

신장 근위세뇨관세포에서 고포도당이 IGF-I 결합과 포도당운반계에 미치는 영향

한호재 · 박권무 · 손창호 · 윤용달*

전남대학교 수의과대학
한양대학교 자연과학대학, 호르몬연구센터*
(1997년 3월 2일 접수)

Effects of high glucose concentration on IGF-I binding and glucose transporters in renal proximal tubule cells

Ho-jae Han, Kwon-moo Park, Chang-ho Son, Yong-dal Yoon*

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University
College of Natural Science, Hanyang University, Hormone Research Center*

(Received Mar 2, 1997)

Abstract : Diabetes mellitus is associated with a wide range of pathophysiological in the kidney. This study was designed to examine the effects of high glucose concentration on IGF-I binding and glucose transporters in renal proximal tubule cells. The results were as follows :

The binding of ^{125}I -IGF-I reached the peak at the 30 minutes and gradually decreased by the time dependent manner. The binding of ^{125}I -IGF-I was inhibited by the unlabelled IGF-I(10^{-14} ~ 10^{-8}M) in a concentration dependent manner. The relative affinity of IGF-I receptor for IGF-I, IGF-II and insulin exhibited typical type 1 binding(IGF-I > insulin > IGF-II). However IGF-II did not compete for the cultured cell membrane ^{125}I -IGF-I binding site at 10^{-14} ~ 10^{-8}M . Under optimal conditions, IGF-I binding to the membranes from 5mM and 20mM glucose treated cells was analyzed. It was found that 20mM glucose treated cells exhibited higher binding activity for IGF-I. In order to further substantiate this increase in IGF-I binding sites, we performed affinity-labelling studies. The cross-linked cell membrane subjected to SDS-PAGE; labelled material was detected by autoradiography. 20mM glucose treated cells exhibited higher levels. The initial rate of methyl- α -D-glucopyranoside(α -MG) uptake was significantly lower($74.41 \pm 6.71\%$) in monolayers treated with 20mM glucose than those of 5mM glucose. However, 3-O-methyl-D-glucose(3-O-MG) uptake was not affected by glucose concentration in culture media. IGF-I significantly increased α -MG uptake in both 5mM and 20mM glucose treated cells. However, 3-O-MG uptake was not

본 연구는 한국과학재단의 '95 핵심전문연구비(951-0612-024-1)와 호르몬연구센터(HRC 96-0401-0401)의 지원을 받아 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Ho-Jae Han, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Republic of Korea.

affected by IGF-I in both conditions.

In conclusion, 20mM glucose increased binding sites of 125 I-IGF-I, inhibited Na/glucose cotransporter activity. But 20mM glucose did not change facilitated glucose transporter.

Key words : Glucose, IGF-I, Transporter, Kidney.

서 론

신장 근위세뇨관은 당, 염기, 이온 등을 포함하여 여러 영양분들을 재흡수함으로써 체내에서 이들 농도를 조절하는 등 중요한 역할을 담당하고 있다. 사구체에서 여과된 포도당은 신장 근위세뇨관에서 약 90% 정도를 재흡수한다. 이는 솔변연의 Na/glucose 공동운반체(SGLT)와 기저막의 촉진적 확산경로(GLUT)를 통해서 이루어진다(Fig 1)¹. 신조직에서 두종류의 SGLT 이성체가 존재하는 것으로 보고되고 있는데 포도당에 높은 친화력을 가진 SGLT1(1:2 glucose:Na⁺ stoichiometry)은 랫트나 토끼 근위세뇨관에 분포하지만 포도당에 낮은 친화력을 가진 SGLT2(1:1 glucose:Na⁺ stoichiometry)는 근위세뇨관의 S1 부분에 존재한다. 이 이성체는 원래 토끼 신장에서 발견되었으며 그 후에 사람 신장에서도 발견되었다²⁻³. 근위세뇨관 세포로부터 혈중으로 포도당의 이동은 포도당에 낮은 친화력을 가진 GLUT2를 이용하기도 하지만 높은 친화력을 가진 GLUT1을 이용하기도 한다⁴⁻⁵. 더욱이

GLUT2는 S1 부분에 국한되어 있는 반면에 GLUT1은 근위세뇨관 전체에 분포하고 있다. 이와같이 근위세뇨관을 따라 SGLT와 GLUT의 분포가 다르게 나타나는데 이는 사구체에서 여과된 포도당을 처리하는데 근위세뇨관 부분별로 특이성을 갖고 있음을 말해준다. 즉, S1 부분의 근위세뇨관에서는 솔변연과 기저막쪽이 low affinity, high capacity를 가진 운반체(SGLT2, GLUT2)를, S2 및 S3 부분에서는 high affinity, low capacity(SGLT1, GLUT1)운반체를 이용해 포도당 흡수를 조절한다. 한편 혈중 고포도당은 신장의 병태생리학적인 변화 및 세포의 기능변화와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있으며 이로 인한 신장기능부전은 당뇨병 환자의 주된 사인중의 하나가 되고 있다⁶. 이들 변화중 초기에는 신장크기, 사구체 부피 및 신장기능의 증가가 특징적이고 후기에는 사구체 간질의 증식, 사구체 세포외기질의 축적 및 알부민뇨 등이 나타난다⁷.

Insulin-like growth factor(IGF)는 생체에서 동물세포의 성장과 분화의 중요한 조절자 역할을 하며 각각의 조직에 대해 특이적인 경로를 통해 각각 다른 기능들을 조절한다⁸. 신장에서 IGF는 당, 아미노산 및 전해질 등의 이동을 비롯하여 단백질의 합성 및 세포의 성장 등을 자극하는데 특히 성장호르몬의 자극에 의해 신장 자체에서 생산되어 직접 작용한다⁹⁻¹¹. 근위세뇨관의 비대와 과기능은 실험적으로 유발시킨 당뇨병의 초기 지표로서 확립된 적이 있다. 실험적으로 한쪽 신장을 절제한 경우 남아있는 신장은 근위세뇨관의 비대와 증식에 기인하여 그 크기가 증가하는데 이는 renotrophic factor(growth stimulatory factor)의 합성증가에 기인한 것으로 생각된다. Renotrophic factor로 가능성이 있는 인자는 IGF-I, IGF-II, epidermal growth factor(EGF), fibroblast growth factor(FGF)와 prostaglandin들이다¹². 실험적으로 유발시킨 당뇨병 상태에서도 성장호르몬과 IGF는 growth hormone bind-

PROXIMAL CELLS

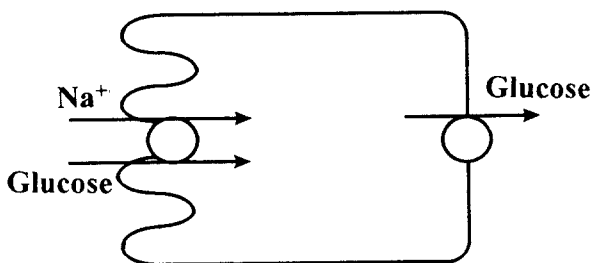


Fig 1. Schematic model illustrating mechanisms of transepithelial glucose transport. Brush-border Na⁺-glucose cotransporter transports filtered D-glucose from tubular lumen into cell. Glucose then diffuse out of cell into blood via basolateral facilitated glucose transporter.

ing protein(GHBP), IGF, IGF 수용체 및 insulin-like growth factor binding protein(IGFBP)으로 이루어진 복잡한 과정을 통해 신장의 병태생리학적 변화에 관련되는 것으로 보고 있다¹³. 급성 streptozotocin(STZ)-유도성 당뇨병 랫트에서도 역시 신장 비대 및 과관류와 함께 일시적으로 신장 IGF-I 생산이 증가되는 것으로 보고되고 있다¹⁴. 또한 신피질의 IGFBP-1에 증가 및 IGFBP-5 mRNA의 감소를 포함하여 신장 IGF계 유전자 발현에 현저하고 복잡한 변화가 일어난다¹².

당뇨병시 포도당과 Na⁺을 재흡수하기 위한 근위세뇨관세포 능력의 변화는 혈중 포도당 농도의 증가와 관련되는 것으로 보고되고 있다¹⁵. 즉, 당뇨병(type I)을 가진 동물에서 Na/H 상호운반체의 활성도는 증가하는 반면에 SGLT의 활성도는 감소된다¹⁶. 그러나 어떠한 기전으로 이러한 효과가 유발되는가에 대해서는 거의 이해되고 있지 않다. 이와같은 실험을 위해 배양된 상피세포의 이용은 물질이동과정에 영향을 줄 수 있는 가능한한 요소들을 쉽게 조절할 수 있기 때문에 세포수준에서 포도당 이동을 연구하는데 매우 효과적이다. 그러나 이들 실험에 사용하는 세포의 물질이동계가 얼마나 생체와 가까운 기능을 갖고 있는지가 중요한 요소가 된다. 이미 널리 사용되고 있는 세포주(cell line)들과는 다르게 동물로부터 직접 적출하여 초대배양한 세포는 체내 정상 신장 근위세뇨관세포들과 매우 유사한 기능을 갖고 있음을 보고한 바 있다¹⁷.

그러므로 본 연구에서는 초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관세포를 이용하여 고폏도당이 IGF-I 결합과 포도당 운반체들에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

재료 : 제일실험동물사육소(경기도 용인)에서 분양 받은 New Zealand White 수컷 토끼(1.3~1.8kg)를 사용하였다. 기본배지는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, glucose, L-glutamine, phenol red, sodium bicarbonate, sodium pyruvate가 포함되지 않음)과 Nutrient Mixture F-12(Ham, L-glutamine, sodium bicarbonate가 포함되지 않고 glucose 1,802mg/1000ml 포함)(Gibco BRL)의 1:1 혼합체를 사용하였다. 모든 실험

험에 사용한 배지는 항생제를 첨가하지 않았지만 근위세뇨관 분리과정에서 사용한 배지에는 penicillin G 100IU/ml와 streptomycin 100µg/ml을 첨가하였다. 배지는 Millipore apparatus 여과장치로 여과된 3차증류수에 녹여 pH를 7.3으로 적정한 후 0.22µm Millipack filter(Millipore)로 여과시켜 사용하였다. Collagenase Class IV, Soybean trypsin inhibitor, Trypsin 2.5% 및 Bovine serum albumin 등은 Gibco BRL에서 구입하였다. Insulin, IGF-I, IGF-II, hydrocortisone, apo-transferrin, dissuccinimidyl suberate(DSS), dimethylsulfoxide (DMSO), ethylenediaminetetraaceticacid(EDTA), sodium-dodecylsulfate(SDS) 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. ¹²⁵I-IGF-I은 Dupont/NEN에서 각각 구입하였다. Acrylamide/Bis, N,N,N',N'-tetramethylethyldiamine (TEMED) 그리고 단백질 분석 염색시약은 Bio-Rad사에서 구입하여 사용하였다. 그 이외의 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

성장인자로 사용한 insulin은 0.01N HCl, transferrin과 hydrocortisone은 증류수에 각각 녹여서 Nalgene filter apparatus(0.22µm)에 여과시킨 후 분주하여 냉장 및 냉동보관하면서 사용하였고, IGF-I과 IGF-II는 먼저 0.1M acetic acid로 녹인후 이 용액을 10% 혈청을 포함한 PBS(phosphate buffered saline: NaCl 140mM, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.5mM, Na₂HPO₄ 8.1mM, pH 7.4)에 재용해시켜 냉동보관하면서 사용하였다. 사구체를 제거하기 위해 관류과정에서 사용한 산화철용액은 Cook와 Pickering¹⁸이 기술한 방법으로 제조하여 사용하였다.

방법 :

근위세뇨관 세포의 초대배양 : 토끼 신장 근위세뇨관세포의 초대배양은 Chung *et al*¹⁹의 방법을 변형한 것으로 토끼를 경추타격으로 안락사시킨 후 신동맥과 정맥을 그대로 유지한 채 즉시 신장을 적출해 지방과 주위조직을 제거한 다음 항생제가 첨가된 차가운 기본배지에 보관하였다. 적출된 신장은 신동맥에 끝이 무딘 19호 주사바늘을 삽입하여 외과용 실로 고정 후 혈액이 완전히 제거될 때까지 멸균된 PBS로 관류시킨다. 이어서 0.5% 산화철용액으로 피질이 암회색이 될 때까지 관류시킨 후 항생제가 첨가된 기본배지로 관류시켰다. 피막을 박리한 후 외과용 가위를 사용하여 피질부만을 약 0.5cm 정도의 조각으로 잘

라내고, 멸균된 조직균질기로 3~4회 갈아 두층의 나이론망(254와 85 μ m)을 통과시킨 후 85 μ m 나이론 망에 걸린 세포만을 수집하여 DMEM/F-12 배지가 채워진 시험관으로 옮긴다. 이들중 산화철을 포함하고 있는 사구체 세포는 멸균된 막대자석을 이용하여 제거하고, 근위세뇨관은 60 μ g/ml collagenase class IV와 60 μ g/ml soybean trypsin inhibitor로 상온에서 각각 3분씩 처리한 후 원심분리(1,000rpm, 5분)하여 3회 세척하였다. 이렇게 준비된 근위세뇨관을 3가지 성장인자(insulin 5 μ g/ml, transferrin 5 μ g/ml, hydrocortisone 5×10^{-8} M)가 첨가된 기본배지에 희석하여 35mm 플라스틱 배양접시에 접종하였다. 배양은 95% 공기와 5% CO₂를 함유한 배양기에서 37 $^{\circ}$ C를 유지하며 실시하였고 배지는 접종후 첫날 교체하고 그 이후는 3일마다 교환하였다. 단 competitive binding assay와 cross-linking analysis를 실시하기 위해서는 매 실험 24시간 전에 배지를 교환하였다.

¹²⁵I-IGF-I binding assay : 세포가 완전히 단층을 형성한 후에 배지를 제거하고 이들 세포를 incubation buffer(NaCl 120mM, KCl 5.9mM, CaCl₂ 2.5mM, MgCl₂ 1.2mM, Na₂HPO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 15.4mM, HEPES 16mM, Glucose 5mM, 1% Bovine serum albumin, pH 7.4)로 3회 세척한 후 1ml incubation buffer에 ¹²⁵I-IGF-I (2x10⁻¹¹M)과 IGF-I(5x10⁻¹⁰M)을 첨가하여 배양시켰다²⁰. 지정된 시간마다 incubation buffer를 제거하고 차가운 incubation buffer(pH 7.4)로 3회 세척하였다. 이 세포에서 세포막과 세포질 내부에 분포된 ¹²⁵I-IGF-I을 분리하기 위해 pH 2.8로 적정된 차가운 1ml incubation buffer를 가지고 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양하였다. 이후 배양액을 수집하여 방사선활성(acid-sensitive radioactivity)을 측정하여 세포막 결합형으로 하였고, 다시 차가운 incubation buffer(pH 7.4)로 3회 세척한 후 세포를 0.1% SDS에서 용해시켜 방사선활성(acid-resistant radioactivity)을 측정하여 세포질 분포형으로 하였다.

Competitive binding assay에서는 ¹²⁵I-IGF-I과 표지되지 않은 각 농도의 insulin, IGF-I 또는 IGF-II를 동시에 첨가한 1ml incubation buffer(pH 7.4)로 30분간 배양시킨 후 차가운 incubation buffer(pH 7.4)로 3회 세척하였다. 이후 세포를 0.1% SDS에 녹여 방사선활성을 측정하였다.

Affinity cross-linking analysis : 세포가 완전히 단층을 형성한 후에 배지를 제거하고 이들 세포를 incubation buffer로 3회 세척한 후 1ml incubation buffer에 ¹²⁵I-IGF-I(2x10⁻¹¹M)과 각 농도의 IGF-I을 동시에 첨가하여 30분간 배양시켰다. 배양후 incubation buffer를 제거하고 차가운 incubation buffer(pH 7.4)로 3회 세척하였다. 수용체에 결합된 리간드를 cross-link시키기 위해 DMSO로 녹인 DSS를 1.0mM 되게 1ml incubation buffer에 첨가하여 15 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양시킨 후 0.1mM Tris와 0.1mM EDTA(pH 7.4)를 3.0ml 첨가하여 반응을 정지시켰다. 세포용해물에서 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. 전기영동후 젤을 건조시킨 후 Kodak film에 10일 동안 -20 $^{\circ}$ C에서 노출시켜 autoradiogram을 얻었다.

¹⁴C-*a*-MG uptake : 고포도당과 IGF-I이 SGLT와 GLUT에 미치는 효과를 관찰하기 위해서 초대배양한 신장 근위세뇨관세포가 80% 정도 증식하였을 때 포도당 무처리군(5mM)과 270mg/100ml 처리군(20mM)으로 나누어 4일동안 배양시켰다. 그 이후에 필요한 경우 IGF-I(5x10⁻⁸M)을 처리하여 4일간 추가배양한 다음 ¹⁴C-*a*-MG와 ¹⁴C-3-O-MG uptake에 사용하였다.

¹⁴C-*a*-MG uptake 실험은 비대사성 당인 *α*-methyl-D-glucoside(*α*-MG)를 이용하여 Sakhani *et al*²¹(1984)의 방법을 변형하여 세포가 완전하게 단층을 형성하였을 때 uptake buffer [NaCl 136mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.3mM, MgSO₄ 0.41mM, MgCl₂ 0.49mM, NaHPO₄ 0.44mM, KH₂PO₄ 0.44mM, HEPES 5mM, Glutamine 2mM, *α*-MG(0.5mg/ml), Bovine serum albumin(0.5mg/ml)]로 배양세포를 3회 세척한 후에, uptake buffer에 ¹⁴C-*a*-MG (0.5 μ ci/ml)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포는 얼음으로 차게한 washing buffer(mannitol 300mOsm, pH 7.4)로 신속하게 3회 세척하였다. 이후 세포는 0.1% SDS 1ml 용해시킨 후 β -counter로 방사선 활성도를 측정하였다. 기저막에서의 포도당 수송은 ¹⁴C-3-O-methyl-D-glucose(0.5 μ ci/ml)를 이용하여 ¹⁴C-*a*-MG uptake 방법과 같이 ¹⁴C-3-O-MG uptake를 실시하였다. 모든 실험결과는 zero time uptake로 각각 교정한 후 Bradford²² 방법으로 측정된 단백질량으로 표준화시켰다. 또한 모든 실험에서 매 실험당 3개 이상의 배양접시를 사용하였다.

통계처리 : 실험성적의 통계처리는 Student's t-test에 의하여 유의성 검정을 실시하여 P value가 0.05 이하일 때 유의성 있는 것으로 간주하였다.

결 과

^{125}I -IGF-I의 competitive binding assay와 cross-linking analysis : ^{125}I -IGF-I의 세포막 표면 및 세포질내 분포를 37°C에서 180분간 배양하면서 경시별로 조사한 결과는 Fig 2와 같다. 세포표면과 세포질내로 들어간 ^{125}I -IGF-I의 방사선 활성은 30분 정도에 최대치에 이르렀다. Fig 3은 ^{125}I -IGF-I의 농도를 고정시켜 놓고 여기에 표지되지 않은 insulin, IGF-I 및 IGF-II를 농도별로 각각 처리하여 ^{125}I -IGF-I의 결합을 조사한 결과이다. ^{125}I -IGF-I만을 단독투여하였을 때를 최대결합 즉, 100%로 하고 표지되지 않은 IGF-I을 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 을 투여했을 때를 nonspecific binding으로 하여 백분율로 표시하였다. ^{125}I -IGF-I의 결합은 Fig 3A에서 처럼 표지되지 않은 IGF-I을 투여하였을 때 농도의존적으로 억제되었고, IGF-I보다는 미약하지만 insulin을 투

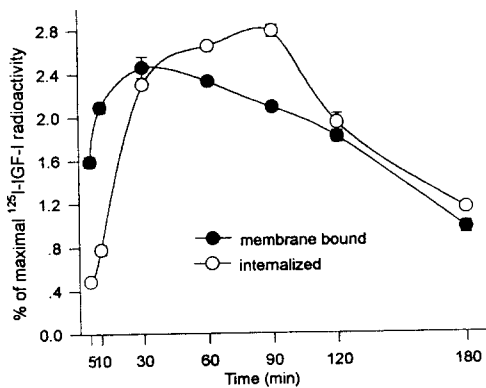


Fig 2. Time course of binding of ^{125}I -IGF-I with primary cultured renal proximal tubule cells at 37°C. Monolayers were incubated with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of unlabeled IGF-I($5 \times 10^{-10}\text{M}$) and 0.6mM bacitracin. After different periods of time, cells were exposed to cold acidified buffer.

Acid-sensitive radioactivity was taken as membrane-bound ^{125}I -IGF-I and acid-resistant radioactivity as internalized ^{125}I -IGF-I. Data are expressed as the relative amount of ^{125}I -IGF-I radioactivity added to monolayer cells. Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures.

여했을 때에도 ^{125}I -IGF-I의 결합은 억제되었다. 하지만 표지되지 않은 IGF-II에 의해서는 거의 억제가 되지 않았다. ^{125}I -IGF-I 결합의 50% 억제는 표지되지 않은 IGF-I의 경우 $6.54 \times 10^{-9}\text{M}$ 에서, insulin의 경우는 $4.51 \times 10^{-8}\text{M}$ 에서 되었다(data not shown). Cross-linking analysis에 의한 autoradiography에서도 표지되지 않은 IGF-I 농도의존적으로 ^{125}I -IGF-I의 결합이 감소해(Fig 3B) competitive binding assay에서의 결과와 일치하였다.

고포도당이 초대배양한 신장 근위세뇨관세포의 ^{125}I -IGF-I 결합에 미치는 영향 : 초대배양한 근위세뇨관세포의 IGF-I 결합부위에 대한 포도당의 효과를 알아보기 위하여 binding assay와 cross-linking analysis

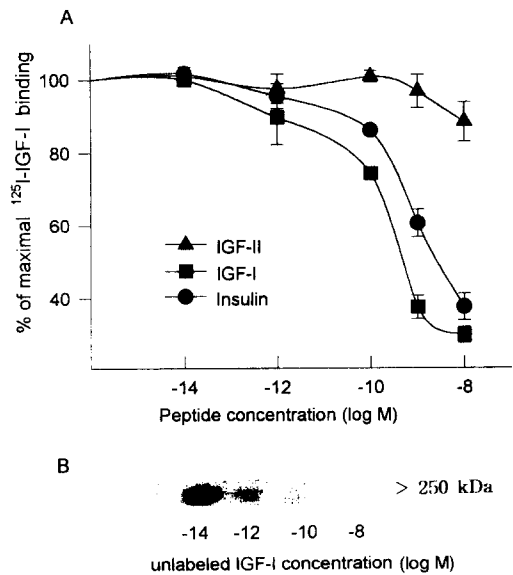


Fig 3. (A) Displacement curves of ^{125}I -IGF-I binding to primary cultured renal proximal tubule cells. Cultures were incubated 30 minutes at 37°C with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) and increasing concentrations of unlabeled IGF-I, IGF-II or insulin. Data are expressed as the relative amount of ^{125}I -IGF-I bound to monolayer cells incubated without competing unlabeled hormone. Values are the means \pm S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. (B) Autoradiograms of ^{125}I -IGF-I cross-linking to primary cultured renal proximal tubule cells without reduction by DTT. Near-confluent cell cultures were incubated 30 minutes at 37°C with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of IGF-I($5 \times 10^{-10}\text{M}$). The bound ligand was cross-linked with 0.1mM disuccinimidyl suberate and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

를 실시하였다. 20mM 포도당 처리군(107.67±2.45%)이 5mM 처리군에 비하여 IGF-I 결합이 유의성 있게 높았다($p < 0.05$, Fig 4A). Cross-linking analysis에 의한 autoradiography에서도 20mM 포도당 처리군에서 ^{125}I -IGF-I의 결합이 5mM 처리군에 비해 증가해(Fig 4B) binding assay에서의 결과와 일치하였다.

Na/glucose 공동운반체와 포도당 촉진적 확산계에 대한 고포도당과 IGF-I의 효과 : 20mM 포도당 처리가 초대배양된 신장 근위세뇨관세포의 SGLT와 GLUT에 미치는 영향을 알아보기 위하여 α -MG 및 3-O-MG uptake를 실시하였다. 20mM 포도당 농도에서 SGLT의 활성화도(74.41±6.71%)는 5mM 포도당군에

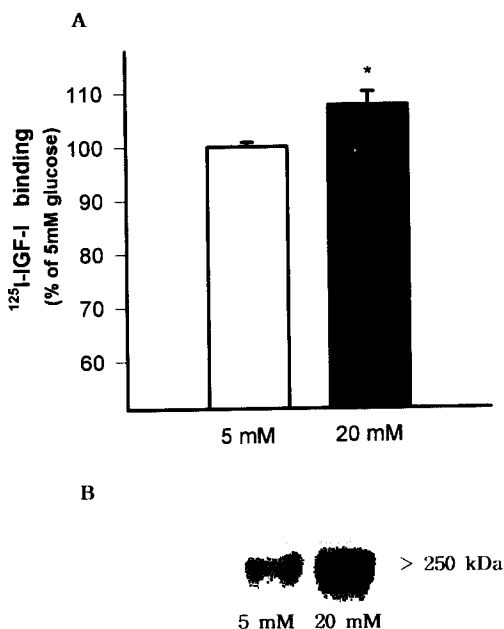


Fig 4. (A) Effect of high glucose concentration on ^{125}I -IGF-I binding to primary cultured renal proximal tubule cells. Primary cultured renal proximal tubule cells were grown in medium containing 5mM glucose or 20mM glucose, as described by "Material and Method". The monolayers were incubated with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of unlabeled IGF-I($5 \times 10^{-10}\text{m}$) and 0.6mM bacitracin for 30 minutes at 37°C. * $p < 0.05$ vs. 5mM glucose. (B) Autoradiograms of ^{125}I -IGF-I cross-linking to 5mM or 20mM glucose treated renal proximal tubule cells without reduction by DTT. Near-confluent cell cultures were incubated 30 minutes at 37°C with ^{125}I -IGF-I($2 \times 10^{-11}\text{M}$) in presence of IGF-I($5 \times 10^{-10}\text{M}$). The bound ligand was cross-linked with 0.1mM disuccinimidyl suberate and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

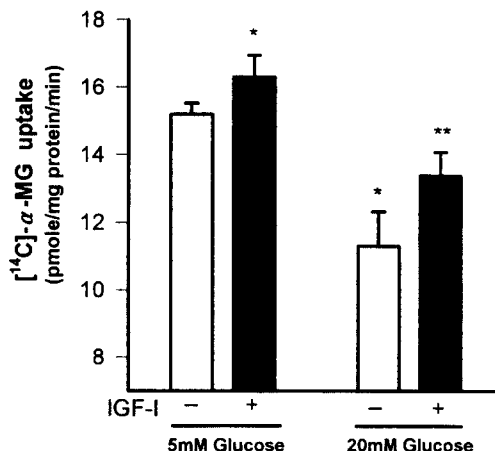


Fig 5. Effect of high glucose concentration and IGF-I on α -MG uptake in primary cultured renal proximal tubule cells. Primary cultured renal proximal tubule cells were grown in 5mM or 20mM glucose and treated with IGF-I($5 \times 10^{-8}\text{M}$) as described in "Material and Method". Uptake was performed with 0.5mM α -MG and ^{14}C - α -MG($0.5\mu\text{Ci/ml}$) for 30 minutes at 37°C. Uptake determinations were corrected for zero time uptake, and standardized with respect to protein as described in "Material and Method". Values are the means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures. * $p < 0.05$ vs. 5mM control, ** $p < 0.05$ vs. 20mM control.

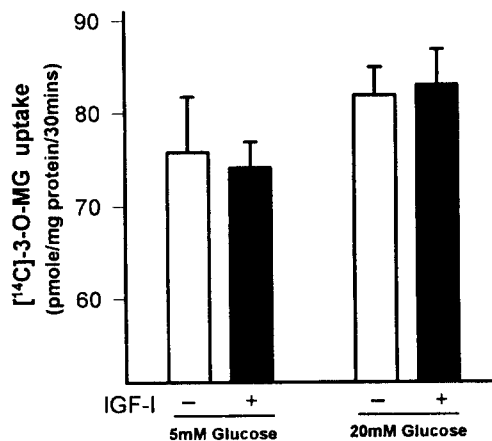


Fig 6. Effect of high glucose concentration and IGF-I on 3-O-MG uptake in primary cultured renal proximal tubule cells. 3-O-MG uptake studies were conducted with uptake buffer containing ^{14}C -3-O-methyl glucoside($0.5\mu\text{Ci/ml}$) for 30 minutes at 37°C. Uptake determinations were corrected for zero time uptake, and standardized with respect to protein as described in "Material and Method". Values are the means±S.E. of 9 separate experiments performed on 3 different cultures.

비해 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$, Fig 5). 그러나 GLUT의 활성도는 20mM 포도당 농도에서 숫적으로 증가하였으나 통계적으로는 유의한 차이가 없었다 (Fig 6). 5mM 및 20mM 포도당 농도에서 초대배양한 세포에 IGF-I을 각각 처리하였을 때 SGLT 활성도는 각각 무처리군에 비해 증가(5mM : $107.20 \pm 4.34\%$, 20mM : $118.30 \pm 6.19\%$)하였으나 GLUT 활성도에는 영향을 미치지 않았다.

고 찰

IGF-I은 세포의 성장 및 세포의 기능분화를 조절하는 인자로 알려져 있는데 신장의 근위세뇨관에도 이들 수용체가 존재하는 것으로 보고되고 있다²³. 본 실험에 사용한 초대배양 근위세뇨관세포에서 방사선 동위원소로 표지된 IGF-I의 결합은 표지되지 않은 IGF-I에 의해서 가장 억제되었고 이보다 미약하지만 insulin에 의해서도 억제되었다. 이는 초대배양한 신장 근위세뇨관세포에서 IGF-I은 자신의 수용체나 insulin의 수용체에도 결합할 수 있음을 의미한다. 하지만 IGF-I의 결합이 IGF-II에 의해서는 거의 영향을 받지 않은 것으로 보아 IGF-II 수용체에는 IGF-I이 거의 결합하지 않는 것으로 생각된다. 사람의 신장절편을 이용한 각 부위별 실험에서 ^{125}I -IGF-I의 결합은 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ insulin에 의해서 억제되었으나 IGF-II에 의해서는 억제되지 않았고²⁴, 신사구체와 세뇨관에서의 ^{125}I -IGF-I의 결합을 50% 억제하는데 표지되지 않은 $3 \times 10^{-9}\text{M}$ 의 IGF-I이 필요한 반면에 insulin은 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 이 요구되었다는 보고가 있다²⁵. 본 실험에서도 ^{125}I -IGF-I의 결합을 50% 억제하는데 insulin이 IGF-I보다 높은 농도가 필요하였다. 이와같은 결과들로 미루어볼 때 신장 근위세뇨관세포에서 IGF-I은 IGF-I과 insulin 수용체를 통하여 대부분 작용함을 알 수 있다.

본 실험에서 고포도당하에서 초대배양한 근위세뇨관세포군에서 IGF-I 결합이 유의성 있게 증가되었으며 cross-linking 결과 역시 이와 일치하였다. 만성 당뇨병 신장에서 IGF-I mRNA는 대조군 랫트의 50% 정도인 반면에 IGF-I 수용체 mRNA는 약 3배 증가되었으며 당뇨 유도후에 insulin 투여시 포도당 농도의존적으로 IGF-I 수용체 mRNA에 감소가 나타났다고 한다¹⁴. 또한 정상 랫트의 사구체에서 IGF-I 수용체

mRNA의 발현은 거의 관찰되지 않은 반면에 당뇨병이 유도된 군에서의 사구체 세포들에서 IGF-I 수용체 mRNA가 검출되었다는 보고가 있다. 사구체에서 IGF-I 수용체를 가진 세포의 숫자는 대조군 랫트에 비해 4주째 최고치에 달하며, 이와같은 사구체세포에서 IGF-I 수용체의 과대발현은 사구체 비대를 일으켜 당뇨병 신증의 원인이 되기도 한다. 한편 정상 혈중 포도당 농도에 가까운 만성 고인슐린 혈증은 IGF-I 또는 IGF-I 수용체의 유전자 발현을 변화시키지 못했다는 보고도 있다²⁶. 이와같은 보고들과 본 실험결과로 보아 혈중 고포도당이 근위세뇨관세포의 IGF-I 수용체를 증가시킴으로써 신장비대 및 물질이동계 변화에 중요한 역할을함을 제안해 준다.

STZ에 의해 유도된 당뇨병 랫트의 신피질로부터 만들어진 솔변연 막세포의 SGLT2의 활성도는 감소되었다¹⁶. BB/W 자가면역 당뇨병 랫트의 솔변연 막세포의 SGLT 활성도 역시 비슷한 억제를 보였기 때문에 위 결과는 STZ 처리에 의한 인공물은 아니라고 결론지었다²⁷. 또다른 연구에서 Yasuda *et al*²⁸은 STZ를 처리한 랫트에서 신피질 솔변연 막세포의 SGLT 활성도 감소는 phlorizin binding에 의해서 결정된 SGLT 부위의 감소에 기인한 것이라 하였다²⁹. 한편 SGLT 활성도는 insulin 투여나 3일동안 굶김에 의해서 혈중 포도당 농도를 감소시켰을 때 회복되는 것으로 보아 이들은 SGLT 발현의 감소는 고포도당 혈증에 기인한다고 하였다. 한편 세포배양배지에 포도당 농도가 5~10mM일 때 0 또는 50mM일 때보다는 SGLT1 mRNA 수준이 10배 정도 증가하는 것으로 나타났다³⁰. 이와같이 고포도당 농도에서 관찰되는 SGLT1 mRNA와 활성도의 감소는 SGLT1 유전자 발현과 포도당이 관련되어 있음을 강력히 시사해준다.

CACO-2 세포(human adenocarcinoma cell line)에서 포도당의 흡수는 SGLT에 의하여 이루어지며 이 세포는 insulin과 IGF-I 수용체를 가지고 있다. 그러나 insulin과 IGF-I 처리시 포도당 이동은 영향을 받지 않는 것으로 보아 이들 수용체는 포도당 수송의 조절과 관계가 없는 것으로 보고되었다³¹. 반면에 FRTL5 세포(rat thyroid cell)에서는 insulin과 IGF-I이 포도당 운반체 유전자 발현을 활성화시킴으로써 또는 세포질부터 세포막으로 포도당 운반체를 동원함으로써 포도당 수송을 촉진하는 것으로 보고되었다³². 한편

SGLT의 억제에 있어서 포도당의 직접적 관련성은 LLC-PK1 cell line을 가지고 조사되어졌다. LLC-PK1은 SGLT를 포함한 많은 근위세뇨관 기능 등을 가지고 있다. Moran *et al*²⁹은 고포도당 상태에서 LLC-PK1의 오랜시간 배양은 SGLT의 수 뿐만아니라 활성도에 감소를 가져온다고 했다²⁹. 한편 당뇨병 랫트의 근위세뇨관은 GLUT2와 mRNA 증가를 보여준 반면에 GLUT1은 변하지 않는다고 하였다³³. 이와같이 증가된 GLUT2는 당뇨병 상태에서 촉진적 확산에 의한 포도당이동 증가의 원인이 된다고 하였다. 본 실험에서도 고포도당으로 초대배양한 세포군에서 SGLT의 활성은 억제되었으나 IGF-I 처리시 무처리군보다 그 활성은 증가되었다. 이는 고포도당 처리시 증가되는 IGF-I 수용체 발현 증가와 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다. 그러나 GLUT는 고포도당 처리군에서 증가하였으나 통계학적으로 유의한 차는 없었다. 또한 IGF-I의 처리에 의해서도 전혀 영향을 받지 않았다. 이와같은 결과로 보아 고포도당은 근위세뇨관세포의 솔변연 포도당 운반계에 보다 강력한 효과를 발현하며 기저막쪽 포도당 운반계와는 서로 다른 기전에 의해서 포도당 운반에 관여하는 것으로 생각된다. 그러나 고포도당 처리에 의해 증가된 IGF-I 결합부위의 증가와 포도당 운반계가 어떤 상관관계를 갖고 있는지는 본 실험결과로 알 수가 없었다. 결론적으로 고포도당은 초대배양한 근위세뇨관세포의 IGF-I 결합부위를 증가시키고 솔변연 Na/glucose 공동운반계를 억제시키나 기저막쪽 포도당 운반계에는 영향을 미치지 않았다.

결 론

본 연구는 초대배양한 토끼 신장 근위세뇨관세포를 이용하여 고포도당이 IGF-I 결합과 포도당운반계에 어떠한 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 실시하였다. 그 결과는 아래와 같다.

1. ¹²⁵I-IGF-I의 농도를 고정시켜 놓고 여기에 표지되지 않은 insulin, IGF-I 및 IGF-II를 농도별로 각각 처리하여 ¹²⁵I-IGF-I의 결합을 조사한 결과 표지되지 않은 IGF-I을 투여하였을 때 농도의존적으로 억제되었고, IGF-I 보다는 미약하지만 insulin을 투여했을 때에도 ¹²⁵I-IGF-I의 결합은 억제되었다. 하지만 표지되지

않은 IGF-II에 의해서는 거의 억제가 되지 않았다. Cross-linking analysis에 의한 autoradiography에서도 표지되지 않은 IGF-I 농도의존적으로 ¹²⁵I-IGF-I의 결합이 감소하였다.

2. 20mM 포도당 처리군이 5mM 포도당 처리군에 비하여 IGF-I 결합이 유의성 있게 높았다. Cross-linking analysis에 의한 autoradiography에서도 20mM 포도당 처리군에서 ¹²⁵I-IGF-I의 결합이 5mM 포도당처리군에 비해 증가해 binding assay에서의 결과와 일치하였다.

3. SGLT는 20mM 포도당 처리군에서 활성도가 감소하였으나, GLUT 활성도는 영향을 받지 않았다. 5mM 및 20mM 포도당 농도에서 초대배양한 세포에 IGF-I을 각기 처리하였을 때 SGLT 활성도는 각각 무처리군에 비해 증가하였으나 GLUT 활성도는 영향을 받지 않았다.

결론적으로 고포도당은 초대배양한 근위세뇨관세포의 IGF-I 결합부위를 증가시키고 솔변연 Na/glucose 공동운반계를 억제시키나 기저막쪽 포도당 운반계에는 영향을 미치지 않았다.

참고 문헌

- Hediger MA, Rhoads DB. Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiological reviews*, 74: 993-102, 1994.
- Kanai Y, Lee W, You G, *et al*. The human kidney low affinity Na/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose. *J Clin Invest*, 93:397-404, 1994.
- Pajor AM, Hirayama BA, Wright EM. Molecular evidence for two renal Na/glucose cotransporters. *Biochem Biophys Acta*, 1106:216-220, 1992.
- Thorens B, Cheng Z, Brown D, *et al*. Liver glucose transporter: A basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney epithelial cells. *Am J Physiol*, 259:C279-C285, 1990.
- Dominguez JH, Camp K, Maianu L, *et al*. Glucose transporters of rat proximal tubule: Differential expression and subcellular distribution. *Am J physiol*, 262:F807-812, 1992.

6. Debnam ES, Unwin RJ. Hyperglycemia and intestinal and renal glucose transport: Implications for diabetic renal injury. *Kidney Int*, 50:1101-1109, 1996.
7. Flyvbjerg A, Landau D, Domene H, *et al.* The role of growth hormone, insulin-like growth factors(IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism*, 44:67-71, 1995.
8. Cohick WS, Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, 55:131-153, 1993.
9. Han HJ, Park KM. Effects of insulin and IGFs on growth and functional differentiation in primary cultured rabbit kidney tubule cells. -Growth and membrane transport- *Kor J Physiol*, 29:191-202, 1995.
10. Flyvbjerg A, Nielsen S, Sheikh MI, *et al.* Luminal and basolateral uptake and receptor binding of IGF-I in rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol*, 265:F624-F633, 1993.
11. Sara VR, Hall K. Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev*, 70:591-614, 1990.
12. Hammerman MR, O'shea M, Miller SB. Role of growth factors in regulation of renal growth. *Annu Rev Physiol*, 55:305-321, 1993.
13. Landau D, Chin E, Bondy C, *et al.* Expression of insulin-like growth factor binding proteins in the rat kidney. *Endocrinology*, 136:1835-1842, 1995.
14. Weiss O, Anner H, Nephesh I, *et al.* Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the kidney of the chronically hypoinsulinemic rat and hyperinsulinemic rat. *Metabolism*, 44:982-986, 1995.
15. Hostteter TH, Olsen JL, Rennke HG, *et al.* Hyperfiltration in remnant nephrons; a potentially adverse response to renal ablation. *Am J Physiol*, 241:F85-F93, 1991.
16. Harris RC, Brenner BM, Seifter JL. Sodium-hydrogen exchange and glucose transport in renal microvillus membrane vesicles from rats with diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 77:724-733, 1986.
17. Han HJ, Kang JW, Park KW, *et al.* Functional characterization of primary culture cells grown in hormonally defined, serum-free medium and serum-supplemented medium. *Korean J Vet Res*, 36:551-563, 1996.
18. Cook WF, Pickering GW. A rapid method for separating glomeruli from rabbit kidney. *Nature*, 182:1103-1104, 1958.
19. Chung SD, Alavi N, Livingston D, *et al.* Characterization of primary rabbit kidney cultures that express proximal tubule functions in a hormonally defined medium. *J Cell Biol*, 95:118-126, 1982.
20. Yagil C, Frank BH, Rabkin R. Effect of bacitracin on binding and processing of insulin by established renal cell line. *Diabetes*, 37:800-805, 1988.
21. Sakhrani LM, Badie-Dezfooly B, Trizna W, *et al.* Transport and metabolism of glucose by renal proximal tubular cells in primary culture. *Am J Physiol*, 246:F757-764, 1984.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254, 1976
23. Hammerman MR, Rogers S. Distribution of IGF receptors in the plasma membrane of proximal tubular cells. *Am J Physiol*, 253:F841-F847, 1987.
24. Chin E, Michels K, Bondy CA. Partition of insulin-like growth factor(IGF) binding sites between the IGF-I and IGF-II receptors and IGF-binding protein in the human kidney. *J Clin Endo and Metabolism*, 78:156-164, 1994.
25. Pillion DJ, Haskell JF, Meezan E. Distinct receptors for insulin-like growth factor I in rat renal glomeruli and tubules. *Am J Physiol*, 255:E504-E512, 1988.
26. Sugimoto H, Shikata K, Makino H, *et al.* Increased gene expression of insulin-like growth factor-I receptor in experimental diabetic rat glomeruli. *Nephron*, 72:648-653, 1996.
27. Nakhoda AF, Like AA, Chappel CI, *et al.* The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes*, 26:100-112, 1977.
28. Yasuda HT, Kurokawa T, Fujii Y, *et al.* Decreased D-glucose transport across renal brush-border membrane vesicles from streptozotocin-induced diabetic rat. *Biochim Biophys Acta*, 1021:114-118, 1990.

29. Moran A, Turner RJ, Handler JS. Regulation of sodium-coupled glucose transport by glucose in a cultured epithelium. *J Biol Chem*, 258:15087-15090, 1983.
 30. Ohta T, Isselbacher KJ, Rhoads DB. Regulation of glucose transporters in LLC-PK1 cells: effects of D-glucose and monosaccharides. *Mol Cell Biol*, 10:6491-6499, 1990.
 31. MacDonald RS, Thornton WH Jr, Bean TL. Insulin and IGF-I receptors in a human intestinal adenocarcinoma cell line (CACO-2): regulation of Na⁺ glucose transport across the brush border. *J Recept Res*, 13:1093-1113, 1993.
 32. Russo D, Damante G, Foti D, *et al.* Different molecular mechanisms are involved in the multihormonal control of glucose transport in FRTL5 rat thyroid cells. *J Endocrinol Invest*, 17:323-327, 1994.
 33. Dominguez JH, Camp K, Maianu L, *et al.* Molecular adaptation of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am J Physiol*, 266:F283-F290, 1994.
-