Original article

J Korean Soc Pediatr Nephrol 2013;17:79-85
DOI: http://dx.doi.org/10.3339/jkspn.2013.17.2.79

ISSN 1226-5292 (print)
ISSN 2234-4209 (online)

Puromycin aminonucleoside의 사구체 족세포 P-cadherin에 대한 영향

충북대학교 의과대학 소아과학교실

하 태 선

Tae-Sun Ha, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

Corresponding Author: Mee Young Sol
Department of Pediatrics, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
Tel: 043-269-6374, Fax: 043-264-6620
E-mail: tsha@chungbuk.ac.kr

*이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(지역대학우수과학자 지원사업, 313-2007-2-E00269)과 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2013R1A1A4A03006207).

Received: 13 September 2013
Revised: 6 October 2013
Accepted: 7 October 2013

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http:// creativecommons.org/licenses/bync/3.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Effect of Puromycin Aminonucleoside on Podocyte P-Cadherin

Purpose: To test whether the expression of P-cadherin, a component of slit diaphragms between podocyte foot processes, would be altered by puromycin aminonucleoside (PAN) in a cultured podocyte *in vitro*.
Methods: Rat glomerular epithelial cells (GEpC) were cultured with various concentrations of PAN. The distribution of P-cadherin was examined with a confocal microscope. Western blotting and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to measure the change in P-cadherin expression.
Results: This study found that P-cadherin was concentrated in the inner and peripheral cytoplasm with high concentrations of PAN under immunofluorescence views. Western blotting of GEpC revealed that PAN induced a decrease of P-cadherin in dose- and time-dependent manners. A high dose (50 μg/mL) of PAN decreased P-cadherin expression by 21.9% at 24 h (P<0.05) and 31.9% at 48 h (P<0.01) compared to those without PAN. In RT-PCR, high concentrations (50 μg/mL) of PAN also decreased P-cadherin mRNA expression, similar to protein suppression, by 23.5% at 48 h (P<0.05).
Conclusion: Podocytes exposed to PAN *in vitro* concentrated P-cadherin internally, and reduced P-cadherin mRNA and protein expression. This could explain the development of proteinuria in experimental PAN-induced nephropathy.

Key words: P-Cadherin, Puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephropathy, Glomerular epithelial cells (GEpC), Podocyte

서론

소아 단백뇨질환에서 소아 신증후군은 매우 중요한 부분을 차지하고 있으며, 이중 미세변화형은 조직학적 원인으로 특발성 신증후군의 대부분을 차지한다[1-3]. 이러한 미세변화형 신증후군의 병태생리의 연구를 위해 직접 환자

Copyright © 2013 The Korean Society of Pediatric Nephrology

또는 이와 유사한 동물실험모델을 사용하는데, 이중 동물실험모델로서 백서에게 퓨로마이신 아미노뉴클레오사이드(puromycin aminonucleoside, PAN)를 주사하여 발생하는 단백뇨나 사구체 족세포(podocyte; glomerular epithelial cells, GEpC)에 특이적인 조직학적 변화, 예를 들면, 족돌기의 편평화와 탈락 등은 특발성 미세변화형 신증후군의 조직상과 매우 유사하며 이를 PAN (-유발성) 신증이라 한다[4-7]. 또한, 생화학적으로 전하장벽의 감소소견 역시 유사하므로 PAN 신증은 특발성 신증후군의 병태생리에 관한 연구대상으로 많이 이용되고 있다[4-7]. 한편, 족세포에 대한 이러한 작용이 생체 내 뿐만 아니라 생체 외 즉, 배양상태의 족세포에도 유사한 영향을 끼칠 것으로 생각되는데 사구체의 다른 세포들에서는 볼 수 없는 족세포에 특이적인 세포독성 등을 통하여 배양한 족세포에 대하여 PAN의 영향이 PAN 신증과 유사한 것으로 사료된다[8, 9]. GEpC의 이러한 변화는 생체 내 뿐만 아니라 생체 외, 즉, 배양상태의 GEpC에도 유사한 영향을 끼쳐서 PAN 신증과 유사하다[7-9].

사구체의 여과는 혈관내피세포, 사구체 기저막(glomerular basement membrane), 그리고 족세포에 의하여 이루어지며, 이중 족세포의 족돌기 사이의 세극막(slit diaphragm)이 여과의 마지막 단계인 선택적 여과에 관여한다[10, 11]. 세극막은 서로 다른 양측의 족세포들로부터 나온 족돌기들 사이를 연결하는 유일한 구조로서, 간상체(rod-like units)들이 지퍼형태의 선상구조를 이루고 있어 여과장벽의 역할을 한다[12, 13]. 최근에 많은 연구에서 세극막 부위에 존재하는 여러 가지 단백으로 nephrin, P-cadherin, FAT, podocin 등이 세포내부와 연결단백(adaptor proteins)으로 zonula occludens-1 (ZO-1), catenins, CD2-associated protein (CD2AP) 등에 의해 세포 내 세포골격과 연결되어 구조적, 기능적 역할을 수행하며, 이러한 단백들의 변화가 사구체 질환에서 단백뇨의 병인이라고 추측된다[13-16]. 이중 세극막에 존재하는 P-cadherin의 세포 외 부분은 HAV motif가 칼슘에 의해 연결되면서 양측 족돌기로부터 나와 세극막과 같은 zipper 구조를 이루며 세포 내 부분은 catenin family를 통하여 actin filament와 연결되어 족돌기와 간벽의 구조적, 기능적으로 역할을 수행한다(Fig. 1)[13, 16-18]. 본 연구에서는 배양한 족세포에서 PAN에 의한 P-cadherin의 질적, 양적 변화연구를 통하여 실험적 신증후군의 발생에 있어서 P-cadherin의 역할을 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 사구체 족세포 배양과 PAN 투여

백서의 사구체 상피세포(glomerular epithelial cells, GEpC)는 Kreisberg가 성상을 확인하고 공여한 세포를 배양하여 실험에 이용하였다[19]. 유지 배양액으로는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1 M Hepes, 0.2 M L-glutamine, 0.01 U/mL insulin 그리고 항생제를 혼합한 RPMI 1640 배양액(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하였고 배경을 줄이기 위해 각각의 실험 전에 FBS 0.5%만을 첨가하였다. 배양액 교환은 2일에 한 번씩 하였고 계대배양은 0.05% trypsin으로 이탈시킨 후 위의 배양액으로 다시 배양하였다[20]. 세포에 다양한 농도의 PAN (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 투여하고, 24시간 혹은 48시간 노출시켰고 대조군은 vehicle만 투여하였다.

3. Confocal microscopy를 이용한 P-cadherin의 분포변화 관찰

백서의 사구체 상피세포를 collagen type-I (Upstate Biotechnology Incorporation, Lake Placid, NY, USA)으로 coating한 glass cover slips에 각각의 조건으로 24시간 동안 배양을 하였으며 PBS로 3번 세척을 해준 후 4% paraformaldehyde를 200 μL씩 실온에서 10분간 처리하여 세포를 고정하고 0.02 M glycine이 들어있는 PBS을 이용하여 3번 세척하였다. 그 후 10% normal goat serum (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA)을 well 당 200 μL씩 처리하여 37℃에서 30분간 배양한 다음, goat serum을 버리고 polyclonal rabbit anti P-cadherin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA) 항체를 1:100으로 희석하여 well

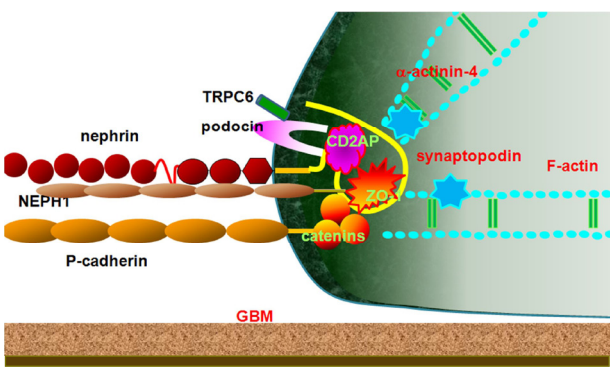

Fig. 1. Schematic view of P-cadherin and β-catenin complex in podocyte.

당 200 μL씩 37℃에서 1시간 노출시킨 뒤 PBS를 이용하여 10분간 3번씩 shaker에서 세척하였다.

준비된 세포들에 이차항체로 Alexa-488 또는 TRITC-conjugated anti-rabbit IgG 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 우선 25 μg/mL으로 PBS에 희석하여 37℃에서 40분간 배양하고 0.1% triton X-100이 들어있는 PBS로 10분씩 2번 세척한 후 PBS로 2번을 10분간 세척하였다. 항 P-cadherin 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)와 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden)도 위와 같은 방법으로 처리하였다. 관찰은 Fluorescence microscope (TCS SP2 AOBS, Leica, Germany)으로 하였다.

4. P-Cadherin 단백양 측정

족세포를 6-well plate에 5×10^6 cells이 되도록 분주하여 confluence가 70-80% 되도록 세포를 배양하였다. 24시간, 48시간 지난 후에 protein extraction solution (PRO-PREP, Intron, Seongnam, Kyungki, Korea)을 well 당 400 μL을 넣고 세포를 용해하였다. 이 용해물을 4℃ 원심분리기로 13,200 rpm에서 30분간 원심분리하였고, 이로부터 얻은 세포 용해물의 상층액을 Bradford 방법으로 정량한 후 5X SDS loading dye와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열하여 준비하였다. 준비된 시료를 10% polyacrylamide-SDS mini gel에 전기영동(SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)하고 electroelution법을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P Membrane, Millipore, Bedford, MA, USA)에 200 mA로 4시간 30분 동안 전사시켰다(TE 22 tank transfer unit; Amersham Biosciences). PVDF membrane을 5% non-fat dry milk를 tris-buffered saline-0.1% tween20 (TBS-T)에 용해시켜 1시간 동안 처리한 다음, TBS-T로 간단히 세척하고 전술한 일차항체를 TBS-T에 희석하여 4시간동안 반응시킨 후, PVDF membrane를 TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 이차항체 (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 1:5,000 희석하여 45분 동안 반응시킨 후, TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 반응이 모두 끝난 PVDF membrane을 West-Zol plus (Intron, Seongnam, Kyungki, Korea)의 용액 A와 B를 1:1로 섞어 PVDF membrane에 반응시킨 후 이를 LAS-3000 imaging system (Fujifilm Life Science, Minato-ku, Tokyo, Japan)에 노출시켜 이미지를 현상하였다. 단백양은 β-tubulin에 대한 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 보정하였다. 현상한 이미지를 Multi Gauge V3.1 프로그램을 사용하여 band density를 측정하고, 이를 대조군 평균치에 100%에 대한 상대값으로 표시하였다.

5. P-Cadherin에 대한 RT-PCR

각 조건에서 배양한 세포를 RNA isolation solution과 chloroform으로 추출을 한 후에 isopropanol, 3% sodium acetate와 100% ethanol을 이용하여 침전시킨 다음 전체 RNA를 분리하였다. RNA 5 μg의 농도로 AMV reverse transcriptase (Intron, Korea)과 oligo-dT (KDR, Korea), 2.5 mM dNTP (Intron, Seongnam, Kyungki, Korea) 그리고 증류수로 최종 20 μL로 부피를 맞춘 후 37℃에서 20분간, 42℃에서 50분간 반응 후 효소를 불활성화시킨 다음 합성된 cDNA을 주형으로 RT-PCR을 수행하였다.

사용한 백서의 P-cadherin sense의 염기서열은 5′- CTT ACAATGGGGTGGTGG-3′이고, antisense의 염기서열은 5′-GCCACGGTGAAATGATCC-3′이었으며 housekeeper로서 백서의 GAPDH sense의 염기서열은 5′-CTCTACCCACG GCAAGTTCAA-3′이고, antisense의 염기서열은 5′-GGATG ACCTTGCCCACAGC-3′이었고 Bionics (Korea)에 주문 제작하였다. 10× PCR buffer (Intron, Korea), 2.5 mM dNTP (Intron, Korea)와 각각의 특정 primer에 증류수를 더하여 전체 양을 25 μL로 맞춘 후 94℃에서 5분간 가열한 다음 94℃ 30초, 각각에 맞는 annealing 온도에서 1분간, 72℃에서 50초간 30 cycles를 시행하였다. 생성물을 2.0% agarose gel을 이용하여 각 시료의 PCR 생성물과 dye을 포함하여 15 μL의 양을 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 UV light하에서 polaroid film에 감광시키고 densitometry (LabWorks 4.0, UVP, Inc. Upland, CA, USA)로 각각 측정한 후 GAPDH의 값으로 보정하였다.

6. 통계적 분석

대조군과 함께 각 항목에 대하여 Western 분석은 3회, RT-PCR은 3회 실험한 후 결과는 mean±standard deviation (S.D)로 표시하였고, 실험군과 대조군간의 차이에 대한 통계적 유의성 분석은 독립표본 T-검정법(SPSS version 12.0; SPSS Inc, Chicago, IL)을 사용하여 비모수적 Student's *t*-test 방법으로 처리되었으며, *P*-값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과

1. Confocal 현미경을 이용한 P-cadherin의 분포 관찰

항 β-catenin 항체와 항 P-cadherin 항체를 같이 처리하였을 때, 외곽세포질에 분포하는 β-catenin (빨강)이 PAN의 농도가 올라갈수록 흐려지면서 P-cadherin (녹색)은 내부로 응집하는 모습을 볼 수 있다(Fig. 2A). 배양세포를 빡빡하게 자라게 한 후 같은 방법으로 관찰하였을 때도, 세포 사이의 β-catenin이 PAN의 농도가 올라갈수록 흐려지면서 간극이 생기는 것을 확인할 수 있었으며, P-cadherin 역시 감소하면서 내부로 응집하는 모습을 볼 수 있다(화살표, Fig. 2B). 이는 PAN에 의해 P-cadherin이 본래 위치에서 내부로 응집하여 세포 간 투과억제기능이 손상됨을 의미할 것으로 사료된다.

2. Western 분석을 이용한 P-cadherin 단백양 측정

P-Cadherin 단백의 밴드는 118 kD 부위에서 관찰할 수 있었으며, P-cadherin 단백밴드의 두께는 β-tubulin 단백 결과로 보정하였다. 여러 농도의 PAN에 노출시킨 후 P-cadherin 단백양을 24시간과 48시간에서 관찰한 결과, 농도에 따라 감소하는 소견을 보였다. 24시간 노출 조건에서 고농도인 50 μg/mL에서 21.9%의 의미 있는 감소(P<0.05)와 48시간이 노출 조건에서 25와 50 μg/mL에서 각각 29.1%와 31.9%의 통계학적으로는 의미 있는 감소소견을 보였다(P<0.01, Fig. 3).

3. RT-PCR을 통한 P-cadherin의 expression 측정

GEpC에서 P-cadherin에 대한 PCR 생성물을 397 base pairs에서 확인할 수 있었으며, P-cadherin mRNA의 표현양을 GAPDH mRNA의 표현양으로 보정한 후 PAN을 투여하지 않은 군의 결과에 대한 각 군의 결과를 비교하였다. RT-PCR에 의한 GEpC에서 P-cadherin의 밴드 두께는 24시간에서는 각 농도 간에 별 차이가 없었으나, 48시간에서는 고농도인 50 μg/mL PAN을 첨가한 조건에서 23.5%의 의미 있는 감소를 보였다(P<0.05, Fig. 4). 즉, 고농도의 PAN

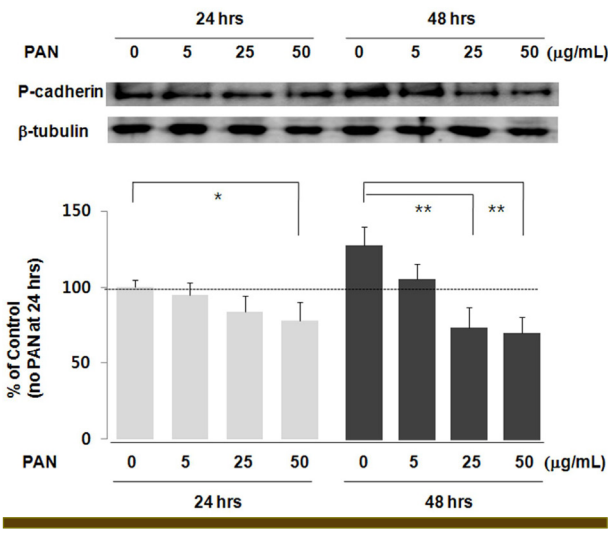

Fig. 3. Effects of PAN on cellular P-cadherin protein levels in cultured cells assayed by Western blotting. High dose (50 μg/mL) of PAN decreased P-cadherin expression significantly by 21.9% at 24 hrs (P<0.05) and 31.9% at 48 hrs (P<0.01), compared to those in without PAN condition. Data are presented as mean± SD; n=3 per group. Control (100%); the value of PAN (-) at 24 hrs. *P<0.05 *versus* control. PAN, puromycin aminonucleoside.

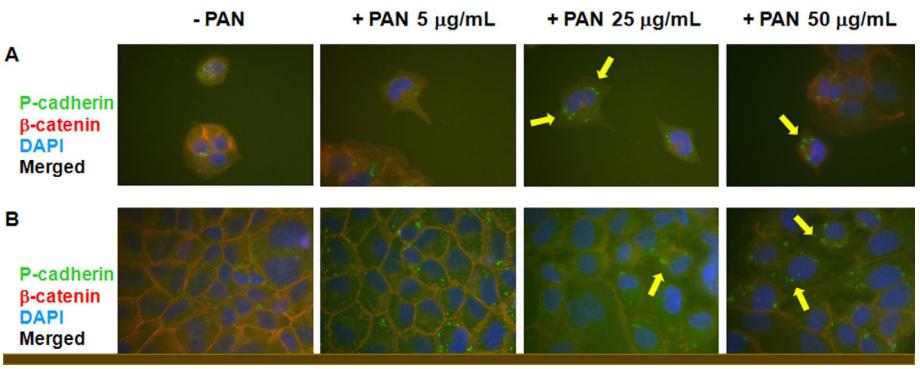

Fig. 2. Confocal microscopy of glomerular epithelial cells with P-cadherin and β-catenin. Merged views show that P-cadherin (green) become concentrated in inner cytoplasm near nucleus in single (A, arrows) and confluent cells (B, arrows), and β-catenin (red) become faint and re-localized inward in single (A) and confluent cells (B) by PAN. Magnification, x1,000. PAN, puromycin aminonucleoside ; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

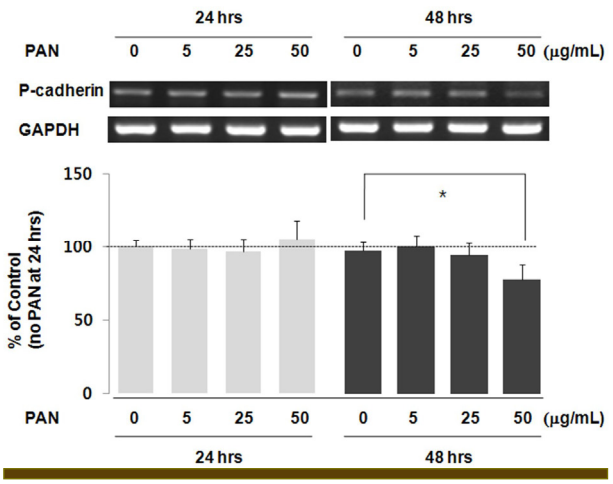

Fig. 4. Effects of PAN on cellular P-cadherin mRNA levels in cultured cells assayed by RT-PCR. High dose (50 μg/mL) of PAN decreased P-cadherin mRNA expression similar to protein suppression by 23.5% at 48 hrs (P<0.05). Data are presented as mean±SD; n=3 per group. Control (100%); the value of PAN (-) at 24 hrs. *P<0.05 *versus* control. PAN, puromycin aminonucleoside; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

은 유전자 수준에서 족세포의 P-cadherin의 생성을 억제시켰다.

고찰

Cadherin 족은 대부분의 장기에서 상피세포조직의 세포와 세포 사이 부착(cell adhesion)에 관여하는 칼슘-의존적 당단백으로, 상피 조직의 구조 유지, 조직의 발생, 그리고 일부 악성 종양 세포의 전이 등에 중요한 역할을 한다[21, 22]. 전형적 cadherin을 조직특이성에 따라 E (epithelial)-, N (neural)-, VE (vascular endothelial)- 그리고 P(placental)-cadherin 등으로 분류한다[23, 24]. E-cadherin은 대부분의 상피세포, N-cadherin은 신경세포에, VE-cadherin은 혈관내피세포에 존재하며, P-cadherin은 태반 외에 피부와 전립선의 기저세포층에 국한하여 존재한다[18, 23, 24]. 사구체에도 E-, P-, R-cadherin이 초기 생성 시기에 주로 존재하는 것으로 보고되었지만[13, 25, 26], 정상 상태나 병적 상태에서 이들 cadherin의 역할에 대해서는 잘 알려지지 않았다. Nakopoulou 등[27]은 E-cadherin이 주로 사구체의 상피세포에서 발현되며, 증식성 사구체신염 환자에서 E-cadherin의 발현이 증가되었다는 보고하였으나, Yaoita 등[25]은 신생백서에서 사구체 상피세포에 보이던 pan-cadherin 염색이 성숙한 백서 뿐 아니라 PAN-유발성 신증에서도 pan-cadherin의 존재를 발견할 수 없었다고 하였다. 그러나 이들이 목표 단백과 사용한 항체가 서로 다르고 특이성 정도도 확인하기 힘들다.

P-cadherin은 전술한 바와 같이, 세포 사이의 부착에 관여하는 당단백인 전형적 cadherin 족의 하나로, 피부와 전립선의 기저세포, 유선의 근상피세포, 그리고 사구체에 존재하는데, 사구체 내에서는 세극막에 존재하는 것으로 미루어 P-cadherin이 세극막의 골격 역할과 동시에 nephrin과 같은 단백과 연관되어 여과 선택성 유지에 관여할 것으로 생각된다[13, 18]. 그러나 nephrin과는 달리 단백뇨와 P-cadherin 사이의 연관성을 증명한 연구는 드물다.

Singh 등[28]은 당화 단백(glycated protein)으로 자극한 GEpC에서 cadherin 발현이 감소하였다고 보고하였으나, Bains 등[29]은 간접면역형광법으로 관찰한 cadherin의 발현을 대조군 신조직과 비교하여 미세변화 증후군과 막성 사구체신염 환자의 신조직에서 의미있는 차이를 발견할 수 없었다고 하였으며, Yaoita 등[25]은 신생백서에서 사구체 상피세포에 보이던 pan-cadherin 염색이 성숙한 백서 뿐 아니라 puromycin aminonucleoside nephrosis에서도 pan-cadherin의 존재를 발견할 수 없었다고 하였다. 그러나 이들이 사용한 항체가 pan-cadherin에 대한 항체이었기 때문에 P-cadherin 단독의 변화를 의미할 수는 없었을 것으로 생각되며 이들 항체가 서로 다르고 특이성 정도도 확인하기 힘들다. 또한, nephrin이 결여된 핀란드형 선천성 신증후군에서 P-cadherin이 정상적으로 표현된다는 사실[30]과 P-cadherin 결여 마우스에서 심한 단백뇨가 동반되지 않는다는 사실[31]로 미루어 단백뇨의 발생과 P-cadherin 사이에 밀접한 관계가 없을 것으로 생각할 수 있다. 그러나 Xu 등[32]은 P-cadherin에 대한 항체를 사용하여 고농도 당에 의해 사구체 족세포의 P-cadherin 단백양의 감소를 확인하였고 mRNA의 발현감소도 보고하였다. 또한, 실험적 당뇨병성 신병증모델에서도 단백뇨와 함께 사구체 족세포 부위의 P-cadherin 단백염색의 감소를 확인하였다. 본 연구자도 고농도의 당과 AGE (advanced glycosylation endproducts)에 의한 GEpC의 P-cadherin을 유전자 수준에서의 억제로 단백의 생성 감소를 초래함으로써, 당뇨환경에서 세극막 성분의 변화를 설명할 수 있었다[33], 또한 Otero 등[34]은 AGE에 의하여 배양한 혈관내피세포에서 이들 세포의 접착에 중요한 VE-cadherin의 의의 있는 감소를 확인하여 혈관 투과성의 증가를 설명하였다.

세극막에 존재하는 P-cadherin의 세포 내 부분은 catenin family (α, β and γ-catenin)를 통하여 actin filament와 연결되어 족돌기와 간벽의 구조적, 기능적으로 역할을 수행한다. 특히, P-cadherin은 β-catenin과 연결되어 있고

catenin complex의 α-catenin은 actin과 연결시킨다(Fig. 1) [13, 16-18]. PAN 신증 동물모델의 사구체에서 Luimula 등[35]은 β-catenin 단백의 의미 있는 감소를 확인하였고, 본 연구자도 세포배양모델에서 PAN에 의한 GEpC의 β-catenin 단백을 유전자 수준에서의 억제로 단백의 생성이 감소을 확인하였다[20]. 즉, PAN에 의하여 족세포의 P-cadherin/β-catenin complex는 서로 유사한 방향으로 분포와 정량적 변화를 보인다.

결론적으로, 본 연구자가 이전 실험에서 확인한 PAN에 의한 실험적 사구체 여과모델에서의 투과율 증가[36]와 본 연구에서의 GEpC의 P-cadherin에 대한 결과, 그리고 Otero 등[34]의 AGE에 의한 혈관내피세포간 cadherin의 감소와 혈관 투과성의 증가결과를 종합하면, PAN에 의한 족세포 P-cadherin의 변화가 투과율의 증가(단백뇨)를 초래함을 설명할 수 있을 것이다.

요약

목적: 단백뇨 질환의 실험모델인 puromycin aminonucleoside (PAN)에서 관찰할 수 있는 족세포의 병리학적 이상에 있어서 P-cadherin의 변화를 생체 외 족세포 배양실험을 통하여 알아보고자 하였다.

방법: PAN에 의한 족세포의 P-cadherin의 변화를 생체 외 배양실험을 통해 알아보고자 백서 사구체 상피세포(GEpC)를 배양하여 다양한 농도의 PAN을 투여하여 confocal 현미경을 통하여 P-cadherin의 분포를 관찰하였고, Western blotting 과 RT-PCR을 사용하여 P-cadherin 발현의 변화를 관찰하였다.

결과: 외곽세포질에 분포하는 P-cadherin은 단일세포 혹은 응집환경에서 PAN의 농도가 올라갈수록 내부로 응집되는 현상를 볼 수 있었다. Western 분석에서, P-cadherin 단백양은 PAN에 농도-의존적으로, 특히, 고농도인 50 mg/mL에서 24시간과 48시간이 노출 조건에서 각각 21.9% ($P<0.05$)와 31.9% ($P<0.01$)의 의미 있는 감소소견을 보였다. RT-PCR에서도 48시간에서 50 mg/mL PAN을 첨가한 조건에서 23.5%의 의미 있는 감소를 보였다($P<0.05$).

결론: PAN은 족세포에서 P-cadherin을 세포막으로부터 내부로의 응집을 유발하고, P-cadherin mRNA의 발현 감소와 단백수준에서 양의 감소를 초래함으로서, 단백뇨의 발생에 기여할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구자는 기술적 도움을 준 안은미, 최지영 연구원에게 감사를 표함.

References

1) Churg J, Habib R, White RH. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children. Lancet. 1970;760:1299-302.
2) Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. Lancet 2003;362:629-39.
3) Sinha A, Bagga A. Nephrotic syndrome. Indian J Pediatr 2012; 79:1045-55.
4) Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. Kidney Int 1975:8:219-32.
5) Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis: Evidence of formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. Lab Invest 1976:34:43-59.
6) Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. Am J Pathol 1987:126:220-29.
7) Caufield JP, Farquhar MG. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. Lab Invest 1978:39:505-10.
8) Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in aminonucleoside nephrosis: In vitro studies. Kidney Int 1994: 45:1057-69.
9) Marshall CB, Pippin JW, Krofft RD, Shankland SJ. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. Kidney Int 2006;70:1962-73.
10) Karnovsky MJ, Ainsworth SK: The structural basis of glomerular filtration. Adv Nephrol Necker Hosp 1972;2:35-60.
11) Remuzzi A, Remuzzi G: Glomerular perm-selective function. Kidney Int 1994;45:398-402.
12) Rodewald R, Karnovsky MJ: Porous substructure of the glomerular silt diaphragm in the rat and mouse. J Cell Biol 1974; 60:423-33.
13) Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular silt diaphragm is a modified adherens junction. J Am Soc Nephrol 2000;11:1-8 .
14) Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. J Am Soc Nephrol 2002;13:3005-15.
15) Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glo-

merular barrier and mechanisms of proteinuria. Physiol Rev 2008;88:451-87.

16) Ha TS. Roles of adaptor proteins in podocyte biology. World J Nephrol 2013:2:1-10.

17) Ha T-S, Park KB. Pathophysiology of proteinuria. Korean J Pediatr 2004;47(Suppl 4):877-85.

18) Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, et al. Cadherin cell adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. Cancer Res 1989; 49:2128-33.

19) Kreisberg JI, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. Kidney Int 1978;14:21-30.

20) Choi JY, Ahn EM, Park HY, Shin JI, Ha TS. The change of podocyte ß-catenin by puromycin aminonucleoside. J Korean Soc Pediatr Nephrol 2011;15:138-45.

21) Grunwald GB. The structural and functional analysis of cadherin calcium-dependent cell adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol 1993;5:797-805.

22) 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 1991;66:107-19.

23) Geiger B, Ayalon O. Cadherins. Annu Rev Cell Biol 1992;8: 307-32.

24) Goodwin M, Yap AS. Classical cadherin adhesion molecules: coordinating cell adhesion, signaling and the cytoskeleton J Mol Histol 2004;35:839-44.

25) Yaoita E, Sato N, Yoshida Y, Nameta M, Yamamoto T. Cadherin and catenin staining in podocytes in development and puromycin aminonucleoside nephrosis Nephrol Dial Transplant. 2002;17(Suppl 9):16-9.

26) Goto S, Yaoita E, Matsunami H, Kondo D, Yamamoto T, Kawasaki K, et al. Involvement of R-cadherin in the early stage of glomerulogenesis. J Am Soc Nephrol. 1998;9:1234-41.

27) Nakopoulou L, Lazaris ACh, Boletis IN, Michail S, Giannopoulou I, Zeis PM, et al. Evaluation of E-cadherin/catenin complex in primary and secondary glomerulonephritis. Am J Kidney Dis 2002;39:469-74.

28) Singh AK, Mo W, Dunea G, Arruda JA. Effect of glycated proteins on the matrix of glomerular epithelial cells. J Am Soc Nephrol 1998;9:802-10.

29) Bains R, Furness PN, Critchley DR. A quantitative immunofluorescence study of glomerular cell adhesion proteins in proteinuric states. J Pathol 1997;183:272-80.

30) Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestila M, et al. Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. Am J Pathol 2000;157:1905-16.

31) Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M, et al. Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. J Cell Biol 1997; 139:1025-32.

32) Xu ZG, Ryu DR, Yoo TH, Jung DS, Kim JJ, Kim HJ, et al. P-Cadherin is decreased in diabetic glomeruli and in glucose-stimulated podocytes in vivo and in vitro studies. Nephrol Dial Transplant 2005;20:524-31.

33) Ha TS, Koo HH, Lee HS, Yoon OJ. High glucose and advanced glycosylation endproducts (AGE) modulate the P-cadherin expression in glomerular epithelial cells (GEpC). J Korean Soc Pediatr Nephrol 2005;9:119-27.

34) Otero K, Martinez F, Beltran A, Gonzalez D, Herrera B, Quintero G, et al. Albumin-derived advanced glycation end-products trigger the disruption of the vascular endothelial cadherin complex in cultured human and murine endothelial cells. Biochem J 2001;359:567-74.

35) Luimula P, Sandström N, Novikov D, Holthöfer H. Podocyte-associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat. Lab Invest 2002;82:713-8.

36) Lee JH, Ha TS. Effects of puromycin aminonucleoside on the cytoskeletal changes of glomerular epithelial cells. Korean J Pediatr 2008;51:54-61.