

포도당분해산물이 사람 복막중피세포 활성화에 미치는 영향

송재숙 · 이경림 · 하헌주*
이화여자대학교 약학대학

Effects of Glucose Degradation Products on Human Peritoneal Mesothelial Cells. Song, Jae Sook, Kyunglim Lee, and Hunjoo Ha*. *Ewha Womans University College of Pharmacy, 11-1 Daehyun-dong, Sedae-mun-gu, Seoul 120-750, Korea* – Both high glucose and glucose degradation products (GDP) have been implicated in alterations of peritoneal membrane structure and function during long-term peritoneal dialysis (PD). The present study examined the role of GDP including methylglyoxal (MGO), acetaldehyde, and 3,4-dideoxyglucosone (3,4-DGE) in HPMC activation with respect to membrane hyperpermeability or fibrosis. The role of reactive oxygen species (ROS) and activation of protein kinase C (PKC) in GDP-induced HPMC activation were also examined. Using M199 culture medium as control, growth arrested and synchronized HPMC were continuously stimulated by MGO, acetaldehyde, and 3,4-DGE for 48 hours. Vascular endothelial growth factor (VEGF) was quantified as a marker of peritoneal membrane hyperpermeability and fibronectin and heat shock protein 47 (hsp47) as markers of fibrosis. Involvement of ROS and PKC was examined by the inhibitory effect of N-acetylcystein (NAC) or calphostin C, respectively. MGO significantly increased VEGF (1.9-fold), fibronectin (1.5-fold), and hsp47 (1.3-fold) secretion compared with control M199. NAC and calphostin C effectively inhibited MGO-induced VEGF upregulation. Acetaldehyde stimulated and 3,4-DGE inhibited VEGF secretion. Fibronectin secretion and hsp47 expression in HPMC were not affected by acetaldehyde or 3,4-DGE. In conclusion, MGO upregulated VEGF and fibronectin secretion and hsp47 expression in HPMC, and PKC as well as ROS mediate MGO-induced VEGF secretion by HPMC. This implies that PKC activation and ROS generation by GDP may constitute important signals for activation of HPMC leading to progressive membrane hyperpermeability and accumulation of extracellular matrix and eventual peritoneal fibrosis.

Key words: Human peritoneal mesothelial cells, glucose degradation products, protein kinase C, reactive oxygen species, vascular endothelial growth factor, fibronectin, heat shock protein 47

복막투석은 잔여신기능을 혈액투석에 비하여 더 오래 보존하고 환자 생존율이 투석 시작 후 3년간은 혈액투석에 비하여 우수한 장점이 있으나 기술 생존율이 혈액투석에 비하여 짧은 점이 문제이다[5, 15]. 장기간 복막투석을 시행한 환자에서는 복막의 비후, 복막 투과성의 증가, 한외여과 부전 등이 관찰되고[4, 22] 이와 같은 복막의 구조적, 기능적 변화로 인하여 복막투석의 효율이 떨어지고 결국에는 복막투석을 지속할 수 없는 상태로 될 수 있다. 보편적으로 사용되는 복막투석액의 생체 부적합 요인들로서 낮은 pH(pH 5.2~5.6), 높은 삼투압(364~485 mOsm/L), 고농도의 포도당(1.36~3.86 g/dl), 그리고 고농도의 포도당 분해산물(glucose degradation products: GDP) 등이 제시되고 있다. 복막중피세포는 복막의 표면을 구성하는 세포로서 복강내 염증에 대한 방어작용을 하는 세포이다. 복막중피세포는 복막투석액에 가장 먼저 그리고 계속적으로 노출되므로 투석액의 비생

리적 성분에 의하여 지속적으로 자극을 받는다. 상용 복막투석액에 대한 복막중피세포의 반응은 최근에 정리된 바 있다[7].

GDP는 고농도의 포도당을 함유하는 상용 복막투석액의 생산 과정 중 고온 멸균 처리 과정이나 저장하는 과정에서 생산된다. 상용 복막투석액 내에는 acetaldehyde > 3-deoxyglucosone(3-DG) > 3,4-dioxyglucosone-3-ene(3,4-DGE) > glyoxal(GO), methylglyoxal(MGO), formaldehyde > 5-hydroxymethyl-furfural(5-HMF), 2-furaldehyde 등이 존재하며, acetaldehyde는 종종 100 μM까지 존재한다[11, 12, 16]. GDP는 복막중피세포[19, 23]를 비롯한 섬유아 세포[11, 21] 및 신경아 세포주[20]의 증식을 억제하고, 복막중피세포의 interleukin (IL)-1β에 의해 유도되는 IL-6 생산을 감소시킨다[23]. MGO와 3-DG는 복막중피세포에서 vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1), IL-6, 그리고 IL-8 등 염증성 사이토카인의 생산을 상향 조절한다[19]. 그러나 GDP가 복막의 투과성 증가나 섬유화과 관련된 세포 활성화에 미치는 영향에 대한 연구는 한정되어 있다.

MGO는 흰쥐 복막중피세포의 혈관내피성장인자(vascular

*Corresponding author
Tel: 82-2-3277-4075, Fax: 82-2-3277-2851
E-mail: hha@ewha.ac.kr

endothelial growth factor: VEGF) mRNA 표현을 증가시키고[8], acetaldehyde가 hepatic stellate cells에서 collagen $\alpha 1$ mRNA 표현을 증가시키미[6] 보고된 정도이다. 최근 Leung 등[10]은 MGO, 3,4-DGE 그리고 2-furaldehyde가 사람 복막중피세포에서 VEGF와 전환성장인자- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$: TGF- $\beta 1$)을 상향조절함을 보고하였다. VEGF는 혈관 투과성과 신생혈관생성을 촉진하는 성장인자로 고농도의 포도당과 GDP를 함유한 투석액을 장기간 사용하는 환자의 복막에서 생산되고[25] 복막내 혈관내피세포에서의 표현이 증가된다[3]. TGF- $\beta 1$ 은 세포외기질(extracellular matrix: ECM) 축적을 유발하는 주된 매개 인자[1]로서 조직 섬유화의 발생과 진행에 중요한 역할을 한다.

활성산소종(reactive oxygen species: ROS)인 O_2^- , H_2O_2 , OH^- 등은 chemokine, cytokine, 성장인자 등의 유전자 발현, 세포 성장 및 분화 그리고 세포 사멸 등을 조절하는 신호전달 분자이다[17]. 본 연구진[9]은 ROS가 복막중피세포에 PKC를 활성화하고 fibronectin의 mRNA와 단백질 표현을 상향조절함을 보고하였다. H_2O_2 는 간장의 stellate cells에서 acetaldehyde에 의해 유도되는 collagen 합성[6]과 혈관 평활근세포에서 MGO 혹은 3-DG에 의해 유도되는 heparin binding-epithelial growth factor like growth factor(HB-EGF)의 상향조절[2]을 매개한다. 따라서, ROS는 GDP에 의해 유도되는 복막중피세포의 활성화에 관여할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 상용복막투석액에 함유된 GDP 성분중 MGO, acetaldehyde 그리고 3,4-DGE가 사람 복막중피세포 활성화에 미치는 영향을 검색하였고 또 이때 ROS와 PKC가 관여하는지를 검색하였다. 복막의 투과성에 대한 지표로서 VEGF를, 섬유화의 지표로서 fibronectin과 heat shock protein 47(hsp47)의 단백질 표현을 정량하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

실험에 사용한 재료는 따로 제시되지 않는 한 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)와 Nalge Nunc International(Naper Ville, IL, USA)에서 구입하였다.

사람 복막중피세포(human peritoneal mesothelial cell: HPMC)의 배양

Stylianou 등[18]의 방법을 변형하여 사람 복막중피세포를 배양하였다[9]. 일반외과 수술 환자에서 약 6 cm²의 장간막을 채취하여 지방을 가능한 많이 제거하고 멸균된 인산완충용액(phosphate buffered saline: PBS)으로 충분히 세척한 후 trypsin 용액(Trypsin 0.125%, EDTA 0.01%, GIBCO BRL, NY, USA)에 37°C에서 흔들면서 배양하였다. 배양 후 1,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액과 상층에 떠 있는 조

직은 버렸다. 하층에 남아 있는 세포 덩어리는 PBS로 세척한 후 100 U/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin을 함유한 M199 배양액(GIBCO BRL)으로 세척하여 10%의 우태아 혈청이 포함된 M199 배양액에 풀어서 10 cm²의 세포 배양 접시에 심고 배양 후 첫 24시간에 배양액의 1/2을 교환하고 그 후부터는 3일마다 교환하였다.

복막중피세포가 집락을 이루면 PBS로 세척하고 trypsin 용액에 푼 후 유리된 세포들을 10%의 우태아 혈청을 포함한 M199 배양액에 띄워서 4°C, 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 계대 배양하였다. 2회와 3회 계대 배양한 복막중피세포를 실험에 이용하였다.

세포가 배양 용기를 채우면 위상차 현미경(Nikon TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan)으로 관찰하여 특정한 모양의 세포 모양과 전자 현미경으로 관찰하여 세포 표면에 많은 미세 융모돌기(microvilli)의 존재, 항 vimentin 항체(DAKO-Vimentin, Glostrup, Denmark)와 항 cytokeratin 항체(DAKO-CK1)를 이용한 면역 조직 화학 염색을 시행하여 양성 반응을 나타내는 것으로 복막중피세포임을 확인하였다.

실험 조건

6-well 세포 배양 용기에 배양한 후 세포들이 거의 찻을 때 혈청이 배제된 M199 배양액으로 교체하여 24시간 배양함으로써 세포 성장을 정지시키고 성장 주기를 동일화하였다.

이후 실험 목적에 알맞게 혈청이 배제된 M199 배양액을 대조군으로 하고 실험군은 acetaldehyde 500 μ M, MGO 310 μ M과 3,4-DGE 0.5~20 μ M으로 하여 48시간동안 배양하였다. 본 연구에 사용한 GDP는 Dr. Wieslander A (Gambro, Lund, Sweden)으로부터 공급받았다. PKC와 ROS의 관련 여부를 검색하기 위하여 각각의 억제제인 calphostin C 100 nM과 N-acetylcystein(NAC) 5 mM을 GDP 투여 1 시간 전부터 첨가하여 48시간동안 배양하였다.

실험이 종료되면 배양액을 취하여 6000 rpm, 4°C에서 5분간 원심 분리한 후 세포 찌꺼기 등을 제거한 상층액을 취하여 분석 때까지 -70°C에서 보관하였다. 동시에 세포 단백을 추출하여 immunoblot 분석을 시행하였다. 간략히 서술하면 세포를 냉장시킨 PBS로 세척한 후 lysis buffer(20 mM Tris pH 7.9, 137 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrasodium, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1 mM tetrasodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)를 넣고 4°C에서 15분간 반응시켰다. 세포를 13000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 취하여 단백량을 측정하였다.

ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

VEGF는 각 실험 조건에서의 세포 배양액을 사용하여 측

정하였다. Sandwich ELISA를 이용한 상품화된 VEGF ELISA Kit(Biosource International Inc., Camarillo, CA, USA)를 이용하였고, 결과는 세포 단백질로 보정하였다. 세포 단백질은 Bio-Rad 분석 시약(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 측정하였으며, 사용한 VEGF ELSIA Kit의 민감도는 5 pg VEGF/ml 이다.

Western blot 분석

배양액에서 분리된 fibronectin과 세포내 hsp47 단백을 Western blot 분석으로 정량하였다. 배양액(20 µg 단백질)과 세포 용해 산물(30 µg 단백질)을 sample buffer(60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 14.4 mM β-mercaptoethanol, 25% glycerol 그리고 0.1% bromophenol blue)와 혼합한 후 95°C에서 5분 동안 끓였다. Fibronectin 단백 측정을 위하여 6% SDS-polyacrylamide gel에서, hsp47 단백 측정을 위하여 8% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 각각의 단백질을 분리하고 완충 용액(48 mM Tris-HCl, 39 mM glycine 그리고 20% methanol)을 이용하여 nitrocellulose 흡착지(Bio-Rad Laboratories)에 전이시켰다. 단백질에 대한 molecular marker를 사용하여 전개와 전이 정도를 확인한 후 흡착지를 blocking 용액(5% nonfat dry milk와 0.1% Tween 20이 포함된 TBS)에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS 용액으로 2회 세척한 후 각각의 일차 항체인 peroxidase-conjugated rabbit anti-human fibronectin (DAKO:1:2000), anti-hsp47 (Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada: 1:2000)으로 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 0.1% Tween 20이 포함된 TBS 용액으로 15분간 4회 세척하였다.

Peroxidase가 conjugation된 이차 항체(HRP-conjugated anti-rabbit IgG: Santa Cruz, CA, USA)로 1시간 동안 반응시킨 후 15분씩 4회 세척하였다. ECL(Enhanced Chemiluminescence, Amersham, Buckinghamshire, UK) kit을 이용하여 이차 항체를 검출하였다. 각각의 밀도를 Tina 2.1 프로그램을 사용하여 측정한 후 정량하여 대조군을 1.0으로 하여 비교하였다.

자료의 분석

모든 자료는 ‘평균 ± 표준 오차’ 표시하였다. 각 실험군 간의 변화 양상을 검토하기 위하여 one-way analysis of variance(ANOVA)와 Fisher's least significant difference 법으로 검정하였다. 필요에 따라 결과들은 Kruskal-Wallis 법과 Mann-Whitney U 법을 사용하여 분석하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적 차이가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. 어느 경우든 p 값이 0.05 이하인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

MGO가 사람 복막중피세포의 VEGF와 fibronectin 분비 그리고 hsp47 표현에 미치는 영향

사람 복막중피세포는 혈청이 배제된 M199 배양액에서 48시간 배양한 기저상태에서 14.1±3.7 pg VEGF/mg of protein을 분비하였다. MGO 310 µM은 사람 복막중피세포에서 대조군과 비교하여 VEGF 분비를 1.9배(Fig. 1A), fibronectin 분비를 1.5배(Fig. 1B) 그리고 hsp47 표현을 1.3배(Fig. 1C)로 유의하게 증가시켰다(p<0.05).

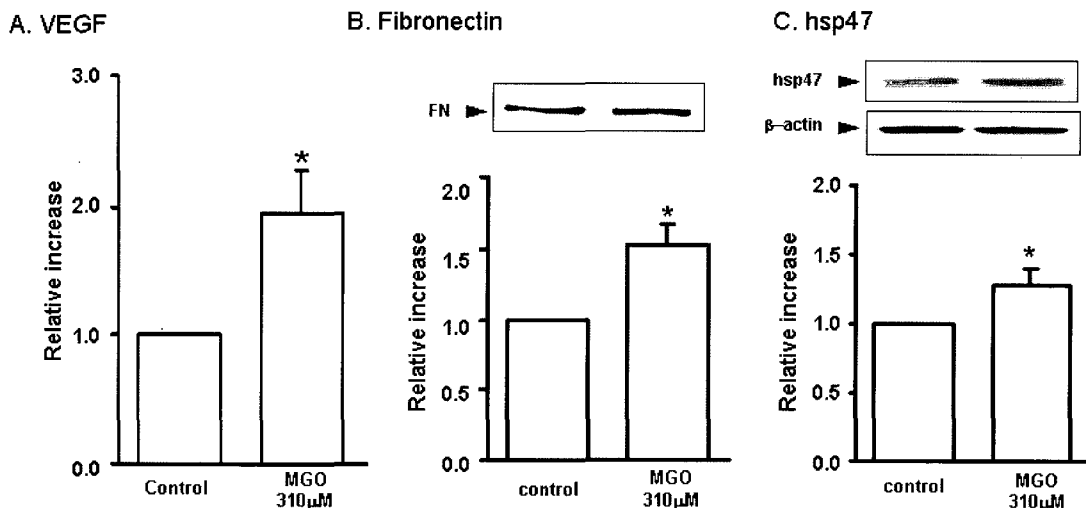


Fig. 1. Effects of methylglyoxal (MGO) on VEGF secretion (A), fibronectin secretion (B), and hsp47 expression (C) by human peritoneal mesothelial cells (HPMC). Quiescent HPMC were incubated with control M199 or MGO 310 µM for 48 hours. VEGF secretion was measured by ELISA. Fibronectin secretion and hsp47 expression were measured by Western blot analysis. Values are mean±SE of 5 experiments. *p<0.05 vs control M199.

Acetaldehyde가 사람 복막중피세포의 VEGF와 fibronectin 분비 그리고 hsp47 표현에 미치는 영향

사람 복막중피세포에서 acetaldehyde 500 μ M은 VEGF 분비(Fig. 2A)를 대조군과 비교하여 2.5배로 유의하게 증가시켰지만($p < 0.05$), fibronectin 분비(Fig. 2B)와 hsp47 표현

(Fig. 2C)에는 의미있는 영향을 주지 않았다. Acetaldehyde는 96시간까지 자극하더라도 복막중피세포에서의 fibronectin 분비와 hsp47 표현에 의미있는 영향을 주지 않았다(자료 제시 안함).

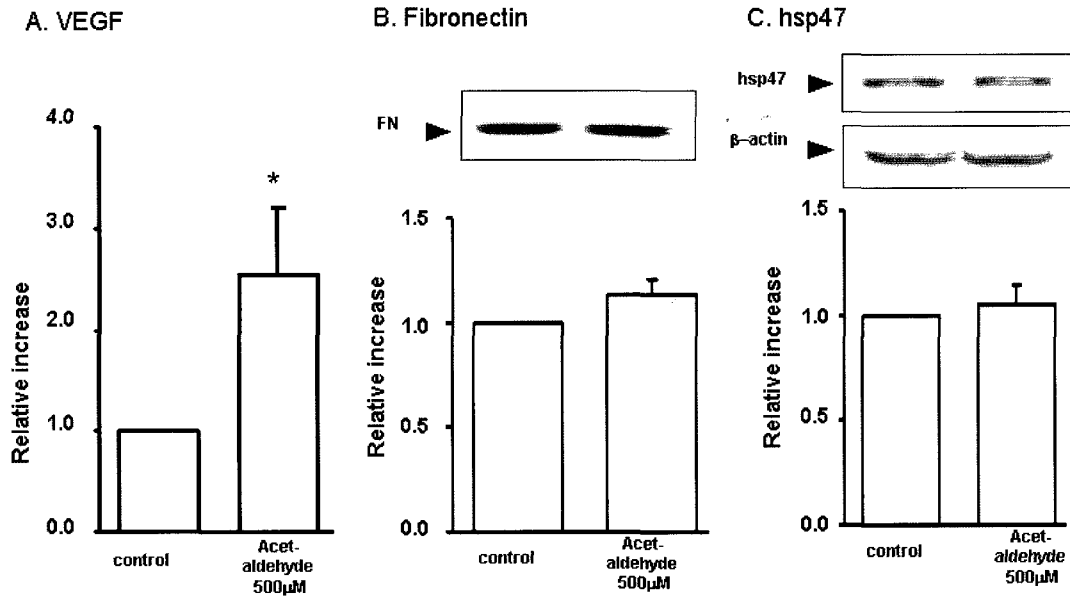


Fig. 2. Effects of acetaldehyde on VEGF secretion (A), fibronectin secretion (B), and hsp47 expression (C) by human peritoneal mesothelial cells (HPMC). Quiescent HPMC were incubated with control M199 or acetaldehyde 500 μ M for 48 hours. VEGF secretion was measured by ELISA. Fibronectin secretion and hsp47 expression were measured by Western blot analysis. Values are mean \pm SE of 6 experiments. * $p < 0.05$ vs control M199.

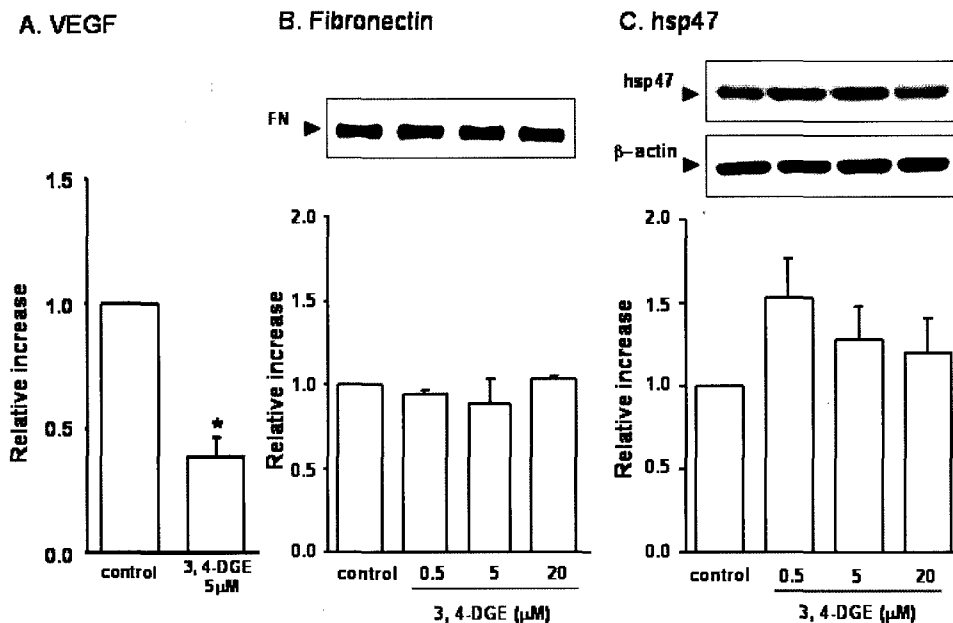


Fig. 3. Effects of 3,4-di-deoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE) on VEGF secretion (A), fibronectin secretion (B), and hsp47 expression (C) by human peritoneal mesothelial cells (HPMC). Quiescent HPMC were incubated with control M199 or 3,4-DGE for 48 hours. VEGF secretion was measured by ELISA. Fibronectin secretion and hsp47 expression were measured by Western blot analysis. Values are mean \pm SE of 5 experiments. * $p < 0.05$ vs control M199.

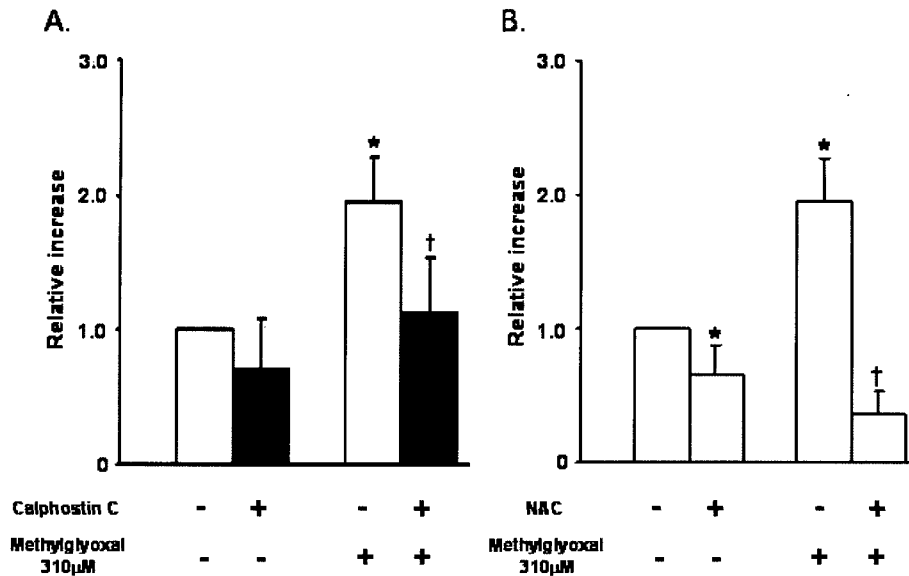


Fig. 4. Role of PKC and ROS on methylglyoxal (MGO)-induced VEGF secretion by human peritoneal mesothelial cells (HPMC). After incubation of quiescent HPMC with control M199 or MGO for 48 hours in the presence or absence of calphostin C 100 nM (A) and N-acetylcysteine (NAC) 5 mM (B), VEGF secretion was measured by ELISA. Values are mean±SE of 5 experiments. * $p < 0.05$ vs control M199, † $p < 0.05$ vs MGO without calphostin C or NAC.

3,4-DGE가 사람 복막중피세포의 VEGF와 fibronectin 분비 그리고 hsp47 표현에 미치는 영향

3,4-DGE 5 μM은 사람 복막중피세포에서 VEGF 분비를 대조군과 비교하여 0.4배까지 유의하게 감소시켰다($p < 0.05$, Fig. 3A). 3,4-DGE는 100 μM 이상에서 세포사망을 유발하였으며(자료 제시 안함), 세포 사멸을 초래하지 않는 농도인 20 μM까지 투여할 때 복막중피세포에서 fibronectin 분비(Fig. 3B)와 hsp47 표현(Fig. 3C)에 의미있는 영향을 주지 못하였다.

MGO에 의한 VEGF 분비 상향 조절에 있어서 ROS와 PKC의 역할

사람 복막중피세포에서 MGO에 의하여 증가한 VEGF 분비는 PKC 억제제인 calphostin C 100 nM(Fig. 4A)과 항산화제 NAC 5 mM에 의하여 유의하게 억제되었다($p < 0.05$, Fig. 4B). Calphostin C 100 nM은 기저상태의 fibronectin 분비에는 영향을 주지 않았으나, NAC 5 mM은 기저상태의 fibronectin 분비 역시 유의하게 억제하였다.

고 찰

상용 복막투석액내에 함유된 GDP가 세포 사멸을 초래함[11, 19, 21, 23]이 잘 알려진 반면 복막의 투과성 증가나 섬유화 등 복막의 구조적 기능적 변화에 미치는 영향에 대한 연구가 상대적으로 제한되어 있어, 본 실험은 GDP가 복막의 투과성 증가나 복막 섬유화를 유발할 수 있는지를 검색하고자 하였다. 본 실험조건에서 복막의 투과성 증가에 관

여하는 VEGF가 MGO나 acetaldehyde에 의하여 유의성있게 증가하였고 섬유화의 지표인 fibronectin과 hsp47 역시 MGO에 의하여 증가하였다.

MGO에 의한 VEGF 분비 상향조절은 흰쥐 복막중피세포에서 VEGF mRNA가 상향조절[8]됨과 사람 복막중피세포에서 VEGF mRNA와 분비가 상향조절[10]된다는 보고와 일치한다. 그러나 acetaldehyde에 의한 VEGF 분비 상향조절은 현재까지 보고되지 않은 새로운 관찰로 acetaldehyde가 조직의 섬유화[6]뿐 아니라 투과성 증가에도 관여할 수 있음을 시사하였다. 조직 섬유화의 최종 매개인자인 TGF-β1이 복막에서 VEGF 발현을 증가시키기[13] 때문에 acetaldehyde에 의한 VEGF 상향조절에 TGF-β1이 관여하는 여부 등 그 기전에 대한 추후 연구가 필요하다. 본 실험조건에서 3,4-DGE는 세포독성이 발현되지 않는 농도에서 VEGF 분비를 유의성 있게 억제하여 상용 복막투석액내에 함유된 모든 GDP가 VEGF를 동일하게 상향조절하지는 않음을 시사하였다. 그러나 Leung 등[10]은 최근 보고에서 3,4-DGE가 사람 복막중피세포에서의 VEGF mRNA와 단백질분비를 유의성있게 상향조절함을 보고하여 본 결과와 상반된 관찰을 하였다. 현재로서 서로 상반된 결과가 초래된 원인은 확실하지 않다.

MGO는 세포외기질인 fibronectin 분비와 collagen 합성에 chaperon 단백질로 작용하는 hsp47 발현 역시 증가시켜 MGO가 복막의 섬유화도 유발할 수 있음을 시사하였다. 반면, acetaldehyde와 3,4-DGE는 본 연구에서 이용한 실험 조건에서 fibronectin 분비와 hsp47 표현에 영향을 주지 못하였다. Acetaldehyde는 본 연구에 사용한 농도에서 hepatic stellate cells에서 collagen 생산을 증가시켜 섬유화를 유발

하는 것으로 보고 되어 있다[6]. 이는 조직에 따라 acetaldehyde에 대한 감수성이 다른 점을 시사한다. 3,4-DGE가 fibronectin과 hsp47 발현에 미치는 영향은 보고된 바가 없다.

끝으로 본 연구에서는 MGO에 의한 VEGF 상향조절이 항산화제 NAC와 PKC 억제제 calphostin C에 의하여 유의성있게 감소함을 관찰하여 MGO에 의한 VEGF 상향조절에 ROS와 PKC가 관여함을 시사하였다. 본 연구에서 MGO가 사람 복막중피세포에서 세포내 ROS를 증가시키고 PKC 활성화를 유발하는지는 측정하지 않았으나 폐동맥의 혈관평활근에서 긴장(strech)에 의한 VEGF 상향조절에 ROS가 관여함[14]과 retinal pigment 상피세포에서 고평도당이나 저산소에 의한 VEGF 상향조절에 PKC가 관여함[24]이 최근 보고된 바 있다.

이상을 종합할 때 본 연구의 결과는 GDP 각 성분 중 MGO와 acetaldehyde가 복막중피세포의 VEGF를 상향조절하고 MGO가 fibronectin 과 hsp47 분비를 상향조절하는 것으로 보아 장기간 복막투석을 시행하는 환자에서 GDP 성분이 복막의 구조적 기능적 변화를 초래할 수 있음을 시사하였다. 나아가 ROS 생산과 PKC 활성화는 투석액내에 함유된 고평도당 뿐아니라 GDP에 의한 점진적인 복막의 투과성 증가, 세포외기질 축적 그리고 복막 섬유화를 유발하는 주된 신호체계로서 이를 선택적으로 억제함으로써 복막의 기능을 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

상용 복막투석액에 함유된 고농도의 포도당과 포도당 분해산물(glucose degradation products: GDP)이 복막의 비후, 복막 투과성의 증가 및 한외여과 부전과 같은 복막의 구조적, 기능적 변화를 초래하리라 추정되고 있다. 본 연구에서는 GDP 성분이 사람 복막중피세포 활성화에 미치는 영향을 검색하였고 또 이때 ROS와 PKC가 관여하는지를 검색하였다. 혈청이 배제된 M199 배양액으로 성장을 동일화시킨 사람 복막중피세포를 GDP인 methylglyoxal(MGO), acetaldehyde, 그리고 3,4-dioxyglucosone-3-ene(3,4-DGE)으로 48시간 동안 자극하였고, 복막의 투과성에 대한 지표로서 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor: VEGF)를, 섬유화의 지표로서 fibronectin과 heat shock protein 47(hsp47)의 단백을 정량하였다. 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)과 protein kinase C(PKC)의 관여여부는 각각 항산화제 N-acetylcystein(NAC)과 PKC 억제제 calphostin C의 억제 효과로 검색하였다. MGO는 대조군과 비교하여 VEGF 분비를 1.9배, fibronectin 분비를 1.5배 그리고 hsp47 표현을 1.3배로 유의하게 증가시켰다($p < 0.05$). MGO에 의한 VEGF 상향 조절은 calphostin C와 NAC에 의하여 유의하게 억제되었다. 사람 복막중피세포에서 VEGF 분비는

acetaldehyde에 의하여 증가하였으나 3,4-DGE에 의하여 억제되었고, fibronectin 분비와 hsp47 표현은 acetaldehyde나 3,4-DGE에 의하여 영향을 받지 않았다. 이상을 종합할 때, ROS 생산과 PKC 활성화가 상용투석액내 함유된 MGO에 의한 점진적인 복막의 투과성 증가, 세포외기질 축적 그리고 복막 섬유화를 유발하는 주된 신호체계로서 이를 선택적으로 억제함으로써 복막의 기능을 유지할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

REFERENCES

1. Border, W. A. and N. A. Noble. 1994. Transforming growth factor- α in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1286-1292.
2. Che, W., M. Asahi, M. Takahashi, H. Kaneto, A. Okado, S. Higashiyama, and N. Taniguchi. 1997. Selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in rat aortic smooth muscle cells. The involvement of reactive oxygen species formation and a possible implication for atherogenesis in diabetes. *J. Biol. Chem.* **272**: 18453-18459.
3. Combet, S., T. Miyata, P. Moulin, D. Pouthier, E. Goffin, and O. Devuyst. 2000. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: 717-728.
4. Davies, S. J., L. Phillips, P. F. Naish, and G. I. Russell. 2001. Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**: 1046-1051.
5. Fenton, S. S., D. E. Schaubel, M. Desmeules, H. I. Morrison, Y. Mao, P. Copleston, J. R. Jeffery, and C. M. Kjellstrand. 1997. Hemodialysis versus peritoneal dialysis: a comparison of adjusted mortality rates. *Am. J. Kidney Dis.* **30**: 334-342.
6. Greenwel, P., J.-A. Dominues-Rosales, G. Mavi, M. Rivas-Estilla, and M. Rojkind. 2000. Hydrogen peroxide: A link between acetaldehyde-elicited α (I) collagen gene up-regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology* **31**: 109-116.
7. Ha, H. and H. B. Lee. 2002. Peritoneal mesothelial cell biology in peritoneal dialysis. *Nephrology* **7**: 220-226.
8. Inagi, R., T. Miyata, T. Yamamoto, D. Suzuki, K. Urakami, A. Saito, C. van Ypersele de Strihou, and K. Kurokawa. 1999. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett.* **463**: 260-264.

9. Lee, H. B., M. R. Yu, J. S. Song, and H. Ha. 2004. ROS amplify PKC signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* **65**: 1170-1174.
10. Leung, J. C., L. Y. Chan, F. F. Li, S. C. Tang, K. W. Chan, T. M. Chan, M. F. Lam, A. Wieslander, and K. N. Lai. 2005. Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**: 1336-1349.
11. Linden, T., A. Cohen, R. Deppisch, P. Kjellstrand, and A. Wieslander. 2002. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. *Kidney Int.* **62**: 697-703.
12. Linden, T., G. Forsback, R. Deppisch, T. Henle, and A. Wieslander. 1998. 3-Deoxyglucosone, a promoter of advanced glycation end products in fluids for peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* **18**: 290-293.
13. Margetts, P. J., M. Kolb, T. Galt, C. M. Hoff, T. R. Shockley, and J. Gauldie. 2001. Gene transfer of transforming growth factor- β 1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**: 2029-2039.
14. Mata-Greenwood, E., A. Grobe, S. Kumar, Y. Noskina, and S. M. Black. 2005. Cyclic stretch increases VEGF expression in pulmonary arterial smooth muscle cells via TGF- β 1 and reactive oxygen species: a requirement for NAD(P)H oxidase. *Am. J. Physiol.* **289**: L288-L298.
15. Moist, L. M., F. K. Port, S. M. Orzol, E. W. Young, T. Ostbye, R. A. Wolfe, T. Hulbert-Shearon, C. A. Jones, and W. E. Bloembergen. 2000. Predictors of loss of residual renal function among new dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: 556-564.
16. Nilsson-Thorell, C. B., N. Muscalu, A. H. Andren, P. T. Kjellstrand, and A. P. Wieslander. 1993. Heat sterilization of fluids for peritoneal dialysis gives rise to aldehydes. *Perit. Dial. Int.* **13**: 208-213.
17. Rhee, S. G. 1999. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* **31**: 53-59.
18. Stylianou, E., L. A. Jemmer, M. Davies, G. A. Coles, and J. D. Williams. 1990. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* **37**: 1563-1570.
19. Welton, A. G., C. G. Schalkwijk, P. M. ter Wee, S. Meijer, J. van den Bon, and R. J. Beelen. 2003. Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and proinflammatory response. *Perit. Dial. Int.* **23**: 213-221.
20. Wieslander, A. P., M. K. Nordin, E. Martinson, P. T. Kjellstrand, and U. C. Boberg. 1993. Heat-sterilized PD fluids impair growth and inflammatory responses of cultured cell lines and human leukocytes. *Clin. Nephrol.* **39**: 343-348.
21. Wieslander, A. P., M. K. Nordin, O. T. Kjellstrand, and U. C. Boberg. 1991. Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929. *Kidney Int.* **40**: 77-79.
22. Williams, J. D., K. J. Craig, N. Topley, C. von Ruhland, M. Fallon, G. R. Newman, R. K. Mackenzie, and G. T. Williams. 2002. Peritoneal Biopsy Study Group: Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**: 470-479.
23. Witoski, J., J. Wisniewska, K. Korybalska, T. O. Bebder, A. Breborowicz, G. M. Gahl, U. Frei, J. Passlick-Deetjen, and A. Jorres. 2001. Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**: 2434-2441.
24. Young, T. A., H. Wang, S. Munk, D. S. Hammoudi, D. S. Young, M. S. Mandelcom, and C. I. Whiteside. 2005. Vascular endothelial growth factor expression and secretion by retinal pigment epithelial cells in high glucose and hypoxia is protein kinase C-dependent. *Exp. Eye. Res.* **80**: 651-662.
25. Zweers, M. M., D. G. Struijk, W. Smit, and R. T. Krediet. 2001. Vascular endothelial growth factor in peritoneal dialysis: a longitudinal follow-up. *J. Lab. Clin. Med.* **137**: 125-132.

(Received Sep. 5, 2005/Accepted Oct. 27, 2005)