

당뇨 백서 사구체 및 고포도당으로 자극한 족세포에서 사이클로스포린이 P-cadherin의 발현에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 내과학교실¹, 국민보험공단 일산병원 내과²
포천중문의과대학 내과학교실³, 이화여자대학교 의과대학 내과학교실⁴

강신욱¹ · 유태현² · 김형종³ · 최훈영¹ · 김주성¹ · 정동섭¹ · 김진주¹
곽승재¹ · 한승혁¹ · 김동기¹ · 이태희¹ · 이정은¹ · 한대석¹ · 류동열⁴

The Effect of Cyclosporine on P-cadherin Expression in Experimental Diabetic Nephropathy and Glucose-Stimulated Podocytes

Shin-Wook Kang, M.D.¹, Tae-Hyun Yoo, M.D.², Hyung-Jong Kim, M.D.³,
Hoon-Young Choi, M.D.¹, Joo-Seong Kim, M.D.¹, Dong-Sub Jung, M.D.¹, Jin-Ju Kim, M.D.¹
Seung-Jae Kwak, M.D.¹, Seung Hyeok Han, M.D.¹, Dong Ki Kim, M.D.¹, Tae Hee Lee, M.D.¹
Jung Eun Lee, M.D.¹, Dae-Suk Han, M.D.¹ and Dong-Ryeol Ryu M.D.⁴

Department of Internal Medicine¹, College of Medicine, Yonsei University
Department of Internal Medicine², NHIC Ilsan Hospital
Department of Internal Medicine³, Pocheon Jungmun Medical College
Department of Internal Medicine⁴, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Purpose: We investigated whether Cyclosporin A (CsA) had the anti-proteinuric effect in diabetic rats and whether it was associated with the alteration of P-cadherin expression.

Methods: Sprague-Dawley rats were injected with diluent (C, N=16) or streptozotocin intraperitoneally (DM, N=16). Eight rats in each group were treated with 10% ethanol or with 1.5 mg/kg/day of CsA (C+CsA and DM+CsA) for 6 weeks. Immortalized mouse podocytes were cultured in media with 5.6 mM glucose (LG), LG+CsA (10⁻⁸ M), LG+TGF-β₁, 30 mM glucose (HG), or HG+CsA. Real time-PCR and Western blot were performed for P-cadherin and TGF-β₁ mRNA and protein expression, respectively, with sieved glomeruli and cell lysates.

Results: Urinary albumin excretion was significantly higher in DM compared with C rats, and CsA treatment inhibited the increase in albuminuria in DM rats. Glomerular P-cadherin mRNA and protein expression in DM were decreased compared with C rats, and these decreases were significantly inhibited by CsA. Glomerular TGF-β₁ mRNA and protein expression were higher in DM than C rats, and CsA treatment inhibited the increase in TGF-β₁ expression in DM. P-cadherin mRNA and protein expression in HG and LG+TGF-β₁ podocytes were lower than LG cells, and these HG-induced decrements were restored by CsA.

Conclusion: CsA treatment reduces urinary albumin excretion in DM rats. P-cadherin expression is decreased under diabetic conditions, which is ameliorated by CsA. In addition, inhibition of the increase in glomerular TGF-β₁ expression under diabetic conditions by CsA seems to restore the P-cadherin expression, resulting in the decrease in albuminuria.

Key Words : Diabetic nephropathy, Proteinuria, Podocyte, Cyclosporin A, P-cadherin

이 논문은 2003년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KPF-2003-042-E20045).

접수 : 2006년 9월 29일, 승인 : 2007년 1월 3일

책임저자 : 류동열 서울시 종로구 종로6가 70 이화여자대학교 의과대학 내과학교실

Tel : 02)760-5572, Fax : 02)762-7756, E-mail : drryu@ewha.ac.kr

서 론

당뇨병성 신병증은 임상적으로는 단백뇨가 특징적인 소견이다¹⁾. 당뇨병성 신병증을 비롯한 각종 사구체 질환에서 단백뇨는 사구체 여과 장벽의 크기 선택성 (size selectivity) 또는 전하 선택성 (charge selectivity)의 소실로 인하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 사구체 여과 장벽은 혈관 내피세포층 (endothelial layer), 사구체 기저막 (glomerular basement membrane), 그리고 세극막 (slit diaphragm)이 존재하는 족세포층 (podocyte layer)으로 이루어져 있는데²⁻⁶⁾, 이 중 사구체 기저막은 비교적 크기가 큰 분자에 대한 여과 장벽, 그리고 세극막은 알부민보다 크기가 작은 분자에 대한 여과 장벽 역할을 하는 것으로 보고되고 있다⁷⁾. 세극막은 서로 다른 족세포에서 기원한 족돌기들 사이에 4×14 nm의 세공을 가지는 연속적인 섬유상의 구조로, 여기에는 nephrin, P-cadherin, NEPH1, 그리고 FAT 등이 존재하는 것으로 알려져 있다⁸⁻¹³⁾.

P-cadherin은 세극막의 기본 골격을 형성하는 단백질로, 세극막을 구성하는 nephrin 등의 다른 단백질과 더불어 사구체 여과 장벽의 선택투과성 (permeability)을 유지하는데 기여하는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 또한, 최근에는 당뇨 백서 사구체 및 고포도당으로 자극한 족세포에서 P-cadherin mRNA 및 단백질 발현의 감소와 단백뇨 발생 사이에 밀접한 관련이 있다는 보고도 있었다¹⁴⁾.

당뇨병성 신병증은 병리적으로 사구체 및 세뇨관의 비후와 세포외 기질의 축적이 특징적인 소견이다^{15, 16)}. 최근에는 calcium-dependent serine/threonine phosphatase인 calcineurin의 활성화가 IGF-1 및 TGF-β₁에 의한 신비후 및 세포외 기질 축적에 관여하며, calcineurin 억제제인 사이클로스포린 (cyclosporin A, CsA) 투여에 의하여 이러한 병리학적 변화가 호전되었다는 연구 결과도 보고된 바 있다^{17, 18)}. 신장에서 calcineurin은 근위세뇨관, 집합관 및 수질 부위에서 주로 발현되나 사구체에서도 발현이 관찰되며¹⁹⁻²²⁾, 당뇨병성 신병증의 경우 그 발현이 증가된다²³⁾. 또한, 백서 메산지움 세포에서는 TGF-β에 의하여 calcineurin의 활성화도가 증가하며, TGF-β에 의한 세포외 기질 축적에 calcineurin 활성화가 필요한 것으로 알려져 있다²⁴⁾.

CsA는 장기 이식 후 흔히 사용하는 강력한 면역억제제로, 미세변화형 신증후군, 국소성 분절성 사구체경화증, 막성 신병증 및 루푸스성 신염 등 단백뇨를 동반한 여러 사구체 질환

의 치료에도 사용되고 있다²⁵⁻³⁰⁾. CsA의 단백뇨 감소 효과는 혈액동학적 변화, 면역억제 효과 등과 관련이 있는 것으로 알려져 왔으며, 그 외 직접적으로 사구체 여과 장벽의 크기 및 전하 선택성을 개선시키고 사구체내 cAMP의 증가를 통하여 효과를 나타낸다는 보고도 있지만³¹⁻³³⁾, 현재까지 CsA가 사구체 여과 장벽 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 규명한 연구는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 실험적 당뇨 백서에서 CsA 투여에 의한 단백뇨 감소 효과를 알아보고, 단백질 발현과 관련이 있는 것으로 생각되는 세극막 관련 단백질 중 하나인 P-cadherin의 발현 변화 사이의 연관성에 대하여 조사하고자 하였다. 또한, 고포도당으로 자극한 배양 족세포에서 P-cadherin의 발현 변화와 백서 메산지움 세포에서 calcineurin 발현의 활성 인자로 알려진 TGF-β₁ 사이의 연관관계에 대해서도 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 동물 실험

1) 대상

무게 230-270 g의 웅성 백서 (Sprague-Dawley rats) 32마리를 사용하였으며, 이 중 16마리는 위약을 복용 주사하여 대조군 (C)으로, 그리고 나머지 16마리는 streptozotocin (STZ) 65 mg/kg을 복용 주사하여 당뇨군 (DM)으로 사용하였다. STZ 주사 72시간 후 혈당을 측정하여 당뇨 발생 여부를 확인하였다. 대조군 및 당뇨군에서 각각 8마리는 무작위로 CsA (Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) 투여군 (1.5 mg/kg/day 피하 투여)과 위약 투여군 (10% ethanol 피하투여)으로 배정되었다. CsA 투여 용량은 2주 이상 10 mg/kg/day 이상의 용량을 투여한 경우 신독성이 발생하였으며^{34, 35)}, 2주 동안 5 mg/kg/day의 용량을 투여하였을 때는 신독성이 관찰되지 않았다는 연구 결과¹⁸⁾에 따라, 6주간 사용하기로 한 본 실험에서는 기존의 연구와 투여량이 유사하도록 1.5 mg/kg/day로 정하였다. 백서들은 자동 온도 조절 시설에서 사육되었으며, 물과 표준 실험식이를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 당뇨 유발 6주 후 체중, 혈당, 혈청 크레아티닌, 그리고 전혈 (whole blood)내 CsA 최저 농도 (trough level)를 측정하였으며, 24시간 소변을 이용하여 알부민 및 크레아티닌 배설량을 측정하였다. 24시간 뇨알부민 배설량은 ELISA (Nephtr II, Exocell, Inc., Philadelphia,

PA, USA)를 이용하여 측정하였다. 모든 동물 실험은 승인된 기안서에 따라 시행되었다.

2) 사구체 분리

백서를 pentothal (50 mg/kg)로 마취한 후 단두하여 희생시킨 다음 신장을 적출하였다. 적출된 신장의 무게를 측정 후 면도날로 장축을 따라 반으로 절개한 다음 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 이용하였다.

2. 족세포 (conditionally immortalized mouse podocyte) 실험

실험에 이용한 족세포는 Dr. Mundel (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA)로부터 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 죽돌기를 갖는 세포로 분화된다 (non-permissive condition)³⁶. 2주 동안 non-permissive condition 하에서 배양한 족세포에서 synaptopodin mRNA의 발현을 PCR로 분석하여 분화를 확인하였다.

족세포의 분화를 확인한 후 세포가 거의 찬 상태에서 정상 포도당군 (5.6 mM, LG), 고포도당군 (30 mM, HG), LG + 24.4 mM mannitol (LG+M), LG + 10^{-8} M CsA (LG+CsA), LG + 10 ng/mL TGF- β_1 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) (LG+TGF- β_1), HG + 10^{-8} M CsA (HG+CsA)의 6군으로 나누어 24시간 동안 자극한 후 세포로부터 RNA와 단백을 추출하였다.

3. 총 RNA 추출 및 역전사

총 RNA는 RNA STAT-60 reagent (Tel-Test, Inc., Friendswood, TX, USA)를 이용하여 추출하였다³⁷. RNA STAT-60 reagent 100 μL 로 사구체 또는 배양한 족세포를 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 3분

간 실온에 보관한 다음, 4°C에서 12,000 \times g로 15분간 원심 분리한 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 건조 시킨 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)을 이용하여 제작하였다. 세포 또는 사구체로부터 분리한 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 AMV reverse transcriptase를 첨가하였다. 이 혼합물은 30°C에서 10분, 42°C에서 1시간, 그리고 99°C에서 5분간의 incubation 과정을 거친 후, -70°C에 보관하였다.

4. Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR)

실험에 사용된 primer 및 PCR 조건은 Table 1에 기술한 바와 같다. RT-PCR은 ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며, 10 μL SYBR Green[®] PCR Master Mix (Applied Biosystems), 25 ng cDNA, 그리고 5 pmol sense와 antisense primer를 포함한 20 μL 반응 혼합물로 시행하였다. PCR 반응 후에는 온도를 60°C에서 95°C로 증가시켜 얻어진 해리 곡선 (dissociation curve)을 확인하였다. 각각의 PCR 수행 시에는 cDNA가 포함되지 않은 음성 대조군도 함께 시행하였다.

$2^{-\Delta\Delta\text{CTC}}$ 을 이용한 상대 정량법으로 각각의 PCR 산물을 비교하였으며, 결과는 P-cadherin, calcineurin A- α , calcineurin A- β , 그리고 TGF- β_1 mRNA 발현을 GAPDH mRNA 발현으로 보정하여 표시하였다. C군 또는 LG군에서의 유전자 발현을 1로 정하여 각 군에서의 발현을 대조군 또는 LG군에 대한 상대적 비로 나타내었다. 예비 실험에서 각 PCR primer의 PCR 산물을 2% agarose gel에서 전기영동하여 단일 밴드임을 확인하였다.

Table 1. Sequences of Primers and PCR Conditions

	Sequence (5'→3')	Annealing Temperature (°C)
Rat TGF β_1		
Sense	AAACGGAAGCGCATCGAA	62
Antisense	GGGACTGGCGAGCCTTAGTT	62
Rat Pcadherin		
Sense	AGTGGGCCACGAGGTACAGA	53
Antisense	ACGCCATGCCGGTGAGT	53
Mouse P-cadherin		
Sense	TGTATCTGAGAATGGTGCCTCTGTAG	56
Antisense	TTGAGTGAACCTGGGCTTGTTG	56
Rat GAPDH		
Sense	TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG	60
Antisense	AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	60
Mouse GAPDH		
Sense	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	60
Antisense	CCTGCTTACCACCTTCTTGA	60
Rat and mouse calcineurin A- α		
Sense	CGAGCCCAAGGCGATTG	60
Antisense	GGAAATGGAACGGCTTTCAC	60
Rat and mouse calcineurin A- β		
Sense	TTCCCTGAACACCGCACAT	60
Antisense	CTGGTCACTGGGCACTATGGT	60

5. 단백질 추출 및 Western blot 분석

각 군의 사구체 또는 배양 족세포를 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×g 로 10분간 원심분리하였다. 상층액내 단백질은 Bio-Rad kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 농도를 결정한 후 50 µg씩 등분하여 -70°C에 보관하였다. 50 µg의 단백질은 Laemmli sample buffer로 처치, 10 0°C로 5분간 가열한 후, 8% 또는 12% acrylamide denaturing SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel내 단백질은 semidry blotting 기계를 이용하여 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 처치한 후, 1:500으로 희석된 monoclonal anti-P-cadherin antibody (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA, USA), polyclonal anti-TGF- β_1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz,

CA, USA), polyclonal anti-calcineurin A- α 와 A- β antibody (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA), 또는 polyclonal anti- β -actin antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)로 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Membrane을 1×PBS와 0.1% Tween-20로 15분간 1회, 5분간 2회 처치한 후, 1:1,000으로 희석된 horseradish peroxidase-linked anti-mouse IgG가 함유된 buffer A에 1시간 동안 반응시킨 다음 ECL chemiluminescent 시약 (Amersham Life Science, Inc.)을 이용하여 가시화하였다. Signal은 TINA image software (Raytest, Straubenhhardt, Germany)를 이용하여 O.D.로 정량화하였다.

6. 면역형광 염색법

신장 조직을 10% neutral-buffered formalin에 고정된 후 표준적 방법으로 처리한 다음 5 µm 절편의 슬라이드를 제작하였다. 면역형광 염색을 위하여 제작된 슬라이드의 파라핀을 제거한 후 에탄올로 적시고 세척하였다. Black and Decker vegetable steamer를 이용하여 10 mM sodium citrate buffer에서 20분간 항원 복구 (antigen retrieval)를 시행하였다.

족세포내 calcineurin A- α 단백질의 발현을 확인하기 위

해 synaptopodin과 calcineurin A- α 이중염색을 시행하였는데, polyclonal anti-synaptopodin antibody (Research Diagnostics, Inc., Concord, MA, USA)를 1:200으로 희석하여 실온에서 3시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 후, Cy3 (red)-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)로 60분간 반응시켰다. 그 후에 다시 polyclonal anti-calcineurin A- α antibody (Chemicon International, Inc.)를 1:100으로 희석하여 실온에서 3시간 동안 반응시키고 PBS로 세척한 후, Cy2 (green)-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 사용하여 60분간 반응시켰다.

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. 동물 실험

1) 동물 자료

실험 기간 중 네 군 모두에서 체중이 증가하였으나, C군 (402±6 g)과 C+CsA군 (397±5 g)에서 DM군 (270±4 g)과 DM+CsA군 (299±8 g)에 비하여 유의하게 증가하였다 (p<0.05). 그러나, 백서를 희생시킬 때 측정된 체중 당 신장의 무게는 C군 (0.76±0.05%)과 C+CsA군 (0.83±0.07

%)에 비하여 DM군 (1.09±0.08%)과 DM+CsA군 (1.01±0.08%)에서 의미있게 높았다 (p<0.05).

당뇨 유발 6주 후 혈당은 C군, C+CsA군, DM군, 그리고 DM+CsA군에서 각각 95.8±0.9 mg/dL, 99.31.8 mg/dL, 466.2±13.9 mg/dL, 그리고 495.1±13.8 mg/dL으로 C군과 C+CsA군에 비하여 DM군과 DM+CsA군에서 의미있게 높았다 (p<0.01). 그리고, 전혈에서 측정된 C+CsA군과 DM+CsA군의 CsA 최저 농도 (trough level)는 각각 16.8±0.9 ng/mL, 15.4±1.4 ng/mL이었다. 크레아티닌 청소율은 C군, C+CsA군, DM군, DM+CsA군에서 각각 0.55±0.07 ml/min/100g, 0.64±0.10 ml/min/100g, 0.84±0.07 ml/min/100g, 0.81±0.12 ml/min/100g으로 측정되어 C군과 C+CsA군에 비하여 DM군과 DM+CsA군에서 의미있게 높았으나 (p<0.05), DM군과 DM+CsA군 사이에서는 유의한 차이가 없었다. 24시간 뇨알부민 배설량은 C군 (0.32±0.02 mg/day)과 C+CsA군 (0.34±0.04 mg/day)에 비하여 DM군 (1.28±0.11 mg/day, p<0.05)에서 유의한 증가를 보였으며, 이러한 증가는 CsA 투여로 의미있게 억제되었다 (0.62±0.18 mg/day, p<0.05, Table 2).

2) 사구체내 calcineurin A- α 및 A- β mRNA와 단백질 발현

DM군에서 사구체내 calcineurin A- α 의 mRNA 발현은 대조군에 비하여 2.1배 증가되었으나 (p<0.05), calcineurin A- β 와 GAPDH의 mRNA 발현은 양 군 사이에 의미있는 차이가 없었다.

Western blot을 이용하여 분석한 사구체내 calcineurin A- α 의 단백질 발현 역시 DM군에서 대조군에 비하여 123% 증가되었던 반면 (p<0.05), calcineurin A- β 와 β -actin의 단백질 발현은 양 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

3) 사구체내 P-cadherin 및 TGF- β_1 mRNA와 단백질 발현

사구체내 P-cadherin의 mRNA 발현은 당뇨 유발 6주 후 대조군에 비하여 DM군에서 40.2% 감소하였으나 (p<

Table 2. Animal Data of the Four Groups

	Control (N=8)	C+CsA (N=8)	DM (N=8)	DM+CsA (N=8)
Body weight after 6 weeks (g)	402±6	397±5	270±4*	299±8*
Kidney Wt /body Wt (%)	0.76±0.05	0.83±0.07	1.09±0.08*	1.01±0.08*
Blood glucose (mg/dl)	95.8±0.9	99.3±1.8	466.2±13.9†	495.1±13.8†
Creatinine clearance (ml/min/100g)	0.55±0.07	0.64±0.10	0.84±0.07*	0.81±0.12*
Urinary albumin excretion (mg/day)	0.32±0.02	0.34±0.04	1.28±0.11*	0.62±0.18†

*p<0.05 vs. Control; †p<0.05 vs. DM; ‡p<0.01 vs. Control

0.01), DM+CsA군에서는 이러한 감소가 유의하게 억제되었다 (Fig. 1). 사구체내 TGF- β_1 의 mRNA 발현은 대조군에 비하여 DM군에서 2.1배 증가되었으며, 이러한 TGF- β_1 mRNA의 발현 증가는 CsA 투여로 56.3% 억제되었다 ($p < 0.05$, Fig. 2). C+CsA군에서 P-cadherin 및 TGF- β_1 의 mRNA 발현은 대조군과 유사하였다. 한편, 사구체내 GAPDH의 mRNA 발현은 모든 군 사이에 유의있는 차이가 없었다.

Western blot으로 분석한 사구체내 P-cadherin의 단백질

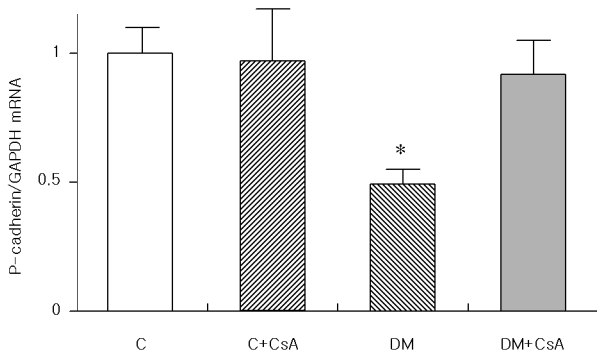


Fig. 1. Glomerular P-cadherin/GAPDH mRNA ratio in control (C), DM, and C and DM rats treated with 1.5 mg/kg/day CsA (C+CsA and DM+CsA, respectively) for 6 weeks. Glomerular P-cadherin/GAPDH mRNA ratio was significantly lower in DM compared with C rats at 6 weeks after the induction of diabetes, and this decrease was significantly inhibited with CsA treatment. CsA had no effect on glomerular P-cadherin mRNA expression in C rats. * $p < 0.01$ vs. C and DM+CsA

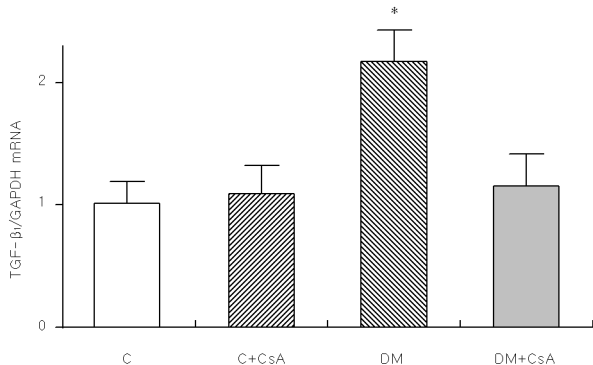


Fig. 2. Glomerular TGF- β_1 /GAPDH mRNA ratio in control (C), DM, and C and DM rats treated with 1.5 mg/kg/day CsA (C+CsA and DM+CsA, respectively) for 6 weeks. Glomerular TGF- β_1 /GAPDH mRNA ratio was significantly higher in DM compared with C rats at 6 weeks after DM induction, and CsA treatment significantly inhibited the increase in glomerular TGF- β_1 /GAPDH mRNA ratio in DM rats. CsA had no effect on glomerular TGF- β_1 mRNA expression in C rats. * $p < 0.05$ vs. C and DM+CsA

발현은 DM군에서 대조군에 비하여 56.1% 감소되었으며 ($p < 0.01$), 이러한 감소는 CsA 투여로 의미있게 억제되었다 (Fig. 3). TGF- β_1 의 단백질 발현은 대조군에 비하여 DM군에서 1.7배 증가되었으며, DM+CsA군에서는 DM군에 비하여 TGF- β_1 단백질의 발현 증가가 76.1% 억제되었다 ($p < 0.05$, Fig. 4). C+CsA군에서 P-cadherin 및 TGF- β_1 의 단백질 발현은 대조군과 유사하였다. 한편, β -actin의 단백질 발현은 모든 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

라. Synaptopodin과 calcineurin A- α 이중 면역형광 염색

신장 조직을 이용하여 족세포 내에서의 calcineurin A- α 의 단백질 발현 여부를 확인하기 위하여 synaptopodin (red)과 calcineurin A- α (green) 이중 염색을 시행한 결과, synaptopodin 염색으로 확인된 사구체의 족세포 내에서

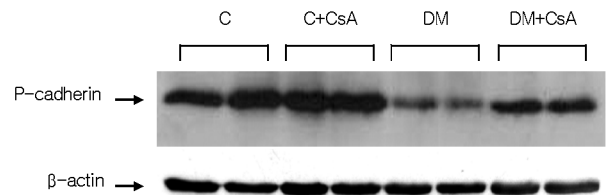


Fig. 3. A representative Western blot for P-cadherin with glomerular lysates of control (C), DM, and C and DM rats treated with 1.5 mg/kg/day CsA (C+CsA and DM+CsA, respectively) for 6 weeks (representative of five blots). Densitometric quantitation revealed that there was a 56.1% decrease in glomerular P-cadherin protein expression in DM relative to C rats ($p < 0.01$), and this decrease was significantly inhibited with CsA treatment ($p < 0.05$). CsA had no effect on glomerular P-cadherin protein expression in C rats. On the other hand, there was no difference in β -actin protein expression among the four groups.

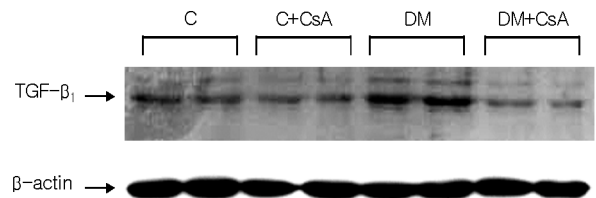


Fig. 4. A representative Western blot for TGF- β_1 with glomerular lysates of control (C), DM, and C and DM rats treated with 1.5 mg/kg/day CsA (C+CsA and DM+CsA, respectively) for 6 weeks (representative of five blots). TGF- β_1 protein levels were 1.7-fold higher in DM compared with C glomeruli ($p < 0.05$), and CsA treatment significantly inhibited the increase in glomerular TGF- β_1 protein expression in DM rats by 76.1% ($p < 0.05$). CsA had no effect on TGF- β_1 protein expression in C rats. On the other hand, there was no difference in β -actin protein expression among the four groups.

calcineurin A- α 의 신호를 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

2. 세포실험

가. Calcineurin A- α 및 A- β mRNA와 단백질 발현

Calcineurin A- α 의 mRNA 발현은 HG군에서 LG군에 비하여 2.2배 증가되었으며, LG+TGF- β_1 군에서도 2.3배 증가되었다 ($p < 0.05$). 그러나 calcineurin A- β 와 GAPDH의 mRNA 발현은 모든 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

Western blot으로 분석한 calcineurin A- α 의 단백질 발현은 LG군에 비하여 HG군과 LG+TGF- β_1 군에서 각각 83%, 67% 증가되었던 반면 ($p < 0.05$), calcineurin A- β 와 β -actin의 단백질 발현에는 의미있는 차이가 없었다. 고포도당의 삼투압 효과를 배제하기 위하여 첨가한 mannitol (24.4 mM)은 calcineurin A- α 및 A- β mRNA와 단백질 발현에 영향을 주지 않았다.

나. P-cadherin mRNA와 단백질 발현

P-cadherin의 mRNA 발현은 HG군에서 LG군에 비하여 50.4% 감소되었으며, 이러한 감소는 CsA 치료로 의의있게 억제되었다 ($p < 0.05$). HG군과 유사하게 LG+TGF- β_1 군에서도 LG군에 비하여 P-cadherin의 mRNA 발현이 49.3% 감소되었다 ($p < 0.05$, Fig. 6). 한편, GAPDH mRNA 발현은 모든 군 사이에 유의한 차이가 없었다.

P-cadherin 단백질의 발현은 LG군에 비하여 HG군과 LG+TGF- β_1 군에서 각각 66.4%, 67.5% 감소되었으며 ($p < 0.05$), HG+CsA군에서는 HG에 의한 P-cadherin의 단백질 감소가 의미있게 억제되었다 (Fig. 7). Mannitol (24.4 mM) 처리군과 LG+CsA군에서 P-cadherin mRNA와 단백질의

발현에 의미있는 변화는 없었다.

고 찰

본 연구에서는 STZ로 당뇨가 유발된 백서에서 6주 동안의 CsA를 투여하였을 때 뇨알부민 배설량이 감소되었다. 이러한 CsA의 단백질뇨 감소 효과는 당뇨 조건 하에서 증가된 사구체내 TGF- β_1 의 발현 억제와 감소된 P-cadherin의 발현 회복과 관련이 있음을 확인하였다.

CsA는 11개의 아미노산으로 구성된 강력한 면역억제제로 calcineurin 활성화를 억제하여 interleukin-2와 같은 사이토카인들의 생성을 억제한다³⁸⁾. Calcineurin은 serine/threonine phosphatase로 nuclear factor of activated T cell family, myocyte enhancer-binding factors, 또는 GATA proteins 등의 탈인산화와 활성화에 관여한다³⁹⁾. 이는 catalytic subunit A와 regulatory subunit B로 구성되어 있는데, A subunit에는 α , β , 그리고 γ 의 세가지 isoform이 있고, 이 중 α 와 β isoform은 대부분의 장기에서 발현되는 반면, γ isoform은 주로 고환에서 발현된다⁴⁰⁾. 신장에는 주로 α isoform의 calcineurin 활성도가 세뇨관 부위에서 가장 높은 것으로 알려져 있다^{21, 22)}. STZ로 당뇨가 유발된 백서의 신장에서는 calcineurin A- α 와 A- β isoform의 발현이 모두 증가되지만, 사구체내에서는 calcineurin A- α 의 발현만 증가되며, 이중 면역형광 염색을 시행한 결과 calcineurin A- α isoform의 발현이 증가된 사구체내 세포는 내피세포와 메산지움 세포였다고 보고된 바 있다²³⁾. 본 연구에서는 calcineurin A- α 발현이 당뇨 백서 사구체에서 증가되어 있음을 재확인하였으며, 사구체내 세포 중 족세포에서

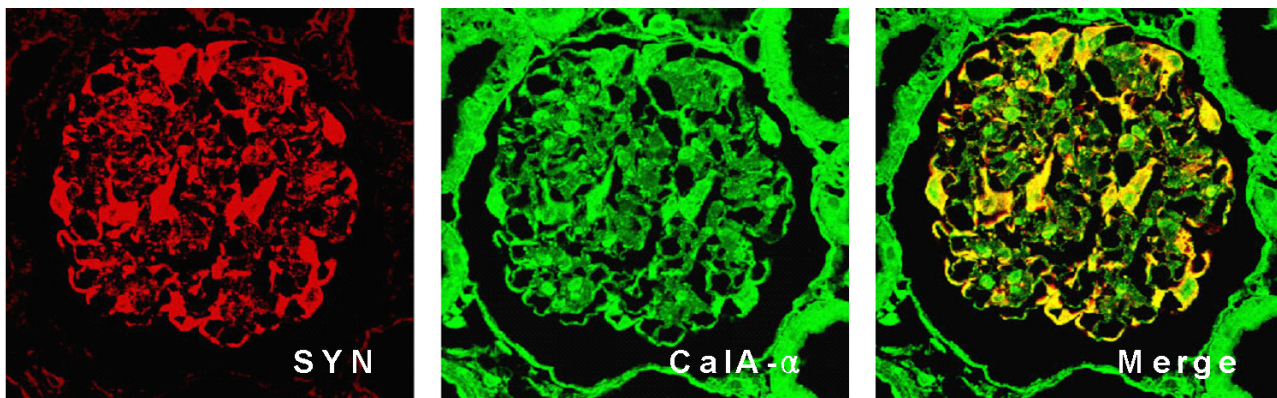


Fig. 5. Dual immunofluorescent staining for the podocyte marker, synaptopodin (SYN), and calcineurin A- α (CalA- α) in diabetic rat glomeruli at 6 weeks after the induction of diabetes. Co-localization of calcineurin A- α (green) and synaptopodin (SYN) (red) is evident as yellow fluorescence on the merge image.

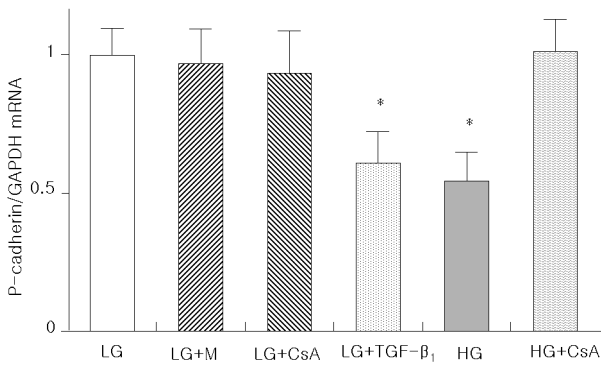


Fig. 6. P-cadherin/GAPDH mRNA ratio in podocytes exposed to 5.6 mM glucose (LG), LG+24.4 mM mannitol (LG+M), LG+10⁻⁸ M CsA (LG+CsA), LG+10 ng/ml TGF-β₁ (LG+TGF-β₁), 30 mM glucose (HG), or HG+10⁻⁸ M CsA (HG+CsA) medium. P-cadherin/GAPDH mRNA ratio was significantly lower in podocytes exposed to HG and LG+TGF-β₁ than LG cells, and this HG-induced decrement in P-cadherin/GAPDH mRNA ratio was ameliorated with CsA treatment.
*p<0.05 vs. LG and HG+CsA

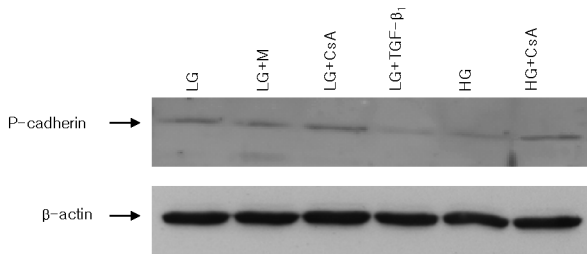


Fig. 7. A representative Western blot for P-cadherin in podocytes exposed to 5.6 mM glucose (LG), LG+24.4 mM mannitol (LG+M), LG+10⁻⁸ M CsA (LG+CsA), LG+10 ng/mL TGF-β₁ (LG+TGF-β₁), 30 mM glucose (HG), or HG+10⁻⁸ M CsA (HG+CsA) (representative of five blots). P-cadherin protein expression was significantly lower in podocytes exposed to HG and LG+TGF-β₁ than LG cells assessed by densitometry (p<0.05), and CsA nearly normalized this HG-induced reduction in P-cadherin protein expression (p<0.05).

도 발현이 된다는 것을 증명하였다.

CsA는 미세변화형 신증후군, 국소성 분절성 사구체경화증, 막성 신병증 및 루푸스성 신염 등의 사구체 질환에서 단백뇨를 감소시키는 효과가 있다고 알려져 있으며²⁵⁻³⁰, 그 작용 기전에 대해서는 논란이 많으나, 면역억제 작용, 혈액동맥적 효과, 사구체 기저막의 전하 선택성에 대한 효과, 그리고 사구체 여과 장벽의 크기 선택성에 대한 효과 등이 거론되고 있다³¹⁻³³. 그러나, 현재까지 CsA가 사구체 여과 장벽 관련 단백질 발현에 미치는 영향을 규명한 연구는 거의 없는 실정므로, 본 연구에서는 당뇨병성 신병증에서 CsA의 투여로 세

극막 관련 단백질의 하나인 P-cadherin의 발현에 변화가 있음을 확인하였다.

P-cadherin은 세포 사이의 부착에 관여하는 당단백인 cadherin족의 하나로, 세극막의 골격 역할과 동시에 nephrin과 같은 단백질과 연관되어 여과 선택성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다^{9, 41, 42}. 그러나 단백질과 P-cadherin의 발현 사이의 연관성에 대한 연구는 극히 미미하며, 그 결과 또한 서로 상이한 실정이다. 핀란드형 선천성 신증후군에서 P-cadherin이 정상적으로 표현되었으며⁴³, P-cadherin 결어 마우스에서 심한 단백뇨가 동반되지 않았다는 보고가 있는 반면⁴⁴, Liu 등⁴⁵은 백서에 anti-P-cadherin antibody를 투여한 결과 24시간 뇨알부민 배설이 49% 증가하였는데 이러한 변화는 nephrin이나 NEPH1과는 무관하여 P-cadherin 역시 사구체 여과 장벽 역할을 한다고 하였으며, 당뇨 백서의 사구체와 고포도당으로 자극한 배양 족세포에서 P-cadherin의 발현 감소와 단백질 발생의 연관성이 보고되기도 하였다¹⁴.

당뇨병성 신병증에서 TGF-β₁ 발현의 증가는 세포비후와 세포외기질의 축적에 중요한 역할을 하며⁴⁶, 족세포 박리(detachment) 및 세포자멸사(apoptosis)를 야기하는 것으로 알려져 있으나⁴⁷, 현재까지 당뇨병성 신병증에서 TGF-β₁과 세극막 관련 단백질의 연관 관계에 대한 연구는 미미한 상태이다. 본 연구에서는 정상 포도당 농도로 배양한 족세포군에서 TGF-β₁을 첨가한 경우 고포도당 자극시와 유사하게 P-cadherin 발현이 감소되었는데, 이는 TGF-β₁이 중간 매개 물질로서 P-cadherin 발현에 영향을 미쳤을 가능성을 제시하는 것이다. 그러나, 향후 TGF-β₁ 경로와 세극막 관련 단백질 발현 사이의 직접적인 인과관계에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

CsA는 수많은 효과에도 불구하고 각종 부작용으로 인하여 임상에서 흔히 사용하지 못하는데, 이 중에서도 신독성이 가장 심각한 문제로 되어 있다. CsA 신독성의 발생 기전은 정확하게 밝혀져 있지 않으나, 경증의 허혈과 여러 매개인자들이 관여하는 것으로 알려져 있으며^{48, 49}, 이 중에서도 중요한 매개인자로 거론되는 것이 TGF-β₁이다. 당뇨 백서에서 2주간 CsA 투여한 결과 신피질에서 TGF-β₁의 mRNA 발현이 증가되었으며¹⁸, TGF-β 특이 중화 항체 투여에 의하여 만성 CsA 신독성 마우스에서 세뇨관 간질의 변화가 호전되었다는 보고도 있다⁵⁰. 그러나, TGF-β₁의 mRNA 발현에 대한 CsA의 효과는 사구체와 신피질에서 서로 상이하여, Gooch 등¹⁸은 CsA 투여로 사구체내 TGF-β₁의 mRNA 발현이 감소되었다고 하여, 본 연구의 결과와 유사하였다. 명

확하지는 않지만 이러한 차이는 실험에 이용한 동물 및 세포 주의 종류, CsA 치료 기간, 그리고 투여 용량과 관련이 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 CsA가 뇨알부민 배설량에 미치는 효과를 규명하고자 당뇨 백서에서 당뇨 유발 후 알부민뇨가 저명해지는 6주 동안 CsA를 투여하고자 하였기 때문에 선행 연구¹⁸⁾에서 투여된 CsA 총량과 유사하도록 1.5 mg/kg/day의 용량으로 투여하였으며, 이러한 저용량 CsA 투여로 인한 임상적 또는 조직학적 CsA 신독성은 발생하지 않았다.

CsA는 신독성 이외에도 당뇨 유발의 위험성이 있는 약제이나⁵¹⁾, 본 연구에서는 저용량의 CsA 투여 백서와 위약 투여 백서 사이에 혈당의 의미 있는 차이가 없었다.

결론적으로, CsA는 당뇨 백서에서 뇨알부민 배설을 유의하게 감소시켰으며, 이러한 효과는 P-cadherin의 발현 변화와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한, CsA에 의한 P-cadherin 발현 감소의 억제제는 당뇨 조건 하에서 관찰되는 사구체내 TGF- β_1 의 발현 증가가 CsA에 의하여 억제되는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다.

한글 초록

목적: 당뇨병성 신병증에서 사이클로스포린 (cyclosporin A, CsA)의 단백질 감소 효과 및 P-cadherin 발현 변화와의 연관성에 대하여 연구하고자 하였다.

방법: 생체내 실험으로는 백서를 대조군 (C), CsA 투여 대조군 (C+CsA), 당뇨군 (DM), 그리고 CsA 투여 당뇨군 (DM+CsA)으로 나누어 당뇨 유발 6주 후에 분리한 사구체를 이용하여 mRNA 및 단백질 발현을 각각 real time-PCR 및 Western blot로 관찰하였다. 생체외 실험으로는 배양 족세포를 정상 포도당군 (LG), LG+CsA 처치군 (LG+CsA), LG+transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) 처치군 (LG+TGF- β_1), 고포도당군 (HG), 그리고 HG+CsA 처치군 (HG+CsA)으로 나누어 24시간 배양한 후 real time-PCR 및 Western blot를 시행하였다.

결과: 24시간 뇨알부민 배설은 C군에 비하여 DM군에서 유의하게 높았으며, DM+CsA군에서는 DM군에 비하여 의미있게 감소되었다. 사구체내 P-cadherin mRNA와 단백질 발현은 DM군에서 C군에 비하여 유의하게 감소되었으며, DM+CsA군에서는 이러한 감소가 억제되었다. 사구체내 TGF- β_1 mRNA와 단백질 발현은 DM군에서 C군에 비하여 유의하게 증가되었으며, DM+CsA군에서는 이러한 증가

가 억제되었다. 배양 족세포의 P-cadherin mRNA와 단백질 발현은 HG군 및 LG+TGF- β_1 군에서 LG군에 비하여 의미있게 감소되었으며, HG+CsA군에서는 이러한 감소가 억제되었다.

결론: CsA는 당뇨 백서에서 뇨알부민 배설을 의미있게 감소시켰으며, 이러한 효과는 P-cadherin의 발현 변화와 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한, CsA에 의한 P-cadherin 발현 감소의 억제는 당뇨 조건 하에서 관찰되는 사구체내 TGF- β_1 의 발현 증가가 CsA에 의하여 억제되는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다.

중심 단어: 당뇨병성 신병증, 단백질, 족세포, 사이클로스포린, P-cadherin

참 고 문 헌

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) Tryggvason K, Wartiovaara J: Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:543-549, 2001
- 8) Rodewald R, Karnovsky MJ: Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60:423-433, 1974
- 9) 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
- 10) Holzman LB, St John PL, Kovari IA, Verma R, Hothofer H, Abrahamson DR: Nephritin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int* 56:1481-1491, 1999
 - 11) Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K: Nephritin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7962-7967, 1999
 - 12) 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: 4829-4936, 2001
 - 13) 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
 - 14) Ryu DR, Xu ZG, Yoo TH, Chang JH, Jung DS, Lee SH, Kim JJ, Choi KH, Lee HY, Han DS, Kang SW: P-cadherin is decreased in glucose-stimulated podocytes and in experimental diabetic nephropathy. *Korean J Nephrol* 22:494-503, 2003
 - 15) 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
 - 16) Adler S: Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 5: 1165-1172, 1994
 - 17) Gooch JL, Tang Y, Ricono JM, Abboud HE: Insulin-like growth factor-I induces renal cell hypertrophy via a calcineurin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 276:42492-42500, 2001
 - 18) Gooch JL, Barnes JL, Garcia S, Abboud HE: Calcineurin is activated in diabetes and is required for glomerular hypertrophy and ECM accumulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F144-F154, 2003
 - 19) Buttini M, Limonta S, Luyten M, Boddeke H: Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney. *Histochem J* 27:291-299, 1995
 - 20) Mukai H, Kuno T, Chang CD, Lane B, Luly JR, Tanaka C: FKBP12-FK506 complex inhibits phosphatase activity of two mammalian isoforms of calcineurin irrespective of their substrates or activation mechanisms. *J Biochem (Tokyo)* 113: 292-298, 1993
 - 21) Tumlin JA, Someren JT, Swanson CE, Lea JP: Expression of calcineurin activity and alpha-subunit isoforms in specific segments of the rat nephron. *Am J Physiol* 269:F558-F563, 1995
 - 22) Tumlin JA: Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am J Kidney Dis* 30: 884-895, 1997
 - 23) Gooch JL, Pergola PE, Guler RL, Abboud HE, Barnes JL: Differential expression of calcineurin A isoforms in the diabetic kidney. *J Am Soc Nephrol* 15:1421-1429, 2004
 - 24) Gooch JL, Gorin Y, Zhang BX, Abboud HE: Involvement of calcineurin in transforming growth factor-beta-mediated regulation of extracellular matrix accumulation. *J Biol Chem* 279:15561-15570, 2004
 - 25) Ponticelli C, Rizzoni G, Edefonti A, Altieri P, Rivolta E, Rinaldi S, Ghio L, Lusvardi E, Gusmano R, Locatelli F, Pasquali S, Catellani A, Della O, Alberighi C: A randomized trial of cyclosporine in steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int* 43:1377-1384, 1993
 - 26) Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, Maxwell DR, Kunis CL: A randomized trial of cyclosporine in patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. North America Nephrotic Syndrome Study Group. *Kidney Int* 56:2220-2226, 1999
 - 27) Meyrier A, Noel LH, Auriche P, Callard P: Long-term renal tolerance of cyclosporin A treatment in adult idiopathic nephrotic syndrome. Collaborative Group of the Societe de Nephrologie. *Kidney Int* 45:1446-1456, 1994
 - 28) Guasch A, Suranyi M, Newton L, Hall BM, Myers BD: Short-term responsiveness of membranous glomerulopathy to cyclosporine. *Am J Kidney Dis* 20:472-481, 1992
 - 29) Cattran DC, Appel GB, Hebert LA, Hunsicker LG, Pohl MA, Hoy WE, Maxwell DR, Kunis CL; North America Nephrotic Syndrome Study Group: Cyclosporine in patients with steroid-resistant membranous nephropathy: a randomized trial. *Kidney Int* 59:1484-1490, 2001
 - 30) Radhakrishnan J, Valeri A, Kunis C, Appel GB: Use of cyclosporin in lupus nephritis. *Contrib Nephrol* 114:59-72, 1995
 - 31) Ambalavanan S, Fauvel JP, Sibley RK, Myers BD: Mechanism of the antiproteinuric effect of cyclosporine in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 7: 290-298, 1996
 - 32) Zietse R, Wenting GJ, Kramer P, Schalekamp MA, Weimar W: Effects of cyclosporin A on glomerular barrier function in the nephrotic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 82:641-650, 1992

- 33) Sharma R, Sharma M, Ge X, McCarthy ET, Savin VJ: Cyclosporine protects glomeruli from FSGS factor via an increase in glomerular cAMP. *Transplantation* 62:1916–1920, 1996
- 34) Murray BM, Paller MS, Ferris TF: Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int* 28:767–774, 1985
- 35) Su Q, Weber L, Le Hir M, Zenke G, Ryffel B: Nephrotoxicity of cyclosporin A and FK506: inhibition of calcineurin phosphatase. *Ren Physiol Biochem* 18: 128–139, 1995
- 36) 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
- 37) 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
- 38) Suthanthiran M, Morris RE, Strom TB: Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am J Kidney Dis* 28:159–172, 1996
- 39) Wilkins BJ, Molkenkin JD: Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322:1178–1191, 2004
- 40) Rusnak F, Mertz P: Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80:1483–1521, 2000
- 41) Takeichi M: Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619–627, 1995
- 42) Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA: Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374:327–337, 1995
- 43) Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestila M, Holmberg C, Salonen R, Heikkinenheimo M, Wartiovaara J, Tryggvason K, Jalanko H: Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* 157:1905–1916, 2000
- 44) 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
- 45) Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS: Nephrin and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 112:209–221, 2003
- 46) Ziyadeh FN: Mediators of diabetic renal disease: The case for TGF- β as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 15(Suppl 1):S55–57, 2004
- 47) Ding G, Reddy K, Kapasi AA, Franki N, Gibbons N, Kasinath BS, Singhal PC: Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F173–180, 2002
- 48) de Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM: Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis* 35:333–346, 2000
- 49) Fellstrom B: Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplant Proc* 36(2 Suppl):220S–223S, 2004
- 50) Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, Ledbetter S: Therapeutic role of TGF- β -neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol* 14:377–388, 2003
- 51) First MR, Gerber DA, Hariharan S, Kaufman DB, Shapiro R: Posttransplant diabetes mellitus in kidney allograft recipients: incidence, risk factors, and management. *Transplantation* 73:379–386, 2002