggesting the role of oxidative stress. High glucose-induced secretion of IGF-I and IGF-II were blocked by H-7, staurosporine, and bisindolylmaleimide I(protein kinase C inhibitors). On the other hand, high glucose also increased lipid peroxide (LPO) formation in a dose dependent manner. In addition, high glucose-induced stimulation of LPO formation was blocked by PKC inhibitors. These results suggest that PKC is responsible for the increase of oxidative stress in the action of high glucose-induced secretion of IGF-I and IGF-II in mesangial cells. In conclusion, high glucose stimulates IGF-I and IGF-II secretion via PKC-oxidative stress signal pathways in mesangial cells.

Key words : Insulin-like growth factors, high glucose, PKC, oxidative stress, mesangial cell, kidney

서 론

Insulin-like growth factors(IGFs)는 IGF-I과 IGF-II로 분류되며 생체내의 다양한 대사 반응에 관여하는 주요한 성장인자들 중의 하나로서, 주로 간세포에서 합성되는 것으로 보고되고 있다 [5, 45]. 한편 이러한 IGFs는 간

세포 이외의 다른 세포에서도 합성되어 자기분비 또는 자기염분비와 같은 방법을 통하여 생체에서 중요한 작용을 하는 것으로 보고되고 있다 [28, 25]. 특히 신장에서는 IGFs가 신장의 발생 및 기능조절에 관여하는 것으로 알려져 있다 [13]. 실제로 신장의 mesangial 세포에서는 IGF-I 및 IGF-II 모두 발현되는 것으로 보아 세포의

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

*Corresponding author: Ho Jae Han

Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2831, Fax: +82-62-530-2809, E-mail: hjhan@chonnam.ac.kr]

성장 및 수축과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정되고 있다 [4, 40].

당뇨병성 신증은 말기신부전증의 주요한 원인이 되며 당뇨병 환자에서 주된 사망 요인의 하나가 되고 있는데 그 병인은 고혈당 때문인 것으로 알려져 있다 [36, 42]. 이러한 당뇨병성 신증은 고혈당증에 의한 사구체 세포 외 기질의 축적에 의한 사구체 경화에 기인하며 [33, 36], 사구체에 위치한 mesangial 세포들이 그 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려지고 있다 [34]. 또한 당뇨병성 신증의 발병에 IGF-I 이외에도 IGF-II도 관련되는 것으로 알려지고 있다 [14, 43]. 그러나 IGFs가 당뇨병 시 신장의 mesangial 세포에서 어떻게 조절되는 지에 대해서는 아직까지 밝혀지지 않고 있다.

당뇨병성 신증의 발병에 활성산소가 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 [12, 31]. 당뇨병 시 mesangial 세포에서도 산화성 스트레스 증가가 관찰되었다 [7]. 또한 1형 및 2형 당뇨병 환자의 섬유아세포 및 혈소판에서 PKC의 활성이 증가되는 것으로 보고 되고 있다 [21, 22]. 이러한 보고들은 당뇨병 시 PKC 및 산화성 스트레스가 중요한 역할을 한다는 것을 말해 주고 있다. 그러나 고포당에 의한 IGFs의 분비작용과 PKC 및 산화성 스트레스와의 관련성에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않고 있다. 따라서 본 연구는 mesangial 세포에서 고포당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비에 미치는 영향과 이 작용과 PKC 및 산화성 스트레스와의 관련성을 조사해 보고자 수행되었다.

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 collagenase는 Life Technologies(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. D-glucose, staurosporine, H-7, N-acetyl cystein(NAC), glutathione(GSH), taurine 및 TPA는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Bisindolylmaleimide I은 Calbiochem(La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다.

Mesangial 세포의 초대배양

실험에 사용할 수컷 Spague-Dawley 랫트(180~210 g)를 24시간 절식시킨 후 pentobarbital sodium(1 ml/kg)을 복강 내로 주사하여 마취시킨 다음 신속하게 isolated 3 claps method를 이용하여 신장을 분리하고, 신동맥을 통하여 streptomycin과 penicillin(100 U/ml)이 포함된 30 ml의 Hanks' balanced salts solution(HBSS)을 서서히 관류

시켜 혈액을 완전히 제거한 후 HBSS에 옮겨서 사구체가 존재하는 신피질을 신장으로로부터 분리하였다. 분리한 피질 조직을 가능한 세절한 다음 HBSS와 함께 30 mesh 및 60 mesh에 여과시킨 후 다시 통과된 시료를 20 mesh에 여과시켜 HBSS에서 세정하였다. 사구체가 함유되어 있는 HBSS를 다시 한번 120×g에서 30초간 원심 분리하여 상층액만을 수합하고 다시 1000×g에서 1분간 원심 분리한 후 침전된 시료만을 채취하였다. 채취된 시료를 RPMI 1640(Sigma) 배지를 이용하여 세정한 다음 1000×g에서 1분간 원심분리 하였다. 정제된 사구체 피막을 제거하기 위하여 collagenase(750I U/ml)(Sigma)에 37°C에서 15분간 서서히 교반하면서 배양한 다음 무혈청 RPMI 1640 배지로 3번 세정하였다. 이와 같은 과정을 통하여 얻어진 사구체 세포들을 세포배양 접시에 500 사구체/cm²가 되도록 분주한 다음 D-valine으로 치환된 Minimum Essential Media Eagle(Sigma)를 사용하여 5% CO₂, 95% O₂인 CO₂ 배양기에서 흔들리지 않도록 고정하여 72시간 동안 배양시켰다. 이때 D-valine 배지에는 HEPES(15 mM), streptomycin(100 U/ml), penicillin(100 U/ml), fungizon(0.25%), insulin(0.013 µg/ml) 그리고 20% fetal bovine serum을 함유하도록 하고, 이후 CO₂ 배양기에 배양시켰다. 계대 배양 시에는 5 mM의 포도당을 함유한 DMEM/F-12를 사용하였다.

시료의 전 처리

시료 내 IGF들은 대부분 Insulin-like growth factor binding proteins(IGFBPs)와 결합된 형태로 존재하므로 IGFBP로부터 IGFs를 분리하기 위하여 acid-ethanol [9]과 formic acid [6] 추출 방법을 사용하였다. 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 4°C에서 30분간 원심분리(3000 rpm)하여 유리 IGF-I을 함유하는 상층액 500 µl에 0.855 M trizma base를 200 µl 넣어 분석에 사용하였다. IGF-II의 분리는 혈청 50 µl에 0.5% Tween 20을 함유하는 8.0 M formic acid 100 µl를 넣어 혼합하고 350 µl acetone을 첨가하였다. 그 후 4°C에서 15분간 원심분리(3500×g)하여 상층액 200 µl에 1.75 M trisma base 85.7 µl를 넣어 분석에 사용하였다. 이후 formic acid-acetone 추출법으로 IGFBPs로부터 IGF-II를 분리하여 농도를 측정하였다.

IGFs(IGF-I과 II) 추적자 제조

Chloramin-T 방법 [26]을 약간 변형시켜 사용하였으며 그 방법을 간단히 요약하면 다음과 같다. 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 10 µl에 rhIGFs 1 µg을 첨가

한 후 [¹²⁵I] (Amersham Life Science, ILL, USA) 1 mCi 를 첨가하고 0.04 mg/ml의 chloramin-T를 넣어서 신속히 혼합한 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 0.2M sodium phosphate buffer(0.2% BSA 포함)에 용출시켜 분획 수집기(20 drops)에 받아서 gamma counter(Packard, ILL, USA)로 cpm을 측정하고 방사능이 3×10⁶ cpm이 되도록 각각 분주하여 -70°C에 냉동보관 하였다.

IGFs 방사면역 측정법

혈청 내 IGFs 농도는 [¹²⁵I]-IGFs에 polyclonal anti-IGFs를 사용한 방사면역 측정법(radioimmunoassay, RIA)을 이용하였으며, 요약하면 다음과 같다. 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 µl을 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 4,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 결합형과 비결합형을 분리시켰고 결합형의 방사능을 gamma counter로 측정하였다.

Lipid peroxide 형성

Confluent한 mesangial 세포에서 LPO 형성은 Ohkawa 등 [32]의 방법에 따라 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 차게한 물에 식힌 후, 비특이적인 적색 색소를 제거하기 위하여 n-butanol-pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 첨가한 후 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수합하였다. 이 시료를 spectrofluometry (emission 파장 553 nm, excitation 파장 515 nm)로 측정하여 nmol/mg protein으로 표시하였다.

통계처리

실험결과의 통계처리는 Student's t test 및 Analysis of Variance(ANOVA)로 하였으며, P 값<0.05를 유의한 차이의 한계로 하였고, 실험결과의 표현은 means±S.E로 하였다.

결 과

고포도당이 IGF-I 및 IGF-II 분비에 미치는 영향

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. 또한 고포도당이 IGF-II 분비에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 실험결과 고포도당 처리 시 IGF-II 분비가 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 고포도당에 의한 IGF-II 분비증가는 IGF-I 분비증가와 비슷한 양상을 보

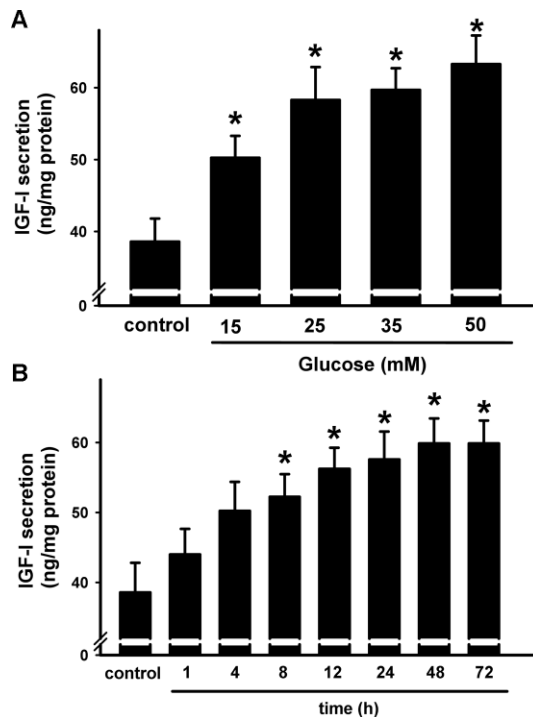


Fig. 1. Dose course (A) and time response curve (B) of high glucose on IGF-I secretion. Mesangial cells were incubated with different dosage of glucose (5 to 50 mM) or 25 mM glucose at different time intervals (0 to 72 h). Values are means±S.E. of 12 separate experiments performed on 4 different cultures.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

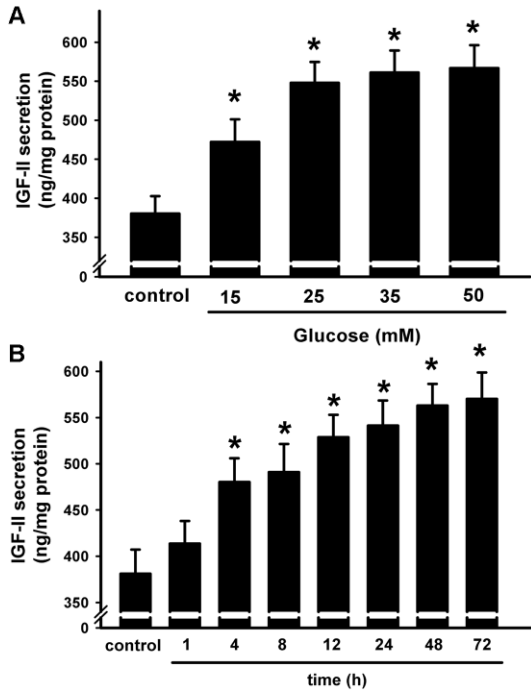


Fig. 2. Dose course (A) and time response curve (B) of high glucose on IGF-I secretion. Mesangial cells were incubated with different dosage of glucose (5 to 50 mM) or 25 mM glucose at different time intervals (0 to 72 h). Values are means \pm S.E. of 12 separate experiments performed on 4 different cultures. * $p < 0.05$ vs. control.

였다.

고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용과 산화성 스트레스와의 관련성

고포도당에 의한 IGF-I 분비 작용이 산화성 스트레스와 관련하는지를 알아보기 위하여 내인성 산화제인 $H_2O_2(10^{-5}M)$ 를 mesangial 세포에 72시간 처리하였다. 실험결과 IGF-I 및 IGF-II 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다(Fig. 3). 다음 단계로서 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용에 산화성 스트레스가 직접 관련하는지를 알아보기 위하여 항산화제인 NAC ($10^{-5}M$), GSH($10^{-5}M$) 또는 taurine($2 \times 10^{-3}M$)을 25 mM 포도당 처리 30분 전에 처리 하였다. 실험결과 이들 항산화제들을 전 처리하였을 때 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용은 차단되는 것으로 나타났다. 직접적으로 mesangial 세포에 25 mM 포도당을 처리하여 시간 대별로 LPO 형성을 측정된 결과, 4시간 이상에서 LPO 형성은 대조군에 비해 유의성 있는 증가작용을 보였으며 농도별로는 15 mM 이상의 포도당 처리 시 증가되는

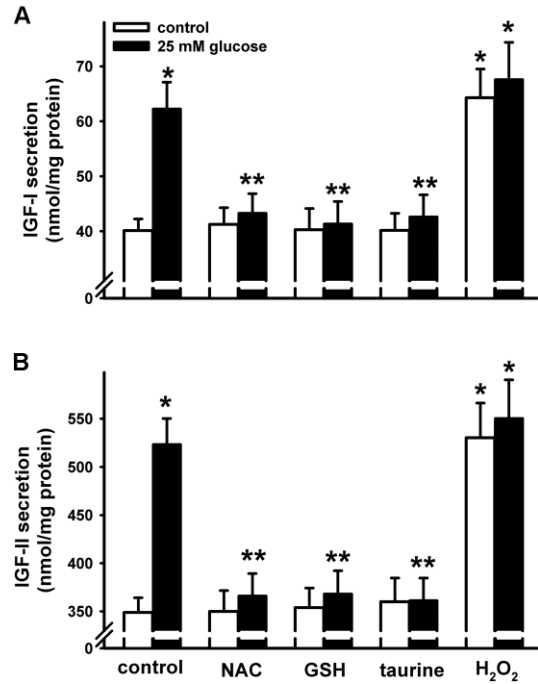


Fig. 3. Involvement of oxidative stress on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were incubated with NAC ($10^{-5}M$), GSH ($10^{-5}M$), taurine (2 mM) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose or were incubated with 25 mM glucose alone or together with hydrogen peroxide ($10^{-5}M$) 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.

것으로 나타났다(Fig. 4).

고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용과 PKC와의 관련성

고포도당에 의한 IGF-I 분비 작용이 PKC와 관련하는지를 알아보기 위하여 PKC 활성화제인 TPA(100 ng/ml)를 72시간 처리하였을 때 IGF-I 및 IGF-II 농도는 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되었다(Fig. 5). 다음 단계로서 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용에 PKC가 직접 관련하는지를 알아보기 위하여 PKC 억제제인 staurosporine($10^{-8}M$), H-7($10^{-4}M$) 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. 또한 PKC와 산화성 스트레스와의 관련성을 살펴보기 위하여 PKC 억제제들을 전 처리한 후 25 mM 포도당을 처리하여

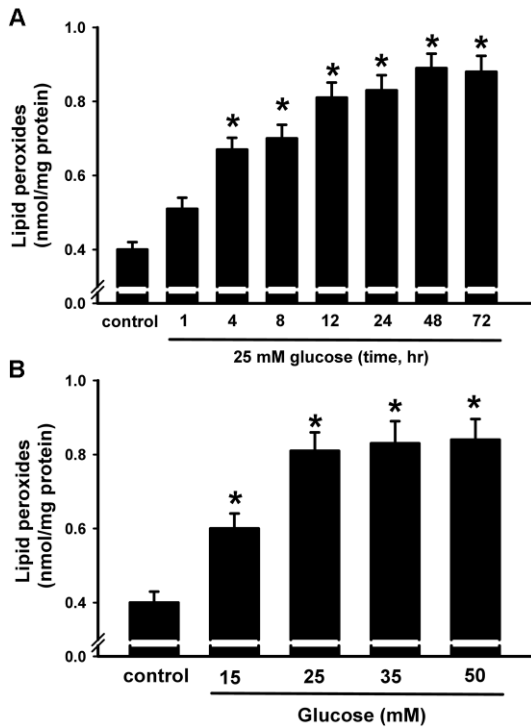


Fig. 4. Time (A) and dose (B) response of high glucose in lipid peroxide formation. Mesangial cells were incubated with 25 mM glucose at different time intervals (0 to 72 hr) or different dosage of glucose (5 to 50 mM). Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *p<0.05 vs. control.

LPO 형성을 측정하였다. 25 mM 포도당에 의한 LPO 형성 증가작용은 staurosporine, H-7 및 bisindolylmaleimide I 처리 시 유의성 있게 차단되었다.

고찰

본 실험에서 mesangial 세포에 고포도당 처리 시 IGF-I 분비가 유의성 있게 증가되었다. 이러한 결과는 streptozotocin으로 유도된 1형 당뇨병 모델 랫트의 신장에서 IGF-I이 증가되었다는 보고 [29] 및 2형 당뇨병 모델인 Non-Obese Diabetic(NOD) mouse에서 분리한 mesangial 세포에서 IGF-I이 증가했다는 보고 [12]와도 일치하였다. 본 실험에서 고 포도당에 의한 IGF-I 분비 증가 효과가 포도당을 8시간 이상 처리 시 관찰되는 것으로 보아, mesangial 세포가 고포도당에 노출시 짧은 시간 내에 IGF-I의 분비 작용을 증가시켜 당뇨병성 신증의 발병에 관여할 수 있음을 시사해 주고 있다. 이러한 결과는 당뇨병성 신장 비대는 신장의 IGF-I의 일시적인

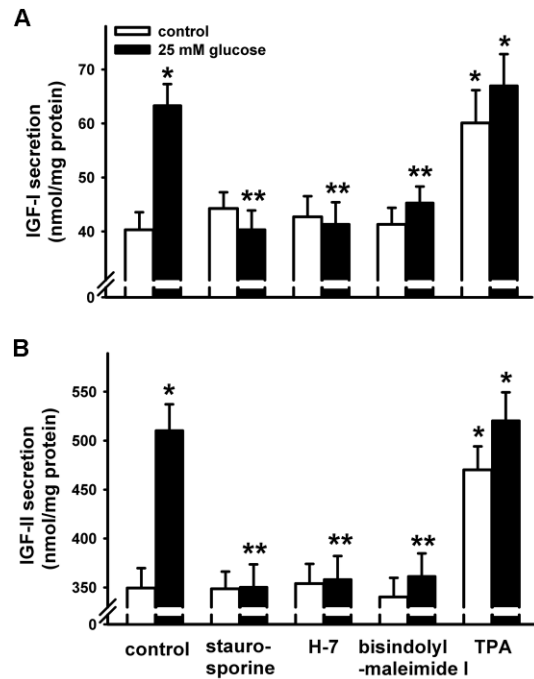


Fig. 5. Effect of PKC inhibitors on high glucose-induced stimulation of IGF-I (A) and IGF-II (B) secretion. Mesangial cells were incubated with staurosporine (10^{-8} M), H-7 (10^{-4} M), or bisindolylmaleimide I (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose or were incubated with 25 mM glucose alone or together with TPA (100 ng/ml) for 72 hr. Values are means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. *p<0.05 vs. control, **p<0.05 vs. 25 mM glucose.

증가에 의해서 유발된다는 보고와 일치하였다 [16]. 또한 신장의 mesangial 세포에 IGF-I을 처리하였을 때 이들 세포의 비대가 유도되었다는 보고와도 일치되고 있다 [15].

II형 당뇨병 Goto-Kakizaki(GK) 랫트 태아 모델에서 췌장의 IGF-II 농도가 정상치에 비해 현저히 증가되었으며 [19], 신생 랫트의 1형 당뇨병 시에 신장에서 IGF-II 농도가 증가되었다는 보고가 있다 [10]. Spranger 등 [37]은 성인에 있어서 IGF-II가 당뇨병성 망막증에 관련된다고 보고하였으며, Heo 등 [18]은 IGF-II가 당뇨병성 신증의 발병에 중요한 역할을 할 것으로 보고하였다. 한편, 당뇨병성 신경증 시 IGF-II를 처리하였을 때 그 증상이 호전되는 것으로 보아 당뇨병성 신경증에서는 IGF-II 수준이 감소하는 것 같다고 하였다 [32]. 그러나 본 실험에서는 고포도당 처리 시 IGF-I 및 IGF-II 모두 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 4주 동안 고포도당을 처리한 랫트에서 IGF-I 및 -II 분비와 이들 유전

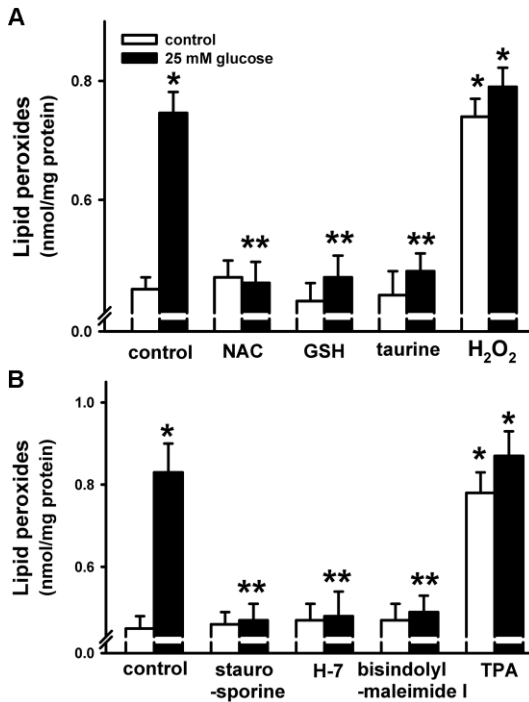


Fig. 6. Effects of antioxidants (A) and PKC inhibitors (B) on high glucose-induced increase of lipid peroxide formation. Mesangial cells were incubated with NAC (10^{-5} M), GSH (10^{-5} M), taurine (2 mM), staurosporine (10^{-8} M), H-7 (10^{-4} M), or bisindolylmaleimide I (10^{-6} M) for 30 min prior to the treatment of 25 mM glucose or were incubated with 25 mM glucose alone or together with hydrogen peroxide (10^{-5} M) or TPA (100 ng/ml) 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.

자들이 동시에 증가한다는 결과와 일치하였다 [18]. 하지만 이러한 작용들이 어떠한 신호전달경로를 통하여 이루어지는지에 대해서는 밝혀지지 않았다.

산화성 스트레스는 당뇨병성 신증의 발병과 밀접한 상관관계를 갖고 있으며 [27], STZ에 의해 유도된 당뇨병 랫트 및 당뇨병 환자의 경우에 활성산소에 기인한 조직 손상이 일어나는 것으로 보고 되고 있다 [44]. 본 실험에서도 고포도당을 처리하였을 때 활성산소종이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 mesangial 세포에 고포도당 처리 시 malondialdehyde(MDA)의 증가와 glutathione(GSH) 함량의 감소를 나타낸 보고와 일치하였다 [7]. Abou-Seif & Youssef [1]는 당뇨병 환자에서 적혈구의 LPO 형성이 증가되었고 혈청 내 IGF-I의 수준이 증가하는 것으로 보아 간접적으로 이들 작용에 활성산소가 관련될 수 있음을 보고하였다. 본 실험에서도

역시 당뇨병성 신증의 발병과 밀접한 관련이 있는 IGF-I 및 IGF-II의 분비 증가 작용에 산화성 스트레스가 관련되고 있음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 고포도당 처리 시 IGF-I 및 IGF-II의 분비 증가 작용에 산화성 스트레스가 관련되고 있음을 시사해 주는 첫 보고이다.

PKC는 고포도당에 의한 당뇨병성 신증의 발병에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보고되고 있다 [11]. 본 실험에서 PKC는 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 작용을 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 고포도당에 의한 PKC의 활성화는 고포도당의 대사산물인 DAG 생성에 기인한 것으로 보인다 [3]. Craven 등 [8]도 역시 생체에서 분리한 사구체에 고포도당을 처리하였을 때 DAG의 합성이 증가된다고 하였다. 비록 본 실험에서는 PKC의 isoforms들에 대해서는 살펴보지 않았으나 당뇨병 랫트의 사구체 세포에서 PKC β 의 활성이 유도되고 [23] 및 PKC- β 를 억제함으로써 당뇨병성 신증의 치료가 가능하다는 보고 [41]로 미루어 볼 때 PKC- β 가 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

본 실험에서 산화성 스트레스의 증가는 PKC 활성화에 의해 조절되는 것으로 보이며 이는 mesangial 및 혈관세포에서 고포도당에 의한 활성산소의 생성은 PKC 의존적이라는 보고와 일치하였다 [17, 20]. 특히 mesangial 세포에서 고포도당에 의한 PKC 활성화가 산화성 스트레스에 의해 활성화되는 Nuclear Factor subunit의 이동을 촉진하고 있다는 보고와도 일치하고 있다 [24]. 하지만, 이러한 활성산소가 역으로 PKC를 활성화시킬 수 있다는 최근의 보고들과는 상충된다고 할 수 있다 [30, 39]. 본 실험에서는 이에 대한 부분은 직접 살펴보지 않았기 때문에 정확히 설명할 수는 없지만 아마도 이들 상호간의 cross-talk 관계가 성립될 것으로 추정하고 있다. 본 실험에서는 PKC에 의해 조절되는 산화성 스트레스의 증가가 IGF-I 및 IGF-II의 분비를 증가시킨다는 것을 처음으로 보고하였다. 최근에 Kurzawa 등 [25]은 mouse의 배아에서 산화성 스트레스 증가 시 IGF-I 및 IGF-II의 증가가 관찰되었다고 보고하여 본 실험결과와 유사한 면을 보여주었지만 당뇨병과의 관련성을 보여주지는 못했다. 본 실험에서는 고포도당에 기인한 산화성 스트레스 및 PKC의 활성 증가가 당뇨병성 신증 발병에 중요한 인자들 중의 하나인 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가에 관련된다는 것을 보다 구체적으로 제시하였다. 결론적으로, 고포도당은 PKC 활성증가를 통해 산화성 스트레스를 증가시켜서 IGF-I 및 IGF-II 분비를 증가시키는 것으로 보인다.

결론

Insulin-like growth factor(IGF)는 당뇨병성 신증의 발

병 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 mesangial 세포에 고포도당 처리 시 IGF 분비에 미치는 영향과 그 작용에 있어서 산화성 스트레스 및 PKC와의 관련성을 알아보았다. 결과는 다음과 같다. 고포도당(>15 mM) IGF-I 및 IGF-II 분비를 유의성 있게 증가시켰으며 이러한 작용은 항산화제들 (taurine, NAC, GSH)을 전처리하였을 때 차단되었으며, 직접적으로 고포도당을 처리하여 산화성 스트레스 표지인 LPO 형성을 측정할 결과 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 볼 수 있었다. 한편, PKC와의 상관관계를 알아본 결과 고포도당에 의한 IGF-I 및 IGF-II 분비 증가 작용은 PKC 억제제들(staurosporine, H-7, bisindolylmaleimide I)을 전처리하였을 때 차단되는 것으로 나타났다. 이러한 PKC 억제제들은 고포도당에 의한 산화성 스트레스 증가 작용을 유의성 있게 억제하는 것으로 보아 산화성 스트레스의 조절작용에도 관여되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 볼 때 mesangial 세포에서 고포도당은 PKC-산화성 스트레스 신호전달 경로를 통하여 IGF-I 및 IGF-II 분비작용을 증가시키는 것으로 보인다.

참고문헌

1. **Abou-Seif, M. A. and Youssef, A. A.** Oxidative stress and male IGF-1, gonadotropin and related hormones in diabetic patients. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001, **39**, 618-623.
2. **Agardh, C. D., Stenram, U., Torffvit, O. and Agardh, E. R.** Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. *J. Diabetes Complications.* 2002, **16**, 395-400.
3. **Babazono, T., Kapor-Drezgic, J., Dlugosz, J. A. and Whiteside, C.** Altered expression and subcellular localization of diacylglycerol-sensitive protein kinase C isoforms in diabetic rat glomerular cells. *Diabetes.* 1998, **47**, 668-676.
4. **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.
5. **Binoux, M.** The IGF system in metabolism regulation. *Diabetes Metab.* 1995, **21**, 330-337.
6. **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.
7. **Catherwood, M. A., Powell, L. A., Anderson, P., McMaster, D., Sharpe, P. C. and Trimble, E. R.** Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int.* 2002, **61**, 599-608.
8. **Craven, P. A., Davidson, C. M. and DeRubertis, F. R.** Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes.* 1990, **39**, 667-674.
9. **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.
10. **De La Puente, A., Goya, L., Ramos, S., Martin, M. A., Alvarez, C., Escriva, 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.
11. **Derubertis, F. R. and Craven, P. A.** Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 1994, **43**, 1-8.
12. **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.
13. **Feld, S. and Hirschberg, R.** Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev.* 1996, **17**, 423-480.
14. **Flyvbjerg, A., Landau, D., Domene, H., Hernandez, L., Gronbaek, H. and LeRoith, D.** The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism.* 1995, **44**, 67-71.
15. **Gooch, J. L., Tang, Y., Ricono, J. M. and Abboud, H. E.** Insulin-like growth factor-I induces renal cell hypertrophy via a calcineurin-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, 42492-42500.
16. **Gronbaek, H., Nielsen, B., Frystyk, J., Flyvbjerg, A. and Orskov, H.** Effect of lanreotide on local kidney IGF-I and renal growth in experimental diabetes in the rat. *Exp. Nephrol.* 1996, **4**, 295-303.
17. **Ha, H., Yu, M. R., Choi, Y. J., Kitamura, M. and Lee, H. B.** Role of high glucose-induced nuclear factor-

- kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002, **13**, 894-902.
18. **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.* 2001, **47**, 329-334.
 19. **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 Grimelius, 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.
 20. **Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H. and Nawata, H.** High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000, **49**, 1939-1945.
 21. **Iori, E., Marescotti, M. C., Vedovato, M., Ceolotto, G., Avogaro, A., Tiengo, A., Del Prato, S. and 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.
 22. **Kimura, M., Ishizawa, M., Miura, A., Itaya, S., Kanoh, Y., Yasuda, K., Uno, Y., Morita, H. and Ishizuka, T.** Platelet protein kinase C isoform content in type 2 diabetes complicated with retinopathy and nephropathy. *Platelets.* 2001, **12**, 138-143.
 23. **Koya, D., Jirousek, M. R., Lin, Y. W., Ishii, H., Kuboki, K. and King, G. L.** Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1997, **100**, 115-126.
 24. **Kumar, A., Hawkins, K. S., Hannan, M. A. and Ganz, M. B.** Activation of PKC-beta(I) in glomerular mesangial cells is associated with specific NF-kappaB subunit translocation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2001, **281**, F613-F619.
 25. **Kurzawa, R., Glabowski, W., Baczkowski, T. and Brelik, P.** Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin, and selenium. *Reprod. Biol.* 2002, **2**, 143-162.
 26. **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.
 27. **Lee, H. B., Yu, M. R., Yang, Y., Jiang, Z. and Ha, H.** Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003, **14**, S241-S245.
 28. **Mathews, L. S., Norstedt, G. and Palmiter, R. D.** Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986, **83**, 9343-9347.
 29. **Miyatake, N., Shikata, K., Wada, J., Sugimoto, H., Takahashi, S. and 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.
 30. **Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A. Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I. and Brownlee, M.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000, **404**, 787-790.
 31. **Obrosova, I. G., Fathallah, L., Liu, E. and Nourooz-Zadeh, J.** Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Free. Radic. Biol. Med.* 2003, **34**, 186-195.
 32. **Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, **95**, 351-358.
 33. **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.
 34. **Schleicher, E. D. and Olgemoller, B.** Glomerular changes in diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1992, **30**, 635-640.
 35. **Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J. and Froesch, E. R.** Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology.* 1983, **113**, 297-305.
 36. **Sheetz, M. J. and King, G. L.** Molecular understanding

- of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002, **288**, 2579-2588.
37. **Spranger, J., Buhnen, J., Jansen, V., Krieg, M., Meyer-Schwickerath, R., Blum, W. E., Schatz, H. and Pfeiffer, A. F.** Systemic levels contribute significantly to increased intraocular IGF-I, IGF-II and IGF-BP3 [correction of IFG-BP3] in proliferative diabetic retinopathy. *Horm. Metab. Res.* 2000, **32**, 196-200.
 38. **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.
 39. **Studer, R. K., Craven, P. A. and DeRubertis, F. R.** Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism*. 1997, **46**, 918-925.
 40. **Tack, I., Elliot, S. J., Potier, M., Rivera, A., Striker, G. E. and Striker, L. J.** Autocrine activation of the IGF-I signaling pathway in mesangial cells isolated from diabetic NOD mice. *Diabetes*. 2002, **51**, 182-188.
 41. **Tuttle, K. R. and Anderson, P. W.** A novel potential therapy for diabetic nephropathy and vascular complications: protein kinase C beta inhibition. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, **42**, 456-465.
 42. **Wardle, E. N.** How does hyperglycaemia predispose to diabetic nephropathy? *QJM*. 1996, **89**, 943-951.
 43. **Werner, H., Shen-Orr, Z., Stannard, B., Burguera, B., Roberts, C. T. Jr. and LeRoith, D.** Experimental diabetes increases insulin-like growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes*. 1990, **39**, 1490-1497.
 44. **West, I. C.** Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*. 2000, **17**, 171-180.
 45. **Yakar, S., Wu, Y., Setser, J. and Rosen, C. J.** The role of circulating IGF-I: lessons from human and animal models. *Endocrine*. 2002, **19**, 239-248.
 46. **Zhuang, H. X., Wuarin, L., Fei, Z. J. and Ishii, D. N.** Insulin-like growth factor (IGF) gene expression is reduced in neural tissues and liver from rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus, and IGF treatment ameliorates diabetic neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 1997, **283**, 366-374.