

성인 미세변화 질환 환자에서
치료 반응에 따른 병리학적 소견
및 신조직 내 유전자 발현의 차이

연세대학교 대학원
의 학 과
박 선 영

성인 미세변화 질환 환자에서
치료 반응에 따른 병리학적 소견
및 신조직 내 유전자 발현의 차이

지도 교수 강 신 욱

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2006 년 6 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 선 영

박선영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2006 년 6 월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 끊임없는 관심과 인내심을 갖고 지도해 주신 강신욱 선생님께 진심으로 감사드립니다. 선생님의 가르침으로 저의 의학자로서의 길에 큰 초석을 마련할 수 있었으며 앞으로도 의학을 전공하는데 있어서 많은 도움이 될 것으로 생각합니다. 또한, 저를 위하여 세심한 조언을 아끼지 않으신 이수곤 교수님, 홍순원 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 본 논문이 완성하기까지 부족한 점이 많은 저에게 격려와 도움을 주신 한승혁 선생님께 고마움을 표현하고 싶습니다. 마지막으로 항상 저를 보살피 주시는 부모님께 고개 숙여 감사드리며 곁에서 힘이 되어준 인생의 반려자인 정근씨에게 이 작은 논문을 바칩니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	5
II.대상 및 방법	9
1. 연구 대상	9
2. 연구 방법.....	9
가. 자료 수집.....	9
나. 신조직검사	10
다. 총 RNA 추출	11
라. 역전사	12
마. 실시간-중합효소 연쇄반응	12
3. 통계 분석	14
III. 결 과	16
1. 대상 환자군의 임상적 특성과 검사실 소견.....	16

2. 스테로이드 반응성에 따른 임상적 특성 및 검사실 소견의 차이	18
3. 스테로이드 반응성에 따른 신조직 내 유전자 발현의 차이	21
IV. 고 찰	25
V. 결 론	32
참고문헌	34
영문요약	41

그림 차례

Figure 1. Cumulative CR rates.....	19
Figure 2. Cumulative CR rates according to IgM deposition on immunofluorescence microscopy	21
Figure 3. Nephrin/WT-1 mRNA (A) and GCR/GAPDH mRNA (B) ratio in early and late responders	23
Figure 4. Correlation between GCR mRNA expression and time interval from the start of steroid therapy to complete remission	24

표 차례

Table 1. Demographic characteristics and laboratory findings of patients	17
Table 2. Comparison between early and late responders	20

국문요약

성인 미세변화 질환 환자에서 치료 반응에 따른
병리학적 소견 및 신조직 내 유전자 발현의 차이

목적: 미세변화 질환 (minimal change disease, MCD) 환자의 경우 소아에 비하여 성인에서 약물 치료에 대한 반응이 늦게 나타나는 경향이 있다. 성인 미세변화 질환 환자에서는 발병 당시의 연령, 신기능, 그리고 단백뇨 선택성 등이 스테로이드의 반응과 관련이 있다는 보고들은 있으나, 조직학적 변화나 조직 내 유전자 발현에 따른 치료 반응을 관찰한 연구는 극히 미미한 실정이다. 일부 연구에서 세극막을 구성하는 단백질 이상이 사구체 기원의 단백뇨와 관련이 있다고 보고되었으며, 이중에서도 세극막을 구성하는 대표적인 단백질인 네프린 (nephrin)의 발현이 성인 미세변화 질환 환자에서 감소되어 있다고 보고된 바는 있으나 스테로이드 치료 반응과의 연관성에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀진 바가 없다. 스테로이드는 세포 내 글루코코르티코이드

수용체 (glucocorticoid receptor, GCR)와 결합하여 효과를 나타내며, 소아 신증후군에서 백혈구의 GCR과 스테로이드 치료 반응 사이의 관련성을 밝히고자 한 연구 보고는 있었으나, 신장 조직 내 GCR과 스테로이드 반응 사이의 상관관계를 규명한 연구는 전무한 실정이다. 이에 본 연구자는 성인 미세변화 질환 환자를 대상으로 스테로이드 치료 반응에 따른 병리학적 소견과 네프린 및 GCR 유전자의 발현 차이를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법: 2000년 1월 1일부터 2005년 12월 31일까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에서 신장 조직검사상 미세변화 질환으로 확진된 성인 신증후군 환자를 대상으로 스테로이드 치료 반응에 따른 임상적 및 혈청 생화학적 검사 결과, 병리학적 소견, 그리고 신조직 내 네프린과 GCR mRNA의 발현을 비교 분석하였다. 완전 관해 (complete remission, CR)는 부종이 없는 상태에서 요검사상 단백이 음성이면서 요중 단백/크레아티닌 비가 0.3 미만인 경우로 정의하였다. 대상 환자는 스테로이드 반응에 따라 치료 4주 이내에 CR 상태에 도달한 경우에 early responder (ER), 4주 이후에 CR이 동반된 경우에는 late responder

(LR)로 분류하였다.

결과: 대상 환자는 총 28명으로, ER군이 20명, LR군이 8명이었다. CR까지의 기간은 ER군에서 16.5 ± 0.9 일로, LR군의 52.0 ± 4.9 일에 비하여 유의있게 짧았다 ($p < 0.005$). ER군과 LR군 사이에 연령, 고혈압 유무, 혈중 요소질소, 혈청 크레아티닌, 24시간 뇨단백 배설량, 그리고 선택적 단백뇨 지수에는 의미있는 차이가 없었다. 신장 조직검사 소견상 미약한 메산지움 내 IgM 침착이 동반되었던 환자는 LR군에서 ER군에 비하여 유의하게 많았으며 (75.0% vs 30.0%, $p < 0.05$), 스테로이드 치료 기간별 완전 관해율도 IgM 침착이 동반되었던 환자에서 유의있게 낮았다 ($p < 0.05$). 신조직 내 네프린과 GCR의 mRNA 발현을 실시간-중합효소 연쇄반응 (real time-PCR)을 이용하여 분석한 결과, WT-1으로 보정한 네프린 mRNA의 발현은 양 군 사이에 의미있는 차이가 없었으나, GAPDH로 보정한 GCR mRNA의 발현은 ER군에 비하여 LR군에서 유의하게 감소되어 있었다 ($p < 0.005$). GCR의 mRNA 발현과 스테로이드 사용 후 완전 관해까지 소요된 기간 사이에는 유의있는 음의 상관관계가 있었다 ($r = -0.39$, $p < 0.05$).

결론: 성인 미세변화 신증후군 환자에서 사구체 내 IgM 침착 유무와 신조직 내 GCR mRNA의 발현 정도가 스테로이드 반응성 예측에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말: 미세변화 질환, 스테로이드 반응성, IgM 침착, 글루코코르티코이드 수용체, 실시간-중합효소 연쇄반응

성인 미세변화 질환 환자에서 치료 반응에 따른 병리학적 소견 및 신조직 내 유전자 발현의 차이

<지도교수 강 신 옥>

연세대학교 대학원 의학과

박 선 영

I. 서 론

미세변화 질환 (minimal change disease, MCD)은 신증후군 환자에서 가장 흔히 관찰되는 병리학적 소견으로, 소아의 경우 스테로이드 치료에 대한 반응이 양호하여 스테로이드 투여 후 2주 내에 50%, 8주 내에는 거의 모든 환자에서 완전 관해가 유도되는 것으로 알려져 있다¹⁻². 그러나, 성인의 경우에는 스테로이드 치료에 대한 관해율이 소아에서와는 다른 경향을 보이는데, 기존의 외국

연구에 의하면 성인 미세변화 질환 환자에서는 스테로이드 투여 후 4주 내에 37~50%, 8주 내에 51~76%, 그리고 16주 내에 76~96%의 환자에서 완전 관해가 유도되는 것으로 보고되어 있다³⁻⁶. 결국, 성인 미세변화 질환의 경우 소아에 비하여 완전 관해율이 낮을 뿐만 아니라 스테로이드에 대한 반응도 지연되기 때문에 장기간의 고용량 스테로이드 치료로 인하여 스테로이드의 부작용을 경험하는 환자가 많게 된다³⁻⁶. 따라서 스테로이드에 대한 반응을 예측할 수 있는 확실한 지표가 있다면 반응이 지연될 것으로 예상되는 환자에서 조기에 스테로이드와 다른 약제를 병용 투여할 경우 적은 용량의 스테로이드를 사용하게 되어 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지의 보고에 의하면 성인 미세변화 질환 환자에서 스테로이드에 대한 반응의 예측인자로 발병 당시의 연령, 신기능, 그리고 단백뇨 선택성 등이 알려져 있다⁵⁻⁶. 또한 병리학적으로는 상대적 간질 용적이 신손상 정도 및 단백뇨 선택성과 관련이 있으면서 스테로이드에 대한 반응과도 연관이 있다는 보고들이 있다⁵⁻⁶. 그러나 사구체 내 조직병리학적 변화나 신조직 내 유전자

발현 정도에 따른 스테로이드 반응성을 관찰한 연구는 극히 미미한 실정이다.

미세변화 질환의 병인은 아직까지 명확하게 규명되어 있지 않으나 T-임파구나 순환 싸이토카인 등이 본 질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 이야기되어지고 있으며⁷, 이는 본 질환에서 스테로이드를 사용하는 이론적 근거가 되기도 하지만 미세변화 질환에서 스테로이드의 작용 기전에 대해서는 아직 논란이 많은 실정이다. 스테로이드는 세포 내 글루코코르티코이드 수용체 (glucocorticoid receptor, GCR)와 결합한 후 핵 내로 이동하여 효과를 나타내게 되기 때문에 신증후군을 포함한 각종 전신 질환 환자에서 스테로이드에 대한 반응성을 단핵구 또는 임파구 내 GCR의 발현 측면에서 관찰한 연구는 종종 있어 왔다⁸⁻⁹. 그러나, 조직 내 GCR의 발현 정도에 따른 스테로이드 반응성을 관찰한 연구는 극히 미미하였으며, 더더욱 신증후군 환자에서 신장 조직 내 GCR의 발현과 스테로이드 반응성 사이의 연관성을 규명한 연구는 현재까지 전무한 실정이다.

이에 본 연구자는 성인 신증후군 환자 중 신장 조직검사상

미세변화 질환으로 진단된 환자를 대상으로 스테로이드 치료
반응에 따른 병리학적 소견과 GCR를 포함한 유전자 발현의 차이를
알아보고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 연구 대상

2000년 1월 1일부터 2005년 12월 31일까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에 신증후군으로 입원하여 신장 조직검사를 시행받았던 환자 중 병리학적으로 미세변화 질환으로 진단된 16세 이상의 성인 환자를 대상으로 하였다. 추적 관찰 기간이 3개월 미만이었던 환자와 전신 질환이나 악성 종양이 동반되었던 환자는 대상에서 제외하였으며, 미세변화 질환 이외에 다른 사구체 질환이 동반된 경우도 대상에서 제외하였다.

2. 연구 방법

가. 자료 수집

본 연구는 후향적 연구로, 의무기록 검토를 통하여 신장 조직검사 당시의 연령, 성별, 고혈압 유무 등의 인구통계학적 특성과 혈색소, 헤마토크릿, 혈중 요소질소, 혈청 크레아티닌, 총 단백질과 알부민, 총 콜레스테롤, 24시간 뇨단백 배설량, 요중 단백질/크레아티닌 비,

선택적 단백뇨 지수, 혈중 IgG/IgA/IgM, 그리고 C3/C4 등의 검사실 소견을 조사하였다.

모든 환자에서 스테로이드 (prednisolone)를 매일 1 mg/kg의 용량으로 사용하였으며, 스테로이드 사용 후 완전 관해까지의 기간을 산출하였다. 완전 관해는 부종이 없는 상태에서 요검사항 단백질이 음성이면서 요중 단백/크레아티닌 비가 0.3 미만인 경우로 정의하였다.

대상 환자는 스테로이드 사용 후 완전 관해까지의 기간을 기준으로 치료 4주 내에 완전 관해 상태에 도달한 환자를 조기 반응군 (early responder, ER), 그리고 4주 이후에 완전 관해가 동반된 환자를 지연 반응군 (late responder, LR)으로 분류하여 임상적 특성, 검사실 소견, 그리고 신조직 내 네프린과 GCR mRNA의 발현 정도를 비교하였다.

나. 신조직 검사

모든 환자에서 신조직 검사는 초음파 유도 하에서 16G 생검침을 이용하여 시행하였다. 신생검을 통하여 얻어진 조직으로 광학

현미경, 면역형광 현미경, 그리고 전자 현미경 검사를 시행하였으며, 신피질 조직의 일부는 -80°C 에 보관하였다.

다. 총 RNA 추출

총 RNA를 추출하기 위하여 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 사용하였다. 환자로부터 얻은 신장 조직을 막자사발에 넣고 액화 질소를 부어가면서 조직을 분쇄하였다. 여기에 $800\ \mu\text{L}$ 의 RNA STAT-60 reagent를 첨가하였다. 이후 $160\ \mu\text{L}$ 의 chloroform을 첨가하고 30초간 충분히 흔들어 섞은 후 3분간 실온에 보관한 다음, 4°C 에서 $12,000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube로 옮겼다. 여기에 $400\ \mu\text{L}$ 의 isopropanol을 첨가하고 4°C 에서 $12,000\times\text{g}$ 로 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.

라. 역전사 (Reverse transcription)

cDNA는 cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 제작하였다. 조직으로부터 추출한 총 RNA 중 2 μg 의 RNA에 10 μM random hexanucleotide primer, 1 mM dNTP, 8 mM MgCl_2 , 30 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.2 mM dithiothreitol, 25 U RNase inhibitor, 그리고 40 U avian myeloblastoma virus reverse transcriptase를 첨가하였다. 이 혼합물은 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고 99°C에서 5분간의 incubation 과정을 거친 후, -70°C에 보관하였다.

마. 실시간-중합효소 연쇄반응 (Real time-PCR)

네프린, GCR, Wilms' tumor-1 (WT-1), 그리고 GAPDH mRNA의 발현은 real time-PCR을 이용하여 분석하였다. PCR을 위한 primer는 Life Technologies (Rockville, MD, USA)에 의뢰하여 제작하였으며, 네프린 sense primer 염기 서열은 5'-GGT GAA TTC CAC CTG CAC ATC-3', antisense primer 염기 서열은 5'-AGC TTG GGA GGA ACC AGG AT-3'; GCR sense primer 염기

서열은 5'-GCA GCG AAG ACT TTT GGT TG-3', antisense primer 염기 서열은 5'-GTG AAA CTG CTT TGG ACA GA-3'; WT-1 primer 염기 서열은 5'-CAC GGT GTC TTC AGA GGC AT-3', antisense primer 염기 서열은 5'-GTC TCA GAT GCC GAC CGT AC-3'; GAPDH sense primer 염기 서열은 5'-GAT TCC ACC CAT GGC AAA TT-3', 그리고 antisense primer 염기 서열은 5'-AGA TGG TGA TGG GAT TTC CAT T-3'이었다.

Real-time PCR은 25 ng RNA에 해당하는 cDNA 5 μ L, 10 μ L의 SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Inc., Foster, CA, USA), 그리고 각각 5 pmol의 sense와 antisense를 함유한 20 μ L 반응 혼합물을 이용하여 ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)으로 시행하였다. PCR 조건은 95°C에서 9분간 가열한 후, 94.5°C에서 45초, 60°C에서 45초, 그리고 72°C에서 1분간 45 cycles를 시행하였다. PCR을 시행한 후 온도를 60°C에서 95°C로 서서히 높여 melting curve를 구하였으며, 모든 실험은 각 sample당 triplicate로 시행하였다. Comparative C_T 방법을 이용하여 각각의 mRNA 양을 추정하였으며, WT-1 또는

GAPDH의 결과로 보정하였다. 조기 반응군에서의 WT-1으로 보정한 네프린과 GAPDH로 보정한 GCR mRNA의 발현 비를 1로 정의하였으며, 조기 반응군과 지연 반응군에서의 유전자 발현을 상대적으로 비교하였다.

3. 통계 분석

모든 결과는 평균±표준오차 (SEM) 또는 백분율 (%)로 나타내었다. 스테로이드 반응에 따라 분류한 ER군과 LR군의 결과는 연속 변수의 경우에는 Mann-Whitney U test, 그리고 항목 변수의 경우에는 Chi-Square test를 이용하여 비교하였다. 결과에 따른 완전 관해율의 차이는 Kaplan-Meier analysis를, 그리고 유전자 발현 정도와 스테로이드 치료 시작 후 완전 관해까지 소요된 기간 사이의 상관관계는 Spearman correlation analysis를 이용하여 분석하였다.

모든 통계 분석은 개인용 컴퓨터 통계 프로그램 SPSS Package (Window release Ver. 13.0) (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였으며, p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로

유의한 것으로 간주하였다.

III. 결 과

1. 대상 환자군의 임상적 특성과 검사실 소견

본 연구의 대상 환자는 총 28명이었으며, 남녀비는 1.6:1, 그리고 평균 연령은 32.5 ± 2.4 세이었다. 대상 환자 중 고혈압의 과거력이 있었던 환자는 2명이었으며, 내원 당시 신부전증이 동반되었던 환자는 8명이었다. 입원 당시의 평균 혈색소 수치는 14.2 ± 0.3 g/dL, 헤마토크릿 $40.7 \pm 0.9\%$, 혈중 요소질소 20.5 ± 2.5 mg/dL, 혈청 크레아티닌 1.2 ± 0.1 mg/dL, 총 단백 4.2 ± 0.2 g/dL, 알부민 1.8 ± 0.1 g/dL, 그리고 총 콜레스테롤은 376.4 ± 19.9 mg/dL이었다. 요검사상 현미경적 혈뇨를 동반한 환자는 4명이었으며, 24시간 뇨단백 배설량은 10.9 ± 1.4 g, 그리고 선택적 단백뇨 지수는 0.18 ± 0.03 이었다. 혈중 IgG, IgA, 그리고 IgM 농도는 각각 552.7 ± 127.6 mg/dL, 260.9 ± 25.1 mg/dL, 그리고 148.5 ± 13.5 mg/dL이었으며, C3와 C4 농도는 각각 120.6 ± 4.5 mg/dL, 43.2 ± 10.2 mg/dL이었다 (Table 1).

Table 1. Demographic characteristics and laboratory findings
of patients (n=28)

Age at onset	32.5±2.4
Sex (M/F)	17/11
Hypertension	2
Renal failure at presentation	8
Microscopic hematuria	4
Hemoglobin (g/dL)	14.2±0.3
Hematocrit (%)	40.7±0.9
BUN (mg/dL)	20.5±2.5
Creatinine (mg/dL)	1.2±0.1
Total protein (g/dL)	4.2±0.2
Albumin (g/dL)	1.8±0.1
Total cholesterol (mg/dL)	376.4±19.9
24-hour urinary protein excretion (g/24hr)	10.9±1.4
Selective proteinuria index (SPI)	0.18±0.03
Serum IgG (mg/dL)	552.7±127.6
Serum IgA (mg/dL)	260.9±25.1
Serum IgM (mg/dL)	148.5±13.5
C3 (mg/dL)	120.6±4.5
C4 (mg/dL)	43.2±10.2

All values are expressed as mean±SEM

2. 스테로이드 반응성에 따른 임상적 특성 및 검사실 소견의 차이

스테로이드 투여 후 4주 내에 완전 관해 상태에 도달한 환자 (ER군)는 20명 (71.4%)이었으며, 8주 내에 완전 관해가 동반된 환자는 25명 (89.3%)이었다 (Figure 1). 완전 관해까지 소요된 기간은 ER군에서 16.5 ± 0.9 일로, LR군의 52.8 ± 4.9 일에 비하여 유의하게 짧았다 ($p < 0.005$). ER군과 LR군 사이에 연령, 성별, 고혈압 유무, 혈중 요소질소, 혈청 크레아티닌, 총 단백, 알부민, 총 콜레스테롤, 24시간 뇨단백 배설량, 선택적 단백뇨 지수, 혈청 IgG, IgA, IgM, C3, C4 등에는 의미있는 차이가 없었다. 또한 조직병리학적 소견상 정도의 간질 섬유화가 동반되었던 환자는 ER군에서 3명, LR군에서 1명으로, 양 군 사이에 유의있는 차이가 없었다. 그러나 면역형광 현미경 검사상 미약한 IgM 침착이 동반되었던 환자는 LR군에서 ER군에 비하여 유의하게 많았다 (75.0% vs. 30.0%, $p < 0.05$) (Table 2). IgM 침착 여부에 따른 완전 관해율을 Kaplan-Meier analysis로 분석한 결과, IgM 침착이 동반되었던 환자에서 스테로이드 치료 기간별 완전 관해율이

의미있게 낮았다 ($p < 0.05$) (Figure 2).

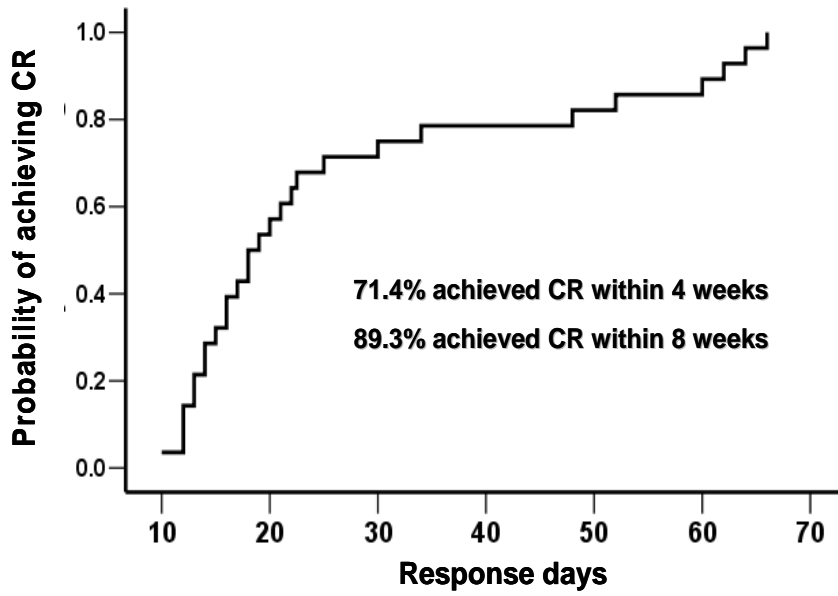


Figure 1. Cumulative CR rates

Table 2. Comparison between early and late responders

	*Early responders (n=20)	†Late responders (n=8)	p-value
Time to CR (days)	16.5±0.9 [§]	52.0±4.9 [§]	<0.005
Age at onset	32.3±2.7	32.9±5.3	[#] NS
Male/female	13/7	4/4	NS
Hypertension	1 (5.0%)	1 (12.5%)	NS
Renal failure at presentation	5 (25.0%)	3 (37.5%)	NS
Microscopic hematuria	1 (5.0%)	3 (37.5%)	NS
Hemoglobin (g/dL)	14.5±0.3	13.4±0.8	NS
Hematocrit (%)	41.2±0.8	39.6±2.3	NS
Albumin (g/dL)	1.6±0.2	2.2±0.4	NS
BUN (g/dL)	21.0±2.9	19.3±5.4	NS
Creatinine (mg/dL)	1.1±0.1	1.3±0.3	NS
Total cholesterol (mg/dL)	387.7±22.3	348.3±42.4	NS
24-hour urinary protein excretion (g/24hr)	11.5±1.7	9.6±2.2	NS
Selective protein index (SPI)	0.16±0.04	0.19±0.04	NS
Serum IgG (mg/dL)	415.1±48.3	965.3±480.2	NS
Serum IgA (mg/dL)	283.0±30.8	194.7±27.7	NS
Serum IgM (mg/dL)	145.5±17.1	157.3±18.2	NS
C3 (mg/dL)	122.6±5.9	115.9±6.2	NS
C4 (mg/dL)	48.0±14.5	32.4±5.6	NS
Interstitial fibrosis	3 (15.0%)	1 (12.5%)	NS
IgM deposition	6 (30.0%)	6 (75.0%)	0.04

*Early responders ; CR achieved within 4 weeks after the initiation of steroid therapy, † Late responders ; CR achieved after 4 weeks after the initiation of steroid therapy, § ; mean±SEM, [#]NS ; Not significant

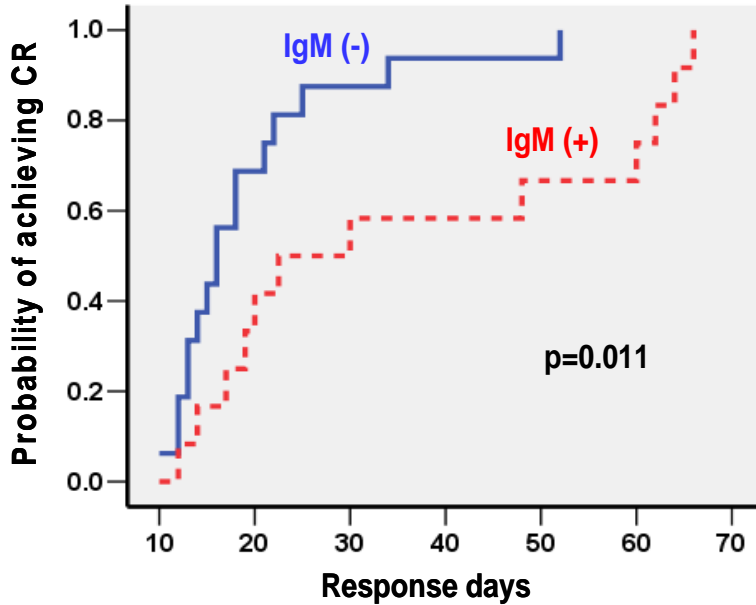


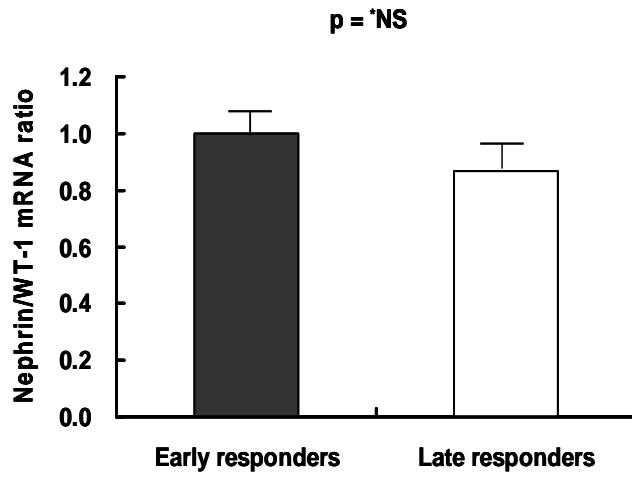
Figure 2. Cumulative CR rates according to IgM deposition on immunofluorescence microscopy

3. 스테로이드 반응성에 따른 신조직 내 유전자 발현의 차이

단백뇨와 관련된 세극막의 대표적 구성 성분인 네프린과 GCR의 mRNA 발현을 real time-PCR을 이용하여 분석한 결과, 족세포 표지자인 WT-1 mRNA로 보정한 네프린 mRNA의 발현은 양 군

사이에 유의있는 차이가 없었으나, GAPDH mRNA로 보정한 GCR mRNA의 발현은 ER군에 비하여 LR군에서 유의하게 감소되어 있었다 ($p < 0.005$) (Figure 3A, B). GCR의 mRNA 발현과 스테로이드 치료 시작 후 완전 관해까지 소요된 기간 사이에는 의미있는 음의 상관관계가 있었다 ($r = -0.39$, $p < 0.05$) (Figure 4).

A.



B.

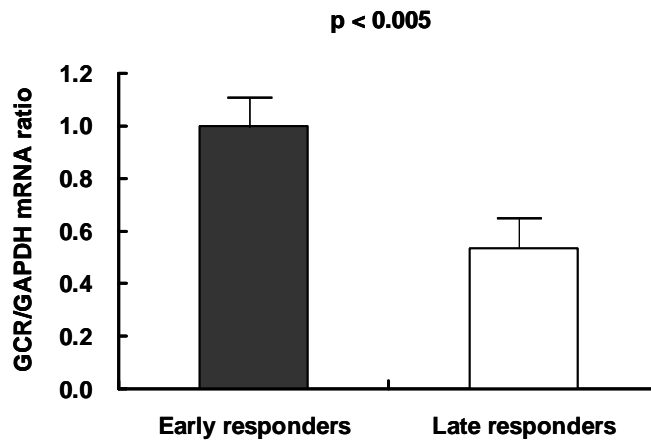


Figure 3. Nephrin/WT-1 mRNA (A) and GCR/GAPDH mRNA (B)

ratio in early and late responders

*NS ; Not significant

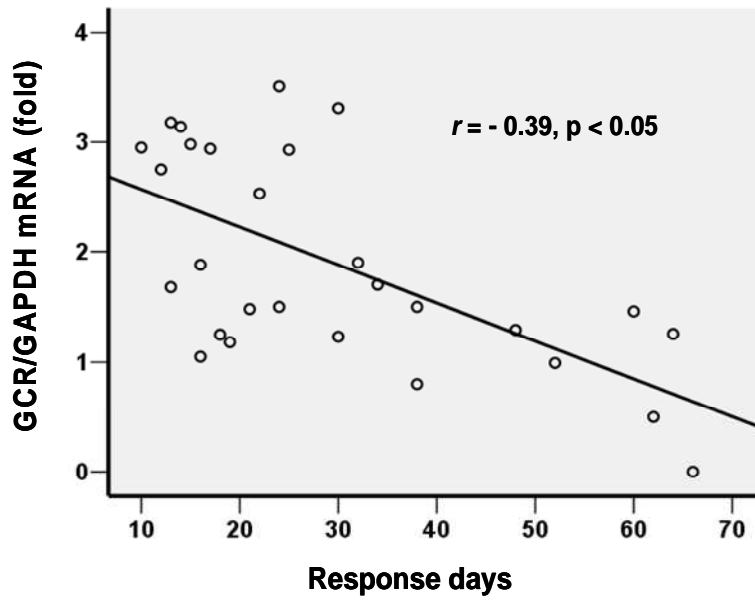


Figure 4. Correlation between GCR mRNA expression and time interval from the start of steroid therapy to complete remission

IV. 고찰

미세변화 질환은 신증후군 환자에서 가장 흔히 관찰되는 병리학적 소견으로, 스테로이드에 대한 반응이 비교적 양호하면서 조기에 반응을 보이는 소아와는 달리 성인에서는 약물에 대한 반응이 지연되는 것으로 알려져 있다⁵⁻⁶. 성인에서 스테로이드에 대한 반응성이 낮은 이유로는 체격 대비 스테로이드 용량이 적기 때문이라는 주장도 있지만³, 아직까지 그 이유가 명확하게 밝혀져 있지는 않은 실정이다. 한편, 성인 환자에서도 스테로이드에 대한 반응이 개개인에 따라 다양하게 나타나는데, 이러한 스테로이드 반응성과 관련된 임상적 특성이나 검사실 소견에 대한 연구는 현재까지 극소수에 불과하다.

성인 미세변화 질환 환자만을 대상으로 스테로이드 반응성을 연구한 Nakayama 등의 보고에 의하면⁵, 상대적 간질 용적(relative interstitial volume)과 상관관계가 있었던 발병 당시의 신기능 및 선택적 단백뇨 지수가 스테로이드에 대한 반응성에 영향을 미치는 인자로 나타났다. 반면에, 발병 당시의 연령이나

24시간 뇨단백 배설량은 스테로이드 반응성과는 무관한 것으로 밝혀졌다. Tse 등도 성인 미세변화 질환 환자 50명을 발병 당시의 연령을 기준으로 50세 이상 환자군과 18~50세 환자군으로 나누어 스테로이드 치료에 대한 완전 관해율을 비교한 결과, 50세 이상 환자군에서 높은 고혈압 환자의 비율과 낮은 신기능에도 불구하고 스테로이드에 대한 반응성은 18~50세 환자군과 유사하다고 하였다⁶. 본 연구에서도 ER군과 LR군 사이에 연령, 성별, 혈청 알부민 및 총 콜레스테롤 농도, 그리고 24시간 뇨단백 배설량 등에는 의미있는 차이가 없어 기존의 연구 보고와 일치하는 결과를 보였다. 그러나 Nakayama 등의 연구 결과와는 상이하게 신기능이나 선택적 단백뇨 지수가 양 군에서 유사하였다. 이러한 상이한 결과가 Nakayama 등의 연구에서는 ER군과 LR군 구분을 스테로이드 사용 후 8주를 기준으로 한 반면에, 본 연구에서는 4주로 하였기 때문일 수도 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 ER군과 LR군을 스테로이드 시작 후 8주를 기준으로 분류할 경우 LR군에 속하는 환자가 3명으로 너무 적어서 양 군 사이의 비교 분석이 불가능하였을 것으로 사료된다.

미세변화 질환은 병리학적으로 광학 및 면역형광 현미경 하에서 정상 소견이 특징적이지만 종종 면역형광 현미경 하에서 IgM 침착이 관찰되는 경우가 있다. 미세변화 질환 환자에서 IgM 침착이 동반된 경우 스테로이드 치료에 대한 반응이 좋지 않다는 보고가 있는가 하면¹⁰, IgM 침착과 스테로이드 반응성 사이에 유의한 상관관계가 없을 뿐만 아니라 메산지움 세포의 증식과도 관련이 없다는 보고도 있다¹¹⁻¹³. Zeis 등은 85명의 미세변화 질환 환아를 대상으로 스테로이드 치료에 대한 반응을 알아본 결과, 면역형광 현미경 검사상 IgM 침착이 없었던 65명 중 62명에서 스테로이드에 대한 반응성을 보인 반면, IgM 침착이 동반되었던 20명 중에서는 14명만이 스테로이드에 반응이 있었던 것으로 미루어 보아 IgM 침착이 스테로이드 치료에 대한 저항성과 관련이 있다고 하였다¹⁰. 또한 그들은 IgM 침착이 동반되었던 미세변화 질환 환자를 장기적으로 추적 관찰하면서 일부에서 신장 조직검사를 재시행한 결과, 6명의 환자에서 국소성 분절성 사구체경화증으로 진단되었다고 하였다¹⁰. 본 연구에서도 병리학적으로 IgM 침착이 동반되었던 환자에서 스테로이드에 대한 반응이 불량하였는데,

국소성 분절성 사구체경화증이 초기에는 신피질과 신수질 경계 부위의 사구체만을 침범하며 미세변화 질환에 비하여 스테로이드 저항성을 가지고 있다는 점을 고려할 때, IgM 침착을 동반한 환자의 일부가 국소성 분절성 사구체경화증 환자이었을 가능성을 완전히 배제할 수는 없을 것으로 생각된다.

최근의 연구에 의하면 족세포 (podocyte)의 손상이 국소성 분절성 사구체경화증과 당뇨병성 신병증을 포함한 각종 사구체 질환의 발생과 관련이 있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁶. 또한 사구체 기원의 단백질이 사구체 세극막 (slit diaphragm)을 구성하는 단백질 이상과 밀접하게 연관되어 있다는 보고들도 많은 실정이다¹⁷⁻²¹. 성인 미세변화 질환에서도 세극막을 구성하는 대표적인 단백질인 네프린의 발현이 감소될 뿐만 아니라 발현 부위도 변하는 것으로 보고되어 있다²²⁻²⁵. 이러한 기존의 연구 결과를 기초로 본 연구자는 사구체 손상이 심할수록 네프린의 발현 감소가 심하며, 이러한 경우에 스테로이드에 대한 반응이 지연될 수 있을 것이라는 가정 하에 스테로이드 반응성에 따른 네프린 mRNA의 발현 정도를 비교하였다. 연구 결과에서도 알 수 있듯이

네프린 mRNA의 발현과 스테로이드에 대한 반응 사이에는 유의한 상관관계가 없었는데, 이는 네프린의 발현이 족세포 손상을 반영하는 표지자가 아닐 가능성이 있을 뿐만 아니라 미세변화 질환의 발생과 족세포 손상 사이에 큰 연관성이 없기 때문일 수도 있을 것으로 생각된다. 향후 족세포 손상이 병인으로 이야기되어지고 있는 국소성 분절성 사구체경화증 환자를 대상으로 네프린의 발현과 스테로이드 반응성 사이의 상관관계에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다.

스테로이드는 대부분의 자가면역 질환이나 미세변화 질환을 포함한 각종 신장 질환에서 일차 약제로 사용되어지고 있는데, 자가면역 질환에서는 전신적인 면역 억제 작용을 목적으로 스테로이드를 사용하는 반면에, 각종 신장 질환, 특히 미세변화 질환에서 스테로이드를 사용하는 이론적 근거는 미약한 실정이다. 이러한 스테로이드는 세포 내 GCR과 결합한 후 핵 내로 이동하여 효과를 나타내게 되기 때문에 GCR의 발현과 스테로이드 반응성 사이의 연관성을 관찰한 연구가 종종 있어 왔다^{8-9, 26-28}. 스테로이드 저항성을 보인 류마티스 관절염 환자나 천식 환자에서 단핵구 내

GCR의 발현이 감소되어 있었다는 보고가 있는가 하면²⁹⁻³⁰ 신증후군 환자에서 단핵구 내 GCR의 발현과 스테로이드 반응성 사이에 의미있는 상관관계가 있었다는 보고도 있다⁸. 반면에, Haack 등은 다양한 사구체 질환에 의한 신증후군 환자에서 스테로이드 치료에 대한 반응에 따른 단핵구 내 GCR의 발현에 차이가 없었던 것으로 보아 단핵구보다는 대상 조직 (target tissue) 내 GCR이 스테로이드 반응성과 관련이 있을 가능성이 있다고 하였다⁹. 그럼에도 불구하고, 신장 질환 환자에서 신장 조직 내 GCR의 발현에 따른 스테로이드 반응성을 규명한 연구는 아직까지 전무한 상태이다. 사구체 내에는 메산지움 세포, 혈관 내피세포, 그리고 족세포 모두에서 GCR이 발현되는 것으로 보고되었으며, 사구체에 비하여 근위 세뇨관과 원위 세뇨관에서 발현이 더 뚜렷한 것으로 알려져 있다²⁶. 본 연구 결과상 스테로이드 치료에 대한 반응이 조기에 나타났던 환자에서 신장 조직 내 GCR의 발현이 의의있게 높았을 뿐만 아니라 GCR의 발현 정도와 스테로이드 치료 시작 후 완전 관해까지 소요된 기간 사이에 의미있는 상관관계가 있었던 것으로 미루어 보아 신장 조직 내 GCR의 발현이 스테로이드

반응성에 영향을 미치는 인자일 수 있을 것으로 사료된다. 다만, 본 연구에서 사용한 조직이 신피질 부위이었기 때문에 사구체 내의 GCR만을 대변하지 못하였다는 사실이 본 연구의 제한점일 수는 있겠으나, 국내외적으로 최초로 신장 조직 내 GCR의 발현과 스테로이드 반응성 사이의 연관성을 규명하였다는 점에서 큰 의미가 있다고 생각한다.

V. 결 론

성인 미세변화 질환 환자에서 스테로이드 치료 반응에 따른 병리학적 소견과 신조직 내 유전자의 발현 차이를 알아보기 위하여 2000년 1월 1일부터 2005년 12월 31일까지 연세대학교 의과대학 부속 세브란스 병원에 신증후군으로 입원하여 신장 조직검사를 시행받았던 환자 중 병리학적으로 미세변화 질환으로 진단된 16세 이상의 성인 환자 28명을 대상으로 임상적 특성, 검사실 결과, 병리학적 소견, 그리고 신조직 내 네프린과 GCR의 mRNA 발현을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 완전 관해까지 소요된 기간은 ER군에서 16.5 ± 0.9 일로, LR군의 52.8 ± 4.9 일에 비하여 유의하게 짧았다 ($p < 0.005$). ER군과 LR군 사이에 연령, 성별, 고혈압 유무, 혈중 요소질소, 혈청 크레아티닌, 총 단백, 알부민, 총 콜레스테롤, 24시간 뇨단백 배설량, 선택적 단백뇨 지수, 혈청 IgG, IgA, IgM, C3, C4 등에는 의미있는 차이가 없었다.
2. 면역형광 현미경 검사상 신장 조직 내에 미약한 IgM 침착이

동반되었던 환자가 LR군에서 ER군에 비하여 유의있게 많았으며 (75.0% vs. 30.0%, $p < 0.05$), 스테로이드 치료 기간별 완전 관해율도 IgM 침착이 동반되었던 환자에서 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$).

3. 신조직 내 네프린과 GCR의 mRNA 발현을 real time-PCR을 이용하여 분석한 결과, 네프린 mRNA의 발현은 양 군 사이에 의미있는 차이가 없었으나, GCR mRNA의 발현은 ER군에 비하여 LR군에서 유의있게 감소되어 있었다 ($p < 0.005$). 또한, GCR의 mRNA 발현과 스테로이드 치료 시작 후 완전 관해까지 소요된 기간 사이에는 유의한 음의 상관관계가 있었다 ($r = -0.39$, $p < 0.05$). 이상의 결과로, 성인 미세변화 질환 환자에서 사구체 내 IgM 침착 유무와 신조직 내 GCR mRNA의 발현 정도가 스테로이드 반응성 예측에 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1. International Study of Kidney Disease in Children: Predication of histopathology from clinical and laboratory characteristics at the time of diagnosis. *Kidney Int* 1978;13:159-165.
2. International Study of Kidney Disease in Children: The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. *J Pediatr* 1981;98:561-564.
3. Nolasco F, Cameron JS, Heywood EF, Hicks J, Ogg C, Williams DG. Adult-onset minimal change nephrotic syndrome: a long-term follow-up. *Kidney Int* 1986;29:1215-1223.
4. Fujimoto S, Yamamoto Y, Hisanaga S, Morita S, Eto T, Tanaka K. Minimal change nephrotic syndrome in adults: response to corticosteroid therapy and frequency of relapse. *Am J Kidney Dis* 1991;17:687-692.
5. Nakayama M, Katafuchi R, Yanase T, Ikeda K, Tanaka H,

- Fujimi S. Steroid Responsiveness and Frequency of Relapse in Adult-Onset Minimal Change Nephrotic Syndrome. *Am J Kidney Dis* 2002;39:503–512.
6. Tse KC, Lam MF, Yip PS, Li FK, Choy BY, Lai KN, et al. Idiopathic minimal change nephrotic syndrome in older adults: steroid responsiveness and pattern of relapse. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1316–1320.
7. Carlotti AP, Franco PB, Elias LL, Facincani I, Costa EL, Foss N, et al. Glucocorticoid receptors, in vitro steroid sensitivity, and cytokine secretion in idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney int* 2004;65:403–408.
8. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Tomaszewska B, Wiercinski R, Stasiak-Barmuta A. Expression of glucocorticoid receptors in mononuclear cells in nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003;18:778–782.
9. Haack D, Schärer K, Asam-tauscher A, Vessei P. Glucocorticoid receptors in idiopathic nephrotic syndrome.

- Pediatr Nephrol 1999;13:653-656.
10. Zeis PM, Kavazarakis E, Nakopoulou L, Messaritaki A, Zeis MP, Nicolaidou P. Glomerulopathy with mesangial IgM deposits : long-term follow up of 64 children. *Pediatr Int* 2001;43:287-292.
 11. Kim PK, Kim NA, Kim KS, Choi IJ. Steroid effects on minimal lesion nephrotic syndrome with and without immune deposits. *Int J Pediatr Nephrol* 1982;3:257-261.
 12. Pardo V, Riesgo I, Zilleruelo G, Strauss J. The clinical significance of mesangial IgM deposits and mesangial hypercellularity in minimal change nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis* 1984;3:264-269.
 13. Ji-Yon Y, Melvin T, Sibley R, Michael AF. No evidence for a specific role of IgM in mesangial proliferation of idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1984;25:100-106.
 14. Horinouchi I, Nakazato H, Kawano T, Iyama KI, Furuse A, Aizono K, et al. S. In situ evaluation of podocin in normal

and glomerular disease. *Kidney Int* 2003;64:2092–2099.

15. Furness PN, Hall LL, Shaw JJ, Fringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1234–1237.
16. Schmid H, Henger A, Coehn CD, Frach K, Grone HJ, Scholndorff D, et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2958–2966.
17. Tobias BH, Thomas B. The slit diaphragm : a signaling platform to regulate podocyte function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2005;14:211–216.
18. Kestila M, Ienkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein–nephrin–is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575–582.
19. Boute N, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan

- K, et al. NPHS2 encoding the glomerular proteins podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000;24:349-354.
20. Patrakka J, Lahdenkari AT, Ollikoskimies, Holmberg C, Wartiovaara J, Jalanko H. The number of podocyte slit diaphragms is decreased in minimal change nephrotic syndrome. *Pediatr Res* 2002;52:349-355.
21. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2063-2071.
22. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, et al. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001;158:1723-1731.
23. Guan N, Ding J, Zhang J, Yang J. Expression of nephrin,

- podocin, α -actinin, and WT1 in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2003;18:1122-1127.
24. Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Routsalainen V, al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplan* 2003;18:70-76.
25. Kim BK, Hong HK, Kim JH, Lee SH. Differential expression of nephrin in acquired human proteinuric disease. *Am J Kid Dis* 2002;40:964-973.
26. Yan K, Kudo A, Hirano H, Watnabe T, Tasaka T, Nakajima K, et al. Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. *Kidney Int* 1999;56:65-73.
27. Lamberts SWJ, Koper JW, Biemond P, Holder FH den, Jong FH de. Cortisol receptor resistance: the variability of its clinical presentation and response to treatment. *J Clin Endocrinol metab* 1992;74:313-321.

28. Schlechte JA, Ginsberg BH, Sherman BM. Regulation of the glucocorticoid receptor in human lymphocytes. *J Steroid Biochem* 1982;16:69-74.
29. Schlaghecke R, Kornely E, Wollenhaupt J, Specker CH. Glucocorticoid receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:740-744.
30. Griese M, Krusenbach G, Lusebring K, Koster W, Roth B, Reinhardt D. Glucocorticoid receptors in mononuclear blood cells and their correlation to endogenous and exogenous corticoids in healthy and asthmatic children. *Eur J Pediatr* 1988;147:490-495.

Abstract

Differences in pathologic findings and gene expressions of renal tissue according to steroid responsiveness in adult onset minimal change nephrotic syndrome

Sun Young Park

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Shin-Wook Kang)

Minimal change disease (MCD) is the most common pathologic diagnosis in children with nephrotic syndrome. Compared to children, adult patients with MCD tend to have a slower response to steroids, and it has been reported that the age of onset, renal

function, and selectivity of proteinuria are associated with the steroid responsiveness in MCD patients. However, little is known about the relationships between pathologic findings or the expression of certain gene and the response to steroid treatment in adult patients with MCD. This study was undertaken to investigate the differences in pathologic findings and the mRNA expression of nephrin and glucocorticoid receptor (GCR) in renal tissue according to steroid responsiveness in adult onset minimal change nephrotic syndrome.

Twenty-eight adult patients who presented with idiopathic nephrotic syndrome at Severance Hospital of Yonsei University College of Medicine and fulfilled the criteria for MCD clinically and pathologically were chosen for this study. Complete remission (CR) was defined as negative or trace on urine dipstick tests and urinary protein/creatinine ratio less than 0.3 without edema. Based on the response to steroid treatment, the patients were divided into two groups: early responders (ER) in whom CR

was achieved within 4 weeks of steroid treatment; late responders (LR) in whom CR was achieved after 4 weeks of steroid treatment. A comparative analysis of the clinical, biochemical, and pathologic findings were performed between the ER and LR group. In addition, the mRNA expressions of nephrin, Wilms' tumor-1 (WT-1), GCR, and GAPDH, assessed by real time-polymerase chain reaction, were also compared between these two groups.

Of the 28 patients, ER group consisted of 20 patients and LR of 8 patients. The time interval from the start of steroid therapy to CR was significantly shorter in the ER group compared to the LR group (16.5 ± 0.9 vs. 52.0 ± 4.9 days, $p < 0.01$). The demographic characteristics and biochemical findings of the ER group were comparable to those of the LR group. However, the proportion of patients with minimal IgM deposition on immunofluorescence was significantly higher in the LR group compared to the ER group (75.0% vs. 30.0%, $p < 0.01$). The mRNA expression of GCR was

significantly lower in LR group than that in the ER group ($p < 0.005$), whereas nephrin mRNA expression was not different between the two groups. In addition, there was a significant negative correlation between mRNA expression of GCR and the time interval from the start of steroid treatment to CR ($r = -0.39$, $p < 0.05$).

In conclusion, the presence of glomerular IgM deposition and the amount of GCR in renal tissue may be useful predictors of steroid responsiveness in adult MCD patients.

Key Words : minimal change disease, IgM deposition, steroid responsiveness, glucocorticoid receptor, real-time PCR