

당과 후기당화합물의 생체 외 사구체여과율 모델에 대한 역할

포천중문의과대학교 분당차병원 소아과, 충북대학교 의과대학 소아과학교실*

이 준 호 · 하 태 선*

= Abstract =

Effects of High Glucose and Advanced Glycosylation Endproducts(AGE) on the *in vitro* Permeability Model

Jun Ho Lee, M.D. and Tae Sun Ha, M.D.*

Department of Pediatrics, Bundang CHA General Hospital,
College of Medicine, Pochon CHA University, Sungnam, Department of Pediatrics*,
College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Purpose: We describe the changes of rat glomerular epithelial cells when exposed to high levels of glucose and advanced glycosylation endproducts(AGE) in the *in vitro* diabetic condition. We expect morphological alteration of glomerular epithelial cells and permeability changes experimentally and we may correlate the results with a mechanism of proteinuria in DM.

Methods: We made 0.2 M glucose-6-phosphate solution mixed with PBS(pH 7.4) containing 50 mg/mL BSA and protease inhibitor for preparation of AGE. As control, we used BSA. We manufactured and symbolized five culture dishes as follows; B5 - normal glucose(5 mM) + BSA, B30 - high glucose(30 mM) + BSA, A5 - normal glucose(5 mM) + AGE, A30 - high glucose(30 mM) + AGE, A/B 25 - normal glucose(5 mM) + 25 mM of mannitol(osmotic control). After the incubation period of both two days and seven days, we measured the amount of heparan sulfate proteoglycan(HSPG) in each dish by ELISA and compared them with the B5 dish at 2nd and 7th incubation days. We observed the morphological changes of epithelial cells in each culture dish using scanning electron microscopy(SEM). We tried the permeability assay of glomerular epithelial cells using cellulose semi-permeable membrane measuring the amount of filtered BSA through the apical chamber for 2 hours by sandwich ELISA.

Results: On the 2nd incubation day, there was no significant difference in the amount of HSPG between the 5 culture dishes. But on the 7th incubation day, the amount of HSPG increased by 10% compared with the B5 dish on the 2nd day except the A30 dish($P < 0.05$). Compared with the B5 dish on the 7th day the amount of HSPG in A30 and B30 dish decreased to 77.8% and 95.3% of baseline, respectively($P > 0.05$). In the osmotic control group (A/B 25) no significant correlation was observed. On the SEM, we could see the separated intercellular junction and fused microvilli of glomerular epithelial cells in the culture dishes where AGE was added. The permeability of BSA increased by 19% only in the A30 dish on

이 연구는 2004년 한국과학재단 특정기초연구사업(KOSEF, R01-2002-000-00251-0)의 보조로 수행되었음.

접수: 2006년 3월 17일, 승인: 2006년 4월 19일

책임저자: 하태선, 충북 청주시 개신동 62, 충북대학교병원 소아과

Tel: 043)269-6374 Fax: 031)780-5239 E-mail: tsha@chungbuk.ac.kr

the 7th day compared with B5 dish on the 7th day in the permeability assay ($P < 0.05$).

Conclusion : We observed not only the role of a high level of glucose and AGE in decreasing the production of HSPG of glomerular epithelial cells in vitro, but also their additive effect. However, the role of AGE is greater than that of glucose. These results seems to correlate with the defects in charge selective barrier. Morphological changes of the disruption of intercellular junction and fused microvilli of glomerular epithelial cells seem to correlate with the defects in size-selective barrier. Therefore, we can explain the increased permeability of glomerular epithelial units in the in vitro diabetic condition. (J Korean Soc Pediatr Nephrol 2006;10:8-17)

Key Words : Advanced glycosylation endproducts(AGE), Glucose, Diabetes, Glomerular permeability, HSPG, Intercellular junction, Proteinuria

서 론

당뇨병성 신증은 전 세계적으로 만성신부전의 가장 흔한 원인 중 하나이며 당뇨병에서의 가장 중요한 합병증과 사망원인으로서 소아에서 주로 발생하는 인슐린 의존성 당뇨병에서는 약 30-50%의 발생빈도를 보이고 일단 발병한 신증은 비가역적이고 이러한 대사성 신손상이 진행을 하게 되면 만성 신부전으로 이행하게 된다[1]. 당뇨병에서의 당뇨병성 신증의 발병요소로는 고혈당의 조절실패가 가장 중요하고 여기에 유전적인 요소도 어느 정도 관여할 것으로 생각하나 체액성 물질 또는 대사성 물질들의 영향, 혈액학적 기전 등의 기전으로서 신손상이 발생하고 진행한다[2, 3]. 이러한 진행성 당뇨병성 신증의 이전단계인 미세알부민뇨(microalbuminuria, 30-300 mg/day of albumin)는 이러한 신손상의 초기단계임을 시사하고 신부전으로 진행할 확률이 미세알부민뇨가 없을 때보다 20배 이상의 위험도가 있다[2]. 따라서 당뇨병 환자의 신손상에 대한 예후지표로서 미세알부민뇨, 즉, 사구체 투과성의 증가에 의한 단백뇨는 매우 중요하므로 지속적으로 관찰하여야 한다.

당뇨병에서의 당뇨병성 신증의 발병요소로는 고혈당의 조절실패가 가장 중요하고 여기에 유전적인 요소도 어느 정도 관여할 것으로 생각하나 체액성 물질 또는 대사성 물질들의 영향, 혈액학

적 기전, 시토카인(VEGF, bFGF), 후기당화합물 등의 기전으로서 신손상이 발생하고 진행한다[2, 3].

고혈당은 간접적인 병적효과를 내는데 생체 외 실험에서 혈관사이세포, 내피세포에서 type IV collagen, laminin B1 그리고 fibronectin 유전자 발현을 증가시켜 사구체질환을 유발시킬 수 있다[4].

당뇨병성 신증의 발병요소로서의 후기당화합물의 첨가역할은 다음과 같다. 고혈당이 지속되면서 단백질과 반응하면 비효소성 당화합을 비롯한 일련의 생화학적 과정을 통하여 Amadori 생성물을 거쳐 비가역적인 후기당화합물(advanced glycosylation endproducts, AGE)이 생성된다[5] (Fig. 1).

AGE는 조직내 단백질, 특히, collagen이나 laminin과 같은 대사반감기가 긴 단백질조물과 교차결합(crosslinking)하면 분해되기가 어렵고 비가역적이므로 기저막 또는 세포외기질의 비후

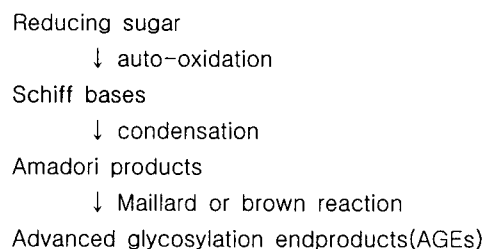


Fig. 1. Chemical reaction pathway for nonenzymatic glycosylation of proteins.

화를 일으키고 LDL, IgG 등의 혈장단백과의 결합 등을 통하여 조직을 물리적 그리고 구조적으로 변화시키며 광범위한 교차연결과 지방과산화물을 일으키며 탄력성이 줄어들고 혈관투과성을 증가시키며 단백구를 유도하기도 한다[6, 7]. 지방과 산화를 통하여는 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하면서 세포손상을 일으킨다[8].

또한, 성장인자, cytokines, 세포의 기질 등의 유전자 발현을 증가시키고 세포증식을 촉진시킨다[9]. 따라서 일단 한번 조직에 침착하면서 이와 같이 이차적인 반응을 계속 유발시키면서 임상적으로 노화, Alzheimer 질환, 동맥경화증, 만성신부전에서 아밀로이드증 등의 노인성, 혹은, 만성질환의 발병과 연관성이 높으며 당뇨병에서도 각종 합병증, 예를 들면, 혈관합병증, 망막증, 신증 등의 발생과 관련이 있다[9]. 실제 당뇨병에서 이것의 측정정도는 당뇨병성 망막증 등의 합병증의 정도(severity)와도 비례한다. 당뇨병성 신증의 신장에서도 마찬가지로 collagen 등과의 결합을 통하여 분해에 저항하고 기질의 정상적인 결합을 방해하여 경화병변을 만들고 cytokines과 반응성 산소종 등을 통한 여러 다양한 기전으로 신손상 및 이의 진행을 유도한다[7, 10].

한편, 이러한 변화는 AGE 생성억제제인 aminoguanidine이 이러한 변화를 감소시킬 수 있다는 사실로도 AGE의 중요성을 증명할 수 있다[11, 12]. 정상적인 실험동물에서 AGE를 정맥투여하면 사구체비대, 사구체 기저막의 비후, 혈관간부위의 경화, 알부민뇨 등의 소견을 보이고[32] type IVcollagen의 $\alpha 1$ chain과 laminin $\beta 1$ chain에 대한 mRNA, 그리고 TGF- β 에 대한 mRNA의 표현이 증가한다[14, 15]. 이러한 임상적 그리고 분자생물학적 소견들은 마찬가지로 aminoguanidine 투여시 예방 또는 감소시킬 수 있다[7, 13-15]. 따라서 AGE도 당뇨병성 신증에서 사구체 세포와 사구체 기저막의 손상과 단백뇨의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다

[13].

본 연구는 사구체 기저막의 주요생성원인 사구체 상피세포와 내피세포를 배양유지한 후 생체 외 당뇨병 상태로서 고농도의 당을 포함하는 배양액과 후기당화합물을 적용하여 배양하고 이때 나타나는 병리적 변화, 즉, 세포의 기질의 변화와 형태학적 변화와 함께 투과성(여과율)의 변화를 살펴보고 동시에 당뇨병성 신증에서의 단백뇨의 기전을 설명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포 배양

쥐의 사구체 상피세포는 Kreisberg(University of South Alabama, USA)에 의해 제공되었고, 그가 묘사한 대로 배양되었다[16].

2. 후기당화합물의 준비

50 mg/mL BSA(Fraction V, Sigma)와 protease inhibitor를 포함한 PBS(pH 7.4)에 glucose-6-phosphate를 섞어 0.2 M의 용액을 만들었다. 37°C reaction tube에 무균상태로 6주간 저장하였다.

3. 후기당화합물과 당의 혼합

BSA를 대조군으로 하였으며, 후기당화합물과 BSA를 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ surface area의 농도가 되도록 붓고 다음과 같은 비교대상의 culture dishes를 만들었다.

B5: BSA만 첨가 - 5 mM

B30: BSA만 첨가 - 30 mM

A5: 후기당화합물만 첨가 - 5 mM

A30: 후기당화합물만 첨가 - 30 mM

A/B 25: osmotic control - 25 mM mannitol

4. 세포 추출물의 준비

이미 자란 여러 층의 세포들을 PBS로 두 차례 세척한 후 4 M guanidinium-HCl, 2% CHAPS, protease inhibitor와 함께 밤새 4°C에

서 추출하고, -20°C에 보관하였다.

5. HSPG양의 측정

ELISA를 이용하여 heparan sulfate proteoglycan(HSPG)양을 측정하였다(primary antibody; rat perlecan의 core protein에 대한 monoclonal antibody(UBI, USA)).

6. 세포의 형태학적 관찰

Scanning electromicroscopy(SEM)를 이용하여 형태학적 관찰 각각의 culture dishes에 있는 사구체 상피세포를 5% glutaraldehyde로 고정하고 2% osmium tetroxide로 후고정한 후 ethanol로 탈수시켰다. Critical point drying 과정 후 gold coating하여 SEM(Hitachi S-570, Japan)으로 관찰하였다.

7. 생체의 사구체 여과율의 관찰

Semi-permeable membrane을 이용하여 permeability assay 0.45 mm의 pore size를 갖는 cellulose semi-permeable membrane(Millicell-HA, Millipore Corp., MA, USA)의 표면에 이미 성장한 사구체 상피세포를 부착시켰다. Maintenance media를 새 것으로 교환한 후 basolateral media에 1 µg/mL의 BSA를 넣는다. 두 시간 동안 apical chamber를 통해 여과되는 BSA양을 sandwich ELISA method로 측정하였다. 각각의 수치는 첨가한 총 BSA양에 대한 millicell chamber에 찬 BSA의 비율로 계산하였다.

8. 통계적 분석

각각의 수치는 (평균±표준편차)로 표시하였고, 분석은 Student's t-test를 사용하였으며, $P < 0.05$ 를 통계학적으로 유의하다고 판단하였다.

결 과

후기당화합물의 농도는 fluorescence sphec-

trophotometer를 이용하여 440 nm에서 concentration-dependent emission peak를 이용하여 확인하였다.

1. ELISA를 이용한 HSPG의 측정

48시간 배양 후 측정된 대조군을 포함한 다섯 culture dishes의 HSPG양은 통계학적 차이는 없었다. 일 주 배양 후에 48시간 동안 배양한 B5 dish에 비해서 일 주 배양한 A30 dish를 제외한 일 주 배양한 모든 dishes에서 10% 이상의 HSPG양의 증가를 보였다($P < 0.05$, Fig. 2). 일 주 배양한 B5 dish에 비해서 일 주 배양한 A30 과 B30 dish에서 각각 HSPG양이 각각 77.8%와 95.3%로 감소하였고($P > 0.05$), osmotic control group(A/B 25)에선 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$, Fig. 3).

2. 사구체 상피세포의 형태학적 관찰

일 주 배양 후 당과 후기당화합물에 의한 사구체 상피세포의 형태학적 변화를 scanning EM을

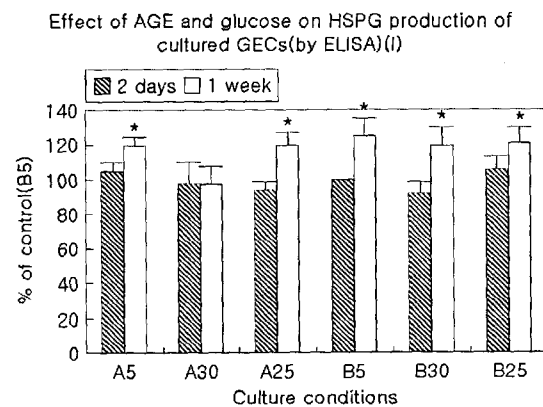


Fig. 2. Effect of glucose and AGE on the HSPG production of cultured glomerular epithelial cells during two and seven days incubation time(assayed by ELISA) when the HSPG amount of the control(2nd day B5 - left column of B5) is determined as 100%(vertical axis). B5; 5 mM glucose + BSA adding, B30; 30 mM glucose + BSA adding, A5; 5 mM glucose + AGE adding, A30; 30 mM glucose + AGE adding, A/B 25; 5 mM + 25 mM of mannitol added(osmotic control). * $P < 0.05$, compared with the value for the 2nd day B5.

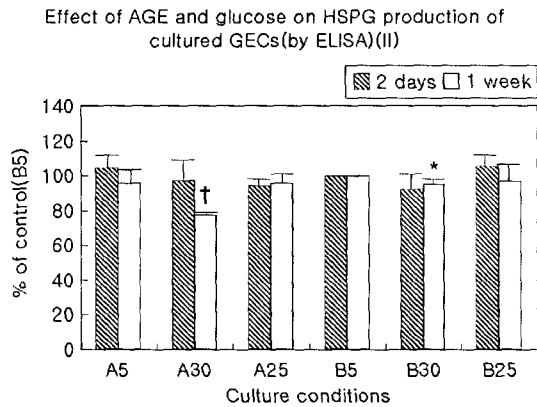


Fig. 3. Effect of glucose and AGE on the HSPG production of cultured glomerular epithelial cells during two and seven days incubation time (assayed by ELISA) when the HSPG amount of the control (7th day B5 - right column of B5) is reckoned as 100% (vertical axis). B5; 5 mM normal glucose + BSA, B30; 30 mM high glucose + BSA, A5; 5 mM normal glucose + AGE, A30; 30 mM high glucose + AGE, A/B 25; 5 mM + 25 mM of mannitol (osmotic control). * $P < 0.01$, compared with the value for the 7th day B5. † $P < 0.01$, compared with the value for the 7th day B5.

이용하여 관찰하였다. 후기당화합물이 첨가된 경우에 분리된 세포사이이음(intercellular junction)과 융합된 미세융모를 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 이런 형태학적 변화는 후기당화합물의 영향으로 유도된 size-selective barrier의 파괴가 부분적으로나마 사구체 기저막에서의 알부민 투과성의 증가의 원인임을 암시하고 있다.

3. 당과 후기당화합물의 사구체 상피세포에 대한 albumin permeability에 미치는 영향

BSA의 투과는 일 주 배양 후 A30 dish에서 만 일 주 배양 후 B5 dish에 비해 19% 증가하는 소견을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다 ($P > 0.05$, Fig. 5).

고 찰

당뇨병성 신증에 있어서 사구체 상피세포와 내피세포에 대한 연구들은 아직 결과들이 많지 않고 초보적인 단계이고, 또한, 당뇨병성 신증에서

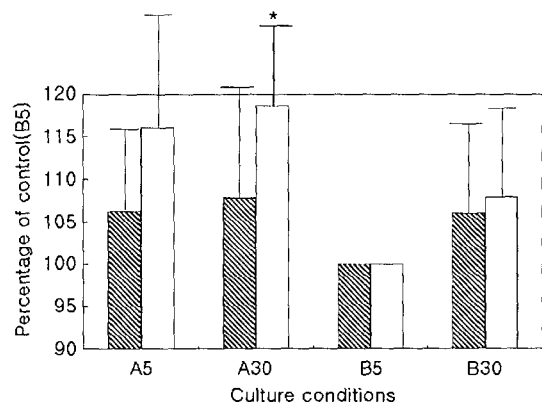


Fig. 4. Effect of glucose and AGE on the permeability of cultured glomerular epithelial cells by the in vitro permeability assay. The increased passage of BSA was shown only in A30 of the 7th day incubation culture dish (right column of A30, $P < 0.05$). At the 7th day A30, 19% increment of permeability was observed compared to the control when the permeability of the control of the 7th day B5 was determined as 100% (vertical axis). B5; 5 mM normal glucose + BSA, B30; 30 mM high glucose + BSA, A5; 5 mM normal glucose + AGE, A30; 30 mM high glucose + AGE. * $P < 0.05$, compared with the value for the 7th day B5.

의 단백질의 발생기전에 있어서도 이들 세포를 이용한 연구실적은 미미한 실정이다. 특히 사구체 상피세포와 내피세포와 관련하여, 이 세포가 사구체여과에 중요한 역할을 함에도 불구하고 그동안 생체외 여과율 실험은 거의 이루어지지 못하였다. 그러나 본 연구자들이 시행한 예비실험에서는 이러한 모델을 이용한 실험에서 매우 흥미있는 결과를 얻었다. 즉, AGE와 고농도 당의 상태에서 여과율이 19%가 증가함을 관찰하였다 [17]. 이에 본 연구는 사구체 기저막의 주요 생성 원인 사구체 상피세포와 내피세포를 배양유지한 후 생체 외 당뇨병 상태로서 고농도의 당을 포함하는 배양액과 AGE를 적용하여 배양하고 이때에 나타나는 병리적 변화, 즉 세포외 기질의 변화와 형태학적 변화와 함께 투과성(여과율)의 변화를 살펴보았다.

고농도의 당과 AGE는 사구체 상피세포의 HSPG 형성을 감소시키는데 서로 부과효과를 보

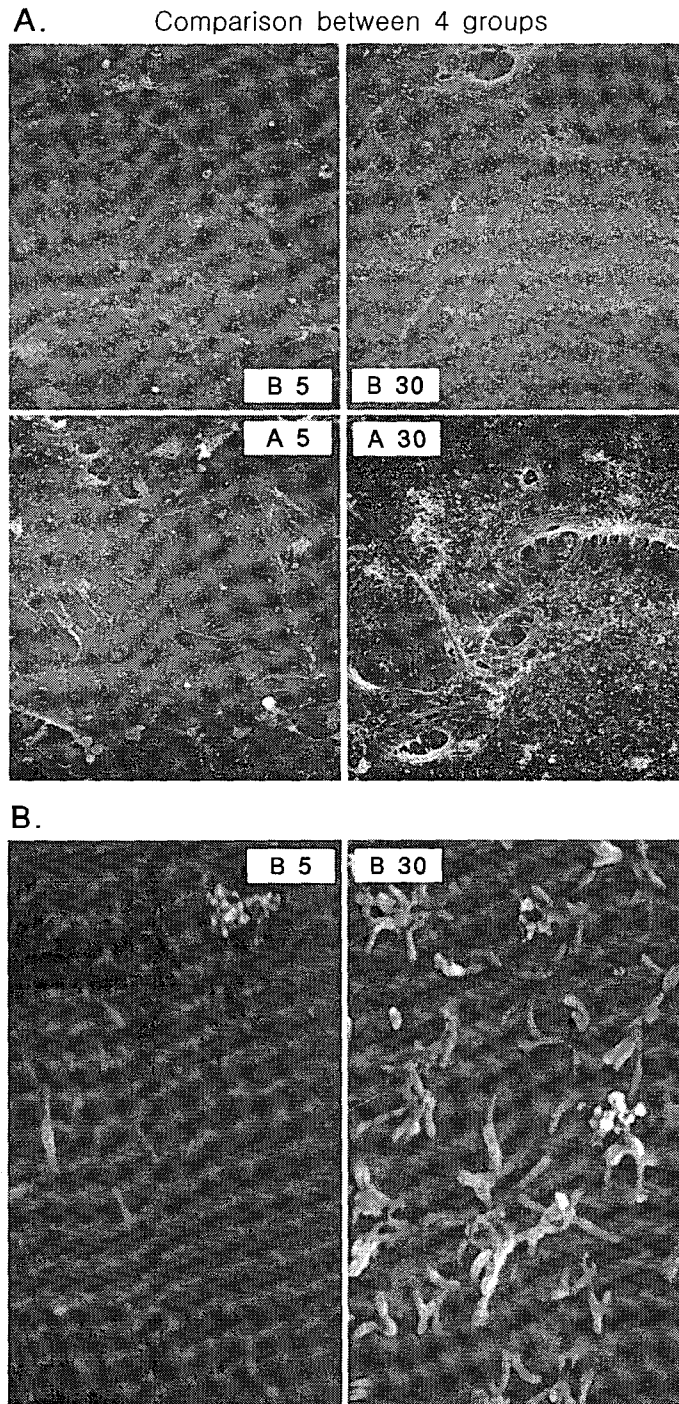


Fig. 5. Morphological alterations of cultured glomerular epithelial cells in the 7nd(th) day incubation culture dishes by scanning EM(SEM). We can see the disrupted intercellular junction and fused microvilli on AGE-adding conditions(A5, A30). Most severe changes are shown at A30 dish with high glucose adding AGE. (A) SEM ($\times 2,000$) (B) SEM ($\times 20,000$).

이지만, AGE의 역할이 상대적으로 더 컸다. 이런 결과는 세포사이이음의 파괴와 투과성의 증가라는 결과와도 서로 상관관계가 있을 것으로 생각되며, 생체의 실험상 장기적인 고농도의 당을 유지할 경우 size-selective와 charge-selective barrier 둘 다 결합이 올 것으로 생각된다.

사구체 모세혈관벽은 여러 기능 중 사구체의 여과라는 중요한 기능을 담당하는데 사구체 혈관 내피세포, 사구체 기저막, 사구체 상피세포의 세포소에 의하여 결정된다. 여기에는 크기선택성(size selective) 그리고 전하선택성(charge selective) 간벽이 그 역할을 한다[18]. 크기선택성(size selective) 간벽은 구조적 기능에 의한 역할로서 endothelial fenestrae, 세 층의 사구체 기저막, interpedicular filtration slit diaphragms와 filtration slits으로 구성된 모세혈관벽 각 구조의 크기와 간격에 의해 결정되며[19], 또한, 사구체 기저막의 주성분인 type IV collagen, laminin, entactin, heparan sulfate proteoglycan 등으로 구성된 체모양(mesh-like)의 network의 구조적 특성으로도 size-selective barrier로서의 역할을 한다[18]. 전하선택성 간벽은 언급한 사구체 모세혈관벽구조 중 일부에서 지니는 음전하에 의해 양전하인 단백질 성분들이 반발되는데 heparan sulfate proteoglycan, sialoprotein 등이 이러한 역할을 담당한다[20]. 이러한 사구체 모세혈관벽의 구조 또는 성분에 변화가 생기면 임상적으로 단백뇨 등이 생길 수 있다[21].

당뇨병성 신증에서의 단백뇨에 대한 연구는 사구체 여과능, 사구체 여과를 담당하는 세포들, 사구체 기저막의 기능 등에 대한 연구 등으로 행하고 있는데 당뇨병성 신증 환자와 당뇨병성 신증을 지니는 동물모델의 신조직 그리고 사구체 상피세포를 배양한 생체의 연구로 나누어서 설명할 수 있다[22].

당뇨병성 신증 환자의 신조직 검사에서 사구체에서의 사구체 기저막이나 내장상피세포, 혈관내피세포 부위의 구조적, 성분적 결과를 살펴보면,

광학 또는 전자현미경검사, 면역형광검사, 면역조직학적 검사, 사구체 기저막의 분리, 분석연구에서 전반적인 사구체 기저막의 비후소견을 보이면서 성분상 heparan sulfate proteoglycan이나 음이온부위는 감소하나 type IV collagen과 fibronectin은 증가하는 모습을 볼 수 있다[23-25]. 당뇨병성 신증을 지니는 동물모델의 신조직을 이용한 연구로서 단백뇨의 기전에 관한 연구결과를 살펴보면, streptozotocin 유발성 당뇨병백서에서 사구체의 proteoglycan의 합성이 감소하고[26, 27] 이는 초기 streptozotocin 유발성 당뇨병백서의 사구체에서 heparan sulfate proteoglycan에 대한 mRNA의 감소와 관련 있을 것으로 사료된다[28]. Type IV collagen에 대하여는, streptozotocin 유발성 당뇨병백서에서 면역조직학적 검사와 면역형광검사상 사구체에서 type IV collagen이 증가하고 이에 대한 mRNA의 표현도 streptozotocin 유발성 당뇨병백서와 kkAy(or KKAY) 생쥐에서 증가하여 post-transcriptional 조절을 받을 것으로 사료된다[23, 26, 28, 29]. Laminin의 경우에도 streptozotocin 유발성 당뇨병백서에서 면역조직학적 검사와 면역형광검사상 사구체부위에 laminin이 증가하고 laminin β 1 또는 γ 1 chain에 대한 mRNA의 표현도 증가함을 보고하였다[23, 26, 28]. 또한, 사구체에서는 기저막에만 존재하는 laminin α 5 chain에 대한 단클론 항체를 이용한 면역형광검사상 db/db 생쥐 모델(인슐린 비의존성)과 streptozotocin 유발성(인슐린 의존성) 당뇨병백서의 사구체 기저막에서 laminin α 5 chain의 양이 증가함을 알 수 있었으나 streptozotocin 유발성 당뇨병백서에서는 laminin α 5 chain에 대한 mRNA의 표현은 증가하고 db/db 생쥐에서는 감소하는 소견을 보여 laminin α 5 chain의 양의 증가기전은 두 모델간에 서로 상이하게 조절됨을 알 수 있다[30, 31].

생체 외 배양실험으로서 van Det NF 등[32]은 인간 사구체 상피세포는 고농도의 당이 있는 상태에서 metabolic labeling, 면역형광검사와

enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 검사상 heparan sulfate proteoglycan이 감소하고 sulfation pattern의 변화를 보고하였고, 또한, transforming growth factor-beta(TGF- β)의 생성을 증가시키고 이것은 fibronectin, tenascin, biglycan과 같은 세포외 기질의 증가와 관련이 있을 것으로 추론하였다[33]. 백서의 사구체 상피세포에서도 heparan sulfate proteoglycan의 mRNA와 그양의 감소와 함께 대사의 이상 조절 현상을 보고하였는데[34] 본 연구에서도 백서의 사구체 상피세포에 대하여 당 뿐만 아니라 후기당화합물에 의해서도 heparan sulfate proteoglycan의 mRNA와 그 양의 감소를 증명하였다[35].

또한, 돼지의 사구체 혈관내피세포에 고농도의 당을 투여하여 heparan sulfate proteoglycan의 mRNA의 감소를 관찰하였다[36]. Collagen에 관하여는, 본 연구자가 속한 그룹에서 백서의 사구체 상피세포를 고농도의 당에 노출시켰을 때 세포와 배양액분획 모두에서 ELISA 검사로서 collagen의 $\alpha 1$ 과 $\alpha 3$ chain의 양이 증가함을 관찰하였다[29]. 따라서 당뇨병성 신증 환자와 동물 모델의 신조직 분석에서 당뇨병성 신증의 사구체 부위 또는 사구체 기저막의 음이온부위의 감소로 인한 전하장벽의 기능부전과 non-proteoglycan 성분의 증가로 인한 크기선택성 간벽의 기능장애가 당뇨병 발생의 중요한 기전임을 알 수 있었고 이것은 사구체 상피세포의 배양연구로도 뒷받침이 되었다[29].

앞으로 세포사이이음의 파괴기전과 HSPG가 감소되는 기전에 대한 연구가 더 많이 되어져야 할 것으로 생각되며, 더불어 세포기저막에 다른 음전하 성분의 물질과 다른 구조성분에 대한 연구들이 계속 이어져야 할 것으로 사료된다.

한 글 요약

목 적 : 생체 외 당뇨병 상태에서 고농도의 당

을 포함하는 배양액과 후기당화합물을 적용하여 세포배양하고 이때에 나타나는 병리적 변화, 즉, 세포외 기질의 변화와 형태학적 변화와 함께 투과성(여과율)의 변화를 살펴보고 동시에 당뇨병성 신증에서의 단백질의 기전을 설명하고자 하였다.

방 법 : 후기당화합물의 준비를 위해 50 mg/mL BSA(Fraction V, Sigma)와 protease inhibitor를 포함한 PBS(pH 7.4)에 glucose-6-phosphate를 섞어 0.2 M의 용액을 만들었다. BSA를 대조군으로 하였으며, 후기당화합물과 BSA를 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ surface area의 농도가 되도록 붓고 다음과 같은 비교 대상의 culture dishes를 만들었다(B5; BSA만 첨가 - 5 mM, B30; BSA만 첨가 - 30 mM, A5; 후기당화합물만 첨가 - 5 mM, A30; 후기당화합물만 첨가 - 30 mM, A/B 25; osmotic control - 25 mM mannitol). 이를 배양 후와 일 주 배양 후 각각의 culture dishes에 있는 heparan sulfate proteoglycan (HSPG)양을 ELISA를 이용하여 측정하고 B5를 대조군으로 하여 각각 비교하였다. 각각의 culture dishes에 있는 사구체 상피세포를 scanning EM(Hitachi S-570, Japan)을 이용하여 형태학적 관찰을 하였다. Cellulose semi-permeable membrane을 이용하여 각각의 culture dishes에서 두 시간 동안 apical chamber를 통해 여과되는 BSA양을 sandwich ELISA method로 측정하여 투과성에 대한 분석을 하였다.

결 과 : 이를 동안 배양 후 측정된 대조군을 포함한 다섯 culture dishes의 HSPG양은 통계학적 차이는 없었다. 일 주 배양 후에 이들 동안 배양한 B5 dish에 비해서 일 주 배양한 A30 dish를 제외한 일 주 배양한 모든 dishes에서 10% 이상의 HSPG양의 증가를 보였다($P < 0.05$). 일 주 배양한 B5 dish에 비해서 일 주 배양한 A30과 B30 dish에서 각각 HSPG양이 각각 77.8%와 95.3%로 감소하였고($P > 0.05$), osmotic control group(A/B 25)에선 통계적으로 유의한

차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 후기당화합물이 첨가된 경우에 SEM상 분리된 세포사이이음(intercellular junction)과 융합된 미세융모를 관찰할 수 있었다. BSA의 투과성은 일 주 배양 후 A30 dish에서만 일 주 배양 후 B5 dish에 비해 19% 증가하는 소견을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다($P>0.05$).

결론 : 사구체 상피세포의 HSPG 형성의 감소에 고농도의 당과 후기당화합물은 서로 부가적인 역할을 하고 후기당화합물이 더 큰 역할을 함을 알 수 있다. HSPG 감소 소견과 더불어 SEM상 장기간 고혈당을 유지하면 사구체 여과기전에서 size-selective와 charge-selective 장벽에 결합을 유발할 수 있으며 당뇨병에서의 단백뇨의 기전 중 하나로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Parving H-H, Osterby R, Anderson PW, Hsueh WA. Diabetic nephropathy. In Brenner BM editor. Brenner and Rector's the kidney. 5th ed, Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1996:1864-92.
- 2) Tuttle KR, DeFronzo RA, Stein JH. Treatment of diabetic nephropathy. A rational approach based on its pathophysiology. Semin Nephrol 1991;220-35.
- 3) Sharma K, Ziyadeh FN. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. Semin Nephrol 1997;17:80-92.
- 4) Ayo SH, Radnik RA, Glass WFII, Garoni JA, Rampt ER, Appling DR, et al. Increased extracellular matrix synthesis and mRNA in mesangial cells grown in high-glucose medium. Am J Physiol 1991;260:F185-91.
- 5) Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J Biol Chem 1981;256:5204-8.
- 6) Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med 1988;318:1315-21.
- 7) Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Lab Invest 1994;70:138-51.
- 8) Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycosylation end products with their receptors/binding proteins. J Biol Chem 1994;269:9889-97.
- 9) Vlassara H. Protein glycation in the kidney. Role in diabetes and aging. Kidney Int 1996;49:1795-804.
- 10) Makino H, Shikata K, Kushiro M, Hiro-naka K, Yamasaki Y, Sugimoto H, et al. Roles of advanced glycation end-products in the progression of diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 1996;11(Suppl 5): 76-80.
- 11) Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. Diabetes 1991;40:1328-34.
- 12) Edelstein D, Brownelee M. Aminoguanidine ameliorates albuminuria in diabetic hypertensive rats. Diabetologia 1992;35:96-7.
- 13) Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycosylation endproducts induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:11704-18.
- 14) Yang CW, Vlassara H, Striker GE, Striker LJ. Administration of AGEs in vivo induces genes implicated in diabetic glomerulosclerosis. Kidney Int 1995;47(Suppl 49):S55-8.
- 15) Striker LJ, Striker GE. Administration of AGEs in vivo induces extracellular matrix gene expression. Nephrol Dial Transplant 1996;11(Suppl 5):62-5.
- 16) Jeffrey I, Kreisberg JI, Patricia D, Wilson P. Renal cell culture. J Elect Micro Tech 1987;9:235-263
- 17) Ha TS. Effects of high glucose and advanced glycosylation endproducts(AGE) on

- the in vitro permeability model using semi-permeable membrane. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 2001.
- 18) Tisher CC, Madsen KM. Anatomy of the kidney. In: Brenner BM editor. *Brenner and Rector's the kidney*. 5th ed, Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1996:3-71.
 - 19) Venkatachalam MA, Rennke HG. The structural and molecular basis of glomerular filtration. *Circ Res* 1976;43:337-447.
 - 20) Kanwar YS, Linker AF, Farquhar MG. Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol* 1980;86:688-93.
 - 21) Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS. Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: A study of glomerular barrier function. *Kidney Int* 1982;21:633-41.
 - 22) Ha TS, Study of the mechanism of proteinuria in diabetic nephropathy. *Kor J Pediatrics* 1998;41(Suppl 1):S69-S74.
 - 23) Ziyadeh FN. The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1993; 22:736-44.
 - 24) Tamsma JT, van den Born J, Bruijn JA, Assmann KJ, Weening JJ, Berden JH, et al. Expression of glomerular extracellular matrix components in human diabetic nephropathy: decrease of heparan sulphate in the glomerular basement membrane. *Diabetologia* 1994;37:313-20.
 - 25) van der Woude FJ, van Det NF. Heparan sulphate proteoglycans and diabetic nephropathy. *Exp Nephrol* 1997;5:180-8.
 - 26) van den Born J, van Kraats AA, Bakker MA, Assmann KJ, van den Heuvel LP, Veerkamp JH, et al. Selective proteinuria in diabetic nephropathy in the rat is associated with a relative decrease in glomerular basement membrane heparan sulphate. *Diabetologia* 1995;38:161-72.
 - 27) Karasawa R, Nishi S, Suzuki Y, Imai N, Arakawa M. Early increase of chondroitin sulfate glycosaminoglycan in the glomerular basement membrane of rats with diabetic glomerulopathy. *Nephron* 1997;76:62-71.
 - 28) Fukui M, Nakamura T, Ebihara L, Shirato I, Tomino Y, Koide H. ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes* 1992;41:1520-7.
 - 29) Kasinath BS, Ha TS, Maldonado R, Kalluri R. Differential regulation of alpha1(IV) and alpha3(IV) chains by glucose and insulin in glomerular epithelial cells. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 1987:7.
 - 30) Ha TS, Barnes JL, Stewart JL, Ko CW, Miner JH, Abrahamson DR, et al. Regulation of renal laminin in mice with type II diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1931-9.
 - 31) Kasinath BS, Barnes JL, Ha TS, Ko CW. Differential regulation of $\alpha 5$, a novel chain of laminin, in animal models of diabetic nephropathy. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 1997;8:641A
 - 32) van Det NF, van den Born J, Tamsma JT, Verhagen NA, Berden JH, Bruijn JA, et al. Effects of high glucose on the production of heparan sulphate proteoglycan by human mesangial and glomerular visceral epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1996;49:1079-89.
 - 33) van Det NF, Verhagen NA, Tamsma JT, Berden JH, Bruijn JA, Daha MR, et al. Regulation of glomerular epithelial cell production of fibronectin and transforming growth factor- β by high glucose, not by angiotensin II. *Diabetes* 1997;46:834-40.
 - 34) Kasinath BS, Grellier P, Terhune WC, Ghosh-Choudhury G, Abboud SL. Regulation of basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein gene expression by high glucose medium in glomerular epithelial cells. *J Cell Physiol* 1996;167:131-6.
 - 35) Ha TS, Kim HS, Kasinath BS. The change of heparan sulfate proteoglycan by glucose and advanced glycosylated endproducts in glomerular epithelial cells. *Korea J Nephrol* 2000;19:1:22-30.
 - 36) Ha TS, Duraisamy S, Faulkner JL, Kasinath BS. Regulation of glomerular endothelial cell proteoglycans by glucose. *J Korean Med Sci* (in progress), 2004.