

고포도당으로 자극한 족세포 및 초기 당뇨 사구체에서 P-cadherin mRNA 및 단백질 발현

연세대학교 의과대학 내과학교실, 신장질환연구소

류동열 · 허종호 · 유태현 · 장제현 · 정동섭 · 이수현
김진주 · 최규현 · 이호영 · 한대석 · 강신욱

〈요 약〉

목 적 : 당뇨병성 신증은 임상적으로는 단백뇨가 가장 특징적인 소견으로, 최근의 연구에 의하면 당뇨병성 신증을 포함한 대부분의 사구체 질환에 의한 단백뇨는 사구체 여과 장벽 (glomerular filtration barrier)의 이상에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 이에 저자들은 고포도당으로 자극한 배양 족세포와 streptozotocin으로 당뇨가 유발된 백서의 사구체를 이용하여 사구체 여과장벽 중 세극막 (slit diaphragm)에 존재하는 것으로 알려져 있는 P-cadherin의 변화를 관찰함으로써 당뇨병성 신증에서 단백뇨의 병인을 규명하고자 하였다.

방 법 : 불멸 생쥐 족세포 (immortalized mouse podocytes)를 정상 포도당 (5.6 mM), 고포도당 (30 mM), 그리고 정상 포도당+만니톨 (24.4 mM)로 7일간 자극한 후 P-cadherin mRNA와 단백 발현의 변화를 각각 RT-PCR과 Western blot을 이용하여 관찰하였다. 또한, 12마리의 Sprague-Dawley 백서를 대상으로 대조군 (6마리)과 당뇨군 (6마리)으로 나누어 당뇨 유발 6주 후에 분리한 사구체를 이용하여 RT-PCR과 Western blot을 시행하였으며, 조직에서의 P-cadherin 발현은 면역조직화학 염색법을 이용하여 관찰하였다.

결 과 : 고포도당은 배양 족세포의 P-cadherin mRNA와 단백 발현을 각각 47%, 62% 감소시켰으나 ($p < 0.05$), 만니톨은 P-cadherin의 발현에 영향을 주지 않았다. 24시간 요알부민 배설은 대조군에 비해 당뇨군에서 유의하게 높았다 (3.15 ± 0.24 mg vs. 12.80 ± 1.12 mg, $p < 0.01$). 사구체내 P-cadherin mRNA의 발현은 당뇨군에서 대조군에 비해 58% 감소되었으며 ($p < 0.05$), P-cadherin 단백 발현 역시 당뇨군에서 대조군에 비해 67% 감소되었다 ($p < 0.05$). 면역조직화학 염색 결과 사구체내 P-cadherin 단백질의 발현은 족세포에 국한되었으며, 대조군에 비해 당뇨군에서 유의하게 감소되어 있었다 ($p < 0.05$).

결 론 : 이상의 생체내외 실험 결과로 보아, 당뇨병성 신증에서 사구체 족세포내 P-cadherin의 발현 감소가 단백뇨의 발생과 관련이 있을 것으로 생각된다.

서 론

당뇨병성 신증은 투석이나 신이식이 필요한 말기

이 논문은 2002년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KPF-2002-041-E00122).

접수: 2003년 7월 1일, 승인: 2003년 7월 21일

책임저자: 강신욱 서울특별시 서대문구 신촌동 134

연세대학교 의과대학 내과학교실

Tel: 02)361-5428, Fax: 02)393-6884

E-mail: kswkidney@yumc.yonsei.ac.kr

신부전증의 원인 질환 중 가장 많은 빈도를 차지하는 질환으로¹⁾, 임상적으로는 단백뇨가 특징적인 소견이다²⁾. 당뇨병성 신증을 비롯한 각종 사구체 질환에서 단백뇨는 사구체 여과 장벽의 크기 선택성 (size selectivity) 또는 전하 선택성 (charge selectivity)의 소실로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 사구체 여과 장벽은 혈관 내피세포층 (endothelial layer), 사구체 기저막 (glomerular basement membrane), 그리고 세극막 (slit diaphragm)이 존재하는 족세포층 (podo-

cyte layer)으로 이루어져 있다³⁻⁷⁾. 이중 사구체 기저막은 비교적 크기가 큰 분자에 대한 여과 장벽, 그리고 세극막은 알부민보다 크기가 작은 분자에 대한 여과 장벽 역할을 하는 것으로 보고되고 있다⁸⁾.

세극막은 서로 다른 족세포에서 기원한 족돌기들을 연결시켜 주는데, 4×14 nm의 세공을 가지는 연속적인 섬유상의 구조이다⁹⁾. 과거에는 폐쇄소대 (tight junction) 단백질 zonula occludens-1 (ZO-1)이 세극막의 세포질 측에 존재하는 것으로 미루어 세극막이 일종의 변형된 폐쇄소대일 것으로 생각되어져 왔다¹⁰⁾. 그러나, 최근에 면역형광 현미경과 면역전자 현미경을 이용한 연구를 통해 세극막이 변형된 폐쇄소대가 아니라 P-cadherin을 포함하는 변형된 부착소대 (adherens junction)라는 연구 결과가 보고되었으며¹¹⁾, P-cadherin 외에도 nephrin^{12, 13)}, NEPH1¹⁴⁾, 그리고 FAT¹⁵⁾ 등이 세극막에 존재하는 분자로 밝혀졌다.

Cadherin족은 대부분의 장기에서 세포와 세포 사이의 부착에 관여하는 칼슘-의존적 당단백으로, 상피조직의 구조 유지, 조직의 발생 과정, 그리고 일부 악성 종양 세포의 전이 등에 중요한 역할을 한다¹⁶⁻²¹⁾. 전통적 cadherin은 조직 특이성에 따라 E (epithelial)-, N (neural)-, 그리고 P (placental)-cadherin으로 분류되는데²²⁾, E-cadherin은 대부분의 상피세포, N-cadherin은 신경세포에 존재하며, P-cadherin은 태반 외에 피부와 전립선의 기저 세포층에 국한하여 존재한다²³⁾. 사구체에도 E-cadherin과 P-cadherin이 존재하는 것으로 보고되었지만^{11, 24)}, 정상 상태나 병적 상태에서 이들 cadherin의 역할에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 최근에 E-cadherin이 주로 사구체의 상피세포에서 발현되며, 증식성 사구체신염 환자에서 E-cadherin의 발현이 증가되었다는 연구 결과가 보고되었으나²⁴⁾, 세극막의 골격 역할을 하는 것으로 알려져 있는 P-cadherin의 변화에 대한 연구는 전무한 실정이다.

이에 저자 등은 초기 당뇨병성 신증에서 단백뇨의 발생 기전을 규명하기 위해 고포도당으로 자란 족세포 (conditionally immortalized mouse podocyte)와 당뇨 사구체에서 세극막 단백질의 하나인 P-cadherin 발현의 변화를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 족세포 (conditionally immortalized mouse podocyte) 배양

실험에 이용한 족세포는 Dr. Mundel로부터 기증받은 세포로, 33°C에서 γ -interferon이 포함된 배양액으로 배양하면 일반적인 상피세포와 유사하게 증식을 하지만 (permissive condition), 37°C에서 γ -interferon이 없는 배양액으로 배양하면 생체내 족세포와 유사하게 증식이 정지되면서 족돌기를 갖는 세포로 분화된다 (non-permissive condition)²⁵⁾. 2주 동안 non-permissive condition 하에서 배양한 족세포에서 synaptopodin mRNA의 발현을 RT-PCR로 분석하여 분화를 확인하였다.

2. 세포 실험

족세포의 분화를 확인한 후 배양액내 최종 포도당 농도가 각각 5.6 mM (정상 포도당군)과 30 mM (고포도당군)이 되게 RPMI 1640 배양액에 D-glucose (Sigma Chemical Co.)를 첨가하였다. 세포가 거의 찬 상태에서 각각의 배양액으로 7일간 배양한 후 세포로부터 RNA와 단백을 추출하였다. 고포도당에 의한 삼투압 효과를 배제하기 위해 포도당 농도가 5.6 mM인 배양액에 24.4 mM mannitol을 첨가한 배양액도 사용하였다.

3. 동물 실험

1) 대상

무게 200-250 g의 웅성 백서 (Sprague-Dawley rats) 12마리를 사용하였으며, 이중 6마리는 위약을 복강 주사하여 대조군 (C)으로 사용하고, 나머지 6마리는 streptozotocin 65 mg/kg을 복강 주사하여 당뇨를 유발시켰다. Streptozotocin 주사 72시간 후 혈당을 측정하여 당뇨 발생 유무를 확인하였다. 백서들은 자동 온도조절 시설에서 사육되었으며 불과 표준 실험식이를 자유롭게 섭취하도록 하였고, 당뇨 유발 6주 후 체중, 혈당, 24시간 요알부민 배설량을 측정한 후 희생되었다. 24시간 요알부민 배설량은 ELISA (Nephrot II, Exocell, Inc., Philadelphia, PA, USA)를 이용하여 측정하였다. 모든 동물 실험은 승인된 기관서에 따라 시행되었다.

2) 사구체 분리

백서를 pentothal (50 mg/kg)로 마취한 후 단독하여 희생시킨 다음 신장을 적출하여 sieve를 통과시키는 방법으로 사구체를 분리하였다. 적출된 신장을 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 후 가위로 피질만을 분리하여 인산 완충 용액 (phosphate buffered saline, PBS)에 옮긴 후 체공이 200, 150 및 75 μm 인 stainless sieve를 차례로 통과시킨 다음 75 μm 소공에 걸린 사구체를 실험에 이용하였다²⁶⁾.

4. 총 RNA 추출 및 RT-PCR

총 RNA를 추출하기 위해 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 사용하였다. RNA STAT-60 reagent 100 μL 로 배양한 족세포 또는 사구체를 처리하였으며, 사구체의 경우 동결과 해동을 3회 반복하여 용해시켰다. 여기에 700 μL 의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하고 vortex한 후 실온에 5분간 두었다. 이후 160 μL 의 chloroform을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 3분간 실온에 보관한 다음, 4°C에서 12,000 \times g로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 400 μL 의 isopropanol을 첨가하고 4°C에서 12,000 \times g로 30분간 원심분리하였다. RNA 침전물은 70% ice-cold ethanol로 세척, Speed Vac을 이용하여 건조시킨 후 DEPC-증류수로 희석시켰다. 분리된 RNA 순도는 spectrophotometry상 260 nm과 280 nm에서 측정된 optical density (O.D.) 값을 이용하여 확인하였다.

cDNA는 Boehringer Mannheim cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 제작하였다. 세포 또는 사구체로부터 분리한 총 RNA 중 2 μg 의 RNA에 10 μM random hexanucleotide primer, 1 mM dNTP, 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.2 mM dithiothreitol, 25 U RNase inhibitor, 그리고 40 U AMV reverse transcriptase를 첨가하였다. 이 혼합물은 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고 99°C에서 5분간의 incubation 과정을 거친 후, -70°C에 보관하였다.

GAPDH와 P-cadherin mRNA의 발현은 PCR을 이용하여 분석하였다. PCR을 위한 primer는 Life Technologies (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제

작하였으며, 생쥐 GAPDH sense primer 염기 서열은 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3', anti-sense primer 염기 서열은 5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'; 백서 GAPDH sense primer 염기 서열은 5'-GACAAGATGGTGAAGGTCGG-3', anti-sense primer 염기 서열은 5'-CATGGACTGTG-GTCATGAGC-3'; 생쥐 P-cadherin sense primer 염기 서열은 5'-CTTACAATGGGGTGGTGG-3', anti-sense primer 염기 서열은 5'-GTGATGGTGA-AATGGTCC-3'; 백서 P-cadherin sense primer 염기 서열은 5'-CTTACAATGGGGTGGTGG-3', anti-sense primer 염기 서열은 5'-GCCACGGTGAAAT-GATCC-3'이었다.

PCR은 20 ng (GAPDH) 또는 40 ng (P-cadherin) RNA에 해당하는 cDNA, 1.5 U Taq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Inc., Foster, CA, USA), 20 μM dNTP, 각각 25 pmol sense와 antisense primer, 1.5 mM MgCl₂를 함유한 50 μL 반응 혼합물을 이용, 95°C에서 9분 가열한 후 94.5°C에서 45초, 62°C (GAPDH) 또는 58°C (P-cadherin)에서 45초, 그리고 72°C에서 1분간 32 cycles (GAPDH) 또는 45 cycles (P-cadherin)를 시행한 후, 마지막에는 72°C에서 7분간 더 반응시키는 방법으로 하였다. PCR이 끝난 후 증폭된 PCR 산물은 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동하였다. TINA image software (Raytest, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 O.D.를 측정하였으며, GAPDH의 O.D.로 보정하였다.

5. 단백질 추출 및 Western blot 분석

각 군의 배양 족세포와 사구체를 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (2% sodium dodecyl sulfate, 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% [vol/vol] glycerol)를 이용하여 용해시킨 후, 세포 용해액을 4°C에서 10,000 \times g로 10분간 원심분리하였다. 상층액 내 단백질은 Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 농도를 결정한 후 50 μg 씩 등분하여 -70°C에 보관하였다. 50 μg 의 단백질은 Laemmli sample buffer로 처리, 100°C로 5분간 가열한 후, 8% acrylamide denaturing SDS-polyacrylamide gel를 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel내 단백질은 semidry blotting 기계를 이용하

여 Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL, USA)에 이전시켰다. Membrane을 실온에서 1시간 동안 blocking buffer A (1×PBS, 0.1% Tween-20, 그리고 8% nonfat milk)로 처리한 후, P-cadherin (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA)에 대한 1차 항체로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Membrane을 1×PBS와 0.1% Tween-20로 15분간 1회, 5분간 2회 처리한 후, 1:1,000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG가 함유된 buffer A에 1시간 동안 반응시킨 후 ECL chemiluminescent 시약 (Amersham Life Science, Inc.)을 이용하여 가시화하였다. Signal은 TINA image software (Raytest)를 이용하여 O.D.로 정량화하였다.

6. 면역조직화학 염색법

신장 조직을 10% neutral-buffered formalin에 고정한 후 표준적 방법으로 처리한 다음 5 μm 절편의 슬라이드를 제작하였다. 면역조직화학 염색을 위해 제작된 슬라이드의 파라핀을 제거한 후 에탄올로 적시고 세척하였다. Black and Decker vegetable steamer를 이용하여 10 mM sodium citrate buffer에서 20분간 antigen retrieval을 시행하였다. P-cadherin 염색을 위해 단일클론 rat anti-mouse P-cadherin antibody (Zymed Laboratories, Inc.)를 1:100으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 슬라이드를 세척하고 biotinylated link anti-mouse and anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)로 30분간 반응시킨 후 streptavidin-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 30분간 처리하였다. 이후 DAB로 처리하고 세척한 후 표본을 hematoxylin으로 대조염색하였다. 절편내의 모든 사구체에서 P-cadherin의 면역조직화학 염색 정도를 0-4+까지의 점수를 이용하여 반정량화하였다.

7. 통계 분석

모든 수치는 평균±표준오차 (SEM)로 표시하였다. 통계 분석은 SPSS 통계 프로그램 윈도우용 11.0판 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 결과들은 Mann-Whitney U 검정이나 Kruskal-Wallis

다중 비교용 비모수 검정을 사용하여 분석하였으며, Kruskal-Wallis 검정상 통계학적 차이가 있는 경우 Mann-Whitney U 검정으로 확인하였다. p값이 0.05 미만인 경우 의미있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 세포 실험

1) 배양 족세포에서 P-cadherin mRNA와 단백질 발현

P-cadherin mRNA 발현은 7일간 고포도당으로 자극한 족세포에서 정상 포도당군의 53% 수준으로 감소된 반면 ($p<0.05$), 양군 사이에 GAPDH mRNA 발현에는 차이가 없었다 (Fig. 1). Western blot를 이용하여 분석한 P-cadherin 단백질 발현도 mRNA 발현과 유사한 결과를 보였는데, TINA software 측정상 정상 포도당군에 비해 고포도당군에서 62% 감소되어 있었다 ($p<0.05$) (Fig. 2). 삼투압의 효과를 배제하기 위해 mannitol을 첨가한 배양액은 족세포의 P-cadherin mRNA와 단백질 발현에 영향이 없었다.

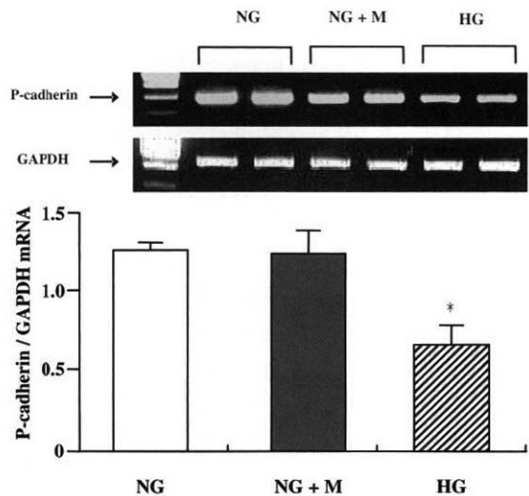


Fig. 1. RT-PCR electrophoresis for P-cadherin and GAPDH mRNA of podocytes exposed to normal glucose (NG, 5.6 mM), NG + mannitol (M, 24.4 mM), and high glucose (HG, 30 mM) media for 7 days (N=6). A significant decrease in P-cadherin/GAPDH mRNA ratios was observed in HG cells compared to NG cells. * $p<0.05$ vs. NG.

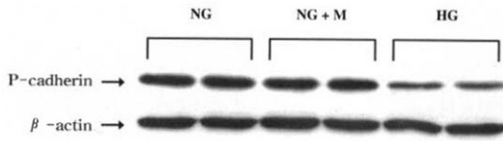


Fig. 2. Western blot of P-cadherin with podocytes exposed to normal glucose (NG, 5.6 mM), NG+mannitol (M, 24.4 mM), and high glucose (HG, 30 mM) for 7 days (representative of four blots). P-cadherin protein expression was significantly lower in podocytes exposed to HG than in those exposed to NG or NG+M.

2. 동물 실험

1) 동물 자료

대조군과 당뇨군 모두에서 실험 기간 중 체중 증가를 보였으나, 당뇨군 (274 ± 4 g)에 비해 대조군 (403 ± 5 g)에서 체중이 의미있게 증가하였다 ($p < 0.01$). 백서를 희생시킬 때 신장의 무게를 측정하였는데, 체중 당 신장의 무게는 대조군에 비해 당뇨군에서 의미있게 높았다 (0.66 ± 0.02 vs. $1.13 \pm 0.05\%$, $p < 0.01$). 당뇨 유발 6주 후 혈당은 대조군과 당뇨군에서 각각 466.5 ± 5.2 , 97.8 ± 2.2 mg/dL이었다 ($p < 0.01$). 24시간 요알부민 배설량은 대조군 (3.15 ± 0.24 mg)에 비해 당뇨군 (12.80 ± 1.12 mg)에서 유의하게 증가되어 있었다 ($p < 0.05$).

2) 대조군과 당뇨군에서 분리한 사구체내 P-cadherin mRNA와 단백질의 변화

RT-PCR로 분석한 사구체내 P-cadherin mRNA 발현은 대조군에 비해 당뇨군에서 의미있게 감소되었다. TINA image software를 이용하여 측정한 O.D.는 당뇨군에서 대조군의 42% 수준으로 감소된 결과를 나타냈다 ($p < 0.05$). 그러나, 양군 사이에 GAPDH mRNA 발현에는 의미있는 차이가 없었다 (Fig. 3).

Western blot를 이용하여 분석한 P-cadherin 단백질 발현도 mRNA 발현과 유사한 결과를 나타냈다. TINA software 측정상 대조군에 비해 당뇨군 사구체에서 P-cadherin 단백질 발현이 67% 감소되어 있었다 ($p < 0.05$) (Fig. 4).

3) P-cadherin에 대한 면역조직화학 염색

P-cadherin에 대한 면역조직화학 염색을 시행한 결과, 염색은 족세포에 국한되었으며, 대조군에 비해 당뇨군에서 사구체내 P-cadherin 단백질 발현이 의미있

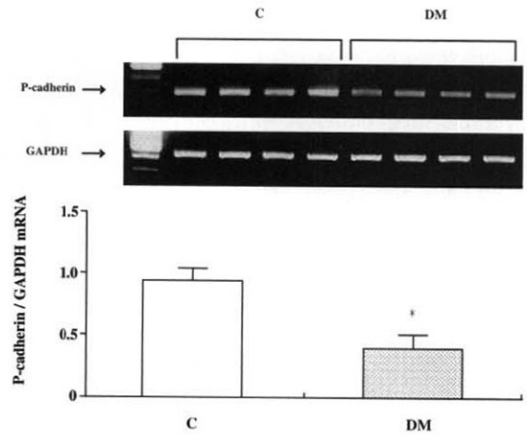


Fig. 3. Glomerular P-cadherin and GAPDH mRNA expressions in control (C) and DM rats. Glomerular P-cadherin/GAPDH mRNA ratios were significantly lower in DM compared with C rats. * $p < 0.05$ vs. C.

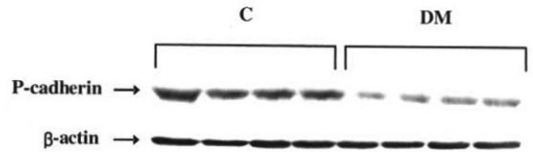


Fig. 4. Western blot for P-cadherin with control (C) and DM glomeruli at 6-week after DM induction (representative of four blots). Densitometric quantitation revealed that there was a 67% decrease in P-cadherin protein expression in DM relative to C glomeruli ($p < 0.05$), whereas there was no difference in beta-actin protein expression.

게 감소되어 있었다. 면역조직화학 염색 정도를 0-4+까지의 점수로 반정량화한 결과, 당뇨군에서 대조군에 비해 의미있게 염색 점수가 낮았다 (2.9 ± 0.3 vs. 1.2 ± 0.2 점, $p < 0.05$) (Fig. 5).

고 안

당뇨병성 신증은 병리학적으로는 사구체와 세뇨관의 비후 및 세포외 기질의 축적, 임상적으로는 단백뇨가 특징적인 소견이다^{2, 27, 28}. 단백뇨는 각종 사구체 질환에서 흔히 동반되는 소견으로, 단백뇨의 발생은 혈관 내피세포, 사구체 기저막, 그리고 족세포로 이루어져 있는 사구체 여과 장벽의 크기 또는 전하 선택성의 소실에 기인하는 것으로 알려져 있다³⁻⁷. 본 연

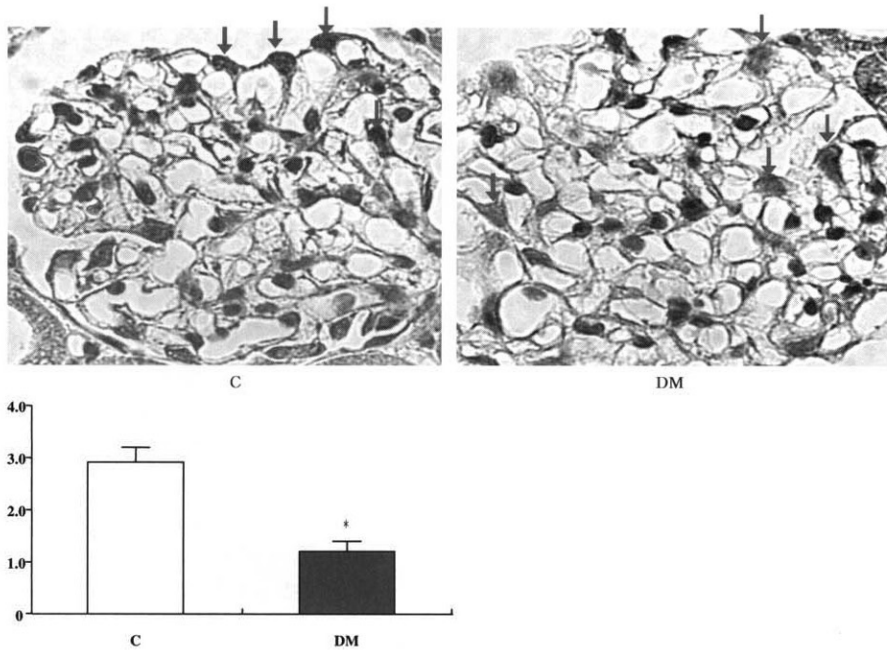


Fig. 5. Immunohistochemical staining for P-cadherin protein in control (C) and DM glomeruli at 6-week after DM induction. There was a significant decrease in glomerular P-cadherin expression, which appeared to be confined within visceral epithelial cells (arrows), in DM rats ($\times 400$). A semiquantitative score for determining P-cadherin immunohistochemical staining within glomeruli was significantly lower in DM compared with C rats (2.9 ± 0.3 vs. 1.2 ± 0.2 , $p < 0.05$).

구에서는 세극막에 존재하는 것으로 알려져 있는 분자의 하나인 P-cadherin mRNA와 단백질의 발현이 초기 당뇨 사구체와 고포도당으로 자극한 족세포 모두에서 의미있게 감소되었다는 것을 처음으로 증명하였으며, 이는 P-cadherin 발현의 감소와 당뇨병성 신증에서 동반되는 단백질 사이에 연관이 있음을 시사하는 결과로 생각된다.

족세포는 사구체의 상피하 기저막의 합성과 유지뿐만 아니라 여과 선택성을 유지하는 데에 중요한 역할을 한다⁸⁾. 족세포는 기저막의 요강 측에 존재하며, 수개의 1차 돌기가 다수일, 2차 돌기로 분지되는 형태를 지닌다. 세극막은 서로 다른 족세포에서 기원한 족돌기들을 연결시켜주는데, 4×14 nm의 세공을 가지는 크기 선택성 여과의 기능을 한다⁹⁾. 아직까지 세극막의 분자 구조가 확실히 밝혀져 있지 않은 상태이나, 최근의 연구들을 통해 세극막에 존재하는 몇 종류의 단백질이 밝혀졌다. 이중 nephrin은 핀란드형 선천성 신증후군 환자에서 돌연변이를 동반하는 NPHS1 유전

자의 산물로²⁹⁾, 세극막에 존재하는 것으로 알려진 최초의 단백질이다^{12, 13)}. 이후로 Mundel 등²⁵⁾에 의해 생체내의 족세포와 유사한 구조와 기능을 보유한 족세포 (conditionally immortalized podocyte)의 배양이 가능해지면서 세극막을 구성하는 단백질에 관한 연구가 활발히 진행되어, 과거에 ZO-1이 세극막의 세포질 측에 존재하는 것으로 미루어 세극막이 일종의 변형된 폐쇄소대일 것이라는 생각이¹⁰⁾ P-cadherin을 포함하는 변형된 부착소대라는 사실로 바뀌게 되었다¹¹⁾. Nephrin과 P-cadherin 외에도 NEPH1¹⁴⁾과 FAT¹⁵⁾가 세극막에 존재하며, catenin¹¹⁾, CD2-associated protein³²⁾, podocin^{33, 34)}, 그리고 ZO-1¹⁰⁾ 등이 세극막과 관련된 단백질로 알려져 있다.

과거로부터 사구체 여과 장벽의 변화가 각종 사구체 질환에서 단백질의 병인일 것으로 생각되어져 왔다. 이러한 관점에서 수행된 몇몇 연구 결과들이 보고되었는데, 거의 대부분이 nephrin에 초점을 둔 연구들이었다³⁵⁻⁴⁰⁾. Puromycin aminonucleoside나 염화수은

으로 유도된 실험적 사구체 질환에서 nephrin mRNA와 단백 발현의 감소뿐만 아니라, nephrin 단백질의 재분포가 일어나며, nephrin mRNA 발현의 감소가 단백뇨의 발생에 선행되었다는 보고가 있다³⁶⁾. 원발성 성인 신증후군 환자에서도 nephrin 단백질의 발현이 감소되었다는 연구 결과가 있지만³⁹⁾, 사구체 질환을 동반한 소아 환자에서 nephrin 단백질의 발현에 변화가 없었다는 보고도 있다⁴⁰⁾. 따라서 단백뇨를 동반하는 모든 사구체 질환에서 nephrin 단백질 발현이 감소되는 것은 아닐 것으로 생각된다. 당뇨병성 신증의 경우도 단백뇨가 특징적인 임상 소견이기 때문에, 당뇨병성 신증에서 단백뇨와 nephrin 발현 사이의 연관성에 관한 연구가 있어 왔으나 결과는 서로 상이하였다. Bonnet 등³⁷⁾은 streptozotocin으로 당뇨가 유발된 자발성 고혈압 백서에서 nephrin mRNA와 단백질 발현 모두가 유의하게 감소되었다고 보고한 반면, Aaltonen 등³⁸⁾은 streptozotocin 유발 당뇨 백서와 non-obese 마우스에서 현성 알부민뇨가 발생되기 전인 초기 당뇨병성 신증에서 nephrin mRNA가 오히려 증가되었다고 하였다. 이렇게 동일 질환에서의 상이한 결과는 실험에 이용한 동물과 당뇨 유발 기간의 차이, 또는 동반된 고혈압의 유무 등에 기인할 것으로 생각된다.

P-cadherin은 세포 사이의 부착에 관여하는 당단백인 전통적 cadherin의 하나로, 피부와 진립선의 기저 세포, 유선의 근상피세포, 그리고 사구체에 존재하는데, 사구체내에서는 세극막에 존재하는 것으로 미루어 P-cadherin이 세극막의 골격 역할과 동시에 nephrin과 같은 단백질과 연관되어 여과 선택성 유지에 관여하는 것으로 여겨지고 있다^{11, 23)}. Nephrin과는 달리 단백뇨와 P-cadherin 사이의 연관성을 증명한 연구는 거의 없는 실정이다. Bains 등³⁵⁾은 미세변화 증후군과 막성 사구체신염 환자의 신조직을 이용한 실험에서 대조군과 비교해볼 때 간접 면역형광법으로 관찰한 cadherin의 발현에 의미있는 차이가 없었다고 하였으며, Singh 등⁴¹⁾도 당화 단백질로 자극한 사구체 상피세포에서 cadherin 발현이 감소하였다고 보고하였으나, 이들이 사용한 항체가 Pan-cadherin에 대한 항체이었기 때문에 P-cadherin 단독의 변화를 관찰할 수는 없었을 것으로 생각된다. Nephrin이 결여된 핀란드형 선천성 신증후군에서 P-cadherin이 정상적으로 표현된다는 사실³⁰⁾과 P-cadherin 결여 마우스에서 심한 단백뇨가 동반되지 않는다는 사실³¹⁾로 미

루어 단백뇨의 발생과 P-cadherin 사이에 밀접한 관계가 없을 것으로 생각할 수도 있다. 그러나, 위에서 언급한 바와 같이 사구체 여과 장벽과 관련된 단백질 중 가장 중요하다는 이야기되고 있는 nephrin 조차도 당뇨병성 신증 초기에는 오히려 증가되는 것으로 보아³⁸⁾ 단백뇨의 발생에 하나의 단백질보다는 여러 단백질의 발현 변화가 관여할 것으로 생각된다.

모든 연령의 제 1형 당뇨병 환자에서 사구체 족세포의 수가 감소되어 있으며, 이러한 변화는 유병 기간이 짧은 경우에도 나타나는 것으로 알려져 있다⁴²⁾. 또한, 제 2형 당뇨병을 동반한 Pima Indians의 신생검 소견상 임상적 신증 환자에서는 사구체당 족세포의 수가 감소되었으며, 동시에 족돌기의 융합 소견이 관찰되었다⁴³⁾. 이러한 족세포 수의 감소는 족세포의 기저 세포막에 존재하는 $\alpha 3 \beta 1$ integrin의 감소로 인해 사구체 기저막으로부터의 국소적 탈락이 일어나기 때문인 것으로 알려져 있다⁴⁴⁾. 따라서 미세알부민뇨 (micro-albuminuria)나 현성 단백뇨를 동반한 당뇨 환자의 요침사에서 족세포가 검출되며, 소변내 족세포의 수는 미세알부민뇨보다는 현성 단백뇨 환자에서 유의하게 많은 것으로 보고되고 있다⁴⁵⁾. 본 연구에서는 초기 당뇨 사구체와 고폐도당으로 자극한 족세포에서 P-cadherin의 발현이 유의하게 감소되었는데, GAPDH mRNA 및 β -actin 단백질의 발현에 차이가 없었을 뿐만 아니라 면역조직화학 염색상 사구체내 염색 정도와 범위에 의미있는 차이가 있었던 것으로 보아 P-cadherin 발현의 감소가 족세포 수의 감소와 관련되지는 않았을 것으로 생각된다.

이상의 결과로, 초기 당뇨 사구체와 고폐도당으로 자극한 족세포에서 P-cadherin mRNA와 단백질 발현이 유의하게 감소되었으며, 이러한 발현 감소는 당뇨병성 신증의 특징인 단백뇨의 발생과 관련이 있을 것으로 생각된다.

= **Abstract** =

P-Cadherin is Decreased in Glucose-Stimulated Podocytes and in Experimental Diabetic Nephropathy

Dong-Ryeol Ryu, M.D., Zhong-Gao Xu, M.D.
Tae-Hyun Yoo, M.D., Jae-Hyun Chang, M.D.
Dong-Sub Jung, B.S., Su-Hyun Lee, B.S.
Jin-Ju Kim, B.S., Kyu Hun Choi, M.D.
Ho Yung Lee, M.D., Dae-Suk Han, M.D.
and Shin-Wook Kang, M.D.

*Department of Internal Medicine,
College of Medicine, Institute of Kidney Disease,
Yonsei University, Seoul, Korea*

Background : Proteinuria is a cardinal feature of glomerular disease including diabetic nephropathy, and glomerular filtration barrier is considered as a filter restricting protein excretion in urine. We tested whether the expression of P-cadherin, a molecule known to be located at the slit diaphragm, was altered by high glucose in cultured podocytes in vitro and by diabetes in vivo.

Methods : In vitro, immortalized mouse podocytes were cultured in media with 5.6 mM glucose (NG), NG+24.4 mM mannitol (NG+M), or 30 mM glucose (HG) for 7 days at 37°C. Cell lysates were used for RT-PCR and Western blot. For animal studies, twelve Sprague-Dawley rats were injected with diluent (Control, C, N=6) or streptozotocin (DM, N=6) intraperitoneally, and were sacrificed after 6 weeks. RT-PCR and Western blot for P-cadherin mRNA and protein expression, respectively, were performed with sieved glomeruli, and immunohistochemistry with renal tissue.

Results : HG significantly reduced P-cadherin mRNA and protein expression in cultured podocytes by 47% and 62%, respectively ($p < 0.05$). Twenty-four hour urinary albumin excretion was significantly higher in DM (12.80 ± 1.12 mg/day) compared to C rats (3.15 ± 0.24 mg/day) ($p < 0.05$). Glomerular P-cadherin mRNA expression was significantly lower in DM than that in C rats ($p < 0.05$). P-cadherin protein expression assessed by Western blot and immunohistochemistry showed a similar pattern.

Conclusion : Exposure of podocytes to HG in vitro and diabetes in vivo reduced P-cadherin mRNA and protein expression. These findings suggest that the decrease in P-cadherin expression is connected to the early changes of diabetic nephropathy and thus may contribute to the development of

proteinuria. (**Korean J Nephrol** 2003;22(5):494-503)

Key Words : P-cadherin, High glucose, Podocyte, Diabetic nephropathy, Proteinuria

참 고 문 헌

- 1) Collins AJ, Kasiske B, Herzog C, Chen SC, Everson S, Constantini E, Grimm R, McBean M, Xue J, Chavers B, Keane W, Matas A, Manning W, Louis T, Ma J, Pan W, Liu J, Li S, Roberts T, Dalleska F, Snyder J, Ebben J, Frazier E, Sheets D, Johnson R, Li S, Dunning S, Gilbertson D, St. Peter W, Frederick P, Eggers P, Agodoa L : Excerpts from the United States Renal Data System 2001 Annual Data Report : Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 38(Suppl 3):S5-S8, 2001
- 2) Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E : The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32(Suppl 2):64-78, 1983
- 3) Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA : Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab Invest* 44:271-279, 1981
- 4) Myers BD, Okarma TB, Friedman S, Bridges C, Ross J, Asseff S, Deen WM : Mechanisms of proteinuria in human glomerulonephritis. *J Clin Invest* 70:732-746, 1982
- 5) Daniels BS, Deen WM, Mayer G, Meyer T, Hostetter TH : Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest* 92:929-936, 1993
- 6) Guasch A, Deen WM, Myers BD : Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans. *J Clin Invest* 92:2274-2282, 1993
- 7) Ota Z, Shikata K, Ota K : Nephrotic tunnels in glomerular basement membrane as revealed by a new electron microscopic method. *J Am Soc Nephrol* 4:1965-1973, 1994
- 8) Tryggvason K, Wartiovaara J : Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:543-549, 2001
- 9) Rodewald R, Karnovsky MJ : Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60:423-433, 1974
- 10) Kurihara H, Anderson JM, Farquhar MG : Diversity among tight junctions in rat kidney : glomerular slit diaphragms and endothelial junctions express only one isoform of the tight junction

- protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7075-7079, 1992
- 11) Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P: The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* **11**:1-8, 2000
 - 12) Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Holthofer H, Abrahamson DR: Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* **56**:1481-1491, 1999
 - 13) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:7962-7967, 1999
 - 14) Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA, Starbuck M, Brandt M, Gupta A, Ramirez-Solis R, Zambrowicz BP, Powell DR: Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* **21**:4829-4836, 2001
 - 15) Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, Ohshiro K, Kawachi H, Okada H, Suzuki H, Kihara I, Yamamoto T: FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* **59**:1003-1012, 2001
 - 16) Grunwald GB: The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **5**:797-805, 1993
 - 17) Takeichi M: Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* **7**:619-627, 1995
 - 18) Gumbiner BM: Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345-357, 1996
 - 19) Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM: Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:119-146, 1997
 - 20) Frixen U, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A: E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cell lines. *J Cell Biol* **113**:173-185, 1991
 - 21) Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F: Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumour cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**:107-119, 1991
 - 22) Geiger B, Ayalon O: Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* **8**:307-332, 1992
 - 23) Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O: Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* **49**:2128-2133, 1989
 - 24) Nakopoulou L, Lazaris ACh, Boletis IN, Michail S, Giannopoulou I, Zeis PM, Stathakis CP, Davaris PS: Evaluation of E-cadherin/catenin complex in primary and secondary glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* **39**:469-474, 2002
 - 25) Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R: Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* **236**:248-258, 1997
 - 26) Kang SW, Adler SG, Lapage J, Natarajan R: p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. *Kidney Int* **60**:543-552, 2001
 - 27) Mauer SM, Steffes MW, Ellis EN, Sutherland DE, Brown DM, Goetz FC: Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J Clin Invest* **74**:1143-1155, 1984
 - 28) Adler S: Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* **5**:1165-1172, 1994
 - 29) Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* **1**:575-582, 1998
 - 30) Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestila M, Holmberg C, Salonen R, Heikinheimo M, Wartiovaara J, Tryggvason K, Jalanko H: Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* **157**:1905-1916, 2000
 - 31) Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M, Hynes RO: Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* **139**:1025-1032, 1997
 - 32) Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* **159**:2303-2308, 2001
 - 33) Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P: Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP

- and nephrin. *J Clin Invest* **108**:1621-1629, 2001
- 34) Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessey F, Attie T, Gubler MC, Antignac C: Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* **160**:131-139, 2002
- 35) Bains R, Furness PN, Critchley DR: A quantitative immunofluorescence study of glomerular cell adhesion proteins in proteinuric states. *J Pathol* **183**:272-280, 1997
- 36) Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, Kerjaschki D, Holthofer H: Nephrin in experimental glomerular disease. *Kidney Int* **58**:1461-1468, 2000
- 37) Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z: Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* **44**:874-877, 2001
- 38) Aaltonen P, Luimula P, Astrom E, Palmén T, Gronholm T, Palojoki E, Jaakkola I, Ahola H, Tikkanen I, Holthofer H: Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* **81**:1185-1190, 2001
- 39) Doublie S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G: Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* **158**:1723-1731, 2001
- 40) Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, Jalanko H: Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* **12**:289-296, 2001
- 41) Singh AK, Mo W, Dunea G, Arruda JA: Effect of glycosylated proteins on the matrix of glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* **9**:802-810, 1998
- 42) Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM: Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* **59**:2104-2113, 2001
- 43) Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW: Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* **99**:342-348, 1997
- 44) Regoli M, Bendayan M: Alterations in the expression of the alpha 3 beta 1 integrin in certain membrane domains of the glomerular epithelial cells (podocytes) in diabetes mellitus. *Diabetologia* **40**:15-22, 1997
- 45) Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H: Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **15**:1379-1383, 2000