

자연발생 당뇨쥐의 신장에서 섬유화 초래인자인 Transforming Growth Factor- β 1의 발현

계명대학교 의과대학 신장연구소, 병리학교실*, 내과학교실†, 대구가톨릭대학교 의과대학 내과학교실†

김형엽* · 장재휘 · 한상미 · 안기성† · 박성배† · 김현철† · 박관규*

〈요 약〉

목 적 : 당뇨병성 신질환은 당뇨병증에서 나타나는 합병증의 하나로서 사구체경화에 의한 신장의 기능상실로 이어진다. 이러한 당뇨병적 사구체경화와 과혈당증은 세포외기질의 증가로 인해 일어난다고 알려져 있으며, 그 중에 하나로 transforming growth factor (TGF)- β 1의 과발현에 기인한다고 알려져 있다. 당뇨병에 의해 사구체의 경화가 일어나면 그 회복이 불가능하며 근본적인 치료법이 정립되어 있지 않기 때문에, TGF- β 1의 발현시기와 위치를 찾는 것은 이를 바탕으로 한 치료 시기 및 방법 결정에 크게 도움이 될 것이다.

방 법 : 자연발생적인 제 2형 당뇨병 모델인 OLETF 쥐를 사용하였으며, 대조군으로는 유전적으로 유사하나 당뇨병이 발생하지 않는 LETO 쥐를 사용하여, 당뇨에 의한 사구체 섬유화와 TGF- β 1의 발현양상을 비교 조사하였다. 당뇨병적인 증상이 관찰된 쥐를 30주부터 60주까지 혈당과 체중을 측정하였고, 회생 후 신장을 적출하여 형태학적인 변화를 관찰하고, TGF- β 1에 대한 면역조직화학적 염색 및 RT-PCR을 실시하여 TGF- β 1의 발현 양과 발현 부위를 조사하였다.

결 과 : 37주째의 혈당은 OLETF 쥐와 LETO 쥐에서 각각 237 mg/dL와 131 mg/dL이었으며, 체중에 있어서는 OLETF 쥐가 LETO에 비하여 유의하게 증가하였다. HE 염색을 통한 형태학적 관찰에서는 60주까지도 사구체경화는 확인되지 않았다. 그러나 TGF- β 1에 대한 면역조직화학적 염색 결과, 30주에서 40주까지의 OLETF 쥐에서 사구체 내피세포에서 TGF- β 1이 발현됨을 확인할 수 있었고, 37주부터는 세뇨관 상피세포에서도 TGF- β 1의 발현을 확인할 수 있었다. 60주 OLETF 쥐의 사구체 내피세포에서는 TGF- β 1의 발현은 없었으나, 세뇨관 상피세포에서는 많은 양의 TGF- β 1의 발현을 관찰할 수 있었다. 30주째의 OLETF 쥐와 LETO 쥐로부터 RNA를 분리하여 TGF- β 1 mRNA에 대한 RT-PCR 결과, LETO 쥐에 비하여 OLETF 쥐에서 TGF- β 1 mRNA의 발현이 의의있게 많았다. 대조군인 LETO 쥐는 유의할 만한 TGF- β 1의 발현이 없었다.

결 론 : 본 연구에서 OLETF 쥐의 사구체 섬유화는 60주까지도 매우 느리게 진행되었으나, 30주 이후에 혈당과 TGF- β 1의 발현은 크게 증가하였다. OLETF 쥐 37주째부터는 TGF- β 1의 발현이 사구체 내피세포에서 뿐만 아니라 세뇨관 상피세포에서도 과다 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

서 론

접수 : 2002년 8월 29일, 승인 : 2003년 1월 13일
책임저자 : 박관규 대구시 중구 동산동 194번지

계명대학교 의과대학 병리학교실
Tel : 053)250-7465, Fax : 053)250-7095
E-mail : park1234@dsmc.or.kr

당뇨병에 의한 신질환은 주로 사구체 경화증, 초자질 변성, 세뇨관 간질염증으로 이어지며 이중 사구체

경화증은 가장 대표적인 신손상의 형태라 할 수 있다

¹⁾. 이러한 사구체 경화증은 transforming growth factor (TGF)- β 1에 의한 세포외 기질 (extracellular matrix)의 증가로 인해 일어난다고 알려져 있으며 당뇨병에서의 과혈당증은 TGF- β 1 promoter를 작동시켜 TGF- β 1을 발현시키고 이는 세포외 기질인 fibronectin, collagen 등의 합성을 촉진시킨다^{2, 3)}. 지속적인 세포외기질의 확장은 사구체 경화증 (glomerular sclerosis)을 초래하여 결국 말기 신부전에 이르게 된다^{4, 5)}.

TGF- β 1은 체내 거의 모든 세포들의 성장, 분화, 기능을 조절하는 cytokine이다. TGF- β 1은 부착성 성장형 (anchorage dependent growth) 세포주인 쥐의 섬유모세포 (fibroblast)를 비부착성 성장형 (anchorage independent growth)으로 가역화하는 인자, 즉, 형질전환을 유도하는 물질로 처음 알려졌으며 이에 근거하여 그 이름이 명명되었다^{6, 7)}. 그러나, TGF- β 1은 일반적으로 성장을 촉진시키기보다는 상피세포 (epithelial cell), 내피세포 (endothelial cell) 등을 포함한 대부분의 세포주에 대하여 성장 억제 효과를 보임이 밝혀졌다^{8, 9)}. 또한 TGF- β 1은 T-cell 세포자멸사와 암에도 관여하는 것으로 보고되고 있다¹⁰⁾. 당뇨병에 의한 신질환에서 TGF- β 1의 발현은 많이 보고되고 있지만 발현시기나 발현위치는 아직 논란의 대상이 되고 있으며, 정확한 자료나 이론이 정립되어 있지 않다. 따라서 당뇨병성 신질환의 근본적인 치료가 어려울 뿐만 아니라 일단 사구체의 경화가 일어나면 그 회복이 불가능하기 때문에 TGF- β 1의 발현시기와 위치를 찾는 것이 중요하며, 이것을 토대로 하여 당뇨병성 신질환 치료방법의 결정이 가능해 질 것이다.

Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐는 1993년 일본에서 개발된 인슐린 비의존형 당뇨병의 실험동물 모델로서 출생 후 점차 비만해지다가 24주경에 당뇨병이 발병되는 것으로 알려져 있으며, 자연발생적으로 사람의 제 2형 당뇨병과 유사한 증상을 나타내는 종으로 장기간 생존이 가능하다^{11, 12)}. Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐는 유전적으로 OLETF 쥐와 유사하나 당뇨병의 발병이 없는 종으로 OLETF 쥐의 대조군으로 사용된다.

본 연구는 OLETF 쥐를 통해 당뇨병성 신질환과 관련이 있는 TGF- β 1의 발현시기 및 위치 등의 발현양상을 알아보기 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 OLETF 쥐, 대조군으로는 LETO 쥐를 일본 Otsuka 연구소에서 공여 받아 사용하였다. 각기 30마리의 OLETF와 LETO 쥐는 20주 상태로 제공받고 동물실험실에서 5주간 사육한 후 25주에 이르러 실험을 시작하였다. 전체 실험 기간 중의 식이는 마우스류의 실험동물 사료를 투여하였다. 30주 이후 40주까지 OLETF와 LETO 쥐를 각기 3마리씩 희생하고 양측 신장을 적출하였다.

60주령 이후의 OLETF와 LETO 쥐의 신장 조직은 대구 가톨릭대학교 의과대학 내과학교실로부터 조직을 받아 실험에 사용하였다.

2. 체중 및 혈당 측정

OLETF와 LETO 쥐는 1주 간격으로 체중을 측정하고, 혈당은 Precision (Medisence, USA)을 사용하여 혈당량을 측정하였다.

3. 광학현미경 관찰

OLETF와 LETO 쥐에서 적출한 신장 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 계열 알코올로 탈수하고 침투과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 후 2 μm 의 박질편을 만들어 hematoxylin 및 eosin (H&E) 염색을 시행하였다.

4. 면역조직화학염색

TGF- β 1 단백 발현을 알아보기 위해 단클론성 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 하였다. 파라핀 포매된 신장 조직을 2 μm 의 두께로 잘라서 부착제로 처리된 슬라이드에 붙이고 탈파라핀을 거쳐 함수하였다. 메탄올에 회석한 3% H₂O₂ 용액에서 30분간 처리하여 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단하고 0.01 mol 인산 완충액에서 10분간 세척하였다. TGF- β 1에 대한 1차 항체 (Cellscience, USA)를 37°C에서 30분간 반응시키고, biotinylated anti-mouse IgG (DAKO LSAB kit, USA)를 2차 항체로 사용하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, streptoavidin peroxidase (DAKO LSAB kit, USA)로 발색하였다. Mayer hematoxylin으로 대조염색을 한 후 광학현미경으

로 관찰하였다.

5. mRNA의 분리 및 역전사-중합효소연쇄반응 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

OLETF와 LETO 쥐의 적출한 신장으로부터 전체 RNA는 RNAzolB (TEL-TEST, Friendwood, USA)를 사용하여 추출하고 분광광도계 (Beckman, Peapack, USA)로 RNA의 순도와 정제된 양을 구하였다. 분리한 1 μ g의 RNA를 주형으로 1st strand cDNA synthesis Kit (Boehringer Mannheim Co., IN, USA)를 이용하여 oligo dT primed first strand DNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 MgCl₂의 농도가 1.5 mmol, dNTP 0.5 mmol, 2.5 U/ μ L의 Taq polymerase와 PCR 완충액에 각기 25 pmol의 TGF- β 1과 house keeping gene인 GAPDH primer를 혼합하여 PCR 반응기 (Perkin-Elmer Cetus, CT, USA)에서 증폭하였다. GAPDH의 primer는 백서의 유전자에서 고안하였으며, 5'-GTGGACATTGTTGCCATCAACG-3', 5'-GAGGGAGTTGTCATATT-TCTCG-3'를 사용하여 351 bp의 산물을 얻었고, TGF- β 1의 primer는 5'-CCTGCTGCTTCTCCCC-TCAACC-3', 5'-CTGGCACTGCTTCCCGAATG-TC-3'를 사용하여 598 bp의 산물을 얻었다. PCR 시간 및 온도는 94°C에서 2분간 변성시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 68°C에서 2분간 반응시키는 조건으로 25회 수행하고, 68°C에서 7분간 반응시켰다. 이렇게 얻어진 증폭산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

6. Western blot

OLETF와 LETO 쥐의 적출한 신장을 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 650 mM NaCl, 5% Triton X-100, 200 mM Phenyl-methyl-sulfonuyl fluoride, 0.02 mM Aprotinin, 2 mM Leupeptin, 5 mM phenanthroline, 28 mM Benzamidine)에 잘라 넣고 homogenizer로 균질화 한 후, 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 취하였다. 전체 단백질은 각기 100 μ g으로 정량하여 10% polyacrylamide gel에서 전기영동으로 분리하고, 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride 막으로 전이시켰다. 1차 항체로 rabbit TGF- β 1 polyclonal antibody (Santa Cruz, USA), 2차 항체로 anti-rabbit

Ig horseradish peroxidase linked whole antibody (Amersham Biosciences, UK)로 반응시킨 후 ECM™ western blotting detection reagents (Amersham Biosciences, UK)에 반응시키고, film에 노출, 현상하였다.

7. 통계 분석

실험동물에 대한 체중 및 혈당치는 평균土 표준편차로 표시하였다.

결 과

OLETF 쥐는 체중이 계속 증가하다가 37주째에 이르러서는 급격히 체중이 증가하여 600 g까지 증가하였다가 40주 이후에는 감소하여 60주령에는 573 g을 유지하였다. LETO 쥐의 체중은 평균적으로 440 g 수준을 계속 유지하며 주령이 증가함에 따라 완만하게 증가하여 60 주령에는 634 g에 이르렀다 (Fig. 1). 혈당량은 37주령의 OLETF 쥐가 평균 237 mg/dL에 이르고, 60주령에는 286 mg/dL까지 증가하였다. 반면 LETO 쥐는 평균 131 mg/dL로 정상적인 혈당치를 보였으며, 60주령에서도 평균 121 mg/dL의 정상의 혈당치를 보였다 (Fig. 2).

H&E 염색을 통한 신장의 형태학적 관찰에서 OLETF와 LETO 쥐 모두 60주까지도 사구체 경화는 발생하지 않았다. 60주령의 OLETF 쥐에서는 사구체 용질, 뇨강 및 세뇨관 간질의 용적이 증가하였고, 세

Fig. 1. The changes of body weight for OLETF and LETO rats. Values are means \pm SD.

뇨관 상피세포의 파사가 확인되었다 (Fig. 3A). 그러나 LETO 쥐는 어떠한 형태적 변화도 관찰되지 않았다 (Fig. 3B).

TGF- β 1 단백 발현에 대한 면역조직화학적검사 결과 LETO 쥐의 주된 작용부위는 35주 이후 사구체내의 내피세포에서 발현이 확인되었으나, 그 외 다른 부위에서의 발현은 확인되지 않았다 (Fig. 4).

OLETF 쥐는 35주에서 38주까지의 경우 사구체내 내피세포와 세뇨관 상피세포 모두에서 발현이 확인되

었다. 그러나 60주 이후에는 내피세포에서의 TGF- β 1 단백 발현이 소실되었으나, 세뇨관 상피세포에서의 발현은 매우 강하게 나타났다 (Fig. 5).

RT-PCR에 의해 확인한 TGF- β 1 mRNA의 발현에서도 대조군인 LETO 쥐에 비하여 OLETF 쥐에서 크게 증가됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 6A, 6B). 또한, 60주령의 LETO 쥐와 OLETF 쥐의 TGF- β 1 단백 발현에 있어서도 OLETF에서 크게 증가됨을 확인하였다 (Fig. 6C).

고 칠

당뇨병성 신증의 특징적인 구조적 변화는 사구체기저막의 비후와 혈관간 기질의 확장으로, 세포외기질의 과다 생산 또는 분해의 감소에 기인하는 것으로 알려져 있다^{2, 13)}. 특히 혈관간 기질의 확장은 알부민뇨, 고혈압, 사구체여과율의 감소 등 당뇨병성 신증의 임상적 소견과 밀접한 관계를 보이는데¹⁴⁾, 당뇨병의 초기에는 사구체와 신장의 비대가 관찰되고 이 변화는 TGF- β 1의 영향으로 생각되며 세포외기질의 과다 생산을 거쳐 결국 사구체 경화와 말기신부전증으로 이행하는 것으로 알려져 있다^{15, 16)}.

TGF- β 1이 당뇨병성 사구체 손상을 매개하는 주요 인자 중의 하나임을 고포도당을 처리한 쥐의 세포를 통해 확인되었다¹⁷⁾. 고포도당을 처리한 쥐의 혈관

Fig. 2. The changes of blood glucose level for OLETF and LETO rats. Values are means \pm SD.

Fig. 3. The light micrograph of kidney from LETO rats (A) shows unremarkable changes, but that of OLETF rats (B) at 60 weeks of age shows evidence of tubular necrosis (H&E stain, $\times 200$).

Fig. 4. The immunohistochemical stains in kidney of 60-week-old LETO rats show increased expression of TGF- β 1 mostly at the glomerular (A) and peritubular capillary endothelial cells (B) ($\times 200$).

Fig. 5. The immunohistochemical stains in kidney of 60-week-old (A, B) OLETF rats show increased expression of TGF- β 1 at the tubular epithelium and the glomerulus shows negative staining ($\times 400$).

간세포에서 TGF- β 1이 proteoglycan 합성을 증가시키고, 고포도당과 함께 또는 단독으로 fibronectin 합성을 증가시킨다고 하였다. 또한, 당뇨병쥐의 사구체 내 TGF- β 1 mRNA와 단백이 서서히 그리고 진행성으로 증가하고, 당뇨병성 신증 환자의 사구체내 TGF- β 1 단백은 fibronectin 단백과 함께 현저히 증가되는 것으로 알려져 있다^{17, 18)}.

고혈당증은 신장에서 TGF- β 1 단백 발현을 자극하는 주요 인자이다¹⁷⁾. 인슐린 치료로 혈당을 정상화하면 당뇨쥐의 신장 피질에서 TGF- β 1 단백 발현과 신장의 비대도 약화된다고 하였다⁴⁾. 또한 고혈압과 고지혈증은 당뇨병성 신증의 진행을 가속화시키는 주요 위험 인자이며 TGF- β 1 단백의 과발현에 기인한다고 하였다¹⁸⁾. TGF- β 1 단백의 과발현은 OLETF 쥐

다^{1, 12)}. 14주째 OLETF 쥐는 당뇨병 전기 단계와 유사한 특징을 나타내며, TGF- β 1 mRNA가 상당히 증가한다고 하였다¹⁹⁾. 또한 30주째에는 비의존성 인슐린 당뇨병의 특징을, 54주째에 이르러서는 인슐린 의존성 당뇨병의 특징을 나타낸다고 하였다²⁰⁾. OLETF 쥐의 체중은 LETO 쥐와 비교하여 14주에서 46주 사이에서 상당히 증가하고, 이후에는 점차 감소하여 54주에 이르러서는 두 군간의 차이는 없다고 하였다^{1, 21)}. 본 연구에서도 OLETF 쥐의 체중은 36주째까지 계속 증가하다가 37주째에 이르러서는 급격한 체중의 증가를 보였으며 이후 체중이 감소하여 40주 이후에는 LETO 쥐와 차이를 보이지 않았다.

OLETF 쥐는 연령이 증가함에 따라 혈당치도 대조군인 LETO 쥐와 달리 상당히 증가한다고 하였다^{1, 21)}. 특히 38주째 OLETF 쥐는 혈당치가 유의할 만큼 증가하며 이는 인슐린 비의존성 당뇨에서 인슐린 의존성 당뇨로의 전환과 일치한다고 하였다¹²⁾. 그러나 본 연구에서 OLETF 쥐는 33주까지는 170 mg/dL 까지 상승하다가 35주째에 이르러서는 감소하였다. 36주 이후 다시 상승하여 37주째에는 혈당치가 237 mg/dL까지 상승하였다가 감소하여 이후 200 mg/dL의 수준을 유지하였다. 그러나 이후 상승하여 60주째에는 286 mg/dL을 유지하였다. LETO 쥐의 혈당치는 정상을 유지하였다.

정상 쥐의 신장에서 TGF- β 1 단백은 세뇨관 세포에서 발현되는 반면 간질의 섬유화로 인한 신질환에서는 세뇨관 상피세포와 간질세포에서 주로 발현된다고 하였다⁹⁾. 간질세포에서 생성되는 TGF- β 1 단백은 간질의 섬유화 진행에 가장 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며^{22, 23)}, 근위세뇨관세포에서 분비되는 TGF- β 1 단백은 인접한 cortical fibroblast의增식을 유도한다고 하였다²²⁻²⁴⁾. OLETF와 LETO 쥐의 정상 세뇨관세포는 TGF- β 1 항체에 대해 약하게 염색된 반면, 섬유화가 진행된 OLETF 쥐의 간질 세포와 기질에서는 TGF- β 1 항체에 대해 매우 강하게 염색된다고 하였다²²⁾. Ichikawa 등²²⁾은 40주 이후 OLETF 쥐의 사구체는 비대해지고 사구체간질 기질의 축적과 사구체 기저막의 비후가 일어나기 시작하고, 미만성 사구체 경화와 정상 사구체가 공존한다고 하여, 70주 이후 OLETF 쥐의 세뇨관은 위축과 세포의 침윤이 일어나며 섬유화가 진행된다고 하였다²²⁾. 그러나 86주 OLETF 쥐의 사구체내의 세포에서는 TGF- β 1

Fig. 6. The Expression level of mRNA and protein for the TGF- β 1 in LETO and OLETF rats at different ages. (A) Representative RT-PCR showing mRNA for the TGF- β 1. (B) RT-PCR results are quantified by scanning densitometry. Data are normalized with GAPDH mRNA level and are presented as relative values. (C) The level of TGF- β 1 protein in kidney of 60-week-old LETO and OLETF rats. The analyzed by Western blot. Coomassie blue staining of the gel is shown for protein control.

의 당뇨병성 신증의 진행과 관련이 있는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

이러한 당뇨병성 신증의 병태생리에 중요한 인자인 TGF- β 1의 작용 부위와 시점을 밝히기 위한 노력이 있어 왔지만 아직도 완전히 밝혀지지 않은 실정이며, 그것은 TGF- β 1의 존재를 확인할 수 있는 실험 모델의 부재도 한 이유이다. 본 연구에서는 자연발생적 인 당뇨쥐인 OLETF 쥐를 대상으로 면역조직화학적 염색 및 RT-PCR 등의 방법을 시행하여 당뇨병성 신증에 관여하는 TGF- β 1의 작용부위와 시기를 밝히고자 하였다.

제 2형 당뇨 쥐 모델 중의 하나인 OLETF 쥐는 자연 발생적으로 비만증과 당뇨병이 발생하는 쥐로, 사람의 제 2형 당뇨병처럼 고혈당과 경한 비만, 인슐린 저항성 등이 나타나는 특징이 있어 사람의 제 2형 당뇨병과 가장 유사한 당뇨 쥐 모델이라고 할 수 있

항체에 대해 양성반응을 보이는 세포가 거의 검출되지 않았다²²⁾. Yamagishi 등²⁶⁾ 일부 다른 연구자들은 OLETF 쥐의 섬유화된 사구체내 세포에서 TGF- β 1의 발현이 증가하였으며, OLETF 쥐의 사구체에서 TGF- β 1 단백 발현은 30주째에 일시적으로 증가했다가 54주에 이르러서는 감소한다고 보고하였다.

본 연구에서는 OLETF 쥐의 경우 60주 이후 세뇨관세포의 위축과 침윤이 관찰되었으나 사구체의 섬유화는 발생하지 않았다. TGF- β 1 단백 발현은 35주에서 38주째의 OLETF 쥐에서는 세뇨관 내피세포와 세뇨관 상피세포에서 확인되었다. 그러나 60주 이후에는 상피세포에서는 TGF- β 1 단백의 발현이 확인되지 않았고, 세뇨관 상피세포에서의 발현은 매우 강하게 나타나, Shilling 등²⁵⁾의 보고와 일치하는 결과를 보였다. 그러나 아무런 형태적 변화도 일어나지 않은 대조군으로 사용한 LETO 쥐는 35주 이후 사구체의 내피세포에서 TGF- β 1 단백의 발현이 약하게 확인되었고, 그 외 다른 부위에서의 발현은 없었다. 당뇨병에 대한 많은 연구에서 TGF- β 1의 발현은 주로 사구체에서 일어나는 것으로 알려져 있으나 최근 세뇨관 상피세포에서도 발현되는 것으로 보고되고 있다²²⁾. 본 연구에서도 OLETF 쥐의 사구체 섬유화는 60주 까지도 매우 느리게 진행되었으나, TGF- β 1의 발현이 사구체 내피세포에서 뿐만 아니라 근위세뇨관 및 원위세뇨관의 상피세포에서도 과다 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

OLETF와 LETO 쥐로부터 분리한 전체 RNA를 분리하여 TGF- β 1 mRNA의 발현량을 조사한 결과 32주째의 OLETF 쥐는 LETO 쥐와 비교하여 80% 이상 증가했음을 확인하였다.

이러한 결과들로 미루어 TGF- β 1 mRNA와 단백의 발현은 신장의 섬유화 진행과 밀접한 관계가 있으며, 좀 더 세분화된 시점에서 TGF- β 1 mRNA와 단백의 신장내 발현을 조사해야만 할 것이다. 사람과 유사한 당뇨병을 일으키는 당뇨쥐에서의 본 연구 결과를 토대로 볼 때, 사람의 당뇨병에서도 이와 유사한 결과를 예측할 수 있으므로 당뇨병 치료를 위한 좋은 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

= Abstract =

Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Spontaneously Developed Diabetic Rats

Hyung Yup Kim*, Jae Hwi Jang, Sang Mi Han,
Ki Sung Ahn, M.D.[†], Sung Bae Park, M.D.[†]
Hyun Chul Kim, M.D.[†]
and Kwan Kyu Park, M.D.*

Dongsan Kidney Institute, Departments of Pathology* and Internal Medicine[†], Keimyung University School of Medicine,
and Departments of Internal Medicine[†], The Catholic University of Korea[†], Daegu, Korea

Background : Diabetic nephropathy is a common cause of end-stage renal disease by means of glomerular and interstitial fibrosis. Increases in extracellular matrix (ECM) and changes in its components have been documented in the glomeruli of diabetic nephropathy. Fibrogenic cytokines, particularly transforming growth factor (TGF)- β 1, play a central role in progressive renal fibrosis. Activated TGF- β 1 is known to increase the production of ECM as collagen and fibronectin. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat is an inbred strain that spontaneously develops non-insulin-dependent diabetes mellitus which progresses to diabetic glomerulosclerosis. This study is examined the time points and localization of TGF- β 1 in diabetic glomerulosclerosis of OLETF rats.

Methods : OLETF rats, a chronic model for human type 2 diabetes mellitus, and age-matched control (LETO) rats were used. Blood was assayed for glucose and body weight were measured. From rats aged 30 to 60 weeks, animals were sacrificed under ether anesthesia, and both kidneys were removed. Portions of these tissues were processed for light microscopy and immunohistochemistry of TGF- β 1. TGF- β 1 mRNA levels were measured by reverse transcription polymerase chain reaction.

Results : The body weights of OLETF rats were significantly greater than those of LETO rats from the age of 30 to 40 weeks, but those of OLETF rats gradually decreased after 40 weeks of age. There were no differences in body weights between these two strains at 50 weeks of age. Blood glucose levels of OLETF rats increased significantly with aging and were significantly higher than those of LETO rats after 32 weeks of age. There was no significant fibrosis in kidney of OLETF and LETO rats at all

ages examined. The TGF- β 1 protein was detected in the glomerular endothelial cells and tubular epithelial cells of OLETF rats at 35 to 38 weeks of age. The TGF- β 1 protein in tubular epithelial cells of OLETF rats was strongly expressed at 60 weeks of age, whereas the glomerular endothelial cells scarcely detected the expression of TGF- β 1 protein. In LETO rat kidneys, the TGF- β 1 protein is detected in the glomerular endothelial cells at 35 weeks of ages, but is not detected in any other cells. The TGF- β 1 mRNA of OLETF rats were increased at 32 weeks of age, higher than that of control LETO rats.

Conclusion : Until 60 weeks of age, glomerular sclerosis became very weakly in OLETF rats. However, in 30-week-old OLETF rats, the blood glucose levels and TGF- β 1 protein increased significantly. The TGF- β 1 protein was detected in the glomerular endothelial cells and tubular epithelial cells of OLETF rats at 37 weeks of age. (**Korean J Nephrol 2003;22(2):165-173**)

Key Words : OLETF, LETO, TGF- β 1

참 고 문 헌

- 1) Fukui T, Noma T, Mizushige K, Aki Y, Kimura S, Abe Y: Dietary troglitazone decreases oxidative stress in early stage type II diabetic rats. *Life Sci* **66**:2043-2049, 2000
- 2) Aoyama I, Shimokata K, Niwa T: Oral adsorbent AST-120 ameliorates interstitial fibrosis and transforming growth factor-beta (1) expression in spontaneously diabetic (OLETF) rats. *Am J Nephrol* **20**:232-241, 2000
- 3) Hida K, Wada J, Zhang H, Hiragushi K, Tsuchiyama Y, Shikata K, Makino H: Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. *J Lipid Res* **41**:1615-1622, 2000
- 4) Hikita M, Bujo H, Yamazaki K, Taira K, Takahashi K, Kobayashi J, Saito Y: Differential expression of lipoprotein lipase gene in tissues of the rat model with visceral obesity and postprandial hyperlipidemia. *Biochem Biophys Res Commun* **277**:423-429, 2000
- 5) Hosomi N, Noma T, Ohyama H, Takahashi T, Kohno M: Vascular proliferation and transforming growth factor-beta expression in pre- and early stage of diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis* **162**:69-76, 2002
- 6) Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges. *J Cell Biol* **119**:1017-1021, 1993
- 7) Border WA, Noble NA: Transforming growth factor in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**:1286-1292, 1994
- 8) Minami A, Ishimura N, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y, Nakaya Y: Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis* **162**:85-92, 2002
- 9) Okada M, Takemura T, Yanagida H, Yoshioka K: Response of mesangial cells to low-density lipoprotein and angiotensin II in diabetic (OLETF) rats. *Kidney Int* **61**:113-124, 2002
- 10) Katsuragi I, Okeda T, Yoshimatsu H, Utsunomiya N, Ina K, Sakata T: Transplantation of normal islets into the portal vein of Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats prevents diabetic progression. *Exp Biol Med* **226**:681-685, 2001
- 11) Zhu M, Mizuno A, Noma Y, Murakami T, Kuwajima M, Shima K, Lan MS: Defective morphogenesis and functional maturation in fetal islet-like cell clusters from OLETF rat, a model of NIDDM. *Int J Exp Diabetes Res* **1**:289-298, 2001
- 12) Sugimoto K, Tsuruoka S, Fujimura A: Effect of enalapril on diabetic nephropathy in OLETF rats: the role of an anti-oxidative action in its protective properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**:826-830, 2001
- 13) Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH: A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**:R254-R260, 2001
- 14) Covasa M, Ritter RC: Attenuated satiation response to intestinal nutrients in rats that do not express CCK-A receptors. *Peptides* **22**:1339-1348, 2001
- 15) Takao T, Tojo C, Nishioka T, Hashimoto K: Increased adrenocorticotropin responses to acute stress in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (type 2 diabetic) rats. *Brain Res* **852**:110-115, 2000
- 16) Tamura K, Kanzaki T, Tashiro J, Yokote K, Mori S, Ueda S, Saito Y, Morisaki N: Increased atherogenesis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats before the onset of diabetes mellitus: association with overexpression of PDGF beta-receptors in aortic smooth muscle cells. *Athero-*

- sclerosis **149**:351-358, 2000
- 17) Kubo E, Maekawa K, Tanimoto T, Fujisawa S, Akagi Y: Biochemical and morphological changes during development of sugar cataract in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat. *Exp Eye Res* **73**:375-381, 2001
- 18) Kondo M, Kanemoto N, Taniguchi Y, Iwanaga T, Arita N, Nose M, Tanigami A: Atypical hyperplasia of choledocho-pancreatic duct epithelium in an Otsuka Long Evans Tokushima Fatty strain of rats. *Pathol Int* **50**:126-135, 2000
- 19) Beinfeld MC, Connolly K, Pierce RC: OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rats that lack the CCK 1 (A) receptor develop less behavioral sensitization to repeated cocaine treatment than wild type LETO (Long Evans Tokushima Otsuka) rats. *Peptides* **22**:1285-1290, 2001
- 20) Kanagawa K, Nakamura H, Murata, Yosikawa I, Otsuki M: Increased gastric acid secretion in cholecystokinin-1 receptor-deficient Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Scand J Gastroenterol* **37**:9-16, 2002
- 21) Iwashima Y, Abiko A, Ushikubi F, Hata A, Kaku K, Sano H, Eto M: Downregulation of the voltage-dependent calcium channel (VDCC) beta-subunit mRNAs in pancreatic islets of type 2 diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* **280**:923-932, 2001
- 22) Ichikawa M, Kanai S, Ichimaru Y, Funakoshi A, Miyasaka K: The diurnal rhythm of energy expenditure differs between obese and glucose-intolerant rats and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* **130**:2562-2567, 2000
- 23) Moran TH, Lee P, Ladenheim EE, Schwartz GJ: Responsivity to NPY and melanocortins in obese OLETF rats lacking CCK-A receptors. *Physiol Behav* **75**:397-402, 2002
- 24) Nishida S, Segawa T, Murai I, Nakagawa S: Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in type 2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity. *J Pineal Res* **32**:26-33, 2002
- 25) Shilling PD, Feifel D: Decreased haloperidol-induced potentiation of zif268 mRNA expression in the nucleus accumbens shell and the dorsal lateral striatum of rats lacking cholecystokinin-A receptors. *Synapse* **43**:134-138, 2002
- 26) Yamagishi T, Saito Y, Nakamura T, Takeda S, Kanai H, Sumino H, Kuro-o M, Nabeshima Y, Kurabayashi M, Nagai R: Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherosgenic risk factors. *Hypertense Res* **24**:705-709, 2001